

· 基础研究 ·

补肾活血方联合人脐带血间充质干细胞 修复小鼠膝关节软骨缺损的实验研究

岑芊瑶¹, 刘江源², 曾庆贺², 温经渊², 吴丛姿², 王旭², 吴震³, 金红婷², 陈佳丽²

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 浙江中医药大学骨伤研究所, 浙江 杭州 310053;

3. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012)

摘要 目的:探讨补肾活血方联合人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)修复小鼠膝关节软骨缺损的效果及作用机制。方法:将 24 只 10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组,每组 6 只。除对照组外,其余 3 组均用针头在小鼠股骨髁滑车关节面上造一个直径 0.45 mm、深 1 mm 的圆柱形缺损。分别于造模后第 1 周、第 2 周、第 3 周,向 hUCB-MSCs 组、补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节腔内注射 10 μ L 的 hUCB-MSCs 悬液(200 个细胞 $\cdot \mu$ L⁻¹),向对照组和模型组小鼠膝关节腔内注射 10 μ L 的生理盐水;各组小鼠均每周注射 1 次。造模后第 2 天,补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠给予补肾活血方浓缩液(20 μ L \cdot g⁻¹)灌胃,对照组、模型组和 hUCB-MSCs 组小鼠每天给予等量生理盐水灌胃;各组小鼠均每天灌胃 1 次,共 4 周。灌胃结束后第 2 天,脱颈处死各组小鼠,切取小鼠右侧膝关节,以 Micro-CT 观察小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构;以阿尔新蓝-苏木素染色观察膝关节软骨缺损区软骨退变情况,并采用国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)评分对关节软骨退变情况进行评估;采用免疫组织化学染色测定小鼠膝关节软骨缺损区软骨中 II 型胶原蛋白 α 1 链(collagen type II alpha 1 chain, Col2a1)和基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)的表达量。结果:①小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构观察结果。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区骨松质的骨密度均高于模型组(LSD- t = 18.425, P = 0.000; LSD- t = -10.186, P = 0.000; LSD- t = -7.487, P = 0.000),骨体积分数均高于模型组(LSD- t = 7.242, P = 0.002; LSD- t = -5.243, P = 0.006; LSD- t = -5.441, P = 0.006),骨小梁厚度均大于模型组(LSD- t = 7.575, P = 0.002; LSD- t = -10.005, P = 0.002; LSD- t = -5.409, P = 0.006),骨小梁数量均多于模型组(LSD- t = 9.166, P = 0.000; LSD- t = -10.014, P = 0.000; LSD- t = -9.147, P = 0.000),骨小梁分离度均小于模型组(LSD- t = -9.120, P = 0.000; LSD- t = 10.375, P = 0.000; LSD- t = 7.650, P = 0.002);hUCB-MSCs 组骨松质骨小梁数量少于对照组(LSD- t = 3.027, P = 0.039);其余各组之间两两比较,差异均无统计学意义。②小鼠膝关节软骨缺损区软骨退变情况观察结果。与对照组相比,模型组小鼠关节软骨退变明显;与模型组相比,hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠关节软骨退变较轻。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠 OARSI 评分均低于模型组(LSD- t = -11.762, P = 0.000; LSD- t = 10.947, P = 0.000; LSD- t = 14.779, P = 0.000),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组和对对照组小鼠 OARSI 评分均低于 hUCB-MSCs 组(LSD- t = -5.635, P = 0.005; LSD- t = -3.443, P = 0.026),对照组小鼠 OARSI 评分低于补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组(LSD- t = -5.914, P = 0.004)。③小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 和 MMP13 表达量测定结果。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 阳性表达面积均大于模型组(LSD- t = 9.863, P = 0.000; LSD- t = 45.990, P = 0.000; LSD- t = -17.406, P = 0.000),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 阳性表达面积大于 hUCB-MSCs 组(LSD- t = 3.623, P = 0.022),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组和 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 阳性表达面积与对照组的差异均无统计学意义(LSD- t = -1.643, P = 0.176; LSD- t = 0.533, P = 0.623)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组 MMP13 阳性细胞数占比均低于模型组(LSD- t = -14.299, P = 0.001; LSD- t = 9.688, P = 0.001; LSD- t = 15.638, P = 0.000),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组 MMP13 阳性细胞数占比低于 hUCB-MSCs 组和对对照组(LSD- t = -11.488, P = 0.007; LSD- t = 3.578, P = 0.023),hUCB-MSCs 组 MMP13 阳性细胞数占比高于对照组(LSD- t = -9.425, P = 0.000)。结论:补肾活血方联合 hUCB-MSCs 能明显改善小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构,修复软骨缺损,其作用机制可能与上调 Col2a1 的表达和抑制 MMP13 的表达有关。

关键词 膝关节;软骨;关节;小鼠;软骨缺损;间质干细胞;脐带血;补肾活血方;骨微结构;动物实验

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2023ZL037);浙江省基础公益研究计划项目(LGF20H270005)

通讯作者:陈佳丽 E-mail:chenjiali1585@163.com

Bushen Huoxue Fang (补肾活血方) combined with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against knee articular cartilage defects in mice: an experimental study

CEN Qianyao¹, LIU Jiangyuan², ZENG Qinghe², WEN Jingyuan², WU Congzi², WANG Xu², WU Zhen³, JIN Hongting², CHEN Jiali²

1. The Second Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. Institute of Traumatology and Orthopedics of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

3. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects and mechanism of Bushen Huoxue Fang (补肾活血方, BSHXF) combined with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs) in repairing knee articular cartilage defects in mice. **Methods:** Twenty-four 10-week-old female C57BL/6J mice were selected and randomized into control group, model group, hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group, 6 ones in each group. A cylindrical defect (0.45 mm in diameter and 1 mm in depth) was created on the articular surface of trochlea of femoral condyle with a needle in mice except for the ones in control group. At week 1, 2 and 3 after the modeling, the mice in hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group were intervened by knee intra-articular injection of hUCB-MSCs suspension (10 μ L, 200 cells/ μ L), while the ones in control group and model group with the same dose of normal saline. All mice were intervened once a week. On day 2 after the modeling, the mice in BSHXF combined with hUCB-MSCs group were intragastric administered with BSHXF concentrate in dosage of 20 μ L/g, while the ones in control group, model group, and hUCB-MSCs group with the same dose of normal saline. All mice were intervened once a day for consecutive 4 weeks. On day 2 after the end of intragastric administration, all mice were sacrificed by cervical dislocation and their right knees were harvested. The bone microstructure and cartilage degeneration in the knee articular cartilage defect zone were observed by using Micro-CT and alcian blue-hematoxylin (ABH) staining, respectively, and the knee articular cartilage degeneration was evaluated by using Osteoarthritis Research Society International (OARSI) score. Furthermore, the expression levels of collagen type II alpha 1 chain (Col2a1) and matrix metalloproteinase 13 (MMP13) in the cartilage of knee articular cartilage defect zone were detected by using immunohistochemical staining. **Results:** ①In the knee articular cartilage defect zone, the control group, hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group exhibited higher bone mineral density and bone volume fraction, thicker trabeculae, more trabeculae, and lower trabecular separation in cancellous bone compared with that of model group (LSD- t = 18.425, P = 0.000; LSD- t = -10.186, P = 0.000; LSD- t = -7.487, P = 0.000; LSD- t = 7.242, P = 0.002; LSD- t = -5.243, P = 0.006; LSD- t = -5.441, P = 0.006; LSD- t = 7.575, P = 0.002; LSD- t = -10.005, P = 0.002; LSD- t = -5.409, P = 0.006; LSD- t = 9.166, P = 0.000; LSD- t = -10.014, P = 0.000; LSD- t = -9.147, P = 0.000; LSD- t = -9.120, P = 0.000; LSD- t = 10.375, P = 0.000; LSD- t = 7.650, P = 0.002). The hUCB-MSCs group displayed less trabeculae compared to control group (LSD- t = 3.027, P = 0.039). Further pairwise comparison among other groups showed no statistical significance. ②Compared to control group, the knee articular cartilage degenerated more obviously in mice of model group; while, compared to model group, the mice in hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group exhibited slight knee articular cartilage degeneration. The OARSI score was lower in control group, hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group compared to model group (LSD- t = -11.762, P = 0.000; LSD- t = 10.947, P = 0.000; LSD- t = 14.779, P = 0.000), and was lower in BSHXF combined with hUCB-MSCs group and control group compared to hUCB-MSCs group (LSD- t = -5.635, P = 0.005; LSD- t = -3.443, P = 0.026), and was lowest in control group (LSD- t = -5.914, P = 0.004). ③The positive expression area of Col2a1 in cartilage of knee articular cartilage defect zone was larger in mice of control group, hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group compared to model group (LSD- t = 9.863, P = 0.000; LSD- t = 45.990, P = 0.000; LSD- t = -17.406, P = 0.000), and was larger in mice of BSHXF combined with hUCB-MSCs group compared to hUCB-MSCs group (LSD- t = 3.623, P = 0.022); while, the BSHXF combined with hUCB-MSCs group and hUCB-MSCs group didn't differ from control group in the positive expression area of Col2a1 in cartilage of knee articular cartilage defect zone in mice (LSD- t = -1.643, P = 0.176; LSD- t = 0.533, P = 0.623). The proportion of MMP13-positive cells was lower in control group, hUCB-MSCs group and BSHXF combined with hUCB-MSCs group compared to model group (LSD- t = -14.299, P = 0.001; LSD- t = 9.688, P = 0.001; LSD- t = 15.638, P = 0.000), and was lower in BSHXF combined with hUCB-MSCs group and control group compared to hUCB-MSCs group, and was lowest in BSHXF combined with hUCB-MSCs group (LSD- t = -11.488, P = 0.007; LSD- t = 3.578, P = 0.023; LSD- t = -9.425, P = 0.000). **Conclusion:** BSHXF combined with hUCB-MSCs can significantly improve the bone microstructure, and repair the cartilage defects in knee articular cartilage defect

zone of mice. It may exert the effects by up-regulating the expression of Col2a1 and inhibiting the expression of MMP13.

Keywords knee joint; cartilage, articular; mice; cartilage defects; mesenchymal stem cells; umbilical cord blood; Bushen Huoxue Fang; bone microstructure; animal experimentation

膝关节软骨附着于关节表面,发挥着润滑关节、吸收震荡、承受负荷的功能。膝关节软骨缺损会严重影响患者的日常生活和基本活动,其临床表现为关节疼痛、僵硬、肿胀等。据统计,全球 60 岁以上人群中,10% 的男性和 18% 的女性存在膝关节软骨缺损^[1]。尽管针对关节软骨缺损的修复已有大量研究,但至今仍未取得令人满意的成果。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类源自中胚层的多能干细胞^[2],具有强大的自我更新和分化为多种细胞谱系的能力^[3]。其中,人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)具有良好的成骨、成软骨诱导分化和集落刺激能力^[4]。随着干细胞研究的深入和临床应用技术的不断发展,hUCB-MSCs 将在软骨损伤修复领域发挥更加重要的作用。

研究已证实,中药复方对缺损软骨也具有修复作用^[5]。补肾活血方由右归饮化裁而来,临床上我们将其用于治疗膝关节软骨损伤,并取得了满意的疗效。我们团队前期研究已证明,补肾活血方可刺激 MSCs 的增殖和迁移并上调转化生长因子- β 的表达,从而促进软骨细胞外基质 II 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type II alpha 1 chain, Col2a1)的表达,进而加速软骨组织的修复与再生^[6-7]。为了探讨补肾活血方联合 hUCB-MSCs 修复膝关节软骨缺损的效果和可能的作用机制,我们进行了相关动物实验,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 24 只,体质量(20 ± 5)g,均由浙江中医药大学动物实验研究中心提供,动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。动物饲养及实验均在浙江中医药大学动物实验研究中心进行,实验方案经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查通过,伦理批号:IACUC-20220418-23。

1.2 实验试剂 hUCB-MSCs(杭州易文赛生物技术有限公司),4% 多聚甲醛(北京索莱宝公司)、14% 乙二胺四乙酸二钠(上海生工生物工程股份有限公司)、阿尔新蓝-苏木素(alcian blue-hematoxylin, ABH)(美国 Sigma 公司),Col2a1 单克隆抗体(英国 Abcam 公

司),兔抗鼠基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)单克隆抗体(英国 Abcam 公司),藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、荧光素别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)、PB450(苏州四正柏生物科技有限公司)。

1.3 实验仪器 XS-205DU 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),VIP 5-Jr 型组织脱水机(日本樱花公司),EC-350 型组织包埋机(德国美康),HM355S 型石蜡切片机(德国 Microm 公司),显微镜和显微拍摄系统(德国蔡司公司),SkyScan1176 型 Micro-CT(比利时 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 补肾活血方浓缩液制备 补肾活血方药物组成:熟地黄 9 g、杜仲 4 g、炮附子 6 g、枸杞子 9 g、山茱萸 6 g、红花 3 g、山药 6 g、甘草片 3 g、肉桂 6 g、桃仁 6 g。肉桂和桃仁加 10 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次,其余药物加 12 倍量水回流提取 3 次,最终将醇提物和水提物充分混合均匀,制成每毫升含 1.7 g 生药的浓缩液。

2.2 hUCB-MSCs 的表型鉴定 取传至第 4 代的 hUCB-MSCs,待细胞长至培养皿 80% ~ 90% 时进行鉴定。用 0.25% 胰蛋白酶室温下消化 1 ~ 2 min,900 \times g 离心 15 min,收集细胞沉淀,PBS 洗涤 3 次,制成 600 μ L 的细胞悬液。取 4 支流式管,先于每管加 100 μ L 细胞悬液,再分别向管中加入以 PE 标记鼠抗人 CD34、FITC 标记鼠抗人 CD45、APC 标记鼠抗人 CD90、PB450 标记鼠抗人 CD29 各表型抗体 20 μ L。避光孵育 15 min,PBS 洗涤 2 次后,用流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD34、CD45、CD90、CD29 的表达率。

2.3 分组与造模 将 24 只小鼠称重后按体质量排序编号,从随机数字表中选取 24 个连续的 2 位数记录在小鼠编号下方,再将 24 个随机数字从小到大排序,随机数字排序 1 ~ 6 对应的小鼠纳入对照组、7 ~ 12 对应的小鼠纳入模型组、13 ~ 18 对应的小鼠纳入 hUCB-MSCs 组、19 ~ 24 对应的小鼠纳入补肾活血方

联合 hUCB-MSCs 组。用氯胺酮溶液将小鼠麻醉后,仰卧于手术台上,以小鼠膝关节为中心备皮和局部消毒。沿小鼠髌骨内侧做纵形切口,钝性分离髌韧带周围软组织后,向外侧挤压髌骨使髌骨向外侧脱位。暴露膝关节面后,用 1 mL 注射器针头(型号 26G)在模型组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠股骨髌滑车关节面上造一个直径 0.45 mm、深 1 mm 的圆柱形缺损^[8]。用生理盐水冲洗切口后,复位髌骨,闭合关节腔,逐层缝合。对照组小鼠采用同样的手术方法,但在股骨髌滑车关节面不做任何处理。

2.4 药物干预 分别于造模后第 1 周、第 2 周、第 3 周,向 hUCB-MSCs 组、补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节腔内注射 10 μ L 的 hUCB-MSCs 溶液(200 个细胞 $\cdot \mu$ L⁻¹),向对照组和模型组小鼠膝关节腔内注射 10 μ L 的生理盐水;各组小鼠均每周注射 1 次。造模后第 2 天,补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠给予补肾活血方浓缩液(20 μ L \cdot g⁻¹)灌胃,对照组、模型组和 hUCB-MSCs 组小鼠每天给予等量生理盐水灌胃;各组小鼠均每天灌胃 1 次,共 4 周。小鼠灌胃给药量按照“人和动物间体表面积折算的等效剂量比值”^[9]进行计算。

2.5 实验指标观察

2.5.1 小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构观察 灌胃结束后第 2 天,脱颈处死各组小鼠,切取小鼠右侧膝关节。将膝关节标本用保鲜膜包好,置于 Micro-CT 载物台上,以股骨远端为中心选择感兴趣区域,对其中的骨松质进行二维扫描,获得重建图像后观察小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构,并用 CTAn1.10 软件定量分析骨松质的骨密度、骨体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度及骨小梁分离度。

2.5.2 小鼠膝关节软骨缺损区软骨退变情况观察 Micro-CT 检查结束后,将小鼠膝关节标本置于 4% 多聚甲醛中固定 3 d,14% 乙二胺四乙酸二钠脱钙 14 d,流水冲洗 24 h 后脱水,常规石蜡包埋、切片,切片厚度为 3 μ m。随机选取各组小鼠部分膝关节切片,进行 ABH 染色,在光学显微镜下观察并采集图像。采用 Image J 软件对染色图片进行处理后,采用国际骨关节炎研究学会(Osteoarthritis Research Society International, OARSI)评分^[10]评估关节软骨退变情况,OARSI 评分越高退变越严重。

2.5.3 小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 和 MMP13 表达量测定 随机选取各组小鼠部分膝关节切片,在柠檬酸钠溶液中修复 4 h,然后滴加相应一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天滴加同源二抗室温孵育 30 min,然后滴加 DAB 显影。最后,在显微镜下观察并采集图像。采用 Image J 软件对图像进行分析,测定 Col2a1 阳性表达面积和 MMP-13 阳性细胞占比(阳性细胞数占细胞总数的百分比)。

2.6 数据统计 采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,对照组、模型组、hUCB-MSCs 组及补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组骨松质的骨密度、骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨小梁分离度、Col2a1 阳性表达面积、MMP13 阳性细胞数占比的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 hUCB-MSCs 表型鉴定结果 流式细胞仪检测传代 hUCB-MSCs 中 CD45 阳性细胞比率为 99.92%,CD34 阳性细胞比率为 99.96%,CD90 的阳性细胞比率为 98.85%,CD29 的阳性细胞比率为 98.06%(图 1)。

3.2 小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构观察结果 实验过程中模型组和 hUCB-MSCs 组各有 1 只小鼠死亡;此外,有 6 只小鼠的数据明显异于其他小鼠,其中对照组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组各有 2 只、模型组和 hUCB-MSCs 组各有 1 只小鼠,数据统计时均予以剔除。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区的骨松质骨密度均高于模型组(LSD-*t* = 18.425, $P=0.000$; LSD-*t* = -10.186, $P=0.000$; LSD-*t* = -7.487, $P=0.000$);其余各组小鼠膝关节软骨缺损区骨松质骨密度比较,差异均无统计学意义(LSD-*t* = -1.336, $P=0.253$; LSD-*t* = -0.478, $P=0.653$; LSD-*t* = 0.544, $P=0.610$)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区的骨松质骨体积分数均高于模型组(LSD-*t* = 7.242, $P=0.002$; LSD-*t* = -5.243, $P=0.006$; LSD-*t* = -5.441, $P=0.006$);其余各组小鼠骨松质骨体积分数比较,差异均无统计学意义(LSD-*t* = 1.410, $P=0.231$; LSD-*t* = 1.600, $P=0.185$; LSD-*t* = 0.010, $P=0.993$)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠骨松质骨小梁厚度大于模型组(LSD-*t* = 7.575,

$P = 0.002$; $LSD-t = -10.005$, $P = 0.002$; $LSD-t = -5.409$, $P = 0.006$); 其余各组小鼠骨松质骨小梁厚度比较, 差异均无统计学意义 ($LSD-t = -1.847$, $P = 0.139$; $LSD-t = -0.222$, $P = 0.835$; $LSD-t = 1.124$, $P = 0.324$)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠骨松质骨小梁数量多于模型组 ($LSD-t = 9.166$, $P = 0.000$; $LSD-t = -10.014$, $P = 0.000$; $LSD-t = -9.147$, $P = 0.000$), hUCB-MSCs 组骨松质骨小梁数量少于对照组 ($LSD-t = 3.027$, $P =$

0.039), 其余各组小鼠骨松质骨小梁数量的差异均无统计学意义 ($LSD-t = 2.301$, $P = 0.083$; $LSD-t = -0.752$, $P = 0.494$)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠骨松质骨小梁分离度小于模型组 ($LSD-t = -9.120$, $P = 0.000$; $LSD-t = 10.375$, $P = 0.000$; $LSD-t = 7.650$, $P = 0.002$); 其余各组小鼠骨松质骨小梁分离度比较, 差异均无统计学意义 ($LSD-t = -0.905$, $P = 0.417$; $LSD-t = -0.526$, $P = 0.627$; $LSD-t = 0.202$, $P = 0.850$)。见图 2、表 1。

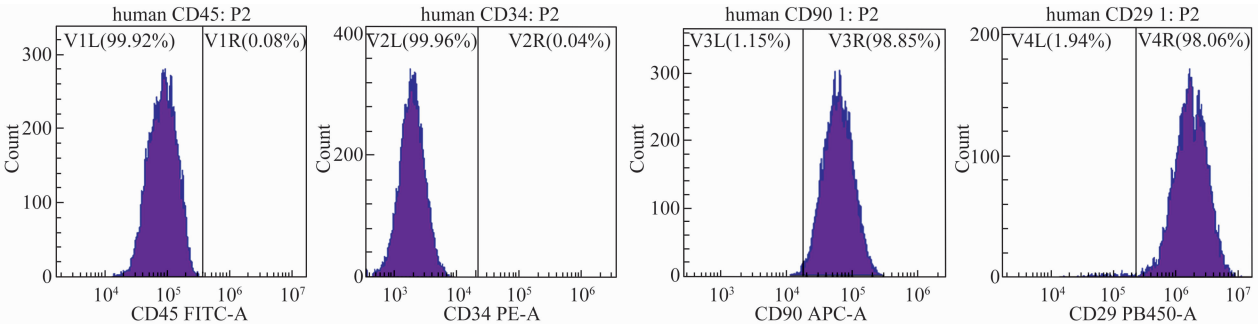


图 1 人脐带血间充质干细胞表型鉴定结果

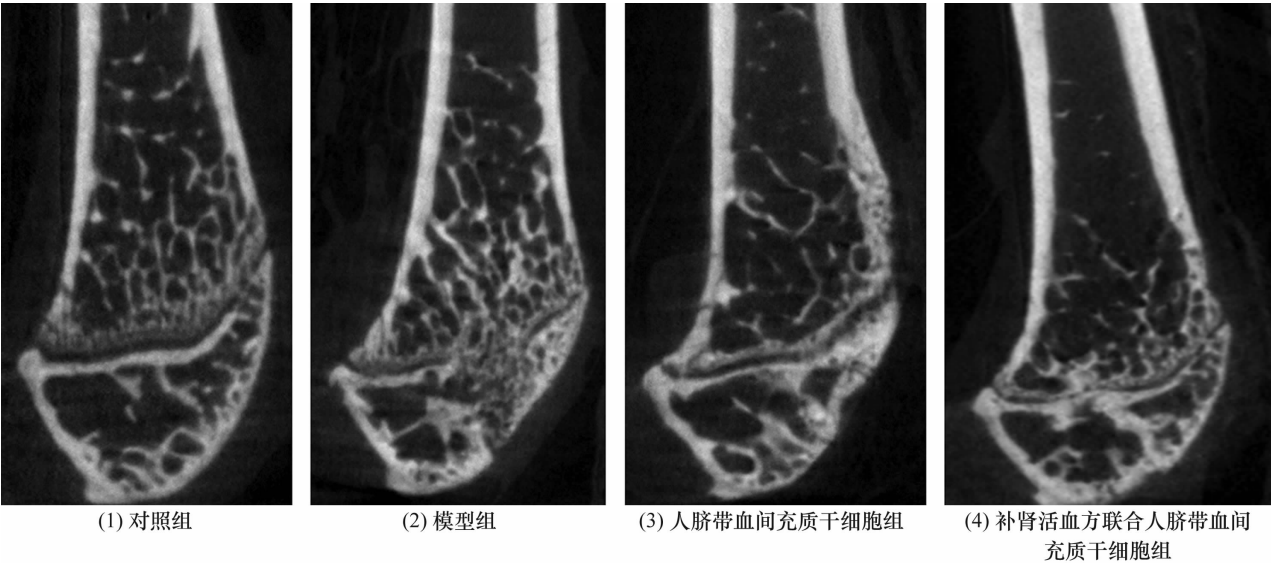


图 2 药物干预后小鼠膝关节软骨缺损区 Micro-CT 图像

表 1 药物干预后小鼠膝关节软骨缺损区骨松质骨微结构参数

组别	样本量/ 只	骨密度/ ($\bar{x} \pm s, g \cdot cm^{-3}$)	骨体积分数/ ($\bar{x} \pm s, \%$)	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s, mm$)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s, 个 \cdot mm^{-1}$)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s, mm$)
对照组	4	0.455 ± 0.021	68.807 ± 1.211	0.104 ± 0.008	6.861 ± 0.351	0.103 ± 0.006
模型组	4	0.212 ± 0.010	44.227 ± 5.753	0.061 ± 0.006	4.679 ± 0.216	0.145 ± 0.005
hUCB-MSCs ¹⁾ 组	4	0.495 ± 0.047	65.414 ± 3.987	0.116 ± 0.008	6.194 ± 0.149	0.107 ± 0.004
补肾活血方联合 hUCB-MSCs ¹⁾ 组	4	0.473 ± 0.058	65.385 ± 3.502	0.106 ± 0.013	6.309 ± 0.221	0.106 ± 0.008
F 值		41.600	24.297	21.377	43.464	37.275
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)人脐带血间充质干细胞。

3.3 小鼠膝关节软骨缺损区软骨退变情况观察结果

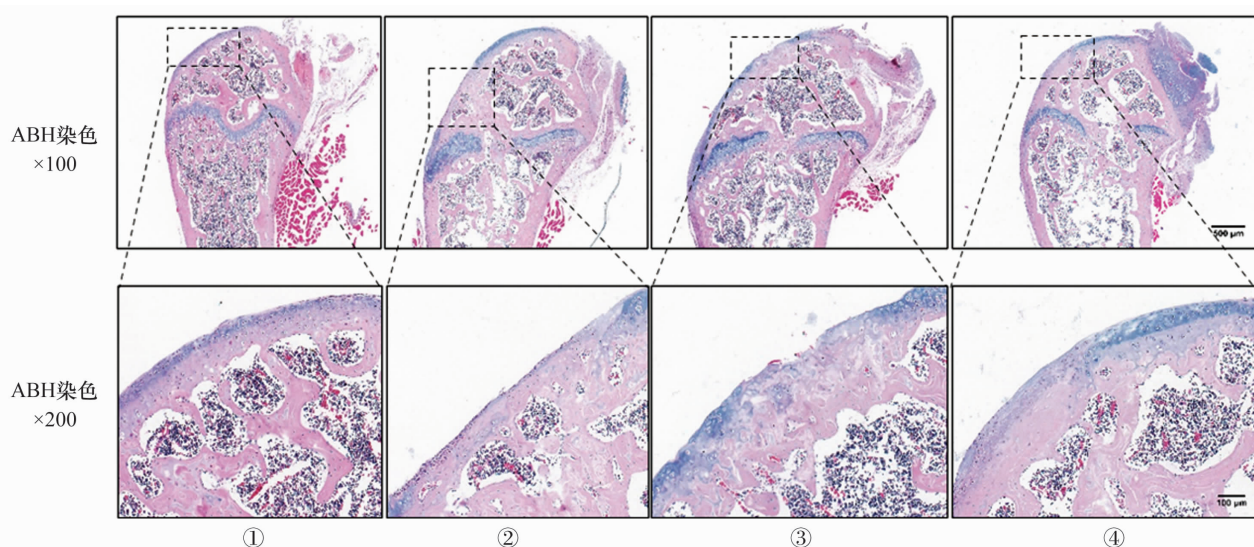
实验过程中模型组和 hUCB-MSCs 组各有 1 只小鼠死亡;对照组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组各有 1 只小鼠的数据明显异于其他小鼠,数据统计时均予以剔除。对照组小鼠膝关节软骨基质呈深蓝色,模型组小鼠膝关节软骨基质呈浅蓝色,hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨基质颜色较模型组深,颜色越浅退变越严重(图 3)。各组小鼠 OARSI 评分的差异有统计学意义[(0.387 ± 0.541)分,(4.672 ± 0.325)分,(2.330 ± 0.178)分,(1.517 ± 0.176)分, $F = 85.781, P = 0.000$],对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠 OARSI 评分低于模型组(LSD- $t = -11.762, P = 0.000$;LSD- $t = 10.947, P = 0.000$;LSD- $t = 14.779, P = 0.000$),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组和对照组小鼠 OARSI 评分均低于 hUCB-MSCs 组(LSD- $t = -5.635, P = 0.005$;LSD- $t = -3.443, P = 0.026$),对照组小鼠 OARSI 评分低于补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组(LSD- $t = -5.914, P = 0.004$)。

3.4 小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 和 MMP13 表达量测定结果

药物干预后 Col2a1 免疫组化结果显示:对照组小鼠软骨基质 Col2a1 阳性表达区颜色深且范围大;模型组小鼠软骨基质 Col2a1 阳性表达区颜色浅且范围小;与模型组相比,hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠软骨基质 Col2a1

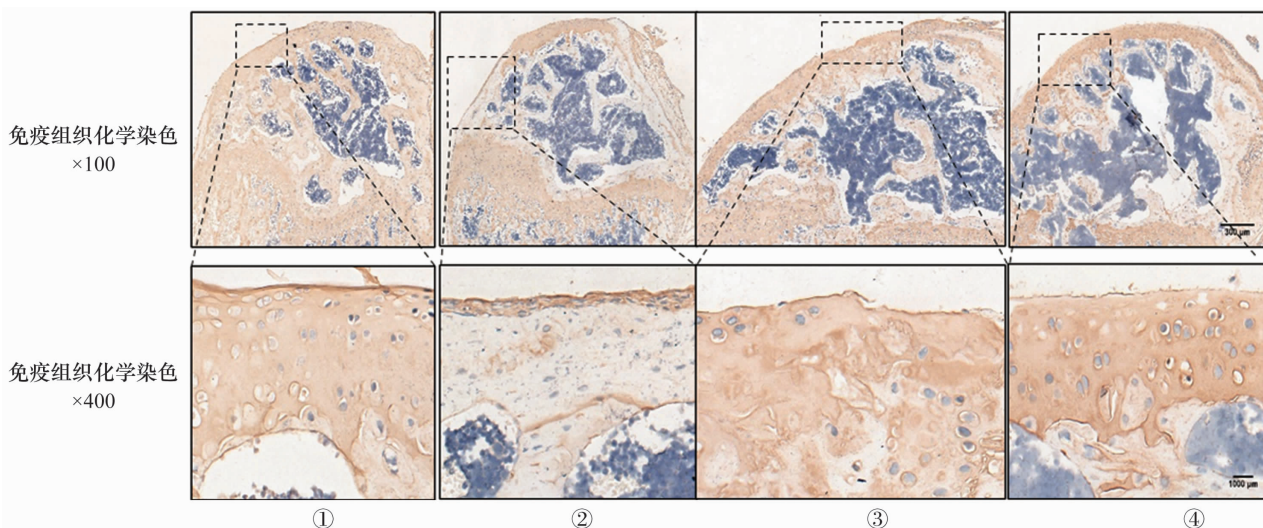
阳性表达区颜色明显变深、范围明显变大(图 4)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 阳性表达面积均大于模型组(LSD- $t = 9.863, P = 0.000$;LSD- $t = 45.990, P = 0.000$;LSD- $t = -17.406, P = 0.000$),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 阳性表达面积大于 hUCB-MSCs 组(LSD- $t = 3.623, P = 0.022$),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组和 hUCB-MSCs 组小鼠膝关节软骨缺损区软骨 Col2a1 阳性表达面积与对照组的差异均无统计学意义(LSD- $t = -1.643, P = 0.176$;LSD- $t = 0.533, P = 0.623$),见表 2。

药物干预后 MMP13 免疫组化结果显示:模型组小鼠 MMP13 阳性细胞呈棕色,且数量较多;与模型组相比,对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠 MMP13 阳性细胞数明显减少(图 5)。对照组、hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组 MMP13 阳性细胞数占比均低于模型组(LSD- $t = -14.299, P = 0.001$;LSD- $t = 9.688, P = 0.001$;LSD- $t = 15.638, P = 0.000$),补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组 MMP13 阳性细胞数占比低于 hUCB-MSCs 组和对照组(LSD- $t = -11.488, P = 0.007$;LSD- $t = 3.578, P = 0.023$),hUCB-MSCs 组 MMP13 阳性细胞数占比高于对照组(LSD- $t = -9.425, P = 0.000$),见表 2。



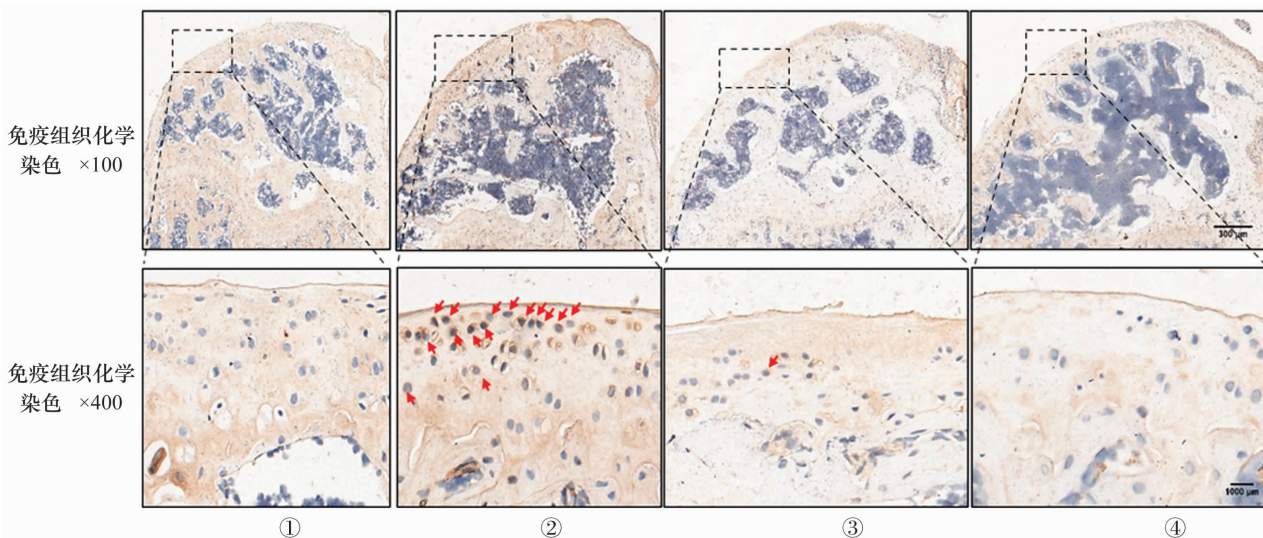
ABH 为阿尔新蓝-苏木素,①为对照组,②为模型组,③为人脐带血间充质干细胞组,④为补肾活血方联合人脐带血间充质干细胞组。

图 3 药物干预后小鼠膝关节软骨缺损区软骨组织阿尔新蓝-苏木素染色结果



①为对照组,②为模型组,③为人脐带血间充质干细胞组,④为补肾活血方联合人脐带血间充质干细胞组。

图 4 药物干预后小鼠关节软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链表达的免疫组织化学检测结果



①为对照组,②为模型组,③为人脐带血间充质干细胞组,④为补肾活血方联合人脐带血间充质干细胞组,红色箭头指基质金属蛋白酶 13 阳性细胞。

图 5 药物干预后小鼠关节软骨组织中基质金属蛋白酶 13 表达的免疫组织化学检测结果

表 2 药物干预后小鼠关节软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链阳性表达面积和基质金属蛋白酶 13 阳性细胞数占比

组别	样本量/只	Col2a1 ²⁾ 阳性表达面积/ ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)	MMP13 ³⁾ 阳性细胞数占比/ ($\bar{x} \pm s, \%$)
对照组	5	42.904 \pm 5.269	19.334 \pm 1.411
模型组	5	12.715 \pm 0.584	50.705 \pm 3.529
hUCB-MSCs ¹⁾ 组	5	41.261 \pm 0.902	29.707 \pm 1.282
补肾活血方联合 hUCB-MSCs ¹⁾ 组	5	48.936 \pm 3.557	14.397 \pm 1.929
F 值		75.444	157.005
P 值		0.000	0.000

注:1)人脐带血间充质干细胞;2)Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链;3)基质金属蛋白酶 13。

4 讨 论

膝关节软骨无神经、淋巴分布,也没有直接的血液供应。它的营养主要来源于周围关节滑液的滋润

以及软骨下骨少量的血液供应。因此,膝关节软骨损伤后很难自身修复^[11-12],这严重影响了患者的正常生活。膝关节软骨缺损较为常见,可单独发生,也可

与前交叉韧带和半月板损伤同时发生^[13]。软骨缺损可能是骨关节炎的早期表现,也可能是骨关节炎发展的一个重要因素^[14]。在本研究中,我们发现软骨缺损小鼠的骨松质骨密度、骨体积分数、骨小梁数量明显下降,骨小梁厚度和骨小梁分离度显著增加。这提示软骨的破坏可能会加速骨质破坏,从而为骨关节炎的发展埋下隐患。目前,根据软骨退变程度,临床上治疗软骨损伤的常见方法可分为三类:姑息治疗、修复治疗和再生治疗^[15]。尽管这些方法在治疗软骨损伤方面取得了一定的疗效,但都无法达到完全根治的效果。因此,寻找更好的治疗软骨损伤的方法对于提高患者生存质量具有重要意义。

近年来,干细胞治疗为软骨损伤的修复提供了一种具有前景的治疗策略,但治疗的关键在于确保干细胞能够正常分化或被诱导分化^[16]。MSCs 是一类早期未分化细胞,具有自我复制、自我更新、无限增殖及多向分化潜能等特点^[17]。它们可以通过分泌细胞因子、促进内源性组织器官的干祖细胞增殖及进行免疫调节等方式,作为种子细胞来实现组织器官的修复。在退行性骨关节炎中,MSCs 被视为是治疗软骨缺损的潜在细胞来源^[18]。其治疗作用方式通常有 2 种:一是直接从 MSCs 分化为软骨细胞,二是优化关节内环境^[19]。这也为我们利用 MSCs 治疗软骨缺损提供了一定的思路。MSCs 可来源于骨髓、脐带、滑液、滑膜、脂肪、皮肤等多种组织,对组织修复与再生有强大的作用^[20]。其中,胎盘和脐带是同种异体 MSCs 的主要来源,这些来源的 MSCs 也已成为目前较容易获得的 MSCs^[21]。然而,关于 hUCB-MSCs 机制的研究还相对较少。Wang 等^[22]的研究表明,与来源于骨髓的 MSCs 相比,hUCB-MSCs 具有相似的形态学表型特征,包括各种表型标志物的表达、免疫原性、体外免疫调节效力和多谱系分化能力,但 hUCB-MSCs 具有更高的克隆原性、增殖和迁移潜力,并能明显促进相关软骨生成因子的分泌。此外,也有研究^[23]证明,hUCB-MSCs 相比于来源于骨髓的 MSCs 更有利于修复软骨缺损。

“髓”作为奇恒之腑的重要组成部分,在骨伤疾病的发生和发展过程中起着关键作用。骨病的一个重要环节就是骨枯髓萎。髓内营养系统是骨的重要营养来源。若骨骼失去髓的滋养,则骨骼脆弱无力。补肾活血方由《景岳全书》中的补肾经方右归饮化裁而

来,具有补肾活血、壮筋止痛之功效。临床上采用该方治疗骨关节炎,能缓解患者临床症状和改善关节功能。目前已有相关研究报道,补肾活血方能通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,降低 Wnt2、 β -catenin、糖原合成激酶-3 β 的表达量,从而抑制软骨细胞凋亡,促进软骨细胞的增殖和胶原蛋白的合成,进而保护关节软骨^[24]。同时,补肾活血方还能通过抑制肿瘤坏死因子- α 、MMP3、白细胞介素-6 的表达,控制炎症反应,调控关节软骨细胞外基质降解,从而延缓软骨损伤进程^[25]。

硫酸化糖胺聚糖主要包括硫酸软骨素、硫酸乙酰肝素和硫酸角质素等,它们在软骨细胞外基质中起着重要的生物学作用,如维持软骨结构、保护软骨细胞、调节细胞信号传导等。在软骨退变过程中,硫酸化糖胺聚糖的表达会发生改变。一般来说,随着软骨退变程度的加重,硫酸化糖胺聚糖的表达量会降低,这可能导致软骨细胞外基质的降解、软骨组织结构的破坏以及软骨细胞的损伤。通过检测硫酸化糖胺聚糖的表达水平,可以间接评估软骨的退变程度。因此,在本研究中,我们采用 ABH 染色检测软骨基质中硫酸化糖胺聚糖的表达,以评估软骨的退变程度。图 3 中的蓝色指示硫酸化糖胺聚糖,蓝色越浅,硫酸化糖胺聚糖的表达量越低,软骨退变越严重。与对照组相比,模型组小鼠关节软骨退变明显;与模型组相比,hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组小鼠关节软骨退变较轻。

Col2a1 是软骨细胞外基质的主要组成部分,其降解是导致关节内软骨损伤的主要原因^[26]。MMP13 是 MMPs 家族的一员,它可以引起软骨中的 Col2a1 和蛋白聚糖的降解,其表达水平升高与软骨退变有关^[27]。在本研究中,我们采用免疫组织化学染色检测小鼠膝关节软骨缺损区软骨中 Col2a1 和 MMP13 的表达量。图 4 中的棕色表示 Col2a1 的阳性表达,面积越大表达量越高。本研究结果显示:与模型组相比,hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组的小鼠软骨基质 Col2a1 阳性表达显著上调,说明这 2 组小鼠的软骨基质合成代谢水平得到恢复。此外,相较于 hUCB-MSCs 组,补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组软骨基质的 Col2a1 阳性表达水平更高。图 5 中的蓝色表示细胞核,棕色表示 MMP13 阳性表达;棕色细胞数目越多其表达量越高。本研究结果显示:与对照组相

比,模型组小鼠软骨基质中 MMP13 表达水平显著提高;与模型组相比,hUCB-MSCs 组和补肾活血方联合 hUCB-MSCs 组中 MMP13 表达水平均显著降低,说明这 2 组小鼠的软骨基质分解代谢水平明显降低。

本研究结果显示,补肾活血汤联合 hUCB-MSCs 能明显改善小鼠膝关节软骨缺损区骨微结构,修复软骨缺损,其作用机制可能与上调 Col2a1 的表达和抑制 MMP13 的表达有关。

参考文献

- [1] PEREIRA D, RAMOS E, BRANCO J. Osteoarthritis [J]. Acta Med Port, 2015, 28(1): 99 – 106.
- [2] WANG P, ZHANG S, MENG Q, et al. Treatment and application of stem cells from different sources for cartilage injury: a literature review [J]. Ann Transl Med, 2022, 10(10): 610.
- [3] FANG W, SUN Z, CHEN X, et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells for knee arthritis and cartilage defects: a review of the literature [J]. J Knee Surg, 2021, 34(13): 1476 – 1485.
- [4] KUANG M J, HUANG Y, ZHAO X G, et al. Exosomes derived from Wharton's jelly of human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce osteocyte apoptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats via the miR-21-PTEN-AKT signalling pathway [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(9): 1861 – 1871.
- [5] 陈祁青, 金红婷, 应俊, 等. 右归饮含药血清对骨髓间充质干细胞成软骨分化的促进作用及其 microRNA 表达谱分析 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1380 – 1386.
- [6] HU S, GE Q, XIA C, et al. Bushenhuoxue formula accelerates fracture healing via upregulation of TGF- β /Smad2 signaling in mesenchymal progenitor cells [J]. Phytomedicine, 2020, 76: 153256.
- [7] XIA P, WANG X, QU Y, et al. TGF- β 1-induced chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells is promoted by low-intensity pulsed ultrasound through the integrin-mTOR signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 281.
- [8] GAO L, GOEBEL L K H, ORTH P, et al. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research [J]. Dis Model Mech, 2018, 11(6): 34280.
- [9] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7(2): 27 – 31.
- [10] GLASSON S S, CHAMBERS M G, VAN DEN BERG W B, et al. The OARSI histopathology initiative recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18 Suppl 3: S17 – 23.
- [11] VAISH A, SHANMUGASUNDARAM S, KIM S A, et al. Biological reconstruction of the joint: concepts of articular cartilage regeneration and their scientific basis [J]. J Clin Orthop Trauma, 2022, 24: 101718.
- [12] GUO X, XI L, YU M, et al. Regeneration of articular cartilage defects: therapeutic strategies and perspectives [J]. J Tissue Eng, 2023, 14: 20417314231164765.
- [13] NECKAR P, POTOCKOVA H, BRANIS J, et al. Treatment of knee cartilage by cultured stem cells and three dimensional scaffold: a phase I/IIa clinical trial [J]. Int Orthop, 2023, 47(10): 2375 – 2382.
- [14] KATZ J N, ARANT K R, LOESER R F. Diagnosis and treatment of hip and knee osteoarthritis: a review [J]. JAMA, 2021, 325(6): 568 – 578.
- [15] WEI W, DAI H. Articular cartilage and osteochondral tissue engineering techniques: recent advances and challenges [J]. Bioact Mater, 2021, 6(12): 4830 – 4855.
- [16] 吴悄. 诱导骨髓间充质干细胞定向分化成软骨细胞和成骨细胞的影响因素 [J]. 福建轻纺, 2022(11): 11 – 14.
- [17] 王莹, 李丽丽. 骨髓间充质干细胞外泌体在治疗心衰中的作用 [J]. 心血管康复医学杂志, 2023, 32(2): 218 – 220.
- [18] ANGELE P, DOCHEVA D, PATTAPPA G, et al. Cell-based treatment options facilitate regeneration of cartilage, ligaments and meniscus in demanding conditions of the knee by a whole joint approach [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2022, 30(4): 1138 – 1150.
- [19] JAYARAM P, IKPEAMA U, ROTHENBERG J B, et al. Bone marrow-derived and adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in primary knee osteoarthritis: a narrative review [J]. PM R, 2019, 11(2): 177 – 191.
- [20] KANGARI P, TALAEI-KHOZANI T, RAZEGHIAN-JAHROMI I, et al. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 492.
- [21] SOLTANI S K, FOROGH B, AHMADBEIGI N, et al. Safety and efficacy of allogenic placental mesenchymal stem cells for treating knee osteoarthritis: a pilot study [J]. Cytotherapy, 2019, 21(1): 54 – 63.
- [22] WANG M, YANG Y, YANG D, et al. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. Immunology, 2009, 126(2): 220 – 232.

(下转第 24 页)

- 32(9):802-806.
- [9] 刘迪,刘卉,陶艳红,等. 颈部端提手法操作特征的动力学与运动学参数分析[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(12):19-22.
- [10] MOUSAVI S J, TROMP R, SWANN M C, et al. Between-session reliability of opto-electronic motion capture in measuring sagittal posture and 3-D ranges of motion of the thoracolumbar spine[J]. J Biomech, 2018, 79:248-252.
- [11] IN T S, JUNG J H, JUNG K S, et al. Effects of the multidimensional treatment on pain, disability, and sitting posture in patients with low back pain: a randomized controlled trial[J/OL]. Pain Res Manag, 2021 [2023-07-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34306274>.
- [12] 苏少亭. 腰椎定点旋转手法的在体运动力学量化研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2019.
- [13] 薛彬,李飞跃,王玮,等. 魏氏伤科“悬足压膝”手法的运动学规律和机制研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(10):5-8.
- [14] 王成远,金添,孙树椿,等. 清宫正骨流派传承对中医骨伤学科发展的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(1):81-83.
- [15] 王尚全,孙树椿,陈明,等. 清宫正骨流派学术思想初探[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(9):68-70.
- [16] 张怡颖. 基于 IMU 的人体全身运动捕捉技术与装置研究[D]. 杭州:浙江大学, 2018.
- [17] 孙树椿. 清宫正骨手法图谱[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:109-110.
- [18] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Height and body-mass index trajectories of school-aged children and adolescents from 1985 to 2019 in 200 countries and territories: a pooled analysis of 2181 population-based studies with 65 million participants[J]. Lancet, 2020, 396(10261):1511-1524.
- [19] 李建国,高春雨,高景华,等. 基于运动捕捉系统构建摆拨截手法治疗踝关节扭伤动画仿真模型的研究[J]. 中国数字医学, 2021, 16(8):93-97.
- [20] 林东鑫,黄学成,秦庆广,等. 基于运动捕捉技术比较 2 种颈椎手法治疗后颈椎活动范围的差异[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(21):3281-3285.
- [21] 刘元华,冯跃,李庆兵,等. 基于三维运动捕捉技术的踝跗法运动学参数特征研究[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(3):235-241.
- [22] HUANG X, LIN D, LIANG Z, et al. Mechanical parameters and trajectory of two Chinese cervical manipulations compared by a motion capture system[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9:714292.
- [23] SÁNCHEZ-ZURIAGA D, LÓPEZ-PASCUAL J, GARRIDO-JAÉN D, et al. Reliability and validity of a new objective tool for low back pain functional assessment[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(16):1279-1288.

(收稿日期:2023-08-03 本文编辑:李晓乐)

(上接第 13 页)

- [23] PERRY J, ROELOFS A J, MENNAN C, et al. Human mesenchymal stromal cells enhance cartilage healing in a murine joint surface injury model[J]. Cells, 2021, 10(8):1999.
- [24] 梁祖建. 补肾活血方调控 Wnt/ β -catenin 信号通路保护关节软骨的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12):2327-2330.
- [25] 孙东东,沈卫星,王卓,等. 补肾活血方中 4 种有效成分对炎性因子释放抑制活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8):2674-2677.
- [26] 郑力铭,马佳凯,王威,等. 关节软骨退变相关生物学标志物研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(3):78-84.
- [27] YAO X, SUN K, YU S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis[J]. J Orthop Translat, 2020, 27:33-43.

(收稿日期:2023-09-07 本文编辑:时红磊)

(上接第 19 页)

- [22] KIM H A, CHO M L, CHOI H Y, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(7):2152-2163.
- [23] ZHAO Z, DAI X S, WANG Z Y, et al. MicroRNA-26a reduces synovial inflammation and cartilage injury in osteoarthritis of knee joints through impairing the NF- κ B signaling pathway[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4):BSR20182025.
- [24] 曹寅生,邝高艳,危建文,等. 加味独活寄生合剂对兔膝骨关节炎模型软骨 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(7):1273-1277.
- [25] 曹寅生,易强,邝高艳,等. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨追风透骨胶囊减缓兔膝关节关节炎模型软骨退变的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2):240-248.
- [26] CHOI M C, MARUYAMA T, CHUN C H, et al. Alleviation of murine osteoarthritis by cartilage-specific deletion of IkB ζ [J]. Arthritis Rheumatol, 2018, 70(9):1440-1449.

(收稿日期:2023-08-27 本文编辑:吕宁)