

干细胞疗法及组织工程在血友病关节炎治疗中的研究进展

徐菊菊¹ 闫振宇^{1,2*}

(1.华北理工大学; 2. 华北理工大学附属医院)

摘要: 血友病关节炎(HA)是血友病最常见的并发症之一,临床和亚临床状态频发出现关节出血,最终会导致不可逆转的损伤,是一种致残性疾病。现阶段最主要的医学手段是控制出血和手术治疗,这两种方式可短暂减轻关节炎的症状,但无法延缓病情进展。近年来,干细胞再生疗法已成为治疗血友病关节炎新疗法的核心,以骨髓间充质干细胞(MSC)尤为显著,为患者提供了高质量生活的希望。这篇综述主要以骨髓间充质干细胞疗法及组织工程技术治疗血友病关节炎2个方面进行表述。

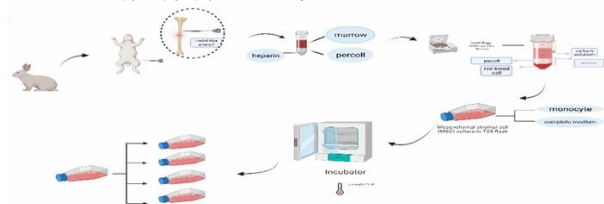
关键词: 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 细胞治疗; 关节炎; 血友病; 细胞支架; 组织工程;

血友病(hemophilia)是由X连锁隐性遗传性凝血因子单基因突变所引起的少见血液系统疾病^[1],而按照欠缺的不同凝血因子,可分为血友病A(FVIII缺乏症)和血友病B(FIX缺乏症)。大多数血友病患者(people with hemophilia, PWH)是关节囊内不断多次出血所引起的膝关节滑膜炎、血液滞留导致的,这也是血友病最常见的骨关节炎并发症,主要发生的部位是膝关节、踝关节和肘关节^[2]。近年来,随着医学科技的螺旋渐进式发展,已开发出不同类型的先进疗法,这类疗法将是治愈性的,如基因疗法、细胞疗法和组织工程,以及最新的诱导多能干细胞(iPSC)技术,可能会为血友病患者提供无数的临床应用。各种治疗方法都有各自的优缺点,比如替代疗法的劣势是价格昂贵,容易引起感染和血栓的形成,此外,非常容易导致抗体的产生或移植体细胞活力的缺失,使得FVIII的短期表达治疗。而细胞疗法多集中在干细胞上,干细胞具有自身可用性、多能分化、旁分泌营养作用、免疫原性、非致瘤性和安全性,尤其突出的是可以分化形成软骨细胞、成骨细胞、神经细胞等,此外还能够修复软骨及组织,还具备取材便捷、易于培养的优势。目前已有大量研究表明,干细胞疗法和组织工程在骨科疾病的治疗领域上获得了广泛的关注及应用。

1. 骨髓间充质干细胞的概述

干细胞疗法最重要是选择合适的靶细胞,同时较容易收获及强大的细胞加工潜力,可将外源基因成功导入和保持稳定持续的表达,寿命时间长或有自我更新能力等特点。当然,除了软骨生产的潜能,干细胞还是软骨修复的理想替代来源。其次,还具有显著的旁分泌活性,其中生长因子和细胞因子通过反馈回路中的血管生成和直接软骨细胞增值来滋养软骨。目前用于治疗HA研究最多的是间充质干细胞,它已成为血友病性关节炎治疗的主流,以骨髓间充质干细胞较为常见。有较多动物实验表明骨髓间充质干细胞的提取方法简单,以提取兔骨髓间充质干细胞为例,主要分为全骨髓贴壁方法以及密度梯度离心方法,二者之间以后者方法可以获得较为纯净的单核细胞,通过培养最终可获得骨髓间充质干细胞(MSC),具体操作方法可见图1^[8]。几十年来,弗里登斯坦在对骨髓微环境开拓性探索的前提下,融合世界各地不一样实验室研究成果,表明骨髓间充质干细胞进入体内和身体之外具有广泛分化发展前景,比如,可分化为骨骼细胞、软骨体细胞、人脂肪组织等中胚的来源细胞。MSC关节腔内移植法在骨关节炎等疾病的治疗中已被证明具有修复软骨,虽然减缓疾病进展^[3],但是目前尚无MSC关节腔移植医治HA的医学报导。依据动物实验研究表明,MSC关节腔移植能有效减少关节腔内出血、促进骨与软骨修复、延缓关节炎病情进展,可有效治疗HA^[9]。

图1: 密度梯度离心法提取兔MSC示意图



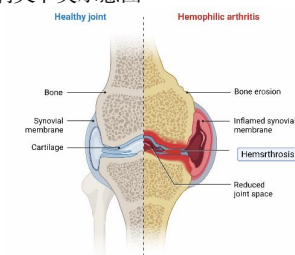
2. 基于MSC的细胞疗法

对于出现关节病变的HA,基因疗法可以提高患者的凝血水平,但是凝血因子FVIII或FIX表达时间持续性有限,相比之下,干细胞进行基因修饰或递送FVIII或FIX是最持久的方法。特发性骨关节炎(OA)是一种伤残性疾病,还没有任何手术可以阻止骨关节炎的进展性退化,血友病性关节炎(HA)是另一种类型的关节退行性变,OA和HA之间具有相似性。关于HA,目前为止只有极少数相关动物实验数据报道,这些报道表明关节腔内注射MSC似

乎有效,移植的间充质干细胞成功植入到受伤的软骨并促进其再生和修复,可减轻OA和HA患者的疼痛,可以在轻微关节软骨损伤中迅速产生积极结果,与没处理的关节相比,MSC治疗的关节表现出弥漫性细胞增多、更多的钙化和更少的骨侵蚀,但技术有局限性,缺损处填充了由多能性骨髓间充质干细胞分化而来的纤维软骨,这导致成分不一致,生物力学性能低于天然软骨。通过人类不断进行科学技术的提高,MSC在许多不同的临床应用已被证明是安全的,并且在许多正在进行的试验中从未被报道导致人类恶性肿瘤。

血友病性关节炎发展主要分为三个阶段:(1)急性血红色增多症;(2)慢性滑膜炎;(3)退行性关节炎;简言之,血液反复外渗到关节腔,主要表现为滑膜增生、血管增加、含铁血黄素沉积和软骨破坏(图2)^[3-4]。Hooiveld等研究发现:在血液的刺激下,单核细胞/细胞巨噬细胞合成分泌的IL-1 β 促使周围生成大量的过氧化氢,后者通过与血红蛋白衍生的Fe发生芬顿反应,在软骨细胞周围生成强细胞毒性的羟基自由基,造成软骨细胞凋亡并危害软骨基质的合成,导致软骨毁坏。依据HA的发病机制来看,HA治疗的潜在性靶点包括清除含铁血黄素、消除炎症及修复软骨。根据MSC的细胞治疗机制与HA治疗的潜在靶点有着较高的契合度,主要包含止血、免疫调节及骨与软骨修复。

图2: 血友病性关节炎示意图



3. 干细胞培养支架的类型及意义

目前,间充质干细胞具有优良的成骨特点,复合材料的支架及复合生长因子的支架具有更优良的成骨能力,提高了种植于关节腔后的存活率,最大程度发挥出MSC的软骨修复能力^[5]。支架的材料提供了化学线索,支架形状提供了生物物理线索,而且支架对干细胞在细胞粘附、增殖和骨形成中提供结构支撑,同时还作为指导干细胞分化、组织再生和控制组织结构的微环境。

(1) 水凝胶支架

当前软骨再生修复的主要策略是水凝胶支架,水凝胶是一种很有前途的生物相容性材料,拥有超高含水量、柔韧性和良好生物相容性的三维高分子骨架,在重建软骨界面的平台提供了不同生长因子和干细胞,其结构同天然透明的软骨有着相似的物理性^[6]。水凝胶支架适合用于细胞封装中,将间充质干细胞包裹在水凝胶内,然后再注射到受损的关节中。而使用在胶原凝胶中的MSC临床数据表明,对局部损害和骨关节炎病人的情况有所改善,新软骨的发展过程中取代天然细胞外基质(ECM),对调节细胞功能、维持组织结构和扩散营养物质至关重要。在此,近期出现一种基于硅烷化胶原模拟合成肽的仿生化学水凝胶,该合成具有使用双正交溶胶-凝胶交联反应包封MSC的能力,通过使用单功能肽和双功能肽调整水凝胶组成,可以成功地改善了其机械性能,产生了更具弹性的支架,并实现了嵌入的MSC存活21天,并在软骨培养基中诱导分化时表达软骨细胞标记物,从而使软骨细胞标记物的上调。这种仿生的长期混合水凝胶作为软骨组织工程的合成和模块化支架很有意义,但是它们存在一些限制,可能损害其在生物医学目的上的使用。首先,它们来自动物来源,可能存在低批次间的重现性和安全性问题。其次,它们缺乏适当的机械特性,能够使持续的细胞分化和ECM产生,可通过添加交联剂部分地克服

这一限制,但其固有毒性对细胞活力仍有害。

(2) 胶原支架

胶原蛋白是一种丰富多样的细胞外基质蛋白质,被发现了在医药学、药业、食品上都有很多运用^[7]。胶原由于具有生物相容性、生物降解性、多孔性、低免疫原性和细胞粘附特性,在培养软骨细胞的方面有着显著优势,可以使间充质干细胞均匀分布,因此该支架是目前最常见的一类 MSC 培养支架。胶原蛋白支架分为 I 型和 II 型,其中 I 型胶原是骨组织的重要组成蛋白;II 型胶原是细胞外基质的主要成分之一,在维持软骨细胞功能中起着重要作用,依据组织工程材料关于 II 型胶原的资料,II 型胶原可诱导细胞黏附和增殖,维持 MSC 软骨生成以及维持分化的软骨细胞表型。在修复过程中,II 型胶原蛋白被细胞分泌的酶分解,产物被细胞吸收后作为合成新基质的原料^[10]。有学者指出,在软骨组织工程中,若选择了 I 型胶原作为细胞培养支撑,则软骨细胞更容易出现不分化过程,最终产生了纤维软骨,即非透明软骨。所以,对于胶原来说,若软骨组织工程支架以选用 II 型胶原为主,可更促进软骨细胞黏附、生长和分化,使软骨细胞保持稳定的表型结构。Wakitani^[8]等人觉得伴随胶原浓度的提升,支架联接的多孔材料发生变化,0.8% 的胶原支架中孔径的孔数量提升,反过来,0.2% 的胶原蛋白支架具有较少的孔和较大的孔径,具体来说,0.2% 的胶原支架微孔板少,孔径大。具体而言,0.2% 胶原在 10% 应力下具备类似纯天然软骨组织的缩小特性。Amaddon、陈辉^[9]等发现并确认在两种胶原支架培养下 II 型胶原蛋白表达上升较快,因而,II 型胶原是非常适合 MSC 向软骨组织分化的细胞支架。然而这些结构物理性能差,限制他们在大部分研究中的运用,临床上多采用胶原与其他组织材料联用,使用化学或物理交联方法,这将调整了体内和体外系统的机械稳定性。

(3) β -磷酸三钙支架

β -磷酸三钙是一种合成的、可以降解的无机材料,具有较好的相容性、活性和可降解性,是一种理想的组织修复材料,其成分与正常人体中骨骼矿物质组成类似,在体内降解产物易被组织吸收,不产生毒性,当细胞通过 β -TCP 时对 MSC 的机械损伤很小。有科研小组进行回顾性病例对照中,证实接种在 β -磷酸三钙陶瓷支架上的基因转染的 MSC 促进了骨再生,因此可作为一种 MSC 支架材料置入关节腔内^[10]。 β -TCP 的多孔结构为 MSC 的粘附和生长提供了支架,而孔隙之间的连接有助于支架的血液供应。MSC 种子可以在 β -磷酸三钙支架缺陷区域周围很好地存活,在短时间内降解并被吸收,而降解时间较其他研究报道的时间很长,长达 3 年,表明引入 MSC 可以加速 β -TCP 的降解,从而促进新骨的形成;此外, β -TCP 降解过程中钙离子和磷离子的降解可以为骨再生提供材料和改善微环境,因此它作为理想的骨替代材料。

(4) 石墨烯支架

石墨烯是一种新式单面或多层结构的碳纳米材料,对于多层石墨烯来说,相互之间可以滑动,因而具有独特的润滑功能,故在超负荷条件下和长期的代谢过程中,可以有效地降低关节摩擦损伤,在解决关节炎方面显著的优势^[11]。由于与石墨烯相比,GO 在水性介质中的分散性、机械强度、生物活性和成骨活性更好,因此更适用于生物用途^[12]。GO 纳米粒子 (NPs) 更容易透过细胞,与此同时具有较好的导电性、机械稳定性和较好的抗氧化能力,抑止单核-巨噬细胞转化的免疫反应和血小板的活性。这种特性有助于干细胞生长和分化,提高 MSC 细胞活力,进而 GO 支撑架大大的提升了体细胞与周边环境相互影响。^[14]因而,石墨烯不但可提供 MSC 培养的支架材料构造,还能够润滑关节,降低软骨组织表面滑动摩擦力,为软骨再生修补给予相对稳定的结构力学环境。

(5) 软骨脱细胞支架

软骨脱细胞支架是一种能够仿真模拟天然软骨细胞外环境的软骨结构工程材料,将分离的软骨组织通过酶消化吸收除去结构里细胞成分,但储存了各种有效生物活性成分及保留了细胞外基质组成的三维空间结构。为种子干细胞的生长发育造就了生物动力学的空间结构的同时,还提供了支持干细胞黏附、增殖、分化和分泌等良好的生存环境,取向性分布相似于正常软骨组织,间充质干细胞和软骨脱落细胞共同培养可能消除软骨的去分化和间充质不稳定的成软骨分化状态,同时保留了软骨下骨的结构和功能完整^[13]。有组织工程机构采用动物猪的软骨脱落细胞进行冷冻和交联技术制成干细胞-脱落细胞复合支架修复退行性椎间盘疾病,并证实在外体内具有可行性。同时也有动物实验表明间充质干细胞的外泌体可以促进脱落细胞支架作用及软骨再生^[13]。近年来,已有研究机构已经研制出各种形式的软骨组织工程应用于临床,并且具有相当的疗

效,但是目前仍没有关于软骨脱落细胞支架应用于 HA 临床的报道^[13]。关于支架植入后,降解速度、变形范围、长期机械性能维持等的实验研究仍需大量实验进一步完善和补充。

4.目前的局限性与未来展望

现阶段,因为人们对干细胞再生医学的进一步认识及组织工程技术的高速发展,干细胞治疗 HA 的临床转化飞速发展。MSC 在关节腔内的修复功能的有效性显而易见,美中不足的地方是它受到某些原因的影响导致修复时间有限。有动物实验研究表明 MSC 治疗虽然成功改善了凝血因素水平,可将其提高,但却无法达到对凝血因素的长期持续表达,其缘由可能是体细胞活力和免疫耐受性下降,因而要按时行 MSC 移植治疗,这种行为不但会对滑膜关节造成了重复性损害,而且提升感染风险。而当前,以骨髓间充质干细胞技术为基础的组织工程技术在国家全球各国的支持下,医学上已经获得了巨大进展,并被成功应用到一些疾病当中,如糖尿病、骨质疏松、心力衰竭等疾病,作为一种新的有前景的医疗技术,在未来血友病性关节炎的治疗方法方面具有非常大的临床诊治发展潜力。尽管组织工程在关节炎研究方向上获得了一些成效,但是由于血友病性关节炎与关节炎并不完全相同,并有其自身特殊性,在临床应用中仍面对比较大的困难。坚信在不久的将来,干细胞作为软骨组织修复的种子细胞,脱软骨细胞外基质作为软骨支架,应用到血友病性关节炎的动物模型关节腔内,使破坏的关节软骨及软骨下骨重新修复,同时待技术成熟后应用于临床血友病性关节炎患者,提高患者生活质量,使血友病性关节炎在治疗上开启一个新的篇章。

参考文献:

- [1]GUALTIEROTTI R, SOLIMENO L P, PEYVANDI F. Hemophilic arthropathy: Current knowledge and future perspectives [J]. J Thromb Haemost, 2021, 19(9): 2112-21.
 - [2]HAUW W W S, CHIA J S J, NANDURKAR H H, et al. The potential role of protease systems in hemophilic arthropathy [J]. Blood advances, 2022, 6(18): 5505-15.
 - [3]LYONS L P, WEINBERG J B, WITTSTEIN J R, et al. Blood in the joint: effects of hemarthrosis on meniscus health and repair techniques [J]. Osteoarthritis and cartilage, 2021, 29(4): 471-9.
 - [4]HAN Z, ZHENG L, LUO D, et al. Ferropoiesis: a new target for iron overload-induced hemophilic arthropathy synovitis [J]. Annals of hematology, 2023, 102(5): 1229-37.
 - [5]康坤龙, 王新涛. 生物支架材料促进骨髓间充质干细胞成骨分化的研究热点 %J 中国组织工程研究 [J]. 2022, 26(04): 597-603.
 - [6]ZHANG H, CAI Q, ZHU Y, et al. A simple hydrogel scaffold with injectability, adhesivity and osteogenic activity for bone regeneration [J]. Biomater Sci, 2021, 9(3): 960-72.
 - [7]WANG H. A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies [J]. 2021, 13(22): 3868.
 - [8]MUNIR N, CALLANAN A. Novel phase separated polycaprolactone/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering [J]. Biomed Mater, 2018, 13(5): 051001.
 - [9]TAMADDON M, BURROWS M, FERREIRA S A, et al. Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro [J]. Scientific reports, 2017, 7: 43519.
 - [10]ELIMELECH R, KHOURY N, TAMARI T, et al. Use of transforming growth factor-beta loaded onto beta-tricalcium phosphate scaffold in a bone regeneration rat calvaria model [J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2019, 21(4): 593-601.
 - [11]LIU A, WANG P, ZHANG J, et al. Restoration Effect and Tribological Behavior of Hyaluronic Acid Reinforced with Graphene Oxide in Osteoarthritis [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(1): 91-7.
 - [12]OLATE-MOYA F, ARENS L, WILHELM M, et al. Chondroinductive Alginate-Based Hydrogels Having Graphene Oxide for 3D Printed Scaffold Fabrication [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(4): 4343-57.
 - [13]MAI Z, CHEN H, YE Y, et al. Translational and Clinical Applications of Dental Stem Cell-Derived Exosomes [J]. Front Genet, 2021, 12: 750990.
- 作者简介: 姓名: 徐菊菊, 性别: 女, 民族: 汉族, 出生年月: 1991 年 12 月, 籍贯: 吉林长春, 学历: 研究生, 研究方向: 血液科 职称医师