

富含细胞因子自体血清的制备及细胞因子分析

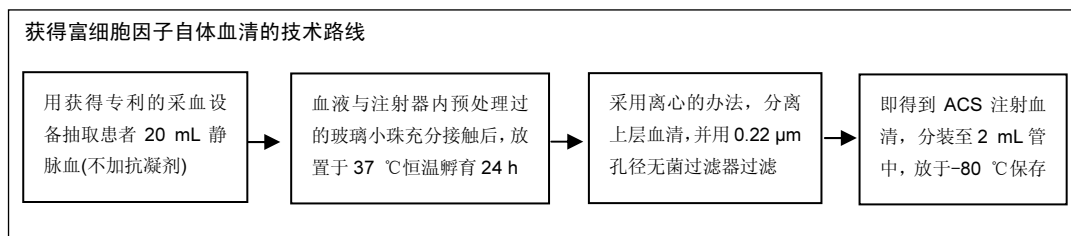
陈曦, 汪鉴, 李一佳(云南舜喜再生医学工程有限公司, 云南省昆明市 650106)

引用本文: 陈曦, 汪鉴, 李一佳. 富含细胞因子自体血清的制备及细胞因子分析[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24):3894-3899.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.24.021

ORCID: 0000-0003-3459-7617(陈曦)

文章快速阅读:



陈曦, 女, 1989 年生, 云南省昆明市人, 2014 年中国科学院昆明动物研究所毕业, 硕士, 主要从事干细胞和细胞因子的研究。

通讯作者: 李一佳, 博士, 副高职称, 云南舜喜再生医学工程有限公司, 云南省昆明市 650106

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2017)24-03894-06

稿件接受: 2017-04-11

主题词:

富含细胞因子自体血清提取技术: 此技术是利用自身的血液, 加以刺激的手段, 通过离心方法, 提取出富含细胞因子的血清的最新生物技术。大量研究和临床实验表明: 提取的富含细胞因子血清在缓解组织炎症方面具有显著的作用, 并且操作简单、具有很高的安全性。

白细胞介素 1 受体拮抗剂: 白细胞介素 1 受体拮抗剂是白细胞介素 1 家族中的一员。在大量的动物疾病模型以及人的自身免疫性疾病和慢性炎症疾病中产生。它结合到白细胞介素 1 的受体上与白细胞介素 1 竞争结合位点, 但是在这些结合不会引发胞内反应。已经有很多科研组在研究它在阻碍白细胞介素 1 促炎效应中所扮演的角色。

摘要

背景: 自体血清疗法是一种新兴的、安全的生物疗法, 主要适应证是骨关节炎、风湿性关节炎等类似病症。

目的: 探讨富含细胞因子的自体血清制备方法并进行细胞因子分析。

方法: 采用了获得专利的采血设备(内含 3 mm 玻璃小珠)进行外周血采集, 充分混匀后放置于 37 °C 的恒温培养箱内, 进行 24 h 的恒温孵育, 最终分离过滤得到自体血清。测定白细胞介素 1 受体拮抗剂、白细胞介素 6、白细胞介素 8、白细胞介素 1β 等细胞因子定量的浓度, 并用细胞因子抗体芯片的检测方法对 36 种细胞因子进行了半定量测定。

结果与结论: ①制备的自体血清中多种细胞因子浓度有明显增加, 其中, 对缓解骨关节炎病症起到关键作用的白细胞介素 1 受体拮抗剂的质量浓度由平均 140.25 ng/L 增加至 1 125 ng/L, 增加 8 倍以上; 白细胞介素 6 质量浓度由 389.5 ng/L 增加至 2 802 ng/L, 白细胞介素 8 由“未检测到”增加至 2 822 ng/L; ②采用细胞因子抗体芯片的方法检测制备的自体血清发现, 至少有 10 种细胞因子的含量发生了改变, 大部分因子的变化趋势是制备后增加, 少数几个因子呈下降的趋势; ③结果证明, 制备的自体血清当中, 含有大量的白细胞介素 1 受体拮抗剂和多种细胞因子, 另外, 自体血清中还含有一部分趋化因子, 提示这些趋化因子能够招募更多的免疫细胞来到炎症部位, 加快炎症反应进程, 起到治疗的作用。

关键词:

组织构建; 组织工程; 自体血清; 白细胞介素 1 受体拮抗剂; 细胞因子; 骨关节炎

主题词:

血清; 细胞因子类; 骨关节炎; 组织工程

Purification and cytokine profile of autologous conditioned serum

Chen Xi, Wang Jian, Li Yi-jia (Yunnan Shunxi Regeneration Medical Engineering Co., Ltd., Kunming 650106, Yunnan Province, China)

Chen Xi, Master, Yunnan Shunxi Regeneration Medical Engineering Co., Ltd., Kunming 650106, Yunnan Province, China

Corresponding author:

Li Yi-jia, M.D., Yunnan Shunxi Regeneration Medical Engineering Co., Ltd., Kunming 650106, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Autologous conditioned serum (ACS) is a new and safe biological therapy method mainly used for osteoarthritis, rheumatoid arthritis and other similar diseases.

OBJECTIVE: To explore the purification method and cytokine profile of ACS.

METHODS: Blood obtained equipment (containing 3 mm of glass beads) was used to collect peripheral blood samples that were mixed uniformly and then placed in a 37 °C thermostatic incubator for 24 hours, finally filtered to obtain ACS. The quantitative determination of interleukin (IL)-1Ra, IL-6, IL-8, and IL-1β was conducted, and the 36 kinds of cytokines were semi-quantitatively detected by cytokine antibody array.

RESULTS AND CONCLUSION: The levels of various cytokines in ACS were obviously increased, among which, IL-1Ra level (important for alleviating osteoarthritis) was increased from 140.25 ng/L to 1 125 ng/L

(increased by above 8 times); IL-6 level was increased from 389.5 ng/L to 2 802 ng/L; IL-8 level was not detected firstly and finally increased to 2 822 ng/L. Cytokine antibody array results showed that at least 10 kinds of cytokines in ACS were changed, and most of cytokines were on a rise, and few in decline. These results indicate that the ACS contains IL-1Ra and a variety of cytokines, and some chemokines in the ACS recruit more immune cells to the inflammation sites and accelerate the inflammatory process, further exerting therapeutic effects.

Subject headings: Serum; Cytokines; Osteoarthritis; Tissue Engineering

Cite this article: Chen X, Wang J, Li YJ. Purification and cytokine profile of autologous conditioned serum. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(24):3894-3899.

0 引言 Introduction

骨关节炎为一种退行性病变,系由于增龄、肥胖、劳损、创伤、关节先天性异常、关节畸形等诸多因素引起的关节软骨退化损伤、关节边缘和软骨下骨反应性增生,又称骨关节病、退行性关节炎、老年性关节炎、肥大性关节炎等。临床表现为缓慢发展的关节疼痛、压痛、僵硬、关节肿胀、活动受限和关节畸形等。

骨关节炎的常规治疗手段分为保守治疗和手术疗法。保守治疗以全身用药和关节内局部用药为主。早期骨关节炎患者,可对症给予口服消炎镇痛药或活血化淤的药物治疗,关节软骨保护剂透明质酸或水凝胶的关节内注射也能起到一定的缓解效果,以上药物的运用以达到改善症状、提高生活质量的目的^[1]。

对于关节疼痛、肿胀明显,行走功能障碍,核磁共振显示有软骨破坏,关节内有游离体、骨赘增生或伴有半月板损伤的骨关节炎患者,则应求助于外科手术。外科治疗骨关节炎的手术方法有关节镜清理术、软骨全层损伤区钻孔减压微骨折术、胫骨高位截骨矫正力线术和人工关节置换术^[1]。

近年来,基础科研阶段和临床运用阶段新兴了多种骨关节炎类似疾病的治疗方法,比如富血小板血浆(PRP)法^[2-3]、干细胞移植疗法^[4]、软骨细胞移植疗法、生长因子及凝胶载体的应用,多种新兴疗法在基础科研及临床试验阶段取得了不错的疗效。以往富血小板血浆用于治疗骨关节炎的临床试验研究很少,缺乏有力的循证医学证据。但近年来随着学界对富血小板血浆的关注度增高,已陆续见到一些临床试验证实富血小板血浆能有效地改善和缓解骨关节炎的症状。将富血小板血浆注入关节内用于研究其是否对膝骨关节炎具有治疗作用,这项研究共治疗了115例受骨关节炎累及的膝关节,每周进行一次注射,疗程共3周,在治疗结束后6-12个月追踪患者的疗效,他们发现经治疗后的病变关节其功能和症状都较治疗前有明显的好转^[3]。

在众多炎症反应和慢性病中,白细胞介素1 β 都是一个关键性的炎性因子,例如骨关节炎、类风湿关节炎和痛风。现在临床上用于抑制白细胞介素1 β 的惯用策略是使用人工重组制备的抗白细胞介素1 β 的生物制剂,即白细胞介素1受体拮抗物,起到快速止痛、缓解炎症的作用^[5];同时使用一些抗炎因子可以抑制白细胞介素1的产生,并且促进白细胞介素1受体拮抗物的生成,例如白细胞介素4、白细胞介素10、白细胞介素13。

早在1998年,一种称为自体血清疗法、或Orthokine疗法的新型生物治疗手段就被用于临床治疗被骨关节炎^[6]、类风湿关节炎等病症困扰的患者^[7];2004年,自体血清疗法被用于治疗运动员的肌肉紧张^[8]。

与富血小板血浆技术不同,富细胞因子的血清在制备时已经活化了血小板和免疫细胞,能够在制备过程中就获得足够量的细胞因子和生长因子,使用时得到最高的生物效力。

富细胞因子的血清可以从患者自身血液中提取,经提取富集处理后,可用于相关疾病的治疗,因而来源丰富,取材方便,制备方法简单而且可以让身体吸收。其次,富细胞因子的血清是来源于患者自身,在使用过程中能够避免病毒传播和免疫排斥等问题。此外,细胞因子在骨性关节炎发生、发展过程中起重要作用,部分细胞因子具有抑制骨性关节炎病变发展的作用。

与分解代谢有关的细胞因子主要有基质金属蛋白酶;与合成代谢有关的细胞因子主要有转化生长因子,骨形态发生蛋白,胰岛素样生长因子,成纤维细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子;在关节组织中发现的影响细胞功能的炎性因子包括白细胞介素、趋化因子和肿瘤坏死因子等^[9]。这些生长因子相互之间具有协同响应,与其他促进细胞活性的因子相互作用和影响,共同维持着组织环境的平衡,对伤口愈合、修复和再生有着重要的作用。

最原始的自体血清制备方法是使用CrSO₄包被过表面的玻璃小珠与新鲜血液混合,37℃静置24 h后提取血清,即可得到富含多种细胞因子的血清给患者进行回输治疗。自体血清疗法一般为21 d内重复注射6次^[10]。

自体血清用于临床治疗的文献报道非常多。Frisbie等^[11]证明了自体血清技术对膝关节炎的治疗具有显著作用;Astolfi等^[12]证明了自体血清技术在骨关节炎治疗中的积极作用;Baltzer等^[13]证明了:自体血清对于髌关节炎有积极临床作用;Meijer等^[14]证明了自体血清对骨关节炎有非常好的疗效,并且从不良反应发生率上看,自体血清治疗组和安慰剂组没有明显差别,但是透明质酸治疗组发生的不良反应明显增多。

本文中,采用了无需进行CrSO₄包被的玻璃小珠进行自体血清制备,最大程度降低了自体血清回输带来的不良反应和发生过敏的风险,研究过程中,对白细胞介素1受体拮抗物、白细胞介素6、白细胞介素8、白细胞介素1 β 等细胞因子进行了定量的浓度测定,并且用了细胞因子抗体芯

片的检测方法对36种细胞因子进行了半定量的含量检测, 结果证明制备的自体血清当中, 含有大量的白细胞介素1受体拮抗物和多种抗炎因子, 另外, 自体血清中还含有一部分趋化因子, 这些趋化因子能够招募更多的免疫细胞来到炎症部位, 加快炎症反应进程, 起到治疗的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2016年1至7月在云南舜喜再生医学工程有限公司研究中心实验室(云南昆明)完成。

1.3 材料

全血的获得: 3个身体状况健康的、20-45岁的自愿献血者, 并且确保不含有本研究内涉及到的相关疾病。

1.4 实验方法

1.4.1 制备阶段 用获得专利(2016年5月16日获得受理, 受理号为201610314952.X)的采血设备从静脉采血20 mL/人(30 mL注射器, 内含玻璃小珠、不添加抗凝剂), 后进入制备阶段; 同时用另一只不抗凝的采血管采血2 mL(山东赛华, 5 mL普通非抗凝管), 静置30 min, 待血液凝固后离心分离上层血清, 分装至灭菌1.5 mL离心管, 标记后置于-80 °C保存, 作为后续实验中的阴性对照(即无珠子/无孵育富血小板血浆样品)。

1.4.2 采血设备的准备 将3 mm医疗级玻璃小珠(VWR International)用超纯水洗净后烘干, 按每3 mL全血加入10颗的比例预先放置于已获专利的采血套装中(2016年5月16日获得受理, 受理号为201610314952.X)。然后对特制采血套装进行高压灭菌, 65 °C烘干备用。

1.4.3 自体血清的制备方法 血液采集后, 充分缓慢摇匀, 保证玻璃小珠与新鲜全血充分接触, 将装有全血和玻璃小珠的特制采血套装放置于37 °C的恒温培养箱内, 进行24 h的恒温孵育, 经过恒温放置, 血液凝固后会出现分层, 用移液器将析出的上层血清转移至1.5 mL小离心管, 用离心机, 以3 500 r/min的转速, 离心5 min, 将多余的红细胞沉淀去除, 最后使用0.22 μm无菌滤器过滤上层血清, 并分装至无菌的1.5 mL离心管, 即得到富含细胞因子的血清。

1.4.4 获得富细胞因子的自体血清的技术路线 ①容器准备: 将3 mm医疗级玻璃小珠按每3 mL全血加入10颗的比例预先放置于特制采血套装中。然后对特制采血套装进行高压灭菌; ②采集外周血全血样本: 用特制的采血套装采集静脉全血20 mL, 并充分摇匀, 保证玻璃小珠与新鲜全血充分接触; ③恒温孵育: 将装有全血和玻璃小珠的特制采血套装放置于37 °C的恒温培养箱内, 进行24 h的恒温孵育; ④血清收集: 经过恒温放置, 血液凝固后会出现分层, 用移液器将析出的上层血清转移至15 mL小离心管; ⑤用离心机, 以3 500 r/min的转速, 离心5 min, 将多余的红细胞沉淀去除; ⑥使用0.22 μm无菌滤器过滤上层血清, 并分装至无菌的2 mL冻存管, 即得到富含细胞因子的血清。

1.4.5 细胞因子水平测定 采用ELISA检测方法, 对白细胞介素1受体拮抗物、白细胞介素1β、白细胞介素6、白细胞介素8进行浓度的定量测定(Peprotech ELISA抗体试剂盒及Peprotech ABTS缓冲液试剂盒)。按照试剂盒说明书进行实验, 最后用酶标仪进行A值的读取(Thermo Fisher MultiscanGo全波长读数仪), 并用Excel进行结果的统计和分析, 生成标准曲线和柱状图。

1.4.6 细胞因子抗体芯片 采用人细胞因子固相抗体芯片(R&D Systems, Catlog: ARY005)可在一个样本内同时检测36种细胞因子、趋化因子和急性期蛋白等, 此方法快速、灵敏、性价比高。实验用到的成像仪为GE Las4000(中国科学院昆明动物研究所肿瘤生物学课题组)。结果图的分析软件为Image J。

1.5 主要观察指标 血清中多种细胞因子(白细胞介素6、白细胞介素8、肿瘤坏死因子α、白细胞介素1受体拮抗物等)的质量浓度变化。

1.6 统计学分析 数据由第一作者应用Excel、Image J软件处理

2 结果 Results

2.1 自体血清制备后中多种细胞因子含量增加 一般情况下, 在新鲜血清里细胞因子的含量都很低, 或者很难被检测到。当通过自体血清制备技术, 血液与3 mm直径的医疗级玻璃小珠充分接触并在37 °C环境孵育24 h后, 通过ELISA检测技术, 发现在自体血清中多种细胞因子的质量浓度有明显增加。其中, 对缓解骨关节炎病症起到关键作用的白细胞介素1受体拮抗物的浓度由平均140.25 ng/L增加至1 125 ng/L, 增加8倍以上(图1A); 另外2种细胞因子白细胞介素6质量浓度由389.5 ng/L增加至2 802 ng/L, 白细胞介素8质量浓度由“未检测到”增加至2 822 ng/L(图1B, C)。

同时, 检测了骨关节炎的关键致病因子白细胞介素1β, 发现在自体血清制备前后, 白细胞介素1β质量浓度都处于“未检测到”范围, 即白细胞介素1β含量不会随血液与玻璃小珠的接触和37 °C恒温孵育而增加, 这也为自体血清能够用到临床治疗骨关节炎疾病提供了另一个理论支撑。

2.2 通过高通量筛查, 多种细胞因子出现了增加或下降的含量改变 细胞因子抗体芯片的方法, 可以在一个样品内同时检测36种细胞因子、趋化因子和急性期蛋白, 此方法快速、灵敏。从结果可以看出, 在经过制备的自体血清中, 至少有10种细胞因子的含量发生了改变(图2), 大部分因子的变化趋势是制备后增加, 少数几个因子呈含量下降的趋势。用Image J统计软件统计分析得8种含量增加的细胞因子, 浓度增加最多的3个因子分别为CCL2、白细胞介素8和CXCL1(表1); 根据统计结果, 有5种因子含量呈下降趋势, 其中下降最剧烈的因子为CD40受体, 其余4个因子均为2倍不到的改变(表2)。

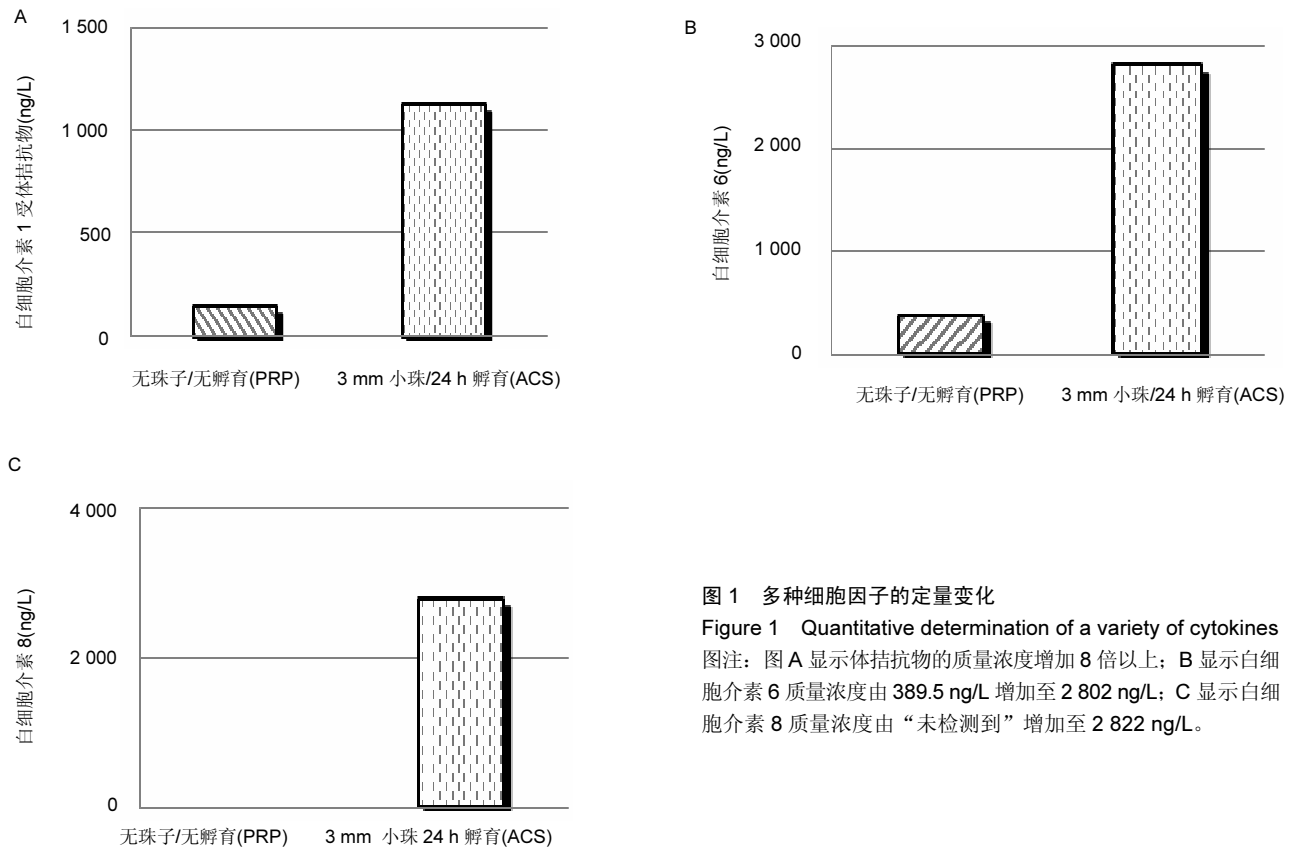


图 1 多种细胞因子的定量变化

Figure 1 Quantitative determination of a variety of cytokines

图注: 图 A 显示体拮抗物的质量浓度增加 8 倍以上; B 显示白细胞介素 6 质量浓度由 389.5 ng/L 增加至 2 802 ng/L; C 显示白细胞介素 8 质量浓度由“未检测到”增加至 2 822 ng/L。

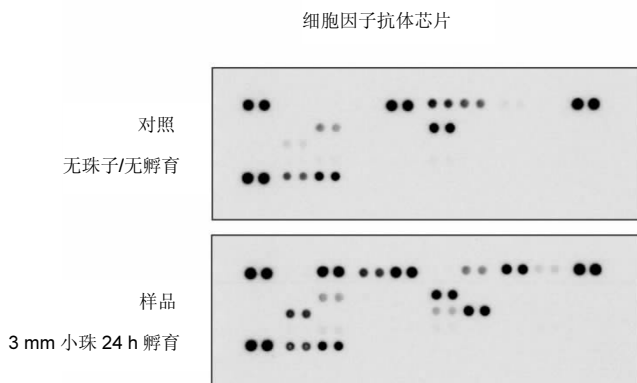


图 2 细胞因子抗体芯片检测多种细胞因子变化趋势

Figure 2 Cytokine profile detected by cytokine antibody array

图注: 出现了增加或下降的含量改变。

表 2 用 Image J 软件分析 36 种细胞因子得到有 5 种因子含量呈下降趋势

Table 2 Five cytokines with decreased levels in 36 kinds of cytokines analyzed by Image J software

芯片位置	细胞因子名称	降低倍数
A9,A10	趋化因子 5(CCL5/RANTES)	1.1
A11,A12	CD40 Ligand/TNFSF5	11.2
	CD154, CD40LG, gp39, TRAP	
A13,A14	Complement Component C5/C5a, C5/C5a	1.6
B5,B6	趋化因子 12(CXCL12/SDF-1, PBSF)	1.4
B11,B12	细胞间黏附分子 1(ICAM-1/CD54)	1.1

表 1 用 Image J 软件分析 36 种细胞因子得到 8 种含量增加的细胞因子

Table 1 Eight cytokines with increased levels in 36 kinds of cytokines analyzed by Image J software

芯片位置	细胞因子名称	增加倍数
A5,A6	趋化因子 2(CCL2/MCP-1, MCAF)	21.8
A7,A8	趋化因子 3/4(MIP-1 α /MIP-1 β , CCL3/CCL4)	7.2
A15,A16	趋化因子 1(CXCL1/GRO α , CINC-1, KC)	12.0
A17,A18	趋化因子 10(CXCL10/IP-10, CRG-2)	1.2
C3,C4	白细胞介素 1 受体拮抗物(IL-1Ra/IL-1F3)	5.8
C11,C12	白细胞介素-6(IL-6, BSF-2)	2.0
C13,C14	白细胞介素-8(IL-8, CXCL8, GCP1, NAP1)	16.7
E3,E4	巨噬细胞游走抑制因子(MIF, GIF, DER6)	1.2

表 3 自体血清与类似技术的比较

Table 3 Comparison of autologous conditioned serum and platelet-rich plasma

项目	富血小板血浆技术	自体血清技术
取材	静脉采血	静脉采血
制备方法	1 h	1 d
安全性	自体回输	自体回输
	无免疫排斥	无免疫排斥
成分	主要为血小板	主要为细胞因子
		已排除血小板等无关物质
适用性	临床治疗效果欠佳	临床适应证较多
	主要用于医美行业	技术成熟
有效性	细胞因子含量很低	富含丰富的生长因子和细胞因子
	效果不明显	治疗效果较好

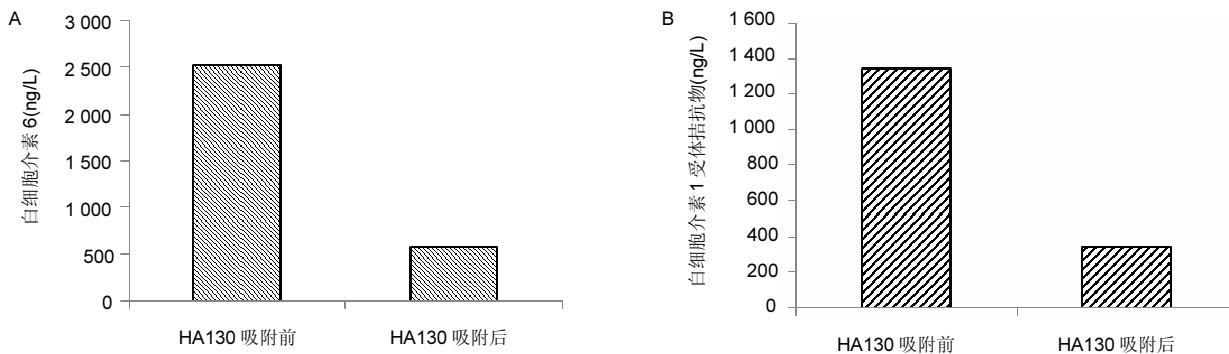


图3 HA130树脂吸附后细胞因子的定量检测

Figure 3 Quantitative determination of a variety of cytokines after HA130 resin adsorption

图注: 图A显示白细胞介素6的质量浓度由2514 ng/L降低至518 ng/L; B显示白细胞介素1受体拮抗物质量浓度由1342 ng/L降低至342 ng/L。

3 讨论 Discussion

自体血清技术与现有类似技术的对比: 现有的类似疗法称为富血小板血浆疗法, 富血小板血浆(Platelet Rich Plasma)是富含血小板的血浆。

富血小板血浆技术是指利用自身的血液, 离心提取出富含高浓度血小板的血浆。富血小板血浆技术在基本理论上跟自体血清相似, 但相比较而言, 富血小板血浆得到的仅仅是富含血小板的血清, 而自体血清能得到富细胞因子的血清, 排除了血小板等其他非相关物质, 对目标物质有更强的针对性。

富血小板血浆技术在临床的使用范围不广, 因其临床治疗的效果欠佳, 故主要用于医美方面(表3)。结果显示, 经过自体血清制备过程的血清中, 相比较阴性对照有多种细胞因子的含量发生变化, 其中包含抗炎因子, 也有部分促炎因子。白细胞介素1受体拮抗物的增加非常明显, 但是白细胞介素1 β 却没有出现增加的趋势, 此结果为自体血清可用于骨关节炎等病症的治疗提供了理论基础。

而且, 研究中发现, Orthokine制备方法得到的富含细胞因子血清的成分, 不像Meijer等^[14]的研究结果中阐述的那样, 都是白细胞介素1受体拮抗物、白细胞介素4、白细胞介素10和白细胞介素13, 结果更多是证明了玻璃小珠和新鲜血液的共同作用会同时产生抗炎和促炎因子。在白细胞介素1受体拮抗物生成的同时, 白细胞介素6和白细胞介素8的变化也非常剧烈, 因白细胞介素6属于促炎因子, 白细胞介素8则是一个双向作用的细胞因子, 所以该技术在此基础上可以再进行优化。选择合理可行的方法将自体血清中大量的白细胞介素6和白细胞介素8去除, 并保留有用的白细胞介素1受体拮抗物和其余的多种生长因子, 以此取得更好的临床治疗效果。

为了去除自体血清中的促炎成分, 在研究中使用了珠海健帆公司的HA树脂血液灌流器, 旨在利用树脂吸附的方法吸附去除促炎的成分。HA树脂血液灌流器由柱体和吸附剂两部分组成, 柱体由端盖、盖帽、锥塞、密封圈和圆台形

柱筒组成; 吸附剂为经独特工艺处理的中性大孔吸附树脂, 其吸附能力主要取决于三维网状结构的分子筛作用和树脂分子基团的电荷引力以及亲脂疏水特性, 对分子结构中具有亲脂疏水基团(如带苯环或环状结构)的目标物质具有相对特性的吸附性能。

目前, HA树脂血液灌流器一共有5种不同型号的产品在临床使用, 研究中使用的是HA130树脂血液灌流器, 临床上的使用范围是维持性血液透析相关并发症: 肾性骨病、顽固性皮肤瘙痒、周围神经病变、心血管疾病、顽固性高血压、肾性脑病、营养不良等的防治。可针对清除尿毒症毒素中的中大分子毒素或与蛋白结合类毒素, 如 β 2微球蛋白、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6等^[15]。

实验结果证明, 当自体血清通过与HA130树脂颗粒充分结合后, 促炎的白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 的确得到了吸附去除, 但是对治疗骨关节炎的有效成分白细胞介素1受体拮抗物同样也大部分被去除了(图3), 原因可能是因为, 树脂吸附的原理是通过吸附蛋白质分子量大小大于一定数值, 并且相对接近的蛋白质, 来起到吸附去除的作用, 然而白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素1受体拮抗物相对分子质量均大于500 000, 都会被树脂颗粒吸附在内, 起不到只去除促炎因子成分, 而保留有效成分的效果, 并不是最佳的解决方案。后期, 还需更深层次研究新的解决方案。

最后, 很多临床实验都证明自体血清对骨关节炎、膝关节炎、髌关节炎等都有明显的疗效^[11-14, 16-17], 并且可以明显缩小前十字韧带重建术后的骨髓道的扩大^[18], 还有研究发现自体血清可以有效改善母马子宫内膜炎的病症^[19]。

尽管现有的自体血清制备方法仍有局限和瑕疵, 还需后续进行制备方法的优化和改进。但是自体血清的临床使用却已经得到了很多有效的病理证实, 再加之此技术是利用自身的血液, 并且操作简单、具有很高的安全性, 治疗时直接注射到患病关节, 有很高的生物利用度, 确实是一种新型、安全的生物疗法, 在缓解组织炎症方面具有显著

的作用,可以在临床上广泛推广。

作者贡献: 实验由李一佳指导,陈曦设计,陈曦和汪鉴共同实施,最后由陈曦完成文章的撰写。

利益冲突: 所有作者共同认可文章有无相关利益冲突。

伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求,文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者陈曦、通讯作者李一佳对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 武红,韩颖,生孟军,等.骨关节炎治疗进展[J].医学综述,2007,13(14):1089-1091.
- [2] 林文祥,严康宁,陈进鸿,等.关节腔注射自体血清治疗11例膝骨性关节炎[J].广东医学,2013,34(3):336.
- [3] 周祝兴.富血小板血浆治疗骨关节炎的研究进展[J].贵州医药,2016,40(4):432-434.
- [4] 美丽,刘少英,刘福艳,等.脂肪组织来源干细胞治疗骨关节炎研究进展[J].国际骨科学杂志,2016,3(2):102-105.
- [5] Geburek F, Lietzau M, Beineke A, et al. Effect of a single injection of autologous conditioned serum (ACS) on tendon healing in equine naturally occurring tendinopathies. Stem Cell Res Ther. 2015; 6:126.
- [6] 欧盟批准Orthokine作为治疗关节炎的新方法[J].国外医学情报,2006,27(4):4.
- [7] Wehling P, Moser C, Frisbie D, et al. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases: the orthokine therapy. BioDrugs. 2007;21(5):323-332.
- [8] Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P, et al. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. Int J Sports Med. 2004;25(8):588-593.
- [9] Heisterbach PE, Todorov A, Fluckiger R, et al. Effect of BMP-12, TGF-beta1 and autologous conditioned serum on growth factor expression in Achilles tendon healing. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012;20(10):1907-1914.
- [10] Magalon J, Bausset O, Veran J, et al. Physico-chemical factors influencing autologous conditioned serum purification. Biores Open Access. 2014;3(1):35-38.
- [11] Frisbie DD. Autologous-conditioned serum: evidence for use in the knee. J Knee Surg. 2015 ;28(1):63-66.
- [12] Astolfi M, McGuire K, Kaminski TW. The effectiveness of autologous conditioned serum in the treatment of knee osteoarthritis. J Sport Rehabil. 2014;23(4):365-369.
- [13] Baltzer AW, Ostapczuk MS, Stosch D, et al. A new treatment for hip osteoarthritis: clinical evidence for the efficacy of autologous conditioned serum. Orthopedic reviews. 2013; 5 (2): 59-64.
- [14] Meijer H, Reinecke J, Becker C, et al. The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. Inflamm Res. 2003;52(10): 404-407.
- [15] 周西豫,宋洁,张晓东,等.采用HA130型树脂灌流器血液灌流对维持血液透析患者微炎症的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(21):3909-3912.
- [16] Fox BA, Stephens MM. Treatment of knee osteoarthritis with Orthokine-derived autologous conditioned serum. Expert Rev Clin Immunol. 2010 ;6(3):335-345.
- [17] Frizziero A, Giannotti E, Oliva F, et al. Autologous conditioned serum for the treatment of osteoarthritis and other possible applications in musculoskeletal disorders. British medical bulletin 2013;105:169-184.
- [18] Goni VG, Singh Jhala S, Gopinathan NR, et al. Efficacy of Epidural Perineural Injection of Autologous Conditioned Serum in Unilateral Cervical Radiculopathy: A Pilot Study. Spine. 2015; 40 (16): E915-921.
- [19] Ferris RA, Frisbie DD, McCue PM. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. Theriogenology. 2014; 82 (1): 36-42.