

外周血源性间充质干细胞修复骨关节炎软骨损伤的应用前景与问题

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3520>

杨腾云, 李彦林, 刘德健, 王国梁

2095-4344.3520

投稿日期: 2020-06-04

送审日期: 2020-06-12

采用日期: 2020-07-20

在线日期: 2020-10-22

中图分类号:

R459.9; R318; Q813

文章编号:

2095-4344(2021)19-03071-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点—

文章综述了外周血源性间充质干细胞的研究现状及其在骨关节炎软骨修复中的应用, 分析了目前临床应用受限的主要问题以及可能的解决方案, 以期合理利用外周血源性间充质干细胞作为种子细胞来修复软骨。

外周血间充质干细胞优势

(1) 外周血采集操作简单、创伤小、并发症少、可重复性高;
(2) 来源自体, 降低疾病传播及免疫相关风险;
(3) 不存在伦理学问题。

外周血间充质干细胞分离、提取、培养

(1) 联合使用粒细胞集落刺激因子和AMD3100动员后, 能有效将间充质干细胞动员入外周血;
(2) 采用密度梯度离心法能分离提取出外周血间充质干细胞, 且方便易行。

外周血间充质干细胞在骨关节炎与软骨修复方面的应用

(1) 目前应用方式主要为直接注射和体外培养再移植2种方式;
(2) 动物实验和人体试验均显示出良好的效果;
(3) 自体、异体、异种细胞移植均有较佳的安全性及良好的修复效果。

文题释义:

间充质干细胞: 是一种具有自我更新、增殖能力强、产生克隆细胞群、多向分化等特点的成体干细胞, 其表达典型的间充质细胞表面标记CD73、CD90、CD105, 缺乏造血细胞表面标记CD14、CD34、CD45, 当细胞在体外特定条件下培养, 有成软骨、成骨、成脂肪形成等作用。

外周血源性间充质干细胞: 外周血经密度梯度离心法、免疫磁珠分离法等分离提取的单核细胞, 经培养具有间充质干细胞表型特征和多向分化能力, 可作为理想的组织工程种子细胞。

摘要

背景: 随着近年组织工程技术应用到软骨修复研究领域, 间充质干细胞作为一种具有自我更新、增殖能力强、产生克隆细胞群、多向分化等特点的成体干细胞, 是软骨修复理想的种子细胞, 而外周血源性间充质干细胞具有取材方便、创伤小等优点, 已成为目前该领域的研究热点。

目的: 综述外周血源性间充质干细胞的研究现状及其在骨关节炎软骨修复中的应用, 分析了目前临床应用受限的主要问题以及可能的解决方案, 以期合理利用外周血源性间充质干细胞, 为软骨损伤的治疗找到适宜的种子细胞。

方法: 检索 PubMed 数据库、万方数据库、CNKI 中国期刊全文数据库收录的相关文献。英文检索词为“peripheral blood derived mesenchymal stem cells, circulating mesenchymal stem cells, cartilage repair, osteoarthritis treatment”, 中文检索词为“外周血源性间充质干细胞, 循环间充质干细胞, 软骨修复, 骨关节炎”, 最终纳入57篇文献进行归纳总结。

结果与结论: 近年关于软骨组织工程的研究有显著和持续的增长, 而外周血来源间充质干细胞有其成软骨优势, 能作为更加理想的种子细胞应用于软骨组织工程, 具有良好的临床应用前景。

关键词: 干细胞; 间充质干细胞; 外周血间充质干细胞; 骨关节炎; 软骨损伤; 软骨肥大; 软骨修复

Application prospects and problems of peripheral blood derived mesenchymal stem cells in cartilage repair of osteoarthritis

Yang Tengyun, Li Yanlin, Liu Dejian, Wang Guoliang

Department of Sports Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Yang Tengyun, Department of Sports Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Corresponding author: Li Yanlin, MD, Professor, Department of Sports Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: With the application of tissue engineering technology to the cartilage repair research field in recent years, mesenchymal stem cells as a kind

昆明医科大学附属第一医院运动医学科, 云南省昆明市 650032

第一作者: 杨腾云, 男, 1993年生, 重庆市人, 汉族, 2016年昆明医科大学毕业, 主要从事骨关节损伤修复与重建研究。

通讯作者: 李彦林, 博士, 教授, 昆明医科大学附属第一医院运动医学科, 云南省昆明市 650032

<https://orcid.org/0000-0003-3224-6040>(杨腾云)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81960409, 81760403), 项目负责人: 李彦林; 云南省科技厅-昆明医科大学联合基金重点项目[2017FE467(-007)], 项目负责人: 李彦林; 云南省专家工作站项目(2018IC102), 项目负责人: 李彦林

引用本文: 杨腾云, 李彦林, 刘德健, 王国梁. 外周血源性间充质干细胞修复骨关节炎软骨损伤的应用前景与问题[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(19):3071-3076.



of adult stem cells with the characteristics of self-renewal, strong proliferation ability, clonal cell population and multidirectional differentiation, are ideal seed cells for cartilage repair. Moreover, peripheral blood derived mesenchymal stem cells, due to its conveniently, minimally invasive to the patient, have become the research focus in the field.

OBJECTIVE: To review research status of peripheral blood derived mesenchymal stem cells and their applications in cartilage repair of osteoarthritis, to analyze the main problems of limited clinical application and possible solutions, so as to rationally utilize peripheral blood derived mesenchymal stem cells and find suitable seed cells for the treatment of cartilage injury.

METHODS: Relevant articles collected from PubMed database, Wanfang database and CNKI Chinese journal full-text database were searched. The key words were "peripheral blood derived mesenchymal stem cells, circulating mesenchymal stem cells, cartilage repair, osteoarthritis treatment" in English, and "peripheral blood derived mesenchymal stem cells, circulating mesenchymal stem cells, cartilage repair, osteoarthritis" in Chinese. Finally, 57 articles were included for summary.

RESULTS AND CONCLUSION: The recent research on cartilage tissue engineering has increased significantly and continuously in recent years. Peripheral blood derived mesenchymal stem cells have the advantage of chondrogenesis, can be used as more ideal seed cells in cartilage tissue engineering and have a good clinical application prospect.

Key words: stem cells; mesenchymal stem cells; peripheral blood mesenchymal stem cells; osteoarthritis; cartilage injury; cartilage hypertrophy; cartilage repair

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81960409 (to LYL), No. 81760403 (to LYL); the Key Project of Joint Fund between Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Kunming Medical University, No. [2017FE467(-007)] (to LYL); the Yunnan Expert Workstation Project, No. 2018IC102 (to LYL)

How to cite this article: YANG TY, LI YL, LIU DJ, WANG GL. Application prospects and problems of peripheral blood derived mesenchymal stem cells in cartilage repair of osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(19):3071-3076.

0 引言 Introduction

软骨损伤是一种在世界范围内高患病率和致残的损伤。增龄、肥胖、劳损、创伤、关节先天性异常、关节畸形等诸多因素可引起慢性退行性关节疾病，如骨关节炎、类风湿关节炎，导致人体大关节（髋关节、膝关节、肘关节）的软骨全层退化，最终导致患者关节活动严重受限和生活质量下降^[1-2]。因此，软骨损伤修复成为一个亟待解决但处理棘手的问题。

迄今许多软骨修复方法都没能得到令人满意的长期修复效果，研究者们曾尝试采用微骨折、关节灌洗清创、骨髓刺激技术、自体骨软骨移植、自体软骨细胞移植、自体松质骨移植等外科手术技术，以期形成新的软骨面^[3-5]，这些技术针对小的局灶性或中型骨软骨缺损有一定治疗效果，但其形成的软骨组织为纤维软骨，而非透明软骨组织，致使临床推广使用受限。自体软骨细胞移植虽然较其他方法更优，但由于软骨细胞可用数量有限，且其有向成纤维细胞变性的倾向及再生软骨的变性，也使得推广使用受限^[5-6]。

随着组织工程技术的日趋发展，基于干细胞的治疗方法有望成为软骨再生的种子细胞^[7-8]。间充质干细胞是一种具有自我更新、增殖能力强、产生克隆细胞群、多向分化等特点的成体干细胞，表达典型的间充质干细胞表面标记 CD73、CD90、CD105，不表达造血细胞表面标记 CD14、CD34、CD45，当细胞在体外特定条件下培养，有成软骨、成骨、成脂肪形成等作用^[9-10]。研究表明，间充质干细胞可从多种组织中提取获得，其主要存在于结缔组织与器官间质中，如骨髓、脂肪、羊膜、脐带、外周血等^[11-12]。由于其来源广泛，可分化成软骨，使其在软骨修复方面具有巨大的潜力。

目前国内学者对于骨髓、脂肪等来源间充质干细胞的研究较为成熟，研究涉及多个领域，已应用于临床治疗心血管疾病^[13]、神经系统疾病^[14-15]、免疫疾病^[16]、骨与关节疾病等^[17-19]。然而，从骨髓或脂肪组织中获得的自体间充质干细胞存在供体局部并发症和感染的风险，FREITAG 等^[20]在利用脂肪间充质干细胞治疗骨关节炎时发现，治疗组在脂肪提取术后都有轻微的不适和瘀伤，RANMUTHU 等^[21]也报告了脂肪采集部位会产生局部疼痛和肿胀等不良事件，DRAGANSKI

等^[22]研究发现，即使经专业培训人员进行骨髓采集术，也存在采集过程中不适感、术后疼痛以及感染的风险，而异体来源则可能导致疾病传播和移植宿主病等风险。近年研究发现外周血来源间充质干细胞由于其取材时操作简单、创伤小、并发症少，且不存在伦理学问题等优点，迅速成为组织工程领域的研究热点^[23-24]。文章就外周血来源间充质干细胞在软骨组织工程中应用研究进展做一综述，以期对软骨损伤的治疗提供理想的种子细胞。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 第一作者应用计算机检索 PubMed 数据库、万方数据库、CNKI 中国期刊全文数据库收录的相关文献。英文检索词：peripheral blood derived mesenchymal stem cells, circulating mesenchymal stem cells, cartilage repair, osteoarthritis treatment; 中文检索词：外周血源性间充质干细胞，循环间充质干细胞，软骨修复，骨关节炎，以近 5 年文献为主，最终纳入 57 篇文献进行归纳总结。

1.2 纳入与排除标准 纳入标准：①有关外周血间充质干细胞介绍的相关文献；②有关外周血间充质干细胞分离、提取、培养的相关文献；③有关外周血间充质干细胞应用于软骨修复的相关文献。排除标准：①与研究目的无相关的文献；②重复性研究；③资料无法提取的文献。

1.3 质量评估及数据的提取 计算机初检得到 926 篇文章，通过阅读文题和摘要进行初步筛选；排除中英文文献重复性研究，以及内容不相关或陈旧文献，最后纳入 57 篇文献通过精读进行归纳，纳入文献包括综述与实验研究，实验研究包含动物实验与人体试验，体内与体外实验均纳入其中。

2 结果 Results

2.1 外周血来源间充质干细胞提取、分离、培养与鉴定 研究初期，外周血来源间充质干细胞存在与否一直颇受争议，随着研究的不断深入，学者们成功从猫、猪、绵羊、马等动物和人外周血中分离出间充质干细胞^[25-30]，并通过实验证实其与骨髓、脂肪等来源间充质干细胞具有相似生物学特

性，但分离效率较低。研究初期，KASSIS 等^[30]通过使用集落刺激因子激活健康成年人外周血，从外周血祖细胞中分离出大量的间充质干细胞，这一实验使得外周血来源间充质干细胞分离效率得到了很大的提高。目前，许多研究者联合集落刺激因子和 AMD3100 对大鼠、兔等动物外周血进行动员，成功提取外周血来源间充质干细胞，并认为 2 种动员剂具有协同作用^[31-32]。ZHAO 等^[33]研究也证实集落刺激因子和 AMD3100 是外周血来源间充质干细胞的有效动员剂，相比于单一因子动员组，动员效率提高近 4 倍。

目前分离提取外周血来源间充质干细胞的方法暂无统一标准，但文献报道的分离方法主要有 4 种，早期 KUZNETSOV 等^[34]提出的全血细胞法、FERNANDEZ 等^[35]实验采用的血细胞分离机法和 READING 等^[36]采用的免疫磁珠分离法，以及目前国内外实验采用最多的密度梯度离心法^[25-33]。免疫磁珠分选法和流式细胞仪分离法虽然获得的外周血来源间充质干细胞较纯，但因其费用高、操作复杂且分选后的细胞活性低等原因现在已较少采用；密度梯度离心法因其符合正常生理性渗透压而不易破坏生物膜，对细胞无损害，分离效果好且简便易行，成为目前国内外常用的分选方案。

HOPPER 等^[37]从健康人体中分离出外周血来源间充质干细胞，在低氧条件下培养 2 周后呈成纤维细胞样形态，94% 的细胞表达间充质干细胞标记物 (CD90、CD105、CD146)，而在正常氧条件下只有 41% 的细胞表达这些标记物，这为后续培养条件提供了有用的参考价值。赵岚等^[38]在实验中发现即使纯度较高的外周血来源间充质干细胞，体外培养 40 d 即发生衰老和凋亡，但 β - 联蛋白可延长细胞存活时间至 90 d 以上，增加其体外增殖率 1.08 倍，明显提高了细胞增殖能力，为进一步提高外周血来源间充质干细胞的存活和增殖提供了新的突破点。大量实验皆证实外周血来源间充质干细胞具有和骨髓间充质干细胞相似的增殖及多向分化能力，流式细胞学分析 CD44、CD54、CD105、CD166 均为阳性，CD14、CD34、CD45、CD31 均为阴性，I 型胶原和 III 型胶原免疫组化法染色均为阳性^[25-33]，这与国际干细胞治疗协会 (ISCT)^[39]提出的间充质干细胞的 3 个定义标准相符：①贴壁生长；②表达特定表面抗原；③多向分化能力。外周血获取具有更简便、更微创的特点，操作所带来并发症也显著降低，具有良好的临床应用前景。不仅如此，因为来源于自体，可以更有

效降低疾病传播和移植物抗宿主病等风险。

2.2 外周血来源间充质干细胞在骨关节炎及软骨修复中的应用

近年来，不同来源的间充质干细胞在软骨修复中的应用取得了不错的成就，如来自骨髓、脂肪和滑膜组织的间充质干细胞，通过注射或体外培养后移植等方式促进软骨修复^[17-19]。随着研究的进行，外周血来源间充质干细胞也进行了体内外的动物实验与人体相关试验，取得了积极的研究成果，见表 1^[32-33, 40-48]。

2.2.1 动物实验 相关实验主要包括 3 方面的应用：同种自体移植、同种异体移植与异种移植。SPAAS 等^[40]从 1 匹 5 岁龄的患有骨关节炎的马外周血中分离提取出外周血间充质干细胞，经过体外培养后注入其髌关节，通过视觉步态评估和客观的压力板分析，结果证实了外周血来源间充质干细胞具有促进马骨关节炎恢复的作用。随后，BROECKX 及其团队在 2014 年与 2019 年的实验中，分别对自发骨关节炎或者诱发导致骨关节炎的马，使用同种异体外周血来源间充质干细胞移植联合富含血小板血浆处理其关节软骨面的轻中度受损，治疗后定期行视觉步态、跛行评分和客观压力板分析，以及影像学和实验结束尸检等一系列评估，结果显示马的临床疼痛与跛行表现均有明显改善^[41-44]。FU 等^[32]在实验中探讨了外周血来源间充质干细胞用于兔软骨修复的可行性，利用集落刺激因子和 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 动员兔外周血后分离和扩增出间充质干细胞，然后与脱钙骨基质复合植入膝关节修复缺损软骨，并与骨髓间充质干细胞相对比，显示出相同的体内修复软骨缺损的能力。ZHAO 等^[33]从滇南小耳猪外周血中提取培养外周血间充质干细胞，而后制备载细胞因子壳聚糖缓释微球与脱钙骨基质复合工程骨，同种异体移植修复膝关节软骨缺损，结果显示此工程骨能较好地修复滇南小耳猪关节软骨缺损，并且接近于周围正常软骨组织。基于同种异体治疗的成功，异种移植的实验也被实施，所采用的间充质干细胞均来源于马外周血。DAEMS 等^[45]应用马外周血来源间充质干细胞治疗犬自发骨关节炎，治疗后行走时跛足的程度明显低于安慰剂治疗，此外，狗在行走时突然转向时的疼痛明显减轻，但体检、影像学、生化检查等其他各方面均无明显差异，其原因可能是样本量不足与无法进行组织学检查的局限性，但该实验表明了异种应用外周血来源间充质干细胞的安全性。DEBOSSCHERE 等^[46]在最近的研究中也得出

表 1 | 外周血来源间充质干细胞在骨关节炎及软骨修复中的应用

实验体	相关文献	治疗类型	治疗方式	安全性	有效性
动物	SPAAS 等 ^[40]	自体	注射	无不良反应	显著
	BROECKX 等 ^[41-44]	同种异体	注射	中度闪光反应 (165 匹马中有 3 匹) ^[41] ；鼻涕 (75 匹马中有 3 匹) ^[42]	显著
	FU 等 ^[32]	同种异体	复合支架移植	无不良反应	显著
	ZHAO 等 ^[33]	同种异体	复合支架移植	未提及不良反应	显著
	DAEMS 等 ^[45]	异种	注射	呕吐和腹泻 (6 只狗中有 1 只)，考虑与服用药物有关	临床症状有改善，但统计学无差异
	DEBOSSCHERE 等 ^[46]	异种	注射	无不良反应，多次注射无细胞免疫反应	未提及
人体	VEBER 等 ^[47]	自体	注射	关节内粘连 (1 例患者)、关节疼痛伴间歇性渗出和运动受限 (1 例患者)	显著
	FU 等 ^[48]	自体	注射	无不良反应	显著

相同结论,他们认为与同种异体间充质干细胞相比,异种马外周血来源间充质干细胞对猫免疫调节特性更优,并且多次注射无明显细胞免疫反应,这将是一种更有效和潜在有效的间充质干细胞替代治疗方法。

2.2.2 人体应用 外周血来源间充质干细胞在人体的试验研究远远少于动物实验,但试验结果有力支持其临床应用。VEBER等^[47]对52例晚期骨关节炎软骨缺损ICRS III或IV级病变患者进行治疗,这些患者采用微骨折联合自体外周血来源间充质干细胞移植,然后覆盖胶原膜,约90%的病例取得了良好的效果。FU等^[48]病例报告显示了使用外周血来源间充质干细胞修复关节软骨的积极的治疗结果。外周血来源间充质干细胞来源于1例19岁软骨损伤程度为ICRS IV级男性拳击运动员,通过在移植骨膜瓣下注射外周血来源间充质干细胞并结合髌股关节重建来修复软骨缺损,术后8个月复查关节镜检查表面光滑,经过7.5年的随访,患者恢复了竞技跆拳道运动;各类关节评分以及CT和MRI评估显示与术前相比有显著改善。

3 讨论 Discussion

骨关节炎、类风湿关节炎和创伤常常引起软骨损伤,随着病情的进展,可出现致畸、致残。对于轻度至中度软骨损伤,临床上的保守疗法通常包括非类固醇抗炎药和其他口服镇痛药、减肥、物理治疗和运动。如果症状得不到有效缓解,采用非手术有创治疗,如注射皮质类固醇、透明质酸衍生物和其他生物活性注射剂^[49]。然而,关节软骨组织缺乏血管、淋巴、神经等系统,软骨细胞数量有限,加之结构损伤和普遍的炎症环境,均使软骨修复和关节功能恢复受限^[50]。现有的临床治疗技术,均或多或少的存在差强人意之处,而外周血来源间充质干细胞是具有取材简便、创伤小等优点的优质种子细胞,使组织工程化的理念被引入到软骨损伤治疗中,若被合理利用,将为软骨损伤修复带来了巨大的前景。

近年来,关于外周血来源间充质干细胞的研究逐渐增多,软骨组织工程的研究也取得了许多喜人的成绩,但软骨损伤的治疗仍旧是一个巨大的挑战,外周血来源间充质干细胞在软骨损伤修复应用方面仍需突破各种难题。目前软骨组织工程中一个较难攻坚的问题为间充质干细胞肥大分化,限制了其在软骨组织工程中的有效应用。大多数研究聚焦于提高间充质干细胞软骨分化能力,但间充质干细胞也具有成骨分化能力,使之诱导软骨形成时具有向晚期肥大分化,而后导致软骨内骨化的本质,成为一个不适合临床应用于关节软骨修复的问题。如何设计一种可靠的方案,使间充质干细胞在关节表面产生稳定的软骨,仍然是一个挑战。首先,不同种子细胞对软骨肥大分化有一定影响。CHEN等^[51]报道了骨髓来源间充质干细胞诱导分化的软骨细胞表型是不稳定的,发展到晚期肥大和组织矿化,最终导致软骨内骨化,其他间充质干细胞来源,如脂肪或滑膜,也存在肥大或不稳定的表型。FU等^[32]在利用兔作为供体进行实验时认为外周血来源

间充质干细胞和骨髓间充质干细胞具有相似的生物学特性,甚至更强大的成软骨分化能力,以及更弱的成骨能力,这使得外周血来源间充质干细胞在软骨修复的组织工程学方面具有更强的优势。其次,一般认为间充质干细胞成软骨分化是由多种信号因子共同参与的复杂过程,细胞因子在间充质干细胞的软骨分化中起着重要作用。BOS等^[52]在进行急性软骨损伤研究时发现转化生长因子 β 、成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子等的表达,这些生长因子对软骨修复发挥积极作用。而后的研究者也得出相似观点,其认为在生理状态下,导致软骨组织合成代谢的信号之间存在一种微调的平衡,特别受转化生长因子 β 家族调控,有关蛋白质和肽类,如成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、骨形态发生蛋白等可进一步增强转化生长因子 β 促软骨生成的作用^[53-54]。软骨组织工程的一个最新趋势是模拟体内生长因子共同作用环境,将生长因子组合应用以最大限度地发挥其影响作用,并模拟体内生长因子环境,以此抑制肥大分化等问题。陈松等^[55]在探究体外诱导兔滑膜来源间充质干细胞向软骨细胞分化的最佳细胞因子组合时发现,联合使用骨形态发生蛋白2、转化生长因子 $\beta 3$ 及地塞米松组产生的软骨微球体积、质量最大、软骨相关基因表达最多。CHIJIMATSU等^[56]也认为联合使用转化生长因子 $\beta 3$ 和骨形态发生蛋白2是诱导滑膜来源间充质干细胞软骨形成的最佳条件,能有效诱导软骨组织的形成,软骨组织富含蛋白多糖和II型胶原。ZHAO等^[33]将骨形态发生蛋白2、转化生长因子 $\beta 3$ 二者联合应用能更好地诱导外周血来源间充质干细胞成软骨分化,二者具有明显协同作用,并且在与脱钙骨基质复合修复滇南小耳猪骨缺损时,接近于周围正常软骨组织。在多种因子的共同作用下,外周血来源间充质干细胞有其成软骨优势,能作为更加理想的种子细胞应用于软骨组织工程。

外周血中间充质干细胞数量少,而动员剂可能存在的毒副作用难以避免,更加安全有效的动员方法还待研究。LONGHINI等^[57]使用电针刺刺激成功地将间充质干细胞动员到血液中,而没有产生其他干细胞动员剂(如肾上腺素、多巴胺、集落刺激因子或AMD3100)诸如发热、不适和疼痛所带来的不良反应。此研究为安全有效获得外周血来源间充质干细胞提供了一个新的方向,更多切实可行的方法还需要进一步探索。

关于外周血来源间充质干细胞在软骨组织工程中的应用,大致分为2类:一类为间充质干细胞的直接注射,另一类则为间充质干细胞体外成软骨诱导后再加之利用,他们的研究结果似乎均有积极的作用。然而,目前并没有相关实验进行两者之间的比较,体外诱导成软骨再行体内移植,是否可以缩短体内软骨修复效率,亦或是直接注射使细胞存在于体内微环境更有利于细胞生长分化,这些还不得而知,之后还需要进一步实验证实较佳的应用方式,以便为外周血来源间充质干细胞的临床应用提供一个切实可行的方式。

虽然现在只是停留在基础研究及动物和人体试验阶段,

与其他组织来源间充质干细胞相比，外周血来源间充质干细胞的培养相对困难，导致其在体内应用的报道较少，还没有任何实验能够产生令人信服的、可重复的、持久的、整合良好的关节软骨再生。相信随着科学的不断发展，相关研究的不断深入，外周血来源间充质干细胞将会给软骨损伤的治疗带来一个崭新的突破，具有良好的应用前景。

致谢：感谢导师李彦林教授的指导和文章审核。

作者贡献：杨腾云参与文献收集、分析总结、综述构思设计，李彦林、刘德健、王国梁负责项目指导与文章审核。全体作者都阅读并同意最终的文本。

经费支持：该文接受了“国家自然科学基金项目(81960409, 81760403)”“云南省科技厅-昆明医科大学联合基金重点项目[2017FE467(-007)]”及“云南省专家工作站项目(2018IC102)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南：该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

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，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”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] KIM SJ, SHETTY AA, KURIAN NM, et al. Articular cartilage repair using autologous collagen-induced chondrogenesis (ACIC): a pragmatic and cost-effective enhancement of a traditional technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020;28(8):2598-2603.

[2] LIU Y, MA Y, ZHANG J, et al. Exosomes: A Novel Therapeutic Agent for Cartilage and Bone Tissue Regeneration. *Dose Response.* 2019; 17(4):1559325819892702.

[3] RIFF AJ, HUDDLESTON HP, COLE BJ, et al. Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Allograft Transplantation Render Comparable Outcomes in the Setting of Failed Marrow Stimulation. *Am J Sports Med.* 2020;48(4):861-870.

[4] GUGJOO MB, AMARPAL A, SHARMA GT, et al. Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds. *Indian J Med Res.* 2016;144(3):339-347.

[5] PUNWAR S, KHAN WS. Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *Open Orthop J.* 2011;5 Suppl 2:296-301.

[6] PELTTARI K, WINTER A, STECK E, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10): 3254-3266.

[7] LOLLI A, PENOLAZZI L, NARCISI R, et al. Emerging potential of gene silencing approaches targeting anti-chondrogenic factors for cell-based cartilage repair. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(19):3451-3465.

[8] RAGNI E, PERUCCA ORFEI C, DE LUCA P, et al. Secreted Factors and EV-miRNAs Orchestrate the Healing Capacity of Adipose Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1582.

[9] LIN W, XU L, LIN S, et al. Characterisation of multipotent stem cells from human peripheral blood using an improved protocol. *J Orthop Translat.* 2019;19:18-28.

[10] PIÑEIRO-RAMIL M, SANJURJO-RODRÍGUEZ C, CASTRO-VIÑUELAS R, et al. Usefulness of Mesenchymal Cell Lines for Bone and Cartilage Regeneration Research. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6286.

[11] JAIN A, KHADWAL A, SACHDEVA MUS, et al. Variables affecting the presence of mesenchymal stromal cells in peripheral blood and their relationship with apheresis products. *Br J Haematol.* 2020;189(4):772-776.

[12] LOTFY A, EL-SHERBINY YM, CUTHBERT R, et al. Comparative study of biological characteristics of mesenchymal stem cells isolated from mouse bone marrow and peripheral blood. *Biomed Rep.* 2019;11(4): 165-170.

[13] KIM J, SHAPIRO L, FLYNN A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2015;151:8-15.

[14] DABROWSKA S, ANDRZEJEWSKA A, LUKOMSKA B, et al. Neuroinflammation as a target for treatment of stroke using mesenchymal stem cells and extracellular vesicles. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):178.

[15] GU J, HUANG L, ZHANG C, et al. Therapeutic evidence of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation for cerebral palsy: a randomized, controlled trial. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):43.

[16] GUGJOO MB, HUSSAIN S, AMARPAL A, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immuno-Modulatory and Anti-Inflammatory Mechanisms in Immune and Allergic Disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2020;14(1):3-14.

[17] IJIMA H, ISHO T, KUROKI H, et al. Effectiveness of mesenchymal stem cells for treating patients with knee osteoarthritis: a meta-analysis toward the establishment of effective regenerative rehabilitation. *NPJ Regen Med.* 2018;3:15.

[18] GARZA JR, CAMPBELL RE, TJOUMAKARIS FP, et al. Clinical Efficacy of Intra-articular Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Double-Blinded Prospective Randomized Controlled Clinical Trial. *Am J Sports Med.* 2020;48(3):588-598.

[19] BASTOS R, MATHIAS M, ANDRADE R, et al. Intra-articular injections of expanded mesenchymal stem cells with and without addition of platelet-rich plasma are safe and effective for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2018;26(11):3342-3350.

[20] FREITAG J, BATES D, WICKHAM J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Regen Med.* 2019;14(3):213-230.

[21] RANMUTHU CDS, RANMUTHU CKI, KHAN WS. Evaluating the Current Literature on Treatments Containing Adipose-Derived Stem Cells for Osteoarthritis: a Progress Update. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(11):67.

[22] DRAGANSKI E, DEASON T, CRAIG FE. Bone Marrow Aspiration and Biopsy Performed by RNs: A Review of Clinical Practice. *Am J Nurs.* 2019;119(9):47-53.

[23] 杨春水, 杨志刚, 李建英, 等. 成人外周血间充质干细胞诱导为神经元样细胞的体外研究 [J]. *交通医学*, 2010,24(6):602-604.

[24] WANG SJ, JIANG D, ZHANG ZZ, et al. Chondrogenic Potential of Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded on Demineralized Cancellous Bone Scaffolds. *Sci Rep.* 2016;6:36400.

[25] SATO K, YAMAWAKI-OGATA A, KANEMOTO I, et al. Isolation and characterisation of peripheral blood-derived feline mesenchymal stem cells. *Vet J.* 2016;216:183-188.

- [26] CASADO JG, GOMEZ-MAURICIO G, ALVAREZ V, et al. Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;147(1-2):104-112.
- [27] LYAHYAI J, MEDIANO DR, RANERA B, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res.* 2012;8:169.
- [28] SPAAS JH, DE SCHAUWER C, CORNILLIE P, et al. Culture and characterisation of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells. *Vet J.* 2013;195(1):107-113.
- [29] CHONG PP, SELVARATNAM L, ABBAS AA, et al. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2012;30(4):634-642.
- [30] KASSIS I, ZANGI L, RIVKIN R, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(10):967-976.
- [31] FU Q, ZHANG Q, JIA LY, et al. Isolation and Characterization of Rat Mesenchymal Stem Cells Derived from Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood. *Cells Tissues Organs.* 2015-2016; 201(6):412-422.
- [32] FU WL, ZHOU CY, YU JK. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 2014;42(3):592-601.
- [33] ZHAO D, LI Y, ZHOU X, et al. Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells Combined with Modified Demineralized Bone Matrix Promote Pig Cartilage Defect Repair. *Cells Tissues Organs.* 2018;206(1-2):26-34.
- [34] KUZNETSOV SA, MANKANI MH, GRONTHOS S, et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1133-1140.
- [35] FERNÁNDEZ M, SIMON V, HERRERA G, et al. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20(4):265-271.
- [36] READING L, STILL K, BISHOP N, et al. Peripheral blood as an alternative source of mesenchymal stem cells. *J Bone Mineral Res.* 2000;15(6): 1239-1239.
- [37] HOPPER N, WARDALE J, BROOKS R, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Enhance Cartilage Repair in in vivo Osteochondral Defect Model. *PLoS One.* 2015;10(8):e0133937.
- [38] 赵岚, 季洲, 张锐, 等. β - 联蛋白促进大鼠外周血间充质干细胞存活及扩增 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(8):880-887.
- [39] LI Z, CHEN S, MA K, et al. Comparison of different methods for the isolation and purification of rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res.* 2019:1-9.
- [40] SPAAS JH, OOSTERLINCK M, BROECKX S, et al. Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: A case report. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 2012;81(1):11-15.
- [41] BROECKX S, SULS M, BEERTS C, et al. Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(6):497-503.
- [42] BROECKX S, BORENA BM, ZIMMERMAN M, et al. Intravenous application of allogenic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a safety assessment in 291 equine recipients. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(6):452-457.
- [43] BROECKX SY, SEYS B, SULS M, et al. Equine Allogeneic Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells Are an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. *Stem Cells Dev.* 2019;28(6): 410-422.
- [44] BROECKX SY, MARTENS AM, BERTONE AL, et al. The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: A randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. *Equine Vet J.* 2019;51(6):787-794.
- [45] DAEMS R, VAN HECKE L, SCHWARZKOPF I, et al. A Feasibility Study on the Use of Equine Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Natural Occurring Osteoarthritis in Dogs. *Stem Cells Int.* 2019;2019:4587594.
- [46] DEBOSSCHERE Y, DEPUYDT E, PAUWELYN G, et al. Safety and immunomodulatory properties of equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells in healthy cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 2020;227:110083.
- [47] VEBER M, VOGLER J, KNEŽEVIĆ M, et al. Combination of Filtered Bone Marrow Aspirate and Biomimetic Scaffold for the Treatment of Knee Osteochondral Lesions: Cellular and Early Clinical Results of a Single Centre Case Series. *Tissue Eng Regen Med.* 2020;17(3):375-386.
- [48] FU WL, AO YF, KE XY, et al. Repair of large full-thickness cartilage defect by activating endogenous peripheral blood stem cells and autologous periosteum flap transplantation combined with patellofemoral realignment. *Knee.* 2014;21(2):609-612.
- [49] ARSHI A, PETRIGLIANO FA, WILLIAMS RJ, et al. Stem Cell Treatment for Knee Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2020;13(1):20-27.
- [50] JAFRI MA, KALAMEGAM G, ABBAS M, et al. Deciphering the Association of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using an ex vivo Osteochondral Culture System. *Front Cell Dev Biol.* 2020;7:380.
- [51] CHEN S, FU P, CONG R, et al. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis.* 2015;2(1):76-95.
- [52] BOS PK, VAN OSCH GJ, FRENZ DA, et al. Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit auricular cartilage wound model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(4):382-389.
- [53] BRANLY T, BERTONI L, CONTENTIN R, et al. Characterization and use of Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Cartilage Engineering. Study of their Hyaline Cartilage Forming Potential when Cultured under Hypoxia within a Biomaterial in the Presence of BMP-2 and TGF- β 1. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(5):611-630.
- [54] FAN L, CHEN J, TAO Y, et al. Enhancement of the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage repair by ghrelin. *J Orthop Res.* 2019;37(6):1387-1397.
- [55] 陈松, 符培亮, 丛锐军, 等. TGF- β 3、BMP-2 及地塞米松诱导兔滑膜 MSCs 成软骨分化的研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(1): 92-99.
- [56] CHIJIIMATSU R, KOBAYASHI M, EBINA K, et al. Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro. *Cytotechnology.* 2018;70(2):819-829.
- [57] LONGHINI ALF, SALAZAR TE, VIEIRA C, et al. Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells demonstrate immunomodulatory potential for therapeutic use in horses. *PLoS One.* 2019;14(3):e0212642.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)