

关节内注射间充质干细胞治疗退行性膝骨关节炎临床研究进展

龚恒¹ 陈连旭² 黄斌¹

1 清华大学临床医学院(北京 100084)

2 清华大学附属北京清华长庚医院(北京 102218)

关键词 间充质干细胞;膝关节炎;关节腔内注射;临床进展

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种发生于中老年人群的常见肌骨系统疾病,其发生率及病情进展随年龄的增大而提高。由于该疾病以关节软骨退化、半月板磨损和骨赘形成为突出特征,因而被认为是一种退行性改变。KOA在全世界范围内的发病率很高,在全球范围内统计的291种疾病中,该病的患病人数从1990年的1050万增加到2010年的1710万^[1]。流行病学研究报告显示我国KOA的发病率为5.5%~10.8%^[2]。目前所应用的KOA治疗手段都无法从根本上逆转疾病的发展进程,在疾病晚期,常常需要全膝关节置换等手术治疗。目前针对非终末期的骨关节炎患者,国际上兴起了以间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植技术为主的治疗方法,在国外广受关注并应用于临床,在国内还仅限于动物实验和较小规模的临床实验阶段。本综述主要通过Pubmed数据库,以“Mesenchymal Stem Cells、Intra-Articular Injection、Osteoarthritis”为关键词进行检索,主要关注了<Stem cells>、<Osteoarthritis Cartilage>、<Transplantation>等杂志发表的有关MSCs的基础、动物和临床实验文献,就MSCs促进软骨再生的机制、关节腔注射MSCs的疗效、给药的不同方法及MSCs注射的副反应等方面进行总结,为国内进行MSCs的研究和应用提供参考。

1 间充质干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具备向软骨细胞、脂肪细胞和骨细胞等间叶组织分化的能力,对人体结缔组织的支持维护起部分作用的成体干细胞,在人体骨髓、脂肪、滑膜等组织中广泛存在^[3]。从不同部位收集并培养出的MSCs在免疫表型、多向分化能力上存在不同程度的差异。Barry等^[4]分析了膝关节周围不同组织来源的MSCs的特点,发现脂肪来源的间充质干细胞(adipose derived MSCs, AD-MSCs)和骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow de-

rived MSCs, BM-MSCs)都具备很强的增殖分化能力,而其他部位干细胞的增殖分化活性相对较弱。因此,临床上也常用脂肪和骨髓来源的MSCs作为“种子细胞”来对患者进行治疗。

2 间充质干细胞治疗膝骨关节炎的机制

针对MSCs和KOA的关系研究较多。大多数学者认为MSCs在结缔组织的再生和损伤修复方面发挥着重要作用^[5]。研究发现MSCs组织修复的机制主要表现在两方面:自身分化形成组织细胞和促进周边细胞向缺损组织转化。

一方面MSCs能直接分化形成相关组织来补充该损伤部位的缺损^[6]。干细胞体外实验表明, MSCs作为一种多能干细胞,其本身具备多向分化的能力。将MSCs进行单独培养,在培养基中加入转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β), MSCs可向软骨细胞方向分化^[7],研究人员可通过检测培养基中关节软骨的特殊成分如:硫酸软骨素、II型胶原蛋白等直接观测到软骨组织的生成。由于MSCs本身所具备的分化能力,也催生了生物支架技术:将MSCs植入到生物支架中,培养一段时间后,再将生物支架植入软骨缺损部位,以其本身的软骨化能力,促进关节软骨的修复。

另一方面, MSCs在受到周边微环境的作用时,可以分泌细胞活性因子促进其周围的细胞再生,这种旁分泌作用称为营养作用(trophic)^[8]。目前认为, MSCs这种对周边细胞的旁分泌作用是促使软骨修复的主要途径^[9]。研究表明^[10], MSCs通过细胞的出胞作用,形成大量外泌体(exosome),这些外泌体携带各种营养因子及MicroRNA(miRNA),通过旁分泌作用,促进周围细胞向软骨细胞转化。将MSCs所形成的外泌体分离单独培养,同样可以达到软骨修复的目的^[11]:研究人员构建了关节软骨缺损的大鼠模型,分别注射MSCs外泌体和磷酸盐缓冲液,在第6周和第12周解剖膝关节,在大体

收稿日期:2019.10.26

基金项目:北京市医院管理中心“青苗”计划专项经费资助(QML20180403)

第1作者:龚恒, Email: gh19@mails.tsinghua.edu.cn; 通信作者:陈连旭, Email:bjchenlx69@163.com

和镜下可以观察到明显再生的关节软骨。因此,有研究者^[9]认为,直接分离 MSCs 中针对软骨细胞修复而形成的外泌体并将其应用于临床,可能会是未来治疗 OA 的新方向。但目前 MSCs 所生成的外泌体成分复杂,很难将其彻底完全解析。有研究者发现^[12],将人脐带血 MSCs 内的小血小板反应蛋白-2 (thrombospondin-2, TSP-2) 基因表达阻断后,与软骨母细胞共同培养,会使后者合成的硫酸软骨素和软骨生成减少;而在培养基中加入外源性的 TSP-2 后,会使软骨母细胞的软骨化能力增强。此外,研究人员还发现将 TSP-2 单独注入该模型中,软骨缺损处将出现少量的透明软骨,而将脐带血 MSCs 的 TSP-2 分泌进行阻断,再进行实验,则会发现透明软骨生成明显减少。因此,他们认为 TSP-2 是 MSCs 生成的外泌体中促进细胞向软骨细胞分化的有效成分之一。此外,miRNA 作为一种可以特异性抑制目标蛋白基因表达的小分子备受关注,相关研究也表明外泌体中所含有的多种 miRNA 在诱导软骨细胞生成、抑制骨关节炎病情进展等方面也扮演了重要角色,例如 miRNA-23b 可以通过下调蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 促进细胞向软骨细胞分化^[13], miRNA-145 可以特异性抑制 Smad3 基因的表达以减少基质金属蛋白酶-13 (matrix metalloproteinases, MMP-13) 的产生^[14]。因此,依靠这种旁分泌作用,间充质干细胞能够作为组织细胞的储存库,当组织发生损伤时,可以再生出受损组织以保证人体正常的生理活动。

此外,间充质干细胞也可参与调控 T 细胞相关的免疫反应,进一步抑制骨关节炎相关的炎症反应,从而减缓 KOA 的病程进展^[4, 6, 8]。研究发现,从终末期膝关节炎患者体内提取出的 MSCs,其分裂分化活性都显著低于正常人体中的 MSCs^[15]。随着年龄的增长,人体内各部位 MSCs 的成软骨能力会逐渐下降^[4]。有研究构建了退行性膝关节炎的动物模型^[16],研究人员用超顺磁性氧化铁纳米粒子对 BM-MSCs 进行标记,然后将其注射到膝关节内,实验结果虽然没能观测到新的软骨形成,但在 MRI 下可以观察到标记的 BM-MSCs 会在注射后 8~24 小时内向软骨缺损区移动,说明 MSCs 对组织损伤存在主动修复倾向。综上所述, MSCs 在遏制 KOA 的病情进展方面存在巨大的治疗潜力。

3 关节内注射间充质干细胞的临床研究

目前国外针对 MSCs 的临床研究有很多,已有相关的药物问世^[17]。目前普遍采取的方法是将 MSCs 制成细胞悬液,向关节腔内直接注射,这种方式简单易行,对患者损伤较小,在临床试验中广泛应用。

作为治疗细胞的 MSCs 来源比较广泛,其中 BM-MSCs 和 ADMSCs 是目前临床试验常用的治疗细胞。

研究表明 ADMSCs 在免疫抑制、防止 OA 进一步恶化方面的特点更为突出^[18],而在软骨化方面相较于 BM-MSCs 并不占优势^[19]。但临床上提取 BM-MSCs 相对困难,且 BM-MSCs 相对缺乏,仅占吸出物的 0.001%~0.002%^[20, 21],而 ADMSCs 可以占到吸出物有核细胞的 1%~7%^[22]。更重要的是,ADMSCs 的分裂分化活性相比于 BM-MSCs 更不易受患者年龄和病情等因素影响^[23]。因此,目前选择 ADMSCs 进行临床研究较多。

长期随访结果表明,ADMSCs 对 Kellgren-Lawrence 分级为 I~III 级的 KOA 患者治疗效果良好。Jo 等^[24]从患者腹部抽取脂肪分离干细胞并体外培养,将获取的 ADMSCs 分三个浓度梯度: 1×10^7 个(低剂量)、 5×10^7 个(中剂量)、 1×10^8 个(高剂量),分别注入三组患者关节腔内,在干预后 1 月、2 月、3 月和 6 月进行膝关节功能评估,3 月和 6 月时进行膝关节核磁共振扫描,6 月时进行关节镜检查。结果发现,各组患者的膝关节功能及症状明显改善, MRI 和关节镜检查显示明显的软骨再生,且软骨再生情况与 MSCs 的剂量有关,高浓度组的软骨再生情况明显高于低剂量组。一项评估 MSCs 缓解骨关节炎患者临床症状如疼痛、僵硬程度、活动能力的临床研究中(phase I/II)^[25],纳入 32 名患者,其中包括 Kellgren-Lawrence 分级为 IV 级的患者,分别注射 10×10^6 个(低剂量)、 10×10^7 个(高剂量),并与注射透明质酸的患者作对照,进行随机双盲研究,利用疼痛视觉模拟评分法(visual analogue scale/score, VAS)和膝关节炎评分系统(The Western Ontario and McMaster Universities, WOMAC)量表评分进行评估。通过四年的随访,发现高剂量组治疗的膝关节炎患者临床症状的改善程度明显高于低剂量组和对照组。其他的临床研究,通过膝关节损伤和骨关节炎评分(the knee injury and osteoarthritis score, KOOS)、WAMAC 等量表评分,结合膝关节 MRI 和关节镜检查,证明关节腔内注射 ADMSCs 对膝骨关节炎患者的功能改善、症状缓解甚至软骨再生都有良好的治疗效果^[126-29]。

有临床研究比较了多次膝关节注射和单次膝关节注射 ADMSCs 的疗效。研究中^[30]纳入了 30 名患者,将其分为三组,一组患者进行单次的膝关节腔内注射 MSCs: 100×10^6 , 一组患者注射后 6 个月后进行再次注射,每次注射剂量为 100×10^6 , 对照组采取传统疗法,利用 WOMAC 和 KOOS 评分量表进行评估。随访 1 年,结果显示:相对于对照组,关节注射 ADMSCs 的患者膝关节功能改善明显,两次注射 ADMSCs 的患者得到更稳定的临床效果。该研究不仅证实了注射 ADMSCs 的治疗效果,也证明了膝关节多次注射 ADMSCs 临床效果更好。但目前针对多次给药和单次给药的对比性研究较少,尚需更多的临床研究结果加以证实。

临床实验所使用的 MSCs 悬液大多是以生理盐水作为载体进行关节注射,也有研究将富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)和透明质酸(hyaluronic acid, HA)作为载体,联合 MSCs 进行给药^[31]。研究者利用患者自身髌下脂肪垫分离提取 ADMSCs,在体外扩增后,联合自身来源的 PRP 进行膝关节腔注射,对照组给予相同剂量的 PRP,利用 Lysholm 量表评分、Tegner 活动指数量表和疼痛 VAS 评分量表进行评估,结果显示实验组患者的治疗效果优于对照组。在 MSCs 联合 HA 及 PRP 进行的对比性研究中,实验组患者不仅临床症状得到明显改善,而且在术前和术后多次的 MRI 检查中,通过测量胫骨平台软骨厚度并进行术前和术后对比,均显示出明显的软骨再生^[32]。相关研究^[33]探讨了 MSCs 与 PRP 和 HA 共同使用后的联合促进效应,他们观察到 MSCs 结合 PRP 及 HA 关节内注射后,可以显著增加 MSCs 的增殖和软骨分化能力,这与 PRP 及 HA 成分中含有丰富的生长因子有关。但也有研究^[34]表明, MSCs 联合 PRP 膝关节腔注射治疗后,患者在膝关节功能和疼痛的缓解方面,与单独注射 MSCs 无明显差别,但该研究缺乏相应的影像学或组织学证据。

此外,目前临床上多采用自体 MSCs 进行相关研究,一方面, MSCs 来源广泛,容易获取,且自体 MSCs 分离、扩增后注入人体,可以避免免疫排斥反应,另一方面,使用自体 MSCs 可以有效地规避医学伦理问题。虽然自体 MSCs 具备很多优势,但是其劣势也十分明显:一是患者需要二次手术,会增加患者的抵触情绪;二是 MSCs 的分化能力会随患者的年龄增长而减弱,因此自体来源的 MSCs 针对老年患者的治疗效果可能不佳。应用同种异体 MSCs 治疗 KOA 也取得良好的临床效果^[35]。研究者使用异体来源的 BM-MSCs 进行膝关节腔内注射,对照组注射 HA,并在实验中设立了组内对照,随访时使用 WOMAC、VAS 评分量表评估患者临床症状的改善程度,术前和术后进行膝关节核磁共振扫描,评估患者的关节软骨变化情况,实验结果显示,实验组患者的临床症状和软骨质量的改善情况都明显优于对照组。有研究者^[36]使用同种异体 MSCs 对患者进行治疗,长达 7 年的随访结果显示,患者膝关节软骨缺损部位出现了软骨再生,且与周边固有的软骨整合良好。但该研究不是关节内直接注射同种异体 MSCs,而是利用 MSCs 与透明质酸混合形成凝胶状物质,对软骨缺损进行修补,3 年后的 MRI 结果显示软骨缺损处有新的软骨形成,钆增强造影显示关节表面有大量造影剂富集。

针对 MSCs 治疗 KOA 的研究,研究对象大部分都是 Kellgren-Lawrence 分级为 III 级以下患者,显示出较好的临床效果。但针对 Kellgren-Lawrence 分级 III 级以上患者的治疗,相关研究较少。近年研究报道了采用

自体 BM-MSCs 对 12 名 Kellgren-Lawrence 分级 III 级以上患者进行治疗^[37],24 个月的随访结果显示:大部分患者在 VAS 及 KOOS 评分上都有较为明显的好转,但 MRI 上并未发现明显的软骨再生。分析认为这是由于晚期的膝关节炎患者体内的 MSCs 软骨分化能力减弱造成的。该研究与其他研究显示软骨再生的结果不一致^[24, 36, 38]。另一研究^[32]同样对 Kellgren-Lawrence 分级 III 级以上患者进行研究,应用脐带血来源的 MSCs 进行治疗,观测到了很好的软骨再生情况,认为与脐带血 MSCs 的软骨分化能力较强有关。目前关于 MSCs 对终末期 KOA 患者治疗的应用尚需进一步研究。

从目前所进行的临床研究中长期随访结果来看,膝关节腔内注射 MSCs 尚未发现明显的不良反应^[39]。一项随机分组对照研究^[27]纳入 53 名 Kellgren-Lawrence 分级为 II~IV 级的患者,分两次注射 5×10^7 数量的 MSCs,以注射透明质酸为对照,随访 12 个月,结果显示,实验组患者仅有轻微的不良反应,如局限性肿胀、进针点疼痛等,与对照组相比无显著性差别。且这些不良反应均在 7 天内自行缓解。目前在各种动物及人体中进行的临床实验中,均未出现严重的不良反应^[26, 29, 40-42],在一项研究 MSCs 疗效的荟萃分析^[43]中,参与统计的 11 项研究均未出现严重不良反应,显示利用 MSCs 治疗骨关节炎具备临床所要求的安全性和可靠性。

4 总结

目前针对 MSCs 的相关研究仍然存在一些问题。由于 MSCs 的特殊性,无法扩大实验规模,目前的研究样本一般不超过 50 人,缺少大规模的双盲随机对照研究,研究结果缺乏足够的说服力。同时由于自体来源 MSCs 的诸多限制,无法大规模开发和临床应用。但 MSCs 作为一种具备多向分化能力的组织干细胞,因其独特的组织学特性已应用于临床的多个领域,如应用于治疗肝脏组织纤维变性^[44]和促进骨骼肌再生^[45]等,均取得了良好的临床效果。在膝关节炎治疗方面,利用 MSCs 强大的软骨化能力,可以使关节软骨的损伤得以修复,停止甚至逆转膝骨关节炎的病情发展。未来需要加强同种异体 MSCs 治疗 KOA 的研究,筛选优化分化能力强的 MSCs,进行商业化规模化开发,为广大骨关节炎患者带来福音。

5 参考文献

- [1] Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73 (7):1323-1330.
- [2] Tang X, Wang S, Zhan S, et al. The prevalence of

- symptomatic knee osteoarthritis in China: results from the China health and retirement longitudinal study. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(3):648–653.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411):143–147.
- [4] Barry F and Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(10):584–594.
- [5] Kong L, Zheng LZ, Qin L, et al. Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J Orthop Translat*, 2017, 9:89–103.
- [6] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2):341–347.
- [7] Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, et al. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng*, 2010, 20(3):145–158.
- [8] Caplan AI and Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006, 98(5):1076–1084.
- [9] Toh WS, Lai RC, Hui JHP, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 67:56–64.
- [10] Phinney DG and Pittenger MF. Concise Review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. *Stem Cells*, 2017, 35(4):851–858.
- [11] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(12):2135–2140.
- [12] Jeong SY, Kim DH, Ha J, et al. Thrombospondin-2 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promotes chondrogenic differentiation. *Stem Cells*, 2013, 31(10):2136–2148.
- [13] Ham O, Song BW, Lee SY, et al. The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling. *Biomaterials*, 2012, 33(18):4500–4507.
- [14] Yang B, Kang X, Xing Y, et al. Effect of microRNA-145 on IL-1 β -induced cartilage degradation in human chondrocytes. *FEBS Letters*, 2014, 588(14):2344–2352.
- [15] Murphy JM, Dixon K, Beck S, et al. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(3):704–713.
- [16] Xia T, Yu F, Zhang K, et al. The effectiveness of allogeneic mesenchymal stem cells therapy for knee osteoarthritis in pigs. *Ann Transl Med*, 2018, 6(20):404.
- [17] Yano K, Watanabe N, Tsuyuki K, et al. Regulatory approval for autologous human cells and tissue products in the United States, the European Union, and Japan. *Regen Ther*, 2015, 1:45–56.
- [18] Waldner M, Zhang W, James IB, et al. Characteristics and immunomodulating functions of adipose-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells across defined human leukocyte antigen barriers. *Front Immunol*, 2018, 9:1642.
- [19] Im GI, Shin YW and Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(10):845–853.
- [20] Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(4):761–773.
- [21] Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Blanco-Gelaz MA, et al. Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. *Transplant Proc*, 2013, 45(1):434–439.
- [22] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006, 24(5):1294–1301.
- [23] Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*, 2008, 26(6):664–675.
- [24] Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*, 2014, 32(5):1254–1266.
- [25] Lamo-Espinosa JM, Mora G, Blanco JF, et al. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: long-term follow up of a multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *J Transl Med*, 2018, 16(1):213.
- [26] Lee WS, Kim HJ, Kim KI, et al. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(6):504–511.
- [27] Lu L, Dai C, Zhang Z, et al. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1):143.
- [28] Matas J, Orrego M, Amenabar D, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis: repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(3):215–224.
- [29] Khalifeh Soltani S, Forogh B, Ahmadbeigi N, et al. Safety and efficacy of allogeneic placental mesenchymal stem cells for treating knee osteoarthritis: a pilot study.

- Cytherapy, 2019, 21(1):54-63.
- [30] 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.
- [31] Koh YG and Choi YJ. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *The Knee*, 2012, 19(6):902-907.
- [32] 韩健, 殷振华, 李富航, 等. 人自体脂肪间充质干细胞治疗骨关节炎的临床研究. *实用骨科杂志*, 2017, 23(03):235-239.
- [33] Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, et al. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015, 23(5):1308-1316.
- [34] 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.
- [35] Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, et al. Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial. *Transplantation*, 2015, 99(8):1681-1690.
- [36] Park YB, Ha CW, Lee CH, et al. Cartilage regeneration in osteoarthritic patients by a composite of allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel: results from a clinical trial for safety and proof-of-concept with 7 Years of extended follow-up. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(2):613-621.
- [37] Chahal J, Gomez-Aristizabal A, Shestopaloff K, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cell treatment in patients with osteoarthritis results in overall improvement in pain and symptoms and reduces synovial inflammation. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(8):746-757.
- [38] de Windt TS, Vonk LA, Slaper-Cortenbach IC, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons. *Stem Cells*, 2017, 35(1):256-264.
- [39] Song Y, Du H, Dai C, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen Med*, 2018, 13(3):295-307.
- [40] Marinas-Pardo L, Garcia-Castro J, Rodriguez-Hurtado I, et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Horse Allo 20) for the Treatment of osteoarthritis-associated lameness in horses: characterization, safety, and efficacy of intra-articular treatment. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(17):1147-1160.
- [41] Harman R, Carlson K, Gaynor J, et al. A prospective, randomized, masked, and placebo-controlled efficacy study of intraarticular allogeneic adipose stem cells for the treatment of osteoarthritis in dogs. *Front Vet Sci*, 2016, 3:81.
- [42] Riester SM, Denbeigh JM, Lin Y, et al. Safety studies for use of adipose tissue-derived mesenchymal stromal/stem cells in a rabbit model for osteoarthritis to support a phase I clinical trial. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(3):910-922.
- [43] Yubo M, Yanyan L, Li L, et al. Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0175449.
- [44] Eom YW, Shim KY and Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med*, 2015, 30(5):580-589.
- [45] Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett*, 2015, 589(11):1257-1265.