

富血小板血浆联合骨髓间充质干细胞 对兔股骨头坏死的影响

杜刚, 李林, 张波, 韦程寿, 唐俊, 黄克*
(广西医科大学第三附属医院骨一科, 南宁 530031)

[摘要] **目的:**研究富血小板血浆(PRP)联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)对兔股骨头坏死的治疗效果。**方法:**随机将 50 只新西兰兔随机分为空白对照组、模型组、PRP(3%)组、BMSCs(1×10^6 /mL)组、PRP 与 BMSCs 联合组。无菌环境下,建立兔股骨头坏死模型,术后 4 周 PRP 组 1 次性注射植入 RPR 12 mg, BMSCs 组单纯 1 次性注射植入 BMSCs 1 mL,PRP 与 BMSCs 联合组股骨头内髓芯减压后 1 次性注射植入 BMSCs 1 mL 与 PRP 12 mg 复合物,空白对照组与模型组不植入任何物质作为对照。造模后第 12 周,取材。采用 HE 染色,光镜下观察骨髓腔内骨小梁结构和骨细胞、脂肪细胞的变化情况;蛋白质印迹法(Western blot 法)检测损伤的兔股骨头中血小板衍生因子(PDGF)蛋白的表达水平。**结果:**与空白对照组比较,模型组骨髓腔内骨小梁变细或坏死,骨细胞减少,骨头疏松,脂肪细胞增多。骨陷窝空缺率高($P < 0.05$)。与模型组比较,各治疗组骨髓腔内骨小梁变粗,排列整齐,骨细胞增多,脂肪细胞减少。骨陷窝空缺率降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。PRP 组、BMSCs 组、PRP 与 BMSCs 联合组骨髓组织 PDGF 蛋白表达水平与模型组相比均有明显的提高,其中 PRP 与 BMSCs 联合组 PDGF 蛋白表达水平最高($P < 0.05$)。**结论:**PRP、BMSCs 在一定程度上可使骨细胞增殖,减少骨陷窝空缺率,抑制骨髓腔内脂肪细胞,增加损伤股骨头中骨髓组织 PDGF 蛋白表达,促进股骨头再生。

[关键词] 富血小板血浆; 骨髓间充质干细胞; 股骨头; 骨陷窝空缺; 血小板衍生因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0213-04

[doi] 10.11653/syfy2013160213

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130607.1126.002.html>

[网络出版时间] 2013-06-7 11:26

Effect of Platelet Rich Plasma Combined with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Rabbit Femoral Head Necrosis

DU Gang, LI Lin, ZHANG Bo, WEI Cheng-shou, TANG Jun, HUANG Ke*
(Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of platelet rich plasma (PRP) combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in treatment of rabbit femoral head necrosis. **Method:** Fifty rabbits were randomly divided into normal group, model group, PRP group (3%), BMSCs group (1×10^6 /mL) and combination group. The model of rabbit femoral head necrosis was made by operation. After 4 weeks of operation, the PRP group was implanted the PRP, the BMSCs group was implanted the BMSCs, the combination group implanted the PRP and BMSCs. Normal group was not treated. The rabbit femoral head necrosis were observed by HE trichrome coloration after 12 weeks of operation. The change of the trabeculae of bone, bone cells in the bone, fat cells were observed by light microscopy. Then PDGF protein in the rabbit femoral head was tested by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the trabecular of bone became thinner, decreased in bone cells,

[收稿日期] 20120327(026)

[基金项目] 南宁市科技局重大专项(南科发字[2010]33号201001026C)

[第一作者] 杜刚,博士研究生,主治医师,从事骨髓干细胞治疗骨病的基础研究,E-mail:1730951693@qq.com

[通讯作者] *黄克,主任医师,从事骨关节炎的临床与基础研究,E-mail:jackabede@126.com

fat cells increased, empty osteocyte lacuna in the trabeculae were increased in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, in all treatment groups trabecular bone became thicker, bone cells increased, fat cells decrease, empty osteocyte lacuna in the trabeculae were decreased and improved the expression of PDGF in the rabbit femoral head ($P < 0.05$). **Conclusion:** PRP combined with BMSCs can effectively induce bone regeneration, improved the expression of PDGF and improve bone tissue recovery.

[**Key words**] PRP; BMSCs; femoral head; empty osteocyte lacuna; PDGF

股骨头坏死是股骨头最常见的疾病,好发于青壮年,病变导致关节软骨破坏和股骨头塌陷,最终造成髋关节功能丧失。激素、乙醇等各种原因导致的股骨头坏死均以股骨头局部缺血为其最终病理改变,因而如何改变股骨头局部血供、促进血管再生和关节软骨及骨组织形成、保存自体股骨头并防止其塌陷已成为各种治疗的重点^[1]。Antonio 等研究表明富血小板血浆具有软组织的功能修复和骨组织再生中起到重要的作用^[2],而且富血小板血浆 (PRP) 内含多种生长因子,其本身还可作为支架材料、凝固后具可塑性^[3]。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 可以分化为骨细胞、软骨细胞或脂肪细胞等功能。本研究观察 PRP 联合 BMSCs 对兔股骨头坏死的影响,为进一步开发研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 正常健康新西兰大白兔,雌雄各半,4 个月龄,体重 2.6~3.2 kg,由广西医科大学实验动物中心提供,试验动物生产许可证 SCXK(桂)2009-0002,试验动物使用许可证 SCXK(桂)2009-0005。

1.2 试剂 H-DMEM 培养基(北京索来宝,批号 20120815),标准胎牛血清[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,批号 NWJ0473],胰蛋白酶(北京索来宝,批号 Lot. 20120702),多克隆 PDGF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology,批号 QD-1303),兔抗羊 IgG-HRP 抗体(上海江莱生物科技有限公司,批号 2013-0218),预染蛋白 Marker(西安润德生物技术有限公司,批号 RD1301),大肠杆菌内毒素 (Sigma 公司,批号 L-2630)。

1.3 仪器 BH-Z 普通光学显微镜 (Olympus), Airtech 无菌超净工作台 (苏州富泰洁净系统有限公司),低温高速离心机 (德国 Heraeus),常温高速离心机 (美国, Thermofisher), -40 °C 低温冰箱 (青岛海尔股份有限公司)。

2 方法

2.1 PRP 制备 采用 PCCS kit 法^[4] 无菌提取 PRP,具体过程为:取 5.0 mL 新西兰大白兔股静脉血加入预先放置 10% 枸橼酸钠抗凝剂的离心管

中,离心 3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 3 min 45 s,吸取上层血浆及血小板,再次离心,3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 13 min,弃上层清液后与激活剂(凝血酶与 10% CaCl_2 的混合物)适当比例震荡,混匀,静置于 4 °C 冰箱过夜,再离心,1 500 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min,吸出上清液(即为 PRP 液),调节至 3% 备用。

2.2 BMSCs 培养^[5] 取新生兔断颈法处死,医用乙醇浸泡消毒 3 次,无菌分离兔四肢长骨干,剔除软组织。分离出股骨与胫骨,并将其表面组织剥离干净,骨两端用剪刀断开,暴露髓腔,采用一次性注射器吸取 PBS 缓冲液反复冲洗骨髓腔 15 次,直至骨髓腔呈灰白色。将冲洗液合并置于离心管中,加 PBS 缓冲液至 10 mL,平衡。采用全骨髓培养与差速贴壁分离法培养并纯化 BMSCs 细胞液,调节细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。

2.3 动物分组与股骨头坏死模型的建立^[6] 将 50 只新西兰大白兔随机分为 5 组,每组 10 只:空白对照组、模型组、PRP (3%) 组、BMSCs ($1 \times 10^6/\text{mL}$) 组、PRP (3%) 和 BMSCs ($1 \times 10^6/\text{mL}$) 联合组。除正常组外其余动物造模。方法为兔静脉注射 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大肠杆菌内毒素 (LPS) 2 次,注射间隔为 24 h。在第 2 次注射 LPS 后,臀肌注射甲基强的松龙 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,注射 3 次,每次注射间隔为 24 h。

2.3 给药途径和方法 术后第 4 周,分别向 PRP (3%) 组、BMSCs ($1 \times 10^6/\text{mL}$) 组、PRP (3%) 和 BMSCs ($1 \times 10^6/\text{mL}$) 联合组的股骨头内髓芯减压后注射,0.4 mL 3% PRP, BMSCs 细胞液 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) 1, 0.4 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs 细胞液 ($1 \times 10^6/\text{mL}$),每周注射 1 次,连续注射 4 周。造模 12 周后,切取股骨头固定、包埋、切片、观察病理学变化。

2.4 观察指标 造模 12 周后分别处死各组实验兔,采用 HE 染色对股骨头进行染色,光镜下观察骨髓腔内骨小梁结构和骨细胞、脂肪细胞的变化情况。

2.5 Western blot 法检测 PDGF 蛋白的表达 提取各组兔子骨髓组织 100 mg, 15 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,沉淀物中加入 0.02 mL 裂解液,混匀。取蛋白样品,上样每孔上样量为 15 μg ,同时上样

Marker。取出 PVDF 膜,用洗膜液洗 10 min。将膜浸入 5% 的脱脂奶粉中,封闭过夜。用杂交液稀释抗体,PDGF 为 1:1 000,将膜浸入抗体中,室温摇床上反应 2 h。取出 PVDF 膜用洗膜液洗 3 次,每次 10 min。加入二抗孵反应,稀释抗体为 1:2 000,将膜浸入抗体中,室温摇床上反应 2 h。将 PVDF 放入暗盒,曝光,显影,定影,晾干保存。胶片应用图像分析系统进行分析。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验,方差齐者采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

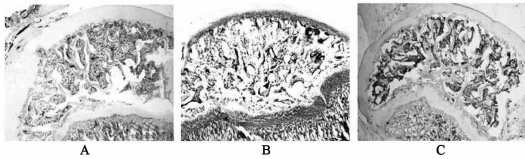
3.1 组织病理学观察 空白组:软骨细胞均匀,排列整齐;骨髓腔内骨小梁完整,整齐,骨细胞清晰可见,细胞核较大,细胞饱满;骨小梁周围分布较多成骨细胞,骨陷窝空缺,脂肪细胞少。

模型组:软骨细胞肥大不均匀,排列紊乱;骨髓腔内骨小梁变细,稀疏;可见有骨细胞固缩,坏死,附近破骨细胞较多,成骨细胞少,且脂肪细胞体积变大,数量明显增多;骨陷窝空缺明显增多。

PRP 组:软骨细胞排列有些紊乱,大小基本均匀;骨髓腔内骨小梁不完整,较模型组粗,骨细胞固缩现象减少,脂肪细胞体积和数量均减少;存在一些骨陷窝空缺。见图 1。

BMSCs 组:软骨细胞排列尚算整齐;骨髓腔内骨小梁上骨细胞细胞边缘清晰,成骨细胞增多,脂肪细胞数量明显减少,骨陷窝空缺较少。

PRP 与 BMSCs 联合组:软骨细胞排列整齐,大小基本均匀;骨髓腔内骨小梁排列规则整齐,致密饱满,骨细胞未见有固缩现象,成骨细胞数量较多,未见明显大的脂肪细胞,基本无骨陷窝空缺。



A. 正常组;B. 模型组;C. PRP(12 mg)与 BMSCs(1×10^6)联合组

图 1 富血小板血浆联合骨髓间充质干细胞对股骨头坏死组织病理学的影响(HE 染色, $\times 200$)

3.2 PRP 与 BMSCs 对骨陷窝空缺率的影响 与空白组比较,模型组骨陷窝空缺率显著增加($P < 0.05$);与模型组相比,PRP 组、BMSCs 组、PRP 与 BMSCs 联合组的骨陷窝空缺率明显下降,其中 PRP 与 BMSCs 联合组的骨陷窝空缺率最少。见表 1。

表 1 股骨头内髓芯减压后注射 PRP 与 BMSCs 对骨陷窝空缺率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	PRP /mg/只	BMSCs /mL/只	骨陷窝空缺率 /%
空白	-	-	6.53 ± 1.46
模型	-	-	24.85 ± 2.57 ¹⁾
PRP	12	-	15.92 ± 1.62 ^{1,2)}
BMSCs	-	1	13.79 ± 1.83 ^{1,2)}
PRP + BMSCs	12	1	10.28 ± 1.21 ^{1,2)}

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 PRP 与 BMSCs 对兔股骨头中 PDGF 的影响 PDGF 是创伤局部最早出现的生长因子,故模型组中 PDGF 蛋白表达水平与空白组相比稍有提升($P < 0.05$)。与模型组相比,PRP 组、BMSCs 组、PRP 与 BMSCs 联合组 PDGF 蛋白表达水平均有明显的提高($P < 0.05$),其中 PRP 与 BMSCs 联合组的 PDGF 蛋白表达水平最高。见表 2。

表 2 PRP 与 BMSCs 对兔股骨头中 PDGF 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	PRP /mg/只	1×10^6 /mL BMSCs	PDGF/GAPDH
空白	-	-	0.19 ± 0.03
模型	-	-	0.26 ± 0.05 ¹⁾
PRP	12	-	0.42 ± 0.11 ^{1,2)}
BMSCs	-	1	0.51 ± 0.07 ^{1,2)}
PRP + BMSCs	12	1	0.69 ± 0.15 ^{1,2)}

4 讨论

股骨头坏死全称为股骨头无菌性坏死,或股骨头缺血性坏死,是骨科常见病、多发病。其发病因多种诱因导致的股骨头局部血运不良,从而引起骨细胞进一步缺血、坏死、骨小梁断裂、股骨头塌陷等的一种骨质病变^[7]。BMSCs 是一类中胚层来源的干细胞,为骨组织工程的首选种子细胞。在机体内骨的形成和损伤后的修复中发挥着重要的作用^[8]。BMSCs 在一定的条件刺激下,可诱导兔 BMSCs 细胞增殖,分化成软骨细胞和成骨细胞。BMSCs 能分泌多种生长因子,还具有机械支持作用,保持着骨髓动

态平衡,调节造血,维持自我更新和增殖能力^[9]。

PRP 是通过离心的方法从自体血中提取出来的血小板浓缩物。研究表明,PRP 中富含高浓度的血小板,其数目比全血中数目高 3 倍以上;还含有多种生长因子与纤维蛋白原,如血小板衍生生长因子(PDGF),转化生长因子- β (TGF- β),类胰岛素生长因子(IGF),表皮生长因子(EGF),血管内皮生长因子(VEGF)等^[10]。通过不同生长因子的相互作用,结合靶细胞表面的受体,激活细胞的信号通路,诱导细胞产生伤口愈合所需的各种蛋白质和细胞增殖,调整细胞排列形态,且纤维蛋白在凝血酶的作用下释放出内部生长因子,促进骨样组织恢复。

PRP 具有促进 BMSCs 增殖与分化的作用。PRP 通过诱导磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶与骨保护素,从而促进骨的形成,加速骨组织愈合,促进创口愈合^[11-12]。PRP 加强 BMSCs 的成骨活性的机制可能为:①PDGF-AB 是血清间质细胞的主要趋化因子,可有效刺激 BMSCs 的有丝分裂,促进细胞增殖,同时以自分泌形式诱导更多的 PDGF 生成。②TGF- β 可促进 BMSCs 的胞外基质生成,诱导其分化为成骨细胞,并通过靶细胞膜的介导,促进成骨。③IGF-I,VEGF 与多种生长因子可诱导细胞增殖,协同发挥成骨作用,诱导 BMSCs 分化为成骨细胞,修复缺损组织。

血小板衍生因子(PDGF)是一种生物趋化因子,是骨组织创伤后修复和再生的一种特殊且重要的信号分子。可刺激内皮细胞加速生长,促进细胞有丝分裂成骨细胞。提高 PDGF 在创伤骨组织中的表达水平,可使创伤处成骨细胞分泌钙基质,矿化成骨^[13]。

本实验对兔股骨头进行组织学比较,PRP 与 BMSCs 联合治疗组较单独 PRP 组、BMSCs 组相比,股骨头的恢复情况更为良好,骨陷窝空缺率最低,差异有显著性意义($P < 0.05$),同时可提高股骨头中 PDGF 蛋白表达水平($P < 0.05$)。提示,PRP 与 BMSCs 应用时产生协同作用,PRP 提高骨髓中内源性 PDGF 蛋白表达,促进 BMSCs 的增殖与分化,提供股骨修复中所需的生长因子和蛋白,恢复股骨头的生长。

[参考文献]

- [1] 赵海燕,夏亚一,康鹏德. 股骨头坏死病因与发病机制研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2009,17(8):604.
- [2] Antonio B, Paolo V, Bruno O, et al. Deep-frozen allogeneic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges:a preliminary study[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2009,67(6):1300.
- [3] 王思明,南欣荣. 富血小板血浆促进骨缺损修复的研究进展[J]. 北京口腔医学,2007,15(6):349.
- [4] Weibrich G, Kleis W K. Curasan prp kit vs. PCCS prp system collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma[J]. Clin Oral Impl Res, 2002,13(4):437.
- [5] 姚志成,钟跃思,胡昆鹏,等. 骨髓间质干细胞培养液上清对肝星状细胞增殖及纤维化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(23):4181.
- [6] 杨明亮,罗先正,王正明. 实验性动物股骨头坏死模型的制备及其病理生理机制[J]. 中国骨伤,2000,13(4):207.
- [7] 陈宜,祝云利,吴海山. 非创伤性股骨头坏死的国外研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2010,18(3):230.
- [8] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999,284(5411):143.
- [9] 胡资兵,曾荣,郭伟韬,等. 骨髓间充质干细胞诱导分化特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(43):8561.
- [10] 李明,张长青. 富血小板血浆临床应用及其生物材料性能[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(8):1445.
- [11] 张洪涛,蔡道章,刘康,等. 富血小板血浆对人骨髓间充质干细胞成骨诱导的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(6):1045.
- [12] 张卫兵,洪光祥,康皓. 富血小板血浆对兔骨髓间充质干细胞增殖的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(34):6639.
- [13] 郝永强,戴尅戎. 骨质疏松性骨折愈合过程中 PDGF-A 与 PDGF- α R 的表达[J]. 中华骨科杂志,2002,22(12):743.

[责任编辑 聂淑琴]