

富血小板血浆联合骨髓间充质干细胞不同 配比浓度对兔软骨缺损的影响

杜刚, 李林, 张波, 唐俊, 韦程寿, 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)与骨髓间充质干细胞(BMSCs)不同的配比浓度对兔软骨缺损的治疗效果。方法:随机将 60 只新西兰兔随机分为模型对照组、PRP 组(3%)、BMSCs 组(1×10^6 /mL)、不同配比浓度的 PRP + BMSCs 联合组(1:5, 2:5, 3:5)。建立兔软骨损伤模型,术后第 2 周靶侧肌肉注射不同配比浓度的 PRP 与 BMSCs,每周 1 次,连续给药 4 周。采用 Masson's 三色染色法,观察关节软骨缺损情况;采用 Pineada 法进行关节软骨组织学半定量计分,并通过观察患兔术膝切口,了解术后愈合情况。结果:与模型对照组比较,不同配比浓度的 PRP 与 BMSCs 联合组中的关节软骨半定量分值均减少($P < 0.05$)。不同配比浓度的 PRP 与 BMSCs 联合组中,关节软骨半定量分值随 PRP 浓度的增加而减少,关节软骨半定量分值与 PRP 值呈现线性关系,其中 PRP 与 BMSCs 配比浓度为 3:5 的效果最为明显,差异有显著性意义($P < 0.05$)。结论:PRP、BMSCs 在一定程度上可促进骨组织恢复;关节软骨缺损恢复程度与 PRP 浓度表现出一定的量效关系。

[关键词] 富血小板血浆; 骨髓间充质干细胞; 兔软骨缺损; 配比浓度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0258-04

[doi] 10.11653/syfyj2013190258

Improvement of Rabbit Cartilage Defects by Platelet-rich Plasma Combined with Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow at Different Consistency

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

[Abstract] **Objective:** To study effect of platelet rich plasma combined with bone marrow mesenchymal stem cells at different consistency on rabbit cartilage defect. **Method:** Sixty rabbits were randomly divided into control group, platelet-rich plasma (PRP) group (3%), bone mesenchymal stem cells (BMSCs) group (1×10^6 /mL) and combination group (PRP + BMSCs 1:5, 2:5, 3:5). The models of rabbit cartilage defect were made by operation. Then the models were injected combination at different consistency once a week from 2th week to 5th week after operation. The rabbit cartilage defects were observed by Masson trichrome coloration. Semi-quantitative scoring of articular cartilage were computed by Pineada. Repair of articular cartilage defect in rabbits were observed. **Result:** Compared with the control group, semi-quantitative scoring of articular cartilage in each combination group decreased ($P < 0.05$). In combination groups, semi-quantitative scoring of articular cartilage was lower when PRP at higher consistency. PRP combined with BMSCs (3:5) was lowest in combination groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** PRP combined with BMSCs can effectively induce bone regeneration and improve bone tissue recovery. The recovery of articular cartilage defects was related with PRP concentration.

[Key words] PRP; BMSCs; rabbit cartilage defect; different consistency

[收稿日期] 20130503(019)

[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

关节软骨属于透明软骨,表面光滑,呈淡蓝色,有光泽。关节软骨主要使关节软骨紧紧与骨结合起来而不会掉下来,同时当受到压力时候,还可以有少许的变形,起到缓冲压力的作用。

各种创伤和骨病造成的关节软骨缺损在临床中常见,因此治疗关节软骨缺损是现代骨科领域研究的重点^[1]。骨髓间充质干细胞(BMSCs)是存在于骨髓中的间充质干细胞。具有定向或多向分化的潜能,可以分化为骨细胞、软骨细胞或脂肪细胞等。富血小板血浆(PRP)是自体全血经离心后得到的血小板浓缩物,含有多种生长因子,其本身还可作为支架材料、凝固后具可塑性^[2]。Antonio等研究表明,PRP在软组织的功能修复和骨组织再生中起到重要的作用^[3]。本研究观察PRP与骨髓间充质干细胞(BMSCs)不同的配比浓度对兔软组织损伤的影响,为其进一步的研究开发提供科学的基础数据。

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。实验前将其适应性饲养1周。

1.2 试剂与仪器 H-DMEM培养基,标准胎牛血清(Gibco U S),胰蛋白酶(鼎国生物技术有限公司),SABC试剂盒与DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。HITACHI-7171A自动生化分析仪(日本),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℃低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

2 方法

2.1 PRP制备 采用改良的PCCS kit法^[4]无菌提取PRP,具体过程为:取新西兰大白兔股静脉血5.0 mL加入预先放置10%枸橼酸钠抗凝剂的离心管中,离心 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,3 min 45 s,吸取上层血浆及血小板,再次离心, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,13 min,弃上层清液,将剩余液体与激活剂(凝血酶与10%CaCl₂的混合物)适当比例震荡,混匀,4℃冰箱过夜,血凝块充分收缩后再离心, $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}\times 15\ \text{min}$,吸取全部上清液(即为PRP液),调至3%,备用。

2.2 BMSCs培养 取新生兔断颈法处死,医用乙醇浸泡消毒3次,无菌分离兔四肢长股骨干,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次以上,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 兔软骨缺损模型的建立 将60只新西兰大白兔随机分为6组,每组10只:模型对照组、PRP组、BMSCs组、PRP与BMSCs联合组(1:5, 2:5, 3:5)。耳缘静脉注射3.0%戊巴比妥钠麻醉,兔双膝关节备皮,消毒、铺巾,仰卧位固定,无菌操作下行双膝内侧切口,逐层切开达关节腔,将髌骨导向外侧脱位,显露股骨髌关节面,用牙科钻打圆形孔,每孔直径4 mm,深度为3 mm,达软骨下骨,术毕,复位髌骨,逐层关闭伤口。术后逐层缝合,分笼饲养,不限制其活动。每天分别im青霉素40万单位与庆大霉素4万单位。

2.4 给药途径和方法 术后第2周起,靶侧肌肉注射给药,每周注射1次,连续注射4周。PRP组注射0.4 mL 3% PRP, BMSCs组注射BMSCs细胞液($1\times 10^6/\text{mL}$)1 mL;不同配比浓度PRP与BMSCs联合组分别注射0.2 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs细胞液($1\times 10^6/\text{mL}$), 0.4 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs细胞液($1\times 10^6/\text{mL}$), 0.6 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs细胞液($1\times 10^6/\text{mL}$)。模型组正常饲养,不做治疗处理。末次给药24 h后,切取缺损软组织固定、包埋、切片、观察病理学变化。

2.5 观察指标 术后5周各组分别处死实验兔,将缺损修复组织采用Masson's染色,光镜下观察关节软骨缺损情况。采用Pineada法,对取出标本的关节液色泽,软骨平整度,滑膜改变及软骨与周围临近软骨之间的关系等进行关节软骨组织学半定量计分。依据Pineada法^[5],将关节软组织的细胞形态、基质染色、表面光整、软骨厚度、与周围软骨整合程度进行半定量计分,标准见表1。关节软骨组织学疗效标准见表2。

2.6 统计学方法 本研究数据应用SPSS 18.0软件进行统计学数据分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多样本均数间比较采用One-way ANOVA分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 病理学组织观察 光镜下观察显示,空白对照组中缺损处临近的正常软骨细胞排列紊乱,缺损处非软骨组织。PRP组、BMSCs组的软骨缺损处主要由纤维软骨细胞组成,软骨厚度较薄。PRP与

表 1 关节软骨组织学半定量计分标准

分数	细胞形态	基质异染	软骨平整度	软骨厚度	与周围软骨整合程度
0	透明软骨细胞	基质正常	平滑 (>2/3)	>2/3	整合良好
1	透明软骨细胞为主	轻度减少	中度(1/2 ~ 3/4)	1/3 ~ 2/3	单侧结合或双侧部分结合
2	纤维软骨细胞为主	显著减少	不规则(1/2 ~ 1/4)	<1/3	两侧结合均不佳
3	非软骨为主	无异染	严重不平 (<1/4)		
4	全部非软骨				

表 2 关节软骨组织学疗效标准

疗效	愈合程度
完全愈合	关节软骨缺损取内分化正常软骨细胞被基质包围,关节表面光滑,与周围组织结合紧密
不完全愈合	吸附组织分化较差,细胞排列不规整,新生组织表面粗糙,与周围邻近组织部分或完全连接
未愈合	缺损区含极少软骨组织,有纤维肉芽组织填充,表面凹陷不平,与周围组织部分连接或未连接

BMSCs 联合治疗组的缺损软骨以透明软骨细胞为主,纤维软骨细胞较少,软骨厚度 PRP 和 BMSCs 单独治疗组的厚;缺损处周围正常软骨细胞排列整齐。

3.2 PRP 和 BMSCs 对兔软骨缺损的影响 与模型对照组相比,给药各组关节软骨半定量分值均有所下降($P < 0.05$),说明各给药组的软骨缺损均有修复。其中 0.6 mL PRP + 1 mL BMSCs 组的缺损软骨

的修复效果最为显著, ($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 PRP 和 BMSCs 对兔软骨缺损的疗效 与模型对照组相比,各给药治疗组软骨修复的例数显著增加,且 PRP 与 BMSCs 联合给药治疗后,完全修复例数明显增加($P < 0.05$)。PRP 与 BMSCs 联合治疗组中,0.6 mL PRP + 1 mL BMSCs 组对兔软骨缺损的疗效最好。见表 4。

表 3 各组关节软骨组织学半定量计分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	细胞形态	基质染色	表面光整	软骨厚度	结合情况
模型对照	3.85 ± 1.23	2.68 ± 1.17	2.79 ± 1.01	2.05 ± 0.72	1.91 ± 0.83
0.4 mL 3% PRP	2.74 ± 0.78 ¹⁾	1.93 ± 0.46 ¹⁾	2.14 ± 0.69 ¹⁾	1.33 ± 0.35 ¹⁾	1.45 ± 0.31 ¹⁾
BMSCs ²⁾	2.41 ± 0.82 ¹⁾	1.75 ± 0.37 ¹⁾	1.63 ± 0.45 ¹⁾	1.19 ± 0.45 ¹⁾	0.93 ± 0.42 ¹⁾
0.2 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs ²⁾	1.45 ± 0.43 ¹⁾	1.26 ± 0.29 ¹⁾	0.98 ± 0.31 ¹⁾	0.84 ± 0.36 ¹⁾	0.67 ± 0.26 ¹⁾
0.4 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs ²⁾	1.06 ± 0.37 ¹⁾	0.94 ± 0.28 ¹⁾	0.77 ± 0.19 ¹⁾	0.61 ± 0.22 ¹⁾	0.41 ± 0.14 ¹⁾
0.6 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs ²⁾	0.73 ± 0.35 ¹⁾	0.81 ± 0.28 ¹⁾	0.50 ± 0.12 ¹⁾	0.39 ± 0.13 ¹⁾	0.25 ± 0.09 ¹⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ BMSCs 为 1×10^6 /mL(表 4 同)。

表 4 PRP 与 BMSCs 对软骨缺损的疗效 ($n = 10$)

组别	完全修复	不完全修复	未修复
模型对照	0(0.0)	0(0.0)	10(100.0)
0.4 mL 3% PRP	1(10.0)	5(50.0) ¹⁾	4(40.0) ¹⁾
BMSCs ²⁾	3(30.0) ¹⁾	6(60.0) ¹⁾	1(10.0) ¹⁾
0.2 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs ²⁾	6(60.0) ¹⁾	3(30.0) ¹⁾	1(10.0) ¹⁾
0.4 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs ²⁾	6(60.0) ¹⁾	4(40.0) ¹⁾	0(0.0) ¹⁾
0.6 mL 3% PRP + 1 mL BMSCs ²⁾	8(80.0) ¹⁾	2(20.0) ¹⁾	0(0.0) ¹⁾

注:与模型对照组同项指标比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

关节软骨在关节活动中起重要作用,其表面光滑,能减少相邻两骨的摩擦,缓冲运动时产生的震动^[6]。关节软骨是一种特殊的结缔组织,由单一的软骨细胞,纤维及基质组成。软骨是由致密结缔组织的胶原纤维构成的基本框架,在纤维间存在着大量的软骨细胞。这些软骨细胞通过关节运动,从关节液中取得营养成分和排泄代谢物,维持关节软骨的正常代谢^[7]。

在关节软骨中无血管,无神经,无淋巴引流等,故关节软骨缺损后,自我修复的能量非常有限,需通过外源性修复、基因治疗等治疗方法。软骨生长方式有两种,一种为间质生长即软骨内生长,通过软骨细胞长大、无丝分裂而生长;另一种为外加生长,即软骨膜下或软骨下骨的细胞生长而形成,故软骨全层损伤时可很快有纤维组织进而分化为类软骨组织^[8]。但近年来在治疗软骨缺损的研究上提出了通过用“生长因子 + 支架材料”促进种子细胞增殖

的方法来治疗软骨缺损。这种方法将会成为攻克软骨修复模式这一难题的理想选择^[9]。

BMSCs是由Friedenstein等最早发现的一类中胚层来源的干细胞。BMSCs与机体内的骨形成和损伤后的修复密切相关^[10-11]。在外界诱导下可多向分化潜能,有文献报道,在一定微环境刺激下,可诱导兔BMSCs细胞增殖,并向软骨表型分化,于体外分化成软骨细胞^[7]。BMSCs不仅有机支持作用,还能分泌多种生长因子,同时可保持骨髓动态平衡,调节造血,维持自我更新和增殖能力^[12]。所以骨髓间充质干细胞是治疗软骨损伤理想的种子细胞。

大量研究证实,PRP中富含高浓度的血小板,多种生长因子与纤维蛋白原^[13]。PRP所含的各种生长因子相互作用,和靶细胞表面的受体结合,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,诱导细胞增殖、调整细胞排列形态,促进骨样组织及胶原合成^[14]。而纤维蛋白原在凝血酶作用下可缓慢聚合,释放出内部生长因子,有利于发挥生长因子间的协同作用,增进组织修复效果。

PRP具有明显的促进BMSCs增殖与分化的作用。David M等的研究结果显示,PRP促进骨髓间充质干细胞增殖与向成骨细胞分化呈明显的剂量依赖性。同时PRP还可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。PRP加强BMSCs的成骨活性的机制可能主要包括以下几点^[15]:①血小板衍生生长因子(PDGF)-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。②转化生长因子- β (TGF- 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。③促生长因子-1(IGF-I),血管内皮生长因子(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。

本研究中实验兔进行组织学比较,PRP与BMSCs联合治疗组较单独PRP组与BMSCs组相比,修复情况更为显著,差异有显著性意义。随着PRP含量的增加,软骨缺损的修复情况有更明显的好转;0.6 mL PRP + 1 mL BMSCs组对兔软骨缺损的疗效最好,差异有显著性意义。提示,通过提高PRP的相对配比浓度,增加对种子细胞BMSCs修复软骨缺损所需的营养物质,可提高干细胞增殖与成骨活

性,促进软骨缺损部位恢复。

[参考文献]

- [1] 李学金,李群,张知博.同种异体新鲜半月板移植的长期随访观察[J].成都医学院学报,2008,3(04):277.
- [2] 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.
- [3] 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]. Int J Oral Max Surg, 2009, 67(6):1300.
- [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] Wakinani S, Goto T, Pineda S J, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage [J]. J Bone Joint Surg (Am), 1994, 76:569.
- [6] 石长贵,蔡韵韵,鲍哲明,等.骨生长因子促进骨折愈合研究进展[J].国际骨科学杂志,2010,31(3):184.
- [7] 王刚,刘一,单玉兴,等.不同应力环境对兔骨髓间充质干细胞修复关节软骨缺损的影响[J].中国修复重建外科杂志,2004,18(2):96.
- [8] 彭雪林,张利,李玉宝,等.关节软骨缺损修复的研究与进展[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(2):336.
- [9] 吴涛,徐俊昌,南开辉,等.淫羊藿苷促进羊骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(19):3725.
- [10] 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.
- [11] Pountos I, Giannoudis P V. Biology of mesenchymal stem cells [J]. Injury, 2005, 36 (Suppl 3):S8.
- [12] 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.
- [13] 程文俊,金丹,裴国献,等.复合富血小板血浆新型可注射组织工程骨体内成骨研究[J].中华显微外科杂志,2010,33(1):41.
- [14] Border W A, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair [J]. Clin Invest, 1992, 90(1):1.
- [15] Marukawa E, Oshina H, Iino G, et al. Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft [J]. J Craniomaxillo facial Surg, 2011; 39 (4):278.

[责任编辑 聂淑琴]