

自体富血小板血浆联合骨髓基质干细胞复合改建脱细胞真皮基质修复兔关节软骨的可行性研究

赵 明¹, 魏艳红²

[摘要] **目的:** 研究自体富血小板血浆 (PRP) 联合骨髓基质干细胞 (BMSCs) 复合改建脱细胞真皮基质 (ADM) 修复兔关节软骨的修复效果及临床价值。 **方法:** 选择 60 只股骨髁关节损伤的青紫蓝兔作为研究对象, 随机分为研究组、对照组和空白组, 各 20 只。首先制备 PRP, 再分离 BMSCs, 并进行体外培养, 接种于 ADM 支架上。研究组培养基添加 10% PRP, 其他条件同对照组, 空白组兔不做任何处理。将 BMSCs-ADM 复合物植入兔关节缺损处, 在 1、2、3 个月末对构建的软骨组织进行免疫力学、组织学、生物力学检测, 比较 PRP-BMSCs-ADM 联合修复关节缺损的效果。 **结果:** 随着培养时间延长, BMSCs 的细胞数目显著增多, 呈现 S 形生长曲线, 第 3 天后进入对数期, 第 9 天后进入平台期; 从第 3 天开始, 细胞数目 OD 值研究组均明显高于对照组 ($P < 0.01$); 随着时间的延长, 各组标本软骨样细胞数目增多, 软骨陷窝逐渐成熟, 软骨表面逐渐光滑, IRCS 宏观评分和组织学评分均呈现增长趋势 ($P < 0.01$), 标本压力弹性模量有上升趋势 ($P < 0.05$); 同时期研究组标本评分与压力弹性模量均显著高于对照组和空白组 ($P < 0.01$); 3 个月后, 研究组软骨缺损修复状况明显优于对照组和空白组。 **结论:** 自体 PRP 联合 BMSCs 复合改建 ADM 修复兔关节软骨的修复效果良好, 具有可行性。

[关键词] 关节软骨缺损; 富血小板血浆; 骨髓基质干细胞; 脱细胞真皮基质

[中图分类号] R 684 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.08.001

The feasibility study of acellular dermal matrix reconstructed with autologous platelet-rich plasma combined with bone marrow stem cells in the repair of cartilage of rabbit

ZHAO Ming¹, WEI Yan-hong²

(1. Department of Orthopedics, The 251st Hospital of PLA, Zhangjiakou Hebei 075000;

2. Operating Rooms, The Traditional Chinese Medicine Hospital of Yuxian County, Yuxian Hebei 075721, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and clinical value of acellular dermal matrix (ADM) reconstructed with autologous platelet-rich plasma (PRP) combined with bone marrow stem cells (BMSCs) in the repair of cartilage of rabbit. **Methods:** Sixty rabbits with femoral condylar articular injury were randomly divided into the study group, control group and blank group (20 rabbits each group). The PRP and BMSCs were isolated, cultured, and inoculated with the ADM scaffolds *in vitro*. The 10% of PRP was added to the culture medium in study group, and the other treatment was the same as the control group. The blank group did not give any process. The BMSCs-ADM composite was implanted into the articular defect of rabbits. The reconstructing cartilage tissue was detected using the immune mechanics, histology and biomechanics at the end of 1, 2 and 3 months of implantation. The restoration effects of joints defect with PRP-BMSCs-ADM were analyzed. **Results:** With the prolongation of the culture time, the number of BMSCs cells increased significantly, the growth curve of cells appeared S-shaped, which arrived at logarithmic phase and plateau phase after 3th day and 9th day, respectively. From the 3th day, the OD value of cell counts in study group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). With the extension of time, the number of cartilage-like cells in all groups increased, the cartilage space matured gradually, the surface of cartilage smoothed gradually, the macro scoring of IRCS and histological scoring increased significantly ($P < 0.01$), the elastic modulus of the specimens pressure increased ($P < 0.05$). During the same period, the specimen scoring and pressure elastic modulus in study group were significantly higher than those in control group and blank group ($P < 0.01$). After 3 months, the repair of cartilage defect in study group was significantly better than that in control group and blank group ($P < 0.01$). **Conclusions:** The effects of ADM reconstructed with PRP combined with BMSCs in repairing the cartilage of rabbit are good, which is feasible.

[Key words] cartilage defect; autologous platelet-rich plasma; bone marrow stem cell; acellular dermal matrix

关节软骨具有减少相邻两骨摩擦、润滑骨关节

的作用^[1-2], 关节软骨缺损患者往往活动不便, 而且有剧烈疼痛感。骨髓基质干细胞 (bone marrow stromal cell, BMSCs) 存在于骨髓中, 在一定诱导条件下可分化为骨、软骨和脂肪等。将 BMSCs 诱导分化为软骨细胞为创伤、感染、肿瘤等各种原因形成的软

[收稿日期] 2015-06-15

[作者单位] 1. 中国人民解放军第 251 医院 骨科, 河北 张家口 075000; 2. 河北省张家口市蔚县中医院 手术室, 075721

[作者简介] 赵 明(1977-), 男, 硕士, 主治医师。

骨缺损患者带来了福音,具有良好的应用前景^[3-5]。自体富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是自体全血经离心后得到的小血小板浓缩物,富含大量生长因子及蛋白质,将 PRP 作为诱导因子加入培养基中,诱导 BMSCs 分化为软骨组织细胞,可加快组织修复,提高修复效果^[6-7]。本研究探讨了自体 PRP 联合 BMSCs 复合改建脱细胞真皮基质(ADM)修复兔关节软骨的效果及临床价值,现作报道。

1 材料与方法

1.1 一般资料 取 60 只股骨髁关节缺损的青紫蓝兔,2 月龄,雌性,体质量(2.53 ± 0.27) kg,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。将青紫蓝兔随机分为研究组、对照组和空白组,各 20 只。3 组青紫蓝兔的一般资料差异无统计学意义,具有可比性($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 PRP 的提取 手术麻醉青紫蓝兔后,取其心脏血液 10 mL,加入含有 10% 枸橼酸钠的离心管中,采用 Petrunaro 法制备 PRP。首先以 1 500 r/min 的转速离心 6 min,用无菌注射器吸出含有血小板的血浆层;再次离心采用 1 000 r/min 的转速,离心 6 min,取上清至另一离心管,剩余部分即为 PRP。

1.2.2 BMSCs 的提取、分离与培养 将青紫蓝兔在无菌条件下分离股骨、胫骨,10 mL DMEM 培养液冲洗骨髓腔,得到细胞悬液。再在 1 000 r/min 条件下离心 5 min,弃去上清,然后加入 5 mL 含 10% FBS,100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养液,轻轻吹打成骨髓细胞悬液。将骨髓细胞接种于 ADM 支架上,在 37 °C、5% CO₂ 恒温箱培养,观察细胞生长情况。

1.2.3 分组处理与指标检测 研究组培养基中加入 10% PRP;对照组不加 PRP,其他条件相同;空白组兔不做任何处理。BMSCs 培养 7 d 后,将 BMSCs-ADM 复合物植入兔关节缺损处,在 1、2、3 个月末对构建的软骨组织进行免疫学、组织学、生物力学检测。比较 PRP-BMSCs-ADM 联合修复关节缺损的效果。

采用 MTT 法检测 BMSCs 在 ADM 上培养的细胞数目 OD 值,采用 IRCS 组织学评分法评价组织学修复情况,以压缩弹性模量测定标本生物力学性能。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验、方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 2 组标本不同培养时间 BMSCs 的细胞数目 OD 值比较 2 组标本随着培养时间延长,BMSCs 的细胞数目均显著增多($P < 0.01$),呈现 S 形生长曲线,第 3 天后进入对数期,第 9 天后进入平台期;从第 3 天开始,研究组细胞数目 OD 值均明显高于对照组($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 3 组标本不同时间 IRCS 宏观和组织学评分情况比较 结果显示,随着时间的延长,各组标本 IRCS 宏观评分和组织学评分均明显升高($P < 0.01$);研究组标本不同时间 IRCS 宏观和组织学评分均显著高于对照组与空白组($P < 0.01$),而对照组亦均显著高于空白组($P < 0.01$) (见表 2、3)。

2.3 3 组标本不同时间生物力学检测结果比较 2 个月末和 3 个月末检测 3 组标本的生物力学性能,显示,3 个月末时 3 组标本压力弹性模量均明显上升($P < 0.01$),但研究组标本 2 个月末和 3 个月末压力弹性模量均显著高于对照组与空白组($P < 0.01$),而对照组亦明显高于空白组($P < 0.01$) (见表 4)。

2.4 3 个月末关节软骨缺损修复状况 3 个月后,研究组软骨缺损修复状况明显优于对照组和空白组,软骨表面光滑、完整,成熟度高,无明显缺损;对照组组织充填不均匀,交界处缺乏连续性,空白组整体偏红,无明显修复迹象(见图 1)。

3 讨论

软骨组织由软骨细胞、纤维及基质组成,是关节软骨的重要部分,具有优异的抗压耐磨作用,可保护骨组织免于磨损^[8-10]。软骨组织细胞增殖能力很弱,加之关节软骨没有血管,也无法获得修复组织的细胞因子,因此发生关节软骨缺损后不能完成自我修复。目前临床主要采用药物治疗、手术以及物理方法治疗,但均有一定弊端。药物治疗虽可有效缓解疼痛,但严重的不良反应限制了其应用。手术治疗主要是骨膜或软骨移植,但移植的软骨组织较脆弱,生物力学性能远远不如原始关节软骨,灵活性也不如从前^[11-13]。而激光照射和声波刺激等物理方法也只能起到一定的辅助治疗作用。因此,治疗的关键在于获得生物力学性能、组织学性能等各方面均符合要求的软骨组织^[14-15]。

骨髓基质为造血系统提供结构和功能支持,并影响造血干细胞的分化,可分化为网状细胞、成骨细

表 1 2 组标本不同培养时间 BMSCs 的细胞数目 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	培养时间					F	P	MS _{组内}	
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天				第 11 天
研究组	20	0.176 ± 0.034	0.295 ± 0.042 ^{*△}	0.857 ± 0.047 ^{*△△}	1.215 ± 0.058 ^{*△△##}	1.226 ± 0.045 ^{*△△##}	1.285 ± 0.052 ^{*△△##}	2 225.06	<0.01	0.002
对照组	20	0.183 ± 0.042	0.207 ± 0.035	0.611 ± 0.049 ^{*△}	0.924 ± 0.048 ^{*△△##}	1.024 ± 0.042 ^{*△△##}	1.113 ± 0.051 ^{*△△##}	1 673.38	<0.01	0.002
t	—	0.58	7.20	16.20	17.29	14.68	10.56	—	—	—
P	—	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—

q 检验:与第 1 天比较 * * P < 0.01; 与第 3 天比较 △ △ P < 0.01; 与第 5 天比较 ## P < 0.01

表 2 3 组标本不同时间 IRCS 宏观评分比较($\bar{x} \pm s$; 分)

分组	n	1 个月末	2 个月末	3 个月末	F	P	MS _{组内}
研究组	20	4.04 ± 0.42 ^{☆☆□□}	7.89 ± 0.47 ^{☆☆□□}	10.24 ± 0.45 ^{☆☆△△□□}	980.08	<0.01	0.200
对照组	20	3.64 ± 0.37 ^{☆☆}	5.73 ± 0.39 ^{☆☆}	6.46 ± 0.42 ^{☆☆△△☆☆}	276.18	<0.01	0.155
空白组	20	3.21 ± 0.34	3.94 ± 0.44 ^{**}	4.06 ± 0.47 ^{**}	23.95	<0.01	0.177
F	—	24.10	414.26	971.00	—	—	—
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—
MS _{组内}	—	0.143	0.189	0.200	—	—	—

q 检验:与 1 个月末比较 * * P < 0.01; 与 2 个月末组比较 △ △ P < 0.01; 与空白组比较 ☆ ☆ P < 0.01; 与对照组比较 □ □ P < 0.01

表 3 3 组标本不同时间 IRCS 组织学评分比较($\bar{x} \pm s$; 分)

分组	n	1 个月末	2 个月末	3 个月末	F	P	MS _{组内}
研究组	20	5.85 ± 0.43 ^{☆☆□□}	10.33 ± 0.52 ^{☆☆□□}	14.21 ± 0.36 ^{☆☆△△□□}	1 795.42	<0.01	0.195
对照组	20	4.03 ± 0.56 ^{☆☆}	6.48 ± 0.45 ^{☆☆}	10.52 ± 0.47 ^{☆☆△△☆☆}	874.41	<0.01	0.246
空白组	20	2.52 ± 0.68	3.85 ± 0.55 ^{**}	5.76 ± 0.63 ^{△△}	136.98	<0.01	0.387
F	—	173.60	821.90	1 440.68	—	—	—
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—
MS _{组内}	—	0.320	0.259	0.249	—	—	—

q 检验:与 1 个月末比较 * * P < 0.01; 与 2 个月末组比较 △ △ P < 0.01; 与空白组比较 ☆ ☆ P < 0.01; 与对照组比较 □ □ P < 0.01

表 4 3 组标本不同时间压力弹性模量测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	2 月末	3 月末($\bar{d} \pm s_d$)	t	P
研究组	20	0.427 ± 0.018 ^{☆☆□□}	0.096 ± 0.009 ^{☆☆□□}	47.70	<0.01
对照组	20	0.244 ± 0.013 ^{☆☆}	0.123 ± 0.013 ^{☆☆}	13.38	<0.01
空白组	20	0.096 ± 0.008	0.153 ± 0.018	38.01	<0.01
F	—	2 961.47	84.98	—	—
P	—	<0.01	<0.01	—	—
MS _{组内}	—	0.000 2	0.000 2	—	—

q 检验:与空白组比较 ☆ ☆ P < 0.01; 与对照组比较 □ □ P < 0.01

胞、纤维细胞等,在一定条件下加入特定诱导因子可促使其向成骨细胞方向分化。早在 19 世纪即有学者证明了这一点^[16-17]。近几十年来发展的软骨组织工程通过选用合适的种子细胞加入特定生物因子诱导,在特殊的支架培养分化为软骨细胞,用于关节软骨缺损的治疗,具有一定的成效。本研究选用 BMSCs 作为种子细胞,自体 PRP 作为生长因子源,脱细胞真皮基质作为支架材料,培养出的软骨组织生物学性能和组织学性能均符合要求。

本研究结果显示,随着培养时间延长,BMSCs 的细胞数目显著增多,呈现 S 形生长曲线,第 3 天后进入对数期,第 9 天后进入平台期;从第 3 天开始,研究组细胞数目 OD 值明显高于对照组。这可以解释为自体 PRP 富含多种蛋白质和生长因子,研究表明,其中所含血小板衍生因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子-β、血管内皮生长因子等均具有强烈的促进有丝分裂的作用,因此在 BMSCs 培养基中加入 PRP 可在一定程度上促进细胞分裂,增加细胞数目,诱导细胞分化为软骨组织。IRCS 组织学评分结果也印证了这一点^[18-20]。随着时间的延长,各组标本软骨样细胞数目增多,可观察到软骨陷窝,并逐渐成熟,软骨表面也逐渐光滑,IRCS 宏观评分和组织学评分均呈现增长趋势;但不同时期,研究组标本评分均显著高于对照组和空白组,表明研究组修复效果更佳。另外,所有标本压力弹性模量有上升趋势,但不同时期研究组和对照组测定值均明显高于空白组(P < 0.01),表明研究组标本生物学性能优于对



A: 研究组; B: 对照组; C: 空白组
图1 3个月末关节软骨缺损修复状况

对照组和空白组。

综上所述,自体 PRP 联合 BMSCs 复合改建 ADM 修复兔关节软骨的修复效果良好,具有可行性,可尝试用于人类关节缺损的治疗。

[参 考 文 献]

- [1] 时长江. PRP 联合 BMSCs 负载改建脱细胞真皮基质对兔膝关节软骨损伤修复作用的研究[D]. 天津:天津医科大学,2014.
- [2] 蒋建召. 富血小板血浆复合自体浓缩红骨髓促进骨缺损愈合的实验研究[D]. 郑州:郑州大学,2010.
- [3] 宋广明. 补肾活血汤结合骨髓基质干细胞复合体修复兔膝关节软骨缺损[D]. 北京:北京中医药大学,2011.
- [4] 李小建. 脱细胞真皮复合骨髓基质干细胞构建组织工程前交叉韧带的实验研究[D]. 西安:第四军医大学,2013.
- [5] 李春亮,李文方. 膝关节半月板损伤磁共振成像诊断与关节镜检查对比研究[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(9):687.
- [6] 贾俊杰. 富血小板血浆联合主动运动对大鼠髌股关节全层软骨缺损的修复效果研究[D]. 广州:南方医科大学,2014.
- [7] SHERIDAN MH, SHEA LD, PETERS MC, *et al.* Bioabsorbable polymer scaffold for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery[J]. *J Controlled Release*, 2000, 64(1/3):91.
- [8] 李会波. 生物反应器内应用富血小板血浆构建组织工程骨体内血管化的评估的实验研究[D]. 济南:山东大学,2013.
- [9] 严安. 富血小板血浆凝胶复合材料修复颈椎缺损的实验研究[D]. 长沙:中南大学,2009.
- [10] 张寅权,李国东,张平,等. 关节镜下 FasT-Fix 半月板内缝合技术治疗膝半月板损伤[J]. 临床和实验医学杂志,2012,11(7):507.
- [11] 李明,张长青. 富血小板血浆与关节软骨修复[J]. 国际骨科学杂志,2010,48(3):171.
- [12] 李春根,康晓乐,宋广明,等. 独活寄生汤结合骨髓基质干细胞复合体修复兔膝关节软骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(32):5957.
- [13] 陈冬,姚建华,黄炎,等. 改良 Brostrom 法联合踝关节镜治疗踝关节扭伤致慢性踝关节不稳的研究[J]. 临床和实验医学杂志,2015,10(6):497.
- [14] PETER SJ, KIM DJ, STAMATAS GN. Effect of transforming growth factor β 1 released from biodegradable polymer microparticles on marrow stroma osteoblasts cultured on poly (propylene fumarate) substrates [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50:452.
- [15] OKUDA K, KAWASE T, MOMOSE M, *et al.* Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro [J]. *J Periodontol*, 2003, 74(6):849.
- [16] 徐静,王黎明,周立冬,等. 富血小板血浆及脐带间充质干细胞修复软骨损伤[J]. 中国组织工程研究,2014,18(41):6633.
- [17] GRUBER R, VARGA F, FISCHER MB, *et al.* Platelets stimulate proliferation of bone cells; involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes [J]. *Clin Oral Implan Res*, 2002, 13(5):529.
- [18] 林静,赵景新. 大鼠高强度运动后的软骨损伤及寡聚基质蛋白的表达[J]. 临床和实验医学杂志,2014,09(22):1840.
- [19] 陈永锋. 复合骨髓基质干细胞的 β -磷酸三钙在兔脊柱后外侧融合中的应用研究[D]. 西安:第四军医大学,2012.
- [20] 张苍宇. 组织工程骨膜的构建及其同种异体体内成骨修复兔肩胛骨缺损的实验研究[D]. 兰州:兰州大学,2014.

(本文编辑 刘璐)