

## 纯化血小板对大鼠软骨细胞增殖 及膝关节炎大鼠软骨修复的作用研究

原晓强<sup>1</sup>, 金王东<sup>1</sup>, 周云婧<sup>1</sup>, 叶希佳<sup>1</sup>, 郭佳娜<sup>1</sup>, 单乐天<sup>1</sup>, 童培建<sup>2</sup>, 肖鲁伟<sup>1</sup>

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

**摘要** 目的: 观察纯化血小板(purified platelet rich plasma, pPRP)对大鼠软骨细胞增殖及膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)大鼠软骨修复的作用。方法: 取 5 只 SD 大鼠抽取腹主动脉血, 经多次离心后获得 pPRP, 并制成低( $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ )、中( $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ )、高( $1 \times 10^8$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) 3 种浓度的 pPRP。5 只 SD 大鼠抽取腹主动脉血后脱颈处死, 取膝关节软骨分离软骨细胞。将培养的第 3 代软骨细胞分为生理盐水组、pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组和 pPRP 高浓度组, 每组设 5 个复孔。各组细胞以无血清 IMDM 培养基处理后, 生理盐水组更换为含 10% FBS 的培养基, pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组和 pPRP 高浓度组分别更换为含 10% FBS 和低、中、高浓度 pPRP 的培养基。分别于培养 24、48、72 h 后采用 CCK-8 法测定细胞增殖情况。另外选取 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、KOA 模型组和 pPRP 治疗组, 每组 10 只。KOA 模型组、pPRP 治疗组大鼠通过向双侧膝关节腔内注射碘乙酸进行 KOA 造模, 空白组不进行造模。1 周后, 向 pPRP 治疗组大鼠双侧后肢膝关节腔各注射 50  $\mu\text{L}$  高浓度 pPRP, 向空白组和 KOA 模型组大鼠膝关节腔注射等量生理盐水, 每周 1 次, 共注射 4 次。药物干预结束后分别对各组大鼠进行步态分析、膝关节 X 线检查及膝关节病理学观察。结果: ①软骨细胞增殖测定结果。培养 24、48、72 h 后 4 组软骨细胞活力比较, 组间差异均有统计学意义( $0.411 \pm 0.014$ ,  $0.458 \pm 0.052$ ,  $0.473 \pm 0.029$ ,  $0.489 \pm 0.011$ ,  $F = 5.860$ ,  $P = 0.007$ ;  $0.502 \pm 0.003$ ,  $0.551 \pm 0.022$ ,  $0.568 \pm 0.019$ ,  $0.572 \pm 0.029$ ,  $F = 12.196$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.619 \pm 0.008$ ,  $0.747 \pm 0.006$ ,  $0.754 \pm 0.031$ ,  $0.763 \pm 0.018$ ,  $F = 67.065$ ,  $P = 0.000$ )。培养 24 h 后, pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组、pPRP 高浓度组细胞活力均高于生理盐水组( $P = 0.026$ ;  $P = 0.003$ ;  $P = 0.000$ ); pPRP 高浓度组和 pPRP 中浓度组的细胞活力均高于 pPRP 低浓度组( $P = 0.028$ ;  $P = 0.008$ ); pPRP 高浓度组的细胞活力高于 pPRP 中浓度组( $P = 0.002$ )。培养 48 h 后, pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组、pPRP 高浓度组细胞活力均高于生理盐水组( $P = 0.002$ ;  $P = 0.008$ ;  $P = 0.006$ ); pPRP 高浓度组和 pPRP 中浓度组的细胞活力均高于 pPRP 低浓度组( $P = 0.033$ ;  $P = 0.027$ ); pPRP 高浓度组的细胞活力高于 pPRP 中浓度组( $P = 0.002$ )。培养 72 h 后, pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组、pPRP 高浓度组细胞活力均高于生理盐水组( $P = 0.000$ ;  $P = 0.000$ ;  $P = 0.000$ ); pPRP 高浓度组和 pPRP 中浓度组的细胞活力均高于 pPRP 低浓度组( $P = 0.016$ ;  $P = 0.033$ ); pPRP 高浓度组的细胞活力高于 pPRP 中浓度组( $P = 0.029$ )。②步态分析结果。3 组大鼠跑步过程中单位时间内(1 s)左后肢和右后肢着地面积比较, 组间差异均有统计学意义[( $2.36 \pm 0.49$ )  $\text{cm}^2$ , ( $1.68 \pm 0.18$ )  $\text{cm}^2$ , ( $1.98 \pm 0.26$ )  $\text{cm}^2$ ,  $F = 10.320$ ,  $P = 0.005$ ; ( $2.82 \pm 0.59$ )  $\text{cm}^2$ , ( $1.91 \pm 0.29$ )  $\text{cm}^2$ , ( $2.41 \pm 0.31$ )  $\text{cm}^2$ ,  $F = 11.790$ ,  $P = 0.002$ ]。空白组、pPRP 治疗组大鼠左后肢着地面积均大于 KOA 模型组( $P = 0.002$ ;  $P = 0.008$ ); 空白组、pPRP 治疗组大鼠右后肢着地面积均大于 KOA 模型组( $P = 0.001$ ;  $P = 0.002$ ); 空白组与 pPRP 治疗组大鼠左后肢及右后肢着地面积比较, 组间差异均无统计学意义( $P = 0.050$ ;  $P = 0.068$ )。③X 线检查结果。X 线片显示空白组大鼠膝关节软骨完整, 关节面平整; KOA 模型组关节软骨明显退变, 胫骨平台与股骨远端关节面均不平整, 有骨赘样组织形成, 并有软骨缺损迹象; 与 KOA 模型组相比, pPRP 治疗组大鼠膝关节软骨退变程度较轻微。④病理学检查结果。与空白组相比, KOA 模型组大鼠膝关节软骨面明显缺损, 缺损处软骨细胞丢失, 软骨细胞排列紊乱, 软骨下骨硬化, 骨小梁面积明显减小, 骨髓腔细胞增生、排列紊乱, 骨小梁中的骨细胞明显减少; pPRP 治疗组大鼠膝关节软骨面基本光滑, 表面未见明显缺损或裂隙, 部分区域内可见软骨细胞丢失, 软骨下骨骨小梁排列尚整齐, 骨小梁稀疏变窄, 部分断裂。结论: pPRP 可促进大鼠软骨细胞增殖; 高浓度的 pPRP 可以在一定程度上修复 KOA 大鼠退变的关节软骨, 改善运动能力。

**关键词** 骨关节炎; 膝关节; 软骨细胞; 富血小板血浆; 细胞增殖; 大鼠; 动物实验

**Effect of purified platelet rich plasma on chondrocyte proliferation in rats and cartilage repair in rats with knee osteoarthritis: an experimental study**

YUAN Xiaoqiang<sup>1</sup>, JIN Wangdong<sup>1</sup>, ZHOU Yunjing<sup>1</sup>, YE Xijia<sup>1</sup>, GUO Jiana<sup>1</sup>, SHAN Letian<sup>1</sup>, TONG Peijian<sup>2</sup>, XIAO Luwei<sup>1</sup>

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81302989); 浙江省重点科技创新团队自主项目(2011R50022-02); 高校博士点基金青年教师项目(20133322120006); 浙江省中医药科技计划项目(2013ZQ007)

通讯作者: 单乐天 E-mail: letian.shan@foxmail.com

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

2. Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

**ABSTRACT** **Objective:** To observe the effect of purified platelet rich plasma (pPRP) on chondrocyte proliferation in rats and cartilage repair in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** Five SD rats were selected and their blood was drawn from aorta abdominalis. The pPRP with different concentration ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,  $1 \times 10^7/\text{mL}$  and  $1 \times 10^8/\text{mL}$ ) were obtained after repeated centrifugation. Then the five SD rats were executed, and their knee articular cartilages were fetched out for separating chondrocytes. The third-generation chondrocytes of SD rats cultured in vitro were divided into normal saline group, pPRP low-concentration group, pPRP middle-concentration group and pPRP high-concentration group, 5 holes in each group. The chondrocytes in each group were cultured in serum-free IMDM medium, and then the serum-free IMDM medium was replaced by 10% FBS-containing medium in normal saline group and medium containing 10% FBS and pPRP with low, middle and high concentration in pPRP low-concentration group, pPRP middle-concentration group and pPRP high-concentration group respectively. The cell proliferation were measured by using CCK-8 method when the chondrocytes were cultured for 24, 48 and 72 hours respectively. Another 30 SD rats were selected and were randomly divided into blank group, KOA model group and pPRP treatment group, 10 cases in each group. The KOA models were created in KOA model group and pPRP treatment group by intra-articular injecting iodoacetic acid into bilateral knees. One week later, the rats in pPRP treatment group were administrated with intra-articular injection of high-concentration pPRP with dose of 50  $\mu\text{L}$  in bilateral knee joint, while the rats in the other two groups were administrated with intra-articular injection with the same dose of normal saline, once a week for consecutive 4 weeks. After the end of drug intervention, gait analysis, X-ray examination and pathological observation of knee joint were performed on all of the rats. **Results:** There was statistical difference in chondrocytes activity between the 4 groups after 24-, 48- and 72-hour culture respectively ( $0.411 \pm 0.014$ ,  $0.458 \pm 0.052$ ,  $0.473 \pm 0.029$ ,  $0.489 \pm 0.011$ ,  $F = 5.860$ ,  $P = 0.007$ ;  $0.502 \pm 0.003$ ,  $0.551 \pm 0.022$ ,  $0.568 \pm 0.019$ ,  $0.572 \pm 0.029$ ,  $F = 12.196$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.619 \pm 0.008$ ,  $0.747 \pm 0.006$ ,  $0.754 \pm 0.031$ ,  $0.763 \pm 0.018$ ,  $F = 67.065$ ,  $P = 0.000$ ). After 24-hour culture, the chondrocytes activity were higher in pPRP low-, middle- and high-concentration group compared to normal saline group ( $P = 0.026$ ;  $P = 0.003$ ;  $P = 0.000$ ), and were higher in pPRP high- and middle-concentration group compared to pPRP low-concentration group ( $P = 0.028$ ;  $P = 0.008$ ), and were higher in pPRP high-concentration group compared to pPRP middle-concentration group ( $P = 0.002$ ). After 48-hour culture, the chondrocytes activity were higher in pPRP low-, middle- and high-concentration group compared to normal saline group ( $P = 0.002$ ;  $P = 0.008$ ;  $P = 0.006$ ), and were higher in pPRP high- and middle-concentration group compared to pPRP low-concentration group ( $P = 0.033$ ;  $P = 0.027$ ), and were higher in pPRP high-concentration group compared to pPRP middle-concentration group ( $P = 0.002$ ). After 72-hour culture, the chondrocytes activity were higher in pPRP low-, middle- and high-concentration group compared to normal saline group ( $P = 0.000$ ;  $P = 0.000$ ;  $P = 0.000$ ), and were higher in pPRP high- and middle-concentration group compared to pPRP low-concentration group ( $P = 0.016$ ;  $P = 0.033$ ), and were higher in pPRP high-concentration group compared to pPRP middle-concentration group ( $P = 0.029$ ). The results of gait analysis showed that there was statistical difference in the touching ground areas of left and right hindlimbs within unit time during running between the 3 groups ( $2.36 \pm 0.49$ ,  $1.68 \pm 0.18$ ,  $1.98 \pm 0.26$  cm(2),  $F = 10.320$ ,  $P = 0.005$ ;  $2.82 \pm 0.59$ ,  $1.91 \pm 0.29$ ,  $2.41 \pm 0.31$  cm(2),  $F = 11.790$ ,  $P = 0.002$ ). The touching ground areas of left hindlimbs were larger in blank group and pPRP treatment group compared to KOA model group ( $P = 0.002$ ;  $P = 0.008$ ). The touching ground areas of right hindlimbs were larger in blank group and pPRP treatment group compared to KOA model group ( $P = 0.001$ ;  $P = 0.002$ ). There was no statistical difference in the touching ground areas of left and right hindlimbs between blank group and pPRP treatment group ( $P = 0.050$ ;  $P = 0.068$ ). The X-ray films showed that the knee articular cartilages were complete and the knee articular surfaces were smooth in rats of blank group; while obvious knee articular cartilage degeneration, rough tibial plateau and distal femoral articular surfaces, osteophytes and articular cartilage defects were found in rats of KOA model group. The degrees of knee articular cartilage degeneration were slighter in pPRP treatment group compared to KOA model group. The results of pathological examination showed, obvious knee articular cartilage surface defects, chondrocytes loss at defect site, disorganized chondrocytes, sclerosis of subchondral bone, significant decrease in trabecular bone areas, disorganized hyperplastic cells in marrow cavity and significant decrease in number of trabecular bone cells in rats of KOA model group. The knee articular cartilage surfaces were basically smooth and no obvious defects and gaps were found in knee articular cartilage surfaces in rats of pPRP treatment group. Chondrocytes loss were found in some regions and sparse and narrow bone trabeculas arranged in order in subchondral bone. **Conclusion:** The pPRP can effectively promote the proliferation of chondrocytes in rats, and high-concentration pPRP can repair the degenerative articular cartilages and improve exercise abilities of rats with KOA to some extent.

**Key words** osteoarthritis; knee joint; chondrocytes; platelet rich plasma; cell proliferation; rats; animal experimentation

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的慢性退行性骨代谢疾病,是老年人致残的主要原因之一,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。衰老、肥胖、创伤、劳损、遗传等均是其致病因素,其中衰老为主因<sup>[2]</sup>。KOA 的典型特征是关节软骨退变,表现为软骨降解、关节滑膜纤维化、关节局部炎症、软骨下骨硬化、骨髓病变、骨赘形成、韧带和关节腔退变等一系列退行性病变,最终引起关节疼痛、关节僵硬、关节失用等行为功能障碍<sup>[3-5]</sup>。Mistry 等<sup>[6]</sup>的研究证实,OA 软骨细胞存在不同程度的凋亡,是关节软骨发生退行性改变的主要病理因素之一,对关节软骨破坏起支配性作用。

富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 是全血离心后得到的血小板浓缩物<sup>[7]</sup>,具有多种生物学特性:①从自体抽取离心获得,具有良好的生物相容性,无免疫排斥和炎症反应等问题;②加入激活剂后,富血小板血浆凝成胶状物并含有高浓度的纤维蛋白原;③PRP 被激活后,血小板  $\alpha$  颗粒可释放出大量生长因子,包括转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor -  $\beta$ , TGF -  $\beta$ )、血小板源性生长因子 (platelet - derived growth factor, PDGF)、胰岛素样生长因子 - 1 (insulin-like growth factor 1; IGF - 1)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等,这些生长因子能促进细胞增殖及细胞外基质合成,对创伤愈合及组织再生有重要作用<sup>[8]</sup>。近年来研究发现 PRP 中有较多的生长因子对软骨修复有促进作用,其中促进软骨细胞合成代谢的因子有 IGF、TGF、PDGF 等<sup>[9]</sup>;这些因子的作用使治疗 OA 有了新的方向。我们前期优化了 PRP 的制备工艺,得到更高纯度的纯化血小板 (purified platelet rich plasma, pPRP)。本实验拟通过观察 pPRP 对大鼠软骨细胞增殖及 KOA 大鼠软骨修复的作用,为 KOA 的临床治疗提供新的思路。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 雄性 SPF 级 SD 大鼠 35 只,体质量 (200  $\pm$  20) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005,于浙江中医药大学动物实验中心进行实验。实验方案通过医学动物实验伦理委员会批准。

**1.2 试剂及仪器** IMDM 液体培养基、FBS、II 型胶原酶、PBS 磷酸盐缓冲液 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司),青链霉素混合液、胰蛋白酶胰蛋白酶 - EDTA 消化液、CCK - 8、4% 甲醛溶液、EDTA 脱钙液 (Solarbio),枸橼酸钠、生理盐水、碘乙酸 (SIGMA - ALDRICH),水合氯醛 (上海化学试剂采购供应五联化工厂); MDF - J281AT 超低温冰箱 (SANYO),DK - S12 型恒温水浴锅 (上海森信实验仪器有限公司),SW - CJ - 1F 层流超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司),AXiovert200 荧光倒置显微镜、全自动多功能酶标仪、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Thermo)、DigiGait 小鼠脚步特征数字化成像系统 (Mouse Specifics)。

## 2 方法

**2.1 pPRP 制备** 采用多次离心法 (专利号: CN10430720 A) 制备 pPRP,流式鉴定阳性率。具体步骤如下:随机取 5 只 SD 大鼠,抽取腹主动脉血,加入抗凝剂,以 1000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 15 min (离心半径 8 cm),吸取红细胞层以上部分,加入红细胞裂解液,混匀后静置 30 min 后以 1500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 20 min (离心半径 8 cm),去除残余的红细胞,收集中间白色絮状层,再加入生理盐水,以 1500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min (离心半径 8 cm),弃上清液,收集中间白色层,即为 pPRP。将收集的 pPRP 再次离心重悬加工,制成低 ( $1 \times 10^6$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)、中 ( $1 \times 10^7$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)、高 ( $1 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 3 种浓度的 pPRP。

**2.2 软骨细胞分离培养及增殖测定** 采用机械 - II 型胶原酶消化法从 SD 大鼠关节软骨中分离获得软骨细胞<sup>[10]</sup>。具体方法如下:5 只大鼠抽取腹主动脉血后脱颈处死,在 75% 酒精中浸泡 5 min 后取出膝关节,用手术刀片刮下软骨面,在超净工作台中用含双抗的 PBS 清洗,洗净后剪至 1 mm<sup>3</sup> 大小,再用 PBS 清洗 3 次。把组织块装入玻璃试管内,先加 5 倍组织块体积的 0.25% 胰蛋白酶,在 37  $^{\circ}$ C 震荡消化 30 min,再以 1500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min (离心半径 8 cm)。弃上清液,加 0.2% II 型胶原酶消化 4 h,加入含 10% FBS 的 IMDM 培养液终止消化,用 200 目筛网过滤。将滤液以 1500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min (离心半径 8 cm),弃上清,细胞沉淀加入含 10% FBS 的 IMDM 培养液重悬,接种在 6 孔培养板中,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h

后观察贴壁情况。以后 2~3 d 换液 1 次,待细胞贴壁长满后进行传代。

取培养的第 3 代软骨细胞,计数稀释后以每孔 2000~3000 个细胞的密度接种于 96 孔培养板中,分为生理盐水组、pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组和 pPRP 高浓度组,每组设 5 个复孔。各组细胞以无血清 IMDM 培养基进行"饥饿"处理后,生理盐水组更换为含 10% FBS 的培养基,pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组和 pPRP 高浓度组分别更换为含 10% FBS 和低、中、高浓度 pPRP 的培养基。分别于培养 24、48、72 h 后每孔避光加入 20  $\mu$ L CCK-8 试剂,在培养箱内孵育 2 h 后,用全自动酶标仪在 490 nm 波长测定吸光度。

**2.3 大鼠分组、造模及干预** 将 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、膝关节炎(knee osteoarthritis, KOA)模型组、pPRP 治疗组,每组 10 只。KOA 模型组、pPRP 治疗组大鼠通过向双侧膝关节腔内各注射 25 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 碘乙酸 50  $\mu$ L 进行 KOA 造模<sup>[11]</sup>,空白组不进行造模。1 周后向 pPRP 治疗组大鼠双侧后肢膝关节腔各注射 50  $\mu$ L 高浓度 pPRP,向空白组和 KOA 模型组大鼠膝关节腔注射等量生理盐水,每周 1 次,共注射 4 次。

**2.4 大鼠行为学、影像学及病理学观察** 实验干预 4 周后,采用步态分析仪对各组大鼠进行步态分析,速度设为 20 cm  $\cdot$  s<sup>-1</sup>,截取大鼠稳定跑步视频 4 s 左右,用 DigiGait 小鼠脚步特征数字化成像系统软件进行分析。步态分析结束后断颈处死大鼠,拍摄大鼠右侧后肢膝关节侧位 X 线片。X 线检查结束后取出大鼠膝关节置于 4% 甲醛溶液中固定 48 h,EDTA 脱钙 4

周,酒精逐级脱水,浸蜡包埋后在切片机上沿膝关节矢状面将胫骨外侧平台软骨下松质骨和股骨外侧髁软骨下松质骨均沿下肢纵轴方向作切片,厚度 5  $\mu$ m,常规 HE 染色、封片<sup>[12]</sup>。

**2.5 数据统计分析** 采用 DPS 9.5 软件进行数据统计分析,4 组软骨细胞增殖测定结果及 3 组大鼠双侧后肢着地面积的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 软骨细胞增殖测定结果** 培养 24、48、72 h 后 4 组软骨细胞活力比较,组间差异均有统计学意义。培养 24 h 后,pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组、pPRP 高浓度组细胞活力均高于生理盐水组( $P=0.026$ ;  $P=0.003$ ;  $P=0.000$ );pPRP 高浓度组和 pPRP 中浓度组的细胞活力均高于 pPRP 低浓度组( $P=0.028$ ;  $P=0.008$ );pPRP 高浓度组的细胞活力高于 pPRP 中浓度组( $P=0.002$ )。培养 48 h 后,pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组、pPRP 高浓度组细胞活力均高于生理盐水组( $P=0.002$ ;  $P=0.008$ ;  $P=0.006$ );pPRP 高浓度组和 pPRP 中浓度组的细胞活力均高于 pPRP 低浓度组( $P=0.033$ ;  $P=0.027$ );pPRP 高浓度组的细胞活力高于 pPRP 中浓度组( $P=0.002$ )。培养 72 h 后,pPRP 低浓度组、pPRP 中浓度组、pPRP 高浓度组细胞活力均高于生理盐水组( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ ;  $P=0.000$ );pPRP 高浓度组和 pPRP 中浓度组的细胞活力均高于 pPRP 低浓度组( $P=0.016$ ;  $P=0.033$ );pPRP 高浓度组的细胞活力高于 pPRP 中浓度组( $P=0.029$ )。见表 1。

表 1 4 组软骨细胞增殖情况测定结果  $\bar{x} \pm s$

组别	样本量(孔)	培养 24 h 后	培养 48 h 后	培养 72 h 后
生理盐水组	5	0.411 $\pm$ 0.014	0.502 $\pm$ 0.003	0.619 $\pm$ 0.008
pPRP 低浓度组	5	0.458 $\pm$ 0.052	0.551 $\pm$ 0.022	0.747 $\pm$ 0.006
pPRP 中浓度组	5	0.473 $\pm$ 0.029	0.568 $\pm$ 0.019	0.754 $\pm$ 0.031
pPRP 高浓度组	5	0.489 $\pm$ 0.011	0.572 $\pm$ 0.029	0.763 $\pm$ 0.018
<i>F</i> 值		5.860	12.196	67.065
<i>P</i> 值		0.007	0.000	0.000

**3.2 步态分析结果** 3 组大鼠跑步过程中单位时间内(1 s)左后肢和右后肢着地面积比较,组间差异均有统计学意义。空白组、pPRP 治疗组大鼠左后肢着地面积均大于 KOA 模型组( $P=0.002$ ;  $P=0.008$ );

空白组、pPRP 治疗组大鼠右后肢着地面积均大于 KOA 模型组( $P=0.001$ ;  $P=0.002$ );空白组与 pPRP 治疗组大鼠左后肢及右后肢着地面积比较,组间差异均无统计学意义( $P=0.050$ ;  $P=0.068$ )。见图 1、表 2。

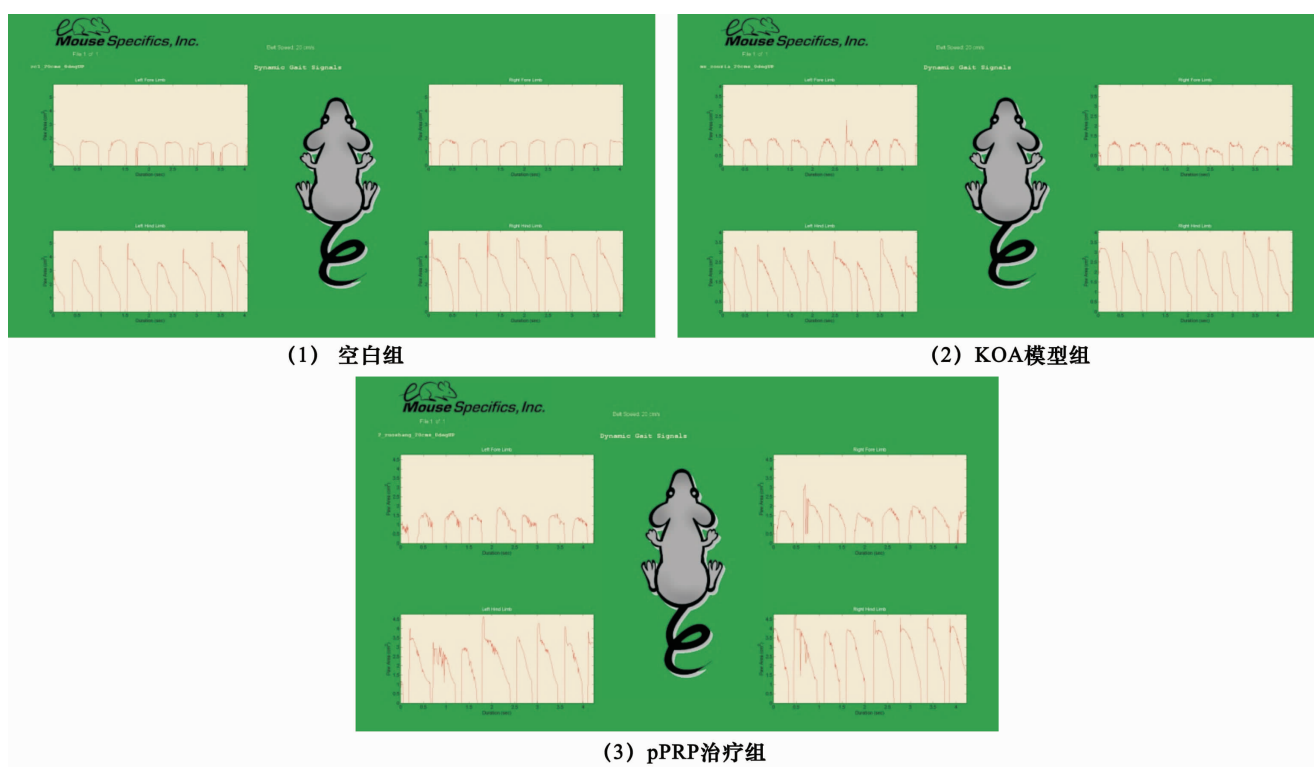


图 1 3 组大鼠跑步过程中后肢着地面积

表 2 3 组大鼠跑步过程中单位时间内(1 s) 后肢着地面积  $\bar{x} \pm s, \text{cm}^2$

组别	样本量(只)	左后肢着地面积	右后肢着地面积
空白组	10	$2.36 \pm 0.49$	$2.82 \pm 0.59$
KOA 模型组	10	$1.68 \pm 0.18$	$1.91 \pm 0.29$
pPRP 治疗组	10	$1.98 \pm 0.26$	$2.41 \pm 0.31$
F 值		10.320	11.790
P 值		0.005	0.002

**3.3 影像学检查结果** X 线片显示空白组大鼠膝关节软骨完整,关节面平整[图 2(1)];KOA 模型组关节软骨明显退变,胫骨平台与股骨远端关节面均不平整,有骨赘样组织形成,并有软骨缺损迹象[图 2(2)];与 KOA 模型组相比,pPRP 治疗组大鼠膝关节软骨退变程度较轻微[图 2(3)]。



图 2 3 组大鼠膝关节侧位 X 线片

**3.4 病理学检查结果** 与空白组相比,KOA 模型组大鼠膝关节软骨面明显缺损,缺损处软骨细胞丢失,软骨细胞排列紊乱,软骨下骨硬化,骨小梁面积明显减小,骨髓腔细胞增生、排列紊乱,骨小梁中的骨细胞

明显减少;pPRP 治疗组大鼠膝关节软骨面基本光滑,表面未见明显缺损或裂隙,部分区域内可见软骨细胞丢失,软骨下骨骨小梁排列尚整齐,骨小梁稀疏变窄,部分断裂。见图 3。



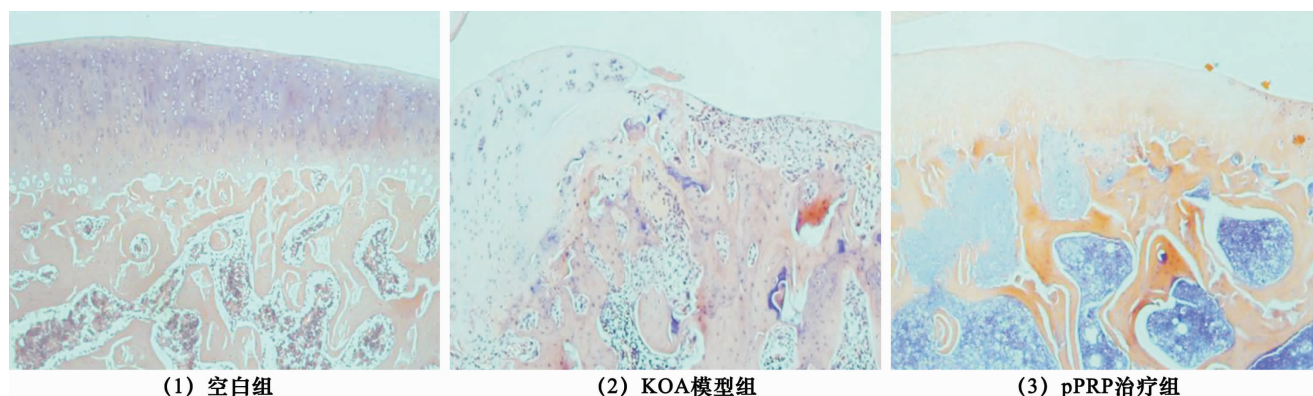


图 3 3 组大鼠膝关节软骨组织切片 (HE 染色 ×50)

## 4 讨 论

血小板所释放的多种细胞生长因子是关节修复所需的关键因子<sup>[13-17]</sup>,其中 PDGF 可促进成骨细胞趋化、增殖,增加胶原蛋白的合成能力;TGF- $\beta$  具有刺激成骨前体细胞及成骨细胞趋化和增殖、抑制破骨细胞形成和骨吸收的作用;IGF-1 能增加成骨细胞活力、促进软骨与骨基质生成;VEGF 可促进新生血管形成,有利于病灶区营养物质供给,还能直接作用于成骨细胞和软骨细胞,增强其迁移、增殖能力。

由于血小板可从患者自身全血中提取,经富集处理后发挥治疗作用,具有来源丰富,取材方便,分离简单等特点,已广泛应用于骨科、口腔科、运动医学等领域。现有的血小板制备方法为 PRP 法,得到 PRP 后用于实验研究和临床治疗。PRP 中血小板的纯度决定了各类生长因子的水平,也决定了其治疗效果。然而现有的 PRP 技术存在诸多缺陷,限制了其在临床的应用,如缺少质量控制体系和公认的统一标准,无法保证制备 PRP 的重复性和生物稳定性;血小板和生长因子获得率和纯度相对较低,仍有大量白细胞和红细胞污染;无法避免血浆残留引起的不良反应<sup>[18-19]</sup>。因此本研究采用通过优化工艺制备的 pPRP 进行实验。

从细胞增殖测定结果来看,培养 24、48、72 h 后 pPRP 各浓度组的细胞活力均高于生理盐水组,pPRP 高浓度组细胞活力均高于 pPRP 低浓度组和 pPRP 中浓度组。膝关节 X 线片和关节软骨病理检查结果均表明,与 KOA 模型组相比,pPRP 治疗组膝关节软骨退变程度较轻。跑步过程中单位时间内脚爪接触地面的面积可以反映大鼠膝关节的损伤程度。跑步过程中 pPRP 治疗组大鼠双侧后肢着地面积均大于 KOA 模型组,接近空白组。

本研究的结果提示,pPRP 可促进大鼠软骨细胞增殖;高浓度的 pPRP 可以在一定程度上修复 KOA 大鼠退变的关节软骨,改善运动能力。

## 5 参考文献

- [1] Gardner L. The Nature and causes of osteoarthritis[J]. Br Med J(Clin Res Ed),1983,286(6363):418-424.
- [2] Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, et al. Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis[J]. Int J Biochem Cell Biol,2010,42(10):1594-1601.
- [3] van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGF $\beta$  signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther,2010,12(1):201.
- [4] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther,2009,11(3):227.
- [5] Coluet J, Vinatier C, Merceron CA, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage[J]. Drug Discov Today,2009,14(19/20):913-925.
- [6] Mistry D, Oue Y, Chambers MG, et al. Chondrocyte death during murine osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004,12(2):131-141.
- [7] 吴俊,张俊,刘锦波. 富血小板血浆复合软骨细胞构建可注射性组织工程化软骨[J]. 中国组织工程研究,2014,18(30):4764-4770.
- [8] Kim Young, Park Hyung, Han Sik, et al. The effect of platelet-rich plasma on flap survival in random extension of an axial pattern flap in rabbits[J]. Plast Reconstr Surg,2013,132(1):85-92.
- [9] 刘黎,邓廉夫. 骨关节炎相关细胞因子及蛋白的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2013,13(1):187-190.
- [10] Ryu Hwang, Chun Soo. Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1 $\beta$  regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes[J]. J Biol Chem,

2006, 281(31): 22039-22047.

- [11] Tong P, Xu S, Cao G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe - stage osteoarthritis model induced by mono - iodoacetate [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 740-744.
- [12] 张荣凯, 杨禄坤, 叶志强, 等. 以关节不稳建立的大鼠骨关节炎模型[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(37): 6628-6635.
- [13] Sato M, Yamato M, Hamahashi K, et al. Articular cartilage regeneration using cell sheet technology [J]. Anat Rec (Hoboken), 2014, 297(1): 36-43.
- [14] Eo SH, Cho H, Kim SJ. Resveratrol inhibits nitric oxide - induced apoptosis via the NF - kappa B pathway in rabbit articular chondrocytes [J]. Biomol Ther (Seoul), 2013, 21(5): 364-370.
- [15] Pirvu N, Schroeder E, Peroglio M, et al. Platelet - rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production [J]. Eur Spine J, 2014, 23(4): 745-753.
- [16] Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, et al. Expression of transforming growth factor - beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD - 2P in spontaneous and instability - induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation [J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(11): 1414-1421.
- [17] Funck - Brentano Thomas, Lin Hilène, Hay Eric, et al. Targeting bone alleviates osteoarthritis in osteopenic mice and modulates cartilage catabolism [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33543.
- [18] 张丽, 高静, 肖长杰. 富血小板血浆在修复牙周组织缺损中的应用研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2011, 27(1): 571-573.
- [19] 王悦, 朱喆, 刘昕鸣, 等. 富血小板血浆提取方法的探讨[J]. 实用口腔医学杂志, 2011, 27(5): 643-648.

(2016-02-07 收稿 2016-09-30 修回)

## · 通 知 ·

### 全国水针刀微创技术及中医筋骨三针法学习班通知

水针刀微创技术、中医筋骨三针疗法是由北京世针联中医微创针法研究院院长吴汉卿教授经过 30 余年潜心研究, 在传统九针、刀针、水针疗法、针挑疗法、运动针法及太极针法基础上, 根据中医经筋学说及软组织解剖学所总结的融中西医针法于一体的中医微创技术。该技术已被纳入国家中医药管理局“中医医疗适宜技术”, 写入全国高等中医药院校创新教材, 确定为中医药 I 类继续教育推广项目。该技术问世以来, 全国性培训班已成功举办 200 余期, 培训学员数万名, 学员来自国内包括台湾、香港等地区及国外, 如: 马来西亚、新加坡、韩国、俄罗斯、澳大利亚、美国等, 其“短、平、快”的治疗特点受到了国内外专家及广大学员的好评。为满足广大医师要求, 继续举办学习班, 培训内容如下。

**水针刀微创技术、三氧融盘技术** ①水针刀微创技术结合三氧融盘技术治疗软组织损伤病, 如: 颈椎病、肩关节周围炎、肘关节病变、腕管综合征、腰椎间盘突出症、膝关节病变、坐骨神经痛、臀上皮神经痛、风湿类风湿关节炎、腱鞘炎、跟痛症等骨伤疼痛疾病。②水针刀尸体解剖微创入路内容: 该班在医学院解剖馆进行, 结合新鲜尸体全面讲解人体全身三维解剖以及三针法定位、进针方向、针下层次、危险区的划分、常用针法及操作技巧等内容, 学员能自己动手练习。

**中医筋骨三针疗法** 中医筋骨三针疗法分为微型筋骨三针疗法与巨型筋骨三针疗法 2 种, 微型筋骨三针疗法的优点: 该针具针体细如银针, 创伤微、痛苦小, 融合了中医针法和西医刀法, 定位独特, 针法灵活多变, 既有微创针刀的松解分离功能, 又有针灸的补泻候气、疏通经络功能; 该疗法主治: 中风偏瘫、失语症、三叉神经痛、面瘫、肋间神经痛、坐骨神经痛、皮神经卡压症、四肢末端病等。巨型筋骨三针疗法的优点: 该针法有钝性松解、安全可靠、通透力强、松解力度大等特点。其主要针法有: 筋膜扇形撬拨法、筋骨减压术、椎间孔针旋转术等 10 大针法; 该疗法主治: 颈腰椎术后综合征、腰椎管狭窄症、强直性脊柱炎驼背、颈 1 横突综合征、颈 7 棘突综合征等临床疑难病。同时培训水针刀松解埋线技术内容: 脊背九大诊疗区, 应用水针刀松解、注射、磁线留置并配合整脊手法快速治愈颈性心脏病、颈性咽炎、面瘫、癫痫病、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等; 并教授三氧自血疗法治疗心脑血管疾病, 乙肝、丙肝、脂肪肝等肝病, 妇科疾病及皮肤病性病等。

**培训时间:** 每月 1 日正式上课, 学期 12 天, 请提前 1 天报到。

**培训方式及待遇:** 学习班由吴汉卿教授主讲, 采用小班授课, 理论结合临床实习和尸体解剖操作, 学期结束后颁发培训证书及 I 类继续教育学分证书。

**培训地址:** ①北京班地址: 北京市东城区广渠门内夕照寺街东玖大厦 B 座 703 室, 北京世针联中医微创针法研究院。②河南南阳班地址: 河南省南阳市仲景路与天山路口, 水针刀研究院。

**联系电话:** 400 8377 618 **联系人:** 黄建老师 13721820657, 0377-63282507

**网址:** www.shuizhendao.com (中华水针刀微创网)