

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.20.004

自体富血小板血浆对兔膝关节骨性关节炎的治疗效果观察*

咸 杰,何本祥[△],吴 骁,檀亚军

(成都体育学院,成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨富血小板血浆(PRP)对膝关节骨性关节炎(KOA)的治疗机制及作用。**方法** 取成年清洁级新西兰大白兔 32 只,分为空白对照组(A组)、模型对照组(B组)、PRP 治疗组(C组)、玻璃酸钠治疗组(D组)。A 组行模拟造模,B、C、D 组按 Hulth 方法诱发建立兔 KOA 动物模型。动物模型建立成功后,C 组予 PRP 0.5 mL 关节腔注射治疗,3 周 1 次,共 2 次;D 组予玻璃酸钠注射液关节腔注射,每周 1 次,连续 5 周;A、B 组于 C 组同一时间点给予等量无菌生理盐水注射。在普通光学显微镜下观察关节软组织结构、细胞数量、潮线的完整性和甲苯胺蓝染色等情况,比较各组间 Mankin's 评分的差异。收集适量关节液测定各组花生四烯酸的表达情况。**结果** A 组关节软骨结构形态正常,无明显破坏;B、C、D 组关节软骨结构形态均有不同程度的破坏,尤以 B 组软骨结构改变较大,C、D 组软骨形态结构虽有改变,但与 A 组软骨结构较接近。A 组 Mankin's 评分最低,B 组评分最高,C、D 组经干预治疗后评分明显降低;B 组与 C、D 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),C 组与 D 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 组花生四烯酸水平最低,B 组最高,C、D 组水平介于 A、B 组之间,且 C 组低于 D 组($P < 0.05$)。**结论** PRP 对 KOA 具有较为明显的治疗及缓解作用。

[关键词] 膝关节;骨性关节炎;运动医学;富血小板血浆;花生四烯酸**[中图分类号]** R684.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)20-2747-04

Observation on effect of autologous platelet-rich plasma in treating rabbit knee osteoarthritis*

Xian Jie, He Benxiang[△], Wu Xiao, Tan Yajun

(Chengdu Sport University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the treatment mechanism and effect of platelet-rich plasma (PRP) in treating rabbit knee osteoarthritis (KOA). **Methods** Thirty-two New Zealand adult clean class rabbits were randomly divided into the blank control group (A), model control group (B), PRP treatment group (C) and sodium hyaluronate treatment group (D). The group A conducted the simulated model construction, while the group B, C and D established the KOA rabbit model by using the Hulth method. After establishing the animal model, the group C was given PRP 0.5 mL by knee articular cavity injection, once every 3 weeks, twice in total; the group D was given sodium hyaluronate by knee articular cavity injection, once per week for 5 continuous weeks. The group A and B were injected with equal amount of normal saline at the same time point in the group C. The histological structure of articular cartilage, cell number, integrity of tidal line, and toluidine blue staining were observed by common optical microscope. The differences of Mankin's scores were compared among various groups. The proper amount of knee joint fluid was collected for measuring the arachidonic acid expression in each group. **Results** The structure and morphology of articular cartilage in the group A were normal without obvious damage, while which in the group B, C and D had different degrees of damage, especially the cartilage structure in the group B had greater changes. Although the group B and C had the morphological and structure change of articular cartilage, but which was close to the cartilage structure in the group A. The Mankin's score in the group A was lowest, while which in the group B was highest, which in the group C and D was significantly decreased after intervention treatment; the difference between the group B with the group C and D had statistical significance ($P < 0.05$). The difference between the group C and D had statistical significance ($P < 0.05$). The arachidonic acid level in the group A was lowest and which in the group B was highest, which in the group C and group D ranged between the group A and B, moreover the group C was lower than the group D ($P < 0.05$). **Conclusion** PRP has obvious therapeutic and alleviated effect in treating KOA.

[Key words] knee joint; osteoarthritis; sports medicine; platelet-rich plasma; arachidonic acid

富血小板血浆 (platelets-rich plasma, PRP) 是自体血小板的浓缩物, 对治疗膝关节骨性关节炎 (KOA) 有较好的前景^[1], 但由于其疗效及作用机制尚未明了, 限制了其在临床应用。PRP 含有高于正常血浆 3~5 倍的生长因子, 这些内在的生长

因子都是以正常生物性比率存在的。在过去的 20 年中, 它已经在口腔科、颌面外科、普通外科等临床学科被广泛使用^[2]。PRP 中的 α -颗粒可以释放许多生长因子和细胞因子, 主要有转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板

* 基金项目: 四川省科技厅重点项目 (2016JY0052); 四川省科技厅支撑项目 (2014SZ0003); 成都体育学院硕士点建设基金项目 (16SSZX01)。作者简介: 咸杰 (1989-), 住院医师, 硕士, 主要从事运动创伤防治研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1210075193@qq.com。

源性生长因子、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、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子等, 这些细胞因子在细胞分化和细胞增殖等方面起着重要的作用^[3]。PRP 在治疗膝关节软骨退变方面的研究已经取得了很大进展, 但是其对软骨退变的作用机制仍需做深入的研究。

1 材料与与方法

1.1 实验动物及试剂 成年新西兰纯种雄性大白兔 32 只, 体重 1.80~2.50 kg, 平均(2.20±0.16)kg, 由达硕生物科技有限公司提供。清洁级环境条件下饲养于成都体育学院运动医学重点实验室动物实验中心饲养室。花生四烯酸水平检测的 ELISA 试剂盒由四川生工科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 PRP 的制备 自兔耳中心动脉采血。拔除兔耳中心动脉耳背走行处拟进针部位兔毛后, 拍打兔耳 4~5 次, 见动脉充盈后, 用蘸 75% 乙醇的棉签擦拭进针部位 4~5 次, 使动脉继续扩张充血, 以利于进针及采血, 同时对进针部位进行消毒。取 10 mL 无菌注射器拔除针头后连接一次性输液针, 将输液针于进针部位向兔耳耳根方向进针刺入兔耳中心动脉, 缓慢抽取约 5 mL 动脉血, 注入肝素抗凝的真空采血管中, 反复晃动采血管 15~20 次以使抗凝剂与血液完全混合, 防止血液凝固。参照 Landesberg 等^[4]采用二次离心法将 5 mL 自体全血制备为 0.2 mL PRP, 并在血细胞分析仪中对 PRP 进行血小板计数。

1.2.2 动物分组及模型建立 32 只新西兰大白兔按照 Huth^[5]法建立 KOA 动物模型, A 组行模拟造模(假造模); B、C、D 组按照 Huth 方法诱发建立兔 KOA 动物模型^[5]。B、C、D 组造模步骤: 备皮及麻醉满意后, 取仰卧位将实验动物固定在兔手术操作台上, 通过 10% 水合氯醛(按 0.15 mL/100 g 比例^[6])腹腔麻醉后, 取膝关节内侧弧形切口, 依次切开皮肤、皮下组织, 然后切断内侧副韧带, 切开关节囊, 打开关节腔。稍屈曲膝关节, 向外侧牵开髌骨、髌韧带及关节囊, 暴露关节腔, 切除内侧半月板, 切断前、后交叉韧带, 术中应注意避免损伤关节软骨面。用生理盐水注射液反复冲洗关节腔, 切口内注入硫酸庆大霉素注射液 2 万单位, 关闭关节囊, 逐层缝合关闭切口, 外用防水创可贴包扎切口。A 组行假造模, 术前准备、麻醉方式、消毒铺巾同 B、C、D 组; 手术过程中, 不切断内侧副韧带, 打开关节腔后, 探查关节腔, 观察关节腔内无原发病变后关闭切口, 切口关闭方法亦同 B、C、D 组。

1.2.3 干预手段 动物模型稳定后, C 组予自体 PRP 关节腔注射治疗, 3 周 1 次, 每次 0.5 mL, 共 2 次; D 组予玻璃酸钠关节腔注射, 给药剂量根据 Meeh-Riibner 公式计算, 将按体表面积折算的临床常用量等效剂量约为每只兔子 0.2 mL, 每周 1 次, 连续 5 周; A、B 组于 C 组同一时间点给予等量生理盐水注射。

1.2.4 检测指标 治疗 6 周后用空气栓塞法处死所有实验动物。(1)一般情况: 通过 Huth 法诱发造模成功后, 观察各组兔存活状况及造模患肢关节肿胀程度及局部皮温是否升高、肤色状况。(2)花生四烯酸水平测定: 干预及治疗周期结束后, 处死动物, 同时收集造模患肢关节液, 通过 ELISA 双抗夹心法测定

其浓度。

1.2.5 组织形态学观察 切取标本全层膝关节软骨组织, 置于 10% 中性甲醛固定, 石蜡切片, 片厚 6 μ m, 常规 HE 及甲苯胺蓝染色, 400 倍光镜下观察关节软组织结构、细胞数量、甲苯胺蓝染色和潮线完整性。根据 Mankin's 评分标准对关节软骨评分^[7]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 对所得数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C 组外周血与 PRP 浓度之比 离心前全血细胞为 $(361.37 \pm 107.46) \times 10^9/L$, 二次离心后血细胞为 $(1407.75 \pm 317.92) \times 10^9/L$, 其浓度之比均在 3~5 倍, 符合 PRP 要求标准。见表 1。

表 1 C 组外周血与 PRP 浓度之比 ($\times 10^9/L$)

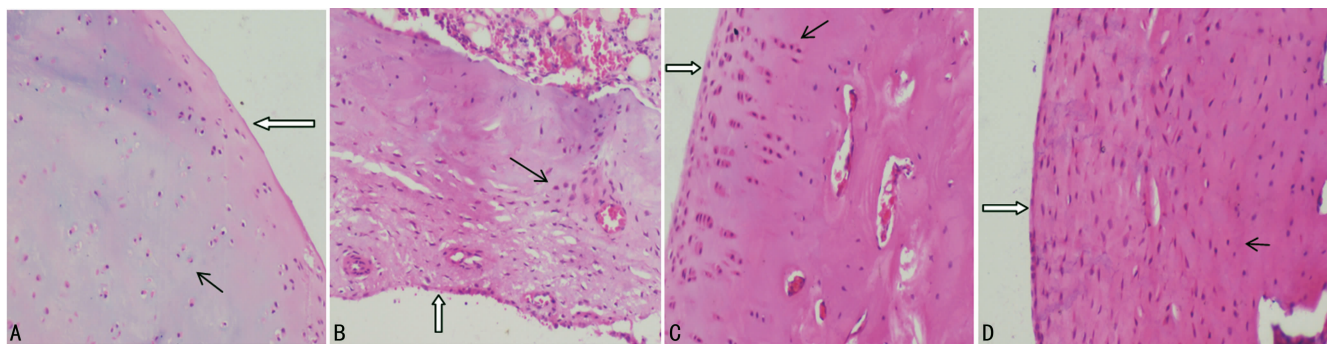
动物编号	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
离心前	259	392	408	569	337	361	208	357
二次离心后	1064	1649	1618	1882	1296	1472	914	1367
离心前后比	4.1	4.2	4.0	3.3	3.8	4.1	4.4	3.8

2.2 一般情况 所有实验动物均存活至实验完成。除手术组动物出现 KOA 外, 所有动物均未出现其他原因所致关节腔感染及病灶的感染。3 组动物造模患肢关节略红肿, 皮温略高于正常。

2.3 各组花生四烯酸水平比较 A、B、C、D 组花生四烯酸水平分别为 (33.15 ± 4.61) 、 (55.90 ± 4.31) 、 (38.65 ± 0.88) 、 (46.39 ± 4.89) mg/g, 差异有统计学意义 ($F = 47.507, P = 0.000$)。B、D 组与 A 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。C 组与 A 组相比较, 差异有统计学意义 ($P > 0.05$)。C、D 组与 B 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。C 组与 D 组相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

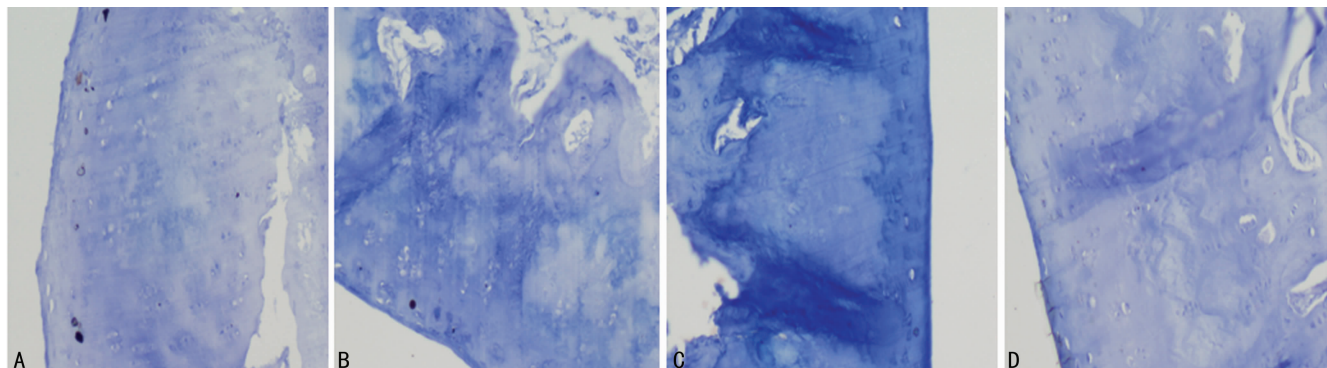
2.4 组织形态学观察 A 组在电镜下切片显示为正常软骨形态, 细胞排列规整, 层次分明, 细胞大小一致, 软骨表面完整, 潮线清晰完整。B 组可见细胞排列紊乱, 层次不清晰, 且可见较为明显的软骨缺损, 局部细胞数量明显增多, 细胞分裂增多, 潮线模糊, 基质失染较为明显。C 组可见软骨层增厚, 细胞排列较为规整, 层次分明, 细胞数量较 B 组明显减少, 未见明显弥漫性数量增生, 细胞核未见明显分裂, 潮线清晰层次分明, 基质未见明显失染。D 组可见软骨细胞排列较为有序, 但细胞层次清晰不如 C 组, 细胞数量轻度增生, 但较 B 组较少, 潮线较为清晰完整, 甲苯胺蓝染色较弱。见图 1、2。

2.5 各组 Mankin's 评分比较 软骨组织结构: C、D 组与 B 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。软骨细胞数量: C、D 组与 B 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组与 C 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。AB-PAS 染色: B、D 组与 A 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C、D 组与 B 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组与 C 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。潮线: C、D 组与 B 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组与 C 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组;“⇨”指示为关节面,“→”指示为排列的软骨细胞

图 1 各组电镜下 HE 染色切片(×400)



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

图 2 各组电镜下甲苯胺蓝染色切片(×400)

表 2 各组 Mankin's 评分比较(̄x±s)

指标	A 组	B 组	C 组	D 组	F	P
软骨组织结构	0.13±0.35	2.50±0.53*	1.13±0.64*#	1.63±0.52*#	28.880	0.000
软骨细胞数量	0.25±0.46	2.51±0.76*	0.51±0.76#	1.50±0.53*#△	20.594	0.000
AB-PAS 染色	0.15±0.48	3.38±0.74*	0.89±0.60#	2.03±0.97*#△	29.930	0.000
潮线	0.12±0.36	2.38±0.18*	0.78±0.44#	1.62±0.53*#△	26.496	0.000
总分	0.65±0.94	10.77±0.74*	3.31±1.23*#	6.43±1.07*#△	127.065	0.000

*: P<0.05,与 A 组比较;#: P<0.05,与 B 组比较;△: P<0.05,与 C 组比较

3 讨 论

本实验研究证实了采用 Hulth 方法诱发建立的兔 KOA 动物模型,其病理过程基本与人类临床上 KOA 的病理变化十分相似,适用于 KOA 病理改变和膝关节腔内药物注射探讨其作用机制等方面的研究;并且动物模型诱发成功率高,稳定性好,本实验所需的动物实验模型均诱发成功。

本次实验采用 Landesberg 二次离心法制备 PRP,操作方法简便稳定,制备浓度高,结果证实其浓度之比为 3~5 倍,与国内外多数文献吻合。

伴随关节软骨的退变,关节液分泌多种炎性介质诱导炎性反应^[8],其中花生四烯酸是较为主要的炎性介质产物之一。花生四烯酸作为前列腺素 E2(PGE2)的前体,通过环氧化酶(COX)的诱导产生后者诱发一系列的炎症反应^[9-10]。正常关节液中并不含或仅含少量花生四烯酸,关节发生炎症反应后花生四烯酸的水平与关节炎性程度呈直接正相关,同时活化后的花生四烯酸能够通过多种白介素因子促进软骨细胞的降解^[11]。实验结果显示,经过 6 周治疗后 PRP 与玻璃酸钠对关

节液中花生四烯酸浓度均有不同程度的下降,提示两组治疗效果较模型对照组较为明显,具有较为理想的治疗效果。同时,PRP 治疗组及玻璃酸钠治疗组 Mankin's 评分均有较为明显的下降,提示二者均能一定程度促进早期关节软骨修复,减轻关节软骨的磨损。而 PRP 治疗组评分优于玻璃酸钠治疗组,提示 PRP 在延缓关节软骨早期退变进程上优于玻璃酸钠。PRP 可能通过释放一系列活性物质^[5],促进受损软骨及局部血管的再生,抑制局部炎性介质的产生,降低 COX 的表达^[12],使花生四烯酸活性降低,与此同时,PRP 所释放的活性因子可下调 COX-2 的表达,降低炎性介质类产物的活性,从而降低花生四烯酸在炎性反应中的作用。此外,PRP 还能上调肝细胞因子及肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的表达,二者能阻断核因子 κB(NF-κB)的表达,抑制炎性反应的发展,从而减轻关节局部的肿胀^[13]。尽管如此,PRP 的制备过程尚未统一,且在制备过程中可产生含白细胞的 PRP(L-PRP)及不含白细胞的 PRP(R-PRP),二者在对膝关节骨性关节炎干预过程中的机制及对比尚需进一步完善。

参考文献

- [1] Bottegoni C, Dei Giudici L, Salvemini S, et al. Homologous platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis in selected elderly patients: an open-label, uncontrolled, pilot study [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2016, 8(2): 35-41.
- [2] Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Solà I, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 25(5): CD006899.
- [3] Pastar Z, Kulisic SM. Effects of platelet-rich plasma in the treatment of chronic ulcer [J]. *Acta Med Croatica*, 2016, 70(1): 65-70.
- [4] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation [J]. *J Oral Maxillo-fac Surg*, 2000, 58(3): 297-300.
- [5] 黄国均. 医药实验动物模型: 制作与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [6] 秦川. 实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [7] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1971, 53(3): 523-537.
- [8] Sánchez M, Anitua E, Delgado D, et al. A new strategy to tackle severe knee osteoarthritis: Combination of intra-articular and intraosseous injections of Platelet Rich Plasma [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(5): 627-643.
- [9] Tsutsumi R. Celecoxib inhibits production of MMP and NO via down-regulation of NF- κ B and iNOS in a PGE2 independent manner in human articular chondrocytes [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 28(81): 727-736.
- [10] Mastbergen SC. Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(4): 405-413.
- [11] Rasheed N, Alghasham A, Rasheed Z. Lactoferrin from camelus dromedarius inhibits nuclear transcription factor- κ B activation, cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in stimulated human chondrocytes [J]. *Pharmacognosy Res*, 2016, 8(2): 135-141.
- [12] Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1 [J]. *Orthop Res*, 2014, 32(4): 551-556.
- [13] Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF [J]. *Cell Physiol*, 2010, 225(3): 757-767.

(收稿日期: 2017-02-11 修回日期: 2017-04-16)

(上接第 2746 页)

- al. Imaging of hypoxia with 18F-FAZA PET in patients with locally advanced non-small cell lung cancer treated with definitive chemoradiotherapy [J]. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 2013, 57(4): 475-481.
- [8] Osinsky S, Zavelevich M, Vaupel P. Tumor hypoxia and malignant progression [J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(2): 80-86.
- [9] Ren W, Mi D, Yang K, et al. The expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Swiss Med Wkly*, 2013, 143(5): w13855.
- [10] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4640-4652.
- [11] Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, et al. Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86459.
- [12] Zhao M, Zhang Y, Zhang H, et al. Hypoxia-induced cell stemness leads to drug resistance and poor prognosis in lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2015, 87(2): 98-106.
- [13] 孟凡荣, 陈琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014(12): 870-876.
- [14] 张曼, 孙秀萍, 宋铭晶. 慢病毒载体用于转基因技术的研究进展 [J/CD]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2014, 8(10): 1949-1953.
- [15] Khetawat D, Broder CC. A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system [J]. *Virol J*, 2010, 7(1): 312.

(收稿日期: 2017-02-09 修回日期: 2017-04-14)

欢迎投稿

欢迎订阅