论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1374-04

复合PRP的可注射型组织工程骨修复兔桡骨缺损的实验研究

黄爱文,金 丹,裴国献,曾宪利,胡稷杰,林海宁 (南方医科大学南方医院创伤骨科,广州 510515)

提 要: 目的 以自体富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)、骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)和纤维蛋白胶构建可注射型组织工程骨并探讨其修复骨缺损的效果。**方法** 36只新西兰兔分为A、B、C 3组,每组12只。A、B组动物术前4 h抽取耳背中央动脉血提取PRP。A组于术前1~2个月抽取双髂骨处骨髓并培养出BMSCs,在体外与纤维蛋白胶(FG)及自体PRP构建成可注型组织工程骨,植入自体桡骨1.5 cm节段性骨缺损,为实验组。B、C两组分别植入PRP+FG、FG于同样骨缺损处为对照组。另取4只桡骨同样部位和大小骨缺损旷置作为空白组。术后观察其一般情况并于4、8、12周取材做组织学切片,术后12周取尺桡骨做生物力学测试。分别从组织学观察、生物力学方面评估比较骨缺损的修复情况。**结果** 组织学观察见A、B组各时间点新骨形成均优于C组。生物力学比较:12周时A组桡骨生物力学强度与正常桡骨比较无明显差异($P>0.05$),但其明显优于B组($P<0.05$)。**结论** PRP对骨缺损愈合有明显促进作用,复合PRP的可注射型骨修复材料及构建的含种子细胞的组织工程骨均可修复节段性骨缺损,但种子细胞的添加可明显促进新骨成熟度和增强其生物力学性能。

关键词: 富血小板血浆;组织工程骨;骨缺损;纤维蛋白胶;骨髓基质干细胞
中图法分类号: R-33;R318.1;R683.410.5 **文献标识码**: A

Injectable tissue-engineered bone made of autologous platelet-rich plasma, fibrin glue and BMSCs for repairing segmental radial defect in rabbits

HUANG Ai-wen, JIN Dan, PEI Guo-xian, ZENG Xian-li, HU Ji-jie, LIN Hai-ning (Department of Orthopaedics and Traumatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To construct injectable tissue-engineered bone graft with fibrin glue (FG), autologous platelet-rich plasma (PRP) and BMSCs and investigate its effect on repairing segmental radial defect in rabbits. **Methods** Thirty-six New-Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups ($n=12$ in each group). A 1.5 cm segmental defect in right radius was made in each animal and three different bone grafts were implanted there respectively. Group A: FG + PRP + BMSCs, Group B: FG + PRP, Group C: FG. About a month before operation, BMSCs withdrawn from bilateral iliac bones of rabbits were cultured and multiplied *in vitro*. Four hours before operation, PRP was extracted from autologous arterial blood and stored at −70 ℃. Another 4 rabbits of which the same defects in radius left empty served as the blank group. At the end of 4, 8, 12 weeks after implantation, two rabbits were sacrificed and specimens were taken from the part of bone defect for histological examination. At the end of 12 weeks, all animals were sacrificed and the radius were taken to analyze the biomechanics strength. **Results** In groups A and B, most FG was absorbed and substituted by newly formed cortical bone in postoperative 8 weeks. Twelve weeks later, the mature new bone with plenty of bone matrix filled in the bone defect and there formed a medullary cavity in group A. The biomechanical strength of radius in group A showed no significant statistical difference with that of normal radius ($P>0.05$), but was better than that in group B ($P<0.05$). **Conclusion** Since PRP can promote healing of bone defects, the

基金项目:国家高技术发展计划("863"计划)重大专项课题(2003AA205010)
Supported by the Key Program of the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205010)
作者简介:黄爱文(1973-),男,湖北省武汉市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨组织工程和骨创伤方面的研究。电话:(020)61641744
通讯作者:裴国献,电话:(020)61641741
收稿日期:2007-01-23;修回日期:2007-04-03

injectable bone grafts made of autologous PRP, with or without BMSCs, are effective in repairing segmental bone defect, and the presence of BMSCs could improve the new bone maturation and increase the biomechanic strength.

Key words: platelet-rich plasma; tissue engineered bone; fibrin glue; bone defect; bone marrow stromal cells

PRP 中含有高浓度的生长因子如血小板源性生长因子（PDGF）、转移生长因子-β（transforming growth factor-β, TGF-β）、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、类胰岛素生长因子（insulin-like growth factor, IGF）、表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）等[1,2]。这些生长因子对促进骨再生有较好的作用。近年来，一些学者证实 PRP 有较佳的促进骨再生能力，与一些植骨材料复合能早期促进新骨形成量和成熟度[3,4]。我们利用组织工程学原理，设计以自体 PRP + 种子细胞 + 可注射型支架材料（纤维蛋白胶），构建可注射型组织工程骨，修复兔桡骨标准骨缺损，在早期的放射学结果中显示有较好的修复效果[5]。本研究从组织学和生物力学方面进一步比较其成骨作用及促血管化影响等，为临床应用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

DMEM 高糖培养基、胎牛血清（Hyclone 公司），抗坏血酸、地塞米松、β-甘油磷酸钠、胰蛋白酶（Sigma）公司。纤维蛋白胶（广州倍绣生物技术公司），抑肽酶（美国 CNI 公司），枸橼酸钠（分析纯，汕头光华化学厂）CO_2 培养孵箱，Sigma-2k-15 低温高速离心机，超净工作台，Nikon 倒置相差显微镜，16#骨髓穿刺针。

1.2　方法

1.2.1　实验动物　　健康新西兰大白兔 36 只（由南方医科大学南方医院动物所提供），雌雄不拘，6 月龄，体质量 2 ~ 3 kg。分为 A、B、C 3 组，每组 12 只动物，编号分笼饲养。采用速眠新、氯胺酮和阿托品复合液肌注麻醉。无菌条件下，手术显露右侧桡骨中段，连同骨膜切除桡骨 1.5 cm。造成节段性骨缺损模型，其中 A 组为实验组，缺损处植入复合可注射型组织工程骨（FG + PRP + BMSCs），B、C 两组为对照组，分别植入复合材料（FG + PRP）和单纯材料（FG）。根据骨缺损大小，植入材料体积约 0.6 ml。上述材料均为胶状。逐层缝合切口，术后 3 d 肌注青霉素 40 万 U/d。另取 4 只兔骨缺损处旷置作为空白组。

1.2.2　细胞培养　　A 组 12 只新西兰大白兔，约术前 1 个月抽取骨髓。采用速眠新、氯胺酮和阿托品复合液肌肉注射麻醉。双侧髂骨处抽取红骨髓 3 ml，按文献[6]方法培养 BMSCs 并诱导其向成骨细胞分化。

1.2.3　PRP 的制作　　整个制作过程严格无菌，术前 4 h，在装有 0.5 ml 10% 枸橼酸钠抗凝剂的 5 ml 注射器，从兔耳背中央动脉抽取 5 ml 血液，摇匀，置入离心管中，采用二次离心法[7]制备 PRP。每 5 毫升全血制成 PRP 约 0.6 ml。

1.2.4　可注射型组织工程骨的构建　　该过程在超净台内完成。复合 PRP 的可注射型组织工程骨由溶液Ⅰ、Ⅱ组成。以抑肽酶溶液溶解纤维蛋白原（80 mg/ml），加入自体 PRP 和细胞密度为 5×10^6/ml 的细胞悬液，成溶液Ⅰ，溶液Ⅰ中纤维蛋白原溶液、PRP 及 BMSCs 细胞悬液体积比为 10∶3∶2。溶液Ⅱ为催化剂溶液，其成份为 $CaCl_2$（40 mmol/ml）和凝血酶（400 IU/ml）。术前 30 min 将消化计数后的 BMSCs 注入含 PRP 的纤维蛋白原溶液中，摇匀，置 37 ℃孵箱备用。使用时以双联注射器分别吸入溶液Ⅰ、Ⅱ；注入体内后约 20 s 形成黏稠果冻状凝胶。B 组不含 BMSCs，C 组不加 BMSCs 和 PRP，其余成分及浓度一致。

1.2.5　检测方法

1.2.5.1　大体观察　　严密观察新西兰大白兔术后的一般情况。术后 4、8、12 周每组各处死 2 只动物取材，观察组织工程骨的表面变化、骨痂形成、骨缺损修复情况及周围组织反应。

1.2.5.2　组织学观察　　分别取术后 4、8、12 周各组骨缺损处中央组织，10% 甲醛固定，复合脱钙液脱钙，石蜡包埋，切片 HE 染色观察其成骨情况。

1.2.5.3　生物力学检测　　取 A、B 组术后 12 周骨缺损愈合的尺桡骨及正常尺桡骨（N 组）各 5 根于 MTS-858 万能材料实验机上作抗扭转、垂直压缩及三点弯曲试验，计算机记录测试数据并绘制力位移曲线，根据曲线计算其扭转刚度，压缩刚度及最大折断力和抗折弯刚度。C 组无骨性愈合标本，未行生物力学检测。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行完全随机设计方差分析，同一时间点各组间的差异 LSD 法比较。

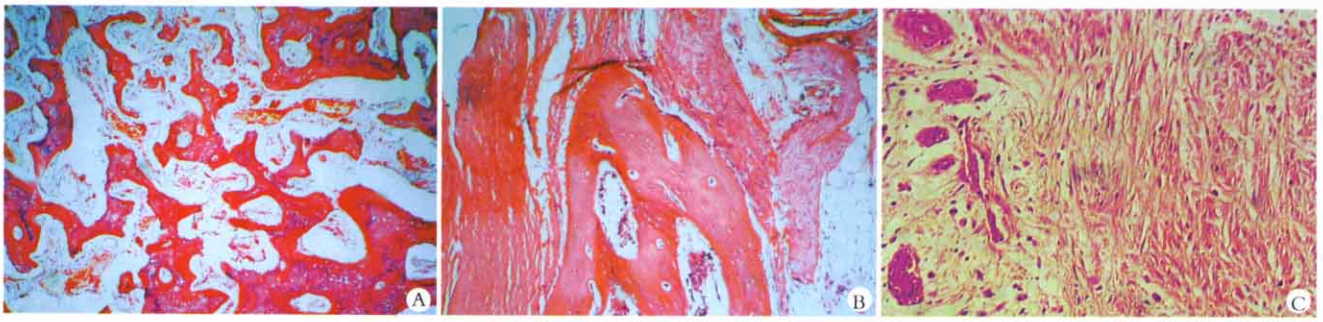
2　结果

2.1　一般情况

术后 1、2 d 所有兔精神、饮食稍差，活动少，无畏寒发热征象，全身未见皮疹。手术伤口无红肿、渗液等。3 d 后精神好转，饮食正常，活动增加。

2.2　组织学观察

术后 4 周，A、B、C 组纤维蛋白凝胶均大部分降解吸收。A 组见新生血管丰富，纤维组织下有大量新生骨组织，可见骨小梁结构，局部见较多成骨细胞及软骨细胞。B 组为纤维组织及新生血管充填。其间有散在片状骨小梁结构，以骨细胞较多见，有小量成骨细胞及软骨细胞。C 组为纤维组织结构，并见少量横纹肌。成纤维细胞丰富，未见成骨（图 1）。



A：A 组 支架材料基本吸收，骨小梁有较多新生血管长入；B：B 组 支架材料已吸收，纤维组织中有片状新生骨小梁；C：C 组 主要为新生内芽组织，未见新骨形成

图 1 术后 4 周各组兔桡骨骨缺损修复处组织学观察 （HE×100）

术后 8 周，各组凝胶均完全降解。A 组见大量新生骨组织连成片状，骨基质丰富并见明显钙盐沉积，有髓腔样结构形成；B 组新生骨组织呈交织状、岛状，较 A 组稍少；C 组仍以纤维组织为主，其间有少量片状成骨。

术后 12 周，A 组为成熟骨组织结构，骨基质丰富，骨细胞缩小，可见少量破骨细胞，骨髓腔贯通，其间可见造血细胞及脂肪细胞；B 组骨组织成熟度稍差，亦可见髓腔内有血细胞；C 组仍为纤维结缔组织，仅见少量小片状骨组织。

2.3 生物力学评估

A 组各生物力学性能稍差于正常尺桡骨组（N），但经方差分析，A 组除压缩刚度与正常尺桡骨组（N）比较有统计学意义（$P<0.05$）外，其抗扭转刚度、抗折弯刚度、三点弯曲最大载荷与正常组比较差别无统计学意义（$P>0.05$）。B 组各生物力学指标均低于 A 组，其差别有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 A、B 组与正常尺桡骨生物力学指标（$n=5, \bar{x}\pm s$）

组别	抗扭转刚度（N·m）	压缩刚度（10^{-3} N/mm）	最大折断载荷（N）	抗折弯刚度（10^{-3} N/mm）
A	0.068 2±0.004 5	640.77±16.90	230.59±14.20	239.09±25.77
B	0.039 0±0.003 1[b]	502.85±32.00[a]	178.69±17.36[b]	154.33±26.87[b]
N	0.071 7±0.003 5	710.69±81.36[a]	260.60±20.462	54.97±12.95

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 A 组比较

3 讨论

骨缺损的修复一直是骨科研究领域的难题，用组织工程方法修复骨缺损是近年来兴起的新技术。随着骨组织工程技术研究的深入，生长因子在组织工程骨中的应用引起了越来越多的学者的注意。目前研究表明骨诱导能力明确的生长因子有 BMP、TGF-β、PDGF、IGF、bFGF 等[8,9]。但单纯应用生长因子于局部，因其半衰期短、易降解或随血循环稀释，不能在局部保持长期的有效浓度[10]。所以必须与载体复合构成一缓释系统，以保证局部形成长期有效的治疗浓度。纤维蛋白是较常用的缓释载体材料之一，其生物相容性好，可完全降解吸收，在 FG 凝聚过程中形成的纤维网格结构有利于生长因子等的缓释。

在骨折的自然愈合过程中，嵌入骨折断端部位的血凝块起着重要作用，其中血凝块中的纤维蛋白和血小板聚集过程中释放的各种生长因子起主导作用。笔者根据仿生学原理，模仿嵌入骨折处的血凝块的成分构建可注射型组织工程骨，其中血小板是经浓缩的，这样可提高生长因子浓度，抑肽酶的加入使 FG 降解减慢，有助于生长因子的缓释。国内外研究者证实添加多种生长因子比用单一生长因子更有利于促进骨愈合[11]。从自体全血中提取的 PRP，制作简单，无免疫原性，且含多种有利于骨愈合的生长因子如 TGF-β、PDGF、IGF 等。另外，PRP 中各种生长因子间浓度比例可能最接近于正常比例，各种生长因子间能发挥最佳协调作用。有研究表明 PRP 与固体材料如 β-TCP、同种异体骨、自体骨等复合能促进新骨再生[3,4]。本研究利用 FG 成形前各成分为液体的特性，复合自体 PRP 与体外培养的 BMSCs，体外构建出可注射状的自体组织工程骨，用于修复兔桡骨缺损，实验结果表明，从组织学方面观察，术后早期 A 组即有大量骨小梁形成，骨细胞及软骨细胞多见，并有大量新生血管组织长入组织工程骨内，这表明本方法构建的组织工程骨体内植入后有较好的促细胞增殖作用和血管化作用。B 组在早期也可见较多新生血管长入，也有原始骨小梁形成，但骨细胞数量及成骨量稍差。而未用 PRP 的 C 组，仅形成纤维组织，未见骨细胞，新生血管较少。这

表明 PRP 的添加一方面可促进组织工程骨中种子细胞的增殖,另一方面也有一定的骨细胞趋化性,可使周围组织中间充质细胞向骨缺损部位聚积,新生血管组织的长入一方面给细胞带来丰富的营养,可促进细胞的成活和增殖,另一方面也为其他部位的间充质细胞聚积于骨缺损部位提供了通道。这可能就是 PRP 中多种生长因子协同作用的结果。国外一些学者证实 PRP 中含有高浓度的 PDGF、TGF-β、VEGF、IGF 等[1,2]。FG 中的氯化钙、凝血酶与 PRP 混合后可以促进血小板凝集,使血小板 α 颗粒释放 PDGF、TGF-β、VEGF 等生长因子。随着 FG 的降解,这些生长因子逐渐释放出来并可在局部维持较长期有效浓度。

这些生长因子中[1],PDGF 具有较强的促有丝分裂和细胞趋化作用,可促进骨髓基质干细胞增殖,也可促使周围组织或血液中的间充质细胞向局部聚积。TGF-β 对未分化的间充质细胞有较强的促增殖功能。而 VEGF 对新生血管的形成具有重要的促进作用,可促进组织工程骨的血管化。IGF 对调整成骨细胞和破骨细胞活性及分化有重要影响[12]。

本研究中生物力学结果显示,组织工程骨修复后尺桡骨生物力学强度与正常尺桡骨差别不大,但未加种子细胞组修复骨缺损后的生物力学特点明显较差。这表明种子细胞的添加可改善骨修复的效果,促进骨成熟和改善生物力学选择性。

综上所述,PRP 促进骨再生的作用主要体现为生长因子作用,尤其体现为多种生长因子的协同作用。但是其具体协同作用机制及各生长因子最佳有效浓度与最佳比例仍有待探讨[13]。

本实验构建的复合 PRP 的可注射型组织工程骨在动物实验中显示了优良的成骨能力,可促进组织工程骨的早期血管化,修复骨缺损从组织学及生物力学方面均有较好的结果。该方法可能对临床骨缺损的修复有一定的指导意义。而且注射型组织工程骨塑形良好,可适用用不规则形骨缺损修复的需要。使用方便,不仅适用于手术治疗骨缺损,也可用于非手术(经皮注射)治疗骨折和骨不连等。如在这种组织工程骨中再加入抗生素,相信也可用于慢性骨髓炎的治疗。

当然,作为一种骨修复材料,必须有足够的机械强度以满足植入初期的支撑需要。本注射型组织工程骨在机械强度方面弱于固体材料,只能用于一些小的非负重区骨缺损的修复,用于大的骨缺损的修复必须与有足够强度的材料同时应用。如何提高可注射型骨修复材料的生物力学强度,以及探寻 PRP 的体内最佳作用浓度等,仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] Assoian R K, Grotendorst G R, Miller D M, *et al*. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets[J]. Nature, 1984, 309(5971): 804 - 806.

[2] Fennis J P, Stoelinga P J, Jansen J A. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2002, 31(3): 281 - 286.

[3] Camargo P M, Lekovic V, Weinlaender M, *et al*. A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans[J]. Int J Periodontics Restorative Dent, 2005, 25(1): 49 - 59.

[4] Hanna R, Trejo P M, Weltman R L. Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial[J]. J Periodontol, 2004, 75(12): 1668 - 1677.

[5] 黄爱文,金　丹,裴国献,等. 复合富血小板血浆(PRP)的可注射型组织工程骨的构建及其修复兔桡骨缺损的放射学评估[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(4): 363 - 367.

[6] 金　丹, 裴国献. 利用骨髓基质细胞体内异位成骨的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2000, 2(1): 49 - 50.

[7] Froum S J, Wallace S S, Tarnow D P, *et al*. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports[J]. Int J Periodontics Restorative Dent, 2002, 22(1): 45 - 53.

[8] Yuan H, Zou P, Yang Z, *et al*. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis[J]. J Mater Sci Mater Med, 1998, 9(12): 717 - 721.

[9] Nevins M, Camelo M, Nevins M L, *et al*. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone[J]. J Periodontol, 2003, 74(9): 1282 - 1292.

[10] 杨志明, 李裕标, 秦廷武, 等. 含缓释生物活性因子的组织工程骨异位成骨[J]. 中国医学科学院学报, 2003, 25(1): 2 - 6.

[11] 杜俊杰, 罗卓荆, 胡蕴玉, 等. 骨形态发生蛋白-2、β 转化生长因子、碱性成纤维成纤维细胞生长因子在体内诱导成骨中的协同作用[J]. 中国临床康复, 2002, 6(14): 2062 - 2063.

[12] 许光武, 俞茂华. 胰岛素样生长因子[J]. 中化内分泌代谢杂志, 2000, 16(1): 52 - 55.

[13] 许建中, 范东伟, 张文霞. 经Ⅱ型胶原修饰后的 PLGA 对诱导后的骨髓基质干细胞粘附及分化的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005, 40(3): 424 - 426.

(编辑　汪勤俭)