

网络出版时间: 2017-4-10 14:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170410.1440.033.html>

◇技术与方法◇

外周血间充质干细胞复合富血小板血浆对腓骨界面愈合的影响

余刚, 徐斌, 涂俊, 刘一军

摘要 探讨兔外周血间充质干细胞(PB-MSCs)复合富血小板血浆(PRP)对腓骨愈合的作用效果。48只新西兰兔分成4组,行前交叉韧带重建术,分别向各组股骨道内注入凝胶、PRP凝胶、PB-MSCs凝胶及PRP+PB-MSCs凝胶。术后4、8、12周各组随机处死4只实验兔,对标本行HE染色,观察腓骨界面组织形态学特点。与对照组相比,PRP组、PB-MSCs组及PRP+PB-MSCs组3个时间点组织形态学评分更高,其中PRP+PB-MSCs组评分最高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明PRP、PB-MSCs均能促进腓骨愈合,并且PB-MSCs与PRP具有协同作用。

关键词 外周血间充质干细胞; 富血小板血浆; 前交叉韧带重建; 腓骨愈合

中图分类号 R 686.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)05-0770-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.033

间充质干细胞是一种具有多向分化潜能的成体干细胞,在损伤组织的修复过程发挥着重要的作用^[1]。研究^[2]表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)不仅能促进腓骨界面纤维软骨的形成,并能减少骨道扩大,促进移植物与骨道愈合。富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)富含各种生长因子,如成纤维细胞生长因子、转化生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子、血小板衍生生长因子等,能促进细胞增殖迁移、血管再生及细胞外基质产生^[3],有利于骨道内移植物的重构^[4]。该研究旨在探讨前交叉韧带重建术中联合应用MSCs与富血小板血浆是否更有利于腓骨愈合。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂仪器 实验动物: 雄性成年新

2017-02-05 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1208085MH157)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院运动创伤与关节镜外科, 合肥 230022

作者简介: 余刚,男,硕士研究生;

徐斌,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: youchen100@126.com

西兰兔48只,2.5~3.3 kg,购买并饲养于安徽医科大学实验动物中心。试剂仪器: L-DMEM培养基(美国 Thermo 公司); 胰酶细胞消化液、胎牛血清(上海碧云天公司); 成骨诱导培养基(深圳伟通公司); CO₂培养箱(上海实贝公司); 光学显微镜(江西凤凰公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔外周血间充质干细胞(peripheral blood mesenchymal stem cells, PB-MSCs)分离培养与鉴定

经耳缘静脉注射粒细胞集落刺激因子动员1周后,用含枸橼酸钠抗凝管抽取外周血10 ml,然后用等体积的PBS稀释,按1:1比例缓慢在上层加入密度为1.073 g/L的Percoll分离液(储存液=9份Percoll原液+1份8.5% NaCl; 1.073 g/L工作液=56%储存液+44% 0.85% NaCl),室温中2 500 r/min离心20 min,吸取中间白色云雾状细胞层,PBS洗涤离心后用完全培养基(含15%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的L-DMEM细胞培养液)重悬,放入5% CO₂、37℃培养箱中培养,每3 d换液1次,当瓶底贴壁细胞生长呈涡旋状并达90%融合时进行传代,取第3代细胞进行鉴定和造模。取第3代外周血间充质干细胞以 1×10^5 /孔密度接种于6孔板中,待细胞生长达80%~90%融合时加入成骨诱导培养基,5% CO₂、37℃培养箱中培养,每2~3 d更换诱导培养基,3周后行茜素红染色,并在显微镜下观察鉴定^[5]。

1.2.2 兔PRP制备 兔耳中央动脉抽取9 ml动脉血,装入含1 ml枸橼酸钠抗凝剂的离心管中,混匀后低温离心机550 r/min离心10 min,吸取上清液于另一离心管中700 r/min离心10 min,弃掉上清液3/4,剩下的部分即为富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)。

1.2.3 实验动物分组及造模 将48只兔分成4组,即对照组、PRP组、PB-MSCs组和PRP+PB-MSCs组,每组12只。3%戊巴比妥钠静脉麻醉,膝关节皮后固定于手术台上,消毒铺巾,做膝关节内

侧切口,取出半腱肌肌腱并编织缝合。在髌内侧切开关节囊,切断前交叉韧带,用 2.0 mm 克氏针分别于前交叉韧带上下止点处钻一骨道,通过细针和缝线将肌腱拽入骨道内,两端与周围组织缝扎固定,根据组别不同分别向股骨道内注入凝胶、PRP 凝胶、PB-MSCs 凝胶和 PRP + PB-MSCs 凝胶,无菌生理盐水冲洗关节腔,逐层缝合关节囊及手术切口,消毒后用无菌敷料包扎。术后前 3 d 肌注青霉素 40 万单位预防感染,饲养中有 3 只兔子死亡并及时补充。

1.2.4 组织学观察 造模完成后分别于 4、8、12 周各组随机处死 4 只实验兔,取出重建后的腱骨组织,将腱骨组织置于 10% 甲醛中固定 72 h,然后于乙二胺四乙酸中脱钙 6 周左右,脱钙完成后依次进行梯度脱水、透明、浸蜡、包埋,最后将石蜡切片行 HE 染色,观察移植骨与骨道之间的组织愈合情况,并根据组织形态学评分标准对切片腱骨界面进行评估^[8]。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,腱骨界面形态学评分以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用双因素方差分析, $P < 0.05$ 说明两组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PB-MSCs 分离培养与鉴定 原代细胞培养 3~4 d 后,孤立的圆形细胞逐渐向周围扩散并粘附于培养瓶瓶壁,随后细胞呈梭形或纤维细胞样形态并伸出伪足,随着培养时间延长,细胞迅速增长并呈旋涡状,14 d 左右细胞融合达 80%~90% 时用胰酶消化进行传代培养,每 4~5 d 传一代,传至第 3 代时细胞形态均匀,排列整齐。PB-MSCs 在成骨诱导培养基中培养 3 周,茜素红染色可见红色的钙化结节,表明第 3 代 PB-MSCs 具有向成骨细胞分化的潜能,见图 1。

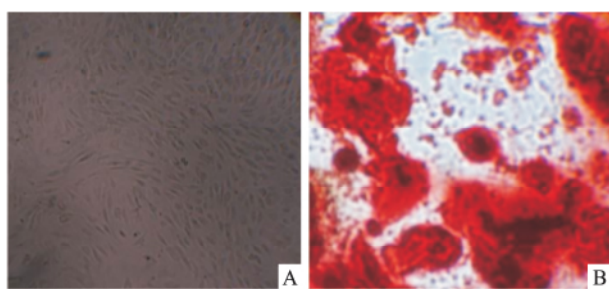


图 1 PB-MSCs 形态特点及茜素红染色 $\times 100$

A: 第 3 代 PB-MSCs; B: 茜素红染色

2.2 腱骨界面组织学观察 4、8、12 周取材后行

HE 染色。HE 染色结果表明,术后 4 周对照组腱骨界面连接松散,由不规则的血管组织及成纤维细胞构成的纤维血管界面,可见明显的炎症反应,实验组 (PRP 组、PB-MSCs 组和 PRP + PB-MSCs 组) 腱骨界面炎症反应较轻,可见大量成纤维细胞、疏松的纤维组织及少量不成熟的软骨样细胞,其中 PRP + PB-MSCs 组腱骨界面可见大量排列紊乱的软骨样细胞及不规则的 Sharpey 纤维。术后 8 周对照组腱骨界面纤维血管组织排列更加紧密有序,可见不成熟的软骨样细胞、少量新骨及排列紊乱的 Sharpey 样纤维,各实验组腱骨界面充满新骨及稀疏排列规则的 Sharpey 样纤维,软骨样细胞排列更加有序,细胞大小形态更加规则,胶原纤维成熟,其中 PRP + PB-MSCs 组可见软骨形成,大量 Sharpey 样纤维连接新骨与移植骨,并出现紧密而规则的束状 Sharpey 样纤维,大量成骨细胞聚集。术后 12 周对照组腱骨界面软骨样细胞减少,腱骨界面纤维血管样组织更加紧密有序,各实验组充满紧密规则的 Sharpey 样纤维,移植骨与新骨间出现纤维软骨,纤维组织与骨排列整齐,腱骨之间结合更紧密,其中 PRP + PB-MSCs 组大量新骨形成,纤维组织通过新形成骨与骨道相连,部分腱骨界面出现钙化的软骨及潮线,与正常前交叉韧带止点相似,见图 2。

2.3 腱骨界面组织形态学评分 根据切片组织形态学特点评估腱骨界面愈合情况,结果表明,与对照组相比,PRP 组、PB-MSCs 组及 PRP + PB-MSCs 组 3 个时间点组织学评分更高,其中 PRP + PB-MSCs 组评分最高,差异有统计学意义 ($F = 208.58, P < 0.01$),见表 1、图 3。

表 1 不同时间点各处理组腱骨界面评分 ($n = 48, \bar{x} \pm s$)

时间	对照组	PRP 组	PB-MSCs 组	PRP + PB-MSCs 组
4 周	1.19 $\pm$ 0.40	1.94 $\pm$ 0.58	2.22 $\pm$ 0.54	3.14 $\pm$ 0.42
8 周	2.06 $\pm$ 0.58	2.75 $\pm$ 0.55	3.39 $\pm$ 0.84	4.08 $\pm$ 0.50
12 周	2.89 $\pm$ 0.71	4.69 $\pm$ 0.53	5.03 $\pm$ 0.45	6.42 $\pm$ 0.69

3 讨论

肌腱和韧带牢固附着于骨骼才能保证肌肉骨骼发挥相应的功能,同样,前交叉韧带重建术后移植骨安全稳定的固定在骨道中,患者才能快速进行康复训练,早日恢复到受伤前的活动水平及返回工作,这一方面依赖于合适的手术器械及精湛的手术技术,更重要的则是良好的腱骨愈合,手术的成功很大程

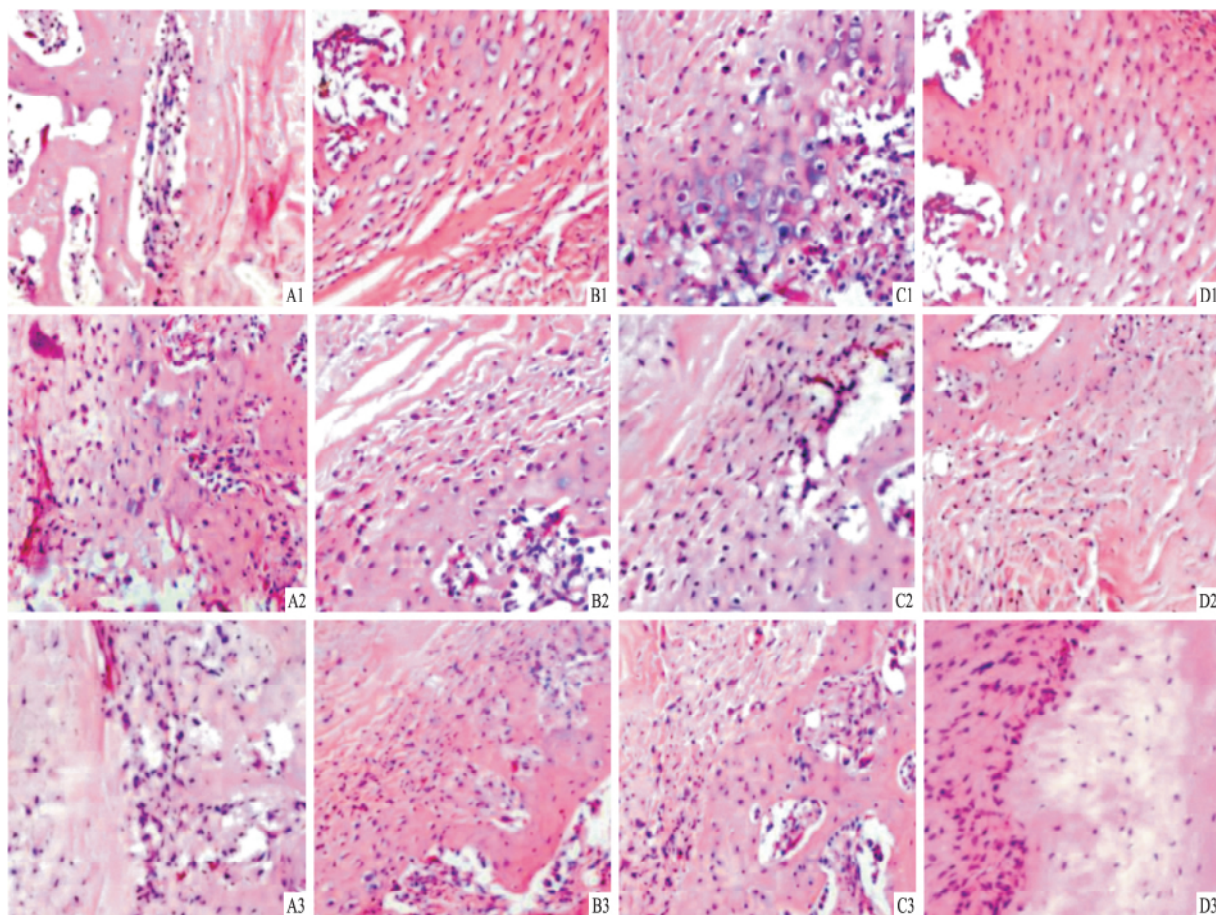


图2 术后不同时间点各组腱骨界面组织形态学观察 HE × 100
A: 对照组; B: PRP 组; C: PB-MSCs 组; D: PRP + PB-MSCs 组; 1: 4 周; 2: 8 周; 3: 12 周

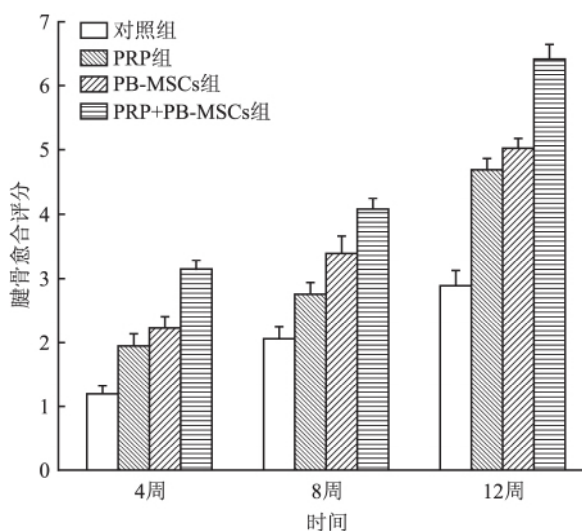


图3 术后不同时间点各组腱骨界面组织形态学评分

度上取决于移植物和骨道之间的生物愈合。

目前,关于前交叉韧带重建术后腱骨愈合过程的生物学机制并不十分明确。一般认为移植物在骨道内有两种愈合方式:直接止点及间接止点,直接止

点组织结构与正常前交叉韧带止点相似,然而,大多数情况下移植物与骨道之间的愈合并不是形成直接止点的4层结构,而是在腱骨界面形成纤维血管样组织,术后几周胶原纤维逐渐增多,形成垂直于腱骨界面的 Sharpey 样纤维的间接止点,最终骨组织长入肌腱,从而使移植物牢固固定在骨道中^[7-8]。间接止点并不是一种理想的愈合方式,该愈合过程不仅非常缓慢,而且其生物力学性能远不如直接止点愈合。因此,促进移植物与骨道愈合,恢复前交叉韧带的生物力学特点,让患者尽早进行功能锻炼,恢复体育运动及日常活动显得尤为重要。

近几年组织工程研究取得了令人鼓舞的成果,大量研究^[9-11]表明 MSCs 和 PRP 均能促进腱骨愈合。Saether et al^[9]研究证明 MSCs 能明显增加抗炎因子 M2s 及 IL-1Ra 表达,增加早期腱骨组织内皮化及基质中 Iα 前胶原沉积,抑制腱骨界面炎症反应,促进移植物在骨道内愈合。移植物血运重建是决定前交叉韧带重建术能否成功的一个最重要的因素,这是移植物在骨道内愈合及在关节腔内韧带化必不

可少的过程,Vogrin et al^[10] 进行一项临床随机对照实验,实验组骨道内注入 PRP,磁共振评价患者骨道内移植血管化,结果表明 PRP 能促进前交叉韧带重建术后早期腱骨界面血管再生,有利于腱骨愈合及加快术后康复锻炼。此外,研究^[11] 表明 PRP 中的某些生长因子与间充质干细胞具有协同作用,两者联合使用更有利于腱骨愈合。Chen et al^[12] 研究表明将碱性成纤维生长因子基因修饰的 MSCs 注入腱骨界面,能明显促进骨道内新骨形成,加速移植与骨道生物愈合过程,增加移植物的生物力学性能。

本研究表明,PRP 与 PB-MSCs 均能促进移植与骨道愈合,并且 PB-MSCs 与 PRP 具有协同作用。PB-MSCs 与 PRP 均可从外周血中获取,操作简单方便,创伤小,因此 PB-MSCs 与 PRP 具有很高的应用价值,今后需要更多的研究来进一步探讨它们的作用机制及临床安全性和有效性,以期更好的为临床应用提供科学依据。

参考文献

- [1] Tian F, Ji X L, Xiao W A, et al. CXCL13 promotes the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on tendon-bone healing in rats and in C3H10T1/2 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 3178–87.
- [2] Jang K M, Lim H C, Jung W Y, et al. Efficacy and safety of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in anterior cruciate ligament reconstruction of a rabbit model: new strategy to enhance tendon graft healing [J]. *Arthroscopy*, 2015, 31(8): 1530–9.
- [3] Hutchinson I D, Rodeo S A, Perrone G S, et al. Can platelet-rich plasma enhance anterior cruciate ligament and meniscal repair? [J]. *J Knee Surg*, 2014, 28(1): 19–28.
- [4] Xie X, Wu H, Zhao S, et al. The effect of platelet-rich plasma on patterns of gene expression in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *J Surg Res*, 2013, 180(1): 80–8.
- [5] Ju Y J, Muneta T, Yoshimura H, et al. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 332(3): 469–78.
- [6] Kuang G M, Yau W P, Lu W W, et al. Use of a strontium-enriched calcium phosphate cement in accelerating the healing of soft-tissue tendon graft within the bone tunnel in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Bone Joint J*, 2013, 95(7): 923–8.
- [7] Hao Z C, Wang S Z, Zhang X J, et al. Stem cell therapy: a promising biological strategy for tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(2): 154–62.
- [8] Kuang G M, Yau W P, Lu W W, et al. Osteointegration of soft tissue grafts within the bone tunnels in anterior cruciate ligament reconstruction can be enhanced [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2010, 18(8): 1038–51.
- [9] Saether E E, Chamberlain C S, Aktas E, et al. Primed mesenchymal stem cells alter and improve rat medial collateral ligament healing [J]. *Stem Cell Rev*, 2016, 12(1): 42–53.
- [10] Vogrin M, Ruppreht M, Dinevski D, et al. Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized, double-blind, clinical trial [J]. *Eur Surg Res*, 2010, 45(2): 77–85.
- [11] Chen B, Li B, Qi Y J, et al. Enhancement of tendon-to-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction using bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified with bFGF/BMP2 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25940.

The effect of peripheral blood mesenchymal stem cells combined with platelet rich plasma on tendon-to-bone healing

Yu Gang, Xu Bin, Tu Jun, et al

(Dept of Sports Injury Arthroscopic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract To investigate the effect of peripheral blood mesenchymal stem cells (PB-MSCs) combined with platelet rich plasma (PRP) on tendon-to-bone healing. 48 New Zealand rabbits were divided into four groups, operation was performed to reconstruct anterior cruciate ligament, the gel, PRP gel, PB-MSCs gel and PRP + PB-MSCs gel were injected into femoral tunnel of each group. At 4th, 8th and 12th week after ACL reconstruction, 4 rabbits were randomly executed in each group, HE staining was used to detect histological characteristics. Compared with control group, PRP group, PB-MSCs group and PRP + PB-MSCs group had higher histomorphometric scores of three time points, among which the PRP + PB-MSCs group had the highest score ($P < 0.01$). The results demonstrated that PB-MSCs and PRP could promote the healing of tendon-to-bone, and PB-MSCs had a synergistic effect with PRP.

Key words peripheral blood mesenchymal stem cells; platelet-rich plasma; anterior cruciate ligament reconstruction; tendon-to-bone healing