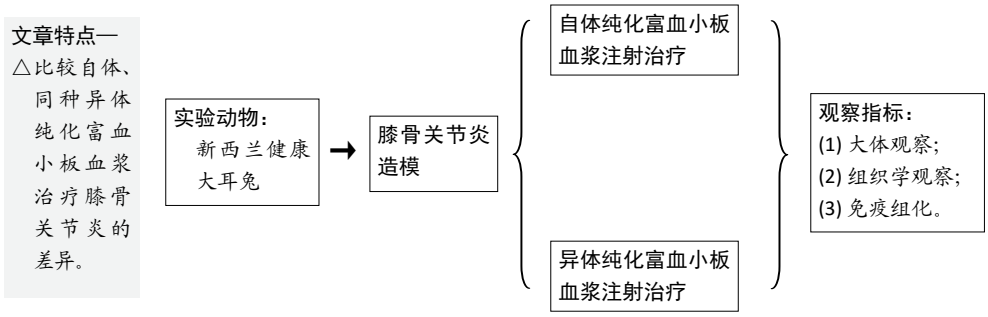
自体、同种异体纯化富血小板血浆治疗兔膝骨关节炎的差异

https://doi.org/10.12307/2021.109
投稿日期：2020-05-26
送审日期：2020-05-28
采用日期：2020-08-29
在线日期：2021-01-30
中图分类号：
R459.9；R319；R684.3
文章编号：
2095-4344(2021)26-04123-07
文献标识码：A

赵露婷[1]，方其林[1]，唐海燕[2]，胥方元[3]

文章快速阅读：



文题释义：

纯化富血小板血浆：富血小板血浆是由外周血经多次离心后所得，活化后的富血小板血浆释放多种生长因子、细胞因子，具有修复软骨病变、调控炎症反应等作用。富血小板血浆中按照白细胞和纤维蛋白含量的不同可分为以下4类：纯富血小板纤维蛋白、富白细胞富血小板纤维蛋白、纯化富血小板血浆、富白细胞富血小板血浆。富血小板血浆已逐渐应用于临床骨科、烧伤整形科等领域，但用于骨关节炎的修复大多数研究者仍推荐纯化富血小板血浆。

摘要

背景：活化后的纯化富血小板血浆可促进软骨细胞的增殖，调控关节内炎症反应，有效治疗膝骨关节炎。

目的：对比自体、同种异体纯化富血小板血浆修复膝骨关节炎的效果。

方法：取32只3月龄新西兰大耳兔，采用随机数字表法分4组，每组8只：正常组不作任何处理；模型组、自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组通过关节内注射木瓜蛋白酶与L−半胱氨酸混合溶液制备膝骨关节炎模型，造模2周后，自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组分别关节内注射自体纯化富血小板血浆与同种异体纯化富血小板血浆，每2周注射1次，共注射3次。末次注射2周后，进行关节软骨大体观察、组织学观察与免疫组化观察。实验经西南医科大学实验动物管理委员会批准。

结果与结论：①大体观察：模型组关节软骨表面粗糙，出现软骨缺损、侵蚀、溃疡，关节骨赘形成，有大量的关节腔积液，自体纯化富血小板血浆组关节软骨损伤及骨赘形成轻于模型组，异体纯化富血小板血浆组关节软骨损伤及骨赘形成与模型组相比无明显改善；②组织学观察：与模型组相比，自体纯化富血小板血浆组软骨结构、基质染色、细胞、潮线等各方面均明显改善(P均< 0.05)，异体纯化富血小板血浆组软骨结构有一定改善(P < 0.05)，但细胞排列、基质染色、潮线方面改善不明显；③免疫组化观察：自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组骨形态发生蛋白2与Sox9表达量的高于模型组(P < 0.05)，自体纯化富血小板血浆组骨形态发生蛋白2表达量高于异体纯化富血小板血浆组(P < 0.05)；④结果表明，自体、同种异体纯化富血小板血浆均能在一定程度上改善膝骨关节炎软骨细胞的增殖能力，促进软骨细胞修复，但自体纯化富血小板血浆的治疗效果更为明显。

关键词：实验；动物；兔；膝骨关节炎；纯化富血小板血浆；骨形态发生蛋白2；Sox9

The difference between autologous and allogeneic purified platelet-rich plasma in the treatment of rabbit knee osteoarthritis

Zhao Luting[1], Fang Qilin[1], Tang Haiyan[2], Xu Fangyuan[3]

[1]The First People's Hospital of Ziyang, Ziyang 641300, Sichuan Province, China; [2]Zigong First People's Hospital, Zigong 643000, Sichuan Province, China; [3]The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Zhao Luting, Master, Physician, The First People's Hospital of Ziyang, Ziyang 641300, Sichuan Province, China

Corresponding author: Xu Fangyuan, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Purified platelet-rich plasma after activation can promote the proliferation of chondrocytes, regulate inflammation in the joints, and effectively treat knee osteoarthritis.

[1] 资阳市第一人民医院，四川省资阳市 641300；[2] 自贡市第一人民医院，四川省自贡市 643000；[3] 西南医科大学附属医院，四川省泸州市 646000

第一作者：赵露婷，女，1993 年生，四川省资阳市人，汉族，2018 年西南医科大学毕业，硕士，医师，主要从事骨与关节疾病的康复研究。

通讯作者：胥方元，西南医科大学附属医院，四川省泸州市 646000

https://orcid.org/0000-0002-3110-7068 (赵露婷)

基金资助：四川省教育厅项目 (12ZB255)，项目负责人：胥方元

引用本文：赵露婷，方其林，唐海燕，胥方元 . 自体、同种异体纯化富血小板血浆治疗兔膝骨关节炎的差异 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(26):4123-4129.

OBJECTIVE: To compare the effects of autologous and allogeneic purified platelet-rich plasma in repairing knee osteoarthritis.
METHODS: Thirty-two 3-month-old New Zealand big-eared rabbits were divided into four groups using a random number table method, with eight rabbits in each group: the normal group was treated without any treatment; in the model, autologous, and allogeneic groups, a knee osteoarthritis model was prepared by intra-articular injection of a mixed solution of papain and L-cysteine. After 2 weeks of modeling, the autologous group and allogeneic group were injected intra-articularly with autologous and allogeneic purified platelet-rich plasma, respectively. Platelet-rich plasma was injected once every 2 weeks for a total of three injections. Two weeks after the last injection, gross observation, histological observation and immunohistochemical observation of the articular cartilage were performed. The experiment was approved by the Laboratory Animal Management Committee of Southwest Medical University.
RESULTS AND CONCLUSION: General observation: The surface of the articular cartilage of the model group was rough, cartilage defects, erosions, ulcers, joint osteophytes were formed, and there was a large amount of joint cavity effusion. Articular cartilage damage and osteophytes formation in the autologous group were lighter than those in the model group. Compared with the model group, the articular cartilage injury and osteophyte formation in the allogeneic group were not significantly improved. Histological observation: Compared with the model group, the cartilage structure, matrix staining, cells, and tide lines of the autologous group were significantly improved ($P < 0.05$); the cartilage structure of the allogeneic group was improved ($P < 0.05$), but there was no obvious improvement in cell arrangement, matrix staining, and tide line. Immunohistochemical observation: The expression of bone morphogenetic protein 2 and Sox9 in the autologous group and the allogeneic group was higher than that of the model group ($P < 0.05$), and the expression of bone morphogenetic protein 2 in the autologous group was higher than that of the allogeneic group ($P < 0.05$). To conclude, both autologous and allogeneic purified platelet-rich plasma can improve the proliferation of knee osteoarthritis chondrocytes and promote chondrocyte repair to a certain extent, but the therapeutic effect of autologous purified platelet-rich plasma is more obvious.
Key words: experiment; animal; rabbit; knee osteoarthritis; purified platelet-rich plasma; bone morphogenetic protein 2; Sox9

Funding: *a grant from Sichuan Provincial Education Department, No. 12ZB255 (to XFY)*
How to cite this article: *ZHAO LT, FANG QL, TANG HY, XU FY. The difference between autologous and allogeneic purified platelet-rich plasma in the treatment of rabbit knee osteoarthritis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(26):4123-4129.*

0 引言 Introduction

膝骨关节炎是中老年人常见的慢性退行性骨关节疾病，目前的治疗方法多样，近年来纯化富血小板血浆逐渐被应用于膝骨关节炎的治疗[1-4]。目前用于科研及临床的纯化富血小板血浆多来源于自体血液，但对于体弱者或合并血液疾病的患者，采集自体血制备纯化富血小板血浆不可取，同时人体存在个体差异，制备而得的纯化富血小板血浆质量不同，这将影响纯化富血小板血浆的临床疗效，那么治疗膝骨关节炎能否使用异体纯化富血小板血浆呢？实验在兔膝骨关节炎早期分别关节内注射自体、同种异体纯化富血小板血浆，比较二者治疗膝骨关节炎的效果，初步探索同种异体纯化富血小板血浆能否代替自体纯化富血小板血浆，为后续同种异体纯化富血小板血浆标准化制备提供一些理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 4 月至 2018 年 1 月在西南医科大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 从西南医科大学实验动物中心 (合格证号 SCXK[川]2013-065) 采购清洁级新西兰健康大耳兔 34 只，雌雄不拘，兔龄 3 个月，体质量 (2.48±0.21) kg。实验兔均于西南医科大学动物饲养室单笼喂养，温度 22−26 ℃，湿度维持在 40%−60% 之间，饲养过程中保证充足的饲料、清洁的饮水，每天清理排泄物。

1.3.2 主要试剂 PAS 缓冲液、苏木精、伊红、二甲苯、体积分数 70%，85%，95%，100% 乙醇 (西南医科大学中心实验室提供)；10% 甲醛溶液 (西南医科大学附属医院病理科提供)；10%EDTA 脱钙液、5% 木瓜蛋白酶、0.03 mmol/L L− 半胱氨酸、3.2% 柠檬酸钠溶液、10% 氯化钙溶液、骨形态发生蛋白 2 免疫组化试剂盒、Sox9 免疫组化试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司提供)。

1.3.3 主要仪器 Bio Ⅱ A 型生物安全柜 (西班牙)；TDZ5-WS 型低速离心机 (中国上海)；TKY-BMB 病理组织包埋机 (泰康医疗设备有限公司，中国湖北)；HW-1500A 病理组织切片机 (汇沃科技有限公司，中国深圳)；TK-218V 型恒温摊片烤片机 (泰维医疗科技有限责任公司，中国湖北)；OLYMPUS CH-20 型光学显微镜、OLYMPUS Spot M20-35S 型显微成像仪 (OLYMPUS 公司，日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 建立膝骨关节炎模型 采用关节内注射木瓜蛋白酶、L− 半胱氨酸混合溶液建立兔膝骨关节炎模型，该方案建立模型简便易行、周期短，且可靠性高[5-6]。将 5% 木瓜蛋白酶、0.03 mmol/L L− 半胱氨酸 (即配即用) 按照 2 ∶ 1 体积比混匀，静置 30 min，用 0.22 μm 的滤膜过滤后留取待用。分别于第 1，3，5 天关节内注射 5% 木瓜蛋白酶、0.03 mmol/L L− 半胱氨酸混合溶液 (0.1 mL/kg)，共注射 3 次。于首次注射木瓜蛋白酶后 2 周随机选取 2 只实验兔处死，观察兔右膝关节病变，以判定造模是否成功。

1.4.2 纯化富血小板血浆制备及活化方式 异体纯化富血小板血浆组实验兔编号 1−8，1 号兔制备得到的纯化富血小板血浆用于 8 号兔，2 号兔制备得到的纯化富血小板血浆用于 1 号兔，以此类推。该实验中总共注射 3 次纯化富血小板血浆，每次 0.5 mL，每次均为现配现用，避免其在保存过程中变质，纯化富血小板血浆的制备时间为各组兔接受纯化富血小板血浆注射的当天，即确定造模成功当天、2 周后、4 周后。

取兔耳中心动脉近端 1/3 处为穿刺点采集动脉血 5.0−6.0 mL，将采集所得的动脉血转移至 15 mL 无菌离心管 (含 3.2% 柠檬酸钠溶液 0.8 mL)，参考 PEREZ 等[7] 提出的制备方案，遵循二次离心原则制备纯化富血小板血浆，第一次相对低速离心 (100×*g*，1 050 r/min，离心半径 8 cm)，舍弃红细胞层后进行第二次相对高速离心 (400×*g*，2 100 r/min，离心半径 8 cm)，两次离心时长均为 10 min；富血小板血浆层沉积在管底，留取 0.5 mL 血浆与富血小板血浆层震荡均匀，即得到纯

组织工程实验动物造模过程的相关问题：	
造模目的：	复制兔膝骨关节炎模型
选择动物的条件：	大耳兔，雌雄不拘，兔龄 3 个月，体质量 (2.48±0.21) kg
模型与所研究疾病的关系：	已有研究表明关节内注射木瓜蛋白酶、L- 半胱氨酸混合溶液可成功复制兔膝骨关节炎模型，该方案造模简便易行、周期短，且可靠性高
动物来源及品系：	清洁级新西兰健康大耳兔
造模技术描述：	采用关节内注射木瓜蛋白酶、L- 半胱氨酸混合溶液建立兔膝骨关节炎模型，将 5% 木瓜蛋白酶、0.03 mmol/L L- 半胱氨酸 (即配即用) 按照 2 ∶ 1 体积比混匀，静置 30 min，用 0.22 μm 的滤膜过滤后留取待用。分别于第 1，3，5 天关节内注射 5% 木瓜蛋白酶、0.03 mmol/L L- 半胱氨酸混合溶液 (0.1 mL/kg)，共注射 3 次
动物数量及分组方法：	34 只健康新西兰兔适应性喂养 1 周后，采用随机数字表法随机抽取其中 8 只作为正常组，余下 26 只建立膝骨关节炎模型，随机选取 2 只兔确定成功造模后，采用随机数字表法将造模成功 24 只兔分为模型组 (*n*=8)、自体纯化富血小板血浆组 (*n*=8)、异体纯化富血小板血浆组 (*n*=8)
造模成功评价指标：	实验确定造模成功与否是通过大体观察，评价指标包括关节软骨、骨赘及关节腔积液形成等；因为要进行软骨病理切片观察，首先要对软骨标本进行脱钙处理，而脱钙所需时间为 2 个月，所以难以通过病理观察确认
造模后观察指标：	关节软骨、骨赘及关节腔积液形成情况
造模后动物处理：	自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组分别关节内注射自体异体纯化富血小板血浆与同种异体异体纯化富血小板血浆，每 2 周注射 1 次，共注射 3 次
伦理委员会批准：	实验经西南医科大学实验动物管理委员会批准

化富血小板血浆 (**图 1**)。关节腔注射之前，将纯化富血小板血浆与 10% 氯化钙溶液按照 9 ∶ 1 比例进行活化 [8]。

1.4.3 实验分组及干预措施 34 只健康新西兰兔适应性喂养 1 周后，采用随机数字表法随机抽取其中 8 只作为正常组，余下 26 只建立膝骨关节炎模型。于首次注射木瓜蛋白酶后 2 周随机选取 2 只实验兔处死，观察兔右膝关节病变，确定成功造模后，采用随机数字表法将 24 只兔分为模型组 (*n*=8)、自体纯化富血小板血浆组 (*n*=8)、异体纯化富血小板血浆组 (*n*=8)。正常组与模型组不接受任何治疗；自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组分别接受膝关节腔注射 0.5 mL 自体纯化富血小板血浆、同种异体纯化富血小板血浆，每 2 周 1 次，共 3 次。

1.5 主要观察指标

1.5.1 大体标本观察 末次干预治疗后 2 周，以空气栓塞法处死各组实验兔，以右侧股骨内侧为切口，逐层打开兔膝关节腔，大体观察关节液及关节软骨面情况，参考 OARSI 关节软骨、骨赘、关节液宏观评级系统评级 [9]。

1.5.2 股骨端软骨病理学评价 将股骨和胫骨在距关节面约 1 cm 处离断，取股骨端置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定 24 h 后取出，用流水冲洗标本一两小时后，将标本浸入 10% EDTA 脱钙液脱钙 2 个月，每周定期更换脱钙液，脱钙完全 (大头针刺入标本无阻力) 后，浸蜡包埋、切片，乙醇逐级脱水，行苏木精 - 伊红染色，病理组织切片观察实施盲法及双人观测，观察内容参考 Mankin's 评分标准评分 [10]。

免疫组化测定：石蜡切片脱蜡脱水，并进行一系列的抗原修复、封固、滴加第一抗体和第二抗体、显色、脱水、封固，行免疫组化检测，使用光学显微镜在 400 倍视野下观察，观察骨形态发生蛋白 2、Sox9 在各组软骨细胞中的表达分布及变化情况，并采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算各组骨形态发生蛋白 2、Sox9 的平均吸光度值，分别计算平均吸光度值，再取其平均值作为单张切片的最终测量值；为避免主观因素影响，观察时对评估者实施盲法。

1.6 统计学分析 统计分析使用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行，所得计量资料采用 $\bar{x}\pm s$、*M*(P25，P75) 表示，多组间计量资料比较，满足正态性和方差齐性的条件下，使用单因素方差分析 (One way-ANOVA)，两组间比较使用 SNK-*q* 检验；如不满足正态性、方差齐性，多组间比较则使用 Kruskal-Wallis 检验，两两比较采用 Mann-Whitney 检验；多组间等级资料比较使用 Kruskal-Wallis 检验，两两比较采用 Mann-Whitney 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义，$P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 各组关节软骨大体观察 正常组关节软骨表面色泽明亮，光滑，无裂隙，无关节积液和骨赘形成；模型组关节软骨呈黄色，表面粗糙，出现软骨缺损、侵蚀、溃疡，关节骨赘形成，有大量的关节腔积液；自体纯化富血小板血浆组关节软骨呈淡黄色，表面较模型组光滑，局部纤维化，部分轻度骨赘形成，关节腔有少量积液形成；异体纯化富血小板血浆组关节软骨呈黄色，表面粗糙，软骨缺损严重，延伸至深层的软骨，形成溃疡，暴露软骨下骨，关节骨赘形成严重，有大量的关节腔积液，见**图 2**。

自体纯化富血小板血浆组关节软骨宏观评级较模型组低 ($Z=-3.554$，$P < 0.01$)，其骨赘情况亦较模型组改善 ($Z=-3.427$，$P < 0.01$)，且与正常组比较差异无显著性意义 ($Z=-3.000$，$P > 0.05$)。异体纯化富血小板血浆组关节软骨及骨赘与模型组相比改善均不明显 (P=0.317，0.178)，且自体纯化富血小板血浆组的关节软骨及骨赘宏观评级均优于异体纯化富血小板血浆组 (P 均 < 0.01)。就关节液宏观评级而言，自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组与模型组相比较差异无显著性意义 ($Z=-1.936$，P=0.053；$Z=-1.875$，P=0.061)，而自体纯化富血小板血浆组关节液情况优于异体纯化富血小板血浆组 ($Z=-2.697$，$P < 0.01$)。各组大体标本宏观评级见**表 1**-**3**。

表 1 | **各组关节软骨的宏观变化评级**
Table 1 | **Macroscopic rating of the rabbit articular cartilage**

组别	*n*	软骨面宏观评级 (*n*)				
		0	1	2	3	4
正常组	8	8	0	0	0	0
模型组	8	0	0	6	2	0
自体纯化富血小板血浆组	8	2	6	0	0	0
异体纯化富血小板血浆组	8	0	0	4	4	0

表 2 | 各组关节面骨赘形成宏观评级
Table 2 | Macroscopic rating of articular osteophyte formation

组别	n	关节面骨赘形成宏观评级 (n)			
		0	1	2	3
正常组	8	8	0	0	0
模型组	8	0	1	7	0
自体纯化富血小板血浆组	8	5	3	0	0
异体纯化富血小板血浆组	8	0	1	4	3

表 3 | 各组关节腔积液形成宏观评级
Table 3 | Macroscopic rating of joint effusion formation

组别	n	关节腔积液形成宏观评级 (n)			
		0	1	2	3
正常组	8	8	0	0	0
模型组	8	0	2	6	0
自体纯化富血小板血浆组	8	0	6	2	0
异体纯化富血小板血浆组	8	0	1	3	4

2.2 各组软骨组织学观察 正常组大部分软骨表面平滑，部分表面不规则，软骨细胞排列整齐，细胞大小一致，细胞基质染色均匀，潮线完整；模型组软骨表面不规则，出现裂隙，细胞排列结构欠规则，与正常组相比，软骨细胞层明显变薄，细胞数量减少，局部软骨细胞聚集成簇，潮线被破坏；自体纯化富血小板血浆组软骨表面较模型组光滑，无裂隙、溃烂形成，细胞排列欠规则，部分软骨细胞固缩，脂质变性细胞增多，部分出现局部细胞聚集成簇，基质染色轻度减少，部分潮线紊乱；异体纯化富血小板血浆组软骨细胞表面粗糙，出现裂隙，部分深达钙化带，软骨细胞层变薄，排列不规则，局部软骨细胞聚集成簇，甚至细胞数量过少，基质染色中度减少，潮线完整性被破坏，见**图 3**。

与模型组相比，自体纯化富血小板血浆组在软骨结构、基质染色、细胞、潮线等各方面均明显改善，各项评分均低于模型组 (P 均 < 0.05)。与模型组相比，异体纯化富血小板血浆组对软骨结构有改善 (P < 0.05)，但其对细胞排列、基质染色、潮线的改善不明显，评分与模型组相比差异无显著性意义 (Z=−0.620，P=0.535；Z= −1.586，P=0.143；Z=−1.464，P=0.143)。自体纯化富血小板血浆组的软骨结构、细胞、基质染色评分均优于异体纯化富血小板血浆组 (P < 0.05)。从改良 Mankin's 评分总分可见：自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组改良 Mankin's 评分较模型组均有降低 (Z=−3.419、P < 0.01；Z=−2.53，P < 0.05)，但自体纯化富血小板血浆组降低得更为明显，且自体纯化富血小板血浆组与异体纯化富血小板血浆组评分存在差异 (Z=−3.419，P < 0.01)。各组改良 Mankin's 评分见图 3、**表 4**。

表 4 | 各组苏木精－伊红染色切片改良 Mankin's 评分
[$\bar{x}\pm s$ 或 M(P25，P75)，n=8]
Table 4 | Modified Mankin's scores of hematoxylin-eosin stained sections

组别	改良 Mankin's 评分				
	结构	细胞	基质染色	潮线	总分
正常组	0(0，0)	0	0	0	0(0，0)
模型组	6(6，6)	2(2，2.75)	2.13±0.64	1	11.5(10.25，12)
自体纯化富血小板血浆组	0.88±0.64[a]	1(0.5，1.5)[b]	1(0，1)[a]	0(0，1)[a]	2.5(1，4.75)[a]
异体纯化富血小板血浆组	5(5，5)[ab]	2(2，2)[b]	2(2，2)[b]	1(1，1)	9.5(8.25，10)[ab]

表注：与模型组相比，[a]P < 0.05；与自体纯化富血小板血浆组相比，[b]P < 0.05

2.3 各组关节软骨免疫组化分析

2.3.1 骨形态发生蛋白 2 免疫组化 光镜下软骨细胞骨形态发生蛋白 2 免疫组化阳性表达为软骨细胞核、质或膜有棕色颗粒附着。正常组软骨细胞分布均匀，骨形态发生蛋白 2 在过渡层见中可见部分软骨细胞胞质浅染色，浅表层、放射层、钙化层均未见明显阳性细胞；模型组表面粗糙，软骨分层不明显，细胞排列紊乱，局部细胞聚集成簇，仅在过渡层见中可见少量胞质极浅染色；自体纯化富血小板血浆组表面规则，软骨细胞排列整齐，在软骨过渡层和放射层可见大量细胞胞质内有棕褐色颗粒，浅表层及钙化层表达相对较弱；异体纯化富血小板血浆组表面欠规则，局部细胞聚集成簇，在浅表层及过渡层见可见大量软骨细胞的胞质中有棕褐色颗粒，放射层可见少量胞质浅染，钙化层无表达。各组骨形态发生蛋白 2 免疫组化染色见**图 4**。

据图像分析系统计算各组骨形态发生蛋白 2 平均吸光度值，自体纯化富血小板血浆组表达量最高，模型组表达量最低，自体纯化富血小板血浆组表达量明显高于正常组、模型组 (P 均 < 0.01)，异体纯化富血小板血浆组高于模型组 (Z=−2.415，P < 0.05)、低于自体纯化富血小板血浆组 (Z=−3.361，P < 0.01)，见**表 5**。

表 5 | 各组骨形态发生蛋白 2 与 Sox9 平均吸光度的比较
[$\bar{x}\pm s$ 或 M(P25，P75)，n=8，$\times10^{-4}$]
Table 5 | Average absorbance value of bone morphogenetic protein 2 and Sox9

组别	骨形态发生蛋白 2	Sox9
正常组	18.90(14.60，27.21)	73.53±20.25
模型组	12.09±4.25	30.27±13.00
自体纯化富血小板血浆组	70.43±8.52[a]	60.94±8.80[a]
异体纯化富血小板血浆组	33.58±16.70[bc]	60.23(36.23，73.18)[b]

表注：与模型组相比，[a]P < 0.01，[b]P < 0.05；与自体纯化富血小板血浆组相比，[c]P < 0.01

2.3.2 Sox9 免疫组化 光镜下软骨细胞 Sox9 免疫组化阳性表达为软骨细胞核、质或膜有棕色颗粒附着。正常组软骨细胞排列整齐，软骨全层可见大量胞质内有棕褐色颗粒；模型组表面粗糙，细胞分层欠清，大量细胞成簇聚集，可见软骨细胞胞质内均为浅棕色着色；自体纯化富血小板血浆组浅表层、过渡层、放射带可见大量胞质棕色颗粒附着，而钙化带细胞胞质多为浅棕色颗粒附着；异体纯化富血小板血浆组软骨细胞排列紊乱，大量细胞簇形成，全层软骨细胞质均为浅棕色颗粒附着。各组 Sox9 免疫组化染色见**图 5**。

据图像分析系统计算各组 Sox9 平均吸光度值，正常组 Sox9 表达量最高，模型组表达量最低，自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组表达量高于比模型组表达 (Z=−3.361，P < 0.01；Z=−2.1，P < 0.05)，正常组、自体纯化富血小板血浆组、异体纯化富血小板血浆组两两比较差异无显著性意义 (P > 0.05)，见表 5。

3 讨论 Discussion

关节软骨持续破坏超过自身有限的增殖修复能力，是骨关节炎发生发展的重要原因之一。关节内注射富血小板血浆

是膝骨关节炎的一项现代治疗技术，活化后纯化富血小板血浆可有效促进软骨细胞的增殖、修复能力，调控关节内炎症反应。实验采用关节注射纯化富血小板血浆治疗兔膝骨关节炎，通过大体标本、病理组织学观察证实了纯化富血小板血浆确能有效修复膝骨关节炎关节软骨损伤，并改善骨赘及关节液形成。

纯化富血小板血浆含有大量起抗分解剂和抗炎剂作用的生长因子[11]，如刺激滑膜成纤维细胞合成透明质酸的血小板生长因子；抑制 NF-κB 基因活化的白细胞介素 1 受体拮抗剂，他参与细胞凋亡和炎症过程；抑制软骨降解的转化生长因子 β，他主要调节和增强组织金属蛋白酶抑制剂的基因表达的因子；此外，还有控制软骨的生长、稳定软骨的胰岛素样生长因子 1 等，以调控软骨细胞和软骨下骨的代谢，维持蛋白聚糖的合成与降解之间的稳态，并刺激软骨细胞的增殖。膝关节软骨细胞体外实验显示，添加富血小板血浆后有效抑制了 Wnt/β-catenin 信号传导，软骨细胞的增殖能力明显增强[12]。膝骨关节炎小鼠模型的体内实验显示，关节腔注射富血小板血浆可有效降低软骨细胞的分解代谢活性，使软骨细胞凋亡的速率减慢，以此保护关节软骨的组织形态[13]。此外，有研究者利用小鼠膝骨关节炎模型发现，关节内注射富血小板血浆可通过调节巨噬细胞亚型来减轻患肢疼痛及滑膜炎症[14]。陈尉等[15]通过细胞学实验发现，富血小板血浆处理能够通过降低滑膜细胞炎症而发挥保护软骨的作用；不少临床研究也报道了富血小板血浆对膝骨关节炎的治疗价值[16-17]。

目前用于临床治疗的富血小板血浆多采用自体血制备，但已有研究者发现同种异体纯化富血小板血浆用于修复骨缺损取得良好疗效[18-19]。一项随机对照临床试验将同种异体富血小板血浆与标准护理联合运用于慢性难治性伤口处置，显示经异体富血小板血浆治疗的伤口炎症渗出明显减少，愈合时间显著缩短[20]。JO 等[21]在对肩袖损伤行关节镜下损伤修复时还使用了同种异体富血小板血浆，结果发现未引起任何局部或一般的并发症，且在临床和结构等方面具有与自体富血小板血浆相当的功效。一项同种异体富血小板血浆修复大鼠跟腱损伤的研究报道显示，单次注射同种异体纯化富血小板血浆可有效促进跟腱原纤维胶原蛋白沉积，同时增强跟腱的拉伸强度[22]。

在针对豚鼠膝骨关节炎的动物实验中，KANWAT 等[23]将同种异体富血小板血浆注射至患肢膝关节腔内，经治疗后关节滑膜炎明显改善，滑膜血管减少，且短期分析中膝关节滑液软骨寡聚基质蛋白水平显著降低，但是短期观察到的富血小板血浆有益作用在长期观察中无法再现，因此同种异体富血小板血浆对膝骨关节炎关节软骨的影响仍然模棱两可。此次实验结果显示，自体纯化富血小板血浆组较模型组的软骨修复、骨赘及关节液有改善，而异体纯化富血小板血浆组较模型组却无明显改善；苏木精－伊红染色软骨切片结果显示：自体纯化富血小板血浆组组、异体纯化富血小板血浆组组较模型组有改善，但自体纯化富血小板血浆组改善更为明显，这与大体标本观察结果一致，表明自体、同种异体纯化富血小板血浆均能在一定程度上改善膝骨关节炎软骨细胞的增殖能力，促进软骨细胞修复，但自体纯化富血小板血浆的治疗效果更为明显。血小板具有高度的免疫原性[24]，接受同种异体血小板治疗极易诱发同种免疫，进而导致接受者出现移植排斥反应。相关研究表明，同种抗体的产生绝大多数针对主要组织相容性抗体 (MHC) 抗原，少数针对抗人血小板抗原的抗体 (HPA)，虽然血小板表达的Ⅰ类 MHC 抗原水平低，但白细胞上可发现高水平的 MHC 抗原，尽管富血小板血浆中的白细胞明显减少，但始终不能完全消除同种免疫 MHC 的风险抗原[25]。此次实验为膝关节腔内局部使用同种异体纯化富血小板血浆，究竟是否存在局部免疫排斥反应，由于未检测相关血小板抗体等，故尚不明确。

如今多种细胞因子已被证实参与软骨细胞的合成代谢[26]，骨形态发生蛋白 2 可有效诱导人间充质干细胞软骨形成[27]，被认为是关节软骨的保护因素；Sox9 是调控软骨发生、发育的核心转录因子，主要调控软骨细胞分化，因此骨形态发生蛋白 2、Sox9 与软骨细胞再生、骨关节炎关系密切。此次实验免疫组化结果显示，模型组骨形态发生蛋白 2、Sox9 表达量最低，考虑原因为膝骨关节炎模型软骨损伤后软骨细胞增殖、修复能力差；关节内注射自体纯化富血小板血浆后骨形态发生蛋白 2、Sox9 表达量升高，且在软骨过渡层和放射层均有大量表达，说明纯化富血小板血浆可能通过上调骨形态发生蛋白 2、Sox9 的表达提高软骨细胞的增殖能力，促进软骨损伤修复；而异体纯化富血小板血浆治疗后骨形态发生蛋白 2、Sox9 的表达量虽然有所增高，但骨形态发生蛋白 2 主要表达在软骨细胞过渡层，与自体纯化富血小板血浆组相比其表达量存在差异，大体标本和组织学评分结果也显示异体纯化富血小板血浆组较模型组无明显改善。既往有研究发现，向正常鼠关节腔反复注射骨形态发生蛋白 2 鼠关节面出现骨赘形成，且晚期膝骨关节炎骨赘中存在骨形态发生蛋白 2 强烈表达[28]。因此，骨形态发生蛋白 2 在骨关节炎软骨细胞中表达具有不同的意义，该因子在健康软骨表达量很低，在软骨损伤、骨关节炎软骨中表达增加，首先考虑是骨形态发生蛋白 2 在损伤刺激后作为修复反应上调，但也不能排除骨形态发生蛋白 2 刺激骨关节炎损伤进一步发展的可能；因此推测异体纯化富血小板血浆组骨形态发生蛋白 2 的表达集中于过渡层，不能有效改善损伤软骨的修复，还可能诱导关节面骨赘形成，但该推断是否成立还需进一步研究证实。

目前富血小板血浆的临床治疗方案尚未统一、规范，各研究中富血小板血浆的注射次数、间隔时间、单次用量不尽相同，而此次实验就富血小板血浆的半衰期特点，共注射 3 次，每次间隔 2 周的治疗方案，但是实验结果仅在末次注射 2 周后取材观察所得，没有进行长期实验结果观察，这在一定程度上局限了实验分析。此外，实验主要存在以下不足：纳入的样本数量偏少；由于研究条件受限，该实验未能对组织标本血小板抗体检测，导致未能明确自体、同种异体纯化富血小板血浆治疗膝骨关节炎存在疗效差异的根本原因，这些都将在后续研究中进一步改进、完善。

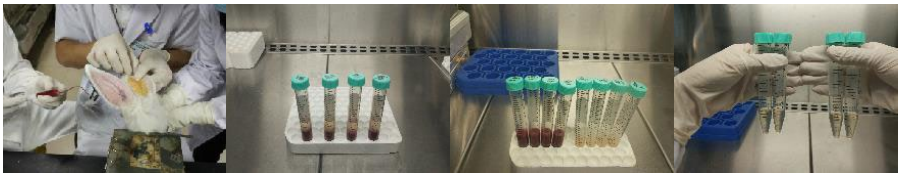
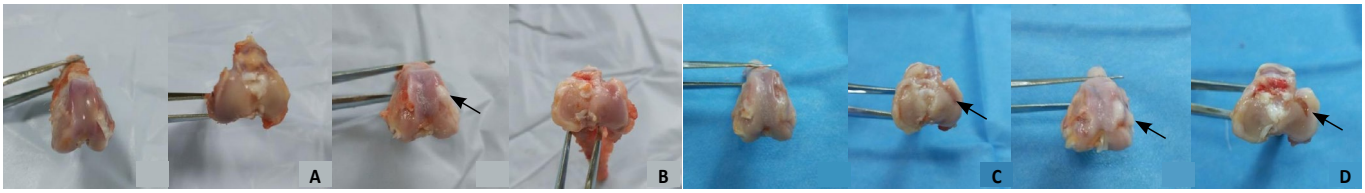


图 1 | 纯化富血小板血浆的制备

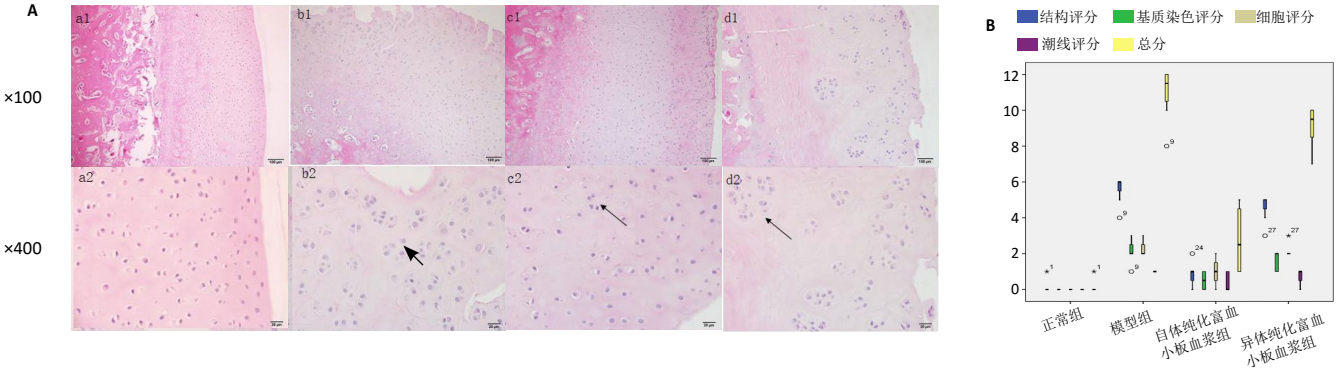
Figure 1 | Preparation of purified platelet-rich plasma



图注：A 为正常组；B 为模型组，关节面骨赘形成，见箭头指示；C 为自体纯化富血小板血浆组，箭头指示关节面欠光滑，见箭头指示；D 为异体纯化富血小板血浆组，关节面软骨缺损，见箭头指示，形成溃疡，暴露软骨下骨

图 2 | 各组兔膝关节股骨端、胫骨端大体标本

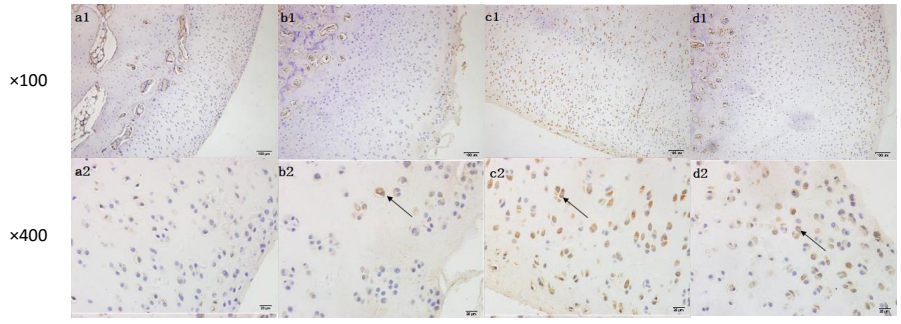
Figure 2 | Macroscopic specimens of femoral and tibial ends of the rabbit knee joints



图注：a1、a2 为正常组，b1、b2 为模型组，c1、c2 为自体纯化富血小板血浆组，d1、d2 为异体纯化富血小板血浆组。A 为各组膝关节软骨苏木精－伊红染色切片，模型组软骨表面不规则，细胞排列结构欠规则，细胞数量减少；自体纯化富血小板血浆组软骨表面较模型组光滑，细胞排列欠规则，部分出现局部细胞聚集成簇；异体纯化富血小板血浆组软骨细胞表面粗糙，软骨细胞排列不规则，局部软骨细胞聚集成簇；图中箭头指示软骨细胞聚集成簇。B 为各组苏木精－伊红染色切片改良 Mankin's 评分

图 3 | 各组膝关节软骨苏木精－伊红染色切片及改良 Mankin's 评分

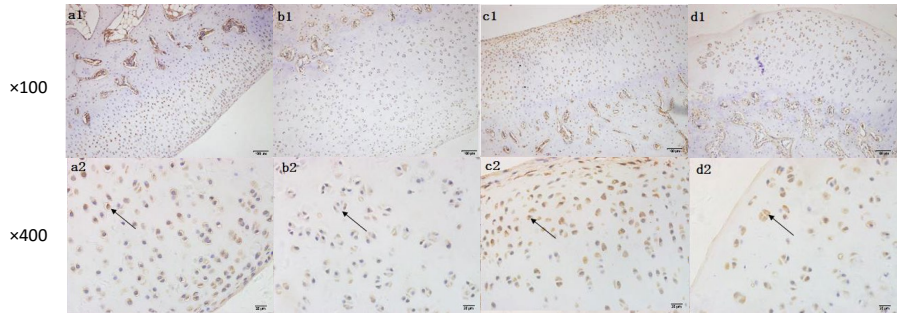
Figure 3 | Hematoxylin-eosin staining and modified Mankin's scores of the knee articular cartilage



图注：a1、a2 为正常组，b1、b2 为模型组，c1、c2 为自体纯化富血小板血浆组，d1、d2 为异体纯化富血小板血浆组。正常组过渡层可见部分细胞胞质浅染色；模型组仅过渡层中可见少量胞质极浅染色；自体纯化富血小板血浆组软骨过渡层和放射层可见大量细胞胞质内有棕褐色颗粒，浅表层及钙化层表达相对较弱；异体纯化富血小板血浆组浅表层及过渡层见可见大量细胞胞质中有棕褐色颗粒，放射层可见少量胞质浅染。箭头指示骨形态发生蛋白 2 免疫组化阳性表达的软骨细胞

图 4 | 各组膝关节软骨骨形态发生蛋白 2 免疫组化染色

Figure 4 | Bone morphogenetic protein 2 immunohistochemical staining of the knee joint cartilage



图注：a1、a2 为正常组，b1、b2 为模型组，c1、c2 为自体纯化富血小板血浆组，d1、d2 为异体纯化富血小板血浆组。正常组软骨全层可见大量胞质内有棕褐色颗粒，见箭头示；模型组细胞胞质内均为浅棕色着色，箭头示软骨细胞聚集成团；自体纯化富血小板血浆组浅表层、过渡层、放射带可见大量胞质棕色颗粒附着，钙化带细胞胞质多为浅棕色颗粒附着，箭头示棕色颗粒；异体纯化富血小板血浆组全层软骨细胞质均为浅棕色颗粒附着，箭头示软骨细胞聚集成团

图 5 | 各组膝关节软骨 Sox9 免疫组化染色

Figure 5 | Sox9 immunohistochemical staining of the knee joint cartilage

综上所述，关节内注射自体纯化富血小板血浆可激活软骨细胞中骨形态发生蛋白 2、Sox9 的表达，提高软骨细胞增殖能力、促进软骨修复，以减轻骨赘、减少关节液，从而达到治疗膝骨关节炎的目的，但异体纯化富血小板血浆对兔膝骨关节炎的疗效并不乐观，其根本原因还有待高质量的相关实验探究，相信随着进一步深入研究，同种异体纯化富血小板血浆能够标准化制备并应用于膝骨关节炎治疗，为临床富血小板血浆治疗膝骨关节炎提供重要指导意义。

作者贡献：赵露婷、方其林进行实验设计，实验实施为赵露婷、方其林、唐海燕，实验评估为赵露婷、方其林、唐海燕，赵露婷成文，胥方元审校。

经费支持：该文章接受了“四川省教育厅项目 (12ZB255)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验经西南医科大学实验动物管理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：该文统计学方法已经由西南医科大学生物统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 周明 , 赵晨钰 , 高谦 , 等 . 自体去白细胞富血小板血浆治疗膝骨关节炎的早期临床疗效观察 [J]. 解放军医学院学报 ,2019,40(8):757-759,763.

[2] ELIK H, DOĞU B, YıLMAZ F, et al. The efficiency of platelet-rich plasma treatment in patients with knee osteoarthritis. J Back Musculoskelet Rehabil. 2020;33(1):127-138.

[3] 沈恺 . 富血小板血浆与透明质酸钠关节腔内注射治疗膝骨关节炎的疗效观察 [J]. 世界最新医学信息文摘 ,2019,19(88):104-106.

[4] BURCHARD R, HUFLAGE H, SOOST C, et al. Efficiency of platelet-rich plasma therapy in knee osteoarthritis does not depend on level of cartilage damage. J Orthop Surg Res. 2019;14(1):153.

[5] 孙鲁宁 , 赵燕华 , 黄桂成 , 等 . 木瓜蛋白酶诱导膝关节骨关节炎模型兔滑膜病理变化与药物注射时间的关系 [J]. 中国组织工程研究与临床康复 ,2011,15(50):9311-9313.

[6] 沈景寿 , 张晶 , 胡毓诗 , 等 . 膝关节骨关节炎诱导性动物模型研究进展 [J]. 中国运动医学杂志 ,2019,38(8):726-730.

[7] PEREZ AG, LANA JF, RODRIGUES AA, et al. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. ISRN Hematol. 2014;2014:1-8.

[8] ALMASRY SM, SOLIMAN HM, EL-TARHOUNY SA, et al. Platelet rich plasma enhances the immunohistochemical expression of platelet derived growth factor and vascular endothelial growth factor in the synovium of the meniscectomized rat models of osteoarthritis. Ann Anat. 2015;197:38-49.

[9] LAVERTY S, GIRARD CA, WILLIAMS JM, et al. The OARSI histopathology initiative- recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18 Suppl 3:S53-65.

[10] 常琦 , 阮贞 , 王宪伟 , 等 . 骨关节炎模型大鼠血清骨保护素及软骨下骨降钙素基因相关肽、神经生长因子表达及 Mankin 评分变化 [J]. 中国老年学杂志 ,2019,39(4):909-913.

[11] KNOP E, PAULA LED, FULLER R. Platelet-rich plasma for osteoarthritis treatment. Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition). 2016;56(2):152-164.

[12] WU J, HUANG JF, QIN XX, et al. Platelet-rich plasma inhibits Wnt/beta-catenin signaling in rabbit cartilage cells activated by IL-1beta. Int Immunopharmacol. 2018;55:282-289.

[13] ASJID R, FAISAL T, QAMAR K, et al. Platelet-rich Plasma-induced Inhibition of Chondrocyte Apoptosis Directly Affects Cartilage Thickness in Osteoarthritis. Cureus. 2019;11(11):e6050.

[14] KHATAB S, VAN BUUL GM, KOPS N, et al. Intra-articular Injections of Platelet-Rich Plasma Releasate Reduce Pain and Synovial Inflammation in a Mouse Model of Osteoarthritis. Am J Sports Med. 2018;46(4):977-986.

[15] 陈尉 , 张国如 , 何健东 , 等 . 富血小板血浆调节滑膜炎保护软骨细胞 [J]. 中国组织工程研究 ,2020,24(29):4643-4649.

[16] 李弯月 , 钱宝延 , 庄卫生 , 等 . 自体富血小板血浆注射联合电针治疗膝骨关节炎的疗效观察 [J]. 中国康复 ,2020,35(3):143-146.

[17] 黄凯华 , 吴志浩 , 张子亮 , 等 . 透明质酸、富血小板血浆及两者联合应用对膝骨关节炎的疗效评估 [J]. 中国骨质疏松杂志 ,2019,25(12):1707-1711.

[18] 吕敏 . 同种异体富血小板血浆标准化制备的研究 [D]. 西安 : 第四军医大学 ,2013.

[19] 高伟 . 同种异体富血小板血浆对兔骨缺损修复作用的实验研究 [D]. 石家庄 : 河北医科大学 ,2017.

[20] LIAO X, LIANG JX, LI SH, et al. Allogeneic Platelet-Rich Plasma Therapy as an Effective and Safe Adjuvant Method for Chronic Wounds. J Surg Res. 2020;246:284-291.

[21] JO CH, SHIN JS, LEE SY, et al. Allogeneic platelet-rich plasma for rotator cuff repair. Acta Ortop Bras. 2017;25(1):38-43.

[22] GREIMERS L, DRION PV, COLIGE A, et al. Effects of Allogeneic Platelet-Rich Plasma (PRP) on the Healing Process of Sectioned Achilles Tendons of Rats: A Methodological Description. J Vis Exp. 2018;(133):55759.

[23] KANWAT H, SINGH DM, KUMAR CD, et al. The effect of intra-articular allogenic platelet rich plasma in Dunkin-Hartley guinea pig model of knee osteoarthritis. Muscles Ligaments Tendons J. 2018;7(3):426-434.

[24] MONCHARMONT P. Platelet component transfusion and alloimmunization: Where do we stand? Transfus Clin Biol. 2018;25(3):172-178.

[25] TRAN JQ, MUENCH MO, HEITMAN JW, et al. Allogeneic major histocompatibility complex antigens are necessary and sufficient for partial tolerance induced by transfusion of pathogen reduced platelets in mice. Vox Sang. 2019;114(3):207-215.

[26] 朱瑜琪 , 王智耀 , 张帅 , 等 . 细胞因子与膝骨关节炎关节软骨损伤的修复 [J]. 中国组织工程研究 ,2017,21(36):5873-5878.

[27] 史文涛 , 戴瑶 , 毕士奇 , 等 . 不同状态 BMP-2 对体外 EMSCs 成骨分化的作用 [J]. 中国矫形外科杂志 ,2019,27(3):261-267.

[28] VAN BEUNINGEN HM, GLANSBEEK HL, VAN DER KRAAN PM, et al. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. Osteoarthritis Cartilage. 1998;6(5):306-317.

(责任编辑：GW，ZN，SX)