

## 富血小板血浆修复关节软骨损伤机制的研究进展

王克涛<sup>1</sup>, 李众利<sup>1</sup>, 朱恒<sup>2</sup>, 毛宁<sup>2</sup>, 张毅<sup>2</sup>

<sup>1</sup>解放军总医院 骨科, 北京 100853; <sup>2</sup>军事医学科学院 基础医学研究所, 北京 100850

**摘要:** 大量研究证明富血小板血浆通过活化后释放的各种生物活性因子和血浆中的各种蛋白发挥促进损伤关节软骨修复的作用, 如能够刺激软骨细胞增殖, 促进骨髓间充质干细胞等骨软骨前体细胞迁移、增殖、向软骨分化和分泌软骨细胞基质, 抑制损伤部位炎症反应, 刺激滑膜细胞分泌透明质酸和关节滑液, 形成凝胶为损伤部位提供早期修复并为前体细胞创造增殖、分化的三维环境等。系统了解富血小板血浆修复关节软骨损伤的机制有助于提高修复关节软骨疗效。

**关键词:** 富血小板血浆; 关节软骨修复; 生物活性因子

**中图分类号:** R 684.3; R 31 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2017)06-0556-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.06.017

**网络出版时间:** 2017-03-30 14:50 **网络出版地址:** http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20170330.1450.002.html

### Research progress on mechanisms of platelet rich plasma for cartilage repair

WANG Ketao<sup>1</sup>, LI Zhongli<sup>1</sup>, ZHU Heng<sup>2</sup>, MAO Ning<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; <sup>2</sup>Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Corresponding author: LI Zhongli. Email: lizhongli@263.net; ZHU Heng. Email: zhudingdingabc@163.com

**Abstract:** Increasing evidence support multiple biological activated factors and plasma proteins released in the activated platelet rich plasma (PRP) play crucial roles in the mechanism of cartilage repair such as promoting proliferation of chondrocytes, stimulating vertical migration, proliferation, chondrocytes differentiation and the synthesis and secretion of cartilaginous matrix in bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and immature chondrocytes. In addition, PRP can protect the chondrocytes via anti-inflammation, stimulating synoviocytes to secrete hyaluronic acid (HA) as well as synovial fluid, and forming gel as initial tissue for wound healing and three-dimensional substrate for progenitors proliferation and differentiation. Understanding mechanisms of PRP in cartilage repair will benefit for improving its therapeutic efficacy.

**Keywords:** platelet rich plasma; cartilage repair; biological factor

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是全血通过离心获得的含高浓度血小板的血浆成分<sup>[1]</sup>。PRP因富含生物活性因子被广泛应用于再生医学和组织修复领域的临床和实验研究<sup>[2-4]</sup>。目前众多研究显示PRP在修复关节软骨缺损、促进软骨再生方面具有独特作用。近年来PRP促进关节软骨修复的研究取得了一系列进展, 本文就PRP促进软骨关节修复的作用机制做一综述。

#### 1 软骨与软骨缺损的治疗

关节软骨是由软骨细胞和软骨基质组成的一种乳白色、光滑的透明组织, 它覆盖于骨关节表面, 起到减少相邻骨摩擦、吸收应力、缓冲关节震动的作用。由于关节软骨没有血管神经分布, 其营养成分必须从关节滑液中获取, 因此关节软骨损伤后极难修复<sup>[5]</sup>。外伤或者其他病理因素导致的软骨缺损引起骨关节炎甚至进展为全关节的损伤<sup>[6]</sup>。

目前, 早期关节软骨修复的方法主要有微骨折技术、自体软骨移植、软骨组织工程等。这些方法试图从生物学、生物力学和运动功能等方面实现软骨修复, 尽管取得了很大进步, 但由于仿生软骨在结构、力学上的缺陷以及复杂的技术、昂贵的价格, 尚难以推广应用, 并且也难以从根本上逆转软骨损伤后的病理进展。晚期关节软骨损伤只能进行人工关节置换。但置换关节存在使用寿命较短、假体松动、手术后活动受限、费用昂贵等问题, 也不是理想的选择。因此找到一种效果理想又简便经济的软骨修复方法是该领域需要研究解决的问题。PRP作为自体的血浆成分, 具有来源广泛、获取简单、低免疫原性和高生物安全性等优点。近年的研究表明, PRP具有修复关节软骨损伤的潜质, 可能成为一种修复软骨缺损的方法。

#### 2 PRP的类型和生物活性

PRP是通过自体血离心提取的富含血小板的血浆成分。通常认为PRP的血小板含量是正常人血浆血小板含量的3~4倍以上<sup>[7]</sup>。并根据其中白细胞和纤维蛋白的含量分为富白细胞PRP(W-PRP)、贫白细胞PRP(P-PRP)、富血小板纤维蛋白(PRF)、去纤维蛋白PRP(PFC)等类型。PRP富含多种生长因子, 主要由血小板活化后 $\alpha$ -颗粒释放, 包括血小板源性生长因子、转化生长因子- $\beta$ 3、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、血管内皮生长因子等<sup>[8]</sup>。这些生长因子具

收稿日期: 2017-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(81371945; 81572159; 31370916)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81371945; 81572159; 31370916)

作者简介: 王克涛, 男, 硕士, 医师。研究方向: 关节镜与运动医学。Email: wangketao1988@163.com

通信作者: 李众利, 男, 博士, 主任医师, 教授。Email: lizhongli@263.net; 朱恒, 男, 博士, 副研究员。Email: zhudingdingabc@163.com

有促进伤口愈合和组织修复再生的作用<sup>[7]</sup>。另外, 血浆蛋白是PRP中发挥生物学作用的重要成分, 其中的纤维蛋白原在PRP激活时形成纤维蛋白, 可以作为组织工程载体。研究表明, PRP已经被广泛应用于骨缺损、软组织损伤修复、创面愈合、感染治疗、功能重建皮肤慢性溃疡等领域的研究和实验性治疗<sup>[2-3]</sup>。近期研究显示, PRP对关节软骨缺损的修复也具有独特作用。

### 3 PRP促进关节软骨修复的机制

**3.1 对软骨细胞增殖的影响** PRP能够通过促进软骨细胞的增殖和软骨相关基质的合成促进缺损部位软骨组织的合成。Akeda等<sup>[9]</sup>发现绵羊软骨细胞在10% PRP中培养72 h, 软骨细胞数量和DNA含量均明显高于普通培养基培养。Kaps等<sup>[10]</sup>认为PRP可以刺激软骨细胞增殖, 但不能引起软骨相关蛋白的沉积。Spreafico等<sup>[11]</sup>发现PRP能刺激软骨细胞增殖和Col II、蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖等软骨基质相关蛋白的合成。Chien等<sup>[12]</sup>通过同时在二维、三维的培养体系中培养软骨细胞, 也发现除软骨细胞有明显增殖外, Col II、聚集蛋白聚糖(aggrecan)基因表达明显升高, 蛋白聚糖和糖胺聚糖的分泌也有增高。

**3.2 对骨软骨前体细胞分化的影响** Akeda等<sup>[9]</sup>发现添加PRP的培养基比普通培养基培养软骨细胞后Col II、蛋白聚糖有明显升高, 但蛋白形态一致, 表明经PRP刺激后, 软骨细胞能够保持软骨表型的稳定。另一些学者发现PRP可以促进Col II、蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖等软骨基质相关蛋白的合成<sup>[11]</sup>。而PRP促进软骨基质相关蛋白分泌的增加可能是通过一种“软骨细胞再分化”过程实现的。Stokes等<sup>[13]</sup>发现PRP作用后与透明软骨相关的aggrecan、Sox9表达增加, 而没有促进Col X(十型胶原)和碱性磷酸酶的分泌, 这表明PRP作用于软骨细胞后促使其向透明软骨而非纤维软骨、骨组织分化, Sox9表达的增加证明PRP可能存在一种“软骨细胞再分化”过程。还有一些学者则进一步阐明了PRP介导的软骨细胞再分化过程是通过大麻素受体-1, 2表达上调实现的<sup>[14-15]</sup>。

**3.3 促进软骨下骨前体细胞垂直迁移和形成透明软骨** PRP可以释放大量生物活性因子促进前体细胞的垂直迁移, 也能促进前体细胞向软骨细胞分化并形成透明软骨。在关节软骨严重缺损时, 软骨下骨中的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)成为修复关节软骨缺损的主要前体细胞来源。另外, 软骨深层的幼稚软骨细胞也是软骨再生的细胞来源。微骨折技术是早期软骨损伤修复的常用外科技术, 它的基本原理就是将软骨下骨和软骨深层的骨髓间充质干细胞和幼稚软骨细胞动员到损伤部位进行修复。但无论是深及软骨下骨的严重关节软骨损伤还是微骨折技术动员的前体细胞都主要形成纤维软骨而不是透明软骨<sup>[16-17]</sup>。研究表明, PRP可以刺激前体细胞的垂直迁移和Col II、蛋白聚糖的分泌, 促进透明软骨基质的形成<sup>[18]</sup>, 可以作为微骨折技术的重要补充或者严重关节软骨损伤的有效治疗方法。

**3.4 促进骨髓间充质干细胞增殖和成软骨分化** BMSC具

有多项分化潜能, 是关节软骨损伤修复的种子细胞<sup>[19]</sup>。PRP富含多种生物活性因子, 其中血小板源性生长因子、转化生长因子- $\beta$  3对BMSC增殖、成软骨分化具有促进作用。研究表明, PRP显著促进BMSC有丝分裂而实现促进增殖效应<sup>[20-21]</sup>。Mishra等<sup>[22]</sup>发现, 在10%的PRP刺激下培养7 d, BMSC数量比普通培养基高7倍, 成软骨分化基因Sox9和aggrecan的表达也较普通培养基培养有显著升高(约10倍)。Xie等<sup>[23]</sup>发现, PRP可以刺激干细胞的增殖、黏附、迁移, 同时可以促进Col II的分泌。可见, PRP一方面通过促进BMSC增殖, 另一方面通过促进BMSC向成软骨细胞分化和软骨基质相关蛋白聚集而促进软骨缺损修复和透明软骨形成。

**3.5 抑制软骨细胞炎症反应和蜕变** PRP可以释放大量的抗炎因子, 如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)受体拮抗剂(IL-1ra), 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )受体拮抗剂1, 2(TNF-R I, II), IL-2、IL-4、IL-10、IL-13和 $\gamma$ -干扰素(interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等<sup>[24]</sup>。IL-1ra可以通过阻滞IL-1受体抑制IL-1活化, TNF-R I, II可以通过与TNF- $\alpha$ 结合而阻止与之相关的信号通路传导<sup>[25-26]</sup>。IL-4、IL-10、IL-13可以抑制TNF- $\alpha$ 介导的前列腺素-E2的合成, 后者是炎症反应的重要介质<sup>[27]</sup>。IFN- $\gamma$ 通过促进IL-18结合蛋白的合成, 抑制IL-18的活性<sup>[24]</sup>。通过上述机制, PRP可以抑制软骨损伤时的炎症反应, 能够促进损伤部位的修复, 防止关节软骨蜕变。

**3.6 促进滑膜细胞分泌透明质酸** 关节滑膜衬于关节囊的内层, 其中的滑膜细胞可以分泌大量的关节滑液, 起到润滑关节、营养软骨的作用。PRP通过释放多种生物活性因子刺激滑膜细胞分泌关节滑液。Iwanaga等<sup>[28]</sup>发现, 关节内注射PRP, 可以促进滑膜细胞分泌透明质酸和金属蛋白酶。透明质酸是关节液内营养软骨细胞、防止关节蜕变的有效成分, 也是透明软骨形成不可或缺的组分。另外, 金属蛋白酶能够介导软骨细胞新陈代谢, 促进损伤软骨细胞的修复和再生。

**3.7 提供软骨修复的三维环境** 由于关节软骨中缺乏血管和凝血因子, 在组织损伤修复的初期难以形成早期修复组织, 这对软骨损伤修复十分不利。同时, 修复软骨损伤的前体细胞在成软骨分化时需有三维结构的诱导。因此, 损伤初期在软骨缺损部位形成三维结构至关重要。PRP含有大量的血浆蛋白和凝血因子, 激活时可以在关节腔受损部位形成凝胶, 凝胶的三维结构可以使前体细胞或者损伤周围软骨细胞黏附, 有利于前体细胞向软骨细胞分化和透明软骨基质的形成。Moroz等<sup>[29]</sup>将BMSC和PRP悬液混合, 用凝血酶和CaCl<sub>2</sub>激活形成凝胶。培养7 d发现细胞呈圆形类软骨样, 并成簇、均一地聚集在支架周围, 培养21 d观察到类软骨样的组织。PRP凝胶一般在7 d内降解<sup>[30]</sup>, 此时细胞的迁移尚不充分, 如果在凝胶中种植细胞或者加入纤维蛋白溶解抑制剂可以延缓凝胶的降解<sup>[31]</sup>。细胞长入后可以分泌软骨细胞外基质, 如Col II和蛋白多糖, 这些细胞外基质可以随着凝胶的降解逐步替代支架成分而形成软骨基质<sup>[30]</sup>。

#### 4 PRP促进骨性关节炎软骨修复的疗效争议

尽管众多体内、体外实验研究显示PRP能通过多种机制修复关节软骨损伤,但在PRP临床治疗骨性关节炎疗效上仍未取得共识<sup>[32]</sup>。Kon等报道了关节腔内注射PRP治疗膝关节骨性关节炎患者的观察结果,采用自评总体健康状况视觉类比量表(EQ-VAS)和国际膝关节文献委员会膝关节评估表(IKDC)评分进行临床评价,结果显示治疗1年后各项评分均较治疗前有所提高<sup>[33]</sup>。然而,Chang等<sup>[34]</sup>发现,直接向骨性关节炎患者关节腔内注射PRP,虽然在2个月和6个月时PRP相对于透明质酸在改善患者症状方面具有更高的有效率,但这仅限于统计学差异,临床疗效则改变甚微。同时,这些临床试验研究尚不能提供PRP治疗骨性关节炎的一级证据,多篇回顾性研究以及美国矫形外科学会发布的骨性关节炎治疗指南也认为PRP治疗骨性关节炎的效果不确定<sup>[35-37]</sup>。

#### 5 结语

PRP通过释放大量生物活性因子、形成凝胶提供三维支架等作用促进软骨损伤修复,相关研究也已经取得一些成果。但因PRP本身成分复杂,不同方法制备的PRP差异较大,实验室研究和临床治疗骨性关节炎方面还存在分歧。尤其对PRP的使用形式、使用方法、促进软骨修复的最优浓度、PRP对不同组织的作用效果以及临床治疗效果等方面还尚未深入研究。因此,仍需进一步研究,以期实现PRP在关节软骨修复及其他疾病中应用的标准化、精确化,为关节软骨损伤的修复和骨性关节炎的治疗提供更有力的支持。

#### 参考文献

- Borrione P, Gianfrancesco AD, Pereira MT, et al. Platelet-rich plasma in muscle healing [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2010, 89 (10): 854-861.
- De La Mata J. Platelet rich plasma. A new treatment tool for the rheumatologist [J]. *Reumatol Clin*, 2013, 9 (3): 166-171.
- Kumaran MS. Platelet-rich plasma in dermatology: boon or a bane [J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2014, 80 (1): 5-14.
- Dhillon MS, Behera P, Patel S, et al. Orthobiologics and platelet rich plasma [J]. *Indian J Orthop*, 2014, 48 (1): 1-9.
- Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis [J]. *Clin Sports Med*, 2005, 24 (1): 1-12.
- Braman JP, Bruckner JD, Clark JM, et al. Articular cartilage adjacent to experimental defects is subject to atypical strains [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2005 (430): 202-207.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 114 (6): 1502-1508.
- Masaki H, Okudera T, Watanebe T, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF) [J]. 2016, 2 (1): 19.
- Akeda K, An HS, Okuma M, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2006, 14 (12): 1272-1280.
- Kaps C, Loch A, Haisch A, et al. Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes [J]. *Med Biol Eng Comput*, 2002, 40 (4): 485-490.
- Spreatico A, Chellini F, Frediani B, et al. Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108 (5): 1153-1165.
- Chien CS, Ho HO, Liang YC, et al. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage [J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2012, 100 (4): 948-955.
- Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, et al. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors [J]. *Biochem J*, 2001, 360 (Pt 2): 461-470.
- Lee HR, Park KM, Joung YK, et al. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2 [J]. *J Control Release*, 2012, 159 (3): 332-337.
- Lee HR, Park KM, Joung YK, et al. Platelet-rich plasma loaded in situ-formed hydrogel enhances hyaline cartilage regeneration by CB1 upregulation [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100 (11): 3099-3107.
- Bae DK, Yoon KH, Song SJ. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees [J]. *Arthroscopy*, 2006, 22 (4): 367-374.
- Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2006, 14 (11): 1119-1125.
- Krüger J P, Hondke S, Endres M, et al. Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells [J]. *J Orthop Res*, 2011, 30 (6): 845-852.
- 张浩, 廖伟雄, 李冀, 等. 兔骨髓腔来源的间充质干细胞的分离培养及其生物学特性的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23 (2): 500-505.
- Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, et al. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (5): 1270-1278.
- Moreira Teixeira LS, Leijten JC, Wennink JW, et al. The effect of platelet lysate supplementation of a dextran-based hydrogel on cartilage formation [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (14): 3651-3661.
- Mishra A, Tummala P, King A, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2009, 15 (3): 431-435.
- Xie X, Wang Y, Zhao C, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (29): 7008-7018.
- Woodell-May J, Matuska A, Oyster M, et al. Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ -stimulated human articular chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29 (9): 1320-1326.
- Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2001, 1 (5): 817-829.
- Malemud CJ. Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date [J]. *Drugs Aging*, 2010, 27 (2): 95-115.
- Möller B, Paulukat J, Nold M, et al. Interferon-gamma induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2003, 42 (3): 442-445.
- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, et al. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint [J]. *Arch Histol Cytol*, 2000, 63 (1): 17-31.

(上接558页)

- 29 Moroz A, Bittencourt RA, Almeida RP, et al. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis : an improved approach in cartilage tissue engineering [ J ] . Platelets, 2013, 24 ( 3 ) : 219–225.
- 30 Meinhart J, Fussenegger M, Höbling W. Stabilization of fibrin–chondrocyte constructs for cartilage reconstruction [ J ] . Ann Plast Surg, 1999, 42 ( 6 ) : 673–678.
- 31 Sitek P, Wysocka–Wycisk A, Kępski F, et al. PRP–fibrinogen gel–like chondrocyte carrier stabilized by TXA–preliminary study [ J ] . Cell Tissue Bank, 2013, 14 ( 1 ) : 133–140.
- 32 Chaimani A, Higgins JP, Mavridis D, et al. Graphical tools for network meta–analysis in STATA [ J ] . PLoS ONE, 2013, 8 ( 10 ) : e76654.
- 33 S á nchez M, Anitua E, Azofra J, et al. Intra–articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA : a retrospective cohort study [ J ] . Clin Exp Rheumatol, 2008, 26 ( 5 ) : 910–913.
- 34 Chang KV, Hung CY, Aliwarga F, et al. Comparative effectiveness of platelet–rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology : a systematic review and meta–analysis [ J ] . Arch Phys Med Rehabil, 2014, 95 ( 3 ) : 562–575.
- 35 Hsu WK, Mishra A, Rodeo SR, et al. Platelet–rich plasma in orthopaedic applications : evidence–based recommendations for treatment [ J ] . J Am Acad Orthop Surg, 2013, 21 ( 12 ) : 739–748.
- 36 Khoshbin A, Leroux T, Wasserstein D, et al. The Efficacy of Platelet–Rich Plasma in the Treatment of Symptomatic Knee Osteoarthritis : A Systematic Review With Quantitative Synthesis [ J ] . Arthroscopy, 2013, 29 ( 12 ) : 2037–2048.
- 37 Jevsevar DS, Brown GA, Jones DL, et al. The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence–based guideline on : treatment of osteoarthritis of the knee, 2nd edition [ J ] . J Bone Joint Surg Am, 2013, 95 ( 20 ) : 1885–1886.