

MSCs 联合 PRP 对兔前交叉韧带重建后腱骨愈合的影响

杨军军,徐 斌,徐洪港,涂 俊,李 洋

摘要 **目的** 探讨骨髓腔内局部应用自体间充质干细胞(MSCs)联合富血小板血浆(PRP)对兔前交叉韧带重建后腱-骨愈合的影响。**方法** 24只健康的新西兰大白兔随机平均分配为M组、P组、MP组及C组。分别在肌腱骨道内注入以生物蛋白胶为媒介的MSCs、PRP、MSCs复合PRP,C组仅注入生物蛋白胶。术后4、8、12周3个时间点取各组兔膝关节标本切片染色,行组织学观察及分析。**结果** 对于腱骨早期愈合有标志性意义的Sharpy样纤维在术后第4周MP组即可观察到,并随着愈合时间的延长,M组、P组及C组也相继出现Sharpy样纤维且Sharpy样纤维的量是持续增加的。各组标本在3个时间点组织形态学Buark评分差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 联合使用MSCs和PRP可促进骨道肌腱早期愈合,比二者单独使用的作用强。

关键词 间充质干细胞;富血小板血浆;前交叉韧带;腱骨愈合

中图分类号 R 686

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0368-05

前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)在维持膝关节的稳定中起着重要作用。ACL损伤是一种常见的运动损伤,目前临床上治疗ACL损伤的主要手术方式为关节镜下ACL重建术。ACL重建术的成功与否很大程度上取决于韧带移植物与骨隧道之间的愈合状况^[1],研究证明骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及富血小板血浆

(platelet rich plasma, PRP)对交叉韧带重建后的腱骨愈合有明显的促进作用^[2-3]。但针对MSCs联合PRP对腱-骨愈合的研究报道较少,该实验利用自体MSCs联合PRP凝胶顶端注射的方法注入骨髓腔内,观察自体MSCs复合PRP是否有促进腱骨愈合的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年的新西兰大白兔24只,约2.5 kg,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要材料及试剂 兔MSCs成骨诱导分化培养基(广州赛业生物技术有限公司);纤维蛋白酶原、凝血酶、MSCs完全培养基、青链霉素(合肥欣乐生物有限公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);CO₂恒温培养箱(美国SHEL LAB);Masson三色染色剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs的提取、分离及培养 粒细胞刺激因子刺激各组兔1周后,取兔外周血10 ml,1 200 r/min离心10 min用5 ml含10%胎牛血清及1%双抗的L-DMEM液的完全培养液冲洗离心管后接种至25 cm²培养瓶中,37℃,5% CO₂恒温箱中培养,48 h后予以第1次换液,后每72 h换液1次,待贴壁细胞铺满培养瓶底部90%以上后进行传代。取生长活跃的第3代细胞进行实验,待细胞传至第3代后,将各组细胞消化后台盼蓝染色并在细胞计数仪上测得各兔细胞活力平均为77.34%。

1.2.2 MSCs的鉴定 每日观察细胞形态,用倒置相差显微镜每日观察体外培养的MSCs增殖和形态

2015-12-08 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:杨军军,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

dependent manner, with peak levels of VEGF mRNA, MMP-2 mRNA and the protein of MMP-2 at 30 mmol/L glucose and peak level of VEGF protein at 40 mmol/L glucose. Under the same intervention, the expression of VEGF and MMP-2 was higher after intervening for 48 hours than 24 hours($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose can promote the proliferation of A549 cells, strengthening the resistance to cisplatin and the expression of VEGF and MMP-2.

Key words glucose; lung adenocarcinoma; growth; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase-2

特点,并拍照记录。MSCs 的成骨诱导鉴定:取第 3 代 MSCs 以 10^5 /孔接种于 6 孔板种,分为实验组及对照组,待细胞融合 80% 后向实验组加入成骨诱导液(L-DMEM,体积分数为 10% 胎牛血清,1% 谷氨酰胺,1% 双抗,0.2% 抗坏血酸,1% 甘油磷酸钠,0.01% 地塞米松),对照组加入完全培养液,隔日换液,诱导 3 周后行茜素红染色,并在倒置显微镜下观察。

1.2.3 PRP 及实验凝胶的制备 制备 PRP 过程严格无菌,造模前 30 min,抽取兔外周血 5~10 ml,置于含有 1 ml 枸橼酸钾 15 ml 离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,抽取上清液,转移至另一离心管 3 000 r/min 离心 10 min,可见离心管中有明显 3 层结构上层为贫血小板血浆,中层为富血小板血浆,下层为红细胞。在肌腱拉入骨道固定完毕后,在 1 ml EP 管中分别加入纤维蛋白原与凝血酶按 4:1 混合,再加入 MSCs 细胞悬液、PRP。即刻形成具有固体性质的生物蛋白胶。

1.2.4 物模型的建立 12 只新西兰大白兔随机分配为 4 组($n=24$)。戊巴比妥麻醉实验兔(1 ml:1 kg)后,术区备皮,消毒铺巾,取出趾长屈肌腱,将肌腱对折,对折后其直径为 (2.2 ± 0.2) mm,长度为 (15 ± 2) mm,对折后肌腱两游离端用无菌缝线编织缝合,折叠处用无菌丝线穿过后备用,在距折叠端 3 mm 处用缝线做好标记。再行髌旁内侧入路,作长约 20 mm 的纵行切口,依次钝性分离皮下筋膜,切开关节囊及内侧支持带,将髌骨向外拉开,切除髌后脂肪垫,显露出前交叉韧带,切除前交叉韧带股骨端,保留胫骨端留作标记,用和肌腱直径相匹配的克氏针分别钻取胫骨及股骨骨道,骨道建立完毕后,测深尺测得股骨道长度 (6 ± 1) mm,同时在胫骨及股骨骨道旁用 0.5 克氏针分别水平钻取两骨道至对侧,将编织好的肌腱两端四线穿过无菌缝针,用缝针穿过胫骨及股骨骨道,且讲连接肌腱的丝线用缝针穿过至骨干对侧,将移植物股骨端拉紧至标记处到达股骨道内口处,将丝线收紧打结,屈膝 30° 将胫骨端收紧打结。配制 MSCs 及 PRP 凝胶,采用顶端注射的方法注入骨道内。M 组注射 MSCs 凝胶,P 组注射 PRP 凝胶,MP 组周 MSCs 及 PRP 凝胶,C 组仅注射生物蛋白凝胶。注射后用生物耳胶封闭骨道外口。多次屈伸膝关节确保韧带稳定固定牢靠后,逐层缝合切口,无菌辅料包扎,术后未予以制动,术后前 3 d 常规注射抗生素。

1.2.5 动物模型取材及组织学观察 于术后第 4、

8 和 12 周 3 个时间点,分别随机处 4 组实验兔各 2 只,取重建韧带后的膝关节,剔除关节周围软组织,保留重建后的前交叉韧带,置于 EDTA 磷酸缓冲液种脱钙 6~8 周后,脱钙结束后按脱水、透明、浸蜡、包埋顺序制作蜡块,将四组关节标本蜡块各切片 10 张(每只兔制作 5 块切片),行 Masson 染色,观察标本出现 Sharpy 样纤维的数量。可以观察到 Sharpy 样纤维的切片则记为有。

1.2.6 4 组标本组织形态学 Buark 评分 参照 Buark 评分标准,用目镜测微尺测量各组标本切片腱-骨界面所含 Sharpy 样纤维的比例。Buark 评分标准为:Grade I 缺乏组织结构的疏松纤维血管组织界面;Grade II 已机化的纤维血管组织伴有胶原纤维产生,占有的界面长度 $<30\%$;Grade III 成熟的纤维组织,细胞和血管减少,占有的界面长度 $30\% \sim 60\%$;Grade IV 纤维血管组织机化成致密结缔组织,垂直的骨道方向的 Sharpey 纤维占有的界面长度 $>60\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,组间数据比较采用 t 检验,等级资料采用非参数秩和检验及 Wilcoxon 秩和检验。设定 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 MSCs 的生长及个代的形态特点 原代细胞培养开始阶段,细胞未贴壁,不易与其他细胞辨认,培养 24 h 后,可观察到培养瓶底部有部分贴壁的、透亮的、长梭形的细胞。随着培养时间延长,培养瓶底部贴壁细胞增多,且增殖较快,培养 5 d 后,贴壁细胞铺满瓶底,排列较整齐,少部分呈集落生长。细胞传代后,第一代及第二代细胞生长迅速,细胞呈多形性,部分贴壁细胞周围伸出伪足,细胞质内颗粒增多,细胞排列紊乱,第三代细胞增殖更加迅速,可见明显集落形成,细胞呈长梭形,形态均一,排列整齐,生长旺盛。MSCs 成骨诱导分化染色后可见散落在培养皿底部被茜素红染成红色的骨细胞。见图 1。

2.2 组织学观察及切片数量统计 M、P 及 MP 组在术后第 4 周观察可见,腱骨连接紧密,界线模糊,可见少量未成熟的软骨样细胞,排列较紊乱,在 MP 组可见部分成熟的软骨样细胞散在地分布于腱骨界面,并有 2 张切片中可观察到 Sharpy 样纤维形成,P 组、M 组未发现有 Sharpy 样纤维形成。术后 8 周 MP、P、M 组均可见 Sharpy 样纤维成分且 MP 组 Sharpy 样纤维的含量较 4 周有增多的趋势,并出现

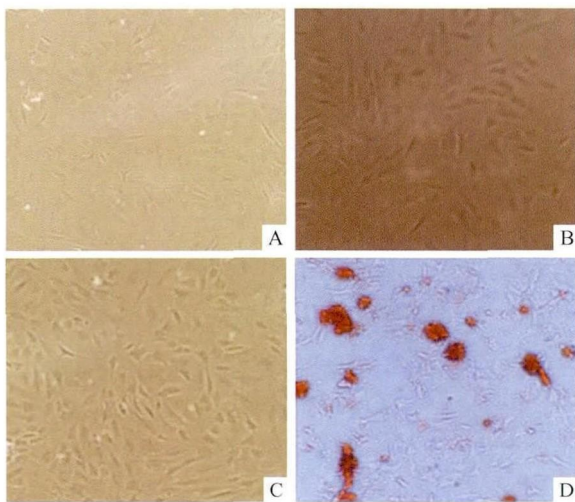


图1 MSCs生长的形态特点及成骨诱导的光镜观察 $\times 100$

A: 原代 MSCs; B: 1 代 MSCs; C: 3 代 MSCs; D: MSCs 成骨诱导茜素红染色

成熟的软骨细胞, 并可见软骨化骨的过程, 新生的骨质长入移植肌腱内, 肌腱侧大部分为成熟的成纤维

细胞, 而靠近骨隧道侧则大部分由不成熟的成软骨细胞构成, 部分区域可见软骨移行带, 其中 MP 组中成熟的软骨样细胞明显多于其它两组。术后 12 周, 实验组 3 组可见大量 Sharpy 样纤维形成, 纤维软骨与钙化软骨增多, 纤维软骨与钙化软骨间有潮线相隔, 形成直接止点结构; C 组在术后第 4 周切片观察可见大量坏死组织, 腱骨间主要由血管肉芽组织连接且连接较松散, 第 8 周腱骨界面连接较前紧密, 腱骨界面多为成纤维细胞, 可见少量不成熟的软骨细胞, 术后 12 周可见腱界面连接紧密, 腱骨界面出现大量成纤维细胞和软骨细胞且胶原纤维排列整齐, 然而可见 Sharpy 样纤维的切片数量仅有 1 张。MP 组含 Sharpy 样纤维切片数量与其余 3 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2、3。

2.3 Buark 评分结果 MP 组在术后 12 周内评分为 Grade I 的切片数量有 15 张, Grade II 有 5 张, Grade III 有 3 张, Grade IV 有 7 张与其余 3 组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

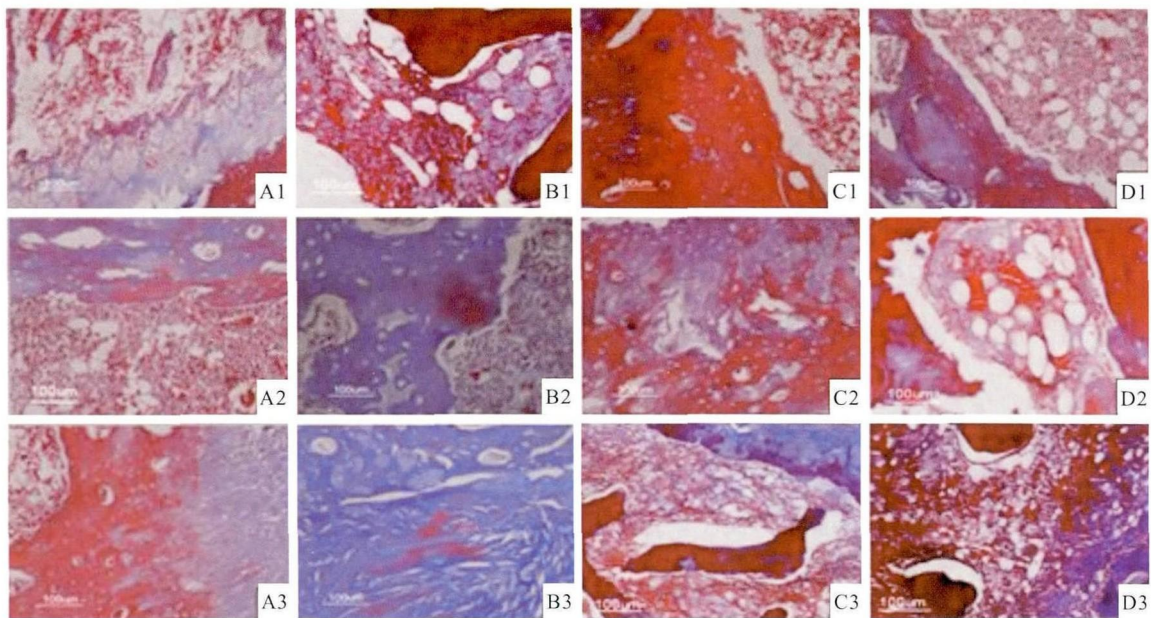


图2 标本切片的光镜观察 $\times 100$

A: MP 组; B: M 组; C: P 组; D: C 组; 1: 第 4 周; 2: 第 8 周; 3: 第 12 周

表1 各组标本在 12 周内组织形态学 Buark 评分

评分	MP 组			M 组			P 组			C 组			合计	秩和范围	平均秩次
	4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周			
GRADE I	8*	4*	3*	10	7	5	1	8	6	10	10	9	90	1-90	45.5
GRADE II	1*	3*	1*	0	0	2	0	1	2	0	0	0	10	91-100	95.5
GRADE III	1*	1*	1*	0	3	2	0	1	2	0	0	0	12	101-112	106.5
GRADE IV	0*	2*	5*	0	0	1	0	0	0	0	0	1	8	113-120	116.5

与其余 3 组比较: * $P < 0.05$

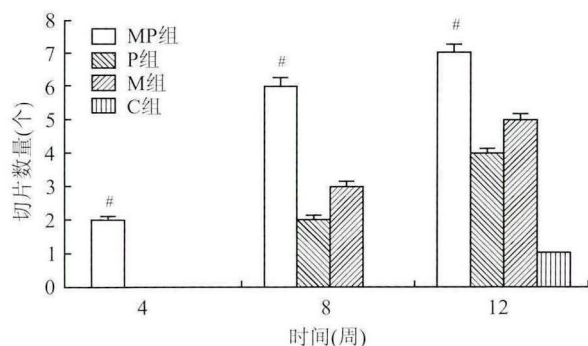


图3 术后不同时间切片数量观察

与其余3组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

关于腱骨愈合的研究报道已有很多,本研究显示肌腱移植术植入骨道后,短期内肉芽组织大量增生,术后约8周腱骨界面可见 Sharpy 样纤维形成,被认为是腱-骨愈合的早期征象^[4]。ACL 直接止点有典型的4层结构:纤维组织、纤维软骨、钙化软骨、骨组织。纤维软骨与钙化软骨之间有“潮线”结构^[5],此结构在传递缓冲应力中起着重要作用。间接止点的特征性结构为 Sharpy 样纤维,Sharpy 样纤维是连接肌腱与骨之间的纤维结构^[6]。较为理想的腱骨愈合为直接止点愈合。本实验中,实验组在术后第8周组织切片染色后即可观察到 Sharpy 样纤维,术后12周 Sharpy 样纤维明显增多,并可见直接止点结构。对照组术后12周组织切片染色后才可观察到 Sharpy 样纤维。说明自体 MSCs 联合 PRP 可以促进腱-骨愈合。

MSCs 是一类存在于外周血,骨髓及脐带血中含有多向分化潜能的干细胞,被认为是理想的“种子细胞”。研究^[7-9]证明 MSCs 对腱骨愈合有显著的促进作用。实验中采取自体的 MSCs 及 PRP,避免了异体抗原排斥反应,增加了实验的安全性。其中含有与创伤愈合和骨再生相关的多种生长因子,如血小板衍生生长因子、转化生长因子 β -1,2、胰岛素样生长因子、表皮生长因子和血管内皮生长因子等,这些生长因子的浓度约为全血中的17倍,其活性可持续约一周^[10]。多数学者^[11]认为 PRP 的作用源于这些因子可调节细胞分裂及分化从而可加速损伤组织的修复。研究^[3,12]证明 PRP 在 ACL 重建后使得韧带修复时间缩短48%。实验结果也提示两个独立因素是可以促进腱骨愈合的。

通过本次实验的组织形态学观察及 Buark 评分

的统计学分析, MSCs 及 PRP 对腱骨愈合都有着促进作用。此次试验结果显示二者联合作用是要高于独立作用的。其机制可能与 PRP 加速了 MSCs 的分裂分化有关。MSCs 在特殊条件下可以分化为多种细胞,其中 PRP 也有着对间充质干细胞促分化作用,研究^[12]证明 PRP 有促进 MSCs 向肌腱细胞分化及加速其分裂繁殖的作用。其机制可能与 PRP 所含的细胞因子有关,研究^[13]证明 PRP 中的 PDGF 可以促进 MSCs 的分泌增加细胞外基质,同时刺激其有丝分裂促进其增殖,同时表皮生长因子可协同 TGF 促进 MSCs 的分化及增殖,PRP 的促分裂分化作用使得 MSCs 早期在骨道内得到了大量的增殖及分化加速了腱骨愈合的过程。本实验仍存在着部分问题例如 PRP 是否对 MSCs 仅有促分化分裂作用而无拮抗作用,目前针对 PRP 对 MSCs 促分化作用仍有争议,不同浓度的 PRP 对 MSCs 的分裂分化作用是否有着差异。此观点会在今后的实验中继续探究。实验中只观察了腱-骨愈合的形态学,对于 MSCs 联合 PRP 对腱-骨愈合的作用,仍需要在增加样本量的同时深入对组织学、生物力学以及生物化学的研究,从而可以使其对腱-骨愈合的影响更具有说服力。实验显示,联合使用 MSCs 和 PRP 可促进骨道肌腱早期愈合且比二者单独使用的作用强。PRP 是一种来源比较简单且和血液中细胞因子比例最贴切的细胞因子复合物,这些因子通过协同作用有效的促进了 MSCs 的早期分裂。实验中 PRP 及 MSCs 均来自于自体,无异体抗原排斥反应,提取方法简单可行,有很强的临床应用前景。

参考文献

- [1] Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar A. Tendon healing in a bone tunnel. Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep [J]. Arthroscopy, 2002, 18(2): 113-23.
- [2] Scranton P E Jr, Lanzer W L, et al. Ferguson M S. Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization [J]. Arthroscopy, 1998, 14(7): 702-16.
- [3] 吕汝举, 刘美静. 富血小板血浆 (PRP) 治疗技术及应用 [J]. 中国医疗器械信息, 2013, 10(15): 50-5.
- [4] Benjamin M, Kumai T, Milz S, et al. The skeletal attachment of tendons-tendon "entheses" [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002, 133(4): 931-45.
- [5] Nebelung W, Becker R, Urbach D, et al. Histological findings of tendon-bone healing following anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring grafts [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2003, 123(4): 158-63.

- [6] François R J, Braun J, Khan M A, et al. Entheses and enthesitis: a histopathologic review and relevance to spondyloarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2001, 13(4): 255–64.
- [7] 邬晓勇, 刘玉杰, 石 斌. 自体骨髓间充质干细胞移植促进交叉韧带重建后腱骨愈合的研究[J]. *军医进修学院学报*, 2010, 31(10): 954–6.
- [8] 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.
- [9] Kanazawa T, Soejima T, Noguchi K, et al. Tendon-to-bone healing using autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in ACL reconstruction without a tibial bone tunnel-A histological study[J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2014, 4(2): 201–6.
- [10] Li Y G, Wei J N, Lu J, et al. Labeling and tracing of bone marrow mesenchymal stem cells for tendon-to-bone tunnel healing[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(12): 2153–8.
- [11] Okuda K, Kawase T, Momose M, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells *in vitro*[J]. *J Periodontol*, 2003, 74(6): 849–57.
- [12] Radice F, Yáñez R, Gutiérrez V, et al. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors[J]. *Arthroscopy*, 2010, 26(1): 50–7.
- [13] Street J, Bao M, de Guzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(15): 9656–61.

Effect of MSCs in combination with PRP on tendon-bone healing of ACL reconstuction

Yang Junjun, Xu Bin, Xu Honggang, et al

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

Abstract Objective To study the effect of autologous mesenchymal stem cell (MSC) in combination with platelet rich plasma (PRP) transplantation on tendon-bone healing after anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction.

Methods Peripheral blood the harvested from rabbits to obtain MSCs. 24 adult New Zealand rabbits were randomly divided into M, P, PM and C group ($n=24$). Rabbits in M group were injected with MSCs via thrombin rabbits in P group were injected with PRP *via* thrombin, rabbits in MP group were injected with a mixture of MSCs, PRP *via* thrombin, while rabbits in C group were injected with only sodium hyaluronate. Four rabbits were killed 4, 8 and 12 weeks after operaton and samples were collected for histological observation of tendon-bone healing. **Results** Scar tissue with some Sharpey's-like fiber components on the tendon-bone interface and a close tendon-bone conjugation were observed 4 weeks in MP group. As the extension of healing time after operation, Sharpy's like fiber could be observed in group M, group P, group C successively and the amount of Sharpy's like fiber was increasing. Differences of the histomorphology Buark score of each group were significant ($P<0.05$) **Conclusion** MSCs in combination with PRP can promote tendon-to-bone healing, and more effective than that of single factor.

Key words mesenchymal stem cells; platelet rich plasma; anterior cruciate ligament; tendon bone healing