

· 论 著 ·

富血小板血浆联合人脐带间充质干细胞移植对大鼠骨质疏松骨折愈合的影响

楚佳奇^{1,2} 孙杰聪^{1*} 李鹏² 李广盛¹ 牛艳茹¹ 林颖¹ 陈光华¹ 魏波¹ 魏劲松¹ 曾荣^{1*}

1. 广东医学院附属医院骨科中心, 湛江 524001

2. 广东医学院附属医院干细胞研发与细胞治疗中心, 湛江 524001

中图分类号: Q813.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 03-0283-05

摘要: **目的** 探讨 PRP 联合 hUC-MSCs 移植对大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响。**方法** 雌性 SPF 级 SD 大鼠 50 只随机分为 5 组, 每组 10 只: 假手术组 (仅切除卵巢周围组织), 安慰剂组 (注射生理盐水), 未诱导组 (给予未诱导的 hUC-MSCs), 成骨诱导组 (移植诱导后的 hUC-MSCs), PRP + 成骨诱导组 (移植诱导后的 hUC-MSCs 联合 PRP)。OPF 造模成功后, 对各组动物进行细胞移植 3 次, 分别在 OPF 造模后 1 周、3 周和 7 周。骨折后的第 1 周、3 周、5 周、7 周、11 周、13 周 Micro CT 扫描动物模型患肢。**结果** Micro CT 动态观察结果显示, PRP + 成骨诱导组骨痂生成量明显多于、早于其余各组, 骨折 11 周时达到临床愈合标准, 而其他组别骨痂重塑期相对滞后, 比正常骨量大鼠愈合时间至少推迟了 37.5%。**结论** PRP 联合 hUC-MSCs 移植可促进大鼠骨质疏松性骨折愈合, 为临床治疗 OPF 提供数据支持。

关键词: 富血小板血浆; 脐带间充质干细胞; 成骨分化; 骨质疏松性骨折

Effect of platelet-rich plasma combined with human umbilical cord-mesenchymal stem cells on the healing of osteoporotic fracture in rats

CHU Jiaqi^{1,2}, SUN Jiecong^{1*}, LI Peng², LI Guangsheng¹, NIU Yanru¹, LIN Hao¹, CHEN Guanghua¹, WEI Bo¹, WEI Jinsong¹, ZENG Rong¹

1. Department of Orthopedic Surgery, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001

2. Stem Cell Research and Cellular Therapy Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001

Corresponding author: ZENG Rong, Email: zengrong5@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of PRP combined with hUC-MSCs transplantation on the healing of osteoporotic fracture in rats. **Methods** Fifty female SPF grade SD rats were randomly divided into 5 groups, 10 rats in each group: The sham operation group was only resected ovarian tissues; The placebo group was injected with saline; The non-induction group transplanted with uninduced hUC-MSCs; The PRP + induction group transplanted with hUC-MSCs combined with PRP. After the OPF model was successfully constructed, cells were transplanted 3 times in each group, 1 week, 3 weeks and 7 weeks after fracture. Micro-CT analysis was performed every two weeks after fracture. **Results** Micro-CT analysis results showed that the amount of callus formation in PRP + induction group was significantly increased than that in the other groups. Clinical healing criteria was achieved at 11 weeks post-fracture, while other groups callus remodeling phase is lagging behind. The bone healing time in rats was delayed for at least 37.5% compared with normal fracture animals. **Conclusion** PRP combined with hUC-MSCs transplantation promote osteoporotic fracture healing in rats.

Key words: Platelet-rich plasma; Human umbilical cord-mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Osteoporotic fracture

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2013020012866); 广东省医学科研基金项目 (B2014313); 湛江市科技计划项目 (2014A06005); 广东医学院科研基金项目 (Z2013005)

* 通讯作者: 曾荣, Email: zengrong5@163.com

* 共同第一作者

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是一种以全身低骨量和骨组织微结构改变、破坏为特征, 能导致骨折脆性增加, 骨折风险性增高的全身疾病。骨质疏松性骨折 (Osteoporosis fracture, OPF) 是 OP 最严重的并发症之一, 其发生、致死致残率较高, 且 OPF 多为粉

碎性,骨强度低,愈合慢,抗再骨折能力差,易发生内固定松动和再骨折。因此寻求一种更为之有效的治疗方法是众多临床及科研工作者的迫切目标。富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)中含有大量生长因子,可加快骨细胞活化,促进骨细胞增殖、血管再生,诱导骨再生,促进骨缺损修复^[1,2]。我们在前期的体外实验中已经证实,相对于单纯成骨诱导,PRP 辅助诱导的人脐带间充质干细胞(Human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)成骨效果更佳。

本实验拟建立 SD(Sprague Dawley)大鼠 OPF 模型并对其进行细胞移植,通过 Micro CT 动态观察探讨 PRP 及 hUC-MSCs 对动物模型骨折愈合的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 SPF(Specific pathogen Free)级 SD 大鼠 50 只,3 月龄,体重 250 ± 17 g(购自广东医学院实验动物中心)。

1.2 主要材料与试剂

人脐带间充质干细胞(P3 代)由广东省脐带血造血干细胞库提供,低糖 L-DMEM 培养基、胎牛血清(FBS, Gibco, 美国),成骨诱导培养基(广州赛业生物科技有限公司),7% 水合氯醛,常规手术器械,动物固定台架,注射器,法国 Osteospace MEDI LINK 双能 X 线骨密度检测仪,规格 1.0×250 mm 骨牵引针 20 支(张家港市保康医疗器械有限公司),克氏针截断器,骨科电钻,骨折模型打击支架^[3],SCANCO MEDICAL Micro CT (viva CT40),NIKON D90 数码相机。

1.3 PRP 制备及成骨诱导

知情同意情况下,无菌采取足月孕产妇脐带血 50 ml(预先加入 10% 枸橼酸钠抗凝剂),第 1 次 460 g 室温离心 8 min,超净台内吸取上层血浆及白膜层细胞,尽量去除红细胞;第 2 次 1100 g 室温离心 10 min,去除约 3/4 上清及底层少许红细胞,剩下中间层约 1 ml 即为 PRP, -20°C 冻存备用。

P5 代 hUC-MSCs 接种于 6 孔板,待细胞 80% 融合时加入成骨诱导培养基,每 3 天换液 1 次,培养至 21 天时进行茜素红染色鉴定。

1.4 制作大鼠 OPF 模型

SD 大鼠购回后适应性饲养 1 周,正常饮食,笼中饲养,自由活动。根据随机数字表,将 50 只 SD

大鼠随机分为假手术组 10 只,手术组 40 只,手术组又分为:安慰剂组、未诱导组、成骨诱导组、PRP + 成骨诱导组,每组 10 只。术前采用双能 X 线骨密度检测仪对大鼠股骨远端进行骨密度(Bone mineral density, BMD)检测。大鼠麻醉后,手术组切除双侧卵巢,假手术组切除相同体积的卵巢周围组织。术后将大鼠分笼饲养,允许其自由活动。各组大鼠手术后 3 个月再次以同样方法,同样参数测定骨密度。确定骨质疏松造模成功后,参照前人方法进行 OPF 造模^[4]。

1.5 细胞移植及动态观察 OPF 愈合

P5 代细胞成骨诱导 7 天后消化,生理盐水重悬,细胞浓度调整为 2×10^6 /ml,移植 0.5 ml 细胞于动物骨折部位。细胞移植共进行 3 次,时间点选为 OPF 模型建立后 1 周、3 周和 7 周。安慰剂组直接注射生理盐水,未诱导组给予未诱导的 hUC-MSCs,成骨诱导组移植诱导后的 hUC-MSCs,PRP + 成骨诱导组移植诱导后的 hUC-MSCs 联合 PRP(含 TGF- β 1 750 pg/ml)^[5]。

骨折后的第 1 周、3 周、5 周、7 周、11 周、13 周进行 Micro CT 扫描动物模型患肢。Micro CT 扫描参数设置如下:X 线能量 70 kVp,114 μA ,8W,扫描模式 BH:ALU,扫描分辨率 0.038 mm,曝光时间 200ms。以 HP 图像采集工作站及 μCT Tomography (V6.1-2)图像采集分析系统进行三维重建。计算骨体积分数(Bone volume/Total volume, BV/TV),以 SPSS 17.0 做单因素 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养及成骨诱导

倒置显微镜下观察 P5 代 hUC-MSCs,接种 12 小时后 80% 左右细胞均已贴壁生长,呈梭形。接种后第二天细胞约有 80% 融合。hUC-MSCs 经成骨诱导培养 21 d,茜素红染色可见间质内含大量矿盐沉积的钙化结节呈红色。

2.2 骨密度检测

采用 MEDI LINK 双能 X 线骨密度检测仪进行骨密度扫描后分析数据:假手术组术前术后样本均数及标准差分别为 0.222 ± 0.071 和 0.238 ± 0.068 , $P > 0.05$,差异无统计学意义;其它 4 个手术组术前术后骨密度均有不同程度降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示骨质疏松造模成功(表 1)。

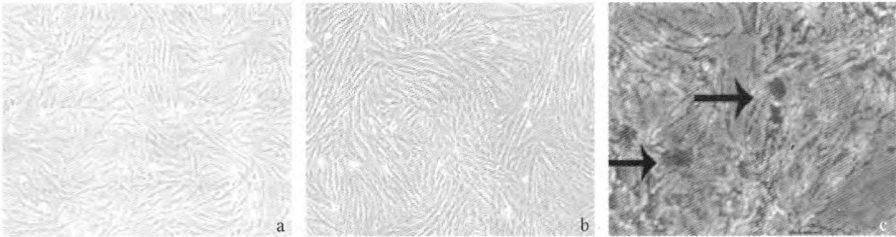


图 1 光镜下细胞生长及成骨诱导后茜素红染色鉴定(40×)。a,接种后 12 小时 80% 细胞贴壁; b,接种后 24 小时,细胞生长融合约 80% ;c,成骨诱导后 21 天茜素红染色,箭头所示为被染红的钙结节

Fig.1 The morphology of cell growth and alizarin red staining after osteogenic induction (40×). a, There were 80% adherent cells at 12 h post-inoculation;b,Cells were grown to confluence about 80% 24 h post-seeding;c, Alizarin red staining was performed after osteogenic induction for 21 d, calcium nodules were marked with red arrows

表 1 假手术组,手术组术前术后样本 BMD 均数比较(g/cm²)

Table 1 Comparison of BMD before and after operation in sham and operation group(g/cm²)

组别 (Group)	术前 (Befor operation)	术后 3 个月 (3 mon post-operation)
假手术组 Sham group	0. 222 ±0. 071	0. 238 ±0. 068 *
安慰剂组 Placebo group	0. 290 ±0. 045	0. 265 ±0. 053 **
未诱导组 Non-induction group	0. 242 ±0. 043	0. 220 ±0. 032 **
成骨诱导组 Osteogenic induction group	0. 224 ±0. 044	0. 204 ±0. 050 **
PRP + 成骨诱导组 PRP + osteogenic induction group	0. 232 ±0. 062	0. 199 ±0. 057 **

注: * 假手术组术前与术后 BMD 比较, $P > 0.05$; ** 手术组术前与术后 BMD 比较, $P < 0.01$ 。

* Comparison of BMD before and after operation in sham operation group, $P > 0.05$; ** Comparison of BMD before and after operation in operation group, $P < 0.01$.

2.3 OPF 造模

骨折术后行 Micro CT 观察 OPF 造模情况(图 2)。内固定过程中, 39 支克氏针正常通过大鼠股骨骨髓腔,X 线摄片骨折线清晰可见。另外 1 只动物克氏针于股骨中下 1/3 处穿出骨髓腔, 与股骨并行, 造模失败; 1 只动物进行骨折打击时击中股骨血管神经束, 造成大量出血, 动物死亡, 造模失败; 1 只动物术后第二天不明原因死亡, 造模失败。总体造模成功率达 92.5%。

2.4 Micro CT 动态观察 OPF 愈合

安慰剂组:在骨折后第 13 周骨痂仍未对骨折端形成有效包裹,与 PRP + 成骨诱导组第 7 周时的骨

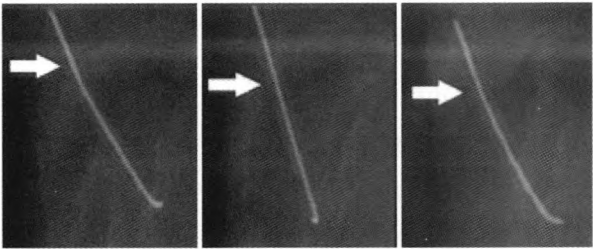


图 2 OPF 造模后 X 线摄片观察。箭头所指为骨折断端。

Fig.2 X-ray images of OPF model. The fracture area was marked with arrow

痂包裹量相仿(图 3);

未诱导组:骨折后第 11 周骨痂包裹与成骨诱导组无明显区别,优于安慰剂组,13 周时,骨痂量、包裹程度与成骨诱导组相仿(图 3);

成骨诱导组:第 3、7 周骨痂量与安慰剂组、未诱导组无明显区别,少于 PRP + 成骨诱导组,骨折后第 11 周骨痂尚未形成完全包裹,第 13 周时,骨折端虽被骨痂包裹,但愈合程度不及 PRP + 成骨诱导组(图 3);

PRP + 成骨诱导组:在骨折后第 3 周重建即可见在骨折部位附近有少量骨痂生长,第 7 周时骨痂在骨折端的包裹明显优于其他组,骨折线逐渐消失;第 11 周时,骨痂已明显包裹骨折部位,提示进入骨折塑形期。(图 3)。

2.5 Micro CT 动态监测骨体积分数

利用 GraphPad Prism 5.0,以扫描时间点为横坐标,BV/TV 值为纵坐标作图,可见 PRP + 成骨诱导组骨体积分数在各时间点明显高于其它三组(图 4)。利用 SPSS 17.0 进行统计分析,结果表明在各个时间点安慰剂组与未诱导组差异均无统计学意义

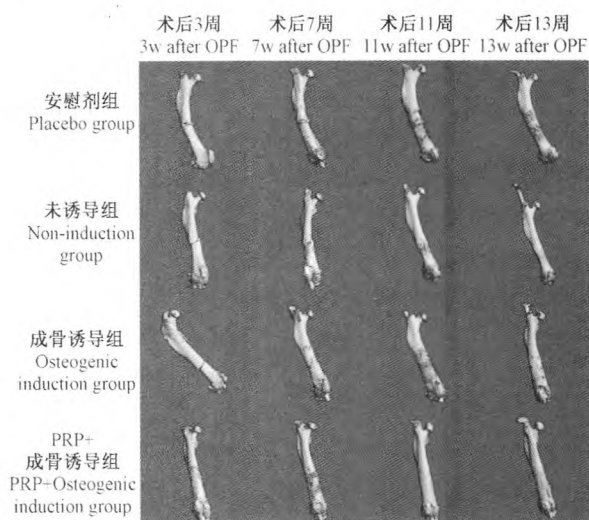


图 3 Micro CT 动态观察骨折愈合情况

Fig. 3 Fracture healing was monitored using Micro CT

($P > 0.05$), PRP + 成骨诱导组各个观察周期 BV/TV 值均高于其他各组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 成骨诱导组 3、7、11 周 BV/TV 值高于未诱导组与安慰剂组, 低于 PRP + 成骨诱导组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

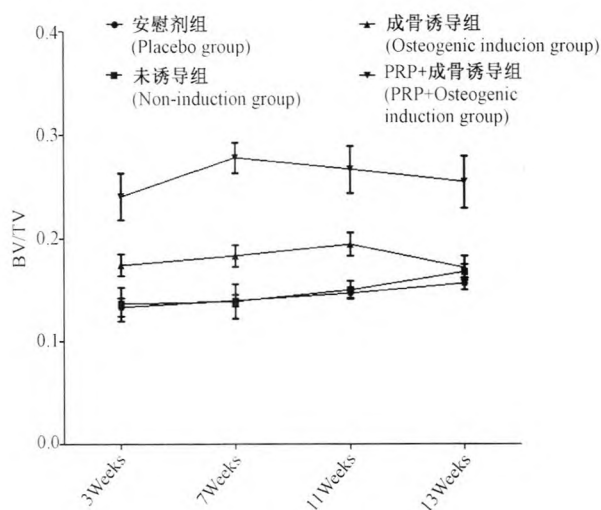


图 4 Micro CT 动态观察 BV/TV 值变化情况

Fig. 4 BV/TV value was analyzed using Micro CT

3 讨论

PRP 富含多种生长因子, 其中转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF- β) 是参与创伤、促进成骨的重要成分之一。TGF- β 可促进前成骨细胞趋化和有丝分裂, 增进胶原基质合成, 同时抑制破骨细胞生成和骨吸收, 从而对创伤愈合和骨组织再生起促进作用^[1, 2, 6]。在移植骨和骨松质内许多细

胞膜上存在着 TGF- β 等因子受体, 如成骨细胞和前成骨细胞, 当加入 PRP 后, 高质量分数的生长因子加快了这些细胞的活化。前人研究发现, TGF- β 1 含量为 750 pg/ml 的 PRP 对诱导干细胞增殖、分化作用显著, 因此本实验采用此浓度的 PRP 对细胞进行处理^[5]。

hUC-MSCs 在体外诱导条件下具有向成骨细胞定向分化的潜能, 相对其它成体干细胞, 来源更丰富, 临床取材方便, 分离纯度更高, 具有强大的增殖与自我更新能力, 免疫原性较低, 蕴藏着比骨髓间充质干细胞更加优越的临床应用价值^[7, 8], 目前已广泛应用于脊髓神经损伤、心肌梗死、软骨组织缺损等领域的临床应用与实验研究^[9, 10]。

OP 患者常伴随骨密度降低, 骨强度减弱, 骨折风险增加^[11]。OPF 的常发部位是腰椎、股骨颈等^[12]。目前已有众多药物投入到临床中用以 OPF 的治疗, 如雌激素类、双膦酸盐类、降钙素及钙制剂等, 虽有疗效, 但往往存在着较大副作用, 并且可能会影响骨组织矿化以及骨折愈合。通常情况下, OPF 比正常骨量的骨折更难愈合。正常中年大鼠的股骨骨折一般在第 8 周即可形成完全包裹的骨痂, 进入骨痂重塑期。本实验我们以 OPF 大鼠模型作为研究对象, 将 PRP 联合 hUC-MSCs 分三次移植骨折部位, 采用 Micro CT 动态观察愈合效果, 结果显示, PRP + 成骨诱导组在第 11 周开始即进入骨痂重塑期, 而其他组别骨痂重塑期更加滞后, 比正常骨量大鼠愈合时间至少推迟了 37.5%。

骨体积分数 (BV/TV) 是 Micro CT 扫描结果中的重要参数, 它反应了重建范围内骨量与整个骨组织的比值, 通过 BV/TV 能观察到不同时期骨量变化。正常骨折愈合过程主要分为 3 个阶段: 血肿机化期, 原始骨痂形成期, 骨痂改造期, 在这三个阶段中, BV/TV 值呈上升趋势。崔燎等在对小鼠骨折进行治疗过程中采用 Micro CT 监测到随时间增加 BV/TV 值升高^[13]。本实验中, 我们观察到各组大鼠的骨折部位在血肿机化期和原始骨痂形成期 BV/TV 呈上升趋势, 但在进入骨痂改造期后呈下降趋势。这可能与动物模型有关: 因 OP 会导致雌激素分泌不足, 破骨细胞活跃程度提高, 在骨痂重建期相对于骨形成, 骨吸收占优势, 致使 BV/TV 的下降超过正常水平。

综上所述, PRP 联合 hUC-MSCs 移植可促进 OPF 愈合, 但愈合的骨组织骨体积分数并未提高, 尚存在较大的再次骨折风险, 如何提高骨体积分数, 从

根本上治疗 OPF,还有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Iqbal J, Pepkowitz SH, Klapper E. Platelet-rich plasma for the replenishment of bone [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2011, 9(4): 258-63.
- [2] Parizi AM, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z, et al. Human platelet rich plasma plus Persian Gulf coral effects on experimental bone healing in rabbit model: radiological, histological, macroscopical and biomechanical evaluation [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(2): 473-83.
- [3] 周晓中, 董启榕, 张健. 大鼠股骨闭合骨折模型的制作 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2007, 26(1): 60-2.
Zhou Xiao-zhong, Dong Qi-rong, Zhang Jian. Establishment of a standard femur closed fracture rat model. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)*. 2007, 26(1): 60-62. (In Chinese)
- [4] Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone [J]. *J Orthop Res*, 1984, 2(1): 97-101.
- [5] Lo W-C, Chiou J-F, Gelovani JG, et al. Transplantation of embryonic fibroblasts treated with platelet-rich plasma induces osteogenesis in SAMP8 mice monitored by molecular imaging [J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(5): 765-73.
- [6] Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, et al. Effects of TGF- β and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model [J]. *Inflammation*, 2012, 35(1): 138-42.
- [7] Wang M, Yang Y, Yang D, et al. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood - derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Immunology*, 2009, 126(2): 220-32.
- [8] Secco M, Moreira YB, Zucconi E, et al. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood [J]. *Stem Cell Rev*, 2009, 5(4): 387-401.
- [9] Ali H, Bahbahani H. Umbilical cord blood stem cells-potential therapeutic tool for neural injuries and disorders [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2010, 70(3): 316-24.
- [10] Park D-H, Lee J-H, Borlongan CV, et al. Transplantation of umbilical cord blood stem cells for treating spinal cord injury [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(1): 181-94.
- [11] Melton Lr, Thamer M, Ray N, et al. Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation [J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(1): 16-23.
- [12] 黄公怡. 骨质疏松性骨折及其临床特点 [J]. *中华骨科杂志*, 2008, 28(1): 74-7.
Huang Gong-yi. Osteoporotic fracture and its clinical characteristics. *Chin J Orthop*. 2008, 28(1): 74-77. (In Chinese)
- [13] Cui L, Cheng H, Song C, et al. Time-dependent effects of sclerostin antibody on a mouse fracture healing model [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2013, 13(2): 178-84.

(收稿日期: 2015-08-06)

(上接第 282 页)

- [2] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, et al. Diabetes and bone loss at the hip in older black and white adults. *J Bone Miner Res*. 2005, 20(4): 596-603.
- [3] Hamann C, Kirschner S, Günther KP, et al. Bone, sweet bone—osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2012, 8(5): 297-305.
- [4] 陈艳芬, 王春怡, 李卫民, 等. 古方黄芪散降糖作用的实验研究, *广东药学院学报*, 2010, 26(1): 73-76.
Chen YF, Wang CY, Li WM. The experimental study on hypoglycemic effect of ancient prescription Huang qisan [J]. *Journal of Guang dong Pharmaceutical College*. 2010, 26(1): 73-76. (in chinese)
- [5] 王春怡, 陈艳芬, 李卫民, 等. 黄芪葛根汤对实验性糖尿病及胰岛素抵抗的影响, *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(16): 144-149.
Wang CY, Chen YF, Li WM. Effect of Huangqi Gegen Decoction on Experimental Diabetes Mellitus and Insulin Resistance. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2011, 17(16): 144-149. (in chinese)
- [6] 罗娇艳, 高英, 王春怡, 等. 黄芪散及黄芪葛根汤调脂作用研究, *中药新药与临床药理*, 2013, 24(3): 221-226.
Luo JY, Gao Y, Wang CY. Study on Lipid Regulation of Huangqi Powder and Huangqi Gegen Decoction. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2013, 24(3): 221-226. (in chinese)
- [7] 罗娇艳, 王芳, 张娟, 等. 黄芪散对糖脂代谢和骨生物力学指标影响的实验研究, *广东药学院学报*, 2014, 31(1): 75-78.
Luo JY, Wang F, Zhang J. Effect of Huangqi San on the glucolipid metabolism and skeletal biomechanical properties in T2DM rats. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*. 2014, 31(1): 75-78. (in chinese)
- [8] 崔燎, 吴铁. 骨质疏松药理学动物实验与图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
Cui L, Wu T. osteoporosis pharmacology animal experiment and atlas [M]. Beijing: Science Press, 2011.
- [9] 陈珏, 张豪, 杨国柱. 骨形态计量学目前应用专家共识, *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(9): 1031-1054.
Chen J, Zhang H, Yang GZ. Expert consensus about the current application of bone histomorphometry. *Chin J Osteoporos*. 2014, 20(9): 1031-1054. (in chinese)
- [10] Xu ME, Xiao SZ, Sun YH, et al. Effects of astragaloside IV on pathogenesis of metabolic syndrome in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2006, 27(2): 229-36.
- [11] Kong XH, Niu YB, Song XM. Astragaloside II induces osteogenic activities of osteoblasts through the bone morphogenetic protein-2/MAPK and Smad1/5/8 pathways. *Int J Mol Med*. 2012, 29(6): 1090-8.
- [12] Wong R, Rabie B. Effect of puerarin on bone formation. *Osteoarthritis arilage*. 2007, 15(8): 894-9.

(收稿日期: 2015-07-20)