

血小板裂解液在骨组织工程中的应用★

陈璐, 李琪佳, 宋会平

Platelet lysate's advances in bone tissue engineering

Chen Lu, Li Qi-jia, Song Hui-ping

Abstract

BACKGROUND: Platelet lysates to repair bone defects cannot only remove the residual cell structure, reduce immunogenicity, but also retain many growth factors to create the conditions for the allograft or xenograft.

OBJECTIVE: To review the studies that platelets can promote the growth of bone lysis as well as application methods in relevant research.

METHODS: PubMed (2004-01/2011-01) and CBM databases (2004-01/2011-01) were searched by using the keywords of "tissue engineering, bone defect, gene therapy, growth factor" in English and "platelet plasma, bone tissue engineering, platelet lysate, growth factor" in Chinese, respectively. Studies addressing platelet lysate to promote bone regeneration and repair were included, and repetitive studies were excluded.

RESULTS AND CONCLUSION: Totally 340 articles were retrieved, and only 23 articles met the inclusive criteria. Up to now, studies have demonstrated that platelet lysate can promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and osteoblasts. Platelet lysate combined with biological ceramic or autogenous bone can significantly promote the repair of bone defects. Rational use of platelet lysate in bone regeneration and repair is of great significance.

Chen L, Li QJ, Song HP. Effects of brain microvascular endothelial cells and astrocytes following treatment with baicalin on neural stem cell differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3793-3796.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 以血小板裂解液修复骨缺损不仅去除了残余细胞结构, 降低了免疫原性, 而且还保留了其中的多种生长因子, 可为异体或异种移植创造条件。

目的: 总结归纳有关对能促进骨生长的血小板裂解液相关研究及应用方式进行综述。

方法: 以 "tissue engineering, bone defect, gene therapy, growth factor" 为检索词, 检索 PubMed 数据库 (2004-01/2011-01), 以 "血小板血浆, 骨组织工程, 血小板裂解液, 生长因子" 为检索词, 检索 CBM 数据库 (2004-01/2011-01)。文献检索语种为英文和中文。纳入血小板裂解液促进骨的再生和修复的文献, 排除重复文献。

结果与结论: 计算机初检得到 340 篇文献, 根据纳入排除标准, 对其中 23 篇文献进行分析。目前研究证实, 血小板裂解液可促进骨髓基质干细胞和成骨细胞的增殖; 与生物陶瓷或自体骨复合, 可明显促进骨缺损的修复。合理应用血小板裂解液对骨的再生和修复具有重要意义。

关键词: 血小板裂解液; 成骨细胞; 骨缺损; 细胞生长因子; 骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.041

缩略语: PL: platelet lysate, 血小板裂解液; PDGF: platelet derived growth factor, 血小板衍生生长因子; IGF: insulin-like growth factor, 胰岛素样生长因子; VEGF: vascular endothelial growth factor, 血管内皮细胞生长因子; EGF: epidermal growth factor, 表皮生长因子

陈璐, 李琪佳, 宋会平. 血小板裂解液在骨组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3793-3796.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Central Laboratory of
Hebei Union Hospital,
Tangshan 063000,
Hebei Province,
China

Chen Lu★, Studying
for master's degree,
Central Laboratory of
Hebei Union Hospital,
Tangshan 063000,
Hebei Province,
China
chenlu2009430@
163.com

Corresponding
author: Li Qi-jia,
Master, Professor,
Central Laboratory of
Hebei Union Hospital,
Tangshan 063000,
Hebei Province,
China
liqijia@163.com

Received: 2011-03-13
Accepted: 2012-04-10

河北联合大学中
心实验室, 河北省
唐山市 063000

陈璐★, 女, 1984
年生, 河北省唐山
市人, 汉族, 河北
联合大学在读硕
士。
chenlu2009430
@163.com

通讯作者: 李琪
佳, 硕士, 教授,
河北联合大学中
心实验室, 河北省
唐山市 063000
liqijia@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2012)20-03793-04

收稿日期: 2011-03-13
修回日期: 2012-04-10
(20110313003/
WLM·W)

0 引言

血小板裂解液(platelet lysate, PL)是全血经过密度梯度离心获得浓缩血小板, 再经过 3 次反复冻融, 血小板裂解而获得的液体成分^[1]。其特点是去除了血小板膜和其他细胞残片, 降低了免疫原性, 并且还保留了其中的多种细胞生长因子, 为异体或异种移植创造了条件^[2-3]。近年来, 人们将其应用于骨组织工程的研究中。在多数研究中, PL 明显地促进了骨的再生和修复。PL 与自体骨、异种骨或羟基磷灰石复合,

并与自体骨髓基质干细胞结合而形成的可注射组织工程骨, 能加快成骨牵引的成骨速度^[4]。现对能促进骨的再生和修复的 PL 应用与作用机制制作一综述。

1 资料和方法

1.1 资料检索

检索人相关内容: 第一作者。

检索时间范围: 2004-01/2011-01。

检索词: 中文检索词: “血小板血浆, 骨组织工程, 血小板裂解液, 生长因子”。英文检

索词: “tissue engineering, bone defect, gene therapy, growth factor”。

检索数据库: PubMed 数据库, 网址 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>); CBM 数据库, 网址: (<http://sinomed.imicams.ac.cn/index.jsp>)。

1.2 资料的纳入与排除标准

纳入标准: ① PL 对骨缺损的修复作用的研究。②骨形成及骨发生相关因子的研究。

排除标准: 重复及年代较陈旧的文獻。

1.3 对纳入文献的评价 计算机检索得到 340 篇文献, 中文 28 篇, 英文 312 篇, 阅读标题与摘要进行筛选, 排除与此文无关的文獻。对于同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。文献的类型主要包括实验研究、临床研究及综述文献。

2 结果

2.1 纳入文献基本情况 共纳入 23 篇文献, 其中文献 [1-4] 涉及 PL 对骨缺损修复的研究现状, 文献 [5-23] 涉及 PL 对骨缺损修复中的作用及研究现状、趋势等。

2.2 文献证据综合提炼

2.2.1 PL 的制备 PL 的制备方法各文献所述不尽相同, 但基本原理是一致的, 即利用全血中血液成分的沉降系数不同梯度离心, 得到沉降系数最大的红细胞和最上层的上清液的交界处有一白色薄层, 肉眼不易识别, 即为富含血小板层。后提取上清液及交界处以下的一小部分红细胞, 增大离心力再次离心, 即得含有高浓度血小板的沉淀。取得血小板沉淀, 用 PBS 重悬。将获取的血小板混悬液连续反复冻融 ($-80^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$) 5 次, 每次间隔约 10 min, 再用低温高速离心, 去除血小板膜和其他细胞残片后, 取上清液, 即获得了 PL^[1]。血小板提取 10 min 后, 开始分泌生长因子, 在 1 h 内分泌出预先合成的 95%。因此, 在制备 PL 过程中血液必须是在抗凝状态。在开始阶段大量释放出生长因子后, 血小板裂解物会继续合成和分泌生长因子, 直至其 7 d 的生命周期终结。因此, PL 必须在使用前新鲜配制。

2.2.2 PL 在骨组织工程中的作用 近年来, 国内外的学者们对 PL 在骨组织工程中的作用进行了大量的体外实验。Xia 等^[5]将加入体积分数 10% 胎牛血清和体积分数 7.5% PL 的培养基与人骨髓基质干细胞培养, 通过细胞形态学, 细胞表型和增殖结果显示, PL 和胎牛血清对人骨髓基质干细胞作用相似, 保持了骨髓基质干细胞生长能力和表型, 并且促进人骨髓基质干细胞增殖。在骨组织工程中, 有望代替胎牛血清在细胞培养中的作用。Lange 等^[6]发现在 LP02 培养基中加入体积分数 5% PL 作为无血清培养基, 可以促进人骨髓基质成纤维细胞集落形成单位和细胞数量的增加。因此, PL 表现

出促丝裂原作用。血小板裂解物培养的骨髓基质干细胞具有典型的成纤维细胞形态, 具备体外成骨、成脂分化等不同分化能力。宋会平等^[7]将不同浓度 PL 作为条件培养基加入大鼠骨髓基质干细胞。在随后的 9 周培养期间, 条件培养基组活细胞数明显高于基础培养基组, 培养 1 周后条件培养基组总蛋白含量显著高于基础培养基组。另外, 骨髓间充质干细胞在不同浓度 PL 培养条件下, 细胞形态基本一致, 多为长梭形, 类似于成纤维细胞。宋会平等^[8]观察 PL 对大鼠骨髓基质干细胞成骨诱导分化的干预效应, 将骨髓基质干细胞进行成骨诱导, 再加入不同浓度的 PL 进行培养。结果显示, 各组骨髓基质干细胞形态逐渐发生改变, 出现类成骨细胞样形态特征。并且, 高浓度 PL 促进细胞生长, 但高浓度 PL 抑制细胞分化。Soffer 等^[9]也发现 PL 短期应用可显著促进体外成骨细胞的增殖和趋化效应, 提高骨细胞黏附和迁移功能, 但长期应用可抑制碱性磷酸酶活性和基质矿化形成, 对成骨细胞的分化产生一定程度的负效应。综上所述, PL 可明显促进骨髓基质干细胞和成骨细胞的增殖。

为了进一步评价 PL 在骨组织工程中的作用, 有人进行了骨再生和缺损修复的动物实验研究。宋会平等^[10]将制备的同种异体 PL、同种异体脱钙骨颗粒与 I 型胶原凝胶复合, 移植到大鼠双侧股骨髁缺损, 分 A、B、C 3 组, 分别植入等量 PL/脱钙骨颗粒/I 型胶原凝胶、脱钙骨颗粒/I 型胶原凝胶和 I 型胶原凝胶。4 周后经放射学、组织学、组织形态计量学、生物力学和免疫学检测, 评价骨缺损的重建效果。X 射线显示 A 组修复区阻射影密度接近正常骨质, 骨密度计量分析显示 A 组显著高于 B 和 C 组, 组织学观察后发现 A 组成骨活动和移植骨片破骨细胞性骨吸收均较 B 和 C 组活跃; 形态计量分析显示 A 组单个视野的成骨面积显著大于 B 和 C 组, 抗压生物力学测试, 破断载荷和能量 A 组均显著高于 B 和 C 组, 三色流式细胞术分析显示, T 细胞亚群 $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 、 $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD4}^-$ 和 $\text{CIM}/\text{CD8}$ 在各组间差异有显著性意义。Dozza 等^[11]将骨髓基质干细胞和制备的 PL、纤维凝胶和 I 型胶原凝胶复合构建重组材料后, 分 A、B、C 3 组, 制成绵羊双髁关节缺损, A、B 组为实验组, 分别植入等量骨髓基质干细胞、PL、纤维凝胶和骨髓基质干细胞、PL、I 型胶原凝胶与假体髁关节附和。C 组为空白组, 只植入假体髁关节, 4 个月, 组织学观察发现 A、B 组成骨面积明显高于 C 组。Salvade 等^[12]发现 PL 与自体骨髓基质干细胞、羟基磷灰石复合形成的可注射组织工程骨, 能加快成骨牵引的成骨速度。Prins 等^[13]将人骨髓基质干细胞和人 PL、胎牛血清与磷酸钙支架复合, 植入裸鼠皮下组织, 6 周后通过组织形态学表明, PL 与胎牛血清比较能明显促进骨髓基质干细胞增殖, 在细胞表面抗原与成骨分化、软骨分化、

脂肪分化能力上与胎牛血清组无区别。上述的研究表明, PL 与羟基磷灰石、磷酸钙复合, 可明显促进骨缺损的修复。Centeno 等^[14]在 2005/2009 将 227 例骨缺损患者分 2 组, 一组注入 PL 与自体骨髓基质干细胞混合物, 另一组不植入任何材料作对照。通过对比 3, 6 个月的 X 射线、MRI 和临床检查, 评价 PL 骨修复效果。结果显示, PL 明显促进骨损伤部位的骨质再生, 无不良反应产生。

2.2.3 PL 的作用机制 血小板除了具有促凝血作用外, 还具有促进组织创伤修复的功能。PL 在去除血小板表面抗原的基础上保留了很多重要的细胞生长因子。细胞生长因子能促进各种细胞的分裂和增殖、增加胶原合成、激发血管长入和诱导细胞分化, 这些作用对骨的修复与再生至关重要^[15]。当 PL 被凝血酶激活后, 形成凝胶, 其中的血小板释放出细胞生长因子。PL 主要含的细胞生长因子有血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等^[16]。宋会平等^[8]对 PL 中相关生长因子的水平进行测定, 参照 Soffer 等^[1]提取 PL 的方法, PDGF、TGF- β 1、IGF-1 和 VEGF 质量浓度分别为(300 $\pm$ 30)、(140 $\pm$ 25)、(80 $\pm$ 35)和(70 $\pm$ 20) ng/L。

PDGF: PDGF 是 PL 液中含有量最高的生长因子, 是一种耐热、耐酸、易被胰蛋白酶水解的阳离子多肽, 相对分子质量约为 30 000。它最初是在血小板的 α 颗粒中发现命名的, 亦可由巨噬细胞和内皮细胞等分泌, 它是最早出现在骨折部位和创伤修复的生长因子之一, 对所有起源间叶的细胞包括成骨细胞、成纤维细胞、骨髓基质干细胞等具有丝裂原作用, 作为促进有丝分裂和生物趋化因子, 促进组织修复, 包括可在创伤骨组织中高效表达, 使成骨细胞趋化、增殖, 并且增加胶原蛋白合成能力, 促进破骨细胞的吸收作用, 从而促进骨形成^[9, 17]。

TGF- β : TGF- β 属于调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族, 家族包括 30 种以上的相关蛋白, 机体内几乎每个细胞都产生 TGF- β , 以旁分泌和自分泌的形式作用于骨髓基质干细胞、成骨细胞和成纤维细胞表面的 TGF- β 受体, 有化学趋化和促进前成骨细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞有丝分裂的作用, 刺激成骨细胞和前成骨细胞的增殖及胶原纤维的合成和蛋白质表达, 作为趋化因子将原始骨祖细胞吸收到损伤处骨组织^[18-19]。

IGF: IGF 是单链多肽, 是一种具有多种生物学活性的骨生长调节因子, 与骨骼中的受体结合后发生受体自身磷酸化激活酪氨酸蛋白酶, 使胰岛素受体底物磷酸化, 从而调节细胞的生长、增殖和代谢, 它能刺激成骨

细胞和前成骨细胞, 促进软骨和骨基质形成。另外, 通过介导作用, 调节成骨细胞和破骨细胞的分化及功能活性^[20]。

VEGF: VEGF 是一种肝素合成蛋白, 由二硫键连接亚基构成的二聚体, 通过自分泌或旁分泌与血管内皮细胞表面受体结合, 促进血管内皮细胞增殖, 诱导新生血管形成。新生血管的生成, 对骨折端提供营养物质, 为局部骨再生及代谢提供有利的环境。其次, 在血管内皮细胞生长因子的作用下, 成骨细胞分化碱性磷酸酶活性增强, 促进骨折愈合^[21]。

在制备 PL 时, 经梯度离心获得的富含血小板血浆中含有纤维蛋白、纤维结合蛋白和玻璃粘连蛋白等蛋白质, 具有细胞黏着和骨引导功能。凝固后形成的纤维网络对促进细胞黏附、防止细胞流失也有一定作用^[22]。生长因子分泌后立即黏附靶细胞膜表面, 激活细胞膜受体。各类细胞如: 间质干细胞、成纤维细胞、成骨细胞、内皮细胞的细胞膜中均有这类受体。这些膜受体再诱导内在的信号蛋白, 形成信号传导, 激活细胞正常的基因序列表达, 如细胞增殖、类骨质产生、基质形成等。因此, 细胞生长因子不进入靶细胞内, 而是通过信号蛋白作用, 不会使靶细胞的遗传性改变, 使正常愈合过程加快, 因此不会引发其他异常改变和肿瘤^[23]。

3 讨论

新近研究的 PL 是血小板衍生物, 抗原物质少, 承载大量生长因子, 制备容易, 具有高效丝裂原效应, 可能成为用于骨组织工程中生长因子的重要来源。在促进骨生长方面就显得更为重要, 并有着广阔的应用前景。但作为新生事物, PL 对骨再生和骨愈合生物学作用的研究才刚刚起步, PL 的作用模式显示出高度的复杂性和多样性。PL 这种多因子效应模式不等同于单个因子效应的简单叠加, 其作用机制还有待进一步深入探索。

4 参考文献

- [1] Soffer E, Ouhayoun JP, Dosquet C, et al. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. Clin Oral Implants Res. 2004;15(5):581-588.
- [2] Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. Biomaterials. 2010;31(2):270-278.
- [3] Lucchini G, Intra M, Dander E. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus- disease in a pediatric population. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;94(12):1649-1660.
- [4] Zaky SH, Ottonello A, Strada P. Platelet lysate favours in vitro expansion of human bone marrow stromal cells for bone and cartilage engineering. Tissue Eng Regen Med. 2008;2(8):472-481.
- [5] Xia W, Li H, Wang Z. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2011;35(6):639-643.

- [6] Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, et al. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;3(1):18-26.
- [7] 宋会平, 王志强, 赵亚平, 等. 血小板裂解液对骨髓间充质干细胞生长的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(21):4031-4034.
- [8] 宋会平, 王志强, 赵亚平, 等. 血小板裂解液对大鼠BMSCs成骨诱导分化的干预效应[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008;22(6):737-741.
- [9] Soffer E, Ouhayoun JP, Dosquet C, et al. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(5):581-588.
- [10] 宋会平, 王志强, 李琪佳, 等. 组织工程学血小板裂解液促进骨重建实验研究[J]. 中华医学杂志, 2009, 43(89):3083-3086.
- [11] Dozza B, Di Bella C, Lucarelli E. Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration. *J Orthop Res.* 2011;29(6):961-968.
- [12] Salvade A, Della Mina P, Gaddi D, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. *Tissue Engineering - Part C: Methods.* 2010;16(2):201-214.
- [13] Prins HJ, Rozemuller H, Vonk-Griffioen S. Bone-forming capacity of mesenchymal stromal cells when cultured in the presence of human platelet lysate as substitute for fetal bovine serum. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(12):3741-3751.
- [14] Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M. Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5(1):81-93.
- [15] Ranzato E, Boccafroschi F, Mazzucco L. Role of ERK1/2 in platelet lysate-driven endothelial cell repair. *J Cell Biochem.* 2010;110(3):783-793.
- [16] Burnouf PA, Juan PK, Su CY. A novel virally inactivated human platelet lysate preparation rich in TGF-beta, EGF and IGF, and depleted of PDGF and VEGF. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010; 56(4):151-160.
- [17] Horner A, Kemp P, Summers C, et al. Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone.* 1998;23(2):95-102.
- [18] Carlson ER. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein. *Alpha Omegan.* 2000;93(3):26-30.
- [19] 夏长所, 洪光祥, 张广龙, 等. 肌腱愈合过程中转化生长因子 β 1基因表达的变化[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(9):296-299.
- [20] 卢向东, 刘强. 珊瑚羟基磷灰石结合重组人胰岛素样生长因子-I修复兔骨缺损的实验研究[J]. 山西医科大学学报, 2004, 35(3):278-230.
- [21] 陈明, 夏仁云. 血管内皮生长因子与骨折愈合[J]. 实用骨科杂志, 2003, 9(1):31.
- [22] Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant.* 2011;20(6):797-811.
- [23] Ranzato E, Mazzucco L, Patrone M, et al. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2030-2038.

作者贡献: 第一作者构思并设计本综述, 所有作者参与分析并解析数据, 第一作者起草, 通讯作者审校, 第一作者对本文负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

此问题的已知信息: 骨组织工程是模拟体内生理性骨再生的过程, 按照传统观点, 血液和骨组织的形成过程是截然不同、毫无关联的两个发生过程。但越来越多强有力的证据表明两者是互相交织在一起的。血液中不同成分, 尤其是血小板成分, 在骨再生修复过程中发挥重要作用。

本综述增加的新信息: 血小板被凝血机制激活后, 可释放多种生长因子, 调控包括成骨细胞和破骨细胞等各种细胞的增殖分化, 高效调节修复初期的骨再生。

临床应用的意义: 分析血小板裂解液促进骨损伤生长增殖效果, 为临床治疗骨损伤与修复提供实验依据。

外国专家修饰的医学英语句型: “嵴减少或消失呈空泡状, 粗面内质网池样扩张, 高尔基体扁平囊扩张”

中文	修饰前的英文	修饰后的英文
嵴减少或消失呈空泡状, 粗面内质网池样扩张, 高尔基体扁平囊扩张。	Ridges of mitochondria decreased or even disappeared. Cisternae of both rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes were dilated.	Mitochondrial cristae were few or even absent from some cells. Dilated cisternae were observed in both the rough endoplasmic reticulum and Golgi complex.
Glees-Marsland 镀银染色胼胝体区及大脑灰白质交界区轴突肿胀较前减轻, 较少见轴突球, 神经元胞体肿大。	Glees-Marsland silver stained sections showed that the swelling of axons, in the corpus callosum and the corticomedullary junction was lighter than that in 6-hour post injury group, and less axonal retraction balls were visible.	Glees-Marsland silver staining in the corpus callosum and at the corticomedullary junction revealed that axonal swelling was less severe, and axonal retraction balls were less numerous, than in tissue from the 6-hour post injury group.