

# 海螵蛸富血小板血浆液复合物修复兔软骨损伤的可行性

毕衡, 王清, 刘涛, 杨立丁, 姚晓, 普宏润, 叶国裕, 向俊宜(云南中医学院第一附属医院骨伤科, 云南省昆明市 650021)

## 文章亮点:

- 1 研究已证实富血小板血浆可以促进软骨细胞的增殖和软骨基质的合成, 刺激软骨形成, 但其容易流动, 不能固定于特定损伤区域。
- 2 海螵蛸经过一定的理化技术制备后具有良好的组织相容性, 轻微挤压就可以粉碎成颗粒装粉末, 其主要成分为碳酸钙; 在与富血小板血浆结合后形成一种相对固定的复合物, 同时钙离子可以诱导富血小板血浆液并激活, 使之产生生长因子。
- 3 实验以海螵蛸支架复合富血小板血浆修复软骨损伤, 结果显示海螵蛸为软骨下基质中软骨细胞的注入提供了空间, 而富血小板激活后产生的生长因子又为软骨细胞生长提供了刺激作用。

## 关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 海螵蛸; 富血小板血浆液; 骨软骨; 生物支架; 云南省自然科学基金

## 主题词:

富血小板血浆; 软骨; 支架(骨科)

## 基金资助:

云南省自然科学基金立项课题(自筹)(2011FZ265)

## 摘要

**背景:** 富血小板血浆是自体血小板的浓集物, 富含大量生长因子, 可以促进组织中细胞和基质的再生, 促进组织修复, 但其容易流动, 不能有效固定于损伤部位。

**目的:** 以海螵蛸生物支架固定富血小板血浆, 观察海螵蛸富血小板血浆复合物修复兔软骨损伤的效果。

**方法:** 将 21 只大白兔随机均分为 3 组, 在兔右膝关节负重髌骨面制作类似 Hulth 骨软骨损伤模型, 实验组于骨损伤处植入海螵蛸支架-自体富血小板血浆复合物, 对照组于骨缺损处植入明胶海绵-富血小板血浆复合物, 空白对照组不植入任何材料。术后 12 周取材, 进行大体观察与组织学观察。

**结果与结论:** 术后 12 周, 实验组软骨缺损区域明显缩小, 组织学观察缺损区域出现类软骨细胞, 排列整齐, 成柱状分布, 非常接近正常软骨组织; 对照组软骨缺损区域有轻度缩小, 组织学观察骨基质表面可见类软骨细胞基质组织, 但排列较为紊乱; 空白对照组软骨缺损区域有轻度缩小, 组织学观察到只有骨细胞及骨基质, 血管组织存在, 未见到软骨及类软骨组织。实验组缺损直径及深度均低于其他两组( $P < 0.05$ )。结果表明海螵蛸支架-富血小板血浆复合物可促进软骨缺损愈合。

毕衡, 王清, 刘涛, 杨立丁, 姚晓, 普宏润, 叶国裕, 向俊宜. 海螵蛸富血小板血浆液复合物修复兔软骨损伤的可行性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3):352-357.

## Feasibility of cuttlebone/platelet-rich plasma compound in the repair of rabbit's cartilage injuries

Bi Heng, Wang Qing, Liu Tao, Yang Li-ding, Yao Xiao, Pu Hong-run, Ye Guo-yu, Xiang Jun-yi (Department of Orthopedics and Traumatology, First Affiliated Hospital of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, Yunnan Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Platelet-rich plasma is a kind of autologous platelet concentrate that includes a large number of growth factors, and it can promote the regeneration of the tissue cells and matrix, and stimulate tissue repair, whereas it is easy to flow, and thus cannot be effectively fixed in the injured site.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of cuttlebone/platelet-rich plasma compound to repair the rabbit cartilage.

**METHODS:** Twenty-one big-ear white rabbits were randomly divided into three groups. A model of osteochondral injury was made in the cartilage of the weight-bearing condyle of the rabbit right knee in the three groups, and respectively treated with implantation of cuttlebone/platelet-rich plasma compound in the experimental group, implantation of gelatin sponge/platelet-rich plasma compound in the control group, and nothing in the blank control group. The specimens were examined at 12 weeks postoperatively for gross observation and histological observation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 12 weeks after surgery, in the experimental group, the cartilage defect region was reduced significantly, chondrocyte-like cells appeared and arranged in alignment, showing a columnar distribution that is very close to the normal cartilage; in the control group, the cartilage defect region was narrowed a little, cartilage matrix-like tissues were visible but irregular; the blank control group, the cartilage

毕衡, 男, 1968 年生, 云南省昆明市人, 汉族, 1990 年云南中医学院毕业, 主任医师, 主要从事中医、中西医结合骨伤科学、微创骨科学、运动医学及关节外科研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2015.03.005

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)03-00352-06

稿件接受: 2015-01-04

defect region was narrowed slightly, and only bone cells, bone matrix and blood vessels were seen with no presence of cartilage or cartilage-like tissues. The defect diameter and depth in the experimental group were lower than those in the other two groups at 12 weeks after surgery ( $P < 0.05$ ). These findings suggest that the cuttlebone/platelet-rich plasma compound can promote the healing of cartilage defects.

**Subject headings:** Platelet-Rich Plasma; Cartilage; Braces

**Funding:** the Natural Science Foundation of Yunnan Province (Self-financing), No. 2011FZ265

Bi H, Wang Q, Liu T, Yang LD, Yao X, Pu HR, Ye GY, Xiang JY. Feasibility of cuttlebone/platelet-rich plasma compound in the repair of rabbit's cartilage injuries. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(3):352-357.

## 0 引言 Introduction

关节软骨属于透明软骨, 自身没有血供, 无淋巴引流与神经分布。软骨细胞是高度分化的组织细胞, 成熟关节软骨中软骨细胞的分裂能力非常有限, 因此软骨损伤后修复能力差<sup>[1]</sup>。随着社会的现代化进程和人口的老齡化, 由外伤和退变引起的关节软骨损伤患者显著增多, 因此寻找解决关节软骨修复的新方法及途径日益显得重要。

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是自体血小板的浓集物, 富含大量生长因子, 可在不同方面对组织中细胞和基质的再生起到促进作用, 从而加速组织修复。富血小板血浆在外科临床及实验研究中应用非常广泛, 一方面富血小板血浆容易从自体中获得, 又有对组织的修复作用; 另一方面, 人们对富血小板的治疗作用机制认识仍然不多。

从1990年开始, 富血小板血浆所含成分逐渐被认识, 其中起主要作用的生长因子目前已发现有30余种, 如血小板源性生长因子、转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子和表皮生长因子等, 其逐渐成为组织工程领域尤其是骨科创伤组织缺损修复方面的研究热点, 目前已在临床广泛应用, 如脊柱融合, 椎间盘退变修复, 关节内骨折愈合, 髌腱、肩袖及交叉韧带的腱性及腱骨愈合, 骨缺损与软骨损伤及术后功能恢复等方面并取得了较好疗效<sup>[2-12]</sup>。但由于缺乏标准的研究方案、血小板分离技术及疗效评估方法, 使得目前的相关报道不断出现争议。因此, 临床医生将富血小板血浆及自体血液浓缩物应用于临床去治疗骨及软组织损伤疾病应该暂缓<sup>[13-14]</sup>, 这需要更多的基础实验去检验富血小板血浆的作用及规范其操作程序。

富血小板血浆容易流动, 不能有效固定于损伤部位。异体骨具有自体骨一些优越的组织特点, 但其存在免疫排斥反应, 并有感染HIV和病毒性肝炎等疾病的可能, 而且制样、处理和存贮的成本很高, 其应用受到很大限制<sup>[15-16]</sup>。因此, 寻找一种有效的支架系统使富血小板相对固定于损伤部位, 对观察其治疗作用将更有说服力。

对于支架多选择具有良好生物相容性的生物材料, 可以保证种子细胞很好地附着在其表面, 并促进细胞增殖和活性的稳定, 既可以为种子细胞生长提供三维空间, 也可以为其提供细胞外基质样结构。之前已经有人用过海藻酸、去端肽胶原、聚乙醇酸-乳酸共聚物、胎盘I型胶原蛋白海绵、珊瑚、羟基磷灰石、同种异体骨、异种骨等支架材料

作为载体, 复合软骨细胞或骨髓间充质干细胞修复关节软骨缺损, 并取得了一定的研究成果<sup>[17-18]</sup>, 但仍然存在植入细胞不稳定而溢出受损区域的问题。

本实验通过建立兔软骨损伤模型, 用海螵蛸支架复合富血小板血浆液对软骨损伤模型进行实验观察, 观察其对软骨损伤的治疗作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2013年10至12月在昆明医科大学动物实验中心完成。

**材料:**

**新鲜海螵蛸:** 市售乌贼, 由本院药学部提供。

**实验动物:** 3月龄雄性大耳白兔21只, 体质量2.1-2.5 kg, 由昆明医科大学动物室提供, 许可合格证号:scxk(111)2008-24。随机均分为实验组、对照组与空白对照组3组, 实验组造模后植入自体富血小板血浆与海螵蛸支架复合物; 对照组造模后植入自体富血小板血浆与明胶海绵复合物; 空白对照组造模后不做任何处理。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

**实验方法:**

**富血小板血浆的制备:** 使用咪达唑仑液0.5 mg/kg耳缘静脉缓注实验组与对照组动物, 待动物麻醉起效后固定于手术台。使用20 mL无菌注射器采集兔心脏血18 mL, 将血液分别放入4个预装有3.2%枸橼酸钠5 mL(抗凝剂与血比例为1:9)的离心管中, 每管4 mL, 其余2 mL作为全血对照。室温静置10 min, 将每管对称放置于离心机, 血液采用Aghaloo离心法<sup>[19]</sup>, 具体方法: 第1次离心215 $\times$ g 10 min, 取离心后白膜层以上及以下3 mm血浆, 置于另一离心管, 进行第2次离心, 再以863 $\times$ g 10 min, 收集上清即贫血小板血浆, 吸取约3/4上清液弃掉, 剩余约0.5 mL即为富血小板血浆(图1)。

**海螵蛸支架的制备**<sup>[20-21]</sup>: 取新鲜海螵蛸, 去除背、腹侧壳部, 自然晾干。切割成1.5 cm $\times$ 1.5 cm $\times$ 2 cm小海螵蛸块10块。用5%NaOH溶液浸泡24 h进行脱脂处理, 用无菌水反复冲洗, 室温下自然晾干; 再用体积分数75%乙醇浸泡48 h, 无水乙醇浸泡48 h, 自然晾干; 用体积分数3% $H_2O_2$ 浸泡24 h进行脱蛋白处理, 用无菌水反复冲洗, 室温下自然晾干。将骨块装袋用等离子反应消毒备用。

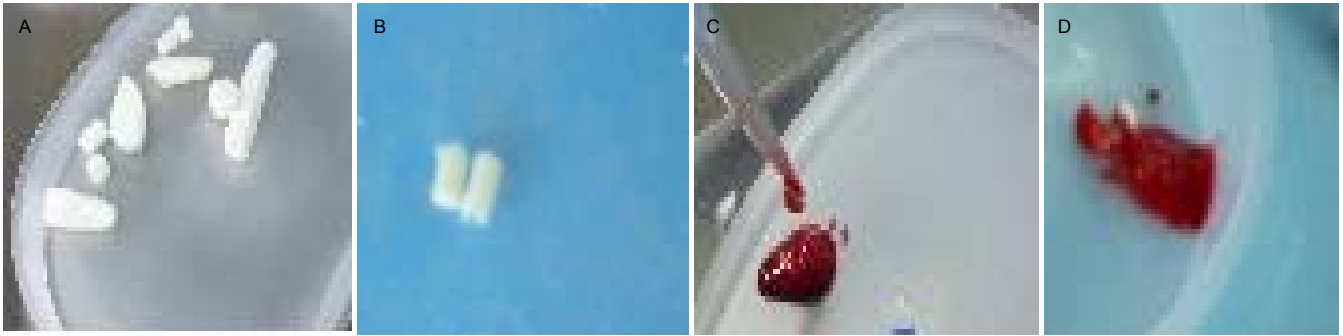


图2 海螵蛸-富血小板血浆复合物的制作

Figure 2 Preparation of cuttlebone/platelet-rich plasma compound

图注: 将海螵蛸块制作成直径 5 mm、高 6 mm 的圆柱体(图 A, B), 将富血小板血浆用移液器移入海螵蛸圆柱体上浸泡并适当搅拌 2 h(图 C, D), 整个操作在无菌手术室内完成。

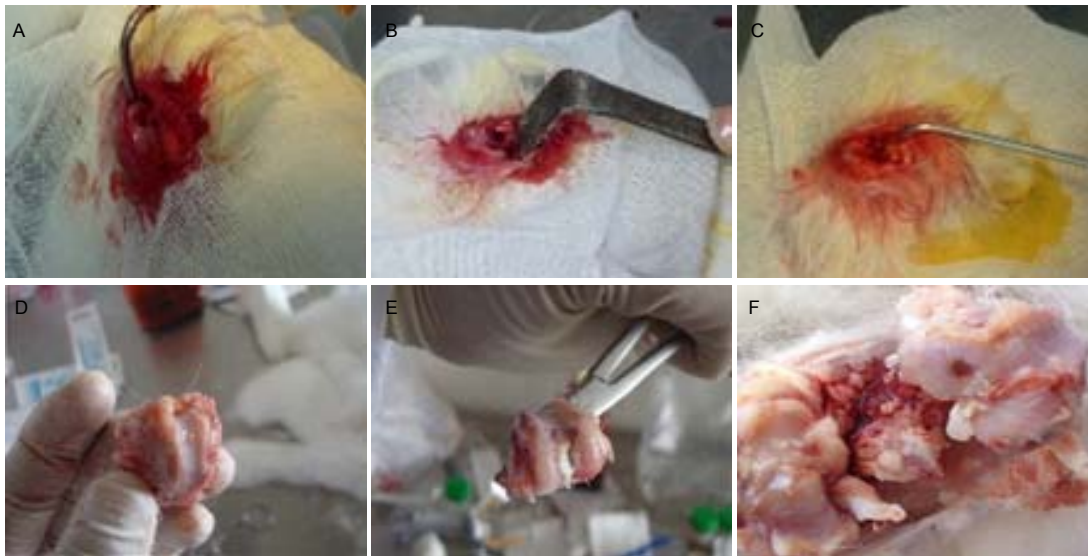


图3 各组术后 12 周右侧股骨髁及整个关节面大体标本观察

Figure 3 Gross observation of the right femoral condyle and the whole articular surface at 12 weeks after surgery

图注: 图中 A、D 分别为实验组软骨缺损造模与术后 12 周大体观察, 术后 12 周软骨缺损区域明显缩小, 已明显修复, 与周围软骨面没有明显分界, 修复组织和周围软骨组织相似, 中心区域有很小的区域和周围软骨组织不同; B、E 分别为对照组软骨缺损造模与术后 12 周大体观察, 术后 12 周软骨缺损区域轻度缩小, 可明显观察到造模痕迹, 但范围减小, 软骨造模表面有滑膜附着, 清理去滑膜后可以见软骨缺损区域, 周围软骨组织生长非常不均衡、不规则; C、F 分别为空白对照组软骨缺损造模与术后 12 周大体观察, 术后 12 周软骨缺损区域有轻度缩小, 但从软骨下骨组织到软骨面仍然存在明显的缺损, 有滑膜组织长入附着, 清理滑膜组织后可见造模缺损区域, 周围软骨组织生长不规则。

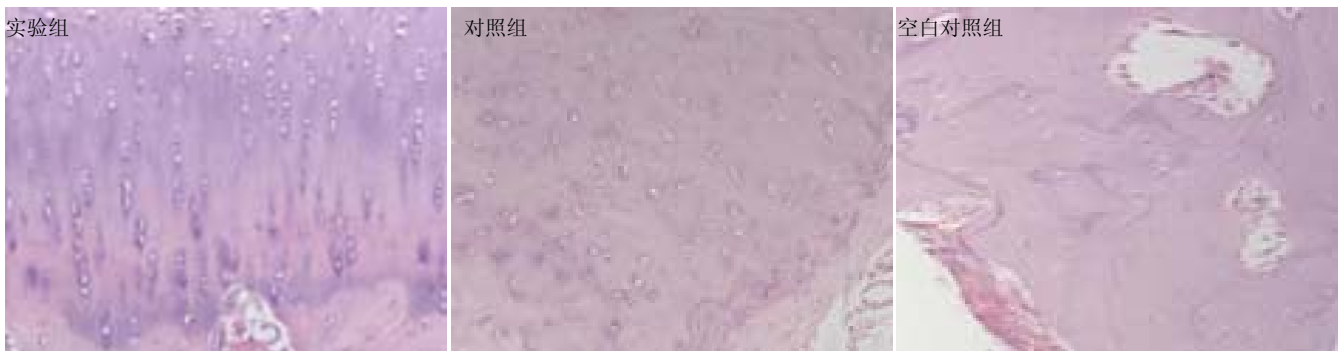


图4 各组术 12 周右侧股骨髁及整个关节面组织学观察(苏木精-伊红染色, ×10)

Figure 4 Histological observation of the right femoral condyle and the whole articular surface at 12 weeks after surgery (hematoxylin-eosin staining, ×10)

图注: 实验组整个缺损区域可以观察到类软骨细胞, 排列整齐, 呈柱状分布, 非常接近正常软骨组织; 对照组在骨基质表面可以见到类软骨细胞、基质组织, 但软骨组织排列较为紊乱; 空白对照组只有骨细胞、骨基质及血管组织存在, 未见软骨及类软骨组织。

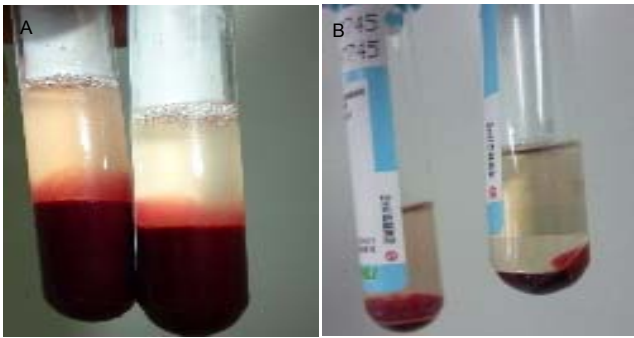


图1 Aghaloo离心法制作富血小板血浆  
Figure 1 Preparation of platelet-rich plasma using Aghaloo's centrifugation method

图注: 图中A为第1次离心后, B为第2次离心后。

**海螵蛸支架富血小板血浆液的制备:** 运用无菌特制的类似腰椎椎体成型术穿刺器套管刀, 直径为5 mm, 将海螵蛸块制作成直径5 mm、高6 mm的圆柱体, 将富血小板血浆用移液器移入海螵蛸圆柱体上浸泡并适当搅拌2 h, 整个操作在无菌手术室内完成(图2)。

**海螵蛸支架富血小板血浆液内置软骨修复实验:** 取3组兔, 盐酸氯胺酮25 mg/kg肌肉注射作基础麻醉, 耳缘静脉推注咪达唑仑0.5 mg/kg, 当发现其头部下垂时即停止注射。麻醉后进行术区备皮、消毒等术前准备。兔单侧下肢驱血(减少静脉出血, 使全身失血量减少), 并在大腿根部绑止血带, 采用改良Hulth模型方法, 选择兔右侧膝关节内侧切口, 切开皮肤, 关节囊, 暴露膝关节内侧, 最大屈膝关节, 将髌骨做外翻脱位, 暴露膝关节整个关节面, 在关节软骨面, 用特制类似人体椎体成型术穿刺外套管刀钻取破坏软骨面, 形成直径为5 mm、深为6 mm的全层软骨损伤。用生理盐水反复冲洗关节腔后, 实验组将海螵蛸-富血小板血浆复合物植入软骨缺损部位, 由于植入材料体积大小与造模损伤的体积大小相同, 固定稳妥, 不需要做过多修整; 对照组将明胶海绵植入软骨缺损区域, 用移液器将富血小板血浆植入明胶海绵; 空白对照组只造成直径为5 mm、深为6 mm的软骨损伤, 不做任何处理, 直接关闭伤口。

手术完毕, 不冲洗伤口, 直接缝合关节囊, 间断缝合皮肤, 无菌辅料覆盖。整个手术操作不超过15 min。术后给予青霉素 $20 \times 10^4$  U/d肌肉注射, 连续3 d, 换药观察伤口情况。术后不固定伤肢, 麻醉复苏后即开始进食及活动。

**大体标本观察:** 术后12周空气耳缘中动脉注射处死实验兔, 解剖兔下右侧膝关节, 在股骨远端截断, 获取右侧股骨髌及整个关节面, 剥离其周围软组织, 作大体形态学观察。

**软骨组织光镜观察:** 将离体组织固定于体积分数10%的中性甲醛中24-48 h, 流水冲洗24 h, 冲洗完后用5%-10%硝酸脱钙。脱水步骤及制片步骤: 体积分数70%乙醇45 min→体积分数80%乙醇45 min→体积分数95% I 乙醇45 min→体积分数95% II 乙醇45 min→无水乙醇 I 45 min→无水乙醇 II 45 min→二甲苯 I 透明30 min→二

甲苯 II 透明30 min→石蜡 I 浸蜡2 h→石蜡 II 浸蜡2 h→包埋→切片-烤片(65 °C)半小时→二甲苯 I 脱蜡5 min→二甲苯 II 脱蜡5 min→无水乙醇 I 1 min→无水乙醇 II 1 min→体积分数95%乙醇 I 1 min→体积分数95%乙醇 II 1 min→体积分数75%乙醇1 min→流水冲洗→蒸馏水洗→苏木精染10 min→流水冲洗→盐酸乙醇分化→自来水冲洗→伊红染色1 min→体积分数75%乙醇脱水30 s→体积分数95% I 乙醇脱水1 min→体积分数95% II 乙醇脱水1 min→无水乙醇 I 脱水1 min→无水乙醇 II 脱水1 min→二甲苯 I 透明1 min→二甲苯 II 透明1 min→封固。在10倍及20倍光镜下观察软骨缺损修复情况。

**主要观察指标:** 海螵蛸富血小板血浆复合物修复兔软骨损伤的效果。

**统计学分析:** 采用SPSS 17.0软件对所得数据进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间血小板计数、软骨缺损直径及缺损深度使用方差分析(ANOVA)分析, 并对有统计学意义的指标进行两两比较。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 21只兔均进入结果分析。

**2.2 富血小板血浆采集结果鉴定** 在实验组及对照组中随机抽取富血小板血浆样本各3份, 用自动血液细胞仪进行血小板计数及手工复核。

**测量方法:** 用血红蛋白吸管分别在装有全血的离心管及富血小板血浆的离心管中吸取样本0.5 mL, 以血小板稀释液稀释至2 mL, 混匀, 先用全自动血液计数, 再取1滴注入清洁计数池内放置10 min, 高倍光镜下做人工计数, 同时比对全血中血小板数。

实验所得到的富血小板血浆中血小板浓度为 $(1\ 258.33 \pm 216.40) \times 10^9 L^{-1}$ , 而全血中的血小板浓度为 $(255.33 \pm 47.07) \times 10^9 L^{-1}$ , 富血小板血浆中血小板浓度为全血的4倍以上。实验组与对照组富血小板血浆血小板计数比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 海螵蛸支架观察** 大体观察为瓷白色, 呈肉眼可见的多孔状外观, 纹理清晰, 质地轻, 脆性较大, 硬度较低。低倍镜下可见海螵蛸中有支柱样结构, 支柱之间相互平行, 即为大体见之清晰纹理, 相邻支柱间是与之相交排列的小梁结构, 壁较薄, 支柱与小梁相间排列, 构成规则的网格结构, 孔隙率为85%-90%, 平均孔径为0.2 mm×0.09 mm。高倍镜下可见支柱与小梁样结构所构成的壁龛样网格结构更为明显, 支柱与小梁表面光滑并呈现出板层结构。

等离子消毒后支架呈黄白色, 保持原有的多孔结构和明显的纹理, 等离子改性前后脆性和硬度变化不大。低倍镜下观察水产物时发现材料保持了其多孔网状结构, 仍由网格样结构构成, 原有的支柱、小梁等结构依然存在。

将采用Aghaloo离心法获得的自体富血小板血浆液与海螵蛸体混合, 室温下静置2 h, 见海螵蛸可以吸收部分



血浆液, 逐渐被染成浅红色并逐渐发生凝血, 富血小板血浆黏附在其表面及网格中。

#### 2.4 各组动物骨缺损模型修复观察结果

**大体观察(图3):** 实验组的软骨缺损区域明显缩小, 已明显修复, 与周围软骨面没有明显分界, 修复组织和周围软骨组织相似, 中心区域有很小的区域和周围软骨组织不同, 考虑为未修复区域, 缺损直径为 $(1.0\pm 0.5)$  mm, 深度为 $(1.0\pm 0.5)$  mm。

对照组的软骨缺损区域轻度缩小, 可明显观察到造模痕迹, 但范围减小, 软骨造模表面有滑膜附着, 清理去滑膜后可以见软骨缺损区域, 周围软骨组织生长非常不均衡、不规则, 中心缺损深度直径为 $(4.0\pm 0.5)$  mm, 缺损深度为 $(3.5\pm 0.5)$  mm。

空白对照组的软骨缺损区域有轻度缩小, 但从软骨下骨组织到软骨面仍然存在明显的缺损, 有滑膜组织长入附着, 清理滑膜组织后可见造模缺损区域, 周围软骨组织生长不规则, 缺损直径为 $(4.0\pm 0.3)$  mm, 缺损深度为 $(5.5\pm 0.5)$  mm。

实验组缺损直径及深度明显低于其他两组( $P < 0.05$ ), 对照组与空白对照组缺损直径及深度比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**组织学观察(图4):** 实验组整个缺损区域可以观察到类软骨细胞, 并且排列整齐, 呈柱状分布, 非常接近正常软骨组织。

对照组在骨基质表面可以见到类软骨细胞、基质组织, 但软骨组织排列较为紊乱。

空白对照组只有骨细胞、骨基质及血管组织存在, 未见到软骨及类软骨组织。

### 3 讨论 Discussion

关节软骨是一种透明软骨, 为特殊的结缔组织, 由大量的细胞外基质和少量的软骨细胞组成, 没有血管、神经和淋巴管。关节软骨的损伤修复是困难的, 因为缺少修复需要的软骨细胞及血供。软骨的重建主要集中在如何从软骨基质补充软骨细胞或者外源性补充软骨细胞组织。软骨修复主要是缺乏足够的软骨细胞, 而自体软骨移植带来了新的希望。结合组织工程和基因治疗相比单独的基因转移细胞移植更加有益<sup>[22-23]</sup>。目前, 自体软骨移植被广泛运用, 新一代的软骨移植结合了细胞及生物支架, 但还没有一种方法可以达到自体软骨细胞的生物及物理特性。寻找新的软骨生物支架或利用软骨下基质补充软骨细胞仍是未来研究的重点<sup>[24-28]</sup>。

富血小板血浆含有高浓度的血小板、白细胞和纤维蛋白等物质。血小板激活后能分泌多种生长因子, 白细胞可防止感染, 纤维蛋白能在局部构建组织修复所需的三维结构。一些基础研究业已证实富血小板血浆可以促进软骨细胞的增殖和软骨基质的合成, 刺激软骨形成<sup>[5]</sup>, 但其容易

流动, 不能固定于特定损伤区域。海螵蛸来源广泛, 价格低廉, 具有相互连通的三维多孔结构, 容易切削加工成所需要的形状。海螵蛸经过一定的理化技术制备后具有良好的组织相容性<sup>[29-31]</sup>, 轻微挤压就可以粉碎成颗粒装粉末, 其主要成分为碳酸钙; 在与富血小板血浆结合后, 形成一种相对固定的复合物, 同时钙离子可以诱导富血小板血浆液并激活, 使之产生生长因子。在本实验中手术所造成的软骨损伤是全层损伤, 良好的契合海螵蛸复合体为软骨下基质中软骨细胞的注入提供了空间, 而富血小板激活后产生的生长因子又为软骨细胞生长提供刺激作用。在实验中12周左右, 植入的富血小板海螵蛸复合物就吸收消失, 说明在软骨生长过程中海螵蛸复合体也在溶解吸收, 但溶解的进度仍有待进一步研究。海螵蛸同时有具有一定支持力及相对的空间占用性, 也可以防止由于炎症反应刺激的滑膜长入, 形成假性填充。从结果来看, 海螵蛸与富血小板血浆结合修复软骨缺损, 无论在大体标本还是组织病理方面均体现了良好的成骨作用, 且优于明胶海绵复合体, 提示海螵蛸与富血小板血浆复合物具有明显促进软骨愈合的作用, 与组织工程支架作为“临时支架”的要求相符<sup>[32]</sup>。

关节软骨损伤后难于自我修复, 从本实验来看应用富血小板血浆及海螵蛸复合物, 利用软骨下基质中软骨细胞的修复作用, 使内源性自体软骨修复成为可能。

**致谢:** 对云南中医学院第一附属医院中心实验室、化验室、病理室工作人员及昆明医科大学动物实验室在实验中的帮助, 表示感谢!

**作者贡献:** 毕衡进行实验设计, 实验实施为毕衡、杨立丁、叶国裕、姚晓、刘涛、普宏润, 实验评估为杨立丁、刘涛, 资料收集为王清、毕衡, 王清成文, 毕衡审校, 毕衡对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

**学术术语:** 富血小板血浆-是自体血小板的浓集物, 富含大量生长因子, 可在不同方面对组织中细胞和基质的再生起到促进作用, 从而加速组织修复。富血小板血浆在外科临床及实验研究中应用非常广泛, 一方面富血小板血浆容易从自体中获得, 又有对组织的修复作用; 另一方面, 人们对富血小板的治疗作用机制认识仍然不多。从1990年开始, 富血小板血浆所含成分逐渐被认识, 其中起主要作用的生长因子目前已发现有30余种, 如血小板源性生长因子、转化生长因子 $\beta$ 、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子和表皮生长因子等, 其逐渐成为组织工程领域尤其是骨科创伤组织缺损修复方面的研究热点, 目前已在临床广泛应用, 如脊柱融合, 椎间盘退变修复, 关节内骨折愈合, 髌腱、肩袖及交叉韧带的腱性及腱骨愈合, 骨缺损与软骨损伤及术后功能恢复等方面并取得了较好疗效。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *Bone Joint Surg Am.* 1998;80(12): 1795-1812.
- [2] 康健,袁文. 富血小板凝胶制备方法的比较与优选[J]. *中国组织工程研究*,2014,18(3):476-481.
- [3] Alsousou J,Thompson M,Hulley P,et al. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br.*2009;91(8):987-996.
- [4] De Almeida AM, Demange MK, Sobrado MF, et al. Patellar tendon healing with platelet-rich plasma: a prospective randomized controlled trial. *Am J Sports Med.*2012;40(6): 1282-1288.
- [5] 刘骥,袁霆,张长青. 富血小板血浆治疗慢性组织损伤的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*,2010,24(6):754-757.
- [6] Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, et al. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. Aliprandi A, Cabitza P. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011; 20(4):518-528.
- [7] Wei LC, Lei GH, Sheng PY, et al. Efficacy of platelet-rich plasma combined with allograft bone in the management of displaced intra-articular calcaneal fractures: a prospective cohort study. *J Orthop Res.*2012;30(10):1570-1576.
- [8] Hartmann EK, Heintel T, Morrison RH, et al. Influence of platelet-rich plasma on the anterior fusion in spinal injuries: a qualitative and quantitative analysis using computer tomography. *Arch Orthop Trauma Surg.*2010;130(7):909-914.
- [9] Liu J, Song W, Yuan T, et al. A Comparison between Platelet-Rich Plasma (PRP) and Hyaluronate Acid on the Healing of Cartilage Defects. *PLoS One.*2014;9(5):e97293P.
- [10] Lundquist W, Stanford R. Chronic Pain Perspectives: Targeting systemic inflammation in patients with obesity-related pain: One practice's success with platelet-rich plasma therapy. *J Fam Pract.*2013;62(9):S10-15.
- [11] Gandhi A, Bibbo C, Pinzur M, et al. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin.*2005;10(4): 621-637.
- [12] Vogrin M, Ruprecht M, Dinevski D, et al. Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized, double-blind, clinical trial. *Eur Surg Res.* 2010;45(2):77-85.
- [13] Sheth U, Simunovic N, Klein G, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(4):298-307.
- [14] Sheth U, Simunovic N, Klein G, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(4):e25.
- [15] Mnaymneh W, Mailinin T. Massive allografts in surgery of bone tumors. *Orthop Clin North Am.*1989;20(3):455-467.
- [16] Johnson EE, Urist MR, Schmalzried TP, et al. Autogenic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. Effects of xenogenic bovine bone morphogenetic protein without and with interposition of soft tissues and interruption of blood supply. *Clin Orthop Relat Res.*1989; (243):254-265.
- [17] 郝永壮,张宇明,苏云星,等. 组织工程化软骨对兔膝关节全层软骨缺损的修复效果[J]. *山西医科大学学报*,2013,44(10):791-836.
- [18] Haider A, Gupta KC, Kang IK. PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):314.
- [19] 张长青,袁霆. 富血小板血浆制作技术和临床应用[M]. 上海:科学技术出版社,2011.
- [20] 周蔚,吴海涛,李采. 海螺峭作为组织工程支架材料的实验研究[J]. *复旦学报:医学版*,2007,34(3):438-441.
- [21] 陶凯,毛天球,陈富林,等. 一种新型羟基磷灰石材料的制备及其细胞相容性探讨[J]. *生物医学工程学杂志*,2006,23(4):887-890.
- [22] Madry H, Kaul G, Zurakowski D, et al. Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cell Mater.*2013;25:229-247.
- [23] Ivkovic A, Marijanovic I, Hudetz D, et al. Regenerative medicine and tissue engineering in orthopaedic surgery. *Front Biosci.* 2011;3:923-944.
- [24] Numano T, Homma K, Tateishi T, et al. Feasibility of noninvasive evaluation of biophysical properties of tissue-engineered cartilage by using quantitative MRI. *J Biomech.*2007;40:2990.
- [25] Cui JH, Park SR, Choi BH, et al. Preconditioning of rabbit mesenchymal stem cells in polyglycolic acid (PGA) scaffold using low-intensity ultrasound improved regeneration of cartilage in rabbit articular cartilage defect model. *Tissue Eng Regen Med.*2010;7:24.
- [26] Hong HH, Kim SJ, Kim SH, et al. Effect of PLGA scaffold penetrated demineralized bone solution for chondrogenesis: In vitro test. *Tissue Eng Regen Med.*2010;7:142.
- [27] 裴雪涛. 再生医学—理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2010: 260-261.
- [28] Mike AG, Sarakinos G, Lyman MD, et al. Sagittal ramus Osteotomies fixed with biodegradable screws: a preliminary report. *J Cell Biochem.*1994;56(4):192-195.
- [29] Sittinger M, Bujia J, Rotter N, et al. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomater.*1996;17:237-242.
- [30] 刘艺,张安祺,王和鸣,等. 海螺峭接骨动物实验研究[J]. *福建医药*, 1998,19(3):49.
- [31] 刘源,于江,白洁,等. 海螺峭-骨形态发生蛋白复合材料对骨缺损大鼠成骨及再血管化的影响[J]. *中华烧伤杂志*,2013,29(6): 548-553.
- [32] 付小兵,王正国,吴祖泽. 再生医学基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:491.