

富血小板血浆在治疗家兔椎间盘退变中的应用价值

刘梦雪 孙祥雪 刘佳良 田腾达 张露

西安培华学院 陕西 西安 710025

摘要:目的:探讨富血小板血浆(PRP)在家兔椎间盘退变(IDD)中的作用及时期延缓发展可能存在的相关机制,为椎间盘退变的临床治疗提供理论与实验数据。方法用血常规分析仪计数血小板的数量,用Elisa方法测定TGF- β 1的含量;将PRP加入兔髓核细胞进行分组培养,A组为兔髓核细胞,B组为兔髓核细胞+PRP,C组为兔髓核细胞+PLT+SB431542,采用PCR检测分别检测三组TGF- β 1、聚集蛋白聚糖(aggrekan)以及II型胶原(collagen II)的核酸表达水平。结果:PRP中的血小板数量为 $(1110.25 \pm 60.15) \times 10^9/L$,是全血中的 (4.062 ± 0.31) 倍;TGF- β 1的含量为 (1183.25 ± 50.13) pg/mL,是全血中的 (3.28 ± 0.54) 倍。与PRP共同培养的兔髓核细胞B组中TGF- β 1、collagen II和aggrekan基因mRNA的表达明显高于A组($p < 0.05$),而加入TGF- β 1抑制剂C组后,三个指标的表达分别为A组的 (5.45 ± 0.32) 倍、 (2.51 ± 0.44) 倍和 (4.35 ± 0.47) 倍,明显低于B组($p < 0.05$)。结论:PRP对于可通过TGF- β 1调节兔髓核细胞的增殖能力,加入TGF- β 1抑制剂可以明显抑制其增值。

关键词:富血小板血浆;兔髓核细胞;椎间盘退变

随着生活节奏的加快,下腰痛(low back pain, LBP)在日常生活中越来越多,已逐渐变为最常见的慢性疾病之一,给患者的健康和经济均带来巨大的压力。椎间盘病变在下腰痛(LBP)中是表现最为明显的,占病例的40%以上^[1]。椎间盘无血管结构,愈合能力很差,受损后会形成局部炎症,并使周围组织应力增大,从而产生伤害引起疼痛^[2]。

目前针对椎间盘源性下腰痛的治疗有保守和手术治疗,保守治疗包括休息、理疗、抗炎镇痛等对症治疗,手术治疗包括单纯髓核摘除术、椎管减压术、脊柱融合术等,但这些治疗仅能缓解症状,并不能从根本上治疗椎间盘退变、恢复脊柱的生物力学结构,术后易产生邻近节段退变加速,甚至需再次手术的风险^[3]。近年来,随着医学和分子生物学的发展,很多的国内外专家都在各个水平对椎间盘的退变机制进行研究,希望通过研究找到突破,从而找到更好的临床治疗手段和有效的治疗方法。

富血小板血浆(PRP)是通过将外周全血进行离心,并提取出PLT的浓缩液,PRP所富含的因子非常多,其中TGF- β 1近年来被广泛研究,其具有十分明显的组织修复能力,而且自身可得,分离相对容易,并且对于自体的伤害不大。随着越来越多的学者对PRP研究,很多欧美国家中,PRP的临床应用已经越来越被关注和研究^[4]。其中PRP骨折愈合及软组织的作用十分明显,并部分用于治疗软骨损伤修复等疾病。首先自体分离并浓缩富血小板血浆,并提取相关因子来治疗自身的相关疾病已经开启了新的治疗模式,其治疗方法高效、安全。据报道,PRP能增强软骨细胞的增殖,并对膝关节软骨退

化有积极临床效果^[5]。髓核细胞的本质为类软骨细胞,其增殖主要是通过TGF- β 1途径启动软骨细胞再分化实现的^[6]。而椎间盘退变是因为髓核细胞的退变。因此,我们推断PRP可通过TGF- β 1延缓椎间盘的退变。

1 材料与方法

1.1 富血小板血浆的制备

第一步	取三只家兔,在家兔耳缘静脉消毒后采血8ml
第二步	将采集好的血液至于离心管内,将离心机调制1500rpm,并离心10分钟;
第三步	吸取全部上清液至交界面下3mm,移至新的离心管,3000rpm速度离心10min后,弃除上层上清液,余下部分混匀,即为未活化的PRP
第四步	将PRP与激活剂(牛凝血酶及10%CaCl ₂ 溶液混合物)按9:1比例混合,室温静置60min,待血块收缩
第五步	以3000rpm速度离心10min,吸取上清即为活化的PRP;
第六步	将活化后的PRP于-80℃冻存备用,待用时以0.22 μ m滤器过滤,按实验需要用培养基稀释后处理细胞。

1.2 全血及PRP中血小板计数

用迈瑞BC-5300全自动血细胞分析仪进行全血已经血小板的计数,并检测出PRP的浓度。

1.3 ELISA法测定TGF- β 1含量

检测不同稀释浓度的PRP中TGF- β 1的含量,分析不同浓度PRP和TGF- β 1的相关性。

1.4 兔髓核细胞分离及体外培养

1.4.1 细胞分离:将三只家兔进行注射空气处死;并取出腰椎脊柱,注意无菌操作,并将胶冻状髓核取出备用。

1.4.2 细胞培养:兔髓核细胞、兔髓核细胞+PRP、兔髓核细胞+PRP+TGF- β I型受体抑制剂(SB431542)培养。

实验分组

组号	组别	细胞
1	对照组	兔髓核细胞
2	血小板组	兔髓核细胞 +PRP
3	血小板 +SB431542	兔髓核细胞 +PLT+SB431542

观察 5 组细胞的生长情况

1.5 PCR 测定 TGF-β 1、II 型胶原基因 collagen

II、aggrecan 基因 mRNA 的表达。

2 实验结果

2.1 全血和 PRP 中血小板计数

用迈瑞 BC-5300 全自动血细胞分析仪计数 PLT，分别检测全血和 PRP 中 PLT，如表 1 所示，PRP 中 PLT 为全血的 (4.07±0.23) 倍。

表 1 家兔全血和 PRP 中 PLT 比较

序号	全血 (×10 ⁹ /L)	PRP (×10 ⁹ /L)	PRP/ 全血
1	270	1103	4.085
2	268	1087	4.056
3	274	1113	4.062
4	270	1108	4.104

2.2 ELISA 法测定全血及 PRP 中 TGF-β 1 含量

根据试剂盒说明书检测全血和 PRP 中 TGF-β 1 的含量，PRP 中 TGF-β 1 的含量为全血中的 (3.29±0.45) 倍，如图表 2。

标准品 TGF-β 1 浓度 - 吸光度曲线

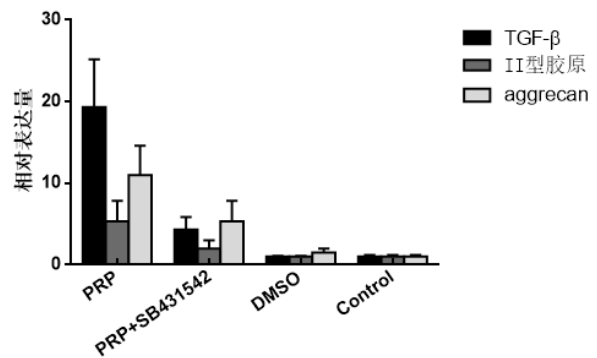
表 2 兔全血和 PRP 中 TGF-β 1 含量的比较

序号	全血 TGF-β (pg/mL)	PRP 中 TGF-β (pg/mL)	PRP/ 全血
1	377	1123	2.98
2	347	1207	3.81
3	378	1235	3.27
4	375	1156	3.08

2.3 A 组、B 组、C 组总 TGF-β 1、II 型胶原基因和 aggrecan 基因 mRNA 的表达

细胞培养分为兔髓核细胞、兔髓核细胞 +PRP、兔髓核细胞 +PRP+TGF-β I 型受体抑制剂 (SB431542) 培养三组，观察 A、B、C 三组髓核细胞外基质结构相关基因 mRNA 表达的变化。结果如图所示。TGF-β 1 核算表达量，与对照组相比，仅加 DMSO 并无显著差异 (p > 0.05)，而兔髓核细胞 +PRP 培养，TGF-β 1 mRNA 的表达是对照组的 (18.11±1.29) 倍，C 组 mRNA 表达是对

照组的 (5.45±0.32) 倍。II 型胶原基因 mRNA 表达量，与 A 组相比，仅加 DMSO 并无显著差异 (p > 0.05)，而兔髓核细胞 +PRP 培养后，II 型胶原基因 mRNA 的表达是 A 组 (3.91±0.34) 倍，C 组 mRNA 表达是对照组的 (2.51±0.44) 倍。相较于 aggrecan 基因 mRNA 表达量，仅加 DMSO 并无显著差异 (p > 0.05)，B 组中 aggrecan 基因 mRNA 表达为对照 (12.45±1.68) 倍，C 组中 aggrecan 基因 mRNA 表达量为 A 组的 (4.35±0.47) 倍。



兔髓核细胞 TGF-β 1、II 型胶原基因和 aggrecan 基因 mRNA 表达的变化

3 讨论

椎间盘退变发病因素十分复杂，具体病因尚未明确。有学者认为，椎间盘的退变与年龄、免疫、遗传等多种因素相关。富血小板血浆 (PRP) 是将自身的血液离心，经过一系列的过程提取出来的血小板浓缩物。目前提取 PRP 有很多不同的方式，根据不同的离心方式、离心时间等提取出的 PRP 中血小板浓度、活性和回收率各不相同。PRP 的提取方法在西方国家十分发达，方式也很多样且纯度高。而国内对于 PRP 的研究大多是手工制作的。本实验我们采用了六步法制备和提取 PRP，所得到的 PRP 中 PLT 与全血相比高出 (4.062±0.31) 倍，TGF-β 1 的与全血相比高出 (3.28±0.54) 倍。在 C 组培养中我们选取了 TGF-β 1 的 I 型受体抑制剂 SB431542 进行共同培养干预，SB431542 可使得 Smad3 蛋白磷酸化收到极大的抑制并且阻止了与 Smad4 蛋白结合，使得 Smad 蛋白无法向核内进行转位，从而达到了阻断 TGF-β 1/Smad 信号通路，也使得通路中的部分靶基因无法准确的表达。通过我们的实验我们得出 PRP 非常有利于兔髓核细胞的增殖，与此同时也有利于其细胞外基质的合成与代谢，但通过 C 组培养结果显示，使用 TGF-β 1 的抑制剂后，PRP 的促髓核细胞增殖效应也受到了抑制，其此在延缓椎间盘退变的效果也十分微弱。因此，我们推测，正是由于 TGF-β 1 的表达收到抑制而

减少,使得下游 collagen II 和 aggrecan 基因 mRNA 表达量的减少,同时减弱了细胞外基质的合成代谢。因此通过本次实验我们初步证明了富血小板血浆可以延缓椎间盘的退变,而在此过程当中,PRP 所释放的 TGF- β 1

至关重要,扮演十分重要的角色。因此,富血小板血浆当中含有十分丰富的生长因子及 PLT,这些因子十分重要,在体外对于兔髓核细胞增殖有着促进作用,其中 TGF- β 1 是发挥作用的主要因素之一。

参考文献:

[1] 左秀芹,尹飒飒,谢惠敏,等.富血小板血浆在肌骨修复领域应用的适用性与相关规范[J].中国组织工程,2021,25(20):3239-3245.

[2] Mohammed S, Yu J. Platelet-rich plasma injections: an emerging therapy for chronic discogenic low back pain[J]. J Spine Surg, 2020, 4(1): 115-122.

[3] 达逸峰,王志浩,郑文凯,等.炎症因子及信号通路在腰椎退行性疾病中的研究进展[J].中华骨科杂志,2020,40(9):597-606.

[4] 杨涛,乔永军,杨文学,等.椎间盘退变炎症因子表达与椎间盘退变程度相关性分析[J].中国骨与关节损伤杂志,2020,35(7):738-740.

[5] 吴九平,样利丽,张郡,等.富血小板血浆联合糖皮质激素/局部麻醉药序贯注射治疗关节突关节综合症的疗效观察[J].中国疼痛医学杂志,2020,26(3):221-231.

[6] 杜薇,丁宇,崔洪鹏,等.经皮内窥镜下椎间盘摘除联合富血小板血浆凝胶微球置入治疗腰椎间盘突出症的疗效观察[J].中国脊柱脊髓杂志,2020,30(11):1001-1006.

项目基金:西安培华学院 2024 年校级大学生创新创业训练计划项 PHDC2024069 《富血小板血浆通过 TGF- β 1 延缓家兔椎间盘退变机制的研究》。