

# 血小板浓缩液的制备及促进兔尺骨骨折愈合方面的实验研究

张爱民<sup>1</sup>, 张英泽<sup>2</sup>, 马维<sup>1</sup>, 范志勇<sup>1</sup>, 史正亮<sup>1</sup>, 宋永周<sup>1</sup>, 张华<sup>1</sup>, 郑广德<sup>1</sup>

(1. 河北医科大学第二附属医院骨科, 河北 石家庄 050061; 2. 河北医科大学第三附属医院骨科)

**摘要** 目的: 探索动脉血小板浓缩液, 在无菌情况下的制备方法。通过免疫组化及物理测量, 证实血小板浓缩液中含有多种生长因子, 并对比分析其对骨折愈合不同时期的促进作用, 为临床应用提供基础资料。方法: 选用 20 只新西兰兔, 随机分成 2 组, 分别为空白组及血小板组。制作尺骨中段骨折动物模型, 采用指钢板行内固定。在手术之前, 先抽取兔股动脉血 6 ml 左右, 经枸橼酸钠抗凝后, 加低速高速离心, 提纯出白色的血小板浓缩液, 将其注射回骨折断端。所有操作均为无菌操作。分别在 1、2、4 及 6 周处死兔, 在骨折处取 5 mm 骨组织标本。切片作 PDGF 免疫组化染色定性分析及测量骨痂直径定量分析。结果: ①6 ml 的兔动脉血在低速及高速离心后, 可分离出 0.5 ml 的血小板浓缩液, 浓度在正常兔血小板浓度的 3 倍以上。②免疫组化染色阳性产物呈棕黄色颗粒状。在空白组术后第 1 周及第 2 周 PDGF 因子为阴性表达, 第 4 周、第 6 周为弱阳性表达; 在血小板浓缩液组, 随着处死时间延长, 阳性表达率逐渐增高。在相同的处死时间, 血小板浓缩液组阳性表达率明显高于空白组。空白组、血小板组兔尺骨骨折标本在 1、2、4、6 周, 均有不同程度骨痂形成, 其中以第 6 周兔骨痂最多, 第 1 周兔以纤维连接为主, 仅有少许骨痂形成。空白组与血小板组同期骨痂直径差异有显著性意义。结论: ①少量的兔血在严格的实验条件下, 能够制备出血小板浓缩液。②兔血小板浓缩液中确含有较高浓度的 PDGF 生长因子。③血小板浓缩液加速了骨折断端的愈合。

**关键词** 尺骨骨折; 骨折愈合; 血小板源性生长因子

**Experimental study on the preparation of blood platelet concentrate and its promotion to fracture healing of rabbit ulna** ZHANG Ai-min\*, ZHANG Ying-ze, MA Wei, FAN Zhi-yong, SHI Zheng-liang, SONG Yong-zhou, ZHANG Hua, ZHENG Guang-de. \* Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Hebei Shijiazhuang, 050061, China

**Abstract Objective:** To explore the preparative method for blood platelet concentrate under the aseptic condition. Furthermore, with immunohistochemical and physical measurement, to confirm promoting effect of blood platelet concentrate which have many types of growth factors on the fracture healing of rabbit's ulna at different periods and to offer theoretical bases for clinical application. **Methods:** Twenty New Zealand rabbits were applied and divided into 2 groups randomly. The fracture models were made on the middle of ulna fixed by finger armor plate. Before the operation, we drew out 6 ml blood from femoral artery and centrifugated by low and the followed high speed with the anti coagulation of sodium citrate, then purified the white blood plate and injected it into the fracture position. All the manipulation was under the aseptic condition. The rabbits were killed at 1, 2, 4 and 6 weeks. Then bone specimen of 5 mm was cut in length of bone tissue near the fracture. Qualitative analysis by immur histochemical staining of PDGF and quantitative analysis by measuring bony were diametered with micrometer. **Results:** ①Blood platelet concentrate of 0.5 ml can be acquired from rabbit's artery blood of 6 ml centrifugated by low and high speed. The concentration had three times as normal level. ②Immunohisto biochemical staining showed positive reaction as brown yellows graunle. In first and second weeks after operation, PDGF factor showed negative. In 4th and 6th weeks, weak positive. In the blood platelet concentration group, so long with the longer time, the rate of reaction becomes higher. At the same time, the positive reaction mascline rate of blood platelet concentration group was obviously higher than that

of the control group. ③Bony scab could be seen on the ulnar specimen in various degrees as the rabbits were killed at 1st, 2nd, 4th and 6th weeks, particularly in the last week. However, in first week only a small amount of callus which was conjuncted with fibers could be seen, and three were no difference from the normal bone diameter. At the same time, three were obvious differences between the control group and the blood platelet concentration group. **Conclusion:** ①Under strict experimental condition, little of rabbit blood can output blood platelet concentrated liquid. ②Rabbit's blood platelet concentrated liquid contains PDGF factor of high concentration. ③Blood platelet concentrated liquid promotes fracture healing.

**Key words** Ulna fractures; Fracture healing; Platelet Derived growth factor

如何促进骨痂形成的生长,一直是创伤外科的热门话题,人们试图从各个方面揭示其内在相关性,达到指导临床的目的。骨痂取决于骨形成与骨吸收的相比率,某些生长因子通过刺激成骨细胞增殖、分裂及其活性而促进骨形成。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor PDGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)及骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等,具有不同生物活性,包括丝裂源活性、促进分化活性及溶骨活性等。它们在骨形成中发挥重要作用。本实验建立尺骨中段骨折动物模型,探索血小板浓缩液的制备方法,验证血小板浓缩液含有 PDGF 生长因子并对骨折愈合的促进作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 实验动物选用河北医科大学动物实验中心提供的成年新西兰兔 20 只,体重在 2.5~3.0 kg,雌雄不限,随机分为空白组和血小板组,每组 10 只。

**1.2 材料** 钢板由江苏苏南医疗器械有限公司提供。千分尺由上海精密仪器一厂制造。PDGF 免疫组化染色采用武汉博士德生物工程有限公司提供试剂盒。

**1.3 方法** ①采集血样:在预实验时,先采集 5 份正常兔动脉血,测算出其正常兔的血小板数,然后在高速离心条件下,测算血小板浓缩液中的血小板数。实验开始后,抽取兔动脉血 6 ml,在 500 r/min 低速离心 5 min。弃去沉淀的血细胞。抽取上层的血浆,1000 r/min 高速离心 7 min,血小板凝集成白斑状沉淀于试管底,剩 0.5 ml 血清震荡 5 min 制成血小板浓缩液,测定其浓度相当正常兔平均血小板计数为 3 倍左右,以备注入动物模型的骨折处。以上操作在无茵条件下进行,包括对试管、抗凝剂的杀菌。②建立动物模型:用 4% 戊巴比妥钠 0.5 ml/kg,腹腔注射麻醉。双前肢常规方法脱毛灭菌,于尺骨中段隆起处纵行切口长 4 cm,沿肌间隙游离尺骨切开骨间膜及骨膜,凿断尺骨后用钢板螺钉固定,缝合骨膜

及各层组织。③将高速离心制成的血小板浓缩液,在无茵条件下注入骨折端。空白组是用同一只兔子的对侧上肢,凿断尺骨后用钢板螺钉固定。这样在样本量较小的情况下得到较好的对比性。④分别在 1、2、4 及 6 周处死兔,在骨折处取 5 mm 骨组织标本。⑤免疫组织化学染色:将样本用 1% 福尔马林固定 24 h,0.1N EDTA 脱钙,系列乙醇脱水,石蜡包埋,纵行组织切片,HE 染色,光镜观察,每组取 2 张切片作 PDGF 免疫组化染色。载玻片行防脱片剂处理,切片脱蜡至水,蒸馏水新鲜配置 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 5~10 min 以灭活内源性酶。微波修复抗原,滴加山羊血清封闭液,室温 20 min,滴加 PDGF 基因抗原的抗体,室温 60~120 min。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,滴加试剂 SABC 20~30 °C 20 min, DAB 显色,最后苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。

**1.4 统计学处理** 各种数据均用 SAS 统计软件处理,进行成组设计定量资料的 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 肉眼观察** 术后仅 1 例伤口出现感染,其余均无红肿及窦道形成。血小板组与空白组兔尺骨骨折标本在 1、2、4、6 周时,均有不同程度软硬骨痂形成,其中以第 6 周兔骨痂最多,最多直径有 10.43 mm,而第 1 周兔以纤维连接为主,仅有少许骨痂形成,直径与正常比较差异无显著性意义。

**2.2 X 线检查** 术后 1 周,尺骨骨折面清晰,术后 2、4、6 周连续观察可见骨折端逐渐模糊,尺骨骨折处表面出现硬骨痂,骨痂影逐渐变大,密度变高。与空白组相比,血小板浓缩液组变化更早,密度更高。

**2.3 尺骨直径测量** 结果见表 1。

**2.4 免疫组化观察** 结果见表 2。PDGF 阳性产物位于骨细胞基质中,呈棕黄色颗粒状,阳性细胞率 < 25% 为 -, 25% 至 50% 为 +, 50% 至 75% 为 ++, > 75% 为 +++。在空白组 PDFG 术后第 1 周及第 2 周为阴性表达,第 4 周、第 6 周为弱阳性表达;在血小板浓缩液组,随着样本时间延长阳性表达率逐渐增高。

在相同的样本时间, 血小板浓缩液组阳性表达率明显高于空白组。

表 1 空白组及血小板浓缩液组兔尺骨骨痂直径平均值比较表 (n = 20, 单位: mm)

Tab. 1 The comparative table of the mean value of the rabbits' ulnar callus in diameter of control and blood platelet concentrate groups (n = 20, mm)

groups	1st week	2nd week	4th week	6th week
control group	6.98 ± 0.19	7.35 ± 0.12	8.43 ± 0.22	9.27 ± 0.31
blood platelet concentrate group	7.24 ± 0.22	7.48 ± 0.14	8.75 ± 0.25	10.43 ± 0.44
t value	2.83	2.22	3.04	6.82
P value	0.01 < P < 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.01

表 2 空白组及血小板浓缩液组 PDGF 免疫组化观察

Tab. 2 PDGF immunohistochemical observation of control and blood platelet concentrate groups

groups	1st week	2nd week	4th week	6th week
control group	-	-	+	+
blood platelet concentrate group	+	++	+++	+++

### 3 讨论

**3.1 动物模型的建立及意义** ①本实验的动物模型的建立, 以最靠近临床应用条件为目的。技术要求程度高。目前还未见到类似模型。选择兔的尺骨中段单骨折, 采用临床常用的钢板内固定, 而未采用石膏或髓内钉固定。②血小板浓缩液的提取是本实验的难点, 要求无菌性操作。首先考虑兔的血小板计数正常值与人不完全一样, 请检验科医生协助, 取 5 只兔子的股动脉血进行肉眼计数, 平均值为  $500 \times 10^9/L$ 。同时摸索出用 6 ml 兔血加 3.28% 枸橼酸钠 1.5 ml 低速 500 r/min 离心 5 min, 高速 1 000 r/min 离心 7 min, 可提纯出血小板浓缩液 0.5 ml, 设计出特制封闭的试管, 全部流程均在其内进行, 达到了无菌化。提纯的浓缩液显微镜下可见满视野聚集成团, 计数超过兔正常值 3 倍以上, 达到了设计目的。③手术中用明胶海绵吸附浓缩液, 将其放置于骨折旁, 起到聚集、缓慢释放的作用。本实验体会到模型的关键在于取血、浓缩、上钢板, 注入浓缩液要一次完成。虽然兔失血相对较多, 但可防止隔日血小板浓缩液的污染。术后给予庆大霉素每日 1 支, 注射 1 周, 均未出现切口感染及排异反应。

**3.2 PDGF 生长因子的作用** ①骨折的愈合过程主要是通过自分泌和邻分泌生长因子作用实施局部调节, 生长因子大部分由骨细胞产生, 并贮存在其基质中<sup>[1]</sup>。PDGF 首先在血小板内被发现, 浓度最高, 其可促进成骨细胞分裂、增殖, 加速骨折愈合。同时在 PDGF 的刺激下, 成骨细胞可通过产生前列腺素而促进破骨细胞的骨吸收功能。②高浓度的 PDGF 及其它血小板内一些生长因子, 可促进成骨细胞的增殖。

③免疫组化证实, PDGF 与细胞膜上的相应受体结合后, 可调节细胞的有丝分裂。④血小板浓缩液可以与其他材料结合, 组成复合材料可促进骨再生。名古屋大学 Yamada 等<sup>[2]</sup>提出以狗做动物模型, 用血小板浓缩液 (PRP) 与骨髓间充质干细胞 (MSCs) 混合形成的复合物治疗骨缺损的研究。2 个月后将再生骨取出发现骨密度明显优于对照组。因为血小板浓缩液取自样本自身, 样本不会对其产生任何免疫排斥反应。临床应用前景较好。Kitoh 等<sup>[3]</sup>进行了初步的临床研究, 将血小板浓缩液复合组织用在 3 例软骨发育不全的患者身上。骨缺损处平均 23 d 愈合, 未观察到任何并发症。研究看起来是安全的, 风险很小。国内最近报道 PRP 与  $\beta$ -TCP 的复合物的初步临床实验研究, 复合物组较单纯  $\beta$ -TCP 组骨折愈合快, 骨结构生成好。提示 PRP 可促进骨的再生<sup>[4]</sup>。

血小板浓缩液的研究目前已广为关注: PRP 的基础研究越来越深入, 更与细胞培养、人工骨等结合研究<sup>[5]</sup>。本实验用少量的兔血在严格的实验条件下, 制备出血小板浓缩液。同时证实血小板浓缩液加速了骨折断端的愈合。为进一步的研究搭建动物平台及提供了理论基础。

#### 参考文献

- 1 陈建庭, 李菊巨, 金大地. 血小板衍生生长因子促进成骨细胞 DNA 合成的实验研究. 中华外科杂志, 1999, 37(7): 409-411.
- 2 Yamada Y, Ueda M, Hibi H. Translational research for injectable tissue engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet rich plasma: from basic research to clinical case study. Cell Transplant, 2004, 13(4): 343-355.
- 3 Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H. T transplantation of marrow derived mesenchymal stem cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis a preliminary result of three cases. Bone, 2004, 35(4): 892-889.
- 4 张宇, 林野, 邱立新. 血小板血浆促进口腔种植骨再生的临床应用研究. 中华口腔医学杂志, 2004, 39(4): 269-272.
- 5 Marlovits S, Mousavi M, Gabler C. A new simplified technique for producing platelet rich plasma: a short technical note. Eur Spine J, 2004, 13(Suppl 1): 102-106.