

富血小板血浆与骨再生

柯希煌¹, 练克俭²

(福建中医学院骨伤系研究生, 福建 福州 350003; 漳州市第175医院骨科)

【摘要】 富血小板血浆是自体血离心后的产物, 其最初被作为一种生物凝胶和屏障膜应用于临床, 主要作用为提高止血效果。近几年有研究发现富血小板血浆对骨再生有促进作用, 这使其成为骨科领域又一热门的研究课题。本文简要综述了富血小板血浆在组成成分、临床应用、对骨再生的作用机制、最佳作用浓度等方面的研究进展, 并讨论了其目前主要存在的问题。资料表明富血小板血浆含有多种高浓度的骨生长所需要的生长因子, 它们在骨再生的各个不同阶段通过直接或者间接的作用促进着细胞的分化与增殖, 从而促进新骨的生存, 而这种促进骨再生的作用在血小板处于中等浓度浓度时作用最强。目前在国外已有部分学者将富血小板血浆应用于临床, 并取得了一定的疗效, 这有可能使其成为促进骨缺损修复的又一有效方法, 具有良好的应用前景。

【关键词】 血小板; 血浆; 骨再生

Platelet rich plasma and bone regeneration KE Xi-huang^{*}, LIAN Ke-jian^{*} The Fujian TCM College, Fuzhou 350003, Fujian, China

ABSTRACT Platelet rich plasma (PRP) is obtained from autologous blood after centrifugation in a cell separator. Originally, PRP was used in clinic as a biologic plasma and barrier film, in order to enhance the effect of hemostasis. It was reported in the recent years that PRP could promote bone regeneration, which created a new research subject in Orthopaedics. This article reviewed the component, the concentration, the clinical application, the mechanism of its action to bone formation and the present problems of PRP. A lot of research data showed that PRP had high concentration of several growth factors which enhanced the proliferation of bone cell through direct or indirect effects on various stages of bone regeneration, and this improvement effects on bone regeneration is the strongest when the concentration of PRP is moderate. PRP is currently used in clinic in foreign countries and the good curative effects were achieved. PRP has a very good application foreground in the bone rehabilitation.

Key words Blood platelets; Plasma; Bone regeneration

富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 是通过密度梯度离心法从全血中分离产生的, 其本质是血小板浓缩物。PRP最初被作为一种生物凝胶和屏障膜应用于临床, 主要作用为提高止血效果。自1984年Assoulin发现PRP中含有多种生长因子后, 其应用领域不断扩大。1997年Whimian率先将自体PRP应用于口腔科临床; 20世纪90年代初, Marx将PRP引入骨重建领域。由于PRP中含有大量骨再生所需的生长因子, 而且各生长因子的比例是机体自身形成的, 这一特性引起了骨科界众多学者的关注。自Marx之后, 许多学者也相继开展了PRP在骨科领域的应用研究, 并取得了一定的成果。本文试将近几年这一领域的相关研究做一综述。

1 PRP的成份研究

提取PRP的方法众多, 如: MA法, Electro Medics法,

DIDECO Compact Advanced Unit (DCA)法, Harvest Smart PRP Processing Unit法等, 但其均是以密度梯度离心法为基础的。对于离心后PRP中血小板的浓度, 目前结论不一, 从高达全血的2.05倍至11倍均有报道^[1-4]。其中Marx等^[5]认为真正意义上的PRP, 其血小板的浓度大约是全血的4倍, 如果少于4倍, 可能是PRP中混有贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP), 而且PRP的容积约是离心前总容积的20%。PRP中含有大量的生长因子已被证实^[4,5], 其主要有转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、类胰岛素生长因子 (insulin like growth factor, IGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血小板衍生因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等。对于各生长因子在PRP中的具体浓度及其所占比例, 目前研究也还不透彻, 因为受采血者的个体差异, PRP制作方法、检测方法等多方面的影响, 变异很大, 但一般认为其为体内正常浓度的3~17倍^[1,5-7], 个别因子的浓

基金项目: 漳州市科技计划项目基金资助 (编号: Z04051)

通讯作者: 柯希煌 E-mail: kexihuang@sina.com

现地址: 福建省漳州市解放军175医院骨科, 邮编: 363000

度甚至可以高达 30 倍^[8]。

2 PRP 的应用性研究

近年来,国内外的学者们对 PRP 进行了大量的体外实验、动物实验以及临床应用性试验等多方面的研究,许多研究都表明 PRP 对骨再生有积极的促进作用。Max 等^[5]应用自体松质骨复合 PRP 来修复下颌骨肿瘤切除术后遗留的骨缺损,研究发现复合 PRP 的实验组的成骨率是单纯松质骨对照组的 1.62~2.16 倍,骨密度也较对照组增高约 20%。Kith 等^[9]将自体骨髓源骨髓基质干细胞复合 PRP 局部注射于股骨及胫骨矫形术中截骨断端的骨缺损处,用以修复骨缺损,研究发现实验组的骨生成速度明显快于对照组,其中实验组平均骨生长速度为 22 d/cm,而对照组为 37.8 d/cm。Joerg 等^[10]用磷酸三钙(tricalcium phosphate, TCP)复合 PRP 移植行上颌窦底加高术,6 个月后,在术区植入种植体处取新生成的骨组织进行组织学检查,与对照组相比,发现加入 PRP 的实验组新骨形成加快了 8%~10%。Frontana 等^[11]将 PRP 接种于钛质薄片上,植于大鼠的胫骨处,将对侧肢体设立为对照组,观察成骨量的变化,结果发现加有 PRP 的实验组成骨骨量(30±7) cm,明显大于对照组的骨量(16±3) cm。另外 Mazar 等^[12]、Fennis 等^[13]、Yazama 等^[14]、Yamana 等^[15]、Oyama 等^[16]通过研究均得出了与以上几位学者相似的结论。

但由于 PRP 的作用机制复杂,而且影响其疗效的因素众多,因此也有不少学者通过研究认为 PRP 对骨再生没有明显的促进作用。Li 等^[17]用小型猪作为实验对象,分别使用 β-TCR β-TCP+PRP 及自体骨材料移植行腰椎前路融合术,研究发现 β-TCP+PRP 与 β-TCP 组融合率均低于自体骨组的 70%。而 Aghaloo 等^[18]用自体骨复合 PRP 修复兔颅骨 8 mm 的骨缺损,通过对比及统计学分析也发现加入 PRP 并未明显促进骨的生长。Zechner 等^[19]则通过实验发现注入 PRP 的实验组只是在早期使成骨作用有一定的增强,而后期并无明显优势,认为 PRP 对骨的再生与修复的作用有时间依赖性。甚至还有学者认为 PRP 不但不能促进成骨,而且还可能由于生长因子与 BMP 相互竞争,而降低了骨再生能力^[20]。

3 PRP 的作用机制研究

因为对 PRP 在植骨领域中的研究开始不久,对其含有的生长因子的确切成份、浓度、相互间的作用机制等方面研究仍不透彻,导致了当前对 PRP 的具体作用机制仍不明确的现状。现在所提出的各种可能的作用机制也是各学者在自身研究的基础上推测出来的,还缺乏必要的科学性。但对于 PRP 的细胞生物学作用,学者们基本上都认同其源于 PRP 中含有的多种高浓度生长因子的功效。

骨的再生与修复是一个较长的过程,而一般情况下伤口中的血小板寿命及其生长因子作用时间为 5~8 d^[5]。对于一次植入 PRP 却能表现出良好的促进骨再生效果,Max 等^[5]认为其机制在于:PRP 中的 TGF-β 作用于骨髓基质干细胞,可以增强其转化为成骨细胞的活性及数量,而成骨细胞自身又可分泌 TGF-β,从而通过自分泌及旁分泌作用刺激骨细胞形成;另外,由于 PDGF 的作用和移植处死腔与周围正常组织的氧压差(移植处氧分压 5~10 mmHg 正常组织氧分压为

45~55 mmHg),使巨噬细胞游走到移植处,增强巨噬细胞的趋化性及活性,术后 3 d 左右,巨噬细胞将代替血小板,成为生长因子的主要来源,当一次植入的 PDGF 等消亡时,巨噬细胞源生长因子及血管生长因子将取而代之促进骨修复。而 Kassolis 等^[21]认为 PRP 能促进骨再生的机制在于:血小板可能涉及骨损伤早期的应答,其通过 α 颗粒释放 PDGF、TGF-β 和 EGF 等启动机体的修复反应,各生长因子通过协同作用,优化骨组织的修复和再生;而且 PRP 进入植骨块后会形成纤维蛋白网,能诱导具有成骨能力的细胞向损伤区迁移,从而大大提高骨诱导能力。Lai 等^[22]则认为 PRP 中的多种生长因子分别与细胞膜表面相应的受体结合后,传入胞内,经过转录因子 1、丝裂原活化蛋白激酶的调节,引发细胞核内核因子表达改变,从而调节基因转录水平。还有部分学者通过当前已知的生长因子之间的协同作用关系来解释 PRP 的促进成骨能力^[8-10,13,14]。目前认为 PDGF 能使处于静止期(G₁/G₀)的细胞转变为具有复制 DNA 潜能的细胞,而 GF 则可在 PDGF 的基础上,使细胞通过 G₀、G₁ 期进入 S 期进行 DNA 复制,继而发生有丝分裂;另外 VEGF、EGF 等的良好的促进血管内皮细胞增殖、诱导新生血管形成作用在骨再生的过程中也起着巨大作用。

当前已有大量研究证实单独应用特定的某一种或联合应用某几种骨生长因子能获得良好的促进骨生成效果,但部分学者研究发现含有大量高浓度生长因子的 PRP 没有这个作用。分析其原因可能在于:① PRP 对骨再生的作用有明显的时间依赖性及剂量依赖性^[19];② PRP 中的 TGF-β 与骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)同源,它们在受体上存在竞争,从而抑制了 BMP 的活性,进而使具有生骨潜能的骨髓间充质细胞向骨及软骨细胞分化减少;③在血小板过高浓度的环境中,过多的抑制和细胞毒素会影响生长因子的活性^[3]。

4 PRP 的有效浓度研究

大多学者们分析认为之所以出现对 PRP 效果不一的报道,其中可能的一个重要影响因素即为浓度问题,即不同的 PRP 浓度可能表现出不一样的效果。即使是有人提出的 PRP 存在的时间依赖性问题^[19],其最终的落脚点也还是浓度问题,即随着时间的推移出现了局部生长因子浓度的变化。为探讨 PRP 中不同浓度的血小板对骨的再生是否有影响,许多学者作了一系列的相关研究。Weibrich 等^[3]用三种浓度的血小板复合移植体进行实验,这三种浓度分别是:①低浓度血小板,其浓度为全血浓度的 0.5~1.5 倍,血小板计数 164 000~373 000/μl PRP;②中等浓度血小板,其浓度为全血浓度的 2~6 倍,血小板计数 503 000~1 729 000/μl PRP;③高浓度血小板,其浓度为全血浓度的 9~11 倍,血小板计数 1 845 000~3 200 000/μl PRP。通过荧光染色法对比,结果发现,中等浓度组实验侧比对照侧荧光染色剂明显增多,而高浓度组却少,从而认为在行 PRP 移植治疗时,其血小板达到一定数目即可,高浓度的血小板似乎降低了骨的再生能力。另外 Max 等^[5]、Zechner 等^[19]、Kin 等^[23]研究也发现,当血小板的浓度在 1 000 000/μl PRP 左右时,PRP 具有正面效应,能促进骨的再生。

5 前景与存在的问题

PRP来源于自体血液,来源丰富,提取方法简便快捷,价格低廉,无毒性,无免疫源性,不会有传染病的风险,临床应用安全,同时其含有众多高浓度生长因子,且各生长因子的比例与体内正常比例相符,可能具有最佳的协同作用,因此其应用前景广泛。

但在应用 PRP时也还存在许多问题,还有大量的工作要去。首先:虽然当前提取 PRP的方法众多,但都存在着不同的缺陷,如对血小板破坏多、提取纯度不够等,因此要建立一套高效稳定、对血小板破坏小的 PRP制作方法,能为 PRP的移植提供良好的供源。其次,影响 PRP疗效的因素很多,要对它们做进一步的研究,争取在临床应用中避免这些因素,能最大限度发挥 PRP的功效。再次,要为 PRP选择一个良好的载体,因为有研究证实不与任何载体结合时,PRP并不能提高骨再生能力^[24]。另外,当前对 PRP的研究还处于临床观察阶段,病例少,作用机制不明确,缺乏必要的科学性,也需大量研究去继续论证。

参考文献

- Landesberg R, Roy M, Glicman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2003, 58(3): 297-300.
- Roldan JC, Jepsen S, Miller J, et al. Bone formation in the presence of platelet rich plasma vs bone morphogenetic protein-7. *Bone* 2004, 34(1): 80-90.
- Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration in platelet rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004, 34(4): 665-671.
- Okuda K, Kawase T, Momoie M, et al. Platelet rich plasma contains high levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003, 74(6): 849-857.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet rich plasma: a growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998, 85(6): 638-646.
- Sonneleitner D, Huemer P, Sullivan D, et al. A simplified technique for producing platelet rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting technique: a technical note. *J Oral Maxillofac Surg* 2000, 58(6): 879-882.
- Dugrillon A, Eichler H, Kem S, et al. Autologous concentrated platelet rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 2002, 60(6): 615-619.
- Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, et al. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003, 61(2): 157-163.
- Kiuchi H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis—a preliminary result of three cases. *Bone* 2004, 35(4): 892-898.
- Joerg W, Kart AS, Stefan SM, et al. Sinus floor augmentation with β -tricalcium phosphate (β -TCP): Dose platelet rich plasma promotes its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 2003, 14(3): 213-218.
- Frontana S, Onmedo DG, Linares JA, et al. Effect of platelet rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent* 2004, 13(1): 73-78.
- Mazor Z, Peleg M, Garg AK, et al. Platelet rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent* 2004, 13(1): 65-72.
- Fennis JP, Stoelting PJ, Jansen JA, et al. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortical cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004, 33(1): 48-55.
- Yazan AM, Ogata H, Kimura A, et al. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J Craniofac Surg* 2004, 15(3): 439-446.
- Yanama Y, Ueda M, Naki T, et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet rich plasma: tissue engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004, 10(5-6): 955-964.
- Oyama T, Nishimoto S, Sugawara T, et al. Efficacy of platelet rich plasma in a alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 2004, 62(5): 555-558.
- Li H, Zou X, Xue Q, et al. Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bio-ceramics and platelet rich plasma: an experimental study on pigs. *Eur Spine J* 2004, 13(4): 354-358.
- Aghabab TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004, 19(1): 59-65.
- Zechner W, Tang LS, Tepper G, et al. Influence of platelet rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003, 18(1): 15-22.
- Choi BH, Im CJ, Huh JY, et al. Effect of platelet rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004, 33(1): 56-59.
- Kassolis J, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000, 71(10): 1654-1661.
- Lai CF, Cheng SL. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor- β in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2002, 277(18), 15514-15522.
- Kim SG, Chung CH, Kim YK, et al. Use of particulate dentin plaster of Paris combination with/without platelet rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002, 17(1): 86-94.
- Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, et al. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation: An experimental study in dogs. *J Orthop Res* 2004, 22(3): 653-658.

(收稿日期: 2006-02-21 本文编辑: 连智华)