

• 实验研究 •

不同激活比例和干预频率富血小板血浆对大白兔半月板损伤修复的效果研究

仇建军 石文俊 邹翰林 张磊

【摘要】 目的 研究不同激活比例和干预频率富血小板血浆 (PRP) 对兔半月板损伤修复的效果。方法 选取 2021 年 4 月至 2021 年 6 月期间成年健康大白兔 68 只作为研究对象, 所有大白兔双膝均建立半月板损伤模型, 右膝关节腔内注射 PRP 进行干预作为试验组, 左膝关节腔内注射不含 PRP 的凝胶作为对照组, 进行 I 期试验和 II 期试验。I 期试验选取大白兔 36 只进行研究, 按随机数字表法将大白兔右膝关节分为 A、B、C 组, 每组各 12 膝, 其左膝关节为对照组; A、B、C 组 PRP 凝胶制备时的激活比例分别为 3 : 1、5 : 1、7 : 1, 所有大白兔右膝关节腔内每周注射 1 次 PRP 凝胶, 对照组左膝关节腔内每周注射 1 次不含 PRP 的凝胶; 干预后 4、8、12 周, 每组分别处死 4 只大白兔并取半月板进行组织学观察。II 期试验选取大白兔 32 只进行研究, 按随机数字表法将大白兔右膝关节分为 A、B、C、D 组, 每组各 8 膝, 其对应左膝关节为对照 1、2、3、4 组; A 组大白兔右膝关节腔内仅进行 1 次 PRP 凝胶注射治疗, B 组大白兔右膝关节腔内每周进行 1 次 PRP 凝胶注射治疗, C 组大白兔右膝关节腔内每 2 周进行 1 次 PRP 凝胶注射治疗, D 组大白兔右膝关节腔内每 4 周进行 1 次 PRP 凝胶注射治疗, 所有大白兔注射的 PRP 凝胶激活比例为 7 : 1, 对照 1、2、3、4 组同时段大白兔左膝关节腔内分别注射不含 PRP 的凝胶; 在干预后 8、12 周, 每组分别处死 4 只大白兔并取半月板进行组织学观察。**结果** I 期试验 4 周时, A、B、C 组半月板愈合等级差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 3 组与对照组半月板愈合等级差异也均无统计学意义 ($P > 0.05$)。I 期试验 8 周时, A、B、C 半月板愈合等级差异无统计学意义 ($P > 0.05$), A、B 组与对照组半月板愈合等级差异无统计学意义 ($P > 0.05$), C 组与对照组半月板愈合等级差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。I 期试验 12 周时, C 组半月板愈合等级优于 A 组、B 组和对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); A、B 组与对照组半月板愈合等级差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。II 期试验 8、12 周时, A、B、C、D 组半月板愈合等级差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且 4 组半月板愈合等级分别优于对照 1、2、3、4 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 半月板损伤修复效果主要取决于 PRP 凝胶制备时的激活比例, 激活比例 7 : 1 的 PRP 凝胶对半月板损伤修复效果最佳。而 PRP 凝胶注射频率对半月板的影响, 仍需要进一步深入研究。

【关键词】 激活比例; 干预频率; 富血小板血浆; 大白兔; 半月板损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2022.05.013

A study of platelet-rich plasma with different activation ratios and intervention frequencies for meniscus injury rabbits QIU Jianjun, SHI Wenjun, ZOU Hanlin, ZHANG Lei. Department of Orthopedics, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Corresponding author: ZHANG Lei E-mail: doc-zl@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of platelet-rich plasma (PRP) with different activation ratios and intervention frequencies for meniscus injury rabbits. **Methods** Sixty-eight healthy adult rabbits grown from April 2021 to June 2021 in laboratory department were selected as research samples. A meniscus injury animal model of both knees was created. Rabbits with intraarticular PRP injection in the right knee were set as the test group. Rabbits with intraarticular gel injection in the left knee were set as the control group. Phase I and II trials were performed. Thirty-six rabbits were chosen for the phase I trial and randomly divided into group A ($n=12$, PRP gel at 3 : 1), group B ($n=12$, PRP gel at 5 : 1), and group C ($n=12$, PRP gel at 7 : 1). All rabbits were treated once a week. After 4 weeks, 8 weeks, and 12 weeks of intervention, four rabbits from each group were euthanized, and their menisci were harvested for histological examination. Thirty-two rabbits were chosen for the phase II trial and randomly divided into group A ($n=8$, PRP injection once), group B ($n=8$, PRP injection every week), group C ($n=8$, PRP injection every two weeks), and group D ($n=8$, PRP injection every four weeks). PRP ratios for all rabbits were set as 7 : 1. After 8 and 12 weeks of intervention, four rabbits from each group were euthanized, and their menisci were harvested for histological examinations. Repair effects were discussed. **Results** In the fourth week of the trial, the meniscus healing grade among group A, group B, and group C showed no statistically significant difference ($P > 0.05$).

作者单位: 200062, 上海中医药大学附属普陀医院骨科

通信作者: 张磊 E-mail: doc-zl@163.com

The meniscus healing grade in groups A, B, and C was not significantly different from that of the control group ($P>0.05$). In the eighth week of the trial, the meniscus healing grade among groups A, B, and C showed no statistically significant difference ($P>0.05$). The meniscus healing grade in groups A and B was not significantly different from that of the control group ($P>0.05$). The meniscus healing grade between group C and the control group was significantly different ($P<0.05$). Upon the twelfth week of the trial, the meniscus healing grade in group C was significantly better than in group A, group B, and the control group ($P<0.05$). However, the meniscus healing grade among group A, group B, and the control group showed no statistically significant difference ($P>0.05$). In the eighth and twelfth weeks of the phase II trial, the meniscus healing grade among groups A, B, C, and D showed no statistically significant difference ($P>0.05$). The meniscus healing grades in groups A, B, C, and D were better than control group 1, control group 2, control group 3, and control group 4 ($P<0.05$). **Conclusion** The repair effects of meniscus injury rabbits were mainly determined by the activation ratios of PRP gels, especially with 7 : 1 PRP gel. However, the impacts of PRP intervention frequencies on meniscus recovery should be further explored in clinical research.

【Keywords】 Activation ratios; Intervention frequencies; Platelet-rich plasma; Rabbits; Meniscus injury

既往临床认为半月板是无功能的残留物,但随着运动医学的不断发展,对半月板功能的认识越来越深入,半月板的功能也被熟知^[1]。半月板损伤是临床上常见的关节损伤类型,近年越来越多的学者发现富血小板血浆 (PRP) 在半月板损伤修复中起到重要作用,但对于 PRP 的激活方式及比例、应用方式、应用频率均无统一标准^[2]。本研究以大白兔为研究对象,分为 I 期和 II 期试验,分析 PRP 不同激活比例和干预频率对半月板修复的影响,进一步为临床应用 PRP 治疗半月板损伤提供理论依据,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 4 月至 2021 年 6 月期间上海中医药大学附属普陀医院实验室培养的成年健康大白兔 68 只作为研究对象,其中雄性大白兔 35 只,雌性大白兔 33 只,年龄 1~2 岁,平均年龄 (1.4±0.2) 岁,体质量为 2.3~3.3 kg,平均体质量 (2.8±0.3) kg。所有大白兔双膝均建立半月板损伤模型,以关节腔内注射 PRP 凝胶的右膝关节为试验组,以关节腔内注射不含 PRP 凝胶的左膝关节为对照组,进行 I 期试验和 II 期试验。

1.2 方法

1.2.1 半月板损伤建模

所有大白兔双膝进行半月板损伤建模,麻醉后内侧入路切开内侧副韧带做一长 2 cm 弧形的切口,沿髌骨内侧上缘至胫骨结节,切开所有皮肤和皮下组织。半月板拉钩显露出内侧半月板前角、体部和股骨踝软骨面。采用刀片在内侧半月板游离缘做一长 0.6 cm 的纵行全层裂伤,术后缝合关节囊,肌注 60 万单位青霉素以预防术后感染。

1.2.2 PRP 凝胶制备

采集兔血标本置入离心管旋转离心,离心力

200 g,离心时间 10 min。离心结束后兔血呈上、下 2 层,上层为血清,下层为血浆,血清与血浆交界处有一薄层,即为富血小板。保留上层血清,交换血清下层 1~2 mm 处的红细胞,去除含红细胞的底层液体。以 200 g 的离心力对血清液体进行旋转离心 10 min,使血小板聚集在离心管底部。去除离心管内大部分上层血清,约占血清总量的 3/4。将剩余的血清液体摇匀,得到 PRP。在 PRP 中加入激活剂,等待 6~10 s,可形成 PRP 凝胶。

1.2.3 干预方法

I 期试验:将 36 只大白兔右膝关节按随机数字表法分为 A、B、C 3 组,每组各 12 膝,以大白兔左膝关节为对照组。A、B、C 组大白兔右膝关节腔内分别注射激活比例为 3 : 1、5 : 1、7 : 1 的自体 PRP 凝胶,对照组大白兔左膝关节腔注射不含 PRP 的凝胶,每周注射 1 次,且均在注射后使用夹板固定膝关节 2 周。

II 期试验:将 32 只大白兔右膝关节按随机数字表法分为 A、B、C、D 4 组,每组各 8 膝,以大白兔相应左膝关节为对照 1、2、3、4 组。A 组仅进行 1 次右膝关节腔内 PRP 凝胶注射治疗,对照 1 组左膝关节腔注射 1 次不含 PRP 的凝胶;B 组每周进行 1 次右膝关节腔内 PRP 凝胶注射治疗,对照 2 组左膝关节腔每周注射 1 次不含 PRP 的凝胶;C 组每 2 周进行 1 次右膝关节腔 PRP 凝胶注射治疗,对照 3 组左膝关节腔每 2 周注射 1 次不含 PRP 的凝胶;D 组每 4 周进行 1 次右膝关节腔 PRP 凝胶注射治疗,对照 4 组左膝关节腔每 4 周注射 1 次不含的 PRP 凝胶。所有大白兔注射的 PRP 激活比例均为 7 : 1,且在所有治疗结束后进行夹板固定膝关节 2 周。

1.2.4 大白兔处理方法

I 期试验:PRP 凝胶治疗后 4、8、12 周,每组分别以空气栓塞的方式处死 4 只大白兔,取大白

兔半月板,对半月板标本采用10%甲醛固定液固定、洗涤、脱钙、透明、透蜡、包埋等,制备成石蜡切片,苏木精-伊红染色(HE染色),在光学显微镜下观察半月板的结构情况。

II期试验:于PRP凝胶治疗后第8周和第12周,每组分别处死4只大白兔,以空气栓塞的方式处死大白兔,取大白兔半月板,将半月板标本采用10%甲醛固定液固定、洗涤、脱钙、透明、透蜡、包埋等,制备成石蜡切片,HE染色,在光学显微镜下观察半月板的结构情况。

1.3 观察指标

根据石蜡切片观察I、II期试验不同时期大白兔半月板损伤愈合情况。愈合等级评估标准^[1]:I级为损伤区创缘整齐,无纤维组织增生,无幼稚成纤维细胞;II级为损伤区创缘新生胶原纤维,创缘可见软骨细胞密度增大;III级为损伤区创缘内有胶原纤维填充,但填充区域无纤维软骨细胞或未形成软骨陷窝;IV级为损伤区创缘内存在大量胶原纤维填充,有少量纤维软骨细胞或形成软骨陷窝;V级为切片无法辨认创缘,纤维软骨分布均匀。

1.4 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件,计数资料用百分比表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 I期试验

2.1.1 4周时半月板愈合等级比较

I期试验4周时,A、B、C组半月板愈合等级差异无统计学意义($P > 0.05$),3组与对照组半月板愈合等级差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

表1 I期试验4周时半月板愈合等级比较/侧

组别	n	I级/II级/III级/IV级/V级
A组	4	3/1/0/0/0
B组	4	3/1/0/0/0
C组	4	2/2/0/0/0
对照组	12	12/0/0/0/0 ^{abc}
χ^2	-	5.750
P	-	0.124

注:^a表示与A组相比, $P > 0.05$;^b表示与B组相比, $P > 0.05$;^c表示与C组相比, $P > 0.05$

2.1.2 8周时半月板愈合等级比较

I期试验8周时,A、B、C组半月板愈合等级差异无统计学意义($P > 0.05$),A、B组与对照

组半月板愈合等级差异无统计学意义($P > 0.05$),C组与对照组半月板愈合等级差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

表2 I期试验8周时半月板愈合等级比较/侧

组别	n	I级/II级/III级/IV级/V级
A组	4	2/2/0/0/0
B组	4	2/1/1/0/0
C组	4	0/1/1/2/0
对照组	12	12/0/0/0/0 ^{abc}
χ^2	-	15.748
P	-	0.001

注:^a表示与A组相比, $P > 0.05$;^b表示与B组相比, $P > 0.05$;^c表示与C组相比, $P < 0.05$

2.1.3 12周时半月板愈合等级比较

I期试验12周时,C组半月板愈合等级优于A组、B组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);A组、B组与对照组半月板愈合等级差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

A组HE染色显示右侧损伤区内部有胶原纤维组织填充,相互编织连接,但未发现纤维软骨细胞,无软骨凹陷形成(下页图1a)。B组HE染色显示右侧损伤区内部有胶原纤维组织填充,相互编织连接,有软骨陷窝形成(下页图1b)。C组HE染色显示右侧损伤区内部有大量胶原纤维组织填充,相互编织连接,还有少数纤维软骨细胞和软骨陷窝形成(下页图1c)。对照组HE染色显示右侧损伤区创面边缘整齐,无明显纤维组织增生,无幼稚成纤维细胞生成(下页图1d~f)。

表3 I期试验12周时半月板愈合等级比较/侧

组别	n	I级/II级/III级/IV级/V级
A组	4	0/3/1/0/0
B组	4	0/2/2/0/0
C组	4	0/0/1/3/0 ^{ab}
对照组	12	12/0/0/0/0 ^c
χ^2	-	21.963
P	-	0.001

注:^a表示与A组相比, $P < 0.05$;^b表示与B组相比, $P < 0.05$;^c表示与C组相比, $P < 0.05$

2.2 II期试验

2.2.1 8周时半月板愈合等级比较

II期试验8周时,A、B、C、D组半月板愈合等级差异无统计学意义($P > 0.05$);A、B、C、D组半月板愈合等级均优于对照1、2、3、4组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(下页表4)。

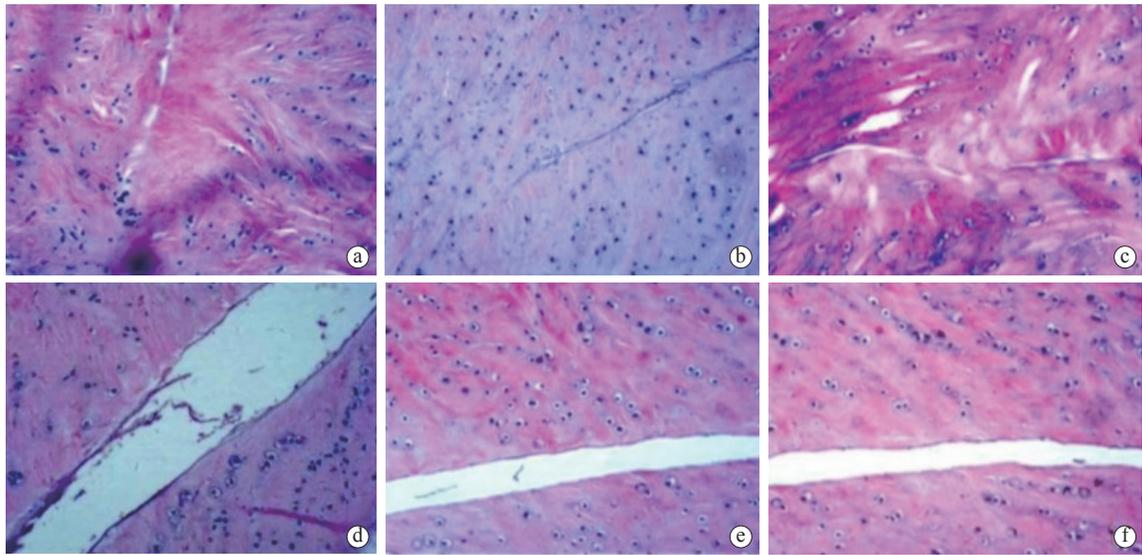


图1 I期试验12周时, HE染色(×100) a. A组 b. B组 c. C组 d~f. 对照组

表4 II期试验8周时半月板愈合等级比较/侧

组别	n	I级/II级/III级/IV级/V级
A组	4	0/2/2/0/0
B组	4	0/2/1/1/0
C组	4	0/1/2/1/0
D组	4	0/1/2/1/0
对照1组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
对照2组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
对照3组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
对照4组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
χ^2	-	36.191
P	-	0.021

注: ^a表示与A组相比, $P < 0.05$; ^b表示与B组相比, $P < 0.05$; ^c表示与C组相比, $P < 0.05$; ^d表示与D组相比, $P < 0.05$

表5 II期试验12周时半月板愈合等级比较/侧

组别	n	I级/II级/III级/IV级/V级
A组	4	0/1/1/2/0
B组	4	0/1/1/2/0
C组	4	0/1/0/3/0
D组	4	0/0/2/2/0
对照1组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
对照2组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
对照3组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
对照4组	4	4/0/0/0/0 ^{abcd}
χ^2	-	38.667
P	-	0.011

注: ^a表示与A组相比, $P < 0.05$; ^b表示与B组相比, $P < 0.05$; ^c表示与C组相比, $P < 0.05$; ^d表示与D组相比, $P < 0.05$

2.2.2 12周时半月板愈合等级比较

II期试验12周时, A、B、C、D 4组半月板愈合等级差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 4组半月板愈合等级均优于对照1、2、3、4组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表5)。

A、B、C、D组 HE染色显示右侧损伤区内部有胶原组织填充, 相互编织连接, 偶有发现软骨陷窝形成 (图2a~d)。对照1、2、3、4组 HE染色显示左侧损伤区局部无明显纤维组织增生, 未发现幼稚成纤维细胞 (图2e~h)。

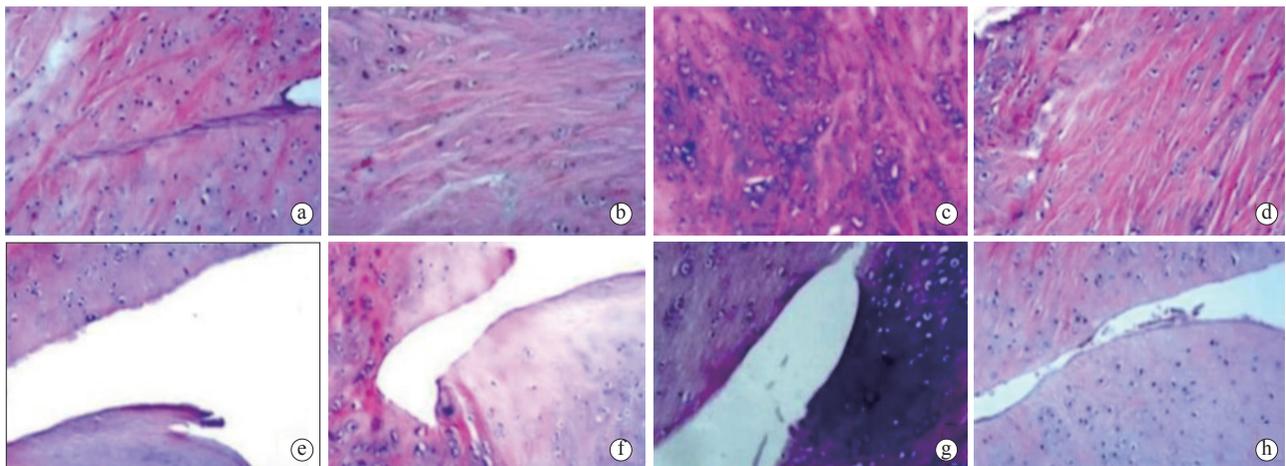


图2 II期试验12周时, HE染色(×100) a. A组 b. B组 c. C组 d. D组 e. 对照1组 f. 对照2组 g. 对照3组 h. 对照4组

3 讨论

PRP来源广泛,制备简单,且安全性较高,被临床广泛应用于组织修复,在肌肉、肌腱、韧带、创面、骨损伤中均具有良好的应用前景^[4-5]。李朝晖等^[6]研究发现,PRP具有损伤小、疗程短、不易复发、安全性高等优势。史昱晖等^[7]研究发现,PRP在缓解膝关节疼痛、改善膝关节功能方面有较好效果,能明显提高关节功能,改善患者生活质量。因此,多数学者认为PRP在修复关节损伤中也有良好效果^[8-10]。

半月板是胫骨关节面上内侧和外侧半月形状骨,其血供局限于外侧1/3,来源于半月板前后角韧带滑膜套。半月板内侧1/3无毛细血管,因此内侧1/3又称为无血运区,由于缺少血供,损伤后难以修复^[11-13]。近年来越来越多的学者进行大量体外研究,发现采用PRP治疗半月板损伤具有较好的修复作用^[14-16]。但体内实验的结果却不尽人意。临床上对于PRP的激活方式、激活比例、应用方式、应用频率等均无统一标准,因此探究PRP的激活比例、应用频率等,有助于为临床应用PRP治疗半月板损伤提供统一标准。本研究对我院培养的大白兔双膝进行半月板损伤建模,应用不同激活比例和不同干预频率分别进行I期和II期试验。I期试验结果显示,在治疗4周后,3:1、5:1以及7:1的PRP激活比例治疗半月板损伤效果并无明显差异,A、B、C组与对照组治疗效果也无明显差异;治疗后8周和12周时,C组半月板愈合等级明显优于A组、B组和对照组。究其原因,前4周治疗效果不明显可能是由于治疗时间尚短,效果并不突出;治疗后8周和12周,7:1激活比例的PRP对半月板损伤的修复效果较佳,明显优于3:1和5:1激活比例的PRP,提示7:1激活比例的PRP修复半月板损伤效果较好。II期试验结果显示,无论治疗8周还是12周,A、B、C、D组半月板愈合等级均无差异,且4组均优于对照1、2、3、4组,结果提示不同干预频率的PRP注射并不会影响PRP对半月板损伤的愈合效果,且对半月板损伤均具有较好修复效果。这可能是由于血小板源性生长因子体内代谢及关节活动影响了组织修复^[17]。

综上所述,半月板损伤修复主要取决于PRP凝胶制备时的激活比例,7:1的PRP凝胶对半月板损伤修复效果最佳。而PRP凝胶注射频率对半

月板的影响,仍然需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 伍卫刚,吴浩波.富血小板血浆联合手术治疗膝关节炎复合半月板损伤[J].中华关节外科杂志(电子版),2021,15(3):369-372.
- [2] Zhang H, Chen S, Qiu M, et al. Lateral meniscus allograft transplantation with platelet-rich plasma injections: a minimum two-year follow-up study[J]. *Knee*, 2018, 25(4): 568-576.
- [3] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎.实用骨科学[M].人民军医出版社,2005:63-64.
- [4] 胡争波,李文虎,袁艾东,等.富血小板血浆治疗慢性半月板损伤的前期疗效观察[J].中华关节外科杂志(电子版),2019,13(1):33-38.
- [5] 秦汉,汪建,张辉,等.关节镜联合富血小板血浆对膝关节半月板损伤患者膝关节功能和生活质量的影响[J].现代生物医学进展,2020,20(5):976-979.
- [6] 李朝晖,蓝国波,黎文勇,等.关节镜联合富血小板血浆治疗老年半月板损伤的短期疗效[J].中华关节外科杂志(电子版),2019,13(2):178-183.
- [7] 史昱晖,陶天奇,朱立帆,等.富血小板血浆对半月板损伤患者炎症及关节功能的影响[J].中华关节外科杂志(电子版),2020,14(3):329-333.
- [8] Kaminski R, Maksymowicz-Wleklik M, Kulinski K, et al. Short-term outcomes of percutaneous trephination with a platelet rich plasma intrameniscal injection for the repair of degenerative meniscal lesions. A prospective, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 856.
- [9] 郎骏,王文波.血小板产物对半月板损伤修复的研究进展[J].现代医学,2019,47(9):1172-1176.
- [10] 马维理,陈国奋.PRP联合关节镜半月板成形术治疗老年膝关节半月板损伤的疗效及对患者关节功能的影响[J].海南医学,2021,32(1):68-71.
- [11] Dai WL, Zhang H, Lin ZM, et al. Efficacy of platelet-rich plasma in arthroscopic repair for discoid lateral meniscus tears[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2019, 20(1): 113.
- [12] 周宙,谭丽娟,陈茂华.富血小板血浆对关节镜治疗膝关节退行性病变患者疗效的影响[J].中国内镜杂志,2019,25(10):73-77.
- [13] 饶东.富血小板血浆联合透明质酸钠治疗老年晚期膝骨关节炎的临床研究[J].实用手外科杂志,2020,34(2):152-154.
- [14] Liu F, Xu H, Huang H. A novel kartogenin-platelet-rich plasma gel enhances chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and promotes wounded meniscus healing in vivo[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 201.
- [15] 齐玮,李春宝,刘玉杰.关节镜下复位缝合富血小板血浆注射治疗陈旧性半月板桶柄样撕裂[J].中国矫形外科杂志,2020,28(10):929-932.
- [16] 吴建伟,陈浩鹏,张天一,等.关节镜联合富血小板血浆治疗老年半月板损伤的短期临床效果评价[J].中国医刊,2020,55(12):1331-1334.
- [17] 陈健,吴波文,徐强,等.关节镜联合富血小板血浆修复半月板疗效的Meta分析[J].中华关节外科杂志(电子版),2020,14(6):709-716.

(收稿日期:2022-04-25)

(本文编辑:卢千语)