

## •综述•

## 血小板衍生物在骨关节炎治疗中的应用

刘哲 唐千 位晓娟 张长青 朱振中

**摘要** 骨关节炎(OA)是一种进展性的慢性退行性关节疾病,目前临床针对早中期OA的有效治疗手段仍十分有限。血小板衍生物是一类来源于血小板的生物制剂,包括富血小板血浆(PRP)、血小板裂解液(PL)及血小板源性外泌体(PL-exo),因其富含多种生物活性分子而被广泛应用于组织的再生修复。近10年来,众多研究表明,相较于口服非甾体类抗炎药或关节腔注射透明质酸钠等传统手段,关节腔注射血小板衍生物能更好地促进OA关节软骨修复,延缓疾病进展,并改善其预后。血小板衍生物的潜在分子机制可能与其所富含的生物活性分子对软骨细胞增殖、细胞外基质代谢及软骨细胞炎症反应等生物学行为的调控相关。该文就血小板衍生物在OA治疗中的研究进展进行综述。

**关键词** 血小板衍生物;骨关节炎;富血小板血浆;血小板裂解液;外泌体

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-7083.2022.06.003

骨关节炎(OA)是一种好发于中老年人群的关节退行性疾病,临床主要表现为进行性关节疼痛、肿胀、僵硬及活动受限<sup>[1]</sup>。随着疾病进展,患者晚期关节功能严重受限,只能接受关节置换治疗,给个人生活及社会经济都带来了沉重的负担<sup>[2]</sup>。而随着人口结构的老龄化,OA发病率显著提高。据统计,在中国40岁以上人群中,OA患者总数已超过1亿人,占比高达46.3%<sup>[3-4]</sup>。然而,目前临床上早中期OA的保守治疗手段如口服非甾体类抗炎药和关节腔封闭治疗(透明质酸钠、糖皮质激素、局麻制剂等)虽然可一定程度上缓解疼痛症状,但对损伤软骨的修复作用欠佳,且无法延缓疾病进展<sup>[5]</sup>。

近年,血小板衍生物被逐渐应用于治疗早中期OA并取得了可观的疗效<sup>[6]</sup>。目前根据制备工艺,应用于OA的血小板衍生物主要有“三代”产品,即富血小板血浆(PRP)、血小板裂解液(PL)及血小板源性外泌体(PL-exo)<sup>[7]</sup>。PRP是通过自体外周血进行梯度离心而获得的浓缩血小板产物,经凝血酶或钙剂的激活,浓缩的血小板可释放丰富的生物活性因子如血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)等以修复损伤软骨。同时,PRP可通过下调白细胞介素(IL)-1、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 等促炎因子的表达,减轻早中期OA

炎症反应<sup>[8]</sup>。目前PRP已广泛应用于OA的临床治疗<sup>[9-10]</sup>。PL是在PRP基础之上进一步冻融、裂解、离心后所得的浓缩生长因子产物。由于去除了细胞成分,PL免疫源性进一步降低。而PL-exo则是在活化的PRP和PL基础上进行超速离心后获得的含有血小板活性成分的细胞外囊泡,其均质性更佳,有效成分得到进一步浓缩<sup>[11]</sup>。目前PL和PL-exo尚处于基础研究阶段。

## 1 PRP

PRP的定义最早由Kingsley等于1954年提出<sup>[12-13]</sup>,并随着其内含生长因子的发现,于20世纪90年代开始应用于颌面外科手术中组织修复以及一些慢性创面的治疗。其后,PRP逐渐用于治疗肌骨运动系统疾病,特别是一些慢性运动损伤及退行性疾病<sup>[14]</sup>。PRP因被证实可以修复损伤软骨,缓解局部炎症反应,近年成为早中期OA治疗的主流手段之一<sup>[15]</sup>。

目前已知PRP中包含1500多种生物活性物质,其中各种生长因子、趋化因子及细胞外基质蛋白在OA软骨修复过程中发挥着重要作用<sup>[8,16]</sup>。软骨组织区别于其他组织,缺少有效的营养供应方式,其损伤后修复较为困难且缓慢<sup>[17]</sup>。维持软骨细胞活性、促进软骨细胞外基质表达及减轻炎症反应对改善OA患者预后,延缓疾病进展具有重要作用<sup>[18]</sup>。Dos Santos等<sup>[19]</sup>的实验表明,PRP可以促进软骨细胞增殖,提高软骨细胞中糖胺聚糖及II型胶原的表达。Ragab等<sup>[20]</sup>则在大鼠OA模型

基金项目:国家自然科学基金(82172400)

作者单位:200233,上海交通大学医学院附属第六人民医院骨科

通信作者:朱振中 E-mail: zzz1129@qq.com

上验证了 PRP 可抑制软骨细胞凋亡信号并下调脂质过氧化物 (LPO) 及 TNF- $\alpha$  等炎症介质的表达水平。Ihnatouski 等<sup>[21]</sup>通过原子力显微镜发现并证实经 PRP 治疗可有效改善兔 OA 软骨组织形变。

Migliorini 等<sup>[22]</sup>在荟萃分析中共计纳入了 30 项有关比较关节腔内注射 PRP 与其他传统生物制剂对 OA 治疗效果的随机对照研究,指出在治疗后第 3、6、12 个月,相较于传统腔内注射制剂(透明质酸或类固醇激素),PRP 可明显缓解关节疼痛并改善运动功能,是更为理想的治疗制剂。而 Abbas 等<sup>[23]</sup>的荟萃分析进一步统计分析白细胞浓度对于 PRP 治疗 OA 效果的影响,认为不同白细胞浓度的 PRP 对于 OA 的治疗效果并无明显区别。

虽然 PRP 对 OA 有着积极的治疗效果,但作为血小板衍生物的“第一代”产品,PRP 仍有一定的局限性。PRP 本质为浓缩的自体血小板,仍保留着较强的免疫原性,所以目前应用于临床治疗的 PRP 大多采用自体回输的方式,这使得一些本身患有血小板相关疾病的患者无法使用。OA 的治疗通常需要多次注射,反复采血对于患者也是不小的负担,同时会增加医源性感染的风险。此外,由于 PRP 的有效成分多为蛋白组分,其有效半衰期短且体外易降解,治疗的稳定性仍有待提高<sup>[8]</sup>。

## 2 PL

PL 是血小板衍生物的“第二代”产品,作为 PRP 的进一步加工制品,其很大程度上去除了富有免疫源性的血小板膜成分,同时保留了具有生物活性的生长因子等蛋白组分。因此,PL 被认为与 PRP 具有相似的生物活性,在基础和临床研究中均被证实可以有效治疗 OA<sup>[24]</sup>。

Pötter 等<sup>[25]</sup>比较 PRP 与 PL 在静态和机械应力下对体外软骨细胞表型和功能的作用,发现 PRP 组与 PL 组软骨糖胺聚糖的表达无显著差异;但在应力环境下,与 PRP 组相比,PL 组软骨细胞亚硝酸盐生成显著减少,而 TGF- $\beta$ 1 表达则明显增加,提示 PL 在体外缓解炎症反应及促软骨生成方面更具优势。Gilbertie 等<sup>[26]</sup>研究发现,PL 可抑制滑膜细胞炎症介质分泌并促进透明质酸合成;用 PL 干预的滑膜细胞条件培养基处理滑膜细胞可促进其细胞外基质蛋白的分泌。Yan 等<sup>[27]</sup>在体内大鼠 OA 模型中验证了 PL 可通过抑制 TNF- $\alpha$  介导核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号,从而抑制炎症反应。此外,Yan 等<sup>[28]</sup>研究发现,相比于 PRP,PL 促干细胞增殖和迁移

的作用更为显著,其分子机制可能与自噬效应蛋白(Beclin-1)依赖性的细胞自噬相关。联合 PL 与脐带间充质干细胞能在 OA 治疗中发挥协同作用。

Al-Ajlouni 等<sup>[29]</sup>通过前瞻性的临床试验研究 PL 对早中期 OA 的治疗效果,在治疗第 32、52 周,通过僵硬、疼痛、症状、日常生活和运动功能 5 个评分量表进行评估,发现关节腔内注射自体 PL 可缓解早中期 OA 患者疼痛症状,提高患者生活质量,改善疾病预后,是一种相对有效且安全的治疗手段。虽然该试验样本量偏小,但却是第一个在临床试验方面评价 PL 对 OA 治疗效果的研究。然而,由于目前 PL 并未广泛应用于 OA 的临床治疗中,所以尚缺少其与 PRP 疗效对比的研究。虽然异体来源的 PL 尚未有应用于 OA 治疗的报道,但其在角膜病和神经退行性疾病中的应用已进入前临床实验阶段<sup>[30]</sup>。

总体而言,相较于 PRP,PL 的制备工艺显著降低了自身的免疫原性,为异体应用提供了可能性,扩大了其临床应用。此外,PRP 对储存温度较敏感,生物有效周期短,而 PL 则可稳定地储存在 0℃ 以下的冷冻环境中,可多次使用。这一定程度上降低了存储及维护成本,以及反复穿刺带来的风险,有效降低了血小板衍生制品在临床应用中的浪费率<sup>[31]</sup>。相较于第一代的 PRP,第二代的 PL 具有相当甚至更优的软骨修复作用及更灵活的使用场景,未来有望取代 PRP 在临床实践中成为新一代的关节腔注射制剂<sup>[24,32]</sup>。

## 3 PL-exo

作为细胞外囊泡的重要组成部分之一,外泌体是一种直径在 30~150 nm 的含有多种蛋白质、核酸及脂质等生物活性成分的微小囊泡<sup>[33]</sup>。外泌体是细胞间传递生物信息的重要纽带,在各种生理及病理过程中都发挥着重要作用。多种细胞来源的外泌体如骨髓、滑膜和脂肪间充质干细胞来源外泌体及 PL-exo 等均已在基础实验中被报道能够有效治疗 OA<sup>[34-35]</sup>。有研究对 PL 进行蛋白质谱分析,发现细胞外囊泡为其主要组分,因此推测 PL-exo 可能是 PL 发挥生物学功能的主要途径<sup>[36]</sup>。目前报道的 PL-exo 的获取来源主要有对 PRP 进行提取和直接对 PL 进行进一步的超速离心加工<sup>[37]</sup>。由于免疫源性的存在以及血细胞的残留,PRP 无法进行多人份的混合(可能会导致凝血),每次只能进行单人份 PRP 的外泌体提取,获取量较少且成

本较高。而 PL 由于免疫成分的剔除, 可以进行一次性的量提取, 但 PL 制备过程中需要反复冻融 PL, 这使得所获得的外泌体膜可能会出现破裂。因此, PRP 与 PL 各有优势, 标准化的制备工艺仍有待进一步研究<sup>[11]</sup>。

2014 年, Torreggiani 等<sup>[38]</sup>首次成功从人 PL 中分离纯化出外泌体, 并对该外泌体组分进行初步分析, 发现 PL-exo 保留了碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、TGF- $\beta$ 、PDGF-BB 等多种组织再生相关生物因子。相较于 PL, PL-exo 白蛋白等血清成分被剔除, 使得有效成分进一步浓缩, 是更为理想的组织修复制剂。随后, Liu 等<sup>[39]</sup>在体内外研究中发现来源于 PRP 或激活 PRP 的 PL-exo 拥有相似的软骨保护作用, 其潜在分子机制可能与激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号转导通路, 抑制软骨细胞凋亡相关。Otahal 等<sup>[40]</sup>比较单纯 PL-exo 与超急性期血清来源外泌体对于软骨细胞的调控, 结果提示两者均能促进细胞外基质合成代谢, 但 PL-exo 可以显著降低 IL-1 等炎症因子的表达水平。

作为血小板衍生物的进一步加工产品, PL-exo 具有良好的均质性、较低的免疫原性及更为浓缩的生物活性组分。此外, 得益于天然的磷脂双分子层的膜结构, PL-exo 能够更好地进入细胞内而发挥作用。虽然目前尚无有关 PL-exo 应用于 OA 的临床对照研究, 但美国梅奥诊所的学者们已成功制备了 PL-exo 冻干粉, 复溶后仍能保持良好的囊泡结构, 并对创面愈合及肌腱具有修复作用<sup>[41-42]</sup>。因此, PL-exo 有望成为一种批量生产的血小板衍生物产品, 可实现标准化生产和异体使用, 有着广阔的临床前景。

#### 4 展望

血小板衍生物目前在 OA 治疗上已取得了许多突破。无论是最初的 PRP 还是后来的 PL 及 PL-exo 都被证实是相对理想的软骨损伤修复制剂。但是目前针对血小板衍生物仍缺乏相对统一的制备工艺、准确的行业规范及基于此的临床应用指南。同时, 目前仍有许多问题如注射后的局部代谢降解、组织在位性及靶向性等亟待解决。此外, 血小板衍生物成分复杂, 其治疗 OA 的具体分子机制仍未阐明, 对相关机制的探索有助于对其进一步的优化提纯。相信未来基于血小板衍生物的治疗手段将不断完善, 并使越来越多的 OA 患者受益。

#### 参考文献

- [1] Kany J, Benkalfate T, Favard L, et al. Osteoarthritis of the shoulder in under-50 year-olds: a multicenter retrospective study of 273 shoulders by the French Society for Shoulder and Elbow (SOFE)[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2021, 107(1): 102756.
- [2] Leifer VP, Katz JN, Losina E. The burden of OA-health services and economics[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(1): 10-16.
- [3] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [4] Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 18.
- [5] Najm A, Alunno A, Gwinnutt JM, et al. Efficacy of intra-articular corticosteroid injections in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Joint Bone Spine, 2021, 88(4): 105198.
- [6] O'Connell B, Wragg NM, Wilson SL. The use of PRP injections in the management of knee osteoarthritis[J]. Cell Tissue Res, 2019, 376(2): 143-152.
- [7] Xie X, Zhang Y, Zhao X, et al. Standardized management of platelet derivatives for tissue regeneration research and applications[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2021, 35(3): 392-398.
- [8] Szwedowski D, Szczepanek J, Paczesny L, et al. The Effect of platelet-rich plasma on the intra-articular microenvironment in knee osteoarthritis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5492.
- [9] Karasavvidis T, Totlis T, Gilat R, et al. Platelet-rich plasma combined with hyaluronic acid improves pain and function compared with hyaluronic acid alone in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. Arthroscopy, 2021, 37(4): 1277-1287.e1.
- [10] Filardo G, Previtelli D, Napoli F, et al. PRP injections for the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Cartilage, 2021, 13(1\_suppl): 364S-375S.
- [11] Saumell-Esnaola M, Delgado D, García Del Caño G, et al. Isolation of platelet-derived exosomes from human platelet-rich plasma: biochemical and morphological characterization[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2861.
- [12] Mościcka P, Przyłipiak A. History of autologous platelet-rich plasma: a short review[J]. J Cosmet Dermatol, 2021, 20(9): 2712-2714.
- [13] Albanese A, Licata ME, Polizzi B, et al. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration[J]. Immun Ageing, 2013, 10(1): 23.
- [14] Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, et al. New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 846045.
- [15] Berney M, McCarroll P, Glynn L, et al. Platelet-rich plasma injections for hip osteoarthritis: a review of the evidence[J]. Ir J Med Sci, 2021, 190(3): 1021-1025.
- [16] Lana JFSD, da Fonseca LF, Macedo RDR, et al. Platelet-rich plasma vs bone marrow aspirate concentrate: an overview of mechanisms of action and orthobiologic synergistic effects[J]. World J Stem Cells, 2021, 13(2): 155-167.



- [17] van Gastel N, Stegen S, Eelen G, et al. Lipid availability determines fate of skeletal progenitor cells via SOX9[J]. *Nature*, 2020, 579(7797): 111-117.
- [18] Hong M, Cheng C, Sun X, et al. Efficacy and safety of intra-articular platelet-rich plasma in osteoarthritis knee: a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 2191926.
- [19] Dos Santos RG, Santos GS, Alkass N, et al. The regenerative mechanisms of platelet-rich plasma: a review[J]. *Cytokine*, 2021, 144: 155560.
- [20] Ragab GH, Halfaya FM, Ahmed OM, et al. Platelet-rich plasma ameliorates monosodium iodoacetate-induced ankle osteoarthritis in the rat model via suppression of inflammation and oxidative stress[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6692432.
- [21] Ihnatouski M, Pauk J, Karev B, et al. Nanomechanical properties of articular cartilage due to the prp injection in experimental osteoarthritis in rabbits[J]. *Molecules*, 2020, 25(16): 3734.
- [22] Migliorini F, Driessen A, Quack V, et al. Comparison between intra-articular infiltrations of placebo, steroids, hyaluronic and PRP for knee osteoarthritis: a Bayesian network meta-analysis[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2020, 141(9): 1473-1490.
- [23] Abbas A, Du JT, Dhotar HS. The effect of leukocyte concentration on platelet-rich plasma injections for knee osteoarthritis: a network meta-analysis[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2022, 104(6): 559-570.
- [24] Meftahpour V, Malekghasemi S, Baghbanzadeh A, et al. Platelet lysate: a promising candidate in regenerative medicine[J]. *Regen Med*, 2021, 16(1): 71-85.
- [25] Pötter N, Westbrook F, Grad S, et al. Evaluation of the influence of platelet-rich plasma (PRP), platelet lysate (PL) and mechanical loading on chondrogenesis in vitro[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20188.
- [26] Gilbertie JM, Long JM, Schubert AG, et al. Pooled platelet-rich plasma lysate therapy increases synovial cell proliferation and hyaluronic acid production while protecting chondrocytes from synovial cell-derived inflammatory mediators[J]. *Front Vet Sci*, 2018, 5: 150.
- [27] Yan L, Zhou L, Xie D, et al. Chondroprotective effects of platelet lysate towards monoiodoacetate-induced arthritis by suppression of TNF- $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B pathway in chondrocytes[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(9): 2797-2811.
- [28] Yan L, Zhou L, Yan B, et al. Growth factors-based beneficial effects of platelet lysate on umbilical cord-derived stem cells and their synergistic use in osteoarthritis treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 857.
- [29] Al-Ajlouni J, Awidi A, Samara O, et al. Safety and efficacy of autologous intra-articular platelet lysates in early and intermediate knee osteoarthritis in humans: a prospective open-label study[J]. *Clin J Sport Med*, 2015, 25(6): 524-528.
- [30] Burnouf T, Goubran HA. Regenerative effect of expired platelet concentrates in human therapy: an update[J]. *Transfus Apher Sci*, 2022, 61(1): 103363.
- [31] Pierce J, Benedetti E, Preslar A, et al. Comparative analyses of industrial-scale human platelet lysate preparations[J]. *Transfusion*, 2017, 57(12): 2858-2869.
- [32] Zamani M, Yaghoubi Y, Movassaghpour A, et al. Novel therapeutic approaches in utilizing platelet lysate in regenerative medicine: are we ready for clinical use?[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17172-17186.
- [33] Mao G, Zhang Z, Hu S, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 247.
- [34] Miao C, Zhou W, Wang X, et al. The research progress of exosomes in osteoarthritis, with particular emphasis on the mediating roles of miRNAs and lncRNAs[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 685623.
- [35] Liu X, Wang L, Ma C, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 470.
- [36] Tang Q, Lim T, Shen LY, et al. Well-dispersed platelet lysate entrapped nanoparticles incorporate with injectable PDLLA-PEG-PDLLA triblock for preferable cartilage engineering application[J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120605.
- [37] Tao SC, Guo SC, Zhang CQ. Platelet-derived extracellular vesicles: an emerging therapeutic approach[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(7): 828-834.
- [38] Torreggiani E, Perut F, Roncuzzi L, et al. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity[J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 137-151.
- [39] Liu X, Wang L, Ma C, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 470.
- [40] Otahal A, Kramer K, Kuten-Pella O, et al. Characterization and chondroprotective effects of extracellular vesicles from plasma- and serum-based autologous blood-derived products for osteoarthritis therapy[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 584050.
- [41] Shi A, Li J, Qiu X, et al. TGF- $\beta$  loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo[J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6616-6631.
- [42] Ren Y, Zhang S, Wang Y, et al. Effects of purified exosome product on rotator cuff tendon-bone healing in vitro and in vivo[J]. *Biomaterials*, 2021, 276: 121019.

( 收稿日期 : 2022-06-28 )

( 本文编辑 : 卢千语 )