

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520091152987

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

共培养条件下富血小板血浆对成骨细胞和肌腱
细胞的增殖与胞浆内钙离子浓度的影响

**The effects of platelet-rich plasma (PRP) on the
proliferation and the concentration of Calcium of osteoblasts and
tenocytes during the process of co-culturing**

厦门大学医学院 09 硕 王南

指导教师姓名: 翟文亮

专 业 名 称: 外科学 (骨外科)

论文提交日期: 2012 年 4 月 20 日

论文答辩时间: 2012 年 5 月 30 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(翟文亮教授)课题(组)的研究成果,获得(军区医学科技创新)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学生理学教研室)实验室完成。

声明人(签名):

2012年06月01日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：

2012年 06 月 01 日

中英文缩略词对照表

ACL: 前交叉韧带
AFA: 自体纤维蛋白黏合剂
ALP: 碱性磷酸酶
BMSCs: 骨髓基质干细胞
BSA: 小牛血清蛋白
CCK-8: 细胞计数试剂盒
Collagen I: I型胶原蛋白
Collagen III: III型胶原蛋白
DMSO: 二甲基亚砷
EGF: 表皮生长因子
FGF: 纤维母细胞生长因子
Fluo-3/AM: 钙离子荧光探针
IGF-I: 胰岛素样生长因子 I
PDGF: 血小板源性生长因子
PluronicF-127: 多元醇表面活性剂
PPP: 贫血小板血浆
PRP: 富血小板血浆
TGF- β : 转化生长因子 β
VCAM-1: 血管细胞粘附分子-1
VEGF: 血管内皮生长因子
Vimentin: 波形蛋白

摘 要

目的: 研究富血小板血浆 (Platelet rich plasma, PRP) 对腱骨愈合过程中肌腱细胞和成骨细胞增殖情况和胞浆内钙离子浓度变化的影响。

方法: 用 transwell 小室建立共培养模型, 用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力, 用激光共聚焦显微镜检测经 fluo-3/AM 染色的胞浆内钙离子浓度的变化。

实验分组: 单独培养成骨细胞组、肌腱细胞组, 单独培养成骨细胞组、肌腱细胞组并各自加入富血小板血浆 (加入小室上层), 分别以成骨细胞和肌腱细胞为待测细胞建立共培养体系但不加入富血小板血浆组, 分别以成骨细胞和肌腱细胞为待测细胞建立共培养体系并且加入富血小板血浆组。

结果: 两种细胞共培养并未加入 PRP 两组生长速度最低, 两种细胞单独培养并未加入 PRP 的两种细胞生长速度居中, 加入 PRP 的各组生长速度最高且同种细胞间未见差别。在此过程中钙离子浓度与细胞增殖能力呈正相关: 两种细胞共培养并未加入 PRP 两组钙离子浓度最低, 两种细胞单独培养并未加入 PRP 的两种细胞钙离子浓度居中, 加入 PRP 的各组钙离子浓度最高且同种细胞单独培养组与共培养组之间未见差别。

结论: 富血小板血浆可以去除两种细胞共培养时彼此的抑制效应, 并提高细胞的增值能力至同样高的水平, 而这种效应是通过提高胞浆内钙离子浓度实现的。

关键词: 腱骨愈合 富血小板血浆 混合培养

Abstract

Objective : The objective of this study was to explore the effects of platelet-rich plasma (PRP) on the proliferation speed and the concentration of Calcium of osteoblasts and tenocytes during the process of tendon-bone healing.

Methods : We established a kind of indirect co-culture system which cultured osteoblasts and tenocytes together indirectly by use of transwell chamber. The proliferation was measured with CCK8 test. And the concentration of Calcium was measured by use of laser confocal microscopy and fluo-3/AM.

Results : The proliferation speed of the group which culturing osteoblasts or tenocytes by use of the indirect co-culture system without PRP was lowest. The proliferation speed of the group culturing osteoblasts or tenocytes without PRP was faster than the former one. The proliferation speed of the other two groups with PRP was fastest. The concentration of intracellular Calcium was proportional to the proliferation speed. The concentration of intracellular Calcium of the group which culturing osteoblasts or tenocytes by use of the indirect co-culture system without PRP was lowest. The concentration of intracellular Calcium of the group culturing osteoblasts or tenocytes without PRP was faster than the former one. The concentration of intracellular Calcium of the other two groups with PRP was fastest.

Conclusions : Platelet-rich plasma (PRP) has the ability not only to wipe off the depression effect of the two kinds of cells while co-culturing them indirectly, but also to improve the proliferation speed to a higher level, during which process the concentration of Calcium would improve either.

Keywords: Tendon-bone healing; Platelet-rich plasma (PRP); Co-culture

目 录

中英文缩略词对照表.....	I
中文摘要及关键词.....	II
英文摘要及关键词.....	III
中文目录.....	IV
英文目录.....	VIII
第一章 绪论.....	1
1.1 腱骨愈合问题的提出.....	1
1.2 富血小板血浆的选取.....	1
1.3 本实验的选题依据.....	5
第二章 实验一 富血小板血浆对共培养条件下肌腱细胞增殖情况的影 响	6
2.1 实验器材.....	6
2.1.1 实验材料.....	6
2.1.2 实验试剂.....	6
2.1.3 实验仪器.....	6
2.2 实验方法.....	7
2.2.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	7
2.2.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	7
2.2.3 间接共培养体系的建立.....	8
2.2.4 生长曲线的绘制.....	8
2.2.5 增殖实验.....	8
2.3 数据统计.....	9

2.4 实验结果	9
2.4.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	9
2.4.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	10
2.4.3 生长曲线的绘制.....	11
2.4.4 增殖实验.....	13
2.5 实验讨论	16
2.5.1 间接共培养模型的建立.....	16
2.5.2 应用富血小板血浆的优势.....	16
第三章 实验二 富血小板血浆对共培养条件下成骨细胞增殖情况的影	
响	18
3.1 实验器材	18
3.1.1 实验材料.....	18
3.1.2 实验试剂.....	18
3.1.3 实验仪器.....	18
3.2 实验方法	18
3.2.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	18
3.2.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	18
3.2.3 间接共培养体系的建立.....	18
3.2.4 生长曲线的绘制.....	18
3.2.5 增殖实验.....	18
3.3 数据统计	19
3.4 实验结果	19
3.4.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	19
3.4.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	19
3.4.3 生长曲线的绘制.....	19
3.4.4 增殖实验.....	19
3.5 实验讨论	23
第四章 实验三 富血小板血浆对共培养条件下肌腱细胞胞浆内钙离子	

浓度的影响	24
4.1 实验器材	24
4.1.1 实验材料.....	24
4.1.2 实验试剂.....	24
4.1.3 实验仪器.....	24
4.2 实验方法	25
4.2.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	25
4.2.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	25
4.2.3 间接共培养体系的建立.....	25
4.2.4 生长曲线的绘制.....	25
4.2.5 胞浆内钙离子浓度的检测.....	25
4.3 数据统计	26
4.4 实验结果	27
4.4.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	27
4.4.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	27
4.4.3 生长曲线的绘制.....	27
4.4.4 胞浆内钙离子浓度的检测.....	27
4.5 实验讨论	30
第五章 实验四 富血小板血浆对共培养条件下成骨细胞胞浆内钙离子浓度的影响	31
5.1 实验器材	31
5.1.1 实验材料.....	31
5.1.2 实验试剂.....	31
5.1.3 实验仪器.....	31
5.2 实验方法	31
5.2.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	31
5.2.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	31
5.2.3 间接共培养体系的建立.....	31
5.2.4 生长曲线的绘制.....	31

5.2.5 胞浆内钙离子浓度的检测.....	31
5.3 数据统计.....	33
5.4 实验结果.....	33
5.4.1 肌腱细胞的原代培养及鉴定.....	33
5.4.2 富血小板血浆（PRP）的制备.....	33
5.4.3 生长曲线的绘制.....	33
5.4.4 胞浆内钙离子浓度的检测.....	33
5.5 实验讨论.....	36
第六章 全文总结.....	37
6.1 本实验创新之处.....	37
6.2 实验结果分析.....	37
6.2.1 细胞增殖方面.....	37
6.2.2 胞浆内钙离子浓度方面.....	37
6.3 实验结论.....	38
6.3.1 两种细胞间的作用.....	38
6.3.2 富血小板血浆的作用.....	38
6.4 不足及展望.....	38
附 录.....	39
附 录 一.....	39
图片.....	39
表格.....	47
附 录 二 中国人民解放军一七五医院伦理委员会同意书.....	54
参 考 文 献.....	55
攻读硕士学位期间发表的学术论文.....	60
致 谢.....	61

Table of Contents

Chinese and English acronym cross-references.....	I
Abstract in Chinese.....	II
Abstract in English.....	III
Table of Contents in Chinese.....	IV
Table of Contents in English.....	VIII
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Tendon-bone lealing.....	1
1.2 Platelet rich plasma.....	1
1.3 Why choose this topic?	5
Chapter 2 Research 1 PRP's impact on tenocytes' proliferation.....	6
2.1 Materials.....	6
2.1.1 Materials.....	6
2.1.2 Reagent.....	6
2.1.3 Instrument.....	6
2.2 Methodds.....	7
2.2.1 Tenocyte culture and identification.....	7
2.2.2 PRP preparation.....	7
2.2.3 Co-culture system.....	8
2.2.4 Growth curves.....	8
2.2.5 Cell proliferation.....	8
2.3 Statistic method.....	9
2.4 Results of this part.....	9
2.4.1 Tenocyte identification.....	9

2.4.2 PRP preparation.....	10
2.4.3 Growth curves.....	11
2.4.4 Cell proliferation.....	13
2.5 Discussion.....	16
2.5.1 Co-culture system.....	16
2.5.2 Why choose PRP?.....	16
Chapter 3 Research 2 PRP's impact on osteoblasts' proliferation.....	18
3.1 Materials.....	18
3.1.1 Materials.....	18
3.1.2 Reagent.....	18
3.1.3 Instrument.....	18
3.2 Methods.....	18
3.2.1 Tenocyte culture and identification.....	18
3.2.2 PRP preparation.....	18
3.2.3 Co-culture system.....	18
3.2.4 Growth curves.....	18
3.2.5 Cell proliferation.....	18
3.3 Statistic method.....	19
3.4 Results of this part.....	19
3.4.1 Tenocyte identification.....	19
3.4.2 PRP preparation.....	19
3.4.3 Growth curves.....	19
3.4.4 Cell proliferation.....	19
3.5 Discussion.....	23
Chapter 4 Research 3 PRP's impact on tenocytes' Calcium concentration	24
4.1 Materials.....	24
4.1.1 Materials.....	24
4.1.2 Reagent.....	24

4.1.3 Instrument.....	24
4.2 Methods.....	25
4.2.1 Tenocyte culture and identification.....	25
4.2.2 PRP preparation.....	25
4.2.3 Co-culture system.....	25
4.2.4 Growth curves.....	25
4.2.5 Concentration of Calcium.....	25
4.3 Statistic method.....	26
4.4 Results of this part.....	27
4.4.1 Tenocyte identification.....	27
4.4.2 PRP preparation.....	27
4.4.3 Growth curves.....	27
4.4.4 Concentration of Calcium.....	27
4.5 Discussion.....	30
Chapter 5 Research 4 PRP's impact on osteoblasts' Calcium concentration	31
5.1 Materials.....	31
5.1.1 Materials.....	31
5.1.2 Reagent.....	31
5.1.3 Instrument.....	31
5.2 Methods.....	31
5.2.1 Tenocyte culture and identification.....	31
5.2.2 PRP preparation.....	31
5.2.3 Co-culture system.....	31
5.2.4 Growth curves.....	31
5.2.5 Concentration of Calcium.....	31
5.3 Statistic method.....	33
5.4 Results of this part.....	33
5.4.1 Tenocyte identification.....	33

5.4.2 PRP preparation.....	33
5.4.3 Growth curves.....	33
5.4.4 Concentration of Calcium.....	33
5.5 Discussion.....	36
Chapter 6 Conclusion and prospect.....	37
6.1 Design creation	37
6.2 Results analysis.....	37
6.2.1 Cell proliferation.....	37
6.2.2 Concentration of Calcium.....	37
6.3 Conclusions.....	38
6.3.1 Interaction between cells.....	38
6.3.2 PRP's impacts.....	38
6.4 Limitations.....	38
Appendix.....	39
Appendix 1	39
Figures.....	39
Tables.....	47
Appendix 2	54
Reference.....	55
Theses.....	60
Acknowledgements.....	61

第一章 前言

1.1 腱骨愈合

在骨科和运动医学当中经常会遇到像肩袖损伤、肌腱移植物重建前后交叉韧带这样的肌腱与骨组织相愈合的问题，愈合的速度和质量关系到最终手术的成败。前交叉韧带（anterior cruciate ligament, ACL）修复主要包括以下几种方式：一种是利用人工韧带重建^[1]，如 LARS 韧带、L-K 韧带等，这些已经用于临床治疗。但是人工合成物有一个缺点：就是其腱-骨愈合的能力不足，因此限制了长期应力作用，并且将造成劳损性松动、断裂，最终使得重建失败。另外，由于人工韧带价格昂贵，其在临床的广泛使用受到进一步限制。另一种是骨-髌韧带-骨重建前交叉韧带^[2]，因为他可以使骨隧道部分的愈合变成直接的骨愈合，所以 ACL 重建的金标准目前仍然是这种方法。然而由于供区损伤症状严重，比如膝前痛，使得这种方法的应用也受到限制。第三种方法是肌腱移植物重建，可以是同种自体移植也可以是异体移植。这种方法目前已经成为研究的热点，而在这之中腱-骨愈合的质量和速度决定了最终手术的成败，然而很多时候它们愈合得并不理想，这会带给患者非常漫长的愈合期和较高的复发率。

1.2 富血小板血浆

富血小板血浆 (Platelet-rich plasma, PRP)——作为一种全血离心后的浓缩物——已经被应用到肌腱和骨组织的愈合过程中。而究其原因，有报道指出，是由于 PRP 中含有较高浓度的各种生长因子^[3-6]，其中主要含有：1，血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)；2，转化生长因子 (transforming growth factor β , TGF- β)；3，血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)；4，类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)；5，表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 等。Slater^[7]在 1995 年利用体外培养骨髓间充质干细胞，之后加用 PRP，从而证明了 PRP 有增快骨髓间充质干细胞的生长的作用。同时，研究者还发现了 PRP 对由骨髓间充质干细胞定向分化而成的成骨细胞的作用：它能使成骨活

性比单一培养成骨细胞要高。这说明 PRP 中所含有的各种较高浓度的生长因子具有促进间充质干细胞和成骨细胞增殖的作用。在另外一项下颌骨重建术的研究中, Tayapongsak^[8]将患者自身纤维蛋白黏合剂(英文名 autologous fibrin adhesive, 即 AFA)注射进骨移植区域, 证明了他可以明显加快骨的修复速度。促进骨组织的愈合一方面依靠骨细胞的增殖, 另一方面依靠新生骨细胞的局部成骨活性的增强。张晔^[9]的实验研究证明, PRP 在具有促进骨细胞增殖效应的同时, 又能够加强它的成骨活性, 因此加强了在骨愈合部位的修复作用。而它的分子基础也许为 PRP 对于骨髓基质干细胞的作用。而这一点是通过 TGF- β 等细胞因子诱发胞核内基因的改变, 进而再由 *cbfal* 启动基因进一步调控而刺激成骨活性增强及骨组织的修复。当今, 富血小板血浆已广泛用于临床科室如: 1, 口腔外科; 2, 整形外科; 3, 胸外科; 4, 骨科; 5, 神经外科等各科室的治疗实验研究。因为 PRP 可以显著地增强骨愈合, 并且因为它来源于自体, 所以不会引起疾病得传播或者免疫排斥反应。另一方面因为 PRP 制作方法简便, 价格便宜, 有很强的临床治疗价值。

因富血小板血浆制作比较简便, 故而受到国内外学者越来越多的关注。其制作和提取方法主要包括两种: 1, 血浆分离置换法; 2, 离心分离法。第一种方法所应用的仪器是多功能医用血成分自动分离设备。用其单采血小板, 由于自动化程度高, 所以采得的 PRP 血小板纯度和浓度都很高。但是, 因为这种方法采血量很多(大约在 150ml 以上), 或由于其需要建立静脉循环通道, 从而在采集血小板后将其他血成分回输者, 因此这种设备价格昂贵, 限制了它在临床治疗中的广泛应用。目前这种方法主要用于血库血小板的采集从而进行成分输血。第二种方法是离心分离法, 这种方法并不需要特别高的制备设备, 并且这种制作方法的步骤相对简单, 因此应用较为广泛。离心分离法制作原理是: 血液中各组成成分沉降系数存在差异。当第 1 次离心后血液被分为主要 3 层, 最底层是红细胞层, 其沉降系数最大; 最上层为血清; 而在交界处有一薄层富血小板层, 它是人体肉眼不易看见的。因此这种方法在 1 次离心后弃去上层血清层, 或者弃去下层红细胞层; 然后改变离心力并进而再次离心, 使血小板进一步分离。两次离心的离心力是有区别的: 当进行第 1 次离心时通常选择较低的离心力, 这样就可以避免血小板过快沉降, 而在第 2 次离心时即采用较高的离心力, 这样就可以在较短时间内使血小板完全沉降下来。有学者指出,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库