

论著·基础研究

A-PRF 促进兔膝关节骨软骨损伤愈合的观察

朱泽宇, 吕成奇, 刘旭凌, 陈昱璐, 邹德荣, 陆家瑜

上海交通大学医学院附属第六人民医院口腔科, 上海 200233

[摘要] **目的**·探讨改良型富血小板纤维蛋白 (advanced platelet-rich fibrin, A-PRF) 在骨软骨再生中的作用。**方法**·获取新西兰兔骨髓间充质干细胞 (bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 和膝关节软骨细胞; 通过低速离心兔心脏血液获得 A-PRF。采用光学显微镜观察 A-PRF 的组织学结构; ELISA 法检测 A-PRF 中生长因子, 包括血小板衍生生长因子、转化生长因子- β 、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子和成纤维细胞生长因子的释放; 采用活/死细胞双染法及 MTT 法检测 A-PRF 对兔 BMSCs 细胞毒性及增殖情况的影响; 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 A-PRF 对兔 BMSCs II 型胶原蛋白、聚集蛋白聚糖、碱性磷酸酶 (ALP) 和骨钙素 (OCN) 基因表达的影响; 使用 transwell 小室测定 A-PRF 对于兔 BMSCs 以及软骨细胞迁移能力的影响。建立兔膝关节骨软骨缺损模型, 将 18 只兔随机分为 3 组: A-PRF 组 ($n=6$) 在缺损处植入 A-PRF; A-PRF+BMSCs 组 ($n=6$) 植入接种兔 BMSCs 的 A-PRF; 对照组 ($n=6$) 不进行植入操作。术后 12 周处死兔, 采用苏木精-伊红 (H-E)、甲苯胺蓝和番红 O-固绿染色进行膝关节标本的组织学观察, 并根据膝关节的表面形态学与组织学情况, 采用国际软骨修复协会 (International Cartilage Repair Society, ICRS) 评分系统进行宏观与组织学评分。**结果**·A-PRF 具有松散的网络结构, 可以缓慢释放生长因子。加入 A-PRF 后, 未观察到其对兔 BMSCs 具有细胞毒性; 在加入 A-PRF 后 24、48 和 72 h, BMSCs 的增殖能力均明显升高 (均 $P<0.05$), 成软骨相关基因 II 型胶原蛋白、聚集蛋白聚糖, 以及成骨相关基因 ALP 和 OCN 均显著上调 (均 $P<0.05$)。加入 A-PRF 后, 兔 BMSCs 与软骨细胞的迁移能力均显著增强 (均 $P<0.05$), 且兔 BMSCs 的迁移能力显著高于软骨细胞 ($P=0.025$)。在兔膝关节缺损模型中, 观察关节表面形态, 可见 A-PRF 组和 A-PRF+BMSCs 组缺损均基本恢复, 而对照组仅有软组织覆盖。在 ICRS 宏观评分方面, A-PRF 组与 A-PRF+BMSCs 组的差异无统计学意义, 但 2 组评分均显著高于对照组 (均 $P<0.05$)。组织学观察显示, A-PRF 组和 A-PRF+BMSCs 组均产生骨软骨修复, 但 A-PRF 组软骨更加成熟, 对照组则形成纤维修复。在 ICRS 组织学评分方面, A-PRF 组与 A-PRF+BMSCs 组的差异无统计学意义, 但 2 组评分均显著高于对照组 (均 $P<0.05$)。**结论**·自体 A-PRF 具有良好的生物相容性和促进 BMSCs 增殖的能力, 在体外和体内均可促进软骨和软骨下骨的修复。

[关键词] 骨软骨损伤; 改良型富血小板纤维蛋白; 生长因子; 硬组织再生**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.01.002 **[中图分类号]** R681.3 **[文献标志码]** A

Observation on A-PRF promoting regeneration of osteochondral defects in rabbit knee joints

ZHU Zeyu, LÜ Chengqi, LIU Xuling, CHEN Yulu, ZOU Derong, LU Jiayu

Department of Stomatology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China

[Abstract] **Objective**·To explore the role of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) in osteochondral regeneration. **Methods**·Bone-marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and knee joint chondrocytes were obtained from New Zealand rabbits. A-PRF was obtained by low-speed centrifugation of the heart blood of rabbits. The histological structure of A-PRF was observed by an optical microscope. The release of growth factors in A-PRF was detected by ELISA, including platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β , insulin-like growth factor, vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor. A-PRF's cytotoxicity and capability for promoting the proliferation of rabbit BMSCs were detected by live/dead double staining and MTT methods. The effect of A-PRF on the gene expression of type II collagen, aggrecan, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) in rabbit BMSCs was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR).

[基金项目] 上海交通大学医学院“双百人”项目 (20191832); 国家自然科学基金 (82071160, 82370933)。**[作者简介]** 朱泽宇 (1998—), 男, 硕士生; 电子信箱: 2929441470@sjtu.edu.cn。**[通信作者]** 陆家瑜, 电子信箱: angelinelu@sjtu.edu.cn。**[Funding Information]** "Two-hundred Talents" Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (20191832); National Natural Science Foundation of China (82071160, 82370933)。**[Corresponding Author]** LU Jiayu, E-mail: angelinelu@sjtu.edu.cn。**[网络首发]** <https://link.cnki.net/urlid/31.2045.R.20231225.1411.002> (2023-12-27 11:38:03)。

Transwell chambers were used to determine the effect of A-PRF on the migration ability of rabbit BMSCs and the chondrocytes. Rabbit knee osteochondral defect models were established, and 18 rabbits were randomly divided into 3 groups. The A-PRF group ($n=6$) was implanted with A-PRF in the defect, the A-PRF+BMSCs group ($n=6$) was implanted with rabbit BMSCs on A-PRF, and the control group ($n=6$) did not undergo implantation. The rabbits were sacrificed 12 weeks after surgery and the knee joint specimens were stained with hematoxylin-eosin (H-E), toluidine blue and safranin O/fast green. Based on the surface morphology and histology of the knee joints, the International Cartilage Repair Society (ICRS) scoring system was used for macroscopic and histological scoring. **Results** · A-PRF had a loose network structure and can slowly release growth factors. No cytotoxicity to rabbit BMSCs was observed after adding A-PRF, and the capability for promoting the proliferation of rabbit BMSCs was significantly increased at 24, 48 and 72 h after adding A-PRF (all $P<0.05$). Chondrogenesis-related gene II collagen and aggrecan, as well as osteogenesis-related genes *ALP* and *OCN* were significantly up-regulated (all $P<0.05$). After adding A-PRF, the migration abilities of rabbit BMSCs and chondrocytes were significantly enhanced (both $P<0.05$), and the migration ability of rabbit BMSCs was significantly higher than that of chondrocytes ($P=0.025$). The joint surface morphology in the rabbit knee joint defect models was observed. It can be seen that the defects in the A-PRF group and the A-PRF+BMSCs group were basically restored, while the defects in the control group were only covered by soft tissue. In the ICRS macroscopic score, there was no statistical difference between the A-PRF group and the A-PRF+BMSCs group, but the scores of the two groups were all significantly higher than those of the control group (all $P<0.05$). According to the histological results, both the A-PRF group and the A-PRF+BMSCs group formed osteochondral repair, but the cartilage in the A-PRF group was more mature, while the control group formed fibrous repair. In the ICRS histological score, there was no statistical difference between the A-PRF group and the A-PRF+BMSCs group, but the scores of both the groups were significantly higher than those of the control group (both $P<0.05$). **Conclusion** · Autologous A-PRF has good biocompatibility and the capability for promoting the proliferation of BMSCs. It can promote the repair of cartilage and subchondral bone both *in vitro* and *in vivo*.

[Key words] osteochondral defect; advanced platelet-rich fibrin (A-PRF); growth factor; hard tissue regeneration

膝关节骨软骨损伤在临床上十分常见, 但骨软组织的再生能力有限。因此, 膝关节骨软骨组织一旦损坏, 便很难自行修复。目前, 组织工程是一种很有潜力的修复骨软骨缺损的方法^[1-4]。研究发现, 富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 是一种从血液分离出来的改良纤维蛋白胶, 可作为细胞支架修复软骨缺损, 作为降解释放的内源性生长因子^[5-6]。在 PRP 的基础上, 进一步的研究^[7-8]表明, 无需使用抗凝剂、凝血酶或氯化钙等任何生化修饰, 便可以从自体全血中获得富血小板纤维蛋白 (platelet-rich fibrin, PRF), 从而最大限度地降低交叉污染的风险。因此, PRF 被视为支持细胞迁移和细胞因子释放的生物愈合基质。可通过较低的离心力以及略微增加离心时间, 将 PRF 进一步修饰为改良型富含血小板的纤维蛋白 (advanced platelet-rich fibrin, A-PRF)。与 PRF 相比, A-PRF 包含更多的生长因子^[9-10]。

A-PRF 含有大量的纤维蛋白以及来源于血小板和白细胞的多种生长因子及细胞因子, 包括血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)^[11-12]。各种因子之间

可协同增强细胞功能, 促进蛋白多糖和 II 型胶原蛋白的合成, 并刺激细胞分裂增殖。此外, A-PRF 凝块表现出更松散的结构, 具有更多的纤维间隙, 并且其中还含有更多的细胞。同时, 即使在血块的远端也能发现白细胞和血小板。一些研究^[13-15]发现, 与 PRP 和 PRF 相比, A-PRF 释放出更多的生长因子, 提示 A-PRF 是一种强大的软骨细胞有丝分裂刺激剂, 是再生医学领域的细胞分化诱导剂。A-PRF 还能增强细胞的迁移能力, 对骨髓、皮肤、根尖、牙龈等来源的间充质干细胞以及神经干细胞均具有募集作用。同时, PRF 也被证明对于软骨细胞具有一定的募集作用^[14,16-17]。这种潜在的募集作用使 A-PRF 在脱细胞支架应用方面具有潜力。

目前, PRF 与 A-PRF 在骨缺损修复中的研究已较为成熟^[18-21], 但是在骨软骨缺损修复中的应用较少。SHEU 等^[22]采用传统 PRF 混合软骨碎片治疗猪股骨髌骨软骨缺损; SUMARTA 等^[23]采用传统 PRF 接种人脐带间充质干细胞, 治疗大鼠下颌骨髌突的软骨缺损, 可以一定程度诱导间充质干细胞增殖与成软骨分化。然而, 由于 A-PRF 的结构更疏松, 所含的细胞因子和生长因子更多, 因此具有更强的成软骨分化诱导能力。ABD EL RAOUF 等^[24]比较了传统 PRF 与 A-PRF 对于软骨细胞的作用, 结果显示 A-PRF 与传统 PRF 均能促进软骨细胞的增殖及骨软骨缺损修复, 但 A-PRF 的促增殖及促组织修复能力相较于传统 PRF

更强,尤其是在组织修复早期。但目前 A-PRF 对于骨髓间充质干细胞 (bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成软骨分化的诱导能力尚未可知。

在本实验中,我们抽取兔心血,通过低速离心获得 A-PRF,检测其对 BMSCs 的生物相容性、增殖、软骨和骨分化能力及迁移能力的影响,并观察 A-PRF 修复兔膝关节骨软骨缺损的作用,以探讨 A-PRF 在软骨和骨再生中的应用价值。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 12月龄健康普通级雄性新西兰兔,平均体质量 2.5 kg。动物购自上海市松江区松联实验动物场,饲养于上海交通大学医学院附属第六人民医院动物实验室。动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2022-0006,使用许可证号为 SYXK (沪) 2021-0028。

1.1.2 主要试剂及仪器 甲基噻唑基二苯基溴化四唑 (MTT) (Amresco, 美国), 10%中性福尔马林固定液 (上海易驰生物科技有限公司, 中国), 二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma, 美国), 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 中国), 活/死细胞染色试剂盒 (ScienCell, 美国), QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, 德国)。

离心机 (TR-18plus; 江苏创英医疗器械有限公司, 中国), iMark 酶标仪 (Bio-Rad, 美国), NanoDrop2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国), 吸收光酶标仪 (ELX808; Bio-tek, 美国), 奥林巴斯光学显微镜 (BX51; 奥林巴斯, 日本), 倒置荧光显微镜 (DMI6000B; Leica, 德国), 7900HT Fast 实时荧光定量 PCR 系统 (ABI, 美国), Transwell 24孔细胞培养小室 (Corning, 美国)。

1.2 兔 BMSCs 与软骨细胞的分离与培养

提取兔 BMSCs, 于兔耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 将兔麻醉后, 使用 16 号骨髓穿刺针连接含有少量肝素的 10 mL 无菌注射器, 从双侧髌前上棘骨髓腔穿刺抽取骨髓共 3~5 mL。将抽取的兔骨髓注入含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中, 离心后弃去上清, 加入培养基后置于 37 °C、体

积分数为 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。将原代 BMSCs 培养 14 d 后, 细胞传代并扩增以备使用。

提取兔软骨细胞, 使用过量戊巴比妥钠麻醉处死兔。在无菌条件下从兔膝关节表面切取软骨组织并剪碎, 在 37 °C 环境中用 0.25% II 型胶原酶溶液消化 3 h。使用移液管吹打 1 min, 静置, 并取上清液离心 (180×g, 5 min), 取沉淀置于含 10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、体积分数为 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养传代获得兔软骨细胞。本研究使用的细胞均为第 3 代。

1.3 A-PRF 的采集制备

抽取 10 mL 兔心血, 低速离心 (281.25×g, 14 min) 获得 A-PRF^[10]。兔心血离心后, 离心管内容物分为 3 层, 自下而上为红细胞沉积层、A-PRF 层和血浆层。使用无菌镊子取出 A-PRF 纤维蛋白凝块, 小心剪去下部的红细胞沉积层, 得到 A-PRF。

1.4 A-PRF 的组织学观察

使用 10% 中性福尔马林固定 A-PRF, 石蜡包埋, 垂直切片 (厚度 5 μm), 用苏木精-伊红染色 (H-E 染色), 光学显微镜 (光镜) 拍摄。

1.5 ELISA 法检测 A-PRF 中生长因子

将 A-PRF 添加到 20 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中并在 37 °C 下孵育。前 1~7 d, 每日收集上清液。采用 ELISA 法量化生长因子 (包括 PDGF、VEGF、TGF-β、IGF、FGF 和 EGF) 的持续释放。具体过程: 将 40 μL 测定稀释剂和 10 μL 样品置于包被有抗体的 96 孔板上, 在 37 °C 下孵育 30 min; 用洗涤缓冲液洗孔 5 次, 用过氧化物酶结合抗体溶液孵育 30 min, 加入酶底物溶液; 避光孵育 15 min 后, 加入 50 μL 终止液终止酶反应; 在 450 nm 处, 在 iMark 酶标仪上测量吸光度。所有样品均分为 3 份重复测试。

1.6 兔 BMSCs 的接种与增殖检测

采用活/死细胞双染法观察 A-PRF 对兔 BMSCs 的细胞毒性。用 A-PRF 培养兔 BMSCs 72 h 后, 每孔加入 100 μL 染色稀释液, 室温避光孵育 30 min, 使用倒置荧光显微镜观察兔 BMSCs 的存活与死亡情况。

采用 MTT 法确定 A-PRF 在培养 24、48 和 72 h 后对 BMSCs 增殖的影响。在每个孵育期后, 每孔加入

50 μL MTT 溶液, 并在 37°C 下孵育 4 h, 使细胞发生反应; 随后加入 150 μL DMSO 以溶解被活细胞还原的紫色甲臞晶体; 使用吸收光酶标仪在 490 nm 处测量所得溶液的吸光度。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 A-PRF 对于兔 BMSCs 基因表达的影响

使用 A-PRF 以及含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基培养兔 BMSCs 7 d, 从中提取总 RNA。对照组中仅使用含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉

表 1 qRT-PCR 引物

Tab 1 Primer sequences for qRT-PCR

Gene	Sequence	
	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Type II collagen	TCCTGTGCGACGACATAAT	CCTTTGGTCTGGTTTCC
Aggrecan	CCCAGAAATCAAATGG	TAGTTGGGCAGCGAGA
ALP	CGTGGCAACTCCATCTT	AGGGTTTCTTGTCGGTGT
OCN	ACTCTGTGCGCCCTGCTG	TCGCTGCCCTCCCTCT

1.8 兔 BMSCs 及软骨细胞迁移的观察

将 A-PRF 剪成约 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ 大小的小块, 置于 24 孔 transwell 的下室, 加入 400 μL 含 10% FBS 与 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基, 对照组中仅于下室加入 400 μL 含 10% FBS 与 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基。将 200 μL 兔 BMSCs 或软骨细胞以 5×10^4 个/mL 接种在 transwell 的上室。孵育 48 h 后, 取出 transwell 小室并用棉签小心擦拭上表面, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min 后, PBS 冲洗, 使用 0.5% 结晶紫染色 10 min, 再冲洗。在 10 倍光镜下, 随机选择 5 个视野并计数。均重复 3 次。

1.9 兔膝关节骨软骨缺损建模、分组及关节评分

于兔耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 进行麻醉。行髌骨外侧切口, 进行髌骨内侧脱位, 显露膝关节。然后, 在髌骨沟制备直径 5 mm、深度 3 mm 的柱状全层骨软骨缺损^[5]。

A-PRF 被切成直径 5 mm、深度 3 mm 的柱状, 用于体内植入。植入前, 将 2×10^7 个/mL 的兔 BMSCs 接种到支架并孵育 4 h。18 只兔随机分为 3 组: A-PRF 组 ($n=6$) 植入 A-PRF; A-PRF+BMSCs 组 ($n=6$) 植入 A-PRF+BMSCs; 对照组 ($n=6$) 不进行植入操作。

术后 12 周处死兔, 采用国际软骨修复协会 (International Cartilage Repair Society, ICRS) 宏观评

估评分进行关节表面形态学和目视评估^[25]。取出植入的标本固定在 10% 中性福尔马林中, 然后将脱钙的标本包埋在石蜡中并垂直切片 (厚 5 μm)。对标本进行苏木精-伊红 (H-E)、甲苯胺蓝和番红 O-固绿染色 (甲苯胺蓝和番红 O 染色可以结合软骨中带负电荷的蛋白多糖), 观察软骨基质的分布、植入物 A-PRF 软骨界面的愈合、新软骨与软骨下骨的结合, 以及 A-PRF 的体内降解。根据 ICRS 评分系统, 由 3 名观察员评估再生组织的质量^[26]。

估评分进行关节表面形态学和目视评估^[25]。取出植入的标本固定在 10% 中性福尔马林中, 然后将脱钙的标本包埋在石蜡中并垂直切片 (厚 5 μm)。对标本进行苏木精-伊红 (H-E)、甲苯胺蓝和番红 O-固绿染色 (甲苯胺蓝和番红 O 染色可以结合软骨中带负电荷的蛋白多糖), 观察软骨基质的分布、植入物 A-PRF 软骨界面的愈合、新软骨与软骨下骨的结合, 以及 A-PRF 的体内降解。根据 ICRS 评分系统, 由 3 名观察员评估再生组织的质量^[26]。

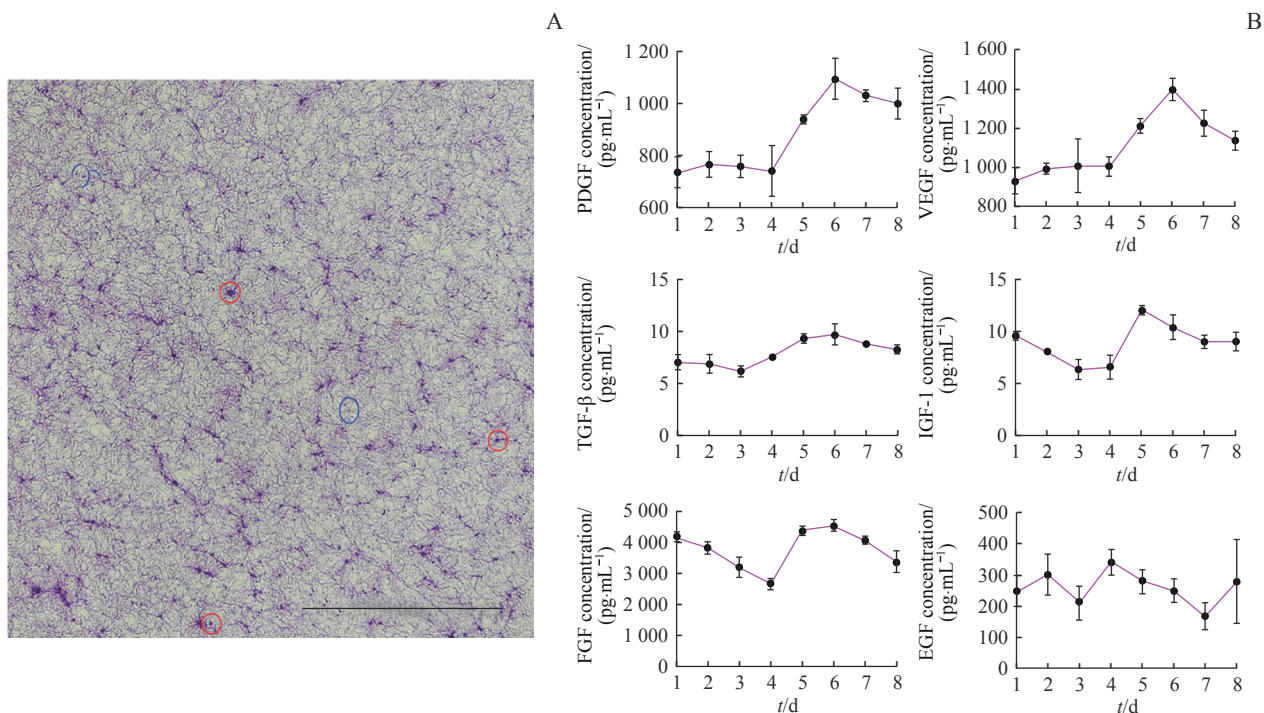
1.10 统计学分析

所有测量值均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行 one-way ANOVA 方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A-PRF 的组织学观察及生长因子的持续释放

A-PRF 的 H-E 染色显示稀疏的纤维网状结构, 其中捕获了白细胞和血小板 (图 1A)。疏松的组织学结构提示其可能有利于细胞的黏附、生长以及营养物质运输, 是一种良好的支架材料。ELISA 法观察到 PDGF、VEGF、TGF- β 、IGF-1、FGF 和 EGF 等分泌性生长因子持续释放 (图 1B), 提示 A-PRF 可能具有促进增殖、诱导分化的能力。



Note: A. H-E staining of A-PRF. Sparse fibrous reticular structures were shown, which trapped white blood cells (red circles) and platelets (blue circles). Scale bar=50 μm. B. Sustained release of growth factors of A-PRF in PBS.

图1 A-PRF 组织结构的光镜观察及生长因子释放

Fig 1 Observation of tissue structure under light microscope and growth factor release of A-PRF

2.2 A-PRF 对兔 BMSCs 的细胞毒性及细胞增殖检测

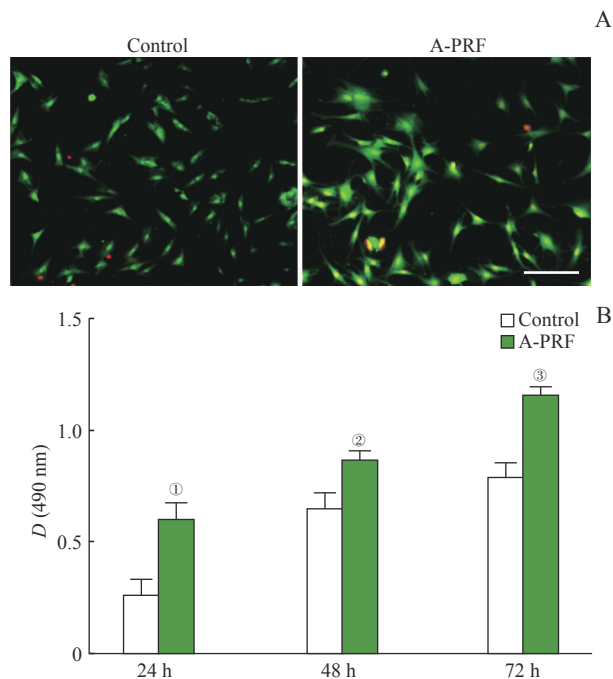
活/死细胞双染结果 (图 2A) 显示: 大部分 BMSCs 呈绿色, 为活细胞; 极少数呈红色, 为死细胞; 说明 A-PRF 对于 BMSCs 未表现出细胞毒性。加入 A-PRF 后 24、48 和 72 h, BMSCs 的增殖能力明显高于对照组 (图 2B), 表明 A-PRF 具有促 BMSCs 增殖作用, 进一步证实了 A-PRF 良好的生物相容性。

2.3 BMSCs 的基因表达

qRT-PCR 检测经 A-PRF 处理的兔 BMSCs 中软骨特异性标志物的表达。结果显示, 与对照组相比, 软骨特异性标志物 type II collagen 和 aggrecan 的 mRNA 表达上调, 骨特异性标志物 ALP 和 OCN 的 mRNA 表达也上调 (图 3)。

2.4 A-PRF 对于兔 BMSCs 及软骨细胞迁移能力的影响

当培养基中仅存在 FBS 时, 兔 BMSCs 与软骨细胞的迁移能力比较, 差异无统计学意义 ($P=0.962$); 当在培养基中加入 A-PRF 时, 兔 BMSCs 与软骨细胞的迁移能力均显著增强 (均 $P<0.05$); 加入 A-PRF

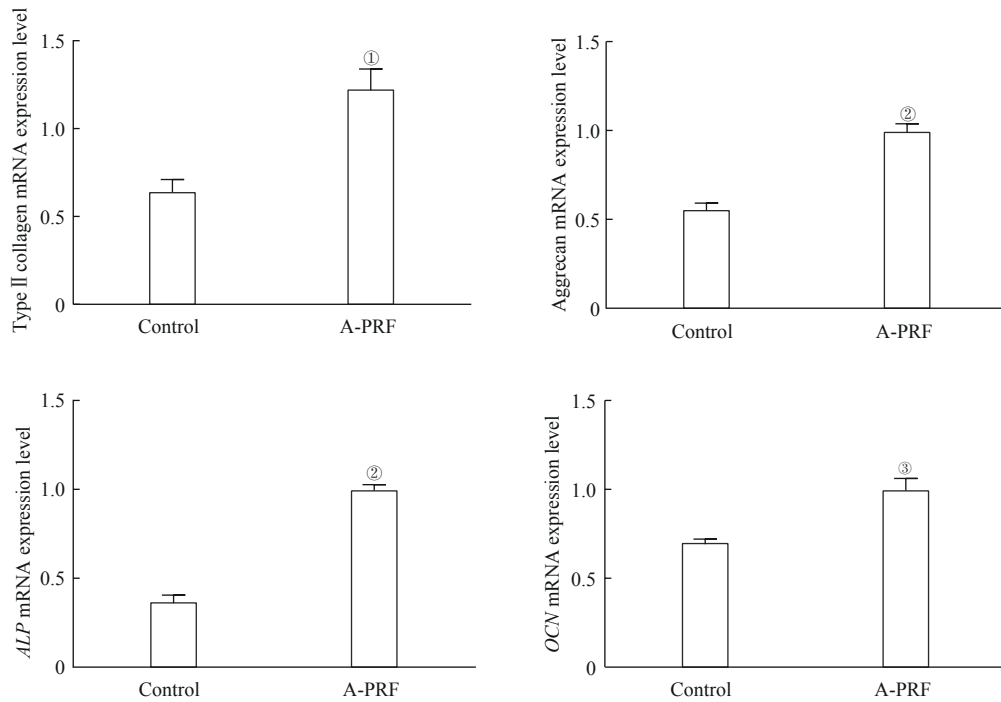


Note: A. Live/dead double staining. Scale bar=100 μm. B. The results of proliferative capacity test. ① $P=0.015$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.005$, compared with the control group.

图2 A-PRF 的细胞毒性与促增殖能力检测

Fig 2 Cytotoxicity and proliferative capacity of A-PRF

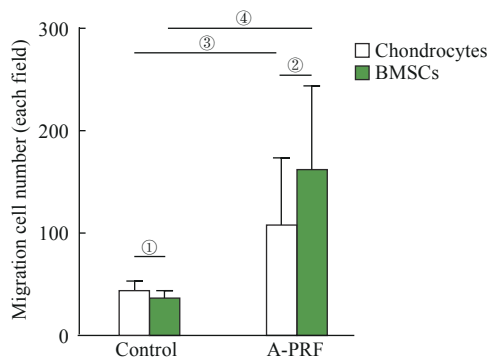
后, 兔 BMSCs 的迁移能力显著高于软骨细胞 ($P=0.025$)。详见图 4。



Note: ^①P=0.032, ^②P=0.000, ^③P=0.007, compared with the control group.

图3 经A-PRF处理后兔BMSCs体外成软骨与成骨基因表达分析(n=3)

Fig 3 Gene expression analysis of *in vitro* chondrogenesis and osteogenesis of rabbit BMSCs treated by A-PRF (n=3)



Note: ^①P=0.962, ^②P=0.025, ^③P=0.006, ^④P=0.000.

图4 A-PRF对兔BMSCs与软骨细胞迁移能力的影响

Fig 4 Effect of A-PRF on the migration ability of rabbit BMSCs and chondrocytes

2.5 A-PRF对兔膝关节骨软骨缺损的修复作用

在兔膝关节骨软骨缺损模型建造并施行骨软骨缺损修复术后12周内, 所有兔均恢复良好, 未出现明显感染等症状。取出标本后观察关节面, A-PRF组和A-PRF+BMSCs组软骨缺损基本恢复, 而对照组仅有软组织覆盖(图5)。A-PRF组和A-PRF+BMSCs组ICRS宏观评分比较, 差异无统计学意义, 但2组评分均显著高于对照组(均P<0.05, 图6A)。组织学观察显示, A-PRF组和A-PRF+BMSCs组的软骨缺损处基本被新的软骨组织填满, 2组的软骨下骨缺损也被新骨组织填充, 植入物与周围的天然软骨和软骨下骨

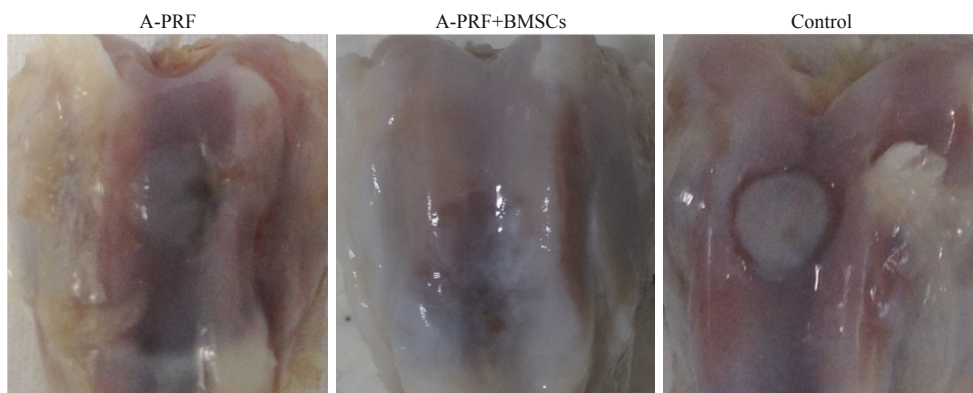
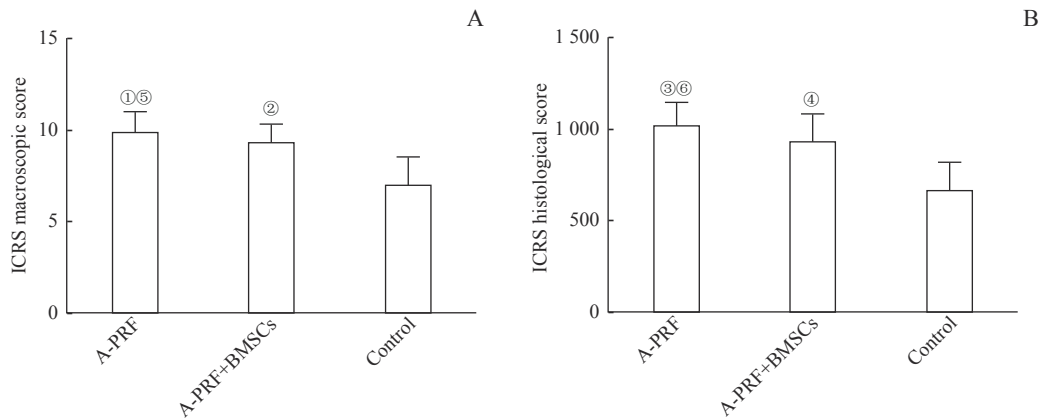


图5 膝关节标本的大体观察

Fig 5 General observation of knee joint specimens

结合良好，没有明显的纤维组织界面（图 7A）。A-PRF 组再生软骨和软骨下骨层厚度与邻近宿主组织相当，成熟的软骨下骨小梁结构与宿主相似；关节软骨与软骨下骨之间的潮线结构是连续的，是成熟软骨的典型特征。A-PRF+BMSCs 组新生软骨层厚度明显大于 A-PRF 组，表面纤维软骨膜较厚，新生

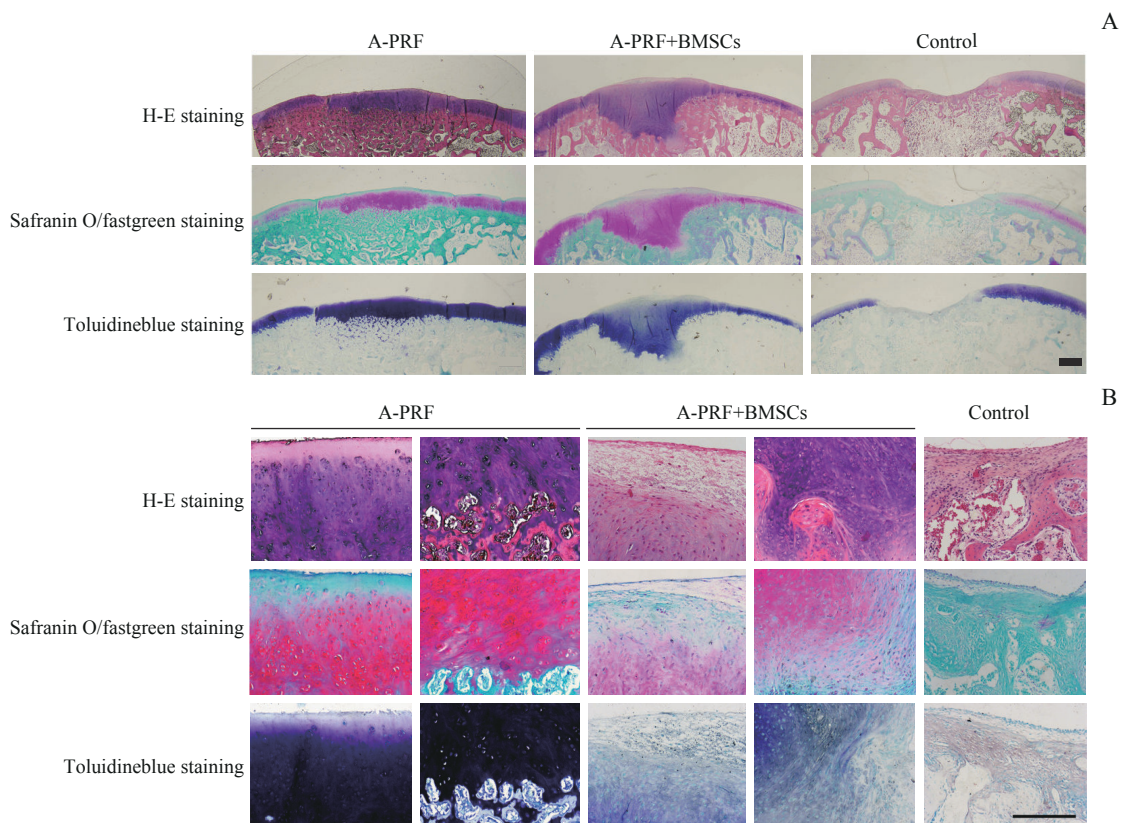
软骨和软骨下骨尚未重建成熟，潮线结构略显不清晰。对照组缺损区域无明显新生软骨和骨覆盖，仅有纤维组织覆盖（图 7B）。在 ICRS 组织学评分中，A-PRF 组评分高于 A-PRF+BMSCs 组，但差异无统计学意义，而 2 组评分均显著高于对照组（均 $P < 0.05$ ，图 6B）。



Note: A. ICRS macroscopic score. B. ICRS histological score. ① $P=0.003$, ② $P=0.011$, ③ $P=0.002$, ④ $P=0.019$, compared with the control group. ⑤ $P=0.767$, ⑥ $P=0.534$, compared with the A-PRF+BMSCs group.

图 6 A-PRF 和 BMSCs 在骨软骨修复体内实验中的定量评估 ($n=6$)

Fig 6 *In vivo*-quantitative assessment of A-PRF and BMSCs in osteochondral repair ($n=6$)



Note: A. Scale bar=1 mm. B. Scale bar=50 μm.

图 7 膝关节标本的组织学观察

Fig 7 Histological observation of knee joint specimens

3 讨论

活动关节周围的软骨在支撑机械负荷和促进运动方面发挥作用,其降解会导致剧烈疼痛和运动障碍。如果新组织不能在结构上与天然软骨结合,即使是最先进的生物和材料也无法成功地形成软骨替代品。因此新基质和原始基质之间整合不良,可能导致了許多软骨组织工程中的再生修复失败^[27]。

低速长时间离心得到的A-PRF是一种高孔隙率、高含水量的自体纤维蛋白支架,可以很好地模拟软骨和骨骼的生物学特性。A-PRF具有良好的生物相容性,可以促进BMSCs的增殖。由于BMSCs具有软骨形成能力,已被用于软骨修复。当其被添加到软骨缺损处时,自体支架可以很好地接触缺损周围的天然软骨和软骨下骨,并且不会产生免疫排斥反应。多孔的三维网状结构有利于携带细胞、血小板和生长因子,可以为它们提供适宜的短期庇护环境;这种结构还非常有利于氧气和营养物质的扩散,可以为细胞增殖和分化提供适宜的环境^[28]。同时,细胞和生长因子可以通过化学键与纤维蛋白结合,更稳定地储存在内部,从而减少制备过程中细胞和生长因子的损失。在此过程中,通过收集更多的细胞,白细胞层增厚,并获得更高比例的中性粒细胞及更多的血小板^[29]。在纤维蛋白降解过程中,血小板可在没有任何人工制剂的情况下不断被激活并释放生长因子,从而避免全身或局部免疫反应的风险。这种疏松多孔的三维结构以及含有更多细胞和生长因子的特殊结构,使得A-PRF在促进血管生成和软硬组织再生方面具有明显的优势。

水分占关节软骨湿重的80%左右^[30]。为了模拟这种环境,富含水分的三维水凝胶网络已成为原位软骨再生的热门选择。作为一种水凝胶,A-PRF主要由纤维蛋白组成。纤维蛋白为细胞生长提供了天然的微环境,具有支持细胞附着以及刺激细胞外基质合成和组装的天然倾向,从而促进蛋白多糖和Ⅱ型胶原蛋白的产生^[24]。然而,当将这种纤维蛋白水凝胶植入体内时,由于其机械强度弱于周围组织,也会发生降解。但其与基质间的交联可以提高其机械完整性并减缓其降解,同时对嵌入其中的细胞也有显著影响^[31-32]。A-PRF中的生长因子,如PDGF、TGF- β 、IGF、VEGF、EGF和FGF,已显示出促进软骨和骨再生的潜力^[33-34]。这种功能化支架在降解过程中可

释放结合调节成分,从而增强缺损处的骨软骨再生。

本研究结果显示,A-PRF可以显著上调Ⅱ型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖的基因表达。Ⅱ型胶原蛋白与聚集蛋白聚糖均为成软骨分化时表达的特异性基因。其中Ⅱ型胶原蛋白是软骨细胞增殖期的特异性标志物,聚集蛋白聚糖则是软骨细胞外基质的主要组成物质,这2种基因所表达的蛋白对关节软骨的稳定与功能有重大影响。这2种基因的同时表达表明了A-PRF有利于BMSCs分泌软骨基质,并且可以诱导BMSCs向关节透明样软骨细胞分化,而非成纤维样软骨细胞,最终可能形成具有良好结构与功能的软骨。同时,经A-PRF处理的BMSCs中的ALP和OCN成骨基因表达也显著上调。ALP与OCN是成骨特异性基因。其中,ALP是公认的成骨细胞特异性基因,其表达上调代表兔BMSCs在A-PRF的作用下,向成骨细胞分化、增殖,并且周围基质开始成熟,骨组织修复进入了成骨早期阶段;OCN则可以与钙离子结合,调节钙离子稳态与骨骼矿化,其表达上调也证明了兔BMSCs的成骨分化,表明骨组织修复进入了中晚期的矿化阶段。因此,这2种成骨特异性基因的上调,表明A-PRF有助于成骨分化^[35]。

此外,本研究结果显示,A-PRF也能促进兔BMSCs的迁移,且其效果显著优于对周围软骨细胞的趋化作用。该结果说明A-PRF可能对于兔体内的间充质干细胞也具有促进其归巢的作用。

在膝关节骨软骨缺损动物模型中,A-PRF组新形成的软骨基本充满缺损区,并与缺损区周围的天然软骨结合良好,无明显的纤维组织界面。在体外PBS中,A-PRF纤维支架至少可以维持2个月。由此可见,A-PRF的降解率与膝关节缺损处新生软骨的再生率基本一致。A-PRF中的生长因子可能在促进软骨和软骨下骨再生中发挥作用。A-PRF可促进BMSCs表达Ⅱ型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖等软骨细胞相关基因。Ⅱ型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖是软骨基质的主要成分,它们的分泌和沉积促进软骨再生。因此,A-PRF可以显著促进兔BMSCs原位成软骨分化,也不再依赖以往软骨组织工程中对于体外软骨细胞培养的需求。A-PRF可促进BMSCs成骨细胞相关基因ALP和OCN的表达,说明A-PRF也具有促进软骨下骨修复的潜力。A-PRF对兔BMSCs以及软骨细胞迁移能力的促进作用,进一步提示其在体内具有潜在的细胞募集能力,具有巨大的应用潜力。

在 A-PRF+BMSCs 组中, 新生软骨的厚度大于 A-PRF 组。这是因为 A-PRF 疏松的纤维网状结构可携带大量 BMSCs, 可以显著促进软骨基质的分泌和沉积, 用于关节软骨缺损的修复和再生。然而, 过度增厚的再生软骨伴随着较厚的纤维软骨膜和不完整的潮线结构, 这提示含有大量 BMSCs 的 A-PRF 可显著促进软骨再生, 但新生软骨在术后 3 个月内未完成重建成熟。A-PRF 组新生软骨和软骨下骨组织基本重建成熟, 形态与周围宿主组织基本一致, 说明 A-PRF 本身可以完成全层骨软骨缺损的修复。同迁移能力检测结果一样, A-PRF 可能可以通过募集体内自体的间充质干细胞, 对兔膝关节组织进行再生修复。因此, 脱细胞的 A-PRF 在体内的治疗效果与加入种子细胞兔 BMSCs 的 A-PRF 比较, 并没有显著差异。该结果也与 CHENG 等^[36] 在颞下颌关节软骨组织再生修复中所观察到的结果一致。脱细胞 A-PRF 避免了提取 BMSCs 的创伤, 减少了 BMSCs 体外增殖及材料接种的过程, 缩短了植入前的准备时间, 也避免了与 FBS 等难以确定具体组分物质的接触培养, 降低了治疗中的不确定性、潜在的免疫反应和病原感染风险, 因此具有巨大的软骨及软骨下骨缺损修复的应用潜力。

综上所述, 自体 A-PRF 具有良好的生物相容性, 可以促进 BMSCs 的增殖。这种多孔的三维网络结构有利于携带细胞、血小板和生长因子, 并在降解过程中释放它们。A-PRF 可促进 BMSCs 表达软骨细胞相关基因 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖, 以及成骨细胞相关基因 *ALP* 和 *OCN*。单独使用 A-PRF 可修复兔膝

关节全层软骨缺损, 在软骨和软骨下骨再生方面具有巨大应用潜力。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属第六人民医院动物福利伦理委员会的审核批准 (动物福利伦理审查受理号 DWLL2023-0440)。动物选择、管理和实验方案均符合 ARRIVE 指南。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Animal Welfare Ethics Committee of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, (Approval Letter No. DWLL2023-0440, dated 30/05/2023), and all animal selection, management and experimental protocols were carried out by following the ARRIVE guidelines.

作者贡献/Authors' Contributions

朱泽宇、陆家瑜、邹德荣参与了实验设计; 朱泽宇、吕成奇、陈昱璐参与了实验操作; 吕成奇负责数据分析; 朱泽宇、刘旭凌、陈昱璐、陆家瑜、邹德荣参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by ZHU Zeyu, LU Jiayu and ZOU Derong. The experiments were completed by ZHU Zeyu, LÜ Chengqi and CHEN Yulu. The data was analyzed by LÜ Chengqi. The manuscript was drafted and revised by ZHU Zeyu, LIU Xuling, CHEN Yulu, LU Jiayu and ZOU Derong. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-05-30
- Accepted: 2023-09-12
- Published online: 2023-12-27

参·考·文·献

- [1] GETGOOD A, BROOKS R, FORTIER L, et al. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2009, 91(5): 565-576.
- [2] STEINWACHS M R, GUGGI T, KREUZ P C. Marrow stimulation techniques[J]. *Injury*, 2008, 39 (Suppl 1): S26-S31.
- [3] HANGODY L, VÁSÁRHELYI G, HANGODY L R, et al. Autologous osteochondral grafting: technique and long-term results[J]. *Injury*, 2008, 39 (Suppl 1): S32-S39.
- [4] REVELL C M, ATHANASIOU K A. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(1): 1-15.
- [5] XIE X, WANG Y, ZHAO C, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29): 7008-7018.
- [6] KESIKBURUN S. Intra-articular platelet-rich plasma injections were not superior to viscosupplementation for early knee degeneration[J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(16): 228.
- [7] STELLER D, HERBST N, PRIES R, et al. Impact of incubation method on the release of growth factors in non-Ca²⁺-activated PRP, Ca²⁺-activated PRP, PRF and A-PRF[J]. *J Cranio Maxillo Facial Surg*, 2019, 47(2): 365-372.
- [8] DOHAN EHRENFEST D M, RASMUSSEN L, ALBREKTSSON T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(3): 158-167.
- [9] CLARK D, RAJENDRAN Y, PAYDAR S, et al. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: a randomized controlled clinical trial[J]. *J Periodontol*, 2018, 89(4): 379-387.
- [10] GHANAATI S, BOOMS P, ORLOWSKA A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells[J]. *J Oral Implantol*, 2014, 40(6): 679-689.

- [11] EGGLE K, SALMA I, DUBNIKA A. From blood to regenerative tissue: how autologous platelet-rich fibrin can be combined with other materials to ensure controlled drug and growth factor release[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11553.
- [12] MASUKI H, OKUDERA T, WATANEBE T, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF)[J]. *Int J Implant Dent*, 2016, 2(1): 19.
- [13] YU M, WANG X, LIU Y, et al. Correction to: cytokine release kinetics of concentrated growth factors in different scaffolds[J]. *Clin Oral Investig*, 2019, 23(4): 1999.
- [14] WONG C C, OU K L, LIN Y H, et al. Platelet-rich fibrin facilitates one-stage cartilage repair by promoting chondrocytes viability, migration, and matrix synthesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): E577.
- [15] NARAYANASWAMY R, PATRO B P, JEYARAMAN N, et al. Evolution and clinical advances of platelet-rich fibrin in musculoskeletal regeneration[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2023, 10(1): 58.
- [16] WONG C C, KUO T F, YANG T L, et al. Platelet-rich fibrin facilitates rabbit meniscal repair by promoting meniscocytes proliferation, migration, and extracellular matrix synthesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): E1722.
- [17] WONG C C, CHEN C H, CHAN W P, et al. Single-stage cartilage repair using platelet-rich fibrin scaffolds with autologous cartilaginous grafts[J]. *Am J Sports Med*, 2017, 45(13): 3128-3142.
- [18] DA SILVA L M P, SÁVIO D S F, DE ÁVILA F C, et al. Comparison of the effects of platelet concentrates produced by high and low-speed centrifugation protocols on the healing of critical-size defects in rat calvaria: a microtomographic and histomorphometric study[J]. *Platelets*, 2022, 33(8): 1175-1184.
- [19] ENGLER-PINTO A, SIESSERE S, CALEFI A, et al. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2019, 30(10): 962-976.
- [20] FERREIRA SÁVIO D S, SILVA L M P D, REIS G G D, et al. Effects of platelet-rich fibrin produced by three centrifugation protocols on bone neoformation in defects created in rat calvaria[J]. *Platelets*, 2023, 34(1): 2228417.
- [21] TSUKIOKA T, HIRATSUKA T, NAKAMURA M, et al. An on-site preparable, novel bone-grafting complex consisting of human platelet-rich fibrin and porous particles made of a recombinant collagen-like protein[J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2019, 107(5): 1420-1430.
- [22] SHEU S Y, WANG C H, PAO Y H, et al. The effect of platelet-rich fibrin on autologous osteochondral transplantation: an *in vivo* porcine model[J]. *Knee*, 2017, 24(6): 1392-1401.
- [23] SUMARTA N P M, KAMADAJA D B, HENDRIJANTINI N, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells over platelet rich fibrin scaffold for mandibular cartilage defects regenerative medicine[J]. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 2021, 21: e0034.
- [24] ABD EL RAOUF M, WANG X, MIUSI S, et al. Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma[J]. *Platelets*, 2019, 30(2): 213-221.
- [25] VAN DEN BORNE M P J, RAIJMAKERS N J H, VANLAUWE J, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture[J]. *Osteoarthr Cartil*, 2007, 15(12): 1397-1402.
- [26] MAINIL-VARLET P, VAN DAMME B, NESIC D, et al. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: icrs II [J]. *Am J Sports Med*, 2010, 38(5): 880-890.
- [27] ZHANG Z J, MCCAFFERY J M, SPENCER R G S, et al. Growth and integration of neocartilage with native cartilage *in vitro*[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23(2): 433-439.
- [28] MIRHAJ M, TAVAKOLI M, VARSHOSAZ J, et al. Preparation of a biomimetic bi-layer chitosan wound dressing composed of A-PRF/sponge layer and L-arginine/nanofiber[J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 292: 119648.
- [29] KOBAYASHI E, FLÜCKIGER L, FUJIOKA-KOBAYASHI M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF[J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(9): 2353-2360.
- [30] PARMAR P A, CHOW L W, ST-PIERRE J P, et al. Collagen-mimetic peptide-modifiable hydrogels for articular cartilage regeneration[J]. *Biomaterials*, 2015, 54: 213-225.
- [31] DOMÍNGUEZ PÉREZ J M, FERNÁNDEZ-SARMIENTO J A, AGUILAR GARCÍA D, et al. Cartilage regeneration using a novel autologous growth factors-based matrix for full-thickness defects in sheep[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2019, 27(3): 950-961.
- [32] LEE C R, GRODZINSKY A J, SPECTOR M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(23): 3145-3154.
- [33] PARK H, TEMENOFF J S, HOLLAND T A, et al. Delivery of TGF- β 1 and chondrocytes *via* injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 7095-7103.
- [34] BAE S E, CHOI D H, HAN D K, et al. Effect of temporally controlled release of dexamethasone on *in vivo* chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells[J]. *J Control Release*, 2010, 143(1): 23-30.
- [35] CUI Y, HUANG R, WANG Y, et al. Down-regulation of LGR6 promotes bone fracture recovery using bone marrow stromal cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 629-637.
- [36] CHENG B, TU T, SHI X, et al. A novel construct with biomechanical flexibility for articular cartilage regeneration[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 298.

[本文编辑] 吴洋