

富血小板血浆预防大鼠创伤性异位骨化的实验研究

鲁嘉良^{1,2} 魏莎² (通讯作者) 刘路³

1.北京中医药大学深圳医院(龙岗)深圳信息职业技术大学社康中心 广东 深圳 518000

2.深圳出入境边防检查总站医院外二科 广东 深圳 518000

3.内蒙古医科大学基础医学院 内蒙古 呼和浩特 010010

【摘要】目的:探讨富血小板血浆(PRP)对创伤后异位骨化(HO)的抑制作用。方法:32只雄性Wistar大鼠,16只制备PRP,其余随机分为模型对照组(A组)和PRP组(B组),每组8只。A组通过跟腱钝挫伤加切断建立HO模型;B组在建模后局部注射PRP。术后10周通过影像学、HE染色评估异位骨形成。结果:一般情况、影像学表现、HE染色均表明A组建模成功,并且得到了稳定的结果。影像学观察术后10周,A组全部出现明显的异位骨形成,B组仅4只出现明显骨化表现,A组与B组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。HE染色:A组全部出现异位骨化,B组仅50%发生($P<0.05$)。HE染色显示A组以骨细胞软骨内形成为主,B组以纤维组织和部分软骨骨岛为主。结论:富血小板血浆对大鼠创伤后跟腱炎症反应及异位骨化的发生有抑制作用。

【关键词】富血小板血浆;跟腱;创伤;异位骨化

DOI:10.12417/2811-051X.26.06.013

异位骨化(HO)是指在正常情况下没有骨组织的软组织内形成的新生骨,其往往引发肿胀、疼痛、关节活动障碍等症状,严重影响患者的生存和生活质量。现有的治疗手段仍存在种种弊端^[1],找到一种理想的预防和治疗HO的方法具有重要意义。由于富血小板血浆(PRP)中血小板激活后释放出多种高浓度的生长因子,具有组织修复潜力^[2]。本研究拟通过建立大鼠HO模型,探讨PRP对于HO的抑制效果,为下一步提供更好的治疗方案打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年群雄性Wistar大鼠32,体重290~350g。16只取血制备PRP,剩余16只随机分成2组,每组8只。A组:手术建模,方法见后文,跟腱伤口周围注射200 μ L生理盐水;B组:在A组处理的基础上,跟腱伤口周围注射200 μ LPRP。术后10周处死全部大鼠。

1.2 PRP 配制方法

取16只Wistar大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(0.2-0.3ml/100g)麻醉,在严格无菌条件下,采用珠海朗泰生物科技有限公司生产的PRP套装,将每8mL自体静脉血制备成2.5mLPRP^[3]。具体流程如下:从大鼠心脏采集8mL静脉血于套装分离管中(管内预先配置含有3.8%w/v柠檬酸钠和生物分离胶),随后置于配套LTA-1600离心机常温下400g离心

9min,取出分离管垂直静置5min后,抽离贫血小板血浆3~4mL,轻轻摇晃分离管使沉淀血小板均匀分布于剩余血浆中,使用5mL注射器抽出该部分血浆,即可得到大约2.5mLPRP。无菌分瓶收集并保存于4 $^{\circ}$ C冰箱中以备下一步实验用。

1.3 手术方法

Wistar大鼠麻醉后,参照Allen等^[4]的重物坠落法,采用自制的挫伤模型打击装置(图1a),用重量为200g砝码自1m高处落下,砸到右小腿跟腱。右下肢常规消毒,铺洞巾,切开暴露跟腱,在中点处完全切断跟腱,不作缝合,关闭切口。

1.4 观察及评估指标

术后10周进行:(1)大体观察一般情况及术区周围组织质地、钙化情况;(2)拍摄右后肢侧位X线片观察HO情况,统一曝光条件(45kV,100mA,0.2s)及照射距离(40cm);(3)HE染色观察病理变化。

1.5 统计学分析

应用SPSS 18.0统计软件,计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及大体观察

术后各组大鼠一般情况良好,切口愈合好,无感染及死亡情况发生。建模后各组击打区域均出现皮肤青紫、瘀点,术中

基金项目:深圳市基础研究专项(自然科学基金)基础研究面上项目(JCYJ20220530172613030)

内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2022MS08059)

罗湖区软科学研究计划项目(LX202402033)

可见跟腱周围肌肉撕裂、出血。术后10周观察大鼠跟腱周围情况，可见各组均有不同程度的肿胀。取材观察显示：A组质地硬，弹性差，均出现骨样钙化组织；B组质地软，弹性较好，其中4只未见明显骨样钙化组织，4只可见骨样钙化组织，但明显体积小于A组。

2.2 影像学观察

术后10周，A组全部出现高密度影并且范围均较大（图1b）；B组仅4只出现高密度影，密度及骨化体积较小（图1c）。术后10周A组发生异位骨化的发生率明显高于B组，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），具体见表1。



a: 自制打击装置；b: A组术后10周X射线片；c: B组术后10周X射线片。

图1 动物模型的建立情况

表1 术后10周两组大鼠异位骨化发生情况比较[例(%)]

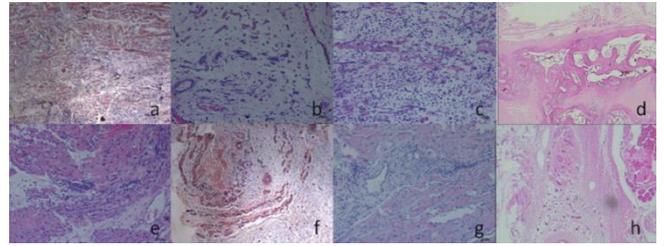
组别	n	异位骨化
A组	8	10 (100)
B组	8	4 (50.0) *
χ^2		5.333
P		0.021

*: 与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 组织学检查

术后1周，A组可见部分区域为炎性细胞所浸润，部分肌纤维细胞嗜酸性坏死，残存肌纤维原有轮廓；B组可见大量骨骼肌细胞，肌细胞间可见少量炎症细胞（图2a、e）。术后2周，A组可见炎症进一步扩散，肌纤维发生坏死、断裂、透明样变；B组可见炎症细胞减少并发生机化，由新生薄壁毛细血管和大量成纤维细胞组成肉芽组织（图2b、f）。术后4周，A组可见机化反应明显，肉芽组织增多，炎症包裹肌纤维；B组可见肌纤维间未见炎症细胞残存，肌纤维间发生纤维化，其内可见动脉机化（图2c、g）。术后10周，A组可见大量骨细胞软骨内形成，存在大量软骨细胞、骨陷窝和成骨细胞。B组中出现HO的跟腱组织中可见骨细胞较少，存在较多成片的软骨细胞，成纤维细胞较多，间质内伴有动脉机化，未出现HO的

软组织中多为纤维结缔组织和腱性纤维组织（图2d、h）。



a、b、c、d: 分别代表A组术后1, 2, 4, 10周;

e、f、g、h: 分别代表B组术后1, 2, 4, 10周。

图2 各组不同时相点骨肌HE染色结果($\times 100$)

3 讨论

从组织学角度来看，HO与正常骨形成具有相似的病理特征。其早期表现为成纤维细胞大量增殖，成熟后与周围软组织分界清晰，呈现典型的层状结构：内层富含未分化间质细胞，中层可见大量骨样组织及活跃的成骨细胞，外层则出现明显矿化沉积，最终形成成熟的板层骨结构。HO本质上是通过软骨内成骨过程实现的病理性骨形成，其发生发展与多种危险因素密切相关，包括骨折、外科手术、中枢神经系统损伤、烧伤及局部组织缺氧等。目前学界普遍认为，HO的形成必须同时满足三个基本条件：存在成骨前体细胞、具备成骨诱导信号以及适宜的局部微环境，这一过程受到全身和局部多种促骨化与抑骨化因子的精细调控^[5]。

在实验研究方法学方面，早期研究多采用肌肉创伤法诱导HO，通过反复造成软组织损伤和出血来促进异位骨化^[6]。然而，该类方法的可控性和重复性较差，结果变异度较大^[7]。目前国内学者多采用跟腱切断法，虽然能稳定诱导HO形成，但其病理过程与临床创伤后HO存在显著差异。本研究通过改良的创伤合并跟腱切断法建立HO模型，既保证了实验结果的稳定性，又较好地模拟了临床创伤性HO的发病过程。

炎症反应在HO发生发展中起着关键作用。^[8]研究表明，各种组织损伤均可引发不同程度的炎症反应，进而诱导骨形态发生蛋白(BMPs)等成骨诱导因子的表达，激活BMP信号通路，促进HO的形成^[9]。这一机制也解释了为何非甾体抗炎药能够通过抑制炎症反应，降低BMP-2等成骨因子的表达，从而有效预防HO^[10]。值得注意的是，张弛等^[11]研究发现，在炎症因子刺激下，内皮-间质转化(EndMT)可能参与HO的发病过程，而SMAD7基因的表达可有效阻断这一转化途径。此外，神经源性炎症也被证实参与HO的发生，组织损伤后释放的神经肽可通过激活免疫细胞，调控早期炎症反应进程^[12]。本研究结果进一步证实了炎症反应在HO中的重要作用。实验结果显示，A组早期炎症反应显著，且异位骨化发生率明显高于B组，组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。这表明炎症反应可能是启动HO过程的关键因素

富血小板血浆 (PRP) 作为一种富含多种生长因子和炎症调节因子的自体生物制剂, 在组织修复中展现出独特优势^[13], 其不仅能够促进血管生成、胶原合成和细胞增殖, 还对肌腱、韧带、骨和软骨等组织的修复具有积极作用^[14]。Monto 等^[15]采用超声引导下 PRP 注射治疗慢性跟腱炎患者, 术后影像学表现和临床症状均得到显著改善。机制研究表明, PRP 可能通过抑制 IL-1 β 等炎性因子的表达, 调节炎症信号通路的活化^[16]。本实验结果显示, PRP 处理组 (B 组) 各时间点的炎症反应均较模型组减轻, 软组织修复质量更好, HO 发生率显著降低

($P < 0.05$)。这表明 PRP 不仅能够通过抗炎作用抑制 HO 的发生, 还可能通过促进组织修复改善患者功能预后。

然而, 本研究仍存在一定局限性。首先, 主要依靠组织学观察得出结论, 缺乏对相关炎症因子表达的定量检测; 其次, 对 PRP 中各生长因子的变化规律及其与 BMP 信号通路的相互作用机制尚未明确。未来研究应进一步深入探讨 PRP 调控 HO 的具体分子机制, 为临床防治 HO 提供新的理论依据和治疗策略。

参考文献:

- [1] 姜宇丰,张睿,闵红巍.全关节置换术后异位骨化的研究进展[J].中华临床医师杂志电子版,2025,19(07):526-531.
- [2] Cenni E,Granchi D,Vancini M,et al.Platelet release of transforming growth factor-beta and beta-thromboglobulin after in vitro contact with acrylic bone cements.Biomaterials.2002;23(6):1479-1484.
- [3] 张云逸,朱海丰,邓子璇,等.富血小板血浆治疗创伤后肘关节僵硬 1 例报告[J].生物骨科材料与临床研究,2024,21(05):91-94。
- [4] Allen AR.Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column:a preliminary report[J].J Am Med Assoc,1911,57(11):878-880.
- [5] Kan L,Kessler J A.Evaluation of the cellular origins of heterotopic ossification.[J].Orthopedics,2014,37(5):329-340.
- [6] 熊洋,周世博,俞兴,等.获得性异位骨化的分子生物学机制[J].中国组织工程研究,2024,28(30):4881-4888.
- [7] 蒋静,尹良军.异位骨化的实验研究现状[J].创伤外科杂志,2001,3(4):3.
- [8] Winkler S,Craiovan B,Wagner F,et al.Pathogenesis and prevention strategies of heterotopic ossification in total hip arthroplasty:a narrative literature review and results of a survey in Germany[J].Archives of Orthopaedic&Trauma Surgery,2015,135(4):481-489.
- [9] Ranganathan K,Loder S,Agarwal S,et al.Heterotopic Ossification:Basic-Science Principles and Clinical Correlates[J].Journal of Bone&Joint Surgery-american Volume,2015,97(13):1101-1111.
- [10] 冯祁军,范存义,蒋毅,等.帕瑞昔布钠对创伤后异位骨化形成中 BMP-2 及 VEGF 表达的影响[J].浙江创伤外科,2019,024(005):878-881.
- [11] 张弛,纪方.SMAD7 调控内皮间质转化可预防跟腱损伤后的异位骨化[J].中国组织工程研究,2017,21(08):1178-1185.
- [12] Salisbury E,Rodenberg E,Sonnet C,et al.Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification[J].Journal of Cellular Biochemistry,2011,112(10):2748-2758.
- [13] van Buul G M,Koevoet W L,Kops N,et al.Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes[J].American Journal of Sports Medicine,2011,39(11):2362-70.
- [14] Chen L,Dong SW,Liu JP,et al.Synergy of Tendon Stem Cells and Platelet-Rich Plasma in Tendon Healing.J Orthop Res.2012,30(6):991-997.
- [15] Monto RR.Platelet rich plasma treatment for chronic Achilles tendinosis.Foot Ankle Int,2012,33(5):379-385.
- [16] Mifuneyz Y,Matsumotoy T,Takayamayz K,et al.The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair.Osteoarthritis and Cartilage.2012:1-11.