

血小板裂解液联合脂肪干细胞干预大鼠膝关节炎的实验研究

郑传睿¹ 王蔡未¹ 周莉¹ 童培建¹ 肖鲁伟¹ 单乐天^{1△}

[摘要] **目的:**观察血小板裂解液(PL)联合脂肪干细胞(ADSCs)对膝关节炎(KOA)大鼠关节疼痛和软骨修复的作用。**方法:**从 SD 大鼠腹部抽取脂肪制备培养 ADSCs,SD 大鼠外周血中分离制备 PL,以碘乙酸(MIA)法建立大鼠 KOA 疼痛模型,分别以低、中、高浓度 PL,低、中、高浓度 ADSCs 以及低、中、高浓度 PL 联合 ADSCs 对 KOA 模型大鼠进行双侧关节腔注射干预,每周注射 1 次,定期观察生理行为及评价疼痛指标,注射 4 次后取膝关节进行组织病理学观察及 Mankin's 评分。**结果:**压痛结果表明:造模后第 4 周,模型组压痛阈值较正常组显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);低、中、高浓度 PL 组,高浓度 ADSCs 组,以及低、中、高浓度联合组压痛阈值分别与模型组比较有显著提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。热痛结果表明:造模后第 4 周,模型组的热痛阈值较正常组显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);低、中、高浓度 PL 组,中、高浓度 ADSCs 组,以及低、中、高浓度联合组热痛阈值分别与模型组比较有显著提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。膝关节软骨病理学观察结果:大鼠膝关节软骨 Mankin's 评分比较,差异有统计学意义($P<0.01$);模型组的 Mankin's 评分高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);低、中、高浓度 PL 组,低、中、高浓度 ADSCs 组,低、中、高浓度联合组 Mankin's 评分较模型组显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);PL 高浓度组的 Mankin's 评分低于 PL 低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);ADSCs 高浓度组的 Mankin's 评分低于 ADSCs 低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合高浓度组 Mankin's 评分低于联合低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合高浓度组 Mankin's 评分低于 PL 高浓度组和 ADSCs 高浓度组($P<0.01$)。**结论:**PL 联合 ADSCs 可提高 KOA 模型大鼠疼痛阈值,修复软骨损伤,且其作用效果优于 PL 和 ADSCs 单独使用,PL 和 ADSCs 在治疗膝关节炎上有一定的协同作用,可用于临床治疗。

[关键词] 骨关节炎;血小板裂解液;脂肪干细胞;软骨;动物实验

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)08-0009-06

Experimental Study on Therapeutic Effect of Platelet Lysate Combined with Adipose-Derived Stem Cells on the Rat Models of Osteoarthritis

ZHENG Chuanrui¹ WANG Caiwei¹ ZHOULi¹ TONG Peijian¹ XIAOLuwei¹ SHAN Letian^{1△}

¹Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

Abstract Objective: To observe the effect of platelet lysate (PL) combined with adipose-derived stem cells (ADSCs) on cartilage repair in rats with knee osteoarthritis (KOA). **Methods:** The ADSCs with different concentration (1×10^6 /mL, 1×10^7 /mL, 1×10^8 /mL) were obtained by the collagenase digestion method from fats in 4 SD rats and PL was isolated from their peripheral blood. Another 88 SD rats were selected and were randomly divided into blank group, KOA model group, PL low-concentration group, PL middle-concentration group, PL high-concentration group, ADSCs low-concentration group, ADSCs middle-concentration group, ADSCs high-concentration group, PL with ADSCs low-concentration group, PL with ADSCs middle-concentration group and PL with ADSCs high-concentration group, 8 cases in each group. The KOA models were created in KOA model group, PL low-concentration group, PL middle-concentration group, PL high-

concentration group, ADSCs low-concentration group, ADSCs middle-concentration group, ADSCs high-concentration group, PL with ADSCs low-concentration group, PL with ADSCs middle-concentration group and PL with ADSCs

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81774331)

¹ 浙江中医药大学(杭州,310053)

△通信作者 E-mail: letian.shan@zcmu.edu.cn

high-concentration group, by intra-articular injecting iodoacetic acid into bilateral knee joint. One week later, the rats in PL low-concentration group, PL middle-concentration group, PL high-concentration group, ADSCs low-concentration group, ADSCs middle-concentration group, ADSCs high-concentration group, PL with ADSCs low-concentration group, PL with ADSCs middle-concentration group and PL with ADSCs high-concentration group, were administrated with intra-articular injection of PL low-concentration group, PL middle-concentration group, ADSCs low-concentration group, ADSCs middle-concentration group, ADSCs high-concentration group, PL high-concentration group, PL with ADSCs low-concentration group, PL with ADSCs middle-concentration group and PL with ADSCs high-concentration group, with dose of 50 μ L in bilateral knee joint, while the rats in the other two groups were administrated with intra-articular injection with the same dose of normal saline, once a week for consecutive 4 weeks. After the end of drug intervention, pressure-pain threshold, paw withdrawal latency (PWL), pathological observation and Mankin's scoring of knee joint were performed on all of the rats. **Results:** The results of tenderness showed that the tenderness threshold of the model group was significantly lower than that of the normal group ($P < 0.01$). The tenderness threshold of the low, middle and high concentration PL group, high concentration ADSCs group, the low, middle and high concentration PL with ADSCs group, was significantly higher than that of the model group ($P < 0.01$). The results of thermal pain showed that the model group was significantly lower than that of the normal group ($P < 0.01$). The thermal pain of the PL low-concentration group, PL middle-concentration group, PL high-concentration group, ADSCs middle-concentration group, ADSCs high-concentration group, PL with ADSCs low-concentration group, PL with ADSCs middle-concentration group and PL with ADSCs high-concentration group was significantly higher than that of the model group. ($P < 0.01$). There was statistical difference in Mankin's scores of knee articular cartilage ($P < 0.01$). The pathological results showed that the Mankin's score of the model group was significantly higher than the normal group ($P < 0.01$), the Mankin's score of the PL low-concentration group, PL middle-concentration group, PL high-concentration group, ADSCs low-concentration group, ADSCs middle-concentration group, ADSCs high-concentration group, PL with ADSCs low-concentration group, PL with ADSCs middle-concentration group and PL with ADSCs high-concentration group was significantly lower than the model group ($P < 0.01$), the PL high-concentration group lower than PL low-concentration group and PL middle-concentration group ($P < 0.01$), the ADSCs high-concentration group lower than ADSCs low-concentration group and ADSCs middle-concentration group ($P < 0.01$), the PL with ADSCs high-concentration group lower than PL with ADSCs low-concentration group and PL with ADSCs middle-concentration group ($P < 0.01$), the PL with ADSCs high-concentration group lower than PL high-concentration group and ADSCs high-concentration group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Both the PL, ADSCs and PL with ADSCs can improve joint pain in KOA rats and repair cartilage damage, and PL with ADSCs surpasses PL or ADSCs. This technique can be used for adjuvant treatment of clinical KOA.

Keywords: osteoarthritis; platelet lysate; adipose-derived stem cells; cartilage; animal experimentation

膝骨关节炎 (Knee Osteoarthritis, KOA) 是一种以关节软骨退变、破坏、丢失为主要特点的常见慢性退行性疾病, 致残率高达 53%^[1]. 其主要的临床表现为进展性的膝关节疼痛、肿胀、僵硬, 最终导致活动受限、关节失用等^[2]. 血小板裂解液 (Platelet Lysate, PL) 具有促进 KOA 软骨修复的作用^[3,4]. 脂肪源性干细胞 (Adipose Derived Stem Cells, ADSCs) 可向软骨细胞、成骨细胞等定向分化^[5], 起到修复和治疗骨关节炎的作用^[6]. 本研究通过动物实验探讨 PL 联合 ADSCs 治疗对 KOA 病变中疼痛和软骨损伤的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 88 只, 体质量 (200 \pm 20) g, 上海斯莱克实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号为 SCKK (沪) 2007-0005.

1.2 试剂及仪器

PBS 磷酸盐缓冲液、青链霉素混合液、生理盐水、

MEM 培养基、FBS 胎牛血清、碘乙酸 (SIGMA-ALDRICH)、手术剪刀、镊子、培养瓶、离心管、四型胶原酶、戊巴比妥钠、4% 甲醛溶液、EDTA 脱钙液 (Solarbio) 足底热辐射测痛仪 (37370, 意大利 UGO BASILE)、YLS-3E 电子压痛仪 (安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司)、MDF-J281AT 超低温冰箱 (SANYO)、SW-CJ-1F 层流超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)、DK-S12 型恒温水浴锅 (上海森信实验仪器有限公司)、100 μ m 细胞筛、CO₂ 细胞培养箱 (Thermo)、AXiovert200 荧光倒置显微镜。

1.3 方法

1.3.1 脂肪干细胞 (ADSCs) 制备及质量控制 利用胶原酶消化法提取。选取 4 只 SD 大鼠, 无菌条件下取大鼠腹股沟脂肪组织, 置于含有 PBS 缓冲液的培养皿中。去除组织中的血管、筋膜, 在 PBS 中反复清洗 3 ~ 5 次。用手术剪将清洗后的脂肪剪碎, 置于 50 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃除上层组织。加入适量的四型胶原酶, 于 37 $^{\circ}$ C 中消化 45 min. 加入含

10%FBS 的 MEM 培养液终止消化。100 μm 细胞筛过滤,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清。将细胞接种入 25 cm^2 培养瓶中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中。1 h 后换液,观察细胞生长情况。每 3 d 换 1 次液,1 周后传代。实验干预前收集培养瓶中生长的第 3 代 ADSCs,再次离心重悬加工,制成低(1×10^6 个/mL)、中(1×10^7 个/mL)、高(1×10^8 个/mL)3 种浓度的 ADSCs,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 PL 制备及质量控制 参照 Soffer 等^[7]的方法从 SD 大鼠外周血中制备 PL。取 4 只 SD 大鼠,使用 0.2%戊巴比妥钠麻醉,每只大鼠采血 6~8 mL,用 3.8%柠檬酸三钠抗凝,1 500 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm)。取上清和血小板层细胞,室温下 1 500 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm),得到沉淀,于 2 mL PBS 缓冲液中重悬。将获取的血小板混悬液反复冻融(-80 $^{\circ}\text{C}$ /37 $^{\circ}\text{C}$)5 次,每次间隔 10 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 8 000 r/min 离心 30 min(离心半径 8 cm),去细胞残片、血小板膜,离心后取上清液。将收集的 PL 再次离心重悬加工,制成低(1×10^6 个/mL)、中(1×10^7 个/mL)、高(1×10^8 个/mL)3 种浓度。应用 ELISA 法检测 PL 上清液中细胞因子含量。

1.3.3 大鼠分组、造模及干预 将 88 只 SD 大鼠随机分为空白组、KOA 模型组、ADSCs 低浓度治疗组、ADSCs 中浓度治疗组、ADSCs 高浓度治疗组、PL 低浓度治疗组、PL 中浓度治疗组、PL 高浓度治疗组、ADSCs 联合 PL 低浓度治疗组、ADSCs 联合 PL 中浓度治疗组、ADSCs 联合 PL 高浓度治疗组,每组 8 只。对空白组大鼠双侧后膝关节腔内各注射 25 mg/mL 生理盐水 50 μL ,其余组大鼠均通过向双侧后膝关节腔内各注射 25 mg/mL 碘乙酸 50 μL 进行 KOA 造模。造模 1 d 后向 ADSCs 低、中、高浓度治疗组大鼠双侧后肢膝关节腔分别注射 50 μL 低、中、高浓度 ADSCs,PL 低、中、高浓度治疗组大鼠分别注射 50 μL 低、中、高浓度 PL,将低、中、高浓度的 ADSCs 和低、中、高浓度的 PL 分别按 1:1 比例混合,联合低、中、高浓度治疗组大鼠分别注射 50 μL 低、中、高浓度的 ADSCs 和 PL 的混合液,向空白组和 KOA 模型组大鼠膝关节腔注射等量生理盐水,每周 1 次,共注射 4 次。

1.3.4 压痛实验 使用 YLS-3E 电子压痛仪测定大鼠的压痛阈值。将大鼠置于固定桶内,使动物处于舒适又被固定的状态,用扁型头对大鼠双侧后足背进行施压,大鼠因疼痛而出现鸣叫或挣扎时显示的压力值即为此动物的压痛阈值。

1.3.5 热痛实验 使用足底热痛敏测试仪(Ugobasile,意大利)检测大鼠双侧后足趾热痛阈值。将大鼠置于

温度在(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 透明玻璃箱内,待大鼠处于安静状态(停止探索性活动和梳理毛发)时开始检测,检测时将测试仪上的“十”字形标记置于大鼠左后跖足底中央并避开足垫,从仪器开始至大鼠出现抬腿回避的时间作为大鼠的热痛阈值。热痛实验于每次压痛实验后的 6 h 进行测定。每只检测 3 次,每次间隔 5~6 min。测定热痛阈值温度的上限设定为 35 $^{\circ}\text{C}$ ^[8],时间上限设定为 20 s。

1.3.6 膝关节软组织学检测及骨关节炎程度的评定 造模后第 4 周,最后一次热痛阈值测试后,断颈处死大鼠并取十一组大鼠双侧的膝关节置于 4%多聚甲醛固定 48 h,用 EDTA 脱钙 4 周,酒精逐级脱水,浸蜡包埋后在切片机上将胫骨平台外侧软骨下松质骨和股骨外侧髁软骨下松质骨沿下肢纵轴方向切片,切片厚度 5 μm ,切片后常规脱蜡复水,经自来水冲洗后进行番红 O 染色、封片。光镜下观察组织病理学改变,并按照 Mankin's 软骨组织学评分标准^[9]进行评分。

1.3.7 统计学方法 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS19.0 软件对所得数据进行统计分析。11 组大鼠的痛阈值检测、Mankin's 评分^[23]均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验,两两比较均采用 students-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

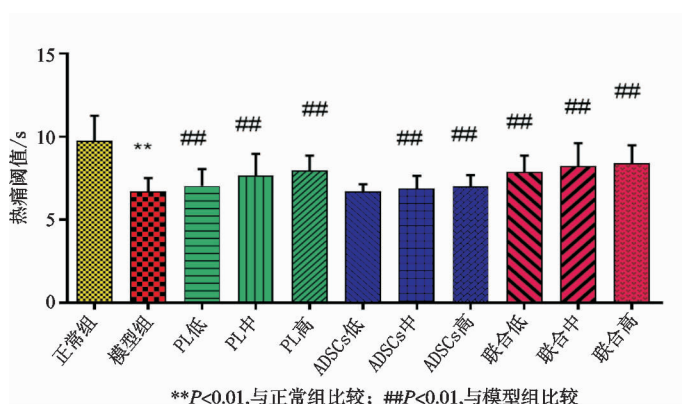
2 结果

2.1 PL 细胞因子含量测定结果

经测定,此次实验制备的 PL 中含有血小板源性生长因子(61.07 ± 1.13)ng/mL,转化生长因子- β (6.12 ± 0.11)ng/mL,类胰岛素生长因子-1(2.23 ± 0.03)ng/mL,成纤维细胞生长因子-b(7.15 ± 0.55)ng/mL 等细胞因子。

2.2 热痛阈值检测

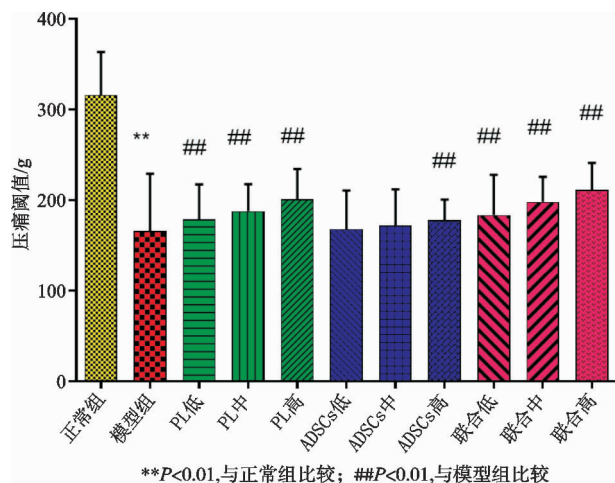
造模后第 4 周,11 组大鼠的压痛阈值比较:模型组的热痛阈值低于空白组、PL 低浓度组、PL 中浓度组、PL 高浓度组、ADSCs 中浓度组、ADSCs 高浓度组、联合低浓度组、联合中浓度组和联合高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);模型组的热痛阈值与 ADSCs 低浓度组差异无统计学意义($P>0.01$);PL 低浓度组的热痛阈值低于 PL 中浓度组和 PL 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);PL 中浓度组的热痛阈值低于 PL 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);ADSCs 低浓度组的热痛阈值低于 ADSCs 中浓度组和 ADSCs 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);ADSCs 中浓度组的热痛阈值低于 ADSCs 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合低浓度组的热痛阈值低于联合中浓度组和 PL+ADSCs 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合中浓度组的热痛阈值低于 PL+ADSCs 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1。

图1 11组大鼠热痛阈值测定结果($\bar{x} \pm s$)

2.3 压痛阈值检测

造模后第4周,11组大鼠的压痛阈值比较:模型组压痛阈值较正常组显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);低、中、高浓度PL组,高浓度ADSCs组,以及低、中、高浓度联合组压痛阈值分别与模型组比较有显著性提高,差异有统计学意义($P<0.01$);模型组的压痛阈值与ADSCs低浓度组及ADSCs中浓度组差异无统计学意义($P>0.01$);PL低浓度组的压痛阈值低于PL中浓度组和PL高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);PL

中浓度组的压痛阈值低于PL高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);ADSCs低浓度组的压痛阈值低于ADSCs中浓度组和ADSCs高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);ADSCs中浓度组的压痛阈值低于ADSCs高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合低浓度治疗组的压痛阈值低于联合中浓度治疗组和联合高浓度治疗组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合中浓度治疗组的压痛阈值低于联合高浓度治疗组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图2。

图2 11组大鼠压痛阈值测定结果($\bar{x} \pm s$)

2.4 病理学结果与 Mankin's 评分结果

大鼠膝关节软骨组织病理学结果表明:与空白组相比,KOA模型组大鼠膝关节软骨表面缺损明显,缺损处软骨细胞丢失严重,软骨下骨呈现纤维化退变,双染色重度减少;PL和ADSCs单独治疗对KOA模型大鼠关节软骨均有改善作用,其中低浓度组软骨细胞丢失和大量肥大细胞,双染色重度减少,并可见软骨表面缺损;中浓度组软骨细胞少量缺失,双染色中度减少,可见明显肥大软骨细胞;高浓度组可见大量正常软骨细胞,双染色轻微减少,软骨面较平整,仅见少量肥大软骨细胞。PL和ADSCs联合治疗组治疗相较KOA模型组大鼠,关节软骨明显改善,且效果优于PL及ADSCs单独治疗组。低浓度联合治疗组可见关节软骨表面稍有缺损,双染色中度减少,可见软骨细胞肥大;中浓度联合治疗组

软骨表面较平整,双染色轻微减少,软骨细胞少量丢失,可见大量正常软骨细胞,仅见少量肥大细胞;高浓度联合治疗组关节软骨基本恢复正常,双染色正常,关节表面较平整,软骨层明显增厚,软骨细胞形态正常。11组大鼠膝关节软骨Mankin's评分结果显示:模型组的Mankin's评分高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);低、中、高浓度PL组,低、中、高浓度ADSCs组、低、中、高浓度联合治疗组Mankin's评分较模型组显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);PL高浓度组的Mankin's评分低于PL低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);ADSCs高浓度组的Mankin's评分低于ADSCs低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$),联合高浓度治疗组Mankin's评分低于联合低、中浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$);联合高浓度治疗组Man-

kin's 评分低于 PL 高浓度组和 ADSCs 高浓度组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3-4.

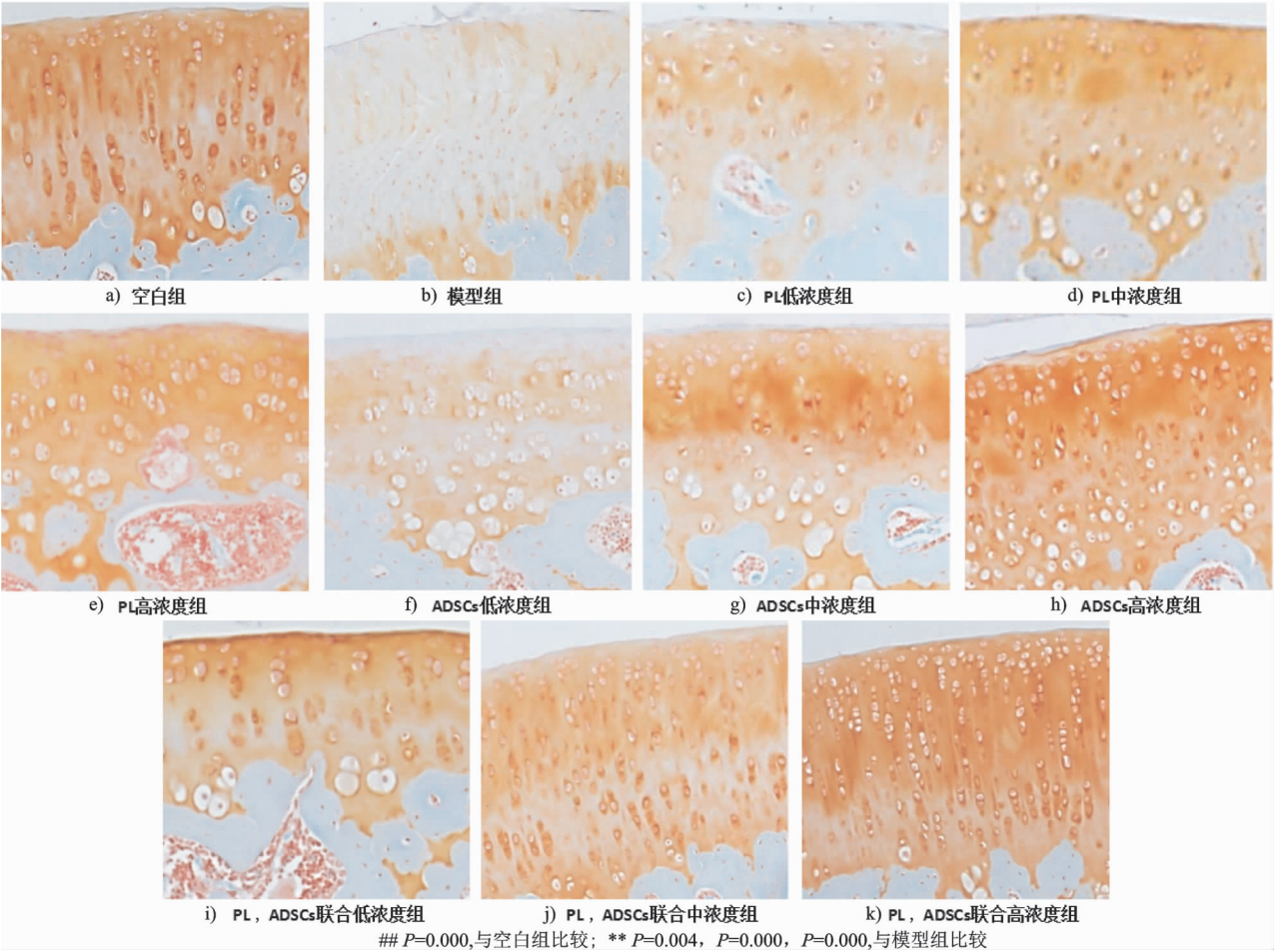


图 3 大鼠膝关节软骨组织病理切片(番红染色,100×)

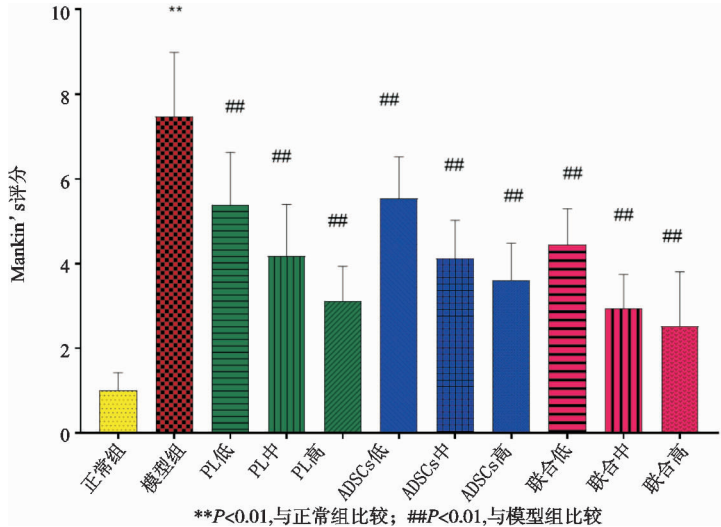


图 4 大鼠膝关节软骨组织病理 Mankin's 评分($n=10$)

3 讨论

目前常用于 KOA 临床治疗的药物有甾体类抗炎药(SAIDs)、非甾体类抗炎药(NSAIDs)、关节营养素、阿片类镇痛药等,这些药物能缓解疼痛、改善关节活动度等 KOA 症状^[10],但这些药物不仅无法逆转 KOA 的病变进程,还会对机体产生明显的毒副作用^[10]。血小板被激活时,血小板内的 α 颗粒可释放转化生长因子- β 、成纤维细胞生长因子-b、血小板源性生长因子、

类胰岛素生长因子-1 等生长因子^[11,12],这些生长因子可促进成骨细胞趋化及增殖,软骨和骨基质的形成,抑制破骨细胞的形成及骨吸收,给 OA 的治疗提供了新的方向^[13,14]。血小板裂解液是富血小板血浆(PRP)冷冻后的裂解液经进一步分离所获得,经体外释放生长因子并注射在患膝关节内^[15]。PL 保留了其中的多种生长因子,能够取得不亚于 PRP 的治疗效果,而且能大大减少血小板自身的抗原性^[16]。前期实验已经证明 PL 具

有修复软骨损伤、提高 KOA 大鼠模型疼痛阈值的作用^[17]。MSCs 来源丰富、制备简单,是再生医学领域最有临床应用前景的种子细胞。脂肪干细胞是 MSCs 的重要组成部分,来源于脂肪组织,可分化为软骨细胞,促进软骨修复,有效抑制骨关节炎进展^[18,19]。已有文献提出自体富血小板血浆联合间充质干细胞治疗骨性关节炎在缓解疼痛,改善日常活动方面取得了显著的疗效^[20]。

本研究首次使用血小板裂解液联合脂肪干细胞干预大鼠 KOA 模型,实验结果表明,在造模 4 周后,PL 组、ADSCs 组及联合组的疼痛阈值较模型组提高,联合组高于 PL 组及 ADSCs 组。3 组治疗组中高浓度组的疼痛阈值均较低浓度组有明显提高,可说明干预具有剂量效应,提示 PL 及 ADSCs 可缓解大鼠 KOA 模型的炎性疼痛,提高痛阈,并且 PL、ADSCs 联合治疗组效果优于单独治疗组。在大鼠膝关节软骨组织病理 Mankin's 评分中,PL 组、ADSCs 组及联合组的 Mankin's 均低于模型组,其中 PL 组低于 ADSCs 组,而联合组评分较其余两组低;3 组治疗组中高浓度组的 Mankin's 评分较中低组高,提示 PL 及 ADSCs 均能修复膝骨关节炎模型大鼠关节软骨的损伤,且 PL 及 ADSCs 联合的修复效果优于单独治疗组,一定范围内作用效果与剂量正相关。

本次实验结果表明,PL 和 ADSCs 均可促进大鼠软骨修复,提高 KOA 大鼠的痛阈,二者联合使用效果比单用一种效果好,且其作用效果与 PL 和 ADSCs 的剂量有关。证明 PL 联合 ADSCs 对 KOA 动物模型关节软骨修复、缓解炎性疼痛疗效的确切性,该技术为临床治疗 KOA 提供了一种新的思路和方法。

参考文献

- [1] CLOUET J, VINATIER C, MERCERON C, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage[J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14 (19/20): 913-925.
- [2] ABRAMSON S B, ATTUR M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): 227-235.
- [3] HILDNER F, EDER M J, HOFER K, et al. Human platelet lysate successfully promotes proliferation and subsequent chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells; a comparison with articular chondrocytes[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(7): 808-818.
- [4] PEREIRA R C, SCARANARI M, BENELLI R, et al. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(11/12): 1476-1488.
- [5] ZUK P A, ZHU M, MIZUNO H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based

therapies[J]. *Tissue Eng J*, 2001, 7(2): 211-228.

- [6] TER HUURNE M, SCHELBERGEN R, BLATTES R, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64 (11): 3604-3613.
- [7] SOFFER E, OUHAYOUN J P, DOSQUET C, et al. Effects of platelet lysates on select bone cell functions[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2004, 15(5): 581-588.
- [8] 贺端端, 郭向阳. cAMP-PKA 信号通路介导大鼠骨癌痛的产生和维持[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015, 21(1): 10-14.
- [9] WANG J, DONG F F, LI X F, et al. Effects of Yiqi Huayu prescription on knee cartilage degeneration in HIF-1 gene knockout mice[J]. *China J Orthop Trauma*, 2013, 26(6): 486-492.
- [10] CLOUET J, VINATIER C, MERCERON C, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage[J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14 (19-20): 913-925.
- [11] SATO M, YAMATO M, HAMAHASHI K, et al. Articular cartilage regeneration using cell sheet technology[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014, 297(1): 36-43.
- [12] PIRVU T N, SCHROEDER J E, PEROGGIO M, et al. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production[J]. *Eur Spine J*, 2014, 23(4): 745-753.
- [13] 张希, 刘萍. 骨性关节炎所致慢性持续性疼痛的发病机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(2): 248-255.
- [14] 刘, 邓廉夫. 骨关节炎相关细胞因子及蛋白的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(1): 187-190.
- [15] 鞠昌军, 姜红江, 高广凌, 等. 体外人工膝支具辅助血小板裂解液治疗膝关节骨性关节炎的临床疗效分析[J]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2018, 4(4): 224-230.
- [16] SELLBERG F, BERGLUND E, RONAGHI M, et al. Composition of growth factors and cytokines in lysates obtained from fresh versus stored patho-gen-inactivated platelet units[J]. *Transfus Apher Sci*, 2016, 55(3): 333-337.
- [17] 凌晓宇, 周康, 姚黎佳, 等. 血小板裂解液对膝骨关节炎模型大鼠疼痛和软骨损伤的影响及作用机制研究[J]. *中医正骨*, 2017, 29(11): 8-14.
- [18] 杨雨润, TIAN Hua. 自体脂肪源性间充质干细胞修复兔软骨缺损的实验研究[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(31): 2214-2218.
- [19] 刘兆杰, 胡永成, 张银光, 等. 血管内皮生长因子转染后脂肪组织来源于细胞蛋白分泌表达及成骨郭德检测[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(23): 1845-1849.
- [20] 戎露江, 夏永法, 钱涛, 等. 富含血小板血浆联合骨髓间充质干细胞治疗骨性关节炎的 WOMAC 评分分析[J]. *浙江创伤外科*, 2017, 22(2): 294-295.

(收稿日期: 2019-03-12)