

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201607181

## 人脐带间充质干细胞联合富含血小板血浆促进大鼠跟腱损伤的修复

王 位<sup>1</sup>, 付宇翀<sup>1</sup>, 周 梅<sup>1</sup>, 唐 红<sup>1</sup>, 张吉强<sup>2</sup>, 唐康来<sup>1</sup> (400038 重庆, 第三军医大学: 西南医院骨科, 全军矫形外科中心<sup>1</sup>, 基础医学部神经生物学教研室<sup>2</sup>)

**[摘要]** **目的** 探讨不同浓度富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)在体外对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)增殖、分化的影响, 评估 hUC-MSCs 联合 PRP 对大鼠跟腱损伤修复的影响。**方法** PRP 活化后成为 PRP-clot releasate (PRCR)。取 P3 代 hUC-MSCs 于培养皿中培养 24 h 后, 分别加入含 0% (对照组)、10%、20%、40% PRCR 的 DMEM/F12 培养基, 于第 1、2、3、4 天测定 hUC-MSCs 的增殖速度。P3 代 hUC-MSCs 按相同分组培养, 于第 1、3、5 天收集细胞并提取蛋白。Western blot 检测 hUC-MSCs 中成肌腱分化标志性基因肌腱蛋白 C (tenascin c, TNC)、SCX (scleraxis)、I 型胶原的表达。选取 48 只 8 周龄雄性 SD 大鼠, I 型胶原酶溶液 50  $\mu$ L 注射于大鼠右侧跟腱制备跟腱损伤模型, 3 d 后于损伤部位再次分别注射 50  $\mu$ L 生理盐水 (对照)、hUC-MSCs 悬液、PRP 或 PRP + hUC-MSCs 混悬液, 术后 2、4 周安乐死大鼠, Western blot 检测跟腱中 TNC、SCX 及 I 型胶原的表达, 跟腱切片 HE 染色行组织学评估。**结果** PRCR 在体外对 hUC-MSCs 增殖均有促进作用, 20% PRCR 组促增殖作用最显著 ( $P < 0.05$ ); 20% PRCR 组较对照组在体外可以显著地促进 hUC-MSCs 成肌腱分化标志性基因的表达 ( $P < 0.05$ ); 术后 2、4 周, PRP + hUC-MSCs 组跟腱中成肌腱分化相关基因在蛋白水平表达更高, 跟腱切片 HE 染色显示 PRP + hUC-MSCs 组纤维排列更规整, 炎细胞更少。**结论** 适宜浓度 PRP 在体外显著促进了 hUC-MSCs 的增殖、成肌腱分化; PRP 联合 hUC-MSCs 能有效促进大鼠受损跟腱的修复。

**[关键词]** 人脐带间充质干细胞; 富含血小板血浆; 大鼠模型; 跟腱损伤

**[中图分类号]** R329.2; R686.1; R977.8 **[文献标志码]** A

## Synergistic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on promoting healing of Achilles tendon injury in rats

Wang Wei<sup>1</sup>, Fu Yuchong<sup>1</sup>, Zhou Mei<sup>1</sup>, Tang Hong<sup>1</sup>, Zhang Jiqiang<sup>2</sup>, Tang Kanglai<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Center of Orthopedic Surgery, Southwest Hospital; <sup>2</sup>Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of different concentrations of platelet-rich plasma (PRP) on the proliferation and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) *in vitro*, and evaluate the effect of hUC-MSCs combined with PRP in the treatment of collagenase-induced Achilles tendon injury in rats. **Methods** PRP was activated to prepare into PRP-clot releasate (PRCR). hUC-MSCs at passage 3 were incubated in control medium or medium supplemented with 10%, 20% or 40% PRCR, and the proliferation of hUC-MSCs on days 1, 2, 3 and 4 was evaluated. Tenogenesis related genes (scleraxis, tenascin-C, and collagen type I) were assessed by Western blotting on days 1, 3 and 5. In 2 and 4 weeks after hUC-MSCs, PRP, hUC-MSCs + PRP or saline (as control) injection into the injured Achilles tendon, the tendon tissue was harvested and evaluated by histology and Western blotting. **Results** PRCR

**[基金项目]** 全军医学科研“十二五”计划(创新专项重点 13CXZ008)

**[通信作者]** 唐康来, E-mail: tangkanglai@hotmail.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.018.html>

promoted the proliferation of hUC-MSCs *in vitro*, and 20% PRCR prominently increased the number of hUC-MSCs ( $P < 0.05$ ) as well as the protein levels of collagen type I, tenascin-C and scleraxis ( $P < 0.05$ ). Combination of hUC-MSCs and PRP resulted in better healing effect of the injured tendon by improving histological characteristics and increasing expression of tenogenesis related genes in 2 and 4 weeks after operation. **Conclusion** Appropriate concentration of PRP promotes the proliferation and tenogenic differentiation of hUC-MSCs. Combination of hUC-MSCs and PRP has synergistic effect on promoting healing of the injured Achilles tendon.

[ **Key words** ] human umbilical cord mesenchymal stem cells; platelet-rich plasma; rat model; Achilles tendon injury

Supported by the "Twelfth Five-year Plan" of Medical Research Foundation of PLA (13CXZ008). Corresponding author: Tang Kanglai, E-mail: tangkanglai@hotmail.com

肌腱损伤是最常见的运动损伤,分为急性和慢性损伤,修复过程缓慢,正常结构与功能恢复困难,绝大多数为肌腱纤维化及瘢痕修复。肌腱细胞的再生、足够的局部营养是损伤修复的两个关键因素<sup>[1]</sup>。间充质干细胞可作为种子细胞用于组织器官损伤修复<sup>[2]</sup>;骨髓等各种组织来源的干细胞也已在各级研究中用于肌腱损伤的修复治疗<sup>[3-5]</sup>,但存在异位骨化等风险<sup>[6]</sup>。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)具有干细胞更原始、增殖分化能力更强、免疫原性低、适合异体移植、取材方便、无大的伦理学争议等优点<sup>[7]</sup>,是更加理想的种子细胞。富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是从静脉血提取的血小板含量超过 $1 \times 10^6$ 个/ $\mu\text{L}$ 的血浆,因含有多种生长因子,是肌腱损伤修复的另一研究热点。体外研究<sup>[8]</sup>表明,PRP的激活形式PRP-clot releasate (PRCR),可以促进肌腱干细胞分化为肌腱细胞、肌腱细胞的增殖和富含I型胶原的细胞外基质的合成、沉积。González等<sup>[9]</sup>研究发现,在兔跟腱损伤模型中,PRP通过增加I型胶原和III型胶原的表达、合成来促进受损肌腱组织的再生修复。在临床上,Mishra等<sup>[10-11]</sup>报道PRP局部注射治疗对肌腱损伤有效;Di等<sup>[12]</sup>也认为PRP对肌腱病是有效的。在体外,PRP的浓度可以影响肌腱细胞的增殖、分化、迁移以及分泌等行为,且高浓度的PRP对上述行为是无益的<sup>[13]</sup>。PRP的浓度对hUC-MSCs的增殖、分化有怎样的影响以及hUC-MSCs联合PRP促进受损肌腱修复的效果如何,目前尚不明确。因此,本研究通过观察不同时间点各组细胞的增殖速度及成肌腱相关标志基因的表达,探讨不同浓度的PRP对hUC-MSCs增殖、成肌腱分化的影响;观察术后各组大鼠跟腱组织学表现及成肌腱相关标志基因的表达,了解PRP联合hUC-MSCs对受损肌腱修复的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级成年健康8周龄雄性SD大鼠48只,体重250~300g,由第三军医大学实验动物中心提供。采用颗粒型普通大鼠饲料喂养,饮用干净水源,室温 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 1.2 PRP的准备

PRP由第三军医大学西南医院输血科抽取健康供者静脉血后采用白膜层法制备,以白细胞过滤器去除白细胞,检测PRP中血小板浓度,双蒸水调整PRP中血小板浓度至1 000 000个/ $\mu\text{L}$ ;在PRP中加入10%的氯化钙溶液(1:10)并放入 $37^\circ\text{C}$ 的细胞孵箱中1h使血小板充分聚集活化,首先以 $153 \times g$ 离心5min,收集富含各种生长因子的上清液,再依次以 $1 250 \times g$ 和 $1 770 \times g$ 离心10min去除红细胞、细胞碎片及细胞基质等,此时得到的上清液即PRCR<sup>[13]</sup>,存储于 $4^\circ\text{C}$ 备用。研究证明PRP和PRCR对细胞的作用无差别,所以本实验的体外细胞实验均采用PRCR<sup>[14]</sup>。

### 1.3 hUC-MSCs的准备

hUC-MSCs由第三军医大学西南医院生物治疗中心实验室提供,该实验室已通过GMP认证。

### 1.4 主要实验试剂及实验器材

DMEM/F12培养基(sh30023.01, HyClone公司), FBS(美国Gibco公司), I型胶原酶(美国R&D Systems公司), CCK-8检测试剂盒(美国Bio-Rad公司), Collagen I抗体(ab34710, Abcam), SCX抗体(ab58655, Abcam), Tenascin-c抗体(ab108930, Abcam), 倒置相差显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.5 实验分组及方法

1.5.1 CCK-8检测hUC-MSCs增殖速度 前期预实验观察到大于50%PRCR对hUC-MSCs有抑制作用,并且hUC-MSCs出现大量死亡的现象,故高浓度

PRCR 组设定为 40%。实验分为 4 组,取 P3 代 hUC-MSCs 接种于 96 孔细胞培养板中,每组 3 个孔,培养 24 h 观察细胞完全贴壁后,分别加入含有 0% (对照组)、10%、20%、40% PRCR 的 DMEM/F12 培养基 (FBS 浓度为 10%),分别于第 1、2、3、4 天以 CCK-8 试剂盒 (使用方法参考 CCK-8 试剂盒说明书)测定各孔波长 450 nm 处的光密度值 [ $D(450)$ ],以反映各组细胞的增殖速度。

**1.5.2 Western blot 检测 hUC-MSCs 成肌腱标志性基因蛋白表达水平** 取 P3 代 hUC-MSCs 接种于 6 孔细胞培养板中,每组 3 个孔,培养 24 h 观察细胞完全贴壁后,按照与测 hUC-MSCs 增殖速度相同的实验分组进行培养,分别于第 1、3、5 天提取各组细胞蛋白,Western blot 检测成肌腱标志性基因 Collagen I、SCX 及 Tenascin-c (TNC) 的蛋白表达水平。

**1.5.3 动物模型建立及动物实验的设计** 大鼠跟腱损伤动物模型的建立参照文献[15-16],48 只 SD 大鼠腹腔注射 5% 戊巴比妥钠 (7 mL/kg),麻醉成功后,右后肢剃毛、消毒,切开皮肤,切口长约 2 mm,显露跟腱体部,将 10 mg/mL I 型胶原酶溶液 50  $\mu$ L 以 29G 规格的胰岛素注射器在直视下注入跟腱体部,大鼠跟腱损伤模型建立完成。实验分为 4 组 ( $n = 12$ ),I 型胶原酶注射 3 d 后在相同位置再次按分组分别注入 50  $\mu$ L 生理盐水 (对照组)、hUC-MSCs (注射细胞量约  $1 \times 10^5$  个)、PRP、PRP + hUC-MSCs (PRP 浓度参照体外细胞实验结果),术后 2、4 周每组各安乐死大鼠 6 只,每组取 3 条跟腱标本 Western blot 检测肌腱组织中 TNC、SCX 及 Collagen I 的蛋白表达,3 条跟腱标本经多聚甲醛固定、石蜡固定、切片行组织学染色。

**1.5.4 Western blot 检测** 使用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白 (贝博生物技术公司) 收集总蛋白 (细胞或组织中加入蛋白裂解液,收集于 EP 管中,冰上裂解 30 min,15 000 r/min,离心 15 min,提取上清液,4  $^{\circ}$ C 待测),BCA 试剂盒 (赛默飞世尔科技有限公司, MG162286) 测定蛋白样本浓度。电泳:配制 SDS-PAGE 凝胶 (碧云天, P0012A),样品中加入浓缩的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液  $5 \times$  Buffer (碧云天, P0015),100  $^{\circ}$ C 加热 5~10 min,充分变性蛋白,冷却后上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内进行电泳 (先用 80 V, 30 min,待 marker 分开后 120 V,60 min)。转膜:选用 PVDF 膜,电流为 200~250 mA,时间为 90~120 min。封闭:5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h。一抗孵育:以 Collagen I、SCX 及 TNC 抗体 4  $^{\circ}$ C 振荡孵育过夜, PBST 轻摇清洗 3 次,每次 10 min。二抗孵育:二抗山羊抗兔 (中杉金桥 1:3 000),室温摇床振荡 2 h, PBST

轻摇清洗 3 次,每次 5 min。显影:将 AB 液 (50  $\mu$ L A 液 + 50  $\mu$ L B 液) 加到膜上,显色后曝光。用 Quantity One 分析软件分析光密度值。

**1.5.5 组织学观察** 5  $\mu$ m 厚的切片行苏木精-伊红 (HE) 染色后显微镜下观察跟腱组织,并通过其纤维结构、纤维排列、炎症反应等评估受损跟腱修复情况<sup>[17]</sup>。

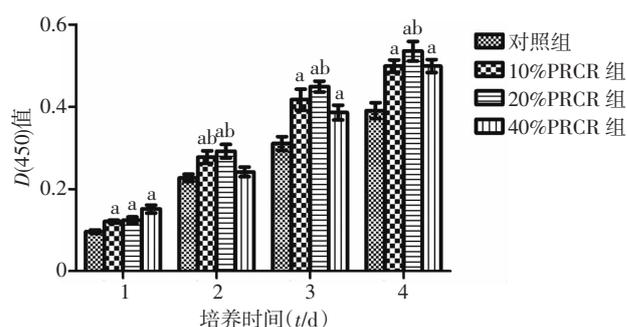
## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 含适宜 PRCR (20%) 的培养基在体外可以显著促进 hUC-MSCs 的增殖

培养 1、2、3、4 d 时,检测各组  $D(450)$  值以反映细胞的增殖速度 (图 1)。各时间点含 PRCR 培养基的细胞增殖速度值均大于对照组。其中 1 d 时,含 PRCR 培养基的  $D(450)$  值均显著大于对照组 ( $P < 0.05$ ),其中 40% PRCR 组 hUC-MSCs 增殖速度最快,与 10% PRCR 组、20% PRCR 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );10% PRCR 组与 20% PRCR 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。2、3、4 d 时,20% PRCR 组 hUC-MSCs 增殖速度最快,同对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );其中 2 d 时,20% PRCR 组与 10% PRCR 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),但细胞增殖速度明显快于 40% PRCR 组 ( $P < 0.05$ ),对照组与 40% PRCR 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );3 d 时,各组差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );4 d 时,除 10% PRCR 组与 40% PRCR 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),其余各组差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示,实验组中不同浓度的 PRCR 在体外对 hUC-MSCs 的增殖均有促进作用,而其中以 20% PRCR 的促细胞增殖效应最明显 (图 1)。



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 40% PRCR 组比较

图 1 CCK-8 检测各组细胞的增殖情况

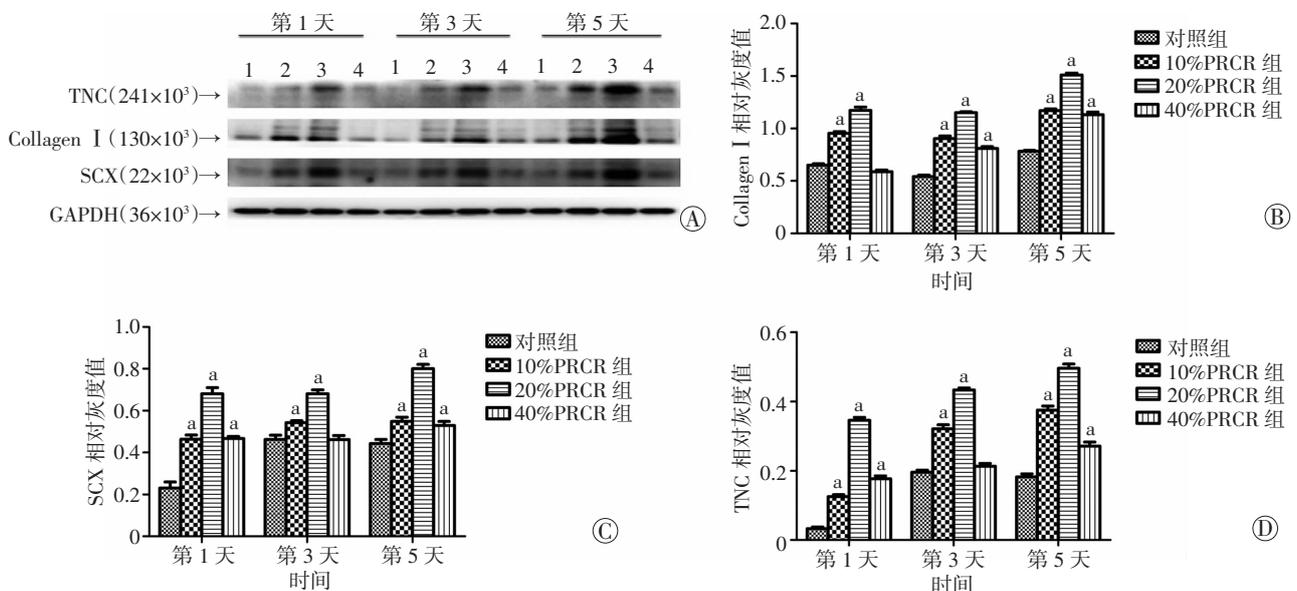
2.2 含适宜 PRCR (20%) 的培养基在体外可显著提高 hUC-MSCs 成肌腱标志性基因的表达

培养 1、3、5 d 时,各组细胞蛋白收集后采用 Western blot 检测成肌腱标志性基因 Collagen I、SCX 及 TNC 的蛋白表达水平(图 2)。Collagen I:1 d 时,10% PRCR 组与 20% PRCR 组的表达量均显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 40% PRCR 组的表达量与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );3、5 d 时,实验组的表达量均显著高于对照组( $P < 0.05$ );在所有时间点,20% PRCR 组的表达量均明显高于其他组( $P < 0.05$ )。SCX:1、5 d 时,各实验组的表达量均显著高于对照组( $P < 0.05$ );3 d 时,10% PRCR 组、20% PRCR 组的表达量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),40% PRCR 组的表达量与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );在所有时间点,20% PRCR 组的表达量均明显高于其他组( $P < 0.05$ )。TNC:1、5 d 时,各实验组的表达量均显著高于对照组( $P < 0.05$ );3 d 时,10% PRCR 组、20% PRCR 组的表达量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),40% PRCR 组的表达量与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );在所有时间点,20% PRCR 组的表达量均明显高于其他组( $P < 0.05$ )。Collagen I、SCX 及 TNC 的表达量在各时间点均以 20% PRCR 组最高,且明显高于其他两个实验组及对照组;表明在体外适宜浓度的 PRCR,即 20% PRCR 组对 hUC-MSCs 成肌腱标志性基因的蛋白水平的表达的

促进作用最为明显(图 2)。

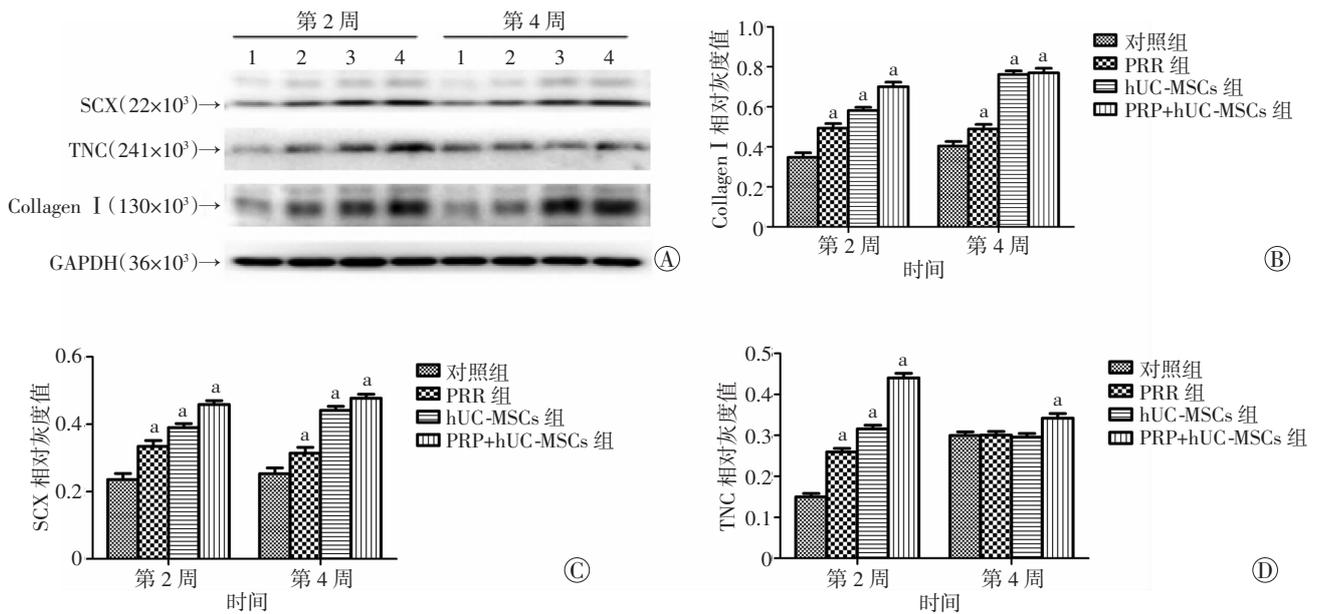
2.3 PRP 复合 hUC-MSCs 促进大鼠跟腱损伤后修复过程中成肌腱标志性基因的表达

按照实验分组于跟腱体部行注射性治疗后 2、4 周,Western blot 测定各组大鼠跟腱中成肌腱相关基因(Collagen I、SCX、TNC)的蛋白表达水平(图 3)。Collagen I:术后 2、4 周,PRP + hUC-MSCs 组的表达量均最高,各实验组均显著高于对照组( $P < 0.05$ );其中 2 周时,各组间均有显著差异( $P < 0.05$ );4 周时,hUC-MSCs 组与 PRP + hUC-MSCs 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。SCX:术后 2、4 周,PRP + hUC-MSCs 组的表达量均最高,实验组均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),且各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TNC:术后 2 周,PRP + hUC-MSCs 组的表达量最高,实验组均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),且各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );术后 4 周,PRP + hUC-MSCs 组的表达量最高,且显著高于其他 3 组( $P < 0.05$ ),而对照组、PRP 组及 hUC-MSCs 组间则差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验表明,Collagen I、SCX 及 TNC 的表达量在全部时间点均以 PRP + hUC-MSCs 组最高,而 hUC-MSCs 组表达也均高于对照组和 PRP 组;PRP 联合 hUC-MSCs 促进大鼠受损跟腱愈合的作用最为显著,单独使用 hUC-MSCs 较单独使用 PRP 促进大鼠跟腱愈合的作用更强,而 PRP 可以增强 hUC-MSCs 促进大鼠受损跟腱愈合的能力。



A: Western blot 检测 1:对照组;2:10% PRCR 组;3:20% PRCR 组;4:40% PRCR 组;B:半定量分析 Collagen I 的表达 a: $P < 0.05$ ,与对照组比较;C:半定量分析 SCX 的表达 a: $P < 0.05$ ,与对照组比较;D:半定量分析 TNC 的表达 a: $P < 0.05$ ,与对照组比较

图 2 Western blot 检测不同培养时间各组 hUC-MSCs 成肌腱相关标志基因蛋白水平表达的变化



A: Western blot 检测 1: 对照组; 2: PRP 组; 3: hUC-MSCs 组; 4: PRP + hUC-MSCs 组; B: 半定量分析 Collagen I 的表达 a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; C: 半定量分析 SCX 的表达 a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; D: 半定量分析 TNC 的表达 a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图 3 Western blot 检测术后不同时间各组大鼠跟腱组织中成肌腱相关标志基因蛋白水平表达的变化

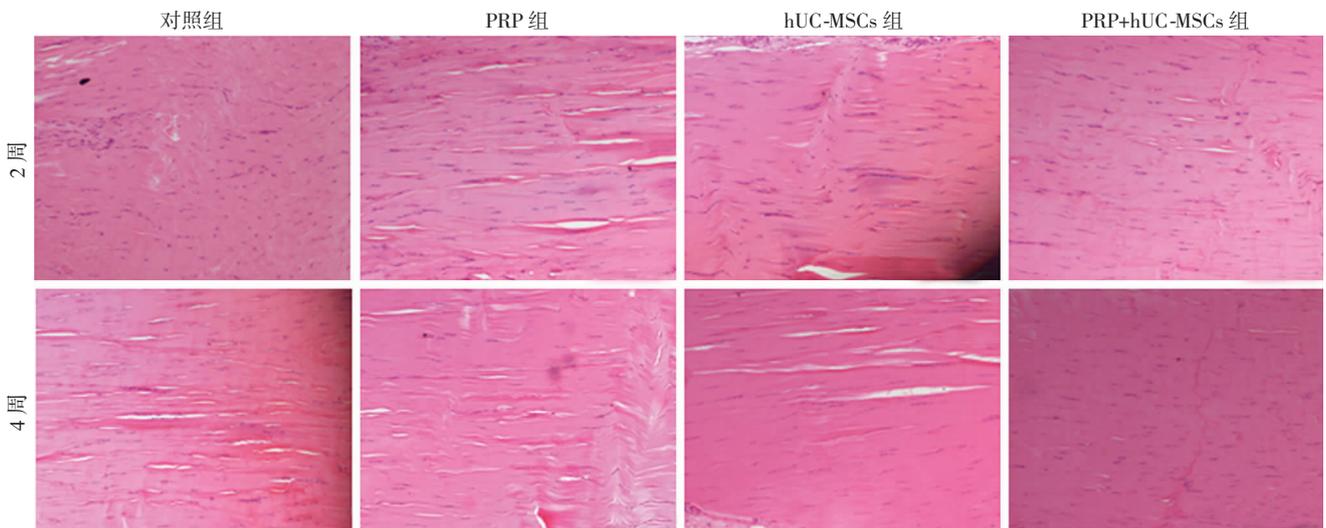


图 4 HE 染色观察各组大鼠术后 2、4 周跟腱愈合情况 (×100)

#### 2.4 PRP 复合 hUC-MSCs 改善了大鼠受损跟腱修复后的组织学表现

按照动物实验分组将术后 2、4 周的大鼠跟腱组织切片并行 HE 染色, 通过显微镜下观察跟腱组织的纤维排列和炎性反应等组织学指标分析跟腱愈合的质量。术后 2 周, PRP 组及对照组跟腱组织中胶原纤维的排列紊乱、无序, 炎性细胞浸润较多; PRP + hUC-MSCs 组及 hUC-MSCs 组跟腱组织中胶原纤维排列更加整齐、有序, 炎性细胞浸润更少; 其中 PRP + hUC-

MSCs 组表现最明显。术后 4 周, 各组跟腱组织的纤维结构、纤维排列和炎性反应等组织学表现均较该组 2 周时的组织学表现更优; hUC-MSCs 组以及 PRP + hUC-MSCs 组的组织学表现均优于对照组, 其中 PRP + hUC-MSCs 组表现最好, 而 PRP 组对受损跟腱愈合的改善不明显 (图 4)。实验结果提示: PRP + hUC-MSCs 组以及 hUC-MSCs 组能在术后 2、4 周让受损跟腱有更好的组织学表现, PRP 可以增强 hUC-MSCs 促进受损跟腱修复的能力, 而单纯使用 PRP 促进受损跟

腱修复的作用有限。

### 3 讨论

肌腱损伤非常多见,跟腱作为完成走、跑、跳等动作不可或缺的肌腱,在肌腱损伤中最为常见。间充质干细胞(MSCs)是组织修复的研究热点,其中hUC-MSCs在向临床转化具有很大的优势及空间;除了前文所述hUC-MSCs的优点外,还有研究表明:其成骨、成脂能力较弱,这可能会减少肌腱及腱周出现异位骨化、脂肪化的风险<sup>[18-20]</sup>。这是本研究选择hUC-MSCs的原因。在肌腱愈合的过程中,肌腱组织中小血小板源性生长因子,表皮生长因子,转化生长因子 $\beta$ 1和胰岛素样生长因子等的表达都会上调,某些因子受体的表达也会上调;而PRP中的血小板也可以释放这些因子,当这些因子与受体结合后即可激活参与组织愈合的相关通路,这为PRP用于肌腱修复提供了理论依据。

本研究中,我们选择了去除白细胞的PRP,因为研究表明,富含白细胞的PRP在体外对干细胞是有害的<sup>[21]</sup>;乏白细胞的PRP与富含白细胞的PRP相比较,能减轻肌腱修复早期的炎症反应,并且可以促进胶原等细胞外基质正常的合成以及减少基质降解<sup>[22-23]</sup>。体外实验结果表明:PRP可以促进hUC-MSCs的增殖,促增殖效应在PRCR体积浓度为20%时达到最强;随着PRCR浓度的增加,这种促增殖的效应逐渐减弱;甚至在预实验中,当PRCR体积浓度达到50%时,细胞开始出现比较明显的死亡现象;这个实验结果和“PRP浓度依赖性的加快细胞增殖只是在某一个浓度范围内”的观点是比较一致的。同样的,PRP可以使hUC-MSCs成肌腱相关标志基因的蛋白表达水平上升,在PRCR体积浓度达到20%时,促进作用最显著;PRCR浓度增加后,这种促进作用减弱甚至可能还会起抑制作用。动物实验中,Western blot结果显示:术后2、4周,PRP+hUC-MSCs组成肌腱相关标志基因的表达最高,hUC-MSCs组次之,PRP组低于两组。这说明hUC-MSCs在肌腱组织“微环境”下有可能成肌腱细胞分化,而PRP具有促进作用。组织学评价也显示:PRP+hUC-MSCs组在术后2、4周让受损跟腱有更好的组织学表现(胶原纤维的排列更加整齐、有序,更少的炎症反应),单纯使用hUC-MSCs或PRP对受损跟腱修复作用均不如二者联合使用时显著。为什么会出现这种情况呢?我们猜测可能和肌腱组织受损后局部恶劣的微环境导致肌腱及腱周组织中促进修复的细胞减少有关,PRP复合hUC-MSCs治疗肌腱损伤的效果之所

以好于两者单独使用,一方面是由于hUC-MSCs作为多能干细胞,具有多向分化潜能,定向分化后可以增加修复细胞的数量,另一方面PRP又为hUC-MSCs的增殖、分化提供了足够的“养分”。

本研究观察了不同浓度PRP在体外对hUC-MSCs增殖、成肌腱分化的影响,以及PRP、hUC-MSCs及二者联合使用对大鼠跟腱损伤修复的影响。结果证实:适宜浓度的PRP可以促进hUC-MSCs增殖、成肌腱分化;PRP与hUC-MSCs联合使用对跟腱损伤修复作用强于二者单独使用,存在协同效应。但PRP浓度影响hUC-MSCs增殖、分化的分子机制,hUC-MSCs在大鼠跟腱组织中的转归以及hUC-MSCs在大鼠受损跟腱修复过程中的具体作用目前尚不清楚,需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Petrou I G, Grognez A, Hirt-Burri N, *et al.* Cell therapies for tendons: old cell choice for modern innovation[J]. *Swiss Med Wkly*, 2014, 144: w13989. DOI:10.4414/smw.2014.13989
- [2] Lee J S, Hong J M, Moon G J, *et al.* A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(6): 1099-1106. DOI:10.1002/stem.430
- [3] Renzi S, Riccò S, Dotti S, *et al.* Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 95(1): 272-277. DOI:10.1016/j.rvsc.2013.01.017
- [4] Lee S Y, Kim W, Lim C, *et al.* Treatment of Lateral Epicondylitis by Using Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(10): 2995-3005. DOI:10.1002/stem.2110
- [5] Lui P P, Kong S K, Lau P M, *et al.* Allogeneic tendon-derived stem cells promote tendon healing and suppress immunoreactions in hosts: *in vivo* model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(21/22): 2998-3009. DOI:10.1089/ten. TEA.2013.0713
- [6] Lin Y M, Wu C C, Chang Y C, *et al.* Target disruption of ribosomal protein pNO40 accelerates aging and impairs osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(4): 903-910. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.12.003
- [7] Ding D C, Chang Y H, Shyu W C, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy[J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 339-347. DOI:10.3727/096368915X686841
- [8] Zhang J, Wang J H. Platelet-rich plasma releasate promotes

- differentiation of tendon stem cells into active tenocytes[J]. *Am J Sports Med*, 2010, 38(12): 2477 – 2486. DOI:10.1177/0363546510376750
- [9] González J C, López C, Álvarez M E, *et al.* Autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for Achilles tendinopathy induced by collagenase in a rabbit model[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19623. DOI:10.1038/srep19623
- [10] Mishra A, Randelli P, Barr C, *et al.* Platelet-rich plasma and the upper extremity[J]. *Hand Clin*, 2012, 28(4): 481 – 491. DOI:10.1016/j.hcl.2012.08.008
- [11] Mishra A K, Skrepnik N V, Edwards S G, *et al.* Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients[J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(2): 463 – 471. DOI:10.1177/0363546513494359
- [12] Di M B, Filardo G, Kon E, *et al.* Platelet-rich plasma: evidence for the treatment of patellar and Achilles tendinopathy—a systematic review[J]. *Musculoskelet Surg*, 2015, 99(1): 1 – 9. DOI:10.1007/s12306-014-0340-1
- [13] Giusti I, D'Ascenzo S, Mancò A, *et al.* Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior *in vitro* [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 630870. DOI:10.1155/2014/630870
- [14] Giusti I, Rughetti A, D'Ascenzo S, *et al.* Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells[J]. *Transfusion*, 2009, 49(4): 771 – 778. DOI:10.1111/j.1537-2995.2008.02033.x
- [15] Tsai Y P, Chang C W, Lee J S, *et al.* Direct radiofrequency application improves pain and gait in collagenase-induced acute achilles tendon injury[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 402692. DOI:10.1155/2013/402692
- [16] Shah V, Bendele A, Dines J S, *et al.* Dose-response effect of an intra-tendon application of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in a rat Achilles tendinopathy model [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(3): 413 – 420. DOI:10.1002/jor.22222
- [17] Chen J, Yu Q, Wu B, *et al.* Autologous tenocyte therapy for experimental Achilles tendinopathy in a rabbit model [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(15/16): 2037 – 2048. DOI:10.1089/ten.TEA.2010.0492
- [18] Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, *et al.* Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 916136. DOI:10.1155/2013/916136
- [19] Hsieh J Y, Fu Y S, Chang S J, *et al.* Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(12): 1895 – 1910. DOI:10.1089/scd.2009.0485
- [20] Burk J, Ribitsch I, Gittel C, *et al.* Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources[J]. *Vet J*, 2013, 195(1): 98 – 106. DOI:10.1016/j.tvjl.2012.06.004
- [21] Zhang L, Chen S, Chang P, *et al.* Harmful Effects of Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma on Rabbit Tendon Stem Cells *In Vitro* [J]. *Am J Sports Med*, 2016. DOI:10.1177/0363546516644718
- [22] Dragoo J L, Braun H J, Durham J L, *et al.* Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons [J]. *Am J Sports Med*, 2012, 40(6): 1274 – 1281. DOI:10.1177/0363546512442334
- [23] Cross J A, Cole B J, Spatny K P, *et al.* Leukocyte-Reduced Platelet-Rich Plasma Normalizes Matrix Metabolism in Torn Human Rotator Cuff Tendons [J]. *Am J Sports Med*, 2015, 43(12): 2898 – 2906. DOI:10.1177/0363546515608157

(收稿:2016-07-26;修回:2016-09-04)

(编辑 龙亮)