DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2023.06.013

富血小板血浆在椎间盘退变治疗中的应用

田志康[1]　综述　　孟纯阳[2]　审校

([1] 济宁医学院临床医学院,济宁 272013;[2] 济宁医学院附属医院脊柱外科,济宁 272029)

摘　要　颈肩腰腿痛是临床常见病,椎间盘退变(intervertebral disc degeneration,IDD)后产生的髓核突出压迫和刺激脊神经根导致的神经病理性疼痛是颈肩腰腿痛的常见原因。随着生活节奏加快,颈肩腰腿痛日渐年轻化,病情严重者会丧失劳动能力甚至致残,给个人、家庭和社会带来了巨大的医疗和经济负担。如何延缓和治疗 IDD 已成为医疗领域的热点和难点。富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP)治疗 IDD 是一种新型无创的非手术疗法,不仅可以改善退变椎间盘的微环境,而且对髓核细胞有着促增殖、促分化、促进基质合成和抗凋亡的作用,且 PRP 与间充质干细胞的联合应用或许会带来更好的疗效。然而由于 PRP 的制备标准不统一,给规范化治疗带来了严峻挑战。本文对 PRP 在治疗 IDD 上的最新研究成果进行了梳理和综述。

关键词　富血小板血浆;椎间盘退变;治疗;修复

中图分类号:R681.5+3　　**文献标识码**:B　　**文章编号**:1000-9760(2023)12-441-05

Application of platelet rich plasma in degenerative intervertebral disc

TIAN Zhikang[1], *MENG Chunyang*[2]

([1]*School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining* 272013 *China*;
[2]*Dapartment of Spinal Surgery, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining* 272029 *China*)

Abstract: Neck, shoulder, waist and leg pain is a common clinical disease, and neuropathic pain caused by the compression of the nucleus pulposus and stimulation of the spinal nerve root after intervertebral disc degeneration (IDD) is a common cause of neck, shoulder, waist and leg pain. With the accelerated pace of life, neck, shoulder, waist and leg pain is becoming increasingly younger, and in severe cases, it can lead to loss of labor ability or even disability, posing a huge medical and economic burden to individuals, families, and society. How to delay and treat IDD has become a hot and difficult topic of global research. Platelet rich plasma (PRP) is a new non-invasive non-surgical treatment for IDD. It can not only improve the microenvironment of degenerative intervertebral discs, but also promote the proliferation, differentiation, matrix synthesis and anti-apoptosis of nucleus pulposus cells. Simultaneously the combined application of PRP and mesenchymal stem cells may bring better therapeutic effects. However, due to the inconsistent preparation standards of PRP, it poses a serious challenge to the research of standardized treatment. This article summarizes the latest research results of PRP in the treatment of intervertebral disc degeneration, with the aim of better clinical application of PRP.

Keywords: Platelet rich plasma; Intervertebral disc degeneration; Treatment; Repair

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)造成的颈肩腰腿痛全球发病率超过 80%[1]。作为人体内最大的无血管组织,椎间盘由中央髓核(nucleus pulposus, NP)、外纤维环和软骨终板 3 部分组成。包括过度机械负荷、生物因素、细胞营养的变化和炎症微环境在内的多种因素均可诱发 IDD[2]。值得注意的是,退变椎间盘内的炎症可以驱动细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、生长因子活性及合成代谢速率降低,从而导致椎间盘保水和承重能力下降,引起椎间盘突出,压迫脊

[基金项目]山东省自然科学基金重点项目(ZR2020KH010),济宁市重点研发计划项目(2022YXNS001)

[通信作者]孟纯阳, E-mail: mengchunyang1600@mail.jnmc.edu.cn

神经诱发颈肩腰腿痛[3]。

当前 IDD 的治疗主要包括保守治疗和手术治疗,其中保守治疗以缓解疼痛为主要目的,包括休息、物理和药物治疗方法。手术治疗则是通过消除脊柱节段间的运动来减少椎间盘源性疼痛。寻找一种行之有效的无创非手术疗法已成为当前的难点和热点。随着生物治疗技术的快速发展,使用自体细胞疗法治疗 IDD 的病例日益增加,其中最具代表性的是富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)和含有间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的骨髓浓缩物。

1　PRP 分类与制备

PRP 是众多生物疗法中一项很有前景的新技术,它是由自体全血离心得到的,包含许多从血小板 α-颗粒和致密颗粒中释放的生物活性介质,还有一些来自血浆的成分,如凝血酶原、纤维蛋白原、纤维连接蛋白等。PRP 的生物学功能表现在与活化的血小板表达的黏附蛋白一起参与组织损伤识别和受损组织修复,并在细胞信号通路中发挥核心作用[4]。由于其极具潜力的再生作用,已成为骨科急慢性疾病的一种有前途的治疗工具[5-6]。此外,PRP 不仅对髓核细胞(Nucleus pulposus cells, NPCs)有促增殖、促分化、抗凋亡的作用,而且可以通过诱导 ECM 的合成和分泌来调控细胞外微环境。PRP 应用于 IDD 有以下优点:1)不发生免疫排斥反应;2)可以避免疾病的传播;3)可以通过离心制备,且比重组生长因子价格低。然而,由于其制备标准不统一,不同的制备方法可能导致细胞和细胞因子在 PRP 中的浓度不同[7-8],给研究 PRP 带来了巨大的挑战。

根据白细胞和纤维蛋白含量不同,PRP 主要分为 4 类:纯富血小板血浆(pure platelet-rich plasma, P-PRP)、白细胞富血小板血浆(leukocyte-containing platelet-rich plasma, L-PRP)、富白细胞血小板纤维蛋白和纯富血小板纤维蛋白。不同类型的 PRP 因其物质成分的含量不同,对 IDD 的修复作用也不同[8]。众所周知,白细胞的数量上升会增加 TNF-α、IL-1β 等炎症相关因子的表达。尽管 P-PRP 和 L-PRP 均能诱导正常髓核间充质干细胞(N-NPMSCs)的增殖和分化,上调 ECM 相关蛋白的表达。但是 L-PRP 中的白细胞会激活 NF-κB 通路,上调椎间盘细胞的分解代谢细胞因子 MMP-1 和 MMP-13,增强椎间盘细胞的分解代谢,抵消血小板释放的生长因子的抗炎作用,对 IDD 的修复产生不利影响[9]。此外,L-PRP 中的白细胞可以激活退变的髓核间充质干细胞(D-NPMSCs)的炎症反应和分解代谢[10],抑制 NPMSCs 的增殖和分化,从而减缓其对退变椎间盘的修复作用。与 N-NPMSCs 相比,D-NPMSCs 形成的集落更少,增殖更慢,PRP 中的白细胞成分降低了 PRP 的促增殖作用,因此,P-PRP 或许是更适合的早期 IDD 治疗策略。目前制备 PRP 没有明确的标准,不同方法得到的 PRP 中生物活性成分含量和疗效存在显著差异[11]。有研究比较了手工制备一次离心法及 OSP 套装制备二次离心法制备的 PRP 对 IDD 修复作用的影响[12]。结果显示,相对于手工制备方式,以 OSP 为代表的套装制备法所得 PRP 的白细胞浓度和血小板富集倍数均高于手工组。同时套装制备组对退变椎间盘有更明显的细胞增殖作用,可以更好地促进胶原蛋白Ⅱ(collagen type Ⅱ, COLⅡ)的合成。然而,套装制备组的白细胞浓度也较高,其产生的促炎因子能够促进蛋白聚糖(aggrecan, AGC)的去硫酰化并诱发其降解,抑制细胞外基质的合成,降低疗效。因此,有必要进一步明确 PRP 的制备标准以及各组分对退变椎间盘的精确作用,并分离出白细胞等不利于 IDD 修复的成分,使其在临床发挥更佳的作用。

2　PRP 在 IDD 修复中的研究

2.1　体外研究

PRP 中有丰富的生长因子,其中转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)的浓度最高,其不仅可以促进 ECM 的合成,同时还可以参与免疫调节、损伤修复等多种生理过程[13-14]。经 PRP 处理后,NPCs 中 TGF-β1 的浓度明显升高,同时 PRP 可以有效提高 COLⅡ、AGC、sox-9 mRNA 的表达水平,以及 Smad2/3、COLⅡ、AGC 的蛋白表达。用 TGF-β1 抑制剂抑制 TGF-β1 受体的激活,可降低 Smad2/3、COLⅡ和 AGC 的表达[15]。这表明,PRP 通过髓核细胞的 TGF-β1 受体激活 TGF-β1/Smad2/3 通路,增加 ECM 成分的合成分泌,发挥 IDD 治疗作用。

P-PRP 来源的外泌体(platelet-rich plasma exosomes, PRP-exo)是 PRP 释放的含有高浓度生长因子的微粒,能消除 NPCs 中 H_2O_2 诱导产生的

活性氧,并抑制 NPCs 促炎细胞因子(IL-1β、IL-18、TGF-β 和 IL-6)的生成和分泌[16]。同时,PRP-exo 可以通过下调 Keap1 来促进 Keap-Nrf2 复合物释放 Nrf2,并使 Nrf2 从细胞质转移到细胞核发挥其抗氧化作用,抑制氧化应激介导的细胞焦变性,从而减轻 IDD。此外 PRP-exo 通过调控 NF-κB 和 MAPK 通路来抑制 M1 巨噬细胞的极化,促进 STAT6 磷酸化影响 M2 巨噬细胞的极化,增加 NLRP3 泛素化和减少 IL-1β 和 Caspase-1 的产生促进 NLRP3 的自噬降解。同时,PRP-exo 还可减少 IL-1β 诱导的 NPCs 凋亡[17]。PRP-exo 对 IDD 的治疗作用显示了 PRP 在 IDD 非细胞疗法中的巨大潜力。

这都充分验证了 PRP 在促进 NPCs 增殖、分化、抗炎、抗氧化等方面具有重要作用。尽管如此,对 PRP-exo 的相关研究还很有限。将来的研究可以向分离 PRP 中的有效成分(如外泌体、TGF-β1 等)来修复退变的椎间盘靠拢。同时,PRP 对细胞增殖的积极作用不与 PRP 的浓度呈正相关,高浓度的 PRP 也可能抑制细胞增殖,而低浓度的 PRP 可能对细胞增殖有长期的积极影响[15]。

2.2　体内研究

PRP 的体内实验不仅可以模拟临床环境的修复过程,还可以发挥其作为一种自体动态、海绵状纤维蛋白基质支架的真正治疗潜力,为临床应用奠定基础。

与体外研究得出的结论一致,由于 PRP 中 TGF-β 含量较高,可以激活 TGF-β/Smad 2/3 途径,促进 COLⅡ和其他基质成分的合成和分泌,从而延缓 IDD[15]。含有 PRP 的水凝胶能有效修复大鼠的退变椎间盘[18]。PRP 发挥修复作用的前提是被凝血酶等激活物激活,从而将其含有的各种生长因子释放出来。然而激活后的 PRP 会立即转变为凝胶状,不利于注射。这为 PRP 的研究带来了新的挑战,先前的研究从激活的 PRP 中提取出呈现液态、可用于椎间盘注射的富血小板血浆释放物(platelet-rich plasma releasate, PRPr),注射入退变椎间盘后,椎间盘高度、组织学形态、细胞数量、ECM 含量均得到明显改善,并且 PRPr 治疗后椎间盘内的 AGC 和 COLⅡ含量升高[19]。提高 PRP 中血小板含量将有助于获取更高活性的 PRPr,这为 PRP 治疗 IDD 提供了新的方向。

细胞治疗 IDD 的局限性之一是由于 IDD 的恶劣微环境限制了 MSCs 的生存和分化能力[20],而 PRP 却可以通过诱导 ECM 合成和分泌来调控细胞外微环境[21]。

最近,有研究将 PRP 作为水凝胶成分,构成负载 MSCs 的载体,用来修复退变的椎间盘。结果显示含有 PRP 的水凝胶不仅可以维持椎间盘结构的完整性,同时可以增强 MSCs 的增殖活力及抗氧化能力[22-23]。

含有 PRP 的水凝胶与骨髓间充质干细胞或脂肪间充质干细胞联合注射到退化的动物椎间盘中发现 MSCs 在体内移植后能存活 12 周,远超过单纯注射 MSCs[24-25]。这是由于注入椎间盘的 PRP 可以被周围组织激活,与 MSCs 形成三维支架,维持 MSCs 的增殖与活力,保持其持续的再生作用。以上这些研究表明,PRP 与 MSCs 的联合治疗或许是治疗 IDD 的更好方式,然而最佳的 PRP 和 MSCs 的移植方法和治疗比例仍不明确,希望将来可以制定出与 MSCs 联合使用的最佳比例。且 PRP 通过哪种方式来调控 MSCs 的增殖分化能力及抗氧化还有待进一步探讨。

3　PRP 在 IDD 修复中的临床应用

体外实验和体内实验都已证明 PRP 对退变椎间盘的治疗作用,接下来需要在临床试验中进一步验证。一项对 47 例慢性腰椎间盘源性疼痛患者的前瞻性、双盲、随机对照研究表明[26],与对照组相比,椎间盘内注射 PRP 在功能[功能评分指数(Functional Rating Index, FRI)、疼痛(数值评分量表(Numeric Rating Scale, NRS)]和患者满意度方面有统计学意义的改善。经过一年的随访,NRS、FRI 和 SF-36 疼痛评分从基线到 6 个月再到 1 年得到持续显著的改善。两年以后 PRP 注射液治疗对疼痛和功能的改善仍旧具有统计学意义,并且注射 PRP 没有显示出不良事件[27]。Cheng 等[28]将随访时间再次延长至 5~9 年,结果显示这部分患者在注射治疗 5~9 年同样表现出统计学上和临床上显著的疼痛和功能改善。一系列临床随访充分说明 PRP 采取椎间盘注射法治疗 IDD 是可取的并且具有长期疗效。此外,有研究评估了在透视引导下硬膜外椎板间注射 5mLPRP 治疗慢性 IDD 相关下腰痛患者的临床疗效。在为期 3 个月的研究中,患者症状逐渐持续改善,VAS 评分和改良 Oswestry 残疾问卷评分均有所改善。值得注意的是,经硬膜外注

射的 PRP 可直接进入病变神经根区域,同样没有产生不良反应[29]。鉴于该试验随访时间较短,仍需进一步的研究来探明经硬膜外椎板间注射 PRP 的长期有效性及安全性。

在有限的研究中我们可以发现,不论是在椎间盘内注射 PRP 还是通过硬膜外椎间板注射 PRP,对退行性椎间盘的治疗都有作用,且没有不良事件发生。希望将来可以有更多的临床资料来优化 PRP 治疗策略,更好地服务于临床 IDD 的修复。

4　总结与展望

IDD 是一种慢性退行性疾病,其特点是 NPCs 数量减少,ECM 降解,促炎因子水平升高。PRP 作为生物治疗 IDD 的重要组成部分,其所含有的各种生长因子不仅发挥促进 NPCs 增殖、ECM 合成、抑制炎症反应、改善退变椎间盘的微环境的作用。而且 PRP 不会造成免疫排斥反应和疾病的传播,还可以通过离心制备。经 PRP 改善后的微环境更加适合 MSCs 的生存,此外,PRP 与 MSCs 在 IDD 的联合使用,为 IDD 的修复提供了一个全新的、可行的策略。

然而,PRP 的制备标准一直未能得到统一,不同方法得到的 PRP 中生物活性成分含量存在显著差异,且对于能够引发最优作用效果的 PRP 的确切体积分数尚无明确定论。目前已明确修复作用机制的生长因子是 TGF-β1,其他生长因子的作用机制还有待进一步研究。值得注意的是随着年龄的增长,PRP 依赖其生长因子对 IDD 的修复作用会因细胞膜上生长因子的受体的减少而变差,所以 PRP 主要作为一种早期预防椎间盘进一步退变的治疗方式。随着生物治疗成为研究热点,PRP 与 MSCs 的联合应用或许可以结合两种治疗的优点,成为新的研究方向。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

[1] Ding SL, Zhang TW, Zhang QC, et al. Excessive mechanical strain accelerates intervertebral disc degeneration by disrupting intrinsic circadian rhythm[J]. Exp Mol Med, 2021, 53(12): 1911-1923. DOI: 10. 1038/s12276-021-00716-6.

[2] Kamali A, Ziadlou R, Lang G, et al. Small molecule-based treatment approaches for intervertebral disc degeneration: Current options and future directions[J]. Theranostics, 2021, 11(1): 27-47. DOI: 10. 7150/thno. 48987.

[3] Sun Y, Lyu M, Lu Q, et al. Current perspectives on nucleus pulposus fibrosis in disc degeneration and repair [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6612. DOI: 10. 3390/ijms23126612.

[4] Zhou T, Ran J, Xu P, et al. A hyaluronic acid/platelet-rich plasma hydrogel containing MnO(2) nanozymes efficiently alleviates osteoarthritis in vivo[J]. Carbohydr Polym, 2022, 292: 119667. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2022. 119667.

[5] Belk JW, Kraeutler MJ, Houck DA, et al. Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid for knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Am J Sports Med, 2021, 49(1): 249-260. DOI: 10. 1177/0363546520909397.

[6] Xuan Z, Yu W, Dou Y, et al. Efficacy of platelet-rich plasma for low back pain: A systematic review and meta-analysis[J]. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2020, 81(6): 529-534. DOI: 10. 1055/s-0040-1709170.

[7] Chang Y, Yang M, Ke S, et al. Effect of platelet-rich plasma on intervertebral disc degeneration in vivo and in vitro: A critical review[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8893819. DOI: 10. 1155/2020/8893819.

[8] Everts P, Onishi K, Jayaram P, et al. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7794. DOI: 10. 3390/ijms21207794.

[9] Jia J, Wang SZ, Ma LY, et al. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma on nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells: Implications for the clinical treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 7162084. DOI: 10. 1155/2018/7162084.

[10] Wang SZ, Fan WM, Jia J, et al. Is exclusion of leukocytes from platelet-rich plasma (PRP) a better choice for early intervertebral disc regeneration?[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 199. DOI: 10. 1186/s13287-018-0937-7.

[11] Dejnek M, Witkowski J, Moreira H, et al. Content of blood cell components, inflammatory cytokines and growth factors in autologous platelet-rich plasma obtained by various methods[J]. World J Orthop, 2022, 13(6): 587-602. DOI: 10. 5312/wjo. v13. i6. 587.

[12] 练诗林,张燕,蒋强,等. 全血及不同方式制备富血小板血浆对髓核细胞的干预效应[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(8): 1199-1204. DOI: 10. 12307/2023. 061.

[13] Zhang T, Wang XF, Wang ZC, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF-beta/Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110287. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2020. 110287.

[14] Lodyga M, Hinz B. TGF-beta1-A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity[J]. Semin Cell Dev Biol, 2020, 101: 123-139. DOI: 10. 1016/j. semcdb. 2019. 12. 010.

[15] Yang H, Yuan C, Wu C, et al. The role of TGF-beta1/Smad2/3 pathway in platelet-rich plasma in retarding intervertebral disc degeneration [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(8): 1542-1549. DOI: 10. 1111/jcmm. 12847.

[16] Xu J, Xie G, Yang W, et al. Platelet-rich plasma attenuates intervertebral disc degeneration via delivering miR-141-3p-containing exosomes [J]. Cell Cycle, 2021, 20 (15): 1487-1499. DOI: 10. 1080/15384101. 2021. 1949839.

[17] Qian J, Wang X, Su G, et al. Platelet-rich plasma-derived exosomes attenuate intervertebral disc degeneration by promoting NLRP3 autophagic degradation in macrophages[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 108962. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2022. 108962.

[18] Chai Q, Zhang B, Da Y, et al. Enhancement and repair of degenerative intervertebral disc in rats using platelet-rich plasma/ferulic acid hydrogel[J]. Cartilage, 2023, 14(4): 506-515. DOI: 10. 1177/19476035231157341.

[19] 朱锴. 自体富血小板血浆释放物对兔退变椎间盘修复作用的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.

[20] Hu S, Xing H, Zhang J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Immunomodulatory effects and potential applications in intervertebral disc degeneration[J]. Stem Cells Int, 2022, 2022: 7538025. DOI: 10. 1155/2022/7538025.

[21] Vadala G, Russo F, Di Martino A, et al. Intervertebral disc regeneration: from the degenerative cascade to molecular therapy and tissue engineering[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2015, 9(6): 679-690. DOI: 10. 1002/term. 1719.

[22] Russo F, Ambrosio L, Peroglio M, et al. A hyaluronan and platelet-rich plasma hydrogel for mesenchymal stem cell delivery in the intervertebral disc: An organ culture study[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 2963. DOI: 10. 3390/ijms22062963.

[23] Wang F, Guo K, Nnan L, et al. Kartogenin-loaded hydrogel promotes intervertebral disc repair via protecting MSCs against reactive oxygen species microenvironment by Nrf2/TXNIP/NLRP3 axis[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 204: 128-150. DOI: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2023. 04. 018.

[24] Hou Y, Shi G, Shi J, et al. Study design: in vitro and in vivo assessment of bone morphogenic protein 2 combined with platelet-rich plasma on treatment of disc degeneration[J]. Int Orthop, 2016, 40(6): 1143-1155. DOI: 10. 1007/s00264-015-2840-5.

[25] Ma C, Wang R, Zhao D, et al. Efficacy of platelet-rich plasma containing xenogenic adipose tissue-derived stromal cells on restoring intervertebral disc degeneration: A preclinical study in a rabbit model[J]. Pain Res Manag, 2019, 2019: 6372356. DOI: 10. 1155/2019/6372356.

[26] Tuakli-wosorun YA, Terry A, Boachie-adjei K, et al. Lumbar intradiskal platelet-rich plasma (PRP) injections: A prospective, double-blind, randomized controlled study[J]. PM R, 2016, 8(1): 1-10. DOI: 10. 1016/j. pmrj. 2015. 08. 010.

[27] Monfett M, Harrison J, Boachie-adjei K, et al. Intradiscal platelet-rich plasma (PRP) injections for discogenic low back pain: an update[J]. Int Orthop, 2016, 40(6): 1321-1328. DOI: 10. 1007/s00264-016-3178-3.

[28] Cheng J, Santiago KA, Nguyen JT, et al. Treatment of symptomatic degenerative intervertebral discs with autologous platelet-rich plasma: follow-up at 5-9 years[J]. Regen Med, 2019, 14(9): 831-840. DOI: 10. 2217/rme-2019-0040.

[29] Bhatia R, Chopra G. Efficacy of platelet rich plasma via lumbar epidural route in chronic prolapsed intervertebral disc patients-a pilot study[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10 (9): UC05-UC07. DOI: 10. 7860/JCDR/2016/21863. 8482.

(收稿日期　2023-01-06)
(本文编辑: 石俊强)