

富血小板血浆对兔腰背根神经节细胞凋亡的影响

董晤讯¹, 马勇¹, 郭杨¹, 朱爱洪², 朱亚亮², 黄浩², 于辉², 于晖曜²

作者单位:¹南京中医药大学第一临床医学院骨伤研究所, 江苏 南京 210023;

²常州市金坛区中医医院骨伤科, 江苏 常州 213200

通信作者: 朱爱洪, 男, 主任中医师, 研究方向为中医药防治脊柱关节病, E-mail: zah26588@163.com

基金项目: 江苏省金坛市科技计划社会发展项目(JT2013070、JT201461)

摘要:目的 观察富血小板血浆对兔背根神经节结扎加自体髓核移植所致背根神经节组织学形态及神经元凋亡的作用, 并初步探讨其作用机制。方法 2017年10月至2018年2月, 将48只新西兰兔按随机数字表法分为治疗组、对照组和假手术组, 造模后治疗组给予相同剂量的自体富血小板血浆, 对照组给予等体积自体脂肪组织, 假手术组只暴露背根神经节。取相应背根神经节标本, 行石蜡包埋切片后进行HE染色、TUNEL法染色, 镜下观察并计算阳性细胞数, 所得数据用SPSS 19.0统计软件进行分析。结果 各组大鼠96 h背根神经节HE染色可见: 对照组神经元皱缩, 排列欠规则, 细胞间隙宽, 尼氏小体变少, 细胞核缩小; 治疗组细胞排列规则, 细胞间隙无明显增宽; 假手术组无明显病理变化。各个时间点, 治疗组24 h(15.29±0.98)个、48 h(12.32±0.85)个、72 h(14.55±0.79)个、96 h(15.29±0.98)个的TUNEL法阳性细胞数明显低于对照组的24 h(21.93±2.44)个、48 h(24.34±3.82)个、72 h(23.83±3.30)个、96 h(27.45±1.44)个, 但高于假手术组24 h(5.36±1.05)个、48 h(5.27±1.22)个、72 h(4.20±0.46)个、96 h(4.98±0.72)个($P < 0.05$)。结论 兔腰背根神经节结扎加自体髓核移植可造成神经元凋亡; 富血小板血浆可以抑制细胞凋亡, 对神经元具有保护作用。

关键词:富血小板血浆; 神经节, 脊; 椎间盘移位; 细胞凋亡; 组织学形态; 兔

Effect of platelet-rich plasma on apoptosis of lumbar dorsal root ganglion cells in rabbits

DONG Wuxun¹, MA Yong¹, GUO Yang¹, ZHU Aihong², ZHU Yaliang², HUANG Hao², YU Hui², YU Huiyao²

Author Affiliations: ¹Institute of Orthopaedics and Trauma, The First Clinical School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China; ²Department of Orthopedics and Traumatology, Jintan District Traditional Chinese Medicine Hospital, Changzhou, Jiangsu 213200, China

Abstract: Objective To observe the effect of platelet-rich plasma on the histological morphology and neuronal apoptosis of dorsal root ganglion in rabbits with dorsal root nerve ligation and autologous nucleus pulposus transplantation, and to explore the mechanism of action. **Methods** From October 2017 to February 2018, forty-eight New Zealand rabbits were divided into treatment group, control group and sham operation group according to the random number table method. After the model was established, the same dose of autologous platelet-rich plasma was administered to the treatment group, and the control group was given an equal volume of autologous adipose tissue, the sham-operated group only exposed the dorsal root ganglion. The corresponding dorsal root ganglion specimens were taken, paraffin-embedded and sliced for HE and TUNEL staining. The number of positive cells was observed under microscope and the data was analyzed with SPSS 19.0 statistical software. **Results** 1. HE staining of dorsal root ganglion at 96h in each group showed that neurons in the control group shrank, the arrangement was irregular, the cell gap was wide, the Nissl body was reduced, and the nucleus was reduced. The cells in the treatment group had regular arrangement and cell gaps. No significant widening; no significant pathological changes in the sham group. 2. At various time points, the number of TUNEL positive cells in treatment group was significantly lower than that in the control group at 24h (15.29±0.98), 48h (12.32±0.85), 72h (14.55±0.79), 96h (15.29±0.98) at 24h (21.93±2.44), 48h (24.34±3.82), 72h (23.83±3.30), 96h (27.45±1.44), but higher than sham operation group 24h (5.36±1.05), 48h (5.27±1.22), 72h (4.20±0.46), 96h (4.98±0.72) ($P < 0.05$). **Conclusion** Rabbit lumbar dorsal root ganglion ligation plus autologous nucleus pulposus transplantation can cause neuronal apoptosis, platelet-rich plasma can inhibit cell apoptosis and protect neurons.

Key words: Platelet-rich plasma; Ganglia, spinal; Intervertebral disc displacement; Apoptosis; Histological morphology; Rabbits

腰椎间盘突出症是临床上极为常见的疾病,其发病率较高^[1]。近几年,富血小板血浆(Platelet Rich Plasma, PRP)用于组织再生与修复已经被临床医生和科研人员广泛采用,主要包括组织再生和组织修复^[2]。PRP是从全血中提取出来的血小板浓缩液,含有高浓度的血小板。而每个成型血小板中含有超过30种生物活性蛋白,其中大多数在组织修复中起基础作用^[3]。研究表明,机械性压迫与炎症化学性刺激是腰椎间盘突出后引起腰脊神经根病理生理变化的重要原因^[4]。本研究将兔自体髓核组织移植于腰背根神经并结扎神经根,制作兔腰背根神经机械性压迫、炎性损伤动物模型,该模型除了能产生机械压迫及脊神经根缺血病理改变外,还能通过自体髓核移植产生大量炎症因子,刺激神经根,能较稳定、长久地产生神经痛样的改变,能较好地模拟人类腰椎间盘突出症的发病机制。建模后观察自体PRP干预后腰背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)组织学形态及细胞凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 研究时间为2017年10月至2018年2月,实验动物为健康新西兰兔48只,雌雄各半,体质量范围为1.5~2.0 kg,由南京中医药大学实验动物中心提供并饲养(动物合格证号:201720320)。所有兔均分笼,适应性饲养1周,每日供应足量食物和水,定期更换托盘垫料、消毒和通风。饲养室温度维持在20~25℃,湿度50%~80%,模拟昼夜照明。所有实验操作步骤均轻柔,避免过度刺激实验兔引起紧张。将实验兔按随机数字表法分为治疗组、对照组、假手术组,每组16只。其中造模术后由于失血过多死亡6只,依次补齐后进行实验。本研究符合一般动物试验伦理学要求。

HE染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(显色法)(上海碧云天生物技术有限公司);凝血酶(Sigma公司,美国);抗凝剂枸橼酸钠(南京中医药大学实验中心)。高速冷冻离心机(德国Eppendorf);Image Pro Plus 6.0图像分析系统(Media Cybernetics公司,美国)。

1.2 PRP制备 使用10 mL无菌注射器,吸取20%枸橼酸钠润管,抽取治疗组耳中动脉血约8 mL,其中2 mL用于血小板计数,剩余6 mL置入含有枸橼酸钠抗凝剂的离心管内用于制备PRP。根据Aghaloo二次离心法,首先以215 g离心10 min,吸取白膜层以上血浆置入另一离心管内进行二次离心,以863 g离心10 min,去除上清,留取下层约0.8 mL液体摇匀,即为PRP。取0.2 mL PRP用于血小板计数,剩余0.6

mL PRP中加入0.06 mL凝血酶(浓度1 000 U/mL,溶剂为10%氯化钙),激活PRP以凝集成胶状。

1.3 模型制备及实验方法^[5] 实验新西兰兔采用耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠,按1 mL/kg麻醉,麻醉成功后,将兔俯卧位固定,常规碘伏消毒,铺无菌洞巾。以腰4棘突旁开1 mm为 midpoint,顺棘突方向切开,切口约长4 cm,沿棘突右侧剥离髂棘肌并向一侧分开。咬除L4、L5右侧椎板、关节突和部分椎弓根。显露右侧硬脊膜及L4的右侧神经根。假手术组不作干预,治疗组与对照组采用4-0铬制肠线环扎L4背根神经,松紧度以背根神经略受压变形为度。截断兔尾,取一个椎间盘的髓核,将其移植到右侧L4神经节周围。行相应治疗后缝合切口。

1.4 治疗及观察方法 治疗组兔模型将凝胶状PRP置于DRG周围后缝合切口,对照组兔模型则置入等体积自体脂肪后缝合切口,假手术组不作干预缝合切口。术后3组兔均肌内注射青霉素40万U抗炎治疗。术后分别于24、48、72、96 h取DRG,HE染色观察组织学形态,TUNEL法染色,镜下观察并计算阳性细胞数。

1.5 观察指标

1.5.1 DRG组织形态学观察 测定机械刺激痛阈值后,将3组兔取出的右L4 DRG以生理盐水冲洗后,投入4%多聚甲醛溶液中固定24 h,以备制作光镜标本。病理组织切片按常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后,HE染色、脱水、透明、封片,光学显微镜下观察各组织形态学变化。

1.5.2 TUNEL染色观察DRG细胞凋亡 ①将3组DRG石蜡切片常规脱蜡、复水。②滴加3%过氧化氢1 mL,阻断内源性辣根过氧化物酶。③滴加0.1% TritonX-100使细胞膜的通透性增加。④PBS、双蒸馏水冲洗。⑤标记:滴加TUNEL反应混合液50微升/片。⑥信号转化和分析:加入转化剂-POD(酶标记抗荧光素抗体)、DAB、苏木精复染、脱水、透明、封片。光学显微镜下观察3组兔DRG细胞凋亡率,分析结果,阳性细胞细胞核为棕黄色。

1.6 统计学方法 采用SPSS 19.0软件包处理数据结果。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组多时点比较采用两因素重复测量方差分析,组间精细比较为LSD-*t*检验,时间精细比较为差值*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板计数 兔耳中动脉血中血小板计数为 $(191.93 \pm 12.50) \times 10^9/L$ 。PRP中血小板计数为 $(879.06 \pm 24.70) \times 10^9/L$,约为外周血的4.59倍,达有

效治疗浓度标准。

2.2 组织形态学观察 各组兔于术后各时间点麻醉后,暴露结扎的 DRG。术后 24 h、48 h 肉眼见 DRG 轻度水肿,与周围组织无粘连。术后 72 h、96 h 肉眼观察对照组可见 DRG 水肿,与周围组织粘连;治疗组 DRG 水肿程度较低,与周围组织无粘连,可轻易游离 DRG;假手术组未见 DRG 水肿。术后 96 h HE 染色:可见对照组、治疗组细胞排列规则,细胞间隙无明显增宽;对照组神经元皱缩,排列欠规则,细胞间隙宽,尼氏小体变少,细胞核缩小;假手术组无明显病理变化。

2.3 TUNEL 染色观察 DRG 细胞凋亡 治疗组四个时间点, TUNEL 阳性细胞数均低于对照组 ($P < 0.05$);对照组术后随时间延长 TUNEL 阳性细胞数逐渐增加 ($P < 0.05$);治疗组与假手术组相比,在各个时间点阳性细胞数差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。假手术组与对照组相比,各时间点阳性细胞数均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三组兔富血小板血浆对腰背根神经节细胞凋亡的影响/(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	16	21.93±2.44 ^a	24.34±3.82 ^{bc}	23.83±3.30 ^{bc}	27.45±1.44 ^{ac}
治疗组	16	9.09±1.39 ^{ab}	12.32±0.85 ^{abc}	14.55±0.79 ^{abc}	15.29±0.98 ^{abc}
假手术组	16	5.36±1.05	5.27±1.22	4.20±0.46 ^c	4.98±0.72
整体分析(HF系数)		0.8894			
组间F值,P值		3,401.938,0.000			
时间F值,P值		29.011,0.000			
交互F值,P值		12.385,0.000			

注:与假手术组同时点比较,^a $P < 0.05$,与对照组同时点比较,^b $P < 0.05$;与组内 24 h 比较,^c $P < 0.05$

3 讨论

细胞凋亡是由基因控制的一种程序性死亡过程,这一过程涉及有多个基因及神经生长因子的参与^[6-10]。有研究发现脊神经根受损后,可出现长达数月的神经元凋亡^[11-12]。腰椎间盘突出压迫造成神经根损伤,可引起 DRG 内细胞凋亡。本研究通过对兔背根神经结扎加自体髓核移植,对神经根产生机械性压迫。同时破裂的髓核释放的化学性物质作用于神经根产生炎症反应^[13],造成神经根损伤。在本研究各时间点中,对照组 DRG 中细胞凋亡率明显高于假手术组 ($P < 0.05$),表明该模型可以诱导 DRG 的神经元凋亡。

PRP 疗法已经成为增强组织修复和再生的潜在方法,其临床应用已经扩展到口腔科、皮肤科、眼科、骨科和运动医学等专业领域。一项 PRP 联合同

种异体骨移植治疗骨缺损的随机临床对照试验展现了 PRP 在组织修复方面的能力^[14]。PRP 中富含高浓度血小板,通过氯化钙及凝血酶激活后可释放多种生长因子,其活性可持续 5~8 d^[15]。有研究表明,PRP 中肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)参与抗炎症过程^[16],HGF 可特异性抑制 E-选择素,进而诱导抗炎细胞因子^[17];此外,HGF 可通过抑制 NF- κ B 通路的活化,来降低促炎细胞因子 TNF- α 基因的转录^[18]。在小鼠皮瓣缺血再灌注损伤实验中,PRP 可以抑制 NF- κ B 通路及 TNF- α 的表达^[19]。在对坐骨神经损伤的研究中,发现 PRP 可增强周围神经修复能力,可能与 PRP 中的生长因子参与了神经再生过程有关^[20]。在另一项研究中,发现 PRP 可降低 Bax 基因表达,进而抑制凋亡^[21]。有研究表明 PRP 可促进神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF)表达,这对背根神经节修复具有重要意义^[22]。本研究发现,对照组 TUNEL 阳性细胞数明显高于治疗组与假手术组 ($P < 0.05$),提示自体 PRP 可以明显抑制 DRG 神经元凋亡。

据上所述,本研究结果表明,在兔神经根压迫及炎症模型中,使用自体 PRP 治疗后,可显著降低术后 96 h DRG 细胞凋亡率,抑制细胞凋亡,对神经元具有保护作用,未来通过进一步研究,可能为椎间盘突出症病人的治疗提供新的选择。

参考文献

- [1] 周谋望,岳寿伟,何成奇,等.“腰椎间盘突出症的康复治疗”中国专家共识[J].中国康复医学杂志,2017,32(2):129-135.
- [2] BEIGI MH, ATEFI A, GHANAIEI HR, et al. Activated platelet-rich plasma (PRP) improves cartilage regeneration using adipose stem cells encapsulated in a 3D alginate scaffold [J]. Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine, 2018, 12(6):1327-1338.
- [3] XIE X, ZHANG C, TUAN RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1):204.
- [4] CHEN BL, GUO JB, ZHANG HW, et al. Surgical versus non-operative treatment for lumbar disc herniation: a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Rehabil, 2018, 32(2):146-160.
- [5] 周渝,王玲,陈丙波,等.一种新型大鼠腰椎间盘突出症动物模型的建立[J].中国实验动物学报,2008,16(1):23-26.
- [6] SOARES NDC P, TEODORO AJ, OLIVEIRA FL, et al. Lycopene induce apoptosis in human prostate cells and alters the expression of Bax and Bcl-2 genes [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(2):1290-1297.
- [7] LI Y, HAN F, SHI Y. Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder [J]. Journal of Molecu-

- lar Neuroscience, 2013, 51(1):127-137.
- [8] KUNER P, HERTEL C. NGF induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line expressing the neurotrophin receptor p75NTR [J]. Journal of Neuroscience Research, 1998, 54(4):465-474.
- [9] RAI A, KAPOOR S, SINGH S, et al. Transcription factor NF- κ B associates with microtubules and stimulates apoptosis in response to suppression of microtubule dynamics in MCF-7 cells [J]. Biochemical Pharmacology, 2015, 93(3):277-289.
- [10] DILLON CP, BALACHANDRAN S. StIKing it to a death kinase: IKKs prevent TNF- α -induced cell death by phosphorylating RIPK1 [J]. Cytokine, 2016, 78(2):47-50.
- [11] EGELAND NG, MOEN A, PEDERSEN LM, et al. Spinal nociceptive hyperexcitability induced by experimental disc herniation is associated with enhanced local expression of Csf1 and FasL [J]. Pain, 2013, 154(9):1743-1748.
- [12] HUANG XP, TAN H, CHEN BY, et al. Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(4):449-454.
- [13] ELLIS A, BENNETT DLH. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain [J]. British Journal of Anaesthesia, 2013, 111(1):26-37.
- [14] 余项华, 马广泉, 刘璇, 等. 富血小板血浆治疗骨缺损的临床研究 [J]. 安徽医药, 2018, 22(11):2184-2187.
- [15] MUSSANO F, GENOVA T, MUNARON L, et al. Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma [J]. Platelets, 2016, 27(5):467-471.
- [16] ANITUA E, ANDÍ I, SANCHEZ M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture [J]. Journal of Orthopaedic Research, 2010, 23(2):281-286.
- [17] KOCH AE, HALLORAN MM, HOSAKA S, et al. Hepatocyte growth factor: a cytokine mediating endothelial migration in inflammatory arthritis [J]. Arthritis & Rheumatology, 1996, 39(9):1566-1575.
- [18] SILVA CGD, MACCARIELLO ER, WILSON SW, et al. Hepatocyte growth factor preferentially activates the anti-inflammatory arm of NF- κ B signaling to induce A20 and protect renal proximal tubular epithelial cells from inflammation [J]. Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(4):1382-1390.
- [19] RAH DK, MIN HJ, KIM YW, et al. Effect of platelet-rich plasma on ischemia-reperfusion injury in a skin flap mouse model [J]. Int J Med Sci, 2017, 14(9):829-839.
- [20] ZHENG C, ZHU Q, LIU X, et al. Improved peripheral nerve regeneration using acellular nerve allografts loaded with platelet-rich plasma [J]. Tissue Engineering Part A, 2014, 20(23-24):3228-3240.
- [21] MOUSSA M, LAJEUNESSE D, HILAL G, et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage [J]. Experimental Cell Research, 2017, 352(1):146-156.
- [22] CHO, HYONG-HO, JANG S, et al. Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model [J]. Laryngoscope, 2010, 120(5):907-913.

(收稿日期:2018-12-01, 修回日期:2019-02-09)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.07.027

◇ 临床医学 ◇

角膜内皮检查在高度近视并发白内障术前检查中的应用

夏晔, 董立红, 俞华, 张燕

作者单位: 安徽医科大学附属巢湖医院眼科, 安徽 合肥 238000

通信作者: 董立红, 女, 主任医师, 研究方向: 白内障及青光眼, E-mail: dlhyp6583@sina.com

摘要: **目的** 探讨角膜内皮检查在高度近视合并白内障病人手术中的应用价值。 **方法** 采用前瞻性病例对照研究。采用随机数字表法选取2019年1—11月在安徽医科大学附属巢湖医院接受超声乳化白内障摘除联合人工晶状体植入术的病人63例(77例次), 眼轴 >26.0 mm为高度近视组, 23.0-25.0 mm作为对照组, 其中高度近视组31例(39例次), 对照组例32例(38例次)。应用角膜内皮镜分别于术前及术后1周、1月及3月对病人中央角膜厚度(CCT)和内皮细胞密度(CD)以及六角形细胞百分比(6A%)进行观察, 汇总后对数据进行统计学分析。 **结果** 高度近视组与对照组间术前中央角膜厚度、内皮细胞密度以及六角形细胞百分比间差异无统计学意义($P>0.05$); 与术前相比较, 高度近视组与对照组的内皮细胞密度及六角形细胞百分比均呈下降趋势; 术后1周时, 高度近视组与对照组的内皮细胞密度分别为($1\ 965.32\pm306.39$)个/ mm^2 和($2\ 135.60\pm285.31$)个/ mm^2 , 与术前相较均差异有统计学意义($P<0.05$); 术后1周和1月高度近视组中央角膜厚度分别为(642.54 ± 31.10)百和(572.53 ± 25.84)百 μm , 均高于对照组($P<0.05$), 3个月时基本恢复至术前水平。 **结论** 高度近视合并白内障病人白内障超声乳化术后角膜的损伤更严重, 且恢复所需的时间更长; 术前角膜内皮检查应作为常规检查项目, 以制定个性化治疗方案。

关键词: 角膜内皮细胞丧失/病理学; 超声乳化白内障吸除术/副作用; 近视; 细胞计数; 晶体植入, 眼内