

幹細胞併合血小板纖維蛋白應用於骨折之修補與再生(I)

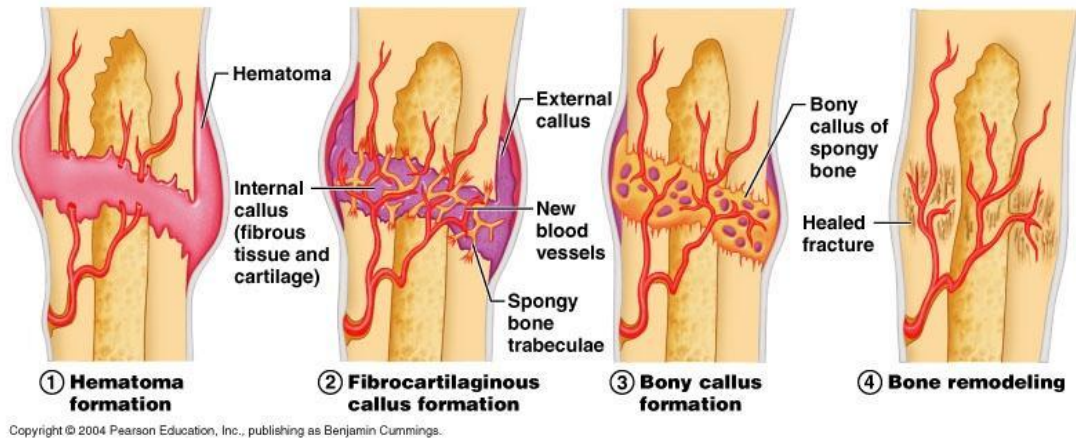
林思緯、府城宏、郭宗甫 (國立台灣大學獸醫學系)

在全世界有許多動物都因外傷或疾病而患有骨缺損。一般骨腫瘤切除術和大規模創傷性骨質流失導致的大範圍骨缺損無法使其自主再生，而小的骨缺損可以自行癒合，大的缺損必須透過人為的介入來使其再生。要建立這樣的一個組織再生工程須包括了支架，細胞和生長因子。每一個元素本身都有能力促進組織再生的能力，但是透過結構製作和各項元素的組合可以達到更有效的成果。現今已經有多種生物材料被應用在骨組織再生的領域，例如幹細胞和富含血小板濃縮物將會再進一步的討論。與胚胎幹細胞，多潛能性幹細胞和骨母細胞相比，間葉幹細胞擁有的特性，包括了可以自我更新並且分化成多個細胞譜系，這個強大的治療潛力和組織修復能力使其成為最適合應用於骨組織再生工程中。

富血小板纖維蛋白，由 Choukroun 等研究人員在法國開發出來，屬於第二代血小板濃縮物可廣泛用於增加軟，硬組織癒合。富含血小板纖維蛋白，透過簡化製備無需生化修改和較低的成本，因此有較好的優勢。PRF 本身是可塑的，可以形成強的纖維蛋白網絡，並誘導膠原蛋白的合成和骨形成，透過逐漸釋放細胞因子和生長因子來進一步達到長時間骨再生的效果。PRF 也含有大量白細胞和細胞因子的自體血纖維蛋白基質可作為大支架和生長因子，並與 MSC 具有協同作用。自體富血小板纖維蛋白的應用程序可以呈現增強癒合和功能恢復的新的可能性。儘管 PRF 和幹細胞或單獨的 PRF 在骨組織癒合過程的任一組合證實具有顯著的效果，但在小動物的臨床應用還沒有很大程度上的應用。因此，PRF 和幹細胞的再生還需要涉及大量的受試者的研究來評估進一步臨床上的成效。

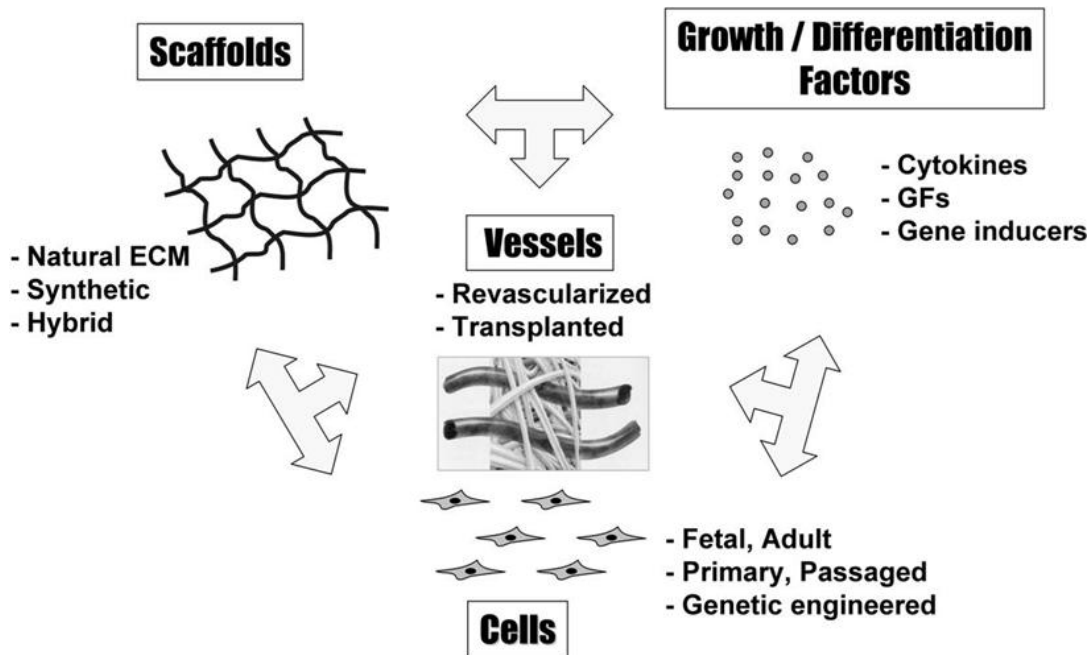
(一)簡介

骨頭的胚胎發育有兩種起源，一種是膜性骨化，另外一種是軟骨內骨化。一般骨間接癒合建立在軟骨內骨化，在骨折發生後，骨折斷面先形成血腫，吸引嗜中性球、巨噬細胞及嗜骨細胞到此處來移除壞死、受損組織，接著進入炎症期刺激細胞分裂和血管生長，在修復期時，先形成軟骨痂，在進一步透過軟骨內骨化，形成硬骨痂，最後進入重建期，透過破骨細胞吸收及骨母細胞沉積的平衡加上 Wolff 定律哈氏系統重建的骨骼重塑來達到全面的骨折癒合。[1][25]



(K. Arvidson, et al 2011)

而骨折直接癒合為哈維氏重塑同步癒合與重建斷端，不經過骨痂及重塑的癒合過程，進一步透過膜性骨化，來完成骨頭的癒合。骨頭在斷裂破損後的修補是經由一連串細胞和分子的反應來達到骨頭新生。而這一連串的骨頭生成反應由以下步驟進行；最初由間葉組織裡的細胞，又稱 mesenchym cell 加上其他細胞的聚集和分化，再來是細胞外基質的形成和鈣化結構，加上周圍或全面性的重塑過程，這些過程都由生長因子所調控。[1]而這些生長因子有很多，如 interleuki-1 可以開起整個骨癒合的反應，transforming growth factor(TGF)、platlet derived growth factor(PDGF)作用是誘導和趨化間葉幹細胞和骨原始細胞引導的增生和分化，進一步形成細胞外基質來達到軟骨和硬骨生成，其他還有血管生長因子等等。



(Jose A. Andrades, et al 2011)[13]

上圖為一張組織工程三要素(Tissue Engineering Triad)及其內含成份的示意圖。一個好的骨癒合是需要 scaffold, living cell, 血管新生和生物性的活化分子相互的配合來達到最佳修補和再生的效果。目前的理論認為理想的骨組織再生應使用具骨傳導之生物材料(biomaterial)來做為 scaffold。常見的有 biopolymer, 磷酸鈣、hydroxyapatite(HAp)及硫酸鈣(calcium sulfate)等等, 適當的 scaffold 可以支持細胞的定植 colonization, 移動和生長。支架必須要符合三個條件, 第一是支架必須提供一個正確的解剖構造和維持一個解剖空間作為骨再生之用。第二支架必須有物理性的支撐能力, 最後支架應該要可以加強這些生物因子的再生能力。再來是具骨誘導之生長因子(growth factor), 這些常見的有 cytokine, gene inducer 或是 bone morphogenetic protein BMP-2, 可以用來促進細胞的增值和分化, 以及具造骨能力之細胞 (osteogenic cells), 常見的就有 stem cell。[13]

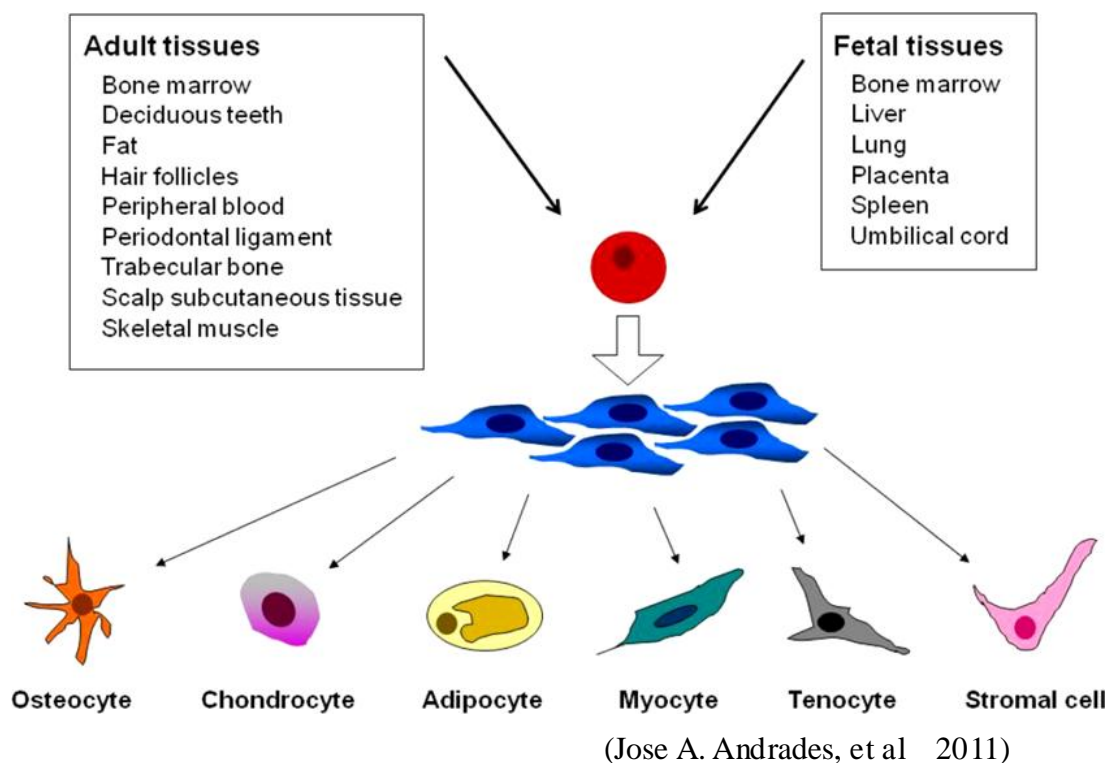
自體骨移植因具有 osteogenic, osteoconductive, osteoinductive, 以及較小的感染可能性或免疫問題。因此他們往往被用來治療骨不癒合 nonunion, 骨再生不良的情況、主要骨缺損或不癒合骨折等等通常可能需要植骨來填補缺陷, 骨移植可以填補缺損空間, 並提供支持, 增強生物修復缺損的能力。一般自體骨移植具有很多優點, 但是使用自體移植植物也有很大的缺點, 其中包括有限的可用性和品質參差不齊, 感染可能性, 手術時間較長和出血, 捐贈部位的慢性疼痛, 和較高的成本。加上, 自體移植植物的量是有限的。為了克服這些缺點, 最近的許多研究都集中在發展新型的骨移植替代過去幾十年傳統骨移植。因此新的生物材料—血小板和幹細胞以及骨粉的應用就是一個支架合併活細胞和生長因子的最好的骨再生材料。現在已經開始慢慢的廣泛應用。

使用在骨頭再生工程的細胞選擇上主要有這四大種類, 分別為造骨細胞、胚胎幹細胞、誘導性多功能幹細胞和間葉幹細胞, 他們都有助於骨頭再生的能力。首先造骨細胞本身就存在於一般骨頭裡面, 因此被認為是做為骨再生工程一個很好的選擇, 但是由於造骨細胞存在數量有限, 增值速度慢; 反觀幹細胞擁有造骨細胞沒有的特質, 因此幹細胞變成為很好的選擇。雖然胚胎幹細胞有很好的骨頭再生能力, 但因為免疫排斥以及有形成畸胎瘤可能性, 加上一些道德上的考量所以較少被使用。基於胚胎幹細胞骨再生特質, 科學家嘗試製作出類胚胎幹細胞的幹細胞, 也就是誘導多功能幹細胞。它具有可能分化成不同細胞譜系的能力, 但是最大的缺點就是對載體有特異性, 所以難以廣泛使用在不同的個體上。[18]

(二)間葉幹細胞

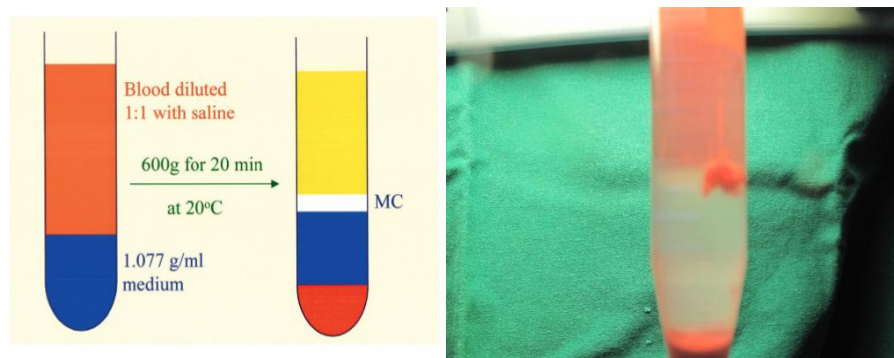
間葉幹細胞最早是由德國病理學家 Cohnheim 提出。在 1966 和 1963 分別由兩位學著確認間葉幹細胞具有 osteogenic 和 chondrogenic 分化的潛力。間葉幹細胞本身是來自於骨髓非造血細胞。這些細胞具有兩個重要的能力: 潛在的長時間自我更新, 並能夠分化多個細胞譜系。間葉幹細胞在其表面上表現了多種不同的

抗原，其中包括了 Stro-1、CD105、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106 等等。除了骨髓之外，間葉幹細胞也存在於多種不同的組織當中。[13]



上圖很清楚地說明了，間葉幹細胞可以從成人骨髓、脂肪、肌肉等組織分離出來。在胎兒可以從骨髓、肝、肺、胎盤中分離出來。他獨特的分化特性可以使它分化成多種不同的中胚層細胞如骨細胞、脂肪細胞、基質細胞等等，近年來更有研究發現間葉幹細胞可以有效的分化成神經細胞。[13]

一般間葉幹細胞在骨髓抽取時的量，只構成整個骨髓細胞約 0.001 到 0.01 個百分比。[13]儘管間葉幹細胞數量有限，間葉幹細胞可以很容易地通過標準培養技術來增加幹細胞數量。整個製備幹細胞的流程如下：首先麻醉豬隻，接著進行樣本採樣，可以由動物的腸骨外角處利用骨髓針抽取骨髓血或是從股骨或脛骨等處採樣。再由 lymphoprep 利用密度差異來進行分離，接著進行培養，最後再由流式細胞儀做細胞分類來純化



首先以與骨髓血同體積之 medium 稀釋骨髓血(ex. 5ml 骨髓血 加 5ml PBS)。Lymphoprep 先置入離心管內(等體積的骨髓液 ex.5ml 骨髓血則置入 5ml Lymphoprep)。將稀釋骨髓血慢慢滴入離心管，讓稀釋骨髓血於 Lymphoprep 之上。離心 20min 2000rpm。取離心完後於 Lymphoprep 與血清之間的 cells 在 CO₂ 培養箱進行培養

接著利用 α MEM (培養液)進行細胞的培養，培養液內含(10%FBS(胎牛血清)及 1X 三合一抗生素)。在五天的培養至數量變多後，無黏附性的細胞則移除，即可準備染抗體 CD90 anti human 抗體。間葉幹細胞的最初培養是屬於異源的，存在著不同細胞和分化成不同細胞的能力。在培養間葉幹細胞時常常會在第五到第六代之後漸漸失去其原本骨再生分化的能力。目前有人認為是與間葉幹細胞在培養中被其他成熟細胞污染有關，而這些細胞包括了纖維母細胞和其他分化後的間葉幹細胞等等。一般間葉幹細胞為纖維母細胞和基質細胞的前驅細胞，而這些細胞會與癌細胞互相作用，使其在動物體使用後可能發展為惡性腫瘤。因此利用流式細胞儀純化 可以減少和預防這樣的狀況發生。由於間葉幹細胞表面可以表現不同種的抗原，利用這樣的方式，透過流式細胞儀來分離出間葉幹細胞並去除其他非間葉幹細胞的細胞，再經由免疫螢光染色進一步純化來得到我們需要的幹細胞。[12]

(三)富含血小板物質

接下來我們要介紹富含血小板的物質，雖然在過去 35 年來已經有把纖維蛋白(fibrin)衍生物用在許多領域上，不過當時要產生這些物質過程較為複雜且具有交叉感染的風險；加上在 1978 年傳染性肝炎的肆虐，美國禁止了這些物質的使用。因此極力發展出自體來源的纖維蛋白衍生物變成為當時的思考方向，而血小板濃縮技巧提供了相對簡單且最佳生成的步驟，這種血小板濃縮物即為稱為富含血小板血漿 Platelet-rich plasma(PRP)；另外在法國又發展出新一代血小板濃縮物質，即為富含血小板纖維蛋白 Platelet-rich fibrin(PRF)，因此接下來為大家介紹 PRP 跟 PRF。[6]

(I)富含血小板血漿：Platelet-rich plasma(PRP)

(1)起源：首先我們先來介紹 PRP，全名為 Platelet-rich plasma，最早在 1994 年由 Tayapongsak 等人發現，當時目的是要把骨移植片段維持在一定的團塊，不過當時必須花一到三周時間來製作同時在使用前還需花 2 天時間處理，因此在當時仍然沒有辦法應用，直到在 Marx 等人在 1998 把 PRP 用於下顎重建手術的海綿骨的骨髓移植中，PRP 才開始有較廣泛應用[6]

(2)定義：嚴格上來說，PRP 為一種由血液所衍生出的產物主要使用在預防和治療因中樞起源的血小板缺乏所引起的出血，像是髓質發育不全和急性白血病等等，也因此使用上仍然受到限制[6]。

(3)製作方式：通常可以分成兩種，複雜方法為利用血液學細胞離心機，而簡單方法是利用商業上的套組加上 2 步驟離心，不過在這裡我們介紹一般概念：

第一步驟：抽取靜脈血並加入抗凝劑，目的要避免血小板活化跟脫顆粒。

第二步驟：第一次離心(又稱為 soft spin)，為短時間且慢速離心，離心完後分為 3 層(Fig 1.)

底部 (占總體積 55%)	紅血球細胞
頂部 (占總體積 40%)	脫細胞血漿層(Acellular plasma layer)，主要由一些在血液中運行的分子組成(主要是 fibrinogen)，此層又稱為缺乏血小板的血漿(Platelet-poor plasma(PPP))
中間層 (占總體積 5%)	此層中血小板的濃度大大增加，會呈現一種黃色樣(又稱 buffy coat)，也就是未來會形成 PRP 部分，以現在的技術並沒有辦法跟下層的紅血球細胞層分開。

第三步驟：用無菌針筒把 PPP、PRP 和一些紅血球吸取出來並放到第二個管子中(此時不加抗凝)以準備下一次離心。

第四步驟：第二次離心(又稱 hard spin)，為較長時間且快速的離心，離完心後分 3 層(Fig 1.)

底部	剩餘的紅血球細胞跟及一些血小板濃縮層
頂部 (占總體積 80%)	脫細胞血漿層(PPP)
中間層	中間層 buffy coat / PRP

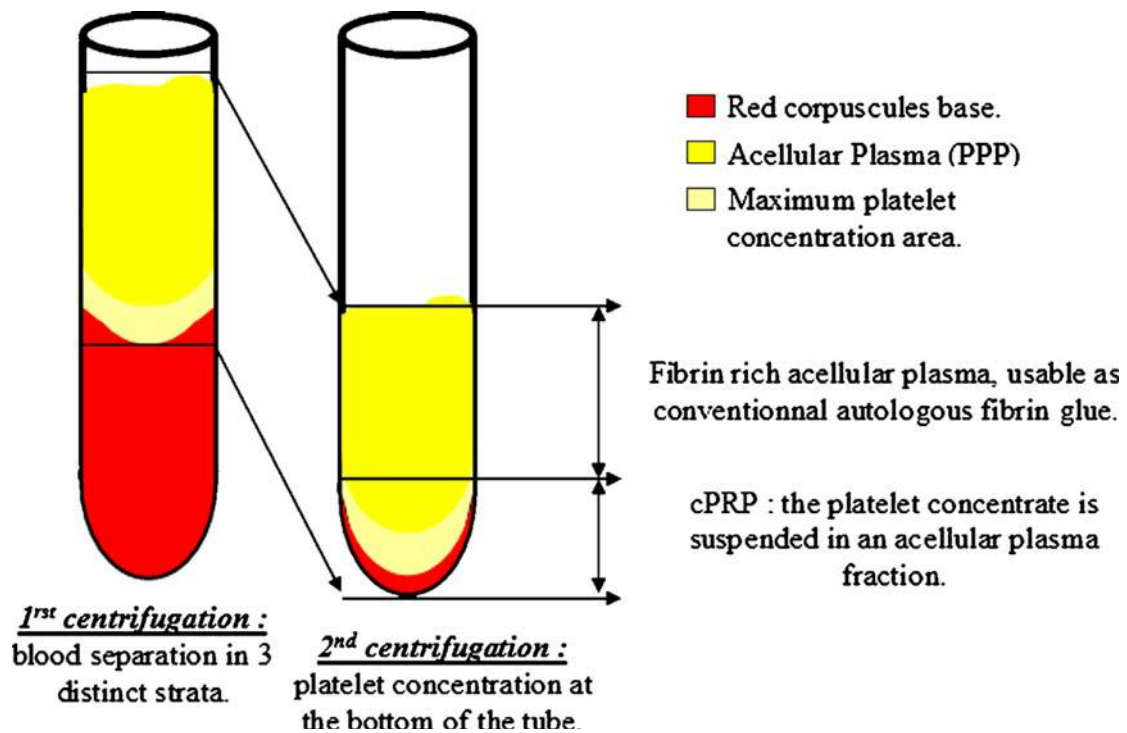


Fig 1. 第一次離心後分為 3 層，最底部為紅血球細胞，最上層為脫細胞血漿層，中間層為血小板濃縮層，會呈現一種黃色樣(buffy coat)，也就是 PRP 部分。把上面兩層吸取出來並放到第二個管子中再一次離心，離完心後再分 3 層，最底部為

剩餘的紅血球細胞跟及一些血小板濃縮，最頂部為 PPP，中間層為 PRP。[6]

第五步驟：遺棄掉上層 PPP，不過要留下足夠血清使濃縮血小板可以懸浮在裡面之後慢慢搖動來獲取將要使用的 PRP

第六步驟：把 PRP 跟牛凝血酶(bovine thrombin)和氯化鈣混和，之後血小板濃縮物形成膠狀，即可使用。而在此過程中纖維蛋白原(Fibrinogen)也會濃縮並且聚合去建造一個纖維蛋白基質(此基質具有止血和附著特性)。[6]

(II)富含血小板纖維蛋白：Platelet-rich fibrin(PRF)

(1)起源：起源為 2000 年法國的 Choukroun et al. 當時使用在口腔跟上顎顏面手術。

(2)設備：離心血液(但不須加抗凝或牛凝血酶)，PC-02 table 離心機(Fig 2.)以及收集套組。

(3)製作方式：

第一步驟：採取靜脈血 10ml 置於試管內。

第二步驟：以 2500~3000rpm/min 離心 10~12min，經離心後分三層(Fig 2.)，下層為紅血球碎片，上層為脫細胞血漿層(Acellular plasma layer)，為淡黃色澄清物，中間層為 PRF 凝膠。

第三步驟：靜滯離心物 3min 後遺棄上清液，此時下面會連著紅血球細胞層，用剪刀把紅血球細胞層剪掉(Fig 2.)，取出中間的 PRF 凝膠，並用無菌紗布擠壓成膜狀，即可得到具有一定形態、彈性及韌性的 PRF 膜。(Fig 2.) [6]

不加抗凝的目的為使得血小板在接觸到管壁時可以在幾分鐘之內就活化並釋放凝血因子，因此可以花比較少時間就去把纖維蛋白原濃縮在中間層，同時纖維蛋白原也會以自然方法聚集再等循環中凝血酶來活化。

不過就是因為不加抗凝，此種方法的成功大部分會取決於血液收集速度跟離心。因此在處理過程中唯有快速處理才可以獲得穩定的 PRF，若發生自然凝血否纖維蛋白會以一種較擴散形式來聚合起來，從而無法製得結構完整可供利用的 PRF 膜。[6]

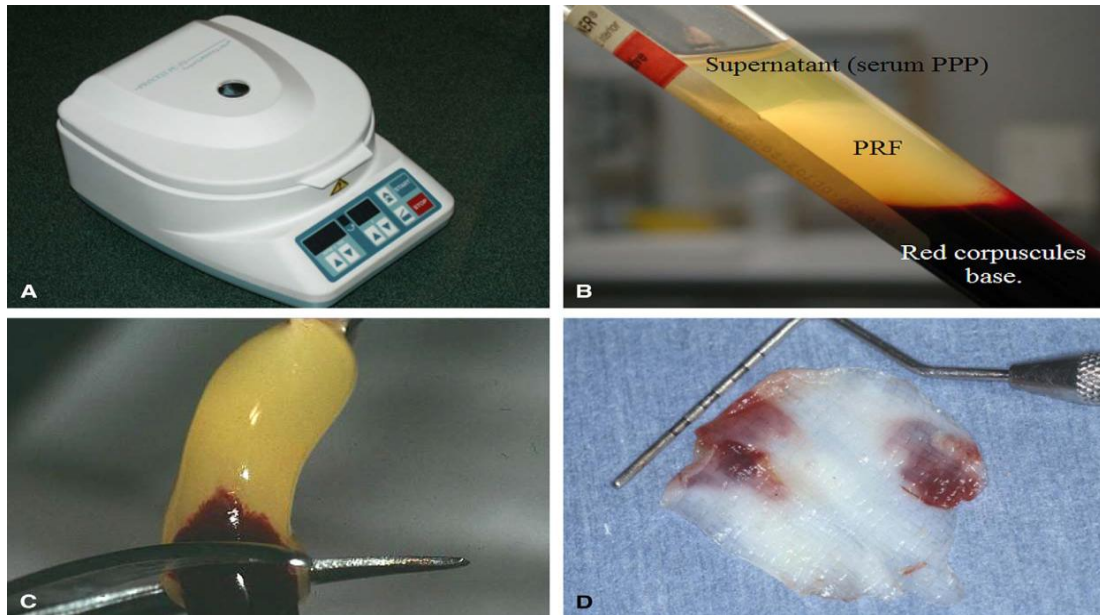


Fig 2. 用 PC-O2 離心機處理 PRF(A)允許一個結構化的血纖維蛋白的血塊在管子中間，位在底部的紅血球和脫細胞的血漿頂部之間(B)採集後的 PRF(C)藉由把血清跟血凝塊分開，自體纖維蛋白膜很容易獲得(D)

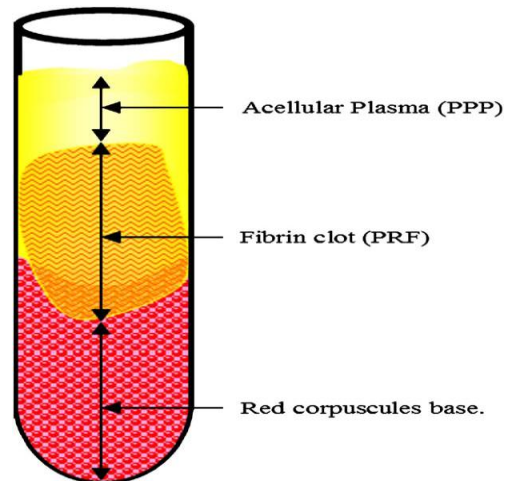


Fig 3. 血液採集後立即離心，允許一個結構化的纖維蛋白血塊在管中間形成，位在頂部脫細胞的血漿和底部紅血球之間。[6]

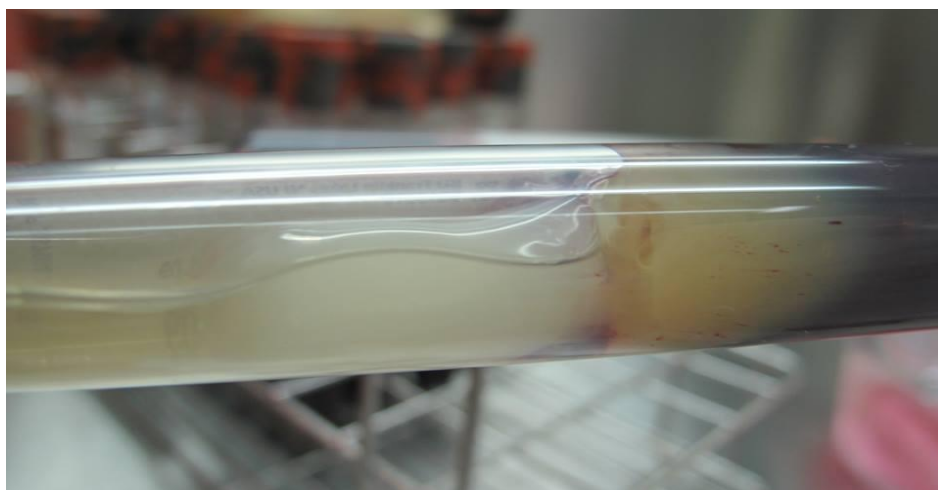


Fig 4. 這是由郭宗甫老師所獨創製造PRF方法，由商品化的試管中有一層凝膠可以把紅血球細胞和PRF分開且試管橫放可以增加表面積，可以釋放更多血清。



Fig 5. 將試管倒過來上面為紅血球細胞，中間為凝膠，塊狀物為製作好的PRF。

(四)PRF與PRP比較

富含血小板的物質可以透過幾個機制來達到骨頭修補的效果：(1)由炎症反應刺激血小板釋放生長因子、止血因子和細胞激素來促進骨再生的效應(2)由於血管新生在骨頭修補是不可缺少的，而這些物質可以透過血小板釋放的血管生長因子有效的加速血管生長。

PRF 所含的成分基本上與 PRP 幾乎相同，包括轉型生長因子 (transforming growth factor, TGF)、類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor, IGF-1)、血小板衍生生長因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、表皮生長因子 (platelet derived epidermal growth factor, PDEGF) 和血管內皮細胞生長因子 (platelet derived angiogenesis factor, PDAF) 等等，這些生長因子都具有促進軟、硬組織再生的功能。而富含血小板纖維蛋白中所含的各種生長因子可以有效的調控成骨細胞、成纖維細胞等與組織修復緊密相關的細胞增殖、分化以及凋亡，且作用較 PRP 顯著，也因此富含血小板纖維蛋白對細胞增殖和分化的影響更大[27]

PRF 作為一個第二代血小板濃縮物質，在修補和再生的角色上比起 PRP 有更多優勢：(1)首先是 PRF 可機械性的把各種生長因子抓取，並可藉著血液循環中的葡萄糖胺聚醣與各種生長因子發生化學聯結(2)由血小板釋放的生長因子可有效抵抗內源性的纖維蛋白酶的蛋白水解作用，延長生長因子的作用時間(3)PRF 的花費也比 PRP 少許多，製備的過程也較容易。PRP 在製作過程中需要加入抗凝劑和牛凝血酶來促進纖維蛋白原轉換成纖維素，不過抗凝劑和牛凝血酶為外來物質，因此難免會有排斥反應的存在。然而 PRF 製作過程中並不需這些步驟，因此可以大大降低免疫排斥反應跟交叉感染的危險，因此使用上比 PRP 更安全。

(4) 纖維蛋白在聚合過程中會形成兩種型態纖維網路：四分子聚合(雙側連接)或三分子聚合(單側連接)。PRP 由於有加入牛凝血酶因此容易形成四分子聚合(由較強凝

血酶活性聚合而成)，可以使纖維蛋白網路增厚，而形成較堅硬的網路，不過此種網路並不適合去抓取細胞激素跟允許細胞遷移；反之 PRF 沒有加入凝血酶，因此會形成三分子聚合(由較弱的凝血酶濃度形成)，而這種所建造網路較精細且有彈性同時可以抓住細胞激素和允許細胞遷移，也因此 PRF 膜較有彈性(5)PRF 會以較緩慢的方式聚合來形成三度空間的纖維素網，此外在釋放生長因子的速度上也較 PRP 緩慢，此種緩慢釋放可以更有效的促進細胞遷移和增值(6)PRF 在底層有豐富的白細胞也可作為免疫上的調控，PRF 纖維蛋白凝塊中可觀察到大量白細胞，這些白細胞在纖維蛋白溶解過程中可持續釋放免疫調節相關的細胞因子來減輕局部不良的免疫反應並且增強有機體抵抗感染能力。[6][7]

在血液中少量生理上可使用的凝血酶緩慢的將纖維蛋白原轉化成纖維素並緩慢的聚合進而形成一個有利於癒合過程的生理結構。在此過程中所生成的纖維蛋白網狀結構與人類天然的結構非常相似，即組織疏鬆、孔隙較大、彈性良好，此種特殊結構使得營養成分及氧氣可以輕易地擴散至細胞周圍，同時促進骨髓幹細胞分化為成骨細胞、沉積骨質、加速成骨過程，並且更有效的促進細胞的遷移和增殖，進而達到癒合。不過 PRF 雖然擁有許多 PRP 所沒有的優點，但 PRF 並非仍有一些缺點存在：(1)由於 PRF 通常是自體來源的，所以在數量上有限制(2)PRF 本身含有免疫細胞和抗原分子，因此在同種異體的移植並不適合。但是郭宗甫教授的研究團隊利用單一步驟將 PRF 完全分離可以減少底層的免疫細胞，在實驗的模式中使用在異體移植上並沒有發現排斥的現象(3)再來是製備過程不需要加入抗凝劑，所以血液在短期間內就凝結，因此在處理的過程需要快速，才能製作出最佳的 PRF。[8][11]