

富血小板血浆来源外泌体治疗膝骨关节炎的机制与作用

黄双霜^{1,2}, 向小娜^{1,3,4,5}, 余曦^{1,3}, 何竟^{1,3,4}

https://doi.org/10.12307/2023.383

投稿日期: 2022-05-05

采用日期: 2022-07-07

修回日期: 2022-08-03

在线日期: 2022-08-23

中图分类号:

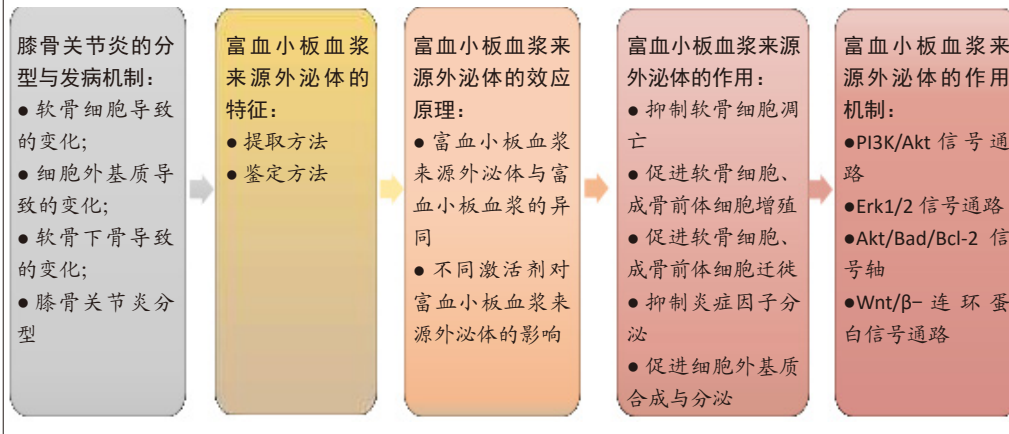
R457; R318; R681.8

文章编号:

2095-4344(2023)15-02420-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 富血小板血浆来源外泌体在膝骨关节炎治疗中的应用



文题释义:

膝骨关节炎: 一种以关节软骨退变、软骨下骨改变、骨赘形成和非细菌性滑膜炎为病理改变特征的退行性疾病, 伴有膝关节疼痛、僵硬、步行困难等症状。

富血小板血浆来源外泌体: 发挥富血小板血浆活性效应的重要因子, 为直径40~200 nm的细胞外囊泡, 是一种具有生物活性的蛋白质、mRNA和非编码RNA的载体, 在细胞-细胞和血小板-细胞通讯中起着至关重要的作用。

摘要

背景: 骨关节炎是一种常见的关节退行性疾病, 再生疗法促进膝骨关节炎软骨修复一直是研究热点, 其中富血小板血浆来源外泌体可能是一种新的再生治疗方式。

目的: 综述目前文献, 总结富血小板血浆来源外泌体在膝骨关节炎中的应用、作用以及潜在机制。

方法: 以“platelet rich plasma, extracellular vesicles, exosomes, knee osteoarthritis”为英文关键词、以“富血小板血浆, 细胞外囊泡, 外泌体, 膝骨关节炎”为中文关键词分别在Embase、Medline、Cochrane Central Register of Controlled Trials、PubMed、万方数据库及中国知网检索。初检得到1 007篇文献, 按纳入、排除标准最终共入选65篇文献进行综述。

结果与结论: ①富血小板血浆来源外泌体的制备涉及富血小板血浆的制备、激活以及使用试剂盒或者超高速离心法获取外泌体, 鉴定方法包括标志物表达检测、形态学观察、颗粒跟踪分析等; ②富血小板血浆来源外泌体的作用包括抑制软骨细胞凋亡, 促进软骨细胞增殖与迁徙, 抑制炎症因子分泌, 促进细胞外基质合成与分泌; ③在机制方面, 涉及PI3K/Akt、Erk1/2、Akt/Bad/Bcl-2及Wnt/ β -连环蛋白信号通路。

关键词: 骨关节炎; 富血小板血浆; 外泌体; 细胞外囊泡; 综述

Mechanism and effect of platelet-rich plasma-derived exosomes for treating knee osteoarthritis

Huang Shuangshuang^{1,2}, Xiang Xiaona^{1,3,4,5}, Yu Xi^{1,3}, He Jing^{1,3,4}

¹Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²The Fifth People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610031, Sichuan Province, China; ³West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China;

⁴Key Laboratory of Rehabilitation Medicine in Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ⁵Institute of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Huang Shuangshuang, Master candidate, Physician, Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; The Fifth People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

Corresponding author: He Jing, MD, Professor, Chief physician, Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; Key Laboratory of Rehabilitation Medicine in Sichuan Province, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

¹四川大学华西医院康复医学中心, 四川省成都市 610041; ²四川省第五人民医院, 四川省成都市 610031; ³四川大学华西临床医学院, 四川省成都市 610041; ⁴康复医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610041; ⁵四川大学华西医院康复医学研究所, 四川省成都市 610041

第一作者: 黄双霜, 女, 1994年生, 四川省成都市人, 汉族, 四川大学在读硕士, 医师, 主要从事骨骼肌肉与神经康复的临床研究。

通讯作者: 何竟, 博士, 教授, 主任医师, 四川大学华西医院康复医学中心/四川大学华西临床医学院/康复医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610041

https://orcid.org/0000-0001-5737-2057 (黄双霜)

基金资助: 四川省卫生健康委员会科研课题(20PJ037), 项目负责人: 余曦; 四川省自然科学基金(2022NSFSC1312), 项目负责人: 余曦

引用本文: 黄双霜, 向小娜, 余曦, 何竟. 富血小板血浆来源外泌体治疗膝骨关节炎的机制与作用 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(15):2420-2426.



Abstract

BACKGROUND: Osteoarthritis is a common degenerative joint disease. Regenerative therapy has always been a research hotspot for the repair of cartilage in knee osteoarthritis, and platelet-rich plasma-derived exosomes may serve as a new regenerative treatment modality.

OBJECTIVE: To review the current literature and summarize the application, role and potential mechanism of platelet-rich plasma-derived exosomes in knee osteoarthritis.

METHODS: Chinese and English keywords were “platelet-rich plasma, extracellular vesicles, exosomes, knee osteoarthritis”. Embase, Medline, Cochrane Central Register of Controlled Trials, PubMed, Wanfang, and CNKI were retrieved. 1 007 articles were preliminarily obtained. A total of 65 articles were selected for review according to the inclusion and exclusion criteria.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The preparation of platelet-rich plasma-derived exosomes involves the preparation, activation, and acquisition of exosomes by kits or ultra-high-speed centrifugation methods, and the identification methods include marker expression detection, morphological observation, and nanoparticle tracking analysis. (2) The role of platelet-rich plasma-derived exosomes include improving their proliferation by inhibiting chondrocyte apoptosis, promoting chondrocyte migration, inhibiting the secretion of inflammatory factors, and promoting extracellular matrix synthesis and secretion. (3) In terms of mechanism, PI3K/Akt, Erk1/2, Akt/Bad/Bcl-2 and Wnt/ β -catenin signaling pathways are involved.

Key words: osteoarthritis; platelet-rich plasma; exosome; extracellular vesicle; review

Funding: Scientific Research Project of Sichuan Provincial Health Commission, No. 20PJ037 (to YX); Natural Science Foundation of Sichuan Province, No. 2022NSFSC1312 (to YX)

How to cite this article: HUANG SS, XIANG XN, YU X, HE J. Mechanism and effect of platelet-rich plasma-derived exosomes for treating knee osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(15):2420-2426.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种常见的致残疾病，2006–2016 年间全球伤残损失健康生命年百分比增长了 31.5%^[1]，导致巨大的社会经济成本，对个体健康和卫生保健系统有显著影响^[2-3]。膝骨关节炎是骨关节炎最常见的亚型^[4]，主要影响老龄人群及肥胖人群，临床症状为膝关节疼痛、肿胀、僵硬和活动能力下降^[5]。膝骨关节炎的病理改变包含关节软骨退变、软骨下骨改变、骨赘形成和非细菌性滑膜炎^[6]，其发病机制复杂，起初认为与“磨损”这种机械应力有关^[7]，后发现微环境和遗传因素在疾病恶化过程中相互作用，最终导致关节软骨变性、关节内炎症伴滑膜炎和软骨下骨变化^[8-9]。软骨细胞产生和分泌的细胞外基质和成纤维细胞样滑膜细胞分泌的滑液是维持微环境的 2 种重要成分^[10-12]，但是软骨细胞仅占软骨体积的 2%^[13-14]，所以膝骨关节炎发生时可能首先被来自滑膜或软骨下骨的炎症信号激活^[15]，从而改变细胞外基质合成和降解之间的平衡，导致关节软骨自我再生潜力有限。目前推荐的治疗方案多限于疼痛控制，少有促进关节软骨再生。

富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 是新鲜全血离心后的自体产物^[16-17]，含有许多促进组织修复的生长因子 (如血小板衍生生长因子 AB、转化生长因子 β 1 和血管内皮生长因子)^[18-19]。已有大量研究报道富血小板血浆对于年轻及影像学分级较低 (Kellgren-lawrence 分级 2–3 级) 的膝骨关节炎患者能发挥疼痛缓解、功能提升及改善生活质量的作用^[20-21]。除了这些生长因子外，血小板被激活后释放细胞外囊泡，其中直径 40–200 nm 的囊泡称为外泌体^[22]。外泌体是具有生物活性的蛋白质、mRNA 和非编码 RNA 的载体，并且在细胞–细胞和血小板–细胞通讯中起着至关重要的作用^[23]。

由于外泌体不具有免疫原性且稳定性较高，可以保护内容物免受降解酶或化学物质的侵害。尽管近年来对有核细胞 (如癌细胞^[24]、免疫细胞和干细胞^[25-26]) 来源外泌体的功能和潜在机制进行了大量研究，但很少有研究评估富血小板血浆来源外泌体 (exosomes derived from platelet-rich plasma, PRP-Exos) 的作用。PRP-Exos 是新发现的富血小板血浆中发挥生物活性效应的重要因子，此文章通过对 PRP-Exos 治疗膝骨关节炎的可能机制及应用进行综述，旨在为临床治疗膝骨关节炎提供新的治疗方法和思路。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者及第二作者分别于 2022 年 6 月进行检索。

1.1.2 检索数据库 Embase(via OvidSP, 1974 年至 2022 年 6 月); Medline(via OvidSP, 1946 年至 2022 年 6 月); Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL, via OvidSP)、PubMed 数据库、万方数据库 (1998 年至今)、知网 (建库至今)。

1.1.3 检索词 英文检索词为 “platelet rich plasma, extracellular vesicles, exosomes, knee osteoarthritis”; 中文检索词为 “富血小板血浆, 细胞外囊泡, 外泌体, 膝骨关节炎”。

1.1.4 检索文献类型 基础研究、临床试验及综述。

1.1.5 检索文献时限 各数据库建库至今。

1.1.6 检索策略 PubMed 数据库输入 “(((platelet rich plasma) OR (PRP)) OR ((exosome*) OR (EV) OR (Extracellular vesicle*))) AND ((knee osteoarthritis) OR (KOA))”; Ovid 平台检索策略见表 1。

表 1 | Ovid 检索策略

序号	具体内容
#1	(KOA OR knee osteoarthritis).af.
#2	(Extracellular vesicle\$ OR EV\$ OR exosome\$).af.
#3	(PRP OR platelet rich plasma).af.
#4	#2 OR #3
#5	#1 AND #4
#6	remove duplicates #5

1.2 入选标准

1.2.1 纳入标准 ①与膝骨关节炎、相关细胞生长或 PRP-Exos 相关的文献; ②涉及 PRP-Exos 或者微囊泡的文献; ③临床研究需完成临床试验注册、符合注册研究的 PICOS, 无报道偏倚; ④文章内容可靠, 有相关论点或实验数据支撑。

1.2.2 排除标准 ①重复性研究; ② Protocol 类研究; ③会议摘要; ④被撤回的文章; ⑤语言非中文或英文。

1.3 质量评估 计算机初步检索到 1 007 篇文献, 通过检索文献标题和摘要进行初筛, 排除与此次研究相关度不高的文献, 初步纳入文献 632 篇。通过阅读文献正文, 排除不符合纳入标准的文献, 最终纳入 65 篇文献进行综述, 其中英文文献 64 篇, 中文文献 1 篇, 文献检索流程见图 1。

2 结果 Results

2.1 膝骨关节炎的发病机制和分型 膝骨关节炎的发展机制非常复杂, 不是简单的机械刺激导致的损伤, 但机械应力的确又扮演着重要角色^[7]。机械刺激和酶促因素被认为会损害软骨细胞功能并破坏基质^[27], 见图 2。

2.1.1 软骨细胞导致的变化 早期膝骨关节炎的治疗措施主要集中在软骨上。在病理结构上观察到软骨破裂, 细胞水平上观察

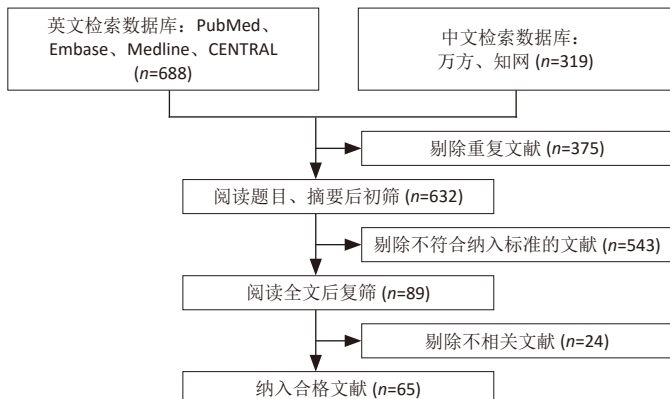


图1 | 文献检索流程图

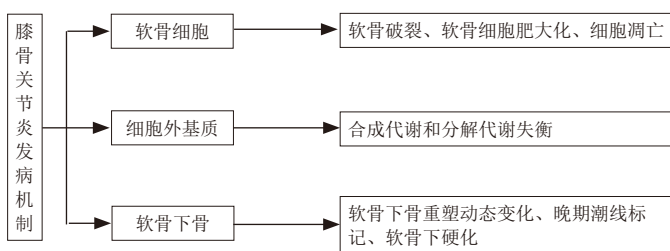


图2 | 膝骨关节炎的发病机制

到软骨细胞肥大化、发生凋亡等细胞程序性死亡，因此治疗目标常包括重建受损的软骨、防止软骨分解、减少软骨细胞死亡等^[28]，进一步研究发现，软骨细胞的改变可能是基因错误表达导致的。目前发现2号染色体上编码的卷曲同源相关蛋白、6号染色体上编码的骨形成蛋白5和16号染色体上编码的白细胞介素4受体蛋白参与软骨细胞信号传导和信号转导通路，而这些基因可能引发异常的细胞信号传导或对信号的异常反应^[29]。

2.1.2 细胞外基质导致的变化 软骨基质的合成和分解之间的动态平衡受合成代谢和分解代谢影响，合成代谢主要受到胰岛素样生长因子等生长因子的调节，而分解代谢主要受到白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子、蛋白酶的调节^[27]。在一定范围内，软骨细胞受到机械刺激后可以通过改变细胞的代谢活动来消除或补偿导致骨关节炎的有害影响，但是当这些有害影响超出系统的补偿能力时，就会发生基质退化^[30]。

2.1.3 软骨下骨导致的变化 软骨下骨异常可能是引起膝骨关节炎的初始原因，在疾病过程中软骨下骨的重塑处于动态变化^[31]。软骨下骨指的是皮质骨板和软骨下松质骨，皮质骨板位于钙化软骨正下方，一般厚度为1-3 mm，而松质骨位于远端，比皮质骨板多孔且代谢活跃，并且具有更低的骨体积、密度和刚度^[31]。在早期膝骨关节炎中，由于重塑率增加，软骨下皮质骨板变薄，同时，随着松质骨丢失，骨小梁板变得更薄。而在疾病晚期，软骨下皮质骨板增厚，但软骨下松质骨仍为骨质减少，钙化软骨开始向关节软骨推进，随着钙化软骨向前矿化，留下多个潮线标记，因此产生更厚的矿化板，并使得无法自行更新的关节软骨厚度减少，伴随着从关节软骨表面开始的蛋白聚糖丢失和纤维震颤^[32]。因此在病理上体现出膝骨关节炎晚期是软骨下硬化(包括软骨下皮质骨板和钙化软骨)和更薄、更细的关节软骨。

2.1.4 膝骨关节炎分型 虽然膝骨关节炎的病理表现相似，但并非所有患者对药物等干预的反应是一致的，说明膝骨关节炎可能存在不同亚型。YUAN等^[33]通过转录组测序将骨关节炎分为C1-糖胺聚糖代谢紊乱骨关节炎亚型、C2-胶原代谢紊乱骨关节炎亚型、C3-激活的感觉神经元骨关节炎亚型及C4-炎症骨关

节炎亚型，见图3。C1的特征是软骨聚蛋白聚糖表达增加、多功能蛋白聚糖表达下降，反映膝骨关节炎早期；C2的特征是软骨下骨血管丛丰富、5A1与6A1胶原高表达；C3的特征是感觉神经纤维与软骨接触，高表达神经分子，体现出疼痛敏感；C4的特征是T淋巴细胞及单核细胞被激活，促进炎症反应。这项研究也反映出膝骨关节炎的不同分型或许与最初或最主要的发病机制相关。

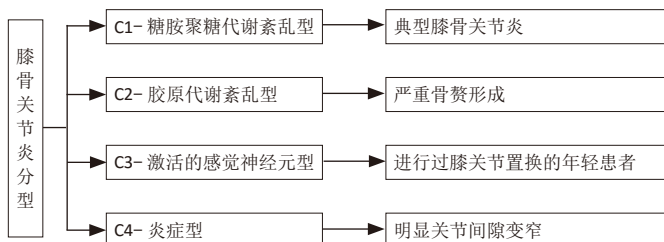


图3 | 膝骨关节炎根据转录组测序结果进行分型及临床特征

2.2 PRP-Exos的特征及应用 PRP-Exos是一种特定直径的细胞外囊泡，密度为1.1-1.2 g/mL^[34]，可完成细胞间的具有生物活性的脂质、核酸(DNA、mRNAs及非编码RNAs)及蛋白质的运输^[35]，促进受体细胞的基因表达以及细胞增殖、凋亡的调节与免疫调节等^[36-38]。外泌体来源于内体，细胞质膜内陷可以形成早期内体，内体向腔内出芽形成腔内囊泡，成熟多囊泡内体与细胞膜融合释放腔内囊泡到细胞外^[39]。

2.2.1 PRP-Exos的提取 PRP-Exos的提取可分为2步：首先需完成富血小板血浆的制备，多数研究选择2次离心。将血液加入带抗凝剂的采血管中，首次离心将血小板从血浆中的红细胞和白细胞中分离，然后将分离的含有血小板的血浆转移到新的离心管中，并以较高离心力再次离心，弃去大部分上清血浆，然后将血小板沉淀重新悬浮在残留血浆中以获得富血小板血浆^[40]。IYER等^[41]采用一步法离心，150 r/min离心5 min制备大鼠富血小板血浆，而ZHANG等^[42]在4℃下采用1 000 \times g离心20 min制备兔源富血小板血浆。第二步需完成外泌体的提取，采用的方法包括超高速离心法及试剂盒法。CERVENAKOVA等^[43]采用ExoQuick™等试剂盒可较为便捷地完成外泌体的提取，4℃过夜孵育后1 500 \times g离心30 min。超高速离心法步骤较为复杂^[44-45]，如非新鲜富血小板血浆需重新离心悬浮，血小板颗粒被激活，然后通过低速离心以丢弃细胞碎片，取得的上清液通过0.22 μ m过滤器完成大直径囊泡的去除，其次以10 000-20 000 \times g连续离心30-60 min，将外泌体与微囊泡分离。以100 000-1 300 000 \times g的离心力完成70-90 min的2次超高速离心以获取PRP-Exos，以少量PBS重悬后可保存于-80℃。也有部分研究直接从血浆或者血小板裂解物中收集外泌体，见表2^[45-51]。

2.2.2 PRP-Exos的鉴定 PRP-Exos的鉴定与其他外泌体一致，包括通过透射电子显微镜表征囊泡形态^[42]、纳米粒子跟踪分析显示粒径和浓度^[41]，以及外泌体带有的标志物验证，见表3。PRP-Exos的大小和表面标志物与其他细胞来源的外泌体相似，但外泌体的含量随着组织类型的不同而不同。目前研究报道了异源三聚体G蛋白、Hsp70^[46]、Hsp101^[48]、血小板表面糖蛋白CD41^[44-45]、CD61^[42, 52]，以及内体来源的四跨膜蛋白家族成员^[53-54]，如CD9、CD63和CD81，其余还包括肿瘤易感基因101(tumor suppressor gene 101, TSG101)和Alix^[54-55]。TSG101是微囊泡体形成特异性转运相关蛋白所需的内体分选复合物，在外泌体中并不特异性表达^[56]。尽管最近的一项研究表明，与其他和非CD63相比，CD63是一种更具特异性的微囊泡体表面标志物^[57]。

2.2.3 PRP-Exos的治疗 目前PRP-Exos暂未进行临床应用，多数

表 2 | 两步法制备富血小板血浆的条件

作者	发表年	血源	采用设备	首次离心力	首次离心时间	二次离心力	二次离心时间	温度
SAÁ 等 ^[46]	2014	人	4-44 转子 (Eppendorf)	800×g	30 min	3 900×g	16 min	室温
TORREGGIANI 等 ^[45]	2014	人	未提及	1 000 r/min	5 min	1 900 r/min	15 min	室温
YIN 等 ^[47]	2016	人	WEGO	160×g	10 min	250×g	15 min	室温
LIU 等 ^[48]	2019	新西兰兔	未提及	250×g	10 min	1 000×g	10 min	未提及
NILFOROUSHZADEH 等 ^[49]	2021	人	未提及	300×g	10 min	2 000×g	10 min	未提及
XU 等 ^[50]	2021	小鼠	未提及	100×g	10 min	600×g	10 min	6 °C
ZHANG 等 ^[51]	2022	人	Beckman coulter	160×g	10 min	250×g	15 min	室温

研究为细胞层面的研究，体外使用剂量包含 1×10^8 个外泌体颗粒 /mL、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 50 mg/mL ^[45, 58-60]。动物体内注射采取原位关节腔内注射，100 $\mu\text{g}/\text{次}$ ，每周 1 次，共进行 6 周注射治疗^[48]，而结合生物材料后采取的剂量明显减低^[51]。PRP-Exos 应用流程中涉及的提取、鉴定及注射方式见表 3 及图 4。

表 3 | 富血小板血浆来源外泌体 (PRP-Exos) 的提取、鉴定及注射方法

提取方法	鉴定	注射部位	剂量	文献
超高速离心	电镜、标志物鉴定 (CD41、CD63)	NA	体外: 12 孔板每孔 5 μg 及 50 μg	[45]
超高速离心	标志物鉴定 (CD9、CD63、CD81、CD41)	NA	体外: 5 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 体内: NR	[44]
超高速离心	标志物鉴定 (TSG101、CD9、CD63、CD81、CD41 及阴性表达 Calnexin)	NA	体外: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 体内: 100 μg	[54]
exoEasy Maxi 试剂盒	标志物鉴定 (CD9、CD63、CD81、Hsp101)、NTA	关节腔内注射	体内: 100 $\mu\text{g}/\text{次}$ 每周 1 次, 共 6 周	[48]
超高速离心	NTA、TEM、标志物鉴定 (CD9、CD63、CD81)	NA	体内: 1×10^8 个颗粒, 每周 1 次, 共 2 周	[41]
超高速离心	NTA、低温电子显微镜、标志物鉴定 (Alix、CD9、CD63)	NA	体外: 1×10^8 个颗粒 /mL	[58]
超高速离心	TEM、标志物鉴定 (CD9、CD63、CD81、TSG101、CD41, 阴性表达 Calnexin)	NA	体外: 50 mg/mL	[59]
超高速离心	TEM、标志物鉴定 (CD81、CD9、CD63、Hsp70)	NA	体外: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	[60]
超高速离心	NTA、标志物鉴定 (CD9、CD63、CD81)	关节腔内注射	体外: 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	[51]

表注: TEM 为透射电子显微镜, NTA 为纳米颗粒跟踪分析, NA 为不适用, NR 为未报道

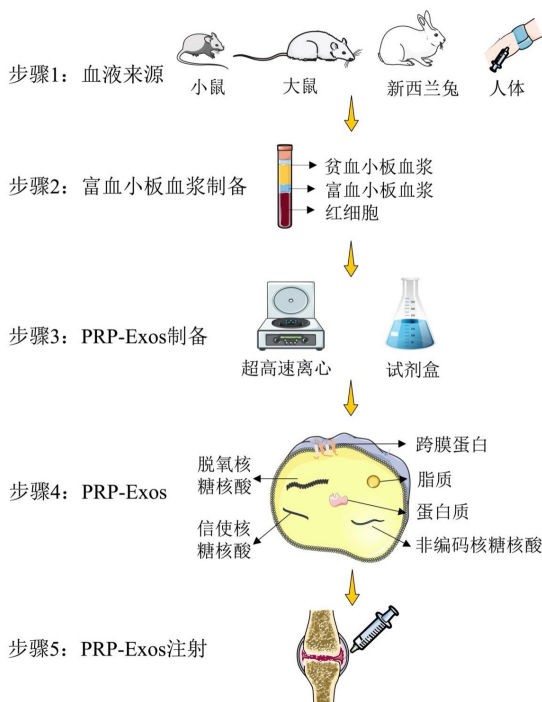


图 4 | 富血小板血浆来源外泌体 (PRP-Exos) 的提取、鉴定及应用步骤

2.3 PRP-Exos 的效应原理

2.3.1 PRP-Exos 与富血小板血浆的异同 一般根据其白细胞与纤维蛋白的含量比可以将富血小板血浆分为 4 类: ①富含白细胞的富血小板血浆; ②贫白细胞的富血小板血浆; ③富含白细胞的血小板纤维蛋白; ④纯富血小板纤维蛋白^[16]。富血小板纤维蛋白是三维结构的纤维蛋白基质, 因此富血小板纤维蛋白在给药或移植后不会迅速溶解, 且其制备无需使用抗凝剂或活化剂^[61]。但无论是哪种富血小板血浆其发挥作用的主要机制在于活化的血小板分泌大量的生长因子、趋化因子和细胞因子, 促进血管生成, 调节细胞外基质, 加速细胞募集、增殖和分化, 并抑制软骨细胞的凋亡^[54]。活化后的富血小板血浆可上调碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)AB/BB、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达^[45]。虽然富血小板血浆通常在 37 °C 或室温下制备, 但 ETULAIN 等^[62]发现在 4 °C 条件下预孵育富血小板血浆可最大限度地释放血小板衍生的促血管生成分子。

PRP-Exos 以往被认为是从活化的血小板中释放的促凝物质^[63], 富血小板血浆起效的各类因子一旦从血小板中释放出来将失去磷脂膜的保护, 可能会被细胞外环境中的裂解酶破坏并迅速失去其生物活性^[64], 因此外泌体这样的天然囊泡或许是一种延效工具。另外 PRP-Exos 中生长因子的含量高于富血小板血浆^[45], 但目前暂无富血小板血浆与 PRP-Exos 的内容成分、机制及疗效的对比研究, PRP-Exos 能否替代富血小板血浆仍需大量研究。

2.3.2 不同激活剂对 PRP-Exos 的影响 有多种方法可以激活富血小板血浆, 不同的活化剂可能会影响生物活性分子的释放和纤维蛋白原的裂解。RUI 等^[59]设置 0.1 U/mL 凝血酶, 2 mmol/L 葡萄糖酸钙溶液, 等体积的 2 mmol/L 葡萄糖酸钙溶液 + 0.1 U/mL 凝血酶的混合物及等体积的生理盐水为活化剂探究不同激活方式对富血小板血浆及 PRP-Exos 的影响, 研究发现用凝血酶 + 葡萄糖酸钙激活的富血小板血浆收获了最高浓度的外泌体, 其次为葡萄糖酸钙、凝血酶。同时凝血酶 + 葡萄糖酸钙激活后产生的 PRP-Exos 中, 细胞因子 (血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子 BB、碱性成纤维生长因子、转化生长因子 β) 浓度最高。此外, SAUMELL-ESNAOLA 等^[60]发现 CaCl_2 活化的血小板比未活化的血小板释放更多的外泌体, 透射电子显微镜下形态典型, 并且 CaCl_2 活化后的 PRP-Exos 更加符合外泌体的分子特征。包括生长因子和细胞因子在内的 10^5 种分析物的阵列分析表明, CaCl_2 活化后的 PRP-Exos 中大多数分析物水平较低, 但外泌体标志蛋白水平相对较高。因此, 认为钙离子促使外泌体从血小板中释放。

2.4 PRP-Exos 的作用

2.4.1 PRP-Exos 对膝关节关节炎的作用 PRP-Exos 对膝关节关节炎的治疗作用主要体现在促进软骨细胞增殖、迁徙, 减少软骨细胞

凋亡及肥大化,抑制炎症因子的释放,促进细胞外基质分泌,见表4。LIU等^[48]在软骨细胞体外实验中添加白细胞介素1 β 模拟炎症环境,研究发现PRP-Exos仍具有促进软骨细胞增殖与迁徙能力,同时促进软骨基质分泌、减少软骨细胞凋亡。OTAHAL等^[58]通过实时定量聚合酶链式反应对软骨细胞的基因表达分析显示,PRP-Exos加入激活后的M1型巨噬细胞共培养的骨关节炎来源软骨细胞后II型胶原蛋白表达增加,而通过酶联免疫吸附法检测显示肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素1 β 水平较低,说明PRP-Exos对炎症因子有抑制作用,并促进细胞外基质的分泌。

表4 | 富血小板血浆来源外泌体 (PRP-Exos) 特征及对膝骨关节炎的潜在作用

试验类型	作用	文献
体外实验	促进人源骨髓间充质干细胞增殖、迁徙、成骨分化	[45]
体外实验	促进成纤维细胞和血管内皮细胞增殖、迁移, PI3K/Akt 和 Erk1/2 信号通路参与血管生成和促进增殖作用	[44]
体内外实验	通过 Akt/Bad/Bcl-2 通路抑制地塞米松对骨髓间充质干细胞和成骨前体细胞的成骨抑制作用	[54]
体内实验	通过 Wnt/ β - 连环蛋白信号通路促进细胞增殖、抑制软骨细胞凋亡	[48]
体内实验	通过调节细胞外基质重塑和炎症环境促进肌肉恢复	[41]
体外实验	促进 II 型胶原蛋白表达、抑制肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 分泌	[58]
体外实验	葡萄糖酸钙 + 凝乳酶的混合物激活的富血小板血浆分泌的外泌体数量最多、PRP-Exos 生长因子浓度最高, 通过 AKT/ERK 信号通路促进人源血管内皮细胞增殖与迁移	[59]
体外实验	钙离子促使外泌体从血小板中释放	[60]
体内外实验	结合热敏凝胶促进小鼠骨髓间充质干细胞和软骨细胞的增殖和迁移, 干细胞成软骨分化, 抑制软骨细胞的凋亡	[51]

表注: PI3K/Akt 为磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B, Erk 为细胞外调节蛋白激酶, Bad 为 B 淋巴细胞瘤 2 基因相关启动子, Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤 2 基因

除此之外, PRP-Exos 发挥作用可能与剂量相关。TORREGGIANI 等^[45]比较了 0.6, 5, 50 μ g 这 3 种浓度的血小板裂解物来源外泌体对人源骨髓间充质干细胞的影响, 5 μ g 及 50 μ g 的外泌体分别可促进 10.3 倍及 27.1 倍的细胞增殖, 同时促进细胞迁徙, 5 μ g 的外泌体还可促进骨髓间充质干细胞成骨分化。GUO 等^[44]发现 5 μ g/mL PRP-Exos 和 50 μ g/mL PRP-Exos 对成纤维细胞及血管内皮细胞的生长显示出相似的增殖率。

2.4.2 PRP-Exos 对其他骨骼肌肉系统疾病的作用 目前 PRP-Exos 对膝骨关节炎的研究较少, 但 PRP-Exos 在其他骨骼肌肉系统疾病中的研究也有一定参考意义。如 TAO 等^[54]发现 PRP-Exos 可以促进骨组织的维持和再生, 并促进细胞增殖。体外实验结果表明 PRP-Exos 可以在添加地塞米松的激素环境下促进血管生成, 用 PRP-Exos 处理的骨髓间充质干细胞和成骨前体细胞的凋亡细胞比例更少。PRP-Exos 可以抑制体外激素环境下对骨髓间充质干细胞和成骨前体细胞的成骨抑制作用。另外, IYER 等^[41]认为 PRP-Exos 及间充质干细胞来源外泌体均可以加速损伤肌肉的恢复。通过大鼠构建的肌肉损伤模型发现两者可以通过调节细胞外基质和抑制炎症, 从而促进肌肉恢复, 但涉及机制不完全相同, PRP-Exos 治疗后肌细胞生成素增加, 而间充质干细胞来源外泌体治疗后炎症因子表达明显下降。PRP-Exos 与组织材料的结合近年也在积极探索中。ZHANG 等^[51]将 PRP-Exos 与热敏水凝胶 (PRP-Exo-Gel) 结合后移植于距下关节, 发现 PRP-Exo-Gel 可连续释放外泌体长达 28 d, 并促进小鼠骨髓间充质干细胞和软骨细胞的增殖、迁移, 同时增强干细胞的成软骨分化, 抑制炎症诱导的软骨细胞变性。通过体内实验证实, PRP-Exo-Gel 增加了外泌体的释放时间, 抑制了软骨细胞的凋亡和肥大, 促进其增殖,

并可能在干细胞募集中发挥作用, 延缓骨关节炎的进展。PRP-Exos 在不同的骨骼肌肉系统疾病模型上均表现出对细胞生长、细胞外基质及炎症的调节作用, 与生物材料的结合也是膝骨关节炎治疗的未来方向。

2.5 PRP-Exos 作用机制 目前关于 PRP-Exos 的机制探究主要在分子层面。PRP-Exos 在促血管生成方面的机制涉及 PI3K/Akt 和 Erk1/2 信号通路^[44, 59]。此外, PRP-Exos 通过 Akt/Bad/Bcl-2 信号通路抑制激素环境下细胞凋亡^[54], 并通过抑制白细胞介素 1 β 刺激的软骨细胞中的 Wnt/ β - 连环蛋白信号通路来促进细胞增殖和软骨基质分泌^[48]。就 PRP-Exos 包含的非编码 RNA 而言, 目前仅 XU 等^[65]研究进行了 miR-141-3p 对髓核细胞的保护作用探究。PRP-Exos 通过下调 Keap1, 导致 Nrf2 从 Keap1-Nrf2 复合物中释放, 进一步从细胞质转移到细胞核以实现其抗氧化生物学功能。XU 等^[65]进一步研究发现 PRP-Exos 对 Nrf2 缺陷的髓核细胞没有生物学作用。此外, PRP-Exos 中富含 miR-141-3p, miR-141-3p 可以靶向 Keap1 mRNA 的 3' 非翻译区降解, 导致 Nrf2 易位。

3 讨论与展望 Discussion and prospects

3.1 既往他人该领域研究的贡献和存在的问题 富血小板血浆作为一种生物材料已经广泛运用于骨骼肌肉系统疾病, 特别是膝骨关节炎中, 现已经制定了相关指南和专家共识。但其来源的外泌体相关研究较少, 仍处于研究探索阶段。目前对于外泌体的研究主要集中在肿瘤治疗及间充质干细胞来源外泌体, 关于 PRP-Exos 的研究主要集中在细胞层面, 涉及创面修复、骨重建、软骨修复等方面, 但 PRP-Exos 对膝骨关节炎的可能治疗作用及机制暂无较系统的总结。

3.2 作者综述区别于他人他篇的特点 文章综述了 PRP-Exos 的特征, 包括如何提取及鉴定, 以及 PRP-Exos 在膝骨关节炎中已经发现及潜在的作用和作用机制, 例如: 通过抑制软骨细胞凋亡改善其增殖、促进软骨细胞迁徙、抑制膝骨关节炎的炎症因子分泌、促进细胞外基质合成与分泌等。

3.3 综述的局限性 由于原始研究较少, 且部分研究未严格制备膝骨关节炎模型, 所以 PRP-Exos 治疗膝骨关节炎的作用及机制仍需要进一步研究。

3.4 综述的重要意义 膝骨关节炎是常见的肌骨系统疾病, 治疗方式多样, 但如何促进破裂软骨、软骨下骨重建及微环境的良性建立仍是难点, 对此, 再生治疗或是重要组成部分。相较富血小板血浆, PRP-Exos 具有完整膜结构, 可以成为生物信号传输的载体, 有利于推广与应用。此外, 已有研究将 PRP-Exos 与组织工程结合, 这也将成为 PRP-Exos 应用的又一延展。

3.5 课题专家组对未来的建议 如同富血小板血浆的研究, PRP-Exos 起效的生物因子十分复杂, 需要完成生长因子含量及释放速度等检测并进行长期研究。虽然目前认为 PRP-Exos 与富血小板血浆发挥主要作用的主要来源是血小板激活后释放的生长因子, 但其包含的非编码 RNA、DNA 等是否有重要作用尚未可知, 需要明确作用。富血小板血浆的组分、质量控制始终缺乏标准及严格的报道, 而 PRP-Exos 同样面临此问题, 需要建立 PRP-Exos 的质量控制体系。

作者贡献: 第一作者进行综述设计, 第一、第二作者完成资料收集、论文撰写, 通讯作者审核。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南); 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] VOS T, ABAJOBIR AA, ABATE KH, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-1259.
- [2] HUNTER DJ, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393(10182):1745-1759.
- [3] SAFIRI S, KOLAHI AA, SMITH E, et al. Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):819-828.
- [4] KOLASINSKI SL, NEOGI T, HOCHBERG MC, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020;72(2):149-162.
- [5] MUSUMECI G, AIELLO FC, SZYCHLINSKA MA, et al. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6093-6112.
- [6] 向小娜, 余曦, 刘岩, 等. 富血小板血浆与脉冲电磁场联合应用治疗骨关节炎: 理论与临床研究的进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(30): 4868-4874.
- [7] DOBSON GP, LETSON HL, GRANT A, et al. Defining the osteoarthritis patient: back to the future. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018;26(8):1003-1007.
- [8] MURPHY C, WITHROW J, HUNTER M, et al. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Mol Aspects Med*. 2018;60:123-128.
- [9] LI J, PEI M. Cell senescence: a challenge in cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(4):270-287.
- [10] LI Y, WU Y, JIANG K, et al. Mangiferin Prevents TBHP-Induced Apoptosis and ECM Degradation in Mouse Osteoarthritic Chondrocytes via Restoring Autophagy and Ameliorates Murine Osteoarthritis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8783197.
- [11] GUILAK F, NIMS RJ, DICKS A, et al. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol*. 2018;71-72:40-50.
- [12] TU J, HUANG W, ZHANG W, et al. TWIST1-MicroRNA-10a-MAP3K7 Axis Ameliorates Synovitis of Osteoarthritis in Fibroblast-like Synoviocytes. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;22:1107-1120.
- [13] RAHMATI M, NALESSO G, MOBASHERI A, et al. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res Rev*. 2017;40:20-30.
- [14] HUNZIKER EB, QUINN TM, HÄUSELMANN HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(7):564-572.
- [15] GLYN-JONES S, PALMER AJ, AGRICOLA R, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-387.
- [16] DE VOS RJ, WEIR A, VAN SCHIE HT, et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010;303(2):144-149.
- [17] FOSTER TE, PUSKAS BL, MANDELBAUM BR, et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37(11):2259-2272.
- [18] DOHAN EHRENFEST DM, RASMUSSEN L, ALBREKTSSON T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-167.
- [19] LOUIS ML, MAGALON J, JOUVE E, et al. Growth Factors Levels Determine Efficacy of Platelets Rich Plasma Injection in Knee Osteoarthritis: A Randomized Double Blind Noninferiority Trial Compared With Viscosupplementation. *Arthroscopy*. 2018;34(5):1530-1540.e2.
- [20] KON E, BUDA R, FILARDO G, et al. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):472-479.
- [21] SAMPSON S, REED M, SILVERS H, et al. Injection of platelet-rich plasma in patients with primary and secondary knee osteoarthritis: a pilot study. *Am J Phys Med Rehabil*. 2010;89(12):961-969.
- [22] THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
- [23] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977.
- [24] CHENG N, DU D, WANG X, et al. Recent Advances in Biosensors for Detecting Cancer-Derived Exosomes. *Trends Biotechnol*. 2019;37(11):1236-1254.
- [25] LI D, WANG Y, JIN X, et al. NK cell-derived exosomes carry miR-207 and alleviate depression-like symptoms in mice. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):126.
- [26] CHEW JRJ, CHUAH SJ, TEO KYW, et al. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration. *Acta Biomater*. 2019;89:252-264.
- [27] MICHAEL JW, SCHLÜTER-BRUST KU, EYSEL P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(9):152-162.
- [28] ECKSTEIN F, LE GRAVERAND MP, CHARLES HC, et al. Clinical, radiographic, molecular and MRI-based predictors of cartilage loss in knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(7):1223-1230.
- [29] WILSON JF. To stop osteoarthritis, fixing cartilage may not be enough. *Ann Intern Med*. 2007;147(6):437-439.
- [30] ANDRIACCHI TP. Osteoarthritis: Probing knee OA as a system responding to a stimulus. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(7):371-372.
- [31] BURR DB, GALLANT MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):665-673.
- [32] ASO K, SHAHTAHERI SM, HILL R, et al. Associations of Symptomatic Knee Osteoarthritis With Histopathologic Features in Subchondral Bone. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(6):916-924.
- [33] YUAN C, PAN Z, ZHAO K, et al. Classification of four distinct osteoarthritis subtypes with a knee joint tissue transcriptome atlas. *Bone Res*. 2020;8(1):38.
- [34] DOYLE LM, WANG MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7):727.
- [35] CAO Q, GUO Z, YAN Y, et al. Exosomal long noncoding RNAs in aging and age-related diseases. *IUBMB Life*. 2019;71(12):1846-1856.
- [36] WHITESIDE TL. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*. 2018;35:69-79.
- [37] LIU Y, LIN L, ZOU R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/

- GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle*. 2018;17(21-22):2411-2422.
- [38] HA DH, KIM HK, LEE J, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells*. 2020;9(5):1157.
- [39] LIU J, REN L, LI S, et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(9):2783-2797.
- [40] DOHAN EHRENFEST DM, RASMUSSEN L, ALBREKTSSON T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009; 27(3):158-167.
- [41] IYER SR, SCHEIBER AL, YAROWSKY P, et al. Exosomes Isolated From Platelet-Rich Plasma and Mesenchymal Stem Cells Promote Recovery of Function After Muscle Injury. *Am J Sports Med*. 2020;48(9): 2277-2286.
- [42] ZHANG W, DONG X, WANG T, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma mediate hyperglycemia-induced retinal endothelial injury via targeting the TLR4 signaling pathway. *Exp Eye Res*. 2019;189:107813.
- [43] CERVENAKOVA L, SAÁ P, YAKOVLEVA O, et al. Are prions transported by plasma exosomes? *Transfus Apher Sci*. 2016;55(1):70-83.
- [44] GUO SC, TAO SC, YIN WJ, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model. *Theranostics*. 2017;7(1): 81-96.
- [45] TORREGGIANI E, PERUT F, RONCUZZI L, et al. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cell Mater*. 2014;28:137-151.
- [46] SAÁ P, YAKOVLEVA O, DE CASTRO J, et al. First demonstration of transmissible spongiform encephalopathy-associated prion protein (PrP^{Sc}) in extracellular vesicles from plasma of mice infected with mouse-adapted variant Creutzfeldt-Jakob disease by in vitro amplification. *J Biol Chem*. 2014;289(42):29247-29260.
- [47] YIN W, QI X, ZHANG Y, et al. Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte- and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects. *J Transl Med*. 2016;14:73.
- [48] LIU X, WANG L, MA C, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):470.
- [49] NILFOROUSHZADEH MA, AGHDAMI N, TAGHIABADI E. Effects of Adipose-Derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma Exosomes on The Inductivity of Hair Dermal Papilla Cells. *Cell J*. 2021;23(5):576-583.
- [50] XU Y, LIN Z, HE L, et al. Platelet-Rich Plasma-Derived Exosomal USP15 Promotes Cutaneous Wound Healing via Deubiquitinating EIF4A1. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:9674809.
- [51] ZHANG Y, WANG X, CHEN J, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma administration in site mediate cartilage protection in subtalar osteoarthritis. *J Nanobiotechnology*. 2022;20(1):56.
- [52] ZHANG W, JIANG H, KONG Y. Exosomes derived from platelet-rich plasma activate YAP and promote the fibrogenic activity of Müller cells via the PI3K/Akt pathway. *Exp Eye Res*. 2020;193:107973.
- [53] FLAMANT S, TAMARAT R. Extracellular Vesicles and Vascular Injury: New Insights for Radiation Exposure. *Radiat Res*. 2016;186(2):203-218.
- [54] TAO SC, YUAN T, RUI BY, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway. *Theranostics*. 2017;7(3):733-750.
- [55] LEBLANC P, ARELLANO-ANAYA ZE, BERNARD E, et al. Isolation of Exosomes and Microvesicles from Cell Culture Systems to Study Prion Transmission. *Methods Mol Biol*. 2017;1545:153-176.
- [56] XU X, LIANG Y, LI X, et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2021;269:120539.
- [57] MATHIEU M, NÉVO N, JOUVE M, et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat Commun*. 2021;12(1):4389.
- [58] OTHAL A, KRAMER K, KUTEN-PELLA O, et al. Effects of Extracellular Vesicles from Blood-Derived Products on Osteoarthritic Chondrocytes within an Inflammation Model. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7224.
- [59] RUI S, YUAN Y, DU C, et al. Comparison and Investigation of Exosomes Derived from Platelet-Rich Plasma Activated by Different Agonists. *Cell Transplant*. 2021;30:9636897211017833.
- [60] SAUMELL-ESNAOLA M, DELGADO D, GARCÍA DEL CAÑO G, et al. Isolation of Platelet-Derived Exosomes from Human Platelet-Rich Plasma: Biochemical and Morphological Characterization. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2861.
- [61] SHAO S, PAN R, CHEN Y. Autologous Platelet-Rich Plasma for Diabetic Foot Ulcer. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(12):885-890.
- [62] ETULAIN J, MENA HA, MEISS RP, et al. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Sci Rep*. 2018;8(1):1513.
- [63] MELKI I, TESSANDIER N, ZUFFEREY A, et al. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets*. 2017;28(3):214-221.
- [64] WU J, PIAO Y, LIU Q, et al. Platelet-rich plasma-derived extracellular vesicles: A superior alternative in regenerative medicine? *Cell Prolif*. 2021;54(12):e13123.
- [65] XU J, XIE G, YANG W, et al. Platelet-rich plasma attenuates intervertebral disc degeneration via delivering miR-141-3p-containing exosomes. *Cell Cycle*. 2021;20(15):1487-1499.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)