

· 论 著 ·

富血小板血浆凝胶对脂肪干细胞修复皮肤软组织缺损创面的影响

廖怀伟¹, 韩超¹, 刘丽忠^{1△}, 曹闽军²

(1. 南昌大学第一附属医院整形科, 南昌 330006; 2. 江西省吉安市中医院整形科 343009)

摘要:目的 探讨富血小板血浆(PRP)凝胶和脂肪干细胞(ADSCs)在创面修复中的作用。方法 取大鼠腹股沟脂肪组织, 使用贴壁筛选法分离、培养 ADSCs, 三系诱导分化鉴定。取 6~7 周龄雄性 SD 大鼠 30 只, 随机选取 12 只大鼠经心脏取动脉血 7~10 mL/只, 采用改良 Appel 法制备 PRP; 倒置相差显微镜下对留存的全血及 PRP 进行血小板计数。剩余 18 只大鼠随机分成 3 组, 每组 6 只; A 组为 ADSCs+PRP 处理组, B 组为 ADSCs 处理组; C 组为 PRP 处理组, 所有未处理创面设定为 D 组(对照组); 观察创面肉芽组织生长情况, 创面周围炎症反应及上皮化程度。记录创伤后各时间点创面面积、创面收缩率、创面完全愈合时间; 24 d 后处死各组大鼠, 取创面愈合组织, HE 染色观察。**结果** 大鼠 PRP 中血小板计数约为全血的 5.21 倍。创面完全愈合所需要的时间 A 组为(18.25±1.44)d, B 组为(19.13±1.28)d, C 组为(19.72±0.87)d, D 组为(22.31±1.65)d; 术后 3、7、11、15 d A、B、C 组创面收缩率均高于 D 组($P<0.05$)。**结论** PRP 凝胶可促进 ADSCs 修复创面, 且较单独使用 ADSCs 或 PRP 效果好。

关键词:脂肪干细胞; 富血小板血浆凝胶; 软组织缺损; 创面修复

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)32-3859-04

The influence of platelet rich plasma gel applied to adipose-derived stem cells repair soft tissue wounds

Liao Huaiwei¹, Han Chao¹, Liu Lizhong^{1△}, Cao Minjun²

(1. Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. Department of Plastic Surgery, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Ji'an City, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract: Objective To explore the role of ADSCs and PRP in soft tissue defect repairing. **Methods** Harvest adipose tissue from inguinalis fat pad of SD rats, isolation, culture, and identification the ADSCs through three differentiation method. Take 30 male SD rats about 6-7 weeks old randomly. Randomly selected 12 rats been take blood from heart. Preparation the PRP with modified appel method. To count platelet of whole blood and PRP under microscope. Take the remaining rats. Divided the rat into 3 groups ($n=6$ in each group) randomly, of which group A treatment with ADSCs and PRP; Group B treatment with ADSCs; Group C treatment whit PRP. Selected one side of skin defect wound for test randomly and the relative side skin defect is for control, Handle all of the control wound to group D; Observe the growth of granulation tissue on the wound surface; observe the inflammatory surrounding and the degree about epithelial. statistical analysis and record the wound size, and calculation the shrinkage rate of wound in different periods. Record the time of completely healing time. Histologic observation of the wound healing tissue. **Results** Platelet counting showed platelet of PRP is 5.21 times than whole blood. The wound completely healed time: group A (18.25±1.44) days, group B(19.13±1.28)days, group C(19.72±0.87)days, group D(22.31±1.65) days, The time of each treatment group and control group was significantly obvious ($P<0.05$). At 3, 7, 11 and 15 days after experimental treatment, compared with the control group the experiment group of wound contraction rate was significantly obvious ($P<0.05$). **Conclusion** Application of ADSCs with PRP can enhance the quality and shorten the wound healing time than used them alone.

Key words: adipose stem cell; platelet-rich plasma gel; soft tissue defects; wound healing

皮肤软组织缺损创面的愈合是一个复杂的生物学过程, 在影响组织缺损修复的众多因素中, 参与组织再生的局部干细胞来源不足、促愈的细胞因子缺乏是影响皮肤软组织缺损创面修复的两个重要因素^[1]。有研究证实, 局部注射的种子细胞在特定环境中可分化为血管内皮细胞等组成血管组织的终末细胞, 直接形成新生血管和再生的组织, 并可通过旁分泌多种生长因子而发挥作用^[2]。本实验采用取材方便、来源广泛、创伤小, 低免疫原性的脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)作为种子细胞修复创面^[3-5], 并在其修复过程中应用富含多种与体内正常比例相符生长因子的富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)凝胶^[6], 观察 PRP 凝胶对 ADSCs 修复皮肤软组织缺损创面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物为 6~7 周龄 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 体质量 220~240 g, 由南昌大学医学院动物中心提供。主要仪器: 凝血酶(Sigma 公司, 美国), 7%水合氯醛, 无水 CaCl₂(国药集团化学试剂有限公司); 3M 硅胶片(3M 公司, 美国), 高速离心机(中科中佳科学仪器有限公司, 安徽), DT-100 电子天平(北京医用天平厂)。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs 的制备 取大鼠双侧大腿内侧腹股沟处脂肪组织, 密度梯度离心法分离 ADSCs, 并使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素, 低糖培养基 L-DMEM 体外培养扩增, 传代培养至第 3 代备用^[7]。

1.2.2 ADSCs 三系分化法鉴定 取分化培养的第 3 代 ADSCs, 以 5×10^4 /mL 接种在用于诱导分化的 6 孔板中; 分别加入三系分化诱导液培养基进行诱导分化, 每 3 d 更换诱导培养基 1 次; 成脂诱导分化组进行诱导分化处理后 2 周, 行油红 O 染色倒置显微镜下观察, 成骨诱导分化组进行诱导分化处理后 4 周后需行 Von Kossa 染色观察鉴定。成神经诱导 24 h 后, 加兔抗大鼠 Nestin 一抗 (1:100 稀释), 4 °C 冰箱过夜, 保湿; PBS 冲洗后加羊抗兔二抗 IgG-TR (1:200 稀释), 封片后免疫荧光显微镜下观察、拍照。

1.2.3 PRP 的制备 随机选取 12 只大鼠, 以 7% 水合氯醛经腹腔麻醉, 使用预先装有 1 mL 复方枸橼酸钠抗凝剂的 10 mL 注射器, 直视下从每只大鼠心脏取动脉血 (约可取 7~10 mL), 混匀, 置入离心管中, 采用改良 Appell 法^[8] 1 000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血浆及血小板, 再调整到 3 000 r/min 离心 8 min, 弃上层血浆, 将剩余液体与激活剂 (凝血酶与 10% CaCl₂ 的混合物) 以 9:1 比例混合, 置于常温空气中振荡, 2 min 后即形成血小板凝胶。实验过程中留取部分全血及 PRP 进行血小板计数, 确保 PRP 中血小板的数量是全血的 4 倍以上。

1.2.4 皮肤软组织缺损创面动物的构建及分组 取剩余 18 只大鼠使用 7% 水合氯醛 (0.25 mg/100 g) 经腹腔内注射成功麻醉大鼠后, 将其四肢展平、俯卧位固定于板面上, 剪除术区体毛后进行切口标记, 切口设计在其背部正中脊柱两侧相距 2 cm 处, 分别设计一个直径为 2 cm 的圆形创面, 全背部用碘伏、乙醇反复消毒 3 次后, 用 11 号尖刀沿标记线全层切除皮肤, 形成皮肤软组织缺损创面。随机抽取一侧创面为试验处理创面, 与之相对的另一侧创面即为对照创面, A 组为 ADSCs+PRP 处理组, B 组为 ADSCs 处理组, C 组为 PRP 处理组, 所有未处理创面设定为 D 组 (对照组); 体内移植细胞浓度控制为 3×10^6 /mL, 每个创面覆盖 1 mL 已激活的 PRP 凝胶。体内移植时注射方法为: 双侧创面均在创缘设计等距的 6 点进行真皮内及皮下注射、基底等距的 2 点进行肌层内注射, 每个注射点注入 0.1 mL 液体。各组具体处理方法: A 组为 ADSCs+DMEM 局部注射+PRP 凝胶覆盖创面; B 组 ADSCs+DMEM; C 组为 DMEM 局部注射+PRP 凝胶覆盖创面, D 组为单纯 DMEM 局部注射。创伤术后在创面均匀涂抹盐酸金霉素眼膏后, 使用 3M 膜覆盖, 将各组大鼠单笼饲养, 3 d 后去除创面 3M 膜, 观察记录大鼠的一般状况、局部创面愈合情况和创面面积变化。

1.2.5 组织标本的制备 术后第 24 天处死各组大鼠, 取缺损愈合后疤痕及其周围部分组织, 使用体积分数 4% 甲醛固定, 脱梯度脱水、浸蜡、包埋后制成约 5 μ m 厚的切片, 切片方向设计为纵切, 以确保制作的切片均位于软组织缺损修复后的疤痕中心处附近。

1.2.6 主要观察指标

1.2.6.1 创面情况 观察创面肉芽组织生长情况, 以及周围炎症反应和上皮化程度。

1.2.6.2 创面收缩率 在术后第 3、7、11、15 天的固定时间点使用医用透明膜覆盖于创面并沿创面边缘画出创面, 剪下所绘膜片, 将其置于分度值为 0.1 mg 天平称取质量并换算成面积, 记录创面面积大小, 以刚制得的软组织缺损创面面积大小为原创面面积, 创面收缩率 (%) = (1 - 现创面面积 / 原创面面积) \times 100%

1.2.6.3 创面完全愈合时间 观察缺损创面愈合情况, 设定

缺损创面完全上皮化是创面表面无渗出物, 且创面表面已被上皮组织完全覆盖所需时间即为完全愈合时间。

1.2.6.4 组织病理学观察 各组创面完全愈合后处死大鼠, 获取创面愈合组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片后行 HE 染色, 光镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。行配对样本 *t* 检验或多个样本均数多重比较的 SNK 方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板计数 将制作 PRP 过程中获取全血时和制得 PRP 时留取的少量样本进行血小板计数。全血血小板计数为 $(624.5 \pm 31.4) \times 10^9$, PRP 中血小板计数为 $(3206.22 \pm 204.46) \times 10^9$, 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), PRP 中测得的血小板浓度为大鼠全血中血小板浓度的 5.21 倍。

2.2 ADSCs 体外诱导多向分化潜能 第 3 代细胞置于成脂诱导培养基分化后, 可见诱导所得的细胞呈葡萄串状分布, 使用油红 O 染色剂进行染色处理, 细胞内出现亮红色颗粒, 证明细胞质内满布折光性高的圆形脂滴。成骨分化培养基内诱导分化 4 周后使用 Von Kossa 方法染色后置于镜下观察, 在集落生长细胞团的中央区, 细胞外基质中可观察到棕黑色团块沉淀, 此阳性结果即为磷酸盐矿化沉淀。成神经诱导培养基中约 5 h 后即可在倒置相差显微镜下观察到: 经处理细胞的胞质以细胞核为中心呈收缩样表现, 胞质的收缩导致细胞体积逐渐变小, 周围的胞质收缩形成细胞突起, 形成了两极或多极样细胞。继续进行诱导分化 24 h 后, 经诱导的细胞大多分化表现为类似神经元样的细胞形态。

2.3 大体观察结果 在实验后第 3 天时, 除去保护创面的 3M 膜后, 可观察到各组缺损创面被淡白色膜状物覆盖, 将皮肤缺损创面初步闭合, 此时创面并不稳定, C 组表面可见部分暗红色血痂, 但不稳定, 易脱落; 各组创面均缩小, 但 A、B、C 组创面面积较 D 组小。第 7 天时各软创面表层可见淡红色或暗红色痂皮, 揭去表面痂皮后可见 A 组创面下已形成较为可靠的肉芽组织, 颜色红润、触之易出血, 各组创面面积均变小, 但 A、B、C 组创面收缩程度大。第 11 天时, A、B、C 组创面上皮化程度明显, 但 D 组创面表面仍有部分暗红色血痂覆盖。第 15 天时 A 组创面几乎完全愈合; B、C 组创面大小相差不大, 表面亦覆盖着较薄的上皮组织; A、B、C 组创面面积较 D 组创面小。见图 1。

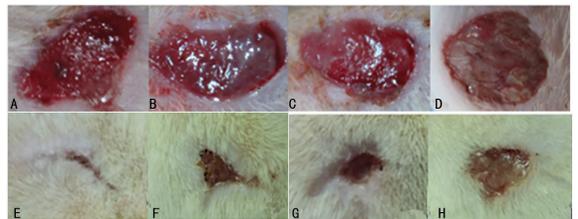


图 1 大鼠皮肤软组织缺损创面变化
A: A 组 7 d; B: B 组 7 d; C: C 组 7 d; D: D 组 7 d; E: A 组 15 d; F: B 组 15 d; G: C 组 15 d; H: D 组 15 d。

图 1 大鼠皮肤软组织缺损创面变化

2.4 创面完全愈合时间 创面完全愈合所需要的时间以 A 组 (18.25 \pm 1.44) d 最短, D 组 (22.31 \pm 1.65) d 愈合时间最长; B 组 (19.13 \pm 1.28) d 与 C 组 (19.72 \pm 0.87) d 创面愈合时

间差异无统计学意义;A、B、C 组与 D 组创面完全愈合时间相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 创面收缩率比较 A、B、C 组创面收缩率比 D 组大($P < 0.05$),A 组创面收缩率在各时间点比 B、C、D 组大($P < 0.05$),B 组与 C 组的创面收缩率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 创伤后各时间点各组创面收缩率($\bar{x} \pm s$)

组别	创面收缩率(%)			
	3 d	7 d	11 d	15 d
A 组	34.1 \pm 4.1	73.7 \pm 2.4	92.3 \pm 2.5	98.2 \pm 1.2
B 组	27.1 \pm 3.7	62.3 \pm 3.4	85.3 \pm 1.9	94.3 \pm 2.1
C 组	25.1 \pm 4.5	59.7 \pm 4.3	84.2 \pm 3.1	93.0 \pm 2.6
D 组	13.2 \pm 3.4	32.4 \pm 4.1	67.9 \pm 3.2	85.2 \pm 3.7

2.6 组织病理学观察 观察创面愈合后组织切片,A 组的皮下腺体样结构层次分明,新生血管较正常皮肤组织多,胶原纤维排列与正常皮肤组织类似;B 组创面内腺体样结构较正常皮肤多,新生血管较 A 组少,胶原纤维排列较紊乱;C 组新生毛细血管较多,腺体样结构较少,但其胶原纤维排列有序;D 组新生血管形成,视野里被紊乱排列的胶原纤维填充,腺体样组织较少。

3 讨 论

创伤修复领域中研究较多的细胞疗法,原理是以正常、具有功能的细胞,替换有缺陷或病损的细胞,从而替代、修复或加强受损组织或器官的生物功能。具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的干细胞在细胞疗法中应用最为广泛。BMSCs 作为细胞疗法的种子细胞,能够明显促进血管新生,改善血液供应、促进组织再生。但 BMSCs 在培养易产生较多造血干细胞成分,而 ADSCs 培养后得到则是较为纯净单一的间充质成分;Cao 等^[9]研究结果证实了 ADSCs 能够直接向血管内皮细胞分化,参与血管新生,故 ADSCs 在促进血管新生及组织再生的能力要优于 BMSCs。使用 ADSCs 作为细胞疗法的种子细胞可明显促进局部组织的再血管化^[10],进而加速创面愈合、缩短创面愈合时间。Takahashi 等^[11]报道了在进行局部脂肪移植时,辅助应用 ADSCs,能明显提高移植脂肪的存活率。Reichenberger 等^[12]在大鼠皮瓣的实验中局部注射 ADSCs 后,观察到皮瓣的存活率有明显提升。多数学者认为,细胞疗法的作用机制:一是局部注射的种子细胞直接分泌多种可以促进血管新生的细胞因子发挥作用;二是种子细胞在局部环境中通过分化作用直接转化为血管内皮细胞等组成血管组织的终末细胞,形成新生血管和再生组织。理论上通过局部增加生长因子存留时间亦可缩短创面愈合时间。

临床上因条件所限常使用单一的生长因子,仅能促进某一阶段创面的愈合过程,将多种因子组合使用,更符合创伤愈合的生物学过程,才可能达到最佳的促创面愈合效果^[13]。如何在体外将各种单一基因重组因子按最佳配比组合,是临床应用生长因子的研究热点。研究发现,血小板成功激活后可在一段时间内持续释放多种与机体内配比、种类类似的生长因子。本实验采用改良 Appel 离心法制备 PRP,成功后混合加入适量的凝血酶和钙离子,促使 PRP 形成凝胶状,称为 PRP 凝胶。

在激活剂作用下,PRP 凝胶释放多种比例协调的高浓度生长因子,能够成为创面修复过程中可靠的生长因子供源。PRP 凝胶与临床上应用的单一生长因子相比较,有其独特的优势:(1)PRP 凝胶可以为创面提供一个适合创面愈合的湿润环境,还能在其存在于创面阶段持续分泌高浓度生长因子,发挥最大的促愈作用^[14]。避免了目前应用于临床的液态重组生长因子试剂喷洒在创面后容易流失和蒸发的缺点。(2)PRP 凝胶中生长因子的种类与浓度配比与机体相似,能够通过协同作用而发挥最大的促愈作用,弥补了临床上应用单一生长因子效果不佳的缺陷。(3)PRP 凝胶是由大量的纤维蛋白组成的立体网状结构,可为细胞生长提供良好支架,纤维蛋白的回缩作用还可促进创面收缩和凝血^[15]。(4)PRP 凝胶可以是自源性的,避免了异种或同种异体的生长因子可能引起的免疫排斥或毒副作用。(5)通过离心方法制备的 PRP 凝胶中含有大量与血小板沉降系数相近的单核细胞和白细胞,在创面修复过程中能够发挥预防感染的作用^[16]。(6)PRP 凝胶的制作方法简单易行、成本较低。近年来国外已有将其应用于牙周病、口腔种植、颅面、骨关节软骨等修复的研究报道^[17-18]。而在皮肤软组织缺损修复方面的研究则少见报道。

本研究在创面修复结果显示,创面愈合时间以 A 组最短,B 组、C 组愈合时间较 A 组长,D 组愈合时间最长;证明了 ADSCs 和 PRP 凝胶处理创面后可促进创面修复,联合使用 ADSCs 和 PRP 凝胶促创面愈合作用强,可显著缩短创面愈合时间。HE 染色结果显示经 ADSCs 和 PRP 凝胶处理创面后,创面愈合组织结构能够较稳定的恢复,可形成与正常皮肤组织类似的结构,但腺体和新生血管较正常组织多,可能与局部含较多的干细胞有关;胶原纤维排列较整齐,瘢痕形成少,可能与 PRP 凝胶促愈作用有关。单独使用 ADSCs 或 PRP 凝胶处理创面则不能达到联合使用时的效果。可能与 ADSCs 联合 PRP 凝胶修复创面时既能大量补充局部创面中组成新生组织的干细胞,又能利用 PRP 凝胶持续提供高浓度、与体内配比相似的生长因子,从而加速创面的愈合过程有关。值得注意的是,本研究中经 PRP 凝胶处理的实验创面胶原纤维排列有序,愈合时间较无 PRP 凝胶处理组缩短,说明 PRP 凝胶在加速软组织创伤愈合、减少瘢痕形成上起重要作用。单独 ADSCs 与 PRP 凝胶处理创面后,创面完全愈合时间相差不大,创面收缩率无显著的统计学意义。

ADSCs 可为局部皮肤软组织缺损创面提供具有多向分化能力的干细胞,并可促进局部血管新生;PRP 凝胶则为局部组织持续提供大量生长因子和细胞因子,刺激血管生成、成纤维细胞增殖以及胶原合成。本研究结果提示,在 ADSCs 修复创面时应用 PRP 凝胶缩短愈合时间,并改善其愈合效果。但 PRP 凝胶与 ADSCs 联合运用于创面修复尚处于起始阶段,需要进一步研究的是 PRP 凝胶使用方法及与 ADSCs 混合的最佳浓度配比,两者间在创面修复过程中相互调控情况也是今后研究的方向。

参考文献:

- [1] Yilmaz S, Cakar G, Kuru BE. Platelet-rich plasma in combination with bovine derived xenograft in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a case report with re-entry[J]. Platelets, 2007, 18(7): 535-539.

- [2] Nie C, Yang D, Xu J, et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis[J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(2):205-216.
- [3] 林敏魁, 陈小玲, 赵欣, 等. 不同浓度凝血酶对富血小板血浆修复颅骨缺损的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(2):209-213.
- [4] 李明, 张长青. 富血小板血浆与关节软骨修复[J]. *国际骨科学杂志*, 2010, 31(3):171-173.
- [5] 郝天智, 朱敬民, 扈文博. 自体富血小板血浆凝胶联合脱细胞异种真皮基质治疗深Ⅱ度烧烫伤[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(6):647-649.
- [6] David AP. Current science of regenerative medicine with stem cells[J]. *Invest Med*, 2006, 54(1):33-36.
- [7] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2):211-228.
- [8] Appel TR, Pazsch B, Müller J, et al. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2002, 13(5):522-528.
- [9] Cao Y, Liao L, Meng Y, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(2):370-379.
- [10] Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, et al. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 338(3):401-411.
- [11] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4):663-676.
- [12] Reichenberger MA, Heimer S, Schaefer A, et al. Adipose derived stem cells protect skin flaps against ischemia-reperfusion injury [J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 30(12):1203-1210.
- [13] Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration [J]. *Bone*, 2004, 34(4):665-671.
- [14] Fuerst G, Reinhard G, Tangl S, et al. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs [J]. *J Clin Periodontol*, 2004, 31(9):784-790.
- [15] Mazzucco LBV, Cattana E, Guaschino R, et al. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: fibrinet, regen PRP-kit, plateltex and one manual procedure [J]. *Vox Sang*, 2009, 97(2):110-118.
- [16] Roldan JC, Jepsen S, Miller J, et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7 [J]. *Bone*, 2004, 34(1):80-90.
- [17] Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, et al. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose dependent way [J]. *Arch Oral Biol*, 2010, 55(3):185-194.
- [18] Schlegel KA, Zimmermann R, Thorwarth M. Sinus floor elevation using autogenous bone or bone substitute combined with platelet-rich plasma [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 104(3):15-25.

(收稿日期:2013-07-10 修回日期:2013-08-12)

(上接第 3858 页)

- [7] Urena P, Hruby M, Ferreira A, et al. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7(3):506-512.
- [8] Ates F, Koken T, Demir S, et al. Comparison of three different immunoassay methods for the evaluation of intact parathyroid hormone levels in hemodialysis patients [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71(3):227-231.
- [9] De PL, Coppolino G, Bolignano D, et al. Parathyroid hormone variability parameters for identifying high turnover osteodystrophy disease in hemodialysis patients: an observational retrospective cohort study [J]. *Ther Apher Dial*, 2010, 14(6):566-571.
- [10] Fournier A, Ghitu S, Bako G, et al. Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in haemodialysis patients [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14(11):2772-2774.
- [11] Malluche HH, Mawad H, Monier-Faugere MC. Effects of treatment of renal osteodystrophy on bone histology [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, 3(suppl 3):S157-163.
- [12] 王成, 娄探奇, 唐骅, 等. 常用血液净化方法对维持性血液透析患者血清甲状旁腺素的清除效果 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2005, 14(1):61-63.
- [13] Movilli E, Camerini C, Gaggia P, et al. Effect of post-dilutional on-line haemodiafiltration on serum calcium, phosphate and parathyroid hormone concentrations in uraemic patients [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(12):4032-4037.
- [14] Perez-Garcia R, Albalade M, de Sequera P, et al. On-line haemodiafiltration improves response to calcifediol treatment [J]. *Nefrologia*, 2012, 32(4):459-466.
- [15] 贺海东, 张汝忠. 维持性血液透析患者透析充分性与血浆脑钠肽水平关系 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2010, 21(6):459-460.

(收稿日期:2013-06-01 修回日期:2013-07-10)