

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.004

过期单采血小板来源富血小板血浆的制备及体外功能研究*

吴春喜¹, 付银鑫², 谭晶晶³, 董素芳^{4△}

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 湖北武汉 430030; 2. 湖北省武汉市第四医院输血科, 湖北武汉 430032; 3. 湖北省武汉市中医院检验科, 湖北武汉 430014;
4. 海南医学院热带医学与检验医学院, 海南海口 571199

摘要:目的 探讨过期单采血小板(SDP)制备富血小板血浆(PRP)的方法及在体外对内皮细胞迁移和成血管能力的影响。方法 采用过期 SDP 使用离心浓缩法制备 PRP, 并采用凝血酶法激活 PRP, 应用 ELISA 试剂盒测定血小板衍生生长因子-AB(PDGF-AB)、血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)水平, 通过划痕试验和成血管试验评估其对内皮细胞的迁移和成血管能力的影响。结果 过期 SDP 来源的 PRP 和 SDP 中血小板浓度分别为 $(1\ 723 \pm 352) \times 10^9/L$ 和 $(398 \pm 52) \times 10^9/L$, 前者更高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ELISA 检测 PDGF-AB、VEGF 和 TGF- β_1 水平, 在过期 SDP 来源的 PRP 中分别为 $(43.23 \pm 15.13) \text{ ng/mL}$ 、 $(327.61 \pm 72.55) \text{ pg/mL}$ 、 $(77.13 \pm 17.27) \text{ ng/mL}$; 在 SDP 中分别为 $(7.16 \pm 2.49) \text{ ng/mL}$ 、 $(136.91 \pm 25.97) \text{ pg/mL}$ 、 $(18.90 \pm 4.59) \text{ ng/mL}$, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 划痕试验中, 与 SDP 比较, 过期 SDP 来源的 PRP 对内皮细胞的迁移能力有明显影响 ($P < 0.05$); 成血管试验中, 过期 SDP 来源的 PRP 促成血管能力优于 SDP。结论 过期 SDP 能制备具有高浓度生长因子的 PRP, 并在体外对内皮细胞的迁移和成血管能力有明显的促进作用。

关键词:过期单采血小板; 富血小板血浆; 内皮细胞; 成血管

中图分类号: R331.1+43

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)14-1965-04

Preparation and functional research in vitro of expired single donor platelets-derived PRP*WU Chunxi¹, FU Yinxin², TAN Jingjing³, DONG Sufang^{4△}

1. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College of HUST, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Blood Transfusion, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan, Hubei 430032, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430014, China; 4. School of Tropical Medicine and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China

Abstract: Objective To investigate the preparation method and the effect of platelet-rich plasma (PRP) from expired single donor platelets (SDP) on endothelial cell migration and tube formation activities. **Methods** Choose expired single donor platelet as the experimental material, PRP was prepared by centrifuge inspissation method, then activated by thrombin. The contents of platelet derived growth factor-AB (PDGF-AB), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transformed growth factor- β_1 (TGF- β_1) were measured by the ELISA kits. The effects of PRP from expired SDP on the cell migration and tube formation were measured by wound healing and tube formation assays. **Results** The platelet contents of PRP and SDP were $(1\ 723 \pm 352) \times 10^9$ and $(398 \pm 52) \times 10^9/L$ respectively, and the former was higher ($P < 0.05$). In ELISA assays, the contents of PDGF-AB, VEGF and TGF- β_1 were $(43.23 \pm 15.13) \text{ ng/mL}$, $(327.61 \pm 72.55) \text{ pg/mL}$ and $(77.13 \pm 17.27) \text{ ng/mL}$ in PRP respectively, while the PDGF-AB, VEGF and TGF- β_1 contents of SDP were $(7.16 \pm 2.49) \text{ ng/mL}$, $(136.91 \pm 25.97) \text{ pg/mL}$ and $(18.90 \pm 4.59) \text{ ng/mL}$ respectively, and the former was higher ($P < 0.05$). In wound healing assay and endothelial cell network formation assay, the cell migration activities and angiogenesis of PRP for endothelial cells were significant higher than those of SDP ($P < 0.05$). **Conclusion** Expired SDP could be used to prepared PRP with a high concentration of growth factors, and had a significant role in promoting endothelial cell migration and angiogenic ability in vitro.

Key words: expired single donor platelets; platelet-rich plasma; endothelial cell; angiogenesis

* 基金项目: 海南省自然科学基金项目(817138); 海南省科协青年科技英才创新计划项目(QCXM201701)。

作者简介: 吴春喜, 男, 技师, 主要从事临床检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: smileagain@163.com。

富血小板血浆(PRP)参与创伤组织修复的调控,目前已被广泛引入创伤治疗^[1]。PRP是通过离心的方法从血液中提取的血小板浓缩物,含有多种高浓度且与体内正常比例相符的生长因子,各种生长因子间能发挥最佳的协同作用,可以有效促进伤口修复^[2]。近年来,国内外大量的动物模型研究和临床研究分析均显示,PRP所含的高浓度生长因子对各类组织缺损与创伤的修复具有积极促进作用,可明显缩短愈合时间,提高愈合质量,能有效促进创口愈合^[3-7]。目前,PRP主要通过手工法离心自体血液提取,其含有大量白细胞,并且提取量有限,有报道证实低白细胞富血小板血浆(LP-PRP)有更好的临床疗效^[8]。单采血小板(SDP)是指用血细胞分离机从1名健康献血者血循环中1次采集1个治疗剂量的血小板,该献血者的其他血液成分即刻回输。SDP的血小板纯度高($\geq 2.5 \times 10^{11}$ 个/袋)^[9],白细胞污染率低($\leq 5 \times 10^6$ 个/袋)^[10]。因此,SDP来源制备的PRP可能更适合于临床自体或异体伤口修复应用。血小板在室温下的保存寿命仅5d左右,血小板保质期短、输注需求量大与输注时间不确定性三者之间的矛盾往往导致血小板供不应求或浪费。过期报废血小板在未染菌的情况下,血小板功能发生变化,但仍含有大量生长因子,可以在临床组织修复应用中发挥更大作用。笔者在前期研究的基础上,将过期SDP制备成PRP,并在体外研究其对入脐静脉内皮细胞(HUVECs)迁移和成血管能力的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源 2016年8—10月由武汉市血液中心提供1个单位规格新鲜血液及SDP(效期为3~5d)各3袋,1个单位的过期SDP(有效期为8~10d)3袋,均在22℃的血小板振荡保存箱中保存,经过全自动血细胞培养仪检测均无污染菌。过期SDP用于制作PRP。HUVECs由南昌大学医学院提供。

1.2 仪器与试剂 血小板恒温振荡箱(PH-A,普华医疗器械有限公司);全自动血细胞培养仪[B-9120, BD医疗器械(上海)有限公司];血细胞分析仪(ADVIA2120,上海西门子医疗器械有限公司);显微镜(CX22, Olympus株式会社);CO₂培养箱[HERA cell,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];内皮细胞培养基(M200,德国Cascade Biologics生物制剂公司);Matrigel基质胶(BD Biosciences公司);瑞氏染色液试剂盒(瑞氏染色液,珠海贝索生物技术有限公司);血小板衍生生长因子-AB(PDGF-AB)ELISA试剂盒(BYS10100B,上海博研生物科技有限公司);血管内皮生长因子(VEGF)ELISA试剂盒(BY10115B,上海博研生物科技有限公司);转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)ELISA试剂盒(BYS10090B,上海博研生物科技有限

公司);多功能酶标仪(M580, HEALES公司);低温离心机[Biofuge,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];凝血酶冻干粉(一格制药有限公司)。

1.3 样品处理

1.3.1 PRP样品制备 试验过程在无菌条件下操作,将过期SDP分装至50 mL离心管中,采用传统两步离心法1500 r/min离心10 min,离心后分3层,上清层、中间层及红细胞层。吸取上清层、中间层及红细胞层下层1~2 mm,移入另一离心管,轻轻摇匀,再次3200 r/min离心8 min,弃上层液体,取剩余1.5 mL液体,轻轻混匀后,得到PRP。

1.3.2 生长因子提取 将凝血酶冻干粉放置室温复温10 min,每瓶加入含500 μ L 10%CaCl₂溶液,摇匀至液体清亮后,每50 mL制备的PRP加入凝血酶溶液200 μ L,待液体凝聚成胶冻状,5000 r/min离心10 min,吸取上层血清转移到EP管中,-80℃冰箱保存待ELISA检测。与PRP同等体积的SDP或全血加入200 μ L凝血酶溶液,按以上步骤提取上清液。

1.4 血小板计数 使用血细胞自动分析仪进行血小板计数,同时制作血涂片,完全晾干后,使用瑞氏染色液染色,在显微镜下观察并拍摄照片。

1.5 血小板生长因子水平测定 用ELISA检测不同样品中PDGF-AB、VEGF和TGF- β_1 水平。操作过程严格按照试剂盒说明书进行,结果使用M580酶标仪判读。

1.6 HUVECs迁移能力测定 用马克笔在6孔板背后用直尺均匀划直线,将HUVECs细胞消化传代至6孔板,待细胞均匀长满板底,将枪头垂直和孔背后横线呈90°划痕,用PBS洗细胞3次,洗去划下的细胞,再分别加入无血清培养基、SDP上清液和PRP上清液。分别在0、12 h拍照观察。试验重复3次。

1.7 对HUVECs成血管能力测定 将Matrigel基质胶放于4℃融化,24 h后使用冷藏的枪头加Matrigel基质胶50 μ L铺满96孔板板底,再放置于培养箱中30 min使胶凝固,每孔加入HUVECs细胞 2×10^4 个,再分别加入50 μ L无血清培养基、SDP上清液、PRP上清液,放入CO₂培养箱6 h后拍照观察。试验重复3次。

1.8 统计学处理 采用Excel2013软件建立数据表,采用SPSS22.0软件分析试验数据。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两组比较采用SNK-*q*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同样品血小板计数 全血样品血小板计数为 $(202 \pm 32) \times 10^9/L$,过期SDP来源的PRP血小板计数为 $(1\ 723 \pm 352) \times 10^9/L$,SDP中血小板计数为 $(398 \pm$

52) × 10⁹/L。过期 SDP 来源的 PRP 血小板计数与 SDP 中血小板计数相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。



注: A 为全血; B 为 SDP; C 为 PRP

图 1 血小板计数比较(瑞氏染色血细胞, ×400)

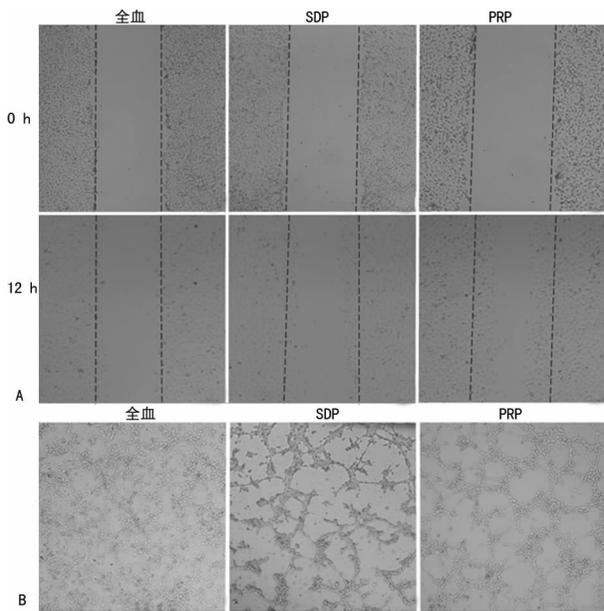
2.2 不同样品生长因子水平比较 过期 SDP 来源的 PRP 中所含有的血小板生长因子水平更高, 与 SDP 及全血比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同样品生长因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

样品	PDGF-AB(ng/mL)	VEGF(pg/mL)	TGF-β ₁ (ng/mL)
全血	3.24 ± 1.26	87.82 ± 11.59	12.23 ± 3.48
SDP	7.16 ± 2.49	136.91 ± 25.97	18.90 ± 4.59
PRP	43.23 ± 15.13*#	327.61 ± 72.55*#	77.13 ± 17.27*#

注: 与 SDP 比较, * $P < 0.05$; 与全血比较, # $P < 0.05$

2.3 不同样品在体外对内皮细胞功能的影响



注: A 为细胞划痕试验, 0 h 及 12 h 时显微镜下观察, ×400; B 为成血管试验, 6 h 时显微镜下观察, ×400

图 2 不同样品对 HUVECs 迁移和成血管能力的影响

2.3.1 对 HUVECs 迁移的影响 对 HUVECs 的细胞划痕试验显示, SDP 与过期 SDP 来源的 PRP 在培养 12 h 后, 都表现出可促进 HUVECs 的迁移能力, 见图 2A。使用 ImageJ 软件对迁移面积进行计算, 发现与 SDP(愈合率为 21.8%) 中 HUVECs 比较, 过期 SDP

来源的 PRP 中的 HUVECs(愈合率为 55.3%) 迁移能力更强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3.2 对 HUVECs 成血管能力的影响 无血清培养基中无管腔形成, 而 SDP 和过期 SDP 来源的 PRP 中的 HUVECs 形成血管样管腔更多, 其中后者形成的管腔最多, 见图 2B。

3 讨论

PRP 中含有高度浓缩的血小板, 是自体生长因子的来源, 对软组织缺损、不愈伤口及骨组织具有修复作用, 其应用已成为组织修复研究领域的热点。制备 PRP 的方法很多, 不同的离心速度、时间和次数制备的 PRP 血小板浓度和活性也不相同。目前, 研究中制备 PRP 主要采用 Okuda 离心法和 Landesberg 法, 均为二步法, 整个离心过程需要 20~30 min^[11-12]。本研究中采用血液中心制备的 SDP, 通过二步离心法, 简单、快捷地得到富集数量为正常血液中血小板数量 8 倍的 PRP, 能够在更大程度上减少对血小板的破坏。

SDP 保质期较短(3~5 d), 而临床经常因不确定因素导致 SDP 大量浪费, 目前在美国这一浪费率接近 50%, 每年要浪费十多亿美元, 在我国血小板浪费率也接近这个比例。国外对过期报废的血小板的重复利用主要通过反复冻融将其制成可输注性血小板膜微粒产品, 安全性较好, 但操作烦琐, 且得到的生长因子浓度低。本试验将过期 SDP 浓缩成 PRP, 使用凝血酶溶液激活血小板, 充分释放出生长因子, 根据 ELISA 检测结果, PRP 中的生长因子 PDGF-AB、VEGF、TGF-β₁ 水平均得到 4 倍以上浓缩, 表明过期 SDP 中所含生长因子仍具有生物活性。

血管新生是组织修复的关键步骤^[13]。新生血管的形成能够维持肉芽组织的生成, 促进角质细胞的存活和刺激成骨细胞生长等, 而内皮细胞作为血管重要组成部分, 在发挥其功能中起关键作用。生长因子如 PDGF-AB、VEGF 和 TGF-β₁、胰岛素样生长因子、表皮生长因子等, 能与血管内皮细胞表面受体结合, 促

进内皮细胞增殖,诱导新生血管形成,为组织供氧提供营养物质,运输代谢废物,为局部组织再生和代谢提供有利的微环境^[14-15]。本研究中由过期 SDP 制备的 PRP 具有高浓度的生长因子,并且明显促进了 HUVECs 的迁移,增强了 HUVECs 的成血管能力,这些数据有力地证明了过期 SDP 来源 PRP 仍具有大量生物活性因子,对血管新生有促进作用,但其在体内功能还需要进一步验证。当然,本研究也有不足之处,由于血液制品宝贵,样品来源均为正常医疗过程中所收集,故样本量较少,为了弥补样本量缺陷,本研究中的试验均重复了 3 次或以上,试验结果具有很高的可重复性,给出试验结论严谨。

血液是一种宝贵的资源,为了保证临床用血安全,SDP 过期则应报废,本研究结果将为过期 SDP 再次利用提供理论依据,为组织修复提供一种新的治疗策略,从而节约宝贵的血液资源。

参考文献

- [1] FERNANDEZ-MOURE J S, VAN EPS J L, CABRERA F J, et al. Platelet-rich plasma: a biomimetic approach to enhancement of surgical wound healing[J]. *J Surg Res*, 2017, 207: 33-44.
- [2] WU P I, DIAZ R J. Platelet-Rich Plasma[J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2016, 27(4): 825-853.
- [3] WU Y, DONG Y, CHEN S, et al. Effect of platelet-rich plasma and bioactive glass powder for the improvement of rotator cuff tendon-to-bone healing in a rabbit model[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 21980-21991.
- [4] MESSORA M R, NAGATA M J, FUCINI S E, et al. Effect of platelet-rich plasma on the healing of mandibular defects treated with fresh frozen bone allograft: a radiographic study in dogs[J]. *J Oral Implantol*, 2014, 40(5): 533-541.
- [5] LAMPLLOT J D, ANGELINE M, ANGELES J, et al. Distinct effects of platelet-rich plasma and BMP13 on rotator cuff tendon injury healing in a rat model[J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(12): 2877-2887.
- [6] SALEM N, HELMI NASSAF N. Renoprotective effect of

platelet-rich plasma on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 9658230.

- [7] KELC R M. Concerns about fibrosis development after scaffolded PRP therapy of muscle injuries: commentary on an article by Sanchez et al. : "Muscle repair: platelet-rich plasma derivatives as a bridge from spontaneity to intervention"[J]. *Injury*, 2015, 46(2): 428.
- [8] DUIF C, VOGEL T, TOPCUOGLU F, et al. Does intraoperative application of leukocyte-poor platelet-rich plasma during arthroscopy for knee degeneration affect postoperative pain, function and quality of life? A 12-month randomized controlled double-blind trial [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2015, 135(7): 971-977.
- [9] 邱艳. 全血成分血质量要求与血液标准化[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 215-218.
- [10] 中华人民共和国卫生部, 中国标准化委员会. 全血成分血质量要求: GB 18469-2012[S]. 北京: 中国标准化委员会, 2012.
- [11] OKUDA K, KAWASE T, MOMOSE M, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro[J]. *J Periodontol*, 2003, 74(6): 849-857.
- [12] LANDESBURG R, ROY MGLICKMAN R S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 58(3): 297-300.
- [13] KIRSTEN A, BIELEFELDSAEID A N, ALMAN E, et al. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(12): 2059-2081.
- [14] 仇建军, 张长青, 袁霆, 等. 富血小板血浆及所含相关因子在组织修复再生中的应用与作用[J]. *中国组织工程研究*, 2009, 13(41): 8131-8134.
- [15] EELEN G, DE ZEEUW P, TREPS L, et al. Endothelial cell metabolism[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 3-58.

(收稿日期: 2019-01-15 修回日期: 2019-04-16)

(上接第 1964 页)

- meta-analysis[J]. *JAMA Intern Med*, 2015, 175(1): 76-87.
- [9] KIERAN D, STEPHEN B. Role of the pharmacist in reducing healthcare cost: current insights [J]. *Integrat Pharm Res Pract*, 2017, 2017(6): 37-46.
- [10] OLIVEIRA D R, BRUMMEL A R, MILLER D B, et al. Medication therapy management: 10 years of experience in a large integrated health care system[J]. *J Manag Care Pharm*, 2010, 16(13): 185-195.
- [11] NANETTE K, WENGER C, JERRY H, et al. Optimiza-

tion of drug prescription and medication management in older adults with cardiovascular disease[J]. *Drugs Aging*, 2017, 34(11): 803-810.

- [12] SOLA B N, ALVAREZ DA, CODINA J C. The role of the pharmacist in the design, development and implementation of medication prescription support systems [J]. *Farm Hosp*, 2016, 40(6): 457-476.
- [13] 李海萍, 董杰, 尹玉磊. “品管圈”在药剂科药品安全管理中的应用[J]. *现代医院*, 2017, 17(10): 1420-1422.

(收稿日期: 2019-01-20 修回日期: 2019-04-12)