

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.08.014

[http://www.crter.org]

王鹏飞, 时长江, 王玉亮, 姜文学. 兔富血小板血浆制备及其活性分析[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(8):1411-1417.

## 兔富血小板血浆制备及其活性分析\*★

王鹏飞, 时长江, 王玉亮, 姜文学

天津医科大学一中心临床学院, 天津市 300070

### 文章亮点:

- 1 实验采用3种不同的离心方法制备提取富血小板血浆, 并对其相关参数及活性进行比较。
- 2 富血小板血浆可提供多种自体促生长因子, 促进骨髓间充质干细胞、软骨细胞增殖分化。
- 3 实验中发现: ① Petrunaro 法首次较大离心力造成红细胞、血小板的沉降, 因此在白膜层下的红细胞中夹杂着大量的血小板, 使得首次离心后上层血浆中只含有很少的血小板。Landesberg 法、Aghaloo 法首次离心力小, 可使沉降速率大的红细胞首先沉降于管底, 而对血小板的影响相对较小, 故大部分血小板仍位于上清血浆中。Landesberg 法第2次离心力不变, 此离心力不能使上层血浆中全部的血小板沉降于管底, 所以血小板回收率低于 Aghaloo 法。
- 4 富血小板血浆活化后还会释放其他多种生长因子, 包括碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子、内皮细胞生长因子等其它活性因子, 本实验因资金的问题仅对血小板源性生长因子, 转化生长因子进行了测定, 故不能全面了解富血小板血浆活化后其他因子含量的变化。

### 关键词:

生物材料; 生物材料基础实验; 富血小板血浆; 血浆; 血小板; 血小板源性生长因子; 转化生长因子; 血小板活化; 软骨组织; 活化; 组织工程; 组织再生; 其他基金; 生物材料图片文章

### 摘要

**背景:** 富血小板血浆是目前已知富含多种生长因子并能将其释放的自体提取物, 并已应用于骨、软骨组织工程再生的研究。

**目的:** 通过比较不同方法制备兔富血小板血浆中血小板浓度, 并测定其血小板源性生长因子、转化生长因子  $\beta 1$  水平, 探讨富血小板血浆制备方法及影响因素。

**方法:** 采用 Petrunaro 法、Landesberg 法、Aghaloo 法制备新西兰大耳白兔富血小板血浆。检测3组富血小板血浆中血小板计数, 以及3组富血小板血浆活化前后及正常血浆、贫血小板血浆中血小板源性生长因子、转化生长因子  $\beta 1$  水平。

**结果与结论:** 3种方法制备的富血小板血浆中血小板计数、血小板回收率、血小板富集系数差异有非常显著性意义( $P < 0.001$ ), Landesberg 法和 Aghaloo 法均可制备有效浓度的富血小板血浆, 且 Aghaloo 法制备血小板浓度及活性高于 Landesberg 法( $P < 0.05$ )。活化前3组富血小板血浆中血小板源性生长因子、转化生长因子  $\beta 1$  水平与正常血浆组、贫血小板血浆组比较差异无显著性意义。活化后, Landesberg 法和 Aghaloo 法制备的血小板血浆中血小板源性生长因子、转化生长因子  $\beta 1$  水平明显高于活化前( $P < 0.001$ ), 且 Aghaloo 法最高( $P < 0.05$ )。富血小板血浆中血小板计数与血小板源性生长因子水平( $r=0.872$ ,  $P < 0.001$ ), 转化生长因子  $\beta 1$  水平( $r=0.917$ ,  $P < 0.001$ )呈正相关。

王鹏飞★, 男, 1986年生, 河北省成安县人, 汉族, 天津医科大学在读硕士, 主要从事股骨头坏死及软骨再生研究。  
feition2417@163.com

通讯作者: 姜文学, 主任医师, 硕士生导师, 天津市第一中心医院骨科, 天津市 300070  
jiangwenxue@medmail.com.cn

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)08-01411-07

收稿日期: 2012-06-08

修回日期: 2012-07-23

(20120510003/GW·W)

## Preparation and activity of rabbit platelet-rich plasma

Wang Peng-fei, Shi Chang-jiang, Wang Yu-liang, Jiang Wen-xue

First Center Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Wang Peng-fei★, Studying for master's degree, First Center Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
feition2417@163.com

Corresponding author: Jiang Wen-xue, Chief physician, Master's supervisor, First Center Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
jiangwenxue@medmail.com.cn

Supported by: the Scientific Foundation of Tianjin Health Bureau, No. KG109\*

Received: 2012-06-08  
Accepted: 2012-07-23

## Abstract

**BACKGROUND:** Platelet-rich plasma is an autogeneic extract containing and releasing a variety of growth factors, which has been used in the research of bone and cartilage tissue engineering and regeneration.

**OBJECTIVE:** To investigate the preparation methods of platelet-rich plasma and its influencing factors by comparing the platelet concentration in the platelet-rich plasma prepared by different methods in rabbits and detecting the levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta 1$ .

**METHODS:** Platelet-rich plasma was prepared by the methods of Petrunaro, Landesberg and Aghaloo. Platelet amount was counted in the platelet-rich plasma prepared using three methods as well as platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta 1$  levels.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There were significant differences in the platelet count, platelet recovery rate and platelet enrichment coefficient in the platelet-rich plasma prepared by these three methods ( $P < 0.001$ ). The effective concentration of platelet-rich plasma could be prepared by the methods of Landesberg and Aghaloo, and the platelet concentration and activity prepared by Aghaloo method was higher than that prepared by Landesberg method with a statistical difference ( $P < 0.05$ ). The levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta 1$  in the inactivated platelet-rich plasma were not statistically different from those in the normal plasma and platelet-poor plasma. The levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta 1$  in the activated platelet-rich plasma prepared by Landesberg and Aghaloo methods were significantly higher than before activation ( $P < 0.001$ ), especially in the activated platelet-rich plasma prepared by Aghaloo method ( $P < 0.05$ ). The platelet count in the platelet-rich plasma was positively correlated with the levels of platelet-derived growth factor ( $r=0.872$ ,  $P < 0.001$ ) and transforming growth factor  $\beta 1$  ( $r=0.917$ ,  $P < 0.001$ ).

**Key Words:** biomaterials; basic experiments of biomaterials; platelet-rich plasma; plasma; platelet; platelet-derived growth factor; transforming growth factor; platelet activation; cartilage; activation; tissue engineering; tissue regeneration; other grants-supported paper; biomaterial photographs-containing paper

Wang PF, Shi CJ, Wang YL, Jiang WX. Preparation and activity of rabbit platelet-rich plasma. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(8): 1411-1417.

## 0 引言

软骨组织损伤后修复一直是困扰临床大夫的难题。尽管对于软骨修复的研究在不断深化, 但还没有一个成熟的方案能再造出高质量的透明软骨。当前组织工程是软骨修复的主要研究方向。富血小板血浆是自体血液的提取物, 采用离心的方式将全血中的血小板回收, 并在活化剂的作用下激活血小板, 引发聚合反应、 $\alpha$ -颗粒脱颗粒, 最终释放多种促生长因子, 包括血小板源性生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子及内皮细胞生长因子<sup>[1]</sup>。富血小板血浆因其制备简单、易获取、无免疫原性及疾病传播的风险等优点在软骨再生研究中受到越来越多的重视。目前报道的富血小板血浆制备方法种类繁多, 所制得的富血小板血浆中血小板浓度差别较大, 研究结果不一。实验将采用3种不同离心方式, 通过计算血小板的回收率、富集系数, 测定活化后富血小板血浆中血小板源性生长因子、转化生长因子 $\beta 1$ 浓度, 评价不同方法所得富血小板血浆的活性。

## 1 材料和方法

**设计:** 方法学实验。

**时间及地点:** 于2012年2月至5月在天津医科大学一中心临床学院, 卫生部危重病急救医学重点实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 6只雌性新西兰大耳白兔, 由天津医科大学实验动物中心提供, 体质量2.0-2.5 kg。

## 富血小板血浆实验应用的试剂及仪器:

## Main experimental reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
CaCl <sub>2</sub>	sigma, 美国
血小板源性生长因子、转化生长因子β1 酶联免疫分析试剂盒	R&D, 美国
凝血酶冻干粉	国奥, 长春
低速常温离心机	湘仪, 湖南
倒置显微镜	奥林巴斯, 日本
酶标仪	BioTek, 美国

## 实验方法:

**富血小板血浆的制备:** 25%乌拉坦溶液4 mL/kg耳缘静脉缓注, 待动物麻醉确切后固定于手术台。使用20 mL 无菌注射器, 抽取2 mL 10%枸橼酸钠并润管, 心脏抽取血液至20 mL。将血液分别放入3个15 mL离心管, 每管6 mL。其余2 mL室温静置2 h后吸取上层血浆待用。抽得全血分别采用Petrungaro法、Landesberg法、Aghaloo法制备富血小板血浆<sup>[2]</sup>。具体制备过程为: Petrungaro法, 第1次离心1 500×g 6 min, 取离心后白膜层以上血浆置于另一离心管, 进行第2次离心, 条件为1 000×g 6 min, 收集上清即贫血小板血浆, 移至另一离心管中, 剩余0.8 mL吹打均匀即富血小板血浆。其余两种富血小板血浆获取方法同Petrungaro法, 只是Landesberg法两次离心条件均为200×g 10 min; Aghaloo法第1次离心215×g 10 min, 第2次离心863×g 10 min。

## 富血小板血浆制备实验分组:

## Experimental grouping:

实验分组	方法
Petrungaro 法	第1次离心1 500×g 6 min, 取离心后白膜层以上血浆置于另一离心管, 进行第2次离心, 条件为1 000×g 6 min, 收集上清即贫血小板血浆, 移至另一离心管中, 剩余0.8 mL吹打均匀即富血小板血浆
Landesberg 法	第1次离心200×g 10 min, 取离心后白膜层以上血浆置于另一离心管, 进行第2次离心, 条件为200×g 10 min, 收集上清即贫血小板血浆, 移至另一离心管中, 剩余0.8 mL吹打均匀即富血小板血浆
Aghaloo 法	第1次离心215×g 10 min, 取离心后白膜层以上血浆置于另一离心管, 进行第2次离心, 条件为863×g 10 min, 收集上清即贫血小板血浆, 移至另一离心管中, 剩余0.8 mL吹打均匀即富血小板血浆

**血小板计数采用草酸胺法:** 取清洁1.5 mL EP管, 移入0.38 mL制备的草酸胺溶液, 分别取20 μL样本置于EP管中, 吸取上清洗涤3次, 充分混匀, 待完全溶解后再次混匀1 min。取上述均匀血小板悬液20 μL, 冲入细胞

计数板, 湿盒中静置10-15 min, 使血小板沉降到同一水平后, 倒置显微镜下进行血小板计数。

## 血小板回收率及富集系数计算:

$$\text{血小板回收率} = \frac{\text{富血小板血浆中血小板总数}}{\text{全血中血小板总数}} \times 100\%$$

$$\text{富集系数} = \frac{\text{富血小板血浆中血小板浓度}}{\text{全血中血小板浓度}}$$

采用双抗体夹心酶联免疫分析法(ELISA)测定血小板源性生长因子、转化生长因子β1水平: 富血小板血浆活化前留取0.3 mL待用。体积比1:9的激活剂(500 U凝血酶冻干粉溶于1 mL 10%氯化钙中)激活富血小板血浆, 室温静置24 h后, 4 000 r/min 15 min提取萃取液。所有样品梯度降温后-80 °C保存备用。

对正常血浆、贫血小板血浆、未活化富血小板血浆及活化后富血小板血浆萃取液行血小板源性生长因子、转化生长因子β1水平检测。

测定前将样本从-80 °C冰箱移入4 °C后室温平衡2 h。将收集的各组样本按照ELISA说明书进行检测。

**主要观察指标:** ①3种方法制备的富血小板血浆中血小板计数。②3组富血小板血浆活化前后及正常血浆、贫血小板血浆中血小板源性生长因子、转化生长因子β1水平。

**统计学分析:** 采用SPSS 17.0软件对所得数据进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间血小板计数、血小板回收率、血小板富集系数、血小板源性生长因子、转化生长因子β1水平比较使用单因素方差分析(ANOVA)分析, 并对有统计学意义的指标进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为显著界值。

## 2 结果

2.1 采用Petrungaro法、Landesberg法、Aghaloo法制备富血小板血浆中血小板计数的比较 正常全血血小板计数为 $(375.33 \pm 37.03) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。3种制备方法所得富血小板血浆中血小板计数、血小板回收率及血小板富集系数差异有非常显著性意义( $P < 0.001$ )。Aghaloo法制备的富血小板血浆中血小板计数、血小板回收率、血小板富集系数与其他两种方法比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 结果见表1。

2.2 采用Petrungaro法、Landesberg法、Aghaloo法制备富血小板血浆中血小板源性生长因子、转化生长因子β1水平的比较 见表2, 3。

表 1 采用 Petrungraro 法、Landesberg 法、Aghaloo 法制备富血小板血浆中血小板计数、回收率、富集系数的比较

Table 1 The platelet count, platelet recovery rate and platelet enrichment coefficient in the platelet-rich plasma prepared by the methods of Petrungraro, Landesberg and Aghaloo ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	血小板计数 ( $\times 10^9/L$ )	血小板回收率(%)	血小板富集系数
Petrungraro 法	96.33±46.01	3.71±1.90	0.27±0.14
Landesberg 法	1 205.16±160.26	42.98±6.11	3.21±0.45
Aghaloo 法	1 958.33±316.41	70.57±15.87	5.28±1.18
<i>F</i>	123.45	69.36	69.47
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: Aghaloo 法制备的富血小板血浆中血小板计数、血小板回收率、血小板富集系数高于 Petrungraro 法、Landesberg 法( $P < 0.05$ ), 且 Petrungraro 法制备的富血小板血浆中血小板计数、血小板回收率、血小板富集系数高于 Landesberg 法( $P < 0.05$ )。

表 2 采用 Petrungraro 法、Landesberg 法、Aghaloo 法制备的富血小板血浆活化前与正常血浆、贫血小板血浆中血小板源性生长因子、转化因子  $\beta 1$  水平的比较

Table 2 The levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta 1$  in the inactivated platelet-rich plasma prepared by the methods of Petrungraro, Landesberg and Aghaloo compared with those in the normal and platelet-poor plasma ( $\bar{x}\pm s, \mu g/L$ )

组别	血小板源性生长因子	转化因子 $\beta 1$
Petrungraro 法制备的未活化富血小板血浆	9.50±0.58	48.42±9.31
Landesberg 制备的未活化富血小板血浆	9.49±0.78	47.09±3.50
Aghaloo 法制备的未活化富血小板血浆	9.56±0.65	51.75±6.22
正常血浆	10.04±0.15	51.63±4.08
贫血小板血浆	10.28±1.18	47.14±5.44
<i>F</i>	1.175	0.823
<i>P</i>	0.352	0.523

注: 在未活化情况下, 3 种方法所制备的富血小板血浆与正常血浆组、贫血小板血浆组比较, 血小板源性生长因子、转化因子  $\beta 1$  水平差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表2结果表明, 在未活化情况下3种方法所制备的富血小板血浆未活化情况下与正常血浆组、贫血小板血浆组比较, 血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 水平差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

由表3结果可见, 3种方法所制备的富血小板血浆活化后与未活化样本中血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 水平差异有非常显著性意义( $P < 0.001$ ); Aghaloo法

制备的富血小板血浆活化后血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 水平最高, 与其他两种方法比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。其中Petrungraro法制备的富血小板血浆活化前后血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 水平差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 3 采用 Petrungraro 法、Landesberg 法、Aghaloo 法制备的富血小板血浆活化前后血小板源性生长因子、转化因子  $\beta 1$  水平的比较

Table 3 The levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta 1$  in the activated or inactivated platelet-rich plasma prepared by the methods of Petrungraro, Landesberg and Aghaloo ( $\bar{x}\pm s, \mu g/L$ )

组别	血小板源性生长因子	转化因子 $\beta 1$
Petrungraro 法制备的活化富血小板血浆	9.33±0.97	64.10±5.64
Landesberg 法制备的活化富血小板血浆	12.06±1.45	125.04±10.46
Aghaloo 法制备的活化富血小板血浆	15.50±1.18	165.16±23.97
未活化富血小板血浆	9.52±0.62	49.09±6.67
<i>F</i>	56.912	173.072
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

注: 在活化条件下, 3 种方法所制备的富血小板血浆中血小板源性生长因子、转化因子  $\beta 1$  水平高于未活化富血小板血浆( $P < 0.001$ ); Aghaloo 法制备的富血小板血浆中血小板源性生长因子、转化因子  $\beta 1$  水平高于其他两种方法( $P < 0.05$ )。Petrungraro 法制备的富血小板血浆活化前后两种因子水平差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

2.3 相关分析结果 相关分析结果表明, 富血小板血浆中血小板计数与血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 水平呈明显正相关( $r$ 分别为0.872和0.917,  $P$ 均<0.001)。

### 3 讨论

目前对于体外培养骨髓间充质干细胞、软骨细胞用于骨与软骨缺损的研究中, 体外细胞培养常规使用胎牛血清, 但其具有引起动物源性病毒感染及异种蛋白变态反应的可能性<sup>[3]</sup>, 对于其培养的细胞和组织应用于临床还存在很大争议。富血小板血浆源于自体血液提取部分, 因其能提供多种生长因子, 且各因子比例适合, 可与胎牛血清担当同样的角色。

富血小板血浆通常采用离心的方式获取, 不同离心力、离心时间所制备的富血小板血浆中血小板浓度存在明显统计学差异。Petrungraro 法、Landesberg 法、

Aghaloo法分别代表3种不同的富血小板血浆制备方式。Petrungaro法为首次高速离心,而后中低速离心。Landesberg法两次均为低速离心。Aghaloo法则为首次低速离心而后高速离心。本实验证实Landesberg法、Aghaloo法所制备的富血小板血浆符合目前公认的富血小板血浆中血小板浓度 $>1\ 000\times 10^9\ L^{-1}$ [4]。而Petrungaro法所制备的富血小板血浆显然没有符合这一要求,反而低于正常全血中的血小板浓度。图1-4显示了正常血浆及3种方法制备的富血小板血浆中血小板含量(来自于同一只实验动物)。

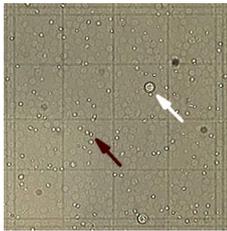


图1 兔正常全血中血小板量,棕色箭头所示为血小板,白色箭头所示为白细胞( $\times 200$ )

Figure 1 The number of normal whole blood platelets, brown arrow indicates platelets, and white arrow indicates leukocyte ( $\times 200$ )



图2 Petrungaro法制备的富血小板血浆中血小板量( $\times 200$ )

Figure 2 Platelet count in the platelet-rich plasma prepared by the method of Petrungaro ( $\times 200$ )

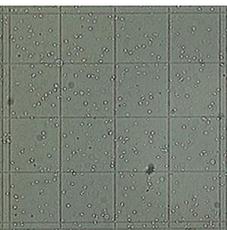


图3 Landesberg法制备的富血小板血浆中血小板量( $\times 200$ )

Figure 3 Platelet count in the platelet-rich plasma prepared by the method of Landesberg ( $\times 200$ )

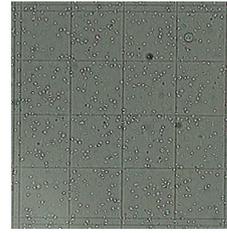


图4 Aghaloo法制备的富血小板血浆中血小板量( $\times 200$ )

Figure 4 Platelet count in the platelet-rich plasma prepared by the method of Aghaloo ( $\times 200$ )

分析其原因是由于Petrungaro法首次较大离心力可同时造成红细胞、血小板的沉降,因此在白膜层下的红细胞中夹杂着大量的血小板。正是这样使得首次离心后上层血浆中只含有很少的血小板。在实验过程中对Petrungaro法首次离心后对白膜层及白膜层下部3 mm体积的红细胞层进行了收集,血小板计数发现血小板浓度为 $(1\ 370.16\pm 204.76)\times 10^9\ L^{-1}$ ,见图5,这一结果也证实先前的猜想。

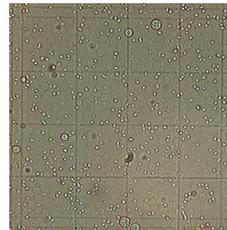


图5 Petrungaro法制备富血小板血浆取白膜层下3 mm体积中血小板含量

Figure 5 Platelet count 3 mm below the white coat of the platelet-rich plasma prepared by the method of Petrungaro

由于Landesberg法、Aghaloo法首次离心力小,使沉降速率大的红细胞首先沉降于管底,而对血小板的影响相对较小,故大部分血小板仍位于上清血浆中,Landesberg法第2次离心力仍为 $200\times g$ ,此离心力不能使上层血浆中全部的血小板沉降于管底,所以血小板回收率低于Aghaloo法。而Aghaloo法第2次离心使保留在上层血浆中了大部分的血小板降于管底,因此使其回收率最高。

实验选用血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 进行测定从而评价富血小板血浆活性。研究证实富血小板血浆释放的血小板源性生长因子、转化因子 $\beta 1$ 是促进骨髓间充质干细胞增殖和诱导其分化的重要因子[3],Mishra等[5]研究证明转化因子 $\beta 1$ 具有诱导骨髓间充质

干细胞向软骨细胞方向分化的作用, 刺激蛋白聚糖和II型胶原的表达、促进细胞增殖, 并且抑制向脂肪细胞方向分化。Ng等<sup>[6]</sup>发现人骨髓间充质干细胞增殖及向软骨方向分化过程中血小板源性生长因子、转化生因子 $\beta 1$ 信号通路发挥着重要的作用。抑制血小板源性生长因子信号通路后骨髓间充质干细胞仅能分化成少量的功能不全的成骨细胞, 抑制转化生因子 $\beta 1$ 信号通路后细胞完全不能向软骨细胞方向分化。Brandl等<sup>[7]</sup>单独使用血小板源性生长因子、转化生因子 $\beta 1$ 培养的人软骨细胞与对照组相比有明显的促有丝分裂作用, 且证明血小板源性生长因子、转化生因子 $\beta 1$ 不影响细胞染色体端粒的生物学特征, 对细胞没有促无限增殖作用, 为血小板源性生长因子、转化生因子 $\beta 1$ 细胞培养的细胞应用临床于提供了安全性依据。

Sun等<sup>[8]</sup>制备的兔富血小板血浆血小板浓度与本实验中Landesberg法制备的富血小板血浆浓度相近, 其测定富血小板血浆中转化生因子 $\beta 1$ 水平与实验结果相似。实验对正常血浆、贫血小板血浆、未活化富血小板血浆也进行了转化生因子 $\beta 1$ 水平测定, 比较发现没有显著统计学差异, 提示 $<1\ 500\times g$ 的离心力不会使血浆中转化生因子 $\beta 1$ 多肽分子发生聚集沉降, 也不会引起血小板活化。实验结果同时显示了Petrunaro法制备的富血小板血浆活化后与未活化富血小板血浆相比转化生因子 $\beta 1$ 水平无差异, 可能是由于Petrunaro法制备的富血小板血浆中血小板数量少的原因。需要指出的是富血小板血浆在使用激活剂活化后, 物理特性发生明显改变, 可迅速凝集成富血小板凝胶, 见图6, 因此在富血小板血浆活化后不太可能使用注射器进行局部或关节内注射。



图6 Aghaloo法制备的富血小板血浆活化后迅速形成的富血小板凝胶

Figure 6 Platelet-rich gel formed rapidly after activation of the platelet-rich plasma prepared by the method of Aghaloo

预实验过程中对活化后1 h的富血小板凝胶离心后行ELISA测定发现, 血小板源性生长因子、转化生因子

$\beta 1$ 水平与正常血浆比较无明显差异, 且所得萃取液的量很少。而在室温静置24 h后测定血小板源性生长因子、转化生因子 $\beta 1$ 水平有明显增高, 离心后萃取液的量也较之前多, 见图7, 提示活化后血小板对活性因子的释放需要一定时间。



图7 静置24 h高速离心后富血小板凝胶萃取液及收缩的富血小板凝胶

Figure 7 Platelet-rich gel extraction and contracted platelet-rich gel after standing for 24 h and centrifuging at a high speed

Duan等<sup>[9]</sup>应用富血小板血浆及洗涤后的富血小板血浆对大鼠骨髓间充质干细胞进行体外培养, 比较发现富血小板血浆及洗涤后的富血小板血浆在早期对细胞增殖作用无统计学差异, 培养后期洗涤后富血小板血浆促增殖作用明显, 且两种培养方式对细胞分化方向也产生不同影响。说明血液中的白细胞和其他细胞成分对血小板活化后因子的释放过程有影响。因此本实验与常见制备富血小板血浆方法相比丢弃了白膜层及其附近红细胞层中的血小板<sup>[2,10-11]</sup>, 减少富血小板血浆中白细胞及其他细胞因素对血小板活性的影响。富血小板血浆可由不同的离心力造成血小板数量的不同, 因此一味的增加富血小板血浆中血小板数量, 可使其中生长因子浓度富集。Weibrich等<sup>[12]</sup>报道人的有效富血小板血浆血小板浓度应介于 $(503-1\ 729)\times 10^9\ L^{-1}$ 之间, 浓度 $>1\ 800\times 10^9\ L^{-1}$ 将对组织再生产生抑制作用, 因此适合浓度富血小板血浆才促进种子细胞的增殖和分化。

实验证实Landesberg法和Aghaloo法均可制备有效浓度的富血小板血浆, Aghaloo法制备血小板浓度及活性高于Landesberg法, 且存在统计学差异。活性因子含量与血小板数量呈正相关性。细胞增殖、分化是一个多因子调控的复杂过程, 富血小板血浆中除血小板源性生长因子、转化生因子 $\beta 1$ 外还含有大量其他种类生长因子, 因此富血小板血浆是否具有稳定的作用, 还需要长期实验研究和临床疗效观察。但因富血小板血浆的天然优势, 在组织工程领域将有广阔的应用前景。

**致谢:**对于本文提供帮助的天津市第一中心医院卫生部危重病重点实验室各位老师表示感谢,感谢天津医科大学总医院王景华教授在统计学分析方法方面给予的指导意见。

**基金资助:**天津市卫生局科技基金重点攻关课题(KG109)。

**作者贡献:**实验设计、实施为第一作者,实验评估、审校为通讯作者,第一作者对文章负责。

**利益冲突:**课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:**实验过程中对动物处置方法符合中华人民共和国科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**作者声明:**文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Lacci KM,Dardik A.Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.*2010;83(1):1-9.
- [2] Yuan T,Zhang CQ.*Zhongguo Linchuang Kangfu.*2004; 8(15):7939-7941.  
袁霆,张长青.骨组织及软组织修复作用中富血小板血浆的制作及其原理[J].*中国临床康复*,2004,8(15):7939-7941.
- [3] Drengk A,Zapf A,Stürmer EK,et al.Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.*2009;189(5):317-326.
- [4] Marx RE.Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.*2004;62(4):489-496.
- [5] Mishra A,Tummala P,King A,et al.Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15(3):431-435.
- [6] Ng F,Boucher S,Koh S,et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.*2008;112(2):295-307.
- [7] Brandl A,Angele P,Roll C,et al.Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-β1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. *J Orthopaed Res.* 2010;28(3)354-360.
- [8] Sun Y,Feng Y,Zhang CQ,et al.The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop.* 2010;34(4):589-597.
- [9] Duan J,Kuang W,Tan J,et al.Differential effects of platelet rich plasma and washed platelets on the proliferation of mouse MSC cells. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(4):2485-2490.
- [10] Wang Y,Zhu Z,Liu XM,et al.Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi. 2011;27(5):643-648.  
王悦,朱喆,刘昕鸣,等.富血小板血浆提取方法的探讨[J].*实用口腔医学杂志*,2011,27(5):643-648.
- [11] Kanthan SR,Kavitha G,Addi S,et al.Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury.*2011;42(8):782-789.
- [12] Weibrich G,Hansen T,Kleis W,et al.Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on periimplant bone regeneration. *Bone.*2004;34(4):665-671.