

## 两种离心程序制备的富血小板纤维蛋白结构分析

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3189>毕庆伟<sup>1</sup>, 刘承璞<sup>1</sup>, 李岩<sup>1</sup>, 赵雯雯<sup>1</sup>, 韩梅<sup>2</sup>

2095-4344.3189

投稿日期: 2020-07-23

送审日期: 2020-07-25

采用日期: 2020-09-15

在线日期: 2020-11-19

中图分类号:

R459.9; R318.08; R782.4

文章编号:

2095-4344(2021)22-03534-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读:

对比两种离心程序制备的富血小板纤维蛋白的结构差异

离心程序 1: 1 500 r/min 离心 14 min

离心程序 2: 3 000 r/min 离心 10 min

选择符合  
纳入标准  
的受试者采集静脉血 离心  
富血小板纤维蛋白离心制造机白细胞富血小板纤维蛋白  
改良富血小板纤维蛋白(1) 苏木精-伊红染色;  
(2) 免疫组化染色;  
(3) 扫描电镜;  
(4) 透射电镜。

## 文题释义:

**改良的富血小板纤维蛋白:** 富血小板纤维蛋白首先由法国CHOUKROUN教授等在2000年提出, 其含有血液的主要成分, 含有约97%的血小板和大于50%的白细胞, 并集中在由纤维蛋白组成的一个特定的三维分布中。2014年GHANAATI等进行程序改良制造出新的富血小板纤维蛋白, 在结构上有别于传统富血小板纤维蛋白。

**富血小板纤维蛋白离心制造机:** 专门用于离心富血小板纤维蛋白的机器, 离心力和离心速度的不同导致制备富血小板纤维蛋白的结构也不相同, 专业的离心机是经过研究开发而出, 研究结果可信度高。

## 摘要

**背景:** 富血小板纤维蛋白因其特性已在临床中广泛应用, 但不同离心程序制造出的纤维蛋白结构及成分会有不同, 进而影响临床效果。

**目的:** 比较两种特定离心程序制备的富血小板纤维蛋白的组织特点。

**方法:** 采集40例自愿捐献者的静脉血, 随机分2组, 每组20例, 一组通过低速离心(1 500 r/min离心14 min)程序获得改良富血小板纤维蛋白, 另一组通过中速离心(3 000 r/min离心10 min)程序获得传统白细胞富血小板纤维蛋白。通过苏木精-伊红染色、免疫组化技术、扫描电镜及透射电镜观察两组纤维蛋白中的白细胞、纤维蛋白基质分布情况及差异。

**结果与结论:** ①苏木精-伊红染色: 两组纤维蛋白均含有较多白细胞, 多集中在中间层并偏向于红细胞端层, 凝胶层大部分为纤维蛋白基质, 其中改良富血小板纤维蛋白中的白细胞在凝胶层有一些散在均匀分布; ②免疫组化: 两组纤维蛋白在中间层区域含有大量白细胞, 包括单核细胞和中性粒细胞, 改良富血小板纤维蛋白中的中性粒细胞比例大于白细胞富血小板纤维蛋白( $P < 0.05$ ), 两组单核细胞比例比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); ③扫描电镜: 两组纤维蛋白的白细胞分布广泛, 其中改良富血小板纤维蛋白中纤维蛋白基质空间内白细胞和血小板数量稍多, 纤维蛋白基质排列略紧密; ④透射电镜: 两组纤维蛋白中间层聚集较多的中性粒细胞、单核细胞, 血小板密集并含量较多, 纤维蛋白基质排列致密, 其中改良富血小板纤维蛋白中的纤维蛋白基质排列略密集, 白细胞含量及血小板稍多; ⑤结果表明: 因含有的白细胞数量差别, 改良富血小板纤维蛋白可能比白细胞富血小板纤维蛋白在促进组织愈合中发挥更积极的作用。

**关键词:** 材料; 富血小板纤维蛋白; 改良; 离心; 组织工程; 炎症; 中性粒细胞; 单核细胞; 血小板

**缩略语:** 白细胞富血小板纤维蛋白: leukocyte-platelet-rich fibrin, L-PRF; 改良富血小板纤维蛋白: advanced-platelet-rich fibrin, A-PRF

## Structure analysis of platelet-rich fibrin derived from two centrifugation procedures

Bi Qingwei<sup>1</sup>, Liu Chengpu<sup>1</sup>, Li Yan<sup>1</sup>, Zhao Wenwen<sup>1</sup>, Han Mei<sup>2</sup><sup>1</sup>Heilongjiang Stomatological Disease Center, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; <sup>2</sup>Heilongjiang Nursing College, Harbin 150002, Heilongjiang Province, China

Bi Qingwei, Master, Associate chief physician, Heilongjiang Stomatological Disease Center, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Corresponding author:** Li Yan, Chief Physician, Heilongjiang Stomatological Disease Center, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China<sup>1</sup>黑龙江省口腔病防治院, 黑龙江省哈尔滨市 150001; <sup>2</sup>黑龙江省护理高等专科学校, 黑龙江省哈尔滨市 150002**第一作者:** 毕庆伟, 男, 1982年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔种植的临床及基础研究。**通讯作者:** 李岩, 主任医师, 黑龙江省口腔病防治院, 黑龙江省哈尔滨市 150001<https://orcid.org/0000-0001-5501-650X> (毕庆伟)**基金资助:** 黑龙江省卫健委科研课题 (2017552), 项目负责人: 毕庆伟; 黑龙江省卫健委科研课题 (2018033), 项目负责人: 赵雯雯

引用本文: 毕庆伟, 刘承璞, 李岩, 赵雯雯, 韩梅. 两种离心程序制备的富血小板纤维蛋白结构分析 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(22):3534-3539.



## Abstract

**BACKGROUND:** Platelet-rich fibrin has been widely used in clinic because of its characteristics, but the structure and composition of fibrin produced by different centrifugation procedures will be different, which will affect the clinical effect.

**OBJECTIVE:** To compare the histological characteristics of platelet-rich fibrin prepared by the different centrifugation procedures.

**METHODS:** Venous blood samples from 40 voluntary patients were divided into two groups ( $n=20$ ). In group A, modified platelet-rich fibrin was obtained by low-speed centrifugation (1 500 r/min centrifugation for 14 minutes). In group B, traditional platelet-rich fibrin was obtained by medium-speed centrifugation (3 000 r/min for 10 minutes). Hematoxylin-eosin staining, immunohistochemistry, scanning electron microscopy, and transmission electron microscope were used to analyze the difference of leukocytes and fibrin matrix in two groups of platelet-rich fibrin.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Hematoxylin-eosin staining: Both groups contained more leukocytes, mostly concentrated in the middle layer and biased towards the end layer of erythrocytes. Gel layer was mainly composed of fibrin matrix, and the leukocytes were coagulated in the advanced platelet-rich fibrin. The glue layer was scattered and evenly distributed. (2) Immunohistochemistry: The two groups contained a large number of leukocytes in the middle layer, including monocytes and neutrophils. The proportion of neutrophils in the modified platelet-rich fibrin was greater than that of the leukocyte-rich platelet fibers ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the ratio of monocytes between the two groups ( $P > 0.05$ ). (3) Scanning electron microscopy: The leukocytes of the two groups were distributed slightly widely. The numbers of leukocytes and platelet in the advanced platelet-rich fibrin were slightly higher than those in leukocyte- and platelet-rich fibrin. The fiber matrix cords were slightly tightly arranged in the modified platelet-rich fibrin. (4) Transmission electron microscopy: The two groups of intermediate layers gathered a large number of platelets and many neutrophils and monocytes. The protein matrix was densely arranged, among which the fiber matrix in the modified platelet-rich fibrin was slightly denser than that in leukocyte- and platelet-rich fibrin. (5) The results showed that the modified platelet-rich fibrin may be better than leukocyte- and platelet-rich fibrin due to the difference in the number of leukocytes. The advanced platelet-rich fibrin may play a more active role in promoting tissue healing.

**Key words:** materials; platelet-rich fibrin; improvement; centrifugation; tissue engineering; inflammation; neutrophils; monocytes; platelets

**Funding:** Scientific research project of Heilongjiang Health Commission, No. 2017552 (to BQW); the Scientific Research Project of Heilongjiang Health Commission, No. 2018033 (to ZWW)

**How to cite this article:** BI QW, LIU CP, LI Y, ZHAO WW, HAN M. Structure analysis of platelet-rich fibrin derived from two centrifugation procedures. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(22):3534-3539.

## 0 引言 Introduction

富血小板纤维蛋白是在富血小板血浆研究基础上衍生出来的自体生物材料。第一代浓缩富血小板血浆在医学各种领域获得应用共识并被广泛使用,但在制备中因含有抗凝剂,从而会阻止伤口正常愈合及带来潜在风险<sup>[1-3]</sup>,为临床使用带来不便。因此,衍生的富血小板纤维蛋白在制备过程中不使用抗凝剂,由于其白细胞含量较高,也被命名为白细胞富血小板纤维蛋白(leukocyte-platelet-rich fibrin, L-PRF)。富血小板纤维蛋白具有三维纤维蛋白基质结构,可以在引导性骨再生和引导性组织再生程序中发挥功能<sup>[4-6]</sup>。富血小板纤维蛋白能够集合自体血液中的白细胞、血小板和纤维蛋白基质分子,借助纤维蛋白立体结构可以缓慢释放生长因子等<sup>[7]</sup>,被认为是参与组织愈合过程中安全、有效的生物材料。富血小板纤维蛋白经常在口腔颌面外科手术中用作外科辅助剂,以改善愈合并促进组织再生<sup>[8-9]</sup>。由于富血小板纤维蛋白具有调节血管反应的潜在能力<sup>[10]</sup>,并可通过促进早期血管形成和组织生长来加速伤口愈合<sup>[11]</sup>,因此在口腔医学领域得到了广泛的应用,包括牙周再生<sup>[12-13]</sup>、牙根覆盖<sup>[11]</sup>、牙槽嵴保存和上颌窦提升等<sup>[14-15]</sup>。

但是,在白细胞成分及生长因子种类等研究方面富血小板纤维蛋白仍有很多未知的研究区域。国内外有些研究表明,不同的离心方式会对富血小板纤维蛋白的生物学特性产生影响,低速度离心方式可获得较大的细胞含量<sup>[7, 16]</sup>。实验采用中速、低速两种离心方式进行收集,对制备完成的富血小板纤维蛋白标本进行组织学及电镜观察分析,评价两种离心程序下制备完成的富血小板纤维蛋白的结构及生物学特性,遴选优化的富血小板纤维蛋白制备方法,为临床应用富血小板纤维蛋白提供数据支持。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 组织学对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年3月至2017年8月在黑龙江省口腔防治院和哈尔滨医科大学、哈尔滨工业大学完成。

1.3 材料

1.3.1 血液样本 采集40例就诊患者静脉血,其中男23例,女性17例;年龄20-62岁,平均(45.8±12.2)岁。按照随机对照原则将40例患者分为2组,每组20例,一组通过低速离心程序制备改良富血小板纤维蛋白(advanced-platelet-rich fibrin, A-PRF),另一组通过中速离心程序制备L-PRF。实验经黑龙江省口腔防治院伦理委员会审查批准,所有研究对象均知晓研究目的并签署知情同意书。

**纳入标准:**血常规指标正常且3个月内未曾服用过影响白细胞和血小板的相关药物,无全身系统性疾病等的患者。

**排除标准:**离心后未形成完整富血小板纤维蛋白凝胶胶块,无法进行压膜成形者。

1.3.2 实验用器材与主要试剂 富血小板纤维蛋白离心制造机(PROCESS PC-02型, Nice, 法国);扫描电子显微镜(S-3400N型, 日立, 日本);透射电子显微镜(H-7650, 日立, 日本);病理切片机(RM2235, 德国徕卡);倒置显微镜(NIKON CI-S, 日本尼康);鼠抗人CD15单克隆抗体(货号BA0221, 博士德生物工程有限公司);鼠抗人CD68单克隆抗体(货号BA3639, 博士德生物工程有限公司);DAB显色剂、PBS(北京中科万邦生物科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 富血小板纤维蛋白的提取 每例患者分别采集2管外周静脉血共20 mL,按照随机分组原则立即放入预先设定好程序的离心机中离心,离心后凝胶块去掉红色血块部分后仔细从试管中取出(不破坏红色血块与纤维蛋白接触部分),压膜工具箱制成片状标本,随后分别被固定在体积分数4%甲醛溶液中(苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色备用)和2.5%戊二醛溶液中(扫描电子显微镜、透射电子显微镜备用)24 h,再分别进行包埋。富血小板纤维蛋白离心制造机

离心程序参照文献 [17-18], A-PRF 组离心程序: 1 500 r/min 离心 14 min; L-PRF 组离心程序: 3 000 r/min 离心 10 min。

1.4.2 苏木精-伊红及免疫组化染色 将 A-PRF 和 L-PRF 标本按照固定、脱水透明、石蜡包埋、切片等步骤制作成 5  $\mu\text{m}$  组织切片, 进行常规苏木精-伊红染色。组织切片经过二甲苯、梯度乙醇脱水、PBS 冲洗、一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜、二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  30 min、DAB 显色、苏木精复染、脱水、透明、封固等步骤进行免疫组化染色 (检测 CD15 抗体和 CD68 抗体), 光学显微镜观察、采集图像。

1.4.3 扫描电镜观察 将 A-PRF 和 L-PRF 标本分别固定于 2.5% 戊二醛溶液中 24 h (4  $^{\circ}\text{C}$ ); 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.2) 漂洗组织 3 次, 每次 10 min; 1% 饿酸固定 2 h; 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.2) 将固定的标本漂洗 3 次, 每次 10 min; 乙醇梯度脱水, 乙酸异戊酯置换 20 min;  $\text{CO}_2$  临界点干燥 40 min, 喷镀金属膜, 扫描电镜下观察并采集图像。

1.4.4 透射电镜观察 将 A-PRF 和 L-PRF 标本分别加入 2.5% 戊二醛溶液 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; 0.1 mol/L 的 PBS (pH=7.2) 漂洗, 用 1% 饿酸固定 1 h, 蒸馏水 4  $^{\circ}\text{C}$  漂洗 10 min; 乙醇梯度脱水, 环氧丙烷梯度脱水, 重复 2 次, 40  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 1 : 1 环氧丙烷和 EPON 包埋液的混合液浸透标本 2 h 后加入包埋液浸透, 标本挑入胶囊中放入烤箱 (600  $^{\circ}\text{C}$ , 24 h); 超薄切片机切片, 厚度 500 nm; 醋酸铀染液染 10 min, 铅染液染 8 min, 透射电镜下观察并采集图像。

1.5 主要观察指标 A-PRF 和 L-PRF 中白细胞成分及分布、血小板活性、纤维蛋白基质类型。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异应用  $t$  检验进行比较, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 两种纤维蛋白的大体形态 离心后, 离心管上部分凝胶为富血小板纤维蛋白。将 A-PRF 和 L-PRF 凝胶分为 3 部分, 包括: 黄色部分为纤维蛋白凝胶, 占据富血小板纤维蛋白大部分空间 (凝胶层); 血凝块集中区为红细胞接触部分, 即红细胞沉积层 (红细胞端层); 中间部分为凝胶层与红细胞沉积层两者之间的部分 (中间层), 见图 1; 制作完成的 2 种富血小板纤维蛋白凝胶颜色、形态接近。

2.2 两种纤维蛋白苏木精-伊红染色结果 光学显微镜下可以观察到, A-PRF 和 L-PRF 均含有较多白细胞, 多集中在中间层并偏向于红细胞端层, 凝胶层大部分为纤维蛋白基质; A-PRF 中的白细胞在凝胶层有一些散在均匀分布, L-PRF 中的白细胞在凝胶层散在分布较少 (图 2)。

2.3 两种纤维蛋白免疫组化染色结果 免疫组化染色结果显示, 两种纤维蛋白在中间层区域含有大量白细胞, 包括单核细胞 (CD68 阳性细胞) 和中性粒细胞 (CD15 阳性细胞), 其中 A-PRF 含有的中性粒细胞分布更广泛、数量更多; L-PRF 在中间层含有中性粒细胞数量较多, 在凝胶层较少; 二者含有的

单核细胞数量无明显差别, 分布主要集中在中间层, 见图 3。

显微镜下随机选择中间层近凝胶层 3 个视野, 按照百分比分配原则, 取 3 次计数平均数计入结果, A-PRF 组、L-PRF 组中性粒细胞 (CD15 阳性细胞) 占的比例分别为 (55.30 $\pm$ 12.15)% 和 (34.30 $\pm$ 11.55)%, 两组比较差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); A-PRF 组、L-PRF 组单核细胞 (CD68 阳性细胞) 占的比例分别为 (29.20 $\pm$ 8.15)% 和 (26.50 $\pm$ 8.72)%, 两组比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

2.4 两种纤维蛋白扫描电镜观察结果 扫描电镜下观察可见, 两种纤维蛋白中间层均含有大量成簇白细胞, 白细胞集中区域表面纤维蛋白较少, 白细胞数量向凝胶层方向开始减少, 纤维蛋白基质呈网格状立体交错排列, 并包裹白细胞和血小板; 其中 A-PRF 纤维蛋白基质交错略显紧密, 纤维略细, 凝胶层中白细胞数量多于 L-PRF, 呈散在排列, 并且血小板活化程度高于 L-PRF, 见图 4。

2.5 两种纤维蛋白透射电镜观察结果 透射电镜下可见, 两种纤维蛋白中均可观察到单核细胞、中性粒细胞, A-PRF 交界处细胞及种类含量比 L-PRF 多, 并且 A-PRF 凝胶层中的纤维蛋白基质略显紧密; 两组中间层白细胞种类较多, 中性粒细胞和单核细胞在不同位置聚集, 见图 5。

2.6 生物相容性 实验制备的两种纤维蛋白来自于人体, 具有良好的生物相容性。

## 3 讨论 Discussion

富血小板纤维蛋白首先由法国 CHOUKROUN 教授等<sup>[19]</sup>研制出, 富血小板纤维蛋白是一种自体纤维蛋白基质, 含有的血小板和白细胞等成分集中在由纤维蛋白组成的一个的三维结构中。富血小板纤维蛋白是经静脉全血离心浓缩而产生的, 在提取过程中没有人为添加外源性生物药剂, 因此最终制备品避免了潜在传染病风险等缺点, 在临床中富血小板纤维蛋白的应用非常广泛<sup>[20]</sup>。与富血小板血浆相比, A-PRF 含有更高水平的血小板和血小板衍生生长因子, 在细胞增殖实验中 A-PRF 显著刺激了骨膜细胞的增殖<sup>[21]</sup>。富血小板纤维蛋白被激活后释放出多种因子, 包括转化生长因子  $\beta$ 、血小板衍生生长因子、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和血管内生长因子等, 释放出的部分因子在骨再生过程中发挥潜在的重要作用, 如抗感染、促进愈合、抑制疼痛等作用<sup>[22-24]</sup>。基于这种情况, 深入研究发现富血小板纤维蛋白可以体外诱导人骨髓间充质干细胞的增殖和分化<sup>[25]</sup>。王灿莉等<sup>[16]</sup>研究结果提示, A-PRF 促进成纤维细胞的增殖活性优于传统富血小板纤维蛋白。富血小板纤维蛋白与间充质干细胞混合物还对下颌骨重建发挥成骨作用<sup>[26]</sup>, 同时富血小板纤维蛋白和替考拉宁、丁胺卡那霉素或聚盐酸己双胍溶液联合可以起到抑菌作用<sup>[27]</sup>。研究发现, 富血小板纤维蛋白可预防口服双膦酸盐患者的颌骨骨坏死风险<sup>[28]</sup>。另有研究提示, 骨形态发生蛋白 2 联合富血小板纤维蛋白在治疗药物相关性颌骨骨坏死方面会起到很好的治疗作用, 部分患者病变能够完全消退<sup>[29]</sup>。近

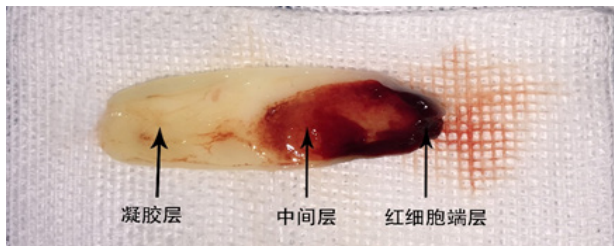
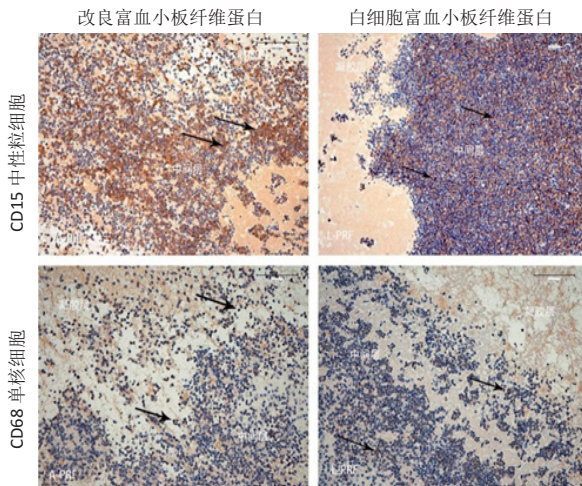


图1 | 富血小板纤维蛋白大体形态及分层

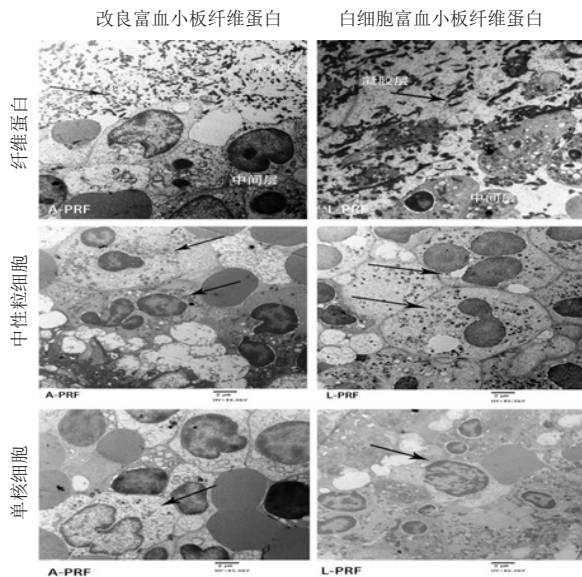
Figure 1 | Morphology and stratification of platelet rich fibrin



图注：两种纤维蛋白在中间层区域含有大量白细胞，包括单核细胞 (CD68 阳性细胞) 和中性粒细胞 (CD15 阳性细胞)，其中改良富血小板纤维蛋白含有的中性粒细胞分布更广泛、数量更多；白细胞富血小板纤维蛋白在中间层含有中性粒细胞数量较多，在凝胶层较少。箭头示阳性染色细胞

图3 | 两种纤维蛋白的组织学形态 (SP 免疫组织化学染色, ×20)

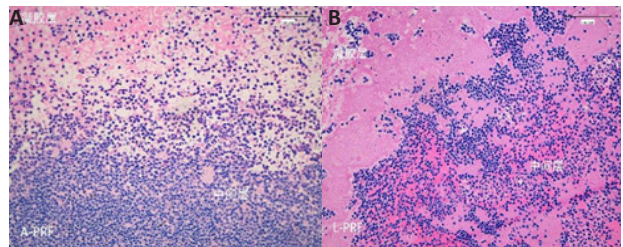
Figure 3 | Histological morphology of two kinds of fibrin (SP immunohistochemical staining, ×20)



图注：两种纤维蛋白中均可观察到单核细胞、中性粒细胞，改良富血小板纤维蛋白交界处细胞及种类含量比白细胞富血小板纤维蛋白多，并且改良富血小板纤维蛋白凝胶层中的纤维蛋白基质略显紧密；两组中间层白细胞种类较多，中性粒细胞和单核细胞在不同位置聚集。箭头分别代表纤维蛋白基质、中性粒细胞、单核细胞

图5 | 两种纤维蛋白的微观结构 (透射电镜, 比例尺=2 μm)

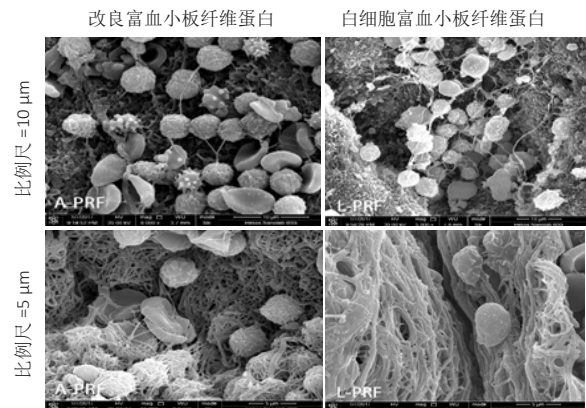
Figure 5 | Microstructure of two kinds of fibrin (transmission electron microscope, scale bars=2 μm)



图注：A 为改良富血小板纤维蛋白，B 为白细胞富血小板纤维蛋白。两种纤维蛋白均含有较多白细胞，多集中在中间层并偏向于红细胞端层，凝胶层大部分为纤维蛋白基质；改良富血小板纤维蛋白中的白细胞在凝胶层有一些散在均匀分布，白细胞富血小板纤维蛋白中的白细胞在凝胶层散在分布较少

图2 | 两种纤维蛋白中白细胞分布 (苏木精-伊红染色, ×20)

Figure 2 | Distribution of leukocytes in two kinds of platelet-rich fibrin (hematoxylin-eosin staining, ×20)



图注：两种纤维蛋白中间层均含有大量成簇白细胞，纤维蛋白基质呈网格状立体交错排列，并包裹白细胞和血小板；其中改良富血小板纤维蛋白纤维蛋白基质交错略显紧密，纤维略细，凝胶层中白细胞数量多于白细胞富血小板纤维蛋白，呈散在排列

图4 | 两种纤维蛋白的微观结构 (扫描电镜)

Figure 4 | Microstructure of two kinds of fibrin (scanning electron microscope)

些年的临床研究发现，口腔黏膜的病变 (例如白斑和扁平苔藓) 切除后局部使用富血小板纤维蛋白膜也能够促进伤口愈合<sup>[30]</sup>，富血小板纤维蛋白还可以重建退缩的牙龈，同时能够降低术后不适<sup>[31]</sup>。这些研究结果均提示，富血小板纤维蛋白具有促进成骨和抑菌的潜在能力，以及在伤口愈合中具有积极作用。在口腔颌面外科学<sup>[32-33]</sup>、运动医学、骨科学和皮肤科学研究中对富血小板纤维蛋白都提出了有意义的结果<sup>[34-36]</sup>。虽然富血小板纤维蛋白的应用范围越来越广，但对富血小板纤维蛋白生物学结构的统一表述较少，而制备富血小板纤维蛋白的离心程序正是对其生物学结构产生影响的关键。离心程序中的离心速度及离心力、离心时间会影响富血小板纤维蛋白生物学结构，导致最终的富血小板纤维蛋白组织学特征也不尽相同<sup>[37]</sup>，目前制备富血小板纤维蛋白常用的离心程序包括：3 000 r/min 离心 10 min<sup>[18]</sup>、2 500 r/min 离心 10 min<sup>[38]</sup>、2 700 r/min 离心 12 min 和 1 500 r/min 离心 14 min 等<sup>[17]</sup>。研究发现，离心力大、离心时间长，在制备过程中可能会有大量的血小板成分遭到破坏和白细胞成分的丢失等，离心方式显著影响富血小板纤维蛋白内部细胞、生长因子和纤维蛋白

结构<sup>[39]</sup>。进一步的研究提出,低速离心程序制备的富血小板纤维蛋白有利于生长因子释放,通过增加成纤维细胞迁移、增殖和改变胶原 mRNA 水平而影响组织再生<sup>[40]</sup>。随着离心力的降低,富血小板纤维蛋白内部纤维蛋白支架间的白细胞数量增加,因此较低离心速度的使用导致白细胞和细胞因子被更多保留下来,并使它们在纤维蛋白凝块中更好地分布<sup>[41]</sup>。故实验选择以较低离心速度为研究重点的方法进行富血小板纤维蛋白凝胶的制备,比较较低离心转速条件与中等离心转速条件下制备的富血小板纤维蛋白在组织学上的差别,探讨制备富血小板纤维蛋白较为合适的离心程序,为临床选择富血小板纤维蛋白提供数据支持。

此次实验结果显示,使用不同的离心程序制备的富血小板纤维蛋白大体标本外观相似,均可分为3部分(红细胞端层、中间层、凝胶层)。苏木精-伊红染色结果显示,两组标本均含有大量的白细胞,白细胞集中于近红细胞端的中间层,凝胶层主要为纤维蛋白,红细胞端层主要为红细胞;A-PRF组中白细胞在中间层集中并向凝胶层有散在均匀分布,L-PRF组中这种向凝胶层散在分布情况较少见,其白细胞主要集中在中间层,这种观察结果表明A-PRF组中白细胞占据范围略广,提示其发挥抗炎等作用范围相对更广泛。免疫组织化学染色结果显示,两组标本含有较多中性粒细胞和单核细胞,以及大量的纤维蛋白基质,A-PRF组比L-PRF组的中性粒细胞含量丰富,分析其结果也具有统计学意义,单核细胞之间无明显差异,这种结果提示在抗炎症和抗感染等方面A-PRF比L-PRF可能会发挥更大的作用。扫描电镜观察结果显示,A-PRF和L-PRF均具有高密度的纤维蛋白网状立体结构,研究结果也与DOHAN EHRENFEST等<sup>[42]</sup>报道相似,这是否因为离心力不同所导致尚不得而知,但是富血小板纤维蛋白这种致密结构对缓慢释放内部成分方面应该会有积极作用。实验还发现A-PRF纤维蛋白基质条索略细,网状结构相对要比L-PRF略紧密,与DOHAN EHRENFEST等<sup>[42]</sup>研究发现略有差别,观察这种结构紧密差别之间并不明显,分析可能在压膜成型时间存在误差导致或者可能相互之间在致密度方面略存在差别,对此结果尚待进一步观察。两组在中间层部分区域含有的白细胞较多,因此该区域纤维基质网状结构略少,细胞释放量也就相对较多,发挥抗炎等作用会更明显。扫描电镜观察两组中均存在血小板现象,血小板的活化可以在生长因子的释放方面也发挥重要的积极作用,并在局部促进凝血的作用也会更突出。因此,作者考虑这种纤维蛋白立体结构及血小板活化可能在缓慢释放白细胞和生长因子方面也会起到很好的作用。DOHAN EHRENFEST等<sup>[43]</sup>研究发现,L-PRF膜可以连续地释放大量生长因子,并在膜里产生较多的白细胞群,这也与此次实验的观点比较相近。实验透射电镜观察结果显示,纤维蛋白中间层和凝胶层交界处纤维蛋白基质状态同扫描电镜描述接近,在不同的观察视野内也发现了不同的细胞,包括中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等,进一步验证了以上的研究内容。

综上所述,富血小板纤维蛋白的内部结构和成分会受到离心程序的影响,因此富血小板纤维蛋白中的成分和其缓慢释放特性对组织愈合也会产生不同的影响。此次实验发现,因含有的白细胞数量和血小板活化程度存在差别,A-PRF比L-PRF会发挥更多的积极作用,但是由于实验非同一个体自身的对比,而且存在样本量有限、样本染色差异及在样本制备过程中存在样本大小和凝胶液渗出量的差别等不足,研究结果还需要进一步研究验证。对于后续的研究尚需在血小板活化状态及透射电镜观察不同深度中细胞的种类方面进行更深入的探索,因此A-PRF在临床中的应用机制还有待于进一步观察。

**致谢:**感谢哈尔滨工业大学材料学院和哈尔滨医科大学生理学院、哈尔滨医科大学第一附属医院病理科的支持。

**作者贡献:**所有作者参与了实验设计、实验操作、数据整理分析、文章发表。

**经费支持:**该文章接受了“黑龙江省卫健委科研课题(2017552, 2018033)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:**文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:**文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:**文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:**该文统计学方法已经黑龙江省口腔医院生物统计学专家审核。

**文章版权:**文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**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”式条款,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。

## 4 参考文献 References

- [1] ANFOSSI G, TROVATI M, MULARONI E, et al. Influence of propranolol on platelet aggregation and thromboxane B2 production from platelet-rich plasma and whole blood. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1989;36:1-7.
- [2] FIJNHEER R, PIETERSZ RN, DE KORTE D, et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: A comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion*. 1990;30:634-638.
- [3] MARX RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:489-496.
- [4] TOFFLER M. Guided bone regeneration (GBR) using cortical bone pins in combination with leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Compend Contin Educ Dent*. 2014;35:192-198.
- [5] LEKOVIC V, MILINKOVIC I, ALEKSIC Z, et al. Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects. *Periodontol Res*. 2012;47:409-417.
- [6] SHIVASHANKAR VY, JOHNS DA, VIDYANATH S, et al. Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. *Conserv Dent*. 2013;16:261-264.
- [7] KOBAYASHI E, FLÜCKIGER L, FUJIOKA-KOBAYASHI M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest*. 2016;20(9):2353-2360.

- [8] DOHAN EHRENFEST DM, ANDIA I, ZUMSTEIN MA, et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3-9.
- [9] SIMONPIERI A, DEL CORSO M, SAMMARTINO G, et al. The relevance of Choukrounan platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part I: A new grafting protocol. *Implant Dent.* 2009;18:102-111.
- [10] MARTINEZ CE, SMITH PC, PALMA ALVARADO VA. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Front Physiol.* 2015;6:290.
- [11] EREN G, KANTARCI A, SCULEAN A, et al. Vascularization after treatment of gingival recession defects with platelet-rich fibrin or connective tissue graft. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2045-2053.
- [12] CASTRO AB, MESCHI N, TEMMERMAN A, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *Clin Periodontol.* 2017;44:67-82.
- [13] PANDA S, DORAISWAMY J, MALAIAPPAN S, et al. Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. *J Investig Clin Dent.* 2016;7:13-26.
- [14] SUTTAPREYASRI S, LEEPONG N. Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation. *Craniofac Surg.* 2013;24:1088e94.
- [15] JEONG SM, LEE CU, SON JS, et al. Simultaneous sinus lift and implantation using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *Craniofac Surg.* 2014;42:990e4.
- [16] 王灿莉, 焦志立, 孙勇, 等. 两种富血小板纤维蛋白对人牙龈成纤维细胞增殖活性影响的比较 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(7): 1007-1012.
- [17] GHANAATI S, BOOMS P, ORLOWSKA A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implant.* 2014;40(6):679-689.
- [18] DOHAN DM, CHOUKROUN J, DISS A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e51-e55.
- [19] CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFFLER C, et al. Une opportunit e it implantaologie: le PRF. *Implantodontie.* 2000;42: 55-62.
- [20] 裴延平, 林松杉. 富血小板纤维蛋白的临床应用 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2012, 28(7):441-443.
- [21] MASUKI H, OKUDERA T, WATANEBE T, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent.* 2016;2:19.
- [22] 李艳秋, 周延民, 孙晓琳, 等. 富血小板纤维蛋白体外释放 TGF- $\beta$  和 PDGF-AB 影响因素的探讨 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2012, 26(6): 404-407.
- [23] DOHAN EHRENFEST DM, DISS A, ODIN G, et al. In vitro effects of Choukroun PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(3):341-352.
- [24] DAVID M, JOSEPH C, ANTOINE D, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e37-44.
- [25] DOHAN EHRENFEST DM, DOGLIOLI GM, DEL CM, 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. *Arch Oral Biol.* 2010;55(3):185.
- [26] LIAO HT, CHEN CT, CHEN CH, et al. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. *J Trauma.* 2011;70(1):228.
- [27] KNAFL D, THALHAMMER F, VOSSEN MG. In-vitro release pharmacokinetics of amikacin, teicoplanin and polyhexanide in a platelet rich fibrin-layer (PRF)-a laboratory evaluation of a modern, autologous wound treatment. *PLoS One.* 2017;12(7):e0181090.
- [28] ASAKA T, OHGA N, YAMAZAKI Y, et al. Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. *Clin Oral Investig.* 2016;11:1-8.
- [29] PARK JH, KIM JW, KIM SJ. Does the Addition of Bone Morphogenetic Protein 2 to Platelet-Rich Fibrin Improve Healing After Treatment for Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw? *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(6):1176-1184.
- [30] PATHAK H, MOHANTY S, URS AB. Treatment of Oral Mucosal Lesions by Scalpel Excision and Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting: A Review of 26 Sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015;73(9):1865-1874.
- [31]  NC  E. The Use of Platelet-Rich Fibrin Versus Subepithelial Connective Tissue Graft in Treatment of Multiple Gingival Recessions: A Randomized Clinical Trial. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017; 37(2):265-271.
- [32] DEL CORSO M, VERVELLE A, SIMONPIERI A, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1207-1230.
- [33] SIMONPIERI A, DEL CORSO M, VERVELLE A, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1231-1256.
- [34] ZUMSTEIN MA, BERGER S, SCHOBER M, et al. Leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) for long-term delivery of growth factor in rotator cuff repair: review, preliminary results and future directions. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1196-1206.
- [35] ZUMSTEIN MA, BIELECKI T, DOHAN EHRENFEST DM. The Future of Platelet Concentrates in Sports Medicine: Platelet-Rich Plasma, Platelet-Rich Fibrin, and the Impact of Scaffolds and Cells on the Long-term Delivery of Growth Factors. *Oper Tech Sports Med.* 2011;19(3): 190-197.
- [36] MAJID E, MOHAMAD RM, AMIR HN, et al. Platelet-Rich Fibrin: An Autologous Fibrin Matrix in Surgical Procedures: A Case Report and Review of Literature. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2012;24(69): 197-202.
- [37] DOHAN DM, CHOUKROUN J, DISS A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e45-50.
- [38] CHOUKROUN J, DISS A, SIMONPIERI A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):299-303.
- [39] DOHAN EHRENFEST DM, PINTO NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2017;24:1-14.
- [40] FUJIOKA-KOBAYASHI M, MIRON RJ, HERNANDEZ M, et al. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol.* 2017; 88(1):112-121.
- [41] MARCHETTI E, MANCINI L, BERNARDI S, et al. Evaluation of Different Autologous Platelet Concentrate Biomaterials: Morphological and Biological Comparisons and Considerations. *Materials.* 2020;13(10): 2282.
- [42] DOHAN EHRENFEST DM, DEL CORSO M, DISS A, et al. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 2010;81(4): 546-555.
- [43] DOHAN EHRENFEST DM, DE PEPPA GM, DOGLIOLI P, et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors.* 2009;27(1):63-69.

(责任编辑: GW, ZN, TXY)