

不同激活剂对富血小板血浆生长因子的影响

刘建香¹, 冯星星², 王淑霞¹, 周蓉¹, 吕孟兴¹, 屈柯喧^{1,3}<https://doi.org/10.12307/2025.266>

投稿日期: 2024-01-04

采用日期: 2024-02-29

修回日期: 2024-04-13

在线日期: 2024-04-25

中图分类号:

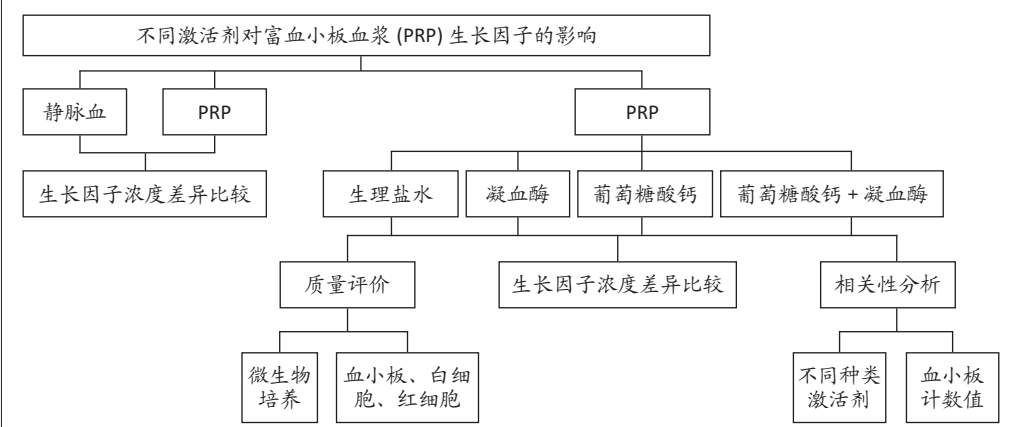
R459.9; R318; R496

文章编号:

2095-4344(2025)10-02067-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 不同激活剂处理后富血小板血浆中生长因子水平的变化



文题释义:

激活剂: 富血小板血浆中加入激活剂能刺激富血小板血浆中的血小板迅速活化, 释放高浓度生长因子, 加速组织愈合。临床常用的激活剂有葡萄糖酸钙、凝血酶、葡萄糖酸钙+凝血酶混合剂。

生长因子: 是富血小板血浆中临床治疗的关键效应分子, 参与组织生理病理过程的修复, 主要有血小板衍生生长因子BB、血小板衍生生长因子AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子、胰岛素样生长因子1、转化生长因子 β 等。不同的生长因子通过与特异的、高亲和的细胞膜受体结合, 调控机体细胞增殖、迁移, 促进组织修复。

摘要

背景: 生长因子是富血小板血浆在临床治疗中发挥作用的关键效应分子, 不同激活剂激活富血小板血浆后生长因子浓度存在差异, 是影响临床疗效的重要因素。

目的: 分析不同激活剂对富血小板血浆中生长因子质量浓度的影响。

方法: 招募12名健康志愿者, 采集EDTA-K2抗凝静脉血, 应用二次离心法制备富血小板血浆。比较静脉血与富血小板血浆中生长因子的质量浓度差异。将富血小板血浆分别与4种激活剂(生理盐水、凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙+凝血酶)按照体积比10:1混匀, 置于37℃恒温水浴箱孵育30 min, 离心后提取上清液, 检测生长因子质量浓度; 利用血琼脂平板检测上清液中的细菌生长情况; 采用Pearson相关分析不同激活剂与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性, 血小板计数值与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性。

结果与结论: ①富血小板血浆中血小板衍生生长因子BB、血小板衍生生长因子AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子的质量浓度分别是静脉血中对应生长因子质量浓度的8.7, 22.2, 2.3, 2.8倍($P < 0.05$); ②与生理盐水组比较, 凝血酶组、葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙+凝血酶组中血小板衍生生长因子BB、血小板衍生生长因子AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度升高($P < 0.05$); 凝血酶组、葡萄糖酸钙组血小板衍生生长因子BB质量浓度高于葡萄糖酸钙+凝血酶组($P < 0.05$), 凝血酶组血小板衍生生长因子AB质量浓度高于葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙+凝血酶组($P < 0.05$), 凝血酶组表皮生长因子质量浓度低于葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙+凝血酶组($P < 0.05$); ③血琼脂平板实验结果显示4组上清液中均无细菌生长; ④Pearson相关分析显示, 富血小板血浆中血小板衍生生长因子BB质量浓度与凝血酶存在正向强相关性($r=0.683$, $P < 0.05$), 血管内皮生长因子质量浓度与凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙+凝血酶激活混合剂存在正向强相关性($r=0.730$, 0.789 , 0.686 , $P < 0.05$); 富血小板中血小板计数值与4种生长因子质量浓度均无相关性($P > 0.05$); ⑤结果提示, 不同激活剂对富血小板血浆中生长因子浓度产生不同影响, 建议临床根据不同生长因子质量浓度和治疗需求选择不同激活剂, 以提高临床疗效。

关键词: 富血小板血浆; 凝血酶; 葡萄糖酸钙; 血小板衍生生长因子BB; 血小板衍生生长因子AB; 血管内皮生长因子; 表皮生长因子

Effects of different activators on platelet-rich plasma growth factors

Liu Jianxiang¹, Feng Xingxing², Wang Shuxia¹, Zhou Rong¹, Lyu Mengxing¹, Qu Kexuan^{1,3}¹Department of Blood Transfusion, ²Department of Clinical Laboratory, Kunming Children's Hospital, Kunming 650028, Yunnan Province, China; ³Kunming昆明市儿童医院, ¹输血科, ²检验科, 云南省昆明市 650028; ³昆明市儿童血液疾病免疫与分子诊断医学技术中心, 云南省昆明市 650028

第一作者: 刘建香, 女, 1989年生, 云南省昆明市人, 汉族, 主管检验师, 主要从事输血医学研究。

通讯作者: 屈柯喧, 副主任技师, 昆明市儿童医院输血科, 云南省昆明市 650028; 昆明市儿童血液疾病免疫与分子诊断医学技术中心, 云南省昆明市 650028

并列通讯作者: 吕孟兴, 主任医师, 昆明市儿童医院输血科, 云南省昆明市 650028

<https://orcid.org/0009-0009-5071-6254> (刘建香)

基金资助: 昆明市卫生科技人才培养项目 [2021-SW(省)-024], 项目负责人: 屈柯喧; 昆明市卫生科技人才培养项目 [2022-SW(技术)-007], 项目参与人: 冯星星、屈柯喧; 昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目 (2022-06-04-003), 项目参与人: 屈柯喧、吕孟兴、刘建香; 昆明市卫生健康委员会卫生科研课题项目 (2023-11-01-022), 项目负责人: 刘建香

引用本文: 刘建香, 冯星星, 王淑霞, 周蓉, 吕孟兴, 屈柯喧. 不同激活剂对富血小板血浆生长因子的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(10):2067-2073.



Medical Technology Center for Immunology and Molecular Diagnosis of Children's Blood Diseases, Kunming 650028, Yunnan Province, China

Liu Jianxiang, Laboratorian-in-charge, Department of Blood Transfusion, Kunming Children's Hospital, Kunming 650028, Yunnan Province, China

Corresponding author: Qu Kexuan, Associate chief technician, Department of Blood Transfusion, Kunming Children's Hospital, Kunming 650028, Yunnan Province, China; Kunming Medical Technology Center for Immunology and Molecular Diagnosis of Children's Blood Diseases, Kunming 650028, Yunnan Province, China

Co-corresponding author: Lyu Mengxing, Chief physician, Department of Blood Transfusion, Kunming Children's Hospital, Kunming 650028, Yunnan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Growth factor is the key effect molecule that plays a role in platelet-rich plasma in clinical treatment. There are differences in the concentration of growth factor after different activators activate platelet-rich plasma, which is an important factor affecting clinical efficacy.

OBJECTIVE: To analyze the influence of different activators on the mass concentration of growth factors in platelet-rich plasma.

METHODS: Totally 12 healthy volunteers were recruited to collect EDTA-K2 anticoagulant venous blood. Secondary centrifugation was used to prepare platelet-rich plasma. The difference in mass concentrations of growth factors was compared between venous blood and platelet-rich plasma. The platelet-rich plasma was mixed with four activators (normal saline, thrombin, calcium gluconate, calcium gluconate + thrombin) according to the volume ratio of 10:1, and incubated in a constant temperature water bath at 37 °C for 30 minutes. After centrifugation, the supernatant was extracted and the mass concentration of growth factor was detected. The bacterial growth in supernatant was measured by blood agar plate. Pearson correlation was used to analyze the correlation between different activators and the mass concentration of growth factor in platelet-rich plasma, and the correlation between the value of thrombocytometer and the mass concentration of growth factors in platelet-rich plasma.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The mass concentrations of platelet-derived growth factor-BB, platelet-derived growth factor-AB, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor in platelet-rich plasma were 8.7, 22.2, 2.3, and 2.8 times of those in venous blood, respectively ($P < 0.05$). (2) Compared with normal saline group, the mass concentrations of platelet-derived growth factor BB, platelet-derived growth factor AB, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor were increased in the thrombin group, calcium gluconate group, and calcium gluconate + thrombin group ($P < 0.05$). The mass concentration of platelet-derived growth factor BB in the thrombin group and calcium gluconate group was higher than that in the calcium gluconate + thrombin group ($P < 0.05$), and the mass concentration of platelet-derived growth factor AB in the thrombin group was higher than that in the calcium gluconate group and calcium gluconate + thrombin group ($P < 0.05$). Epidermal growth factor mass concentration in the thrombin group was lower than that in the calcium gluconate group and calcium gluconate + thrombin group ($P < 0.05$). (3) The results of blood agar plate test showed no bacterial growth in the supernatant of the four groups. (4) Pearson correlation analysis showed that the mass concentration of platelet-derived growth factor BB in platelet-rich plasma was strongly positively correlated with thrombin ($r=0.683$, $P < 0.05$), and the mass concentration of vascular endothelial growth factor was strongly positively correlated with thrombin, calcium gluconate, calcium gluconate + thrombin stimulant ($r=0.730$, 0.789 , 0.686 , $P < 0.05$). There was no correlation between the value of thrombocytometer and the mass concentration of four kinds of growth factors ($P > 0.05$). (5) The results suggest that different activators have an impact on the concentration of growth factors in platelet-rich plasma. It is suggested to choose different activators to improve clinical efficacy according to different growth factor mass concentrations and treatment needs.

Key words: platelet-rich plasma; thrombin; calcium gluconate; platelet-derived growth factor BB; platelet-derived growth factor AB; vascular endothelial growth factor; epidermal growth factor

Funding: Kunming Health Science and Technology Talent Training Project, No. 2021-SW(Province)-024 (to QKX); Kunming Health Science and Technology Talent Training Project, No. 2022-SW(Technology)-007 (to FXX, QKX); Health Scientific Research Project of Kunming Health Commission, No. 2022-06-04-003 (to QKX, LMX, LIX); Health Scientific Research Project of Kunming Health Commission, No. 2023-11-01-022 (to LIX)

How to cite this article: LIU JX, FENG XX, WANG SX, ZHOU R, LYU MX, QU KX. Effects of different activators on platelet-rich plasma growth factors. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(10):2067-2073.

0 引言 Introduction

富血小板血浆是通过物理方法将血液离心后得到的浓缩血小板，含有多种生长因子和蛋白等生物活性物质。通过不同的激活剂激活后，富血小板血浆释放多种高浓度生长因子，最主要的生长因子有血小板衍生生长因子BB、血小板衍生生长因子AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子、胰岛素样生长因子1、转化生长因子 β 等。生长因子是富血小板血浆临床治疗的关键效应分子^[1-9]，生长因子浓度是衡量富血小板血浆质量的指标，在细胞增殖、血管生成及组织修复中发挥不可替代的作用，可显著加速组织愈合^[10-14]。生长因子的浓度与组织修复效果密切相关，富血小板血浆中生长因子浓度不同将影响富血小板血浆的临床治疗效果^[15-17]。

目前，国内外已开展的富血小板血浆制备方法及激活剂使用五花八门^[18]，至今无统一标准，导致富血小板血浆制品质量参差不齐。如何保障富血小板血浆制品质量，最大限度发挥其内生长因子的作用、提高治疗效果，是富血小板血浆治疗中迫切需要解决的关键问题。

富血小板血浆常用的制备方法有成分血单采机制备、

试管法手工制备、专用分离套制备、血袋采集制备等^[7]。试管法手工制备不受人群及血容量限制，具有成本低、采血量少及操作简单方便等优点，被广泛应用于临床多学科。国内外对单采法制备富血小板血浆中生长因子浓度与激活剂的研究已有报道，然而，很少有研究涉及试管法手工制备富血小板血浆中不同激活剂对生长因子浓度差异的研究。此次研究选择试管法手工制备富血小板血浆，分析不同激活剂对富血小板血浆中生长因子浓度的影响，为不同激活剂富血小板血浆临床应用提供实验室依据。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 对比观察试验，组间比较进行配对t检验或Wilcoxon秩和检验。

1.2 时间及地点 试验于2023年7月在昆明市儿童医院儿童医学检验中心完成。

1.3 对象 招募12名健康志愿者，男3名，女9名，平均年龄(32.67 $\pm$ 5.37)岁。所有受试者对研究知情同意并签署了知情同意书。研究方案已通过昆明市儿童医院医学伦理委员会批准(批准号：2022-03-231-K01)。

纳入标准：凝血功能正常，无感染，无血液病，血小板计数正常；血红蛋白：男性 ≥ 120 g/L，女性 ≥ 110 g/L；无传染性疾病、严重心血管疾病、严重肝功能异常、肿瘤性疾病；无严重感染，近1周内未服用抗凝抗聚药物及影响血小板功能药物等。

1.4 试剂与仪器 凝血酶冻干粉（湖南一格，规格：1000 U/瓶，批号：210122-1）；葡萄糖酸钙注射液（河北天成，规格：10 mL：1 g，批号：1B220127102）；血小板衍生生长因子BB ELISA检测试剂盒（联科生物，批号：A913720613）、血小板衍生生长因子AB酶联免疫吸附检测试剂盒（Proteintech，批号：KE00222）；血管内皮生长因子酶联免疫吸附检测试剂盒（联科生物，批号：A18320654）、表皮生长因子酶联免疫吸附检测试剂盒（联科生物，批号：A19311234）；血琼脂平板（Autobio，批号：20230602B）；低速离心机（中科中佳，型号：SC-3616）；全自动血液分析仪（Sysmex，型号：XE-5000）；生物安全柜（BIOBASE，型号：BSC-1500 II A2-X）；CO₂培养箱（Thermo，型号：371 直热式）；洗板机（Thermo Fisher，型号：Wellwash Versa）；酶标仪（Autobio，型号：PHOMO）。

1.5 方法

1.5.1 标本采集 采集EDTA-K2抗凝静脉血，每人（13.08 $\pm$ 1.24）mL，标本采集顺畅，无溶血、凝块、严重乳糜等。

1.5.2 富血小板血浆的制备 富血小板血浆制备前，所有标本进行血常规检测。应用试管法手工二次离心法分离血小板：第1次使用轻离心，500 $\times g$ 离心10 min，使血液分为血浆层和红细胞层，留取全部血浆并做血小板计数；根据血小板计数值及所需富血小板血浆量留取预留量，剩余部分进行第2次重离心，1 700 $\times g$ 离心15 min，富集血小板，弃上清留取底层血小板与预留量混匀，制备富血小板血浆（1.98 $\pm$ 0.06）mL/人，备用。

1.5.3 富血小板血浆质量评价 根据标本采集量及富血小板血浆制备量，计算并比较静脉血与富血小板血浆中血小板、白细胞、红细胞富集系数和回收率，以评估富血小板血浆质量达到《自体富血小板血浆制备技术专家共识》^[16]。

血小板富集系数 = 富血小板血浆中血小板计数值 / 静脉血中血小板计数值；

血小板回收率 = (富血小板血浆体积 $\times$ 富血小板血浆中血小板计数值) / (静脉血体积 $\times$ 静脉血中血小板计数值) $\times 100\%$ ；

白细胞富集系数 = 富血小板血浆中白细胞计数值 / 静脉血中白细胞计数值；

白细胞回收率 = (富血小板血浆体积 $\times$ 富血小板血浆中白细胞计数值) / (静脉血体积 $\times$ 静脉血中白细胞计数值) $\times 100\%$ ；

红细胞富集系数 = 富血小板血浆中红细胞计数值 / 静

脉血中红细胞计数值；

红细胞回收率 = (富血小板血浆体积 $\times$ 富血小板血浆中红细胞计数值) / (静脉血体积 $\times$ 静脉血中红细胞计数值) $\times 100\%$ 。

1.5.4 静脉血与富血小板血浆中生长因子质量浓度差异 静脉血 1 700 $\times g$ 离心5 min，留取上清，备用。采用酶联免疫吸附实验测定血小板衍生生长因子BB、血小板衍生生长因子AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子的质量浓度。按照酶联免疫吸附检测试剂盒说明书浓度进行血浆稀释，分别在酶标板内加入标准品及待检测样本，加样过程在15 min内完成，立即加入对应抗体，使用封板膜封板，振荡孵育。孵育结束后使用洗板机洗涤6次，拍干水分，每孔内加入辣根过氧化物酶，使用新的封板膜封板，室温孵育。孵育结束后使用洗板机洗涤6次，拍干水分，每孔内加入显色底物，避光孵育。孵育结束后加入终止液显色，在30 min内使用酶标仪在450 nm和630 nm测定吸光度值，计算标准品和样本的平均吸光度值，然后再减去零浓度标准品的吸光度值，计算样本浓度时乘以稀释倍数则为最终结果。

1.5.5 激活剂制备 ①生理盐水：9 g/L氯化钠注射液；②凝血酶：9 g/L氯化钠注射液溶解凝血酶冻干粉，使凝血酶配制成100 U/mL浓度；③葡萄糖酸钙：10 mL/1 g葡萄糖酸钙注射液；④葡萄糖酸钙 + 凝血酶混合剂：10 mL/1 g葡萄糖酸钙注射液溶解凝血酶冻干粉，使凝血酶配制成100 U/mL浓度。

1.5.6 不同激活剂对富血小板血浆中生长因子水平的影响

实验分组：将富血小板血浆分别与4种激活剂（生理盐水、凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶）按照体积比10 : 1混匀，置于37℃恒温水浴箱孵育30 min，2 220 $\times g$ 离心20 min，取上清液。

生长因子质量浓度检测：采用酶联免疫吸附实验在1 h内检测血小板衍生生长因子BB、血小板衍生生长因子AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子的质量浓度。检测方法同上。

微生物培养：使用一次性无菌定量接种环取10 μ L不同激活剂制备完成的富血小板血浆上清液，分别于血琼脂平板内分区划线接种，置于35℃、体积分数5% CO₂培养箱内培养18–24 h，观察有无细菌生长。

1.6 主要观察指标 静脉血与富血小板血浆中血小板、红细胞与白细胞计数值以及生长因子质量浓度检测结果；不同激活剂激活后，富血小板血浆中生长因子质量浓度差异。

1.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.5.1软件和SPSS 23.0进行统计分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用t检验，符合偏态分布的计量资料用中位数

和四分位数间距 $[M(IQR)]$ 表示, 组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。采用 Pearson 相关分析不同激活剂与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性, 血小板计数与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文统计学方法已经昆明市儿童医院儿童研究所专家审核。

2 结果 Results

2.1 富血小板血浆质量评价结果 富血小板血浆中所含白细胞和红细胞计数明显低于静脉血 ($P < 0.01$), 血小板计数是静脉血中血小板计数的 5.5 倍 ($P < 0.01$), 见图 1。

富血小板血浆中白细胞和红细胞回收率、富集系数低, 血小板回收率、富集系数高, 富血小板血浆中的血小板计数为静脉血中血小板计数的 5.5 倍 (4-8 倍为理想水平)^[16, 19-21], 见表 1。

表 1 | 富血小板血浆中白细胞、红细胞的回收率和富集系数 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 | Recovery rate and enrichment coefficient of leukocytes and erythrocytes in platelet-rich plasma

项目	白细胞 ($\times 10^9 L^{-1}$)	红细胞 ($\times 10^{12} L^{-1}$)	血小板 ($\times 10^9 L^{-1}$)
静脉血	5.95±2.75	4.48±0.36	231.08±28.60
富血小板血浆	2.11±1.46	0.04±0.02	1 251.67±221.90
回收率 (%)	5.95±2.75	0.15±0.07	82.32±8.41
富集系数	0.393±0.174	0.010±0.004	5.455±0.759

2.2 静脉血与富血小板血浆中生长因子质量浓度差异检测结果 与静脉血相比较, 富血小板血浆中血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子的质量浓度均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 2、图 2。

表 2 | 静脉血与富血小板血浆中生长因子质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Comparison of growth factor mass concentration between venous blood and platelet-rich plasma

项目	血小板衍生生长因子 BB(ng/mL)	血小板衍生生长因子 AB(pg/mL)	血管内皮生长因子 (pg/mL)	表皮生长因子 (pg/mL)
静脉血	1.01±0.89	1 918.65±1 127.33	50.60±65.99	28.23±18.90
富血小板血浆	8.77±4.05	42 524.78±7 852.56	118.57±81.06	80.08±50.40
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01

2.3 不同激活剂对富血小板血浆上清细菌生长的影响 血琼脂平板实验结果显示 4 组样本均无微生物生长, 见图 3。

2.4 不同激活剂对富血小板血浆中生长因子质量浓度的影响 凝血酶组、葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙 + 凝血酶组血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度均高于生理盐水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 凝血酶组、葡萄糖酸钙组血小板衍生生长因子 BB 质量浓度高于葡萄糖酸钙 + 凝血酶组 ($P < 0.05$), 凝血酶组血小板衍生生长因子 AB 质量浓度高于葡

萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙 + 凝血酶组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 凝血酶组表皮生长因子质量浓度低于葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙 + 凝血酶组 ($P < 0.05$), 见表 3、图 4。

表 3 | 不同激活剂对富血小板血浆中生长因子质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 | Effects of different activators on the mass concentration of growth factor in platelet-rich plasma

组别	血小板衍生生长因子 BB(ng/mL)	血小板衍生生长因子 AB(pg/mL)	血管内皮生长因子 (pg/mL)	表皮生长因子 (pg/mL)
生理盐水组	1.56±1.30	4 609.80±2 926.11	75.57±77.78	97.22±86.08
凝血酶组	7.28±4.61 ^b	27 189.32±8 840.38 ^b	305.90±374.10 ^a	504.08±261.40 ^b
葡萄糖酸钙组	6.03±2.98 ^b	19 637.98±9 205.75 ^{bc}	278.11±296.51 ^a	690.43±281.78 ^{bc}
葡萄糖酸钙 + 凝血酶组	5.11±2.77 ^{ace}	17 424.68±7 157.74 ^{bd}	237.40±195.13 ^a	628.87±192.93 ^{bc}

表注: 与生理盐水组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与凝血酶组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与葡萄糖酸钙组比较, ^e $P < 0.05$ 。

2.5 不同激活剂与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性分析 富血小板血浆中血小板衍生生长因子 BB 质量浓度与凝血酶激活剂存在正向强相关性 ($r=0.683$, $P < 0.05$), 与葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶激活剂无相关性 ($r=0.556$, 0.502 , $P > 0.05$); 血管内皮生长因子质量浓度与凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶激活剂存在正向强相关性 ($r=0.730$, 0.789 , 0.686 , $P < 0.05$); 血小板衍生生长因子 AB 和表皮生长因子质量浓度与各激活剂均无相关性 ($r=-0.164$, 0.234 , 0.058 , 0.323 , 0.451 , 0.369 , $P > 0.05$), 见图 5。

2.6 血小板计数与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性分析 富血小板血浆中血小板计数与血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度均无相关性 ($r=0.133$, -0.074 , -0.050 , -0.044 , -0.192 , 0.168 , -0.027 , 0.043 , 0.033 , 0.050 , 0.309 , 0.082 , 0.415 , 0.463 , 0.419 , -0.311 , -0.130 , 0.085 , 0.229 , 0.091 , $P > 0.05$), 见图 6。

3 讨论 Discussion

生长因子是富血小板血浆临床治疗中发挥作用的關鍵性因子, 其中, 血小板衍生生长因子是刺激组织增生的常见肽类调节因子, 是一种重要的促细胞分裂剂, 可促进多种细胞增殖生长、诱导成纤维细胞趋化和有丝分裂、调节胶原酶分泌和胶原合成, 主要作用于间质细胞, 促进组织重塑, 在创伤愈合中作用突出。血管内皮生长因子是一种血管内皮细胞的特异性有丝分裂原, 在体外可促进血管内皮细胞的生长, 在体内可诱导血管增生, 尤其是在低氧环境下, 血管内皮生长因子与内皮细胞膜上血管内皮生长因子受体结合, 引起受体的自身磷酸化, 从而激活有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 实现血管内皮生长因子的有丝分裂原特性, 与血小板衍生生长因子有

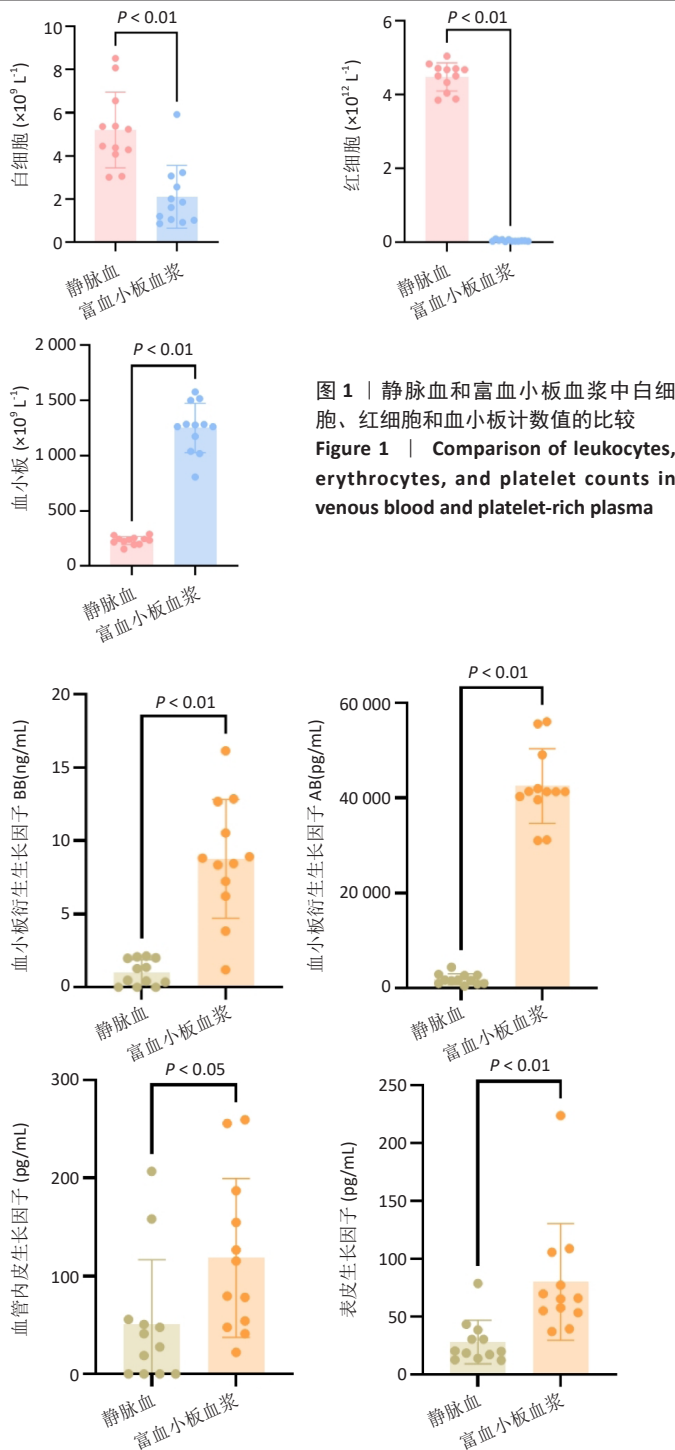


图1 | 静脉血和富血小板血浆中白细胞、红细胞和血小板计数值的比较
Figure 1 | Comparison of leukocytes, erythrocytes, and platelet counts in venous blood and platelet-rich plasma

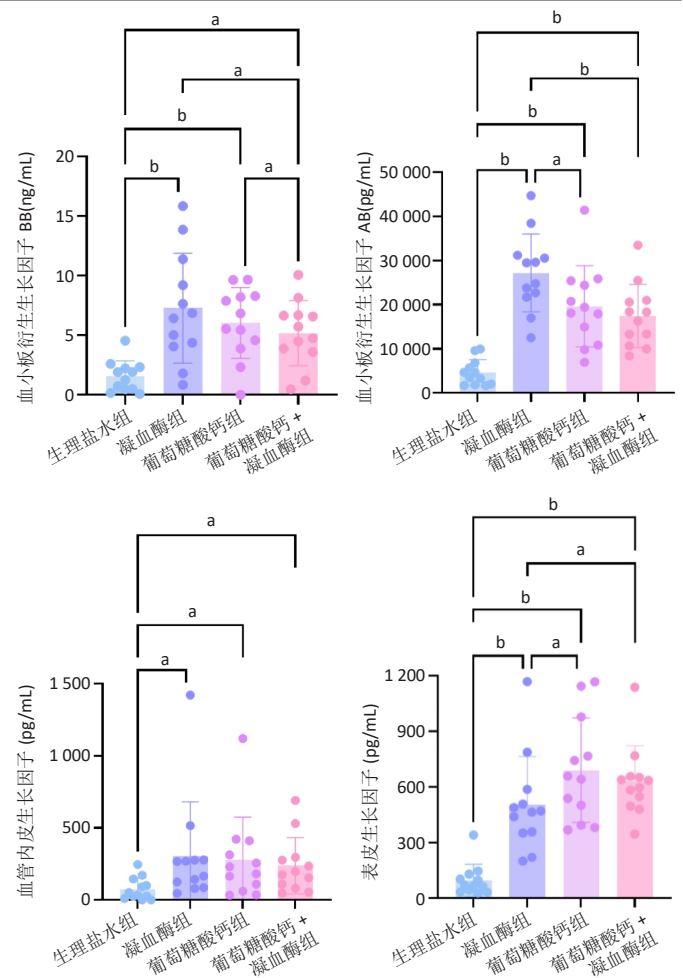


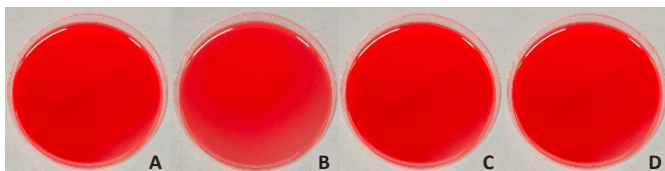
图4 | 各组富血小板血浆上清中生长因子质量浓度的比较

Figure 4 | Comparison of growth factor mass concentration in supernatant of platelet-rich plasma of each group

相互促进作用，诱导内皮细胞增生。胰岛素样生长因子能加强胶原蛋白合成，促进成纤维细胞分化，调节细胞的生长、增殖、代谢。转化生长因子 β 诱导内皮细胞趋化和血管生成，调节其他生长因子的促有丝分裂效应，抑制巨噬细胞和淋巴细胞增殖，介导局部炎症反应。表皮生长因子具有广泛的生物学效应，能极强地促进各种表皮组织生长，还能促进正常表皮细胞的新陈代谢，是热、酸稳定性最高的生物活性多肽之一，半衰期也较长，医学上已被用于烧烫伤、溃疡、各类创伤、角膜损伤及生物美容等治疗。不同生长因子之间构成复杂的调控网络，在促进组织愈合中，既有单因子的生物学效应又有多因子的协同作用。不同生长因子作用各异，在组织再生和细胞再生的信号传导及调控中起重要作用^[17, 22]。

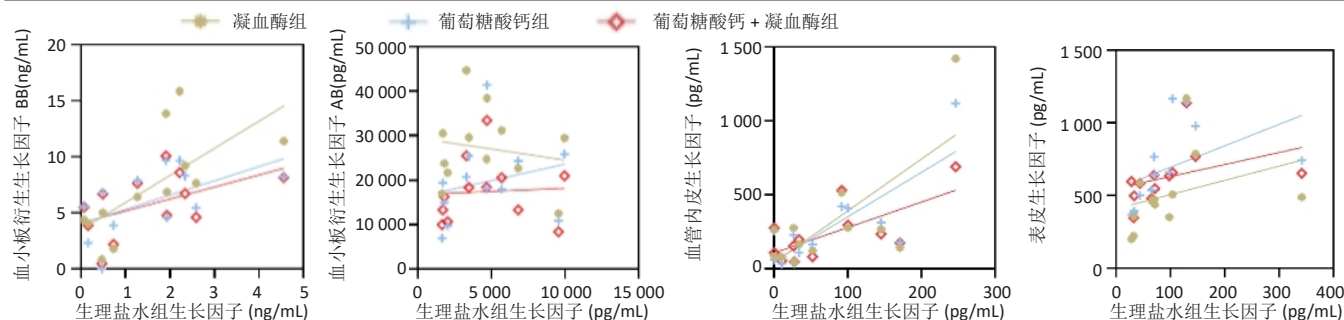
富血小板血浆通过被激活从而发挥生物学作用，临床治疗常用激活剂为凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙+凝血酶混合剂等。此次研究采用二次离心法制备富血小板血浆，其内白细胞平均浓度为 $(2.11 \pm 1.46) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ，红细胞平均浓度为 $(0.04 \pm 0.02) \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$ ，血小板平均浓度为 $(1\,251.67 \pm 221.90) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ，达到《自体富血小板血浆制备

图2 | 静脉血与富血小板血浆中生长因子质量浓度检测结果
Figure 2 | Detection results of growth factor mass concentration between venous blood and platelet-rich plasma



图注：A-D 分别为生理盐水组、凝血酶组、葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙+凝血酶组琼脂平板实验结果，4组样本均无微生物生长。

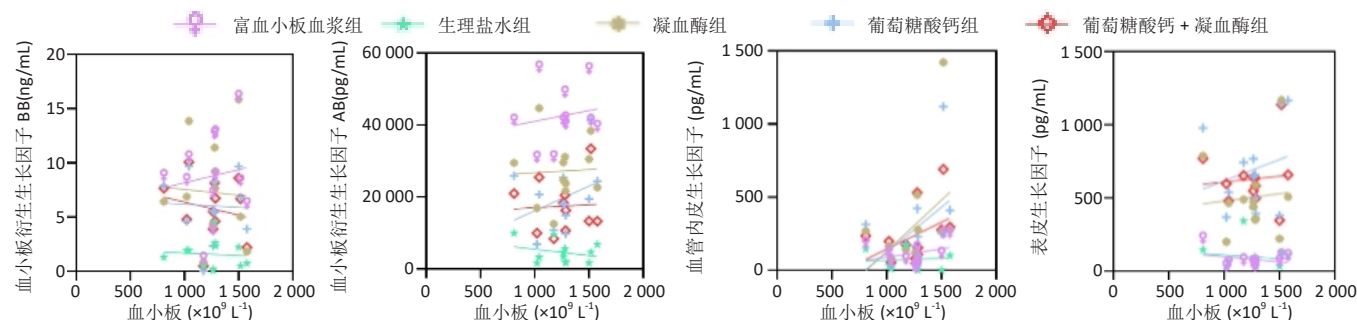
图3 | 不同激活剂对富血小板血浆上清细菌生长的影响
Figure 3 | Effects of different activators on the growth of platelet-rich plasma supernatant bacteria



图注：富血小板血浆中血小板衍生生长因子 BB 质量浓度与凝血酶激活剂存在正向强相关性 ($r=0.683$, $P<0.05$)，与葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶激活剂无相关性 ($P>0.05$)；血管内皮生长因子质量浓度与凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶激活剂存在正向强相关性 ($r=0.730$, 0.789 , 0.686 , $P<0.05$)；血小板衍生生长因子 AB 和表皮生长因子质量浓度与各激活剂均无相关性 ($P>0.05$)。

图 5 | 不同激活剂与富血小板血浆中生长因子质量浓度的相关性

Figure 5 | Correlation between different activators and growth factor mass concentrations in platelet-rich plasma



图注：富血小板血浆中血小板计数与血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度均无相关性 ($P>0.05$)。

图 6 | 富血小板血浆中血小板计数与生长因子质量浓度的相关性

Figure 6 | Correlation between the value of platelet count and the mass concentration of growth factors in platelet-rich plasma

技术专家共识》中有效血小板治疗浓度^[15, 23]。此次研究富血小板血浆中红细胞去除率达 99.11%，血小板回收率达 82.32%，血小板计数值是静脉血中血小板计数值的 5.5 倍，微生物培养均无细菌生长，高于向仁雪等^[24]报道手工制备富血小板血浆的血小板计数值，说明此次研究获得高质量的富血小板血浆各成分浓度达到理想水平。

正常人血浆中即能检出生长因子，但含量极微，制备为富血小板血浆或浓缩血小板制品后生长因子质量浓度成数倍增加。此次研究结果显示，富血小板血浆中血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度明显高于静脉血，分别是静脉血的 8.7, 22.2, 2.3, 2.8 倍 ($P<0.05$)。使用凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶混合剂激活后，富血小板血浆中血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子的质量浓度明显高于生理盐水组 ($P<0.05$)。

不同激活剂激活富血小板血浆后，生长因子释放的动力学不同^[25-26]，浓度水平存在差异^[27]。此次研究发现，凝血酶激活组富血小板血浆中的血小板衍生生长因子 BB 质量浓度为 (7.28 ± 4.61) ng/mL，明显高于葡萄糖酸钙 + 凝血酶激活剂组 (5.11 ± 2.77) ng/mL ($P<0.05$)；血小板衍生生长因子 AB 质量浓度为 $(27\ 189.32\pm8\ 840.38)$ pg/mL，明显

高于葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙 + 凝血酶组 $[(19\ 637.98\pm9\ 205.75), (17\ 424.68\pm7\ 157.74)]$ pg/mL, ($P<0.05$)，与高华等^[22]、杨域等^[28]报道的结果一致。葡萄糖酸钙组富血小板血浆中的表皮生长因子质量浓度为 (690.43 ± 281.78) pg/mL，明显高于凝血酶组 (504.08 ± 261.40) pg/mL ($P<0.05$)。在葡萄糖酸钙 + 凝血酶激活组富血小板血浆中的血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度总体偏低。凝血酶组、葡萄糖酸钙组、葡萄糖酸钙 + 凝血酶组富血小板血浆中的血管内皮生长因子质量浓度分别为 (305.90 ± 374.11) , (278.11 ± 296.51) , (237.40 ± 195.13) pg/mL，3 组间比较差异无显著性意义 ($P>0.05$)，与杨域等^[28]报道的血管内皮生长因子质量浓度在凝血酶激活剂组和葡萄糖酸钙组中含量接近一致。综上所述，不同激活剂激活富血小板血浆后生长因子质量浓度差异明显。

此次研究对血小板计数及不同激活剂与生长因子质量浓度的差异进行相关性分析，结果显示，血小板衍生生长因子 BB、血小板衍生生长因子 AB、血管内皮生长因子、表皮生长因子质量浓度与血小板计数值无相关性，与激活剂的种类存在较强相关性：凝血酶激活剂与血小板衍生生长因子 BB 质量浓度存在正向强相关性，凝血酶、葡萄糖酸钙、葡萄糖酸钙 + 凝血酶混合激活剂与血管内

皮生长因子质量浓度存在正向强相关性, 3种激活剂与血小板衍生生长因子AB、表皮生长因子质量浓度无相关性, 与高华等^[22]报道激活剂的类型对血小板浓度与生长因子质量浓度的相关性有影响一致。

综上所述, 采用相同方法获得的富血小板血浆中生物活性成分含量均会存在差异, 不同方法的重复性差异也较大。激活剂的种类及剂量对富血小板血浆中生长因子质量浓度产生影响^[29]。生长因子是临床治疗的关键效应分子, 使用激活剂后富血小板血浆中生长因子质量浓度明显增高, 不同激活剂对富血小板血浆中生长因子质量浓度的影响存在明显差异, 不同激活剂与富血小板血浆中生长因子的质量浓度存在较强相关性, 是影响富血小板血浆中生长因子质量浓度差异的关键因素, 建议临床针对不同的生长因子质量浓度和治疗需求选择不同激活剂的富血小板血浆制品, 以最大限度发挥富血小板血浆的治疗作用, 提高临床疗效。此次研究样本量有限, 并且生长因子的活化和释放又是个复杂的过程, 接下来将开展高质量、大样本的随机对照试验, 从而保证富血小板血浆质量, 以更好地发挥富血小板血浆临床疗效。

作者贡献: 屈柯暄、刘建香进行实验设计, 实验实施为冯星星、刘建香、周蓉, 实验评估为屈柯暄、吕孟兴, 资料收集为刘建香、王淑霞, 刘建香成文, 屈柯暄、吕孟兴审核。

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。

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: 该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] KATAOKA T, MIFUNE Y, INUI A, et al. Combined therapy of platelet-rich plasma and basic fibroblast growth factor using gelatin-hydrogel sheet for rotator cuff healing in rat models. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):605.
- [2] BILAL Ö, TOPAK D, KINAS M, et al. Epidermal growth factor or platelet-rich plasma combined with induced membrane technique in the treatment of segmental femur defects: an experimental study. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1):601.
- [3] RODRIGUES BL, MONTALVÃO SAL, CANCELA RBB, et al. Treatment of male pattern alopecia with platelet-rich plasma: A double-blind controlled study with analysis of platelet number and growth factor levels. *J Am Acad Dermatol.* 2018;80(3):694-700.
- [4] BORSANI E, BUFFOLI B, BONOMINI F, et al. The Growth Factor Release from a Platelet-Rich Plasma Preparation Is Influenced by the Onset of Guttae Psoriasis: A Case Report. *Appl Sci (Basel).* 2022;12(14):7250.
- [5] BEITIA M, DELGADO D, MERCADER J, et al. Action of Platelet-Rich Plasma on In Vitro Cellular Bioactivity: More than Platelets. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5367.
- [6] LIM W, PARK SH, KIM B, et al. Relationship of cytokine levels and clinical effect on platelet-rich plasma-treated lateral epicondylitis. *J Orthop Res.* 2017;36(3):913-920.

- [7] CELIKTEN M, SAHIN H, SENTURK GE, et al. The effect of platelet-rich fibrin, platelet-rich plasma, and concentrated growth factor in the repair of full thickness rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg.* 2023;S1058-2746(23)00772-3. doi: 10.1016/j.jse.2023.09.028.
- [8] XU H, XU F, ZHAO J, et al. Platelet-Rich Plasma Induces Autophagy and Promotes Regeneration in Human Dental Pulp Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:659742.
- [9] MYUNG H, JANG H, MYUNG JK, et al. Platelet-rich plasma improves the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells by enhancing their secretion of angiogenic factors in a combined radiation and wound injury model. *Exp Dermatol.* 2020;29(2):158-167.
- [10] ABU-GHNAME A, PERDANASARI AT, DAVIS MJ, et al. Platelet-Rich Plasma: Principles and Applications in Plastic Surgery. *Semin Plast Surg.* 2019;33(3):155-161.
- [11] BOSWELL SG, SCHNABEL LV, MOHAMMED HO, et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sport Med.* 2013;42(1):42-49.
- [12] PINEDA-CORTEZ MR, SUAREZ C, CABRERA JT, et al. Biotherapeutic Applications of Platelet-Rich Plasma in Regenerative Medicine. *Tissue Eng Regen Med.* 2023;20(6):811-828.
- [13] 刘建香, 吕孟兴, 陈昊, 等. 自体富血小板血浆治愈儿童难治性骨髓炎合并骨折 1 例 [J]. *中国输血杂志*, 2023,36(8):673-675.
- [14] ORBAN YA, SOLIMAN MA, HEGAB YH, et al. Autologous platelet-rich plasma vs conventional dressing in the management of chronic diabetic foot ulcers. *Wounds.* 2022;33(2):36-42.
- [15] CHIU CH, CHEN P, YEH WL, et al. The gelling effect of platelet-rich fibrin matrix when exposed to human tenocytes from the rotator cuff in small-diameter culture wells and the design of a co-culture device to overcome this phenomenon. *Bone Joint Res.* 2019;8(5):216-223.
- [16] 中国输血协会临床输血管理专业委员会. 自体富血小板血浆制备技术专家共识 [J]. *中国输血杂志*, 2021,34(7):677-683.
- [17] KUSHIDA S, KAKUDO N, MORIMOTO N, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs.* 2014;17(2):186-192.
- [18] 王淑君, 赵广超, 罗开云, 等. 不同处理方式对富血小板血浆相关生长因子的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2022,30(6):1834-1838.
- [19] WANG SL, LIU XL, KANG ZC, et al. Platelet-rich plasma promotes peripheral nerve regeneration after sciatic nerve injury. *Neural Regen Res.* 2023;18(2):375-381.
- [20] CROISÉ B, PARÉ A, JOLY A, et al. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review. *J Stomatol Oral Maxi.* 2019;121(2):150-154.
- [21] STRAUM OK. The optimal platelet concentration in platelet-rich plasma for proliferation of human cells in vitro-diversity, biases, and possible basic experimental principles for further research in the field: A review. *PeerJ.* 2020;8:e10303.
- [22] 高华, 周世秋, 刘作风, 等. 富血小板血浆在不同激活剂下生长因子浓度的研究 [J]. *中国输血杂志*, 2021,34(10):1086-1089.
- [23] BARIA M, VASILEFF WK, MILLER M, et al. Cellular Components and Growth Factor Content of Platelet-Rich Plasma With a Customizable Commercial System. *Am J Sport Med.* 2019;47(5):1216-1222.
- [24] 向仁雪, 吴建君, 王嘉嘉, 等. 手工与全自动法制备富血小板血浆的质量及治疗膝关节疾病的疗效分析 [J]. *中国输血杂志*, 2021,34(7):695-698.
- [25] ANITUA E, ZALDUENDO MM, ALKHRAISAT MH, et al. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat.* 2013;195(5):461-466.
- [26] 林盘玉, 许放, 赵良军. 富血小板纤维蛋白中生长因子含量及释放周期的实验研究 [J]. *中国医药科学*, 2023,13(5):29-32.
- [27] ZHUANG YW, ZENG YM, CHEN YF, et al. [The effects of different activators on the release curve of human platelet-rich plasma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2018;41(11):868-872.
- [28] 杨域, 张卫, 程飏. 不同激活剂对人富血小板血浆形成凝胶及释放活性物质影响的实验研究 [J]. *中华烧伤杂志*, 2017,33(1):12-17.
- [29] 黄谦, 吴涛, 金丹, 等. 不同比例激活富血小板血浆对其生长因子浓度及人骨髓基质干细胞增殖的影响 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2008,10(10):965-969.

(责任编辑: GW, ZN, WL, YJ)