

· 基础研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.10.006

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250715.1259.005\(2025-07-15\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250715.1259.005(2025-07-15))

血小板分离优化及其激活产物对内皮祖细胞增殖的影响

肖家军¹, 赵越¹, 柏璐^{1,2}, 许程², 左金华², 胡亚辉^{1,2},夏凯¹, 汪碧澄¹, 谢晓彤¹, 唐香香¹

(蚌埠市中医医院; 1. 临床医学研究与转化中心; 2. 检验科 233080)

[摘要] **目的** 优化血小板的富集方法, 分析富血小板血浆 (PRP) 激活前后关键分子的浓度变化及其激活产物对大鼠内皮祖细胞增殖的影响。**方法** 采用试管两次离心法优化血小板的富集, 并检测富集后 PRP 的血小板计数; ELISA 检测 PRP 激活前后血管内皮生长因子 (VEGF)、内皮抑素 (ES) 和 P-选择素 (CD62P) 浓度变化; 采用液氮冻融法激活 PRP, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 PRP 激活产物对大鼠内皮祖细胞增殖的影响。**结果** 两次离心法可以获得的血小板最佳富集系数为 4.63; 低速长时两次离心富集后, 白膜上层区域血小板计数最高。机采血小板计数为 $500 \times 10^9/\text{L}$ 的 PRP 激活前后, VEGF 浓度分别为 $(3\,418.12 \pm 488.80)$ 、 $(4\,530.04 \pm 308.30)$ pg/mL, ES 浓度分别为 $(6\,168.98 \pm 253.22)$ 、 $(6\,594.65 \pm 82.47)$ pg/mL; CD62P 浓度分别为 $(6\,678.23 \pm 324.15)$ 、 $(17\,630.53 \pm 746.24)$ pg/mL, 激活前后比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。用内皮祖细胞专用培养基梯度稀释激活后的 PRP, MTT 法检测结果表明: 基础培养基培养 48 h 时其促进内皮祖细胞增殖的最佳体积分数为 0.25%; 完全培养基中培养 24 h 时其促进内皮祖细胞增殖的最佳体积分数为 0.062 5%, 48 h 时为 0.125%。**结论** 优化富集的 PRP 激活前后 VEGF、ES 和 CD62P 浓度发生明显变化; 在基础培养基中其促进内皮祖细胞增殖的最佳体积分数为 0.25%。

[关键词] 血小板; 优化; 活化; 内皮祖细胞; 增殖**[中图分类号]** R977.8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2025)10-2269-06Effects of platelet isolation optimization and its activation productson on proliferation of endothelial progenitor cells^{*}XIAO Jiajun¹, ZHAO Yue¹, BAI Lu^{1,2}, XU Cheng², ZUO Jinhua², HU Yahui^{1,2},XIA Kai¹, WANG Bicheng¹, XIE Xiaotong¹, TANG Xiangxiang¹

(1. Clinical Medical Research and Translation Center; 2. Department of Clinical Laboratory, Bengbu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bengbu, Anhui 233080, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the platelet enrichment method, and to analyze the concentration changes of key molecules in platelet-rich plasma (PRP) before and after activation, as well as the impact of its activated products on the proliferation of rat endothelial progenitor cells. **Methods** The tube double-centrifugation method was employed to optimize platelet enrichment, and the platelet count in the enriched PRP was measured. ELISA was used to detect the concentration changes of vascular endothelial growth factor (VEGF), endostatin (ES), and P-selectin (CD62P) in PRP before and after activation. The PRP was activated by using liquid nitrogen freeze-thaw method, and the effect of its activated products on the proliferation of rat endothelial progenitor cells was evaluated by using the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. **Results** The optimal enrichment coefficient of platelets achieved by the double-centrifugation method was 4.63. After low-speed, long-duration double centrifugation, the platelet count was highest in the upper layer of the buffy coat. For PRP with a platelet count of $500 \times 10^9/\text{L}$ obtained by machine collection, the VEGF concentrations before and after activation were $(3\,418.12 \pm 488.80)$ pg/mL and $(4\,530.04 \pm 308.30)$ pg/mL, respectively, the ES concentrations were $(6\,168.98 \pm 253.22)$ pg/mL and $(6\,594.65 \pm 82.47)$ pg/mL, respectively, the CD62P concentrations were $(6\,678.23 \pm 324.15)$ pg/mL and $(17\,630.53 \pm 746.24)$ pg/mL, respectively, statistically significant differences were observed in the above indicators before and after activation ($P < 0.01$). The activated PRP was diluted in a gradient manner by using a specialized culture medium for en-

^{*} 基金项目: 2022 年安徽省重点研究与开发计划项目 (2022e07020064)。

endothelial progenitor cells. MTT assay results indicated that, in the basal medium, the optimal volume fraction for promoting endothelial progenitor cell proliferation was 0.25% after 48 hours of culture; in the complete medium, the optimal volume fractions for promoting endothelial progenitor cell proliferation were 0.0625% after 24 hours and 0.125% after 48 hours. **Conclusion** The concentrations of VEGF, ES, and CD62P in the optimized, enriched PRP exhibited significant changes before and after activation. The optimal volume fraction for promoting endothelial progenitor cell proliferation in the basal medium was 0.25%.

[Key words] platelets; optimization; activation; endothelial progenitor cells; proliferation

血小板是一种由巨核细胞产生的、大量循环于血液系统的无核血细胞,其产生主要是通过肝脏合成的血小板生成素刺激巨核细胞增生性白血病病毒受体(myeloproliferative leukemia virus receptor, MPL)进行调节^[1]。在健康人群中,循环血小板的数量是由血小板形成速率和老化血小板从循环中移除速率决定的^[2]。激活的血小板通过分泌各种关键分子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生长因子、成纤维细胞生长因子、血栓素、P-选择素(P-selectin, CD62P)等在生理和病理状态下发挥功能。富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是通过离心的方法将血液中的血小板进行富集后而广泛应用于临床的血液制品。

在进行血小板富集实验时,由于血液样本之间存在差异,采用已发表文献的实验方法^[3-5]进行重复实验时结果会有很大的差异,因此目前学术界尚无统一的血小板富集方法。另外,文献报道^[6]采用两次离心法分离出的上层血浆和下层 PRP,上层血浆即为贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)层,下层即为供临床应用的 PRP。采用低速长时间两次离心,分离所得的血浆各层中血小板计数精确值文献报道较少,而临床治疗对于这类不含红细胞的血浆有应用需求^[7-10];血小板激活后血浆中重要细胞因子浓度会发生变化,这种变化直接影响其临床应用效果,文献报道其分泌的各种因子对细胞增殖的作用多用 PRP 的体积分数进行考量,缺乏针对血小板的定量分析。本研究将优化两次离心法基础上考察 PRP 激活前后关键分子的浓度变化及其对内皮祖细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 2~3 月龄 SD 雄性大鼠购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[合格证书:SCXK(豫)2020-0005],平均体重 210~270 g,合笼喂养,每笼 3~4 只,环境温度(21±4)℃,自由进食、饮水 2 周,按照《实验动物管理条例》规定进行实验。本实验已通过本院伦理委员会审批(审批号:20220727-1)。

1.1.2 试剂和仪器

柠檬酸钠、柠檬酸、葡萄糖(均为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司),VEGF、人内皮抑素(en-

dostatin, ES)、CD62P ELISA 试剂盒(上海优选生物科技有限公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司),ficol 试剂(德国 Merck 公司),大鼠内皮祖细胞专用培养基(合肥星肽生物科技有限公司),低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司),全自动血液分析仪(日本 Sysmex Corporation 公司),动物饲养系统(北京中西华大科技有限公司),荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司),二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PRP 制备条件的优化及质量评价

根据文献和前期的探索,实验采用人源静脉血试管两次离心法,每组使用 10 mL 负压无抗凝剂的采血管,柠檬酸钠抗凝剂新鲜配制,每管加 1 mL,离心时环境温度控制在(22±3)℃。实验分为 4 组,分别为 B1、B2、B3、B4 组,考虑到临床应用对时间的要求,采用固定离心时间,变化离心速度进行优化:B1 组第一次 160×g 轻离心 5 min,第二次 560×g 高离心 10 min;B2 组第一次 200×g 离心 5 min,第二次 1 925×g 高离心 10 min;B3 组第一次 710×g 离心 5 min,第二次 1 590×g 高离心 10 min;B4 组第一次 1 190×g 离心 5 min,第二次 1 925×g 高离心 10 min。第一次离心后,将上清液和上清液下约 0.5 cm 的红细胞层一并吸出,合并后作为第二次离心的材料。对所有标本制备的 PRP 进行血常规检测,比较原始血液与 PRP 中血小板的富集系数和回收率,各组实验至少重复 3 次。血小板富集系数=PRP 中血小板计数值/静脉血中血小板计数值;血小板回收率(%)=[PRP 体积(mL)×PRP 血小板计数(×10⁹/L)]/[全血体积(mL)×全血血小板计数(×10⁹/L)]×100%。

1.2.2 全血低速长时间两次离心法富集后各层血小板计数

取 4 管 10 mL 同一人的全血样本,第一次 160×g 离心 20 min,取上清液及白膜界面下约 6 mm 的红细胞层转入新管,新管 400×g 离心 15 min。经两次离心后,全血分成 3 层,即血浆层、白膜层和红细胞层,从离心后最上层血浆层开始,每次取 1 mL,混匀后检测各层混合物中的血小板计数,实验至少重复 3 次。

1.2.3 PRP 激活前后 VEGF、ES 和 CD62P 的浓度变化

PRP 激活:采用液氮冻融法,取血库机器设备采集的血小板,调整其浓度为 $500\times10^9/L$,分装留取一定量的 PRP 后,将剩余的 PRP 分别装入 5 mL 冻存管内,浸入液氮罐 5 min,立即取出再浸入 37 ℃ 水浴箱振荡 5 min 溶解,反复冻融 3 次,使 PRP 充分冻融裂解;3 000 r/min 离心 20 min,去除细胞沉渣,0.2 μm 过滤,保存于-80 ℃ 备用。

VEGF、ES 和 CD62P 浓度检测:采用 ELISA 法,具体操作按照试剂盒说明书进行。将调整后的样本浓度进行稀释,分别在酶标板内加入标准品及待检测样本,按照试剂盒说明书的要求每个样本做 3 个复孔,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 15 min。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(A)值 $[A_{(450)}、A_{(630)}]$,计算标准品和样本的平均 A 值,然后再减去零浓度标准品的 A 值,计算样本浓度时乘以稀释倍数则为最终结果。

1.2.4 大鼠内皮祖细胞的分离培养

6 周龄 SD 大鼠麻醉后处死,无菌环境下分离出胫骨和股骨,在 75%乙醇中浸泡 15 min,然后在磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)中去除胫骨和股骨上剩余的肌肉,并反复清洗,转入含有培养基的平皿中,剪断骨的两端,用培养基反复冲洗骨髓腔,将收集的液体转入 10 mL 离心管,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液加入培养液重悬,缓慢移至装有等量淋巴细胞分离液的离心管中,常温 1 500 r/min 离心 15 min。去除上清液,轻轻吸取离心管中间乳白色的单个核细胞层至新的离心管中,加入等量 PBS 后吹打离心,弃上清液,加入大鼠内皮祖细胞专用培养基重悬细胞,反复轻轻吹打成单细胞悬液后接种在 6 cm 细胞培养皿中,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,4 d 后首次换液,去除未贴壁的细胞,以后每 3 天换液 1 次,待细胞融合至 80%左右进行传代。

1.2.5 激活后的 PRP 对大鼠内皮祖细胞的增殖的影响

取对数生长期的大鼠内皮祖细胞,调整细胞浓度,每孔 5 μL 接种于含培养基的 96 孔培养板,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。培养基分为两类,一类是添加 PRP 激活产物的内皮祖细胞完全培养基,另外一类是未添加 PRP 激活产物的基础培养基。完全培养基组:采用完全培养基梯度稀释法稀释至血小板计数为 $500\times10^9/L$ PRP 激活产物,稀释后积分数分别为 0.015 625%、0.031 25%、0.062 5%、0.125%、

0.25%、0.5%、1%和 2% 8 个浓度梯度(分别命名为 0.015 625%组、0.031 25%组、0.062 5%组、0.125%组、0.25%组、0.5%组、1%组和 2%组),对照组为完全培养基;基础培养基组:以同样的方法采用基础培养基进行梯度稀释,对照组为无任何添加的内皮祖细胞专用基础培养基,96 孔培养板每孔终体积为 100 μL。针对不同浓度梯度的 PRP 激活产物,完全培养基组和基础培养基组按照实验设计要求每个浓度做 4 个复孔,该浓度梯度实验重复 3 次。按照 MTT 试剂盒说明书,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 24 h 后,每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 100 μL,作用 4 h 后终止培养,吸去培养孔内的上清液,并在每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,振荡 10 min,用酶标仪测 $A_{(490)}$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内比较采用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析和配对 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 全血制备 PRP 离心条件的优化

采用两步离心法富集后,PRP 血小板计数较原始血浆高 2 倍以上,从血小板富集系数和回收率来看,B2 组相对较高,因此以 B2 组的第一次 200×g 离心 5 min,第二次 1 925×g 高离心 10 min 的分离方法最优,见表 1。

2.2 全血低速长时间两次离心法富集后自上而下不同层血浆的血小板计数变化

原始血浆血小板计数为 $(167.31\pm78.65)\times10^9/L$,第一次离心后剩余血浆为 $(39.75\pm23.55)\times10^9/L$,第二次离心后上层第 1 毫升上清液、第 2 毫升上清液、第 3 毫升上清液,以及制备成功的 PRP 和 PRP 层下剩余血浆血小板浓度分别为 $(138.25\pm72.82)\times10^9/L$ 、 $(161.75\pm93.78)\times10^9/L$ 、 $(159.31\pm91.66)\times10^9/L$ 、 $(543.14\pm286.36)\times10^9/L$ 、 $(436.57\pm208.14)\times10^9/L$,可以看出,与原始血浆比较,两次离心后,血浆中的血小板计数都在减小,第一次离心后的剩余血浆中血小板计数较第二次离心更低;制备成功后的 PRP,即白膜层的上下部分血小板计数很高,且分离出 PRP 后的剩余血浆血小板计数也较高。

表 1 不同离心条件下全血制备 PRP 的血小板计数、回收率和富集系数($\bar{x}\pm s$)

组别	血小板计数($\times10^9/L$)		回收率 (%)	富集系数
	原始血浆	PRP		
B1 组	208.67±60.73	530.21±167.48	52.82±1.87	2.55
B2 组	196.34±34.53	909.05±139.13	68.85±6.34	4.63
B3 组	187.80±18.16	580.23±78.16	57.60±4.34	3.10
B4 组	178.65±58.52	621.21±175.32	63.19±2.29	3.49

2.3 PRP 被激活前后 VEGF、ES 和 CD62P 浓度变化

PRP 被激活后 VEGF、ES 和可溶性 CD62P 浓度较激活前升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

2.4 激活后 PRP 对内皮祖细胞增殖的影响

2.4.1 基础培养基下不同浓度 PRP 激活产物对内皮祖细胞增殖的影响

MTT 实验检测不同浓度 PRP 激活产物对内皮祖细胞增殖的影响。培养 24 h 时检测结果显示:0.015 625%、0.031 625%、0.062 5%、0.125%、0.25%组 $A_{(490)}$ 值逐渐升高,其中 0.062 5%、0.125%和 0.25%组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);0.25%、0.5%、1%、2%组 $A_{(490)}$ 值逐渐减小,且与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与 0.25%组比较,2%组差异也有统计学意义($P<0.01$)。培养 48 h 时检测结果显示:0.015 625%、0.031 625%、0.062 5%、0.125%、0.25%组 A 值逐渐升高,其中 0.062 5%、0.125%和 0.25%组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);0.25%、0.5%、1%、2%组 $A_{(490)}$ 值逐渐减小,且与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);与 0.25%组比较,1%、2%组差异也有统计学意义($P<0.01$),即在基础培养基下,随着时间的延长,实验组内各组之间差异有统计学意义的组在增加(7 个组 *vs.* 8 个组),见表 3。

表 3 两种培养基下不同体积分数的 PRP 激活产物下内皮祖细胞增殖变化 [$A_{(490)}$ 值]

组别	基础培养基		完全培养基	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	0.099±0.005	0.101±0.084	0.142±0.011	0.147±0.002
2%组	0.092±0.004 ^{ac}	0.097±0.003 ^{bc}	0.095±0.010 ^{bd}	0.067±0.003 ^{bc}
1%组	0.127±0.004 ^b	0.238±0.030 ^{bc}	0.141±0.008 ^{ad}	0.089±0.017 ^{bc}
0.5%组	0.128±0.031 ^b	0.379±0.038 ^b	0.150±0.009 ^{ad}	0.131±0.016
0.25%组	0.132±0.009 ^b	0.386±0.043 ^b	0.152±0.012 ^{ad}	0.133±0.007
0.125%组	0.129±0.003 ^b	0.382±0.019 ^b	0.153±0.007 ^a	0.154±0.019
0.062 5%组	0.128±0.029 ^b	0.383±0.028 ^a	0.161±0.016 ^a	0.143±0.006
0.031 25%组	0.117±0.005	0.369±0.052	0.146±0.005	0.147±0.013
0.015 625%组	0.115±0.008	0.347±0.030	0.137±0.004	0.141±0.010

^a: $P<0.05$; ^b: $P<0.01$,与对照组比较; ^c: $P<0.01$,与 0.25%组比较; ^d: $P<0.05$,与 0.062 5%组比较; ^e: $P<0.01$,与 0.125%组比较。

3 讨 论

PRP 自 20 世纪七十年代被发现以来,围绕 PRP 的临床应用与基础研究不断增加。PRP 除了在整形外科、心脏外科、妇科、泌尿外科、眼科和肌肉骨骼领域被广泛研究应用以外^[11],近年发现其可以加速腕管综合征神经的修复^[12]、对退行性神经及神经稳定性疾病^[13]、骨关节炎^[14]、皮肤病^[15]等也有明显疗效,例如在整形外科的创面修复方面,PRP 可以加速烧伤、慢性溃疡及术后创面愈合,促进面部年轻化及提升脂肪移植存活率,减少术后吸收^[16];皮肤病方面,可以利用

表 2 PRP 激活前后 VEGF、ES 和可溶性 CD62P 浓度比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

时间	VEGF	ES	CD62P
激活前	3 418.12±488.80	6 168.98±253.22	6 678.23±324.15
激活后	4 530.04±308.30 ^a	6 594.65±82.47 ^a	17 630.53±746.24 ^a
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

2.4.2 完全培养基下,不同浓度 PRP 激活产物对内皮祖细胞增殖的影响

MTT 实验检测不同浓度 PRP 激活产物对内皮祖细胞增殖的影响。培养 24 h 时,检测结果显示:0.015 625%、0.031 25%、0.062 5%组 $A_{(490)}$ 值逐渐升高,其中 0.062 5%与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);0.062 5%、0.125%、0.25%、0.5%、1%、2%组 $A_{(490)}$ 值逐渐减小,且与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);除了 0.125%组外,其余各组与 0.062 5%组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。培养 48 h 后,检测结果显示:0.015 625%、0.031 25%、0.062 5%、0.125%组 $A_{(490)}$ 值整体呈逐渐升高趋势,但各组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);0.125%、0.25%、0.5%、1%、2%组 $A_{(490)}$ 值逐渐减小,与对照组比较,1%、2%组差异有统计学意义($P<0.01$);与 0.125%组比较,1%、2%组差异也有统计学意义($P<0.01$),即在完全培养基组,随着时间的延长,实验组内各组之间差异有统计学意义的组在减少(9 个组 *vs.* 4 个组),见表 3。

PRP 进行脱发治疗^[17]和瘢痕修复^[18]。

目前临床上制备的 PRP 更多的是来自患者自体血浆^[19-20],通过离心获得高浓度的血小板后再行临床应用。普遍存在的问题是患者个体差异大,血小板富集系数差异较大,很难形成一个统一的标准^[21],研究表明临床应用时血小板富集系数在 2 以上都能取得较好的效果^[22],说明 PRP 应用时浓度适应范围较广泛。本研究通过对已发表文章^[23-24]中的方法进行验证的基础上,并结合临床应用经验,采用 10 mL 离心管两次离心,对于 10 mL 的血浆,第一次 200×g 离

心 5 min,第二次 1 925×g 高离心 10 min,所获得的 PRP 可以满足临床应用需求,并且在制备时间上也相对较短。本研究还发现采用低速长时间两次离心,第一次离心后,剩余血浆内血小板计数较低,第二次离心后上清液各层血小板计数依然较高,这提示通过对第二次分离的上清液进行更高速度或更长时间离心,可以获得更高血小板富集系数的 PRP,在临床特殊科室如皮肤科、眼科等有特殊治疗需求时能够发挥更好的临床效果;另外,分离 PRP 后的红细胞层也比原始血浆血小板计数更高,这提示在实际应用时,可以根据临床需要进行 PRP 总体积的调整。

在 PRP 临床应用中,血小板是否需要激活,如何激活^[25],也是必须考虑的问题。通过对分离的纯血小板的研究发现,采用液氮冻融法^[26]激活,其重要的细胞因子 VEGF、ES 和 CD62P 在激活前后存在明显差异,这提示在临床应用时应根据临床需要做必要的激活,可能会取得更好的疗效。PRP 在干细胞的培养中,由于其分泌的各类细胞因子,常作为一种添加成分,对干细胞的增殖有明显的促进作用^[27]。本研究发现在基础培养基内,添加适量的 PRP 激活产物,能有效促进大鼠内皮祖细胞的增殖,其最佳的体积分数为 0.25%,且与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);但是在完全培养基中,PRP 激活产物的添加,更多地表现为对细胞增殖的抑制作用,培养 24 h 时有一个最小的抑制作用,PRP 激活产物的体积分数为 0.062 5%,且与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);培养 48 h 时最小抑制作用的 PRP 激活产物的体积分数为 0.125%,且与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。可见在完全培养基中如何添加 PRP 激活产物,还需要依据具体情况进一步研究。本研究使用的血小板是无红细胞和白细胞的纯血小板,其激活前后各种成分相对比较容易定量,而在临床上使用的 PRP,组成成分更为复杂,采用液氮冻融法激活存在较大的局限性,未来把 PRP 作为一种营养成分添加剂进行使用时,还需要更深入的研究。

总之,本研究优化了可应用于临床的 PRP 的富集方法;PRP 激活前后 VEGF、ES 和 CD62P 的浓度发生明显变化,在基础培养基中添加 PRP 激活产物促进内皮祖细胞增殖的最佳体积分数为 0.25%。

参考文献

[1] KAUSHANSKY K, LOK S, HOLLY R D, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin[J]. Nature, 1994, 369 (6481): 568-571.

[2] GRODZIELSKI M, GOETTE N P, GLEMBOWSKI A C, et al. Multiple concomitant mechanisms contribute to low platelet count in pa-

tients with immune thrombocytopenia[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):2208.

[3] LANDESBURG R, ROY M, GLICKMAN 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.

[4] 王舒莹, 李晓明, 刘震岳, 等. 3 种不同模式汇集白膜层法制备浓缩血小板质量和保存效果比较[J]. 重庆医学, 2014, 43(4):451-453.

[5] 刘建香, 冯星星, 王淑霞, 等. 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.

[6] MIRON R J, PIKOS M A, ESTRIN N E, et al. Extended platelet-rich fibrin[J]. Periodontology, 2000, 2024, 94(1):114-130.

[7] 尹一力, 郑允文, 李遇梅. 富血小板血浆在脱发治疗中的应用[J]. 皮肤科学通报, 2024, 41(5):497-502.

[8] 宋黎, 陆茂, 叶俊儒, 等. 富血小板血浆局部注射治疗雄激素性脱发的疗效及安全性系统评价[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2020, 36(11):653-657.

[9] 彭小维, 杨洋, 于春红, 等. 温度敏感型富血小板血浆凝胶治疗角膜碱烧伤的实验研究[J]. 眼科新进展, 2016, 36(4):314-317.

[10] PIXLEY J N, COOK M K, SINGH R, et al. Comprehensive review of platelet-rich plasma for the treatment of dermatologic disorders[J]. J Dermatolog Treat, 2023, 34(1):2142035.

[11] GOLLINÔS T, ALEXANDER D, BARKATALI B, et al. Platelet-rich plasma: a narrative review[J]. EFORT Open Rev, 2021, 6(4):225-235.

[12] GAO N, YAN L, AI F, et al. Comparison of the short-term clinical effectiveness of 5% dextrose water, platelet-rich plasma and corticosteroid injections for carpal tunnel syndrome: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2023, 104(5):799-811.

[13] TAI H C, TSAI W K, CHANG M L, et al. Intracavernous injection of platelet-rich plasma reverses erectile dysfunction of chronic cavernous nerve degeneration through reduction of prostatic hyperplasia evidence from an aging-induced erectile dysfunction rat model[J]. FASEB J, 2023, 37(4):e22826.

[14] CAI Y, WANG Z, LIAO B, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of platelet-derived growth factor-BB on osteoarthritis

rat models[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2023,78(1):51-59.

[15] VERMA R,KUMAR S,GARG P,et al. Platelet-rich plasma:a comparative and economical therapy for wound healing and tissue regeneration[J]. Cell Tissue Bank, 2023, 24 (2): 285-306.

[16] 肖义青,宋灿,姚静,等. 富血小板血浆的制备及其在整形外科中的应用进展[J]. 山东医药, 2015,55(17):95-97.

[17] 刘文丽,王莉,高田原,等. 自体富血小板血浆注射联合光疗治疗雄激素性脱发临床观察[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2020, 19(4): 349-353.

[18] 时波. 富血小板血浆联合超脉冲 CO₂ 点阵激光治疗面部痤疮凹陷性瘢痕的应用效果观察[J]. 四川生理科学杂志, 2023,45(2):348-349.

[19] WANG Z,ZHU P,LIAO B,et al. Effects and action mechanisms of individual cytokines contained in PRP on osteoarthritis[J]. J Orthop Surg Res,2023,18(1):713.

[20] 袁俊虎,陈扬,魏鲁青. 富含血小板血浆与常规药物关节腔注射治疗早期膝关节关节炎的临床疗效比较[J]. 骨科, 2019,10(1):25-30.

[21] WANG S,LIU Z,WANG J,et al. Platelet-rich plasma (PRP) in nerve repair[J]. Regen Ther, 2024,27:244-250.

[22] 李卓男,张连波. 富血小板血浆的临床应用[J]. 中国美容整形外科杂志, 2019,30(3):184-187.

[23] 李明,张长青,袁霆,等. 富血小板血浆制备套路的评估研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011,25(1):112-116.

[24] 王舒莹,李晓明,刘震岳,等. 3 种不同模式汇集白膜层法制备浓缩血小板质量和保存效果比较[J]. 重庆医学, 2014,43(4):451-453.

[25] 高阳,刘曹毅,熊博雯,等. 不同激活条件下血小板来源的细胞外囊泡的生物学特征分析[J]. 中国输血杂, 2023,36(2):130-136.

[26] 李洪涛,段建民,周谋,等. 液氮冻融促进血小板源性生长因子 AA 与转化生长因子 β 1 的释放[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6764-6767.

[27] 杨锴,程亚栋,王鹏,等. 富血小板血浆体外培养人脐带间充质干细胞:细胞增殖及成骨分化的能力[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(17): 2652-2658.

(收稿日期:2024-10-15 修回日期:2025-05-10)
(编辑:姚 雪)

(上接第 2268 页)

[24] WANG G D. Aerobic exercise ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury and thrombosis of diabetic rats via activation of AMPK/ Sirt1/PGC-1 α pathway[J]. Gen Physiol Biophys,2022,41(4):319-328.

[25] 曹丰,吴雪萍. 生活方式干预对老年冠心病防控的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2024, 40(10):785-789.

[26] DING C,O’NEILL D,BRITTON A. Trajectories of alcohol consumption in relation to all-cause mortality in patients with cardiovascular disease:a 35-year prospective cohort study[J]. Addiction,2022,117(7):1920-1930.

[27] WANG Y,LI Y S,CHEN C F,et al. Moderate-intensity aerobic exercise inhibits cell pyroptosis to improve myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Mol Biol Rep,2024,52(1):5.

[28] CHEN A,CHEN Z W,XIA Y,et al. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,499(2):267-272.

[29] OGBU I R,NGWUDIKE C,LAL K,et al. Role of glucagon-like peptide-1 agonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass grafting:a meta-analysis[J]. Am Heart J Plus,2021,11:100063.

[30] FANG B B,LIU F,YU X L,et al. Liraglutide alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2023,572:111954.

[31] MARSO S P,DANIELS G H,BROWN-FRANDSEN K,et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2016,375(4):311-322.

(收稿日期:2025-02-21 修回日期:2025-06-09)
(编辑:张芃捷)