

# 幼儿富血小板血浆制备条件的优化及部分细胞因子含量的测定\*

陈圆<sup>1</sup> 何婷<sup>1</sup> 杨云乐<sup>1</sup> 姜媛媛<sup>1</sup> 李萌<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:优化幼儿富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)的制备条件,测定幼儿及成人 PRP 和贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)中部分细胞因子浓度并分析差异,为后续临床研究奠定基础。方法:本研究通过两步法制备 PRP,采用不同的离心条件,分别测定制备前全血和制备后 PRP 中的血小板计数(PLT)、血小板平均容积(MPV)和血小板分布宽度(PDW)等指标,以选择幼儿 PRP 制备的最优离心条件组合。ELISA 法分别测定幼儿 PRP 及 PPP 与成人 PRP 及 PPP 中表皮细胞生长因子(EGF)、转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、胰岛素样生长因子(IGF-1)浓度,并进行统计学分析。结果:可采用全血初次离心 $600 \times g$ (10 min),上层血浆再次离心 $2\ 000 \times g$ (10 min)的方法制备幼儿 PRP。幼儿 PRP 组 EGF、TGF- $\beta$ 1、IGF-1 因子浓度均明显高于成人 PRP 组,三者比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:采用优化离心条件后的两步离心法,可获得稳定、高质量的幼儿 PRP。幼儿 PRP 中 EGF、TGF- $\beta$ 1、IGF-1 因子浓度均明显高于成人 PRP 组,为后续相关试验研究提供了方向。

**[关键词]** 富血小板血浆;贫血小板血浆;细胞因子

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2024.04.002

**[中图分类号]** R457.1 **[文献标志码]** A

## Optimization of preparation conditions of platelet-rich plasma in infants and determination of some cytokines

CHEN Yuan HE Ting YANG Yunle JIANG Yuanyuan LI Meng

(Department of Blood Transfusion, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210008, China)

Corresponding author: LI Meng, E-mail: 1395239217@qq.com

**Abstract Objective:** To optimize the preparation conditions of infant platelet-rich plasma (PRP), measure the concentrations of some cytokines in PRP and platelet-poor plasma (PPP) in infants and adults, and analyze the differences, so as to lay the foundation for subsequent clinical studies. **Methods:** PRP was prepared by a two-step method. Different centrifugation conditions were used to determine platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW) in whole blood PRP before and after preparation, respectively, in order to select the optimal combination of centrifugation conditions for PRP preparation in infants. The concentrations of epidermal cell growth factor (EGF), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and insulin-like growth factor (IGF-1) in PRP and PPP in infants and PRP and PPP in adults were measured by ELISA, and the concentrations were statistically analyzed. **Results:** Infant PRP could be prepared by centrifugation of whole blood  $600 \times g$  (10 min) and upper plasma  $2\ 000 \times g$  (10 min). The EGF, TGF- $\beta$ 1 and IGF-1 factors in infant PRP were significantly higher than that in PRP group. The difference among the three was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Two-step centrifugation method with optimized centrifugation conditions can obtain stable and high quality infant PRP. The concentrations of EGF, TGF- $\beta$ 1 and IGF-1 factors in infant PRP were significantly higher than those in adult PRP group, which provided the direction for subsequent relevant experimental research.

**Key words** platelet-rich plasma; platelet-poor plasma; cytokine

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是通过离心的方法所获取的血小板浓缩液,在再生医学中扮演着重要角色<sup>[1]</sup>,被广泛用于组织再生<sup>[2-3]</sup>、创面修复<sup>[4-5]</sup>、医学美容<sup>[6-7]</sup>等领域。目前报道的

PRP 制备方法多适用于成人,如何获得较高质量的幼儿 PRP,是亟待解决的问题。另外,相较于贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP),PRP 中含有大量的生长因子<sup>[8]</sup>,测定并分析幼儿与成人 PRP 在部分细胞因子浓度上是否存在差异,可为后续 PRP 在幼儿的临床应用中提供依据。

\*基金项目:南京市卫生科技发展项目(No:YKK21155)

<sup>1</sup>南京医科大学附属儿童医院输血科(南京,210008)

通信作者:李萌, E-mail: 1395239217@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试验标本

因幼儿血液采集困难,本次试验中采用的全血标本均为多人份 A 型全血混合样本,也减少了个体间的差异影响。纳入标准:①幼儿年龄:1~6 岁,成人年龄:25~50 岁;②凝血功能及血常规指标正常,且血小板计数(PLT) $>200 \times 10^9/L$ ,肝肾功能正常;③无心脏病、无内分泌系统疾病、无传染性疾病、无肿瘤性疾病;④近 1 个月内未服用任何药物;⑤为避免血型不同造成凝集反应,血型均为 A 型。

### 1.2 标本收集

**1.2.1 标本收集要求** 本试验采用的幼儿标本均为临床申请血型检测的标本,成人血液标本均为临床体检的血液标本,所有血液标本需符合上述纳入标准。

**1.2.2 离心条件选择试验的标本收集** 该试验共进行 2 次,每次收集 30 例幼儿全血共 45 mL(1.5 mL/人)。

**1.2.3 幼儿与成人 PPP、PRP 对比试验的标本收集** ①第 3 次幼儿血液样本:收集 30 例幼儿全血共 15 mL(0.5 mL/人),混合后待制备。②成人血液样本:收集 30 例成人全血共 15 mL(0.5 mL/人),混合后待制备。

### 1.3 主要试剂及仪器

**1.3.1 材料与试剂** 15 mL 塑料离心管(Bio-land);表皮细胞生长因子(EGF)(联科生物,批号 A19310431)、转化生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )(联科生物,批号 A98111123)、胰岛素样生长因子(IGF-1)(联科生物,批号 A113111232)浓度测定均使用 ELISA 试剂盒。

**1.3.2 仪器** 贝克曼大容量低温离心机(德国贝克曼公司),迈瑞 7500 全自动血细胞分析仪(国产),Themo 酶标仪(美国 Themo 公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 两步离心法** 全血经初次离心后将上层血浆转入另一支离心管内;再二次离心,使血小板下沉于底部形成沉淀。上层液即为 PPP,移除上层 PPP,用剩余少量 PPP 重悬底部沉淀,即可获得 PRP。

**1.4.2 幼儿 PRP 制备条件优化试验** 因幼儿血液收集困难,故该试验分两次进行。第一次 PRP 制备:通过查阅文献,初步设置了 3 种离心力和离心时间的组合(表 1)。收集幼儿混合全血 45 mL,平均分为 3 组(15 mL/份),将每组全血标本装入 15 mL 离心管后,分别按照表 1 离心条件制备 PRP,并采用血细胞分析仪检测制备前全血和 PRP 中 PLT、血小板平均容积(MPV)和血小板分布宽度(PDW)三项指标。

表 1 第一次制备幼儿 PRP 离心条件

组别	初次离心		二次离心	
	离心力 /g	离心时间 /min	离心力 /g	离心时间 /min
第一组	500	10	1 500	10
第二组	600	10	2 000	10
第三组	800	10	2 000	10

第二次 PRP 制备:参考第一次试验结果,将离心力和离心时间组合进行部分调整后,开始第二次试验(表 2)。再次收集幼儿全血 45 mL,平均分为 3 组(15 mL/份),按表 2 离心条件制备 PRP,并分析 PLT、MPV 和 PDW 三项指标,以期得到最佳的离心速度与时间的组合。

表 2 第二次制备幼儿 PRP 离心条件

组别	初次离心		二次离心	
	离心力 /g	离心时间 /min	离心力 /g	离心时间 /min
第一组	500	10	1 500	10
第二组	600	10	1 500	10
第三组	600	10	2 000	10

**1.4.3 幼儿与成人对比试验** ① PRP 及 PPP 制备:根据前期试验结果,选择最佳离心条件。将幼儿与成人全血标本同条件下制备 PRP 及 PPP。②采用血细胞分析仪检测以上各组制备前全血和制备后 PRP 中 PLT、MPV 和 PDW 三项指标。③采用 ELISA 试剂盒分别检测幼儿和成人 PRP、PPP 中 EGF、TGF- $\beta_1$ 、IGF-1 因子浓度。

### 1.5 统计学处理

应用 GraphPad prism 10 软件,统计各组中不同细胞因子含量,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 第一次制备幼儿 PRP

幼儿血液分别在三种不同离心条件下制备的 PRP,血常规指标检测结果见表 3。综合 PLT、MPV 和 PDW 三项指标考虑,三组 MPV 数值相同,但第二组 PDW 较制备前变化最小。说明离心条件为初次  $600 \times g$  (10 min),二次  $2 000 \times g$  (10 min)时,PLT 较高且形态保持较好,效果较佳。

### 2.2 第二次制备的幼儿 PRP

幼儿血液分别在三种不同离心条件下制备的 PRP,血常规指标检测结果见表 4。结果显示,综合 PLT、MPV 和 PDW 三项指标考虑,第三组 MPV 和 PDW 较制备前变化最小。再次说明离心条件为初次  $600 \times g$  (10 min)二次  $2 000 \times g$  (10 min)时,效果较佳。

2.3 幼儿与成人 PRP 及 PPP 检测结果对比

2.3.1 常规检测结果 选择离心条件为初次  $600 \times g$  (10 min)、二次  $2\,000 \times g$  (10 min) 制备幼儿及成人样本,相关指标检测结果见表 5。

2.3.2 细胞因子测定结果 利用 ELISA 试剂盒分别测定幼儿 PPP 组、幼儿 PRP 组和成人 PPP 组、成人 PRP 组中 EGF、TGF- $\beta$ 1、IGF-1 浓度,每组样本含量均测定 4 次。试验结果显示,幼儿 PRP

组 EGF 含量明显高于 PPP 组 ( $P < 0.05$ );且幼儿 PRP 组高于成人 PRP 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PRP 组 TGF- $\beta$ 1 含量明显高于 PPP 组 ( $P < 0.05$ );且幼儿 PRP 组高于成人 PRP 组 ( $P < 0.05$ )。IGF-1 在 PPP 组与 PRP 组差异无统计学意义,但幼儿 PRP 组浓度明显高于成人 PRP 组 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

表 3 第一次制备幼儿 PRP 的血常规检测结果

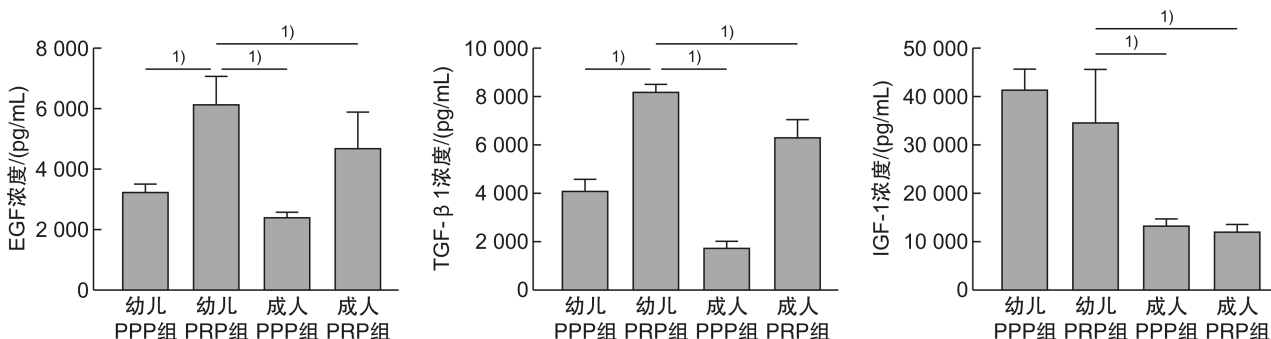
检测指标	制备前全血	第一组 PRP	第二组 PRP	第三组 PRP
红细胞/( $\times 10^{12}$ )	5.16	0.40	0.40	0.40
白细胞/( $\times 10^9$ )	9.99	13.54	13.20	8.22
PLT/( $\times 10^9$ )	304	1 612	1 620	1 821
MPV/fL	12.8	13.2	13.2	13.2
PDW/%	18.6	20.5	19.0	17.3

表 4 第二次制备幼儿 PRP 的血常规检测结果

检测指标	制备前全血	第一组 PRP	第二组 PRP	第三组 PRP
红细胞/( $\times 10^{12}$ )	5.25	0.22	0.22	0.22
白细胞/( $\times 10^9$ )	8.57	1.86	2.34	1.66
PLT/( $\times 10^9$ )	361	2 359	2 398	2 557
MPV/fL	11.4	11.8	11.9	11.7
PDW/%	14.1	13.2	13.3	13.2

表 5 幼儿与成人 PRP 制备的血常规检测结果

检测指标	幼儿组		成人组	
	制备前全血	制备后 PRP	制备前全血	制备后 PRP
红细胞/( $\times 10^{12}$ )	4.29	0.13	4.52	0.23
白细胞/( $\times 10^9$ )	8.28	4.67	6.11	1.34
PLT/( $\times 10^9$ )	308	1 560	254	1 551
MPV/fL	10.8	11.4	11.8	12.6
PDW/%	12.5	12.2	14.8	15.7



与幼儿 PRP 组比较,  $^{1)} P < 0.05$ 。

图 1 各组间不同细胞因子的浓度

3 讨论

关于 PRP 的制备目前已有《自体富血小板血浆制备技术专家共识》<sup>[9]</sup>, 但该共识主要针对成人

PRP 的制备, 并不完全适用于儿童, 特别是幼儿。幼儿全身血容量少且静脉穿刺困难, 活泼好动, 共识中推荐的成分血单采机法和血袋采集法、PRP

专用分离套装法,均需要较多的血量,对幼儿来说存在一定困难。因此,幼儿最适合的 PRP 制备方法为试管法手工采集。

目前手工法制备 PRP 的方法无统一标准,有学者也提到了 PRP 目前并没有最佳的制备方法,细胞成分的构成比例也尚无统一的标准,因此其临床应用价值尚无令人满意的诠释<sup>[10]</sup>。一般来讲,增加离心力和离心时间,可以增加 PRP 中 PLT 的浓度,但是也不能无限制地增加离心力和离心时间,因为有可能造成血小板激活而使效果适得其反。因此找到适合幼儿 PRP 制备的方法,并建立评价其质量的方法显得尤为重要。因此本研究除了采用检测 PLT 之外,还采用了检测 MPV 和 PDW 来初步判断制备的 PRP 质量,找到了比较适合于 15 mL 离心管手工法制备 PRP 的离心条件。即初次离心速度为  $600 \times g$  (10 min),上层血浆再次离心  $2\ 000 \times g$  (10 min),MPV 和 PDW 较制备前变化较小,表明得到的 PRP 质量较佳。

目前认为 PRP 中含有大量的血小板衍生生长因子、TGF- $\beta$ 、IGF-1、成纤维细胞生长因子、结缔组织生长因子、EGF、血管内皮生长因子等因子<sup>[11-12]</sup>,已被广泛应用于创面修复<sup>[13-14]</sup>、关节损伤修复<sup>[15-16]</sup>和皮肤美容<sup>[17-18]</sup>等,其中 EGF、TGF- $\beta$ 1、IGF-1 三种因子可促进血管生成,改善血供,治疗缺血坏死性疾病,可以促进基质合成,重塑组织结构<sup>[19-20]</sup>,在临床组织修复中起到了关键性的作用。本研究测定了三种细胞因子分别在幼儿 PPP、幼儿 PRP 和成人 PPP 和成人 PRP 中的浓度,试验结果表明 EGF、TGF- $\beta$ 1 和 IGF-1 三种因子在幼儿 PRP 中比在成人 PRP 中浓度更高,这可能与幼儿生长发育旺盛有关,也印证了幼儿组织损伤修复较成人更为迅速。有研究表明,脐血 PRP 中有 10 种利于组织修复的活性成分高于成人,其中包括 EGF、TGF- $\beta$ 1<sup>[21]</sup>。本次试验中我们并未检测出 IGF-1 在 PRP 组和 PPP 组中存在差别,可能与我们并未在 PRP 制备后立即检测有关。

因幼儿生理及性格特点,烧烫伤、意外皮损,或者较大的手术后瘢痕恢复不良等较为常见,瘢痕恢复对幼儿成长的意义重大,因此将 PRP 用于幼儿损伤修复是可考虑的治疗方法。目前已有儿童 PRP 应用于临床的报道<sup>[22-23]</sup>,但因其受制于幼儿血液采集难度大,目前研究较少。随着 PRP 应用的逐渐深入,其抑菌作用也被日益重视<sup>[24]</sup>,采用异体 PRP 治疗幼儿损伤是可研究的方向,但考虑到幼儿与成人的 PRP 中部分细胞因子浓度存在差异,有条件的幼儿采集自体 PRP 对损伤修复可能更为有效。后续我们将进行蛋白组学分析,以期发现幼儿与成人 PRP 的其他蛋白差异,为 PRP 的进一步有效应用提供理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, et al. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2018, 22(3):367-374.
- [2] Everts P, Onishi K, Jayaram P, et al. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20):7794.
- [3] 张强,岳宪虎,黄象艳,等.富血小板血浆在髌骨外侧高压症治疗中的应用[J].临床输血与检验,2023,25(3):348-353.
- [4] Lovisolò F, Carton F, Gino S, et al. Platelet rich plasma-derived microvesicles increased invitro wound healing[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18):9658-9664.
- [5] 杨菁,周谋,林放,等.负载 PRP 壳聚糖-明胶复合敷料止血和促愈合效果的初步评价[J].临床输血与检验,2021,23(5):612-616.
- [6] 刘广亚,许育兵,单桂秋,等.自体富血小板血浆治疗雄激素源性脱发临床疗效的影响因素分析[J].中国输血杂志,2022,35(12):1243-1246.
- [7] 邝江波,许喜生,王永飞,等.富血小板血浆联合自体脂肪移植在面部年轻化治疗的 Meta 分析[J].中国美容整形外科杂志,2023,34(9):548-553.
- [8] Milek T, Nagraba L, Mitek T, et al. Autologous platelet-rich plasma reduces healing time of chronic venous leg ulcers: A prospective observational study[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1176:109-117.
- [9] 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.
- [10] 李少文,朱展鸿,单桂秋,等.富血小板血浆制备及其质量评价体系初探[J].中国输血杂志,2022,35(10):1085-1091.
- [11] Tian J, Cheng LH, Cui X, et al. Application of standardized platelet-rich plasma in elderly patients with complex wounds[J]. Wound Repair Regen, 2019, 27(3):268-276.
- [12] Anitua E, Munoz V, Aspe L. In vitro and in vivo effect of platelet-rich plasma-based autologous topical serum on cutaneous wound healing [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2022, 35(1):51-64.
- [13] 李文娟,张树超.富血小板血浆在慢性难愈性创面治疗中的临床研究进展[J].中国输血杂志,2022,35(1):1092-1096.
- [14] 吴锦涛,邹立津,何霞飞,等.血小板浓缩物在创面愈合中的研究进展[J].广东医学,2023,44(1):118-123.
- [15] 陈勇,吴培培,蒋强,等.关节腔内注射 PRP 对膝骨性关节炎炎性感染疼痛介质与 NLRP3/IL-1 $\beta$  通路的影响[J].中华医院感染学杂志,2022,32(15):2338-2342.

- [16] 杨亚崇,帅世超,朱喜春,等. 富血小板血浆治疗膝关节骨性关节炎的研究进展[J]. 中国输血杂志, 2023, 36(1):90-93.
- [17] 宋黎,陆茂,唐懿,等. 点阵 CO<sub>2</sub> 激光联合富血小板血浆治疗萎缩性痤疮瘢痕的系统评价[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(35):5734-5740.
- [18] 朱新华,张二佳,付梦瑶. 强脉冲光联合富血小板血浆注射治疗玫瑰痤疮疗效观察[J]. 中国美容医学, 2023, 32(10):102-105.
- [19] Dionysiou D, Demiri E, Foroglou P, et al. The effectiveness of intralesional injection of platelet-rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers: an experimental and clinical study[J]. *Int Wound J*, 2013, 10(4):397-406.
- [20] Cervelli V, Scioli MG, Gentile P, et al. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(3):206-220.
- [21] 马秉正,赵而海,左振柏,等. 基于 Luminex 技术对比分析激活后的脐血和成人富血小板血浆研究[J]. 中国输血杂志, 2023, 36(1):11-15.
- [22] 刘建香,吕孟兴,屈柯暄,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.
- [23] 刘琴,沈先涛,胡红兵,等. 自体富血小板血浆治疗儿童病理性骨折疗效观察[J]. 临床输血与检验, 2023, 25(3):354-357.
- [24] 刘炎,何颖雨,刘磊,等. 富血小板血浆的抑菌作用及其机制的研究进展[J]. 临床血液学杂志, 2023, 36(6):452-456.
- (收稿日期:2023-08-28 修回日期:2024-01-31)

(上接第 230 页)

- [18] Lemańska-Perek A, Krzyżanowska-Gołąb D, Pupek M, et al. Analysis of Soluble Molecular Fibronectin-Fibrin Complexes and EDA-Fibronectin Concentration in Plasma of Patients with Atherosclerosis [J]. *Inflammation*, 2016, 39(3):1059-1068.
- [19] 林梓豪,黄平. 重症肺炎患者 FDP、D-D、FIB 与炎症指标、病情程度的关系及其短期预后预测价值[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2022, 17(9):1182-1189.
- [20] 颜楠,刁艳君,韩峰,等. 凝血相关检测常见干扰因素分析与探讨[J]. 临床血液学杂志, 2023, 36(10):693-696.
- [21] 石浩,张海博,魏海梁,等. 中医药防治 COVID-19 细胞因子风暴的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(12):216-226.
- [22] Stirling D, Hannant WA, Ludlam CA. Transcriptional activation of the factor gene in liver cell lines by interleukin-6 [J]. *Thromb Haemost*, 1998, 79(1):74-78.
- [23] Watanabe H, Mokuda S, Tokunaga T, et al. Expression of factor XIII originating from synovial fibroblasts and macrophages induced by interleukin-6 signaling [J]. *Inflamm Regen*, 2023, 43(1):2.
- [24] 徐树良,吴慧民,孙启俊. ELISA 检测冷沉淀中纤维连接蛋白含量初探[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(1):30-31.
- (收稿日期:2023-08-28 修回日期:2024-02-26)