

# 富血小板血浆-80℃深低温短期保存后细胞因子的变化

蔺锡桐<sup>1,2</sup> 刘加秀<sup>1,2</sup> 张树超<sup>1,2</sup>

(1 青岛大学基础医学院免疫学系, 山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院输血科)

**[摘要]** 目的 分析富血小板血浆(PRP)-80℃深低温短期保存以后,其内P-选择素、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源生长因子(PDGF)浓度及其pH值等重要指标的变化,为PRP低温储存提供理论依据。方法 取30例健康供者血液制备的PRP,每份样本分成5份,每份留取0.5 mL,分别为A组(新鲜组)和B~E组(分别冻存5、10、15、20 d)。测定各组PRP的pH值;ELISA法测定各组PRP中P-选择素、PDGF和VEGF的水平;血管形成实验检测A组和E组对HUVEC细胞血管形成能力的影响。结果 各组pH值比较差异无显著性( $P>0.05$ );各组PRP中P-选择素、PDGF、VEGF的浓度比较,差异均无显著性( $P>0.05$ );A组和E组中HUVEC血管形成数量比较差异无显著意义( $P>0.05$ )。结论 -80℃深低温保存PRP对其pH值、P-选择素、VEGF和PDGF浓度变化无显著影响,可延长PRP临床应用时间。

**[关键词]** 富血小板血浆;低温保存;P选择素;血管内皮生长因子类;血小板源性生长因子;氢离子浓度

**[中图分类号]** R457.14;R318.52

**[文献标志码]** A

**Changes in cytokines in platelet-rich plasma after short-term cryopreservation at -80℃** LIN Xi-tong, LIU Jiaxiu, ZHANG Shuchao (Department of Immunology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To analyze the changes in important indicators such as P-selectin, vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and pH value in platelet-rich plasma (PRP) after short-term cryopreservation at -80℃, and to provide a theoretical basis for the low-temperature storage of PRP. **Methods** Each of PRP samples prepared from the blood from 30 healthy donors was divided into 5 aliquots, with 0.5 mL retained per aliquot. These samples were designated as group A (fresh sample) and groups B to E (cryopreservation for 5, 10, 15, and 20 d, respectively). The pH values of the five groups were measured. The concentrations of P-selectin, PDGF, and VEGF in each group were determined by the ELISA method. The effect of groups A and E on the vascular formation capacity of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was determined by the angiogenesis assay. **Results** No significant differences were observed in the concentrations of P-selectin, PDGF, and VEGF as well as the pH values between group A and groups B to E ( $P>0.05$ ). Compared with the fresh sample (group A), the number of vessels formed from HUVECs in the sample frozen for 20 d (group E) was basically the same, with no significant differences ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The cryopreservation of PRP at -80℃ has no significant effects on its pH value and concentrations of P-selectin, VEGF, and PDGF, thus extending the clinical application time of PRP.

**[KEY WORDS]** Platelet-rich plasma; Cryopreservation; P-selectin; Vascular endothelial growth factors; Platelet-derived growth factor; Hydrogen-ion concentration

富血小板血浆(PRP)是自体全血经由离心浓缩制得的血液制品,其主要成分为浓缩后的血小板<sup>[1]</sup>。血小板内含有多种细胞器,包括 $\alpha$ -颗粒、致密颗粒和溶酶体等,其中 $\alpha$ -颗粒中包含大量生长因子。PRP受刺激后会脱颗粒释放大量的生长因子,如P-选择素、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源生长因子(PDGF)等<sup>[2]</sup>,这些因子通过相互介导,可形成广泛且多层次的信号分子调控网络,促进成纤维细胞、神经胶质细胞、上皮以及内皮细胞的增殖,加速伤口愈合和组织修复<sup>[3]</sup>。目前PRP多用于退行性

疾病、难愈性创面修复、急慢性损伤、烧伤和角膜损伤等多种临床疾病的治疗,已被广泛应用于运动医学科、康复医学科、心脏外科、妇科、整形外科和眼科等多个学科领域<sup>[4]</sup>。PRP治疗的一个疗程多为1~3周,但其常规保存期只有5 d,超过保存期以后的PRP由于理化性质等方面的改变会导致PRP失活,致血液浪费。因此,如何长期保存PRP是目前临床的一大难题。本研究通过将PRP在-80℃深低温短期保存后,比较冷冻前后其pH值的变化,以及其内P-选择素、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源生长因子(PDGF)等重要生长因子浓度的变化,为PRP低温储存提供理论依据。现将结果报告如下。

**[收稿日期]** 2024-02-16; **[修订日期]** 2024-05-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81502246)

**[通讯作者]** 张树超, Email: shuchaozhang@126.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器和试剂

多功能酶标分析仪、-80 °C 冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),正置倒置一体荧光显微镜(美国 Discover Echo 公司),笔式 pH 计(上海般特仪器有限公司),凝血酶(批号 No.721N031,北京索莱宝公司,终浓度为  $1 \times 10^5$  U/L);ABW 基质胶(批号 20223019ZHA,上海诺娃医药科技有限公司);VEGF-ELISA 试剂盒(批号 25319591007,武汉博士德生物工程有限公司);PDGF-ELISA 试剂盒(批号 7WKTNPQ1JD)和 P-选择素-ELISA 试剂盒(批号 KL048RN06998)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 对象及其分组

选取 30 例自愿献血者的 PRP 样本。纳入标准:①均符合我国国家标准中对献血者的体检以及血液检查的要求;②年龄 18~55 岁者;③体质量 50~82 kg 者;④身体健康无传染病,并在 1 周内未服用过干扰血小板的药物者;⑤PRP 的计数纳入标准约为  $(1\ 081.30 \pm 115.66) \times 10^9/L$  者。将每例 PRP 分装成 5 份,每份 0.5 mL,分别为 A~E 组。A 组为新鲜 PRP,B~E 组分别置于 -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 的 PRB。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 各组 PRP 的 pH 值测定** 使用笔式 pH 计测定 A~E 组 PRP 的 pH 值。其中 B~E 组 PRP 在从冰箱取出以后,需要先解冻至室温状态,再进行测量。

**1.3.2 ELISA 方法测定各组 PRP 中 P-选择素、PDGF 和 VEGF 的水平** 将凝血酶用生理盐水配成浓度为  $1 \times 10^5$  U/L 的溶液,加入无水氯化钙溶解,按照  $Ca^{2+}$ :凝血酶为 40 g/L:  $1 \times 10^5$  U/L 的比例配置激活溶液。分别取 A~E 组 PRP 样品,按照 1 mL 的 PRP 中加入 40  $\mu$ L 激活溶液配比激活 PRP,静置 2 h 后,以 15 000 r/min 离心 10 min,取上层血清。严格按照各细胞因子的 ELISA 试剂盒说明书中的要求进行操作,在加入终止液后立即用多功能酶标仪测量波长 450 nm 处的吸光度值,并根据各自标准曲线,带入所测得吸光度值,计算血清中 P-选择素、PDGF 和 VEGF 水平。

**1.3.3 细胞培养** 将 HUVEC 细胞置于含有 10% 的 FBS 的 DMEM 培养基中,于 37 °C、含体积分数

0.05 CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行常规培养,待细胞密度达 70%~80% 时进行换液传代,传至第三代的细胞用于后续实验。

**1.3.4 HUVEC 细胞血管形成实验** ①将 ABW 基质胶和不含胎牛血清的 DMEM 培养液按照 1:2 比例稀释,取 24 孔板,每孔加入 200  $\mu$ L 基质胶稀释液,置于 37 °C 恒温培养箱中 45 min 使其凝固;②取 A 组与 E 组 PRP 血清分别加入到含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中混匀,留待备用;③将生长状态良好的第三代 HUVEC 细胞以胰酶消化,分为两份,以 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,分别用配制好的含有 A 组与 E 组 PRP 血清的混合培养基重悬,调整 HUVEC 细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,待基质胶凝固后于 24 孔板中每孔中加入 200  $\mu$ L 细胞重悬液,使得每孔中细胞数量约为  $2 \times 10^5$  个,置于 37 °C 细胞培养箱中培养 3 h,使用正置显微镜观察 HUVEC 细胞血管形成的数量。

### 1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.0 对数据进行统计分析和图像处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验。A 组和 E 组 HUVEC 细胞的血管形成数量比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组 PRP 的 pH 值以及 PDGF、P-选择素、VEGF 水平比较**

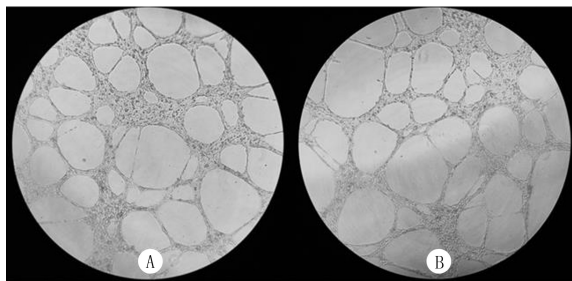
A~E 组 PRP 的 pH 值比较差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ),各组中 P-选择素、PDGF 和 VEGF 的水平比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 PRP 在不同保存条件下 pH 值及细胞因子水平比较 ( $n = 30, \bar{x} \pm s$ )

分组	pH 值	PDGF 水平 ( $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	P-选择素水平 ( $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	VEGF 水平 ( $\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
A 组	7.02 $\pm$ 0.37	2.68 $\pm$ 0.38	2.61 $\pm$ 0.32	0.45 $\pm$ 0.04
B 组	6.93 $\pm$ 0.46	2.54 $\pm$ 0.35	2.54 $\pm$ 0.36	0.43 $\pm$ 0.06
C 组	7.04 $\pm$ 0.37	2.56 $\pm$ 0.51	2.70 $\pm$ 0.42	0.45 $\pm$ 0.04
D 组	6.91 $\pm$ 0.35	2.47 $\pm$ 0.44	2.65 $\pm$ 0.50	0.44 $\pm$ 0.04
E 组	6.85 $\pm$ 0.24	2.46 $\pm$ 0.43	2.58 $\pm$ 0.41	0.46 $\pm$ 0.07

**2.2 PRP 中的生长因子对于 HUVEC 血管形成的影响**

A 组和 E 组中 HUVEC 的血管形成数量分别为  $(49.67 \pm 3.79)$ 、 $(50.00 \pm 1.00)$  个,两组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见图 1。



A、B 分别表示 A 组和 E 组,100 倍

图 1 在不同保存条件下 PRP 中生长因子对 HUVEC 血管形成的影响

### 3 讨论

PRP 中血小板的浓度远高于生理基线,在受到刺激后血小板会释放大量与创伤愈合相关的生长因子和黏附蛋白,从而启动细胞和组织的修复并加快其进程<sup>[5-7]</sup>。PRP 释放的大量生长因子能通过自分泌、旁分泌和内分泌等机制启动损伤修复级联反应,通过刺激细胞的迁移和增殖、血管生成和基质的合成等途径,启动和促进伤口的愈合和修复<sup>[8]</sup>。

近些年来 PRP 已被开发应用于临床中的多个学科<sup>[9-14]</sup>。PRP 治疗每疗程多不超过 3 次,时间间隔多为 1~3 周。据此,本研究探索 -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 后 PRP 的 pH 值及其内各种细胞因子的变化,研究结果可为临床应用提供依据。

离体后的血小板失去细胞内环境的保护作用会变得极其脆弱,容易受剧烈震荡、温度和 pH 值变化等影响而引起血小板的聚集和碎裂,从而影响其生物学功能。常规在临床上 PRP 多在 (22±2)°C 的恒温振荡箱中保存,并且保存时间不超过 5 d<sup>[13]</sup>。依靠这种常温振荡保存方法,PRP 保存时间短、易污染和功效易降低或失活等缺点给临床治疗带来诸多不便,还需要对患者进行频繁血液样本采集,为患者带来巨大精神和经济压力。因此,在不损害 PRP 功能的前提下对其进行冻存也已成为关注热点之一。随着深低温冰箱的推广,本研究分析 PRP 储存在 -80 °C 冰箱后其 pH 值及各种因子水平的变化,以探索延长 PRP 临床应用时间的方法。

PRP 发挥生理功能的最适 pH 值约为 6.5~7.2,在常温保存过程中,PRP 仍会进行有氧代谢和糖酵解等新陈代谢,糖酵解产生的乳酸和氢离子积累到一定浓度时会使得 PRP 的 pH 值迅速下降,当 pH 值下降至 6.0~6.1 时,血小板形态由圆盘状变为圆球状,并且此不可逆的形态变化伴随血小板数量下降和释放的各类生长因子生物学功能的完全丧

失<sup>[15]</sup>。低温能够减慢其新陈代谢进程,降低乳酸的生成和积累,维持血浆缓冲作用。本研究结果显示,新鲜 PRP 及 -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 的 PRP 比较,各组的 pH 值不存在显著差异,说明在 -80 °C 冻存条件下能够延缓 PRP 糖酵解作用引起的乳酸堆积,延缓 pH 下降的速度,延长保存时间。

血小板释放的各种生长因子中,PDGF 是一种刺激组织细胞生长的肽类调节分子,生理状态下存在于血小板 α 颗粒中<sup>[16]</sup>。有研究表明,PDGF 在早期发育阶段能通过结合 PI3K/Akt、JAK/STAT 和 Src 等多条跨膜酪氨酸通路促进细胞有丝分裂和趋化,从而刺激伤口处成纤维细胞、平滑肌细胞和其他细胞的分裂增殖<sup>[17-18]</sup>。在后期成熟期,PDGF 则可促进组织重塑以及特殊细胞的分化<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,新鲜 PRP 及 -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 的 PRP 比较,各组中 PDGF 含量无显著差异,提示冻存的 PRP 在 PDGF 水平释放上可以满足临床应用需求。

VEGF 是一类重要的具有促血管生成活性的生长因子,对 endothelial 细胞有促进有丝分裂和抗凋亡作用,能够增加血管通透性,促进细胞迁移<sup>[20]</sup>。既往研究显示,VEGF 可以通过 PLCγ-ERK 和 PLCγ-PKC 通路来调节细胞增殖,从而促进创面愈合<sup>[21]</sup>。同时,VEGF 是促进血管和淋巴管形成的重要因子,新生的血管和淋巴管可为创面组织的新生和修复供应充足的养分,促进伤口的愈合<sup>[22-23]</sup>。本研究中,新鲜 PRP 及 -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 的 PRP 比较,各组中 VEGF 含量比较无显著差异;同时新鲜 PRP 和 -80 °C 冻存 20 d 的 PRP 对 HUVEC 血管形成能力的影响也无显著差异。提示冻存 5、10、15、20 d 并不会对 PRP 的 VEGF 浓度造成影响,在促进新生血管的生成中的作用与新鲜 PRP 相近。

另外,血小板中的 P-选择素作为黏附分子家族一员,能够介导粒细胞和单核细胞在 endothelial 细胞表面的滚动以及血小板之间的黏附作用,不仅能够参与细胞间和细胞-细胞外基质的相互作用,调节参与信号转导途径和炎症的发生发展<sup>[24]</sup>,而且是在血栓形成和凝血过程中发挥有重要作用<sup>[25]</sup>。P-选择素能够易位到活化后的血小板表面,支持血小板-血小板之间的相互作用,促进血栓形成和凝血<sup>[26]</sup>。不仅如此,P-选择素还能够促进损伤部位对白细胞的募集,此行为能够加速炎症的早期进程<sup>[27]</sup>。本研究中,PRP 在 -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 后,与新鲜 PRP 释放的 P-选择素比较,并无显著差异。可见,P-选

择素在冰冻 20 d 后仍能发挥其正常生物学功能。

综上所述, -80 °C 冻存 5、10、15、20 d 均不影响 PRP 中 PDGF、P-选择素和 VEGF 等重要生长因子的含量及其生物学功能, 同时能够显著延缓其 pH 值下降的速度, 较长时间维持 PRP 功能。该研究结果为临床长时间保存 PRP 提供了一定的理论依据。

**伦理批准和知情同意:** 本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL28419)。所有试验过程均遵照《实验室安全管理守则》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

**作者声明:** 蒯锡桐、张树超参与了研究设计, 蒯锡桐、刘加秀、张树超参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文, 且均声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

[1] AKGÜL A, CIRAK M, BIRINCI T. Applications of platelet-rich plasma in lymphedema[J]. *Lymphat Res Biol*, 2016, 14(4):206-209.

[2] GUPTA S, PALICZAK A, DELGADO D. Evidence-based indications of platelet-rich plasma therapy[J]. *Expert Rev Hematol*, 2021, 14(1):97-108.

[3] XU J, GOU L, ZHANG P, et al. Platelet-rich plasma and regenerative dentistry[J]. *Aust Dent J*, 2020, 65(2):131-142.

[4] ZHANG J Y, FABRICANT P D, ISHMAEL C R, et al. Utilization of platelet-rich plasma for musculoskeletal injuries: An analysis of current treatment trends in the United States[J]. *Orthop J Sports Med*, 2016, 4(12):2325967116676241.

[5] ANDIA I, ABATE M. Platelet-rich plasma: Underlying biology and clinical correlates[J]. *Regen Med*, 2013, 8(5):645-658.

[6] NURDEN A T. Platelets, inflammation and tissue regeneration[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(Suppl 1):S13-S33.

[7] COLLINS T, ALEXANDER D, BARKATALI B. Platelet-rich plasma: A narrative review[J]. *EFORT Open Rev*, 2021, 6(4):225-235.

[8] MARX R E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? [J]. *Implant Dent*, 2001, 10(4):225-228.

[9] ALIO J L, RODRIGUEZ A E, FERREIRA-OLIVEIRA R, et al. Treatment of dry eye disease with autologous platelet-rich plasma: A prospective, interventional, non-randomized study [J]. *Ophthalmol Ther*, 2017, 6(2):285-293.

[10] GIUSTI I, D'ASCENZO S, MACCHIARELLI G, et al. *In vitro* evidence supporting applications of platelet derivatives in regenerative medicine[J]. *Trasfusione Del Sangue*, 2020, 18(2):117-129.

[11] BRASS L F. Thrombin and platelet activation[J]. *Chest*, 2003, 124(3 Suppl):18S-25S.

[12] EVERTS P A, KNAPE J T, WEIBRICH G, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review[J]. *J Extra Corpor Technol*, 2006, 38(2):174-187.

[13] 潘宗岱, 薛静, 孙士鹏, 等. 血小板及其衍生物的保存方案和应用进展[J]. *临床血液学杂志*, 2022, 8(12):900-904.

[14] ZIEGLER M E, STABEN A, LEM M, et al. Targeting myofibroblasts as a treatment modality for dupuytren disease[J]. *J Hand Surg Am*, 2023, 48(9):914-922.

[15] 李秋燕, 夏志杨, 熊小敏. 单采血小板储存时间对 pH 值和乳酸含量的影响观察[J]. *中国现代药物应用*, 2020, 14(15):237-239.

[16] CECERSKA-HERYŃ E, GOSZKA M, SERWIN N, et al. Applications of the regenerative capacity of platelets in modern medicine[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 64:84-94.

[17] FREDRIKSSON L, LI H, ERIKSSON U. The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(4):197-204.

[18] PATSCH C, CHALLET-MEYLAN L, THOMA E C, et al. Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(8):994-1003.

[19] ANTONIADES H N. PDGF: A multifunctional growth factor [J]. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1991, 5(4):595-613.

[20] MELINCOVICI C S, BOŞCA A B, ŞUŞMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Rev Roum De Morphol Embryol*, 2018, 59(2):455-467.

[21] ZHANG X, YAO D, ZHAO W Y, et al. Engineering platelet-rich plasma based dual-network hydrogel as a bioactive wound dressing with potential clinical translational value [J]. *Adv Funct Materials*, 2021, 31(8):2009258.

[22] KARAMAN S, LEPPÄNEN V M, ALITALO K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease [J]. *Development*, 2018, 145(14):dev151019.

[23] MOLENAAR T J, TWISK J, DE HAAS S A, et al. P-selectin as a candidate target in atherosclerosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(5):859-866.

[24] YEINI E, SATCHI-FAINARO R. The role of P-selectin in cancer-associated thrombosis and beyond[J]. *Thromb Res*, 2022, 213(Suppl 1):S22-S28.

[25] PALABRICA T, LOBB R, FURIE B C, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets[J]. *Nature*, 1992, 359(6398):848-851.

[26] GENG J G, CHEN M, CHOU K C. P-selectin cell adhesion molecule in inflammation, thrombosis, cancer growth and metastasis[J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(16):2153-2160.

[27] ANDRÉ P. P-selectin in haemostasis [J]. *Br J Haematol*, 2004, 126(3):298-306.