

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.032

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190122.2030.026.html>(2019-01-23)

富血小板血浆制备技术及其抗菌效应的研究进展*

刘泉体, 兰 婷 综述, 吴佳奇[△] 审校

(西南医科大学附属中医医院创伤外科, 四川泸州 646000)

[摘要] 富血小板血浆(PRP)由于其促进组织修复的能力近年来已逐渐应用于临床,在治疗一些难愈性创面或者感染性创面上有独特的优势,然而其制备技术目前尚无统一标准,关于其抗菌效应的具体机制尚不明确,本文就 PRP 制备技术及抗菌效应的研究进展进行综述。

[关键词] 富血小板血浆;制备技术;抗菌效应

[中图分类号] R459.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)09-1572-04

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是指全血经过离心、分离而得到的高度浓缩的产物,其血小板水平通常为正常全血的 4~5 倍以上。JMARX^[1]对 PRP 中血小板的有效浓度定义为 1×10^6 个/ μL ,并指出较低的浓度不能改善创面愈合,更大的浓度并未显示更好的效果。根据其所含血小板、纤维蛋白和白细胞浓度的不同,进一步分为:纯 PRP(P-PRP),含白细胞 PRP(L-PRP),纯富血小板纤维蛋白(P-PRF),含白细胞的 PRF(L-PRF)这 4 大类别。人们常说的 PRP,是指的 L-PRP。随着研究的逐渐深入,其组织修复效应和独特的抗菌效果逐渐被认识,在临床上将其运用于手术中预防术后感染及某些难治感染性创面^[2]。不过,PRP 的制备方法较多,并无统一标准^[3]。导致其成品中所含成分的比例各不相同,对其抗感染的具体机制尚不明确,对其所含成分的抗感染作用尚有争议。因此,本文就 PRP 的制备技术及抗菌效应的研究进展进行论述。

1 PRP 的制备技术

1.1 制备原理 目前为止,PRP 制剂形态除了液状和凝胶状外,还有粉末状^[4],目前仍以液状居多。其制备方法主要是密度梯度离心法及血浆分离置换法,后者利用多功能医用血成分自动分离设备采集并浓缩血小板,应用于血库血小板的采集和临床成分输血,虽然其制备的血小板浓度和纯度较高,但其设备昂贵,限制了其在临床上的应用。实验研究及临床上许多商业化 PRP 设备采用密度梯度离心法,其原理是根据血液中的各组分离沉降系数不同,在离心状态下各自分层,从而易于提取。

1.2 离心血的采集,抗凝剂、离心管的选择 血液的选择通常分为新鲜与冷冻血,自体血与异体血,血液质量的好坏直接关系到 PRP 的质量。临床上制备 PRP 多使用新鲜的自体血,通常这是最优的选择。但当患者有某些血液系统疾患、大量失血或输液导致自

身血小板浓度异常时,参照普通制备方法可能导致最终血小板浓度不能满足治疗需求,需要调整制备方法或者使用异体血。另外,冷冻的异体血不可避免地存在细胞的破坏和血小板的损伤,其制备的 PRP 效果不如新鲜全血。还有学者认为,使用较粗的针头采血效果会更好。

离心管的选择,决定于 PRP 的使用目的,需要量大小,血小板基线水平及所采用方法的血小板回收率。目前尚没有哪项技术条件能够达到百分百的血小板回收率。所以,当需要 1 mL 的 PRP 时,需要的全血量可能会是 5~10 mL 或者更多。若采用的离心力较大,一次性使用塑料采血管是不错的选择。不过,临床上所使用的采血管容量均较小,对于需要大量使用 PRP 的患者,需要大容量的离心管。另外,还有一些商业化设备配套离心管,如医疗美容所用的 Tubex 管,优化了分离装置,能够使红细胞彻底清除,制备 PRP 时简单易操作,但价格较贵,尚未普及。总之,不管是哪种离心管,都应强调无菌观念。

离体的血液会自发启动凝血过程,为了避免血小板在使用前的过早激活,通常会使用抗凝剂。常在乙二胺四乙酸盐(EDTA)和枸橼酸盐中选择,通常 EDTA 用于全血细胞计数,枸橼酸盐用于凝血或者血库血的保存。考虑到 EDTA 可能损害血小板膜,因此,制备 PRP 时选择枸橼酸钠或枸橼酸葡萄糖(ACD)制剂^[5],其原理是通过与血液中的钙离子形成螯合物,终止其凝血途径而防止血小板聚集。研究发现,枸橼酸钠和 ACD-A 溶液在 pH 值上差异较大,ACD-A 的 pH 值为 4.9,3.8% 的枸橼酸钠 pH 值为 7.8。而 PRP 的 pH 和细胞外钙离子浓度的改变可影响体外血小板聚集,聚集通常在酸性 pH 和低钙时减少^[6]。此外,某些存在于血小板中的抗菌肽在较低 pH 值时,能够发挥更大的抗菌效应。

1.3 离心设备的选择及温度的设定 由于离心方法

* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会课题(130280)。 作者简介:刘泉体(1993-),在读硕士研究生,主要从事创伤骨科方面研究。

[△] 通信作者, E-mail: wujiqi15@163.com。

的不同,各实验室的条件差异,目前无统一的离心机标准。通常而言,低速离心机已满足离心要求,值得注意的是,常温的台式离心机离心的速度越大,采血管表面的温度越高,可达到 $(40\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 。而血小板的常规保存温度是 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$,过高的温度会导致血小板的提前激活,所以,美国血库学会(AABB)推荐 PRP 的离心温度为 $21\sim 24^{\circ}\text{C}$ 。此外,许多学者在离心过程中使用了 $12\sim 16^{\circ}\text{C}$ 的温度水平获得了最佳血小板回收率^[7]。所以,恒温离心机是较优的选择。

1.4 离心力、次数、转速、时间的选择 离心力的大小与转速和离心半径相关。公式表达为:相对离心力(RCF) $=1.118\times 10^{-6}\times R\times W^2$ (R为离心半径,单位为cm;W为每分钟转速,单位为r/min)。国内有些文章在描述制备 PRP 的过程时,只提到了离心的转速及时间,没有提及离心半径,无法知晓其离心力的大小,这种表达方式是不规范的。对于一个固定的离心机而言,离心半径大多是固定的,所以,离心力的数值是不能随意设置的。离心力大小的选择,还取决于离心次数,目前仍无统一标准。

通常制备 PRP 可以分为一次离心法,二次离心法及三次离心法。一次离心法虽然操作简单,但血小板回收率不足限制了其应用;并且,一次离心法往往会使用较大的离心力。研究发现,当离心力大于 $250\times g$ 时,会造成血小板破坏过多。如果治疗所需的 PRP 量少而采集的血液较多时,为了提高血小板的富集倍数,增大离心力是可行的。此外,三次离心法相比二次离心法而言,操作繁琐,虽然可以提取到浓度更纯的 PRP,但也会导致血小板回收率的下降。因此,二次离心法更适合制备新鲜 PRP^[8]。

经典的二次离心法包括:PETRUNGARP 法(第 1 次 $1\ 500\times g$ 离心 6 min,第 2 次 $1\ 000\times g$ 离心 6 min)、LANDESBURG 法(两次均为 $200\times g$ 离心 10 min)、AGHALOO 法(第 1 次 $215\times g$ 离心 10 min,第 2 次 $863\times g$ 离心 10 min)。由于都是手工制备,影响因素较多,哪种方法更优无明确结论,目前国际上也没有统一的标准。不断有学者在此基础上进行探索,如 SHIN 等^[9]以比格犬静脉血制备 PRP 的研究方法发现,第 1 次离心 $1\ 000\times g$ 离心 5 min,血小板回收率最高;第 2 次 $1\ 500\times g$ 离心 15 min,可以回收血小板浓缩率达到 6 倍的 PRP。YIN 等^[10]抽取 80 名健康志愿者新鲜全血,分别设计研究了第 1 次及第 2 次离心的最佳条件,发现在第 1 次 $160\times g$ 离心 10 min,第 2 次 $250\times g$ 离心 15 min 的离心条件下,血小板和生长因子的保存及浓缩效果明显提高,是制备 P-PRP 的最佳方法。王淑君等^[8]探讨了离心血量和制备方法的关系并认为,200 mL 全血采用第 1 次 $850\times g$ 离心 8 min,第 2 次 $4\ 650\times g$ 离心 5 min;300 mL 全血第 1 次 $1\ 000\times g$ 离心 6 min,第 2 次 $4\ 650\times g$ 离心 5 min;400 mL 全血第 1 次 $1\ 220\times g$ 离心 5 min,第 2 次 $4\ 650\times g$ 离心 6 min,是制备 PRP 最佳条件。AM-

ABLE 等^[11]研究了温度变化对 PRP 的影响,认为离心血量为 4.5 mL 时,第 1 次离心控制温度为 18°C , $300\times g$ 离心 5 min;第 2 次离心时 18°C , $700\times g$ 离心 17 min 是制备 PRP 的最佳条件。PEREZ 等^[12]使用 3.5 mL 人血制备 PRP 时,第 1 次离心 $100\times g$ 离心 10 min,第 2 次离心 $400\times g$ 离心 10 min,丢弃 2 次离心后 2/3 的上清液,血小板回收率可达到 $70\%\sim 80\%$,浓度提高 5 倍,并且维持了血小板的完整性和活性。该作者认为时间和加速度是确定第 1 步离心后 PRP 样品成分的关键,血小板大小^[13]、个体间的生物差异、红细胞容积变异等因素对血小板浓度均有影响。离心后手动混合的时间短,难以完全重悬血小板,大约 20%的血小板仍然吸附在红细胞颗粒中,因此容易出现血小板计数时变异较大的情况。

由于众多的研究并无统一的实施标准,且大多数研究没有提供足够的信息来允许该实验被重现,所以,研究之间缺乏可比性,读者能获取的有效信息仍不足^[14]。张长青等^[15]研究认为,盲目采取文献中报道的离心力和离心时间是不可取的,必须根据实际情况,制订出与设备相配套的离心方法,才能制备出有效的 PRP。本文认为,制备 PRP 的影响因素较多,在许多医疗机构并不具备实施相关研究的条件下,参考文献中的方法仍是获得技术指导的重要途径,第 1 次离心时选择较小离心力($200\times g$ 左右)可以减少血小板在红细胞间隙的沉积和第 1 次转移时的损耗,第 2 次离心力可以稍大($700\times g$ 左右),可以提高血小板回收率和避免血小板在高离心力的作用下大量被破坏激活而影响使用效果。

2 PRP 的抗菌效应

2.1 抗菌机制 近年来,越来越多的文献证实,PRP 无论在体内和体外均具有抗菌和抗炎活性,目前对 PRP 的抗菌效应研究,集中在其所含的高浓度血小板和白细胞方面。血小板具有直接和间接的抗菌效应,一方面,血小板最早参与微生物病原体的识别,激活并招募其他免疫细胞参与宿主防御,使感染迅速控制在局部。另一方面,血小板分泌抗菌肽和细胞因子源性肽(Kinocidins),其独特的分子结构和携带的表面电荷,是其发挥直接抑菌作用的重要基础^[16]。一些抗菌肽可以通过破坏细菌细胞膜,抑制微生物 RNA 合成、脂质络合、蛋白合成或蛋白折叠,灭活细菌毒素,激活细菌的自溶系统,进而发挥抗菌效应^[17-18]。由于血小板特殊的结构和功能性质,其介导炎症细胞的趋化和免疫细胞的调节也在其抗菌效应中发挥一定作用。

对于 PRP 所含白细胞的抗菌效应,目前仍有争议^[19]。在人体血液系统中,白细胞在天然宿主防御中起着重要作用,其可以介导细胞免疫,通过各种细胞因子和生物蛋白趋化、聚集和活化巨噬细胞、中性粒细胞,吞噬病原微生物,所以很多人都认为白细胞增加了 PRP 的抗菌作用^[20]。然而,事实可能并非如此。

如 MARIANI 等^[21]通过体外抗菌实验研究了含不同白细胞的 PRP 制剂对一些细菌的抗菌效应,得出结论,认为白细胞的存在并不会增加血小板在体外的杀菌活性。

2.2 PRP 抗菌谱 目前已有一些体外抑菌实验验证 PRP 或者富血小板凝胶(platelet-rich gel, PRG)对某些细菌的抗菌作用,这些研究认为 PRP 及 PRG 对包括甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希杆菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯杆菌、白色念珠菌、口腔链球菌、痤疮丙酸杆菌等可能存在抗菌效应。此外,近期研究显示 PRP 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)也有抗菌活性;不过,由于研究者技术的差异、细菌菌种、毒力、浓度的差异,在抑菌实验中即便是对同种细菌也可能显示出不同结果。如 MAGHSOUDI 等^[22]体外抑菌实验表明,二次离心法制备的 PRP 对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、无乳链球菌、志贺菌属有抑菌效应,对铜绿假单胞、肺炎克雷伯杆菌、沙雷菌属无抑菌作用,全血和 PPP 对上述细菌无任何抑菌效果。该作者认为血小板发挥的是抑菌而非杀菌作用,并且血小板含量越高,效果越强。而 CETINKAYA 等^[23]研究表明,PRP 和 PPP 在体外对 MRSA、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌有抑制作用。因此,目前为止,PRP 及其衍生制品的抗菌谱仍需进一步探索。

2.3 抗菌效应临床研究 血小板可以通过脱颗粒作用释放包括血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、胰岛素样生长因子(IGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、表皮样生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)在内的多种生长因子,以及趋化因子、黏蛋白、抗纤维溶蛋白等物质,在组织的修复、血管的生成、细胞的诱导分化等方面发挥重要作用。临床上将其应用于软组织的修复已不少见,但是,鉴于 PRP 在促进组织修复的同时所展现出来的独特抗菌效应,逐渐有人将其运用于各种感染性创面的临床研究中。如 CHEN 等^[2]以 60 例难治性下肢伤口感染患者为研究对象,以自体 PRG 和生理盐水作对比处理伤口,通过 7 d 的治疗及随访患者的治愈时间,发现自体 PRG 可减少创面面积,减少创面细菌的数目,缩短创面愈合时间,减少并发症的发生。SERRAINO 等^[24]为了研究 PRP 能否在心脏外科手术中降低胸骨切口浅部及深部感染的概率,以 1 093 例接受了胸骨正中切开的心脏手术的患者为研究对象,将患者分为 A、B 两组,A 组患者在手术完成切口关闭时不使用 PRP,而 B 组患者在关闭切口前使用 PRP。实验数据表明,A 组患者的深部切口感染明显比 B 组要高(1.5% vs. 0.20%, $P < 0.05$);并且 A 组患者的浅表切口感染也明显高于 B 组(2.8% vs. 0.5%, $P < 0.05$),由此得出结论,认为 PRP 的应用明显地降低了胸骨切口浅表和深部的感染率。此外,另外一项纳入 2 000 例行了开胸手术的研究也证实了

PRP 可以有效降低术后伤口感染等并发症的发生率,并建议所有接受胸骨切开术的患者,应考虑常规使用 PRP^[25]。不过,并非所有研究都能验证 PRP 的抗感染效果,一项荟萃分析纳入了完全随机对照和非完全随机对照试验,共 1 316 例行全膝关节置换术的患者以评估 PRP 的使用价值和安全性,却发现 PRP 与安慰剂的感染发生率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)^[26]。SANGIOVANNI 等^[27]比较纳入了 500 例足踝手术患者的前瞻性对照研究也发现,术中应用 PRP 并不能降低术后感染或伤口延迟愈合的发生率。所以,PRP 的抗感染效应需要更多大型的随机对照试验研究以证实。不过,也不能因此而拒绝使用 PRP 技术,毕竟,其强大的组织修效应才是人们更应关注的内容。

3 结 语

综上所述,目前对于 PRP 的制备仍然缺乏一个统一的标准,影响其最终成品的因素较多,包括离心力、离心时间、离心温度、采血管、抗凝剂的选择、供血者的个体差异、人员的操作技术、离心设备条件等。PRP 有其独特的抗菌谱并逐渐完善,并且 PRP 中所含成分复杂,在某些体外抑菌实验中表现出的抗菌效应背后有极多的内容需要探索。此外,随着临床上耐药菌株的不断出现,PRP 与抗生素的联合使用可能会成为新的方向,相信 PRP 这项极具实用价值的技术最终会在临床上普及并造福人类。

参考文献

- [1] JMARRX R E. Platelet-rich plasma(PrP): What is PrP and what is not PrP[J]. *Implant Dent*, 2001, 10(4): 225-228.
- [2] CHEN Z H. A study on the therapeutic effects of autologous platelet-rich plasma in the treatment of limbs refractory wound infection[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(11): 15316-15322.
- [3] KRAMER M E, KEANEY T C. Systematic review of platelet-rich plasma (PRP) preparation and composition for the treatment of androgenetic alopecia[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2018, 17(5): 666-671.
- [4] KIEB M, SANDER F, PRINZ C, et al. Platelet-Rich plasma powder: a new preparation method for the standardization of growth factor concentrations[J]. *Am J Sports Med*, 2017, 45(4): 954-960.
- [5] ANITUA E, PRADO R, SÁNCHEZ M, et al. Platelet-Rich plasma: preparation and formulation[J]. *Oper Tech Orthop*, 2012, 22(1): 25-32.
- [6] CALLAN M B, SHOFER F S, CATALFAMO J L. Effects of anticoagulant on pH, ionized Calcium concentration, and agonist-induced platelet aggregation in canine platelet-rich plasma[J]. *Am J Vet Res*, 2009, 70(4): 472-477.
- [7] DHURAT R, SUKESH M. Principles and methods of preparation of Platelet-Rich plasma: a review and author's perspective[J]. *J Cutan Aesthet Surg*, 2014, 7(4): 189-197.

- [8] 王淑君,赵广超,栾建凤,等.不同规格全血制备富血小板血浆的最佳离心条件研究[J].临床输血与检验,2017,19(2):119-122.
- [9] SHIN H S, WOO H M, KANG B J. Optimisation of a double-centrifugation method for preparation of canine platelet-rich plasma[J]. BMC Vet Res, 2017, 13(1):198.
- [10] YIN W J, XU H T, SHENG J G, et al. Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: a comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(3):2060-2070.
- [11] AMABLE P R, CARIAS R B, TEIXEIRA M V, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3):67.
- [12] PEREZ A G, LANA J F, RODRIGUES A A, et al. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma[J]. ISRN Hematol, 2015, 2014(4):176060
- [13] OZER K, KANKAYA Y, ÇOLAK Ö. An important and overlooked parameter in platelet rich plasma preparation: The mean platelet volume[J]. J Cosmet Dermatol, 2018(3):1-9.
- [14] CHAHLA J, CINQUE M E, PIUZZI N S, et al. A call for standardization in Platelet-Rich plasma preparation protocols and composition reporting: a systematic review of the clinical orthopaedic literature[J]. J Bone Joint Surg Am, 2017, 99(20):1769-1779.
- [15] 张长青,袁霆.富血小板血浆在临床应用中的争议与研究进展[J/CD].中华关节外科杂志(电子版),2016,10(6):588-591.
- [16] 李贞贞,易静,胡兴斌,等.血小板抑菌作用的研究进展[J].检验医学与临床,2017,14(17):2645-2648.
- [17] COBOS R, AIZPURU F, PARRAZA N, et al. Effectiveness and efficiency of platelet rich plasma in the treatment of diabetic ulcers[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2015, 16(7):630-634.
- [18] OTVOS J, OSTORHAZI E. Therapeutic utility of anti-bacterial peptides in wound healing[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(7):871-881.
- [19] D'ASTA F, HALSTEAD F, HARRISON P, et al. The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: a systematic review[J]. Platelets, 2018, 29(1):9-20.
- [20] CIESLIK-BIELECKA A, DOHAN EHRENFEST D M, LUBKOWSKA A, et al. Microbicidal properties of leukocyte-and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2012, 26(2 Suppl 1):S43-52.
- [21] MARIANI E, CANELLA V, BERLINGERI A, et al. Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro [J]. BMC Microbiol, 2015(15):149-160.
- [22] MAGHSOUDI O, RANJBAR R, MIRJALILI S H, et al. Inhibitory activities of platelet-rich and platelet-poor plasma on the growth of pathogenic bacteria [J]. Iran J Pathol, 2017, 12(1):79-87.
- [23] CETINKAYA R A, YENILMEZ E, PETRONE P, et al. Platelet-rich plasma as an additional therapeutic option for infected wounds with multi-drug resistant bacteria: in vitro antibacterial activity study[J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2018(5):1-11.
- [24] SERRAINO G F, DOMINIJANNI A, JIRITANO F A, et al. Platelet-rich plasma inside the sternotomy wound reduces the incidence of sternal wound infections [J]. Int Wound J, 2015, 12(3):260-264.
- [25] PATEL A N, SELZMAN C H, KUMPATI G S, et al. Evaluation of autologous platelet rich plasma for cardiac surgery: outcome analysis of 2000 patients [J]. J Cardiothorac Surg, 2016, 11(1):62-70.
- [26] LI F X, LI Y, QIAO C W, et al. Topical use of platelet-rich plasma can improve the clinical outcomes after total knee arthroplasty: A systematic review and meta-analysis of 1316 patients [J]. Int J Surg, 2017(38):109-116.
- [27] SANGIOVANNI T P, KIEBZAK G M. Prospective randomized evaluation of intraoperative application of autologous Platelet-Rich plasma on surgical site infection or delayed wound healing [J]. Foot Ankle Int, 2016, 37(5):470-477.
- (收稿日期:2018-10-03 修回日期:2018-12-26)
- (上接第 1571 页)
- [28] 杨勇,吴励歌,刘永刚,等.晚期癌痛患者大剂量吗啡持续 PCA 泵给药转换系数的回顾性研究[J].中国药师,2017,20(6):1061-1064.
- [29] CHEVILLE A L, BASFORD J R. Role of rehabilitation medicine and physical agents in the treatment of cancer-associated pain[J]. J Clin Oncol Official J Am Soc Clin Oncol, 2014, 32(16):1691-1702.
- [30] ZHANG L L, JIA Z W, XUE W X, et al. Pharmaceutical care of clinical pharmacists participating in the treatment of patients with cancer pain [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2017, 33(9):835-836, 840.
- [31] SUSMAN E. Cancer pain management guidelines issued for children; adult guidelines updated [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(10):711-712.
- [32] CAO F, WANG L, TIAN Y. Analysis of cancer analgesic drugs in our hospital during 2012—2013 [J]. Northwest J Pharmacy, 2015, 30(1):82-84.
- (收稿日期:2018-09-14 修回日期:2018-12-13)