

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.15.011

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230510.1539.007.html\(2023-05-11\)](https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230510.1539.007.html(2023-05-11))

不同离心参数对小剂量全血白膜法采血袋制备富血小板血浆回收率的影响*

张彬¹, 陆华², 宋娜丽¹, 王世春¹, 刘奇¹, 吴春曦¹, 易中梅^{1△}

(1. 陆军军医大学第一附属医院输血科/中国人民解放军重庆血站, 重庆 400038;

2. 重庆医科大学附属第二医院输血科 400010)

[摘要] **目的** 比较小剂量全血白膜法采血袋制备富血小板血浆 (PRP) 的回收率。**方法** 相同来源的全血 50、100 mL 在不同离心参数下离心, 手工分离白膜, 比较白膜层血小板回收率; 将白膜 10、20 mL 在不同离心参数下离心, 分离 PRP, 比较 PRP 血小板回收率; 对 PRP 进行血小板低渗休克反应 (HSR), 验证血小板功能。**结果** 第 1 次离心, 50、100 mL 全血分别在 470、940 g 离心 11 min 白膜层血小板回收率即达到较高水平 [(73.50±13.20)%、(71.30±11.12)%]。第 2 次离心, 10、20 mL 白膜分别在 70、100 g 离心 13 min PRP 血小板回收率达到最高水平 [(95.07±4.90)%、(85.15±2.28)%]。10 mL 白膜在 70 g 离心 13 min、100 g 离心 9 min PRP HSR 比率达到最高水平 [(53.26±3.61)%、(55.50±3.94)%]; 20 mL 白膜在 70 g 离心 17 min、100 g 离心 13 min PRP HSR 比率达到最高水平 [(59.53±6.60)%、(59.39±4.10)%]。**结论** 小剂量全血白膜法制备 PRP 可获得理想的回收率, 是现有制备剂量的补充。

[关键词] 全血; 制备; 白膜; 富血小板血浆; 比率**[中图分类号]** R457.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)15-2301-04

Effects of different centrifugation parameters on the recovery rate of platelet-rich plasma prepared by small-dose whole blood buffy coat method blood collection bag*

ZHANG Bin¹, LU Hua², SONG Nali¹, WANG Shichun¹, LIU Qi¹, WU Chunxi¹, YI Zhongmei^{1△}

(1. Department of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Army Medical University/

Chongqing Blood Bank of PLA, Chongqing 400038, China; 2. Department of

Blood Transfusion, The Second Affiliated Hospital of Chongqing

Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To compare the recovery rate of platelet-rich plasma (PRP) prepared using a small-dose whole blood buffy coat blood collection bag. **Methods** 50 mL and 100 mL of whole blood from the same source were centrifuged using different centrifugation parameters. The buffy coat was then manually separated, and the recovery rate of platelets in the buffy coat was compared. 10 mL and 20 mL of buffy coat were centrifuged using different centrifugation parameters to separate PRP, and the recovery rate of PRP platelets was compared. Platelet hypotonic shock response (HSR) was performed on PRP to assess platelet function. **Results** In the first centrifugation, 50 mL and 100 mL of whole blood were centrifuged at 470 g and 940 g for 11 minutes, respectively. The recovery rate of buffy coat platelets reached a high level, with values of (73.50±13.20)% and (71.30±11.12)% for the two samples. In the second centrifugation, 10 mL and 20 mL of the buffy coat were centrifuged at 70 g and 100 g for 13 minutes, respectively. The recovery rate of PRP platelets reached its highest level at (95.07±4.90)% and (85.15±2.28)%. The ratio of PRP HSR reached its highest level [(53.26±3.61)%, (55.50±3.94)%] when 10 mL of buffy coat was centrifuged at 70 g for 13 minutes and 100 g for 9 minutes. When a 20 mL buffy coat was centrifuged at 70 g for 17 minutes and 100 g for 13 minutes, the ratio of PRP HSR reached its highest level [(59.53±6.60)%, (59.39±4.10)%]. **Conclusion** The preparation of PRP by small-dose whole blood buffy coat method can achieve an optimal recovery

* 基金项目: 中国人民解放军军队护理创新与培育专项 (2021HL012)。 作者简介: 张彬 (1982-), 讲师/主治医师, 博士, 主要从事血液治疗研究。 △ 通信作者, E-mail: yizhongmei2010@163.com。

rate, making it a valuable addition to the current preparation methods.

[Key words] whole blood; preparation; buffy coat; platelet-rich plasma; ratio

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)在治疗难愈合性创面、关节损伤及皮肤年轻化等应用医学的效果优势,让 PRP 的制备技术也得到飞速发展^[1-2]。目前 PRP 分为手工分离制备和血细胞分离机采集(机采),机采回收率稳定,但需患者有足够的血容量及良好的心肺功能,在采集过程中,能够耐受短时间内 ≥ 400 mL 血液短暂离体。体重较轻的患者血容量较少、年纪较大的患者心功能对失血的耐受性差,采集风险较大。对于低体重又需用自体 PRP 的患者,小剂量全血白膜法血袋制备技术显得尤为重要。全血来源现有制备剂量 200、300、400 mL,采血袋制备 PRP 均有相关制备技术的报道^[3-5],为了弥补更小剂量全血采血袋制备 PRP 的研究空白,本课题组对 50、100 mL 全血不同制备参数下获得 PRP 回收率进行了比较分析,旨在确定该条件下制备 PRP 的最佳方法,更好地满足临床需求,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集相同来源的全血 50、100 mL 各 75 袋。仪器和试剂:一次性使用塑料四联采血袋(批号 210818,四川南格尔公司),50、100 mL 转移袋(批号 210401、210402,四川南格尔公司),大容量低温离心机(型号 6000i,德国 Thermo 公司),Hemax330 血球计数仪(山东烟台),CM735A 采血秤(韩国森通公司),SE250 热合机(韩国森通公司),分光光度计(型号 UNIC7200,上海尤尼柯公司)。本研究经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会审批通过[伦理批件号:(A)KY2021057]。

1.2 方法

1.2.1 分组

将相同来源的全血 50、100 mL 各 75 袋根据离心时间(9、11、13、15、17 min)分为 5 组,每组 15 例,手工分离白膜,比较白膜层血小板回收率。将白膜 10 mL \times 60 袋、20 mL \times 70 袋根据离心时间(9、13、17 min)分为 3 组,分离 PRP,在 20 mL 白膜 70 g 离心力时增加 1 组 21 min 离心时间,分组增加为 4 组,每组均为 10 例,比较 PRP 血小板回收率;同时检测并比较在该条件下 PRP 血小板低渗休克反应(hypotonic shock response, HSR)比率,每组各 6 例。

1.2.2 确定离心力

第 1 次离心:根据团队前期制备浓缩血小板的经验参数(1 875 g, 22 °C, 15 min)^[6],离心时间及温度不变,均使用 100 mL 转移袋,倍比下降整数设置离心力梯度,依次为 940、470、240 g。肉眼观察白膜层的紧实度适宜:全血取出时,白膜层无浑浊,分离时白膜层上浮无附壁。50、100 mL 全血分别确定离心力为

470、940 g。第 2 次离心:参照参数(70~100 g, 22 °C, 10 min)^[7-8],离心时间及温度不变,均使用 50 mL 转移袋,设置离心力梯度为 100、70 g,肉眼观察红细胞下沉的紧实度适宜,10、20 mL 白膜分别确定离心力为 70、100 g。

1.2.3 制备 PRP

将 50、100 mL 全血进行第 1 次离心,分别按照 470、940 g, (22 \pm 2)°C, 9、11、13、15、17 min 离心,分离白膜层为 10、20 mL,分离后静置 1 h, 震荡 30 min, 测量白膜层血小板计数, 计算白膜层血小板回收率。将白膜 10、20 mL 分别以 70、100 g, (22 \pm 2)°C, 9、13、17、21 min(仅在 70 g 比较)进行第 2 次轻离心,分离 PRP, 静置 1 h, 震荡 30 min, 检测血小板计数, 计算 PRP 血小板回收率。

1.2.4 测定 HSR 比率

PRP 用自身贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP)稀释至血小板 $200 \times 10^9/L \sim 400 \times 10^9/L$, 与 PPP、蒸馏水均置于 37 °C 保温, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4, PPP 与 PBS 按 2:1 的体积比混合调零, PRP 与 PBS 按 2:1 的体积比混合作为对照管, PRP 与蒸馏水按 2:1 的体积比混合作为样品管, 在 610 nm 处读取样品最小吸光度(A)值及 15 min 时 A 值, 并按下列公式计算 HSR 比率:

$$\text{HSR 比率}(\%) = \frac{\text{样品 A 值} - \text{样品最小 A 值}}{\text{对照 A 值} - \text{样品最小 A 值}} \times 100\%$$

1.2.5 观察指标

全血白膜层血小板回收率、白膜层 PRP 血小板回收率、PRP HSR 比率。

1.2.6 标本留取

白膜混匀后留取 0.5 mL, 测定血小板计数; PRP 留取 4~7 mL, 进行血小板计数, 再检测 HSR 比率。

1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐时采用 LSD 分析结果, 方差不齐时采用 Dunnett T3 分析结果, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同离心时间白膜层血小板回收率比较

50 mL 全血在 470 g 离心 11~17 min 白膜层血小板回收率处于较高水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 100 mL 全血在 940 g 离心 11~15 min 白膜层血小板回收率处于较高水平, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两种剂量白膜层血小板回收率可在离心 11 min 时即达到较高水平, 见表 1。

表1 不同离心时间白膜层血小板回收率比较(n=15, $\bar{x} \pm s$, %)

项目	离心力(g)	9 min	11 min	13 min	15 min	17 min
50 mL	470	69.60±12.70 ^a	73.50±13.20	74.70±12.06	71.20±12.57	74.40±17.10
100 mL	940	63.30±10.91 ^a	71.30±11.12	73.90±13.33	72.80±12.29	68.20±13.09 ^a

^a: P<0.05, 与13 min白膜层血小板回收率比较。

2.2 不同离心时间 PRP 血小板回收率比较

10 mL白膜在70 g、离心13 min PRP血小板回收率最高, 差异有统计学意义(P<0.05); 20 mL白膜在100 g、离心13 min PRP血小板回收率最高, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表2。

2.3 不同离心时间 PRP HSR 比率比较

10 mL白膜在70 g、离心13 min及100 g、离心9 min PRP HSR比率最高, 差异有统计学意义(P<0.05); 20 mL白膜在70 g、离心17 min及100 g、离心13 min PRP HSR比率最高, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表3。

表2 不同离心时间 PRP 血小板回收率比较(n=10, $\bar{x} \pm s$, %)

项目	离心力(g)	9 min	13 min	17 min	21 min
10 mL	70	71.53±2.39 ^a	95.07±4.90	83.43±4.70 ^a	—
10 mL	100	64.50±4.96 ^a	77.48±3.19	72.80±4.63 ^a	—
20 mL	70	67.07±3.15 ^a	74.70±5.94	78.40±4.34	75.06±3.15
20 mL	100	64.37±5.64 ^a	85.15±2.28	77.93±4.01 ^a	—

^a: P<0.05, 与13 min PRP血小板回收率比较; —: 无数据。

表3 不同离心时间 PRP HSR 比率比较(n=6, $\bar{x} \pm s$, %)

项目	离心力(g)	9 min	13 min	17 min	21 min
10 mL	70	44.94±4.99 ^a	53.26±3.61	43.45±3.46 ^a	—
10 mL	100	55.50±3.94 ^a	45.74±3.28	40.00±2.92	—
20 mL	70	—	34.72±4.47	59.53±6.60 ^a	57.21±6.45 ^a
20 mL	100	50.30±1.72 ^a	59.39±4.10	47.18±3.72 ^a	—

^a: P<0.05, 与13 min PRP HSR比率比较; —: 无数据。

3 讨 论

血小板制剂用于临床非输注性(局部)治疗或输注性(全身)治疗, 均是全血来源的血小板浓缩物, 制备技术及临床需求既有重叠又存在较大区别(为了方便论述, 文中PRP仅指非输注性血小板制剂), 如两者血袋白膜法制备的技术原理完全相同, 但50、100 mL全血提取的血小板终产品由于剂量小(10~20 mL), 输注后不能达到治疗效果, 既无临床需求, 也未发现相关的制备参数报道, 但作为PRP进行局部治疗有广阔的应用空间, 相应的制备参数也需研究确定并完善发展。PRP含有大量的生长因子及纤维蛋白, 对创面及损伤的修复有极大优势^[7,9-10]。小剂量全血制备PRP适合低体重及创面小的患者, 因容量小, 手工分离制备技术更加精细; 且相关研究较少, 可借鉴的经验不足; 较标准量全血(200、300、400 mL)制备PRP更加困难。文献报道小剂量全血多采用离心管制备, 制备过程开放环节有污染的风险^[8]; 或是套装制备, 需要现场采集, 立即制备, 尽快使用, 且不可储存, 在使用时间上受到制约。小剂量全血采血袋制备PRP技术全程封闭, 无菌接驳分装备用, 既规避了开放环节风险的发生, 又可储存, 可灵活地调整使用时间。

50、100 mL全血第1次离心后收集白膜为10、20 mL(定量), 血小板回收率(变量)最高的数据反映的是最佳离心条件。本研究显示, 使用采血袋制备小剂量全血, 50、100 mL全血470、940 g, (22±2)°C, 离心11 min时, 全血白膜层血小板回收率即达到较高水平。与文献报道400 mL全血四联采血袋制备的白膜层血小板回收率(87.0%)相比较^[11], 本研究白膜层血小板回收率略低, 因本实验使用的全血剂量小, 如果血袋的整个制备流程血小板耗损量相同, 由于全血剂量小而耗损占比更高, 白膜层血小板回收率则会较低。该报道还阐述了改变制备血袋的结构, 可减少血小板损失, 明显提高回收率, 所以改变血袋结构可成为提升小剂量全血白膜层回收率的研究方向之一。本研究显示, 10、20 mL白膜在70、100 g, (22±2)°C, 离心13 min PRP血小板回收率最高。与本课题组前期研究的400 mL全血6联袋制备浓缩血小板回收率(68.7%)相比, 离心温度无改变, 但本研究得到的PRP血小板回收率较高^[12], 说明50、100 mL全血第2次(即对白膜层的离心)离心力及离心时间均是更加适宜的离心参数。

HSR是通过在体外低渗休克环境中, 血小板膨胀后再恢复正常体积的能力来反映血小板体内存活

率,是评价血小板功能的体外指标,HSR 比率越高,血小板活性恢复越好^[13]。本研究显示,100 mL 全血制备的 PRP 第 2 次离心为 70 g、离心 17 min 时,HSR 比率为(59.53±6.60)%,继续延长离心时间到 21 min 也不会导致 HSR 比率下降,即体内存活无明显下降,与离心 100 g 相比,离心 13 min HSR 比率为(45.74±3.28)%,说明离心力越轻,HSR 比率越高,血小板损伤越小。离心 70 g、13 min 时,HSR 比率最低[(34.72±4.47)%],离心力最轻,HSR 比率却最低。分析认为,虽然 HSR 受 PRP 温度、存放时间等因素影响,但因各组的条件一致,不是差异产生的决定性条件^[14-16]。此外,PRP 中混杂的红细胞较多,在 HSR 实验中添加蒸馏水的环节造成细胞部分溶血,影响透光度导致离心时间更长时 HSR 比率更低,而非 PRP 中血小板功能受到影响^[14]。同时表明,检测 HSR 比率时,红细胞应尽可能去除完全,否则影响实验结果。在 100 g、离心 13 min 时,HSR 比率为(59.39±4.10)%,与 70 g、离心 17~21 min 相当,随着离心时间延长,HSR 比率下降,说明离心时间越短,HSR 比率越高,血小板损伤越小^[17]。本着提升工作效率的原则,相同的 HSR 比率选取用时最短的参数,综合 PRP 回收率,100 mL 全血制备 PRP,第 2 次离心的优选参数为 100 g、(22±2)℃、13 min。同理 50 mL 全血制备 PRP,第 2 次离心优选参数为 70 g、(22±2)℃、13 min。

综上所述,50、100 mL 全血白膜法采血袋制备 PRP 能够获得理想的回收率,在其他离心条件相同的情况下,第 1 次离心力分别为 470、940 g,离心 11 min,第 2 次离心力分别为 70、100 g,离心 13 min,回收率最佳。该方法是标准剂量全血(200、300、400 mL)制备 PRP 的补充方法。

参考文献

- [1] CROISÉ B, PARÉ A, JOLY A, et al. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: literature review [J]. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*, 2020, 121(2): 150-154.
- [2] 林春博, 姚军, 农桔安, 等. 不同浓度富血小板血浆促进骨髓间充质干细胞增殖及向软骨细胞分化的实验研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(12): 2147-2152.
- [3] 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.
- [4] 王承琳, 王丽鸽, 崔靖怡, 等. 浓缩血小板离心参数与装罐方法的标准化研究 [J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(9): 972-974.
- [5] 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.
- [6] 易中梅, 王红苹, 李晨晨, 等. 全血手工制备浓缩血小板后的血浆再制备冷沉淀的回收率评价 [J]. *中国输血杂志*, 2013, 26(2): 117-120.
- [7] 易中梅, 张彬, 陆华. 自体富血小板血浆治疗多种创面的临床效果比对分析. *中国输血杂志* [J], 2020, 33(12): 1257-1261.
- [8] 张昭远, 卫愉轩, 张长青, 等. 应用不同离心条件优化富白细胞富血小板血浆制作方案研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2020, 34(8): 1025-1030.
- [9] VAN LIESHOUT E M M, DEN HARTOG D. Effect of platelet-rich plasma on fracture healing [J]. *Injury*, 2021, 52(Suppl. 2): S58-66.
- [10] DOS SANTOS R G, SANTOS G S, ALKASS N, et al. The regenerative mechanisms of platelet-rich plasma: a review [J]. *Cytokine*, 2021, 144: 155560.
- [11] 余风修, 周载鑫, 沈秋, 等. 两种血袋白膜法制备浓缩血小板回收率研究. *实用临床医药杂志* [J], 2020, 24(22): 87-89.
- [12] 刁荣华, 王泽蓉, 王世春, 等. 不同方式放置白膜制备浓缩血小板回收率指标比较 [J]. *临床输血与检验*, 2019, 21(1): 24-27.
- [13] LINDAHL T L, RAMSTRÖM S. Methods for evaluation of platelet function [J]. *Transfus Apher Sci*, 2009, 41(2): 121-125.
- [14] 赵凤绵, 孙晓红, 张爱红, 等. 采用 HSR 方法测定手工汇集浓缩血小板在不同保存温度下的保存效果 [J]. *中国输血杂志*. 2008, (02): 116-118.
- [15] JOHNSON L N, WINTER K M, REID S, et al. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution [J]. *Cryobiology*, 2011, 62(2): 100-106.
- [16] 孙桂芝, 周娟, 竺青, 等. 单采血小板存储时间及温度对血小板体外功能及炎性细胞因子的影响 [J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(7): 849-852.
- [17] IWAMA A, HIRAYAMA J, NOGAWA M, et al. Comparison between in vitro properties of washed platelet concentrates suspended in M-sol and those in BRS-A, both of which were prepared with an automated cell processor [J]. *Transfus Apher Sci*, 2017, 56(2): 241-244.

(收稿日期: 2022-10-08 修回日期: 2023-03-10)

(编辑: 袁皓伟)