

中国富血小板血浆临床制备方法的研究进展

卫愉轩¹ 张昭远² 范峥莹² 袁霆²

【摘要】 自体富血小板血浆(PRP)是一种通过离心的方法从自体血中提取出来的血小板浓缩物。近20年来,已经被广泛应用于多种学科,如骨科、口腔颌面外科、整形美容科等。然而,至今,PRP的临床制备方法还没有统一标准,不同的制备方法导致PRP的成分以及临床疗效不同,给临床医务工作者应用PRP造成了诸多困扰。通过检索和分析中国已发表有关PRP制备的文献(中文和英文)发现,国内PRP临床制备方法差异性较大,包括采血量、离心设备、离心次数、离心力、离心时间和PRP制备量等。PRP中血小板富集度和回收率,白细胞浓度等指标也不稳定,亟需更高质量的研究或指南来规范和指导临床PRP的制备。

【关键词】 富血小板血浆; 临床研究; 方法; 离心法

Research progress of clinical preparation methods of platelet-rich plasma in China Wei Yuxuan¹, Zhang Zhaoyuan², Fan Zhengying², Yuan Ting². ¹Department of Orthopaedics, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital & Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Shenzhen 518116, China; ²Department of Orthopedics, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China
Corresponding author: Yuan Ting, Email: terrenceyuan@gmail.com

【Abstract】 Autologous platelet-rich plasma (PRP) is platelet concentrate separated from autologous blood by centrifugation. In the past two decades, it has been widely used in various medical fields such as orthopedics, oral and maxillofacial surgery, plastic and cosmetic surgery. However, up to now, the consistent standard for PRP clinical preparation hasn't established. Different preparation methods may lead to different components and clinical effects of PRP, which brings many problems for clinical practitioners to apply PRP. According the literatures (Chinese and English) on PRP preparation published in China, the parameters of domestic PRP preparation methods, including blood collection, centrifugation equipment, number of centrifugation, centrifugal force, centrifugation time and volume of PRP, are quite different. Other indicators of PRP, such as leukocyte concentration, platelet enrichment factor and recovery rate, are also unstable and most are not reported. Therefore, there is an urgent need for high-quality research or guidelines to standardize and guide the preparation of clinical PRP.

【Key words】 Platelet-rich plasma; Clinical study; Methods; Centrifugation

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-134X.2020.02.011

基金项目: 国家自然科学基金(81572239); 上海申康医院发展中心临床科技创新项目(SHDC12016219)

作者单位: 518116 深圳, 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院骨科¹; 200233 上海交通大学附属第六人民医院骨科²

通信作者: 袁霆, Email: terrenceyuan@gmail.com

自体富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是一种通过离心的方法从自体血中提取出来的血小板浓缩物^[1]。PRP中血小板经活化后可以释放多种生长因子如血小板源性生长因子、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子和表皮生长因子等,可以有效促进组织细胞再生和修复^[1]。并且,鉴于PRP来

源方便、自体(无免疫排斥)、制作简单,近20年来,已经被广泛应用于多种学科,如骨科、口腔颌面外科、整形美容科等^[2-3]。PRP在临床上的应用范围虽然越来越广,但关于PRP对不同组织修复疗效的报道并不一致。另外,市面上的PRP制作设备众多,不同的设备制作出的PRP成分,对组织的作用效果,激活方式,以及临床应用方法均不相同。以上这些因素导致PRP目前的临床应用显得有些混乱,也给广大医务工作者带来了困扰。为此,2018年,中国医疗保健国际交流促进会骨科分会发布了《富血小板血浆在骨关节外科临床应用专家共识(2018年版)》和《关节腔注射富血小板血浆治疗膝骨关节炎的临床实践指南(2018年版)》,进一步规范和明确了PRP在骨关节外科和膝骨关节炎的临床操作规范^[2-3]。

在临床上PRP应用疾病谱逐渐趋于共识的同时,PRP的制作方法却显示出多样化或个体化的趋势。比如,PRP制作的离心次数目前有一次离心法,二次离心法,以及程序控制的多次离心法等。制作出的PRP中血小板浓度有1~3倍的,也有4~8倍,甚至更高浓度^[4-7]。除此之外,PRP制作的差异性还包括采血量、离心设备、离心次数、离心力、离心时间、PRP制备量、血小板富集度、回收率以及白细胞浓度,等等。本文旨在通过检索中国已发表有关PRP制备的临床文献(中英文),汇总分析国内富血小板血浆的临床制备的研究进展,为临床制作更高质量的PRP提供参考依据。

一、检索方法

英文检索数据库包括PubMed和荷兰医学文献数据库(Excerpta Medica Database, Embase),检索式以“Platelet-rich plasma”和“China”为自由词,“Humans”和“Clinical study”为限定词,连接词为“And”。中文检索数据库包括中国期刊全文数据库和万方数据库,检索式以“富血小板血浆”和“制作”“制备”为任意词,连接词为“和”,进一步筛选出“临床研究”和“人血”。检索时间截止均为“2019年6月1日”。通过文献阅读,筛选出中国发表涉及临床人血PRP制备参数的相关文献94篇,其中中文79篇,英文15篇。

文献纳入标准:①文献中描述有PRP临床制备流程(数据),可检索到全文;②临床观察性研究;③研究中采集的血样为人血;④研究在中国进行。排除标准:①会议摘要;②文献中未提及PRP制备的参数设置;③动物实验或基础研究;④综述类文献;

⑤重复文献;⑥个案报道。文献筛选流程图如图1。

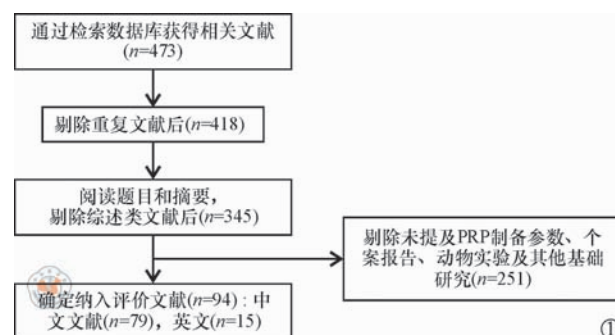


图1 中国已发表临床PRP(富血小板血浆)制备相关文献筛选流程图

二、国内PRP临床制备情况

(一)采血部位与采血量

PRP是通过采集外周血经过离心得到的血小板浓缩物。国内文献报道中提及的采血点几乎均为肘静脉,基本均为“现采现制”,个别采用库存血来提取PRP。采血量的波动范围较大,为4~500 ml,平均采血量53.5 ml;其中最常见采血量为30 ml(14.9%),其他比较常见的采血量还包括10 ml(11.7%)、20 ml(10.6%)、45 ml(10.6%)和50 ml(8.5%)。采血时多采用50 ml注射器,之后转移至装有抗凝剂的离心管并摇匀。文献报道的采血量与抗凝剂体积比例主要为10:1或9:1。

(二)采血时间

文献中较少描述采血时间,少量手术相关文献均为术前采血。血小板的主要功能包括止血和启动组织修复,止血途径包括内源性和外源性途径;目前认为血小板的止血和组织修复过程是一种局部为主的全身性反应,手术不可避免地会激活外源性和/或内源性止血途径,引起血小板黏附、聚集、分布改变,可能影响采血血小板质量,故建议采血时间选择术前^[8-9]。

(三)离心设备和离心温度

文献报道的PRP制备主要采用非商品化离心套装的离心法(77.1%),大多数离心设备的参数未明确描述,国内使用的商用PRP套装(文献中明确描述设备信息)主要为山东威高公司的PRP制备套装(威高PRP)。绝大部分临床PRP制备均在室温下完成,耗时约20~30 min。

(四)离心次数、离心力(转速)和离心时间

国内PRP临床制备主要采用二次离心法(80.2%),一次离心较少(18.8%),制备方法主要参照Landesberg法^[10]的PRP制备流程。

二次离心过程中,第二次离心的离心力(或转速)均不小于第一次离心;其中第二次离心的离心力(或转速)和第一次离心时相等者约占37.9%,第二次离心的离心力(或转速)大于第一次离心时约占62.1%。大多数文献中使用的离心机参数(离心半径、管径、离心管深度)不明,关于第一次和第二次离心的离心力和转速以及离心时间描述差异较大;并且,即使为相同商用型PRP制备套装,采血量、制备参数设置也有较大差异。

第一次离心时,比较常见的离心力设置主要包括200 g(34.6%)、1 500 g(19.2%)、250 g(11.5%)和313 g(11.5%),离心转速主要包括2 000 rpm(27.5%)、2 500 rpm(12.5%)、1 500 rpm(12.5%)和2 400 rpm(10.0%);第一次离心比较常见的时间设置主要为10 min(78.1%),其他时间设置包括20 min、15 min和4 min等。

第二次离心时,比较常见的离心力设置主要包括1 500 g(17.9%)、200 g(17.9%)和250 g(10.7%),离心转速包括2 000 rpm(28.9%)、3 600 rpm(15.8%)、2 500 rpm(13.2%);第二次离心比较常见的时间设置主要为10 min(70.3%)和15 min(12.5%)。

一次离心过程中,采用的离心力(或转速)和时间同样差异较大,离心力设置150~1 500 g,转速设置400~3 400 rpm,离心时间2~40 min,离心参数设置异质性很高。

(五)血小板富集度和回收率

血小板富集度和回收率是评价PRP制备质量的主要指标,主要依据全血体积、全血血小板浓度、PRP的体积和血小板浓度来计算(具体公式如下)^[6]。

$$\text{血小板回收率}(\%) = \frac{\text{PRP 体积(ml)} \times \text{PRP 中血小板浓度}(10^9/\text{L})}{\text{全血体积(ml)} \times \text{全血中血小板浓度}(10^9/\text{L})}$$

$$\text{血小板富集度(倍)} = \frac{\text{PRP 中血小板浓度}(10^9/\text{L})}{\text{全血中血小板浓度}(10^9/\text{L})}$$

国内有关PRP临床制备的研究较少,(19.3%)关注血小板富集度和/或回收率情况。已报道研究中血小板富集度约为1.4~8.1倍,75%的PRP中血小板富集度 \geq 4倍;血小板回收率约为46.5%~79.7%,73%的PRP中血小板回收率 $>$ 60%。Marx^[9, 11]认为PRP中血小板的“工作浓度”是 $1\ 000 \times 10^9/\text{L}$ 。一般认为,为了保证其效果,PRP中血小板富集度应达到3~5倍^[8]。

(六)PRP制备量

离心制备PRP主要是依据全血中红细胞、血

浆、白细胞和血小板不同的比重,离心法可以获得约为全血体积10%的PRP^[8]。国内文献报道的PRP制备量(体积)差异性较大,范围0.4~30 ml,比较常见的PRP制备量为4 ml(20.4%)和5 ml(20.4%),PRP制备量占离心前全血(含抗凝剂)体积比例2.5%~36.4%,平均12.9%。

(七)血小板活性

血小板分化抗原62(cluster of differentiation 62 platelet, CD62P),又名颗粒膜蛋白140(granule membrane protein 140, GMP-140)或P-选择素,是血小板激活的重要标志^[12]。当血小板活化时,血小板内的 α 颗粒膜与开放管道系统融合, α 颗粒内的CD62P随之出现于血小板膜表面,而静止状态的血小板表面是没有CD62P表达的^[13-14]。所以,用CD62P的表达率可以检测血小板的活化率,评估各种生长因子的释放情况^[12]。然而,国内鲜有关注临床PRP中血小板活化情况的研究。

三、小结

PRP是一种通过离心方法使用自体血制备的富含血小板的浓缩产物,基本原理在于全血中各种有形成分(白细胞、红细胞和血小板等)的沉降速率不同,在给予一定时间的离心力后,全血中的有形成分可以出现梯度分层^[8-9]。随着PRP在临床多个学科的广泛推广,各类商用PRP制备套装层出不穷^[5]。然而,不同套装和临床实际应用所需的全血量、离心参数(离心力和时间)、离心次数、操作技术、PRP制备量和PRP质量评价等方面存在诸多差异,可能导致PRP的临床疗效不稳定。

根据文献报道,国内PRP临床制备的采血量波动性较大,为4~500 ml,最常见的采血量为30 ml(14.9%),但采血部位较为一致——肘静脉,采血量的波动性也不可避免地导致国内PRP制备量的波动性很大(0.4~30 ml)。比较推荐的PRP制备量约为全血体积10%^[8]。文献中鲜有关于采血时间的讨论,少量手术相关文献均为术前采血,术前采血可以避免手术和麻醉引起的凝血系统激活和可能出现的血小板分布改变^[8-9]。文献中也同样鲜有关于PRP制备温度的研究,笔者PRP中心的经验是室温下操作(采血后30 min内开始离心),长时间低温处理可能会改变血样的粘度,影响离心效果。国内已发表的文献较少描述离心设备和离心参数,山东威高公司的PRP制备套装是最常见的离心制备套装。不同商品化PRP制备套装所需采血量、离心参数、PRP制备量和质量存在较大差异^[5-6]。同样地,

国内的临床 PRP 制备的离心参数(离心力或转速和离心时间)差异性较大,虽有一定的集中性,但文献中鲜有报道 PRP 的血小板制备质量,无法评价各种制备方法的优劣;本中心目前采用威高公司的 PRP 制备套装;离心参数设置为:第 1 次离心 800 g, 10 min,第 2 次离心 1 100 g,10 min;制备 5 ml PRP,血小板富集度可达到 5~8 倍,回收率平均 72.1% (具体实验数据未发表)。

同时,根据文献报道,各种疾病(包括各种肌腱病和各部位的骨关节炎)的 PRP 应用方案不尽相同,包括注射剂量(ml)、次数、血小板浓度和富集度等,尤其是实际临床注射的 PRP 的制备质量(血小板浓度和富集度)鲜有报道。例如,文献报道的膝骨关节炎的 PRP 关节腔内注射剂量在 4~12 ml 不等,但以 PRP 注射量为 5 ml 和 8 ml 左右的居多^[15-16]。PRP 治疗跟腱病的注射剂量和次数也差异性较大,文献中也较少提及实际应用的 PRP 中血小板浓度和富集度情况^[17-19]。Boesen 等^[17]采用了注射 4 次 4 ml PRP 结合离心训练的方案治疗跟腱病,较单独的离心训练,可以更好地改善局部疼痛、活动水平、跟腱的血管化;而 Krogh 等^[19]采用的是注射 1 次 6 ml PRP 的方案。此外,本中心在采用两次离心法制备富白细胞富血小板血浆和去白细胞富血小板血浆的过程中发现,全血离心后血浆分层情况和成品 PRP 中血小板浓度和富集度存在明显的个体化差异,并且制备质量受离心力、离心时间、温度和采血量等多种因素影响。综上,回顾文献,即使是治疗同一种疾病,所采用的 PRP 制备方法、临床实际注射的 PRP 质量、PRP 剂量等也都存在较大差异,使得 PRP 的临床基线数据参差不齐,在针对某一疾病治疗时,很难比较哪种 PRP 的制备和治疗方案更为优越。故此,笔者认为,有关 PRP 的临床应用研究应详细描述 PRP 制备过程和实际 PRP 质量,有利于同类研究结果的荟萃分析。

国内外许多有关 PRP 制备方法的优化主要是关于离心条件(包括离心力、时间和温度等)的调整优化^[20-26];Piao 等^[26]的研究提示,PRP 制备过程中血小板的沉降和分布也与离心套装材料设计密切相关,例如离心管的直径、深度、底部锥形设计等。此外,也有许多研究提示 PRP 的血小板激活方式、制备后储存时间和温度等也是影响 PRP 质量的重要因素^[27-31]。

四、展望

目前国内 PRP 临床制备尚没有统一标准,采血

量、离心设备、离心次数、离心力、离心时间和 PRP 制备量差异性较大,PRP 的血小板富集度和回收率等指标尚不稳定,缺乏统一的 PRP 质量评价标准,亟需更高质量的研究或指南规范指导临床 PRP 制备操作。PRP 的临床制备涉及多个方面,需要临床医学、材料工程、转化医学等多学科的交叉合作。

参 考 文 献

- [1] Hsu WK, Mishra A, Rodeo SR, et al. Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: evidence-based recommendations for treatment[J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2013, 21(12): 739-748.
- [2] 袁霆,张长青,余楠生. 富血小板血浆在骨关节外科临床应用专家共识(2018年版)[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2018,12(05): 596-600.
- [3] 邢丹,余楠生,袁霆,等. 关节腔注射富血小板血浆治疗膝骨关节炎的临床实践指南(2018年版)[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2018,12(4): 444-448.
- [4] 宣力,田举,宣敏,等. 二次离心法制备富血小板血浆中血小板相关参数的分析[J]. *华南国防医学杂志*, 2017,31(8): 514-517, 530.
- [5] 王书军,温从吉,李诗言. 不同套制备的富血小板血浆中细胞及细胞因子成分的比较[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2016,10(6): 592-597.
- [6] Yin WJ, Xu ZL, Sheng JG, et al. Erythrocyte sedimentation rate and fibrinogen concentration of whole blood influences the cellular composition of platelet-rich plasma obtained from centrifugation methods[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3, A): 1909-1918.
- [7] Yin W, Xu H, Sheng J, 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.
- [8] Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology[J]. *J Craniofac Surg*, 2005, 16(6): 1043-1054.
- [9] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 62(4): 489-496.
- [10] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. 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; discussion 300-301.
- [11] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? [J]. *Implant Dent*, 2001, 10(4): 225-228.
- [12] 袁霆,张长青. 骨组织及软组织修复作用中富血小板血浆的制备及其原理[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(35): 7939-7941.
- [13] Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1995, 21(2): 146-151.
- [14] Stenberg PE, Mcever RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma

- membrane after activation [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 880 – 886.
- [15] Di Y, Han C, Zhao L, et al. Is local platelet-rich plasma injection clinically superior to hyaluronic acid for treatment of knee osteoarthritis? A systematic review of randomized controlled trials [J/OL]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 128. doi: 10.1186/s13075-018-1621-0.
- [16] Shen LX, Yuan T, Chen SB, et al. The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J/OL]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1): doi: 10.1186/s13018-017-0521-3.
- [17] Boesen AP, Hansen R, Boesen MI, et al. Effect of high-volume injection, platelet-rich plasma, and sham treatment in chronic midportion achilles tendinopathy: a randomized double-blinded prospective study[J]. *Am J Sports Med*, 2017, 45(9): 2034 – 2043.
- [18] Albano D, Messina C, Usulli FG, et al. Magnetic resonance and ultrasound in achilles tendinopathy: predictive role and response assessment to platelet-rich plasma and adipose-derived stromal vascular fraction injection[J]. *Eur J Radiol*, 2017, 95(95): 130 – 135.
- [19] Krogh TP, Ellingsen T, Christensen RA, et al. Ultrasound-guided injection therapy of achilles tendinopathy with platelet-rich plasma or saline: a randomized, blinded, placebo-controlled trial [J]. *Am J Sports Med*, 2016, 44(8): 1990 – 1997.
- [20] Miron RJ, Xu H, Chai J, et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~700 g) and low (~200 g) relative centrifugation forces[J]. *Clin Oral Investig*, 2020, 24(3): 1171 – 1182.
- [21] Mariani E, Pulsatelli L. Platelet concentrates in musculoskeletal medicine[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1328. doi: 10.3390/ijms21041328.
- [22] Melo BAG, Luzo Â CM, Lana J, et al. Centrifugation conditions in the L-PRP preparation affect soluble factors release and mesenchymal stem cell proliferation in fibrin nanofibers [J]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2729.
- [23] Chen Z, Deng Z, Ma Y, et al. Preparation, Procedures and evaluation of platelet-rich plasma injection in the treatment of knee osteoarthritis[J/OL]. *J Vis Exp*, 2019, (143): e57700. doi: 10.3791/57700.
- [24] Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane [J]. *Platelets*, 2018, 29(2): 171 – 184.
- [25] de Melo BAG, Martins Shimojo AA, Marcelino Perez AG, et al. Distribution, recovery and concentration of platelets and leukocytes in L – PRP prepared by centrifugation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 161: 288 – 295.
- [26] Piao L, Park H, Jo CH. Theoretical prediction and validation of cell recovery rates in preparing platelet-rich plasma through a centrifugation[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187509. doi: 10.1371/journal.pone.0187509.
- [27] Steller D, Herbst N, Pries R, et al. Impact of incubation method on the release of growth factors in non-Ca(2+)-activated PRP, Ca(2+)-activated PRP, PRF and A-PRF[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2019, 47(2): 365 – 372.
- [28] Etulain J, Mena HA, Meiss RP, et al. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1513.
- [29] Du L, Miao Y, Li X, et al. A novel and convenient method for the preparation and activation of PRP without any additives: temperature controlled PRP [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2018, 1761865. doi: 10.1155/2018/1761865.
- [30] Hosnuter M, Aslan C, Isik D, et al. Functional assessment of autologous platelet-rich plasma (PRP) after long-term storage at –20 °C without any preservation agent [J]. *J Plast Surg Hand Surg*, 2017, 51(4): 235 – 239.
- [31] Hauschild G, Geburek F, Gosheger G, et al. Short term storage stability at room temperature of two different platelet-rich plasma preparations from equine donors and potential impact on growth factor concentrations[J/OL]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1): 7. doi: 10.1186/s12917-016-0920-4.

(收稿日期:2019-10-31)

(责任编辑:张姝江、林敏颖)

卫愉轩,张昭远,范峥莹,等. 中国富血小板血浆临床制备方法的研究进展[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2020, 14(2):196 – 200.