

成份分离机 NGLXCF-3000-N13D 在富血小板血浆制备中的应用

张 喻, 刘广亚, 许育兵, 单桂秋

【关键词】 富血小板血浆; 血小板; 成份分离机制备 PRP; 手工制备 PRP

【中图分类号】 R 331.1⁺43

【文献标识码】 B

doi:10.13730/j.issn.1009-2595.2020.10.018

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是通过离心的方法从血液中提取的血小板(platelet, PLT)浓缩物,富含高浓度的 PLT、白细胞和纤维蛋白。其 PLT 的含量通常为全血的 4~6 倍,浓缩后的 PLT 含有高质量分数的生长因子以及活性蛋白,对局部组织的修复和再生有着重要的作用^[1-7]。现已广泛应用于组织再生、创面修复、感染治疗和功能重建等领域^[8-9]。目前制备 PRP 的方法较多,临床常用的制备方法主要分为设备自动化和手工制备。而制备 PRP 的仪器市面上也有多种选择,不同的仪器设备所制备的 PRP 质量也不尽相同^[10-11],不仅影响临床治疗效果,也不利于 PRP 技术的临床应用和推广。本文通过分析采用 NGLXCF-3000-N13D 成份分离机和手工法制备 PRP,对两种方法中红细胞、白细胞和 PLT 的残余率及回收率进行比较,检验不同方法制备的 PRP 中成分浓度差异,以选择高效、安全的制备方法,并为临床选择合理的制备方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

PRP 由中国人民解放军南部战区总医院血液中心提供的 30 例 PRP 治疗患者血液制备所得。纳入标准:①PLT 计数 $>150 \times 10^9/L$;②采血前一周内没有服用任何影响 PLT 功能和凝血系统的药物。

1.2 主要仪器

台式低速离心机(长沙迈佳森 TD5M);全血细胞分析仪(迈瑞 BC-3000);成份分离仪(南格尔 NGLXCF-3000-N13D);热合机;南格尔 PLT 采集袋;净化工作台(苏州 SW-CJ-1FB);乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝 10 ml 采血管(美

国 BD Vacutaine)。

1.3 PRP 制备方法

1.3.1 实验分组 根据 PRP 制备方法分为手工制备 PRP 组和成份分离机制备 PRP 组,手工制备 PRP 组为成份分离机采集制备过程中留取的 20 ml 全血制备,每组各 30 例。

1.3.2 手工制备 PRP 使用 BD 抗凝管抽取患者静脉血 20 ml,留取 1 ml 做 PLT 计数,上下颠倒混匀后离心,根据血液中各组分的沉降系数不同,第一次以 1500 r/min 离心 10 min,血液分为二层,上层为血浆、PLT 和白细胞,下层为红细胞,使用无菌吸管吸取上层清液,混匀后吸取 0.5 ml 使用血细胞仪检测 PLT 计数,根据治疗浓度调整 PLT 计数,留取所需治疗量,剩余部分进行二次离心,以 3000 r/min,离心 20 min,弃上层贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP),下层即为浓缩 PLT;使用留取治疗所用毫升数重悬浓缩 PLT,即为 PRP,混匀后吸取 0.5 ml 于 EP 管进行 PLT 计数,整个操作过程均在 II 级生物安全柜内进行。

1.3.3 成份分离机制备 PRP 使用前自检,设置默认参数,首先将采集总量、每循环采集量等数据输入机内设定程序,机器自动计算采集循环次数,根据机器屏幕提示安装耗材,穿刺抗凝剂袋,抗凝剂:全血为 1:10,机器进入采血准备,患者穿刺结束后按“采血键”,机器自动运行,静脉采血后,留取 1 ml 进行全血 PLT 计数,达到目标采集量,回输离心杯液体后,机器自动结束;关闭收集袋,用热合机将采血袋封闭,调整计数即为所需要的 PRP。

1.4 血细胞分析及 PRP 相关系数计算

使用血细胞分析仪检测制备前两组全血中 PLT 计数以及制备后 PRP 中 PLT 计数,计算 PLT 回收率。PLT 回收率 = (PRP 体积 \times PRP 中 PLT 浓度) / (全血体积 \times 全血中 PLT 浓度) $\times 100\%$,富集系数 =

PRP 中 PLT 浓度 ÷ 全血中 PLT 浓度。

1.5 细菌培养

在生物安全柜内使用专用的 BacT/ALERT 细菌培养瓶对 PRP 进行细菌培养,用无菌注射器抽取 5 ml PRP 注入专用培养瓶内,立即放入专用培养箱,培养 1 周后记录结果。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对 PRP 中 PLT 计数的回收率及富集系数,白细胞、红细胞的残余率进行比较,比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种制备方法制备时间比较

成份分离机制备 PRP 组平均制备时间为 (16 ± 4.32) min,手工制备 PRP 组平均制备时间为 (46 ± 5.94) min,差异具有统计学意义 ($t = -22.836$, $P = 0.000$)。

2.2 PRP 的 PLT 回收率、富集系数及白细胞、红细胞残余率比较

成份分离机制备 PRP 组 PLT 回收率及富集系数优于手工制备 PRP 组,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05);两组白细胞、红细胞残余率比较,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05),见表 1。

表 1 两组 PRP 制备质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	PLT 回收率 (%)	PLT 富集系数	白细胞残余率 (%)	红细胞残余率 (%)
成份分离机制备 PRP 组	76.11 ± 1.34	5.87 ± 0.64	0.37 ± 0.22	0.02 ± 0.01
手工制备 PRP 组	70.44 ± 7.95	4.64 ± 0.74	0.78 ± 0.18	0.05 ± 0.02
t 值	-2.22	-3.949	4.413	3.198
P 值	0.039	0.001	0.000	0.005

2.3 PRP 革兰阴性细菌培养情况结果

成份分离机制备 PRP 组、手工制备 PRP 组细菌培养 1 周后,BacT/ALERT 血培养仪无阳性瓶,所有细菌培养结果均为阴性。

3 讨论

自上世纪 90 年代早期 PLT 技术问世以来,PRP 逐渐成为组织工程领域的重要治疗手段^[10,12-15]。随着研究的不断深入,PRP 在组织修复方面的优势越来越显著。研究指出,高浓度 PLT 释放的生长因子和活性蛋白作用于目标细胞,促进目标细胞的增殖分化,从而达到组织修复的作用,而高效的 PRP 制备方法应能提

供高浓度的 PLT,因此 PLT 浓度、富集率及回收率是 PRP 成分研究的重要指标。近几年,国外分离制备 PRP 的设备迅速发展起来,大部分已商业化生产的 PRP 制备系统已经能快速稳定地获得高质量的 PRP,各方法所得 PRP 的数量差别不大,但这些系统设备耗材价格昂贵,限制了其在国内一些输血科室的使用^[7,9,14]。

近年来随着对 PRP 制备技术的不断研究,越来越多的企业开始进行 PRP 制备设备研制。但一些商业化套制备的 PRP 残留红细胞较多,无法进行应用浓度质量控制,达不到临床治疗所需浓度,且价格昂贵,极大限制了临床接受度。国内目前仅有山东威高公司生产的 PRP 制备套装获得国家三类医疗器械许可,而一些采血专用血液成份分离机不仅能够制备出高浓度的 PRP,且制备成本较低,操作简单快捷,不易受外界细菌的污染。

本文使用两种方法制备 PRP,从制备时间来看,成份分离机制备 PRP 组比手工制备 PRP 组明显缩短,可大大节省治疗时间。从制备的 PRP 质量方面可以看出,成份分离机制备 PRP 组 PLT 回收率优于手工制备 PRP 组 ($P < 0.05$),白细胞残余率低于手工制备 PRP 组 ($P < 0.05$)。两组红细胞残余率比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果均提示 NGLXCF-3000-N13D 成份分离机制备较手工法制备具有明显优势。成份分离机制备,按照设备操作要求,直接采集血液至分离袋中,整个过程在全封闭状态下将全血分离制备成浓缩 PLT,只需转移血液一次,过程简单,大大缩短制备时间,且制备质量可控,红细胞和白细胞混入量较少,肉眼可见外观颜色呈清亮的黄色,PLT 计数一般可达到 6 倍全血浓缩,可达到临床浓度需求。采集的血液经设备自动分离之后,红细胞和血浆回输患者体内,不浪费血液资源,可以实现一次采集,分装多次保存使用^[16],患者接受度较高,且设备耗材价格合理,较易推广。手工制备 PRP 虽然操作原理简单,但制备过程需经多次离心转移,操作步骤繁琐,不同的离心设备其离心力、离心时间均不同,且白细胞的密度以及沉降系数与 PLT 比较接近,手工吸取时,容易受操作者熟练程度的影响^[14-15],导致 PLT 残余在下层较多,减少 PLT 利用率,或者红细胞和白细胞提取过多,导致残留率较高,影响治疗效果。有学者研究表明,白细胞可增强患者伤口的早期愈合能力,清除机体局部坏死组织,加快损伤组织的修复速度^[11-12],但是王书军等^[2]的研究表明,白细胞分泌的炎症因子白细胞介素 1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β) 和肿瘤坏死

因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 可以抑制软骨细胞细胞外基质分泌并促进其降解, 损害多向分化潜能干细胞向软骨方向分化的能力, 还表示白细胞和炎症因子浓度较低的去白细胞 PRP 对关节炎的疗效优于白细胞和炎症因子浓度较高的富白细胞 PRP^[2,10]。因此, 对于采集的 PRP 中白细胞的含量问题以及作用仍存在较大争议, 值得进一步探讨, 这也将是下一步研究的重点。

参 考 文 献

- [1] 孙 洁, 张剑明. PRP 制备方法的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2009, 36(5): 567-570
- [2] 王书军, 温从吉, 李诗言, 等. 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]. 中华关节外科杂志, 2016, 10(6): 592-597
- [3] 胡育瑄, 何家才. 不同方法制备富血小板血浆对兔脂肪干细胞增殖和成骨分化能力的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1184-1189
- [4] 刘彩霞, 周 健, 王银龙, 等. 不同方法制备富血小板血浆对牵张成骨的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2007, 23(1): 6-8
- [5] 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, 35(8): 7939-7941

- [6] 康 健, 袁 文. 富血小板凝胶制备方法的比较与优选[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(4): 476-481
- [7] 朱业华, 马春会, 栾晓军, 等. 血袋法和试管法制备富血小板血浆的效果比较[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(10): 2399-2401
- [8] Dhillon MS, Behera P, Patel S, *et al.* Orthobiologics and platelet rich plasma[J]. Indian J Orthop, 2014, 48(1): 1
- [9] 李 明, 张长青, 袁 霆, 等. 富血小板血浆制备套装研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(1): 112-116
- [10] 潘红娟, 王雅丽, 吕 爽, 等. 富血小板血浆制备方法稳定性的研究[J]. 中国输血杂志, 2016, 20(6): 1008-1010
- [11] 付维力, 李 棋, 李 箭, 等. 富血小板血浆制备技术及其组分的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(12): 1560-1564
- [12] 汤其元, 马亚萍, 张 斌, 等. 骨组织再生工程中富血小板血浆的应用与研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(4): 597-605
- [13] Roboh JC, Saltzman BM, Yanke AB, *et al.* Effect of leukocyte concentration on the efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis[J]. AM J Sports Med, 2016, 44(3): 792-800
- [14] 吕 敏, 裴国献, 刘 勇, 等. 富血小板血浆的制备现状及研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(13): 2574-2577, 2475
- [15] 李卓男, 张连波. 富血小板血浆的临床应用[J]. 中国美容整形外科杂志, 2019, 30(3): 185-187
- [16] 冯 光, 郝岱峰, 褚万立, 等. 自体单采富血小板血浆凝胶临床制作与应用[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2016, 11(5): 334-339

(2019-11-13 收稿)

(上接第 735 页)

度, 降低工作相关的疲劳感, 激发其工作热情, 有助于提高官兵的职业认同感, 降低职业倦怠程度, 对进一步提高飞行人员军事绩效、维护部队稳定和提高部队战斗力具有重要作用。

参 考 文 献

- [1] Maslach C, Leiter MP. Understanding the burnout experience: recent research and its implications for psychiatry[J]. World Psychiatry, 2016, 15(2): 103-111
- [2] 胡 强, 徐 莉, 陈活良, 等. 我军飞行员伤病原因分析及康复策略进展[J]. 华南国防医学杂志, 2019, 33(1): 64-71
- [3] 张丽华, 王 丹, 白学军. 国外教师职业倦怠影响因素研究新进展[J]. 心理科学, 2007, 30(2): 492-494
- [4] Rogers CR. A theory of therapy, personality, and interpersonal relationship as developed in the client-centered framework. In: Koch. S. (Ed.), Psychology: A Study of Science [M]. New York: McGraw-Hills, 1959: 184-256
- [5] 李永鑫. 工作倦怠及其测量[J]. 心理科学, 2003, 6(3): 6-557
- [6] 汪向东, 王希林, 马 弘, 等. 心理卫生评定量表手册: 增订版[M]. 北京: 中国心理卫生杂志社, 1999: 314-317
- [7] 杨 键, 赵 璧, 吴思英, 等. 飞行员工作倦怠及其与职业应激的相关性[J]. 解放军预防医学杂志, 2014, 32(3): 215-217
- [8] 陈燕峰, 武圣君, 画 妍, 等. 心理资本和士气对陆军官兵职业倦

- 怠的影响研究[J]. 华南国防医学杂志, 2020, 34(2): 119-122, 128
- [9] Huang J, Li X, An Y. The mediating role of coping in the relationship of posttraumatic stress disorder symptoms (PTSS) and job burnout among Chinese firefighters[J/OL]. Int Arch Occup Environ Health, 2020 [2020-09-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32902715/>
- [10] Tzeng HM. The influence of nurses' working motivation and job satisfaction on intention to quit: an empirical investigation in Taiwan[J]. Int J Nurs Stud, 2002, 39(8): 867-878
- [11] 徐英杰. 飞行签派员工作倦怠的成因及干预对策研究[J]. 长沙职业技术学院学报, 2020, 20(2): 79-82
- [12] 康战科. 90 后大学生父母教养方式、自我和谐与人际信任的关系研究[D]. 四川: 四川师范大学, 2014
- [13] 潘 玲. 军队三级医院护理人员职业倦怠、自我和谐与幸福感调查分析[J]. 中国疗养医学, 2017, 26(10): 1100-1102
- [14] 顾一伟, 姜振山, 刘传勇. 飞行员生活事件、应对方式、自我和谐之间的路径分析[J]. 中国疗养医学, 2010, 19(8): 678-681
- [15] 周喜华. 消防员职业倦怠与自我和谐的调查研究[J]. 职业与健康, 2011, 27(4): 367-369
- [16] 胡德永, 王立志, 江燕芳, 等. 高性能战斗机飞行员疲劳程度与血清铁蛋白、乳酸脱氢酶等指标的相关性[J]. 中国疗养医学, 2020, 29(5): 489-492
- [17] Arsintescu L, Chachad R, Gregory KB, *et al.* The relationship between workload, performance and fatigue in a short-haul airline[J]. Chronobiol Int, 2020: 1-3

(2020-08-31 收稿)