

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.20.004

文章编号: 1005-8982(2017)20-0016-05

不同比例激活剂对富血小板凝胶的生物学影响*

戴静¹, 陈建苏², 招志毅¹

[1. 广西省柳州市工人医院 眼科, 广西 柳州 545005; 2. 暨南大学医学院 眼科研究室 (再生医学教育部重点实验室), 广东 广州 510632]

摘要:目的 比较不同比例激活剂对富血小板凝胶的生物学影响, 研究其用于角膜基质再生的可行性。

方法 抽取兔全血, 经二次离心法制备富血小板血浆 (PRP), 将 PRP 与激活剂按不同比例激活, 制备 PRP 凝胶。实验分为 3 个实验组, 分别为 9:1 组 (PRP: 激活剂 = 9:1)、11:1 组 (PRP: 激活剂 = 11:1) 及 5:1 组 (PRP: 激活剂 = 5:1)。将兔角膜基质细胞与 PRP 凝胶共同培养, 进行组织形态学观察, 用细胞增殖 - 毒性检测试剂盒法, 分别检测 3 个实验组 PRP 凝胶释放的复合生长因子促角膜基质细胞的增殖作用。对不同实验组制备的 PRP 凝胶与双层猪角膜基质进行黏附性观察。**结果** 9:1 组制备的 PRP 凝胶促进兔角膜基质细胞的增殖和活化作用强于其他实验组。3 个实验组中, 只有 9:1 组制备的 PRP 凝胶苏木精 - 伊红染色法染色结果显示, 呈有序的网状支架结构, 能紧密黏附并固定双层猪角膜基质。**结论** PRP 与激活剂以 9:1 比例制备的 PRP 凝胶促角膜基质细胞增殖作用最强, 同时具有有序网状结构和良好的组织黏附性及相容性, 是一种可以用于角膜基质再生的良好支架。

关键词: 激活剂; 富血小板凝胶; 角膜基质;

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

Effect of different proportions of activators on biological functions of platelet-rich gel*

Jing Dai¹, Jian-su Chen², Zhi-yi Zhao¹

(1. Department of Ophthalmology, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545005, China;
2. Research Room of Ophthalmology, Key Laboratory of Regenerative Medicine of Ministry of Education, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: Objective To compare the effect of different proportions of activators on the biological function of platelet-rich gel and to reaserch the feasibility for the reconstruction of corneal stroma. **Methods** Rabbit blood was extracted and platelet-rich plasma (PRP) was prepared by two-step centrifugation. Platelet-rich gels were prepared by activation of PRP with thrombin activators in different proportions and divided into three groups. There were group 9:1 (PRP: activators = 9:1), group 11:1 (PRP: activators = 11:1) and group 5:1 (PRP: activators = 5:1). The rabbit keratocytes were seperately co-cultured with the three platelet-rich gels and the morphological features were observed. CCK-8 assay was used to analyze the influences of composite growth factors released from the platelet-rich gel on the proliferation of rabbit keratocytes in the three groups. The adhesive properties of the three platelet-rich gels were evaluated after adhesion to the double-layer porcine corneal stroma. **Results** The platelet-rich gel of the group 9:1 had better effect on promoting cell proliferation than those of other two groups. HE staining displayed that only the platelet-rich gel prepared in the group 9:1 formed an orderly network scaffold that could closely attach to the double-layer porcine corneal stroma. **Conclusions** The platelet-rich gel, prepared by combining PRP with activators in 9:1 proportion, can

收稿日期: 2016-09-26

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 30973244)

[通信作者] 陈建苏, E-mail: chenjiansu2000@163.com

effectively promote the proliferation of keratocytes, and has the nature of orderly network structure, effective adhesiveness and favorable biocompatibility. These properties indicate that the platelet-rich gel prepared by combining PRP with activators in 9 : 1 proportion is an excellent scaffold for the reconstruction of corneal stroma.

Keywords: activator; platelet-rich gel; corneal stroma

富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是一种全血提取后获得的血小板浓缩物,PRP 与激活剂按一定比例激活后,就可得到 PRP 凝胶。PRP 凝胶制备方法中,多种因素都可能影响其生物效应的发挥,而不同激活剂及其比例的选择对 PRP 凝胶促组织再生有非常重要的作用^[1-2]。本文通过 PRP 与凝血酶激活剂按不同比例激活,制备 PRP 凝胶,比较不同比例的激活剂对富血小板凝胶生物学影响的差异,得出促进角膜基质再生所需激活剂的最佳比例,为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

II 型胶原蛋白酶、胰蛋白酶、凝血酶购自美国 Sigma 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自美国 Gibco 公司,活细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)(日本同仁化学研究所),多功能酶标仪(奥地利 Tzcan 公司),倒置显微镜(德国 Leica 公司),3111 型二氧化碳 CO₂ 培养箱、置入 -80℃ 冰箱冷冻保存备用,购自美国 Forma 公司,Universal 32R 型低温离心机(德国 Hettich 公司)。

1.2 方法

1.2.1 激活剂的配制 分别取 1 000 u 凝血酶,0.25 g 10%氯化钙溶于 2.5 ml 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)中制成 100 g/L 氯化钙与 400 u/ml 凝血酶的血小板血浆激活剂,0.22 μm 滤器过滤后离心管(eppendorf, EP)分装,置入 -20℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.2.2 分组及不同组别 PRP 复合生长因子、兔富血小板凝胶的制备 采用改良 Curasan 法二次离心制备富血小板血浆^[3]。取 100 μl 制备好的 PRP 与血小板血浆激活剂分别按 9 : 1、11 : 1 及 5 : 1 的比例混合,从而分为 3 个不同实验组,分别为 9 : 1 组(PRP : 激活剂 = 9 : 1)、11 : 1 组(PRP : 激活剂 = 11 : 1)及 5 : 1 组(PRP : 激活剂 = 11 : 1)。混合激活后可形成胶冻状物,得到 3 个不同实验组的兔 PRP 凝胶。分别将上述 3 个实验组制备的兔 PRP 凝胶放置于 4℃

冰箱 24 h, 4℃、5 000 r/min 离心 20 min。分别吸取析出的上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤后分装,得到 3 个不同实验组的兔 PRP 凝胶释放的复合生长因子萃取液。

1.2.3 CCK-8 法 CCK-8 法检测不同比例激活剂制备的 PRP 复合生长因子对兔角膜基质细胞增殖的影响。采用胶原蛋白酶消化法获取第 3 代兔角膜基质细胞,以胰蛋白酶消化后,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液制成 10 × 10³ 个/ml 密度的兔角膜基质细胞悬液,以 100 μl/孔接种在 96 孔板中,在 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内孵育过夜后,弃原培养液,用无血清 DMEM 液洗涤 2 次,加入新的培养液^[4]。根据加入新细胞培养液的不同分为 4 组:将 3 个不同实验组的 PRP 复合因子萃取液用无血清 DMEM 配制成分含 5.0%兔 PRP 复合因子培养液的 9 : 1 实验组、11 : 1 实验组及 5 : 1 实验组,对照组培养液为未加入任何 PRP 复合因子的无血清 DMEM 液。每组制备 25 孔,分别加入 100 μl/孔各自组的培养液,分别在培养第 2、3、5、7 和 8 天后,每组选取 5 孔加入 10 μl CCK-8, 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内培养 2 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(optical density, OD),求出各组吸光度的平均值。

1.2.4 生物角膜基质支架 采用胶原蛋白酶消化法培养获得的第 3 代兔角膜基质细胞,以胰蛋白酶消化后,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液制成 5 × 10⁵ 个/ml 密度的兔角膜基质细胞悬液 40 μl,分别接种于 3 个不同实验组的富血小板凝胶上,于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内培养 24 h 后,弃去培养基,分别在已贴壁细胞表面覆盖前步制备的 3 个不同实验组的富血小板凝胶,于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内培养 24 h,倒置显微镜下观察细胞的生长状况和形态变化,并拍照记录。取培养 48 h 后的标本,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。

1.2.5 双层猪角膜基质的黏附 从屠宰场猪尸体上获取新鲜猪眼球,用剪刀水平剪出全厚角膜片,解剖显微镜下撕去上皮层和后弹力层,环钻钻取并分离中央直径约 7 mm 大小的角膜板层基质片,深度约

为角膜基质厚度的 1/2,在基质片上加入 120 μl 兔 PRP, 分别以不同比例加入激活剂激活得到兔富血小板凝胶,根据实验组中制备凝胶的激活剂比例不同,分为 9:1 组、11:1 组及 5:1 组;在不同实验组凝胶表面覆盖一层直径约 7 mm 大小的猪角膜基质片,于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内静置过夜。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,不同培养时间各组细胞增生率的比较用重复测量设计的方差分析,4 组总体比较用两因素方差分析,两两比较用 Bonferroni t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔 PRP 凝胶释放的复合生长因子对细胞增殖的影响

5:1 组、11:1 组及 9:1 组与对照组在培养 2、3、5、6 和 8 d 后 OD 值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间 OD 值比较,差异有统计学意义 ($F=819.016, P=0.000$);②各实验组与对照组的 OD 值比较,差异有统计学意义 ($F=268.002, P=0.000$),4 组间两两比较,9:1 组与对照组、5:1 组、11:1 组比较,经 Bonferroni t 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与对照组比较,各实验组吸光度增加速度较快,而 9:1 组吸光度增加速度高于其他各组,相对促角膜基质细胞增殖作用最强;③各实验组与对照组的 OD 值变化趋势比较,差异有统计学意义 ($F=103.599, P=0.000$)。见图 1 和附表。

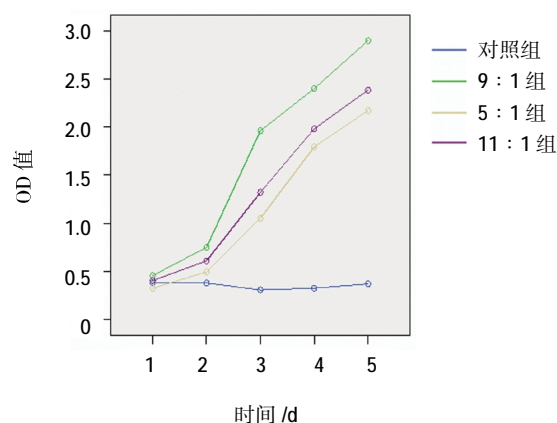
2.2 富血小板凝胶作为生物角膜基质支架

PRP 与血小板血浆激活剂分别按 9:1、11:1 及 5:1 的比例混合后都可以迅速形成透明果冻状的富血小板凝胶。倒置显微镜下观察发现,兔角膜基质细胞在这 3 个实验组制备的富血小板凝胶上附着良好,培养 24 h 后即可见细胞呈梭形及多角形长入凝胶内。但 9:1 组培养 24 h 的角膜基质细胞即可

达 50% 融合,而 5:1 组和 11:1 组细胞数目少于 9:1 实验组(见图 2)。石蜡切片 HE 染色结果发现,只有 9:1 组制备的富血小板凝胶内见大量的纤维素,纤维素之间交织形成多孔有序的网状支架结构,与正常角膜基质胶原纤维排列结构极为相似,可作为组织工程角膜基质支架。9:1 组的富血小板凝胶内培养 48 h 后,兔角膜基质细胞可在凝胶形成纤维网状支架结构中黏附并生长良好,在两层凝胶之间形成典型复层细胞(见图 3A)。而 5:1 组和 11:1 组制备的 PRP 凝胶不能形成多孔有序的网状支架结构,而且角膜基质细胞接种在 5:1 组和 11:1 组的富血小板凝胶内培养 48 h 后,呈单层细胞生长,不能长入凝胶内(见图 3B)。

2.3 富血浆凝胶作为角膜黏附剂

大体观察时,9:1 组制备富血小板凝胶作为黏附剂进行双层猪角膜基质黏附时,呈透明果冻状,能起到很好的固定黏附效果,形成稳定规则的猪角膜基质/兔富血小板凝胶/猪角膜基质复合体的形状(见图 4)。而 11:1 组、5:1 组的富血小板凝胶虽然透明,但不能形成规则的固体的果冻形状,而且与猪角膜基质未能紧密黏附,不能形成猪角膜基质/兔富血小板凝胶/猪角膜基质复合体。



1:第 2 天;2:第 3 天;3:第 5 天;4:第 6 天;5:第 8 天

图 1 各组培养兔角膜基质细胞 OD 值的变化趋势

附表 PRP 复合生长因子培养兔角膜基质细胞不同时间的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	2 d	3 d	5 d	6 d	8 d
对照组	0.379 \pm 0.032	0.353 \pm 0.039	0.306 \pm 0.053	0.324 \pm 0.020	0.359 \pm 0.322
9:1 组	0.456 \pm 0.035	0.749 \pm 0.611	1.963 \pm 0.771	2.501 \pm 0.188	2.900 \pm 0.107
5:1 组	0.324 \pm 0.012	0.494 \pm 0.588	1.051 \pm 0.225	1.794 \pm 0.107	2.173 \pm 0.363
11:1 组	0.403 \pm 0.055	0.609 \pm 0.052	1.321 \pm 0.023	1.983 \pm 0.143	2.386 \pm 0.128

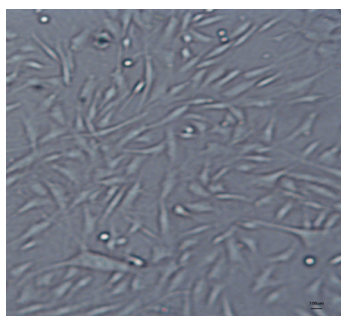
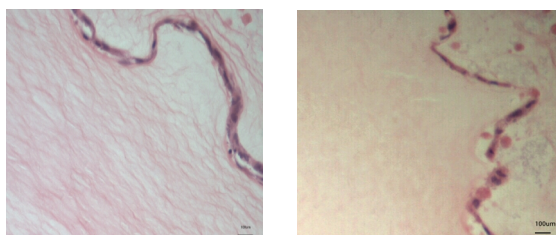


图 2 9:1 组富血小板凝胶培养 24 h 后的细胞形态
(倒置显微镜 $\times 100$)



A 9:1 组 B 5:1 组
图 3 两组富血小板凝胶 (HE $\times 200$)

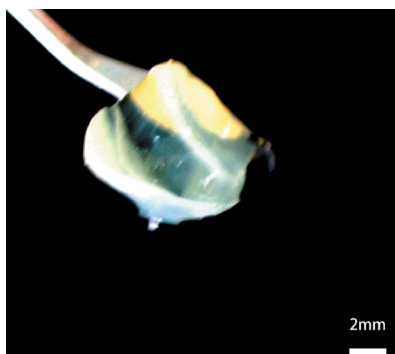


图 4 富血浆凝胶作为角膜黏附剂

3 讨论

PRP 是一种全血经离心提取后获得的血小板浓缩物,富血小板血浆与凝血酶等激活剂混匀激活后形成透明胶冻状物质,即富血小板凝胶。在其激活过程中,分泌多种高浓度细胞生长因子,如血小板衍生因子、转化生长因子- β 、乙基酯树脂磷片胶泥、胰岛素样生长因子及表皮细胞生长因子等,为 PRP 复合生长因子,该生长因子能有效地促进细胞及组织修复^[9]。此外,富血小板凝胶内纤维素之间交织形成多孔有序的网状支架结构,为细胞及组织修复提供良好的支架。目前,PRP 凝胶被广泛的应用到组织工程领域。大量研究证实,PRP 凝胶在临床上的应用取得良好的效果^[6-8]。研究发现,PRP 和 PRP 凝胶在眼科方面也得到一定程度的应用,在治疗角膜

病、眼烧伤及干眼症等眼部疾病方面有良好的临床效果,并广泛用于角膜组织工程再生的研究^[9-10]。

随着 PRP 和 PRP 凝胶在各领域的广泛应用,富血小板血浆凝胶的制备方法逐渐多元化,并无统一标准。而 PRP 凝胶制备方法中多种因素都可能影响其生物效应的发挥,所以针对不同的实验和临床用途需根据自身的需求不同,而确定其最佳的制备方法。研究发现,制备方法中激活剂比例的选择对 PRP 凝胶促组织修复再生有非常重要的作用。目前多数研究者常用的激活剂为牛凝血酶和氯化钙的混合物(100 g/L 氯化钙与 400 u/ml 凝血酶)^[11]。制备 PRP 凝胶时,如果激活剂与血小板血浆选择的比例不同,激活后制备的富血小板血浆凝胶释放的各种生长因子的浓度、速度、比例及生长因子随时间变化规律也大不相同。此外,制备的富血小板血浆凝胶各种成分比例不同,必然影响其组织结构及功能,从而影响其生物学效应的发挥。因此针对富血小板血浆凝胶用于角膜基质修复再生的可行性研究,需要比较选择不同比例的激活剂制备的 PRP 凝胶对角膜基质生物学效应的影响的差异,得出促进角膜基质再生所需激活剂与血小板血浆的最佳配比,为临床治疗提供理论依据。

笔者参考国内外学者的研究成果,采用改良 Curasan 法二次离心制备富血小板血浆,1 100 g/L 氯化钙与 400 u/ml 凝血酶的混合物作为激活剂。使用 PRP 与凝血酶激活剂分别按 9:1、11:1、5:1 的比例混合,分成 3 个组,激活制备的 PRP 复合生长因子及 PRP 凝胶,比较不同比例激活剂制备的 PRP 凝胶用于角膜基质修复再生的可行性。

笔者先研究各组兔 PRP 凝胶释放的 PRP 复合生长因子对兔角膜基质细胞增殖的影响。结果显示,与对照组相比,3 组制备的 PRP 复合生长因子均能促进细胞增殖,但 9:1 组促角膜基质细胞增殖作用高于其他组。可见血小板血浆与激活剂配比为 9:1 时,激活后所得的富血小板血浆凝胶中,各种生长因子的浓度为对角膜基质细胞的增殖作用最强,为最适刺激比例。本实验采用不同比例激活剂制备各组的 PRP 凝胶,并作为载体与角膜基质细胞联合培养重建角膜基质层,观察细胞生长情况及构建的效果。HE 染色结果发现,只有 9:1 组制备的富血小板凝胶内见大量的纤维素交织形成多孔有序的网状支架结构,兔角膜基质细胞可在凝胶形成纤维网状支架结构中黏附并生长良好,在两层凝胶间形成典型复

层细胞。而 5 : 1 组和 11 : 1 组制备的 PRP 凝胶不能形成多孔有序的网状支架结构,而且角膜基质细胞接种在 5 : 1 组和 11 : 1 组的富血小板凝胶内培养 48 h 后不呈复层细胞生长,不能长入凝胶内,说明 9 : 1 组制备的 PRP 凝胶与其他组制备的 PRP 凝胶比较,既能形成与正常角膜基质结构相似有序的纤维网状支架结构,作为生物细胞支架又能更有效地促角膜基质细胞增殖分化,具有良好生物相容性。提示血小板血浆与激活剂配比为 9 : 1 时,激活后所得的富血小板血浆凝胶未来能够运用于角膜基质组织工程再生的研究。本实验对不同比例激活剂制备的兔富血小板凝胶作为黏附剂,进行双层猪角膜基质黏附实验时发现,9 : 1 组制备的富血小板凝胶呈透明果冻状,能形成稳定规则的猪角膜基质 / 兔富血小板凝胶 / 猪角膜基质复合体的形状。而 11 : 1 组和 5 : 1 组的富血小板凝胶虽然透明,但是未能与猪角膜基质紧密黏附形成复合体,说明 PRP 与激活剂以合适的比例(9 : 1)激活制备的富血小板凝胶具有良好的透明性,与异体角膜间具有良好的组织黏附性及相容性。

本实验结果提示,与其他组比较,9 : 1 组制备的 PRP 凝胶释放的复合生长因子能最有效地促进角膜基质细胞增殖,而且制备的凝胶能够作为生物细胞支架构建角膜基质层,并具有良好的生物相容性及黏附性。从而说明血小板血浆与激活剂配比为 9 : 1 时制备的 PRP 凝胶是一种既能黏附又能促进角膜损伤快速修复,而且还是一种接近生理状态的天然生物材料,适合用于组织工程角膜基质层的制备,具有良好的应用前景。因此,制备 PRP 凝胶时,血小板血浆与激活剂配比为 9 : 1 是治疗眼表疾病及角膜基质组织工程再生的最佳比例。

参 考 文 献:

- [1] LACOSTE E, MARTINEAU I, GAGNON G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release[J]. *J Periodontol*, 2003, 74(10): 1498-1507.
- [2] HARRISON S, VAVKEN P, KEVY S, et al. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines[J]. *Am J Sports Med*, 2011, 39(4): 729-734.
- [3] 戴静, 陈建苏, 招志毅, 等. 富血小板凝胶对角膜基质生物学功能的影响[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(8): 705-708.
- [4] 戴静, 陈建苏, 李晓霞, 等. 自体血小板血浆对角膜基质细胞生物学功能的影响[J]. *眼科新进展*, 2010, 30(8): 705-708.
- [5] SCHAR M O, DIAZ-ROMERO J, KOHL S, et al. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(5): 1635-1643.
- [6] GRIFFIN J W, HADEED M M, WERNER B C, et al. Platelet-rich plasma in meniscal repair: does augmentation improve surgical outcomes[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(5): 1665-1672.
- [7] ANDIA I, RUBIO-AZPEITIA E, MAFFULLI N. Platelet-rich plasma modulates the secretion of inflammatory/angiogenic proteins by inflamed tenocytes[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(5): 1624-1634.
- [8] SAKATA R, MCNARY S M, MIYATAKE K, et al. Stimulation of the superficial zone protein and lubrication in the articular cartilage by human platelet-rich plasma[J]. *Am J Sports Med*, 2015, 43(6): 1467-1473.
- [9] ALIO J L, ABAD M, ARTOLA A, et al. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers[J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(7): 1286-1293.
- [10] LUENGO G F, GATTO S C, CROXATTO J O, et al. In vivo lamellar keratoplasty using platelet-rich plasma as a bioadhesive[J]. *Eye (Lond)*, 2010, 24(2): 368-375.
- [11] JAKSE N, TANGL S, GILLI R, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2003, 14(5): 578-583.

(童颖丹 编辑)