

论著 · 基础研究

一次离心法制备大、小鼠富血小板血浆实验条件的优化^{*}

孙振威¹, 仓宝成¹, 宁 群^{2△}, 赵敬湘³, 李鹏龙³

(1. 解放军第 153 中心医院临检中心, 河南郑州 450042; 2. 解放军第 153 中心医院神经内科, 河南郑州 450042; 3. 军事科学院军事医学研究院卫生勤务与血液研究所, 北京 100850)

摘 要:目的 探讨一次离心法制备大、小鼠富血小板血浆 (PRP) 的最佳离心条件。方法 分别采用股动脉插管和心脏穿刺的方法获取大、小鼠动脉血, 14% CPDA-1 抗凝, 滤除白细胞后分装入无菌 EP 管中, 不同条件下 (离心力: $300\times g\sim 600\times g$, 离心时间: 4~12 min) 离心制备大、小鼠 PRP, 利用血液分析仪分别对抗凝全血、滤除白细胞后的血样及 PRP 进行细胞计数, 比较不同方法间的血小板回收率。结果 大、小鼠抗凝全血滤除白细胞后分别以 $400\times g$ 和 $300\times g$ 的离心力离心 8 min 时, 血小板回收率最高。结论 选择合适的离心力和离心时间, 达到白膜形成前的临界状态, 是一次离心法制备 PRP 的关键。

关键词:大鼠; 小鼠; 富血小板血浆; 离心条件
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.001 **中图法分类号:**R446.11; R457.1+4
文章编号:1673-4130(2019)02-0129-04 **文献标识码:**A

Optimization of experimental conditions for preparation of rat and mouse platelet rich plasma by single centrifugation^{*}

SUN Zhenwei¹, CANG Baocheng¹, NING Qun^{2△}, ZHAO Jingxiang³, LI Penglong³

(1. Clinical Laboratory Center, the PLA No. 153 Hospital, Zhengzhou, Henan 450042, China; 2. Department of Neurology, the PLA No. 153 Hospital, Zhengzhou, Henan 450042, China; 3. Institute of Health Services and Hematology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To investigate the optimal centrifugation conditions for preparation of rat and mouse platelet rich plasma (PRP) by single centrifugation. **Methods** Arterial blood of rats and mice by femoral artery cannulation and cardiac puncture were obtained respectively, anticoagulation with 14% CPDA-1, while white blood cells in the blood were filtered out. Then the blood was divided into sterile EP tubes, while PRP was prepared by centrifugation in different conditions (the centrifugal force was $300\times g\sim 600\times g$, and the centrifugal time was 4~12 min). The number of blood cells of the anticoagulant whole blood, the leukocyte-depleted blood sample and PRP were counted by hematology analyzer, and platelet recovery rates were compared between different methods. **Results** The platelet recovery rate was highest when the blood samples of rats and mice were centrifuged at $400\times g$ and $300\times g$ for 8 min respectively. **Conclusion** It is a key to prepare PRP by single centrifugation that selecting the appropriate centrifugal force and time and reaching a critical state before the formation of the buffy coat.

Key words: rat; mouse; platelet rich plasma; centrifugal condition

研究表明,富血小板血浆 (PRP) 因含有多种生长因子,如血小板源生长因子 (PDGF)、转化生长因子 (TGF- β)、血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素样生长因子 (IGF-1)、成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等,在参与止血的同时,具有调控细胞增殖与分化,刺激血管和周围神经再生,促进伤口愈合等功能^[1-3]。人们开

展了大量的动物实验探索 PRP 在医疗领域的应用前景。然而,由于 PRP 的制备方法各不相同,产品质量参差不齐,研究者在相似的实验中往往得到不同甚至相反的实验结果^[4-5],严重影响了血小板相关研究的可靠性。

大、小鼠作为实验动物在 PRP 的研究中具有很

^{*} 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81600148)。
作者简介:孙振威,男,主管技师,主要从事血液免疫学研究。 △ 通信作者, E-mail: ningqun66@163.com。
本文引用格式:孙振威,仓宝成,宁群,等. 一次离心法制备大、小鼠富血小板血浆实验条件的优化[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(2): 129-131.

多优点,如与人的基因同源性高,便于基因修饰,适于分子机制研究;有大量的鼠源抗体,便于进行免疫学研究;药品用量少,适于体内输注实验等^[6-8]。大、小鼠血小板的提取方法也有很多种,既有白膜法,也有富血小板血浆法;既有二次离心法,也有一次离心法^[9-15]。研究表明,小动物血小板提取过程中,由于血量较少,采用白膜法第一次离心后形成的血小板堆积层很薄,手工分离难度较大,故推荐采用富血小板血浆法^[16]。同时,一次离心法的血小板提取率虽不及二次离心法,但其获得的血小板活性明显高于二次离心法,更适于血小板功能试验^[17]。本研究旨在优化一次离心法制备大、小鼠 PRP 的实验条件,筛选出一种稳定可靠的血小板提取方法,为血小板相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠(270~340 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物合格证号:SCXK(京)2012-0001];SPF 级雄性 BALB/C 小鼠(11~13 周龄,24~28 g)购自军事科学院军事医学研究院动物中心[动物合格证号:SCXK-(军)]。常规饲养,实验当天从动物房取出。

1.2 实验器材 小动物呼吸机(D79232 March,德国 HSE),无纺布滤器(X30,江苏东润),高速离心机(Z-16PK,德国 SIGMA),动物血液分析仪(950FS,英国 HEMAVET),FS-PAK 鞘液(英国 Drew Scientific,批号:570265249),戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,化学纯),肝素钠(国药集团,批号:20131016),CPDA-1 血液保养液(美国 SIGMA-ALDRICH,货号:C4431),0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司)。

1.3 实验方法

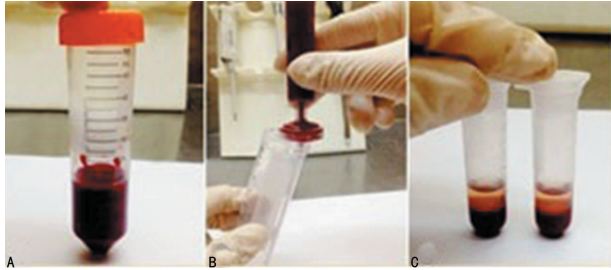
1.3.1 麻醉 配制 2.5%(g/mL)戊巴比妥钠溶液,分别腹腔注射 0.23%、0.35%(容积/大、小鼠的体重量)的戊巴比妥钠溶液麻醉大、小鼠。

1.3.2 取血 配制 0.3%(g/mL)肝素钠溶液,湿润管壁后进行大鼠左侧股动脉插管放血,每只大鼠放血 10 mL,加入 14% CPDA-1 抗凝,实验一次取血 30 mL。对小鼠行气管插管通气,以吸入 0.14 mL CPDA-1 的注射器心脏穿刺取血 1 mL,实验一次取血 18 mL,贴壁缓慢注入 50 mL 离心管中,混匀^[18]。

1.3.3 滤白 超净工作台,取出无菌滤器(滤过直径 5~10 μm),上端连接拔除针头和内芯的 10 mL 注射器,下端紧贴另一离心管管壁,将全血缓慢注入上端注射器管内,依靠重力作用使血液自然滤过。

1.3.4 离心 将滤除白细胞的血样每份 1.5 mL 分装入无菌的 5 mL EP 管中,封口膜封口,22 ℃ 条件下离心。血样分成两层,上层为 PRP 层,下层为红细胞层。超净工作台用移液器转移上层 PRP 于另一无

菌 EP 管中。离心过程中以离心力和离心时间为考察因素,进行正交设计。大鼠血样离心过程中离心力分别取 300×g、400×g、500×g、600×g 4 个水平,小鼠血样离心过程中离心力分别取 300×g、400×g 2 个水平,离心时间均取 4、6、8、10、12 min 5 个水平,每个试验点重复 3 次,见图 1。



注:A 为 14%CPDA-1 抗凝全血;B 为白细胞滤除过程;C 为滤白全血离心后血液分层

图 1 PRP 提取过程

1.3.5 计数 测定抗凝全血、滤除白细胞后的血样和离心后的上层 PRP 体积,各自混匀后取 100 μL 用动物血液分析仪进行细胞计数,计算白细胞滤除率和不同离心方法的血小板回收率。白细胞滤除率=1-(滤除白细胞后血样体积×血样中白细胞计数)/(抗凝全血体积×全血中白细胞计数);血小板回收率=(富血小板血浆体积×富血小板血浆中血小板计数)/(滤除白细胞后血样体积×血样中血小板计数)。

1.4 统计学处理 使用 SAS 9.2 软件包进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对不同试验点数据间的差异进行正交设计一元定量资料方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白细胞滤除率 大、小鼠抗凝全血白细胞滤除率分别为(88.32±4.18)%和(85.16±6.06)%,滤除白细胞前后血样中红细胞、血小板计数结果差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 大鼠血小板回收率 在 4~12 min 的时间段内,随着离心时间的延长,300×g 离心力条件下,血小板回收率逐渐升高;400×g 离心力条件下,血小板回收率先升高再降低,并在离心 8 min 时达到峰值;500×g 和 600×g 离心力条件下,血小板回收率逐渐降低。见表 1。

表 1 不同离心条件下大鼠血小板回收率(%)

离心力	时间				
	4 min	6 min	8 min	10 min	12 min
300×g	12.1±0.7	18.1±1.2	20.1±0.9	22.1±1.5	25.1±2.1
400×g	41.1±2.6	42.1±0.9	44.1±1.7	26.1±3.4	10.1±0.2
500×g	34.1±1.8	26.1±2.3	17.1±0.8	14.1±0.6	4.1±0.5
600×g	37.1±2.9	30.1±1.4	14.1±1.5	7.1±0.8	5.1±0.4

2.3 小鼠血小板回收率 在 4~12 min 时间段内,随着离心时间的延长,300×g 离心力条件下,血小板回收率先升高再降低,并在离心 8 min 时达到峰值;400×g 离心力条件下,血小板回收率逐渐降低。见表 2。

表 2 不同离心条件下小鼠血小板回收率(%)					
离心力	时间				
	4 min	6 min	8 min	10 min	12 min
300×g	31.4±2.5	42.0±3.1	48.6±2.9	42.5±1.7	37.5±2.2
400×g	40.1±3.2	35.7±1.9	28.6±2.7	19.1±0.7	7.7±0.5

3 讨 论

全血中各组分的密度不同是离心法提取血小板的基础。在离心过程中,红细胞由于密度最大最先沉降于底部,血浆由于密度最小而形成上清层,白细胞和血小板的密度介于红细胞和血浆之间,随着离心过程的深入逐渐堆积于两者之间形成白膜层。本研究选用的无纺布滤器可有效滤除直径 10 μm 以上的白细胞,且对直径 5 μm 以下的血小板有良好的透过性^[19],提高了一次离心法制备 PRP 的纯度。一次离心法制备 PRP 实验条件优化的意义在于寻找到形成白膜层前的临界状态,以尽可能简单并最大量获取上层血浆中的血小板。

离心法提取血小板过程中影响血小板回收率的因素有很多,如采血过程、抗凝方法、样本量、离心力、离心加速度、离心时间、离心温度、离心机类型等,其中以离心力和离心时间影响最为显著^[16],本研究在固定其余参数的基础上,重点对这两项实验条件进行了优化。KÜÇÜK 等^[10]、MAMMOTO 等^[11]和 HOSHI 等^[13]采用一次离心法提取大、小鼠血小板时多把离心力设定在 100×g~700×g,离心时间设定在 5~15 min。根据预实验结果,以 300×g~600×g 的离心力和 4~12 min 的离心时间为考察因素,进行正交试验设计,综合考察了二者对血小板回收率的交互影响作用。

研究表明,离心力相同的情况下,随着离心时间的延长,PRP 的体积逐渐增大,PRP 中血小板的计数值逐渐减少。随着离心力的增加,PRP 体积增大的速度和 PRP 中血小板计数减少速度加快。探寻最佳离心条件的过程即是在 PRP 体积与 PRP 血小板计数值此消彼长的过程中获取二者最大乘积时的离心力和离心时间。本实验发现,大、小鼠抗凝全血滤除白细胞后分别以 400×g 和 300×g 的离心力离心 8 min 时,血小板回收率最高。离心力和离心时间应该保持在一定范围内,不宜过大或过小。如果离心力过小或离心时间过短,则离心后分离出来的 PRP 体积有限,血小板回收率较低。相反,如果离心力过大或者离心

时间过长,则血液中的血小板大部分进入白膜层,PRP 中血小板计数值很低,血小板回收率同样不高。

4 结 论

选择合适的离心力和离心时间,达到白膜形成前的临界状态,是一次离心法制备 PRP 的关键。本次实验条件范围内,大、小鼠抗凝全血滤除白细胞后分别以 400×g 和 300×g 的离心力离心 8 min 时,血小板回收率最高。

参考文献

[1] SMITH O J, KANAPATHY M, KHAJURIA A, et al. Protocol for a systematic review of the efficacy of fat grafting and platelet-rich plasma for wound healing[J]. Syst Rev, 2017, 6: 111.

[2] PIETRAMAGGIORI G, SCHERER S S, MATHEWS J C, et al. Quiescent platelets stimulate angiogenesis and diabetic wound repair[J]. J Surg Res, 2010, 160(1): 169-177.

[3] MARIA-ANGELIKI G, ALEXANDROS-EFSTRATIOS K, DIMITRIS R, et al. Platelet-rich plasma as a potential treatment for noncicatricial alopecias[J]. Int J Tricol, 2015, 7(2): 54-63.

[4] MOGHADAM A, KHOZANI T T, MAFI A, et al. Effects of platelet-rich plasma on kidney regeneration in gentamicin-induced nephrotoxicity[J]. J Korean Med Sci, 2017, 32(1): 13-21.

[5] MARTÍN-SOLÉ O, RODÓ J, GARCÍA-APARICIO L, et al. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on a model of renal ischemia-reperfusion in rats[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160703.

[6] SEKERCI C A, TANIDIR Y, SENER T E, et al. Effects of platelet-rich plasma against experimental ischemia/reperfusion injury in rat testis[J]. J Pediatr Urol, 2017, 13(3): 317.

[7] JANSEN A J, JOSEFSSON E C, RUMJANTSEVA V, et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb/IIIa metalloproteinase-mediated cleavage in mice[J]. Blood, 2012, 119(5): 1263-1273.

[8] ZHAO J, SUN Z, YOU G, et al. Transfusion of cryopreserved platelets exacerbates inflammatory liver and lung injury in a mice model of hemorrhage[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2018, 85(2): 327-333.

[9] LORENZO-ZUÑIGA V, BOIX J, MORENO DE VEGA V, et al. Efficacy of platelet-rich plasma as a shielding technique after endoscopic mucosal resection in rat and porcine models[J]. Endosc Int Open, 2016, 4(8): E859-864.

[10] KÜÇÜK L, GÜNAY H, ERBAS O, et al. Effects of platelet-rich plasma on nerve regeneration in a rat model [J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2014, 48(4): 449-454.

[11] MAMMOTO T, JIANG A, JIANG E, (下转第 135 页)

性 RNA (ceRNA) 与 miRNA 相互作用, lncRNA 与 miRNA 之间具有相互调控关系, 并通过调控靶基因的表达, 在卵巢癌发生、发展中发挥重要作用。

4 结 论

卵巢癌侵袭转移是多因素作用的结果, miRNA 及 lncRNA 均在上皮性卵巢癌中的侵袭、转移方面有着重要意义。miRwalk、HMDD、starBase 等是常用的生物信息学分析数据库, 可有效地用于 miRNA 与疾病关系研究^[13]。本研究利用生物信息学分析技术成功描绘了一张与卵巢癌相关的 miRNA 分子调控网络, 为卵巢癌相关分子机制研究、早期诊断、早期治疗提供了有力的技术支撑。

参考文献

[1] REID B M, PERMUTH J B, SELLERS T A. Epidemiology of ovarian cancer; a review[J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14(1): 9-32.

[2] LA VECCHIA C. Ovarian cancer; epidemiology and risk factors[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(1): 55-62.

[3] NIKPAYAM E, TASHARROFI B, SARRAFZADEH S, et al. The role of long non-coding RNAs in ovarian cancer [J]. *Iran Biomed J*, 2017, 21(1): 3-15.

[4] LI Y, QIU C, TU J, et al. HMDD v2. 0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42 (Database issue): D1070-1074.

[5] LI J H, LIU S, ZHOU H, et al. starBase v2. 0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA inter-

action networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D92-97.

[6] WANG J, MA R, MA W, et al. LncDisease: a sequence based bioinformatics tool for predicting lncRNA-disease associations[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): e90.

[7] CARLIN D E, DEMCHAK B, PRATT D, et al. Network propagation in the cytoscape cyberinfrastructure[J]. *PLoS Comput Biol*, 2017, 13(10): e1005598.

[8] IORIO M V, CROCE C M. Commentary on microRNA fingerprint in human epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(21): 8699-8707.

[9] ZHAO H Y, XU H, XUE L C. Regulatory network involving miRNAs and genes in serous ovarian carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 6259-6268.

[10] MIHANFAR A, FATTAHI A, NEJABATI H R. MicroRNA-mediated drug resistance in ovarian cancer [J/OL]. *J Cell Physiol*, 2017-06-19 [2017-09-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28628227>.

[11] ZHANG S, NG M K. Gene-microRNA network module analysis for ovarian cancer[J]. *BMC Syst Biol*, 2016, 10 (Suppl 4): S117.

[12] YANG K, HOU Y, LI A, et al. Identification of a six-lncRNA signature associated with recurrence of ovarian cancer[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 752.

[13] 周嘉彬, 吕钰冰, 韩泽平, 等. 生物信息学分析 mircoRNA 在乳腺癌中的调控网络[J]. *中国医药生物技术*, 2016, 11 (6): 559-562.

(收稿日期: 2018-07-20 修回日期: 2018-10-21)

(上接第 131 页)

et al. Platelet-rich plasma extract prevents pulmonary edema through angiopoietin-Tie2 signaling[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52(1): 56-64.

[12] STEFANINI L, RODEN R C, BERGMEIER W. CalDAG-GEFI is at the nexus of calcium-dependent platelet activation[J]. *Blood*, 2009, 114(12): 2506-2514.

[13] HOSHI R, MURATA S, MATSUO R, et al. Freeze-dried platelets promote hepatocyte proliferation in mice [J]. *Cryobiology*, 2007, 55(3): 255-260.

[14] DOLE V S, BERGMEIER W, MITCHELL H A, et al. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo; role of P-selectin[J]. *Blood*, 2005, 106(7): 2334-2339.

[15] ZHANG J, YUAN T, ZHENG N, et al. The combined use of kartogenin and platelet-rich plasma promotes fibrocartilage formation in the wounded rat Achilles tendon entheses[J]. *Bone Joint Res*, 2017, 6(4): 231-244.

[16] 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.

[17] ARGÜELLES D, CARMONA JU, PASTOR J, et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets[J]. *Res Vet Sci*, 2006, 81(2): 237-245.

[18] XIA S, CHEN G, WANG B, et al. Addition of sodium pyruvate to stored red blood cells attenuates liver injury in a murine transfusion model [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 3549207.

[19] TAO Z Y, XIA H, CAO J, et al. Development and evaluation of a prototype non-woven fabric filter for purification of malaria-infected blood[J]. *Malar J*, 2011, 10: 251.

(收稿日期: 2018-06-26 修回日期: 2018-09-25)