

网络出版时间: 2024-07-04 13:58:51 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1448.006>

# 冷冻保存富血小板血浆对创伤修复的影响及体外机制研究

苏睿<sup>1</sup>, 董良<sup>2</sup>, 潘钊<sup>2</sup>, 闻慧琴<sup>1</sup>

**摘要** 目的 评估  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冷冻保存后冻融的富血小板血浆 (PRP) 对伤口愈合相关细胞的影响, 揭示超低温冻融的 PRP 在创伤修复中的机制, 明确低温冷冻保存 PRP 对促进伤口愈合应用的可行性和有效性。方法 使用未激活的新鲜 PRP、钙离子激活的新鲜 PRP 和冻融后 PRP 分别与巨噬细胞、成纤维细胞和血管形成细胞共培养, 测定比较巨噬细胞极化与炎症反应相关因子的表达及细胞迁移率和增殖率等多项指标, 分析 PRP 对巨噬细胞极化、炎症及细胞增殖的影响。结果 与对照组比较, 超低温冻融后的 PRP 使巨噬细胞 M1 样极化基因 iNOS 表达降低 ( $P < 0.0001$ ), NO 分泌减少 ( $P < 0.001$ ), 尿素含量增加 ( $P < 0.0001$ ), M1 相关炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 降低 ( $P < 0.001$ ), 白细胞介素 (IL)-1 分泌降低 ( $P < 0.001$ ), M2 相关抗炎因子 IL-10、IL-12 分泌水平增加 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。此外, 冻融 PRP 共培养明显促进细胞迁移, 提高了血管形成效率, 高于新鲜 PRP 组 ( $P < 0.01$ ), 与激活 PRP 组效果相当。细胞活死染色和 CCK-8 增殖实验也显示与冻融 PRP 共培养的 L929 和 HUVEC 细胞增殖率均显著增加 ( $P < 0.01$ )。结论  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冷冻保存后的 PRP 能够显著增强细胞的迁移、分化和增殖能力, 同时抑制炎症因子产生, 促进巨噬细胞的 M2 样极化。低温冷冻保存可被视为一种有效的 PRP 保存方法。

**关键词** 富血小板血浆; 低温冷冻保存; 巨噬细胞极化; 创伤修复; 血管形成

中图分类号 R 453.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1143-08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.006

在创面修复过程中, 血小板发挥重要功能, 不仅参与快速止血, 同时释放生长因子以促进自体组织再生修复<sup>[1]</sup>。富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 是由离心制备而成的含高浓度血小板的血浆。因其富含多种促进组织愈合、抗炎修复和软组织再生的生长因子和蛋白质, 有望被开发为用于创面愈

合的新型制剂<sup>[2]</sup>。传统手工制备法离心提取的 PRP, 制备量小, 血小板浓度较低, 红细胞污染率高, 且抽取的余血细胞及成分均弃去, 需要多次静脉穿刺才能获取足够量的 PRP。相比之下, 机器制备法获得的 PRP 产量大, 浓度高, 无红细胞污染率, 除现用还可分袋冻存, 且血细胞等成分在制备的同时均可回输给患者。机器制备法获得的高浓度 PRP 可以在单次静脉穿刺后获得足够的量用于治疗, 这不仅有效简化对患者的管理, 更可节省多次制备使用的时间, 大大提高了临床使用的便捷性, 降低了医疗费用, 也有利于患者的后期护理<sup>[3-4]</sup>。然而, 关于冷冻-解冻过程对 PRP 促进创面修复作用的影响及机制尚不明确。该研究旨在评估  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冷冻保存后冻融的 PRP 对伤口愈合相关细胞的影响, 并探究其作用机制, 以深入了解低温冷冻保存 PRP 产生的生物学效应。

## 1 材料与方法

**1.1 PRP 的准备** 新鲜 PRP 由德国费森尤斯公司的 Com Tec 自动血液成分分离机分离纯化制备而成, 使用管路型号为 C5L, 来源于安徽医科大学第一附属医院输血科的健康志愿者。PRP 经纯化制备后, 一部分在细胞室中无菌分装后冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱。冻融 PRP 使用前由冷冻保存的 PRP 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴融化获得。新鲜激活 PRP 则通过将凝血酶冻干粉和葡萄糖酸钙注射液制备的凝血酶激活剂激活获得。

**1.2 主要试剂与仪器** DMEM、RPMI1640、DMEM/F12、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、胎牛血清、0.25% 胰酶细胞消化液、青-链霉素均购自美国 Gibco 公司; 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 购自美国 Sigma 公司; 白细胞介素 (interleukin, IL)-1、IL-6、IL-10、IL-12 及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒均购自美国 RD 公司; NO 检测试剂盒购自中国盒子生物科技有限公司; 基质胶购自美国 BD 公司; 尿素氮检测试剂盒购自美国 Abcam 公司; CCK-8 试剂盒、Calcein-AM/PI 活/死细胞双染试剂盒购自日本同仁化

2024-03-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81801831); 中国博士后科学基金 (编号: 2021M703067)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院输血科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 中国科学院杭州医学研究所, 杭州 310022

作者简介: 苏睿, 女, 硕士研究生;

闻慧琴, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wenhuiqin@ahmu.edu.cn

学研究所; RNA 提取试剂盒、反转录预混型试剂盒购自艾科瑞生物工程有限公司; 多功能酶标仪购自美国 TECAN 公司; 倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; 生物安全柜、细胞培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司; 冷冻离心机购自美国 Eppendorf 公司; PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。

**1.3 细胞培养** 人单核细胞来源的巨噬细胞系 THP-1、小鼠成纤维细胞 L929、人脐静脉内皮细胞 HUVEC 均购自美国典型培养物保藏中心。THP-1 细胞在 RPMI1640 培养基中培养, L929 细胞在 DMEM 高糖培养基中培养, HUVEC 细胞在 DMEM/F12 培养基中培养。所有培养基中添加 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。每隔 3 d 更换 1 次培养基, 通常 1 周传代 2 ~ 3 次。

**1.4 冻融 PRP 对巨噬细胞极化影响的检测** 以  $8 \times 10^5$  个/ml 的细胞密度将 THP-1 接种在 6 孔板中, 并在培养过程中添加 100 ng/ml PMA 诱导 48 h, 以促使 THP-1 细胞向 M0 型巨噬细胞方向分化。在 M0 型巨噬细胞的基础上继续培养, 向培养基中添加 100 ng/ml 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS) 诱导 M0 向 M1 型巨噬细胞方向分化; 向培养基中添加 20 ng/ml IL-4 和 20 ng/ml IL-13 诱导 M0 向 M2 型巨噬细胞方向分化。同样, M0 细胞分别与含有 5% 终浓度的新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 以及经过冻融的 PRP 共培养 3 d, 然后收集细胞。其中, M0 细胞为阴性对照, M1 和 M2 组作为阳性对照。按照试剂盒说明书提取 RNA, 使用 Nanodrop one 测得 RNA 浓度后进行 RT-PCR 检测, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 随后加入模板(表 1), 进行 qPCR 检测巨噬细胞极化相关基因 iNOS 和 Arg-1 的相对表达含量。

表 1 用于 RT-PCR 和 q-PCR 分析的相关基因的引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
iNOS	F: AGAAACTGAAGAAATCGCTCT R: CCGAGGCCAAACACAGCGTA
Arg-1	F: AATCTACAAAACAGGGCTACTCT R: TGTGATTACCTCCGAGCAA
GAPDH	F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R: TGCTGAAGACGCCACTGGA
VEGF	F: TGCGGATCAAACCTCACCA R: CAGGGATTTTCTTGTCTTGCT

**1.5 冻融 PRP 对巨噬细胞功能影响的检测**

**1.5.1 比色法检测细胞培养上清液 NO 含量** 在 6

孔板内将新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP 与 M0 细胞共培养 3 d 后收集细胞上清液, 其中 M0 细胞为对照组。取 100  $\mu$ l 细胞培养上清液置于 96 孔板中, 立即加入 50  $\mu$ l 试剂 A、B。室温下反应 15 min 后, 使用酶标仪测定波长 550 nm 处的吸光度值。

**1.5.2 比色法检测细胞培养上清液尿素含量** 取 50  $\mu$ l 细胞培养上清液置于 96 孔板中, 加入 50  $\mu$ l 复合检测试剂, 按照试剂盒说明书中的步骤进行反应。37 °C 下反应 60 min 后, 使用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度值。根据试剂盒提供的标准曲线计算出样品中尿素浓度。

**1.5.3 ELISA 检测细胞因子分泌** 在 6 孔板内将新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP 与 M0 细胞共培养 3 d 后收集细胞上清液, 其中 M0 细胞为对照组。经 1 500 r/min 离心 10 min 后, 使用 ELISA 试剂盒检测炎症因子 IL-1、TNF- $\alpha$  和抗炎因子 IL-10、IL-12 的浓度。

**1.6 冻融 PRP 对 L929 迁移能力的影响** 以  $1 \times 10^6$  个/孔的细胞密度在 6 孔板中接种 L929 细胞悬液, 预培养过夜后进行划痕实验。使用无菌 PBS 洗细胞 3 次, 去除不贴壁细胞。随后, 使用含有 5% 终浓度的新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP 的无血清培养基与细胞共培养, 对照组使用新鲜无血清培养基。12 h 后观察和拍摄细胞迁移情况, 并使用 ImageJ 软件分析迁移面积数据。

**1.7 冻融 PRP 对 HUVEC 成血管能力的影响**

**1.7.1 体外成血管实验** 在冰上按 250  $\mu$ l/孔加入 4 °C 冻融的基质胶至 24 孔板中, 置于细胞培养箱中 1 h 待其凝固。随后用胰酶消化细胞, 将 HUVEC 重悬于含有新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP 的培养基中, 并调整细胞密度为  $2 \times 10^6$  个/ml, 对照组则加入纯培养基。放入培养箱培养 4 h 后, 使用显微镜随机记录 5 个视野, 并使用 ImageJ 软件分析血管内皮细胞的小管分枝和数量等参数。

**1.7.2 qPCR 检测 HUVEC 成血管相关基因 VEGF 的表达** 在 6 孔板中以  $1 \times 10^4$  个/孔的细胞密度接种 HUVEC 悬液, 预培养过夜贴壁后加入 5% 终浓度的新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP 至 HUVEC 培养基中, 与细胞分别共培养 3、5、7 d。在相应的培养天数提取 RNA 进行 VEGF 基因的 RT-PCR 和 qPCR 检测, 以研究其表达情况。

**1.8 冻融 PRP 对 L929 和 HUVEC 增殖能力的影响**

**1.8.1 Live/Dead 荧光染色评估细胞活力** 在 24 孔板中以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种细胞悬液, 预培养过夜后加入 5% 终浓度的新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP, 对照组则加入不含 PRP 材料的培养基, 与细胞分别共培养 1、3、5 d。每孔用 2 ml PBS 冲洗 1 次后, 使用活/死细胞双染试剂盒对细胞进行染色, 在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 15 min 2 ml PBS 清洗 1 次, 使用倒置荧光显微镜观察细胞染色情况。

**1.8.2 CCK-8 实验测定细胞增殖** 在 96 孔板中以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种细胞悬液, 并放入培养箱中预培养过夜贴壁。随后, 将细胞分别与上述新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 和冻融 PRP 各材料共培养 1、3、5 d, 对照组则加入不含 PRP 材料的培养基。在相应的检测时间点配置含有 10% CCK-8 溶液的培养基, 并以换液的方式向每个孔中加入  $100 \mu\text{l}$  CCK-8 溶液。将培养板放入培养箱中孵育 2 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值, 并以 650 nm 作为校正波长。

**1.9 统计学处理** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据结果使用 Graphpad prism 6.0 软件进行绘图。对于三组或三组以上的结果采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 冻融 PRP 对巨噬细胞极化的影响** 与 M0 组比较, M1 组显示出 iNOS 的高表达, M2 组显示出 Arg-1 的高表达, 这提示细胞极化模型构建成功。与巨噬细胞共培养 3 d 后相关基因检测结果显示, 与 M1 组比较, 添加 PRP 各组中 M1 巨噬细胞标志物 iNOS 表达水平相对较低。其中, 冻融 PRP 组比新鲜 PRP 组和新鲜激活 PRP 组表达更少的 iNOS ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ) (图 1A)。另外, 与 M0 组比较, PRP 处理的三组中 M2 巨噬细胞标志物 Arg-1 表达水平趋于更高, 这表明 PRP 的加入促进了巨噬细胞向 M2 型极化。其中, 冻融 PRP 组中 M2 表型相关基因 Arg-1 的表达与新鲜 PRP 组差异无统计学意义 (图 1B), 这表明冻融 PRP 促进巨噬细胞向 M2 方向转化的能力与新鲜 PRP 相当。

**2.2 冻融 PRP 对巨噬细胞功能的影响** 经过巨噬细胞与冻融 PRP 共培养 3 d 后, 与对照组比较, NO 的产生被有效降低 (图 2A)。与新鲜 PRP 组比较, 冻融 PRP 组细胞上清液尿素升高 [ $(14.02 \pm 0.48)$

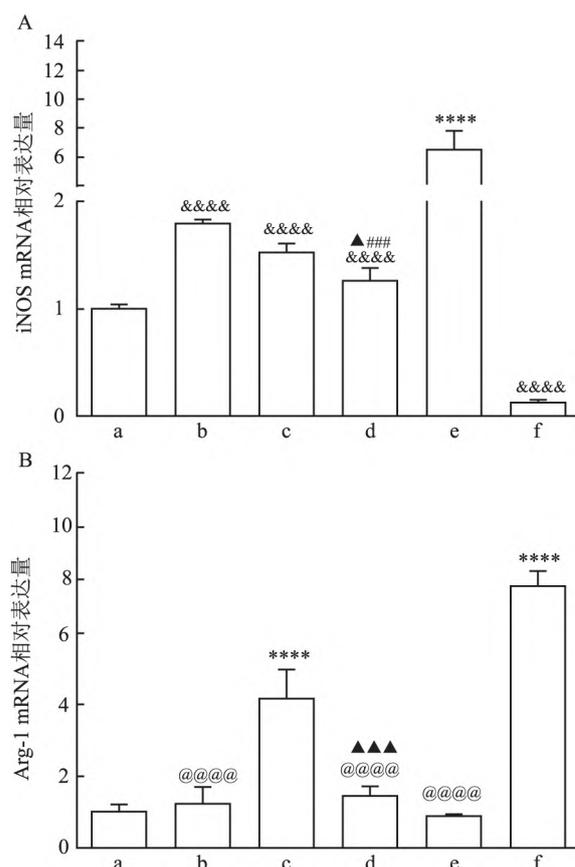


图 1 冻融 PRP 对巨噬细胞 M1/M2 极化的影响 ( $n=3$ )

A: iNOS mRNA 相对表达量; B: Arg-1 mRNA 相对表达量; a: M0 组; b: 新鲜 PRP 组; c: 新鲜激活 PRP 组; d: 冻融 PRP 组; e: M1 组; f: M2 组; 与 M0 组比较: \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; 与 M1 组比较: &&&&  $P < 0.0001$ ; 与 M2 组比较: @@@@  $P < 0.0001$ ; 与新鲜 PRP 组比较: ###  $P < 0.001$ ; 与新鲜激活 PRP 组比较: ▲  $P < 0.05$ , ▲▲▲  $P < 0.001$

$\text{nmol}/\mu\text{l}$  vs  $(11.08 \pm 0.66) \text{ nmol}/\mu\text{l}$ ], 差异有统计学差异 ( $P < 0.05$ , 图 2B)。加入冻融 PRP 的巨噬细胞在共培养 3 d 后, 与对照组比较, 炎症相关的细胞因子  $\text{TNF-}\alpha$  分泌水平降低至  $(122.63 \pm 5.09) \text{ ng/ml}$  (图 2C) 及 IL-1 降低至  $(128.97 \pm 12.46) \text{ ng/ml}$  (图 2D), 而抗炎相关的细胞因子 IL-10 分泌水平增加至  $(76.09 \pm 3.90) \text{ ng/ml}$  (图 2E) 和 IL-12 增加至  $(37.88 \pm 7.77) \text{ ng/ml}$  (图 2F), 这表明冻融后的 PRP 具有促进抗炎作用, 可通过下调炎症相关细胞因子的水平并上调抗炎相关细胞因子的水平实现。值得注意的是, 与新鲜 PRP 组比较, 冻融 PRP 组炎症相关细胞因子  $\text{TNF-}\alpha$  表达减少 ( $P < 0.05$ ), 与新鲜激活 PRP 组差异无统计学意义。这表明冻融 PRP 在炎症调节方面表现出生物活性的保持或增加, 有望成为有力的抗炎治疗产品。

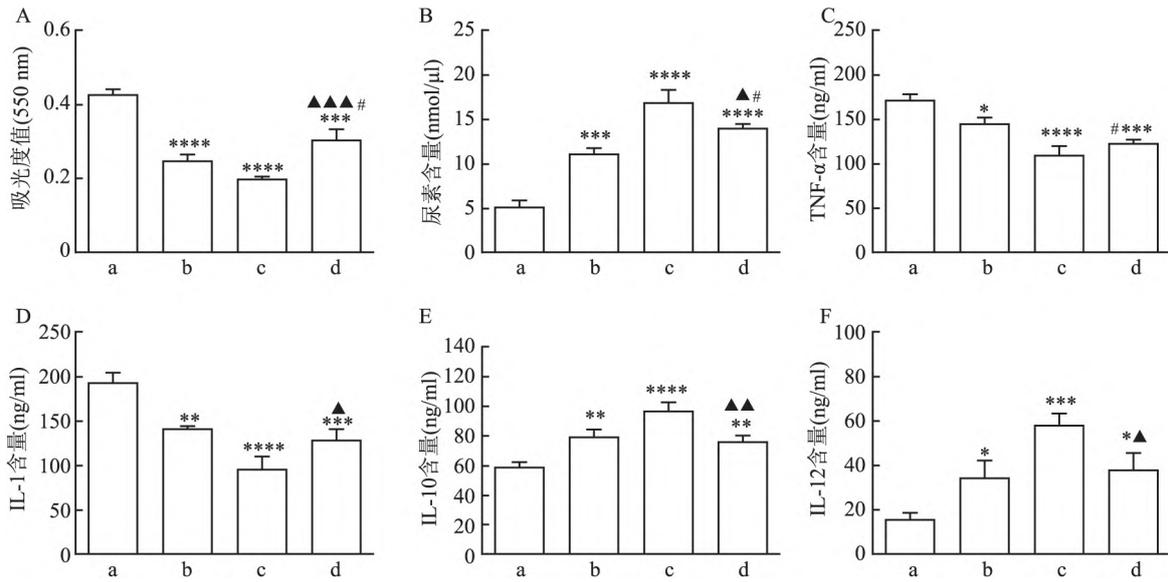


图2 冻融 PRP 对巨噬细胞功能的影响(n = 3)

A: NO 表达; B: 尿素含量; C: TNF-α 含量; D: IL-1 含量; E: IL-10 含量; F: IL-12 含量; a: 对照组; b: 新鲜 PRP 组; c: 新鲜激活 PRP 组; d: 冻融 PRP 组; 与对照组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001; 与新鲜 PRP 组比较: # P < 0.05; 与新鲜激活 PRP 组比较: ▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01, ▲▲▲ P < 0.001

**2.3 冻融 PRP 对 L929 迁移能力的影响** 经过 12 h 的细胞迁移实验观察,结果显示,与对照组比较,负载 PRP 的各组增强了 L929 的迁移能力,大量细胞迁移到划痕中(图 3A)。此外,使用 ImageJ 软件对 0 h 和 12 h 的细胞迁移面积进行了定量分析,结果显示 F 值为 21.76,并且冻融 PRP 促细胞迁移能力与新鲜 PRP 相当(图 3B),两组之间差异无统计学意义,这意味着冷冻保存不会阻碍 PRP 刺激成纤维细胞增殖的能力。

**2.4 冻融 PRP 对 HUVEC 成血管能力的影响** 在体外成血管试验中,使用 ImageJ 软件对随机选取的 3 个视野下的血管生成分支数和血管生成连接点数等参数进行定量分析(图 4A ~ C),结果发现与对照组比较,负载 PRP 的各组明显促进了血管生成。其中冻融 PRP 组在促生成连接点数量方面表现出比新鲜 PRP 组更为优越的性能(P < 0.001),其血管生成结数量更多,管形成效率更高,与新鲜激活 PRP 组的促血管能力相当。此外,qPCR 结果显示,随着培养时间的延长,负载 PRP 的各组 VEGF mRNA 的表达量逐渐增加,与体外血管生成实验的结果相互印证(图 4D)。

**2.5 冻融 PRP 对 L929 和 HUVEC 增殖能力的影响** 含 5% 终浓度的新鲜 PRP、新鲜激活 PRP 及冻融 PRP 与 L929 细胞共培养 1、3、5 d 后,倒置荧光显微镜下观察细胞染色结果,发现加入 PRP 的各组的

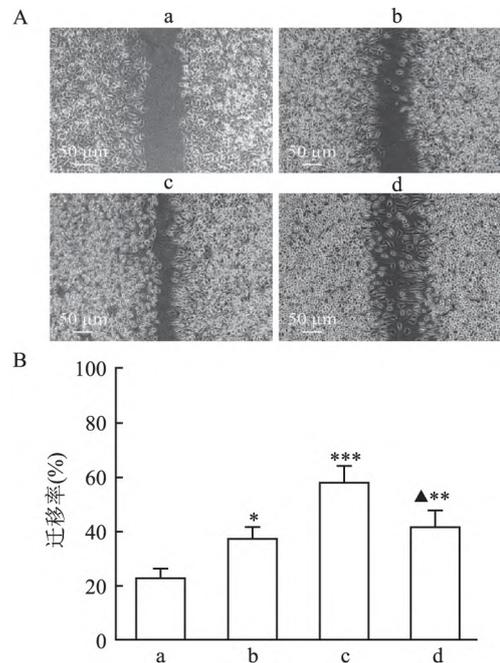


图3 冻融 PRP 对 L929 成纤维细胞迁移能力的影响(n = 3)

A: 12 h 细胞划痕试验 ×10; B: 细胞迁移能力比较; a: 对照组; b: 新鲜 PRP 组; c: 新鲜激活 PRP 组; d: 冻融 PRP 组; 与对照组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001; 与新鲜激活 PRP 组比较: ▲ P < 0.05

L929 细胞与对照组比较均出现增殖(图 5A)。CCK-8 结果表明,冻存后的 PRP 显示出比新鲜 PRP 更好的促细胞增殖作用(图 5B),在第 5 天时甚至显示出比新鲜激活 PRP 更高的细胞存活率(P < 0.05,图 5C)。同样,上述材料与 HUVEC 共培养一段时

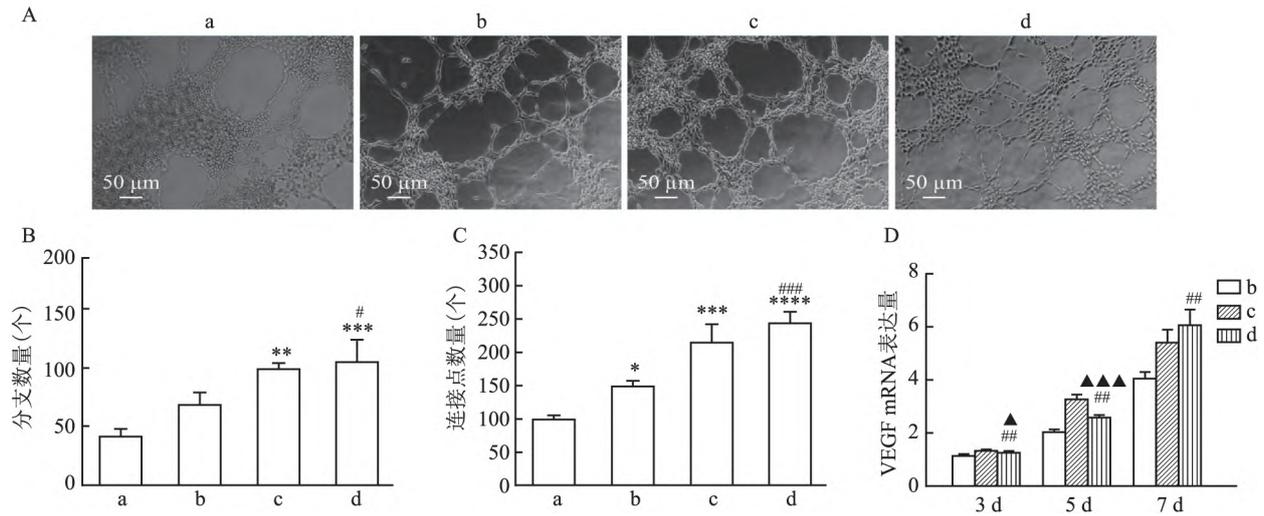


图4 冻融 PRP 对 HUVEC 内皮细胞成血管能力的影响 (n=3)

A: 体外成血管试验 ×10; B: 血管生成分支数统计; C: 血管生成连接点数统计; D: qPCR 检测成血管相关基因 VEGF 的 mRNA 表达; a: 对照组; b: 新鲜 PRP 组; c: 新鲜激活 PRP 组; d: 冻融 PRP 组; 与对照组比较: \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, \*\*\*\* P<0.0001; 与新鲜 PRP 组比较: # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001; 与新鲜激活 PRP 组比较: ▲ P<0.05, ▲▲ P<0.001

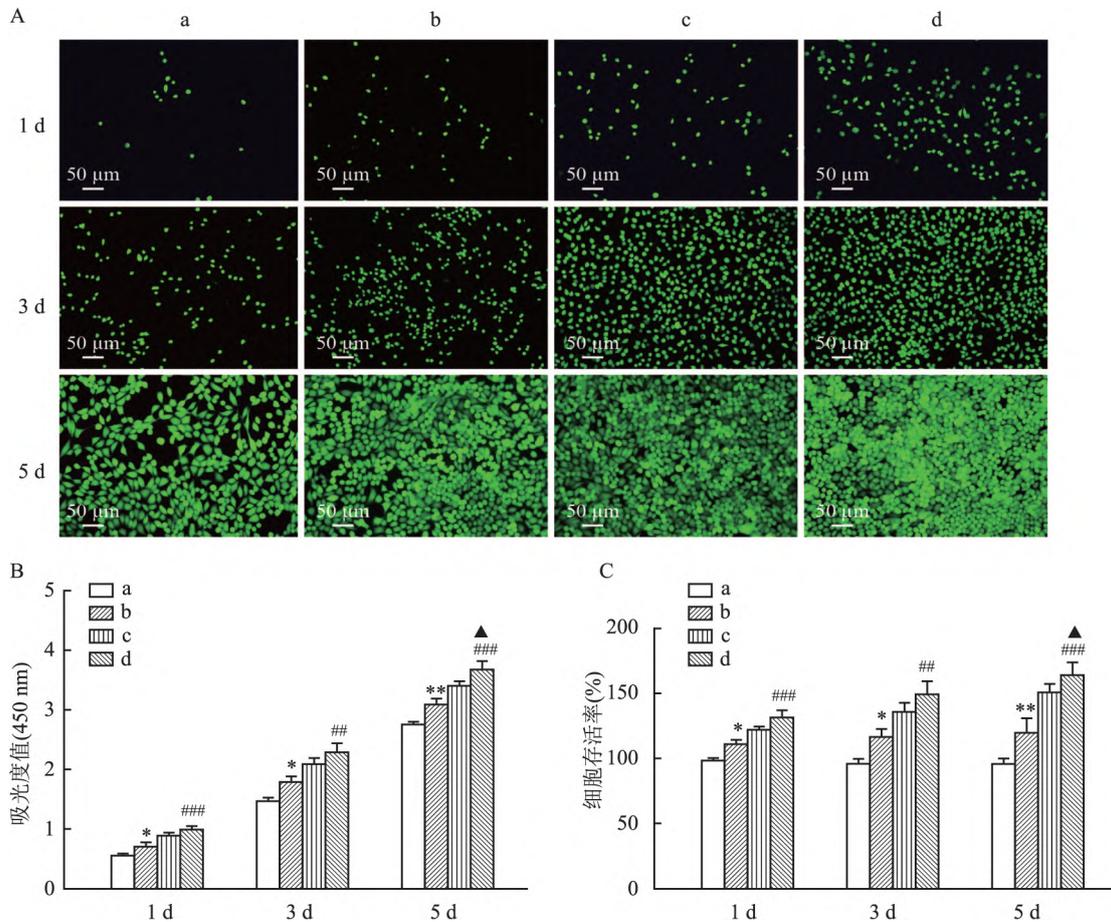


图5 冻融 PRP 对 L929 成纤维细胞增殖能力的影响 (n=3)

A: 活/死细胞染色结果 ×10; B: CCK-8 吸光度值结果; C: 细胞活性分析; a: 对照组; b: 新鲜 PRP 组; c: 新鲜激活 PRP 组; d: 冻融 PRP 组; 与对照组比较: \* P<0.05, \*\* P<0.01; 与新鲜 PRP 组比较: ## P<0.01, ### P<0.001; 与新鲜激活 PRP 组比较: ▲ P<0.05

间后,细胞活死染色结果表明冻融 PRP 对 HUVEC 细胞的增殖有显著的促进作用(图 6A)。CCK-8 结果显示在共培养 1 d 和 5 d,冻融 PRP 组的细胞计数与新鲜激活 PRP 组比较差异无统计学意义,而至第 3 天,冻融 PRP 组的细胞计数超过新鲜激活 PRP 组(图 6B、C)。这表明冻融 PRP 能够有效保持促细胞增殖的生物学活性,甚至表现出与新鲜激活 PRP 相当的效能,证实了冷冻保存作为一种便捷的 PRP 保存方式的潜在价值。

### 3 讨论

冷冻保存 PRP 的主要优势在于其能够延长 PRP 的保存时间,减少采集频率,提高质量一致性,从而扩大了其在临床治疗中的应用范围<sup>[5]</sup>。这一冷冻保存的策略有助于维持 PRP 的稳定性和可重复性,为长期疗法和研究提供了便捷性和可行性,展现极大的实用优势<sup>[6]</sup>。

冷冻保存 PRP 在伤口愈合中的应用前景广阔,但其生物学活性及体外细胞机制值得进一步研究。从生理学角度上来说,伤口愈合是一个生物学上相互联系的复杂过程<sup>[7]</sup>。其中,巨噬细胞快速由 M1 向 M2 极化,完成促炎向抗炎的过渡,是创伤快速修复的关键<sup>[8]</sup>。巨噬细胞的 M1/M2 极化状态可影响细胞内 iNOS 和 Arg-1 的合成,并进一步调控细胞内 NO 和尿素的合成<sup>[9]</sup>。此外,成纤维细胞及血管内皮细胞在组织结构重建阶段起着至关重要的作用<sup>[10-13]</sup>。全面了解这些细胞机制将为深入了解冷冻保存 PRP 的治疗潜力及其在伤口愈合中的应用提供有价值的见解。本研究旨在评估冷冻保存 PRP 对创面修复过程一些重要因素变化的影响,并阐明其在创面愈合过程中的作用机制。通过对细胞机制的分析,本研究将有助于优化 PRP 的冷冻保存和应用方案,提升 PRP 的治疗效果,促进 PRP 在医学领域的进一步临床应用。

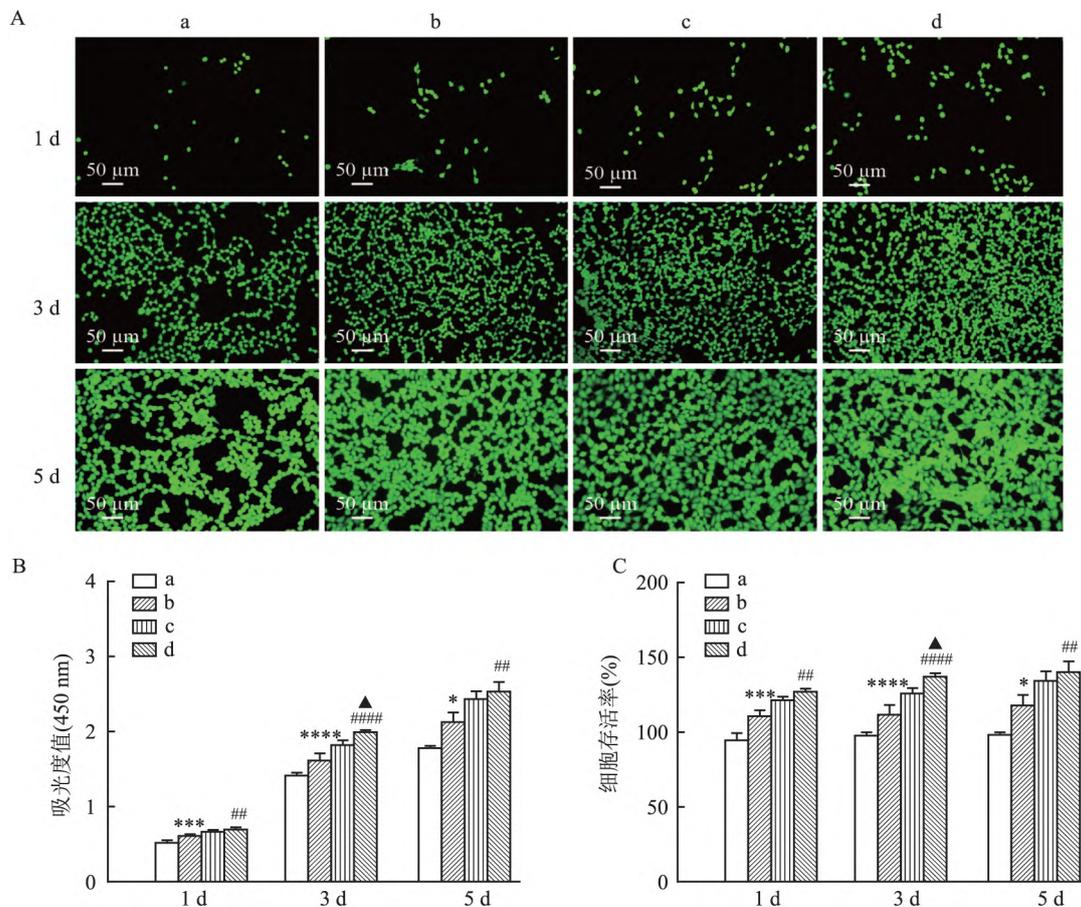


图 6 冻融 PRP 对 HUVEC 成血管细胞增殖能力的影响 (n = 3)

A: 活/死细胞染色结果 ×10; B: CCK-8 吸光度值结果; C: 细胞活性分析; a: 对照组; b: 新鲜 PRP 组; c: 新鲜激活 PRP 组; d: 冻融 PRP 组; 与对照组比较: \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001; 与新鲜 PRP 组比较: ### P < 0.01, #### P < 0.0001; 与新鲜激活 PRP 组比较: ▲ P < 0.05

综上所述,本研究探讨了冻融 PRP 在伤口愈合过程中的细胞效应机制。实验结果表明,冻融 PRP 在调节巨噬细胞向 M2 型极化、促进成纤维细胞的迁移和增殖,以及促进内皮细胞形成新的血管网络等关键细胞促愈合过程中显示出显著的调节潜力,能够影响多种伤口愈合关键细胞的生物行为。值得注意的是,冻融 PRP 的调节效果甚至在某些情况下超过了新鲜 PRP,并且与新鲜激活 PRP 的效应相当,这可能部分归因于冻融过程中对血小板膜的破坏,导致物理激活 PRP 释放生物有效成分发挥作用<sup>[14]</sup>。这些结果证实了冷冻保存是一种既安全又有效的 PRP 储存方式,能够有效维持其质量和生物活性,在伤口愈合领域具有广泛的应用前景,可以改善伤口愈合过程,加速组织修复。从临床角度来看,冷冻保存技术实现了 PRP 按需利用的灵活性,缓解了时间和地点的限制,为适应不同的临床环境提供有效的解决方案。然而,尽管本研究提供了有力的证据,但仍需进一步的深入研究来阐明其中的分子机制和生物学原理,以确定冷冻保存 PRP 在临床实际应用中的可行性和安全性。

#### 参考文献

- [1] 章凡,王哲,胡琨,等.血小板在炎症中的作用:促血栓形成与免疫功能[J].中国临床药理学杂志,2022,38(17):2089-93.
- [2] Dumont L J, Wolfe B, Leite C, et al. Feasibility evaluation of two novel systems for the automated preparation and extended storage of DMSO cryopreserved platelets[J]. Transfusion 2023, 63(8): 1554-62.
- [3] 莫晓群,庞梦茹,孙宇,等.自体单采富血小板血浆凝胶治疗慢性难治性创面的临床研究[J].中国美容整形外科杂志,2022,33(4):222-5.
- [4] Kawase T, Okuda K. Comprehensive quality control of the regenerative therapy using platelet concentrates: The current situation and prospects in Japan[J]. Biomed Res Int 2018, 2018:6389157.
- [5] 单桂秋,施琳颖,李艳辉,等.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):677-83.
- [6] 武文,马红霞,黄象艳.不同储存条件对单采富血小板血浆关键生长因子含量影响的实验研究[J].中国输血杂志,2023,36(8):655-9.
- [7] Dalisson B, Barralet J. Bioinorganics and wound healing[J]. Adv Healthc Mater 2019, 8(18): e1900764.
- [8] Louiselle A E, Niemiec S M, Zgheib C, et al. Macrophage polarization and diabetic wound healing[J]. Transl Res 2021, 236(5): 109-16.
- [9] Wu J, Zhang L, Shi J, et al. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury[J]. EBio Medicine 2020, 58: 102920.
- [10] 王曦,吴江.皮肤老化的几种常见细胞和富血小板血浆治疗进展[J].四川解剖学杂志,2021,29(1):192-5.
- [11] Gurevich D B, David D T, Sundararaman A, et al. Endothelial heterogeneity in development and wound healing[J]. Cells 2021, 10(9): 2338.
- [12] 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):1184-90.
- [13] 郭孝菊,戴莹,林文华,等.富血小板血浆治疗慢性难愈性创面的临床疗效[J].生物骨科材料与临床研究,2022,19(4):50-4.
- [14] Nguyen P A, Pham T A V. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration *in vitro* [J]. J Appl Oral Sci 2018, 26: e20180077.

## The impact and *in vitro* mechanisms of frozen stored platelet-rich plasma on wound repair

Su Rui<sup>1</sup>, Dong Liang<sup>2</sup>, Pan Zhao<sup>2</sup>, Wen Huiqin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Hangzhou Institute of Medicine Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022)

**Abstract Objective** To evaluate the effects and mechanisms of frozen-thawed platelet-rich plasma (PRP) stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  on wound healing-related cells. Furthermore, to explore the feasibility and effectiveness of using cryopreserved PRP at low temperatures for promoting wound healing. **Methods** Using non-activated fresh PRP, calcium-activated fresh PRP, and post-thawed PRP, co-cultured with macrophages, fibroblasts, and vascular endothelial cells, the study measured and compared the expression of polarization and inflammatory factors associated with macrophages, as well as cell migration and proliferation rates among other indicators, to analyze the effects of PRP on macrophage polarization, inflammation, and cell proliferation. **Results** Compared with the control group, post-cryopreserved PRP at ultra-low temperatures resulted in decreased expression of M1-like polarized macrophage gene iNOS

## 2-APB 通过 PKC $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$ 信号通路抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的软骨细胞凋亡

欧阳紫微<sup>1,2</sup>, 董雷<sup>2</sup>, 王琰<sup>1,2</sup>, 程远志<sup>1,2</sup>, 朱仁弟<sup>1,2</sup>, 周仁鹏<sup>1,2</sup>, 赵英杰<sup>1,2</sup>, 胡伟<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨 2-氨基乙氧基苯硼酸(2-APB)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的软骨细胞凋亡的作用及其机制。方法 实验分为 Control 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、2-APB 组和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2-APB 组。CCK-8 法检测各组细胞活力;显微镜下观察 2-APB 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的软骨细胞形态变化的影响;TUNEL 法和流式细胞术检测软骨细胞凋亡情况;流式细胞术检测脂质活性氧(ROS)水平;Western blot 法检测 2-APB 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的各组细胞中 Cleaved-PARP、p-PKC $\alpha$  和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达情况;免疫荧光法检测 PKC $\alpha$  抑制剂 BIM-1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的各组细胞中 HIF-1 $\alpha$  的荧光表达情况。结果 2-APB 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的软骨细胞凋亡具有抑制作用,且当 2-APB 浓度为 100  $\mu$ mol/L 时抑制效果最为显著( $F = 235.80, P < 0.01$ );2-APB 能够抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致软骨细胞凋亡阳性率( $F = 114.80, P < 0.01$ )以及 ROS 的水平( $F = 52.99, P < 0.01$ ),并且抑制 Cleaved-PARP( $F = 10.10, P < 0.05$ )、p-PKC $\alpha$ ( $F = 24.56, P < 0.05$ )和 HIF-1 $\alpha$ ( $F = 6.85, P < 0.05$ )蛋白的表达;PKC $\alpha$  抑制剂 BIM-1 能够抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 HIF-1 $\alpha$  荧光强度的增加。结论 2-APB 可以通

过抑制 PKC $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$  通路减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的软骨细胞凋亡,进而保护软骨细胞。

**关键词** 2-氨基乙氧基苯硼酸;软骨细胞;细胞凋亡;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;PKC $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$  通路

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1150-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.007

细胞凋亡是一种高度调节的细胞死亡形式,正常生理状态下的细胞凋亡能够防止异常增殖的细胞对生物体产生负面影响,维持机体稳态<sup>[1]</sup>。然而在病理状态下,异常凋亡与多种疾病的发生发展密切相关,包括自身免疫性疾病、退行性疾病和肿瘤等。软骨细胞是关节软骨中唯一的细胞类型,其过度凋亡是关节软骨损伤的始动因素,会引发多种软骨破坏相关疾病<sup>[2]</sup>。因此,需要进一步探索调节软骨细胞凋亡的关键因素和机制。

细胞凋亡与活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度累积密切相关,而过量的 ROS 可以诱导缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 $\alpha$ ) 在缺氧组织中广泛表达<sup>[3]</sup>。最新研究<sup>[4]</sup>表明, HIF-1 $\alpha$  累积及细胞凋亡与软骨损伤密切相关。此外,蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是 HIF-1 $\alpha$  活性的调节因子, p-PKC $\alpha$  介导 HIF-1 $\alpha$  转录发挥促凋亡作用<sup>[5]</sup>。这提示 PKC $\alpha$ /HIF-1 $\alpha$  信号通

2024-03-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82071591、82371575、82204405);安徽省自然科学基金(编号:2108085QH383)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心,合肥 230601

作者简介:欧阳紫微,女,硕士研究生;

胡伟,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: huwei@ahmu.edu.cn

( $P < 0.0001$ ), reduced NO secretion ( $P < 0.001$ ), increased urea content ( $P < 0.0001$ ), decreased M1-related inflammatory factor tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ( $P < 0.001$ ) and decreased secretion of white blood cell interleukin(IL)-1 ( $P < 0.001$ ); M2-related anti-inflammatory factor IL-10 secretion levels increased ( $P < 0.01$ ), and IL-12 secretion increased ( $P < 0.05$ ) Furthermore, co-culturing with frozen-thawed PRP significantly promoted cell migration and enhanced vascular formation efficiency, surpassing the effects of fresh PRP and being comparable to activated PRP ( $P < 0.01$ ). Cell viability assays and CCK-8 proliferation experiments also showed a significant increase in the proliferation rates of L929 and HUVEC co-cultured with frozen-thawed PRP ( $P < 0.01$ ). **Conclusion**

After being cryopreserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ , PRP has been proven to significantly enhance cell migration, differentiation and proliferation capabilities, while inhibiting the production of inflammatory factors and promoting M2 polarization of macrophages. Therefore, low-temperature cryopreservation can be considered as an effective method for PRP preservation.

**Key words** platelet-rich plasma; cryopreservation; macrophage polarization; wound healing; angiogenesis