

# 富血小板血浆来源的血小板细胞外囊泡分离技术与应用

李 娇<sup>1</sup>, 李晓丰<sup>1, 2</sup>, 李剑平<sup>1, 2, 3, 4</sup>

<https://doi.org/10.12307/2024.724>

投稿日期: 2023-08-29

采用日期: 2023-10-25

修回日期: 2023-12-04

在线日期: 2023-12-21

中图分类号:

R459.9; R363; R364

文章编号:

2095-4344(2025)01-00156-08

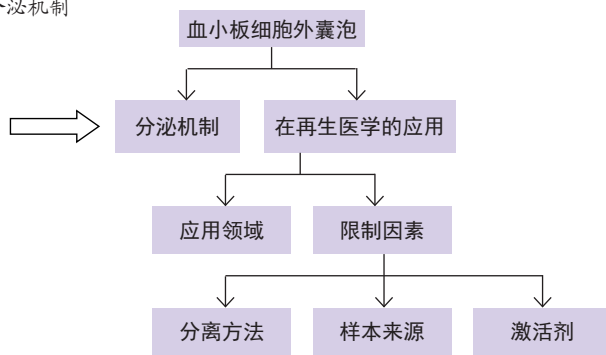
文献标识码: A

## 文章快速阅读: 血小板细胞外囊泡的分泌机制

### 文章特点—

△血小板细胞外囊泡作为再生医学中一种新的无细胞治疗策略是近几年的研究热点,了解血小板细胞外囊泡形成机制,分离获得纯净的血小板细胞外囊泡是其临床应用的前提条件;

△文章主要介绍了血小板细胞外囊泡的分泌机制,在再生医学领域的应用及临床转化的限制因素,为血小板细胞外囊泡的临床转化提供一些理论支撑。



## 文题释义:

**血小板细胞外囊泡:** 是一种由血小板释放的非均匀的纳米级小泡,富含生物活性分子、遗传物质及蛋白质等信息分子,参与细胞通讯和物质交换,在凝血、组织修复及免疫调节等过程发挥重要作用,活化的血小板主要释放微囊泡和外泌体两种类型的细胞外囊泡。

**富血小板血浆:** 是一种通过离心的方法从血液中提取出来的血小板浓缩物,富含生长因子、细胞因子和抗菌肽等多种生物活性物质,具有促进细胞增殖、分化、基质合成、组织再生与修复等作用,在再生医学领域具有广阔的应用前景。

## 摘要

**背景:** 血小板细胞外囊泡是循环中最丰富的囊泡,富含丰富的生物活性分子、遗传物质及蛋白质等信息分子,参与细胞通讯和物质交换,不仅具有良好的促凝活性,还具有促进组织修复和再生的巨大潜力,在再生医学具有广泛的应用前景。

**目的:** 从血小板细胞外囊泡的分泌机制、在再生医学领域的应用及临床转化的限制因素进行阐述,为血小板细胞外囊泡的临床转化提供一些理论支撑。

**方法:** 应用计算机检索2005年1月至2023年8月PubMed数据库与血小板细胞外囊泡有关的文章,英文检索词为“platelet-derived, platelet-rich plasma, extracellular vesicles, isolated, microvesicles exosomes, applications”,最后纳入符合主题标准的文献62篇进行综述分析。

**结果与结论:** ①活化的血小板细胞外囊泡可产生血小板微囊泡和血小板外泌体两种类型的囊泡,前者的分泌可能与肌动蛋白细胞骨架的不对称性相关,后者的分泌可能与H<sup>+</sup>-ATP酶的调节相关。②血小板细胞外囊泡是血小板浓缩物和血小板本身的潜在效应物,可能通过促进血管生成、影响细胞行为、促凝与止血以及发挥炎症作用等几方面影响组织再生。③血小板细胞外囊泡在组织损伤、肌肉再生、软骨再生、骨关节炎等再生医学领域已有临床前报道,作为伤口愈合的潜在治疗方法已有临床试验数据,但血小板细胞外囊泡的分离方法、样本来源以及激活剂的种类等因素限制了血小板细胞外囊泡在再生医学领域的临床转化。④未来血小板细胞外囊泡可能成为再生医学中替代富血小板血浆的无细胞疗法,其临床转化还需要积极寻找鉴别血小板细胞外囊泡和血小板外泌体的特异性标志物,在激活剂刺激血小板细胞外囊泡产生的机制以及血小板细胞外囊泡的最佳收集方式、最佳储存方法、保质期、临床应用的推荐剂量和最佳临床适应证还需要继续深入研究。

**关键词:** 血小板来源; 富血小板血浆; 血小板裂解液; 细胞外囊泡; 微泡; 外泌体; 分离; 治疗; 组织损伤; 应用

## Isolation technique and application of platelet-derived extracellular vesicles from platelet-rich plasma

Li Jiao<sup>1</sup>, Li Xiaofeng<sup>1, 2</sup>, Li Jianping<sup>1, 2, 3, 4</sup>

<sup>1</sup>Liaoning Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning Province, China; <sup>3</sup>Harbin Blood Center, Harbin 150056, Heilongjiang Province, China; <sup>4</sup>Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Li Jiao, Master, Technician-in-charge, Liaoning Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China

**Corresponding author:** Li Jianping, MD, Chief physician, Liaoning Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China; School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning Province, China; Harbin Blood Center, Harbin 150056, Heilongjiang Province, China; Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

<sup>1</sup>辽宁省血液中心辽宁省输血医学研究所, 辽宁省沈阳市 110044; <sup>2</sup>中国医科大学药学院, 辽宁省沈阳市 110122; <sup>3</sup>哈尔滨市血液中心, 黑龙江省哈尔滨市 150056; <sup>4</sup>中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省苏州市 215000

第一作者: 李娇, 女, 1988年生, 2014年沈阳师范大学毕业, 硕士, 主管技师, 主要从事输血医学相关研究。

通讯作者: 李剑平, 博士, 主任医师, 辽宁省血液中心辽宁省输血医学研究所, 辽宁省沈阳市 110044; 中国医科大学药学院, 辽宁省沈阳市 110122; 哈尔滨市血液中心, 黑龙江省哈尔滨市 150056; 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏省苏州市 215000

并列通讯作者: 李晓丰, 硕士, 主任技师, 辽宁省血液中心辽宁省输血医学研究所, 辽宁省沈阳市 110044; 中国医科大学药学院, 辽宁省沈阳市 110122

<https://orcid.org/0009-0008-0642-1398> (李娇); <https://orcid.org/0000-0002-5392-0471> (李剑平); <https://orcid.org/0000-0002-3888-6359> (李晓丰)

基金资助: 中国输血协会威高科研基金资助项目(CSBT-MWG-2021-01), 项目负责人: 李剑平; 辽宁省自然科学基金资助项目

(2020-MS-354), 项目负责人: 李晓丰; 沈阳市卫生健康委科研课题(2022096), 项目负责人: 李娇

引用本文: 李娇, 李晓丰, 李剑平. 富血小板血浆来源的血小板细胞外囊泡分离技术与应用 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(1):156-163.



**Co-Corresponding author:** Li Xiaofeng, Master, Chief technician, Liaoning Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China; School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Platelet-derived extracellular vesicles are the most abundant vesicles in the circulation, rich in bioactive molecules, genetic material, proteins and other information molecules, involved in cellular communication and material exchange, not only has good procoagulant activity, but also has the promotion of tissue repair and regeneration, and has a wide range of applications in regenerative medicine.

**OBJECTIVE:** To elaborate the secretion mechanism of platelet-derived extracellular vesicles, their application in regenerative medicine, and limiting factors for clinical transformation, and to provide some theoretical support for the clinical translation of platelet-derived extracellular vesicles.

**METHODS:** A computerized search of the PubMed database from January 2005 to August 2023 was applied to articles relating to platelet-derived extracellular vesicles with the search terms “platelet-derived, platelet-rich plasma, extracellular vesicles, isolated, microvesicles exosomes, applications”. A total of 62 articles that met the subject criteria were finally included.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Activated platelet-derived extracellular vesicles produce two types of vesicles, platelet-derived microparticles, whose secretion may be associated with the asymmetry of the actin cytoskeleton, and platelet-derived exosomes, which may be associated with the regulation of H<sup>+</sup>-ATPase. (2) Platelet-derived extracellular vesicles are potential effectors of platelet concentrates and platelets themselves, and may intervene in tissue regeneration by promoting angiogenesis, influencing cellular behavior, promoting coagulation and hemostasis, and exerting inflammatory effects. (3) Platelet-derived extracellular vesicles have been reported preclinically in the field of regenerative medicine such as tissue injury, muscle regeneration, cartilage regeneration, and osteoarthritis, and clinical trial data are available as potential therapeutic approaches for wound healing. However, factors such as isolation methods, sample sources, and the types of activators limit the clinical translation of platelet-derived extracellular vesicles into the field of regenerative medicine. (4) In the future, platelet-derived extracellular vesicles may become a cell-free alternative to platelet-rich plasma in regenerative medicine, but the clinical translation of platelet-derived extracellular vesicles needs to actively search for specific markers to differentiate platelet-derived microparticles from platelet-derived exosomes. The mechanism of activator-stimulated platelet-derived extracellular vesicle production, as well as the optimal method of platelet-derived extracellular vesicle collection, the optimal method of storage, the shelf life of the platelet-derived extracellular vesicles, the recommended dosage of platelet-derived extracellular vesicles for clinical application, and the optimal clinical indications need to be further investigated.

**Key words:** platelet-derived; platelet-rich plasma; platelet lysate; extracellular vesicle; microvesicle; exosome; isolation; therapeutic; tissue damage; application

**Funding:** Weigao Scientific Research Foundation of Chinese Blood Transfusion Association, No. CSBT-MWG-2021-01 (to LJP); Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2020-MS-354 (to LXF); Research Project of Shenyang Health Commission, No. 2022096 (to LJ)

**How to cite this article:** LI J, LI XF, LI JP. Isolation technique and application of platelet-derived extracellular vesicles from platelet-rich plasma. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2025;29(1):156-163.

## 0 引言 Introduction

血小板细胞外囊泡是血小板在活化、剪切力、凋亡以及损伤条件下释放的一种亚细胞囊泡<sup>[1]</sup>。在1967年，科学家利用电子显微镜技术首次观察到从活化的血小板中脱落的膜碎片，并将其描述为“血小板尘埃”。早期研究认为这些膜碎片具有与血小板相似的功能<sup>[2]</sup>，有研究者发现这些膜碎片表面的促凝活性比活化的血小板高50-100倍<sup>[3]</sup>。由于富血小板血浆在促进组织修复和再生方面的巨大潜力，近几年富血小板血浆衍生的血小板细胞外囊泡也引起了再生医学的极大兴趣，血小板细胞外囊泡不仅具有良好的促凝活性，还具有促进组织修复和再生的巨大潜力，在一定条件下血小板细胞外囊泡可通过促进组织再生、成纤维细胞增殖和迁移、内皮细胞增殖等方式促进组织修复，增强肌肉、骨骼以及神经再生，干预伤口愈合过程。与富血小板血浆疗法相比，血小板细胞外囊泡具有优越的生物相容性，可穿过组织屏障，在病理部位具有靶向和保留能力，易标准化、使用方便，免疫原性更低，应用范围更广等优点，血小板细胞外囊泡有望取代富血小板血浆成为组织修复和再生领域更有效、更安全的临床候选产品<sup>[4]</sup>。然而，血小板细胞外囊泡作为一种新型的再生医学治疗方法，可能的作用机制及其应用的优点和局限性仍需进一步了解。

文章主要介绍了血小板细胞外囊泡在再生医学的应用，又从分离方法、样本来源以及激活条件对血小板细胞外囊泡临床应用的限制因素进行阐述，期望能够为血小板细胞外囊泡的在再生医学的临床应用提供一些理论支撑。

## 1 资料和方法 Data and methods

### 1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者在2023年8月进行检索。

1.1.2 检索文献时限 2006年1月至2023年8月。

1.1.3 检索数据库 PubMed 数据库。

1.1.4 检索词 英文检索词为“platelet-derived, platelet-rich plasma, extracellular vesicles, isolated, microvesicles exosomes, applications”。

1.1.5 检索文献类型 包括临床研究、综述、Meta分析、指南和研究报告。

1.1.6 检索策略 见图1。

```
#1 platelet-derived [Title/Abstract]
#2 platelet-rich plasma [Title/Abstract]
#3 extracellular vesicles [Title/Abstract]
#4 isolated [Title/Abstract]
#5 #1 OR #2 AND #3 AND #4
#6 platelet-derived Microvesicles [Title/Abstract]
#7 platelet-derived Exosomes [Title/Abstract]
#8 Applications [Title/Abstract]
#9 #6 OR #7 AND #8
#10 #1 OR #2 AND #3 AND #8
```

图1 | PubMed 数据库检索策略图

1.1.7 检索文献量 初步检索到文献266篇。

### 1.2 入组标准

1.2.1 纳入标准 ①论点论据可靠的文章，而且创新性强；②文献的权威性强、时效性新的综述及基础性研究；③血小板细胞外囊泡在再生医学应用相关的研究进展。

1.2.2 排除标准 ①内容重复或陈旧的文献；②讲座与会议摘要之类的文献。

1.3 文献质量评估与数据提取 由第一作者通过计算机独立检索完成，经过审阅文题和相关摘要等进行初次筛选，排除研究目的与内容重复以及与文章无关且陈旧的文献，最终得到62篇符合标准的文献进行综述，中文作者文献14篇，英文作者文献48篇。文献筛选流程见图2。

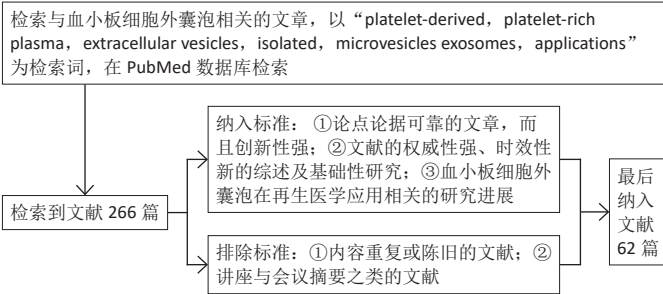


图 2 | 文献筛选流程图

## 2 结果 Results

**2.1 血小板细胞外囊泡简介** 血小板来源于骨髓中的巨核细胞, 是血液中没有细胞核结构细胞中最小的血液细胞, 保存期较短, 一般为 5-7 d, 但 RNA 代谢活动非常活跃, 不仅具有止血, 还具有促进组织再生与修复、免疫等功能。血小板的相关作用依赖于血小板细胞外囊泡, 在血浆众多的细胞外囊泡中, 约有 25% 是血小板细胞外囊泡, 由活化的血小板或骨髓中的血小板前体细胞巨核细胞释放<sup>[5-7]</sup>, 通过 P-选择素和溶酶体相关膜糖蛋白 1 等活化标记物, 可以区分活化血小板释放的细胞外囊泡与巨核细胞产生的细胞外囊泡<sup>[8]</sup>。

最早有研究通过微离心法从血小板中分离出颗粒物, 后来通过凝血酶生成试验确定了其血小板样活性, 但尚未与血小板细胞外囊泡相联系, 直到电子显微成像技术的发展, 人们才逐渐了解血小板囊泡, 近年来, 血小板细胞外囊泡不仅因为良好的促凝活性, 还因为其促进组织修复和再生的巨大潜力越来越受到关注, 见图 3。血小板囊泡的产生依赖于血小板的活化, 活化的血小板释放的血小板细胞外囊泡主要包括 2 种类型: 血小板微囊泡 (platelet-derived microparticles, PMPs) 和血小板外泌体 (platelet-derived exosomes, PEXOs), 见表 1。

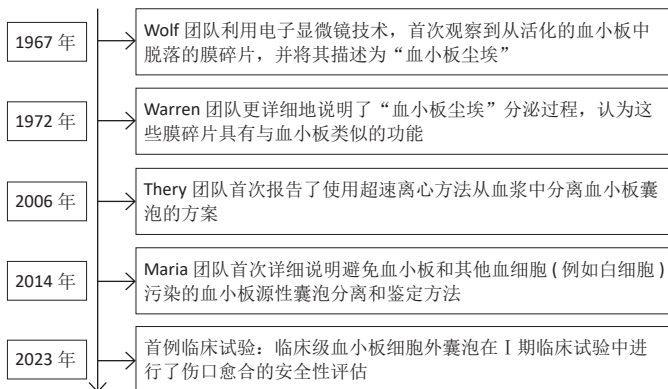


图 3 | 血小板细胞外囊泡发展的时间线图

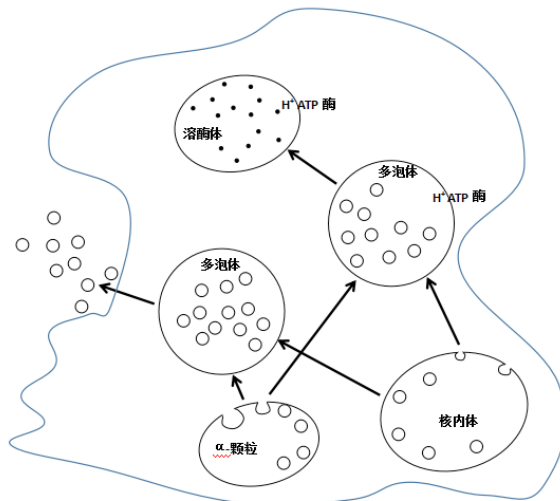
表 1 | 血小板细胞外囊泡的主要特征

指标	PMPs	PEXOs
直径尺寸	100-1000 nm	30-100 nm
密度	1.25-1.30 g/mL	1.13-1.19 g/mL
细胞来源	质膜	多泡体或 $\alpha$ 颗粒
产生机制	出芽	依赖 / 不依赖于内吞体分选复合体的胞吐
表面标志	脂筏蛋白	CD9, CD63, TSG101, ALIX

表注: PMPs 为血小板微囊泡; PEXOs 为血小板外泌体; TSG101 为内吞体分选复合体相关蛋白; ALIX 为程序性细胞死亡 6B 相互作用蛋白。

血小板微囊泡是在应激条件下从细胞质膜通过出芽方式释放的囊泡 (100-1 000 nm), 具有典型血小板和巨核细胞免疫表型<sup>[9]</sup>。而具有亚微米直径 (30-100 nm) 的血小板外泌体起源于多泡体或  $\alpha$ -颗粒, 通过胞吐途径释放, 受环境条件的高度调节, 血小板外泌体的组成更为多变, 更能反映分泌细胞的生理状态。尽管血小板微囊泡和血小板外泌体在产生途径、直径尺寸及生物学特征方面均存在一定差异, 但血小板细胞外囊泡具有一定的重叠性, 目前的分离方法和表征技术常无法区分两者, 一些研究报告, 两者的蛋白质组成可能存在一定的差异, 例如血小板微囊泡表面标志物为脂筏蛋白<sup>[10]</sup>, 常暴露磷脂酰丝氨酸, 而在血小板外泌体中发现了外泌体标记蛋白的高表达, 如 CD9 和 CD63 等<sup>[7, 11-13]</sup>。

**2.2 血小板细胞外囊泡的分泌机制** 血小板外泌体不仅可以来源于核内体, 还可由  $\alpha$ -颗粒产生, 这一过程常依赖多泡体中  $H^+$ -ATP 酶的调节<sup>[14]</sup>, 见图 4。多泡体中胆固醇的积累会激活  $H^+$ -ATP 酶, 促进血小板外泌体的降解, 相反中性鞘磷脂酶 2 抑制  $H^+$ -ATP 酶活性, 导致血小板外泌体的分泌增加<sup>[15]</sup>, 一旦多泡体形成, 多泡体膜将与质膜融合, 内吞体分选转运复合体在多泡体的形成及血小板外泌体的分泌过程中起到了重要作用, 是血小板外泌体形成的最重要机制<sup>[16-19]</sup>, 然而也有研究表明, 外泌体也可以通过非内吞体分选转运复合体机制分泌<sup>[20]</sup>。



图注:  $H^+$ -ATP 酶调节 PEXOs 的降解与释放, 当 pH 值偏酸性时, PEXOs 被降解, 当 pH 值偏碱性时, PEXOs 通过胞吐作用释放至细胞外。

图 4 | pH 值对血小板外泌体 (PEXOs) 形成的影响

血小板微囊泡形成的相关机制目前还不清楚, 但有证据表明, 肌动蛋白细胞骨架在血小板微囊泡的形成过程具有重要作用。肌动蛋白可能通过 3 个步骤调控血小板微囊泡形成的过程: 首先, 肌动蛋白聚合产生的力可以导致质膜中芽的形成<sup>[21]</sup>; 其次, 细胞中的肌球蛋白酶可以将这些成分运输到血小板微囊泡产生的位置; 最后, 肌动蛋白肌球蛋白网络可以闭合“芽体”并与宿主细胞分离。肌动蛋白聚合过程中细胞骨架的不稳定性或发生的结构重排, 导致血小板微囊泡释放量增加<sup>[14, 22]</sup>。此外, 血小板微囊泡的形成还与血小板外膜上的磷脂酰丝氨酸

暴露密切相关, 磷脂酰丝氨酸残基在外膜上表达, 细胞膜上磷脂酰丝氨酸不对称性的丧失与血小板微囊泡形成相一致, 在有磷脂酰丝氨酸暴露缺陷的患者中, 发现血小板细胞外囊泡水平降低, 阐明了磷脂酰丝氨酸在血小板微囊泡形成中的重要性<sup>[23-24]</sup>。

### 2.3 血小板细胞外囊泡在再生医学的应用

**2.3.1 血小板细胞外囊泡的应用领域** 近几十年, 富血小板血浆在再生医学领域的应用逐渐增多, 应用领域包括皮肤创面修复、肌肉骨骼再生、心血管疾病、神经再生、美容及疼痛治疗等。富血小板血浆主要通过释放的多种生物活性分子介导组织再生过程, 主要因子包括: ①初级生长因子: 包括血小板源性生长因子、转化生长因子、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子及肝细胞生长因子等; ②黏附分子: 包括纤维蛋白原、黏附蛋白、纤维连接蛋白、玻璃体连接蛋白和血栓形成反应蛋白 1 和趋化因子等。

尽管富血小板血浆的治疗很有前途, 但临床应用仍然受到一些限制。首先, 许多富血小板血浆衍生的生物分子一旦从血小板中释放出来, 就无法受到磷脂膜的保护, 可能被细胞外环境的溶解酶破坏, 并迅速失去其生物活性。其次, 由于富血小板血浆的制备和临床应用缺乏统一的标准, 而且富血小板血浆的成分常具有一定的异质性, 受捐献者个体的特征影响, 包括性别、年龄和健康状况等导致富血小板血浆的治疗结果难以比较, 并可能导致许多研究无法重复验证。基于以上研究, 近几年, 血小板细胞外囊泡引起了研究者的关注, 陆续开展了血小板细胞外囊泡的应用研究, 目前已在组织损伤、肌肉再生、血管生成、骨再生和骨关节炎等再生医学领域已有临床前报道<sup>[4]</sup>。最近, 基于配体的外泌体亲和纯化色谱方案制备的临床级血小板细胞外囊泡在 I 期临床试验中进行了伤口愈合的安全性评估, 没有明显的不良事件报道, 这表明血小板细胞外囊泡可以安全地用于人类, 并值得进一步临床试验验证对伤口愈合疗效, 为临床级血小板细胞外囊泡对人类的安全性和治疗效用提供了第一个证据<sup>[25]</sup>。

目前, 血小板细胞外囊泡的应用研究主要包括两方面。一方面在体外, 从细胞增殖、分化、迁移等方面研究血小板细胞外囊泡对鼠、兔和猪等动物细胞和人源细胞行为的影响, 细胞类型包括间充质干细胞、成纤维细胞、内皮细胞、软骨细胞及神经细胞等。体外研究发现, 活化的血小板细胞外囊泡可以促进人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移, 以及 miR-126 和血管生成因子的高表达<sup>[26]</sup>。体内研究也证实了血小板细胞外囊泡对血管生成和缺血后血管重建的重要作用, 血小板细胞外囊泡通过诱导局部血管生成促进股骨头坏死死后骨组织的修复和再生<sup>[27]</sup>, 也有研究认为血小板细胞外囊泡促进慢性皮肤创面再上皮化的重要机制之一是促进局部血管生成, 而且, 血小板细胞外囊泡具有剂量依赖性的血管生成效应<sup>[28]</sup>。血小板细胞外囊泡对多种类型细胞有积极影响的证据越来越多。血小板细胞外囊泡治疗可以显著增强血管内皮细胞的生物学行为, 包括招募、增殖、迁移和血管形成能力, 并

促进局部血管生成; 血小板细胞外囊泡可以通过 YAP 去磷酸化, 显著增加原代皮肤成纤维细胞的增殖和迁移, 增加结缔组织生长因子的分泌, 加速创面愈合<sup>[28]</sup>; 血小板细胞外囊泡可有效抑制小鼠成骨细胞和间充质干细胞的细胞凋亡, 促进其增殖和成骨分化<sup>[27]</sup>; 在神经干细胞方面, 血小板细胞外囊泡也被认为可以增强细胞的增殖和存活, 并增加向神经胶质细胞和神经元分化的潜力<sup>[29]</sup>。

众所周知, 血小板具有促凝血特性, 然而研究表明, 血小板细胞外囊泡表面的促凝剂是活化血小板的 50-100 倍<sup>[3]</sup>。一方面, 血小板细胞外囊泡中含有许多凝血相关物质, 显著提高了血小板细胞外囊泡的促凝功能; 另一方面, 血小板细胞外囊泡膜表面带有负电荷的磷脂酰丝氨酸暴露, 促进凝血酶生成, 在止血中发挥重要作用<sup>[30]</sup>。在体外研究发现, 血小板细胞外囊泡可以促进止血, 改善创伤后出血, 含有促凝表型血小板细胞外囊泡能够促进血栓的形成<sup>[31-32]</sup>。

另一方面, 通过建立鼠和兔等动物模型在体外研究血小板细胞外囊泡的再生医学相关作用。美国梅奥诊所的研究组在难治性慢性伤口的临床前研究中, 通过记录家兔模型皮肤完整性、毛囊、汗腺、皮肤油脂和正常水合作用的恢复情况, 发现纯化的血小板细胞外囊泡可以促进伤口愈合、皮肤再生, 达到无瘢痕的皮肤愈合状态, 而且血小板细胞外囊泡可制成干粉, 在室温条件长期保存, 在手术室或床旁即可将粉末与水凝胶溶液混合后直接涂在伤口上, 使用方便<sup>[33]</sup>。研究发现, 当组织中存在炎症时, 血小板细胞外囊泡可以通过促进炎症细胞相互作用, 促进组织中炎症细胞浸润, 破坏内皮细胞, 从而加重组织损伤。当无炎症或抗炎因子大于促炎因子时, 血小板细胞外囊泡可通过促进组织再生、成纤维细胞增殖和迁移、内皮细胞增殖等方式促进组织修复<sup>[34]</sup>。

总之, 血小板细胞外囊泡确实具有诸多超越富血小板血浆的优势条件<sup>[28-39]</sup>, 例如: ①生产因子浓度更高尺寸较小; ②可通过生物屏障; ③免疫原性更低; ④具有磷脂双层分子的保护, 更稳定内容物丰富, 有助于细胞间通讯; ⑤半衰期更长, 保存更方便等, 随着大量的临床应用研究报告, 血小板细胞外囊泡有望取代富血小板血浆, 成为组织修复和再生领域更有效和更安全的临床候选产品。

文章列举了血小板细胞外囊泡临床前实验成果, 见表 2。

#### 2.3.2 血小板细胞外囊泡在再生医学应用的限制因素

**分离方法:** 2006 年, 研究者首次报告了使用超速离心方法从血浆中分离血小板细胞外囊泡的方案<sup>[40]</sup>, 其原理为利用不同转速的离心力, 逐步去除细胞、细胞碎片及大分子干扰物, 通常先低速离心保留上清液中小于 1  $\mu\text{m}$  的颗粒, 随后进行差速离心将较小和密度较低的组分与较大或较重的组分分离。根据血小板微囊泡和血小板外泌体的大小和密度的差异, 多数研究者认为通过低速离心 (21 000 $\times g$  以下) 可分离血小板微囊泡, 高速离心 (100 000 $\times g$  以上) 可分离血小板外泌体或与血小板微囊泡的混合物。然而, 由于尺寸的重叠, 通过超速离心方法从血小板微囊泡和凋亡小体中分离出纯的血小板外泌体也是不可能的。

表 2 | 血小板细胞外囊泡临床前实验结果

第一作者 / 发表年份	研究领域	研究层次类型	主要研究结论
GUO [26], 2017	伤口愈合	体外细胞培养, 在体内: 糖尿病大鼠模型	PRP-Exos 能有效诱导内皮细胞和成纤维细胞的增殖和迁移, 从而改善慢性伤口的血管生成和再上皮化, YAP 途径可能在此过程中发挥重要作用
TAO [27], 2017	股骨头	体外细胞培养, 体内: 大鼠模型	PRP-Exos 能够在内质网应激状态下通过 Akt/Bad/Bcl-2 信号通路促进 Bcl-2 的表达, 从而在股骨头坏死大鼠模型中防止糖皮质激素诱导的细胞凋亡
LIU [38], 2019	骨关节炎	体外: 原发性兔软骨细胞 体内: 兔膝骨关节炎模型	在体内, PRP-Exos 和活化的 PRP 都阻止了骨关节炎的进展, PRP-Exos 的效果明显更有效
IYER [36], 2020	肌损伤	体外: 大鼠骨髓来源的间充质干细胞 / 动物肌肉模型 应变损伤	经血小板细胞外囊泡处理后, 肌原蛋白基因的表达增加, 血小板细胞外囊泡可以促进恢复动物模型中的肌肉应变损伤
OTAHAL [39], 2020	骨关节炎	在体外: 人骨关节炎的软骨细胞	PRP 细胞外囊泡可以诱导骨关节炎软骨细胞的软骨基因表达变化, 同时阻止促炎细胞因子的释放, 可能对急性骨性关节炎具有抗炎的作用
SHI [33], 2021	伤口愈合	体外细胞培养, 兔子模型	血小板外泌体促进上皮和血管细胞活性, 增强血管生成, 以恢复血流和成熟的皮肤功能
RUI [35], 2021	组织再生	体外: 脐静脉内皮细胞	凝血酶和葡萄糖酸钙共同激活后, 通过增殖、迁移和形成血管样细胞 AKT-ERK 信号通路促进脐带内皮细胞的生长
DONG [37], 2022	骨再生	在体外: 大鼠骨髓间充质干细胞	可促进骨髓间充质干细胞的增殖, 并使其在体外进行软骨分化; 促进骨髓间充质干细胞的迁移, 增加软骨生成基因 (胶原蛋白 II、SOX9、Aggrecan) 的蛋白表达, 可能通过调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 促进了软骨源性骨髓间充质干细胞的分化

表注: PRP 为富血小板血浆; Exo 为外泌体。

由于超速离心法易受血浆蛋白的干扰, 大多数研究多选择超速离心法或与其他方法联合分离血小板细胞外囊泡, 其中最常用的方法为尺寸排除色谱, 尺寸排除色谱是以不同粒径的聚合物凝胶作为分离介质填充在分离柱中, 当样本进入时, 样品分子按其分子大小先后排阻, 从凝胶柱中流出, 因此可达到不同粒径分子的分离效果。

已有研究表明, 尺寸排除色谱去除了囊泡中 99% 的可溶性血浆蛋白和 >95% 的高密度脂蛋白, 而不诱导囊泡聚集同时保持了它们的完整性和生物活性 [41], 尺寸排除色谱和超速离心法两者结合, 可以弥补自身的缺点获得比较纯净的血小板细胞外囊泡。尽管还有一些研究根据免疫表型特异性, 选择单克隆抗体和磁珠免疫捕获技术分离血小板细胞外囊泡亚群, 但由于抗体的交叉反应性、血浆中的其他配体的干扰以及洗脱困难等缺陷, 同时由于血小板细胞外囊泡的异质性, 也存在分离偏差。总之, 在缺乏所有血小板细胞外囊泡均表达的共同标记的情况下, 不可能分离出全部血小板细胞外囊泡群体, 在缺乏能够唯一性识别血小板细胞外囊泡亚型的标记物的条件下, 也很难区分血小板微囊泡和血小板外泌体。研究发现, 用尺寸排除色谱从血浆中分离血小板细胞外囊泡, 然后通过双离心浓缩, 获得的血小板细胞外囊泡纯度和浓度更高 [42], 但尺寸排除色谱常会分离所有血浆囊泡, 因此分离血小板细胞外囊泡的样本来源及类型也会对血小板细胞外囊泡分离技术产生一定的影响。

文章总结了血小板细胞外囊泡在再生医学应用中的限制因素 [27-28, 39, 43-52], 见表 3。

表 3 | PEVs 在再生医学应用的限制因素

样本来源	离心条件	囊泡类型	外源激活剂
全血 -PRP 上清 [26]	100 000×g	PEXOs	未描述
全血 -PRP [43]	100 000×g, 和尺寸排阻色谱组合应用	PEVs	未描述
全血 -PRP [39]	100 000×g	PEVs	未描述
全血 -PRP [27]	100 000×g	PEXOs	未描述
去白机采血小板 [44]	100 000×g	PEVs	未描述
去白机采血小板 [45]	100 000×g	PMPs (包括 PEXOs)	凝血酶
血小板裂解液 [46]	30 000 r/min	PEXOs	未描述
白膜法收集的混合浓缩血小板, 3 次冻融循环制备的血小板裂解液 [47]	120 000×g	PEVs	未描述
全血 -PRP [48]	20 000×g	PMPs	钙
从健康捐赠者的富含血小板的血浆中分离出血小板 [49]	20 000×g	PMPs	凝血酶和胶原蛋白
健康献血者血液所制备的富血小板血浆 [50]	17 000×g	PMPs	凝血酶
从健康供者分离的血小板 [51]	21 000×g	PMPs	氯化钙和胶原蛋白
血小板 [52]	2 000×g, 超声	PMPs	未描述

表注: PEVs 为血小板细胞外囊泡; PRP 为富血小板血浆; PMPs 为血小板微泡; PEXOs 为血小板外泌体。

**样本来源:** 根据分离血小板细胞外囊泡样本的血液成分差异, 新鲜全血和血小板浓缩物 (浓缩血小板、机采血小板等) 均可用于分离血小板细胞外囊泡, 见表 3, 图 5。但目前的技术条件还无法从混合囊泡中精准鉴别出不同类型的囊泡, 从降低红细胞、白细胞等其他血细胞囊泡的污染角度考虑, 血小板浓缩物较新鲜全血更适合分离血小板细胞外囊泡。若选择全血, 抗凝全血较不抗凝血更具有优势, 血清在体外凝块形成过程中血小板衍生颗粒水平的明显升高, 从而导致样本不能完全代表原始囊泡组成, 干扰下游研究分析 [53], 抗凝全血需先分离出富血小板血浆成分, 再进行血小板细胞外囊泡分离。由于血小板在样本操作过程中很容易被激活并分泌血小板细胞外囊泡, 因此, 血小板细胞外囊泡分离方案的样本来源应该把防止血小板活化作为考虑因素之一, 为降低体外血小板活化以及导致的血小板细胞外囊泡释放, 国际血栓形成和止血学会推荐将柠檬酸钠作为全血抗凝剂 [54]。根据样本是否活化, 血小板细胞外囊泡可以来源于非外源活化的血小板裂解液, 也可来源于活化的富血小板血浆及其上清液 [27-28, 35, 38, 55]。前者是血小板的裂解纯化物, 是一种无细胞上清液, 可通过超声、冻融等方法制备。目前血小板细胞外囊泡研究的样本来源多是添加外源激活剂活化后的富血小板血浆, 以刺激血小板细胞外囊泡大量释放, 但激活剂对血小板细胞外囊泡的形成机制、分子组成, 甚至生理功能都具有重要的影响作用。

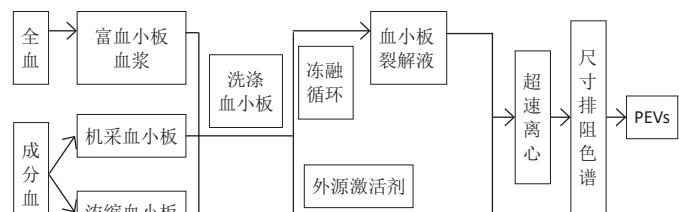


图 5 | 血小板细胞外囊泡 (PEVs) 分离的简要流程图

**激活剂:**物质分泌是血小板活化的重要结果,血小板细胞外囊泡与其他血细胞囊泡分离的主要不同之处常是需要先激活后分离,血小板细胞外囊泡的释放依赖于血小板的活化,激活剂决定血小板细胞外囊泡的生物学特征,不仅仅是其分子组成,甚至影响血小板细胞外囊泡的生物学功能。目前研究较多的激活剂包括凝血酶、 $\text{Ca}^{2+}$ 、胶原蛋白以及二磷酸腺苷等<sup>[56]</sup>。已有研究证明,不同血小板激活剂对血小板细胞外囊泡亚群的数量和质量有不同的影响。研究发现,与单独使用凝血酶或葡萄糖酸钙刺激相比,凝血酶和葡萄糖酸钙一起刺激,产生的血小板外泌体浓度和细胞因子更高<sup>[35]</sup>。在一项不同刺激剂对血小板细胞外囊泡释放量影响的研究中发现,用 $\text{Ca}^{2+}$ 刺激血小板产生最高浓度的血小板细胞外囊泡,凝血酶刺激组血小板细胞外囊泡释放量次之,二磷酸腺苷刺激组血小板细胞外囊泡释放量最低<sup>[6]</sup>,虽然目前没有文章详细说明如何选择激活血小板产生血小板细胞外囊泡的激动剂,但由于刺激条件对血小板细胞外囊泡的生物组成,甚至是生物学功能具有重要的影响,由静止的血小板和受激动剂刺激的血小板产生的血小板细胞外囊泡的结构多样性和尺寸是不同的<sup>[57]</sup>,应该从研究和应用的目的,选择合适的激活剂激活血小板。具体见表4。

表4 | 不同刺激下血小板细胞外囊泡数量和质量差异

激活剂种类	血小板细胞外囊泡平均浓度 ( $\times 10^3 \text{ L}^{-1}$ )	囊泡特征
凝血酶 <sup>[6, 57]</sup>	20.97±1.71	直径最小(50-100 nm),呈球形或拉长,膜表面粗糙,具有小分叉
脂多糖 <sup>[6, 14]</sup>	9.33±3.56	直径小于 $\text{Ca}^{2+}$ ,大于胶原,膜表面较光滑
$\text{Ca}^{2+}$ <sup>[6, 35, 57]</sup>	142.30±10.39	直径最大,膜表面粗糙,异质性明显
胶原蛋白 <sup>[6, 57]</sup>	11.05±2.68	直径中等(50-300 nm),呈圆形,光滑
二磷酸腺苷 <sup>[6, 14]</sup>	7.07±1.11	直径中等(50-300 nm),球形,光滑

研究发现血小板细胞外囊泡形成的机制是其表型和功能的关键决定因素,通过不同的机制衍生出的血小板细胞外囊泡(洗涤血小板/无血小板血浆、未刺激/刺激)表现出不同的促凝特性<sup>[42]</sup>。一些研究认为,胶原蛋白或二磷酸腺苷激活可以用于模拟组织损伤条件下产生的血小板细胞外囊泡,而高剂量的脂多糖激活可以用于模拟炎症条件下产生的血小板细胞外囊泡,特别是在脓毒症患者中<sup>[58]</sup>。而 $\text{Ca}^{2+}$ 作为血小板激活剂,常会导致大量非选择性的膜囊泡破碎,形成大量蛋白质不足的囊泡,类似细胞坏死或凋亡碎裂。当凝血酶作为激活剂时,血小板细胞外囊泡不仅含有生物大分子,还含有细胞器,如线粒体及其DNA等<sup>[59]</sup>。总之,血小板细胞外囊泡亚群激活依赖性变化的定性和定量表征是十分重要的,未来还需要进一步阐述不同激活剂激活血小板释放血小板细胞外囊泡的机制,为临床应用提供足够的理论支撑。

### 3 总结与展望 Summary and prospects

富血小板血浆及其凝胶等血小板浓缩物因具有高浓度的促生长因子,已广泛应用于再生医学领域。近些年,随着外泌体研究热度的持续增加,血小板细胞外囊泡也引起

了众多研究者的关注,特别是血小板细胞外囊泡具有一些优于富血小板血浆的优势条件,许多研究者在再生医学领域相继开展了血小板细胞外囊泡的相关研究,研究结果表明血小板细胞外囊泡可能是再生医学中一种更好的替代方法。尽管文章数量较多,但由于一些因素的限制,导致血小板细胞外囊泡的研究还停留在临床前或者I期试验阶段,基于此文章综述了血小板细胞外囊泡在再生医学中的应用以及未来临床转化的限制因素,为血小板细胞外囊泡的临床转化提供一些理论支撑。

血小板细胞外囊泡的临床转化的限制因素主要包括样本来源、分离方法以及激活剂的选择等。分离血小板细胞外囊泡最常用的方法是超速离心法,仅通过不同速率的离心还无法精准分离血小板微囊泡和血小板外泌体,主要原因是缺乏血小板微囊泡和血小板外泌体的特异性标志物,多数研究仅从粒径对血小板微囊泡或血小板外泌体进行定义和区分,缺乏对血小板细胞外囊泡特异性标志的鉴定。在选择血小板细胞外囊泡的分离方法时,要综合考虑多因素,例如红细胞、白细胞等血细胞囊泡干扰、脂蛋白的干扰等,通过控制均一成分的样本来源,例如机采血小板和浓缩血小板等尽量减少血细胞囊泡的干扰;通过联合尺寸排阻色谱法弥补超速离心法将蛋白聚集物和脂蛋白共同分离的弊端,有效降低血浆脂蛋白的含量;由于血小板较小,甚至血小板可能也会干扰血小板细胞外囊泡的分离,加入激活剂激活血小板后可能会降低血小板的影响作用,但激活剂的种类会直接影响血小板细胞外囊泡的形成过程,导致血小板细胞外囊泡的生物组成甚至是生理功能存在一定差异。因此,作者认为分离血小板细胞外囊泡需要基于其应用途径以及临床作用需求,从样本来源、分离方法以及激活剂的种类多方面综合考虑,选择最佳的组合方式。

在血小板细胞外囊泡的两种类型囊泡中,血小板外泌体在促进组织修复与再生方面具有一定的优势。血小板外泌体富含富血小板血浆中促进愈合作用的分子物质<sup>[46]</sup>,活化血小板释放的大量血小板外泌体也参与了组织修复的调控,在组织修复过程中,血小板外泌体较富血小板血浆等血小板浓缩物更具有优势。血小板外泌体良好的生物相容性和易于制备使其成为靶向给药的载体,磷脂双层结构为富含的生物分子提供了足够的保护,从亲代血小板遗传的膜整合素和受体提供了潜在的靶向能力,也使血小板外泌体成为炎症组织靶向修复的理想候选者<sup>[34, 60]</sup>。与血小板外泌体的主要促进组织修复的作用不同,血小板微囊泡主要跟促凝血作用相关,这可能与血小板微囊泡的形成机制有关。血小板微囊泡是在应激状态改变血小板膜骨架结构通过膜出芽形式释放,直径大于血小板外泌体,血小板膜成分含量远高于血小板外泌体。血小板被活化后,位于膜骨架内侧的磷脂酰丝氨酸转向外侧,膜上磷脂酰丝氨酸的暴露与血小板微囊泡的形成相一致,磷脂酰丝氨酸为凝血因子VIII, Va, Xa的结合提供了阴离子表面<sup>[61]</sup>,促进蛋白质复合物的形成,共同形成凝血级联反应,酶促反应链进一步导致凝血酶的产生,促进纤维蛋白原转化为纤维蛋白,最终形成稳定的血小板堵塞,

达到凝血止血效果<sup>[62]</sup>。因此作者认为,分离出纯净的血小板微囊泡和血小板外泌体,是血小板细胞外囊泡的精准临床应用的前提条件,对于血小板细胞外囊泡在再生医学的临床转化具有重要的意义。

未来,还需更多的基础研究揭示不同激活机制产生的血小板细胞外囊泡膜标记物、内部组成(蛋白质和RNA)以及血小板细胞外囊泡的生理功能差异,寻找血小板微囊泡和血小板外泌体的特异性标志物,精确区分血小板细胞外囊泡亚型,以促进血小板细胞外囊泡的临床转化。另外,血小板细胞外囊泡的最佳收集方式、最佳储存方法、其保质期限、临床应用的推荐剂量和最佳临床适应证等也还需要更多的临床证据<sup>[2]</sup>。随着对血小板细胞外囊泡分子机制的深入理解,以及更有说服力的临床证据,血小板细胞外囊泡可能在不久的将来替代富血小板血浆,成为再生医学的新希望。

**作者贡献:** 全体作者参与文章构思、文献检索和文章修改。第一作者负责文献分析总结及成文。通讯作者负责论文审核。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南);文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

- VAJEN T, MAUSE SF, KOENEN RR. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb Haemost.* 2015;114(2):228-236.
- WU J, PIAO Y, LIU Q, et al. Platelet-rich plasma-derived extracellular vesicles: a superior alternative in regenerative medicine? *Cell Proliferation.* 2021;54(12):e13123.
- SINAURIDZE EI, KIREEV DA, POPENKO NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50-to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.* 2007;97(3):425-434.
- ROSSELLO MA, GENESTRA MAF, MONJO M, et al. Platelet-derived extracellular vesicles for regenerative medicine. *Preprints.* 2021;22(16):8580.
- ARRAUD N, LINARES R, TAN S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):614-627.
- AATONEN MT, OHMAN T, NYMAN TA, et al. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;6:3.
- SPAKOVA T, JANOCKOVA J, ROSOCHA J. Characterization and therapeutic use of extracellular vesicles derived from platelets. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9701.
- FLAUMENHAFT R, DILKS JR, RICHARDSON J, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood.* 2009;5:113.
- ITALIANO JE, MAIRUHU AT, FLAUMENHAFT R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(6):578-584.
- GANGALUM RK, ATANASOV IC, ZHOU ZH, et al.  $\alpha$ B-crystallin is found in detergent-resistant membrane microdomains and is secreted via exosomes from human retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem.* 2011;286(5):3261-3269.
- MOREL O, JESEL L, FREYSSINET JM, et al. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(1):15-26.
- VEDPATHAK S, SHARMA A, PALKAR S, et al. Platelet derived exosomes disrupt endothelial cell monolayer integrity and enhance vascular inflammation in dengue patients. *Front Immunol.* 2024;14:1285162.
- TRIPISCIANO C, RENE W, EICHHORN T, et al. Different potential of extracellular vesicles to support thrombin generation: contributions of phosphatidylserine, tissue factor, and cellular origin. *Sci Rep.* 2017;7(1):6522.
- EUSTES AS, DAYAL S. The role of platelet-derived extracellular vesicles in immune-mediated thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7837.
- CHOEZOM D, GROSS JC. Neutral sphingomyelinase 2 controls exosome secretion by counteracting V-ATPase-mediated endosome acidification. *J Cell Sci.* 2022;135(5):jcs259324.
- COLOMBO M, MOITA C, VAN NG, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 24):5553-5565.
- STOORVOGEL W. Resolving sorting mechanisms into exosomes. *Cell Res.* 2015;25(5):531-532.
- COLOMBO M, RAPOSO G, THERY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-289.
- TRAJKOVIC K, HSU C, CHIANTIA S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008;319(5867):1244-1247.
- WEI DH, ZHAN WX, GAO Y, et al. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res.* 2021;31(2):157-177.
- HOLLIDAY LS, FARIA LP, RODRY WJ Jr. Actin and actin-associated proteins in extracellular vesicles shed by osteoclasts. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):158.
- COLLIER ME, MARAVEYAS A, ETTALAIE C. Filamin-A is required for the incorporation of tissue factor into cell-derived microvesicles. *Thromb Haemost.* 2014;111(4):647-655.
- MOREL O, JESEL L, FREYSSINET JM, et al. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(1):15-26.
- LI X, WANG Q. Platelet-derived microparticles and autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12):10275.
- JOHNSON J, LAW SQK, SHOJAEE M, et al. First-in-human clinical trial of allogeneic, platelet-derived extracellular vesicles as a potential therapeutic for delayed wound healing. *J Extracell Vesicles.* 2023;12(7):e12332.
- SUN Y, LIU XL, ZHANG D, et al. Platelet-derived exosomes affect the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells via miR-126. *Curr Vasc Pharmacol.* 2019;17(4):379-387.
- TAO SC, YUAN T, RUI BY, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway. *Theranostics.* 2017;7(3):733.

- [28] GUO SC, TAO SC, YIN WJ, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model. *Theranostics*. 2017;7(1): 81-96.
- [29] HAYON Y, DASHEVSKY O, SHAI E, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(3):185-192.
- [30] WANG Y, ZHANG S, LUO L, et al. Platelet-derived microparticles regulates thrombin generation via phosphatidylserine in abdominal sepsis. *J Cell Physiol*. 2018;233(2):1051-1060.
- [31] LOPEZ L, SRIVASTAVA AK, BURCHFIELD J, et al. Platelet-derived-extracellular vesicles promote hemostasis and prevent the development of hemorrhagic shock. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-10.
- [32] DTER MR, ALEXANDER W, HASSOUNE A, et al. Platelet-derived extracellular vesicles released after trauma promote hemostasis and contribute to DVT in mice. *J Thromb Haemost*. 2019;17(10):1733-1745.
- [33] SHI A, LI J, QIU X, et al. TGF- $\beta$  loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo. *Theranostics*. 2021;11(13): 6616-6631.
- [34] ZHU Z, SUN S, JIANG T, et al. A double-edged sword of platelet-derived extracellular vesicles in tissues, injury or repair: the current research overview. *Tissue Cell*. 2023;82:102066.
- [35] RUI S, YUAN Y, DU C, et al. Comparison and investigation of exosomes derived from platelet-rich plasma activated by different agonists. *Cell Transpl*. 2021;30:9636897211017833.
- [36] IYER SR, SCHEIBER AL, YAROWSKY P, et al. Exosomes isolated from platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells promote recovery of function after muscle injury. *Am J Sports Med*. 2020;48:2277-2286.
- [37] DONG B, LIU X, LI J, et al. Berberine encapsulated in exosomes derived from platelet-rich plasma promotes chondrogenic differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Biol Pharm Bull*. 2022;45:1444-1451.
- [38] LIU X, WANG L, MA C, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):470.
- [39] OTAHAL A, KRAMER K, KUTEN PO, et al. Characterization and chondroprotective effects of extracellular vesicles from plasma- and serum-based autologous blood-derived products for osteoarthritis therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:584050.
- [40] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;30(1):3-22.
- [41] TAMAS B, HERCZEG K, ZSOFIA O, et al. Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145686.
- [42] FERREIRA PM, BOZBAS E, TANNETTA SD, et al. Mode of induction of platelet-derived extracellular vesicles is a critical determinant of their phenotype and function. *Sci Rep*. 2020;10(1):18061.
- [43] OTAHAL A, KUTEN PO, KRAMER K, et al. Functional repertoire of EV-associated miRNA profiles after lipoprotein depletion via ultracentrifugation and size exclusion chromatography from autologous blood products. *Sci Rep*. 2021;11(1):5823.
- [44] MIYAZAWA B, TRIVEDI A, TOGARRATI PP, et al. Regulation of endothelial cell permeability by platelet-derived extracellular vesicles. *J Trauma Acute Care Surg*. 2019;86(6):931-942.
- [45] AYON Y, DASHEVSKY O, SHAI E, et al. Platelet microparticles promote neural stem cell proliferation, survival and differentiation. *J Mol Neurosci*. 2012;47(3):659-665.
- [46] TORREGGIANI E, PERUT F, RONCUZZI L, et al. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cell Mater*. 2014;28: 137-151.
- [47] ANTICH RM, FORTEZA GMA, CALVO J, et al. Platelet-derived extracellular vesicles promote osteoinduction of mesenchymal stromal cells. *Bone Joint Res*. 2020;9(10):667-674.
- [48] LOVISOLO F, CARTON F, GINO S, et al. Platelet rich plasma-derived microvesicles increased in vitro wound healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(18):9658-9664.
- [49] MAUSE SF, RITZEL E, LIEHN EA, et al. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation*. 2010;122(5):495.
- [50] KIM HK, SONG KS, JUN C, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*. 2015;124(3):376-384.
- [51] LIANG C, HUANG J, LUO P, et al. Platelet-derived microparticles mediate the intra-articular homing of mesenchymal stem cells in early-stage cartilage lesions. *Stem Cells Dev*. 2020;29(7):414-424.
- [52] MOEST T, KOEHLER F, PRECHTL C, et al. Bone formation in peri-implant defects grafted with microparticles: a pilot animal experimental study. *J Clin Periodontol*. 2014;41(10):990-998.
- [53] ZHANG X, TAKRUCHI T, TAKEDA A, et al. Comparison of serum and plasma as a source of blood extracellular vesicles: increased levels of platelet-derived particles in serum extracellular vesicle fractions alter content profiles from plasma extracellular vesicle fractions. *PLoS One*. 2022;17(6):e0270634.
- [54] LACROIX R, JUDICONE C, MOOBERR M, et al. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1190-1193.
- [55] SAUMELL-ESNAOLA M, DELGADO D, GARCIA DCG, et al. Isolation of platelet-derived exosomes from human platelet-rich plasma: biochemical and morphological characterization. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5):2861.
- [56] GARDIN C, FERRONI L, LEO S, et al. Platelet-derived exosomes in atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20):12546.
- [57] PONOMAREVA AA, NEVZOROVA TA, MORDAKHANOVA ER, et al. Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2017;15(8):1655-1667.
- [58] ANTICH RM, FORTEZA GMA, MONJO M, et al. Platelet-derived extracellular vesicles for regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(16):8580.
- [59] BOUDREAU LH, CUCHEZ AC, CLOUTIER N, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood*. 2014;124(14): 2173-2183.
- [60] JOHNSON J, WU YW, BLYTHI C, et al. Prospective therapeutic applications of platelet extracellular vesicles. *Trends Biotechnol*. 2020; 39(6):598-612.
- [61] OWENS AP, MACKMAN N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011;108(10):1284-1297.
- [62] CLARK SR, THOMAS CP, HAMMOND VJ, et al. Characterization of platelet aminophospholipid externalization reveals fatty acids as molecular determinants that regulate coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):5875-5880.

(责任编辑: WJ, ZN, QY, ZM)