论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1798-03

机采浓缩血小板-80℃长期冻存的动态的体外黏附、聚集功能和Ⅲ因子活性变化

孔令魁[1],朱为刚[1],熊 文[2],李雪梅[1] ([1]深圳市血液中心,[2]深圳市输血医学研究所,深圳 518035)

提 要:目的 跟踪观察机采浓缩血小板(platelet apheresis concentrates, PCs)在5% DMSO条件下于-80 ℃冻存1~5年的体外功能变化。**方法** 玻璃珠柱检测血小板黏附功能,花生四烯酸诱导后检测血小板聚集功能,蝰蛇毒检测血小板Ⅲ因子活性。**结果** 对深低温保存的冻存血小板的动态观察发现:PCs冻存期为1~5年融化复苏后的黏附和聚集功能未发现有统计学意义($P>0.05$);冻存至第4年的血小板复苏时4/10样品发生凝集,第5年的有3/11发生凝集;冻存至第5年时,多数样品血小板Ⅲ因子失活。对22 ℃常温保存的液体血小板的观察发现:血小板的黏附功能和最大聚集能力随保存时间的延长逐渐下降,72 h有差异($P<0.05$),96 h有显著性差异($P<0.01$);5 d之内血小板Ⅲ因子活性无明显改变($P>0.05$)。**结论** 22℃保存的液体血小板发生渐进的代谢损伤,而-80℃保存期在3年内的冻存血小板未见明显异常。

关键词:机采浓缩血小板;液体血小板;冻存血小板;低温冻存;黏附;聚集;DMSO

中图法分类号:R329.25;R331.143;R457.12 **文献标识码**:A

Changes of adhesion, aggregation and factor Ⅲ activity of platelet apheresis concentrates *in vitro* after long-term cryo-preservation at -80 ℃

KONG Ling-kui[1], ZHU Wei-gang[1], XIONG Wen[2], LI Xue-mei[1] ([1]Shenzhen Blood Center, [2]Institute of Shenzhen Blood Transfusion, Shenzhen 518035, China)

Abstract: Objective To follow up *in vitro* functional changes of apheresis platelet concentrates (APCs) cryo-preserved at -80 ℃ with 5% dimethylsulphoxide during a period from one to five years. **Methods** The platelet adhesion, aggregation and activity of factor Ⅲ were tested by means of glass-ball column, abduction of arachidonic acid as well as vipe benom respectively. **Results** When the APCs were resuscitated from deep low temperature, the samples showed no significant changes in functions of adhesion and aggregation as the cryo-preservation was prolonged from one to five years ($P>0.05$). However, during the thawing process of the APCs, four out of ten and three out of eleven APCs samples appeared aggregative reaction after cryo-preservance for 4 and 5 years, respectively. The majority of the samples extensively lost their factor Ⅲ activities in the fifth year storage. When fresh, liquid platelets were stored at room temperature (22 ℃), the *in vitro* adhesion and agglutination gradually decreased and statistic differences were observed in 72 h ($P<0.05$) and in 96 h ($P<0.01$). However, the activity of factor Ⅲ was retained in the room temperature up to five days. **Conclusion** The liquid platelets stored at 22 ℃ were increasingly brought on metabolic injury, while the cry-oplatelets frozen at -80 ℃ in three years showed no evident changes.

Key words: apheresis platelet concentrates; liquid platelet; cry-oplatelet; cryopreservation; adhesion; aggregation; DMSO

采用二甲基亚砜(dimethyl-sulphoxide, DMSO)为冷冻保护剂的深低温冻存血小板的研究始于上世纪50年代中期,至今已经历了约50年漫长历程[1,2]。虽然我国在该领域的研究起步较晚,但近年来进步很快,无论是在血小板冻存的基础理论和还是应用研究上都已经取得较大突破[3-8]。为此,本研究以常温保存1~5 d的液体血小板为对照,对深低温保存期间的冻存PCs复苏后的体外功能改变进行了长达1~5年的跟踪观察和研究。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMSO为无色或近乎无色的透明液体,分子式$(CH_3)_2SO$,比重1.099~1.101(g/ml),Sigma公司产品(生物试剂级)。花

作者简介:孔令魁(1955-),男,江苏省南京市人,硕士,副主任技师,主要从事输血医学方面的研究。电话:(0755)83366336-112, E-mail: KLK001@msn.com

收稿日期:2005-10-20;修回日期:2005-12-26

生四烯酸 Fluka 公司产品(化学试剂级),平时保存在 -18 ℃冰箱,用前临时用无水乙醇稀释。蝰蛇毒由广西南宁蛇毒研究所提供。

1.2　仪器

22 ℃恒温水平振荡保存箱,苏州医疗器械公司生产。立式 -80 ℃低温速冻冰箱,日本 Sanyo 公司生产。Poch-100i 血细胞分析仪,日本 Sysmex 公司生产。TYXN-91A 智能血液凝集仪,上海通用机电技术研究所生产。MCS + 全自动血细胞采集机和 994E 管路均为美国血液技术公司(Haemonetics)产品,专用的血小板透气保存袋容积为 1 000 ml。

1.3　血小板采集

从符合卫生部健康标准的无偿献血志愿者中选择有多次无偿献血合格记录的供者,采用 MCS + 机型、994E 管路和少白细胞的血小板 LDP 程序采集浓缩血小板,ACD 抗凝剂与全血比例为 1∶10,PCs 收集量为一个治疗单位(血小板计数≥2.5×10^{11}/袋),产品容积 200 ~ 250 ml。新鲜血小板采集后液体于 22 ℃恒温水平振荡箱中保存,简称液体血小板(liquid platelet)。用于深低温冻存前,液体血小板在常温下保存的一段时间,简称待冻时间。血小板冻存于深低温条件下,简称冻存血小板(cryoplatelet)。

1.4　血小板冻存与复苏

取保存期≤24 h 的新鲜液体血小板,在无菌条件下 DMSO 化操作时要求一边轻轻摇动 PCs 袋,一边用注射器缓慢加入 DMSO 至终浓度(5% ±0.5%)。此步骤的关键是加药速度控制在 1.0 ~ 1.5 ml/min,加药速度过快会导致蛋白变性和血小板活化。加药后充分混匀 2 ~ 3 min,将血小板袋展平置于含透气孔的硬纸板盒中,立即单独放置于深低温速冻冰箱,24 h 后可以转移到 -80 ℃低温冰箱中长期冻存。实验时将血小板冰块分割为所需量装入试管中,立即于 37 ℃水浴中迅速融化至室温,用血浆或生理盐水将待测血小板稀释为(1.5 ~ 2.0)×10^9/L 浓度的富含血小板血浆(PRP)。

1.5　血小板功能测试

1.5.1　黏附功能　　取玻璃珠为填充物的软管黏附柱,将已知血小板计数的 PRP 待测样品从黏附柱上端加入,用血浆封口后水平放置 37℃环境中温育 10 min,其间沿柱轴旋转 180 度,以利血小板的黏附。其后,将黏附柱垂直,从上端加入血浆和从下方收集流出液并进行血小板计数,计算出具有黏附功能的血小板百分比,其计算公式为:

$$\text{黏附功能}(\%)=\frac{(\text{柱前 PRP 计数}-\text{柱后血小板计数})}{\text{柱前 PRP 计数}}\times100\%$$

1.5.2　聚集功能　　用无水乙醇预先配置好作为诱导剂的花生四烯酸。取 PRP 200 μl 于试管内,用微量进样针加花生四烯酸至终浓度为 3.0 mmol/L,于智能血液凝集仪上测定 5 min 的血小板聚集强度曲线,并计算出最大聚集强度。

1.6　Ⅲ因子活性

在玻璃平板上取适量 PRP 液,定量取蝰蛇毒液直接加入,同时秒表计时,用玻璃棒轻轻搅动直至出现凝聚,计算所需时间。

1.7　统计学处理

样品的实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,同类样本均数的显著性差异采用 t 检验。

2　结果

2.1　冻存血小板

PCs 在 5% DMSO 保护剂下于 -80 ℃深低温冻存 1 ~ 5 年,复苏后用肉眼观察外观发现:冻存期为 4 年的 10 个样品在解冻复苏过程中有 4 个发生不可逆絮状凝聚;冻存期为 5 年的 11 个样品中有 3 个发生不可逆絮状凝聚。然而,观察期内冻存血小板的体外聚集和黏附功能并不因冻存时间的延长而发生明显改变($P>0.05$),Ⅲ因子活性在深低温保存 60 月时降低,测定时间由初期(<1 个月)的 18 s 延长至 29 s($t=3.4314$,$P<0.01$),见表 1。

表 1　-80 ℃保存时间延长的对冻存血小板复苏后体外功能的影响

时间(t/月)	黏附		聚		集Ⅲ 因子	
	n	黏附率(%,$\bar{x}\pm s$)	n	聚集率(%,$\bar{x}\pm s$)	n	活性(s)
<1	15	38.2 ±8.0	15	54.1 ±8.6	10	17.6 ±1.5
12	7	34.0 ±9.2	8	51.4 ±9.8	7	17.2 ±2.5
24	13	29.1 ±7.1	16	45.9 ±8.4	9	14.6 ±1.9
36	13	33.9 ±9.2	15	44.1 ±8.6	8	14.1 ±6.2
48	6	37.5 ±11.2	64	45.7 ±10.4	10	17.4 ±9.4
60	8	38.0 ±23.2	8	51.4 ±12.0	8	28.5 ±20.2[a]

a:$P<0.05$,与 1 个月比较

2.2　液体血小板

作为参照实验,液体血小板在 22 ℃标准条件下保存 1 ~ 5 d。与采集 1 h 内的相比较,液体血小板的黏附和聚集功能伴随着保存时间的延长呈现逐渐下降趋势(表 2):两者保存至 72 h的 t 值分别为 2.438 和 2.207($n'=16$,$P<0.05$);至 96 h 的 t 值分别为 3.523 和 3.301 ($n'=15$,$P<0.01$);至 118 h,两者的功能分别只有原来的 46% 和 55%。液体血小板在常温保存 5 d 之内对Ⅲ因子活性并没有影响($P>0.05$)。

表 2　22 ℃保存时间延长的对液体血小板体外功能的影响

时间(t/h)	n	黏附率(%)	聚集率(%)	Ⅲ 因子活性(s)
1	10	44.2 ±9.2	57.8 ±11.9	17.4 ±3.1
24	11	36.5 ±11.3	60.6 ±9.2	21.5 ±16.9
48	8	31.6 ±7.4	45.2 ±8.0	18.7 ±13.5
72	8	25.2 ±7.7[a]	37.6 ±13.3[a]	21.7 ±14.5
96	7	22.1 ±6.5[b]	34.8 ±10.1[b]	17.8 ±15.1
120	7	20.3 ±5.5[b]	31.6 ±9.8[b]	15.5 ±14.2

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 1 h 比较

2.3　无冻存保护剂的低温损伤

将当天采集的未加任何冻存保护剂的新鲜液体血小板直接置于 -80 ℃冰箱冻存数月,以产生最大程度的冻存损伤(cryo-injury)。当血小板融解复苏时,样品均有凝聚物析出,因而无法进行血小板体外黏附功能的检测,但仍可以进行聚集功能和Ⅲ因子活性测定,分别为(25.2 ±4.3)% 和(22.6 ±3.5)s。

2.4　冻存与液体血小板的比较

以血小板最大聚集强度的百分比(聚集功能)为纵轴,以冻存血小板保存月(m)和液体血小板保存小时(h)为单位为上下

两平行横轴，以阳性对照的血小板聚集强度的95%可信度（$t_{(6)0.05}=2.447$）设定灰色（冻存损伤）区作图可见，在5% DMSO保护剂的作用下冻存血小板在深低温条件下经历1～60个月的冻存仍可以较好地维持其聚集功能。相对而言，常温条件下的代谢损伤导致液体血小板聚集功能的不断下降，72 h后部分进入灰区，96 h之后均值进入灰区。

结合表1和表2分析，将采集1 h内的新鲜血小板与1～5年的冰冻血小板进行比较，除Ⅲ因子活性外，血小板的黏附、聚集功能的差别并没有显示统计学意义（$P>0.05$）

2.5 代谢损伤对冻存血小板质量的影响

为了解液体血小板的新鲜程度对冻存血小板体外功能的影响，将采集≤24 h的新鲜液体血小板和待冻时间为72 h的液体血小板分别进行冻存，复苏后进行比较，结果黏附和聚集功能的差异没有显示统计学意义（$P>0.05$），但待冻72 h组的血小板Ⅲ因子活性下降，凝集时间延长至24.5 s以上。

3 讨论

血液服务机构为满足临床对血小板输注的需求，通常希望新鲜血小板在22 ℃条件下尽可能地多保存几天，当临床供应出现富余时才进行深低温下的长期冻存。鉴于血小板存在三羧酸循环酶系，人们又担心新鲜液体血小板在22 ℃待冻时间过长会产生代谢性损伤，最终影响冻存血小板长期冻存的质量。

为解决这一问题，本研究采用较常用的血小板黏附和聚集功能的方法[8]，对22 ℃保存的液体血小板的体外功能变化进行了观察。结果显示，尽管血小板Ⅲ因子活性在5 d观察期内没有发生改变，但随保存时间的延长其黏附和聚集功能逐渐下降，且下降进程呈加快的趋势，第72小时出现统计学意义（$P<0.05$），第96小时出现显著的统计学意义（$P<0.01$）。由此推测，新鲜血小板在常温保存期间可能发生代谢损伤。

此外，采用同样的方法对5% DMSO和－80 ℃条件下的冻存血小板进行了长达5年的跟踪观察，证实其体外黏附和聚集功能并没有发生显著改变（$P>0.05$），甚至可与采集24 h内的新鲜血小板相媲美。这说明：深低温冻存可以有效抑制血小板在常温保存过程中的代谢损伤；冻存过程中所有潜在的致血小板活化步骤或因素并没有明显影响到血小板的体外功能，这包括从血小板采集、液体血小板的待冻时间添加冷冻保护剂、由22～80 ℃的长程降温过程、数年的低温库存、融化复温和复苏等一系列环节。

当然，需要特别指出的是，国内有的血站应用了其他的全自动血细胞分离机，由于运用的采集原理不同，相对过重的累积离心率和过度的浓缩过程可能导致血小板在冻存前受到了物理伤害，这样的血小板其实是不适宜于进行低温冻存。

当然，本研究的动态观察也发现了一些难以解释的现象。例如，通过对24 h和72 h不同待冻时间的冻存血小板黏附和聚集的实验比较，并没有出现预料中的差异。笔者推测，这可能是方法学的不敏感所致。又如，血小板Ⅲ因子活性在冻存60个月后显著降低（$P<0.01$），低温货架期超过48～60个月的冻存血小板复苏后出现一定比例的絮状物等，所致原因尚不清楚。至此，人们仍有大量的疑问：这是由于低温冻存损伤的累积效应所致？是冻存损伤和代谢损伤的叠加效应所致？还是在长期的低温冻存中发生如停电、整理冰箱等难以觉察的环境温度条件的破坏所致？笔者以为，要清楚地逐一阐述这些疑惑，国内停留在对血小板冻融后的比容改变、形态学计数差异的研究，或仅依靠对血小板体外功能测试的静态观察，是不足以揭示冻存血小板随保存时间的延长而发生低温损伤的内在规律，还应探索更有效的研究手段。

总之，通过对液体和冻存血小板体外功能的动态观察，我们可以初步得出如下认识：①由于常温状态下的液体血小板代谢损伤进展较快，72 h后其体外黏附和聚集功能将出现下降，因此液体血小板的待冻时间应该尽可能缩短；②从冻存血小板可以维持完好的体外黏附和聚集功能来看，深低温条件可以很好地抑制代谢损伤；③ 待冻时间＜24 h的冻存血小板在－80 ℃和5% DMSO的保存条件下可延长至48个月。

参考文献：

[1] ANGELINI A, DRAGANI A, BERARDI A *et al*. Evaluation of four different methods for platelet freezing. *In vitro* and *in vivo* studies [J]. Vox Sang, 1992, 62(3): 146－151.

[2] DIJKSTRA-TIEKSTRA M J, DE-KORTE D, PIETERSZ R N, *et al*. Comparison of various dimethylsulphoxide-containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates [J]. Vox Sang, 2003, 85(4): 276－282.

[3] 刘景汉，欧阳锡林，高大勇. 冰冻血小板战时运输和储存的允许温度[J]. 解放军医学杂志，2003，28(4)：343－344.

[4] 刘景汉，欧阳锡林，高大勇. 冰冻血小板的运输及其在野战医院应用的可行性研究[J]. 中国医师杂志，2003，5(7)：872－874.

[5] 张 宏，邬旭群，陈云龙，等. 低温－80 ℃长期保存单采血小板的功能研究[J]. 实用医学杂志，2004，20(7)：844－845.

[6] 丁国良，赵树华，王 珍，等. 冻存血小板中出现絮状物的原因分析[J]. 临床输血与检验，2004，6(2)：114－116.

[7] 孙艳萍，袁 媛，陈召江，等. 冰冻血小板融化复苏后不可逆聚集的原因分析[J]. 临床输血与检验，2005，7(2)：88－89.

[8] GAO D Y, NEFF K, XIAO H Y, *et al*. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation [J]. Cryobiology, 1999, 38(3): 225－235.

（编辑 周 芳）