论著

文章编号:1000-5404(2007)02-0138-03

机采浓缩血小板 -80 ℃长期冻存条件下 CD62p 表达与 ADP 诱导的再表达

孔令魁[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 通过对冻存损伤关键因素的了解评估冻存血小板潜在的冻存期限。**方法** 采用流式细胞技术观察冻存 1 ~6 年复苏后血小板 CD62p 表达和 ADP 诱导后 CD62p 再表达能力。**结果** 在 -80 ℃保存 12 ~48 个月,冻存血小板 CD62p 的表达受得良好抑制,可与 22 ℃保存 28 h 的液体血小板质量相近;而 ADP-CD62p 再表达能力充分,36 个月时为(70.2 ±10.3)%,与常温 24 h 的液体血小板的(70.4 ±21.5)% 相比无显著性差异($P>0.05$);但 48 个月时下降至(35.2 ±18.2)%,与冻存 36 个月比较有非常显著性差异($P<0.01$)。作为对照,液体血小板在采集后 1 h 的 CD62p 表达率为(2.2 ±1.5)%,在 22 ℃条件下随保存时间的延长迅速升高,24 h 有显著性差异($P<0.05$),48 h 和 72 h 有极显著性差异($P<0.01$);而采集后 1 h 的 ADP-CD62p 再表达率为(83.5 ±14.7)%,其后迅速下降,48 h 后有极显著性差异($P<0.01$)。**结论** 新鲜血小板常温条件下待冻期间发生的代谢损伤是影响冻存血小板质量的关键因素,选择≤24 h 的新鲜血小板用于 -80 ℃冻存至少可以保存 3 年。

关键词: 血小板;低温冻存;低温冻存损伤;CD62p 表达;DMSO

中图法分类号: R331.143;R392.11;R457.12 **文献标识码**: A

CD62p expression and ADP induced re-expression in platelet apheresis concentrates after long-term cryopreservation at −80 ℃

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

Abstract: Objective To explore potential shelf-life of cryo-platelets by evaluating pivotal elements to platelet injury. Methods The ability of platelets cryopreserved at deep low temperature for one to six years to express CD62p and re-express after ADP induction was detected with flow cytometry. Results When the platelets preserved at −80 ℃ for the first 12 to 48 months, CD62p expression on the platelets was well restrained and of no significant difference with the liquid platelets stored at room temperature for 28 h, while CD62p re-expression induced by ADP was effectively maintained, and the positive rate of re-expressed CD62p [(70.2 ± 10.3)%] as the platelets preserved at −80 ℃ for 36 h was not significantly different with that [(70.4 ± 21.5)%] of the liquid platelets stored at room temperature for 24 h ($P>0.05$). However, the positive rate of re-expressed CD62p declined to (35.2 ± 18.2)% when the platelets stored at −80 ℃ for 48 months, with significant difference with that for 36 months ($P<0.01$). As control, when the liquid platelets held at 22 ℃, the positive rate of CD62p was (2.2 ± 1.5)% in 1 h after collection, then promptly increased, showed significant difference with that at 24 h ($P<0.05$), at 48 h, at 72 h (both $P<0.01$). As for re-expressed CD62p, the positive rate was (83.5 ± 14.7)% in 1 h, then rapidly decreased, with significantly difference with that at 48 h ($P<0.01$). Conclusion The key factor to the quality of cryo-platelets is the metabolic injury of the liquid platelets occurred at the stand-by period before cryopreservation. Therefore, if cryopreserved in 24 h after collection, platelets could be preserved for at least three years at −80 ℃.

Key words: platelets; cryopreservation; cryo-injury; CD62p expression; DMSO

液体血小板伴常温保存时间的延长可能发生代谢损伤是影响深低温长期冻存的关键因素。本研究以 22 ℃条件下保存 1 ~5 d 的液体血小板为对照,采用流式细胞技术跟踪观察 -80 ℃条件下保存期长达 1 ~6 年的冻存血小板的 CD62p 表达[1] 和 ADP 诱导后的再表达能力[2,3]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

血小板来源、保存条件和常用术语同文献[4]。PAC-1 标

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)83366336-307, E-mail: KLK001@msn.com

收稿日期:2005-10-20;修回日期:2006-02-20

记 FITC 荧光,IgM 标记 FITC 荧光,CD62p 标记 PE 荧光,IgG1 标记 PE 荧光,CD61 标记 PerCP 荧光,一次性 12×75 mm Falcon 试管,均为美国 BD 公司产品。血小板活化剂 ADP 浓度为 0.2 mol/L, 1% 多聚甲醛的 PBS 为固定液,PBS 缓冲液加 0.1% NaN_3,于 2~8 ℃冰箱中保存。PAC-1 阻断剂 RGDS 用 PBS 配制为 10 mg/ml。

1.2　主要仪器

Olympuse 双目生物显微镜(日本),智能血液凝集仪 TYXN-91A(上海通用机电技术研究所),-80 ℃低温速冻冰箱(日本 Sanyo 公司),22 ℃恒温水平振荡仪(苏州医疗器械厂),Poochi-100 血细胞分析仪(日本 Sysmex 公司),FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3　方法

1.3.1　CD62p 表达率　　测试血小板样品分为 2 份,1 份用于血小板自然活化状态的测定,即 CD62p 表达率(简称 CD62p)。血小板取样后立即染色固定,避免操作过程导致的激活,用 PBS 调整血小板浓度计数为 $2\times10^4/\mu l$。测试管中加入 PAC-1-FITC、CD62p-PE 和 CD61-PerCP 各 20 μl,对照管中加入 IgM-FITC、IgG1-PE 和 CD61-PerCP 各 20 μl,2 管中加入未激活的待测血小板 5 μl,混匀后在室温暗处孵育 15~20 min 后加入固定液 1 ml,24 h 内流式分析。

1.3.2　CD62p 再表达率　　取另 1 份待测血小板样品 450 μl,加入激活剂 ADP 50 μl,轻轻摇匀后室温孵育激活,5 min 立即固定染色,全过程在 10 min 内完成,血小板进行流式 CD62p 测定,其百分比为 CD62p 再表达率(简称 ADP-CD62p)。ADP-CD62p 的计算公式为:ADP 激活管 CD62p 阳性率-对照管 CD62p 阳性率(未经 ADP 激活)。

1.4　统计学处理

观察的样本数较少,但其频数基本对称,采用均数作为集中趋势指标,采用标准差作为离散程度指标。两样本均数的比较,采用 t 检验。液体血小板 CD62p 的升高与 22 ℃保存的时间的关联,通过计算直线相关系数(R)并接受 t 检验,若($P<0.05$)证实线性关系,将以时间(h)为自变量(X)和 CD62p 为因变量(Y)获取直线回归方程,并对回归系数作显著性检验。

2　结果

2.1　液体血小板 CD62p

在 22 ℃常温条件下保存的液体血小板 CD62p 表达率随保存时间的延长而增加:保存第 24 小时显示有显著性($t=2.2247$,$P<0.05$),48 h 有非常显著差异($t=2.933$,$P<0.01$)和 72 h($t=5.1210$,$P<0.01$)有非常显著差异。或间隔期为 48 h,如 24 h 与 72、48 h 与 96 h 的两两比较,都显示出非常显著性差异($P<0.01$);随保存时间的延长,以 24 h 为单位的 CD62p 的表达率增幅逐渐增大。具体数据详见表 1。

2.2　液体血小板 ADP-CD62p

如表 1 显示,与血小板 CD62p 表达率的趋势相反,在 22 ℃条件下保存的新鲜液体血小板对 ADP 刺激后的 CD62p 再表达率(ADP-CD62p)随保存时间的延长逐渐衰减,在 1~72 h 期间,平均每 24 小时递减 14.4%。与 1 h 相比,24 h 没有显著性差异($P>0.05$),48 h 有极显著性差异($t=4.1980$,$P<0.01$);24 h与 72 h 的两两比较下降有显著差异($t=2.1188$,$P<0.05$),48 h 与 96 h 的两两比较没有显著差异($P>0.05$)。

表 1　22 ℃条件下不同保存时间液体血小板 CD62p 表达率和 ADP-CD62p 再表达率的变化

保存时间 (t/h)	n	CD62p [($\bar{x}\pm s$)%]	ADP-CD62p [($\bar{x}\pm s$)%]
1	11	2.2±1.5	83.5±14.7
24	8	7.0±7.1[a]	70.4±21.5
48	9	15.5±14.6[b]	58.8±10.8[b]
72	4	28.6±18.2[b]	40.2±26.8
96	5	40.8±26.8	41.3±22.3

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与保存 1 h 比较

2.3　冻存血小板 CD62p

-80 ℃冻存复苏后的血小板 CD62p 表达率与 ADP-CD62p 再表达率参见表 2。需要强调的是,冻存 24 个月组的采用了待冻时间为 48 h 的液体血小板,其余组的待冻时间均为 24 h 以内。结果显示:CD62p 表达率对待冻时间的不同没有显现出异常;冻存血小板 CD62p 表达率的增加相对液体血小板极为缓慢,只是在冻存的 72 个月呈加速的迹象($P<0.01$)。

2.4　冻存血小板 ACD-CD62p

ADP-CD62p 对待冻时间较为敏感(表 2),24 个月低于 36 个月($P<0.05$);对冻存时间也同样敏感,48 个月后 ADP-CD62p 再表达能力急遽下降,有显著性差异($P<0.05$)。

表 2　-80 ℃条件下不同冻存时间血小板 CD62p 表达率和 ADP-CD62p 再表达率的变化

保存时间 (t/月)	n	CD62p [($\bar{x}\pm s$)%]	ADP-CD62p [($\bar{x}\pm s$)%]
24	4	4.8±3.6	56.7±4.3
36	9	8.9±4.1	70.2±10.3[a]
48	9	10.3±5.9[a]	35.2±18.2[ac]
60	6	18.7±7.7[a]	39.2±16.5[c]
72	5	46.7±18.3[b]	9.4±11.5

a: $P<0.05$,与 24 个月比较; b: $P<0.01$,与 60 个月比较,
c: $P<0.01$,与 36 个月比较

2.5　液体和冻存血小板 CD62p 的比较

根据表 1 数据计算,液体血小板 CD62p 的升高与保存时间呈线性关系,直线相关系数(R)=0.9865,并接受 t 检验($P<0.01$)。于是,以时间(h)为自变量(X)和 CD62p 为因变量(Y)做直线回归分析,回归系数经检验有显著性意义($P<0.01$),获得线性方程 $y=-1.2464+0.4159x$ 并作图(图 1)。在图 1 X 轴上方设一平行 X'轴,以血小板低温冻存时间(月)为自变量标示其上,冻存血小板与液体血小板共享 Y 轴的 CD62p 表达率,可以进行液体和冰冻血小板的 CD62p 表达率与时间关系进行换算与比较。例如,X'轴保存 48 个月的冻存血小板 CD62p 表达率为 10.3%,找出坐标(用圆点标示),并通过圆点向 Y 轴作水平延长线与直线方程交汇(用十字线标示)。于是发现,对应液体血小板的 CD62p 表达率的常温保存时间约为 28 h(箭头标示)。类似的数据,也可以通过直线方程式的换算获得。

2.6　ACD-CD62p 的比较

采用与图 1 相同的作图法,绘制液体和冻存血小板 ACD-CD62p 的再表达率的关联分析图 2。由图 2 所见,新鲜血小板在 22 ℃保存前的 72 h 的 ADP-CD62p 再表达能力呈线性下降,

96 h 与 72 h 相比没有显著性改变($P>0.05$)。冻存血小板在 -80 ℃保存至 36 个月时仍具有良好的 ADP-CD62p 再表达能力,但衰减较快,至 72 个月完全耗竭。值得注意的是,冻存 36 个月(待冻时间≤24 h)的 ADP-CD62p 与 24 个月(待冻时间 48 h)相比存在的统计意义上的差异($P<0.05$)。此外,就冻存血小板和液体血小板 ADP-CD62p 而言,冻存 36 个月和常温 24 h之比、24 个月和 48 h 之比,以及 48 ~ 60 个月与 72 ~ 96 h 之比没有差异($P>0.05$)。

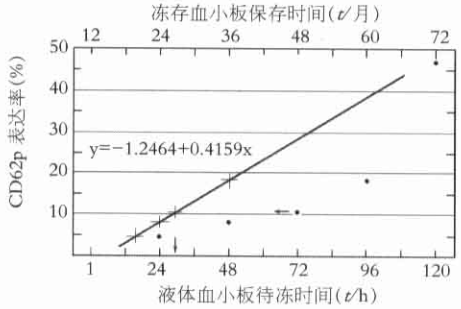


图 1 液体血小板 CD62p 表达率的直线回归与冻存血小板 CD62p 表达率保存时间换算的关联图

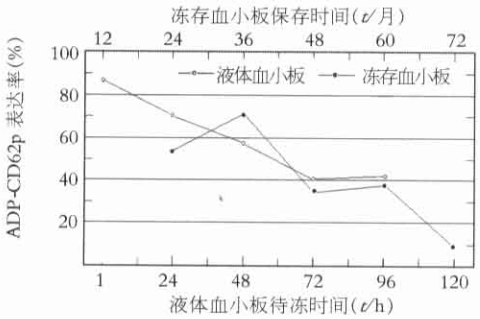


图 2 22 ℃保存的液体血小板和 -80 ℃的冻存血小板 ACD-CD62p 的再表达率比较

2.7 对照样品和失败样品分析

部分血小板在低温冻存期长达 4 ~ 5 年后的解冻复苏过程中出现凝聚,经离心去除凝聚物后,将残余血小板进行流式分析,其 CD62p 和 ADP-CD62p 分别为 6.64% 和 19.87%。而对照实验中未加 DMSO 保护剂直接深低温冻存的血小板复苏后,其 CD62p 和 ADP-CD62p 分别为 56.24% 和 15.58%。

3 讨论

血小板发挥止血功能的主要步骤是黏附、聚集、活化和止血。从方法学上讲,黏附和聚集功能对低温冻存血小板的研究有一定的局限性[4],因而本研究转向对血小板活化的研究。CD62p 为血小板颗粒膜蛋白 -140,也称 P 选择素(P-selectin),是血小板 α 颗粒的膜蛋白成分。血小板被激活时,细胞内的 α 颗粒与质膜或表面连接小管系统融合,血小板开始释放胞内 α 颗粒,所以血小板表面检测到 CD62p 是血小板被活化的重要标志[5]。当由于某种原因血小板被激活、CD62p 表达率增加时,其分泌 α 颗粒也因耗竭而不断递减[6],因此采用血小板再激活的方式可以更好地反映 α 颗粒耗竭的趋势或状态。

本研究通过对液体血小板常温下保存 1 ~ 5 d 的动态观察发现:随保存时间的延长,CD62p 上升并在第 24 h 显现差异($P<0.05$),且增幅逐渐增大;而 ADP-CD62p 则不断下降,第 48 h 有显著性差异($P<0.01$)。血小板体外黏附和聚集功能至第 72 小时后才有统计学意义的改变[4],血小板活化的研究所揭示的液体血小板常温下的代谢损伤进程可以提前到 24 ~ 48 h。通过对冻存血小板深低温保存 1 ~ 6 年的动态观察,随保存时间的延长,CD62p 呈缓慢上升,至 48 ~ 60 个月显现差异($P<0.05$),72 个月有非常显著性差异($P<0.01$);而 ADP-CD62p 的下降趋势较为迅速,至 48 ~ 60 个月时有非常显著性差异($P<0.01$)。

总之,根据本研究结果可以初步归纳如下。首先,新鲜血小板 22 ℃下保存将发生代谢损伤,最先于 24 h 出现 CD62p 表达率的改变,第 48 小时 ADP 诱导 CD62p 再表达能力的显著性下降,第 72 小时体外黏附、聚集功能改变。其次,低温冰冻可以有效地抑制血小板代谢损伤的发生。在 1 ~ 5 年的冻存期间,血小板的体外黏附和聚集功能未发生任何有意义的改变,血小板Ⅲ因子的活性也基本保持完好,CD62p 表达率和 ADP-CD62p 再表达率仅于冻存的第 48 个月有统计学意义的改变。再次,影响冻存血小板质量的关键因素是液体血小板的新鲜程度,待冻时间越短其代谢损伤越小。原则上待冻时间不得超过 24 h,-80 ℃低温冻存血小板的年限可以延长至 3 年。最后,本研究保存期长达 4 ~ 5 年的冻存血小板出现部分冻存失败,其原因不排除为在长年的冻存期间出现停电、整理冰箱等客观因素。

参考文献:

[1] 欧阳锡林, 刘景汉, 潘纪春, 等. 深低温保存新鲜富含血小板血浆质量分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2004, 12(6): 841 -844.

[2] 洪 俊, 姚锦炎, 李小文, 等. 不同方法制备的浓缩血小板表面 CD62 分子的表达[J]. 中国输血杂志, 2002, 15(4): 236 -237.

[3] 刘景汉, 欧阳锡林, 高大勇. 冰冻保存血小板新亚群及其新特性体外研究[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(6): 385 -388.

[4] 孔令魁, 朱为刚, 熊 文, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(17): 1798 -1800.

[5] 赵树铭, 成晓玲, 李书武, 等. 机采血小板 P-选择素在常规和冰冻保存条件下的表达研究[J], 2003, 25(6): 525 -527.

[6] 李 维, 余梅贵, 府伟灵, 等. 冰冻机采血小板超微结构回收率以及 CD62P, PAC-I 的改变[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(9): 1067 -1069.

(编辑 陈聪连)