文章编号:1000-5404(2008)09-0823-04

论著

新型血小板添加液对血小板低温液态保存效果的实验研究

王 昕,李 静,史蓉华,赵树铭 (第三军医大学西南医院输血科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨使用改良的血小板添加液(PAS)替代 70% 自体血浆在低温液态条件下对血小板的保存效果。方法 采集 6 单位单采血小板,每一单位单采血小板平均分为 3 组,A 组加入 70% PAS-Ⅲ M/30% 血浆 10 ℃保存;B 组加入 100% 血浆 22 ℃保存;C 组加入 100% 血浆和海藻糖 -85 ℃保存。A、B 组在第 1、5、7、9 天取样检测,C 组在 20 d 后复苏取样检测。分别检测 PLT 计数、PDW、MPV、CD62p、HSR、PAgT、pH 值、LDH 以及 GLU 的变化。结果 保存期内随保存时间延长,A 组和 B 组 CD62p 表达增加,HSR 和最大聚集率降低;A 组的 LDH 释放、GLU 消耗、CD62p 表达、HSR、血小板最大聚集率与 B 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。B 组 pH 值在第 5 天起明显降低($P<0.05$)。C 组 LDH 释放明显较其他两组增多,但 CD62p 表达较少($P<0.05$)。C 组 PDW 显著升高,除与 B 组第 5 天结果相似外,均高于 A、B 组各时间点结果($P<0.05$)。各组 PLT 计数相差不显著。结论 改良的 PAS-Ⅲ M 能够很好的替代血浆用于血小板的保存,同时在低温条件下能够很好地保护血小板的功能,保存效果好于血浆常温保存。

关键词:血小板;血小板添加液;低温保存;海藻糖
中图法分类号:R331.143;R457.12;R954 文献标识码:A

Effect of modified PLT additive solution for platelets storage at low temperature

WANG Xin, LI Jing, SHI Rong-hua, ZHAO Shu-ming (Department of Transfusion, Southwest hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the preservation effect of a modified platelets (PLT) additive solution (PAS-Ⅲ M) as a substitute for plasma in the storage of platelet concentrates at low temperature. Methods Apheresis platelets from 6 donors were divided and stored in different media, that is, A: 70% PAS-Ⅲ M/30% plasma stored at 10 ℃, B: plasma stored at 22 ℃, C: plasma/trehalose stored at -85 ℃. The samples of in group A and B were respectively collected in 0, 1, 5, 7 and 9 days after storage, and those of group C on day 20 after storage. Platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), platelet distributing width (PDW), CD62p, hypotonic shock response (HSR), platelet aggregation (PAgT), pH, lactic dehydrogenase (LDH), glucose consumption were evaluated. Results The expression of CD62p in group A and B group were increased in a time-dependent manner, but HSR and PAgT were decreased. CD62p expression, LDH release, glucose consumption were significant higher, and HSR, PAgT were significant lower in group B than in group A ($P<0.05$). After 5 days' storage, pH value in group B were significant decreased ($P<0.05$). LDH release were significant higher in samples of C group and the expression of CD62p were lower than those of other 2 groups ($P<0.05$). PDW of C group were increased after storage and significant higher than that of other 2 groups (besides that of B group on day 5) ($P<0.05$). In all storage groups, PLT had no significant difference. Conclusion PAS-Ⅲ M could be a good substitute for plasma in platelet storage, and can protect the platelets function at low temperature.

Key words: platelet; platelet additive solution; storage at low temperature; trehalose

作者简介:王 昕,男,陕西省西安市人,硕士研究生,技师,主要从事血液代用品方面的研究。电话:(023)68765985
通信作者:赵树铭,电话:(023)68765475,E-mail:shumingzhao@yahoo.com
收稿日期:2008-02-26 修回日期:2008-03-14

血小板输注在临床输血中具有重要作用,在大量失血以及化疗、放疗等处理引起的血小板减少症患者的治疗过程中,都需要血小板输注。血小板质量受其保存条件影响,目前常规应用的 22 ℃振荡保存血小板

易受细菌污染[1]，保存期短，故低温液态保存血小板备受关注，但低温液态保存易激活血小板，使其寿命缩短。研究表明，海藻糖能够抑制低温所致的血小板膜侧相分离和血小板聚集[2]，是一种良好的血小板低温保护剂。与传统血浆保存的单采血小板（DPs）相比，血小板添加液（platelet additive solution，PAS）保存的DPs减少了血浆含量，从而降低过敏和发热输血反应，适合ABO血型不相配的血小板输注，同时也可以获得更多的血浆用于其他治疗[3,4]。我们对血小板添加液进行了改良，用改良的血小板添加液（PAS-ⅢM）替代70%血浆在低温10 ℃保存DPs，在9 d内观察血小板的凝集功能等指标的变化，现报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器

血细胞分离仪（CS3000 plus，Baxter公司，美国），KX-21N型血细胞计数仪（Sysmex公司，日本），TYXN-91血液凝集仪（通用机电公司，上海），FAC-Salibur流式细胞仪（BD公司，美国），Cobas C 501全自动生化分析仪（Roche公司，德国），Medica EasyBloodGas血气分析仪（Medica公司，美国），XHZ-1型血小板恒温振荡保存箱（华通公司，苏州）。

1.2 试剂

一次性使用塑料血袋（上海输血技术有限公司，上海），CD41a-FITC、CD62p-PE（BD公司，美国），Mouse IgG1/FITC、Mouse IgG1/PE（晶美生物公司，北京），ADP（40 μmol/L，伯奥生物，上海），肾上腺素（1 mg/ml，重庆西南药业），血小板洗涤液（Na_2EDTA + PBS），0.01 mol/L PBS缓冲液（pH 7.4），HEPES缓冲液（pH 7.4），1%多聚甲醛固定液。

1.3 方法

1.3.1 改良的血小板添加液的制备 参考血小板添加液的配方[5]，加入海藻糖作为改良的血小板添加液。表1列出本研究采用的改良PAS-ⅢM组分。

表1 血小板添加液PAS-ⅢM组分（g/L）

组分	含量
Na_3-枸橼酸·$2H_2O$	3.18
$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$	1.05
Na_2HPO_4	3.05
KCl	0.37
$MgCl \cdot 6\ H_2O$	0.30
NaCl	4.05
海藻糖	75.00

1.3.2 样品的采集与分组 选择6位健康志愿献血者，按操作规程用血细胞分离仪（CS3000 plus）采集DPs，每单位血小板浓度为（1.0～2.0）×10^{12}/L。将每一单位单采血小板平均分成3组保存。A组加入70% PAS-ⅢM/30%血浆；B组加入100%血浆；C组加入100%血浆和海藻糖（海藻糖终浓度为50 mg/ml）。A、C组37 ℃水浴2 h（海藻糖内载入血小板细胞内）后A组置于10 ℃恒温振荡保存，B组在常温（22 ℃）恒温振荡保存，C组于－85 ℃冰箱储存（保存前加入超滤DMSO，终浓度5%，封装后放入冰箱保存）。A、B组分别于保存后第1、5、7、9天取样检测，C组在20 d后复苏取样检测。

1.3.3 血小板膜糖蛋白CD62p的检测 每一标本准备3管，分别编为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ管，各管加入7 μl标本和993 μl血小板洗涤液，并调整浓度至10^6/ml。再分别加入：Ⅰ管：Mouse IgG1/FITC + Mouse IgG1/PE；Ⅱ管：CD41a-FITC + Mouse IgG1/PE；Ⅲ管：CD41a-FITC + CD62p-PE。以上各管20 ℃避光孵育20 min，分别加入2 ml PBS洗涤，1 000 r/min离心5 min，弃上清。分别加入0.3 ml冷多聚甲醛（4 ℃）重悬，2～8 ℃避光保存30 min，流式细胞仪检测。

1.3.4 血小板低渗休克反应 各组标本取适量，分2管，一管经3 000 r/min离心10 min，上清液即乏血小板血浆（PPP）；调整另一管血小板浓度至3.0 ×10^{11}/L，即富血小板血浆（PRP），并用HEPES缓冲液调节PRP pH值为7.0。以PPP调零，测试杯中加入200 μl PRP，放入搅拌棒后插入测试孔中，取200 μl等渗PBS缓冲液迅速注入此测试杯中，并记录凝集仪在1 min内的透光率变化；用低渗去离子水代替等渗PBS缓冲液重复以上操作，并记录凝集仪在5 min内的透光率变化。将等渗PBS缓冲液透光率变化图中第1分钟的透光率值标记为T_{PBS}，将低渗去离子水透光率变化图中的最大透光率值和第5分钟的透光率值分别标记为T_{max}和$T_{5\ min}$，并计算低渗休克反应（HSR）。

$$HSR = \frac{T_{max} - T_{5\ min}}{T_{max} - T_{PBS}} \times 100\%$$

1.3.5 血小板聚集试验 方法基本同血小板低渗休克反应。以PPP调零，在测试杯中加入200 μl PRP，放入搅拌棒后插入测试孔中，取10 μl ADP（40 μmol/L）和10 μl肾上腺素（1 mg/ml），同时迅速注入此测试杯中，记录5 min内的血小板最大聚集率（以PAgT表示）。

1.3.6 pH值 使用Medica EasyBloodGas血气分析仪检测各样品的pH值。

1.3.7 LDH和GLU检测 使用Cobas C 501全自动生化分析仪检测各样品乳酸脱氢酶（LDH）和葡萄糖（GLU）。第1、5、7、9天各样品的LDH、GLU与第0天LDH、GLU比较得出LDH释放和GLU消耗数量，并计算出每10^{11}个血小板在保存期间所释放的LDH（U/10^{11}）和消耗的GLU（mmol/10^{11}）。

1.3.8 血小板计数、MPV、PDW检测 使用KX-21N型血细胞计数仪测定各标本血小板计数、平均血小板体积（MPV）以及血小板分布宽度（PDW）。

1.4 统计学处理

实验数据用$\bar{x} \pm s$表示，应用统计软件为SPSS 13.0。对同一分组采用随机取组设计的方差分析，考察不同时间点之间的差异，若有差异采用配对t检验进一步分析；对同一时间点采用配对t检验考察不同处理组之间的差异。

2　结果

2.1　GLU 消耗和 LDH 释放检测

保存期内,A、B 组随保存时间延长 GLU 消耗和 LDH 释放增加。9 d 内各时间点 A 组 GLU 消耗和 LDH 释放均低于 B 组。C 组 LDH 释放远高于 A、B 组($P<0.01$),GLU 消耗与 A 组 9 d 时相似(表 2)。

2.2　血小板 pH 值的变化

B 组在第 5 天起 pH 值显著降低($P<0.01$),A 组 pH 值变化不显著。在 7 ~ 9 d,B 和 A 组 pH 值近似(表 2)。C 组保存前后 pH 值改变不大(表 2)。

2.3　血小板保存过程中血小板计数、MPV、PDW 的变化

保存期内,各组的 PLT 计数无显著改变。A 组 PDW、MPV 第 1、7 天升高,B 组 PDW、MPV 在第 1 天降低($P<0.05$)。B 组 PDW 第 1 天低于 A 组,第 5 天高于 A 组($P<0.05$),其余时间点两组结果相似。A 组 MPV 在第 1 天高于 B 组,在第 5、9 天低于 B 组。C 组保存后 PDW 显著升高($P<0.05$),除与 B 组第 5 天结果相似外,均高于 A、B 组各时间点结果($P<0.05$)。C 组 MPV 与 A 组第 7 天,B 组第 5、7、9 天结果相似(表 2)。

2.4　血小板膜糖蛋白 CD62p 的表达

在保存期间,随保存时间延长,各组血小板膜糖蛋白 CD62p 表达均呈上升趋势。A 组在保存期间 CD62p 表达低于 B 组($P<0.05$)。C 组 CD62p 表达低于 A、B 组($P<0.01$)。见表 2。

2.5　血小板 HSR 的变化

在保存期间,随保存时间延长,各组血小板 HSR 呈降低趋势。第 0、1 天 A 组与 B 组 HSR 相似,第 5 ~ 9 天 A 组 HSR 高于 B 组($P<0.05$)。C 组 HSR 除与 B 组第 9 天结果相似外,均低于 A、B 组各时间点结果(表 2)。

2.6　血小板最大聚集率的改变

随保存时间延长各组血小板最大聚集率呈下降趋势。保存期间 A 组的血小板最大聚集率显著低于 B 组($P<0.01$,表 2)。

3　讨论

血小板制剂是临床输血治疗的重要部分,对各种原因引起的血小板减少和出血具有明显的治疗作用。常规保存的血小板制剂易受细菌污染[1],只能在常温(22 ± 2)℃振荡保存 5 d,保存 DPs 所用的血浆又增大了受血者发生过敏和发热输血反应的机会。使用血小板添加液(PAS)替代自体血浆保存 DPs 能够减少受血者的副反应发生,有利于 ABO 血型不合个体间的血小板输注。

低温生理学研究表明,在低温下血小板形态会从正常的铁饼状变为圆球状,4 ℃低温保存 24 h 以上会出现 α2 颗粒的聚集和释放。细胞质内钙离子的迅速增加及骨架肌动蛋白的集结装配不仅使血小板形态发生异常改变,还可以使其膜发生脂相转移,导致血小板侧向分离,细胞膜通透性增加,变得容易被激活。尽管加入钙离子螯合剂和细胞松弛素 B 可以维持 4 ℃保存血小板膜的完整性和提高血小板的存活率,但 4 ℃保存的血小板输入体内后会很快被清除,使止血功能下降[6,7]。

最近研究表明,血小板黏附受体复合物(GPIb-IX-V)中的 GPIbα 亚单位能被单核/巨噬细胞膜上的凝集素 Mac-1 识别,并与之结合后,导致 4 ℃保存血小板被巨噬细胞吞噬破坏[8]。海藻糖是一种良好的生物大分子干燥保护剂,在体内可分解成二分子的葡萄糖,对机体无任何毒副作用。低温下海藻糖可作为一种水分替代分子[9],避免血小板生物膜发生固相-液相转变,抑制血小板膜的侧相分离,阻止 GPIbα 的多聚化[2]。无论是内源性还是外源性海藻糖,都能够有效抑制寒冷所致的血小板膜侧相分离和血小板聚集,是一种良好

表 2　保存期间各组体外参数变化($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

保存时间		LDH 释放量(U/10^{11})	GLU 消耗量(mmol/10^{11})	pH	PLT(×10^9/L)	PDW(fl)	MPV(fl)	CD62p(%)	HSR(%)	PAgT(%)
0 d	A	–	–	7.02 ± 0.15	1 435 ± 129	10.1 ± 1.4	8.5 ± 0.9	6.2 ± 1.5	73.0 ± 2.2	91.3 ± 1.5^{a}
	B	–	–	7.42 ± 0.08	1 400 ± 238	12.6 ± 1.9	9.7 ± 1.4	7.3 ± 1.8	75.5 ± 4.2	97.9 ± 0.7
	C	–	–	7.47 ± 0.09	1 337 ± 133	12.2 ± 1.7	10.2 ± 1.5	6.3 ± 0.5	72.7 ± 5.4	95.8 ± 1.3
1 d	A	2.9 ± 1.6^{ac}	0.09 ± 0.03^{a}	6.96 ± 0.21	1 401 ± 179	11.2 ± 1.0^{abc}	9.3 ± 0.7^{abc}	8.8 ± 2.2^{abc}	69.4 ± 1.8^{bc}	65.8 ± 4.4^{ab}
	B	10.0 ± 1.9^{c}	0.24 ± 0.10	7.53 ± 0.12	1 446 ± 120	10.3 ± 0.8^{bc}	8.2 ± 0.6^{bc}	15.2 ± 2.0^{bc}	70.5 ± 2.7^{bc}	86.5 ± 1.5^{b}
5 d	A	9.0 ± 2.9^{ac}	0.23 ± 0.06^{a}	6.96 ± 0.06	1 371 ± 212	10.5 ± 1.22^{ac}	8.7 ± 0.9^{ac}	33.6 ± 4.0^{abc}	61.7 ± 3.2^{abc}	9.2 ± 1.3^{ab}
	B	20.3 ± 2.4^{c}	0.94 ± 0.15	7.11 ± 0.31^{b}	1 239 ± 182	14.6 ± 1.6^{c}	10.3 ± 0.7	42.2 ± 2.1^{bc}	58.6 ± 2.8^{bc}	23.4 ± 2.6^{b}
7 d	A	13.3 ± 2.6^{ac}	0.30 ± 0.03^{a}	7.03 ± 0.13	1 370 ± 161	11.6 ± 1.0^{bc}	9.9 ± 0.6^{b}	42.4 ± 2.3^{abc}	45.4 ± 4.5^{abc}	4.8 ± 2.2^{ab}
	B	28.0 ± 7.2^{c}	1.12 ± 0.19	7.02 ± 0.12^{b}	1 297 ± 280	11.1 ± 2.0^{c}	9.8 ± 1.0	46.4 ± 2.6^{bc}	34.5 ± 3.7^{bc}	12.8 ± 1.8^{b}
9 d	A	18.6 ± 3.4^{ac}	0.41 ± 0.07^{a}	7.05 ± 0.08	1 387 ± 127	10.4 ± 1.2^{c}	8.7 ± 0.9^{ac}	53.8 ± 2.8^{abc}	37.9 ± 3.4^{abc}	2.6 ± 1.3^{ab}
	B	30.4 ± 3.2^{c}	1.25 ± 0.15	7.06 ± 0.10^{b}	1 377 ± 111	11.4 ± 1.1^{c}	10.5 ± 1.0	59.2 ± 2.4^{bc}	32.2 ± 4.2^{b}	5.7 ± 1.3^{b}
20 d	C	43.9 ± 4.2	0.37 ± 0.09	7.41 ± 0.09	1 415 ± 104	14.4 ± 1.1^{b}	10.2 ± 0.3	4.2 ± 0.6	32.2 ± 5.9^{b}	18.4 ± 2.7^{b}

a:$P<0.05$,与同时相点 B 组比较;b:$P<0.05$,与同组 0 d 比较;c:$P<0.05$,与 C 组 20 d 比较

的血小板低温保护剂。

我们在实验中采用在10 ℃保存血小板，一方面提高了低温保存的温度，尽量减少了血小板在4 ℃低温保存时受到的损伤，另一方面10 ℃也不利于细菌的生长、繁殖，降低了血小板受到细菌污染的概率。同时，我们在保存液中加入了海藻糖，试图保护血小板在低温保存过程中免受温度降低带来的影响。实验结果显示，在低温10 ℃条件下细胞代谢降低，血小板代谢消耗的GLU明显低于常温条件下GLU的消耗。LDH多存在于细胞内，在细胞损伤破坏后会释放出来，A组中LDH释放量低于B组，显示A组中血小板保存的完整性较B组好。C组LDH释放量远高于其他两组，表明冰冻状态对血小板能够造成较大的损伤，即便添加了海藻糖，在深低温时血小板仍易受到损伤。

使用血小板添加液替代自体血浆保存DPs在保存期内能否很好的维持血小板的功能显得尤为重要[10,11]。我们使用的改良PAS-ⅢM是在PAS-Ⅲ的基础上增加了氯化钾和氯化镁的含量（钾和镁具有稳定细胞膜和抑制血小板聚集的作用），并添加了一定量的海藻糖，实验表明PAS-ⅢM较好的保持了血小板HSR和CD62p的表达，PLT计数、PDW、MPV、pH值、LDH释放以及GLU消耗各方面保存效果与自体血浆相似甚至更好，能够很好的维持血小板的体外质量。

HSR已被证明是评估血小板输入人体后功能好坏的较好的体外检测指标之一[12]。在我们实验中，A组血小板HSR明显高于B组以及C组血小板，表明海藻糖在液态低温条件下对血小板可起到良好的保护作用，对于液态低温保存的血小板发挥体内功能提供了保证。血小板CD62p表达则是评价发生活化的血小板指标。本实验结果显示，A组血小板CD62p表达均低于B组，表明在低温条件下血小板发生活化的数目较常温保存低。A组血小板的最大聚集率低于B组，也表明保存液中的K^+、Mg^{2+}以及海藻糖能够抑制血小板的聚集，减少血小板的活化。

常温保存条件下，血浆保存组的葡萄糖含量充足，pH值在保存期间呈下降趋势，表明在高糖酵解活性和较低缓冲能力的情况下，介质的pH值通常降低，这与其他作者的报道一致[13]。

总之，使用加入海藻糖的改良血小板添加液替代血浆在低温10 ℃液态保存血小板可使血小板的功能能够得到良好的保护，同时能够减少细菌污染，降低常规保存方法中输血传播疾病的发生概率，延长了血小板的保存期限，可增大临床对血小板的需求。虽然现今使用PAS保存单采血小板的资料比较少，也还没有单采血小板在PAS中保存的标准体外质量资料，但是本实验数据显示，我们采用改良的新型血小板添加液低温液态保存单采血小板效果优于传统的血浆常温保存方法，也为应用该添加剂保存手工分浓缩血小板制剂提供了参考，相信本实验将为血小板保存技术的发展提供一定的依据。

参考文献：

[1] Lee C K, Ho P L, Lee K Y, *et al*. Estimation of bacterial risk in extending the shelf life of PLT concentrates from 5 to 7 days[J]. Transfusion, 2003, 43(8): 1047 – 1050.

[2] Tablin F, Wolkers W F, Walker N J, *et al*. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets[J]. Cryobiology, 2001, 43(2): 114 – 123.

[3] Ringwald J, Zimmermann R, Eckstein R. The new generation of platelet additive solution for storage at 22 degrees C: development and current experience[J]. Transfus Med Rev, 2006, 20(2): 158 – 164.

[4] Gulliksson H. Platelet storage media[J]. Transfus Apher Sci, 2001, 24(3): 241 – 244.

[5] Ringwald J, Walz S, Zimmermann R, *et al*. Hyperconcentrated platelets stored in additive solution: aspects on productivity and *in vitro* quality[J]. Vox Sang, 2005, 89(1): 8 – 11.

[6] Andrews R K, Berndt M C. Platelet physiology: in cold blood[J]. Curr Biol, 2003, 13(7): R282 – R284.

[7] Rivera J, Lozano M L, Corral J, *et al*. Quality assessment of platelet concentrates supplemented with second-messenger effectors[J]. Transfusion, 1999, 39(2): 135.

[8] Hoffmeister K M, Felbinger T W, Falet H, *et al*. The clearance mechanism of chilled blood platelets[J]. Cell, 2003, 112(1): 87 – 97.

[9] 周 俊，刘景汉，欧阳锡林，等. 血小板胞内海藻糖测定方法的建立和评价[J]. 中国实验血液学杂志，2004，12(6)：837 – 840.

[10] Van-der-Meer P F, Liefting L A, Pietersz R N. The effect of interruption of agitation on *in vitro* measures of platelet concentrates in additive solution[J]. Transfusion, 2007, 47(6): 955 – 959.

[11] Diedrich B, Sandgren P, Jansson B, *et al*. *In vitro* and *in vivo* effects of potassium and magnesium on storage up to 7 days of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution[J]. Vox Sang, 2008, 94(2): 96 – 102.

[12] Holme S, Moroff G, Murphy S. A multi-laboratory evaluation of *in vitro* platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion[J]. Transfusion, 1998, 38(1): 31 – 40.

[13] 成晓玲，赵树铭，傅晓岚，等. 两种保存袋对浓缩血小板在22 ℃贮存期间活化状况的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(22)：2067 – 2069.

（编辑 汪勤俭）