DOI:10.16016/j.1000-5404.202103023

血小板病毒灭活后深低温保存的可行性研究

郭梓璇[1,2],施琳颖[2],李艳辉[2],单桂秋[2] 510000 广州,广州中医药大学研究生院[1];510000 广州,南部战区总医院输血医学科[2]

[摘要] **目的** 探讨新鲜血小板经核黄素光化学法病毒灭活后进行深低温保存的可行性。**方法** 采集本院 O 型健康无偿献血者单采血小板共 24 U。实验分为 4 个组:A 为新鲜血小板对照组,B 为血小板病毒灭活组(核黄素光化学法灭活处理),C 为新鲜血小板的深低温保存组(-80 ℃保存),D 为病毒灭活血小板的深低温保存组(核黄素光化学法灭活处理后-80 ℃保存)。用 150 μmol/L 的核黄素结合 1.5 J/cm^2 的 UVB 光源对血小板进行病毒灭活。深低温保存后隔日定义为第 1 天,取样通过扫描电镜观察血小板超微结构的变化;第 1、3、5、7 天取样检测血小板数量、质量、功能与代谢相关指标。使用全自动血常规计数仪检测血小板计数(platelet count, PLT)和平均血小板体积(mean platelet volume, MPV),使用比色法观察低渗休克反应能力(hypotonic shock response, HSR)变化;使用 Annexin V-FITC 和 CD62p-PE 试剂盒和流式细胞术检测细胞凋亡和激活情况;使用血栓弹力图试验(thromboelastogram test, TEG)检测功能变化,记录最大振幅(maximum amplitude, MA)值;使用速率法检测葡萄糖、乳酸变化。综合评估血小板病毒灭活后深低温保存的可行性。**结果** 与 A 组相比较,扫描电镜中 B、C、D 组血小板伸出伪足数量增多,形状不规则,有明显激活现象;4 组 MPV 均随着保存时间的延长而增大,C、D 组明显大于 A、B 组;4 组 HSR 能力均随着保存时间的延长逐渐降低,C、D 组明显不如 A、B 组;4 组的 CD62p 和 Annexin V 阳性率中均随着储存时间的延长而增加,D 组凋亡与激活现象最明显;组间 MA 值变化没有统计学差异;A、B 组葡萄糖水平均随着储存时间的延长呈明显下降;乳酸含量与葡萄糖含量变化基本相反。综合分析,深低温保存对血小板形态和质量指标的有一定的影响,深低温保存过程对血小板形态和质量指标影响明显大于病毒灭活过程,但其功能和代谢指标变化不明显。**结论** 核黄素/UVB 光化学法病毒灭活的血小板进行深低温保存存在一定可行性。

[关键词] 血小板;病毒灭活;UVB;核黄素;光化学法;深低温保存

[中图法分类号] R331.143;R457.12 [文献标志码] A

Feasibility of cryopreservation of platelets after virus inactivation

GUO Zixuan[1,2], SHI Linying[2], LI Yanhui[2], SHAN Guiqiu[2] [1]Graduate School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong Province, 510000; [2]Department of Blood Transfusion, General Hospital of Southern Theatre Command, Guangzhou, Guangdong Province, 510000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the feasibility of deep cryopreservation of fresh platelets after riboflavin photochemical-mediated virus inactivation. **Methods** A total of 24 samples of platelets were collected from O-type healthy free blood donors in our general hospital, with each sample of 200 mL. The platelet samples were subsequently divided into 4 groups: fresh platelets control group (group A), virus inactivated control group (group B), fresh platelet cryopreservation group (group C, stored at -80 ℃) and cryopreservation of virus inactivated platelets group (group D, riboflavin photochemical-mediated virus inactivation and then stored at -80 ℃). In group B and D, the platelets were treated with riboflavin photochemistry (150 μmol/L riboflavin solution and 1.5 J/cm^2 UVB radiation). The next day after

[基金项目] 军队后勤重点科研项目(BGZ15C002),广州市科技计划项目(202102021273)

[通信作者] 单桂秋,E-mail:rabbit_2007@126.com

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

cryopreservation was defined as day 1, and the ultrastructural alterations of platelets were observed with scanning electron microscopy. The quantity, quality, functional and metabolism parameters of platelets were determined on days 1, 3, 5 and 7, respectively. Platelet count (PLT) and mean platelet volume (MPV) were measured using an automatic blood routine counter; the hypotonic shock response (HSR) of platelets was observed with colorimetry; Annexin V-FITC and CD62p-PE kits and flow cytometry were adopted to examine cell apoptosis and activation; thromboelastogram test (TEG) was conducted to detect the functional changes of platelets for the maximum amplitude (MA) value; and the changes of glucose and lactate content were also tested by rate methods. **Results** As compared with group A, the platelets in groups B, C and D were in irregular shape with more parapodia stretched out, which represented an obvious activated state. All groups showed augmented MPV with time prolonging, and the MPV ualues in groups C and D were significant greater than those of groups A and B ($P<0.01$). The HSR of each group was decreased gradually with elapse of preservation time, with groups C and D presenting more obvious reduction than groups A and B ($P<0.01$). The positive rates of CD62p and Annexin V in all groups were elevated over time, and the apoptosis and activation were most notable in group D. The MA value had no significant differences among groups. In addition, the glucose content was declined significantly during preservation, with groups A and B more obvious, while the alteration of lactate was opposite. We found that the morphology and quality of platelets were affected by cryopreservation, and the effect was significantly greater than that caused by virus inactivation. However, its effect on platelet function and metabolism was not distinct. **Conclusion** It is feasible for deep cryopreservation of platelets after riboflavin/UVB photochemical-mediated virus inactivation.

[**Key words**] platelet; virus inactivation; UVB; riboflavin; photochemical method; deep cryopreservation

Supported by the Key Project of Military Logistic Scientific Research (BGZ15C002) and the Project of Science and Technology Plan of Guangzhou City (202102021273). Corresponding author: SHAN Guiqiu, E-mail: rabbit_2007@126.com.

临床输注血小板主要用于防治血小板减少及其功能障碍引起的出血。血小板来源为异体献血者,尽管采供血机构已经按国家规定对其进行检测,但是由于筛查方法的局限性、检测“窗口期”、病原体变异、新生或未知病原体的存在等原因,输注血小板依然存在传播输血相关性疾病残余风险[1]。为了解决这一风险,国内外学者已经对血小板的病原体灭活技术(pathogen inactivation technology,PIT)进行了研究,其中核黄素/UVB 光化学法以人体必需的维生素——核黄素为光敏剂,该技术可以有效灭活大多数病原体,包括病毒、细菌和原虫等[2-4]。国外已研制了商用的 Mirasol 系统并证明了该技术的有效性和安全性,并应用于临床[5]。然而,国内尚未有成熟应用相关报道。

目前临床输注的血小板常规储存在 20~24 ℃的振荡器中,保存期为 5 d[6]。有研究报道将血小板储存在 4 ℃可以延长其保存期限至 7 d 以上[7],在 -80 ℃可保存两年,但血小板在深低温保存之前需加入浓度为 5%~6%的二甲基亚砜(DMSO)作为冷冻保护剂[8],由于 DMSO 有一定的毒性、血小板质量部分下降而不作为临床常规使用。有研究报道,深低温保存的血小板仍保持较好的止血功能,在临床危重症创伤手术救治中有现实止血价值,也没有引起与输血有关的严重不良事件[9]。目前,核黄素光化学法灭活后的血小板与常规血小板储存方式相同,因此也存在保存时间短的难题。国外已有研究报道对补骨脂素/UVA 和 UVC 两种灭活技术病毒灭活后的血小板进行冷藏或深低温保存[10-13]。基于此,本研究进行了核黄素/UVB 灭活后的血小板深低温保存的可行性研究,以期提高血小板安全性同时,延长灭活后血小板的保存期,确保足够的库存来解决临床大量急需血小板情况,同时为延长核黄素/UVB 病毒灭活的血小板保存期提供新方法和实验依据。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PBS 缓冲液(美国 Hyclone),核黄素溶液(美国 MCE),Annexin V-FITC(美国 BioLegend),CD61 APC,CD62p-PE(均购买自美国 Biosciences)。

1.2 主要仪器

UVB 灭活装置(本实验室与广州朗普合作公司共同研制),一次性使用紫外线透疗专用血液容器(万泰,河北),全自动血细胞分析仪(BC-3000,深圳迈瑞

公司),扫描电镜(S-3000N,日本 Hitachi),全自动生化分析仪(COBAS 8000,瑞士罗氏),血栓弹力图检测仪(TEG5000,美国 Haemoscope),725 型紫外可见分光光度计(上海菁华),流式细胞仪(X-20,美国 BD)

1.3 血小板来源

来自南部战区血液中心采集的 O 型健康无偿献血者共 24 份。所有血液成分均按我国献血者血液检测标准检测合格。标本采集前一周,献血者禁服用阿司匹林等影响血小板功能的药物。

1.4 分组

本研究设计共分为 4 组: A 为新鲜血小板对照组, B 为病毒灭活血小板对照组, C 为新鲜血小板的深低温保存对照组, D 为核黄素/UVB 病毒灭活的血小板的深低温保存实验组。

1.5 血小板添加液的制备

参照其他文献进行血小板添加液(platelet additional solution,PAS)配制[14]。将保存液经 0.22 μm 的细菌滤器过滤分装,4 ℃保存备用。

1.6 血小板重悬液的制备

将收集的血小板进行 2 880×*g* 离心 15 min,获得上清为贫血小板血浆(PPP),用上述的 PAS∶PPP 按 65∶35 的比例重悬血小板,即为血小板重悬液,将血小板浓度调整为 1 000×10^9/L。

1.7 核黄素/UVB 法血小板病毒灭活

根据前期实验研究摸索,选择核黄素终浓度为 150 μmol/L、辐照剂量为 1.5 J/cm^2 的 UVB 紫外线对血小板进行灭活处理。将血小板转移至一次性透疗血液容器中,加入终浓度为 150 μmol/L 的核黄素磷酸钠,转移至紫外线透疗专用血液容器内,液层厚度约为 3 mm,在室温中避光放置 10 min 后放置至 UVB 灭活装置中进行灭活处理。

1.8 深低温保存血小板

在血小板悬液加入终浓度为 5%的 DMSO 作为冰冻保护剂。将血小板袋置于振荡器上,将抽取有 DMSO 的空针安装在注射泵上,连接好延长管,使用微量注射泵调节 DMSO 的加入速度为 60 mL/h,边匀速振荡边加入保护剂。结束后迅速将样品置于-80 ℃中保存。

1.9 血小板体外质量和功能检测

扫描电镜下观察血小板超微结构的变化;血小板计数(platelet count,PLT)观察血小板数量变化;平均血小板体积(mean platelet volume,MPV)、低渗休克反应(hypotonic shock reaction, HSR)和血小板表型即血小板激活标志 CD62p、凋亡标志 Annexin V 观察血小板的功能变化;血栓弹力图试验观察血小板止血功能变化;葡萄糖、乳酸含量和 pH 值观察血小板能量代谢的变化。将深低温保存后的隔日定义为第 1 天。第 1 天取样血小板超微结构的变化,第 1、3、5、7 天取样检测血小板数量、质量、功能与能量代谢其他相关指标。深低温保存的血小板在检测前需置于 37 ℃中复温 20 min。检测方法均按说明书进行。

1.9.1 超微结构观察

取 1 mL 血小板悬液于 EP 管中,加入 0.2%的戊二醛溶液进行预固定,2 880×*g* 离心 15 min。弃去上清,加入 3%的戊二醛溶液固定至少 4 h,送至中国科学院微生物所进行扫描电镜处理观察。

1.9.2 质量指标检测

PLT 和 MPV 用全自动血常规计数仪检测; HSR 参照其他文献方法[15],通过紫外分光光度计进行检测,检测前用同型贫血小板血浆(PPP)调整计数为 250×10^9/L;血小板表面激活标志 CD62p 和凋亡标志 Annexin V 阳性率用流式细胞仪进行免疫荧光检测,检测前用 200 μL PBS 调整计数为 10×10^9/L。

1.9.3 功能指标检测

采用血栓弹力图分析仪进行检测,检测前用同型 PPP 调整计数为 200×10^9/L。

1.9.4 能量代谢指标检测

将血小板进行 2 880×*g* 离心 15 min 分离得到上清液,采用自动生化分析仪进行速率法检测葡萄糖、乳酸;pH 计检测 pH 值

1.10 统计学分析

所有实验数据均使用 SPSS23.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行分析与绘图。组间采用单因素方差分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板超微结构的变化

如图 1 所示:A 组血小板形状规则,表面光滑,较少伸出伪足,此时血小板多呈静息状态; B、C、D 组血小板粗糙,伸出伪足的数量明显增多、增粗,处于较为明显的被激活状态。

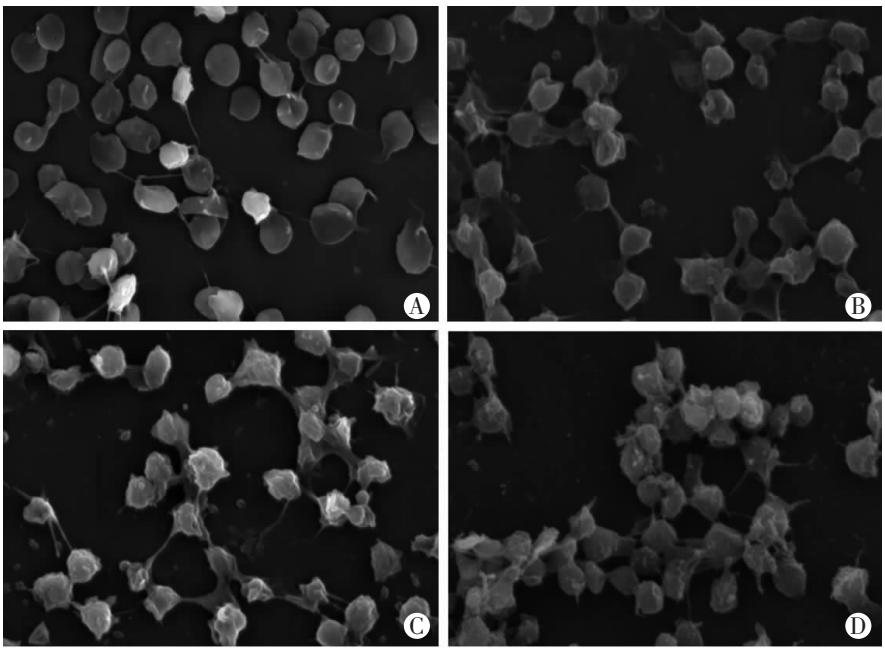
2.2 血小板质量的变化

2.2.1 PLT 和 MPV

A、B 组随着保存时间的延长 PLT 呈现依次下降,C、D 组比 A、B 组稍高。第 7 天时,D 组比 B 组 PLT 显著增加($P<0.05$)。如表 1 所示。A、B 和 C、D 组 MPV 均随着保存时间的延长而增大,C、D 明显大于 A、B 组。C 组与 A 组,D 组与 B 组比较,MPV 的增加都具有统计学差异($P<0.01$),C、D 两组 MPV 无统计学差异(表 1)。

2.2.2 HSR 的变化

各组 HSR 均随着保存时间的延长逐渐降低, C 组与 A 组,D 组与 B 组比较,HSR 的下降都具有统计学差异。C、D 两组 HSR 的差异也具有统计学意义(图 2)。



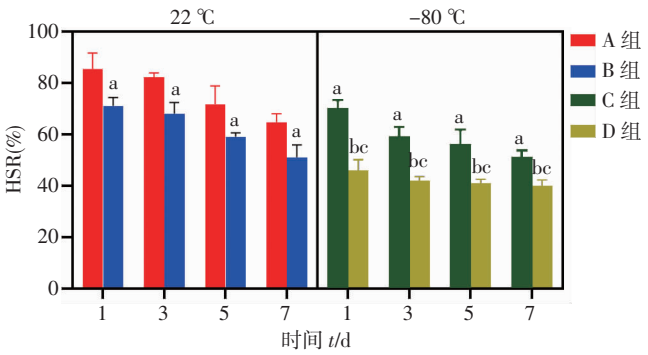
A:新鲜血小板对照组;B:病毒灭活血小板对照组;C:新鲜血小板的深低温保存对照组;D:核黄素/UVB 病毒灭活的血小板的深低温保存实验组

图 1　各组血小板扫描电镜下的超微结构　(×5 000)

表 1　各组 PLT 和 MPV 检测结果($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	PLT/×10^9/L				MPV/fL			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
A 组	1 030.82±1.10	974.33±64.20	970.00±105.39	866.60±79.01^{a}	6.42±0.52	6.55±0.26^{bc}	6.67±0.52^{bc}	6.80±0.22^{bc}
B 组	1 031.00±48.01	930.80±96.35	910.20±95.61	808.20±59.25^{a}	6.47±0.58	6.83±0.15^{bc}	7.57±0.12^{bc}	7.60±0.82^{bc}
C 组	1 037.66±44.46	1 000.33±53.12	1014.00±81.31	982.00±49.00	6.77±0.40	7.03±0.76	7.70±0.14	7.70±0.82
D 组	1 033.67±31.90	1 001.33±23.02	997.33±42.50	975.00±62.00	7.03±0.47	7.44±0.68	8.17±0.12	8.67±1.02

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 D 组比较; c:$P<0.01$,与 C 组比较



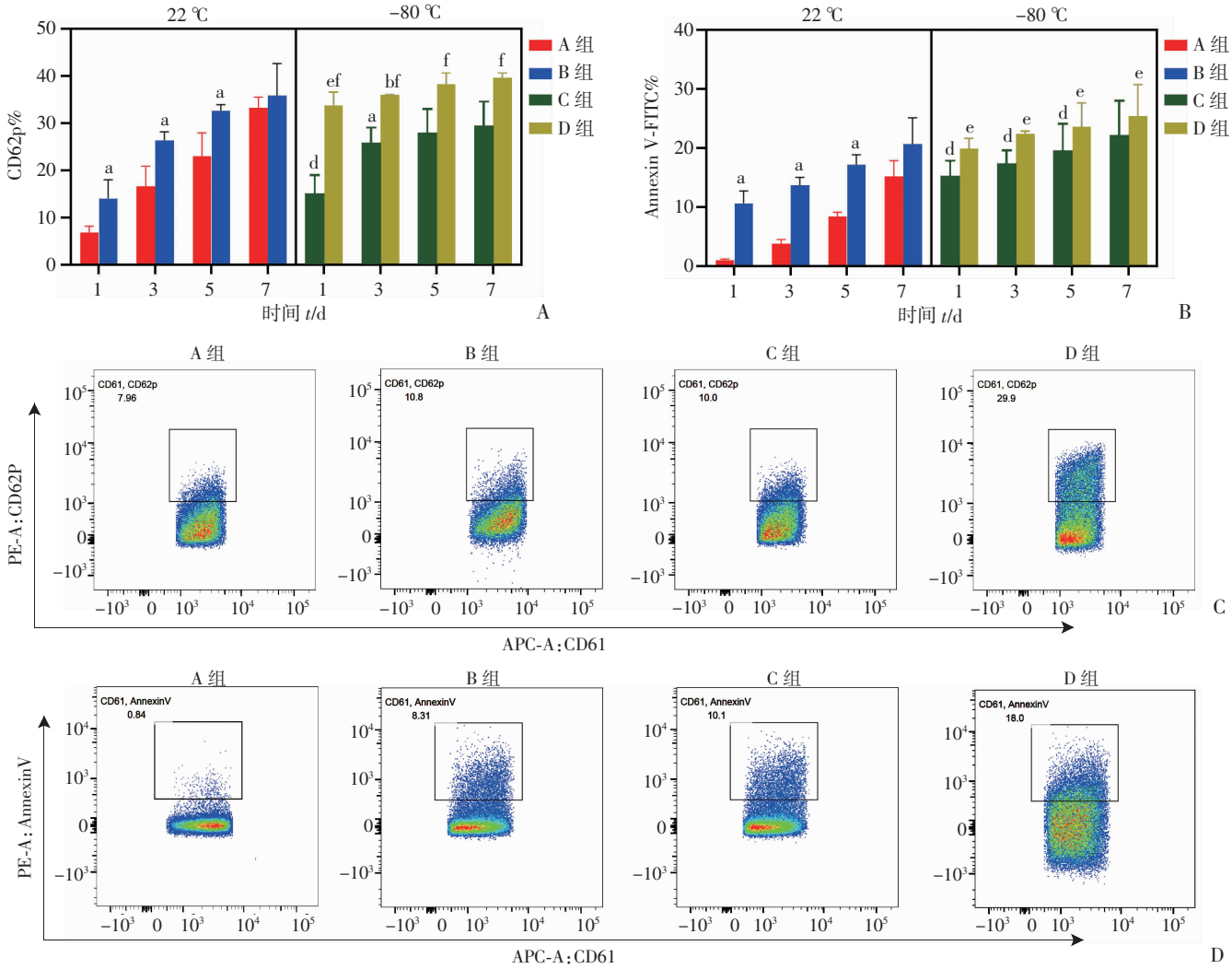
a:$P<0.01$,与 A 组比较;b:$P<0.01$,与 B 组比较;c:$P<0.01$,与 C 组比较

图 2　血小板低渗休克反应的能力　($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.2.3　血小板表面 CD62p 和 Annexin V 的表达　A、B 和 C、D 组 CD62p 和 Annexin V 阳性率均随着储存时间的延长,表明血小板的激活率和凋亡率均呈现上升的趋势。B 组与 A 组、C 组与 A 组、D 组与 B 组之间 CD62p 和 Annexin V 的表达率有统计学差异,C、D 两组 CD62p 的阳性率也有显著差异,但 Annexin V 没有统计学差异(图 3)。

2.2.4　血小板功能的变化　血栓弹力图检测指标中,最大振幅(maximum amplitude, MA)值呈现轻微的下降趋势,A、B 组相对明显,但各组间变化没有统计学差异(图 4)。

2.2.5　血小板能量代谢指标的变化　各组葡萄糖水平均随着储存时间的延长呈现下降趋势,乳酸含量堆积;与 A 组相比,B 组葡萄糖含量显著降低,乳酸含量显著增加,pH 值显著下降;C、D 两组葡萄糖含量有统计学差异;B、D 两组葡萄糖、乳酸、pH 值差异具有统计学意义(图 5)。



A:各检测时间点各组血小板 CD62p 的阳性表达率;B:检测时间点各组血小板 Annexin V 的阳性表达率($n=6$, $\bar{x}\pm s$);a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组比较;d:$P<0.01$,与 A 组比较;e:$P<0.01$,与 B 组比较;f:$P<0.01$,与 C 组比较;C:各组血小板第一天 Annexin V 的流式图;D:各组血小板第一天 CD62p 的流式图

图 3 流式细胞仪分析血小板膜标记物水平的变化 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

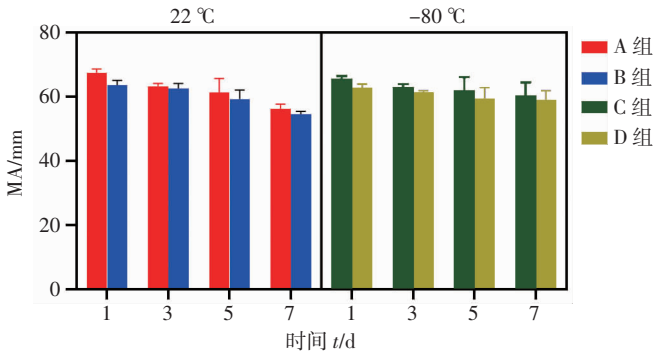
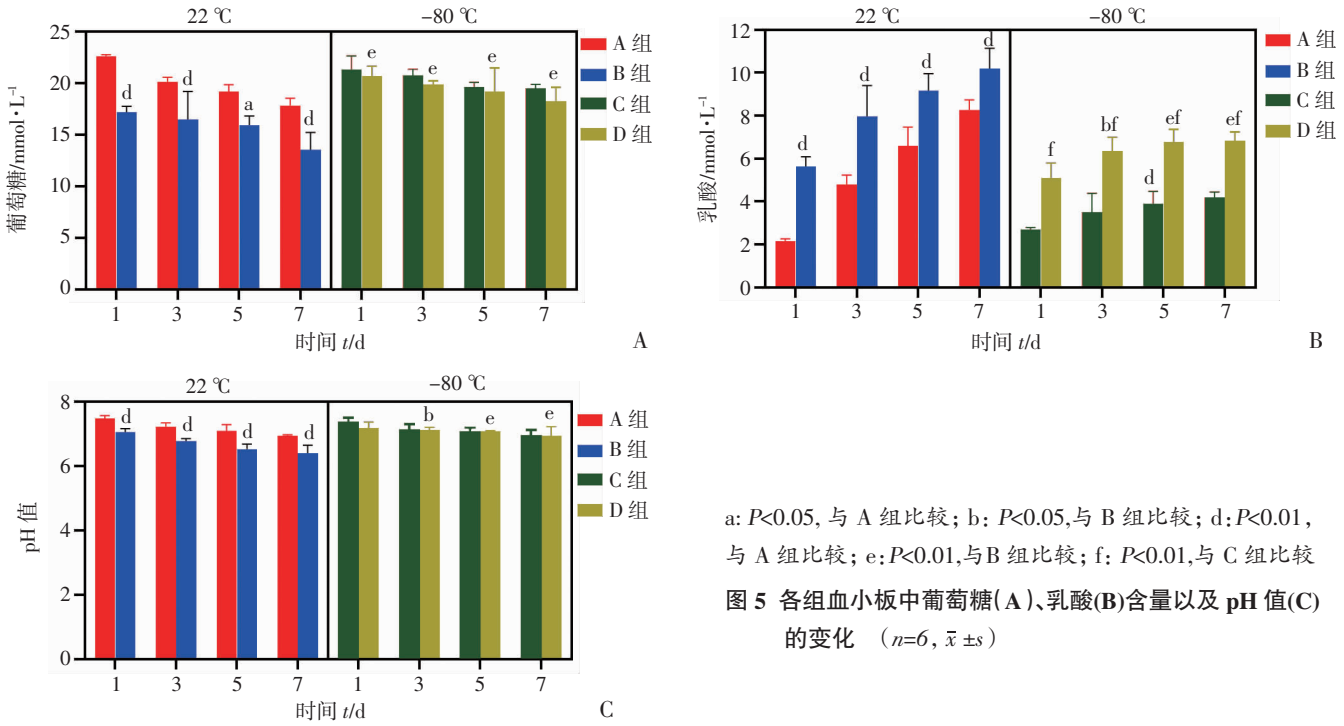


图 4 血小板 TEG 参数的变化 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$, 与 A 组比较; b: $P<0.05$,与 B 组比较; d: $P<0.01$, 与 A 组比较; e: $P<0.01$,与B 组比较; f: $P<0.01$,与 C 组比较

图 5 各组血小板中葡萄糖(A)、乳酸(B)含量以及 pH 值(C)的变化 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

血小板病原体灭活技术主要包括补骨脂素/长波紫外线(UVA)、核黄素/UVA-中波紫外线(UVB)和短波紫外线(UVC),其中补骨脂素及其辐照后产物为有毒物质,灭活病毒后需将其去除[16];UVC 技术不需要光敏剂,但其对血小板损伤较大,本实验室前期也对 UVC 灭活技术进行了研究,发现其对血小板有损伤作用[17-18]; 核黄素/UVA-UVB 通过光敏剂核醇结构结合病原体 DNA/RNA 链,紫外光 UVA/UVB 辐照下发生氧化还原反应,形成共价键,诱导核酸链断裂,阻止病原体的复制[19]。该技术对血小板病毒灭活效果显著,光敏剂及其辐照产物为无毒物质[2]。

B、C、D 组的血小板伪足增多、增粗,结构不规则。病毒灭活和深低温保存过程对血小板的刺激可能是导致其活化的主要原因深低温保存过程比核黄素/UVB 辐照灭活过程对血小板的激活作用更大。

MPV 是血小板活化的形态学指标[20],随着储存时间的延长,血小板 MPV 有增大的趋势,C、D 两组血小板 MPV 的增大趋势相似。深低温保存对血小板的激活增加,与扫描电镜下观察的结果一致,可能是通过破坏血小板膜,影响其通透性,进而导致血小板发生肿胀[21]。

HSR 是检测血小板在低渗环境中发生肿胀而后又可恢复其原有形状的能力。随着储存时间的延长,各组 HSR 逐渐下降,核黄素/UVB 灭活和深低温保存均可降低血小板的低渗休克反应能力。先前的研究报道,深低温保存可引起血小板形态改变,从而导致 MPV 升高和 HSR 降低,该理论报道与本实验上述结果一致[21]。尽管深低温保存对核黄素/UVB 处理血小板的 HSR 能力有一定的损伤作用,但是其 HSR 值均>40%,考虑到接受冰冻血小板输注的患者主要是是进行大出血手术的患者,这种负面影响可不作为决定因素。

细胞凋亡早期磷脂酰丝氨酸 PS 发生外翻,Annexin V 与外显化的 PS 结合可作为早期凋亡的标志[22]。核黄素/UVB 病毒灭活和深低温保存均可造成血小板凋亡数量增加, C、D 两组血小板的凋亡数量没有统计学差异。P-选择素(CD62p)是一种跨膜蛋白,储存在 α 颗粒中,当血小板被激活时,CD62p 的释放和表达显著增强[23],可作为血小板的活化标志。流式实验结果表明,核黄素/UVB 病毒灭活和深低温保存均可导致血小板活化显著增加,深低温保存可以引起病毒灭活后血小板的激活增加,这结果也支持了 D 组 MPV 增加现象。

尽管血小板的质量在深低温保存后有一定的变化,但是 C、D 两组参数变化相似。与 A 组比较,C 组的质量发生一定的改变,但仍然可以发挥其止血功能,在临床上得以应用。血栓弹力图试验是全血中的即时止血测试,可以实时监控整体血块的形成和溶解,是临床上评价输注血小板是否有效的重要功能指标。虽然

在临床上的血液类型并非血小板,但是先前的研究表明在实验中,血小板悬液也可以作为其样本类型[24]。在本研究中,我们发现各组之间 MA 值相似,表明了深低温保存仍然保持核黄素/UVB 灭活的血小板的收缩凝血功能。

血小板是活细胞,需要充足的能量供应可以确保血小板在体外储存过程中的生存,供能物质主要时葡萄糖[25],温度因素可影响能量代谢,22℃时血小板糖酵解速率较快,-80 ℃血小板处于“休眠状态”,糖酵解速率较慢。先前已有研究表明,紫外线辐照可以加速血小板的糖酵解速率,导致葡萄糖消耗的增加以及乳酸的堆积,进而导致 pH 的降低[26],本实验结果与上述描述一致。对病毒灭活后的血小板进行冰冻保存后,实验发现其葡萄糖含量显著增加,乳酸水平下降。JOHNSON 等[13]对 UVC 处理血小板深低温保存也报道了类似的现象,认为深低温保存可以防止病毒灭活后血小板的无氧呼吸,减缓葡萄糖的消耗,改善乳酸堆积的情况。

随着时间的延长,血小板的质量和功能有一定的损伤作用。深低温保存不影响核黄素/UVB 病毒灭活血小板的止血功能。此外,深低温保存还可以降低病毒灭活血小板的糖酵解速率,保证足够的葡萄糖含量。由于临床上深低温保存血小板的应用的有效性已被证实,核黄素/UVB 病毒灭活后血小板深低温保存的主要评价指标与新鲜血小板深低温保存后变化相似。实验结果发现,深低温保存对病毒灭活血小板凋亡和激活有一定的影响,但是由于国内对血小板质量标准评价不涉及到凋亡和激活实验,因此无法进行比较。另外,国内外现有的补骨脂素/UVA 或 UVC 病毒灭活后深低温保存的研究也表明其对血小板有一定的损伤作用,但结果证明其依旧具有促进凝血的效果[10-13],这与我们的实验结果相似。本实验初步探索了核黄素/UVB 灭活后血小板深低温保存的可行性,为进一步的临床实验研究提供一定的参考依据。

参考文献:

[1] WEAVER SC, LECUIT M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease[J]. N Engl J Med. 2015, 372(13): 1231-1239. DOI: 10.1056/NEJMra1406035.

[2] FEYS H B, VAN AELST B, COMPERNOLLE V. Biomolecular consequences of platelet pathogen inactivation methods [J]. Transfus Med Rev, 2019, 33(1): 29-34. DOI: 10.1016/j.tmrv.2018.06.002.

[3] CARDO L J, RENTAS F J, KETCHUM L, *et al*. Pathogen inactivation of Leishmania donovani infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light[J]. Vox Sang, 2006, 90(2): 85-91. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2005.00736.x.

[4] KEIL S D, BENGRINE A, BOWEN R, *et al*. Inactivation of viruses in platelet and plasma products using a riboflavin-and-UV-based photochemicaltreatment[J]. Transfusion, 2015, 55(7): 1736-1744. DOI: 10.1111/trf.13030.

[5] REBULLA P, VAGLIO S, BECCARIA F, *et al*. Clinical effectiveness of platelets in additive solution treated with two commercial pathogen-reduction technologies[J]. Transfusion, 2017, 57(5): 1171-1183. DOI: 10.1111/trf.14042.

[6] BRECHER ME, BLAJCHMAN MA, YOMTOVIAN R, *et al*. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the United States: a history to help illuminate the future[J]. Transfusion. 2013; 53(1): 221-231. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03708.x.

[7] BRAATHEN H, SIVERTSEN J, LUNDE THF, *et al*. In vitro quality and platelet function of cold and delayed cold storage of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution for 21 days[J]. Transfusion. 2019; 59(8): 2652-2661. DOI: 10.1111/trf.15356.

[8] VALERI C R, RAGNO G, KHURI S. Freezing human platelets with 6 percent dimethylsulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and storage at-80 degrees C without postthaw processing[J]. Transfusion, 2005, 45(12): 1890-1898. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00647.x.

[9] SLICHTER S J, DUMONT L J, CANCELAS J A, *et al*. Safety and efficacy of cryopreserved platelets in bleeding patients with thrombocytopenia[J]. Transfusion, 2018, 58(9): 2129-2138. DOI: 10.1111/trf.14780.

[10] SIX K R, DEVLOO R, COMPERNOLLE V, *et al*. Impact of cold storage on platelets treated with intercept pathogen inactivation[J]. Transfusion, 2019, 59(8): 2662-2671. DOI: 10.1111/trf.15398.

[11] MEINKE S, WIKMAN A, GRYFELT G, *et al*. Cryopreservation of buffy coat-derived platelet concentratesphotochemically treated with amotosalen and UVA light[J]. Transfusion, 2018, 58(11): 2657-2668. DOI: 10.1111/trf.14905.

[12] WATERS L, PADULA M P, MARKS D C, *et al*. Cryopreservation of UVC pathogen-inactivated platelets[J]. Transfusion, 2019, 59(6): 2093-2102. DOI: 10.1111/trf.15204.

[13] JOHNSON L, CAMERON M, WATERS L, *et al*. The impact of refrigerated storage of UVC pathogen inactivated platelet concentrates on in vitro platelet quality parameters [J]. Vox Sang, 2019, 114(1): 47-56. DOI: 10.1111/vox.12730.

[14] JOHNSON L, WINTER K M, HARTKOPF-THEIS T, *et al*. Evaluation of the automated collection and extended storage of apheresis platelets in additive solution[J]. Transfusion, 2012,52(3): 503-509. DOI: 10.1016/0006-291x(75)90482-9.

[15] 黄成垠, 肖建宇, 蒋妮真, 等. 2种血小板低渗休克反应测定方法的比较研究[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(7): 514-516.
HUANG C Y, XIAO J Y, JIANG N Z, *et al*. Comparative study of two methods for measuring platelet hypotonic shock response[J]. Chin J Blood Transfus, 2008, 21(7): 514-516.

[16] IRSCH J, LIN L. Pathogen inactivation of platelet and plasma blood components for transfusion using the INTERCEPT blood system™ [J]. Transfus Med Hemother, 2011, 38(1): 19-31. DOI: 10.1159/000323937.

[17] 张爽, 单桂秋, 马静, 等. 短波紫外线灭活血小板中病毒的实验研究[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(6): 564-567.
ZHANG S, SHAN G Q, MA J, *et al*. An experimental study on the virus inactivation in platelet suspension by using short-waveultraviolet[J]. Chin J Blood Transfus, 2016, 29(6): 564-567.

[18] 吴红宜, 单桂秋, 施琳颖, 等. 短波紫外线病毒灭活技术对血小板体外功能影响的实验研究[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(2): 127-132.
WU H Y, SHAN G Q, SHI L Y, *et al*. An experimental study on the function of platelets *in vitro* after treatment with ultraviolet C light virus inactivation technology[J]. Chin J Blood Transfus, 2018, 31(2): 127-132.

[19] CORBIN F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer[J]. Int J Hematol, 2002, 76 Suppl 2: 253-257. DOI: 10.1007/BF03165125.

[20] HAN X, XU P, DUAN X, *et al*. High mean platelet volume-to-platelet count ratio as a diagnostic maker for increased risk of liver function damage in pediatric patients with infectious mononucleosis in China[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(6): 4523-4527. DOI: 10.3892/etm.2019.8104.

[21] JOHNSON L, TAN S, WOOD B, *et al*. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions[J]. Transfusion, 2016, 56(7): 1807-1818. DOI: 10.1111/trf.13630.

[22] SARANG Z, SÁGHY T, BUDAI Z, *et al*. Retinol saturase knock-out mice are characterized by impaired clearance of apoptotic cells and develop mild autoimmunity[J]. Biomolecules. 2019, 9(11): 737. DOI: 10.3390/biom9110737.

[23] ARTHUR J F, SHEN Y, CHEN Y, *et al*. Exacerbation of glycoprotein VI-dependent platelet responses in a rhesus monkey model of type 1 diabetes [J]. J Diabetes Res, 2013, 2013: 370212. DOI: 10.1155/2013/370212.

[24] WHITING D, DINARDO J A. TEG and ROTEM: technology and clinical applications[J]. Am J Hematol. 2014, 89(2): 228-232. DOI: 10.1002/ajh.23599.

[25] JOHNSON L, SCHUBERT P, TAN S, *et al*. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution[J]. Transfusion, 2016, 56(2): 360-368. DOI: 10.1111/trf.13345.

[26] MASTROIANNI M A, LLOHN A H, AKKÖK Ç A, *et al*. Effect of Mirasol pathogen reduction technology system on *in vitro* quality of MCS + apheresis platelets [J]. Transfus Apher Sci, 2013, 49(2): 285-290. DOI: 10.1016/j.transci.2013.06.009.

(**收稿**:2021-03-03;**修回**:2021-04-26)

(编辑 邓强庭)