DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.026
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0525-03

论著

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

赵树铭,成晓玲,李书武,刁荣华,刘 璐,张 红,陈寒梅,陈 敏 (第三军医大学附属西南医院输血科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨常规和冰冻保存条件下对血小板功能的影响。方法 10单位机采血小板分别用常规保存袋和低温保存袋贮存,前者贮存5 d,每天留取标本,后者于-85℃贮存后5 d复苏留样。分别检测血小板聚集率、血小板计数、pH值和血小板膜糖蛋白P-选择素的变化。结果 常规保存条件下,5 d内血小板聚集率、pH、血小板计数均无显著性变化,血小板P-选择素在1 d后即明显升高(从3.77±1.86到10.87±4.75,达3倍,$P<0.01$)。冰冻保存时,血小板聚集率、pH、血小板计数无显著性变化,P-选择素的表达在冰冻后呈显著升高(从4.37±1.82到16.88±7.23,达4倍,$P<0.01$)。结论 血小板P-选择素在常规和冰冻保存条件下的表达变化提示血小板离体后被活化,是反应血小板激活的敏感指标。

关键词:P-选择素;机采血小板;常规保存;冰冻保存
中图法分类号:R318.52;R331.143;R457.12 文献标识码:A

Expression of P-selectin on routinely stored or cryopreserved platelets obtained by single donator apheresis

ZHAO Shu-ming, CHENG Xiao-ling, LI Shu-wu, DIAO Rong-hua, LIU Lu, ZHANG Hong, CHEN Han-mei, CHEN Min
(Department of Transfusion, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the influence of routine storage or cryopreservation on platelet function. Methods Ten units of platelets were collected by single donator apheresis. Each one was divided into 2 equal parts which were preserved with routine storage and cryopreservation respectively. The samples of platelet were respectively collected on each day during the 5 days' routine storage and before and after 5 days of cryopreservation. The platelet aggregative rate, platelet count and pH value were detected with routine methods. The expression of P-selectin on the platelet samples was measured by flow cytometry. Results In routine storage group, the platelet aggregative rate, platelet count and pH value had no change in the 5 days, and the expression of P-selectin increased significantly from 3.77±1.86 to 10.87±4.75 ($P<0.01$) on the first day of storage and remained higher levels thereafter. In the cryopreservation group, no change was found in the parameters mentioned above, and the expression of P-selectin was found to increase significantly from 4.37±1.82 to 16.88±7.23 ($P<0.01$) after cryopreservation. Conclusion The expression of P-selectin on platelets is found to increase after collection under either the routine storage or cryopreservation, and thus it can be regarded as a sensitive marker for platelet activation.

Key words: P-selectin; plateletpheresis; routine preservation; cryopreservation

血小板是临床上输血治疗的重要部分,对各种原因引起的血小板减少具有药物不可替代的治疗作用。一般情况下,血小板可在22℃振荡条件下常规保存5 d。近年来,对低温保存血小板的研究取得了成功,即对血小板于-85℃条件下保存,可根据需要长期大量库存,为临床使用提供了方便[1~4]。为了探讨常规保存方式和低温保存方式对血小板激活的影响,我们将同一份机采血小板分成同等量两份后以两种保存方式对血小板功能等进行研究,观察了血小板计数、血小板pH值、血小板聚集率和血小板P-选择素等指标的变化。

1 材料与方法

1.1 仪器

血细胞分离仪(CS3000 plus,Baxter公司,美国),F-820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),OMNI血气分析仪(Modular System,美国),FACSalibur流式细胞仪(BD公司,美国),XHZ-1型血小板恒温振荡保存箱(华通公司,苏州)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000085)
作者简介:赵树铭(1965-),男,四川省西充县人,博士,副教授,从事临床输血学方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68752689
收稿日期:2002-09-03;修回日期:2002-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 试剂

血小板常温保存袋(CS3000, Baxter公司, 美国), 凝血酶(终浓度2 nmol/L, Sigma), CD41 FITC、CD62-P PE、Mouse IgG/ PE(Caltag Laboratories), ACD-2抗凝剂(上海血液中心), 血小板洗涤剂(Na_2EDTA+PBS)、0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、1%多聚甲醛(Paraformaldehyde)固定液(以上试剂均为分析纯)。

1.3 方法

1.3.1 样品的采集与分组 10位健康自愿献血者, 按操作规程用血细胞分离机(CS3000plus)采集浓缩血小板悬液, 每单位血小板含量为(2.5~3.0)×10^{11}。将每一单位血小板分装成两袋, 分别用血小板常规保存袋(Baxter公司)和低温保存袋(Baxter公司); 前者置22℃血小板保存箱, 水平振摇, 保存5 d, 分别在0(采血的当天)、1、2、3、4、5 d留取样品; 后者用一次性10 ml注射器和24 G头皮针缓慢(> 5 min)加入超滤DMSO, 终浓度为5%。在加入DMSO过程中, 要充分混匀, 避免局部产热, 封装后立即放入-85℃冰箱保存, 分别于保存前和保存后5 d复苏后留取样品。

1.3.2 血小板聚集功能的检测 致聚剂为凝血酶, 终浓度为2 nmol/ml。取塑料试管2只, 分别标明PPP(贫血小板血浆)和PRP(富血小板血浆)。血小板原液2 ml, 3 000 r/min离心10 min, 吸出上清液转移至PPP管; 另取血小板原液0.5 ml于PRP管, 加入1 ml PPP混匀, 使血小板计数约为300×10^9/L。用PPP调零点。将PRP加入测试杯, 加磁力搅拌珠, 加凝血酶, 用血液凝集仪测定, 记录5 min血小板聚集曲线和血小板最大聚集率。

1.3.3 血小板P-选择素的检测[5] 将血小板最终检测浓度调整为10^6个血小板/ml。①将7 μl血小板原液加入993 μl血小板洗涤剂, 稀释成1 ml。②每一标本准备3管, 分别编为A、B、C管, 每管中加入上述液体100 μl。③分别加入: A管: Mouse IgG-1 PE; B管: CD41-FITC+IgG-1 PE; C管: CD41-FITC+CD62P-PE。④避光孵育15 min后, 加入1 ml 1%冷多聚甲醛(4℃), 2~8℃避光保存30 min, 上流式细胞仪检测。

1.3.4 血小板pH的测定 血气分析仪测定血小板悬液pH。

1.3.5 血小板计数 全自动血细胞计数仪测定血小板计数。

1.4 统计学处理

采用SPMR统计程序包进行单因素及双因素方差分析。

2 结果

2.1 血小板聚集率的变化

在常温保存条件下随保存期延长逐渐降低, 但无统计学差异。冰冻保存条件下, 以凝血酶作为致聚剂时引起冰冻后血小板聚集变化不明显(P> 0.05), 见表1, 2。

表1 机采血小板在常规保存条件下血小板功能的变化(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of platelet function under the routine storage and cryopreserved conditions (n=10, $\bar{x}\pm s$)

	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
Percentages of platelet aggregation (%)	43.88±18.11	49.93±17.67	43.75±10.33	31.44±10.13	31.95±13.54	28.54±11.49
Platelet count (×10^{11}/bag)	1093.6±139.1	1046.1±265.4	1071.6±343.2	1173.6±312.8	1107.9±183.7	997.2±71.3
pH	7.028±0.077	7.386±0.080	7.262±0.064	7.126±0.097	6.753±0.207	6.642±0.212

表2 机采血小板在冰冻保存条件下血小板功能的变化(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of platelet function under cryopreserved conditions (n=10, $\bar{x}\pm s$)

	Before cryopreservation	5 days after cryopreservation
Percentages of platelet aggregation (%)	56±8.5	48±9.3
Platelet count (×10^{11}/bag)	1123±158.1	1068±165.4
pH	7.125±0.073	7.118±0.096

2.2 血小板保存过程中pH值的变化

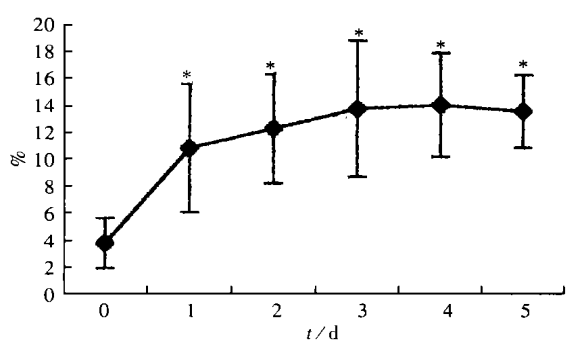
在常温保存条件下, 血小板pH随保存期延长逐渐降低, 但变化不显著; 在冰冻保存条件下, 血小板pH则无变化, 见表1, 2。

2.3 血小板保存过程中血小板计数值的变化

在常规保存条件下, 5 d内血小板计数, 变化不显著; 在冰冻保存条件下, 冰冻前后血小板计数, 无明显差异, 见表1, 2。

2.4 血小板膜蛋白P-选择素的表达

在常规保存状况下, 保存1 d后的血小板CD62-P的表达增加非常显著(P< 0.01); 至保存5 d, 血小板CD62-P的表达均呈增加(P< 0.01)。在保存1~5 d范围内, 血小板P-选择素的表达则无显著性差异, 见图1。冰冻保存条件下, 冰冻后血小板P-选择素的表达也呈明显增加(从4.37±1.82到16.88±7.23, 达4倍, P< 0.01), 见图2。

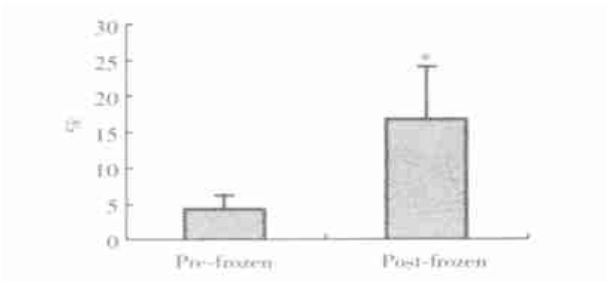


*: P< 0.01 vs 0 d

图1 常规保存条件血小板P-选择素的表达

Fig 1 Expression of P-selectin under the routine storage

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



*: $P<0.01$ *vs* former group

图 2　冰冻保存血小板 P-选择素表达

Fig 2　Expression of P-selectin under cryopreservation

3　讨论

血小板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均有明显的治疗作用。但由于血小板只能在(22±2)℃下振荡保存 5 d, 且易造成细菌污染, 对临床使用带来了不便。常规保存条件下, 因血小板极其脆弱, 离体后很容易发生变形和破坏, 影响体内存活期, 其中影响血小板保存的重要因素有温度和 pH, 温度降低可引起血小板不可逆的形态和功能损伤, 输入体内后容易聚集和破坏; 保存血小板的最适 pH 是 6.5~7.2, 由于保存过程中产生乳酸可使 pH 值发生变化, 如超过正常, 可引起血小板功能下降, 回收率降低。血小板聚集率则是反应血小板聚集功能的一项指标[5,6]。P-选择素是反应血小板激活状态的一项敏感指标[1~4]。

选择素(Selectin)是血管粘附分子家族中的一大成员, 根据表达部位可分为三类: E-Selectin (CD62E), 表达于活化的内皮细胞表面, L-Selectin (CD62L), 表达于白细胞表面, P-Selectin (CD62P), 表达于活化的血小板和酸性粒细胞表面。血小板是一种无核的细胞, 以一种静止状态循环于血液中, 当血小板被激活后, 可发生迅速的形态和生化变化, 细胞的形态从圆盘状变成球状, 并有伪足伸出和颗粒分泌。血小板 P-选择素贮存在血小板的 α 颗粒中, 正常情况下血小板表面无 P-选择素表达或呈持续低表达状态, 当细胞受到刺激后活化分泌到表面。研究表明, P-选择素被认为是反应血小板活化的敏感标志之一, 可通过流式细胞技术来进行检测[4~7]。据报道, 手工制备血小板的 P-选择素表达随保存时间延长逐渐增高, 从第 1 天的约 18%到第 5 天的约 40%, 升高达 2 倍[6], 提示血小板在离体后即可明显活化。我们的实验结果表明, 机采血小板在常规保存状况下, 保存 1 d 后的血小板 P-选择素表达即明显增加, 至保存 5 d 内, 均呈明显增加(约 3~5 倍), 提示血小板离体后处于一种被激活状态; 但在保存的 1~5 d, 血小板 P-选择素无显著性差异, 说明该保存时间和温度等对血小板的再激活作用不明显。冰冻保存条件下, 血小板 P-选择素的表达也呈明显增加(约 4 倍), 提示降温、复融等操作对血小板的损伤较大, 也具有激活作用。冰冻保存的血小板与常规保存 5 d 内的血小板 P-选择素表达无明显差异, 提示这两种保存方式对血小板的损伤都具有影响。但是, 体外血小板 P-选择素的变化并不能完全预测输注后体内血小板的功能恢复情况, 因为采用先进的三色流式细胞术观察到输注后在体内的循环 P-选择素阳性血小板(脱颗粒状态)可很快游离出血小板膜表面的 P-选择素, 并参与循环和发挥功能[8]。

本研究还对血小板的常规评价指标如血小板计数、pH 值及血小板聚集率进行了研究, 结果表明在常温保存条件下血小板聚集功能随保存期延长有逐渐降低的趋势, 但在保存期内变化不明显, 冰冻保存对血小板聚集功能无明显影响; 血小板计数、pH 值在两种保存方式下均无明显变化; 提示机采血小板在常规或冰冻保存条件下, 采用常规的血小板功能评价指标不能真实反映血小板的活化[9], 而血小板 P-选择素的表达则是反应体外血小板活化的敏感指标。

参考文献:

[1] Barnard M R, MacGregor H, Ragno G, *et al*. Fresh, liquid-preserved, and cryopreserved platelets: adhesive surface receptors and membrane procoagulant activity[J]. Transfusion, 1999, 39(8): 880—888.

[2] Lozano M, Escolar G, Mazzara R, *et al*. Effects of the addition of second-messenger effectors to platelet concentrates separated from whole-blood donations and stored at 4℃ or −80℃[J]. Transfusion, 2000, 40(5): 527—534.

[3] 刘景汉, 欧阳锡林, 王青梅, 等. 低温保存血小板在外科手术的应用[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(3): 139—141.

[4] Lozano M L, Rivera J, Corral J, *et al*. Platelet cryopreservation using a reduced dimethyl sulfoxide concentration and second-messenger effectors as cryopreserving solution[J]. Cryobiology, 1999, 39(1): 1—12.

[5] Leytin V, Mody M, Semple J W, *et al*. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2): 565—570.

[6] Cetin M, Eser B, Er O, *et al*. Effects of DMSO on platelet functions and P-Selectin expression during storage[J]. Transfusion Apheresis Science, 2001, 24(3): 261—267.

[7] Walkowiak B, Kralisz U, Michalec L, *et al*. Comparison of platelet aggregability and P-selectin surface expression on platelets isolated by different methods[J]. Thromb Res, 2000, 99(5): 495—502.

[8] Michelson A D. Flow cytometric analysis of platelets[J]. Vox Sang, 2000, 78(S2): 137—142.

[9] 成晓玲, 林武存, 黎汝清, 等. 储存损伤对血小板超微结构、磷脂及聚集功能的影响[J]. 重庆医学, 2000, 29(2): 105—108.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net