

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00809

降温速率对血小板冰冻保存质量的影响

胡慧红¹, 钱宝华^{1*}, 刘宝林², 顾海慧¹, 朱燕霞¹, 花美仙¹

1. 第二军医大学长海医院输血科, 上海 200433

2. 上海理工大学低温生物技术研究所, 上海 200093

[摘要] 目的: 观察不同降温速率下血小板冰冻保存效果, 探讨血小板冰冻保存的最佳降温速率。方法: 在新型血小板冷冻保护剂作用下, 血小板以不同速率(1、10、20℃/min)降温至-80℃后直接转入深低温冰箱保存, 冻存1周后复温检测其体外功能和表面分子的变化, 与非程序降温组及新鲜血小板作比较。结果: 复温后各冰冻保存组血小板计数均低于新鲜对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。肾上腺素诱导的最大聚集率 10℃/min 组与 1℃/min 组、非程序降温组两两比较无统计学差异, 低于新鲜对照组($P < 0.01$), 但高于 20℃/min 组($P < 0.05$)。CD42b 表达的平均荧光强度 10℃/min 组高于其他各冷冻保存组($P < 0.05$), 低于新鲜对照组, 但无统计学意义。血小板复温后 1℃/min 组、20℃/min 组、非程序降温组表面的 CD62p 荧光强度均高于新鲜对照组($P < 0.05$), 10℃/min 组 CD62p 荧光强度高于新鲜对照组, 但无统计学差异。结论: 降温速率对冰冻保存血小板效果影响较大, 在新型血小板冷冻保护剂作用下, 相对于 1、20℃/min, 10℃/min 降温速率效果最佳。

[关键词] 低温保存; 血小板; 血小板计数; CD41 抗原; CD42b 抗原; CD62p 抗原

[中图分类号] R 457.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0809-04

Influence of cooling rate on quality of cryopreserved platelets

HU Hui-hong¹, QIAN Bao-hua^{1*}, LIU Bao-lin², GU Hai-hui¹, ZHU Yan-xia¹, HUA Mei-xian¹

1. Department of Blood Transfusion, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Biotechnology Institute of Low Temperature, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the outcomes of different cooling rates in the cryopreservation of platelets, so as to screen the best cooling rate for cyropreservation of platelets. **Methods:** Platelet concentrate was cooled down with the new cryopreserving solution at various cooling rates (1, 10, 20℃/min) and was kept at -80℃ for one week. Then platelets were thawed to check platelet count, adrenaline induced aggregation, and expression of CD41, CD42b and CD62p; the results were compared with those of the non-programmed cooling group and fresh platelets. **Results:** The platelet counts of cryopreserved groups were lower than that of fresh platelet concentrate ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no differences in adrenaline induced aggregation between 10℃/min group, 1℃/min group, and non-programmed cooling group; and the aggregation of the former 3 groups was lower than that of 1℃/min group ($P < 0.01$) and higher than that of 20℃/min group ($P < 0.05$). The CD42b expression in 10℃/min group was higher than in other groups ($P < 0.05$) and lower than in fresh platelet concentrate. The CD62p expression in 1℃/min group, 20℃/min group, none programme cooling group was higher than in fresh platelet concentrate ($P < 0.05$). The CD62p expression in 10℃/min group was higher than other 3 groups ($P < 0.05$) and lower than in fresh platelet concentrate, with no statistical significance. **Conclusion:** Cooling rate has great impact on the quality of cryopreservtd platelets. Compared with 1℃/min and 20℃/min, 10℃/min is the optimal cooling rate with the new cryopreservation solution in this study.

[KEY WORDS] cryopreservation; blood platelets; platelet count; CD41 antigen; CD42b antigen; CD62p antigen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 809-812]

血小板是血液的重要组成成分, 参与机体凝血过程, 发挥正常的止血功能; 输注血小板对各种原因

引起的血小板减少性和(或)功能障碍性出血具有药物不可替代的治疗作用^[1-2]。由于血小板寿命短、结

[收稿日期] 2008-04-20 **[接受日期]** 2008-07-01

[基金项目] 军队“十一五”课题(06MA180)。Supported by “the 11th-Five Year-Plan” of PLA(06MA180)。

[作者简介] 胡慧红, 硕士生, E-mail: art855@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070711, E-mail: qianbh1963@21cn.com

构和功能易受多种因素的影响,体外不易保存。因此,血小板体外保存成为目前研究的热点^[1]。冰冻保存被认为是延长血小板保存时间的最佳选择之一^[3]。目前国内外研究主要集中于血小板冰冻保存保护剂的开发、保护剂各成分的优化以及冰冻保存血小板的临床应用^[4-9],缺乏降温程序方面的研究。

细胞的低温生物物理特性对细胞的低温保存至关重要,降温速率是其中重要参数之一^[10]。降温速度过快,细胞内的水来不及渗出到细胞外,则会有胞内冰晶形成(intracellular ice formation, IIF),造成细胞的致命损伤。而慢速冷冻过程中,细胞外液的水分不断结冰导致大量的水分由胞内渗出、胞内渗透压升高,造成“溶质效应”^[11]。目前的降温方法均为非程序性降温,无法控制降温速率,存在很多的不可控因素,不利于血小板保存。因此必须寻求一个冷冻保存的最佳降温速率,既能防止“胞内冰”的形成,又能使“溶质效应”最小化。

本实验采用的血小板冷冻保存试剂是一种新型血小板冷冻保护剂^[4-5],我们课题组的前期研究^[2,9,12]证实其有利于血小板保存,能明显降低二甲亚砜(DMSO)的用量。在此基础上,本研究观察此血小板冷冻保护剂条件下不同降温速率对血小板保存活性的影响,以探讨最佳的降温速率。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 全自动血细胞分析仪(Met BC-2800,深圳),冷冻离心机(Heraeus Cryofuge[®] 6000i,德国),深低温冰箱(Forma8500-23, USA),血液凝聚仪(SH-93,上海),FACSCalibur流式细胞仪(Becton Dickinson FACS caliber, USA)和CellQuest分析软件,升降式微机控制程序降温仪(上海理工大学低温生物医学技术研究所自制)。所用试剂均为分析纯,DMSO、硝普钠、阿米洛利(Sigma,美国),腺苷(Amresco,美国),FITC标记抗人CD42b、PE/Cy5标记抗人CD41(BD,美国),PE标记抗人CD62p(Biolegend,美国)。

1.2 冷冻保护剂的配制 阿米洛利 0.003 3 g、硝普钠 0.000 7 g、腺苷 0.001 3 g,溶解于 1 ml DMSO 中,在作为血小板冻存保护剂时,以 1 : 50 比例加入浓缩血小板,DMSO浓度为 2%^[9,13]。

1.3 浓缩血小板的制备及分组 采集 12 例健康合格捐血者全血 200 ml(ACD-B 抗凝),PRP 二次离心法(1 617×g 8 min 和 3 423×g 8 min),2 h 内完成浓缩血小板的制备。将采集的浓缩血小板分成 4 份,每份 1 ml,并预留部分新鲜血小板作对照,加入新型血

小板冷冻保护剂,将每单位浓缩血小板按不同的冷冻速率等分为 4 组(n=12),分别以 1℃/min、10℃/min、20℃/min 降温至-80℃后转入深低温冰箱保存,非程序降温组直接置入深低温冰箱-80℃保存,1 周后复温进行下一步实验。

1.4 血小板计数与血小板回收率 用全自动血细胞分析仪,测定冷冻前及复温后的血小板。血小板体外回收率(RR)=(复温后血小板数/降温前血小板数)×100%。

1.5 血小板聚集功能的检测 采用肾上腺素(5.6 mmol/ml)作为聚集诱导剂。PPP 调零,PRP 调幅,检测并记录 5 min 血小板聚集曲线和血小板最大聚集率。

1.6 血小板表面 CD62p、CD41、CD42b 表达 采用直接法检测血小板 CD62p、CD41、CD42b 表达;在流式专用管中加入 30 μl PBS,然后加入待测浓缩血小板标本 5 μl,再分别加入 5 μl 的 PE-CD62p、PE/Cy5-CD41、FITC-CD42b,常温下避光孵育 20 min,洗涤、离心后加入 300 μl 1%多聚甲醛,上机检测。

1.7 统计学处理 采用统计软件 SPSS 13.0,统计方法为单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls (SNK)法,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种不同程序降温速率的降温曲线 1℃/min、10℃/min、20℃/min 3 种冷冻方法得到的降温过程曲线见图 1,3 种降温速率之间的差异明显。

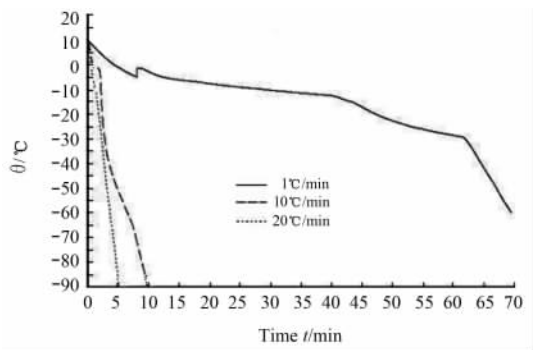


图 1 不同速率的降温曲线

Fig 1 Cooling curve at various cooling rates

2.2 不同降温速率冷冻保存后血小板计数的比较 血小板复温后,1℃/min 组、10℃/min 组、20℃/min 组、非程序降温组血小板计数均低于新鲜对照组(P<0.05 或 P<0.01)。冰冻血小板中 10℃/min 组与 20℃/min 组比较有统计学差异(P<0.05),与 1℃/min 组、非程序降温组比较无统计学差异。10℃/

min 组、1℃/min 组、非程序降温组均高于 20℃/min 组(表 1)。

2.3 冷冻前后血小板聚集功能改变 冷冻后血小板肾上腺素诱导的最大聚集率各处理组相对新鲜对照组显著降低($P<0.01$)。其中 10℃/min 组与 1℃/min 组、非程序降温组两两比较无明显差异均高于 20℃/min 组($P<0.05$, 表 1)。

2.4 流式细胞仪检查结果 与新鲜血小板相比,冰冻复温后的各组血小板表面 CD41 荧光强度无明显变

化($P>0.05$)。1℃/min 组、20℃/min 组、非程序降温组 CD42b 的荧光强度比新鲜对照组的显著减低($P<0.05$),其中 10℃/min 组 CD42b 的表达水平低于新鲜对照组,但无统计学意义,且高于其他各冰冻组($P<0.05$)。冰冻血小板复温 1℃/min 组、20℃/min 组、非程序降温组表面的 CD62p 荧光强度明显高于新鲜对照组($P<0.05$),10℃/min 组 CD62p 荧光强度高于新鲜对照组,但无统计学差异,与其他 3 组比较有统计学意义($P<0.05$, 表 1)。

表 1 冰冻血小板复温后的体外功能测定

Tab 1 Function test of thawed platelets *in vitro*

($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	Platelet count ($\times 10^9/L$)	RR(%)	Adrenaline induced aggregation(%)	CD41 (MFI)	CD42b (MFI)	CD62p (MFI)
Control	850±281	100	51.9±4.4	1 719±522	106.4±43.4	23.2±8.2
Group 1	733±214**	86	29.2±7.9**	1 844±427	78.2±16.2*	38.3±10.8*
Group 2	780±244*	92	34.4±7.1**	1 704±583	87.4±25.8 Δ	28.7±6.9 Δ
Group 3	689±206**	81	25.5±9.5**	1 852±413	69.9±16*	45.0±12.8*
Group 4	699±199*	83	29.8±6.3**	1 791±380	72.1±22.7*	42.2±12.8*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; Δ $P<0.05$ vs group 1, group 3 or group 4. Group 1: 1℃/min; Group 2: 10℃/min; Group 3: 20℃/min; Group 4: Non-programmed cooling group; RR: Recovery rate

3 讨论

近年来,临床应用血小板数量急剧增加,使用新鲜液体血小板及时供给性已远远不能满足临床需要。冰冻保存后的血小板具有良好的即刻止血效果和升高血小板功效,为血小板保存开辟了新途径^[14-15]。但冰冻保存过程本身对血小板具有损伤,影响保存效果,阻碍冰冻保存技术的推广。降温速率是决定细胞冰冻保存效果的重要因素,可根据不同降温速率将细胞损伤分为慢速降温下的溶质效应及快速降温下的胞内冰晶形成^[11,16]。降温过程中,当细胞悬液冷至-5℃时,细胞及周围介质还未结冰,只是处于过冷状态,降温至-5~-15℃之间时,细胞外溶液先出现结冰而细胞内仍未结冰,处于过冷状态,如果降温速率过快,细胞内的水来不及渗出到细胞外,则会在胞内形成冰晶,使胞内外渗透压达到平衡,损伤细胞膜,造成细胞的致命损伤。而降温速度慢的时候,会因为细胞脱水、皱缩和胞内高渗透压状态,损坏细胞膜上的脂质分子,复温时,大量水分进入细胞内,造成细胞死亡^[11]。由于过快或过慢的降温速率都会对细胞造成一定的损伤,因此,必须寻求一个冰冻保存的最佳速率,既慢到足以防止“胞内冰”的形成,又快到使“溶质效应”最小化,使降温速率达到平衡。对于不同的细胞种类和不同的冷冻保护剂,需要探索不同的最佳降

温速率^[11]。

本实验所采用的血小板冷冻保护剂是低浓度 DMSO(2%)和第二信使调节剂混合物,通过可逆的作用于特异的活化通路抑制血小板体外激活、稳定血小板细胞内生化、减少血小板冻存损伤、降低 DMSO 的浓度,提高保存血小板的质量。前期研究^[9,12]已经证实其保存效果等同于 6%的 DMSO。

本研究利用程序降温仪分别以 1℃/min、10℃/min、20℃/min 不同速率将标本降温至-80℃后转至深低温冰箱内保存,1 周后复温检测血小板计数、肾上腺素诱导的最大聚集率,10℃/min 组相对新鲜对照组有显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但高于其他各处理组,与文献^[17]结果类似。

CD41 是血小板膜糖蛋白Ⅲb/Ⅲa 复合物的 α 亚单位,在静息和活化的血小板上均表达,可作为血小板特异性膜抗原来鉴别血小板群^[18]。CD42b 即 GPIIb,是血小板 vW 因子受体,介导血小板黏附于受伤的血管壁,参与血小板止血。血小板体外保存可激活血浆蛋白酶分解 GPIIb,导致其水平下降^[18]。各冰冻组血小板的 CD42b 的荧光强度比新鲜对照组的显著减低($P<0.05$),其中 10℃/min 组 CD42b 的表达低于新鲜对照组,无统计学意义,但高于其他各组($P<0.05$),表明以 10℃/min 降温的冰冻血小板 GPIIb 水平与新鲜血小板最为接近。CD62p 即血小板颗粒膜蛋

白-140,也称P选择蛋白(P-selectin),属于蛋白黏附分子家族。血小板未活化时不表达CD62p,当血小板被激活时,在质膜上表达CD62p。由于CD62p在活化和非活化血小板间的差异最显著,因此CD62p可以作为最准确的血小板激活标志物之一^[19-20]。熔融血小板中1℃/min组、20℃/min组、非程序降温组表面的CD62p的荧光强度高于新鲜血小板($P < 0.05$),其中10℃/min组的CD62p荧光强度低于其他3组冰冻血小板($P < 0.05$),高于新鲜血小板对照组,但无统计学意义。这表明以10℃/min降温的冰冻血小板活化程度低于其他冰冻组。

本研究结果表明,以10℃/min进行程序降温的血小板复温后在各方面与新鲜血小板最为接近,优于其他各组,证明降温速率对血小板冰冻保存效果有影响,选择适当的降温速率可以提高血小板冰冻保存效果,但仍需在血小板低温生物物理学机制方面进行深入研究,同时进一步改进和优化冰冻参数,使冰冻血小板最大限度的保持正常生理功能,从而具有更大的临床应用价值。

(志谢 本研究得到第二军医大学卫生勤务学系卫生统计学教研室孙亚林老师、上海理工大学低温生物技术研究所周国燕副教授、周新丽老师的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

[1] 刘景汉,车 辑. 血小板保存[J]. 中国输血杂志,2008,21: 241-242.

[2] 顾海慧,钱宝华. Thrombosol一种新型血小板保存保护剂[J]. 中国输血杂志,2005,18:64-66.

[3] Valeri C R. Cryopreservation of human platelets and bone marrow and peripheral blood totipotent mononuclear stem cells[J]. Ann N Y Acad Sci,1985,459:353-366.

[4] Currie L M,Lichtiger B,Livesey S A,Tansey W,Yang D J,Connor J. Enhanced circulatory parameters of human platelets cryopreserved with second-messenger effectors: an *in vivo* study of 16 volunteer platelet donors[J]. Br J Haematol,1999,105:826-831.

[5] Pérez-Ceballos E,Rivera J,Lozano M L,Candela M J,Corral J,

Guerrero J A,et al. Evaluation of refrigerated platelet concentrates supplemented with low doses of second messenger effectors[J]. Clin Lab Haematol,2004,26:275-286.

[6] 刘景汉,欧阳锡林,庄 远,李 卉,孙桂香,陈麟凤,等. -80℃长期保存血小板的可行性研究[J]. 中国输血杂志,2008,21:243-245.

[7] 刘景汉,王青梅. 低温保存血小板的临床应用[J]. 解放军医学杂志,1999,24:73-74.

[8] 刘景汉,韩玉凤,李茨芬,殷宗健. 二甲亚砷冷冻保存血小板[J]. 解放军医学杂志,1989,14:106-108.

[9] 顾海慧,钱宝华,张昊翔,吴 江,王 宣,花美仙,等. 低浓度二甲亚砷和第二信使调节剂混合物低温保存血小板的初步研究[J]. 第二军医大学学报,2005,26: 439-441.

[10] 刘景汉,欧阳锡林,吕留彩,高大勇. 低温保存的血小板胞内冰晶形成温度测定[J]. 中国实验血液学杂志,2002,10:574-576.

[11] 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京:科学技术出版社,1994:23-24.

[12] 顾海慧,钱宝华,宋 耘,朱燕霞,罗庆峰,郭 峰. 第二信使调节剂和2%二甲亚砷对血小板冻存后计数的影响[J]. 临床输血与检验,2006,8:176-179.

[13] Lozano M L,Rivera J,Corral J,Gonzalez-Conejero R,Vicente V. Platelet cryopreservation using a reduced dimethyl sulfoxide concentration and second-messenger effectors as cryopreserving solution [J]. Cryobiology,1999,39:1-12.

[14] 吴强驹,张 艳,刘孟黎. 新鲜和冰冻血小板治疗效果的Meta分析[J]. 中国输血杂志,2008,21:37-38.

[15] 刘景汉,王青梅,李锡金,石 群,骆 群,韩 玮,等. 低温保存血小板临床应用效应研究[J]. 解放军医学杂志,2001,26:222-223.

[16] Gao D,Critser J K. Mechanisms of cryoinjury in living cells[J]. IL-AR J,2000,41:187-196.

[17] Holme S. Storage and quality assessment of platelets[J]. Vox Sang,1998,74(Suppl 2):207-216.

[18] Rinder H M. Platelet function testing by flow cytometry[J]. Clin Lab Sci,1998,11:365-372.

[19] Michelson A D,Furman M I. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance [J]. Curr Opin Hematol,1999,6: 342-348.

[20] 欧阳锡林,刘景汉,Gao D Y. 流式细胞术测定保存血小板再表达CD62p方法的建立及应用[J]. 中国输血杂志,2002,10:77-81.

[本文编辑] 贾泽军