·论 著·

大容量人血小板冻干保存的初步研究

王 波[1],张存海[1],徐梦洁[2],许先国[3],陈光明[2],张绍志[2]

[摘要] **目的** 为使血小板冷冻干燥保存技术用于军队临床战创伤救治,在小容量冻干保存的基础上研究大容量人血小板的冷冻干燥技术。**方法** 采用特制血盒作为冻干容器,以20%(w/v)海藻糖和1%(w/v)牛血清白蛋白作为冻干保护剂。冻干样品复水后测量血小板的数值恢复率和体积分布参数,应用流式细胞仪检测血小板的凋亡率和活化率,采用二磷酸腺苷和肾上腺素检测血小板的聚集功能。**结果** 大容量血小板冻干复水后的数值恢复率为(66.3±2.1)%,平均血小板体积较新鲜血小板有明显增加,冻干血小板的细胞凋亡率达20%左右;冻干和复水过程还造成小部分血小板被激活,其最大聚集率为新鲜血小板的50%左右。**结论** 大容量血小板冻干复水后的恢复率较低,形态结构、活性和功能指标均低于新鲜血小板,但基本可以满足血小板临床止血功能标准。

[关键词] 血小板;冷冻干燥;大容量;聚集;流式细胞术

[中图分类号] R457 [文献标志码] A [文章编号] 1672-271X(2012)05-0413-03

Preliminary study on the preservation of large volume of human platelets by freeze-drying

WANG Bo[1], *ZHANG Cun-hai*[1], *XU Meng-jie*[2], *XU Xian-guo*[3], *CHEN Guang-ming*[2], *ZHANG Shao-zhi*[2]. 1. *Intensive Care Unit*, 117 *Hospital of PLA*, *Hangzhou*, *Zhejiang* 310013, *China*; 2. *Institute of Refrigeration and Cryogenics*, *Zhejiang University*, *Hangzhou*, *Zhejiang* 310027, *China*; 3. *Institute of Blood Transfusion*, *Blood Center of Zhejiang Province*, *Hangzhou*, *Zhejiang* 310006, *China*

[**Abstract**] **Objective** Towards a clinical application of the technology of freeze-drying preservation of human platelets in certain military situations, a primary study on the freeze-drying of large volume of human platelets was conducted. **Methods** A specially designed blood vessel was used as the lyophilization container. The human platelets were rehydrated directly after lyophiliztion. The cell recovery rate, mean platelet volume and platelet distribution width were analyzed by a blood-cell counter. The apoptosis rate and activation rate were recorded by a flow cytometry. The aggregation function was tested with adenosine diphosphate and epinephrine. **Results** The recovery rate of rehydrated platelets reached (66.3±2.1)%. Compared with fresh control the mean platelet volume of rehydrated platelets increased significantly. The apoptosis rate was about 20% according to the analysis of the flow cytometry, and a small part of platelets were activated during the freeze-drying and rehydration process. The maximal aggregation rate was approaching approximately 50% of that of fresh control. **Conclusion** Freeze-drying preservation of large volume of human platelets resulted in a comparatively low cell recovery rate compared with that of small volumes, and the morphology, aggregation function was also affected, but meet the clinical requirement of coagulation on the whole.

[**Key words**] platelet; freeze-drying; large volume; aggregation; flow cytometry

血小板保存技术的局限性造成目前血小板的供应不足和浪费。冷冻干燥法为血小板长期保存的一种有效方法[1-2],但现阶段仍局限在小容量(≤10 ml)样本,还不能于临床批量应用。临床输血治疗一般采用血袋,容量大于现有的实验研究样本。本研究在瓶装小容量(1 ml)血小板冻干保存的基础上,尝试采用特制血盒进行大容量(100 ml)血小板的冻干保存,并对冻干血小板复水后的数值恢复率和形态分布,以及聚集和流式等活性指标进行检测比较。

作者简介:王 波(1962-),男,山东潍坊人,硕士,主任医师,硕士研究生导师,从事战、创伤危重病研究

作者单位:1. 310013 浙江杭州,解放军117医院重症医学科;2. 310027 浙江杭州,浙江大学制冷与低温研究所;3. 310006 浙江杭州,浙江省血液中心输血研究所

1 材料与方法

1.1 实验材料 血小板浓缩液[(1~1.5)×10^9/ml]来自健康献血者,浙江省血液中心提供,实验前存于22℃中震荡过夜。

主要试剂:海藻糖(北京京科宏达生物技术有限公司)、牛血清白蛋白(上海生工生物工程公司)、血小板聚集诱导剂二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)和肾上腺素(Chrono-log公司)、流式试剂CD61-PerCP, Annexin V-FITC, PI染色剂和结合

缓冲液(MultiSciences 公司)、CD62P-PE(eBioscience 公司)、PAC-1-FITC(BDIS 公司)。

主要溶液:海藻糖加载缓冲液(含 50 mmol/L 海藻糖,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L KCl,10 mmol/L EGTA,10 mmol/L 咪唑,pH 值为 6.8);冻干保护剂(含有 20 % 海藻糖,1% 牛血清白蛋白,9.5 mmol/L HEPES,142.5 mmol/L NaCl,4.8 mmol/L KCl,1 mmol/L $MgCl_2$);复水溶液为以生理盐水稀释的血浆(1∶1)。

主要仪器:冷冻干燥机(LabConco,美国)、恒温振荡水浴(Bellco Glass,美国)、流式细胞仪(FACS-Calibur,BD,美国)、血球计数仪(CELL – DYN 1700,Abbott,美国)。

特制冻干血盒为 230 mm × 120 mm × 25 mm 的长方体,以医用塑料制作,医用无纺布(透气不透水)密封并预留溶液充注口。

1.2 *血小板冷冻干燥*　血小板浓缩液离心洗涤后重悬于海藻糖加载缓冲液中,于 37 ℃水浴中振荡孵化 4 h。洗涤后再重悬于冻干保护剂中,调整浓度约为 0.1×10^9/ ml。将 100 ml 血小板冻干悬浮液装入特制冻干血盒中,密封充注口。冻干悬浮液在 –60℃中预冻 4 h 后,迅速置于 –30℃的冻干机搁板上,抽真空进行一次干燥 100 h;随后搁板升温至 20 ℃,二次干燥持续时间 40 h。干燥过程中冷阱温度维持 –80 ℃,真空度 1 Pa 左右。冻干后加入 100 ml 复水溶液,轻轻振荡至冻干样品完全溶解后用于实验。

1.3 *血小板计数*　采用血球计数仪测量血小板浓度,血小板平均体积(mean platelet volume,MPV)和血小板分布宽度(platelet distribution width,PDW)。计算血小板的数值恢复率(为冻干复水后的血小板数/冻干前的血小板数 ×100%)。

1.4 *血小板流式实验*　调整血小板浓度,依次加入流式试剂按常规染色处理后,在流式细胞仪上进行分析,采用 CellQuest 软件计算血小板凋亡率和活化率。另取新鲜血小板同样处理并计算。

1.5 *血小板聚集实验*　以新鲜浓缩血小板为对照组,ADP 和肾上腺素为聚集诱导剂(浓度分别为 20 μmol/ L 和 50 μmol/ L),用血球计数仪对聚集前的复水血小板悬浮液和聚集后的复水血小板进行细胞计数,计算聚集率[3](1 – 聚集前悬浮液中血小板数/聚集后上清液中血小板数 ×100%)。

1.6 *统计学处理*　采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,检测数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用双尾 t 检验分析对比,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1 *冻干复水后血小板的恢复率和形态分布*　冻干血小板复水后的数值恢复率为(66.3 ± 2.1)%,MPV 较新鲜血小板明显增加($P < 0.01$),PDW 略有增大但与新鲜血小板无显著差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1　冻干复水后血小板与新鲜血小板的 MPV 和 PDW 值(n =5)

分组	MPV(fL)	PDW(%)
冻干复水后血小板	12.4 ± 0.6*	17.3 ± 0.7
新鲜血小板	9.9 ± 0.6	16.5 ± 0.8

注:与新鲜血小板比较,* $P < 0.01$

2.2 *冻干复水后血小板的凋亡和活化检测*　采用流式细胞仪检测冻干复水后血小板的凋亡和活化结果如图 1 所示。冻干复水后血小板比较新鲜血小板,部分细胞呈现 Annexin V-FITC 阳性,即细胞膜上出现早期凋亡的标志,未凋亡的细胞占血小板总数的(80.3 ± 6.3)%。同时冻干复水后血小板的 PAC-1 表达率较低,但 CD62P 表达率较高,活化早期的血小板(PAC-1-FITC 呈阳性)占血小板总数的(2.5 ± 1.8)%,而活化晚期的血小板(CD62P-PE 呈阳性)占血小板总数的(12.8 ± 4.6)%。

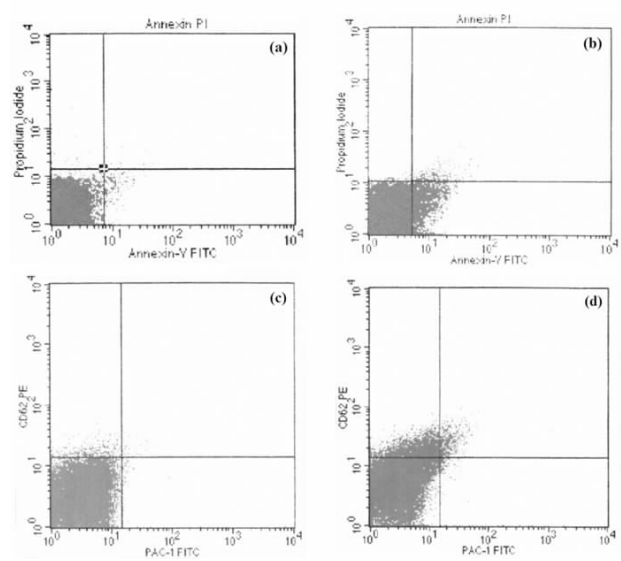

图 1　流式细胞术检测冻干复水后血小板的凋亡率和活化率
(a)和(b)分别为新鲜和冻干复水后血小板的 Annexin V-FITC/PI 图;(c)和(d)分别为新鲜和冻干复水后血小板的 PAC-1-FITC/CD62P-PE 图

2.3 *冻干复水后血小板的聚集反应*　冻干血小板复水后对 ADP 和肾上腺素诱导的聚集功能下降,聚集率约为新鲜血小板的 50% 左右。见表 2。

表2 冻干复水后血小板与新鲜血小板的聚集率($n=5$)

分组	ADP(%)	肾上腺素(%)
冻干复水后血小板	33.3±11.4	32.8±7.6
新鲜血小板	68.5±6.1	57.4±8.4

3 讨 论

不论在和平时期还是在战争环境下,机体在严重创伤或大手术打击下会出现严重的凝血功能障碍,即创伤性凝血病。创伤性凝血病死亡率极高,如及时输注血小板,可显著降低死亡率。由于目前保存技术难有突破,血小板还无法长时间保存,造成临床上血小板严重供应不足和浪费现象并存。现阶段国内已进行的有关人血细胞(如红细胞、血小板、脐带血等)的冷冻干燥保存研究多为小容量样品[4-6],并取得了一定的进展,而国外在大容量人血细胞的冷冻干燥保存方面进展较大,如 Wolkers 等[7]采用特殊设计的冻干血袋(由生物相容性薄膜和0.2 mm孔径的防水透气膜复合制成)对标准血袋单位的血小板(4×10^{10})进行冷冻干燥实验,复水后血小板恢复率达到85%,略低于1 ml瓶装冻干血小板的恢复率。

本文作者曾进行瓶装小容量血小板冻干研究[3,8-10],冻干前血小板通过热孵化加载海藻糖作为细胞内保护剂,采用20%的海藻糖与1%的牛血清白蛋白作为细胞外冻干保护剂,复水后可以直接输注人体[12]。在冻干大容量样品时,采用硅化玻璃瓶可能带来传热传质等方面的问题,为此本研究采用具有生物相容性的医用塑料盒和医用无纺布(透气不透水)制成的冻干血盒作为冻干容器,充注100 ml容量浓度为0.1×10^{9}/ ml的血小板冻干悬浮液(厚度≤0.5cm)进行冷冻干燥实验。目前采用低浓度是考虑到实验用血小板的供应问题,后期的研究会采用较高浓度的血小板。在研究中考虑到容量增加和医用无纺布对于水蒸气传输的阻力,大容量血小板的冻干实验相关参数相比小容量的情形有所改变:一次干燥温度从-40℃提高到-30℃,预冻和一次、二次干燥时间都增加了一倍以上,以保证样品的充分干燥。

从初步结果看来,大容量血小板冻干后的数值恢复率为(66.3±2.1)%,远低于优化的1 ml容量血小板冻干后的恢复率(92±7.8)%[11],同时冻干血小板的凋亡率达到20%左右。可能的原因主要是:①小容量样品可以较精确地控制冻干过程特别是预冻过程参数[11],避免出现细胞内结晶现象,而容量增大后带来样品内部的不均匀性增加,不同部位的细胞冷却速率、干燥过程中的热量传递也存在一定差异,导致部分区域出现细胞内残余水分含量过高,影响冻干保存血小板的存活率;②血小板加入复水溶液前进行预复水操作[11],大容量样品同样由于不均匀性的问题导致部分细胞不能达到最佳的预复水条件。因此本研究将继续进行以下工作:①研究冻干容器中大容量样品在预冻、一次干燥和二次干燥过程中的热量传导过程,改进冻干容器,优化样品内部结构和温度的均一性;②对大容量样品的预复水过程进行研究,确定合适的预复水机制,逐渐提高科研工作水平[13]。

【参考文献】

[1] Kanias T, Acker JP. Mammalian Cell Desiccation: Facing the Challenges[J]. Cell Preserv Technol, 2006, 4(4): 253-277.

[2] Holovati JL, Hannon JL, Gyongyossy-Issa MIC, et al. Blood preservation workshop: new and emerging trends in research and clinical practice[J]. Transfusion Medicine Review, 2009, 23(1): 25-41.

[3] Zhang SZ, Fan JL, Xu XG, et al. An experimental study of the use of ultrasound to facilitate the loading of trehalose into platelets[J]. Cryobiology, 2009, 59(2): 135-140.

[4] Han Y, Quan GB, Liu XZ, et al. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization[J]. Cryobiology, 2005, 51(2): 152-164.

[5] 陈麟凤,刘景汉,汪德清,等. 人红细胞冻干后复水条件的初步研究[J]. 中国实验血液学杂志,2009,17(6):1582-1587.

[6] Li J, Hua TC, Gu XL, et al. Morphology study of freeze-drying mononuclear cells of human cord blood[J]. Cryo Letters, 2005, 26(3): 193-200.

[7] Wolkers WF, Walker NJ, Tamari YE, et al. Towards a clinical application of freeze-dried human platelets[J]. Cell Preserv Technol, 2003, 1(3): 175-188.

[8] 周新丽. 人血小板冷冻干燥保存的实验研究[D]. 浙江大学博士学位论文,2006.

[9] Zhou XL, Zhu H, Zhang SZ, et al. Freeze-drying of human platelets: influence of intracellular trehalose and extracellular protectants[J]. Cryo Letters, 2006, 27(1): 43-50.

[10] Fan JL, Xu XG, Zhang SZ, et al. Experimental study on rehydration conditions of freeze-dried platelets[J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE A, 2009, 10(5): 697-703.

[11] Hoshi R, Murata S, Matsuo R, et al. Freeze-dried platelets promote hepatocyte proliferation in mice[J]. Cryobiology, 2007, 55(3): 255-260.

[12] 冯智慧,胡 彬,刘 棋. 血小板保存的研究进展[J]. 中国输血杂志,2009,22(10):854-856.

[13] 焦留宏,吴德平,赵 兵. 某部4所医院科研情况调查分析[J]. 东南国防医药,2011,13(5):430-432.

(收稿日期:2011-12-22;修回日期:2012-02-21)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)