

L-精氨酸对液体保存血小板的保护作用研究*

林列坤¹, 邓小燕¹, 赵 阳² (1. 广州医学院第二附属医院 510260; 2. 广东省广州市血液中心 510095)

【摘要】 目的 研究在血小板 4℃ 液体低温保存体系中添加 L-精氨酸对血小板保存效果的影响。**方法** 制备新鲜富含血小板血浆 (PRP) 5 份, 每份 PRP 分为 7 份平行样品。一份为对照组 22℃ 保存, 另一份为 4℃ 保存, 其余 5 份加入不同浓度 L-精氨酸溶液, 保存第 1 天到第 5 天检测血小板膜 CD62P 表达率的变化, CD62P 表达率最低的 L-精氨酸浓度为最佳介入浓度。所有数据经配对资料采用 *t* 检验分析。**结果** 血小板 4℃ 保存并加入 L-精氨酸 4 mmol/L 时每天 CD62P 表达率与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 血小板 4℃ 液体低温保存时 L-精氨酸的最佳介入终浓度为 4 mmol/L, 在这一浓度下 L-精氨酸能有效抑制血小板膜 CD62P 表达, 提高血小板的保存质量。

【关键词】 L-精氨酸; 液体低温; 血小板保存

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.21.002

中图分类号: R446.111

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)21-2307-02

Research on the effect of using-L arginine for the preservation of platelet in liquid LIN Lie-kun¹, DENG Xiao-yan¹, ZHAO Yang². 1. The 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College 510260; 2 Guangzhou Blood Center 510095, Guangdong China

【Abstract】 Objective To observe the effect of adding L-arginine to the 4℃ liquid preservation system of platelet. **Methods** 5 examples of plasma rich platelet (PRP) from 5 single donors were collected by means of blood separator. Each example was divided into 7 parallel groups; one was control group at 22℃, the other was control group at 4℃, and the remaining 5 groups were treated with different L-Arginine concentration before leukocyte filtration. PRP with added solution was stored at 4℃. CD62P expression of platelets was evaluated by cytometry assay from the 1st day to the 5th day of storage of platelet preparations. The optimal concentration of L-Arginine solution was established in relationship with the lowest CD62P expression. All results were analyzed by SPSS software with Paired *t* test. **Results** Compared to the blank group, CD62P expression of 4 mmol/L L-arginine group had significant differences ($P < 0.05$) every day. **Conclusion** The concentration of 4 mmol/L was the optimal L-arginine concentration for platelet cryopreservation in liquid. At this concentration, CD62P expression rate was suppressed effectively. It would enhance the quality of platelet during the cryopreservation in liquid.

【Key words】 L-arginine; liquid; platelet storage

血小板 22℃ 振荡保存是美国血液技术协会规定的血小板标准保存方法, 其体外活化率随着保存时间增加而增加, 无效输注概率也随之增加。而 4℃ 液态保存血小板是维持血液细胞活性的理想方法, 4℃ 保存比常规保存的血小板有良好的聚集功能, 但血小板 4℃ 液态保存可诱导血小板活化, 膜完整性破坏, 液体 4℃ 保存血小板超过 2 h 寿命即缩短, 止血活性明显下降^[1]。本实验通过复制体内一氧化氮 (NO) 抑制血小板活化的模式^[2-3], 利用 NO 供体 L-精氨酸主动介入血小板液体低温保存体系, 减少血小板保存期间的可逆性活化, 从而提高在液态低温保存条件下血小板的体外保存质量, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2008 年 8~12 月体检合格的无偿献血员 5 例, 献血员符合《献血者健康检查标准》^[4]。将 ACD 抗凝全血 2 U 用全血成分分离机制备富含血小板血浆 (PRP) 和血小板。

1.2 仪器设备 Sorvall 12BP 血站专用离心机 (美国), Fresenius 全血成分分离机 (德国), eppendorf 离心机 (日本), 自动

接驳器 (日本泰尔茂), SE-200 电子天平 (韩国), 血小板专用保存仪 (美国 HELMER), COULTER Epics XL 流式细胞仪, 生物梅里埃 Organon Bact/Alert 120 全自动血液细菌培养及检测系统 (法国)。

1.3 试剂材料 FITC 标记 anti-human CD62P 抗体 (美国 Immunotech), PE 标记 anti-human CD41 (美国 Beckman Coulter), FITC 标记 mouse IgG isotype control (美国 Beckman Coulter), L-Arginine (Sigma), 血小板专用保存袋 (华南血袋厂), 滤除白细胞输血器 (南京双威)。

1.4 方法

1.4.1 PRP 和血小板制备 采血 6 h 内 ACD 抗凝的 2 U 四联袋全血置 Sorvall 12BP 离心机离心 (22℃, 1 800 r/min 离心 10 min)。离心完毕将全血置分离机上, 分离出上层 PRP。用无菌接驳器将装 PRP 的塑料袋与白细胞过滤器连接, 白细胞过滤器与血小板保存袋连接。过滤白细胞的 PRP 置 22℃ 血小板振荡器上保存。血小板制备方法: 用上法制备 PRP, 进行 2 次离心 (22℃, 3 500 r/min 离心 8 min), 分离上层血小板血

* 基金项目: 广州市卫生局资助题 (2008-YB-78)。

浆,得血小板悬液,振荡保存备用。

1.4.2 采集健康献血者全血 2 U×5 袋,制备 PRP,每份 PRP 分为 7 份平行样品,一份对照组样品 22 ℃ 保存,另一份 4 ℃ 保存,其余 5 份加入 L-精氨酸终浓度 1~4 mmol/L 的处理组样品,第 1 天至第 5 天每天监测血小板膜 CD62P 表达率,CD62P 表达率最低的 L-精氨酸终浓度为最佳介入浓度。

1.4.3 用 pH7.4 的 PBS 将 PRP 或血小板悬液血小板浓度调整至 1×10⁶/L,PE 抗 CD41 标记血小板,FITC 抗 CD62P 标记活化血小板,FITC 标记 IgG 作非特异性阳性标记血小板,用

流式细胞仪检测血小板膜 CD62P 表达率^[4]。

1.4.4 抽取保存至第 5 天的对照组和处理组样品,用生物梅里埃 BacT ALERT 3D 全自动血液细菌培养及检测系统同时做需氧菌和厌氧菌培养,连续培养 5 d,观察结果。

1.5 统计学方法 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对资料 *t* 检验分析。

2 结 果

2.1 L-精氨酸的最佳介入浓度 见表 1。

表 1 L-精氨酸介入浓度对血小板膜 CD62P 表达率的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

L-精氨酸 (mmol/L)	CD62P 表达率(%)				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
0(22 ℃ 对照组)	9.8±2.3	15.4±3.3	18.3±2.3	24.1±3.4	27.3±5.0
0(4 ℃ 对照组)	10.2±2.0	15.5±2.5	18.7±1.1	24.9±2.1	28.0±4.0
1(4 ℃)	10.2±1.7	15.6±1.8	18.5±1.0	24.6±2.6	26.6±4.0△
2(4 ℃)	9.9±1.9	15.7±1.7	17.8±1.4△	24.5±2.1	25.7±3.0△
3(4 ℃)	9.5±2.0	13.4±2.6	16.1±1.5*△	17.1±1.4*△	20.4±1.8*△
4(4 ℃)	6.9±2.0*△	9.1±2.0*△	12.8±1.6*△	14.8±1.1*△	16.7±1.5*△

注:与 0(22 ℃ 对照组)比较,**P*<0.05;与 0(4 ℃ 对照组)比较,△*P*<0.01。

由表 1 可见,4 ℃ 保存期间,CD62P 表达率随 L-精氨酸介入浓度的增加而减少,介入 L-精氨酸终浓度为 4 mmol/L 的处理组每天的 CD62P 表达率与 22 ℃ 对照组差异均有统计学意义(*P*<0.01);介入 L-精氨酸终浓度为 3 mmol/L 的处理组第 3 天和第 5 天的 CD62P 表达率与 22 ℃ 对照组差异有统计学意义(*P*<0.05),第 4 天的 CD62P 表达率与 22 ℃ 对照组差异也有统计学意义(*P*<0.01);其余 L-精氨酸处理组的 CD62P 表达率与 22 ℃ 对照组差异无统计学意义。介入 L-精氨酸终浓度为 4 mmol/L 的处理组每天的 CD62P 表达率与 4 ℃ 对照组差异均有统计学意义(*P*<0.01);介入 L-精氨酸终浓度为 3 mmol/L 的处理组第 3、4、5 天的 CD62P 表达率与 4 ℃ 对照组差异有统计学意义(*P*<0.01);介入 L-精氨酸终浓度为 2 mmol/L 的处理组第 3、5 天的 CD62P 表达率与 4 ℃ 对照组差异有统计学意义(*P*<0.01);介入 L-精氨酸终浓度为 1 mmol/L 的处理组只有第 5 天的 CD62P 表达率与 4 ℃ 对照组差异有统计学意义(*P*<0.01)。

2.2 细菌培养 各实验组和对照组细菌培养结果均为阴性。

3 讨 论

血小板输注是现代医学治疗的一种有效措施,其保存至今仍无理想的方法。目前常规应用的血小板保存方法为 22 ℃ 常温振荡保存,因保存期短和易使血小板遭受细菌污染,且因不可逆的储存损伤而导致血小板功能下降,严重限制其临床应用,使血小板长期处于严重供不应求的状态,因此探索新的血小板保存技术成为输血领域急需解决的热点课题。目前比较成熟的保存方法有 22 ℃ 振荡保存(美国血液技术协会推荐方法)和二甲基亚砜冰冻保存,其他尚在研究阶段的方法还有冷冻干燥脱水保存、4 ℃ 液态保存、人工血小板、NO 和 L-精氨酸处理血小板等^[1,5-8]。液态低温保存是维持血液细胞活性的理想方法,但低温条件易引发血小板膜发生脂相转移,导致膜侧向分离,膜通透性增加,蛋白变性和水肿,血小板发生激活损伤。

L-精氨酸是 NO 释放剂作为可逆性血小板激活抑制剂,作用于血小板环核苷酸系统,刺激腺苷酸环化酶的产生,抑制血小板颗粒内容物释放,减少血小板可逆性活化,延缓血小板代谢速率,降低保存损伤。同时 NO 可直接或间接对细菌、真菌产生杀伤作用,从而减低体外保存血小板的细菌污染风险,提高血小板输注效果。本研究通过在液态保存血小板系统中添加可逆性血小板激活抑制剂 L-精氨酸,防止血小板贮存损伤。由表 1 可见,4 ℃ 低温液体保存条件下,CD62P 表达率随 L-精氨酸介入浓度的增加而减少,其中 L-精氨酸终浓度为 4 mmol/L 的处理组在各保存期的 CD62P 表达率与 22 ℃ 对照组和 4 ℃ 对照组比较差异均有统计学意义。L-精氨酸终浓度为 3 mmol/L 处理组的 CD62P 表达率在第 3 天到第 5 天与 22 ℃ 对照组和 4 ℃ 对照组比较差异均有统计学意义;而 L-精氨酸其余处理组的 CD62P 表达率均呈现较低的抑制率。可见,介入终浓度为 4 mmol/L 的 L-精氨酸的血小板 CD62P 表达率最低,对血小板活化的抑制作用最强,因而将 L-精氨酸的最佳介入终浓度确定为 4 mmol/L。

本文通过筛选有效的可逆性血小板激活抑制剂 L-精氨酸,在血小板 4 ℃ 低温液体保存条件下介入适当浓度的 L-精氨酸后,血小板的活化标志 CD62P 得到显著的抑制,说明 L-精氨酸在液态低温条件下体外对血小板能提供一定的保护作用,能有效减低血小板活化损伤,延长血小板贮存期限。L-精氨酸可能使液态低温保存血小板处于暂时麻醉休眠状态,有效抑制低温所致血小板膜侧向分离及损伤,从而最大限度保存血小板功能,延长体内生存时间,提高在液态低温保存条件下血小板的体外保存质量^[9]。此实验结果有望为血小板保存研究提供新的思路。

参考文献

[1] Kanfman RM. Uncommon cold;could (下转第 2310 页)