论著·临床研究

3种不同模式汇集白膜层法制备浓缩血小板质量和保存效果比较

王舒莹[1],李晓明[2△],刘震岳[1],张建民[1]
(承德医学院附属医院:1.输血科;2.检验科,河北承德 067000)

摘 要:目的 比较3种不同模式汇集白膜层(PBC)法制备浓缩血小板(PC)的质量及保存效果。**方法** 使用3种不同模式PBC法制备PC,依据获得PC的模式不同分为即时PBC组、白膜法(BC)室温过夜组和全血(WB)室温过夜组,所有制备的PC过滤白细胞用血小板添加液(2/3PAS-ⅢM+1/3血浆)保存。比较3组PC在(22±2)℃保存7 d内血小板含量、红细胞残留量、血小板聚集功能、CD62p阳性表达率、抗低渗休克(HSR)能力、pH值及细菌生长等指标。**结果** 与即时PBC组相比,在保存期7 d内BC室温过夜组血小板含量更高且能改善血小板聚集功能,而红细胞残留量、CD62p阳性表达率、HSR能力、pH值及细菌生长等指标无明显差异;与即时PBC组相比,在保存期7 d内WB室温过夜组血小板含量更高且血小板HSR能力也更强,而红细胞残留量、血小板聚集功能、CD62p阳性表达率、pH值及细菌生长等指标两组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** BC室温过夜、PBC法和WB室温过夜PBC法均能安全、可靠、方便地制备PC,且均可代替即时PBC法制备PC。

关键词:浓缩血小板;汇集白膜层法;质量分析
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.028 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)04-0451-03

The comparison among the three models of pooled buffy coats in preparing the platelet concentrate

Wang Shuying[1], *Li Xiaoming*[2△], *Liu Zhenyue*[1], *Zhang Jianmin*[1]
(1. *Department of Blood Transfusion*; 2. *Department of Clinical Laboratory*, *Affiliated Hospital of Chengde Medical College*, *Chengde*, *Hebei* 067000, *China*)

Abstract:Objective To compare the quality and preservation effect among the three models of pooled buffy coats(PBC) in preparing the platelet concentrate(PC). **Methods** 63 identical ABO blood donations were randomly and averagely divided into three groups:the immediate PBC group($n=21$),the buffy coats(BC) group($n=21$) and the whole blood(WB) group($n=21$). In the immediate PBC group,both the separation of the BC and the preparation of the PC was finished in the first day after collecting the WB;in the BC group,the separation of BC was executed in the first day after collecting the WB,while the preparation of the PC was completed in the second day;in the WB group,both the separation of the BC and the preparation of the PC was implement in the second day after collecting the WB. All the prepared PC were storage at (22±2) ℃ for seven days in the preservation solution (composed by 2/3 PAS-ⅢM and 1/3 plasma). Then compare the platelet(PLT) counts,the red blood cell(RBC) residual quantities,the aggregative function of PLT,the positive expression rates of CD62p,the capability of hypotonic shock response(HSR),the PH value and the bacterial growth among PCs prepared by the three models during the stored time. **Results** Compared the immediate PBC group during the seven stored days,the PLT counts of the BC and WB groups were more,the aggregative function of PLT in the BC group was better and the capability of HSR in the WB group was stronger,but the other indexs between the immediate PBC group and the BC or WB group were no significant difference($P>0.05$). **Conclusion** Both an overnight holding of BC and WB at room temperature models of PBC to prepare the PC are safe,reliable and convenient,and they could be substitute for the immediate PBC model to prepare the PC.

Key words:platelet concentrate;pooled buffy coats;quality analysis

目前,国内传统手工制备浓缩血小板(PC)方法包括富含血小板血浆法和白膜法(BC),而汇集白膜层法(PBC)手工制备PC已在欧美国家广泛开展,且这一方法也逐渐在国内推广[1]。PBC制备PC又分为即时PBC法、BC室温过夜法和全血(WB)室温过夜法3种不同模式,后两种模式是在即时PBC法基础之上进行改进获得的工艺,但这两种模式获得PC的质量及保存效果与即时PBC法有无差异却不得而知。因此,本研究中采用这3种模式PBC法制备PC并对不同模式获得的PC质量及保存效果进行了比较,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取ABO血型均为O型志愿献血者63名,所有志愿者均符合《中华人民共和国献血法》健康检查标准,其中男38例,女25例,平均(31.15±10.75)岁,志愿献血者血液来源及PC制备过程均在承德市中心血站完成。依据制备PBC的3种不同模式将63名志愿献血者分为:即时PBC组、BC室温过夜组和WB室温过夜组,每组21例,采集每名志愿献血者新鲜WB 400 mL。

1.2 仪器及试剂 RC-12BP大型离心机、Coulter 755全自动血细胞分析仪、流式细胞仪、荧光标记抗血小板表面糖蛋白单克隆抗体CD62p-PE(批号:358217)及同型对照IG1-PE(批号:556372)均购于美国贝克曼库尔特公司;TSCD-201A无菌导管接口机购于日本泰尔茂公司;血小板恒温保存箱购于苏州医用仪器厂;PAS-ⅢM联袋及PAS-ⅢM血小板保存液购于山东威高集团(pH 7.2);四联采血袋购于日本泰尔茂公司;血小板

作者简介:王舒莹(1971-),学位本科,主管检验师,主要从事临床输血与检验。 △ 通讯作者,Tel:13932421256;E-mail:lxm2950075@126.com。

表 1　BC 室温过夜组、WB 室温过夜组与即时 PBC 组相关指标比较($\overline{x}\pm s$,$n=7$)

分组	血小板计数				红细胞残留量				CD62p 阳性表达率			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
即时 PBC 组	10.51±3.79	10.31±3.65	10.25±3.62	10.19±3.58	3.21±0.68	3.11±0.64	2.97±0.67	2.87±0.63	25.23±7.34	30.12±8.71	38.45±10.64	42.35±9.27
BC 室温过夜组	14.96±3.18*	14.89±3.13*	14.85±3.08*	14.79±3.01*	3.18±0.63	3.07±0.59	2.94±0.63	2.82±0.60	23.89±8.65	28.97±7.89	37.96±9.46	40.78±10.34
WB 室温过夜组	15.93±2.73#	15.75±2.59#	15.68±2.47#	15.54±2.41#	3.12±0.58	3.08±0.61	2.87±0.56	2.77±0.59	24.39±7.69	29.43±9.11	39.12±9.39	41.37±10.49

续表 1　BC 室温过夜组、WB 室温过夜组与即时 PBC 组相关指标比较($\overline{x}\pm s$,$n=7$)

分组	HSR 能力				pH 值				血小板对 ADP 聚集率(%)			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
即时 PBC 组	66.87±8.76	55.43±8.28	50.67±7.99	44.93±8.35	7.12±0.05	7.09±0.04	7.05±0.06	7.08±0.04	84.43±11.29	67.76±10.03	31.17±6.45	21.35±5.49
BC 室温过夜组	67.34±8.42	56.38±8.39	51.17±8.18	46.08±8.09	7.08±0.03	7.11±0.05	7.09±0.04	7.04±0.06	86.49±11.87	77.14±10.76*	50.34±8.34*	39.98±7.34*
WB 室温过夜组	68.49±9.34	65.39±8.15*	59.17±8.64*	53.12±7.69*	6.99±0.06	7.03±0.04	7.01±0.06	7.02±0.03	84.29±11.45	68.13±10.28	34.33±6.32	23.17±4.93

*:$P<0.05$,与即时 PBC 组比较;#:$P<0.01$,与即时 PBC 组比较。

型白细胞过滤器汇集袋购于南京双威;血小板贮存袋购于美国 Haemonetics 公司;任一志愿献血者的新鲜血浆(FFP);血气仪及血气试剂盒购于美国雅培(批号:A11824);Th 肉汤培养基(巯基乙酸酯培养基,批号 12A0219)购于武汉众一生物科学技术公司;血小板聚集诱导剂二磷酸腺苷(ADP)购于美国 sigma 公司(批号:A-21169);UNIC7200 型分光光度计购于上海分析仪器厂。

1.3　方法

1.3.1　PAS-ⅢM PBC-PC 的制备方法　(1)将四联袋采集的志愿献血者新鲜全血(每袋 400 mL)于(22±2)℃保存,以 2 600 r/min 的转速强离心 13 min 分离出 BC,热合后与联袋离断;(2)将 3 袋检验合格的 BC 通过无菌导管接口机汇集到 PAS-ⅢM 联袋中[2],并往 PAS-ⅢM 联袋加入 100 mL PAS-ⅢM 血小板保存液(包括冲洗装 BC 的袋子所用的 PAS-ⅢM)获得 PBC;(3)将 PBC 轻轻混合均匀后以 1 500 r/min 离心 10 min,分离出富含血小板血浆;(4)将富含血小板血浆再以 600 r/min 轻离心 5 min 以除去残留的红细胞,至此即获得由 PBC 制备出的 PC;(5)将获得 PC 通过血小板型白细胞过滤器过滤。即时 PBC 组上述过程于采集 WB 当天完成;BC 室温过夜组先在第 1 天完成前 2 步分离出 BC,将 BC 于(22±2)℃保存放置过夜,于第 2 天继续后续步骤;WB 室温过夜组则将 WB 于(22±2)℃保存放置过夜,第 2 天完成全部制备步骤。所有获得的 PC 均保存在由 2/3 PAS-ⅢM 和 1/3 血浆组成的保存液中,于 4 ℃保存 7 d。

1.3.2　血小板及红细胞残留量计数　于保存期第 1、3、5、7 天,使用全自动血细胞分析仪对获得的 PC 作血细胞计数。

1.3.3　血小板聚集反应的测定　使用任一志愿献血者的新鲜贫血小板血浆将 3 组 PC 样本中血小板浓度稀释到 250×10^9 L^{-1},在 250 μL 稀释后血小板样本中加入 25 μL ADP,再使用血小板聚集仪测定样本中血小板对诱导剂 ADP(浓度为 20 μmol/L)的最大聚集率[3],于保存期第 1、3、5、7 天各检测 1 次。

1.3.4　血小板膜表面糖蛋白 CD62p 表达率检测　于保存期第 1、3、5、7 天,参照文献[4]应用流式细胞仪对 3 组 PC 进行血小板表面糖蛋白 CD62p 表达率的检测:在两只流式细胞仪试管中分别加入 IG1-PE 及 CD62p-PE,随后加入一组经稀释处理好的血小板样本,混合均匀后置于避光处 20 min,再用 1% 的多聚甲醛于 4 ℃固定,10 min 后用流式细胞仪检测 CD62 表达率。

1.3.5　抗低渗休克(HSR)能力的测定　于保存期第 1、3、5、7 天,参照文献[5]使用分光光度计对 3 组 PC 的 HSR 进行测定。分光光度计使用波长 630 nm,将乏血小板血浆(PPP)调零,一只测试杯加入用蒸馏水稀释的样本(稀释比例为 1.0∶1.5),测最大透光率 Tmax,10 min 后测透光率 T10;另一只测试杯则加入用血浆稀释的样本(稀释比例为 1.0∶1.5),测透光率 TP。HSR 恢复率 = (Tmax − T10)/(Tmax − TP) × 100%。

1.3.6　测定 pH 值　使用血气分析仪及血气试剂盒测定 3 组 PC 保存期第 1、3、5、7 天的 pH 值。

1.3.7　细菌培养　细菌培养采用肉汤培养基,取各组样本后进行细菌培养。

1.4　统计学处理　采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\overline{x}\pm s$ 表示;采用独立样本 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,结果以率和构成比表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　取各组保存期第 1、3、5、7 天的样本进行细菌培养,结果均无细菌生长。

2.2　BC 室温过夜组与即时 PBC 组相关指标比较　与即时 PBC 组相比,在保存期 7 d 内 BC 室温过夜组血小板含量均更高,且能改善血小板聚集功能,差异有统计学意义($P<0.05$);而红细胞残留量、CD62p 阳性表达率、HSR 能力、pH 值等指标差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3　WB 室温过夜组与即时 PBC 组相关指标比较　与即时 PBC 组相比,在保存期 7 d 内全血室温过夜组血小板含量更高且血小板 HSR 能力增强,差异有统计学意义($P<0.05$);而红细胞残留量、血小板聚集功能、CD62p 阳性表达率、pH 值等指标两组差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

3　讨　论

PBC 制备 PC 的方法最早由 Bertolini 等[6]于 1989 年报道,既往研究报道患者在输入此方法制备并保存 12 d 的 PC 仍可使血小板计数迅速升高且出血时间缩短,而保存期间反映 PC 功能和质量的指标如 HSR 能力及 pH 值等均符合要求[7]。此外,PBC 手工制备 PC 具有以下优点:(1)PBC 法制备的 PC 保存液由 2/3 PAS-ⅢM 和 1/3 血浆组成,这使血浆得到了节约;(2)由于在制备过程中使用多次过滤处理去除了白细胞且

保存液中血浆较少，这大大减少了患者再输注过程中不良反应的发生；(3)该法制备的PC保存期可长达7 d或以上[8]；(4)患者所需的治疗费用明显降低，正是以上这些优点使得PBC制备PC有广阔的前景。但是传统的即时PBC制备PC模式要求在1 d内完成血液的采集、BC分离与合格性的检测、汇集BC制备PC以及后续的PC保存处理等多项工作，由于时间紧迫往往增加工作人员的夜间工作量及各采血点到血液中心或中心血站运送血液频次[9]，给制备工作带来了很大的不便。为解决上述问题，近年来研究人员尝试采用BC室温过夜法和WB室温过夜法这两种新模式进行PC制备，但室温过夜是否会对PC的质量及保存效果有所影响却有待评价。因此，笔者尝试依据制备PBC的3种不同模式对志愿者的血液进行分组，以探讨这3种PBC模式制备的PC质量及保存效果有无差异。

在本研究中，与即时PBC组相比BC室温过夜PBC组制备的PC含量更高，且能改善血小板聚集功能，而其他相关指标却无明显差异。其原因可能为：刚分离出的BC，其中的白细胞和血小板极易相互黏附聚集形成微聚体，如果此时立即制备PC，由于血小板与白细胞分离不够完全，一方面可导致血细胞计数仪无法识别出微聚体中的血小板，从而使即时PBC模式制备出的PC含量往往较低，另一方面也导致血小板聚集功能大大受损。而随着BC储存时间的延长(如BC室温过夜处理)，由于血小板对外界刺激的敏感性降低，血小板可与白细胞分离使已形成的微聚体充分解聚，此时的血小板就可以被血细胞计数仪识别从而使BC室温过夜模式制备的PC含量增加，而制备出的PC也能重新发挥其聚集功能[10-11]。此外，最近的研究提示WB室温过夜PBC法制备的PC含量可较即时PBC制备的PC平均高出18.60%～33.00%[12-13]，与本研究结果相符，其原因可能与WB室温放置过夜后更容易分离出血小板有关[4]。笔者还观察到，WB室温过夜PBC法制备的PC其HSR能力也较即时PBC法制备的PC强，血小板HSR能力与其在体内的存活率密切相关[14]，制备出的血小板HSR能力越强，其形态与功能也就越接近正常的血小板，但WB室温过夜PBC法制备的PC其HSR能力增强的原因目前尚不清楚，其机制有待进一步地研究。

本研究中获得的PC保存于4 ℃条件下，这与以往PC采取(22±2)℃保存不同，其原因在于本研究采用的是PC保存液由2/3 PAS-ⅢM和1/3血浆组成，而传统方法则完全使用血浆进行PC保存。既往研究表明，在完全使用血浆保存PC时，4 ℃保存条件下，血小板易发生激活、凝集等现象，这大大减弱了血小板的功能[15]。而采用PC保存液进行PC保存时，4 ℃与(22±2)℃条件下保存的PC其功能并无明显差异[5]，即PC保存液能大大减少4 ℃条件下血小板发生激活、凝集的可能，因此在PC保存液中的PC于4 ℃条件下保存是可行的。此外，本研究涉及长期保存血小板且在研究过程中需多次检测多项指标，如PC保存于(22±2)℃条件下，将大大增加发生细菌生长的可能，所以本研究最终采取了4 ℃条件下保存。

总之，BC室温过夜PBC法和WB室温过夜PBC法均能安全、可靠、方便地制备PC，且均可代替即时PBC法制备PC。

参考文献：

[1] 陈红霞，赵风绵，王毅，等.白膜法汇集血小板的现状和前景[J].临床输血与检验，2007，9(2)：189-192.

[2] Pérez-Pujol S，Lozano M，Perea D，et al. Effect of holding buffy coats 4 or 18 hours before preparing pooled filtered PLT concentrates in plasma[J]. Transfusion，2004，44(2)：202-209.

[3] 卢发强，赵士刚，杨玉清，等.白膜层过夜放置对汇集手工浓缩血小板聚集反应和体外激活的影响[J].中国输血杂志，2008，21(5)：364-365.

[4] 刁荣华，王泽蓉，黄朴，等.全血室温过夜制备浓缩血小板制剂的质量分析[J].中国输血杂志，2011，24(11)：930-932.

[5] 赵凤绵，孙晓红，张爱红，等.采用HSR方法测定手工汇集浓缩血小板在不同保存温度下的保存效果[J].中国输血杂志，2008，21(2)：116-118.

[6] Bertolini F，Rebulla P，Riccardi D，et al. Evaluation of platelet concentrates prepared from buffy coats and stored in a glucose free crystalloid medium[J]. Transfusion，1989，29(7)：605-609.

[7] Bertolini F，Rebulla P，Marangoni F，et al. Platelet concentrates stored in synthetic medium after filtration[J]. Vox Sang，1992，62(2)：82-86.

[8] Sandgren P，Shanwell A，Gulliksson H. Storage of buffy coat-derived platelets in additive solutions：in vitro effects of storage at 4 ℃[J]. Transfusion，2006，46(2)：282-834.

[9] Thibauh L，Beaujour A，de Grandmont MJ，et al. Characterization of blood components prepared from whole blood donations after a 24 hour hold with the platelet-rich plasma method[J]. Transfusion，2006，46(8)：1292-1299.

[10] Van der Meet PF，de Wildt-Eggen J. The effect of whole-blood storage time on the number of white cells and platelets in whole blood and in white cell-reduced red cells[J]. Transfusion，2006，46(4)：589-594.

[11] Pielerse RN，de Korte D，Reesink HW，et al. Storage of whole blood for up to 24 hours at ambient temperature prior to eomponent preparation[J]. Vox Sang，1989，56(3)：145-150.

[12] Pieter F，vander Meer，Jose A，et al. Evaluation of the overnight hold of whole blood at room temperature，before component processing：platelets(PLTs) from PLT-rich plasma[J]. Transfusion，2011，51(1S)：S45-49.

[13] Lu FQ，Kang W，Peng Y，et al. Characterization of blood components separated from donated whole blood after an overnight holding at room temperature with the buffy coat method[J]. Transfusion，2011，51(10)：2199-2207.

[14] Murphy S，Rebulla P，BeItolini F，et al. In vitm mment of the quality of stored plaielet concentrates. The BEST(biomedieal excellence for safer transfusion)task force of the intemadonal society of blood transfusion[J]. Transfus Med Bey，1994，8(1)：29-36.

[15] Connor J，Currie LM，Allan H，et al. Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4 ℃ and treatedwith second-messenger effectors[J]. Transfusion，1996，36(8)：691-698.

(收稿日期：2013-09-08 修回日期：2013-10-22)