

文章编号:1007-6735(2013)02-0187-06

搁板温度对人血小板冻干保存的影响

王 波¹, 周 正², 徐梦洁², 许先国³, 张绍志², 陈光明²

(1. 解放军第117医院 危重病医学科, 杭州 310013; 2. 浙江大学 能源工程学系, 杭州 310027;
3. 浙江省血液中心 输血研究所, 杭州 310006)

摘要: 一次干燥温度位的高低直接影响一次干燥所需时间. 实验研究了干燥箱搁板温度对血小板冷冻干燥保存的影响, 检测了冻干血小板复水后的数值恢复率、细胞形态和结构、血小板凋亡和活化等指标, 与新鲜组进行了对照分析. 结果显示: 当搁板温度为 -30°C 时, 血小板冻干复水后的数值恢复率为 $(89.0 \pm 3.2)\%$; 血小板平均体积(MPV)和分布宽度(PDW)值分别为 (12.4 ± 1.5) fL 和 $(18.3 \pm 1.5)\%$, 在可以接受的范围之内; 未凋亡率为 $(87.5 \pm 2.6)\%$, 非活化率为 $(80.4 \pm 2.6)\%$.

关键词: 血小板; 冷冻干燥保存; 一次干燥; 搁板温度; 恢复率
中图分类号: R 318.52 **文献标志码:** A

Effects of Shelf Temperature on the Lyophilization of Human Platelets

WANG Bo¹, ZHOU Zheng², XU Mengjie², XU Xianguo³, ZHANG Shaozhi², CHEN Guangming²

(1. Department of ICU, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China;
2. Department of Energy Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;
3. Institute of Transfusion Medicine, Blood Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, China)

Abstract: The time duration needed for primary drying is directly related with the temperature level used during the primary drying process. The effects of shelf temperature of the drying cabinet on the lyophilization of human platelets were experimentally studied. The cell recovery rate after rehydration, the morphological and structural changes, the non-apoptosis rate and the non-activation rate were detected and compared with those of fresh set. The results show that when the shelf temperature is set at -30°C , the cell recovery rate after rehydration reaches $(89.0 \pm 3.2)\%$ and the MPV and PDW were (12.4 ± 1.5) fL and $(18.3 \pm 1.5)\%$ respectively, both of which are within acceptable ranges. The non-apoptosis rate of rehydrated platelets is $(87.5 \pm 2.6)\%$ and the non-activation rate is $(80.4 \pm 2.6)\%$.

Key words: platelet; freeze drying preservation; primary drying; shelf temperature; recovery rate

血小板输注在临床治疗上有重要应用,然而,现有的血小板保存方法都存在很大的局限性,冷冻干燥将为血小板的长期保存提供一种较为理想的方法,相关研究近年来在国内外都得到了重视.影响冻干血小板复水后恢复率和功能的因素有很多,如保护剂种类和浓度^[1-3]、冻结速率^[4]、复水条件^[5]等.冻干过程的其它工艺参数,如温度、压力和干燥持续时间,可能对血小板冻干的效果也有影响,但目前研究还很少.其中,一次干燥温度是一个十分重要的参数,该温度过高可能导致物料出现塌陷.但一次干燥温度也不能过低,有文献指出,该温度每降低 1℃,升华干燥时间将增加 13%^[6].干燥时间的延长,不仅影响生产效率,而且可能影响冻干效果.本文作者曾在 -38~-40℃ 的搁板温度下进行过 1 mL 血小板悬浮液的冻干,效果较好,但由于一次干燥温度位低,干燥持续时间长达 16~18 h.如果增加血小板的容量,或加厚冻干瓶内装液的高度,持续时间会更长.为了缩短一次干燥时间,本文将尝试采用比 -38℃ 高的搁板温度进行血小板的一次干燥,根据冻干血小板复水后的数值恢复率、凋亡及活化情况,来寻找更加合适的一次干燥参数.

1 材料和方法

1.1 血小板洗涤

新鲜浓缩血小板($1.0 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 血小板/mL)来自健康无偿献血者,由浙江省血液中心提供.将富含血小板的血浆离心 15 min,使血小板沉淀并去除上层血浆;而后加适量生理盐水,将血小板打散使之悬浮;之后再离心 10 min,收集血小板,重复此操作两次.

1.2 海藻糖载入血小板

用含有 50 mmol/L 海藻糖的缓冲液(100 mmol/L NaCl、10 mmol/L KCl 和 10 mmol/L EGTA)将洗涤后的血小板重悬,制成浓度约为 1×10^9 个/mL 的孵化悬浮液;将上述处理后的血小板孵化悬浮液置于 37℃ 的恒温震荡水浴中孵化,震荡频率为 40 次/min,得到的血小板内海藻糖浓度达到约 13 mmol/L^[7].

1.3 血小板的冷冻干燥

冻干保护液的基准缓冲液(PBS 缓冲液)由 9.5 mmol/L HEPES、142.5 mmol/L NaCl、4.8 mmol/L KCl 及 1 mmol/L MgCl₂ 组成.以上述冻干缓冲液作为基准液,加入 1% 牛血清白蛋白(BSA,上海生工)

作为塑性剂,加入 20% 海藻糖($C_{10}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$,北京经科宏达生物技术有限公司)作为细胞外保护剂,浓度百分比以 $w/v(g/100\text{ mL})$ 表示,配置成血小板冻干保护液.将已载入海藻糖的血小板洗涤后重悬于该冻干保护液中,调整细胞悬浮液浓度为 1×10^9 个/mL 左右.

取 1 mL 血小板冻干悬浮液装入直径为 25 mm 的玻璃瓶中,放入 -60℃ 低温冰箱中进行预冻,其冷却速率约为 10℃/min^[8].维持 2 h 之后,迅速取出冻结的血小板样品,置于预先冷却至一次干燥温度的 FreeZone^{12plus} 型冻干机(LabConco,美国)冻干箱内隔板上,进入预先设定好的程序,一次干燥时间为 20 h.一次干燥结束后以 0.2℃/min 的加热速率使搁板温度升至二次干燥温度 20℃,二次干燥时间为 10 h.一次干燥参数见表 1.

表 1 血小板一次干燥温度参数

Tab.1 Primary drying temperatures of platelet lyophilization

℃

组别	1	2	3	4	5	6	7
一次干燥温度	-40	-35	-32	-30	-28	-25	-20

1.4 冻干血小板复水

将 PBS 缓冲液和蒸馏水以 3:1 比例混合制成血小板冻干复水液,将 1 mL 的复水液在室温下直接加入冻干样品瓶中,轻轻震荡,样品迅速完全溶解于复水溶液中.

1.5 冻干复水血小板血液学分析

用 CELL-DYN1700 型血球计数仪(Abbott,美国)分别对冻干前的血小板和冻干复水后的血小板计数,血小板冻干保存的数值恢复率(R_P)的计算公式为

$$R_P = N_a / N_b \times 100\%$$

式中, N_a 表示冻干复水后的血小板计数; N_b 表示冻干前的血小板计数.

利用血球计数仪测定复水后的血小板平均体积(MPV)以及分布宽度(PDW),得到 PDW 曲线.

1.6 冻干复水血小板活化的三色流式分析

1.6.1 冻干复水血小板凋亡检测

本实验以 1 mL 新鲜富含血小板血浆(PRP)为阴性对照,1 mL 冻干后的血小板为实验样品,采用流式细胞仪 FACSCalibur(BD,美国)进行检测,步骤如下:

a. 样本制备.实验组和对照组的血小板悬液样品离心 3 min(1 500 转/min),用 0.5 mL 结合缓冲

液(Binding Buffer)重悬.

b. 荧光染色. 取 10 μL 该溶液加入流式专用管 (BD, 美国), 再依次向管中加入 10 μL PI 染色剂和 5 μL Annexin V-FITC 试剂, 添加试剂后的 BD 管室温避光 15 min 进行染色.

c. 避光染色后的 BD 管中加入 500 μL 生理盐水稀释, 1 h 之内上机检测.

d. 数据结果使用 CellQuest 软件进行分析.

1.6.2 冻干复水血小板活化检测

本实验以 1 mL 新鲜富含血小板血浆 (PRP) 为阴性对照, 1 mL 核苷酸 (ADP) 处理后的活化血小板为阳性对照, 1 mL 冻干后的血小板为实验样品, 采用流式细胞仪进行检测, 步骤如下:

a. 样本制备. 实验组和对照组的血小板悬液样品离心 3 min (1 500 转/min), 用 0.5 mL 结合缓冲液 (Binding Buffer) 重悬.

b. 荧光染色. 取 10 μL 该溶液加入流式专用管, 再依次向管中加入 7.5 μL CD62p-PE 和 PAC-1 FITC, 添加试剂后的 BD 管室温避光 15 min 进行染色.

c. 避光染色后的 BD 管中加入 500 μL 生理盐水稀释, 1 h 之内上机检测.

d. 数据结果使用 CellQuest 软件进行分析.

1.7 统计分析

实验结果以 5 次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差表示, 组间统计显著性差异 P 用异方差假设 t 检验进行比较.

2 结果

2.1 一次干燥温度位对血小板数值恢复率的影响

将密封保存于室温下的冻干血小板复水, 7 种不同温度位下的血小板冻干复水后的数值恢复率分别为 $(60.4 \pm 8.0)\%^{a,b}$, $(80.8 \pm 3.9)\%^{b,c}$, $(84.1 \pm 4.4)\%^{c,d}$, $(89.0 \pm 3.2)\%^{a,d,e}$, $(89.5 \pm 2.1)\%$, $(89.6 \pm 1.6)\%$, $(89.9 \pm 1.4)\%^e$, 如图 1 所示. (注: $a: P = 0.000$; $b: P = 0.001$; $c: P = 0.233$; $d: P = 0.365$; $e: P = 0.572$)

结果表明, 冻干复水后的血小板数值恢复率随着温度的降低而增加, 到达 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时基本不变, 达到 89% 左右. 随着干燥温度的上升, 冻干复水后血小板恢复率迅速下降, 达到 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时下降至 61%.

2.2 一次干燥温度位对血小板形态分布的影响

表 2 表示血小板的 MPV 和 PDW 值随一次干

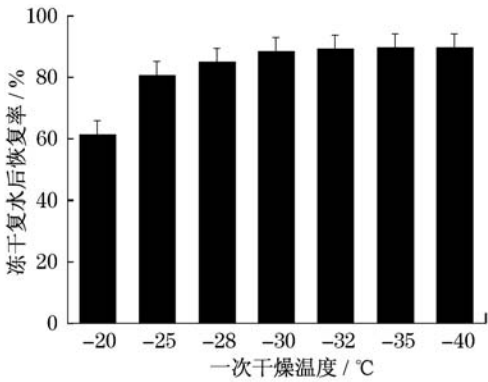


图 1 冻干复水后血小板的数值恢复率 ($n = 5$)
Fig.1 Numerical recovery rate of platelets after freeze-drying and rehydration ($n = 5$)

燥温度的变化关系.

表 2 冻干前后血小板的 MPV 和 PDW ($n = 5$)
Tab.2 MPV and PDW of platelets before and after lyophilization ($n = 5$)

一次干燥 温度/ $^{\circ}\text{C}$	冻干前血小板		冻干后血小板	
	MPV/ fL	PDW/ $\%$	MPV/ fL	PDW/ $\%$
-20	10.3 ± 1.2	15.9 ± 0.3	16.5 ± 1.6	20.3 ± 1.1
-25	10.3 ± 0.1	15.6 ± 0.2	16.1 ± 1.3	20.9 ± 1.0
-28	10.3 ± 0.1	15.6 ± 0.1	14.5 ± 1.4	20.1 ± 1.5
-30	10.2 ± 0.2	15.4 ± 0.4	12.4 ± 1.5	18.3 ± 1.5
-32	10.2 ± 0.2	15.5 ± 0.2	12.2 ± 1.3	18.2 ± 1.3
-35	10.0 ± 0.3	16.0 ± 0.2	11.8 ± 1.0	18.2 ± 1.1
-40	9.9 ± 0.3	15.8 ± 0.3	10.9 ± 0.7	17.6 ± 0.8

实验结果表明, 不论一次干燥温度的取值为多少, 血小板冻干复水后的 MPV 和 PDW 值均较复水前偏大, 一部分实验组的值甚至超过了人体血小板的正常标准参考值, 说明血小板冻干和复水过程对其形态和体积分布影响较大.

2.3 冻干血小板凋亡标志物的表达

使用流式细胞仪对 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为一次干燥温度的冻干血小板进行凋亡检测, 检测结果用 CellQuest 软件进行分析, 结果如图 2 (见下页) 所示. 首先根据血小板大小和颗粒性在前向角/测向角散射光 (FSC/SSC) 中设门 R2 (图 2(a) 中横坐标和纵坐标分别代表前向角与测向角散射光信号强度). 由于 CD61 能与血小板细胞特异性结合, 对 R2 区域中的细胞, 在图 2(b) 中标志 CD61-PerCP 为阳性的细胞设门 R1 (图 2(b) 中横坐标表示 PerCP 荧光信号强度), 区分血小板细胞和其它碎片及污染物, 对 R1 区域中的血小板进行凋亡和活化分析.

Annexin V-FITC 能与细胞膜上凋亡早期的标

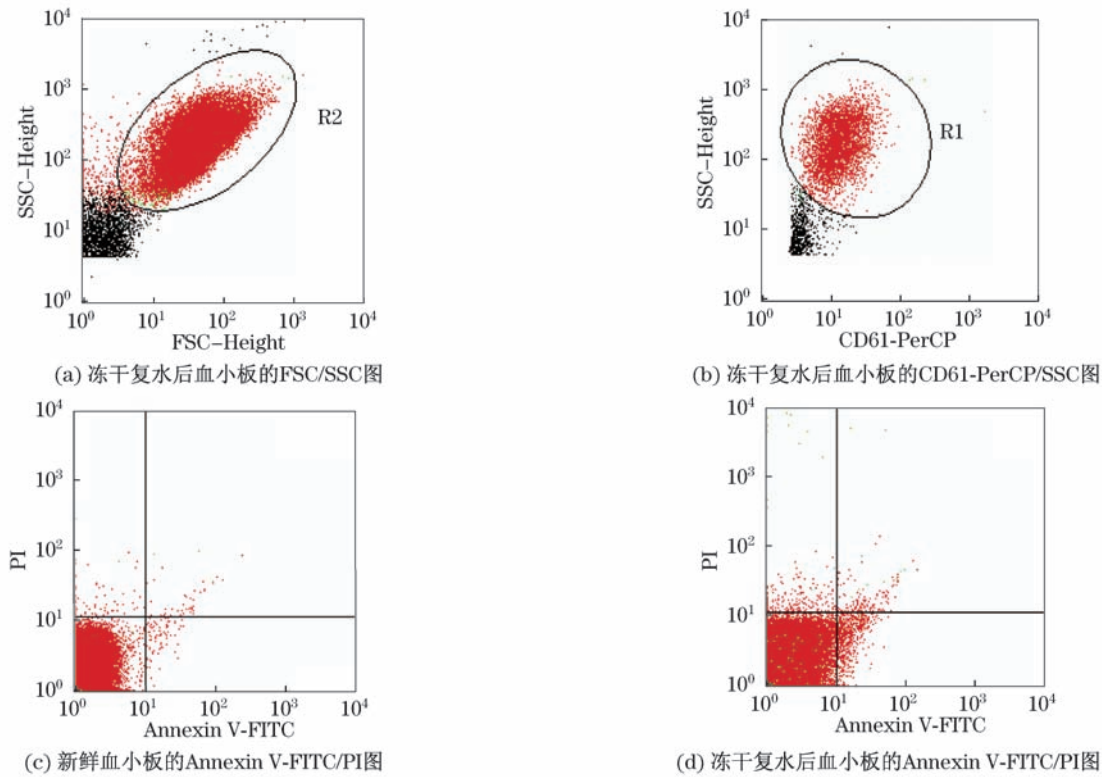


图2 流式细胞术(FCM)检测冻干复水后的血小板凋亡率

Fig.2 Apoptosis rate of platelets detected by FCM

志物磷脂酰丝氨酸结合呈阳性,PI 染色剂能进入细胞膜被破坏的细胞中,与染色体结合呈阳性.根据新鲜血小板将图 2(c)分为 4 个象限,左下象限为非活化的存活血小板,右下象限为早期凋亡的血小板,左上和右上象限 PI 染色呈阳性,表示晚期凋亡或死亡的血小板.图 2(c),(d)中横坐标与纵坐标分别表示 FITC 与 PI 荧光信号强度.

结果表明,实验组和对照组的活细胞数均占血小板总数的 85% 以上,但是冻干复水后血小板的细胞凋亡率显著高于新鲜血小板的自然凋亡率.详细数据参见表 3.

表 3 Annexin V/PI 荧光标记法检测血小板的凋亡 (n = 5)

Tab.3 Apoptosis rate of rehydrated platelets detected by Annexin V/PI fluorescent mark method (n = 5)

组别	Annexin V 阴 PI 阴	Annexin V 阳 PI 阴	Annexin V 阴 PI 阳	Annexin V 阳 PI 阳
新鲜血小板 (阴性对照组)	98.8±0.3	0.5±0.2	0.5±0.1	0.2±0.1
-30℃ 冻干 复水血小板 (实验组)	87.5±2.6	7.8±1.3	3.0±0.4	1.7±0.3

2.4 冻干血小板活化标志物的表达

PAC-1-FITC 和 CD62P-PE 分别为血小板表面活化早期标志物和活化晚期的标志物.根据新鲜血小板阴性对照同样将图 3(a)分为 4 个象限,左下象限为非活化血小板,右下象限为活化早期血小板,右上象限为活化晚期血小板.利用流式细胞术(FCM)检测血小板活化标志物 PAC-1 和 CD62p 的表达,图 3 为 CellQuest 分析结果,图中横坐标和纵坐标分别表示 FITC 和 PE 荧光信号强度.最终详细数据参见表 4.

表 4 PAC-1/CD62p 荧光标记法检测血小板的活化 (n = 5)

Tab.4 Activation rate of rehydrated platelets detected by PAC-1/CD62p fluorescent mark method (n = 5)

组别	PAC-1 阴 CD62p 阴	PAC-1 阳 CD62p 阴	PAC-1 阴 CD62p 阳	PAC-1 阳 CD62p 阳
新鲜血小板 (阴性对照组)	94.2±0.3	1.4±0.2	4.2±0.1	0.2±0.1
ADP 处理后的 新鲜血小板 (阳性对照组)	52.2±0.2	0.6±0.1	46.0±0.2	1.1±0.1
-30℃ 冻干复 水血小板 (实验组)	80.4±2.6	4.6±1.4	11.9±1.3	3.1±0.3

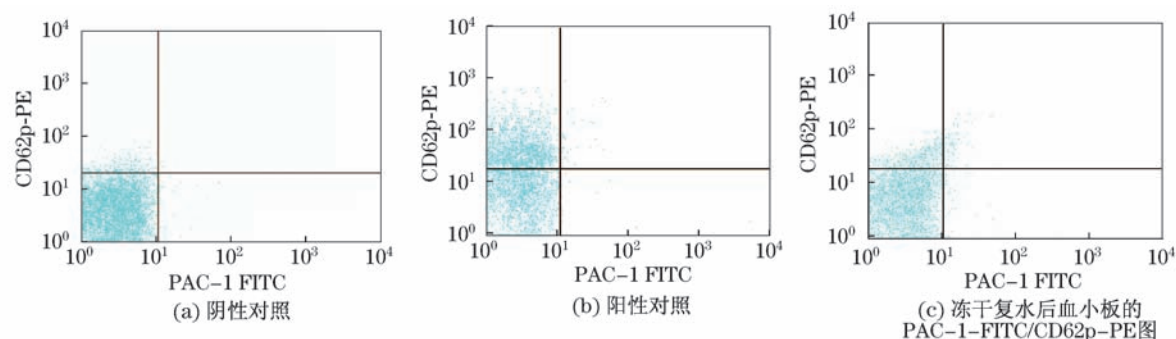


图3 FCM检测冻干复水后的血小板活化率

Fig.3 Activation of rate platelets detected by FCM

3 讨论

冷冻干燥法保存血小板可以大大延长血小板的保存期限,并且具有轻便易带、复水后可以直接使用等优点,近年来成为血小板保存技术研究的热点^[9].目前国内关于血小板冷冻干燥保存的研究主要是针对保护剂配方优化而进行的.周新丽等研究了海藻糖作为细胞内外保护剂的冻干配方问题^[7].曹伟等研究了乙醛前处理和海藻糖载入血小板的问题^[10],刘景汉等研究了海藻糖加载技术和测定方法^[8].优化冻干参数方面的研究目前仍很少,虽然已有学者对冷冻速率、退火等预冻过程中的操作参数进行了一定的研究,但是对于干燥过程的参数几乎无涉及,尤其是一次干燥温度的选取.在食品、药品和微生物冷冻干燥领域,有学者认为物料的温度在整个冻干过程必须始终低于其部分玻璃化转变温度 T_g' ^[11-12],也就是说一次干燥的温度必须低于 T_g' .另有学者认为,结晶型系统的一次干燥温度要低于物料的共晶温度 T_c ,无定形系统的一次干燥温度要低于物料的 T_g' ^[13-16].对于无定形系统,Tang 等还提供了另外一种观点,他们根据一种蛋白质的冻干试验结果,指出一次干燥温度高于 T_g' 也是可行的^[17].

血小板冻干样品的临界温度与许多因素相关,包括预冻的进程、保护剂种类和浓度等.因此,可以通过实验的方法选择合适的一次干燥温度,一方面提高血小板冻干复水后的恢复率和功能,另一方面加快干燥过程的进程.

由上述实验结果可以看出,经过预冻的血小板保存液在 -30°C 左右的数值恢复率达到较满意的水平($>85\%$),即使温度下降到 -40°C ,恢复率提高的也并不多,但是相应的水蒸气升华驱动力却从 12.9 Pa 提高到了 38.0 Pa ^[13],大大加快了干燥进程.

虽然冻干血小板保存液的玻璃化转变温度为 -34.3°C ,但是经过冻结形成的血小板并不是完全的无定形系统,干燥过程中的临界温度也不再是其相应的玻璃化转变温度了.实验结果表明,略微提高干燥温度,并不会对样品的存活率产生很大的影响.但是,当温度上升到 -25°C 甚至 -20°C 时,会对血小板冻干后的存活率产生极大的影响,存活率明显下降,这说明温度高到已使冻结样品产生了融化现象.

对于一次干燥温度为 -30°C 以下的实验组,测得的冻干后血小板 MPV 值都在正常参考范围内.但是 -30°C 和 -32°C 组比较接近正常范围的上限,血小板的体积在冻干后有明显的变大趋势.当干燥温度高于 -30°C 后,冻干后血小板的 MPV 值则均偏离了正常范围,比 12.5 fL 的上限要大出许多.针对血小板分布宽度 PDW,只有 -40°C 实验组的冻干后血小板在正常的 $15.5\sim 18.1\text{ fL}$ 范围内,但是也比较接近正常范围的上限 18.1 fL ,这说明冻干后血小板体积变异较明显,虽然其数值恢复率达到了 90% 左右,但是血小板细胞由于冻干而产生了明显的肿胀现象,血小板的功能可能会出现一定的损失.

经过冻干后的血小板绝大部分集中于 Annexin V 阴性和 PI 阴性区,说明绝大多数的细胞仍然为活细胞,且结果与之前使用血球计数仪得到的结果相差不大(89.0%).早期凋亡的细胞约占所有血小板细胞的 7.8% ,说明冻干和复水过程对血小板存在影响,使得存在于细胞膜磷脂双分子层中的 PS 外翻暴露于细胞膜外层,细胞进入凋亡早期阶段.PI 阳性的血小板细胞占总数的 4.7% ,这说明部分血小板的细胞膜已经破裂,这些血小板在复水后将完全失去其原有的功能.但是,总体而言, -30°C 作为一次干燥温度,细胞的凋亡率比较低,仍在临床检验可接受范围之内.

-30℃冻干后的血小板复水后非活化率可以达到80%左右,说明约有20%的冻干后血小板失去了活性.荧光标记的CD62p(这里使用PE作为荧光素)抗体阳性表达的血小板百分率可反映血小板活化程度^[18].有人研究发现,保存血小板CD62p阳性率与血小板体内存活率及存活期呈负相关^[19].这表明,-30℃作为一次干燥温度保存的血小板虽然数值恢复率较高,达到了89%,但是,输注后的止血效果和存活时间可能会受到影响.刘景汉等人认为,CD62p的表达率较高,血小板在输入体内后,不能很好地满足提高外周血血小板数目的临床需求,但仍然具有较好的聚集活性和促凝血活性,可以作为临时血小板代替品进行输注^[8].他们认为,加入适量的可逆性血小板功能抑制剂可以有效地抑制血小板的体外活化,并且抑制作用是可逆的,保证了在输入体内后具有原有的黏附、释放、聚集等功能,并且具有一定的存活时间^[20].

参考文献:

- [1] 曹伟,王艳,靳鹏,等.冷冻干燥血小板保存技术研究[J].中国实验血液学杂志,2005,13(5):883-888.
- [2] 周新丽,刘宝林,张绍志,等.糖的浓度和种类对血小板冷冻干燥保存的影响[J].上海理工大学学报,2007,29(6):534-538.
- [3] Zhou X L, Zhu H, Zhang S Z, et al. Freeze-drying of human platelets: influence of intracellular trehalose and extracellular protectants [J]. Cryo-Letters, 2006, 27(1):43-50.
- [4] 周新丽,祝宏,张绍志,等.冻结速率对血小板冷冻干燥保存的影响[J].细胞生物学杂志,2006,28(3):481-485.
- [5] Fan J L, Xu X G, Zhang S Z, et al. Experimental study on rehydration conditions of freeze-dried platelets[J]. Journal of Zhejiang University: Science A, 2009, 10(5): 697-703.
- [6] Pikal M J. Use of laboratory data in freeze drying process design: heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze drying[J]. Journal of Parenteral Science and Technology, 1985, 39(3): 115-139.
- [7] 周新丽,张绍志,陈光明.人血小板的冷冻干燥保存:细胞内外保护剂的作用[J].制冷学报,2008,29(2):33-37.
- [8] 周俊,刘景汉,欧阳锡林,等.血小板胞内海藻糖测定方法的建立和评价[J].中国实验血液学杂志,2004,12(6):837-840.
- [9] 刘景汉,周俊,王冬梅,等.冷冻干燥保存血小板的实验研究[J].中国实验血液学杂志,2007,15(5):1098-1101.
- [10] 曹伟,王艳,靳鹏,等.冷冻干燥血小板保存技术研究[J].中国实验血液学杂志,2005,13(5):883-888.
- [11] 刘占杰,华泽钊,陈建明,等.药品冷冻干燥过程中的玻璃化作用[J].中国医药工业杂志,2000,31(8):380-383.
- [12] Hancock B C, Shambli S L, Zografi G. Molecular mobility of amorphous pharmaceutical solids below their glass transition temperatures[J]. Pharmaceutical Research, 1995, 12(6): 799-806.
- [13] 华泽钊.冷冻干燥新技术[M].上海:科学出版社,2006.
- [14] Patel S M, Doen T, Pikal M J. Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control [J]. AAPS PharmSciTech, 2010, 11(1): 73-84.
- [15] 毕殿洲.药剂学[M].北京:人民卫生出版社,1999.
- [16] 李华,骆艳娥,刘延琳.真空冷冻干燥微生物的研究进展[J].微生物学通报,2002,29(3):78-82.
- [17] Tang X L, Pikal M J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice [J]. Pharmaceutical Research, 2004, 21(2): 191-200.
- [18] 彭黎明,杨菁.血小板功能检测及其应用的研究进展[J].中国实验诊断学,2001,5(5):214-217.
- [19] Holme S, Sweeney J D, Sawyer S. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability[J]. Transfusion, 1997, 37(1): 12-17.
- [20] 王冬梅,刘景汉,周俊,等.腺苷对血小板体外激活的抑制作用[J].中国实验血液学杂志,2005,13(6):1094-109.

(编辑:丁红艺)