

低温-80℃保存浓缩血小板 及临床应用学习班资料

深圳市血液中心
一九九九年三月

目 录

1 低温-80℃ 保存浓缩血小板及临床应用

深圳市血液中心 杨春森

2 血小板的冰冻保存

中国医学科学院 范启修

3 血小板血型及安全输血

深圳市输血研究所 吴国光

4 成分输血及输血不良反应

深圳市血液病研究所 汪明春

5 DMSO 冰冻保存浓缩血小板的原理及应用

深圳市血液中心 孔令魁

“低温-80℃保存浓缩血小板及临床应用”

深圳市血液中心 杨春森

1. 项目研究背景:

血小板是一种重要的凝血因子,临床遇到外伤大出血或各种急性血小板减少出血不止的患者,及时补充输注血小板是临床医生将濒临死亡的患者起死回生的重要手段之一。

在输血技术不发达的时代,临床只有靠用“新鲜全血”来补充。但离体血小板在ACD血液中功能迅速衰减,72小时后已无止血作用,所以采用输注新鲜全血的方法补充血小板是不科学的。近年来,成分输血技术发展很快,利用血液单采技术已经可制备高浓度的血小板。但血小板的体外保存有较大的局限性,一是血小板浓缩液在22℃恒温条件下用振荡或旋转式保存的最长保存期不超过72小时,制备多了临床常用不了而造成巨大浪费,制备少了急诊时供应不上;其二是血小板保存严格的温、湿度条件也是细菌繁殖的最适条件,因此多数血站为防止意外污染导致严重输注事故的发生,一般都采用临床需要临时制备的预约供应方式。由于血小板无论是手工分离还是机器采集,整个程序从体检、二次化验到采集操作通常需要4~6小时,所以满足临床血小板急救供应的问题一直难以解决。再则,随着国内无偿献血条例的实施,无偿献血者尚没接受捐献血小板的观念,机采血小板供者来源严重不足产生了新的困扰。

解决上述困扰的最好方式,是研究开发一种保存时间长、输注准备时间短、止血效果好的血小板保存新技术,以真正满足临床抢救大出血的需求。为此,我们于1996年3月成立研究小组,立题《低温-80℃保存浓缩血小板及临床应用》,并开展研究工作。

2. 项目研究内容、技术路线及临床应用:

2.1 研究内容:

在查询大量资料和文献的基础上,根据我站成分分离条件、细胞冻存技术和临床输注要求,确定了本课题研究的几个关键内容,即:血小板冷冻保护剂及其最佳浓度的选择;浓缩血小板分离技术工艺的改进;冻存前后血小板功能检测及比较。

2.1.1 血小板冷冻保护剂的选择

目前最常用于冷冻生物细胞的冷冻保护剂有四种,分别是甘油、二甲基亚砷、葡萄糖和羟乙基淀粉。根据文献和初试从冰冻保存效果、毒性、制作简便、被保存物输前不用洗涤等指标,我们选择了二甲基亚砷为血小板冷冻保护剂。

二甲基亚砷(DMSO),分子式: $(CH_3)_2SO$ 为几乎无色的稀薄液体。DMSO对生物细胞在低温条件下的保护原理为:小分子的DMSO易于透过细胞膜进入细胞内,增加细胞内容质浓度,抑制细胞内冰晶的形成,有利于细胞内外溶液转变为玻璃化状态时,细胞内外的分子运动、生化反应和细胞的生物钟接近停止,因此玻璃化状态下可长期保持血小板的功能与活性,抑制冰晶形成,可避免细胞内外溶质的浓缩给细胞造成损伤。所以血小板在冰冻过程中,当细胞内外产生瞬间的渗透压差时,DMSO的分子运动可以迅速消除细胞内外的渗透压差和抑制冰晶形成,避免了细胞膜在冰冻过程中的损伤,达到低温下保存的目的。

生物体对低浓度的DMSO具有耐受性也是其能作为冷冻保存剂的一个重要条件。

输入体内的DMSO的代谢,一部份以原形于尿中排泄,一部分被氧化成二甲基砷醇缓慢地从尿中排泄,约3%代谢成二甲基硫化物经肺排出,故临床大剂量口服可嗅到病人口中呼出的大蒜臭味。由于人体使用DMSO具有一定的安全性,1980年作为静脉给药辅助药物已载入英国药典。

2.1.2 二甲基亚砷用作血小板冷冻保存剂的最佳浓度选择

文献报导5%浓度的DMSO可以较好的对冰冻血小板起到保护作用,但为了减少在输入血小板时血浆容量和DMSO的输入量,本课题采用了浓缩血小板为保存物。由于浓缩血小板的容量较少,难以控制DMSO浓度为5%的标准浓度,经实验证实DMSO浓度范围在4~6%之间均可起到较好的保护作用。

抽检冻存解融浓缩血小板其DMSO含量均值5.0%[见表1]。

2.1.3 浓缩血小板分离技术工艺的改进

本课题保存血小板影响质量水平的关键之一是如何获得理想的血小板分离技术。为此通过血小板得率的计算,我们比较了各种分离方法后,最终将血小板分离工艺选定为先轻离心制备富血小板浆、再重离心制备浓缩血小板可以获得较理想的血小板得率。

2.1.4 -80℃低温对保存血小板效果观察的研究

在研究过程中我们发现,由于本课题的保存材料为浓缩血小板,其容量少,平均约30~70ml,平放时液面薄,在-80℃条件下受温较均匀,保存效果好。同理,因为冻存浓缩血小板液面薄,在42℃水浴中冻存浓缩血小板复苏温度较均匀,可减少因温度不均所致的损伤。除此之外,5%DMSO低温保存血小板冻融后是否具有凝聚功能是血小板低温保存是否成功的重要参数,为此课题做了一系列冻存前、后血小板功能质量的观察对比实验,具体内容如下:

(1) 冻存前未加DMSO与已加DMSO浓缩血小板的比较:实验表明,血小板的聚集功能和粘附功能无显著差异;血小板第3因子活性和pH值符合标准[见表2]。

(2) 未加DMSO浓缩血小板冻存前后比较,实验表明:冻存后浓缩血小板的聚集功能丧失($P < 0.001$);粘附功能和血小板计数因血小板形态变异已无法测定[见照片];血小板第3因子活性与pH值尚无多大变化。

(3) 已加DMSO浓缩血小板,冻存前后比较,实验表明:血小板各项功能指标均符合质量要求。冰冻保存浓缩血小板延长到三个月至半年以上,均未发生显著变化。[见表2]

(4) 冻存后血小板进行了如下质量检测即:血小板回收率、白细胞计数、红细胞计数、血小板PH值、DMSO含量和微生物等多种参数的测定,均显示在本实验条件下保存的浓缩血小板符合预定要求[见表1]。

2.1.5 血小板远期保存效果观察:

本课题对血小板两年、三年的远期保存效果还待继续动态观察尚在进行,以期获得更加完整的信息。

2.2 技术路线及完成性能指标:

2.2.1 血小板供者的选择

所有采集用于血小板分离的全血均按照《中华人民共和国血站基本标准》完成HBsAg、抗HCV、抗HIV、梅毒、血型正反鉴定、ALT、Hb两次检测合格。

2.2.2 浓缩血小板制备

按常规方法用三或四联袋采集200~400毫升新鲜全血,采集后立即用二步法离心制备,去除血浆留下血小板沉淀和约30~70毫升血浆,室温静置约2小时解聚。

2.2.3 DMSO化的浓缩血小板制备及保存

解聚的浓缩血小板在百级层流室按容积缓慢加入DMSO至终浓度 $5\% \pm 1$,水平置 -80°C 冰箱保存。全部制备过程在6小时内完成。

冻存前一个单位的浓缩血小板含量标准 $>2.4 \times 10^{10}$ 个

2.2.4 冻存血小板的解冻及输注

冷冻保存的浓缩血小板从 -80°C 冰箱取出,放置 42°C 水浴中轻轻摇晃2~3分钟使之迅速融化,观察解冻后浓缩血小板,应无溶血、无气泡、无变色、无凝丝、均匀一致混悬液。临床需接输血滤器输注。

2.3 临床疗效观察

2.3.1 临床冰冻血小板输注有效指征:

所有列入临床疗效观察的病入均有程度不同的血小板减少导致的大出血或明显的慢性出血临床症状,临床输注血小板疗效凡符合以下两条指征中的一项视为有效:

(1) 输注冻存浓缩血小板18~24小时后,可观察到出血症状明显减轻;

(2) 输注冻存浓缩血小板18~24小时后,血小板计数(CCI*值) >10000 。

*: 血小板增加数(/L) = 输后18~24小时血小板计数(/L) -

输前血小板计数(/L) 血小板单位增加数 = 血小板增加数(/L) $\times$ 体表面积(M_2),

公式:

$$\text{纠正计数增加率(CCI)} = \frac{\text{绝对增加值} \times \text{体表面积}(M_2)}{\text{输入血小板数}(\times 10^{11})}$$

CCI <10000 表示有同种免疫或无效性。

2.3.2 观察对象分组情况及比较分析:

输注冻存浓缩血小板的病人根据血小板减少的病因不同,分为血液病组和非血液病组分别观察。结果显示,临床输注冻存血小板可以明显减轻各种原因导致的出血症状,总有效率可达90.57%[见表3]。输注冻存浓缩血小板24小时后,非血液病组的患者血小板计数上升较显著,但对提高血液病组患者血小板计数水平效果不显著。[见表4]。血液病组患者输注前、后血小板计数比较,血小板上升,无显著性差异,非血液病组输注前、后血小板计数患者血小板上升比较,[见表5]有显著性差异。这可能与血液病患者本身骨髓造血功能受抑制、肿瘤细胞浸润、自身抗体形成或长期反复输注随机供者血小板所致血小板输注无效性等诸多因素有关。

3. 成果的创造性和先进性:

3.1 提高浓度,减少副作用

将冻存物由富血小板浆改进为浓缩血小板,使血小板输注时减少了DMSO和血浆量的输入,减轻了患者循环负担。[见表6]

3.1.1 以一个治疗量进行比较,患者在获得相同血小板含量时,本方法输注的容积量少:[见表6]

3.1.2 以一个治疗量进行比较,患者在获得相同血小板含量时,本方法输入的DMSO量少:[见表7]

3.2 二程离心法制备浓缩血小板获得满意得率

本课题将一次离心制备的富血小板浆改为二程离心制备浓缩血小板,使血小板的回收率明显增加,质量明显提高。血小板平均得率为85.41%,国内为73±7%,国外为75%。二程离心制备的浓缩血小板中白细胞和红细胞的残存量最少[见表1]。

3.3 输血前准备时间短,适用于大出血抢救

本方法融化过程简便、无需洗涤,当临床遇急诊大出血抢救时,可即刻从低温冰箱中取出,42℃复苏后即可立给病人输注,与临时找供者做体检化验再机采分离相比,可提前约5小时输注;与冰冻富血小板浆相比,因省去解聚、洗涤步骤的时间,可提前约5个小时输注,从而为挽救垂危病人赢得了宝贵的抢救时间:[见表8]

3.4 操作步骤简化,安全性好

本课题采用浓缩血小板为保存材料,输注一个治疗量的血小板所输入的DMSO和同样方法保存的富血小板浆输注相比减少约22%,因此可以省去洗涤去除DMSO的步骤,简化了程序,减少了洗涤过程染菌的可能。由于操作简便,采血袋、浓缩血小板保存袋、DMSO所用的器皿、均等为一次性用品,安全性好。

4、社会效益和经济效益分析

随着输血医学的发展,临床已经普遍认识到成分输血的重要性,尤其是血小板成分用于临床各种急性大出血和因血小板减少导致的慢性渗血的患者抢救,发挥了巨大的作用。本课题采用低温-80℃冷冻保存血小板技术,其显著的或潜在的社会效益有:

4.1 血小板冷冻保存,突破了常规保存的时间局限,一个城市血液中心长期大量储备血小板,为该城市应付大规模突发事件、防患于未然创造了有利条件。据本课题组统计,1996年5月~1998年9月止我们总共向本市16家医院及惠州二家医院、惠州市中心血站和宝安中心血站提供冻存浓缩血小板2965单位,输注患者317例,目前尚未发现明显的输注反应。

4.2 对涉及到生命垂危的特急病例,尤其是妇产科DIC产妇的抢救,冰冻浓缩血小板具有不可替代的作用,临床已有多例抢救成功的记录,例如:

(1) 1996年7月20日市人民医院妇产科患者叶×,产后DIC、出血性休克。输冻存浓缩血小板10单位后,症状减轻,无明显出血。经治疗出院。

(2) 1997年7月28日市人民医院妇产科患者邱×,产后大出血,3P试验(++),CT不凝,病人濒死状态。输入冻存浓缩血小板8单位后,流血逐渐停止,DIC过程停止,血小板由 $138 \times 10^9/L$ 上升至 $180 \times 10^9/L$,CT 3分钟。经妇产科治疗痊愈出院。

(3) 1997年3月13日市人民医院ICU科患者郑×,呼吸机治疗中,全身皮肤瘀斑!DIC过筛试验:阳性反应。输入冻存浓缩血小板10单位,次日血小板由 $39 \times 10^9/L$ 上升至 $73 \times 10^9/L$,情况改善,DIC试验阴性反应。

4.3 冰冻浓缩血小板对临床因血小板减少出现的出、渗血有较好的疗效,例如:

(1) 1997年5月16日惠州市人民医院外科患者朱×,血小板减少排黑便十余日,输入冻存浓缩血小板16单位后,黑便停止,血小板由 $37 \times 10^9/L$ 上升至 $108 \times 10^9/L$ 。

(2) 1997年6月19日惠州市人民医院外科患者张×,血小板减少皮肤出现瘀斑,输入冻存浓缩血小板12单位后,渗血量减少,血小板由 $40 \times 10^9/L$ 上升至 $100 \times 10^9/L$ 。

4.4 冰冻保存状的血小板适合远程运输,在战时可以作为军事战备物资具有十分重大的战略意义。1998年4月深圳市瑞骐集团公司莫小姐的父亲,在柬埔寨因消化道大出血住进金边市医院,由于条件差,入院两周都未能止血,病情趋恶。经当地一

位台湾医生建议,紧急在国内寻找冻存浓缩血小板。莫小姐在我站购买了20单位冻存浓缩血小板,我站为其作了专门的冻存处理后,该冻存浓缩血小板路途经8小时的航空运输安全抵达金边,医生按照解融的操作迅速给莫先生输注,消化道及时止血。

4.5. 血小板冰冻保存技术为难治性血小板输注的危重患者事先储备组织相容性(HLA)配合的血小板创造了条件。此外,血小板冰冻保存技术可以推广到病人自身血小板冻存和输注,尤其是应用于肿瘤、血液病人的自身造血功能再造术有重要意义,其应用领域广阔。

冻存浓缩血小板除创造了上述巨大的社会效益外,还有较大的经济效益。本课题组在较少投入的情况下,从1996年5月~1998年9月底,已向临床发放冻存浓缩血小板2965个单位,(其中:A型870u;B型752u;O型1098u;AB型245u)收回资金463,332元。如果此项技术在全省推广,以全省年用血总量160吨计,假设其中10%被用于分离浓缩血小板并冰冻保存,可制备浓缩血小板8万单位。每1单位血小板按200元计算,其价值达1600万人民币。由于此项技术为一血多用,从全血中分离血小板不但不影响全血质量(甚至改善其质量),故在基层血站推广前景可观,并将取得巨大的经济效益。

4.6. 综上所述,尽管血液病患者输注后血小板计数增加不明显,但仍有87.49%患者在输注冻存浓缩血小板后出血症状得以改善[见表9]。因此作者认为当临床抢救急需浓缩血小板,而在新鲜浓缩血小板受诸多原因制约不能保证时,输注冻存浓缩血小板可视为首选。

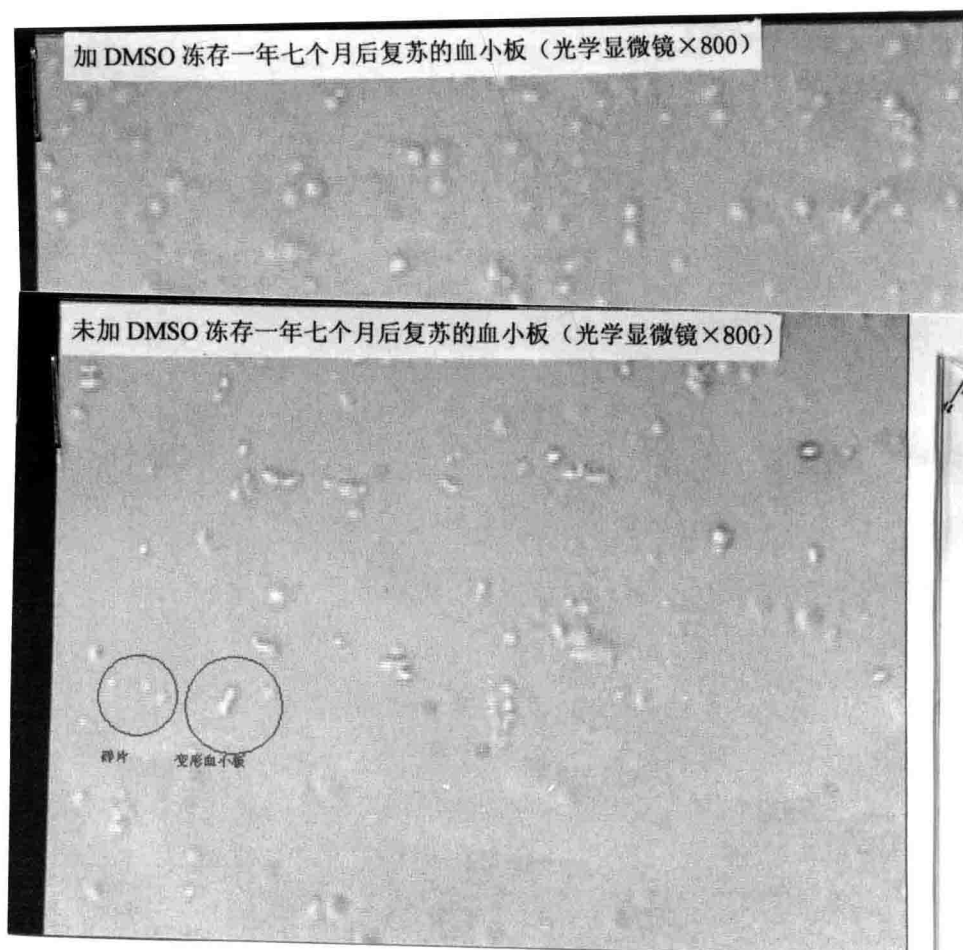


表1 冻存浓缩血小板质量检测

	无菌 试验	肉眼 观察	均值 容积—— 1.030	血小板 绝对值 1010/袋	白细胞 绝对值 106/袋	红细胞 绝对值 109/袋	pH 值测定 均 值	DMSO 含量测 定%
血站基本 质量标准	无菌 生长	均匀一致混 悬液无凝丝	保存 50~70ml	≥ 4.8	≤ 5.0	≤ 2.0	≥ 6.0 保存末期	加入量 4~6%
实验结果 均值	无菌 生长	均匀一致混 悬液无凝丝	60.11 ± 6.12 ml	5.80 ± 1.75	2.76 ± 2.37	0.13 ± 0.19	7.47 $\pm$ 0.23 保存末期	测定均 值 5.0%

表2 血小板功能检测

		血小板聚集功 能测定诱导剂 AA 3.0 PAG(M)*	血小板粘附 功能测定	血小板第3因 子活性测定 (S) 正常对照 $\pm 7(s)$	血小板绝对 值计数 $\times 1010/\text{袋}$	pH值测定 保存末期 ≥ 6.0
冻 前	未加 DMSO	45.09 $\pm$ 16.26 (n 31)	40.47 $\pm$ 15.82 (n 81)	23"54 $\pm$ 3"55 (n 138)	6.44 $\pm$ 1.93 (n 71)	7.47 $\pm$ 0.46 (n 56)
	已加 DMSO	40.60 $\pm$ 16.36 (n 15)	41.75 $\pm$ 13.34 (n 21)	23"47 $\pm$ 3"24 (n 24)	6.07 $\pm$ 1.90 (n 47)	7.25 $\pm$ 0.13 (n 18)
		P值 > 0.5	P值 > 0.5	正常范围	--	≥ 6.0
冻 后	未加 DMSO	25.65 $\pm$ 15.36 (n 47)	血小板形态变 异无法计数	23"11 $\pm$ 4"28 (n 15)	11.60 $\pm$ 5.60 (n 51)	7.44 $\pm$ 0.26 (n 65)
	**	P值 < 0.001	--	正常范围	p < 0.001	--
	已加 DMSO	42.25 $\pm$ 15.67 (n 134)	35.05 $\pm$ 13.39 (n 93)	21"90 $\pm$ 4"18 (n 172)	5.47 $\pm$ 1.53 (n 130)	7.36 $\pm$ 0.25 (n 61)
后	***	0.2 $< P < 0.5$	0.2 $< P < 0.5$	正常范围	回收率84.84%	≥ 6.0
	已加 DMSO	41.69 $\pm$ 18.71 (n 47)	35.54 $\pm$ 16.27 (n 21)	22"25 $\pm$ 4"18 (n 156)	5.40 $\pm$ 1.63 (n 81)	7.52 $\pm$ 0.24 (n 31)
	***	0.2 $< P < 0.5$	0.2 $< P < 0.5$	正常范围	回收率88.96%	≥ 6.0
	已加 DMSO	41.09 $\pm$ 22.48 (n 47)	34.57 $\pm$ 11.53 (n 47)	20"42 $\pm$ 3"72 (n 26)	4.89 $\pm$ 2.09 (n 49)	7.53 $\pm$ 0.19 (n 31)
	***	0.2 $< P < 0.5$	0.2 $< P < 0.5$	正常范围	回收率80.56%	≥ 6.0

* PAG(M) : 表示最大聚集强度 AA 花生四烯酸

** 未加DMSO 冻后与冻前比较

*** 已加DMSO 冻后与冻前比较

表 3 输注 18~24 小时后观察症状明显减轻

观察组	出血症状减轻，输注有效	
血液病	86.08%	88.89%
非血液病	88.89%	92.16%
平均	87.49%	90.57%

表 4 输注 (24 小时) 后血小板计数

观察组	血小板计数 输后上升	CCI 值 $\geq 10000/\mu\text{l}$
血液病	61.84%	21.05%
非血液病	81.48%	57.41%
平均	71.66%	39.23%

其中：CCI 值 ≥ 10000 的有 43 例 (不含死亡 14 例)。

表 5 两组输注前、后血小板计数比较 ($\times 10^9/\text{L}$)

	血液病组 (n=76)	非血液病组 (n=54)
血小板输前平均值	18.57 ± 14.51	42.47 ± 41.93
血小板平均增加值	23.93 ± 15.08	68.43 ± 51.74
输注前与输后 P 值	$P > 0.5$ 无显著性差异	$P < 0.001$ 有显著性差异
两组输注后 P 值	$P \leq 0.001$ 两组有显著性差异	

表 6 DMSO 化的血小板容积比较

	国内	本站
冻存材料	富浆血小板	浓缩血小板
容积 *	500 ml	300 ml

* 含血小板数 $\geq 24 \times 10^{10}$ 个

表 7 DMSO 输注量的比较

	国 内	本 站
冻存材料	富浆血小板	浓缩血小板
DMSO	20.09 g	15.7 g

表 8 血小板输注前准备时间比较

	富浆血小板	浓缩血小板	常规机采	急诊机采
分离时间	-	-	2小时	5小时
42℃融化	2分钟	2分钟	-	-
复苏、解聚	30分钟	-	-	-
洗涤、解聚	30分钟	-	-	-
后解聚时间	120分钟	-	-	-

表 9 输注后两组临床效果

	血液病组	非血液病组
观察例数	76例	54例
血小板输前平均值	$18.57 \pm 14.51 \times 10^9 / L$	$42.47 \pm 41.93 \times 10^9 / L$
血小板平均增加值	$23.93 \pm 15.08 \times 10^9 / L$	$68.43 \pm 51.74 \times 10^9 / L$
输注的有效率	88.89%	92.16%
出血症状减轻	86.08%	88.89%
CCI $\geq 10000 / \mu l$	21.05%	57.41%
平均输注冻存浓缩血小板量/次	22.92×10^{10}	$(4.8 \sim 48 \times 10^{10})$

血小板的冰冻保存

中国医学科学院 范启修

一、血小板的结构、代谢和功能

(一) 结构:

血小板有完整的细胞膜,其形态为盘状,是藉微管微丝为骨架而得相对稳定的。胞内含有多种细胞器如致密颗粒、 α 颗粒、溶酶体、线粒体等,在骨髓成熟需时5-7天,按赤道线分成两半的图形如下:

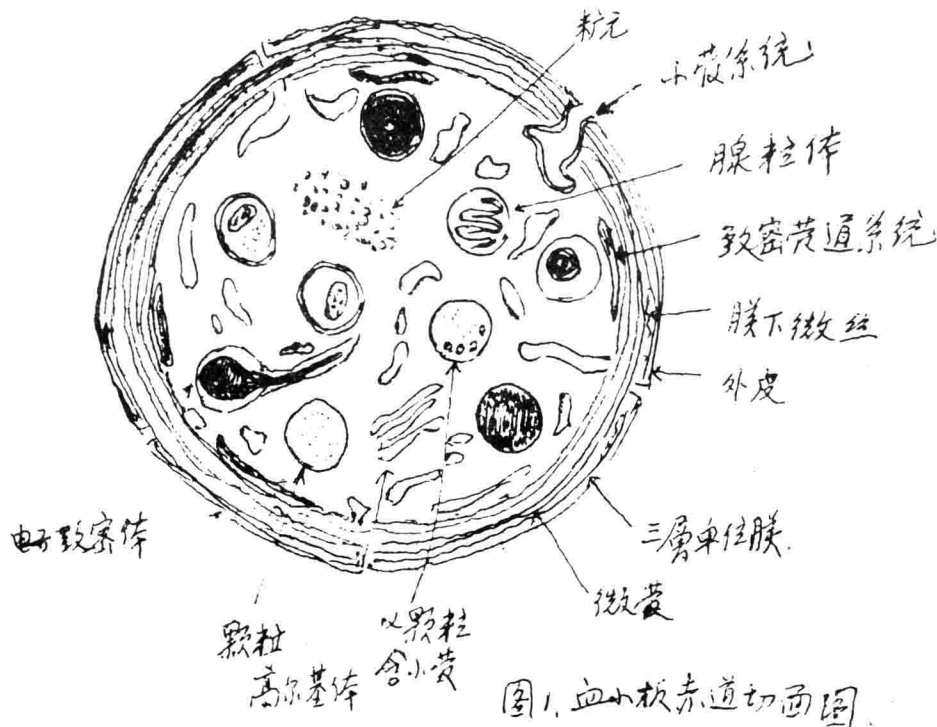


图1. 血小板赤道切面图。

从图1. 可看到血小板的结构远比红细胞复杂,外皮或名萼(glycocalyx)富含糖蛋白(GP),司粘附、聚集。血小板被血浆蛋白所覆盖,,含纤维蛋白元、FVIII、FV,血小板的表面糖蛋白是多种物质的受体包括纤维蛋白元、VWF、凝血酶、ADP、血清素、胶原、抗原抗体复合物。

紧接外皮为富含磷脂单位膜,是血块形成的促进磷脂,多种酶出于此地。。血小板膜的最内层为纤维微管和微丝系统,含肌动和肌球蛋白,它们是维持血小板形状的物质。

血小板胞浆到处有通向胞外的小管系统,是颗粒分泌物的出口通道,也有不外通的致密小管系统,与前列腺素合成和 Ca^{2+} 离子的扣押有关,还有FVIII(纤维蛋白稳定因子)和ATP、ADP能量系统。许多细胞器分布于胞浆中如电子致密体、溶酶体、 α 颗粒、腺粒体、糖元、高氏基体。

(二) 代谢 1. 葡萄糖代谢:

血小板存在三 循环酶系,是有氧代谢的细胞,但呼吸作用较低,活动所需能量主要来自无氧酵解:葡萄糖 $\rightarrow$ 乳酸的能力是红细胞的15倍,在有氧和无氧条件下ATP与水解磷的转换率是一样的,说明有氧和无氧酵解对血小板的葡萄糖代谢都很

重要。血小板还能把枸橼酸变成乳酸、丙酮酸和枸橼酸变成糖原的能力，是否意味着葡萄糖对血小板的能量代谢不重要？

2. 核苷酸代谢

血小板有两个核苷酸池，一是代谢池可进入线粒体和胞浆，同位素可标记上。一是贮存池，代谢不活跃，可进入致密体中(30%ADP和AMP)，ATP平均分布于二池中。与红细胞相比，血小板缺乏PRPP不生成ARP。但血小板有高效的腺苷酸激酶可促使 $AMP+ADP \rightarrow ATP$ ，可算是一种补偿。

3. 脂肪

脂是血小板膜的主要成分，占血小板干重35%，膜与红细胞膜一样也是脂双层结构。血小板膜上长链不饱和的花生四烯酸($C_{20:4}$)最丰富，内质膜上含量最多，血小板含高浓度维生素C，而且有能力把脱H的维生素C还原，与肾上腺有类似的活力。

4. 花生四烯酸代谢

花生四烯酸受激素或其他物质甚至机械的刺激，通过磷脂酶的激活从膜中游离出来，其主要代谢产物是前列腺素(PG)。

前列腺素、cAMP和 Ca^{2+} 在血小板活动中的作用是很复杂的，有促进，有抑制，是生物界活动保持平衡一完善例子。

请看下图：

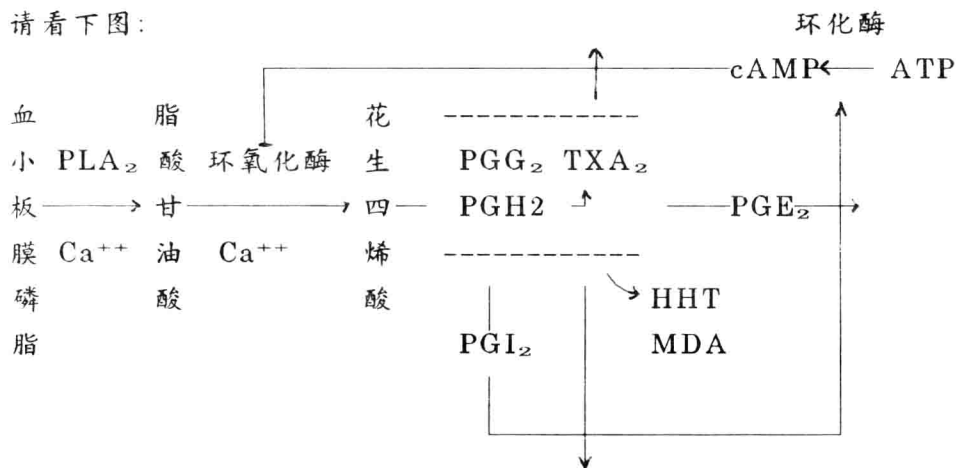


图2. 前列腺素、cAMP及 Ca^{2+} 在血小板活动中的作用

cAMP ↑ 抑制环氧化酶活性，花生四烯酸代谢 ↓

PGG₂、PGH₂和TXA₂则对抗cAMP的这种作用，因此是血小板强激活剂。

PGI₂激活环化酶，cAMP升高，PGE加强这种作用，是血小板强抑制剂。

Ca^{2+} 促进花生四烯酸的作用，而其产物TXA₂又含量下降。

一句话，在花生四烯酸代谢物中有促进的也有抑制的，血小板趋向稳定，以免在体内形成大量血栓。

(三) 功能

1. 粘附：血小板粘附发生于血管内膜下的间质处是血小板发挥止血功能的第一步，需要VWF、GP I b、Thrombospondin和 Ca^{2+} 。

2. 聚集：聚集继粘附而发生，血小板被激活，形态由盘状变有刺球形以增加互相反应的表面积和降低静电荷以促进血小板间的接触，利于发生聚集。血小板被激活后 GP IIb 和 GP IIIa 可能改变为纤维蛋白原的复合受体，产生纤维蛋白网。聚集还可分为低水 ADP、凝血酶、肾上腺诱导的可逆的第一波，血小板脱颗粒和释放内容物属第二波，接着刺激花生四烯酸代谢，参与凝血酶生成和在血小板表面生成纤维蛋白，血液开始凝固。

二、低温生物学

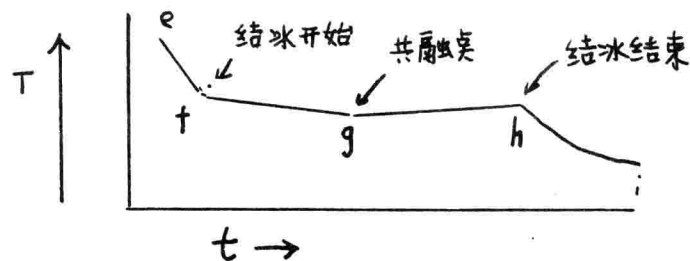
生物物质的代谢强度与温度成正比，温度越低能量消耗越小，在离体条件下灭活或死亡就越慢，利于保存。

温度与激活酶 (ΔE) 的关系举例说明：某物质在 20°C 所需激活能为 8Kcal/mol ，在 -80°C 则需 1320 倍，即很难被激活，等于相当稳定。

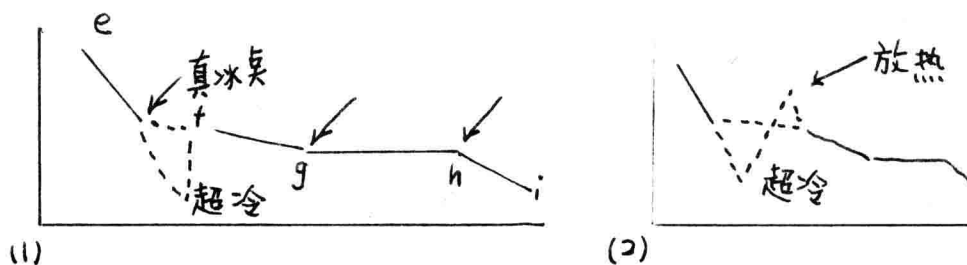
水溶液冰冻对生物物质将产生严重影响：细胞在冷冻过程的变化在慢冻时细胞外先结冰 $\rightarrow$ 细胞脱水 $\rightarrow$ 溶质浓度升高 $\rightarrow$ 细胞遭受化学损伤，脱水严重将使结构水与蛋白质与蛋白质分开，蛋白质分子间距离缩短形成交链，蛋白质变性，丧失生物活性。

一种含 A 和 B 物质的混合物，在冷冻时由于溶质冰点不同，冰点高的先结晶，浓度 % 逐渐下降，B 的 % 则逐渐升高，A 融点将因 B 成分的逐渐升高而下降，到达一定温度反而升高，这个温度叫共融点，在此温度以下两种物质同时结晶出来，此时的混合物叫共融混合物。生物是多价混合物，共融现象是非常复杂的，即使单一物质水溶液的结冰现象也是未尽了解。水溶液的冷冻必须依照一定形式进行，看图 2。

1. 慢速冷冻



2. 快速冷冻



3. 适中冻速

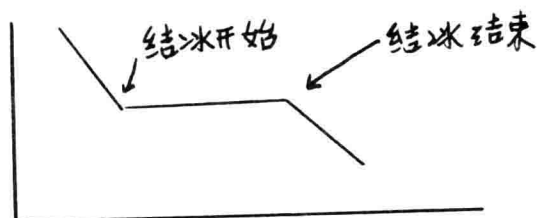


图3. 水溶液的冷冻温度曲线

图3. 是未加防冻剂的水溶液的冰冻曲线, 对于生物物质要避免受结冰所造成的机械(冰块)和化学损伤, 希望出现适中冻速曲线, 不希望出现快速冷冻曲线, 在那里有超冷曲线, 超冷是到了结冰温度而不结冰之意, 但不是长时间不结冰, 而只是结冰时间延后发生。此时的结冰很大必然放热很多, 这个高温也是生物物质受破坏的一个因素, 应用控速降温机冷冻生物物质就是要消除快速冻(2)的放热曲线段。

三、防冻

以红细胞为例, 冰冻对红细胞的损害有两个方面: 一是由于水结冰, 溶质浓度加大产生化学损伤, 二是胞内结冰所造成的机械损害, 前者多发生于慢冻情况($<10^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$), 后者多发生于快冻情况($>10^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$)。

在慢冻情况下, 胞外先结冰, 溶质浓度升高可达4-5等渗透压, 细胞失水体积缩小可达原体积的35%, 多数细胞可耐受比种渗透压威胁。在快冻情况下, 胞内外几乎同时结冰, 无渗透压改变, 其损伤可能是由于在复温中渗透压的不平衡, 而不是由于冰块的机械损伤, 须知复温是冰冻的逆过程, 因此细胞在冰冻时发生破裂有的是在解冻时发生的。

防冻剂均是对水能形成H键产生束缚作用, 在共融混合物中减少盐浓度和PH的改变。

四、血小板冷冻保存(以找到的方献为例)

(一) Bulgaria 不同冷冻程序保存血小板的质量比较(1980年以前)

1. DMSO 终浓度5%

检测项目 冷冻程序(-150°C 保存30天)

	$1^{\circ}\text{C}/1' \rightarrow 10^{\circ}\text{C}/1' \rightarrow -80^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{液N}_2 \rightarrow -20^{\circ}\text{C} 30' \rightarrow \text{液N}_2$	
血小板收缩		
室温对照	1.0 $\rightarrow$ 0.9	
低渗休克	34.5 ± 13.4	31.8 ± 12.54
	147 ± 8.68	152.8 ± 5.53

2. 5%DMSO+5% 葡萄糖终浓度 -196℃保存24小时

冷冻程序: 1℃/1'→-9℃/1'→80℃

质量检测结果

样品	回收率	存活率	寿命	在去脾病人中寿命	
				第1天	第10天
新鲜(10)	100	68±7	10±1	4.1±1.2	7.3±0.6
冰冻(10)	79.8	54±6.1	8±1	5.2±0.9	9.1±1.2

(二) 日本 5% 甘油 59例各种原因血小板减少病人临床效果

疗效指标	任意血员	HLA 配型
血小板计数	45/59~76.3%	无区别
出血倾向	36/59~64.4%	无区别
副反应	(-)	(-)

(三) 四种冷冻保存血小板质量的比较(Mann Taylor1980)

4%HES 15%Dextran 甘油葡萄糖				5%DMSO				新鲜血小板
3% 甘油 5% 甘油 6% 甘油 1℃/1' LN ₂ 气				3% 葡糖 4% 山梨醇 3% 葡糖				
回收率	11	57±11	30±13	32±10	51±15	54±20	42±9	
		21±4						
血清素吸收								
对照 0'	100	100	100	100	100	100	100	100
10'	100	94	95	64	87	62	72	34
60'	100	87	60	52	62	28	28	
低渗休克								
对照	80	20	50	30	12	80	80	95
DMSO 残留						5%	5%	

(四) 四种冷冻保存血小板的评价 (Antonio Angelini 1992)

四种方法:

①6%DMSO(生理盐水稀释)

②5%DMSO-6%HES

③3%甘油

④5%甘油-4%葡萄糖

14名血小板减少症恢复期用Baxter收集白细胞方法收集194次在骨髓移植期自家血小板回输, N₂冷冻, 不需控温冷冻. 结果列于下表

检测项目	方法①	②	③	④
乳酸脱H酶活力				
(LDH)(%)	11±5	64±35	30±12	32±17
丙二醛生产				
(MDA)(%)	34.5±7	22.9±6.8	28±3.1	26.5±6.4
体外回收(%)	77±5.19	54±4.23	68±3.0	64±4.6
输后24小时				
CCI*	5.556±0.97	2.092±1.050	2.980±1.109	3.306±1.245

* (输注后24小时血小板计数-输前血小板计数)×体表面积(m²)

CCI =
$$\frac{\text{输前的血小板数} \times 10^{11}}{\text{输注后24小时血小板计数} - \text{输前血小板计数} \times \text{体表面积(m}^2\text{)}}$$

认为DMSO盐水, 0℃保存, 外回收高于他法10-30%, 细胞外LDH无明显增加, 说明细胞不破漏, 血小板的生化和酶功能仍能维持, 从MDA的生产率仍有34%可知, 低渗休克在62%, 说明未破坏的血小板的功能完整性仍很高, 输后CCI可达5-6000/ul, DMSO法需洗涤血小板悬液, 费时费仪器, 减少回收, 但质量还是比较好的, 总的说, 还有相当多的血小板不活, 应加以研究。

(五) 5%DMSO -80℃ 301医院

检测项目: 低渗休克

新鲜血小板	-80℃保存血小板
70-100%	65% 60% 55%

(六) DMSO 4-5% 深圳市血液中心

1. 检测项目 (一) PF-3 (中国蝥蛇毒试验)

保存时间	15天	16-90天	91-120天	>400天	新鲜血小板
n	11	93	51	3	138
X±SD	22.6±4.16	22.85±4.5	21.17±3.49	20.42±3.72	23.54±3.55

2. 检测项目(二) 聚集功能

诱导剂	未加 DMSO(冻前)		加入 DMSO(冻后)	
	PAG(M)	n	PAG(M)	n
ADP(7.0um/L)	51.10±22.81	84	7.45±3.25	13
ADr(0.1mg/L)	46.20±28.68	76	5.15±1.66	10
AA (1.5mmol/L)	40.60±16.36	25	14.57±9.98	15
AA (3.0mmol/L)	45.09±16.26	31		
	24.34±12.47	45(冻后)	42.25±15.67	134

3. 检测项目(三) 粘附功能

检测项目	粘附功能		PH	
	未加 DMSO	已加 DMSO	未加 DMSO	已加 DMSO
当天				
冻前	40.47±15.82(81)	41.75±13.34(21)	7.47±0.46(56)	7.25±0.13(18)
冻后	血小板形态变异 无法计数	35.05±13.39(93)	-	7.44±0.25(65)
3个月		35.54±16.27(21)	-	7.52±0.24(31)
6个月		34.57±11.53(72)	-	7.53±0.19(31)

4. 临床效果 (平均输注剂量 $24 \times 10^9/L$)

观察项目	组别	
	血液病组	非血液病组
输前血小板平均值	18.57±14.51×10 ⁹ /L(76)	42.47±41.93×10 ⁹ /L(54)
输后血小板平均增值	23.93±15.08×10 ⁹ /L(76)	68.43±51.74×10 ⁹ /L(54)
输注有效率	88.89%	92.16%
出血症状减轻	86.08%	88.89%
CCI≥10000/ul	21.05%	57.41%

五、血小板冷冻保存损伤

(一) 血小板的化学性质的改变:

血小板在血液中的生存极端需要一个化学和物理的稳定微环境,微环境的改变意味着血小板被激活的开始。在正常血流中存在着从血管内皮细胞分泌的激活抑制剂如前列环素以对付凝血酶及非血栓性内皮表面接触时产生的激活。

血小板一经采集激活则开始,血液与抗凝剂接触Ca²⁺浓度的减少就是激活,结果:是α颗粒中β thromboglobulin, FIX 和 GMP140释放,凝血酶的形成,凝血酶原酶复合物的极端增加;在采血管中出现fibrinopeptide A,血管近端300ng/ml,远