

硝普钠对冰冻血小板表面 CD62分子表达的抑制作用

洪俊,徐洪卫,姚锦炎,王浦南(无锡市中心血站,江苏 无锡,214021)

摘要:目的 了解硝普钠对冰冻血小板表面 CD62分子表达的抑制作用。方法 采用藻红素标记的抗 CD62单抗,经流式细胞仪分析血小板表面 CD62分子表达的水平。结果 浓缩血小板在含 2% DMSO及 50 μ mol/L SNP的条件下经 -80 $^{\circ}$ C冰冻保存一周后,CD62分子表达较 2% DMSO组明显降低($P < 0.01$),与 5% DMSO组接近($P > 0.05$)。结论 硝普钠可抑制冰冻血小板表面 CD62分子的表达。

关键词:冰冻血小板;硝普钠;二甲基亚砷;CD62;抑制作用

中图分类号:R972.4 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)02-0116-03

The inhibitory effect of sodium nitroprusside on the expression of CD62 on the surface of cryopreserved platelets

HONG Jun, XU Hong-wei, YAO Jin-yan, WANG Pu-nan(Wuxi Blood Center, Wuxi 214021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibitory effect of sodium nitroprusside (SNP) on the expression of CD62 on the surface of cryopreserved platelet. **METHOD** Phycocerythrin-labeled monoclonal antibody to human platelet CD62 was used to measure the expression of the CD62 on the platelet surface by flow cytometry. **RESULTS** Compared to platelets cryopreserved with 2% DMSO alone, platelets cryopreserved at -80 $^{\circ}$ C for a week in the presence of 2% DMSO and 50 μ M SNP showed significantly lower level of expression of CD62, with no significant difference from those cryopreserved with 5% DMSO. **CONCLUSION** Sodium nitroprusside can

inhibit the expression of CD62 on the surface of cryopreserved platelets.

KEY WORDS: cryopreserved platelets; sodium nitroprusside (SNP); dimethylsulfoxide (DMSO); CD62; inhibitory effect

血小板制剂可用来治疗各种原因引起的血小板减少症,在临床治疗中发挥着十分重要的作用。随着临床治疗技术的发展,血小板的临床用量也呈逐年上升趋势。由于血小板寿命短,结构、功能受多因素影响,如何在长期保存过程中保持血小板的数量及功能,一直是输血医学的研究课题。从20世纪70年代开始,人们已尝试用低温冰冻方法保存血小板,选用的低温保护剂主要有甘油、DMSO。考虑到甘油洗脱较困难,而DMSO则较易进入细胞,并易从细胞中除去,因而趋向使用DMSO。

血小板的贮存损伤主要是由于血小板在体外发生了活化,在体内血小板的活化则受到第二信使系统的抑制。硝普钠在临床上常规用于解除高血压危象、高血压脑病出血、急性血管球性肾炎等。硝普钠可刺激cAMP、cGMP的生成^[1]。Connor等^[2]向4℃液体保存的血小板中加入含硝普钠的第二信使效应剂混合物,使血小板在4℃保存至9d时的各种功能活性均不亚于22℃保存了5d的血小板。本实验初步观察了硝普钠对冰冻血小板表面CD62分子表达的抑制作用,为开展低浓度DMSO冰冻保存血小板研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

藻红素(PE)标记抗CD62单抗;PE标记的鼠IgG1(Pharmingen公司);硝普钠(Sodium nitroprusside, SNP,北京双鹤现代医药技术有限责任公司,批号:00042027);DMSO(MERCK公司)

1.2 仪器

J-6M低温离心机(Beckman公司);Epics XL流式细胞仪(Coulter公司)。

1.3 全血采集

用ACD-B抗凝的四联袋采集200mL全血,在制备PC前,静置于室温1h。

1.4 白膜回浆法制备浓缩血小板^[3]

将采后1h的全血进行离心(3000 r/min, 10 min, 22℃),把血浆、白膜层分别挤入不同的卫星袋中,再将红细胞保存液转移到压积红细胞中制成晶体盐红细胞悬液,然后将大约25~30mL血浆挤入白膜中。将白膜置于血小板保存装置中振荡保存1.5~2h,然后将白膜进行轻离心(1000 r/min, 7 min, 22℃),上清挤入空袋,即制成浓缩血小板。

1.5 实验分组

将同一献血者来源的浓缩血小板分成4份,每份5mL,分别作为新鲜组、5% DMSO组、2% DMSO组、2% DMSO + 50μmol/L SNP组。

1.6 血小板冰冻保存

分别采用终浓度为5% DMSO, 2% DMSO, 2% DMSO + 50μmol/L SNP在-80℃冰冻保存浓缩血小板1周。

1.7 流式细胞仪分析^[4]

将300μL血小板样品用1%多聚甲醛固定10~20 min,然后用PBS洗涤1~2次,向50μL经过洗涤的固定血小板中加入20μL的PE标记的抗CD62单抗,室温避光孵育20~30 min,再用PBS洗涤并稀释至500μL,然后用流式细胞仪测定表达CD62的血小板的百分数,每个样品均用PE标记的鼠IgG1抗体作为对照,确定基线结合量。

1.8 统计分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用t检验。

2 结果

从表1中可以看出,各浓缩血小板组经-80℃冰冻保存一周后,CD62分子表达的水平均显著增高(与新鲜组比较, $P < 0.01$)。只含2% DMSO的浓缩血小板经-80℃冰冻保存一周后,血小板表面CD62表达较5% DMSO组有明显升高($P < 0.01$);含2% DMSO及50μM SNP的浓缩血小板经-80℃冰冻保存一周后,血小板表面CD62表达较2% DMSO组有明显降低($P < 0.01$),与5% DMSO组相比,无明显差异($P > 0.05$)。

表1 硝普钠对冰冻血小板表面CD62分子表达的抑制作用($n=8, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The inhibitory effect of sodium nitroprusside on the expression of CD62 on the surface of platelets cryopreserved with 2% DMSO at -80℃ ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	表达CD62的血小板百分数(%)
新鲜组	16.20 ± 7.39
5% DMSO组	51.44 ± 14.81 ¹⁾
2% DMSO组	62.19 ± 13.58 ^{1,2)}
2% DMSO + 50μM SNP组	51.95 ± 15.44 ^{1,3,4)}

注:1)与新鲜组相比 $P < 0.01$, 2)与5% DMSO组相比 $P < 0.01$, 3)与2% DMSO组相比 $P < 0.01$, 4)与5% DMSO组相比 $P > 0.05$

Note: 1) Compared with fresh platelet group $P < 0.01$, 2) Compared with platelet group cryopreserved with 5% DMSO $P < 0.01$, 3) Compared with platelet group cryopreserved with 2% DMSO $P < 0.01$, 4) Compared with platelet group cryopreserved with 5% DMSO $P > 0.05$

3 讨论

浓缩血小板标准的保存方法是(22 ± 2)℃振荡保存5d,5d的时间限制主要出于有细菌污染可能的考虑^[5]。4℃虽可抑制细菌,但血小板的功能受损严重^[6]。血小板的常规保存方法制约了血站的储备工作,为了适应对血小板日益增长的需求,不少血站陆续开展了5% DMSO冰冻保存血小板的工作。冰冻血小板经37℃融化后不作任何处理直接输注给患者无任何严重不适。美国AABB规定经5%~6% DMSO冰冻保存的血小板输注前必须洗涤除去DMSO,但洗涤处理对血小板回收率和功能有较大影响。临床资料表明含2% DMSO的冰冻血小板制剂不经洗涤直接输注无任何不良反应,具有较高的安全性^[7]。

目前对血小板保存效果的评价往往依赖于体外试验。

CD62分子又称为 P-selectin, GPIIb/IIIa, PADGE 蛋白, 其相对分子质量为 140 000, 存在于血小板 α 颗粒的内表面, 血小板未发生活化时, 其表面不表达 CD62, 一旦血小板受到各种因素的刺激, 发生释放反应, α 颗粒就会与微管系统表面融合, 导致 CD62 出现于血小板的外表面。血小板输后 1h 的体内回收率与表达 CD62 的血小板百分数呈负相关^[8]。因此在血小板保存研究中常常把 CD62 分子的表达作为衡量血小板活化程度的一个敏感指标。本实验结果显示, 经 -80°C 冰冻保存后, 血小板表面 CD62 的表达显著增加; 随着 DMSO 浓度的降低, 血小板表面 CD62 的表达明显增加; 通过在含 2% DMSO 的浓缩血小板中添加 $50\mu\text{mol/L}$ 的硝普钠, 能显著降低 CD62 的表达, 与含 5% DMSO 的冰冻血小板接近, 说明硝普钠具有显著抑制 CD62 分子在冰冻血小板表面表达的作用, 显示出其联合 2% DMSO 冰冻保存血小板的可行性, 当然还需从血小板的形态学、超显微结构和功能等方面对血小板冰冻保存的效果进一步加以研究、观察。另外, 硝普钠是一种血管扩张药, 具有较强的降压作用。含硝普钠的冰冻血小板制剂在临床输用时, 应严格控制输注速度。

参考文献

- [1] Faulds D, Chrisp P, Buckley MM, *et al.* Adenosine, An evaluation of its use in cardiac diagnostic procedures, and in the treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia [J]. *Drugs*, 1991; 41 (4): 596.
- [2] Connor J, Currie LM, Allan H, *et al.* Recovery of platelet concentrates stored at 4°C and treated with second-messenger effectors [J]. *Transfusion*, 1996; 36 (8): 691.
- [3] Lozano M, Estebanell E, Cid J, *et al.* Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive function after storage [J]. *Transfusion*, 1999; 39 (9): 951.
- [4] Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, *et al.* The expression of p-selectin during collection, processing and storage of platelet concentrates: relationship to the loss of in vivo viability [J]. *Transfusion*, 1997; 37 (1): 12.
- [5] Yonitov R, Lazarus HM, Goodnough LT, *et al.* A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets [J]. *Transfusion*, 1993; 33 (11): 902.
- [6] Handin RI, Fortier NL, Valeri CR, *et al.* Platelet response to hypotonic stress after storage at 4°C or 22°C [J]. *Transfusion*, 1970; 10 (6): 305.
- [7] Lazarus HM, Kaniecki-Green EA, Wam SE, *et al.* Therapeutic effectiveness of frozen platelet concentrates for transfusion [J]. *Blood*, 1981; 57 (2): 243.
- [8] Triulzi DJ, Kickler TS, Braine HG. Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on Platelets collected by apheresis [J]. *Transfusion*, 1992; 32 (6): 529.

收稿日期: 2003-12-16