

Engl J Med, 2009, 360(4): 363-375.

[11] Minarik M, Kopeckova M, Gassman M, et al. Rapid testing of clopidogrel resistance by genotyping of CYP2C19 and CYP2C9 polymorphisms using denaturing on-chip capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2012, 33(8): 1306-1310.

[12] Costache II, Rusu C, Ivanov I, et al. Clopidogrel resistance—risk factor in patients with acute coronary syndromes[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2012, 116(2): 383-388.

[13] Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study[J]. Lancet, 2009, 373(9660): 309-317.

[14] Kar R, Meena A, Yadav BK, et al. Clopidogrel resistance in North Indian patients of coronary artery disease and lack of its association with platelet ADP receptors P2Y1 and P2Y12 gene polymorphisms[J]. Platelets, 2013, 24(4): 297-302.

[15] Lee JM, Park S, Shin DJ, et al. Relation of genetic polymorphisms in the cytochrome P450 gene with clopidogrel resistance after drug-eluting stent implantation in Koreans[J]. Am J Cardiol, 2009, 104(1): 46-51.

[16] Blieden KP, Dichiaro J, Lawal L, et al. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52(7): 531-533.

[17] Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(14): 1404-1411.

[18] Collet JP, Silvain J, Landivier A, et al. Dose effect of clopidogrel reloading in patients already on 75-mg maintenance dose: the Reload with Clopidogrel Before Coronary Angioplasty in Subjects Treated Long Term with Dual Antiplatelet Therapy (RELOAD) study[J]. Circulation, 2008, 118(12): 1225-1233.

[19] Mehta SR, Bassand JP, Chrolaviciu S, et al. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes[J]. N Engl J Med, 2010, 363(10): 930-942.

[20] Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial[J]. Lancet, 2010, 376(9748): 1233-1243.

[21] Kushner FG, Hand M, Smith SC Jr, et al. 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(23): 2205-2241.

[22] Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes[J]. N Engl J Med, 2009, 361(11): 1045-1057.

(收稿日期: 2012-12-18)

• 综 述 •

冰冻红细胞技术及其应用的研究进展

李文静¹综述, 沈 瑞²审校

(1. 海军总医院输血科, 北京 100048; 2. 91286 部队门诊部, 山东青岛 266043)

关键词: 冰冻红细胞; 海上救治; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1414-02

冰冻红细胞保存期长、质量可靠, 经过洗涤后的生理形态及生化特性均与液体保存的红细胞相似, 是长期储存红细胞的有效方法, 也是军队及地方医疗机构应对突发事件时血液保障的重要手段。上世纪 80 年代初, 美国食品和药品管理局 (FDA) 批准以 40% 甘油冰冻的红细胞在 -80 ℃ 条件下保存期为 10 年, 主要用于战备血库中血液储存、突发事件下血液供应、稀有血型患者的输血及肿瘤化疗患者的自体血回输。科技发展为冰冻红细胞的制备和应用提供强有力的保障, 提升了中国军队海上卫勤保障能力。本文综述了国内外冰冻红细胞近年来的研究进展, 以及冰冻红细胞在海上救治方面的应用。

1 冰冻红细胞的制备方法

1.1 羟乙基淀粉 (HES) 法 加入 14% 羟乙基淀粉溶液作为细胞外防冻剂, 以液氮冷冻红细胞保存于 -150 ℃, 应用时不需要解冻洗涤。该方法虽然操作简单, 但临床应用疗效不佳, 目前已很少应用。

1.2 甘油法

1.2.1 甘油化 (1) 高浓度甘油慢冻法: 采集 2~6 d 内的全血 1 U (国内规定为 200 mL), 经离心分离出血浆、白细胞及血小板, 向剩余浓缩红细胞内加入 57.1% 甘油溶液 160 mL (300 或 400 mL 全血可依此计算甘油的用量), 使甘油最终浓度为 40%, 加甘油的速度应先慢后快, 于 15~20 min 加毕, 同时不断振荡, 在室温平衡 30 min 后, 放入 -80 ℃ 低温冰箱保存。Lelkens 等^[1]通过比较高浓度甘油法 (40%) 与低浓度甘油法 (19%) 对去甘油后在氯化钠-腺嘌呤-葡萄糖-甘露醇保养液 (SAGM) 中 4 ℃ 保存的冰冻红细胞体外质量的影响, 证实高浓度甘油慢冻法保存的红细胞质量更加稳定, 应用较为广泛。(2) 低浓度甘油超速冷冻法: 在浓缩红细胞中加入甘油, 使甘油最终浓度在 20% 左右, 快速 (1.5~2 min) 冰冻并保存在 -196 ℃ 液氮罐中, 可保存 10 年以上。该方法未被广泛应用, 因为需要应用液氮保存来防止红细胞溶血, 价格昂贵且技术复杂。

1.2.2 解冻 (1) 水浴解冻法 冰冻红细胞使用前放入 37~45 ℃ 水浴箱中缓慢摇动, 35 min 左右完全融化, 目前被广泛采

用。(2)新型微波水热法 采用特制的新型微波解冻装置,42℃ 仅需 5 min 即可完成解冻,加热均匀,大大缩短解冻时间。红细胞保存过程中,主要受到冰晶的机械损伤而导致溶血。张三明等^[2]实验表明,新型微波水热法避免了传统解冻方法中血袋内外温度不均易形成冰晶及较长解冻时间造成红细胞损伤的弊端,减少机械损伤,提高了红细胞回收率和质量,具有很好的发展推广前景。

1.2.3 去甘油 (1)传统经典离心法:将解冻后红细胞 3 000 r/min 离心 10 min 去甘油,加 9% NaCl 溶液 80 mL,平衡 2~3 min 后,加羟乙基淀粉溶液 100 mL,2 600 r/min 离心 6 min,去上清;加羟乙基淀粉溶液 100 mL 和 0.9% NaCl 溶液 200 mL,3 700 r/min 离心 9 min,去上清;加 0.9% NaCl 溶液 200 mL,3 500 r/min 离心 6 min,去上清,重复离心去上清;加 0.9% NaCl 溶液到标示量。(2)改良离心法:在解冻后红细胞中先后加入 9% NaCl 溶液 80 mL 和羟乙基淀粉溶液 100 mL,平衡 5 min 后再加羟乙基淀粉溶液 100 mL,2 600 r/min 离心 6 min,去上清;加 0.9% NaCl 溶液 400 mL,3 700 r/min 离心 9 min,去上清;再加 0.9% NaCl 溶液 400 mL,3 500 r/min 离心 6 min,去上清;加 0.9% NaCl 溶液到标示量。改良后的方法缩减制备过程,减少了离心次数,降低了过程损伤,李援邻等^[3]实验表明工艺改良后红细胞回收率明显提高,其他参数无显著差异。(3)沉降法:在解冻后红细胞中加入 9% NaCl 溶液 80 mL,6% 羟乙基淀粉溶液 120 mL 和 5% 羧甲基淀粉钠(CMS) 70 mL,沉降 30 min,弃上清;加入 6% 羟乙基淀粉溶液 100 mL,0.9% NaCl 溶液 20 mL 和 5% CMS 80 mL,沉降 20 min,去上清;加入 0.9% NaCl 溶液 20 mL 和 5% CMS 40 mL,沉降 15 min,重复本步骤一次;加 0.9% NaCl 溶液到标示量。该法较离心法操作简便,不用离心机分离细胞,且体外实验表明红细胞形态和质量均无显著差异^[4],适用于野战情况处理大量样品。

2 冰冻红细胞的处理系统

2.1 半自动开放式处理系统 Haemonetics 115 红细胞处理仪及 IBM-cobe 2991-1 或 2991-2 红细胞处理仪;用于红细胞的甘油化及去甘油化,去甘油洗涤 1 U 冷冻红细胞需 2 h。因为均为开放系统,需在甘油化及去甘油化过程中使用无菌接管机及孔径 0.22 μm 的过滤器以提供密闭体系。尽管应用无菌接管机,但还存在细菌污染的可能,因此解冻洗涤的红细胞在 4℃ 条件下只允许在输注前存放 24 h。这在很大程度上限制了冰冻红细胞的临床应用,并且该系统操作较复杂、耗时。

2.2 全自动密闭式处理系统

2.2.1 Haemonetics ACP 215 红细胞处理仪 该处理仪是一种全自动多功能的密闭系统,拥有振荡混合平台及连续流动洗涤系统;用于红细胞的甘油化及去甘油化,去甘油洗涤 1 U 冷冻红细胞需 1 h。美国海军血液学研究所实验室(NBRL)通过应用 215 处理仪制备冰冻红细胞取得令人满意的效果。FDA 已批准应用 215 处理仪制备的冰冻红细胞洗涤后于 4℃ 的保存期可超过以往授权的 24 h。

2.2.2 新型透析式红细胞洗涤装置 该装置体积小,重量轻,洗涤程序设计简单,采用透析原理用于红细胞的甘油化及去甘油化,去甘油洗涤一个单位冷冻红细胞只需要 30~40 min。该装置以透析原理去除红细胞保护剂,避免细胞堆积,缩短洗涤保护剂的时间,减少机械及渗透损伤。据相关文献报道^[5-7],该机洗涤效果已经通过体外实验、动物实验和临床实验验证,各

项指标均达到血库质量标准。

3 冰冻红细胞洗涤后质量评价指标

3.1 解冻洗涤后红细胞回收率 Lecak 等^[8]以解冻洗涤后红细胞的回收率大于或等于 80% 为质量标准统计分析显示冰冻红细胞的体外存活及功能并不决定于冰冻保存期的长短或解冻后于 4℃ 保存时间的长短,而与冰冻前于 4℃ 保存期的长短有关。

3.2 输注后 24 h 红细胞体内存活率 Popovsky^[9]认为如果红细胞在采集后 6 d 内进行冰冻保存,其输注后存活率至少应达到 75%。质量标准为输注后 24 h 红细胞体内存活率大于或等于 70%。

3.3 残余溶血量 GB18469-2012 要求洗涤后红细胞悬浮液上清血红蛋白浓度小于或等于 1 g/L。

3.4 残留甘油含量 GB18469-2012 要求洗涤后红细胞悬浮液甘油浓度小于或等于 10 g/L。

3.5 ATP ATP 是国际权威的血液保存体外功能指标,Harmenting^[10]报道,红细胞 ATP 含量与输注后 24 h 红细胞存活率有显著的相关性,足够的 ATP 含量有助于红细胞形态的维持、血液保存期延长及输入体内时红细胞存活率的提高。

3.6 2,3-DPG 2,3-DPG 是红细胞无氧糖酵解的产物,是调节血氧亲和力的重要因素,影响组织供氧。2,3-DPG 浓度下降,血红蛋白对氧亲和力增加,氧解离曲线左移导致组织缺氧。

3.7 无菌度 GB18469-2012 要求血液细菌培养应无细菌生长。

4 冰冻红细胞的海上救治应用

4.1 应用优势 红细胞悬液在 2~6℃ 条件下保存期为 35 d,而冰冻红细胞保存期 10 年,且不会因为舰船摇摆而发生溶血。冷冻血的 2,3-DPG 含量接近正常,与冷冻前区别不大,输入体内后,氧的释放能力比常规方法好,可立即纠正缺氧,对外科手术有利,尤其是出血性休克,可以在大脑和冠状动脉血流量不变的情况下,增强组织的氧气供给。由于去除了细胞代谢产物、抗凝剂及可能的肝炎病毒,即使大量输注也可避免酸中毒、高钾血症以及减少肝炎的传播。尤其是去除抗 A 抗 B 抗体,洗涤后的 O 型血真正成为万能血。另外,冯国基等^[11-12]通过对长航舰载保障“神舟六号”发射海上救护保存血液在返航后的各项指标研究表明,红细胞质量和生化指标在长航前后均与对照组有显著差异,建议长航时间超过 1 个月携行红细胞品种应该考虑冰冻红细胞。

4.2 国外应用现状 美军在越战期间首次使用深低温冰冻红细胞,在 180 多天中使用了 465 U 的冰冻洗涤红细胞。冷战期间美军曾冷冻储存 6×10⁴ U 冰冻红细胞,北约军事同盟有储存 40×10⁴ U 冰冻红细胞的计划。美军在海湾战争中也启动了冰冻保存红细胞系统。美海军医疗舰艇共运送 7 000 U 冰冻红细胞。在波斯湾的美军军舰上洗涤了约 265 U 的冰冻红细胞。美军已成功研制并配备了全自动的冰冻红细胞洗涤仪器。应美国国家血液安全和应用委员会的要求,美国血库协会组织间特别行动委员会提出国家血液储备的构想,目的在于更好地应对国家卫生紧急状态、灾害和恐怖袭击,保障军事行动最初的血液需求。美军长时间利用深低温冷冻红细胞方法(也称战略血液储备),保持稳定的军队血液供应和应付国内突发事件。目前,美军深低温红细胞储存总量为 6.5×10⁴ U,均为 O 型。美国政府在“9.11”恐怖袭击后也建立(下转第 1422 页)

急诊和 ICU 百草枯中毒患者灌流前、后血清 0.6 mL, 加入 20% 三氯醋酸溶液 0.2 mL, 混匀后样本处理方法处理, 取上清液, 采用紫外分光光度法测定。50 例患者灌流前、后血清中百草枯浓度分别为 $(15.70 \pm 9.50) \mu\text{g/mL}$ 和 $(7.81 \pm 4.05) \mu\text{g/mL}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。需要一提的是, 当血液灌流后血清中已测不到百草枯成分时, 尿液定性试验(连二亚硫酸钠法)仍有可能呈阳性或弱阳性。应进一步做对症治疗。

3 讨论

百草枯化学名为 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$, 相对分子质量为 257.2, 纯品为白色晶体, 熔点 $175 \sim 180^\circ\text{C}$, 沸点 300°C , 同时分解。易溶于水, 微溶于乙醇, 在酸性及中性溶液中稳定, 可被碱水解, 常用剂型为 20% 水溶液。毒理学研究显示, 百草枯进入机体内, 与血浆蛋白结合很少, 不经代谢, 在肾小管中不吸收, 多以原形从肾脏排出。其在血中浓度有助于判断中毒预后, 血液内 4 h 和 24 h 浓度分别超过 $2 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的中毒患者几乎不可能存活^[5]。因此, 快速检测血液等体液中百草枯浓度对于其中毒患者的诊疗和预后至关重要。目前报道检测方法有多种, 包括液相色谱法及液相色谱-质谱联用法、气相色谱法及气相-质谱联用法、毛细管电泳法、薄层层析法、免疫法及分光光度法等^[2-5]。由于液相色谱法等需要特殊仪器, 价格昂贵; 而薄层层析法定量效果较差, 目前比较适于临床快速检测为分光光度法。本方法对赵燕燕等^[3]报道的分光光度法进行了改良。文献^[3]报道选用 20% 三氯醋酸沉淀血清蛋白, 4 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液紫外分光光度法扫描测定百草枯。笔者曾采用此方法但发现浓度越高杂质干扰越大, 吸收光谱不是十分理

想。本研究采用的样品处理方法即用三氯醋酸沉淀血清蛋白后, 冰箱 -20°C 放置 10 min 冷冻促使蛋白凝固, 然后以 12 000 r/min 高速离心 10 min, 取上清液备用; 从空白管取上清液 50 μL 做基线测定, 然后再扫描患者上清液。冷冻、高速离心沉淀这样特殊的样品前处理方式, 能够使吸收光谱基线分离, 且操作简便, 回收率高, 线性范围宽, 杂峰干扰少。值得一提的是, 水溶液中的百草枯测定与血液中的百草枯经三氯醋酸处理后的测定其最大吸收峰是略有区别的, 最大吸收峰为 257~263 nm, 而不一定是 257 nm。采用本方法对本院急诊和 ICU 百草枯中毒患者灌流前、后血清标本进行了检测, 结果表明本方法能够满足于临床快速检测可疑患者血液标本中标百草枯浓度的要求。

参考文献

- [1] 陈兴, 范川鹏, 侯天文, 等. 石家庄地区急性中毒 1 345 例毒物分析 [J]. 华北国防医药, 2008, 20(3): 80-81.
- [2] 王朝虹, 李玉安, 邢俊波, 等. 高效液相色谱法测定人血液中的百草枯 [J]. 中国法医学杂志, 2004, 19(3): 160-161.
- [3] 赵燕燕, 刘会芳, 郝丽娜, 等. 血中百草枯的紫外分光光度测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(5): 346-347.
- [4] 杨宇平, 李生莹, 赵营, 等. 人血浆百草枯浓度的高效液相色谱测定法 [J]. 新乡医学院学报, 2008, 25(5): 445-447.
- [5] 刘萍, 邹春华, 郑力行, 等. 生物样品中百草枯检测方法研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2010, 27(9): 563-567.

(收稿日期: 2012-12-08)

(上接第 1415 页)

深低温储备库, 规模为 $10 \times 10^4 \text{U}$, 现存 $1 \times 10^4 \text{U}$ 左右。

4.3 国内应用现状 随着中国首艘成建制 866 医院船装备部队, 医院船不但承担着战时海上医疗救护任务, 而且将在未来远洋护航、灾难救援、巡回医疗和国际人道主义救援等方面发挥重要作用, 初期设想的携行悬浮红细胞方案已远远跟不上需求, 建立与任务性质及规模相匹配的冰冻红细胞储存计划势在必行。另外, 受海洋条件、船体排水量、舰船行驶风向以及减震状况等多种因素影响常引起摇摆, 不利于离心式红细胞洗涤装置的使用。目前, 本科室在研课题致力于建立医院船冰冻红细胞储存库和研发有自主知识产权的透析式冰冻红细胞洗涤装置, 填补军队医院船冰冻红细胞储存应用的空白。

5 小结

随着中国海军实现战略转型, 逐渐由浅蓝走向深蓝, 医院船必将执行长时间远洋任务。冰冻红细胞保存期长, 且不会因为舰船摇摆而发生溶血, 必将成为医院船远洋救护输血的最佳选择。建立完善针对冰冻红细胞储存、使用和补给的量化制度, 是将有限血液资源最大限度利用的有效手段, 能更好地服务于远洋血液保障。

参考文献

- [1] Lelkens CC, Noorman F, Koning JG, et al. Stability after thawing of RBCs frozen with the high-and low-glycerol method [J]. Transfusion, 2003, 43(2): 157-164.

- [2] 张三明, 周宏宇, 涂洪钢, 等. 新型微波解冻装置解冻冰冻红细胞的方法学评价 [J]. 中国临床新医学, 2010, 3(2): 109-111.
- [3] 李援邻, 李裕华, 王春荣, 等. 可提高冷冻去甘油红细胞制品回收率的改良洗涤工艺 [J]. 中国输血杂志, 2006, 19(5): 394-395.
- [4] 韩颖, 刘安, 靳鹏, 等. 冰冻保存红细胞简化洗涤程序的研究 [J]. 中国输血杂志, 2003, 16(5): 316-317.
- [5] 王艳, 靳鹏, 刘敏霞, 等. 冰冻红细胞洗涤方法的比较研究 [J]. 临床输血与检验, 2006, 8(2): 81-84.
- [6] 吴涛, 杨连贵, 姜瑞民, 等. 新型冰冻红细胞洗涤机的临床应用效果观察 [J]. 中国输血杂志, 2008, 21(3): 199-200.
- [7] 靳鹏, 刘安, 曹伟, 等. 新型冰冻红细胞洗涤机洗涤效果的研究 [J]. 中国输血杂志, 2005, 18(3): 212-213.
- [8] Lecak J, Scott K, Young C, et al. Evaluation of red blood cells stored at -80°C in excess of 10 years [J]. Transfusion, 2004, 44(9): 1306-1313.
- [9] Popovsky MA. Frozen and washed red blood cells: new approaches and applications [J]. Transfus Apher Sci, 2001, 25(3): 193-194.
- [10] Harmening D. Modern blood banking and transfusion practices [M]. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1983: 3-9.
- [11] 冯国基, 刘鹏, 郑长青, 等. 水面长航舰艇保存血液红细胞质量的实验研究 [J]. 实用医药杂志, 2006, 23(12): 1470-1473.
- [12] 冯国基, 刘鹏, 郑长青, 等. 水面长航舰艇保存血液生化指标的实验研究 [J]. 实用医药杂志, 2006, 23(6): 696-699.

(收稿日期: 2013-01-14)