

• 论 著 •

冻存前滤除白细胞对解冻红细胞质量影响的研究分析

袁文声, 林惠燕

(中山市中心血站, 广东中山 528400)

摘 要:目的 探讨冻存前滤除白细胞对冰冻解冻去甘油红细胞的血液质量和生化指标的影响。方法 随机采集 20 名无偿献血献血者全血 400 mL \times 20 袋, 常规分离血浆制备成悬浮红细胞 2 μ \times 20 袋。根据配对设计方法, 将血液等量分成两份 1 μ \times 20 袋, 其中 20 袋在 2~4 $^{\circ}$ C 静置 2~4 h 后用一次性白细胞滤器滤除白细胞为滤白组, 另 20 袋不做其他处理为非滤白组。两组红细胞经 40% 甘油化后冻结, 保存在低于 -65 $^{\circ}$ C 的超低温冰箱至少 30 d, 解冻后红细胞复悬于 MAP 红细胞保存液中, 4 $^{\circ}$ C 保存。分别在 0、7、14、21 d 检测解冻红细胞的血液学和生化学指标。结果 滤白组冰冻解冻去甘油红细胞较非滤白组冰冻解冻去甘油红细胞的溶血率低、氨浓度低及 ATP 浓度高, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。滤白组可见 LDH 水平明显抑制, 钾浓度增加速度相对较缓。结论 滤白组解冻红细胞长期生存能力较非滤白组解冻红细胞强。

关键词:冰冻解冻去甘油红细胞; 红细胞保存液; 滤白红细胞; 非滤白红细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1246-03

Research and analysis of cryopreserved red blood cells quality by filtering leucocytes before preservation

Yuan Wensheng, Lin Huiyan

(Zhongshan Blood Center, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: Objective To evaluate the in vitro quality of cryopreserved red blood cells obtained from different sources with or without leucodepletion. **Methods** 20 healthy donators were collected, whole blood 400 mL \times 20 bags, and made them into red blood cells suspension 1 unit \times 20 bags as contrast group and leucocyte-poor red cells 1 unit \times 20 bags as filter group. The two group types of red blood cells were frozen in 40% glycerol after collection and stored at a temperature below -65 $^{\circ}$ C for at least 30 days, thawed, deglycerolised and subsequently reconstituted in MAP. The in vitro haematological and biochemical properties of the thawed red blood cells were tested on days 0, 7, 14, and 21 after deglycerolisation and reconstitution. **Results** Leucodepletion of cryopreserved red blood cells units reduced haemolysis, lowered ammonia concentration, led to sustained higher concentrations of ATP. The quality of all investigated red blood cells units was the same as or even better than that of erythrocytes obtained from erythrocytapheresis. **Conclusion** The long-term survival ability of leucodepleted cryopreserved red blood cells is better than non-leucodepleted cryopreserved red blood cells.

Key words: cryopreserved RBC; alsever solution; leucodepleted RBC; non-leucodepleted RBC

冰冻红细胞可以延长红细胞保存时间长达十年, 主要用于稀有血型红细胞的贮存, 减少了稀有血型血液宝贵资源的浪费, 解决此类血液的紧急临床需要。本研究将滤白和非滤白方法制备的悬浮红细胞进行甘油化冷冻处理, 并于冰冻后一个月复苏进行去甘油洗涤, 重悬于 MAP 红细胞保存液中, 4 $^{\circ}$ C 保存不同时间后, 评估冻存前滤除白细胞对冰冻解冻去甘油红细胞的血液质量和生化指标的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 随机采集 20 名无偿献血献血者全血 400 mL \times 20 袋, 常规分离血浆制备成悬浮红细胞 2 μ \times 20 袋。根据配对设计方法, 将血液等量分成两份 1 μ \times 20 袋, 其中 20 袋在 2~4 $^{\circ}$ C 静置 2~4 h 后用一次性白细胞滤器滤除白细胞为滤白组, 另 20 袋不做其他处理为非滤白组。两组红细胞经 40% 甘油化后冻结, 保存在低于 -65 $^{\circ}$ C 的超低温冰箱至少 30 d, 解冻后红细胞复悬于 MAP 红细胞保存液中, 4 $^{\circ}$ C 保存。分别在 0、7、14、21 d 在无菌净化台内将血液充分混匀后检测解冻红细胞的血液学和生化学指标。

1.2 仪器与试剂 ACP215 全自动红细胞处理机(美国 Haemonetics 公司)、TSCD201 接管机(日本泰尔茂公司)、大容量离心机(日本日立公司)、KX-21 血细胞计数仪(日本 Sysmex

公司)、Nageotte 细胞计数板、一次性使用塑料血袋(广州费森尤斯公司)、235 型去甘油耗材、40% 复方甘油溶液(北京博德桑特)、迈瑞 BS120 全自动生化分析仪、LDH(JSCC 标准化对应)仪器配套试剂、Rapid Lab 855 血气电解质分析仪及原装试剂(Bayer 公司)、ROCHE 电发光仪(日本)ATP 荧光素酶发光法、德国 Boehringer 2,3-DPG 测定专用试剂盒、血浆游离血红蛋白测定试剂盒(北京瑞尔达公司)。

1.3 方法 用三联血袋随机采集 20 名无偿献血者全血 400 mL \times 20 袋, 常规分离血浆制备成悬浮红细胞 2 μ \times 20 袋。运用 ACP215 全自动血液处理仪全自动密闭式方法制备冰冻红细胞, -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存 1 个月后用 ACP215 全自动血液处理仪去甘油化洗涤^[1], 将 ACP215 自动血液处理仪洗涤后的红细胞泵入成品袋并加入 MAP 红细胞保养液, 2~6 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件, 计量资料采用重复测量方差分析数据。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

21 d 保存期内, 非滤白解冻红细胞白细胞数量总是低于 0.1×10^9 /L, 而滤白解冻红细胞白细胞数量总是低于 0.1×10^6 /L。保存 0 d 时, 两组均有轻微的溶血, 两组上清液游离血红蛋白含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着保存时

间的延长,非滤白组上清液游离血红蛋白含量逐渐升高,滤白组轻微升高,保存 7~21 d,非滤白组上清液游离血红蛋白浓度明显高于滤白组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经冰冻及解冻过程,两组红细胞的溶血率均较高,但保存至 21 d,只有 3 例非滤白组的解冻红细胞的溶血率没有达到质量标准(小于 0.8%),而滤白组的 20 例解冻红细胞均达标。经过 21 d 的保存,两组解冻红细胞细胞外钾浓度显著增加,在不同保存时间点,两组解冻红细胞的细胞外钾浓度差异无统计学意义($P>0.05$);随着保存时间的延长,两组解冻红细胞氨浓度几乎呈线性增加,在保存 21 d 时,滤白组解冻红细胞上清液氨离子浓度显著低于 A 组非滤白组解冻红细胞。在保存 0 d 时,两组解冻

红细胞 ATP 水平没有显著性差异,但随保存期延长,两组解冻红细胞 ATP 水平均逐渐下降,非滤白组解冻红细胞 ATP 水平下降更明显,在保存 21 d 时,滤白组解冻红 ATP 水平显著高于非滤白组解冻红细胞。在保存 0 d 时,两组解冻红细胞的 2,3-DPG 水平没有显著性差异,滤白组稍高,在随后的保存期延长,两组解冻红细胞 2,3-DPG 均出现下降,滤白组下降更为明显,到了 21 d,滤白组解冻红细胞 2,3-DPG 水平比非滤白组解冻红细胞低,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组解冻红细胞 LDH 随保存时间延长均逐渐增加,非滤白组增加速度略高于滤白组,但两组比较差异无统计意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 滤白组和非滤白组解冻红细胞血液学和生化学指标检测结果比较($n=20,\bar{x}\pm s$)

指标	组别	0 d	7 d	14 d	21 d	P
溶血率(%)	非滤白组	0.22±0.07	0.50±0.15	0.61±0.17	0.77±0.18	<0.05
	滤白组	0.28±0.05	0.33±0.08*	0.45±0.14*	0.53±0.14*	<0.05
sHb(μg)	非滤白组	0.15±0.05	0.28±0.09	0.33±0.12	0.46±0.13	<0.05
	滤白组	0.18±0.05	0.20±0.07	0.24±0.06	0.29±0.09*	<0.05
K(mmol/L)	非滤白组	1.84±0.17	8.76±1.46	13.71±2.54	17.33±2.79	<0.001
	滤白组	2.09±0.36	7.83±1.51	12.36±2.01	16.68±2.68	<0.001
NH3(μmol/L)	非滤白组	5.78±1.96	121.18±31.43	198.57±41.55	377.71±40.36	<0.001
	滤白组	2.02±0.28*	49.36±17.64*	134.46±31.7*	234.17±46.19*	<0.001
ATP(μmol/g)	非滤白组	7.45±1.44	6.17±1.56	4.82±1.71	2.32±1.14	<0.01
	滤白组	7.32±1.21	6.72±1.31	5.68±1.89	4.36±1.48*	<0.01
2,3-DPG(μmol/g)	非滤白组	6.37±1.56	2.62±0.11	1.47±0.37	0.88±0.25	<0.01
	滤白组	7.02±1.24	1.96±0.09	0.82±0.12	0.21±0.05*	<0.01
LDH(U/L)	非滤白组	1.32±0.31	2.51±0.76	2.92±0.12	3.17±0.70	<0.01
	滤白组	1.14±0.22	1.68±0.33	2.03±0.36	2.36±0.58	<0.01

*: $P<0.05$,与非滤白组比较。

3 讨 论

本研究结果表明,即使经过超低温保存和解冻过程,滤白解冻红细胞和非滤白解冻红细胞的白细胞计数有显著性差异($P<0.05$)。冰冻红细胞在解冻去甘油后重悬于 AS-3 红细胞保存液,2~6 ℃ 保存 21 d 内,仍保持稳定的存活率^[2-3]。本研究通过对比非滤白去甘油解冻红细胞和滤白去甘油解冻红细胞的血液和生化学指标,发现滤白解冻红细胞的生存稳定性相当于或更好于非滤白解冻红细胞,具体表现在以下方面:(1)虽然两组上清液游离红蛋白浓度和溶血率在解冻后都逐渐增加,和相关研究结果相似^[4],但滤白解冻红细胞较非滤白解冻红细胞低。(2)非滤白组解冻红细胞和滤白组解冻红细胞在 MAP 红细胞保存液 2~6 ℃ 保存,ATP 水平均随着保存时间的延长逐渐下降,与相关研究结果相似^[5]。但 Lecak 等^[6]的研究提示解冻红细胞保存于 AS-3 红细胞保存液后,细胞 ATP 水平会轻微上升,可能因为 AS-3 红细胞保存液中较高浓度葡萄糖和腺嘌呤刺激红细胞糖酵解和 ATP 合成。本研究中,经过 21 d 的保存,滤白组解冻红细胞 ATP 下降较少,与非滤白解冻细胞比较有显著性差异,可能因为滤白解冻红细胞白细胞的缺失有利于 ATP 合成^[4]。(3)滤白组解冻红细胞氨离子、细胞外钾及 LDH 均较低,与相关研究结果相似^[6-7]。经 2~6 ℃ 长时间保存后,解冻红细胞氨离子、细胞外钾及 LDH 增加可能与部分红细胞经过冻结和解冻过程受损有关,而滤白组更高则可能

是由于残存的白细胞加速红细胞受损。当儿童或老年患者输血时,因为此类患者无法处理增加了的大量氨离子,应该考虑输注氨离子浓度较低的滤白解冻红细胞。(4) 2,3-DPG 浓度在两组解冻红细胞间差异无统计学意义($P>0.05$)。这可能是因为 2,3-DPG 浓度并不与白细胞相关,而是与活的红细胞表面生理功能相关。

综上所述,冻存前滤除白细胞对减轻解冻红细胞的溶血率、稳定 ATP 水平有作用,表明滤白解冻红细胞长期生存能力较非滤白解冻红细胞强。

参考文献

[1] 杨冬燕,段恒英,王娟娟,等.全自动细胞处理系统制备冰冻红细胞的关键控制点及效果评价[J].重庆医学,2009,38(9):1078-1082.

[2] Bohoněk M,Petrás M,Turek I,et al. Quality evaluation of red blood cell storage with 21-dy post-thaw storage in AS-3 and SAG-M; biochemical and Cr51 recovery measures[J]. Transfusion, 2010,50(1):1007-1013.

[3] Hansen A,Yi QL,Acker JP. Quality of red blood cells washed using the ACP 215 cell processor; assessment of optimal pre-and postwash storage times and conditions[J]. Transfusion, 2013, 53(8):1772-1779.

[4] Bohoněk M,Petrás M,Turek I,et al. In vitro (下转第 1249 页)

1.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS15.0 软件对所得数据进行分析,计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

由表 1 可以看出,免疫耐受组和免疫清除组患者的 CD19⁺B 细胞、CD8⁺T 的数值百分比均明显高于对照组,不同组间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由表 2 可以看出免疫耐受组和免疫清除组患者 CD3⁺T、CD4⁺T、CD4⁺/CD8⁺ 的数值百分比均明显低于对照组,不同组间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 B 细胞、CD8⁺T 的数值 (%)

组别	<i>n</i>	CD8 ⁺	B 细胞
免疫耐受组	21	26.1	12.8±5.0
免疫清除组	29	24.3	15.7±3.9
对照组	20	18.5	10.9±4.5

表 2 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的百分比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ T 细胞 (%)	CD4 ⁺ T 细胞 (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
免疫耐受组	21	72.4±7.1	32.6±5.1	1.25±0.52
免疫清除组	29	73.4±9.5	27.2±5.5	1.12±0.49
对照组	20	82.5±8.2	42.2±7.2	2.28±0.42

3 讨 论

乙型肝炎是一种传染能力强、致死率高的传染性疾病,其中慢性 HBV 感染又是最为常见的乙型肝炎,HBV 感染者需要尽早治疗^[4]。慢性 HBV 患者通常是之前的 HBV 携带者,且经过 6 个月治疗后未被治愈,因此病毒活跃性较高,是各类乙型肝炎患者中传染率较高的类型^[5]。患有乙型肝炎的患者不仅严重影响到自身的健康和生命,还因其较高的传染性而不能正常工作并威胁到他人的健康^[6]。被确诊后的慢性乙型肝炎患者又按照《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断及分型标准将患者分为将慢性乙型病毒性肝炎自然史分为免疫耐受期、免疫清除期、非活动期(低复制期)及再活动期^[7]。慢性 HBV 是过去 HBV 的携带者,病毒较为活跃,传染率极高,一旦诊断为慢性 HBV 感染者就需要立即接受治疗。而慢性乙型肝炎的预防也极为重要,因此对于慢性 HBV 感染者的临床症状和患者不同免疫状态外周血 T、B 细胞亚群的百分比数值及其相互关系有重要的意义,不但为慢性 HBV 患者的医治提供了临床资料,还对提高慢性 HBV 患者的治愈率,乙型肝炎的预防,疫苗的研发和接种提供了依据^[8-9]。

有研究表明,慢性 HBV 患者中 CD19⁺B 细胞、CD8⁺T 的

数值百分比均明显升高,而患者的 CD3⁺T、CD4⁺T、CD4⁺/CD8⁺ 的数值百分比均明显降低。根据外周血 T、B 细胞亚群的数值百分比及其相互关系,得出慢性 HBV 患者的各项指标的变化等,进而采取进一步的治疗。

本研究通过对 2010 年 2 月至 2013 年 3 月 50 例慢性乙肝患者分为免疫耐受组和免疫清除组,检测患者的 CD19⁺B 细胞、CD8⁺T 的数值百分比均明显高于对照组,不同组间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而免疫耐受组和免疫清除组患者 CD3⁺T、CD4⁺T、CD4⁺/CD8⁺ 的数值百分比均明显低于对照组,不同组间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。综上所述,HBV 感染者不同免疫状态外周血 T、B 细胞亚群的数值及其相互关系可作为医生在慢性 HBV 临床诊断中的参考指标,对早期诊断治疗具有重要的指导作用,有助于疾病的预防、诊断和治疗,值得临床推广应用^[10]。

参考文献

[1] 应若素,杨湛,陈燕宇,等. 丙氨酸氨基转移酶水平正常与轻度升高慢性 HBV 感染者的肝脏病理学特征比较[J]. 中华肝脏病杂志,2012,20(8):585-588.

[2] 唐翔宇,杨丽莎,唐美媛,等. 广西桂北地区慢性 HBV 感染不同免疫状态与外周血 T、B 细胞亚群和 NK 细胞的相关性研究[J]. 重庆医学,2013,42(5):496-498.

[3] 郑瑞丹,陈建能,高建平,等. 慢性 HBV 感染者甘露糖结合蛋白基因多态性与疾病进展及与 HBV DNA 相关性的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(2):90-92.

[4] Gao J, Ma X, Gu W, et al. Detection of immune cell subsets in renal allograft recipients before operation and its significance[J]. Chin J of Tis Engin Res, 2013, 17(44):7675-7680.

[5] 邓敏,李明慧,刘顺爱,等. 慢性 HBV 感染者调节性 T 细胞水平及 Foxp3 与 CD127 表达关系的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(1):21-23.

[6] 陈禄彪,揭育胜,许镇,等. OAS-1 基因 SNP rs2660 与慢性 HBV 感染者自发性 HBeAg 血清转换的关系[J]. 中山大学学报:医学科学版,2010,31(5):657-660.

[7] 王社梁,董国君. 血清乙型肝炎表面抗原和表面抗体共阳性慢性 HBV 感染者病毒 S 基因变异分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2012,32(3):249-252.

[8] 张平,焦运,袁迎春,等. 乙型肝炎患者外周血淋巴细胞的变化[J]. 宁夏医科大学学报,2009,31(4):459-460.

[9] 吴涛,施理,林锋,等. 慢性 HBV 感染者外周血 T 细胞亚群研究[J]. 中国热带医学,2011,11(7):867-869.

[10] 陆长春,丁敏侠. 273 例慢性 HBV 感染者肝活检病理与 HBV-DNA 定量的关系分析[J]. 内蒙古中医药,2013,32(15):105.

(收稿日期:2014-12-25)

(上接第 1247 页)

parameters of cryopreserved leucodepleted and non-leucodepleted red blood cellscollected by apheresis or from whole blood and stored in AS-3 for 21 days after thawing[Z]. 2014:199-203.

[5] Bandarenko N, Cancelas J, Snyder EL, et al. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution (AS)-5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system[J]. Transfusion, 2007, 47(4): 680-686.

[6] Lecak J, Scott K, Young C, et al. Evaluation of red blood cells stored at-80 degrees C in excess of 10 years[J]. Transfusion, 2004, 44(9):1306-1313.

[7] Hess JR, Hill HR, Oliver CK, et al. The effect of two additive solutions on the postthaw storage of RBCs[J]. Transfusion, 2001, 41(7):923-927.

(收稿日期:2015-01-02)