

网络出版时间: 2024-12-26 16:52:10 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1136.017>

降低血小板活性氧生成对减少冷藏血小板被吞噬的作用

谢如锋¹, 王志成², 孙洁¹, 杨懿铭¹, 杨洁¹

(¹ 上海市血液中心血液工程学科, 上海 200051; ² 复旦大学附属上海华山医院输血科, 上海 200040)

摘要 目的 探究 N-乙酰半胱氨酸(NAC)的添加在血小板冷藏保存期间对活性氧(ROS)异常增加的影响,进而防止血小板被巨噬细胞和肝细胞识别并清除的作用。方法 将浓缩血小板分成室温组(22℃组)、冷藏组(4℃组)和 NAC 添加组; NAC 添加组为冷藏血小板中分别添加 5 mmol/L(N5 组)和 25 mmol/L(N25 组)的 NAC; 各组血小板保存 5 d 后,流式细胞仪检测血小板 ROS、活化等指标。佛波酯诱导的 THP-1 细胞或原代培养的 HepG2 细胞用于检测对各组血小板的吞噬作用。结果 保存 5 d 后 4℃组血小板 ROS 水平较 22℃组升高($P < 0.05$); 加入 NAC 后,ROS 水平则降低($P < 0.05$)。与 4℃组相比, N5 组血小板 CD62P、磷脂酰丝氨酸(PS)的表达以及 β -N-乙酰葡萄糖胺(β -GlcNAc)的暴露程度均降低($P < 0.05$)。THP-1 和 HepG2 对 N5 组血小板的吞噬率也低于 4℃组($P < 0.05$)。但添加 5 mmol/L NAC 对冷藏 5 d 血小板的计数、pH 值、CD42b 表达、 β -半乳糖(β -Gal)暴露和血小板凝血功能无显著影响。结论 冷藏血小板添加 NAC 可显著降低血小板 ROS 水平,有效减少冷藏血小板被细胞吞噬,提示 NAC 能防止血小板回输体内后被吞噬清除。

关键词 血小板; 冷藏保存; 活性氧; N-乙酰半胱氨酸; 吞噬; 冷藏损伤

中图分类号 R 457.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0123-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.017

临床输注血小板一般以 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的血库标准方法保存,为保证血小板活力和防止细菌及其他

病原体污染,其保存期限仅 5~7 d。与室温保存相比较,冷藏血小板可保存 10 d 以上,不仅降低污染风险,且具有更高的体外活力和更强的止血功能^[1-3]。然而低温可诱导血小板冷藏损伤,导致输注的血小板被快速清除,其体内回收率和生存时间显著下降^[4-7]。至今未见能应用于临床的、阻断血小板冷藏损伤的技术和方法。

N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是一种抗氧化剂,具有清除多种活性氧(reactive oxygen

2024-11-14 接收

基金项目: 上海市卫生健康委员会科研课题计划项目(编号: 201940111、202140008); 上海市科学技术委员会科研计划项目(编号: 15ZR1438300)

作者简介: 谢如锋,女,主任技师;

杨洁,女,副研究员,通信作者, E-mail: yangjie@shc.org.cn

protein in maternal liver significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the DEHP group, the body weight of both dams and fetuses significantly increased in DEHP + DMF group ($P < 0.05$); the levels of TBA, ALP, AST/ALT in the serum of dams and amniotic fluid of fetuses decreased ($P < 0.05$); the degree of liver lesions was improved; the transcription levels of inflammation-related factors TNF- α , IL-6, IL-1, IL-18 and NLRP3 in maternal liver decreased ($P < 0.05$); the expression of NF- κ B and NLRP3 protein in maternal liver significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** DMF can effectively protect the DEHP exposure to lead to female ICP, and its mechanism may be through inhibiting the NF- κ B/NLRP3 pathway and reducing liver inflammation.

Key words intrahepatic cholestasis of pregnancy; dimethyl fumarate; di (2-ethylhexyl) phthalate; inflammation; NF- κ B; NLRP3 inflammasome

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82073566); Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2023A20294); Youth Fund of Anhui Medical University (No. 2023xkj043); Anhui Public Health Clinical Center, Scientific Research and Cultivation Foundation of the First Affiliated Hospital (North District) of Anhui Medical University (Nos. 2023YKJ14, 2023YKJ06, 2023YKJ11)

Corresponding author Wang Jianqing, E-mail: jianqingwang81@126.com

species, ROS) 成分,进而抑制细胞的损伤和凋亡的作用^[5-7]。早期研究^[8]表明,添加 NAC 可显著提高冷藏血小板体外活力。近年来又有研究^[9-10]表明,使用含 NAC 的血小板添加液冷藏保存,可降低血小板 ROS 水平,并保持其体内活力。该研究拟选择合适浓度的 NAC,探究其对血小板胞质 ROS 的影响以及 ROS 水平与血小板吞噬清除之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血小板样本 由上海市血液中心采自健康献血者(伦理审批号: SBC-IRB-2019-20),与血液保存液 II 混合后,于采集当天以白膜法制备成单人份浓缩血小板。

1.1.2 实验细胞 人单核细胞株 THP-1 和人肝癌细胞(human hepatocellular carcinoma cell, HepG2),购自中国科学院细胞/干细胞库(上海)。

1.1.3 实验设备 血细胞分析仪(型号: Mindray BC-5150) 购于中国迈瑞公司; 荧光/发光酶标仪(型号: SpectraMax i3x) 购于美国 MOLECULAR DEVICES 公司; 流式细胞分析仪(型号: CytoFLEX) 购于美国 BeckmanCoulter 公司; pH 计(型号: SevenCompact™ S230) 购于瑞士 Mettler Toledo 公司; 血栓弹力图仪(型号: TEG5000) 购于美国 HAEMONETICS 公司; 二氧化碳培养箱(型号: MCO-48AIC) 购于日本 Panasonic 公司。

1.1.4 试剂和抗体 NAC、佛波酯购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 荧光探针 CellROX® Deep Red Reagent C10422、Lipid Peroxidation 试剂盒 C10445、CFSE 绿色荧光染料购于美国 Life technologies 公司; FITC-琥珀酰化小麦胚芽凝集素 sWGA、FITC-蓖麻子凝集素 RCA120 购于美国 Vector Laboratories 公司; Annexin V-FITC、CD62P-PE 抗体、CD42b-PE 抗体购于美国 BD Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 血小板样品分组和保存 将浓缩血小板每 3 份 ABO 血型同型混合,分装于血小板保存袋中。将浓缩血小板分成室温组(22C 组 22℃ 保存)、冷藏组(4C 组 4℃ 保存)和 NAC 添加组; NAC 添加组为冷藏血小板中分别添加 5 mmol/L 和 25 mmol/L 的 NAC(N5 组、N25 组 4℃ 保存)。各组血小板保存至 5 d。根据实验设计取样测定。

1.2.2 血小板 ROS 和脂质氧化水平的测定 各组血小板保存 1 d 和 5 d 后,加入 10 μmol/L 荧光探针 Deep Red Reagent,置 37℃ 标记 30 min,流式细胞仪分析检测血小板荧光强度。脂质氧化测定采用 Lipid Peroxidation 试剂盒,按照试剂说明书进行标记,荧光/发光酶标仪分别读取每个样本的 $\lambda_{510\text{ nm}}$ 和 $\lambda_{591\text{ nm}}$ 激发光值,并计算比值。 $\lambda_{510\text{ nm}}/\lambda_{591\text{ nm}}$ 即脂质氧化比值,脂质氧化比值越大,脂质氧化水平越高。

1.2.3 血小板体外活力指标和功能测定 各组血小板保存 5 d 后,采用 CD62P-PE 抗体、Annexin V-FITC 和 CD42b-PE 抗体进行标记,流式细胞仪检测各组血小板膜上表面 P-选择素(CD62P)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和糖蛋白 I b α (glycoprotein I b α , GP I b α)表达量的变化。血小板聚集功能检测采用 TEG5000 血栓弹力图仪,取各组血小板样品 1 ml,与 40 μl 高岭土混合,加入 20 μl 0.2 mmol/L CaCl₂ 开始反应,以血栓弹力图曲线和纤维蛋白凝块最大振幅(maximum amplitude, MA)数值判定血小板聚集功能。

1.2.4 β -N-乙酰葡萄糖胺(β -N-acetylglucosamine, β -GlcNAc)和 β -半乳糖(β -galactose, β -Gal)流式检测 22C 组、4C 组和 NAC 添加组血小板保存 1、3、5 d 后,分别加入 0.5 μg/ml FITC-sWGA 和 FITC-RCA120,室温孵育 30 min 后,流式细胞仪检测各保存时间点各组血小板表面糖蛋白残基 β -GlcNAc 和 β -Gal 表达的荧光强度。

1.2.5 吞噬实验检测 THP-1 和 HepG2 细胞对血小板的吞噬率 THP-1 细胞经 500 nmol/L 佛波酯诱导分化 24 h 后,与 CFSE 荧光标记的各组血小板孵育 30 min。去除并冲洗未被吞噬的血小板。胰酶消化获取 THP-1 细胞,并用 CD42b-PE 抗体标记细胞(以此排除黏附有血小板的细胞)。流式细胞仪检测 CFSE 阳性/CD42b-PE 阴性细胞在所有 CD42b-PE 阴性细胞中的百分比,即 THP-1 细胞对血小板的吞噬率。HepG2 细胞吞噬率检测无需诱导,其余方法步骤同 THP-1 细胞。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。两组间均数比较采用独立样本配对 *t* 检验;多组间均数比较采用 One-way ANOVA 或 Two-way ANOVA,并进行 Tukey 的多重检验;以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板 ROS 和脂质氧化检测 各组血小板保存 1 d 和 5 d 后,流式检测血小板的 ROS 水平和脂质氧化水平并进行比较。流式结果显示,在相同的保存时间点,4C 组的血小板 ROS 水平均明显高于 22C 组血小板 ($P < 0.05$);在冷藏血小板中添加 NAC 后,与 4C 组比较,N5、N25 组血小板的 ROS 水平均下降(1 d: $P < 0.01$, $P < 0.0001$; 5 d: $P < 0.05$, $P < 0.01$)。ROS 水平的下降程度与添加的 NAC 浓度呈剂量依赖关系。同时,添加 NAC 的各组在保存 5 d 后,与 22C 组血小板 ROS 水平差异均无统计学意义(图 1A)。同时,在保存 5 d 后,4C 组血小板脂质氧化较 22C 组血小板有增加($P < 0.05$)。虽然添加 NAC 后,血小板的脂质氧化水平发生了下降,但较 4C 组差异无统计学意义(图 1B)。

2.2 血小板基础指标和活化指标检测 各组血小板保存 5 d 后,对血小板进行计数并检测其 pH 值、平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)(表 1)。与 22C 组相比,4C 组血小板保存 5 d 后,细胞数下降($P < 0.05$)。添加不同浓度 NAC 后,冷藏血小板的数量略有上升,但 N5 组与 N25 组间差异无统计学意义。pH 值检测结果显示,各组冷藏血小板

间差异无统计学意义,但 N5 组血小板 pH 值高于 22C 组血小板($P < 0.05$)。同时,冷藏 5 d 后,各组血小板的 MPV 均高于 22C 组血小板,其中 N25 组较 22C 组血小板的 MPV 升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

流式检测各组血小板的 CD62P、PS 等活化指标以及糖蛋白 GP I b α 的表达水平。结果显示,与 22C 组相比,血小板冷藏 5 d 后,活化指标 CD62P、PS 阳性率均升高($P < 0.01$)。添加低浓度 NAC 后,N5 组血小板的 CD62P 表达较 4C 组降低($P < 0.05$),而高浓度的 NAC 则无法抑制 CD62P 的表达,与 4C 组差异无统计学意义(图 2A)。同时,各浓度的 NAC 均能有效降低冷藏血小板的 PS 表达($P < 0.01$)(图 2B)。另外,CD42b 的流式结果显示,与 22C 组相比,4C 组血小板冷藏 5 d 后,表面糖蛋白 GP I b α 表达有所下降,但差异无统计学意义。不同浓度 NAC 添加后,CD42b 的表达虽略有上升,但与 4C 组血小板均差异无统计学意义(图 2C)。

2.3 血小板表面糖蛋白残基 β -GlcNAc 和 β -Gal 的暴露情况 流式结果表明,在冷藏过程中,血小板糖蛋白残基 β -GlcNAc 和 β -Gal 暴露随着保存时间的延长逐渐增加。保存 5 d 后,与 22C 组相比,4C 组血小板的 β -GlcNAc 暴露增加($P < 0.05$);加入

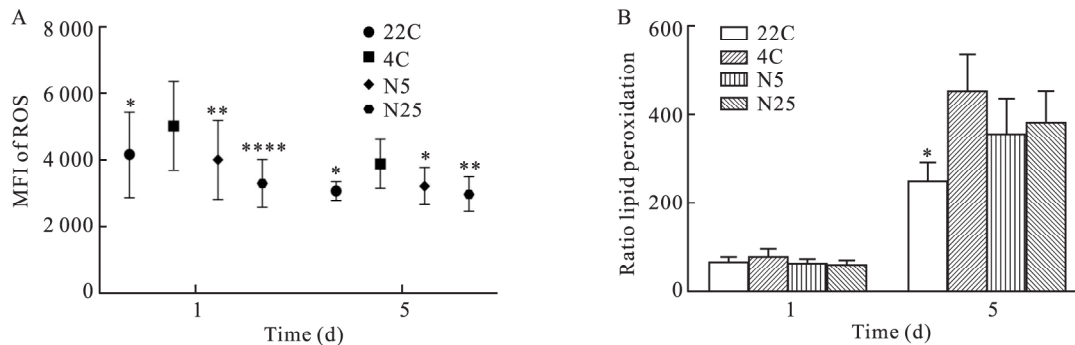


图 1 血小板保存后 ROS 水平和脂质氧化水平检测

Fig. 1 Detection of the levels of ROS and lipid peroxidation after platelet storage

A: ROS expression; B: the results of lipid peroxidation; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs 4C group.

表 1 添加 NAC 对冷藏 5 d 血小板计数、pH 和 MPV 的影响情况($n = 18$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of NAC on count, pH and MPV of platelets after 5-day storage ($n = 18$, $\bar{x} \pm s$)

Indicators	22C	4C	N5	N25
Platelet count ($\times 10^9/L$)	560.30 $\pm$ 130.38	485.70 $\pm$ 89.03*	537.20 $\pm$ 143.64	527.60 $\pm$ 103.52
MPV	8.25 $\pm$ 0.36	8.57 $\pm$ 0.45	8.80 $\pm$ 0.46	9.07 $\pm$ 0.25*
pH	6.830 $\pm$ 0.027	7.150 $\pm$ 0.015	7.230 $\pm$ 0.027*	7.110 $\pm$ 0.022

* $P < 0.05$ vs 22C group.

NAC 后, 冷藏血小板的 β -GlcNAc 暴露则降低 ($P < 0.05$), 且与 22C 组间差异无统计学意义(图 3A)。同时 4C 组血小板的 β -Gal 表达较 22C 组虽有所增加, 但差异无统计学意义; N5 组的 β -Gal 表达与 4C 组、22C 组相比, 亦差异无统计学意义(图 3B)。

2.4 血小板聚集功能检测 血栓弹力图曲线和

MA 值的结果显示, 与室温保存的血小板相比, 冷藏 5 d 的血小板聚集功能有所升高, 但两者差异无统计学意义。添加 NAC 后, N5 组与 4C 组、22C 组相比, 亦差异无统计学意义。这提示, 低浓度 NAC 的添加对冷藏血小板的聚集功能无显著影响(图 4)。

2.5 THP-1 和 HepG2 细胞对血小板的体外吞噬

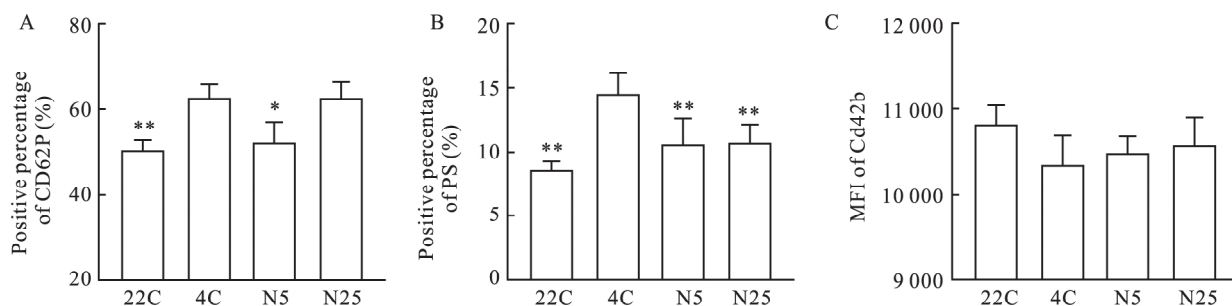


图2 血小板活化标志和糖蛋白表达检测

Fig.2 Detection of platelet activation markers and glycoprotein expression

A: CD62P expression; B: PS expression; C: CD42b expression; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 4C group.

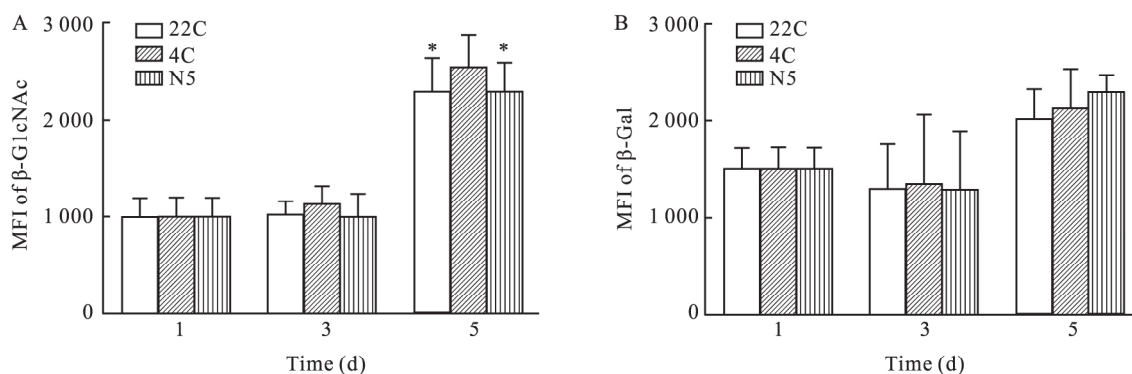


图3 血小板膜糖蛋白残基的暴露情况

Fig.3 Exposure of glycoprotein residues on the platelet membrane

A: β -GlcNAc expression; B: β -Gal expression; * $P < 0.05$ vs 4C group.

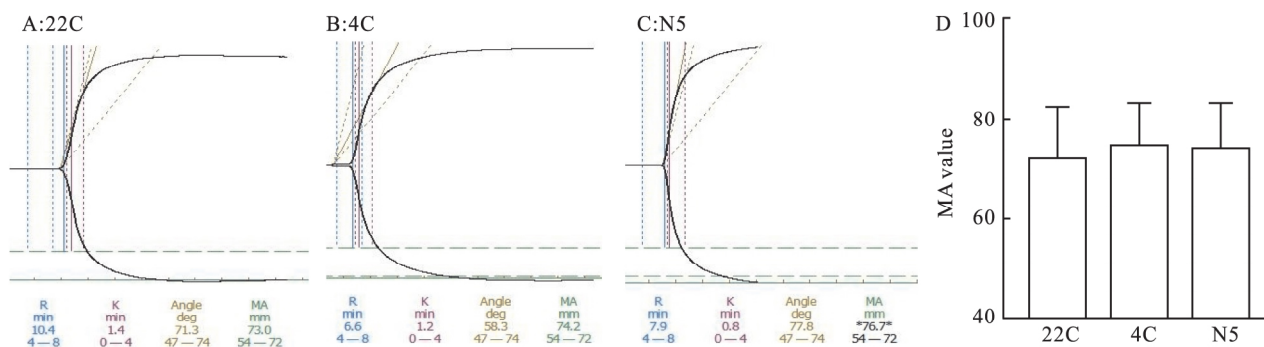


图4 血栓弹力图检测血小板聚集功能

Fig.4 Platelet aggregation function tested by Thromboelastography

A: 22C group; B: 4C group; C: N5 group; D: MA value.

作用 吞噬实验结果表明,THP-1 细胞对保存 5 d 的 4C 组血小板的吞噬率高于 22C 组 ($P < 0.05$)。添加了 NAC 后,THP-1 细胞对 N5 组血小板的吞噬作用较其对 4C 组的下降 ($P < 0.05$) 较其对 22C 组的吞噬作用差异无统计学意义(图 5)。HepG2 细胞分别对 22C 组、4C 组和 N5 组血小板的体外吞噬情况也显示,添加了 NAC 后能有效抑制 HepG2 细胞对冷藏血小板的吞噬作用(图 6)。

3 讨论

血小板冷藏损伤包括其骨架结构和形态变化、胞质钙水平升高、血小板活化和凋亡等^[11]。冷藏保存的血小板虽然能保持较好的聚集功能,但回输体内后被快速吞噬清除,造成其体内回收率显著降低。已有研究证实,冷藏后的血小板膜上黏附分子受体 GP I b-IX-V 的 GP I b α 亚基暴露了糖链末端的 β -N-乙酰葡萄糖氨基,且 GP I b α 发生聚集成簇,从而导致血小板易被巨噬细胞表面的整合素 α M β 2 识别并吞噬^[4]。进一步研究发现,冷藏超过 48 h 的血小

板在复温后,GP I b α 糖链末端在唾液酸转移酶的作用下发生去唾液酸化,暴露了 β -半乳糖残基,导致血小板被肝细胞唾液酸糖蛋白受体识别、清除^[12]进而使得冷藏血小板输注后其体内回收率显著低于室温保存血小板,影响了临床血小板在临床输血中的应用。

已有研究证实血小板 ROS 水平与其保存损伤有密切关系。2016 年,来自美国 FDA 的 Xu et al^[13-14]采用 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 h 与 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 温度循环方法(temperature cycling, TC)在冷藏血小板发生不可逆损伤前间歇性升高温度。他们发现,TC 保存的血小板保存 5 ~ 7 d 后,输注到严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠体内,小鼠肝细胞唾液酸糖蛋白受体不能识别 TC 保存的血小板,该血小板的回收率显著高于冷藏保存血小板。同时发现,与室温保存血小板相比,冷藏保存血小板胞质 ROS 水平显著升高,而 TC 保存方法则能显著降低血小板的 ROS 水平。此外,Ghasemzadeh et al^[15]的研究统计了 ROS 有差异的两组血小板样

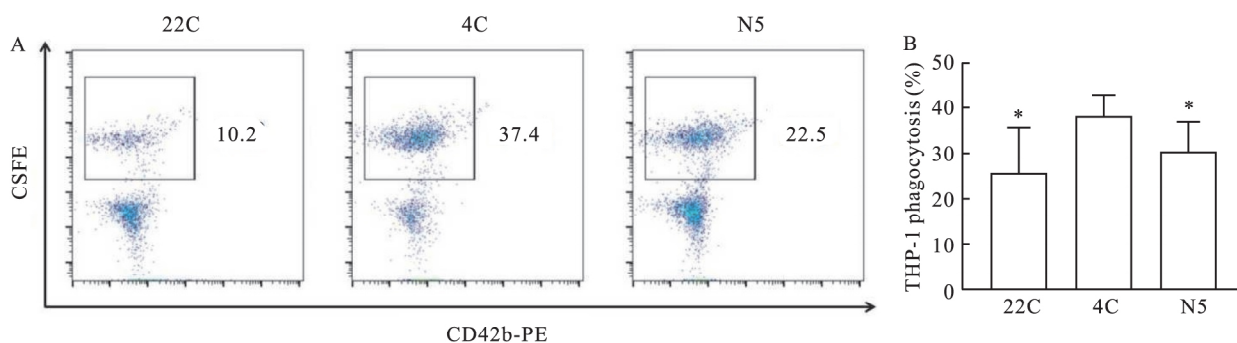


图 5 THP-1 细胞吞噬各组血小板的比较

Fig. 5 Comparison of phagocytosis of platelets in each group by THP-1 cells

A: Flow diagram of platelet phagocytosis by THP-1 cells; B: Phagocytic rate of THP-1 cells; * $P < 0.05$ vs 4C group.

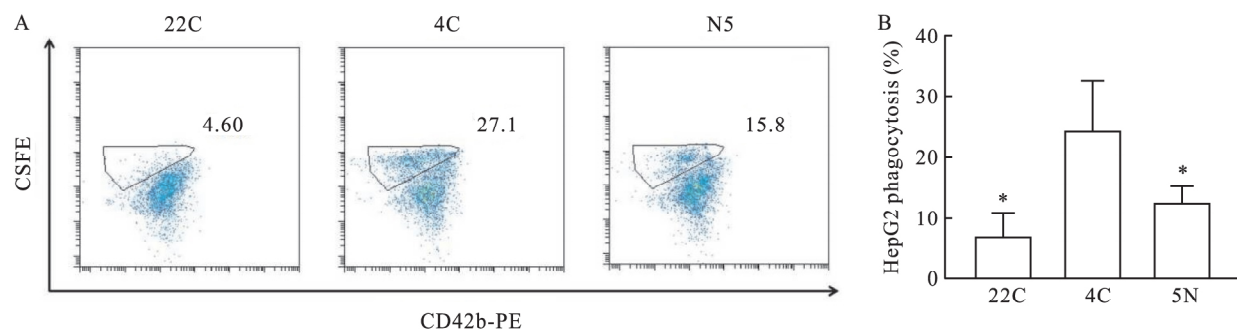


图 6 HepG2 细胞吞噬各组血小板的比较

Fig. 6 Comparison of phagocytosis of platelets in each group by HepG 2 cells

A: Flow diagram of platelet phagocytosis by HepG2 cells; B: Phagocytic rate of HepG2 cells; * $P < 0.05$ vs 4C group.

品,发现 ROS 升高与血小板 GP I b α 的脱落、微囊泡的增加以及磷脂酰丝氨酸表达增加均显著相关。随后又有一些研究^[16-18]报道,长时间冷藏使血小板线粒体功能异常并生成过量 ROS,添加 ROS 清除剂如 NAC、L-肉毒碱(L-carnitine) 和白藜芦醇(resveratrol) 等,可显著降低冷藏血小板 ROS 水平,防止血小板冷藏损伤。

本文研究了不同浓度的 NAC 对降低冷藏血小板胞质 ROS 的作用。在 5 mmol/L 和 25 mmol/L 两个有效浓度中选取了较低剂量作进一步实验,以减少 NAC 可能的抗血小板作用。结果表明,冷藏使血小板 ROS 水平升高的同时,血小板膜脂质氧化增加,保存 5 d 后有显著差异。添加 NAC 冷藏可显著防止脂质氧化,但保存 5 d 后与冷藏保存的血小板相比却未见显著差异。同时,本研究与以往的研究^[18]均表明,冷藏后血小板 CD62P 和磷脂酰丝氨酸表达显著增加,添加 NAC 后两者的表达均显著降低,提示 5 mmol/L NAC 能有效抑制血小板活化和凋亡,且有效浓度远低于 Handigund et al^[8]的研究结果。另外,本研究证实,添加 NAC 可显著降低冷藏血小板膜糖蛋白残基 β -GlcNAc 的暴露,并通过巨噬细胞模型(诱导活化的 THP-1 细胞)建立的体外吞噬实验进一步验证了其保护作用。虽然 NAC 的添加对冷藏血小板 β -Gal 的表达未见明显影响,但肝细胞模型(HepG2) 体外吞噬实验仍显示,添加 NAC 能显著降低 HepG2 细胞对冷藏血小板的体外清除作用。同时, NAC 早已是我国药典收录的一种常用药,本研究表明, 5 mmol/L NAC 的添加对冷藏血小板聚集功能无显著影响,这也为临床血小板输注制品中添加 NAC 的实际应用提供了实验依据。

综上所述, NAC 可有效降低冷藏血小板 ROS 水平,防止脂质氧化、抑制血小板活化和凋亡,进而减少冷藏血小板被巨噬细胞和肝细胞识别吞噬。NAC 的添加有可能改善冷藏血小板回输体内后被快速吞噬清除的状况,进一步的研究有待采用合适的动物模型和人体试验进行验证。

参考文献

- [1] Hornsey V S, Drummol/Lond O, McMillan L, et al. Cold storage of pooled, buffy-coat-derived, leucoreduced platelets in plasma [J]. Vox Sang, 2008, 95(1): 26-32. doi: 10.1111/j.1423-0410.2008.01052.x.
- [2] Mack J P, Miles J, Stolla M. Cold-stored platelets: review of

- studies in humans[J]. Transfus Med Rev, 2020, 34(4): 221-6. doi: 10.1016/j.tmr.2020.08.003.
- [3] Zhao H W, Serrano K, Stefanoni D, et al. In vitro characterization and metabolomic analysis of cold-stored platelets [J]. J Proteome Res, 2021, 20(5): 2251-65. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00792.
- [4] Hoffmeister K M, Josefsson E C, Isaac N A, et al. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets [J]. Science, 2003, 301(5639): 1531-4. doi: 10.1126/science.1085322.
- [5] Berniakovich I, Laricchia-Robbio L, Izpisua Belmonte J C. N-acetylcysteine protects induced pluripotent stem cells from in vitro stress: Impact on differentiation outcome [J]. Int J Dev Biol, 2012, 56(9): 729-35. doi: 10.1387/ijdb.120070ji.
- [6] Li R, Jia Z, Trush M A. Defining ROS in biology and medicine [J]. React Oxyg Species (Apex), 2016, 1(1): 9-21. doi: 10.20455/ros.2016.803.
- [7] Hosseini E, Ghasemzadeh M, Atashibarg M, et al. ROS scavenger, N-acetyl-L-cysteine and NOX specific inhibitor, VAS2870 reduce platelets apoptosis while enhancing their viability during storage [J]. Transfusion, 2019, 59(4): 1333-43. doi: 10.1111/trf.15114.
- [8] Handigund M, Bae T W, Lee J, et al. Evaluation of in vitro storage characteristics of cold stored platelet concentrates with N acetylcysteine (NAC) [J]. Transfus Apher Sci, 2016, 54(1): 127-38. doi: 10.1016/j.transci.2016.01.006.
- [9] Handigund M, Kim J T, Bae T W, et al. N-acetylcysteine reduce the stress induced by cold storage of platelets: a potential way to extend shelf life of platelets [J]. Transfus Apher Sci, 2021, 60(2): 103039. doi: 10.1016/j.transci.2020.103039.
- [10] Hegde S, Wellendorf A M, Zheng Y, et al. Antioxidant prevents clearance of hemostatically competent platelets after long-term cold storage [J]. Transfusion, 2021, 61(2): 557-67. doi: 10.1111/trf.16200.
- [11] Getz T M. Physiology of cold-stored platelets [J]. Transfus Apher Sci, 2019, 58(1): 12-5. doi: 10.1016/j.transci.2018.12.011.
- [12] Rumjantseva V, Grewal P K, Wandall H H, et al. Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets [J]. Nat Med, 2009, 15(11): 1273-80. doi: 10.1038/nm.2030.
- [13] Skripchenko A, Gelderman M P, Awatefe H, et al. Automated cold temperature cycling improves in vitro platelet properties and in vivo recovery in a mouse model compared to continuous cold storage [J]. Transfusion, 2016, 56(1): 24-32. doi: 10.1111/trf.13273.
- [14] Vostal J G, Gelderman M P, Skripchenko A, et al. Temperature cycling during platelet cold storage improves in vivo recovery and survival in healthy volunteers [J]. Transfusion, 2018, 58(1): 25-33. doi: 10.1111/trf.14392.
- [15] Ghasemzadeh M, Hosseini E, Roudsari Z O, et al. Intraplatelet reactive oxygen species (ROS) correlate with the shedding of ad-

- hesive receptors , microvesiculation and platelet adhesion to collagen during storage: Does endogenous ROS generation downregulate platelet adhesive function? [J]. *Thromb Res* ,2018 ,163: 153 – 61. doi: 10. 1016/j. thromres. 2018. 01. 048.
- [16] Amiri F , Dahaj M M , Siasi N H , et al. Treatment of platelet concentrates with the L-carnitine modulates platelets oxidative stress and platelet apoptosis due to mitochondrial reactive oxygen species reduction and reducing cytochrome C release during storage[J]. *J Thromb Thrombolysis* , 2021 , 51(2) : 277 – 85. doi: 10. 1007/ s11239 – 020 – 02241 – 1.
- [17] Ekaney M L , Grable M A , Powers W F 4th , et al. Cytochrome c and resveratrol preserve platelet function during cold storage[J]. *J Trauma Acute Care Surg* ,2017 , 83(2) : 271 – 7. doi: 10. 1097/ TA. 0000000000001547.
- [18] Wang L , Xie R , Fan Z , et al. The contribution of oxidative stress to platelet senescence during storage[J]. *Transfusion* , 2019 , 59 (7) : 2389 – 402. doi: 10. 1111/ trf. 15291.

The effect of reducing platelet reactive oxygen species on decreasing of the refrigerated platelets being phagocytosed

Xie Rufeng¹ , Wang Zhicheng² , Sun Jie¹ , Yang Yiming¹ , Yang Jie¹

(¹*Blood Engineering Laboratory , Shanghai Blood Center , Shanghai 200051;*

²*Dept of Transfusion , Huashan Hospital , Fudan University , Shanghai 200040)*

Abstract Objective To explore the effect of the addition of N-acetylcysteine (NAC) on the abnormal increase of reactive oxygen species (ROS) during platelet cold storage , and to clarify its function of preventing the platelets from being recognized and cleared by macrophages and hepatocytes. **Methods** Platelets Concentrates were divided into room temperature group (22C) , cold storage group (4C) and NAC addition group. In NAC addition group , the platelets were supplemented with 5 mmol/L (N5) and 25 mmol/L (N25) NAC. After 5-day storage , the levels of ROS , activation markers and other index of platelets in each group were detected by flow cytometry. Platelet phagocytosis was detected by PMA-activated THP-1 cells or by primary cultured HepG2 cells. **Results** After 5 days of storage , ROS increased significantly in 4C group than those in 22C group ($P < 0.05$) , and after NAC addition , ROS level reduced significantly ($P < 0.05$) . The expression of CD62P and PS and the exposure of β -GlcNAc on platelets in N5 group significantly decreased compared with those in 4C group ($P < 0.05$) . The platelet phagocytosis by THP-1 and HepG2 cells were also significantly lower in N5 group than those in 4C group ($P < 0.05$) . However , the addition of 5 mmol/L NAC did not significantly affect the count , pH , CD42b expression , β -Gal exposure and coagulation function of cold-stored platelet after 5-day storage. **Conclusion** The addition of NAC to refrigerated platelets can significantly decrease the level of platelet ROS and effectively reduce their phagocytosis by cells , suggesting that NAC addition may protect refrigerated platelets from being cleared by phagocytosis after transfusion.

Key words platelet; cold storage; reactive oxygen species; N-acetylcysteine; phagocytosis; cold storage-induced lesions

Fund programs Scientific Research Project of Shanghai Municipal Health Commission (Nos. 201940111 , 202140008) ; Scientific Research Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 15ZR1438300)

Corresponding author Yang Jie , E-mail: yangjie@ sbc. org. cn