

临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.016

不同离体时间和抗凝剂浓度对血小板激活的影响

金春明¹, 苏咏梅², 刘广勤²

(牡丹江医学院 1. 红旗医院二分院检验科; 2. 第二附属医院检验科, 牡丹江 157011)

【摘要】目的:探索不同离体时间和不同抗凝剂浓度对血小板激活的影响。方法:利用流式细胞术和单克隆抗体检测 85 例健康成人的外周血小板,在不同离体时间和不同枸橼酸钠浓度的作用下,血小板表面糖蛋白 PAC-1、CD62p、CD63 以及凝血酶敏感蛋白(Thrombin-sensitive protein, TSP)的表达量。结果:相同离体时间下,血小板的激活程度随枸橼酸钠浓度(0.109~0.872 mol/L)的增加而增加,在大于 0.872 mol/L 浓度枸橼酸钠浓度下,血小板的激活状态变化不明显。离体 2 h 内血小板表现为轻微增加的激活,2~8 h 内血小板的激活上升明显,8 h 后其状态基本维持不变。结论:一定范围内增加抗凝剂浓度和延长离体时间会促进血小板的激活,要控制最合适的抗凝剂浓度和最短的离体时间来检测血小板相关指标,并选择适当的储存方法保存血小板以降低其因为离体而发生的活化。

【关键词】血小板活化;PAC-1;CD62p;CD63;凝血酶敏感蛋白

【中国图书分类法分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-31

Effect of in vitro time and anticoagulant concentration on platelet activation

JIN Chunming¹, SU Yongmei², LIU Guangqin²

(1. Department of Laboratory, the Second Branch of Hongqi Hospital; 2. Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Mudanjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of in vitro time and anticoagulant concentration on platelet activation. **Methods:** The peripheral blood platelet of 85 healthy adults was exposed to different in vitro time and different concentrations of sodium citrate, then flow cytometry (FCM) and monoclonal antibodies (McAb) were used to detect the expression levels of platelet surface glycoprotein protein PAC-1, CD62p, CD63, thrombin-sensitive protein (TSP). **Results:** Under the same in vitro time, platelet activation was increased with the concentration of sodium citrate increasing from 0.109 mol/L to 0.872 mol/L. Platelet activation did not change significantly when the citrate concentration was higher than 0.872 mol/L. Platelet activation was slight increased within 2 h in vitro, significantly increased within 2~8 h, remained unchanged after 8 h. **Conclusions:** Increasing the anticoagulant concentration within certain range and extending time in vitro can enhance platelet activation. We should choose the most appropriate anticoagulant concentration and the shortest time in vitro to test the platelet-related indicators and select appropriate storage method to save the platelet in order to reduce its activation.

【Key words】platelet activation; PAC-1; CD62p; CD63; thrombin-sensitive protein

血小板具有激活后粘附能力、释放能力增加的特性^[1],在临床血常规检验中检测血小板数量的时候会因为血小板的聚集而使得出的结果较实际偏低^[2]。血小板激活不仅会影响血小板的数量,而且会影响血小板的体积,使得血小板体积分布宽度升高。有人建议使用血小板体积分布宽度的值来作为血小板激活的另一种评价指标^[3]。新鲜血液离体加入抗凝管内后,血小板的形态就开始发生变化,这种变化可能是血小板因为温度突然发生变化或抗凝剂的使用或采血管环境导致。PAC-1、CD62p、CD63、凝血酶敏感蛋白(Thrombin-sensitive protein, TSP)

是血小板活化的主要指标^[4-6],它们主要在活化的血小板表面表达增加。本研究采用流式细胞术检测不同离体时间和不同抗凝剂浓度下的血小板上述 4 项活化指标的变化,探讨二者和血小板激活之间的关系,以期指导临床检验中采取合适的方法检测血小板相关指标和指导最佳的血小板储存方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 我院体检中心体检的健康成年人共 85 例,男 50 例,女 35 例,平均年龄 35 岁(23~47 岁),所有对象体检报告显示各项指标正常。

作者介绍:金春明(1969-),女,副主任技师,
研究方向:临床检验诊断学。

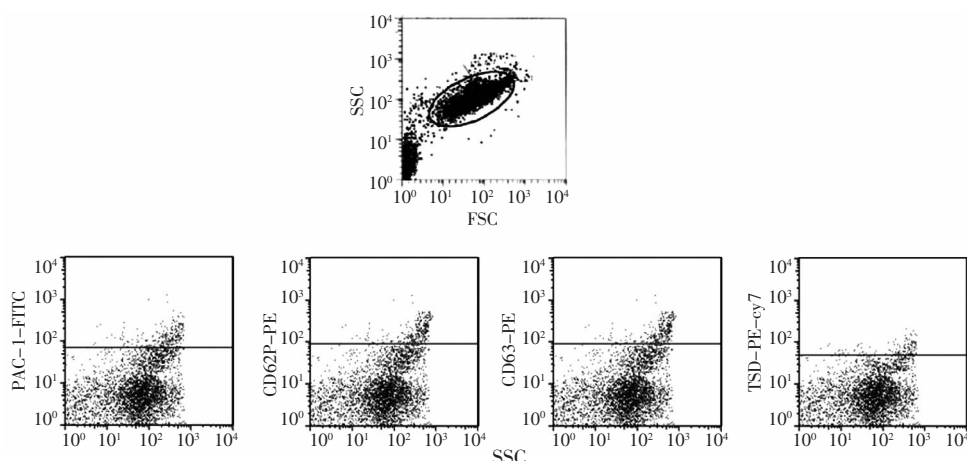


图 1 血小板的散点图及激活标志物检测

Fig.1 Scatter diagram of platelet and detection of activation markers

1.1.2 主要器材 冷冻离心机(Thermo 公司),BD LSR II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。抗凝管为经过清洁处理的试管,往其中各加入 200 μ l 相应浓度枸橼酸钠并加塞,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.1.3 主要试剂 FITC 标记的抗 PAC-1 单克隆抗体,PE 标记的抗 CD63 单克隆抗体,PE-Cy7 标记的抗 TSP 单克隆抗体,PE 标记的抗小鼠 IgM 单克隆抗体均为 BD 公司产品。PE 标记的抗 CD62p 单克隆抗体购自 PharMingen。抗凝剂为用无菌 PBS 配制的终浓度为 1.744 mol/L 的枸橼酸钠储液,用无菌 PBS 稀释为需要浓度。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 所有对象不扎止血带抽取清晨空腹血,不同浓度抗凝管组每管 1.8 ml,轻轻混匀后于 0.5 h 内同步处理。不同离体时间点实验组按时间点室温静置 0、0.5、1、2、4、6、8、12、18、24 h。

1.2.2 血小板制备及标记 抗凝血 800 r/min,5 min 收集富血小板血浆,冷 PBS 洗涤 2 次,调整血小板浓度为 100×10^9 个/L,各实验管加血小板悬液 100 μ l,相应抗体 2.5 μ l,对照管加入 PE 标记抗小鼠 IgM 单克隆抗体,混匀后避光置于 4 $^{\circ}$ C 0.5 h,冷 PBS 洗涤 2 次,各管加入 500 μ l 1%多聚甲醛固定待测。

1.2.3 流式细胞术检测及结果分析 激发光源为 488 nm,采用 Cell Quest 软件对数据进行采集分析,利用 FSC 与 SSC 图,圈取所有血小板为研究对象,分析 10 000 个血小板膜表面相应表面标志的表达情况。

2 结果

2.1 枸橼酸钠对血小板激活的影响

所有标本均处理完毕后马上上机检测,按照图 1 所示的阴性线检测,阴性线上区域所占百分比为阳性百分比。当抗凝剂浓度在 0.109~0.872 mol/L 范围的时候,标本的血小板表面标志 PAC-1、CD62p、CD63、TSP 的表达量随着抗凝剂浓度的增加而增加,在 0.872~1.744 mol/L 范围内无明显变化(图 2)。说明枸橼酸钠对血小板激活的影响在 0.109~0.872 mol/L 范围内影响比较明显。继续增加枸橼酸钠浓度无显著影响。

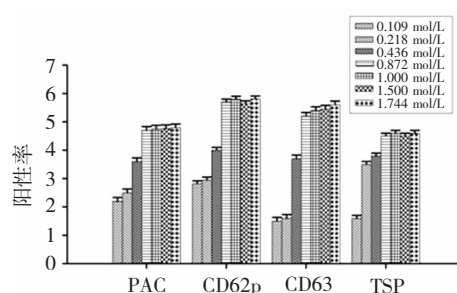


图 2 枸橼酸钠浓度与 PAC-1、CD62p、CD63、TSD 阳性率的关系

Fig.2 Relationship between concentration of citrate and the positive rates of PAC-1, CD62p, CD63, TSP

2.2 延长血小板离体时间对血小板激活的影响

在临床常用枸橼酸钠浓度 0.109 mol/L 的情况下,血小板表面 PAC-1、CD62p、CD63、TSP 的阳性率在 2 h 内变化不明显,在 2~8 h 内明显上升,8 h 后仅发生轻微变化(图 3),说明离体 2 h 血小板激活表现为轻微增加,2~8 h 血小板的激活增加明显,8 h 后其激活状态基本维持不变。

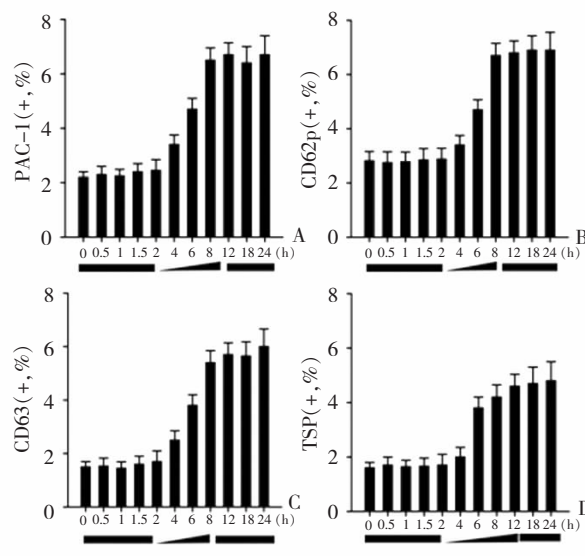


图 3 延长离体时间增加血小板的激活

Fig.3 Enhancing the activation of platelet by prolonging the in vitro time

3 讨 论

血小板具有粘附、释放和聚集功能,这些功能主要是通过血小板表面的膜糖蛋白来实现。血小板膜表面上的糖蛋白主要有 GP I b、GP II b、GP III a、CD62p、CD63 等几种^[7]。

CD63 抗原是相对分子质量为 53 kD 的溶酶体膜糖蛋白(LIMP-CD63),在血小板激活后跨位于浆膜^[8]。在活化早期,血小板及其膜糖蛋白 GP I b/IIa Complex 构型发生改变,暴露出纤维蛋白原受体,促进纤维蛋白原与 GP I b/IIa 识别并结合,并通过 PAC-1 的表达引起血小板聚集而发挥功能。其膜表面 PAC-1 的表达量能更精确更早地反映血小板已经激活,有研究表明 ADP 体外激活血小板时,活化的血小板以 PAC-1 阳性率升高为主,说明 PAC-1 阳性是血小板活化的表现之一。

CD62p 又叫 P 选择素(P-selection)或血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白,分子质量为 140 kD 的膜蛋白(gmp-140),定位于内皮细胞棒状小体和血小板内的 α 颗粒。血小板活化时, α 颗粒膜与血小板质膜融合而与血小板膜表面锚定,成为血小板活化的一个特征性指标。其在血栓形成和血小板聚集中也发挥作用。CD62p 阳性率与血液粘度、纤维蛋白原含量相关,所以 CD62p 阳性率升高可反映血栓疾病和判断血栓前状态。TSP 也是一种定位于血小板 α 颗粒膜上的糖蛋白,在血小板活化时与血小板质膜融合,暴露于表面,能够作为判断血小板激活的指标。

本研究采用流式细胞仪和血小板表面 PAC-1、CD62p、CD63、TSP 的特异性单克隆抗体联合分析血小板表面活化标志物的表达情况。结果显示,在 0.109~0.872 mol/L 范围内逐渐增加抗凝剂浓度,0.5 h 内检测血小板的 PAC-1、CD62p、CD63、TSP 表达量是逐渐上升的,但是在大于 0.872 mol/L 的浓度下其表达无明显变化,说明在 0.109~0.872 mol/L 范围内血小板对枸橼酸钠的浓度最敏感。而且我们发现 PAC、CD62p 和 CD63 的阳性率在 0.109~0.218 mol/L 内变化很小,主要变化发生在 0.218~0.872 mol/L 范围内,TSP 的主要敏感范围则是 0.109~0.218 mol/L,在这个浓度范围内其表达率增加了约 1 倍。临床检测中,凝血相关实验选择的枸橼酸钠浓度为 0.109 mol/L,为了更加贴近临床检测过程,本实验也选定 0.109 mol/L 的枸橼酸钠浓度来检测延长离体时间的影响,结果显示所选 4 种血小板活化标志物均在离体 2 h 后阳性率开始上升,而且在 8 h 后这种变化不再明显。这说明在 0.109 mol/L 枸橼酸钠的存在下,2~8 h 时间段内血小板的活化上升最显著。在 8~

12 h 段内,TSP 的阳性率虽然有所增加,但是也明显缓于 2~8 h 段,另外 3 项则基本保持不变。

在临床采用流式细胞术(Flow cytometry,FCM)对冠心病患者的血小板膜糖蛋白检测中发现,急性冠脉综合征的血小板 PAC-1/CD62p 的表达阳性率为 $(15.54 \pm 6.43)\% / (9.83 \pm 6.06)\%$,而在慢性缺血性心脏病中其表达阳性率为 $(5.38 \pm 2.62)\% / (11.00 \pm 6.37)\%$ ^[9],慢性缺血性心脏病中的 PAC-1 的阳性率已经低于正常血小板离体 8 h 后的 PAC-1 的阳性率,这一比较说明血小板检测时间在离体超过 8 h 会出现诊断慢性缺血性心脏病的假阳性结果。冠心病患者的 CD63 和 CD62p,TSP 表达量明显高于正常组^[10],而 TSP 的阳性率男性为 $(4.93 \pm 3.92)\%$;女性为 $(4.01 \pm 2.62)\%$,与本实验中的离体 8 h 的血小板 TSP 的阳性率 $(4.2 \pm 0.45)\%$ 无明显差别,而且还低于本实验中的抗凝剂浓度为 0.872 mol/L 时候 TSP 的阳性率。同样 CD63 和 CD62p 在冠心病患者血小板的表达阳性率和离体 8 h 以上的血小板表达差异不大。这就说明临床采用 CD63、CD62p、TSP 和 PAC-1 的阳性率来诊断冠脉疾病或凝血相关疾病的时候要考虑离体时间和抗凝剂引起的血小板活化导致的假阳性的影响。

影响血小板活化的因素很多,比如麻醉、抗血栓药物的使用、手术、血小板功能缺陷^[11],本研究表明,血小板易受到抗凝剂和离体时间的影响,血小板活化后其聚集性会增加,并且会发生形状的改变。在临床检验工作中,所使用的抗凝剂和检测时间的不同对血小板的数量和体积分布的影响就不容忽视,要避免任何可能导致血小板意外激活的因素,在日常工作中尽可能做到顺利采集标本,及时送检,改进抗凝剂使用方法。在血小板保存和输注方面,掌握好影响血小板活化的因素对血小板的治疗效果也会有一定的指导作用。

参 考 文 献

- [1] Davies T A, Drotts D J, Weil G J, et al. Flow cytometric measurements of cytoplasmic calcium changes in human platelet[J]. Cytometry, 1988, 9(2):138-142.
- [2] Stokol T, Erb H N. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs[J]. Veterinary Clinical Pathology, 2007, 36(2):148-154.
- [3] 李 月, 代震宇, 张德纯. 血小板分布宽度作为新型血小板活化特异性标志物的评价[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(2):200-202.
- Li Y, Dai Z Y, Zhang D C. Evaluation on platelet distribution width as a novel specific marker of platelet activation[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2011, 36(2):200-202.
- [4] 吴国新, 李建勇, 李佩霞, 等. 血小板表面及血浆内 α 颗粒膜蛋

临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.017

ELITE PRO 血凝仪 2 种测定纤维蛋白原方法结果的比较

徐承来, 周彦, 刘小林

(连云港市第二人民医院检验科, 连云港 222023)

【摘要】目的:研究贝克曼库尔特 ACL ELITE PRO 全自动血凝仪,简称 ELITE PRO。用凝血酶原时间(Prothrombin time,PT)衍算法(PT-Fib)测定纤维蛋白原(Fibrinogen,Fib)含量的精密度及其与凝血酶法(Clauss 法)检测结果的相关性。方法:用 Clauss 法及 PT-Fib 法同时测定 232 例标本的 Fib 含量,对其结果的相关性进行分析,得出 PT-Fib 法测定 Fib 在 ELITE PRO 上的可信范围。结果:PT-Fib 法检测结果精密度高,当 Fib 含量在 1.5~4.5 g/L 时,PT-Fib 法与 Clauss 法的结果接近,两者测定结果正相关;当 Fib<1.5 g/L 或>4.5 g/L 时,PT-Fib 法的结果高于 Clauss 法。结论:当 PT-Fib 法测定的 Fib 含量在 1.5~4.5 g/L 时结果可靠,可直接用于临床报告;当 PT-Fib 法测定的 Fib 结果<1.5 g/L 或>4.5 g/L 时结果不稳定,应用 Clauss 法进一步复查。2 种方法结合使用既可保证 Fib 检测速度的迅速、结果的准确,也可达到节约试剂的目的。

【关键词】ELITE PRO 血凝分析仪;纤维蛋白原;Clauss 法;PT 衍算法

【中国图书分类法分类号】R446.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-16

Comparision between two fibrinogen detection methods with ELITE PRO coagulometer

XU Chenglai, ZHOU Yan, LIU Xiaolin

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Lianyungang)

【Abstract】Objective:To evaluate the accuracy of using PT-Fib method to determine fibrinogen(Fib) content in plasma samples with ACL ELITE PRO automatic coagulometer(ELITE PRO) and its correlation with results of Clauss method. **Methods:**Clauss method and PT-Fib method were used to determine Fib content in 232 plasma fibrinogen samples. Correlation analysis was made to get the confidential range in ELITE PRO when detecting Fib content by PT-Fib method. **Results:**The coefficient of variation of PT-Fib method was 3.8% in ELITE PRO. When the content of Fib was 1.5~4.5 g/L, there was no significant difference between Clauss method

作者介绍:徐承来(1978-),男,主管技师,

研究方向:临床检验工作。

通信作者:周彦,女,主任技师,Email:xclzlxch@163.com。

白的放射免疫测定[J].中华血液学杂志,1992,13(2):99.

Wu G X, Li J Y, Li P X, et al. Radiation immunoassays detection of platelet surface and plasma membrane protein particles[J]. Chinese Journal of Hematology, 1992, 13(2):99.

[5] 王振义,李家增,阮长耿,等.血栓与止血基础理论与临床[M].2版.上海:上海科学技术出版社,1996:42.

Wang Z Y, Li J Z, Ruan C G, et al. Thrombosis and haemostasis basic theory and clinical[M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1996:42.

[6] 张梅,张运,谈红,等.应用流式细胞术对冠心病患者血小板活化和白细胞粘附功能的研究[J].山东大学学报(医学版),2002,40(4):354-355.

Zhang M, Zhang Y, Tan H, et al. Flow cytometry for assessing platelet activation in coronary heart disease[J]. Journal of ShanDong Univetsrity (Health Science), 2002, 40(4):354-355.

[7] Peerschke E I. Platelet membrane glycoproteins: functional characterization and clinical applications[J]. AM J Clini Pathol, 1993, 98(4):455-463.

[8] Michelson A D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function[J]. Blood, 1996, 87(12):4925-4936.

[9] 郭壮波,韦建瑞,张文超,等.流式细胞术检测冠心病患者血小板表面糖蛋白的变化[J].广州医药,2007,38(1):17-19.

Guo Z B, Wei J R, Zhang W C, et al. Flow cytometric detection in patients with coronary artery disease platelet surface glycoprotein changes[J]. Guangzhou Medicine, 2007, 38(1):17-19.

[10] 张锦,张春青,徐从高,等.流式细胞术对冠心病患者血小板活化状态的检测[J].山东医科大学学报,2000,38(2):177-179.

Zhang D, Zhang C Q, Xu C G, et al. Flow cytometry in patients with coronary artery disease platelet activation state detection[J]. Journal of Shandong Medical University, 2000, 38(2):177-179.

[11] 单闯.围术期应用流式细胞术监测血小板活化功能[J].国外医学·麻醉学与复苏分册,2003,24(4):223-226.

Shan C. Application of flow cytometry in intragraft monitoring of platelet active function during perioperative period[J]. Foreign Medical Journal·Anesthesiology and Resuscitation, 2003, 24(4):223-226.

(责任编辑:冉明会)