

血小板贮存方法对血小板活化分子 CD62p 表达的影响

刘更夫¹ 黄飞² 梅方超¹ 周庆申³

【摘要】 目的:探讨常温贮存及冰冻保存血小板对血小板活化分子 CD62p 表达的影响。方法:选择 2013-06—2014-05 符合无偿献血血小板标准的献血者血小板 85 份,采用流式细胞术检测常温贮存 0、1、3、5 d 和冰冻贮存 1、2、3、5 个月血小板表面活化分子 CD62p 表达率,ELISA 方法检测新鲜血小板可溶性 CD62p(sCD62p)的表达水平,比较不同贮存方法和贮存时间对血小板活化的影响。结果:常温贮存组 CD62p 表达率和 sCD62p 水平随着贮存时间的延长而升高($P < 0.05$),冰冻保存对血小板活化分子 CD62p 表达率有影响($P < 0.05$),冰冻保存不同时长对 CD62p 表达率没有影响($P > 0.05$)。结论:常温贮存血小板活化分子 CD62p 活化率随着贮存时间延续而升高,贮存时间 0~1 d 的适用于以提高血小板计数的患者,贮存时间长的新鲜和冰冻保存血小板高适用于急性出血患者。

【关键词】 血小板;活化分子;CD62p;可溶性 CD62p

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.10.002

【中图分类号】 R331.1 **【文献标志码】** A

Effect of different storage methods on expression of platelet activation marker CD62p

LIU Gengfu¹ HUANG Fei² MEI Fangchao¹ ZHOU Qingshen³

(¹Department of Blood Transfusion, Huangshi Central Hospital, Huangshi, 435000, China;²School of Medicine, Hubei Polytechnic University;³Huangshi Blood Centre)

Corresponding author: HUANG Fei, E-mail: 310340118@qq.com

Abstract Objective: To study the effect of different storage on the expression of platelet activation marker CD62p. **Method:** A total of 85 platelets concentrates were obtained from healthy donors by Amicus separator from Jun 2013 to May 2014. The expression of CD62p on platelet from fresh platelet (0, 1, 3, and 5 days) and from cryopreserved platelet (1, 2, 3 and 5 months) were detected by flow cytometry successively. The soluble sCD62p was analyzed by ELISA. **Result:** CD62p expression and soluble sCD62p in fresh platelet increased along with the storage time ($P < 0.05$). CD62p expression was higher in cryopreserved platelet compared with in fresh platelet ($P < 0.05$). The level of CD62p expression in cryopreserved platelet did not change following the storage time ($P > 0.05$), which was related with the methods of platelets storage. CD62p expression and the levels of sCD62p were on the rise with time extending of the storage of fresh platelet ($P < 0.05$). CD62p expression and the levels of sCD62p of the short time storage of platelets were significant lower than that of one of other storage methods of platelets. **Conclusion:** CD62p expressions of fresh platelet with the short time storage were less than that of cryopreserved platelet with the long time storage. Cryopreserved platelet with the long time storage could apply to acute hemorrhagic disease.

Key words platelet; activation of molecular; CD62p; sCD62p

血小板是十分重要的血液成分之一,当血小板数目或功能发生异常时,如白血病、DIC 等疾病,临床已经把输注血小板作为一种不可缺少的治疗手段,输注血小板对于此类疾病的治疗具有明显的作用,在目前临床对于血小板需求越来越多的同时对血小板质量的要求也越来越高,由于血小板本身比较脆弱,离开人体之后容易被激活,所以不同贮存

方法以及贮存时间对血小板活化有一定的影响。CD62p 是血小板活化的主要指标,本文采用流式细胞术(FCM)和 ELISA 对不同贮存方法、不同贮存时间血小板表面 CD62p 表达和血浆 sCD62 浓度进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 血小板制剂

冰冻血小板和机采新鲜血小板均来自当地中心血站。选择 2013-06—2014-05 符合无偿献血血小板标准的献血者血小板 85 份,采用流式细胞术检测常温贮存第 0、1、3、5 天和冰冻贮存 1、2、3、5

¹黄石市中心医院输血科(湖北黄石,435000)

²湖北理工学院医学院

³黄石市中心血站

通信作者:黄飞, E-mail: 310340118@qq.com

个月血小板。新鲜血小板使用 MCS+血细胞分离机采集,供者均符合《卫生部献血者健康检查标准》,当日采集后采用常温(22±2)℃震荡保存 1~5 天。新鲜血小板在无菌条件下注入浓度为 4%~6%的二甲基亚砷,置于-80℃低温冰箱内保存即为冰冻血小板。

1.2 流式细胞术检测 CD62p 表达

对 2 种方法制备的血小板分别测定血小板表面 CD62p。先将血小板样品用 TBS 稀释至 $3 \times 10^8/\text{ml}$,每一样品吸取 2 管各 5 μl ,加入 35 μl TBS。对照管中加入抗 CD61-FITC、IgG1-PE 各 5 μl ;测定管中加入抗 CD61-FITC、抗 CD62P-PE 各 5 μl 。轻轻混匀后室温避光孵育 15 min,然后立即加入预冷 2~8℃的 1%多聚甲醛 500 μl ,避光固定 30 min,24 h 内上 FCM 检测。以单纯血小板对照、单染抗 CD61 对照和单染抗 CD62p 对照调节补偿,以 CD61-FITC/SSC 双参数设门。

1.3 ELISA 检测

sCD62P 将血小板样本离心(1 500 × g, 15 min)后收集上清。sCD62p 浓度检测采用 sCD62pELISA 试剂盒(上海雅浦生物科技有限公司)检测,严格按照操作说明书进行。

1.4 统计学处理

应用 SPSS19.0 软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用成组设计的 *t* 检验,多组间比较采用单因素的方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 常温贮存血小板 CD62p 表达和 sCD62p 含量

采用单因素方差分析常温贮存血小板在第 0、1、3、5 天血小板活化分子 CD62p 表达率和 sCD62p 含量(表 1)。随着贮存时间的延长,各组间 CD62p 表达差异有统计学意义,结果显示呈逐渐升高的趋势。组间采用 SNK-*q* 检验,贮存第 0 天和第 1 天血小板 CD62p 表达率较第 3 天与第 5 天低。sCD62p 浓度含量结果显示,贮存第 0 天和第 1 天血浆中 sCD62p 含量比较差异无统计学意义,贮存第 3 天后 sCD62p 含量升高。

表 1 不同时间 CD62p 的表达率和 sCD62p 含量结果

$\bar{x} \pm s$			
时间/d	例数	CD62p/%	sCD62p/(ng · ml ⁻¹)
0	35	12.5 ± 4.5	3.68 ± 1.32
1	28	15.6 ± 5.1	3.89 ± 1.42
3	25	25.6 ± 8.3 ¹⁾	4.98 ± 1.68 ¹⁾
5	20	36.3 ± 10.2 ¹⁾	6.71 ± 1.97 ¹⁾

与第 0、1 天比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 冰冻血小板 CD62p 表达

冰冻血小板不同贮存时间血小板 CD62p 的表达率无差异统计学意义($P > 0.05$),见表 2,冰冻血小板血小板 CD62p 的表达率不会随着贮存时间的改变而升高。

表 2 冰冻血小板表面活化分子 CD62p 的表达率

$\bar{x} \pm s$		
时间/月	例数	冰冻血小板/%
1	25	34.5 ± 8.5
2	21	35.6 ± 8.1
3	15	36.6 ± 9.3
5	14	36.8 ± 10.2

2.3 贮存 1 个月的冰冻血小板与新鲜血小板 CD62p 的表达率比较

贮存 1 个月冰冻血小板与新鲜血小板 CD62p 的表达率见表 3,贮存第 1 天血小板比贮存 1 个月冰冻血小板与贮存第 3 天和第 5 天新鲜血小板 CD62p 的表达率低。

表 3 冰冻与新鲜血小板 CD62p 的表达率比较

$\bar{x} \pm s$		
时间	例数	CD62p/%
1 个月冰冻血小板	25	34.5 ± 8.5
5 d 新鲜血小板	20	36.3 ± 10.2
3 d 新鲜血小板	25	25.6 ± 8.3
1 d 新鲜血小板	28	15.6 ± 5.1 ¹⁾

与第其他时间段比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

血小板具有结构功能复杂和易被激活的生物学特性,离体后受多种因素影响而变形、活化,损伤,影响输注后体内存活期,保护血小板的活力、存活率及延长贮存期限,对于血小板输注效果有重要意义。血小板表面分子标志物 CD62p(血小板 α -颗粒膜蛋白)是血小板活化时被释放最多的糖蛋白,CD62p 的测定是监测血小板活化状态的敏感指标^[1-2]。

CD62p 又称 P 选择素、颗粒膜白-140(GMP-140),存在于血小板或内皮细胞 α 颗粒内,CD62p 主要功能是介导活化血小板与白细胞、内皮细胞之间的相互作用^[1-2]。输入冰冻血小板后虽然血小板计数增加不明显,不如新鲜血小板,但出血症状改善明来,止血效果优于新鲜血小板^[3-4],冰冻血小板广泛应用于外科、妇科手术,各类急性出血性疾病的防治^[5]。本研究显示常温贮存血小板,随着贮存时间延长,CD62p 活化率升高,贮存第 3 天和 5 天新鲜血小板和冰冻血小板的 CD62p 表达率高于贮

存第 0 天和 1 天新鲜血小板,贮存时间 3 d 以上的新鲜血小板和冰冻血小板适宜于急性出血性疾病。

Barnard 等(1999)提出 sCD62p 可能是血小板活化检测更敏感的指标。研究显示常温贮存血小板随着贮存时间延长 sCD62p 水平和 CD62p 阳性率上升。有学者研究显示血小板 CD62p 表达升高与 sCD62p 表达增加均具有相关性,当活化血小板 CD62p 脱落入血浆后成为 CD62p 阴性血小板,同时血浆中 sCD62p 的表达增高。提示在以 CD62p 表达率反应血小板活化状态时,补充检测 sCD62p 水平有重要意义。

对于血液病患者等治疗性和预防性输注血小板的患者,尤其是免疫抑制患者,应选用贮存时间短的 CD62p 活化率低的新鲜血小板,慎用或者不用 CD62p 活化率高冰冻血小板或者贮存时间长的新鲜血小板。目前临床血小板使用患者明显上升,常温和冰冻保存成为满足临床需要的重要方法,本研究通过 CD62p 表达率和 sCD62p 水平

的检测证实临床根据患者的需要选用不同贮存方法血小板。

参考文献

- [1] Curvers J, de Wildt-Eggen J, Heeremans J, et al. Flow cytometric measurement of CD62P(P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort [J]. *Transfusion*, 2008, 48: 1439—1446.
- [2] 欧阳锡林, 刘景汉, 石群, 等. 优化流式细胞术测定保存血小板 CD62p 表达 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2002, 10(5): 462—465.
- [3] 张学英, 李玲玲, 韩志勇, 等. 冰冻血小板与新鲜血小板的疗效比较 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(1): 26—27.
- [4] 徐伟帆. 新鲜血小板与冰冻血小板输注效果比较 [J]. *白求恩医学院学报*, 2011, 9(6): 419—420.
- [5] 郭美媛, 彭光平, 肖萍. 吉安市冰冻机采血小板临床应用情况 [J]. *中国输血杂志*, 2009, 22(5): 409—409.

(收稿日期: 2015-03-22)

(上接第 831 页)

联合使用,并不能增强单一药物的疗效,但考虑患者由于个体差异,可能存在阿司匹林或者氯吡格雷某一途径抵抗,可以通过另一途径得到有效补充,从而维持有效的血小板抑制^[4]。另外,临床实际监测中也发现一些患者血小板抑制率达到或接近 100%,存在用药过量的出血风险,过度用药情况也应得到重视。

综上所述,TEG 作为一种测定凝血功能的检测方法,能综合地反映心胸外科围手术期凝血各方面的变化,结合临床目前已有的一些凝血功能检查(PT, APTT, Fg, PLT 计数),可以更好地用来监测心血管患者的凝血状态,减少患者围手术期出血,改善患者预后,同时指导冠心病患者术后抗血小板药物的合理有效治疗。

参考文献

- [1] Reikvam H, Steien E, Hauge B, et al. Thrombelastography [J]. *Transfus Apher Sci*, 2009, 40: 119—123.
- [2] 纪宏文, 马丽, 高旭蓉, 等. 血栓弹力图在体外循环心血管手术的应用 [J]. *中国体外循环杂志*, 2011, 9(3): 170—172.
- [3] 谭延国, 张岩, 王芳, 等. TEG 血栓弹力图同常规凝血试验的关系及 TEG 血小板图试验的临床应用 [J]. *中*

国实验诊断学, 2012, 16(1): 81—85.

- [4] 王热华, 林锋, 陈诗泉, 等. 血栓弹力图评估阿司匹林和氯吡格雷血小板抑制率的临床应用 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(17): 4111—4112.
- [5] Ak K, Isbir CS, Tetik S, et al. Thromboelastography - based transfusion algorithm reduces blood product use after elective CABG: a prospective randomized study [J]. *J Card Surg*, 2009, 24: 404—410.
- [6] 王仕刚, 倪虹, 龚庆成. 用血栓弹力图评价体外循环中凝血功能的改变 [J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2003, 19(5): 272—274.
- [7] 余悦娇, 许进明, 张敏, 等. 血栓弹力图检测对指导临床合理输注血液成分作用的探讨 [J]. *临床血液学杂志*, 2014, 27(4): 265—268.
- [8] 刘玲, 侯华娟, 刘亚红, 等. 用血栓弹力图评价阿司匹林及氯吡格雷在缺血性卒中患者中血小板抑制效应的研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(5): 446—448.
- [9] 陈伟任, 樊瑾, 王曙霞, 等. 血栓弹力图评价老年患者服用抗血小板效果的研究 [J]. *血栓与止血学*, 2009, 15(2): 73—74.

(收稿日期: 2015-01-08 修回日期: 2015-02-26)