

全麻手术对患者血小板 CD62p 和 CD63 表达的影响

王升 庞雁 康红灿 李新刚

作者单位:455000 安阳市,河南安阳地区医院血液实验室

【摘要】 目的 观察全麻手术后血小板 CD62p 和 CD63 的变化,探讨全麻手术对血小板活化的影响。**方法** 利用流式细胞术检测 112 例全麻手术患者麻醉诱导前、手术结束后、术后 3 d 血小板 CD62p 和 CD63 表达水平,并进行统计学分析。**结果** 手术结束后及术后 3 d 的 CD62p 表达水平分别与麻醉诱导前比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);手术结束后的 CD63 表达水平与麻醉诱导前比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但术后 3 d 与麻醉诱导前比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 全麻手术后血小板的活化有明显的增强,增加患者术后发生血栓的风险。

【关键词】 全麻手术;流式细胞术;CD62p;CD63

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.012

The influence of surgery under general anesthesia to CD62p and CD63 of platelet

WANG Sheng, PANG Yan, KANG Hong-can, et al. Department of Hematological Laboratory, the Anyang Regional Hospital, Anyang 455000, China

【Abstract】 Objective To monitor the levels of CD62p and CD63 of platelet in patients accepted surgery under general anesthesia and to explore the influence of surgery under general anesthesia to activated state of platelet. **Methods** Flow cytometry was used to measure the levels of CD62p and CD63 of platelet (before the general anesthesia, immediately after the surgery, three days after the surgery) in 112 patients received surgery under general anesthesia, and the results were analyzed statistically. **Results** The level of CD62p in immediately after the surgery and three days after the surgery were all higher than in before the general anesthesia, but the differences were all had no statistical significance ($P > 0.05$). The level of CD63 in immediately after the surgery was higher than in before the general anesthesia, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$), but there was no statistical significance in the difference of CD63 level between three days after the surgery and before the general anesthesia ($P > 0.05$). **Conclusion** There is visible reinforcement activated of platelet after surgery under general anesthesia, which increase the risk of thrombus.

【Key words】 Operation under general anesthesia; Flow cytometry; CD62p; CD63

在临床工作中,全麻手术患者经常发生深静脉血栓(deep venous thrombosis, DVT),对患者造成致命的伤害。血小板是血栓组成的重要成分,血小板活化与血栓的形成存在着密切的关系^[1]。P-选择素(CD62p)和溶酶体蛋白(CD63)均为识别活化血小板的分子标志物,CD62p 被认为是血小板活化检测的“金标准”,CD62p 和 CD63 已成为评价体内血小板活化状态的首选指标。本文研究利用流式细胞术检测了 112 例全麻手术患者血小板上 CD62p 和 CD63 的表达情况,探讨全麻手术对二者的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2009 年 4 月至 2011 年 12 月

我院 112 例全麻手术患者,男性 52 例,女性 60 例,年龄 20~78 岁。其中外科肿瘤患者 46 例(胃癌 19 例、结肠癌 27 例)、骨科骨折患者及关节置换患者 38 例、妇科疾病患者 28 例(乳腺癌 11 例、子宫肌瘤 7 例、宫颈癌 10 例)。手术时间 90~180 min。

1.2 仪器与试剂 鼠抗人 CD62p-PE,鼠抗人 CD63-FITC,同型对照(鼠 IgG-FITC 和鼠 IgG-PE),由 BD 公司提供;鼠抗人 CD41-FITC,鼠抗人 CD61-PE 由 Beckman Coulter 公司提供,流式细胞仪为 Coulter EPICS XL(Beckman Coulter 公司产品)。

1.3 标本采集 分别于患者手术麻醉诱导前,手术结束及手术后 3 d 采集 EDTA-K₂ 抗凝标本进行

CD62p 和 CD63 检测。

1.4 检测方法 采集标本后,立即取抗凝全血以离心半径 8 cm,500 r/min,离心 5 min,取上层富血小板血浆,用 PBS 调整血小板数为 $100 \times 10^9/L \sim 200 \times 10^9/L$,备用。(1)CD62p 检测:在两支流式试管中均加入 10 μ l 鼠抗人 CD41-FITC 后,其中一支试管加入 10 μ l 鼠 IgG PE 作为同型对照管,另一支试管加入 10 μ l 鼠抗人 CD62p-PE 作为测试管,分别加入 50 μ l 富血小板血浆,混匀,室温避光孵育 20 min 后,用 1 ml PBS 缓冲液洗涤一次,离心,弃去上清,然后,加入 500 μ l PBS 缓冲液混匀后置流式细胞仪上进行检测;(2)CD63 检测:在两支流式试管中均加入 10 μ l 鼠抗人 CD61 PE 后,其中一支试管加入 10 μ l 鼠 IgG FITC 作为同型对照管,另一支试管加入 10 μ l 鼠抗人 CD63 FITC 作为测试管,分别加入 50 μ l 富血小板血浆,混匀,室温避光孵育 20 min 后,用 1 ml PBS 缓冲液洗涤一次,离心,弃去上清,然后,加入 500 μ l PBS 缓冲液混匀后置流式细胞仪上进行检测。

1.5 流式分析 分别以 CD41 和 CD61 设门,圈定

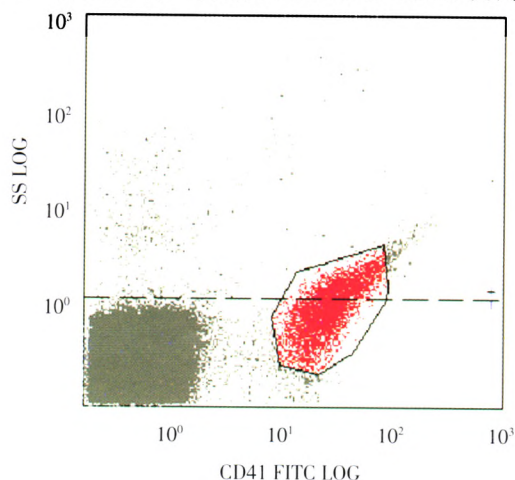


图 1 CD41 设门

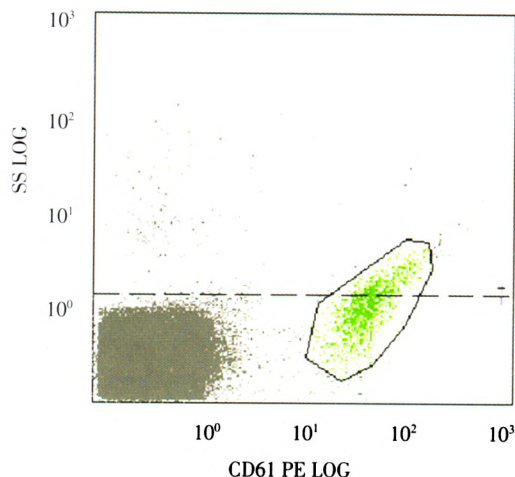


图 3 CD61 设门

血小板 (见图 1 和图 3),以同型对照分别设定 CD62p 和 CD63 阴性界限,观察血小板上 CD62p 和 CD63 的表达百分率(见图 2 和图 4)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用配对资料 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

112 例全麻手术患者血小板的 CD62p 和 CD63 的表达结果见表 1。由表 1 可见,手术结束后及术后 3 d 的 CD62p 表达水平分别与麻醉诱导前比较,差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05);手术结束后的 CD63 表达水平与麻醉诱导前比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但术后 3 d 与麻醉诱导前比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

笔者在临床工作中,有些手术患者术前凝血常规检查均正常,麻醉后有隐匿性血栓存在,术中常发现有血栓形成。特别是在全麻状态下,患者突然出现血栓形成。有文献^[2]报道,血栓栓塞是术后重要的并发症之一。近 30 年来,术后肺栓塞的病死率明显上

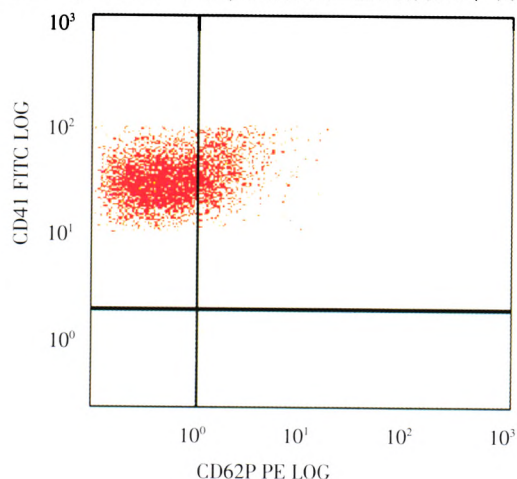


图 2 CD62p 的表达

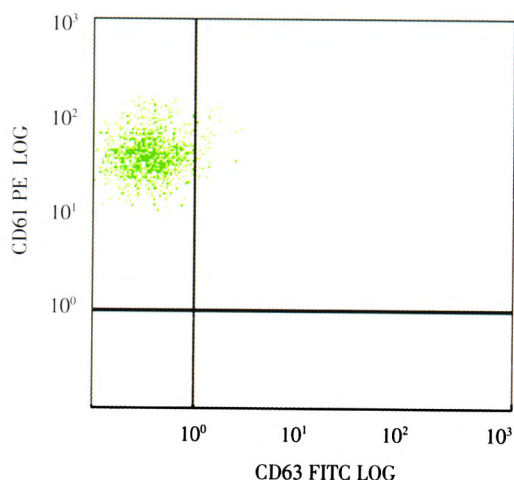


图 4 CD63 的表达

表 1 112 例全麻手术患者血小板的 CD62p 和 CD63 的表达结果($\bar{x}\pm s, \%$)

项目	例数	麻醉诱导前	手术结束后	术后 3 d
CD62p	112	16.74±9.67	22.76±13.89*	20.12±9.83**
CD63	112	1.35±0.94	2.26±1.75#	1.54±0.81##

注: *与麻醉诱导前比较, $t=1.952, P=0.064$; **与麻醉诱导前比较, $t=1.433, P=0.175$; #与麻醉诱导前比较, t 值=4.372, $P<0.001$; ##与麻醉诱导前比较, $t=1.251, P=0.235$

升, 远超出人们的估计。研究^[3]表明, 这类并发症在各科手术均有发生。骨科手术时, 其 DVT 的发生率达 45%~70%, 其中 3%可引起致命的肺栓塞; 妇科手术为 7%~45%, 平均 19%。血小板是血栓的重要成分之一, 而血小板活化是血栓形成的基础, 在血栓形成过程中, 起了重要的作用。血小板在正常血循环中处于静息状态, 在某些生理或病理刺激因子作用下, 血小板发生活化反应, 是血栓前状态的重要指标。血小板活化主要表现为存在于静息血小板胞浆内 α 颗粒膜上糖蛋白 CD62P 和溶酶体膜上的 CD63 随活化血小板的脱颗粒而与血小板膜融合, 在血小板膜上表达成为活化血小板分子标志物^[4]。

近年来研究^[5]发现, CD62P 作为一种细胞黏附分子在凝血与血栓形成过程中发挥着重要作用, 其作为血小板/内皮细胞活化标志和细胞黏附受体, 可通过介导血小板、内皮细胞黏附及与白细胞的相互作用, 启动或参与了包括炎症和血栓形成等多种病理生理起始过程, 是炎症/血栓的重要介质和靶分子。目前已知体内血栓形成的凝血反应起始于血小板活化。活化后血小板表达 CD62P 上调, 后者结合于白细胞可促使其表达组织因子 (tissue factor, TF)。释放入血的 TF, 即可与血中 FVIIa 结合形成 FVIIa/TF 复合物, 始动血栓形成过程中的凝血过程。因此, CD62P 可作为血小板活化与释放最特异的标志物^[4]。同时, 血小板内的 CD63 在活化时存在于血小板表面, CD63 为一种新的结构独特的糖蛋白, 同 P24/CD9 抗原、白细胞 CD37 和 CD53 抗原、肿瘤相关抗原 CD29 等组成一个新的家族。目前研究^[6]认为, CD63 是一种敏感的血小板活化标志物, 其在 DVT 形成中表达显著增多。本文研究结果显示, 112 例全麻手术患者麻醉诱导前其血小板 CD62p 的表达为 (16.74±9.67)%, 手术结束后其血小板 CD62p 的表达为 (22.76±13.89)%, 经统计学比较差异无统计学意义, 但其均值有明显增高的趋势, 术后 3 d 其血小板 CD62p 的表达为 (20.12±9.83)%, 虽然较手术结束后已有所降低, 但还没有恢复到手术前的均值水平; 手术前 CD63 的表达为 (1.35±0.94)%, 手术

后 CD63 的表达为 (2.26±1.75)%, 二者差异有统计学意义。手术后 3 d, CD63 的表达为 (1.54±0.81)%, 与手术前比较, 差异无统计学意义。以上结果显示, 手术结束后血小板 CD62p、CD63 表达水平均较术前有所上升, 提示术后血小板活化明显。笔者在另外的资料^[7,8]中也观察到, 全麻手术后患者的凝血酶原时间、凝血酶时间、活化部分凝血酶时间、国际标准化比值、纤维蛋白原、D-二聚体及白细胞-血小板聚集体, 尤其是单核细胞-血小板聚集体, 均有明显的变化。白细胞和血小板形成聚集体是血栓形成的基础, 而血小板的活化是形成白细胞-血小板聚集体的关键。虽然机体术后出现高凝状态, 但是机体的纤溶系统也会出现相应的升高, 尤其是术后 3 d 机体的纤溶活性更高。这可能除机体本身的凝血-纤溶系统的自我调节稳定外, 也可能与我们术后常规使用低分子肝素钙有一定的关系, 这种变化有待于今后进一步探究。

综上所述, 全麻手术对患者血小板活化有明显影响, 而血小板活化是形成血栓的基础, 通过检测血小板膜 CD63/CD62p 的表达可以了解血小板的活化状态, 预测血栓形成的风险。

4 参考文献

- 1 王振义, 李家增, 阮长庚. 血栓与止血基础理论与临床. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1996, 378-379.
- 2 史琳, 刘怀琼. 手术麻醉与血栓形成的病理生理. 国外麻醉学与复苏杂志, 1991, 2: 92-96.
- 3 Donadini MP, Ageno W, Guasti L, et al. Certoparin for the treatment and prevention of thrombosis: pharmacological profile and results from clinical studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9: 901-909.
- 4 赵亚鹏, 金佩佩, 周同, 等. P-选择素及其细胞黏附与血栓形成. 细胞生物学杂志, 2007, 29: 22-26.
- 5 Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis, 2003, 170: 191-203.
- 6 Silverstein PL, Febbraio M. Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. Blood, 1992, 80: 1470-1475.
- 7 李新刚, 陈桂军, 赵守魁, 等. 全麻手术对消化

(下接第 194 页)

w 后复查,结果仍为 HCV-Ab 有反应。经详细询问病史,患者并无经外源性感染 HCV 的经历,但其父母是否携带 HCV 不详,并拒绝检验,因此我们建议临床做进一步检查,以确定患者是否存在 HCV 感染,以及是否有 HCV 病毒复制。

本实验室以化学发光法为 HCV 筛查试验,本病例初筛结果为 HCV 抗体有反应,按照规定用其他厂家的 ELISA 试剂盒进行复检,结果两阴一阳。HCV-RNA-PCR 检测该标本结果为阴性,不提示 HCV 复制,但不能排除 HCV 感染。由于该患者 ANA 与抗 SmD1 抗体阳性,笔者考虑是否为自身抗体交叉反应,此次检测结果为假阳性。但经过确认实验及免疫蛋白印迹实验证实,该患者的确为 HCV 阳性,只是标本较为特殊,只含有低浓度的 NS3-1 抗体,不含有 HCV-C 抗体。

一般情况下,丙肝患者血清中含有 5 种主要抗 HCV 抗体^[2]:HCV-C(主要抗体)、NS3-1、NS3-2、NS4、NS5。而 HCV 检测试剂包被抗原,一般均能与这 5 种抗体进行反应,但不同厂家 ELISA 试剂盒所包被的 HCV 抗原存在差异,有的 NS3 或 NS4 含量较高,有的则是核心(C)区抗原含量较高,因而检测标本对于各厂商试剂盒的检出能力反应不一。此病例为单 NS3-1 片段阳性,主要包被核心(C)区抗原而 NS3 含量较低的试剂盒则难以检出,如果实验室仅仅采用了一种这样的 ELISA 试剂盒,该病例极有可能漏检。

我国 HCV 抗体 ELISA 检测试剂盒自 1993 年面世以来,质量在不断进步,与当前国外主流的三代试剂相比,我国 HCV 抗体检测试剂在灵敏度和特异性上与国外基本没有差异,并且国产试剂在提高了对 NS3 抗原检测力度的同时,保持了对核心抗原检测的敏感性。但相比国外产品,国产试剂有两个特点^[3]:(1)阴阳性样品的 OD 值差别较小,不能将阴阳性分得很开,对处于临界值附近的样品易检测为假阳性或假阴性,这可能与抗原纯度不足或第二抗体浓度较高等因素有关;(2)不同国产试剂对真阳性的判定阈值 S/CO 各不相同,国外试剂一般将 S/CO ≥ 3.8 判定为真阳性,而国产试剂判定阈值 S/CO 从 ≥ 6.0 到 ≥ 14.0 不等,这就要求我们不能套用美国疾病控制中心标准,要因地制宜的制定自己的判定标准;同时也说明国产试剂盒之间的检测性能有较大的异质性^[2]。国产试剂需要继续加强对 HCV NS3 等蛋白的表达纯化和抗原性研究,努力提高试剂盒生产工艺,在提高特异抗体检出率的同时降低交叉反应,以不断提高 HCV 试剂对各种抗 HCV 抗体的检测。

(上接第 181 页)

道癌症患者凝血功能影响的观察和意义. 医药前沿, 2012, 18: 72-73.

HCV 的诊断最终还是需要 RIBA 和 RNA 检测来确认,但是确认实验价格比较昂贵,不适用于临床广泛使用。为提高检出的准确性,有必要寻找一种快速、便捷的辅助确证诊断技术,以协助临床诊断。HCV-Ag 的实验室检测,为临床检验提供了新思路。其原理采用双抗体夹心法,将待测血清样品稀释后,与包被在固相载体上的 HCV 核心区抗体反应,洗板去除未结合物后加入酶标记的另一株 HCV 抗体,最后加入底物、显色观察结果。其优点:HCV-Ag 在外周血中的测定可以大大缩短 HCV 感染后检测的窗口期,提高检测的灵敏度;HCV-Ag 用于献血员筛查则可以进一步检出窗口期污染血样,从而降低输血后 HCV 感染的残余风险度、保证安全输血;HCV-Ag 也可作为衡量样品中病毒载量的标志物之一,与 HCV-RNA 的定量测定一同用于抗病毒治疗过程中的疗效观察和监测。

5 小结

本病例患者较为特殊,只含有低浓度的 NS3-1 抗体,不含 HCV-C 抗体,因此极易导致漏检,最终经过 RIBA 确认实验证实,该标本中确实含有低浓度的 NS3-1 抗体,但是经过 HCV-RNA-PCR 核酸检测,显示患者并不存在 HCV 病毒复制,为患者进一步治疗提供了依据。目前临床上筛检 HCV 的试剂盒均采用的是间接 ELISA 方法,用以检测血清或血浆样品中 HCV 抗体。尽管使用的抗-HCV ELISA 试剂盒均为国家“批批检”合格产品,其特异性和灵敏度都比较高,但由于各厂商所用抗原质量和各抗原片段包被比例的不同,因此生产的试剂在灵敏度和特异性方面存在一定差异,从而导致检测结果不一致,易产生漏检或假阳性等情况。因此,我们应当重视每一份出现异常结果的标本,采用多种方法对其进行检测,以协助临床医生对患者病情做出正确的诊断,为患者的诊断及治疗赢得宝贵时间。

6 参考文献

- 1 吴超良. 胶体金法与酶联免疫法检测丙型肝炎病毒抗体的比较. 临床医学工程, 2011, 18: 701-702.
- 2 张贺秋, 王国华, 陈坤. 丙型肝炎病毒抗体双抗原夹心法酶联免疫试剂的初步临床评价. 临床输血与检验, 2006, 8: 12-13.
- 3 魏来, 杨瑞峰. 丙型肝炎病毒实验室诊断的现状和存在问题. 中华检验医学杂志, 2008, 31: 845-848.

(收稿日期: 2013-06-25)

(本文编辑: 陈淑莲)

- 8 王升, 赵继全, 李新刚. 全麻手术对患者血小板-单核细胞聚集体的影响. 中国实用医药, 2013, 26: 76-77.

(收稿日期: 2013-01-17)

(本文编辑: 李霏)