

储存期内血小板相关参数的变化及 CD62p 的表达

贺雪花 焦晋山

作者单位:030001 太原市,山西医科大学研究生部

通讯作者:焦晋山, E-mail: zhangchuyue316@sohu.com

【摘要】 目的 观察储存期内血小板 (platelet, PLT) CD62p 的表达和 PLT 各参数间的变化,为临床 PLT 输注的安全性和有效性提供参考依据。方法 收集健康献血者的 PLT 标本 30 份,随机分为正常组和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 组各 15 份; $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 体外震荡存放 0-5 d, 检测 PLT 的 pH 值、计数、聚集和释放试验的参数指标变化及 CD62p 的表达情况,并在显微镜下动态观察 PLT 的形态变化。结果 在 PLT 保存期间,正常组 0-3 d 中,各参数指标变化及 CD62p 表达差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); 3-5 d 中,正常组 PLT pH 值和计数均呈明显下降趋势,聚集和释放试验指标及 CD62p 表达均呈明显上升趋势,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); 而 GSH 组 0-5 d 中,PLT 各参数指标变化及 CD62p 表达差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。显微镜下观察正常组第 5 天时,PLT 出现聚集、空泡现象,但未发生变性;GSH 组第 5 天时,PLT 偶见少量空泡,形态无变化。而正常组与 GSH 组各储存期内不同指标检测结果,除 PLT 1-3 d 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05) 外,其余指标 0-2 d 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05), 而 3-5 d 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结论 PLT 在保存期间发生一定程度的活化和 PLT 形态、功能的变化,为提高临床输注安全性和有效性,建议输注储存期 3 d 内的 PLT 更为有效。

【关键词】 活化;血小板;功能;形态;输注

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.008

Changes of parameters and CD62p expression in the storage period of PLT

HE Xue-hua, JIAO Jin-shan. Department of Postgraduates, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 Objective To observe the changes of parameters and CD62p expression in the storage period of platelet (PLT), providing reference for clinical safety and effectiveness PLT transfusion. **Methods** The 30 PLT samples of healthy donors were selected. 30 PLT samples were randomly divided into normal group (15 samples) and glutathione (GSH) group (15 samples). $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ extracorporeal shock for 0-5 d, the pH, counts, aggregation test, release test and CD62p expression of PLT were detected. And the morphologic changes were observed by microscope. **Results** During the PLT preservation, there were no statistical significance among various parameters changes and CD62p expression in normal group for 0-3 days (P all > 0.05). The pH and counts all appeared downward trend, and aggregation test, release test and CD62p expression all appeared rising trend in normal group for 3-5 days, and the differences all had statistical significance (P all < 0.05). There were no statistical significance among various parameters changes and CD62p expression in GSH group for 0-5 days (P all > 0.05). In the fifth day, the PLT were aggregation, cavitation, but not modified in normal group by microscope, and in GSH group, there were occasional cavitation, but no morphological changes. But the results of parameters about the normal group and GSH group in the storage period, Except the PLT had statistical significance in 1-3 d (P all < 0.05), the other indicators had no statistical significance in 0-2 d (P all > 0.05), and all had statistical significance in 3-5 d (P all < 0.05). **Conclusion** PLT has certain degree of activation and changes of morphological and functional during the preservation. To improve the safety and effectiveness of the clinical transfusion, it is suggest that the PLT in 3 days of preservation should be infused because it is more effective.

【Key words】 Activation; Platelet; Function; Morphology; Infusion

血小板 (platelet, PLT) 为血液中重要的成分之一,其保存越来越受到关注,PLT 体外保存多采用

(22±2) °C 振荡保存方法,但 PLT 在制备及储存的过程中产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)导致其活化,造成 PLT 损伤,所以临床输注不能达到预期疗效。CD62p 的表达作为 PLT 活化标志物之一已被公认,可以监测 PLT 活化程度,谷胱甘肽(glutathione, GSH)可抑制 PLT 活化^[1,2]。因此,本文观察储存期内 PLT 活化程度和 PLT 各参数间的变化,为临床 PLT 输注的安全性和有效性提供实验室参考依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2012 年 5 月至 2012 年 12 月太原市红十字血液中心随机抽取的健康献血者 PLT 样本 30 份。其中男 21 例,女 9 例,平均年龄(31.21±0.23)岁,献血者的选择符合国家规定的健康检查标准。血常规检查指标:血红蛋白(男性≥120 g/L、女性≥115 g/L);PLT (150~450)×10⁹/L;红细胞压积(≥0.36),PLT 形态和功能正常,体重(50~70) kg;采血前 1 w 禁服阿司匹林类等抗 PLT 药物,其转氨酶、乙肝表面抗原、丙型肝炎病毒、梅毒、HIV、血袋重量及外观等检测指标均达到中国输血协会规定的血液合格标准。

1.2 仪器与试剂 SJW-IC 型 PLT 恒温振荡保存箱(潍坊三江电子科技有限公司),流式细胞仪及配套鞘液(美国贝克曼公司),pHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),LH 750 全自动血细胞分析仪及配套试剂(美国贝克曼公司),AggRAM PLT 聚集分析系统(美国海伦娜公司),ATP 荧光检测仪(西安天隆科技有限公司),奥林巴斯电子显微镜(奥林巴斯电子公司);人 CD62p 检测试剂盒(美国贝克曼公司)、GSH

试剂(南京建成科技有限公司),ATP 检测试剂盒(上海乐宇生物科技有限公司),人胶原凝集素(上海隆垒生物科技有限公司)。

1.3 方法 30 份 PLT 样本根据随机数字表随机分为两组,其中正常组 15 例,GSH 组 15 例。在无菌环境下分别取 0~5 d 的样本进行检测(指标检测方法均参照各仪器及试剂盒说明),样本(22±2) °C 体外震荡保存 0~5 d,每日行相关数据检测,并使用高倍电子显微镜观察其形态变化。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间比较采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组 PLT 各储存期不同指标检测结果 正常组 PLT 储存 0~3 d,各储存期不同指标检测结果经比较,差异均无统计学意义($F_{CD62P} = 3.21, F_{pH} = 2.67, F_{PLT} = 1.09, F_{聚集} = 2.13, F_{释放} = 3.36, P$ 均 > 0.05),形态学上观察未见明显异常。正常组 PLT 储存 3~5 d,各储存期不同指标检测结果呈明显升高或下降趋势,经比较差异均有统计学意义($F_{CD62P} = 3.87, F_{pH} = 4.21, F_{PLT} = 3.54, F_{聚集} = 4.09, F_{释放} = 5.64, P$ 均 < 0.05);形态学观察显示,第 5 天可见两个或三个 PLT 聚集,紧密相连,多数 PLT 保持圆形,个别充满空泡,无 PLT 变性(见表 1~表 3,图 1)。

2.2 GSH 组 PLT 各储存期不同指标检测结果 GSH 组 PLT 储存 0~5 d,各储存期不同指标检测结果变化不大,经比较差异均无统计学意义($F_{CD62P} = 3.18, F_{pH} = 2.52, F_{PLT} = 1.03, F_{聚集} = 2.06, F_{释放} = 3.22,$

表 1 正常组、GSH 组各储存期内 PLT CD62p 的表达情况($\bar{x} \pm s, \%$)

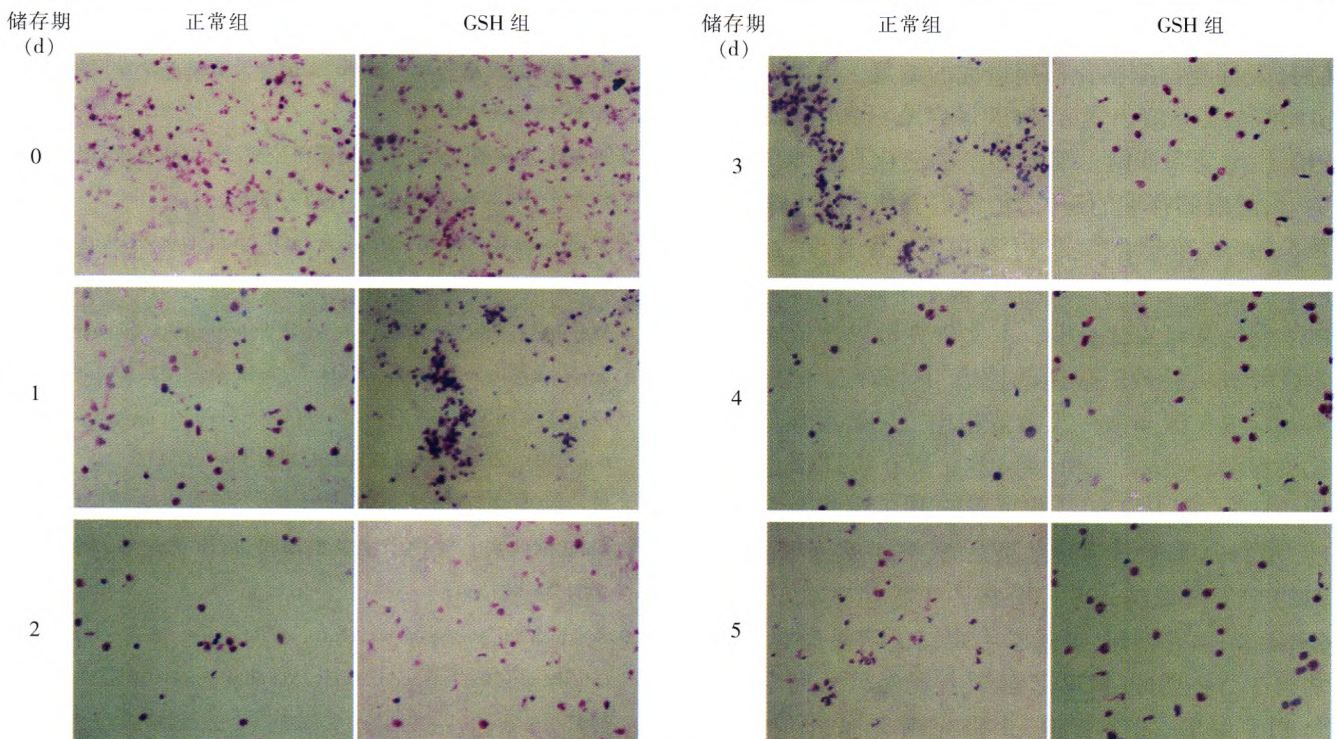
| 组别 | 0 d | 1 d | 2 d | 3 d | 4 d | 5 d |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 正常组 | 2.31±0.34 | 2.98±0.39 | 3.12±0.48 | 4.46±0.72 | 7.27±0.61 | 10.11±3.43 |
| GSH 组 | 2.49±0.47 | 2.72±0.29 | 3.01±0.51 | 3.32±0.41 | 4.54±0.55 | 5.78±0.40 |
| <i>t</i> 值 | 1.202 | 2.072 | 0.608 | 5.323 | 12.873 | 4.856 |
| <i>P</i> 值 | > 0.05 | > 0.05 | > 0.05 | < 0.05 | < 0.05 | < 0.05 |

表 2 正常组、GSH 组各储存期内 PLT pH 及 PLT 计数检测结果的比较($\bar{x} \pm s$)

| 储存期(d) | pH 值 | | | | PLT(×10 ⁹ /L) | | | |
|--------|-----------|-----------|------------|------------|--------------------------|---------------|------------|------------|
| | 正常组 | GSH 组 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 | 正常组 | GSH 组 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 0 | 7.29±0.05 | 7.28±0.03 | 0.664 | > 0.05 | 1198.27±48.52 | 1175.31±46.29 | 1.326 | > 0.05 |
| 1 | 7.27±0.02 | 7.26±0.02 | 1.369 | > 0.05 | 1070.31±52.49 | 983.27±47.53 | 4.761 | < 0.05 |
| 2 | 7.18±0.23 | 7.23±0.03 | 0.835 | > 0.05 | 929.44±58.16 | 902.44±50.16 | 1.362 | < 0.05 |
| 3 | 7.03±0.19 | 7.18±0.08 | 2.818 | < 0.05 | 773.57±69.38 | 851.65±54.33 | 3.432 | < 0.05 |
| 4 | 6.71±0.22 | 7.12±0.11 | 6.456 | < 0.05 | 602.79±81.71 | 807.56±51.38 | 8.217 | > 0.05 |
| 5 | 6.67±0.31 | 6.96±0.13 | 3.341 | < 0.05 | 486.01±101.85 | 763.27±52.23 | 9.382 | > 0.05 |

表 3 正常组、GSH 组各储存期内 PLT 的聚集和释放试验结果($\bar{x}\pm s$)

| 储存期(d) | 聚集(ohms) | | | | 释放(nmol) | | | |
|--------|----------|----------|-------|--------|----------|---------|-------|--------|
| | 正常组 | GSH 组 | t 值 | P 值 | 正常组 | GSH 组 | t 值 | P 值 |
| 0 | 20.2±3.5 | 21.5±2.3 | 1.202 | > 0.05 | 1.3±0.6 | 1.4±0.4 | 0.537 | > 0.05 |
| 1 | 20.7±4.2 | 21.9±3.1 | 0.890 | > 0.05 | 1.4±0.4 | 1.5±0.6 | 0.538 | > 0.05 |
| 2 | 21.5±2.8 | 22.0±3.2 | 0.455 | > 0.05 | 1.7±0.1 | 1.6±0.2 | 1.732 | > 0.05 |
| 3 | 24.4±3.7 | 22.3±1.9 | 1.955 | < 0.05 | 2.0±0.3 | 1.6±0.4 | 3.098 | < 0.05 |
| 4 | 25.3±2.9 | 23.1±2.5 | 2.225 | < 0.05 | 2.2±0.2 | 1.7±0.5 | 3.596 | < 0.05 |
| 5 | 26.5±3.3 | 24.7±2.4 | 1.708 | < 0.05 | 2.4±0.5 | 1.9±0.3 | 3.321 | < 0.05 |

图 1 正常组及 GSH 组各储存期内 PLT 形态学改变情况($\times 400$)

P 均> 0.05);形态学观察显示,第 5 天偶见少量 PLT 聚集,PLT 基本保持圆形(见表 1~表 3,图 1)。

2.3 正常组与 GSH 组 PLT 各参数检测结果比较正常组和 GSH 组 PLT CD62p 阳性表达率及各参数检测指标组间两两比较,除 PLT 外,在 0~2 d 差异均无统计学意义(P 均> 0.05),在 2~5 d,正常组的 pH 值低于 GSH 组,而 CD62p 阳性表达率、PLT 聚集和释放数值均高于 GSH 组,差异均有统计学意义(P 均< 0.05)。见表 1~表 3。形态学观察:两组 0~5 d 保存时间内观察结果差别不明显。见图 1。

3 讨论

PLT 在保存过程中易产生 ROS,ROS 是 PLT 受到氧化还原反应产生的,分子物质组成上具有氧的、较活跃的一类化学物质的总称,包含过氧化氢、超氧自由基等,有文献^[3,4]表明 PLT 自身可以合成并释放 ROS,又称内源性 ROS,使储存期内 PLT 发生一定程度的活化甚至凋亡。大量文献^[5-7]研究表明,CD62p

阳性率的表达强弱代表其活化程度,并与 PLT 的功能及形态的损伤呈正相关。

长期以来,国内医学界一直致力于低温保存 PLT 技术的研究。而国外研究^[8]观察不同物质是否能够抑制储存期内 PLT 的活化。随着对细胞凋亡分子机制的深入研究,许多凋亡诱导剂作用于细胞凋亡中显示 ROS 释放水平高低与 GSH 呈负相关^[9]。GSH 已被证实能够抑制其 PLT 产生的氧化物释放水平,更好地抑制 PLT 颗粒内容物的释放,降低 PLT 活化率,延迟 PLT 的代谢速率,抑制激活及聚集,保持 PLT 功能及形态^[10,11]。从而降低体外保存 PLT 的污染风险,提高了临床输注安全性和有效性。

本文研究表明,经过 GSH 干扰处理的 PLT 在储存 0~5 d 内,CD62p 表达阳性率、pH 值、PLT、PLT 聚集、释放试验的数值变化并不显著,差异均无统计学意义,而正常组的结果变化较明显(见表 1~表 3)。提示了 GSH 抑制了 PLT 的活化,而 PLT 的活化确实

会对储存期内 PLT 的功能指标和样本质量有所影响。在结果中可观察到,PLT 储存期内,无论是否经过 GSH 的处理,CD62p 表达均增强,但正常组较 GSH 组阳性表达率高,提示正常组 PLT 的活化程度较高;PLT 的 pH 值与 PLT 都呈下降趋势。储存期至第 5 天时,两组 pH 值的平均值仍大于 6.3;将两组数据对比观察,其保存至第 3 天时的 pH 值与前一天相比,正常组数值下降幅度较大,这一结果的可能性为 PLT 自身释放大量氧化物,导致其活化的结果。而 GSH 组数值中 pH 值缓慢平稳的下降,其 GSH 发挥其抑制活化作用造成的结果。PLT 同样与 pH 值情况类似,提示 PLT 保存 0-3 d 时,GSH 组 PLT 代谢受到抑制,因为 PLT 的活化与其代谢率有关^[12],随着储存期的延长,正常组 PLT 被活化释放 α 颗粒,释放逐渐增多,促进了 PLT 活化程度,加快了 PLT 的代谢,产生了其数值大幅度下降的趋势。诱导 PLT 聚集及释放试验中,本文研究结果显示 PLT 聚集及释放试验数值呈递增趋势,其保存 3-5 d 中,聚集及释放试验与前一天数值相比,正常组数值上升速度显著,均大于 GSH 组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05),即 PLT 的活化可影响 PLT 聚集及释放速度。总体从形态学观察结果来看,将观察 0-5 d 内典型的 PLT 图像纳入其中分析,正常组 0-3 d 期间,GSH 组 0-4 d 期间,形态学上观察无明显异常,而正常组 3-5 d 期间,PLT 形态学上观察可见两个或三个 PLT 聚集,紧密相连,个别充满空泡,无 PLT 变性;GSH 组 4-5 d 期间,亦可见少量 PLT 发生聚集现象,无 PLT 变性。有文献^[9]报道 PLT 储存期间,因活化或代谢异常导致 PLT 屏障受损引起形态改变,可能由双面凸形转变为球形,使 PLT 产生小聚集情况增多。形态学观察结果提示,正常组的 PLT 形态学上与 GSH 组比较差异不明显。导致上述结果可能与样本个体差异有关。

综上所述,在储存 PLT 的过程中可发生一些功能指标和形态的变化,包括 pH 值、PLT 的降低;CD62p 表达、聚集、释放试验数据升高,提示 PLT 在随着储存时间的延长而发生一定程度的活化甚至凋亡。临床用血治疗时可能会发生 PLT 输注无效^[13]。当 PLT 发生了储存损伤时,PLT 逐步被激活,释放大

量炎症因子,并伴有 PLT 凋亡,PLT 的体内存活率及储备功能会逐渐削弱^[14]。通过本次实验,在提高临床输注安全和有效方面,建议输注储存期 3 d 内的 PLT 更为有效。为减少储存期内 PLT 的损伤,要时刻注意血制品的保存质量和方法,避免临床输注无效。

4 参考文献

- 1 欧阳锡林,刘景汉,Dayong Gao. 流式细胞术测定保存血小板再表达 CD62p 方法的建立及应用. 中国输血杂志,2002,15:77-81.
- 2 查艳萍,秦永文,荆清,等. 谷胱甘肽 S-转移酶-KGDH 融合蛋白的抗血小板作用. 现代临床医学生物工程学杂志,2001,7:244-252.
- 3 刘立根. 氧化物与血小板活化. 国外医学输血及血液学分册,1995,18:364-365.
- 4 王志成,谢如锋,张晓峰. 钙调蛋白抑制剂诱导血小板 GP I b α 酶切的分子机制研究,2012,25:1253-1256.
- 5 Wachowicz B, Oblas B, Zbikowska HM, et al. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. Platelets,2002,13:175-182.
- 6 Marcus AJ, Silk ST, Safier LB, et al. Superoxide production and reducing activity in human platelets. J Clin Invest,1977,59:149-158.
- 7 Lee JH, Kim JT, Cho YG. Effect of nitric oxide on the cryopreservation of platelets. Korean J Lab Med,2008,28:136-143.
- 8 曾娅莉,黄文芳,杨永长,等. 活性氧与谷胱甘肽在辛伐他汀诱导 K562 细胞凋亡时的变化及机制探讨. 重庆医科大学学报,2009,34:992-995.
- 9 Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide superoxide, and peroxynitrite the good the bad and the ugly. Am physiol Soc,1996,271:1424-1437.
- 10 Moro MA, Russel RJ, Cellek S, et al. GMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide. Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93:1480-1485.
- 11 谢月娜,刘嘉馨,王红,等. 一氧化氮供体改善血小板保存质量的初步研究. 中国输血杂志,2011,24:314-318.
- 12 邓小燕,潘昆胎. 血小板保存期间血小板参数和乳酸代谢的变化. 广东医学,2008,29:1521-1522.
- 13 曹慧,卓海龙,徐丽娟,等. 单采血小板保存期间部分参数的改变及其意义. 中国医药导报,2012,9:86-87.
- 14 邹勇,袁青,陆英,等. 机采血小板储存期内活化和凋亡的分析. 广州医药,2012,43:52-54.

(收稿日期:2013-01-30)

(本文编辑:张志成)