DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.034
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-2067-03

论著

两种保存袋对浓缩血小板在22 ℃贮存期间活化状况的影响

成晓玲[1],赵树铭[1],傅晓岚[2],刁荣华[1],刘 璐[1],张 红[1],陈寒梅[1] (第三军医大学:[1]西南医院输血科,[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究不同保存袋对浓缩血小板在贮存期间活化状态的影响。方法 用两种血小板常温保存袋在22 ℃保存浓缩血小板5 d,分别在0、1、3 d和5 d取样品测定CD62p、血小板聚集功能、pH和血小板计数。结果 随保存时间延长,CD62p的表达显著增强,两种保存袋之间的差异非常显著($P<0.01$)。但其它检测指标相差不显著。结论 不同血小板保存袋对血小板在22 ℃贮存期间的活化状态的影响有明显差异,CD62p是评价血小板活化的灵敏指标,对血小板的保存和监控具有重要意义。

关键词:血小板;活化;CD62p
中图法分类号:R331.143;R446;R954 文献标识码:A

Effects of 2 types of platelet storage bags on the activation of concentrated platelet at 22 ℃

CHENG Xiao-ling[1], ZHAO Shu-ming[1], FU Xiao-lan[2], DIAO Rong-hua[1], LIU Lu[1], ZHANG Hong[1], CHEN Han-mei[1] ([1]Department of Transfusion, Southwest Hospital, [2]Central Laboratory, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different storage bags on the activation of concentrated platelets during the storage period. **Methods** Concentrated platelets were stored in 2 different platelet storage bags at 22 ℃ for 5 d. CD62p, platelet congregate function, pH, and platelet count were determined at 0, 1, 3, and 5 d, respectively. **Results** CD62p expression increased significantly in a time-dependent manner. There was significant difference between the two storage bags ($P<0.01$), but there was no significant difference in other indexes between the two storage bags. **Conclusion** Different platelet storage bags have obvious effects on the activation of platelets during the storage period at 22 ℃. CD62p, a sensitive marker for the evaluation of the activation of platelets, is of important significance in the storage and quality control of platelet concentration.

Key words: blood platelet; activation; DC62p

浓缩血小板悬液(platelet concentrated suspension, PCs)在制备和贮存过程中极易引起血小板活化,影响输注效果。采用稳定敏感、精确简单的方法监测血小板活化状况,对改进PCs的制备及保存方法,提高血小板输后体内存活率具有重要意义。我们将PCs分别用两种血小板常温保存袋保存0~5 d,通过测定保存期间血小板CD62p的表达、血小板聚集功能、pH和血小板计数的变化,对各种反应血小板功能活性变化检测方法的意义及不同的血小板常温保存袋对PCs血小板活化程度的影响进行了观察研究,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

NG血小板常温保存袋(国产),BT血小板常温保存袋(Baxter公司,美国),CS3000 plus血细胞分离仪(Baxter公司,美国),F-820型血细胞计数仪(Sysmex公司,日本),TYXN-91血液凝集仪(通用机电公司,上海),OMNI血气分析仪(Modular System,美国),FACScalibur流式细胞仪(BD公司,美国),XHZ-1型血小板恒温振荡保存箱(华通公司,苏州)。试剂:凝血酶(终浓度2 mmol/L,Sigma)、CD41 FITC、CD62p PE、Mouse IgG-1 PE(Caltag Laboratories)、ACD-2抗凝剂(上海血液中心)。血小板洗涤剂(Na2EDTA+PBS)、0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、1%多聚甲醛固定液,以上试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集与分组 10位健康自愿献血者,按操作规程用CS3000plus血细胞分离机采集浓缩血小板悬液,每单位血小板含量为$(2.5\sim3)\times10^{11}$。将每1单位血小板分装成2袋,分别用NG血小板常温保存袋(NG组)和BT血小板常温保存袋(BT组)保存,置22 ℃血小板保存箱,水平振摇,保存5 d。分别在0 d(采血的当天)、1、3、5 d留取样品检测。

1.2.2 血小板膜蛋白CD62p的检测 血小板最终检测浓度为10^6/ml。①将7 μl血小板原液加入993 μl血小板洗涤剂,稀

作者简介:成晓玲(1954-),女,山西省兴县人,主任技师,主要从事血液成分制备及保存方面的研究,发表论文19篇。电话:(023)68754198
收稿日期:2003-12-13;修回日期:2004-06-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

释成 1 ml。②每一标本准备 3 管，分别编为 A、B、C 管，每管中加入上述液体 100 μl。③分别加入：A 管：Mouse IgG1，B 管：CD41 FITC+ IgG PE，C 管：CD41 FITC+ CD62p PE。④避光孵育 15 min 后，加入 1 ml 1%冷多聚甲醛(4 ℃)，2~8 ℃避光保存 30 min，上流式细胞仪检测。

1.2.3 血小板聚集功能的检测 致聚剂为凝血酶，终浓度为 2 nmol/ml，用血液凝集仪测定，记录 5 min 血小板聚集曲线和血小板最大聚集率。

1.2.4 血小板 pH 的测定 血气分析仪测定血小板悬液 pH。

1.2.5 血小板计数 全自动血细胞计数仪测定血小板计数。

1.3 统计学方法

采用 SPMR 统计程序包进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 血小板膜蛋白 D62p 的表达

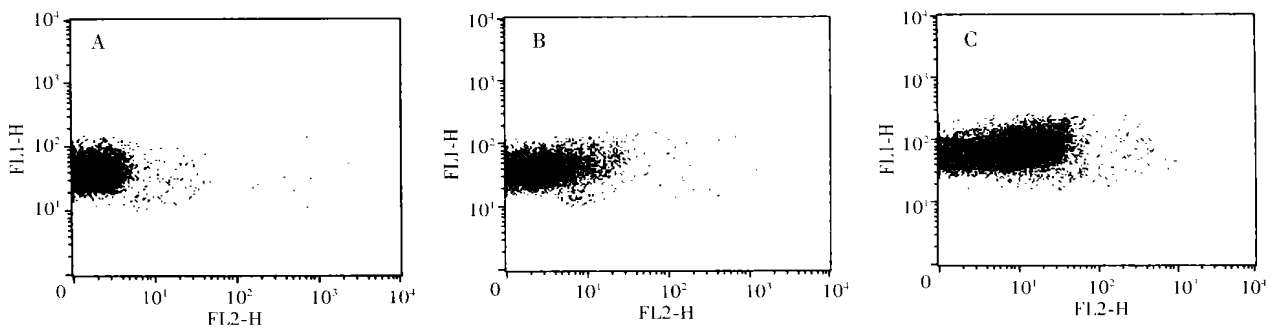
两组间比较(表 1)：保存 1 d 时 CD62p 的表达水平变化相似($P>0.05$)；保存 3 d 时差异显著($P<0.05$)；保存 5 d 时差异非常显著($P<0.01$)。在保存期间，NG 组的血小板膜蛋白 CD62p 的表达明显高于 BT 组，保存 5 d 时 NG 组是 BT 组的 2.3 倍。

同组间比较：与 0 d 比较，保存 1 d 后的 BT 组和 NG 组中的血小板 CD62p 的表达增加非常显著($P<0.01$)；保存 5 d 分别与保存 1、3 d 比较，BT 组血小板表面膜蛋白颗粒 CD62p 的表达无显著差异；NG 组血小板 CD62p 的表达呈递增趋势，保存 5 d 时 CD62p 的表达为 31.59%，约为保存 1 d 时的 3 倍，见图 1。

表 1 血小板膜蛋白 CD62p 表达[$n=10$，($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1 Expression of platelet membrane protein CD62p [$n=10$，($\bar{x}\pm s$)%]

	BT	NG	P
0 d	3.77±1.86	3.77±1.86	
1 d	10.87±4.75	11.06±4.99	>0.05
3 d	13.82±5.08	20.20±8.04	<0.05
5 d	13.65±2.68	31.59±8.13	<0.01



A：The fresh PCs(0 d)；B：The PCs of BT group at 5 d；C：The PCs of NG group at 5 d

图 1 PCs 在新鲜状态(0 d)和 22 ℃保存 5 d 时血小板膜蛋 CD62p 的表达

Fig 1 Expression of platelet membrane protein CK62p of PCs in both fresh state (0) and the state stored for 5 d at 22 ℃

2.2 血小板计数和聚集率的变化

血小板计数在保存期内变化不明显，血小板聚集率则随保存期延长而逐渐降低，但两组比较相差不显著($P>0.05$)。

2.3 血小板 pH 的变化

pH 值随保存期延长逐渐降低，但两组比较相差不显著($P>0.05$)。

3 讨论

血小板 CD62p(P-选择素)是一种分子量为 140 000 的膜糖蛋白，位于血小板内的 α-颗粒和内皮细胞棒管状(weibel-palade)小体内，在正常情况下低水平表达，当血小板或内皮细胞被激活时，CD62p 迅速从胞内翻转至细胞表面表达[1]。在血小板的多种表面活化分子标记物中，CD62p 的表达在活化和非活化血小板之间的差别最大，可以特异地评价血小板活化程度，是理想的血小板活化指标[2]。PCs 采集和保存过程中，因物理刺激、温度、离心力和离心时间、pH 改变等因素引起了血小板活化。在血小板常温保存实验中，将单采 PCs 在采集后 1 h 内标记抗体并固定(0 d)，用流式细胞仪测定 CD62p，阳性表达平均为(3.77±1.86)%，最高 6.86%，最低 0.36%。采用 BT 和 NG 血小板保存袋，22 ℃水平振摇保存血小板，保存 1 d，P-选择素的表达比 0 d 增加 3 倍(BT 组：$P=0.004\ 6$；NG 组：$P=0.003\ 7$，$P<0.01$)，两种保存袋之间无显著差异($P=0.94$，$P>0.05$)；保存 3 d，P-选择素的表达与 0 d 相比较，BT 组与 NG 组别分增加 3.7 倍($P=0.01$)和 5.4 倍($P<0.01$)，两组之间相差显著($P=0.012$，$P<0.05$)；保存 5 d，BT 组与 NG 组 P-选择素表达分别是 0 d 的 3.6 倍($P=0.01$)和 8.4 倍($P<0.01$)，两组之间相差非常显著($P<0.01$)。在 22 ℃水平振摇的条件下，血小板 CD62p 的表达，BT 袋明显低于 NG 袋，提示 BT 袋保存的 PCs 活化程度明显低于 NG 袋保存的 PCs。其临床意义是 CD62p 表达阳性的血小板在体内更容易被截留，清除。如果在制备及保存期间血小板受到损伤，导致较多

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的血小板活化，输注后的血小板存活率将下降。

与手工制备的血小板相比较，机采血小板活化程度较低，在体内的存活率较高。采后 1 h 机采血小板的 CD62p 阳性表达平均为(3.77±1.86)%；用 Bexter 公司生产的血小板常温保存袋保存血小板 5 d，血小板 CD62p 的表达平均为(13.65±2.68)%。而据文献[3,4]报道，保存 1 d 的手工血小板 CD62p 的表达为(55±38)%左右。值得注意的是，虽然目前我国机采血小板越来越普及，但从全血制备的手工 PCs 仍然是血小板输血的重要来源。

不同的保存袋对贮存血小板有重要的影响。有时这种改变难以用过去常用的检测手段发现。实验中观察到，用两种不同的血小板常温保存袋在 22 ℃水平振摇的条件下保存血小板，血小板聚集功能和 pH 随保存时间延长均有改变，但两组相差不显著。血小板计数的变化也不显著，可能是因为全自动血细胞计数仪不能分辨血小板碎片的原故。故以上检测手段对早期反应血小板的活化状态有一定局限性。流式细胞仪检测血小板 CD62p 阳性表达的技术具有敏感、准确、稳定及重复性好的优点，对血小板制备和保存过程的监控具有重要意义。本研究采用 62CDp 评价两种不同的保存袋中血小板的活化状况，两组相差非常显著，说明 NG 血小板常温保存袋质量仍有待提高。

参考文献：

[1] Stenberg P E, McEver R P, Shuman M A, *et al*. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation[J]. J Cell Biol, 1985, 101(3): 880-886.
[2] 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[J]. 中国输血杂志，2002，15(2)：77-81.
[3] Pedigo M, Wun T, Paglieroni T, *et al*. Removal by white cell-reduction filters of activated platelets expressing CD62[J]. Transfusion, 1993, 33(11): 930-935.
[4] 江朝富，崔徐江，汪传喜，等. 血细胞分离机制备的浓缩血小板与洗涤血小板的体外实验对照[J]. 中国输血杂志，2002，15(3)：162-165.

(编辑 王 红)

文章编号：1000-5404(2004)22-2069-01

个案与短篇

32 例胆源性胰腺炎腹腔镜胆囊切除术的体会

Experience in laparoscopic cholecystectomy for hepatogenic pancreatitis in 32 cases

王洪平[1]，余 华[2] ([1] 达州市通川区中医院外科；[2] 达州市中心医院肝胆科，达州 655000)

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 一般资料 筛选我院 2000 年 4 月至 2004 年 4 月收治胆源性胰腺炎病例 32 例，其中男性 18 例，女性 14 例，平均 46 岁。合并高血压 4 例，糖尿病 3 例。发病至入院时间 4～120 h。病史：①既往有胆绞痛或上腹疼痛病史；②发病均上腹痛，腰背部胀痛 25 例，恶心、呕吐 18 例；墨菲氏征(+)9 例；③尿黄和/或皮肤、巩膜黄染；尿黄 9 例，皮肤、巩膜黄染 6 例。无腹部皮肤淤血淤斑者。

1.1.2 实验室检查 ①酶学检查：血、尿淀粉酶均高于正常，9 例血脂肪酶高于正常。18 例血清总胆红素、直接胆红素、间接胆红素，AST、ALT 高于正常；②白细胞升高：9 例> 15×10^9/L，其余病例> 10×10^9/L。

1.1.3 影像学检查 B 超、CT 等影像学检查示大部分病例胆囊大，囊壁厚、毛糙，胆囊内多发性结石，伴胆泥或胆砂。6 例胆囊颈管结石。所有病例胆总管上段无明显增宽，胰体尾部稍大，密度均匀，胰周脂肪间歇尚清。

1.2 方法

本组病例均在保守治疗的基础上，观察患者的体温、黄染、腹部体征、生命体征及酶学变化，待病情稳定、酶学基本正常，行腹腔镜胆囊切除术。病情稳定者，酶学指标恢复正常，进食 3～5 d 后，入院后 10～15 d 左右，行腹腔镜手术。

手术方式：患者平卧位，全身静脉麻醉或持续硬膜外腔阻滞麻醉后按腹腔镜胆囊切除术四孔法进行手术，腹腔镜进入腹腔后，首先检查全腹腔，重点检查有无腹腔积液、网膜钙化等胰腺严重受累的表现及胆囊三角有无粘连或脂肪堆积，行腹腔镜胆囊切除术，常规放置腹腔引流管。

术后治疗：术后继续抗炎、解痉治疗，观察酶学变化，必要时可用抑胰酶剂，观察腹部体征及腹腔引流管，如无腹腔引流物流出，2～3 d 可拔除引流管。

2 结果

所有病例术后恢复良好，术后住院天数 4～7 d，平均 5.6 d。术后随访 5～36 个月，无手术并发症及胰腺炎复发。

(下转 2076 页)

作者简介：王洪平(1961－)，男，四川省达州市人，主治医师，主要从事肝胆外科方面的研究。电话：(0818)2127417

收稿日期：2004-09-01；修回日期：2004-11-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net