DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.035
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1672 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

技术方法

文章编号:1000-5404(2003)18-1672-02

流式细胞仪双色术检测机采血小板活化方法

Determination of platelet activation in platelet concentrated suspension by 2-color flow cytometry

傅晓岚[1],陈兆珍[1],成晓玲[2],赵树铭[2] (第三军医大学:[1]高原军事医学系中心实验室;[2]附属西南医院输血科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨一种流式细胞仪检测机采浓缩血小板悬液活化状态的方法。方法 用CD41-FITC、CD62-PE双色标记,避光反应15 min后加入1 ml 1%多聚甲醛固定,上机分析。结果 采用此方法测定22 ℃保存下不同时间的血小板CD62P表达,表明随着时间的延长CD62P阳性率增加,保存达到3 d及以上,CD62P阳性率增加非常显著。标本以多聚甲醛固定在24 h对CD62P测试结果无明显影响,样品不固定处理,不同时间测定对结果影响非常大。结论 双色标记流式细胞术检测机采血小板活化敏感、特异,重复性好,操作简便,能较好地反映储存中血小板的CD62P的变化。可方便应用于血小板的保存及输注的质量监控。

随着血小板临床应用的与日俱增,研究血小板保存损伤与保存质量也备受关注。血小板保存损伤与血小板的体外活化存在相当密切的关系,血小板保存中功能检测的一项重要的指标就是血小板体外活化的检测[1]。本实验以双色流式细胞术检测机采浓缩血小板悬液在不同保存时间中的CD62P表达,并探讨制样时间及固定对测试结果的影响。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 检测样品

10名健康志愿者,按操作规程用CS3000plus(Baxter公司,美国)血细胞分离机采集的浓缩血小板悬液。用进口血小板常温保存袋(Baxter公司,美国)保存,置22 ℃血小板保存箱,水平振荡,分别于采血当天(0 d),保存1、3、5 d取样检测。

1.2 主要试剂

CD41-FITC、CD62P-PE、Mouse IgG-1 PE(Caltag Laboratory)ACD-2抗凝剂(上海血液中心)。血小板洗涤剂(Na_2EDTA+PBS)、0.2 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)、1%多聚甲醛固定液。以上试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 取血小板原液7 μl,加入993 μl血小板洗涤剂,稀释成1 ml。每一标本取试管A、B、C,均加入上述液体100 μl。然后分别加入:A管:Mouse IgG-1PE;B管:CD41-FITC+IgG-1 PE;C管:CD41-FITC+CD62P-PE。室温避光孵育15 min。加入或不加入1 ml 1%冷多聚甲醛,2~8 ℃避光保存。

1.3.2 流式细胞仪检测 美国BD公司FACSCalibur流式细胞仪,氩离子激光器488 nm谱线,CELLQuest3.1软件。以CD41-FITC与侧向角散射SSC设门设定血小板群。每管检测10 000个血小板。用A管,调整FL1与FL2光电倍增管电压,将阴性对照调整好。B管,优化FL1-FL2与FL2-FL1的补偿。C管,检测CD62P的表达情况,参照阴性对照,得出血小板活化的百分率。

1.4 统计学分析

数据以($\bar{x}\pm s$)%表示,采用配对t检验。

2 结果

2.1 保存时间对血小板CD62P的影响,见表1

表1 不同保存期内,血小板CD62P的变化($n=10$)

保存时间(d)	CD62P($\bar{x}\pm s$)%
0	3.77±1.86
1	11.06±4.99 *△
3	20.20±8.04 **△△
5	31.59±8.13 **△△

*:$P<0.05$, **:$P<0.01$与0 d比较;
△:$P<0.05$, △△:$P<0.01$与前一组比较

2.2 样品制备时间对测定血小板CD62P结果的影响

5例采血当天的样品,染色后不固定。结果:用30 min完成样品制备并上机检测的CD62P阳性率(4.49±1.12)%明显低于1 h完成的CD62P阳性率(16.77±0.38)%,与3 h完成的阳性率(71.22±2.49)%,($P<0.01$)。

用1%多聚甲醛固定后,不同上机检测时间与血小板CD62P的测定结果的关系。对5例采血当天的样品,标记完后加1%多聚甲醛固定,于30 min、24 h、48 h上机检测,阳性率分别为(3.96±0.33)%、(3.48±0.57)%、(3.73±0.41)%。各组数据间无显著差别($P>0.05$)。

3 讨论

P-选择素或CD62P是血小板α颗粒的膜糖蛋白,在静止期,血小板不表达或少量表达CD62P,血小板活化时,颗粒膜蛋白与血小板膜蛋白融合,使CD62P暴露于血小板膜表面,因此,CD62P被认为是血小板活化检测的一项特异、敏感的标志[2]。CD41是血小板表面

作者简介:傅晓岚(1964-),女,河南省林洲市人,实验师,主要从事细胞分析测试方面的研究。电话:(023)68752353

收稿日期:2002-11-17;修回日期:2003-05-05

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

特异性的标记，血小板无论大小与是否活化，均稳定表达 CD41/CD61，所以，可利用 CD41/CD61 来特异性地识别、判断血小板[3]。经血细胞分离机分离后的血小板悬液仍混有一定数量的其他细胞，以往采用前向角散射光 FSC 与侧向角散射光 SSC 设门难以做到对血小板群的准确认定。用 CD41 与 CD62P 双色标记血小板，以 CD41 与侧向角散射光 SSC 设门来区分选定血小板群，保证了所选定检测的颗粒的特异性，从而有效地避免其他种类的细胞以及碎片、鞘液杂质及管道中残存物可能造成的干扰。并且由于流式细胞仪具有同时多色、多参数检测分析的能力，能够很方便、同时检测到血小板的 CD62P 表达情况。

已有分析表明，血小板在储存中，随着保存时间的延长，破碎的白细胞与红细胞及已活化的血小板会释放血小板激活物，使血小板处于持续的激活状态，导致血小板活化加剧[1]。我们用此双色法对 22 ℃下不同保存时间血小板悬液取样检测，可以看出，在相同保存和测试条件下，随着保存时间增加，血小板 CD62P 也明显增加，保存时间≥3 d，CD62P 较 72 h 内有显著变化。再次体现了储存中血小板活化与储存时间的依赖关系，并表明本方法能真实反映血小板的活化状况。

由于血小板是一种非常敏感的物质，在体外更是十分活跃，多种因素均可导致其自身的激活，从而导致错误的测试结果。对于机采血小板，是全自动控制密闭系统，在采集的过程中能较好地防止血小板的激活，在相同的抗凝剂、孵育反应条件下，制备流式细胞仪检测样品的标记过程及标本制作后放置待上机的时间仍会造成 CD62P 测定结果的显著不同。从本实验中可以看到，对于新鲜标记但未用多聚甲醛固定的标本，制样及待上机的时间稍长，CD62P 就增加明显。而标记完再用 1%冷多聚甲醛固定后，在 30 min、24 h、48 h 分别上机检测，得出的 CD62P 阳性率没有明显的差别。提示只要在标记反应完后及时固定，对上机检测时间没有急迫的要求。因此，我们认为通过流式细胞仪联合 CD41-FITC、CD62P-PE 双色标记检测机采血小板的 CD62P，能较好地反映保存中血小板的活化状况，并且敏感、特异，重复性好，操作简便，能检测到少到 1%的活化血小板亚群[4]，作为探讨血小板保存条件、保存质量，临床输注用血小板的质控方法，有较好的应用价值。但样品的制备非常关键。应尽可能在短时间内完成取样、标记，并最好要在标记后加 1%多聚甲醛固定再上机检测才能更好保证测试结果的客观、准确。

关键词：流式细胞术；血小板活化；CD62P；血小板保存
中图法分类号：R446.11　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 吕俊海，刘明东，韩　颖. 血小板保存损伤的研究进展[J]. 中国输血杂志，2002，15(1)：65－67.
[2] 周永列，张继业. 血小板活化标志物及其临床意义[J]. 国外医学与临床生物化学与检验学册，2000，21(6)：299－301.
[3] Michelson A D. Flow cytometry：a clinical test of platelet function[J]. Blood，1996，87(12)：4925－4936.
[4] 李珉珉. 流式细胞术检测血小板功能及其临床应用[J]，中华医学检验杂志，1999，2(3)：182－184

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2003)18-1673-01

个案与短篇

成人先天性巨结肠 1 例

A case report of Hirschsprung's disease in adult

刘占奎，张　超，余佩武　（第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

患者，男性，60 岁，因反复腹痛、腹胀 5 年，加重 1 年入院。缘于 5 年前因食不洁食物后出现腹痛、腹胀、腹泻，为黄色稀水样便，无脓血、粘液，无里急后重感，在重庆市某医院诊断为“急性胃肠炎”，给予抗炎、补液治疗后症状缓解。其后，上述症状无明显诱因出现 3 次，均行结肠镜和钡灌肠检查，诊断为“慢性结肠炎”，口服“结肠炎丸”，症状缓解出院。1 年前无明显诱因出现剧烈腹痛、腹胀，肛门停止排气、排便，遂再次行结肠镜检查，见结肠有一明显狭窄段，活检未见神经节，诊断为“先天性巨结肠”，给予保守治疗。1 年来，上述症状约 2 个月出现 1 次，自觉症状逐渐加重，遂到我院。查体：腹平坦，柔软，无压痛，肝脾肋缘下未及。钡剂灌肠示：升结肠至降结肠肠管明显扩张，降结肠轮廓不整呈锯齿状，排便后升结肠、直肠收缩，降结肠、横结肠仍扩张。给予清洁灌肠 1 次/d，肠道准备 1 周，术中见：乙状结肠扩张，横径约 20 cm，肠壁增厚，在直肠与乙状结肠交接处有一狭窄肠段，长约 2.2 cm，降、横、升结肠亦明显扩张，肠壁较薄。行左半结肠切除、横结肠直肠吻合器吻合术。病理显示狭窄肠段内无神经节细胞。诊断为成人先天性巨结肠。

作者简介：刘占奎(1970－)，男，河南省洛阳市人，硕士研究生，主要从事胃肠疾病方面的研究。电话：(023)65399044

收稿日期：2003-06-10；修回日期：2003-07-20

（下转 1680 页）

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