DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.030
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1067-03

论著

冰冻机采血小板超微结构回收率以及CD62P,PAC-Ⅰ的改变

李 维[1],余梅贵[2],府伟灵[1] ([1]第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038;[2]重庆市血液中心输血研究室,重庆 400015)

提 要:目的 研究以终浓度5%二甲亚砜(DMSO)为主的冷冻保存剂加入机采血小板冻存1周、4周后血小板超微结构,体外回收率(RR)以及CD62P和PAC-Ⅰ的改变。方法 跟踪30例机采血小板产品,采用全自动血细胞分析仪,透射电镜(TEM)技术和流式细胞术(FCM)等分析并比较加入以DMSO为主的冷冻保存剂在-120 ℃冻存1周,4周后血小板的超微结构,RR值及CD62P和PAC-Ⅰ的改变。结果 30例冷冻保存1周及4周后的血小板仍然具有相对完整的超微结构。冻存1周及4周后血小板的RR分别为冻前的79.49%±6.14%和74.07%±5.39%。新鲜机采血小板的CD62P及PAC-Ⅰ的值分别为50.72%±14.31%,53.23%±20.26%;冻存一周及四周后CD62P和PAC-Ⅰ的值分别为30.96%±11.02%,22.96%±9.90%;32.07%±9.21%,19.55%±10.33%。结论 与新鲜机采血小板相比,冰冻血小板仍然具有较高的回收率和相对完整的超微结构,但也显示了不同程度的激活。与较高的回收率相对应,冷冻保存1周及4周后的机采血小板产品仍然具有较高的CD62P及PAC-Ⅰ活性,其CD62P及PAC-Ⅰ值无显著性差异($P>0.05$)。

关键词:血小板;超微结构;回收率;CD62P;PAC-Ⅰ
中图法分类号:R331.143;R446.11 文献标识码:A

Changes of ultrastructure, retrieval rate, CD62P and PAC-I of cryopreserved platelets

LI Wei, YU Mei-gui, FU Wei-ling (Department of Blood Transfusion, Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes of the ultrastructure, *in vitro* retrieval rate (RR) and the activities of CD62P and PAC-I of the platelets after 1 or 4 weeks' cryopreservation. **Methods** A total of 30 samples of platelets obtained by a cytocentrifuge (BAXTER CS-3000, USA) were preserved in DMSO solution at -120℃ for 1~4 weeks. The ultrastructure, *in vitro* RR and the activities of CD62P and PAC-I of all the platelet samples were observed and calculated at fresh, after 1 or 4 weeks' cryopreservation with automated hemocyte analysis, transmission electron microscopy and flow cytometry. **Results** All 30 platelet samples had relatively intact ultrastructure, but in comparison with their fresh counterparts, the RR was (79.49±6.14)% for those cryopreserved for 1 week and (74.07±5.39)% for those for 4 weeks. The CD62P value was (50.72±14.31)%, (30.96±11.02)%, and (32.07±9.21)% respectively for the samples at fresh, and after 1 and 4 weeks' cryopreservation, and the value of PAC-I was (53.23±20.26)%, (22.19±9.90)% and (19.55±10.33)% for these 3 groups of platelet samples. **Conclusion** In comparison with fresh platelets, cryopreserved platelets still have higher RR and intact ultrastructure, though the activities of CD62P and PAC-I are decreased to some extent.

Key words: platelet; ultrastructure; retrieval rate; CD62P; PAC-I

血小板输注是临床救治出血及各种原因所致血小板减少的重要手段。特别是近年来随着外科医学新技术的广泛应用,大剂量输血和疑难、复杂手术的增多使临床输用血小板需要量急骤增加。新鲜液体血小板不能满足临床需要,而22 ℃条件保存血小板时间短并有可能发生细菌污染,使战备储血,特殊血型和自身输血的应用受限。因此,研究低温保存血小板对解决临床输注血小板难题是一大突破。低温保存的血小板具有良好的止血效果和升高血小板功效,副作用少[1,2],并具有安全,快捷,疗效好的特点。笔者根据国际国内文献报道及多年工作实践采用了以终浓度为5% DMSO为主的冷冻保存剂,观察了新鲜血小板冻存1周、4周后超微结构和RR值的改变情况;同时通过流式细胞术观察新鲜血小板冻存1周及4周后CD62P,PAC-Ⅰ两个单抗指标的改变。

作者简介:李 维(1971-),女,重庆市人,硕士研究生,主管检验师,主要从事造血干细胞基础与临床移植方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754000-73106

收稿日期:2001-11-25;修回日期:2002-03-05

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 美国BAXTER CS-3 000血细胞分离机;瑞典AC-920全自动血细胞分析仪;美国Becton Dickinson流式细胞仪(FACS Calibur);日本HITACHIH-600透射电镜;日本SANYO ULTRA LOW深低温冰箱(-152 ℃)。

1.1.2 冷冻保存剂 二甲亚砜(DMSO),系北京化工厂产品。为无色稀薄液体,浓度99%,分子式$(CH_3)_2SO$,分子量78.13,凝点18 ℃~20 ℃,比重1.098~1.102 g/ml。

1.1.3 机采血小板 30例机采血小板产品来源于本血液中心成分制备室。

1.2 方法

1.2.1 机采血小板的制备 筛选献血员严格按照PLT>150×10^9/L,其余指标符合正常人的标准要求。按照CS-3 000的操作规程采集血小板。采集完毕,取出产品,并留取产品标本,供全自动血细胞分析仪计数及流式细胞仪检测。

1.2.2 冷冻机采血小板的制备及复苏 在无菌间的超净工作台上,将DMSO按终浓度5%缓慢加入机采血小板保存袋中并摇匀,留样于冷冻管。将样品立即置于-120 ℃深低温冰箱内冻存,开启至关闭冰箱约3~5 min,温度下降约10 ℃,15 min

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

后可恢复至－120 ℃。1 周、4 周后从－120 ℃深低温冰中迅速取出血小板样品冷冻管，在 42 ℃恒温水浴箱内快速解冻融化，3～5 min 内完成冷冻血小板的复苏，立即计数及供流式细胞仪，电镜检测。

1.2.3 冷冻前后血小板计数 吸取新鲜及复苏解冻的血小板标本 10 μl(AC-920 全自动血细胞分析仪检测血小板的最大值为 1 000× 10^9/ L，因机采血小板产品血小板计数往往为高浓度，故取半量)，作血小板计数(复管)，求均值。

1.2.4 透射电镜标本的制作 取新鲜及复苏解冻的血小板标本轻离心，去上清，用 4%戊二醛固定 2 h，然后将标本置换到 0.1 mol/ L 的 PBS 缓冲液中，再以 1%的锇酸固定 2 h，然后用 50%，70%，90%的酒精及 90%，100%的丙酮常规逐级脱水，以环氧树脂 618 浸透包埋，制成 0.35 μm 的半薄切片，定位，并制成 400～600？的超薄切片，经醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色，最后上 H-600 型电镜观察结果。

1.2.5 冷冻前后血小板 CD62P 及 PAC-Ⅰ的检测 根据血小板前向角散射(FSC)与侧向角散射(SSC)的特点，荧光检测经对数放大，设定阈值，即"门"，以避免 RBC，WBC，细胞碎片及机器噪声的干扰。收集 5 000～10 000 个以上血小板，选用 ADP(0.2 mmol/ L)作为诱聚剂使血小板活化，CD62P 以 CD61 作门，光散射及荧光数据存入软盘，用 CELL QUEST 2.2 版分析结果。

2 结果

2.1 冷冻保存血小板的回收率

见表 1。

表 1 30 例血小板冷冻保存前、后一周、四周计数及体外回收率($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Retrieval rates of the platelets at fresh and after 1 or 4 weeks' cryopreservation($\bar{x}\pm s$)

	Fresh platelet-products	Cryopreserred for 1 week of platelet products	Cryopreserred for 4 weeks of platelet-products
PLT(× 10^9/ L)	1 388.4±101.07	1 103.6±77.25	1 028.35±66.84
RR%		79.49±6.14	74.07±5.39

2.2 新鲜机采血小板及冷冻保存 1 周，4 周后血小板超微结构的观察

见图 1～6。图 1，图 2 为新鲜机采血小板的透射电镜照片：血小板呈星形或多角形，成群分布，有各种细胞器，无细胞核，膜完整，可见微丝，微管，糖原颗粒，线粒体等图，致密颗粒，α 颗粒丰富，开放管道系统和致密管道系统也清晰可见。图 3～6 分别为冷冻保存 1 周和 4 周血小板的透射电镜照片：冰冻血小板外形不规整或有膜损伤，大部分呈圆盘状，可见伪足和凹陷。开放管道系统和致密管道系统出现一定程度的肿胀，空泡明显增加，α 颗粒和致密颗粒明显减少。这种改变在冷冻保存四周血小板更加明显。

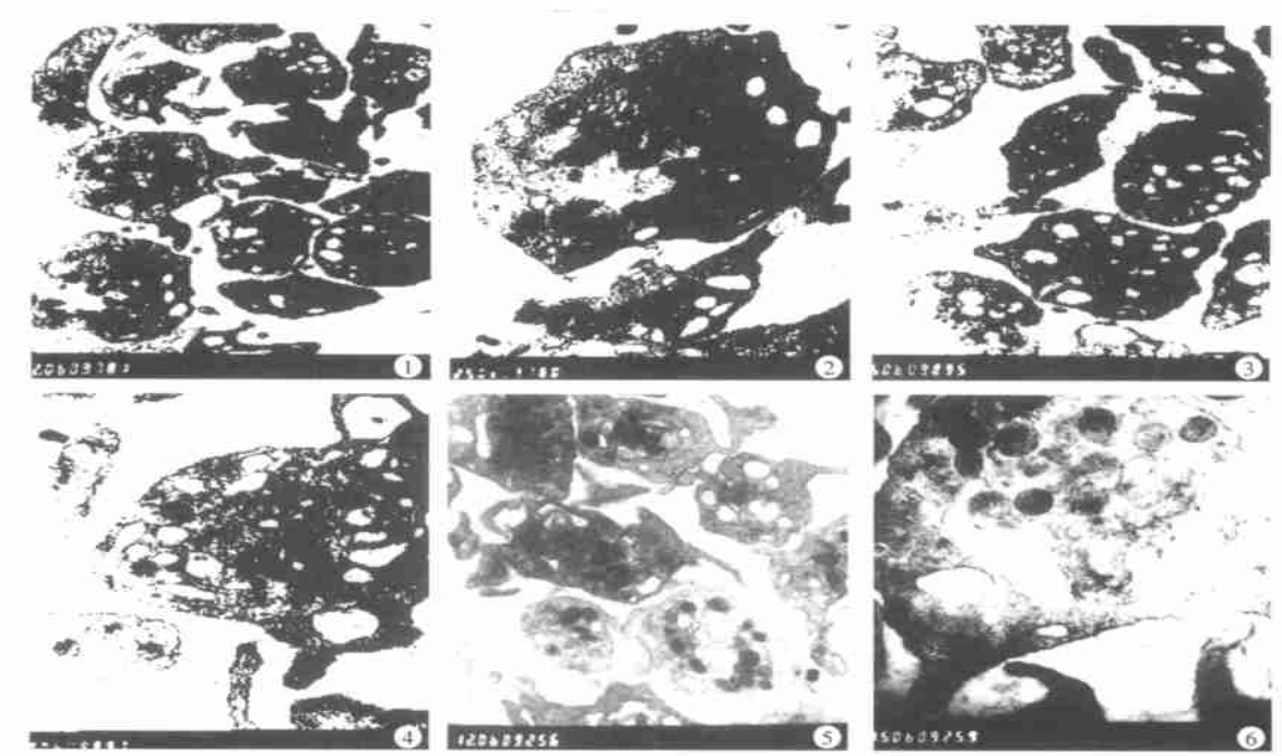


图 1 正常机采血小板透射电镜 (× 12 000)

Fig 1 Transmission electron microgram of fresh platelet-products (TEM× 12 000)

图 2 正常机采血小板透射电镜 (× 20 000)

Fig 2 Transmission electron microgram of fresh platelet-products (TEM× 20 000)

图 3 冷冻保存 1 周血小板透射电镜 (× 15 000)

Fig 3 Transmission electron microgram of platelet－products after 1 week's cryopreservation (TEM× 15 000)

图 4 冷冻保存 1 周血小板透射电镜 (× 20 000)

Fig 4 Transmission electron microgram of platelet-products after 1 week's cryopreservation (TEM× 20 000)

图 5 冷冻保存 4 周血小板透射电镜 (× 12 000)

Fig 5 Transmission electron microgram of platelet-products after 4 weeks' cryopreservation (TEM× 12 000)

图 6 冷冻保存 4 周血小板透射电镜 (× 35 000)

Fig 6 Transmission dectron microgram of platelet－products after 4 weeks' cryopreservation (TEM× 35 000)

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

2.3 新鲜及冻存 1 周、4 周机采血小板表达 CD62P 和 PAC-Ⅰ的情况

见表 2。

表 2 新鲜及冻存 1 周、4 周机采血小板 CD62P 和 PAC-Ⅰ($\%, \bar{x}\pm s$)

Tab 2 CD62P and PAC-I of the platelet samples at fresh and after 1 or 4 weeks' cryopreservation ($\%, \bar{x}\pm s$)

CD62P(%)			PAC-I(%)		
Fresh platelet products	Cryopreserved for 1 week of platelet-products	Cryopreserved for 4 weeks of platelet-products	Fresh platelet products	Cryopreserved for 1 week of platelet-products	Cryopreserved for 4 weeks of platelet-products
50.72±14.31	30.96±11.02	32.07±9.21	53.23±20.26	22.19±9.90	19.55±10.33

3 讨论

本实验结果显示以 DMSO 为保护剂－120 ℃深低温保存 1 周及 4 周机采血小板平均 RR 值分别为 79.49%±6.14%和 74.07%±5.39%, 该结果与国外报道[2]相近。血小板形态学的改变直接关系到冻融后血小板的 RR 值, 但形态学改变与血小板功能间的关系尚待进一步研究。冻存 1 周及 4 周的机采血小板在超微结构上仍然维持了较好的形态, 在外形上尽管出现伪足并向球形转变, 但尚未发现空泡样血小板以及血小板互相粘附聚集等严重激活损伤的改变, 血小板冻融后形态接近正常, 基本结构仍清晰可辨。储存颗粒仍然散布于血小板细胞内, 尚未完全进入中央区, 储存颗粒仍然可以看到完整的包膜, 线粒体完整, DMSO 及－120 ℃的深低温保存对血小板的外衣没有造成破坏。据报道[3], 低温保存血小板膜表面粘附受体结合能力明显增强, 促凝血活性明显提高, 即刻止血效果显著。活化血小板与静止血小板相比, 其质膜糖蛋白(GP)常发生显著变化, 尤其是原来存在于颗粒膜上的 GP 在质膜上大量表达, 成为活化血小板的分子标志物[4~5]血小板被活化时, 其颗粒膜与质膜或表面连接小管系统膜融合, 颗粒膜蛋白 CD62, CD63, GMP-33, LAMP-1 和 LAMP-2, PAC-Ⅰ等检测表达活化标志物在质膜上表达检测冻存前后血小板 CD62P 和 PAC-Ⅰ的改变可反映血小板活化功能的改变, 本实验结果显示 CD62P(%)和 PAC-Ⅰ(%)均有不同程度的下降趋势, 实验提示 DMSO 除对机采血小板产品有一定的低温保护作用外, 对血小板的膜有一定的损害。

多年的临床实践证明, 冷冻保存机采血小板不但极大地方便了临床, 随用随取, 并有良好的止血效果。从减少手术出血和减少各种血液成分的需求方面, 冷冻保存血小板明显优于液体保存血小板, 就止血效果而言, 前者好于后者[6]。

参考文献:

[1] 刘景汉, 王青梅, 李茨芬, 等. 血小板低温保存与临床应用研究[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23(4): 293－294.
[2] 刘玉英, 欧阳绚林, 刘景汉. 富含血小板血浆冰冻保存及保存效果的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(12): 1 455－1 456.
[3] Barnard M R, MacGregor H, Ragno G, *et al*. Fresh, liquid-Preserved, and cryopreservedn platelets: adhesive surface receptors and membrane procoagulant activity[J]. Transfusion, 1999, 39(8): 880.
[4] Andrews R K, Lopez J A. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29(1): 91.
[5] Metzeiaar M J, Sixma J J, Nieuwenhuis H K. Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies[J]. Blood Cells, 1990, 16(1): 85.
[6] Khuri S F, Healey N, MacGregor H, *et al*. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-pressrved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass[J]. J thorac Cardiovasc Surg, 1999, 117(1): 172.

(编辑 张大春)

文章编号: 1000-5404(2002)09-1069-01

个案与短篇

免疫组织化学染色方法在纤维支气管镜细胞学诊断中的应用

Application of immunohistochemical staining in cytological diagnosis by fibrobronchoscopy

刘丽梅, 柳凤轩, 段光杰 (第三军医大学附属西南医院病理研究所, 重庆 400038)

临床对疑为肺癌患者作纤维支气管镜检测活检或刷片进行病理诊断已广泛开展, 但对于刷片细胞学常规 HE 染色诊断中肺癌分型较为困难。为此, 我们应用免疫组织化学方法标记, 检测 4 种抗体在纤维支气管镜刷片细胞的表达, 旨在探讨分型意义。

1 材料和方法

1.1 材料

收集临床疑为肺癌的纤维支气管镜刷片 42 例(每例 2 张), 年龄最大 76 岁, 最小 25 岁, 平均年龄为 54.26 岁。男女之比为 3.57∶1。在做刷片的同时作纤维支气管镜组织活检, 常规 HE 染色。2 张刷片, 其中一张刷片用 4%的多聚甲醛固定 10 min, 水洗后, 行苏木精染色, 镜下观察细胞形态, 在查见癌细胞或可疑癌细胞的刷片处用 DAKO 笔画圈, 防止抗体流动而引起交叉反应, 室温干燥 10 min 后进行免疫组化染色。另一张刷片做常规 HE 染色。

1.2 试剂

特异性一抗 CK、CK-HMW、CK-LMW、NSE 及 EnVision 试剂盒 K4001 均购自丹麦 DAKO 公司。以上试剂均为即用型。

(下转 1072 页)

作者简介: 刘丽梅(1973－), 女, 四川省通江县人, 技师, 主要从事病理实验技术方面的研究。电话: (023)68754434

收稿日期: 2001-07-20; 修回日期: 2001-09-10

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