

◇ 临床医学研究 ◇

流式细胞术检测血小板脱糖方法建立及意义

汪嘉佳¹, 陶莉莉¹, 潘莹¹, 王会平¹, 晏开力¹, 张家奎¹, 倪合宇², 翟志敏¹

摘要 目的 通过运用流式细胞术检测正常人血小板在 4、25℃ 下 0、4、8、24 h 各个时间点, 血小板脱糖的两个标志物蓖麻凝集素(RCA)、鸡冠刺桐凝集素(ECL) 是否有所差异, 确立运用流式细胞术检测血小板脱糖水平的最佳条件。确立最佳条件后, 运用流式细胞术检测 20 例原发免疫性血小板减少症(ITP) 患者的血小板脱糖水平。方法 随机选取正常成年人 20 例, 运用多参数流式细胞术检测正常成年人不同温度(4、25℃) 不同时间点(0、4、8、24 h) 条件下血小板脱糖水平(RCA、ECL) 是否存在差异。确立最佳条件后, 运用流式细胞术检测 20 例 ITP 患者血小板脱糖水平。结果 4、25℃ 下 4 个时间点脱糖水平 RCA%、ECL% 均不明显。常规治疗效果较好的 ITP 患者脱糖水平 RCA%、ECL% 不明显, 但是治疗效果不好的 ITP 患者脱糖水平 RCA%、ECL% 明显高于治疗效果理想的患者。结论 流式细胞术检测血小板脱糖水平最好在标本收集后立即处理, 脱糖水平(RCA、ECL) 与 ITP 患者治疗效果有关, 即脱糖水平越低其治疗效果越好。

关键词 血小板脱糖; 原发免疫性血小板减少症; RCA; ECL; 流式细胞术

中图分类号 R 733.711

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)03-0329-04

原发免疫血小板减少症(autoimmune thrombocytopenia, ITP) 是一种由体液免疫和细胞免疫共同介导的, 以血小板破坏增加, 骨髓中巨核细胞成熟障碍和血小板生成异常为特点的一种自身免疫性疾病, 约占出血疾病的 30%^[1]。一直以来, 研究者都认为 ITP 中血小板被清除主要是依靠 FC 受体途径, 脾脏被认为是血小板清除的主要场所^[2]。但目前研究^[3-5] 表明在鼠体内, 血小板清除可以通过非 FC 受体途径, 即血小板膜上糖蛋白发生脱糖, 这些

去糖蛋白通过肝脏库普弗细胞以及肝细胞去唾液酸糖蛋白受体被清除。脱糖是指血小板膜上的糖蛋白在神经酰胺酶作用下脱糖而暴露乙酰葡萄糖胺、半乳糖等残基, 鸡冠刺桐凝集素(erythrina cristagalli lectin, ECL) 可以标记半乳糖, 蓖麻凝集素(ricinus communis agglutinin, RCA) 可以标记乙酰葡萄糖胺^[3-4]。该实验利用检测血小板在不同温度(4、25℃) 不同时间点是否脱糖及是否有区别, 建立最佳血小板脱糖检测条件。通过检测 20 例 ITP 血小板脱糖水平, 来分析血小板脱糖水平对于 ITP 的临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验对象 随机选择安徽医科大学第二附属医院体检中心正常成年者 20 例, 其中男 10 例, 女 10 例, 年龄 19~65(30±9) 岁, 按照 4、25℃ 分为 2 组, 每个组中按照时间点(0、4、8、24 h) 再次分组, 命名为正常对照组 4、25℃ 0、4、8、24 h 8 组, 运用流式细胞术检测 8 组血小板脱糖水平(RCA、ECL)。同时收集 ITP 20 例, 按照常规治疗后血小板是否恢复正常, 命名为治疗有效、治疗无效两组, 运用流式细胞术分别检测 20 例 ITP 患者血小板脱糖水平(RCA、ECL)。

1.2 主要试剂与仪器 RCA(克隆号为 FL-4081)、ECL(克隆号为 FL-4141) 均购自美国 Vector Laboratories 公司; 藻红蛋白(PE) 标记的 CD42b 单抗(克隆号为 SZ2)、异硫氰酸荧光素(FITC) 标记的山羊抗兔 IgG 单抗(克隆号为 ZF-0311) 均购自美国 Beckman-Coulter 公司; 前列环素(克隆号为 18220) 购自美国 Cayman Chemical 公司; HEPES 溶液(140 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl、0.5 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L glucose、0.5 mmol/L NaHCO₃, pH=7.4)、ACD 溶液(2.5% 柠檬酸三钠、1.5% 柠檬酸和 2% D-葡萄糖), 以及阴性对照试剂; 流式细胞仪为 FC500-MCL, 荧光激发光波长为 488 nm 和 633 nm, 分析系统软件为 CXP 系统, 购自美国 Beckman-Coulter 公司。

1.3 检测方法 ① 离心血小板及标记抗体: 首先将正常人外周血 2 ml 放置于枸橼酸钠管中并且加

2014-12-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81141104); 安徽高校省级自然科学研究重大项目(编号: KJ2014Z017)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院血液内科(安徽医科大学血液病研究中心), 合肥 230601

²加拿大多伦多大学实验医学与病理生物学系, 加拿大 M2J46A

作者简介: 汪嘉佳, 男, 硕士研究生;

翟志敏, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zzzm889@163.com

入 2 μl 前列环素(浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 946 r/min 离心 15 min, 运用微量移液器取得高浓度血小板血浆, 加入 ACD(量为 1/10 PRP) 保存血小板, 再次 1 360 r/min 离心 15 min, 制备血小板完毕后, 用 HEPES 溶液(pH = 6.5) 调制 PRP, 保证血小板浓度为 $200 \times 10^9/\text{L}$ 。取调制后血小板 50 μl , 标记单抗 CD42b (2.5 μl) 及检测脱糖试剂(ECL/RCA 2.5 μl) 孵育 20 min。后加入 HEPES 溶液(pH = 7.4) 到 500 μl 用流式细胞仪检测脱糖水平(ECL、RCA) 在此之前先同份标本进行阴性对照确定流式细胞仪界值。②在不同温度(4、25 $^{\circ}\text{C}$) 不同时间点(0、4、8、24 h) 条件下依照上述步骤检测血小板脱糖。③在上述确立最佳条件后, 运用流式细胞术分别检测 20 例患者的血小板脱糖水平(RCA、ECL)。④检测前常规对流式细胞仪进行光流路质量调控和荧光补偿, 使仪器各项指标在质量控制允许值范围。检测时首先根据前向(forward scatter, FSC) 和侧向(side scatter, SSC) 散射光信号对有核细胞群进行设门, 每份标本获取设门内血小板约 10 000 个, 检测后数据以 List-mode 文件形式保存。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以中位数(P_{25} , P_{75}) 表示, 两组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验方法分析, 两组以上采用 Kruskal-Wallis 秩和检验方法分析。

2 结果

2.1 血小板脱糖水平(RCA、ECL) 在流式细胞仪上的表达 运用阴性对照以及空白对照确立正常人临界值(图未给出)。确立好方案后, 正常对照组血小板不发生脱糖, RCA%、ECL% 均为 0。见图 1。ITP 患者血小板发生脱糖, RCA% 为 68.3%, ECL% 为 20.9%; CD42b 与 RCA 共阳性为 53.2%, CD42b 与 ECL 共阳性为 15.6%。见图 2。

2.2 正常组血小板在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下所有时间点脱糖

水平(RCA、ECL) 比较 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 各时间点血小板脱糖水平 RCA%、ECL% 值见表 1、2。运用 Kruskal-Wallis 秩和检验分别检测 4 个时间点下脱糖水平 RCA%、ECL%, 差异均有统计学意义($P = 0.032$, $P = 0.016$)。即 4 个时间点下脱糖水平 RCA、ECL 均分别有差异。进一步在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 运用 Wilcoxon 秩和检验进行时间点两两相互比较, 24 h 脱糖水平 RCA% 分别与 0 h 脱糖水平 RCA%、4 h 点脱糖水平 RCA%、8 h 点脱糖水平 RCA% 相互比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而其他相互比较时, 差异均无统计学意义。24 h 点脱糖水平 ECL% 分别与 0 h 点 ECL%、4 h 点 ECL%、8 h 点 ECL% 比较时, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而其他两两比较, 差异均无统计学意义。

2.3 正常组血小板在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下所有时间点脱糖水平(RCA、ECL) 比较 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 各时间点血小板脱糖水平 RCA%、ECL% 值见表 1、2。运用 Kruskal-Wallis 秩和检验检测, 差异均无统计学意义($P = 0.301$, $P = 0.632$)。即 4 个时间点下脱糖水平 RCA、ECL 均无差异。进一步在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 运用 Wilcoxon 秩和检验分别进行血小板脱糖水平 RCA%、ECL% 4 个时间点两两相互比较, 差异均无统计学意义。

表 1 4、25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 4 个时间点 RCA% [P_{50} (P_{25} , P_{75})]

时间(h)	4 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
0	0.1(0.1 0.3)	0.2(0.1 0.3)
4	0.3(0.1 0.7)	0.1(0.0 0.2)
8	0.1(0.1 0.6)	0.1(0.0 0.4)
24	0.5(0.1 1.2)	0.2(0.0 0.6)

表 2 4、25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 4 个时间点 ECL% [P_{50} (P_{25} , P_{75})]

时间(h)	4 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
0	0.0(0.0 0.1)	0.0(0.0 0.1)
4	0.1(0.0 0.2)	0.0(0.0 0.2)
8	0.1(0.0 0.2)	0.0(0.0 0.5)
24	0.3(0.0 0.7)	0.1(0.0 0.5)

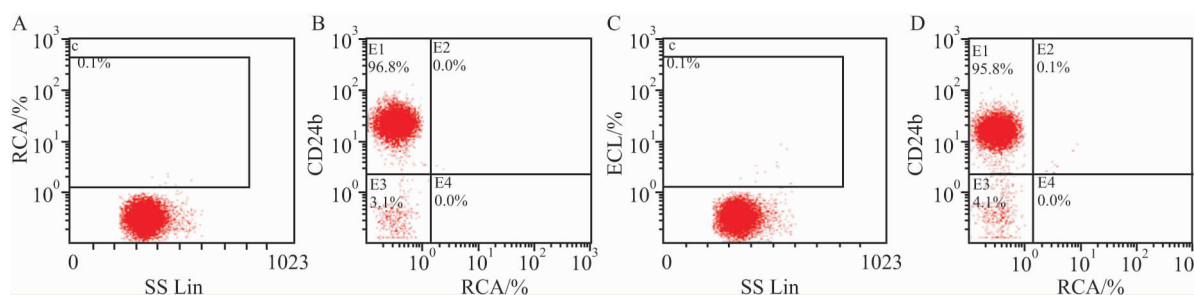


图 1 正常对照组血小板脱糖表达

A: 正常对照组 RCA%; B: 正常对照组 RCA% 与 CD42b 共阳性; C: 正常对照组 ECL%; D: 正常对照组 ECL% 与 CD42b 共阳性

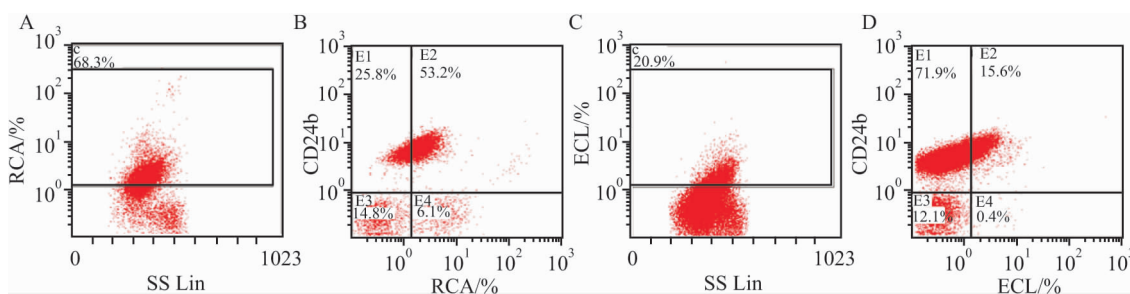


图2 ITP患者治疗无效组脱糖表达

A: ITP患者治疗无效组 RCA %; B: ITP患者治疗无效组 RCA % 与 CD24b 共阳性; C: ITP患者治疗无效组 ECL%; D: ITP患者治疗无效组 ECL % 与 CD24b 共阳性

2.4 正常组血小板不同温度、相同时间点下脱糖水平(RCA、ECL)比较 在不同温度下,运用 Wilcoxon 秩和检验检测相同时间点脱糖水平(RCA/ECL)是否存在差异,首先分析 RCA 4℃条件下4 h 与 25℃条件下4 h 相互比较,差异有统计学意义($P=0.005$)。4℃条件下8 h 与 25℃条件下8 h 相互比较,差异有统计学意义($P=0.046$)。4℃条件下24 h 与 25℃条件下24 h 相互比较,差异无统计学意义($P=0.080$)。分析 ECL 4℃条件下4 h 与 25℃条件下4 h 相互比较,4℃条件下8 h 与 25℃条件下8 h 相互比较,4℃条件下24 h 与 25℃条件下24 h 相互比较,差异均无统计学意义。

2.5 运用流式细胞术检测 ITP 患者血小板脱糖 将 20 例 ITP 患者运用流式细胞术检测血小板脱糖水平,见表 3。其中常规治疗后,治疗有效组及治疗无效组的血小板脱糖水平见表 4。运用 Wilcoxon

表4 ITP患者血小板脱糖水平 [P_{50} (P_{25} P_{75})]

项目	常规治疗有效	常规治疗无效
RCA%	0.6(0.3, 1.3)	15.3(8.9, 32.8)
ECL%	0.6(0.2, 1.7)	1.8(1.1, 6.3)

秩和检验分析上述前后两组 RCA%, 差异有统计学意义($P=0.001$)。上述前后两组 ECL% 相互比较, 差异有统计学意义($P=0.023$)。

3 讨论

血小板脱糖是指血小板膜表面上的糖蛋白在唾液酸酶作用下,暴露残基。血小板脱糖是一种有别于既往依靠 FC 受体导致血小板破坏的新理论。已经在哺乳动物体内发现 4 种导致糖蛋白脱糖的神经酰胺酶,且 4 种神经酰胺酶中起主导作用的是 NEU-1,一般这些酶通常位于血小板的内部。当冷藏保存时能过“翻转”作用,表达于血小板表面^[4]。NEU-1 主要作用于糖蛋白 GPIb 复合体,脱糖后的糖蛋白残基在肝脏细胞中被破坏^[5]。这区别于以往的血小板在脾脏中破坏的理论。

为了使得检测血小板脱糖水平误差降到最低,本实验主要研究最佳检测血小板脱糖的实验条件。之所以选择 4℃和 25℃,主要是因为实验标本大部分保存在 2 种温度下。通过本实验,该实验表明 4℃时候血小板的脱糖水平(RCA、ECL)在 4 个时间点条件下,存在差异,渐近增高。在 25℃时,血小板脱糖水平(RCA、ECL)在 4 个时间点条件下无差异。在 4℃条件下 4 个时间点之间进一步相互两两比较,该实验表明血小板标本立即检测比其他 3 个时间点检测时间更适宜,本实验 4℃条件下 4 个时间点之间相互两两比较,总体趋势随着时间推移脱糖水平增高。在 25℃条件下,虽然脱糖水平(RCA、ECL)在 4 种时间点下均无差异,但是在各个时间点离心悬浮血小板上机检测,可以表明随着时间的推移血小板数目逐步减少,并且更容易在血小板中混

表3 20例 ITP 患者脱糖水平检测

编号	来院时血小板 ($\times 10^9/L$)	治疗经过	治疗后 血小板($\times 10^9/L$)	RCA%	ECL%
1	7	激素	107	2.0	1.8
2	8	激素	188	1.3	0.9
3	20	激素	138	0.3	3.2
4	17	激素	155	0.3	0.1
5	14	激素	208	0.0	0.0
6	19	激素,丙球蛋白	103	0.2	0.2
7	4	激素,丙球蛋白	103	0.6	0.9
8	41	激素	100	0.9	1.6
9	5	激素,丙球蛋白	205	0.6	0.3
10	4	激素	136	1.3	0.3
11	4	激素,丙球蛋白	18	74.8	20.8
12	7	激素	60	19.3	2.0
13	19	激素	13	6.4	1.7
14	4	激素,丙球蛋白	5	23.4	1.2
15	50	激素	47	15.8	1.7
16	15	激素,丙球蛋白	21	60.8	14.2
17	44	激素,丙球蛋白	30	11.5	3.7
18	50	激素	54	3.6	0.7
19	59	激素	50	9.7	0.3
20	7	激素,丙球蛋白	39	14.8	1.9

有红细胞干扰检测。所以该实验检测血小板脱糖应在取得标本后立即检测,标本保存干扰血小板的脱糖水平检测。

在检测 ITP 患者血小板脱糖水平(RCA/ECL)时,本实验可检测到 ITP 患者的脱糖水平呈阳性,本实验运用 CD42b 标记血小板膜上的糖蛋白—GPIb α ,但是 CD42b 与 RCA/ECL 共阳性只占 ITP 患者全部脱糖表达的一部分,RCA/ECL 单阳性占其余部分。所以本实验表明,区别如小鼠体内血小板脱糖(主要针对糖蛋白 GPIb α),人体内血小板膜上糖蛋白脱糖不是主要针对 GPIb α ,膜上其它糖蛋白在脱糖过程中也起着主要作用。同时检测 20 例 ITP 患者,比较治疗过程、疗效与脱糖水平之间是否有关系,可以证实脱糖水平越低,其疗效越好,常规治疗就能使得血小板恢复正常。所以本实验表明血小板脱糖水平的检测可以用来提示 ITP 患者的治疗效果,为临床医师最初选择治疗方案提供参考^[7]。同时血小板脱糖是一种有别于既往依靠 FC 受体导致血小板破坏的新理论,可以为今后研制治疗难治性 ITP 患者的药物带来新的思路。本实验将继续研究人体内血小板膜上其余糖蛋白参与血小板脱糖的过程,同时检测其他血小板减少的患者是否也会出现

血小板脱糖。

参考文献

- [1] Watson Williams E J, Macpherson A I, Davidson S. The treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura: a review of ninety-three cases [J]. *Lancet*, 1958, 2(7040): 221-6.
- [2] Hoffmeister K M, Felbinger T W, Falet H, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets [J]. *Cell*, 2003, 112(1): 87-97.
- [3] Hoffmeister K M, Josefsson E C, Isaac N A, et al. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets [J]. *Science*, 2003, 301(5639): 1531-4.
- [4] Jansen A J, Josefsson E C, Rumjantseva V, et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates a metalloproteinase-mediated cleavage in mice [J]. *Blood*, 2012, 119(5): 1263-73.
- [5] Kaplan C. Toddy for chilled platelets? [J]. *Blood* 2012, 119(5): 1100-2.
- [6] Li J, van der Wal D E, Zhu L, et al. Fc-independent phagocytosis: Implications for IVIG and other therapies in immune-mediated thrombocytopenia [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2013, 13(1): 50-8.
- [7] 秦平, 侯明. 2012 版成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识解读 [J]. *临床血液学杂志* 2013, 26(3): 151-5.

The test method about desialylation of platelet to establish and its significance

Wang Jiajia, Tao Lili, Pan Ying, et al

(Dept of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Bio-medical Research Center of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To detect desialylation of platelets in normal and research influence about ricinus communis agglutinin(RCA) and erythrina cristagalli lectin(ECL) which are two factors of desialylation of platelets in different time periods(0, 4, 8, 24 h) and different temperatures(4, 25 °C), thus establish the test method which can detect desialylation of platelets in autoimmune thrombocytopenia(ITP). **Methods** 20 normal subjects were selected and researched for the differences about RCA and ECL which were two factors of desialylation of platelets in different time periods(0, 4, 8, 24 h) and different temperatures(4, 25 °C) with flow cytometry. Under this condition, the best test method that could detect desialylation of platelets in 20 cases of ITP could be established in the end. **Results** The results showed that the median of the desialylation of platelets(RCA% and ECL%) was not significant in 4 periods under 4, 25 °C, respectively. The results showed that the median of the desialylation of platelets(RCA% and ECL%) in effective responses to conventional therapy(corticosteroids, IVIG etc) was lower than the group which were inferior responses to conventional therapy. **Conclusion** The test method about desialylation of platelets in ITP should be better to detect in one day. The desialylation of platelets(RCA, ECL) is interrelated with treatment of ITP. And the lower desialylation prompts better outcome in ITP which is effective response to conventional therapy. **Key words** platelet desialylation; autoimmune thrombocytopenia; RCA; ECL; flow cytometry