

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0512-03

流式细胞术检测血小板活化的影响因素分析*

黎庆梅¹, 韦建瑞^{2△}, 洪介民¹, 陈辉¹, 郭壮波², 李彪²

(暨南大学第四附属医院,广州市红十字会医院¹中心实验室,²心血管内科,广东广州 510220)

[摘要] 目的:探讨流式细胞术(FCM)检测血小板活化的影响因素。方法:采集6名志愿者静脉血,枸橼酸钠为抗凝剂,室温放置不同时间后进行三色免疫荧光标记,FCM检测血小板早期活化标志物纤维蛋白原受体(Fib-R,即PAC-1)和晚期活化标志物P选择素(CD62P)的变化。结果:血小板活化标志物PAC-1和CD62P随着放置时间的延长而表达增加($P < 0.05$)。抽血后10 min和30 min PAC-1和CD62P测定值分别相差2.7%和3.5%。且抽血后在不同的活化水平下重复检测多次,结果重复性好,其变异系数(CV) < 5%。结论:在室温,枸橼酸钠抗凝条件下,放置时间对血小板活化标志物PAC-1和CD62P的检测有较大影响,宜在30 min内对采集血液免疫荧光标记后进行流式细胞仪检测。

[关键词] 流式细胞术;血小板;血小板糖蛋白GP II b-III a复合物;CD62P

[中图分类号] R331 **[文献标识码]** A

Assessment of affecting factors in measuring activating platelets with the method of flow cytometry

LI Qing - mei¹, WEI Jian - rui², HONG Jie - min¹, CHEN Hui¹, GUO Zhuang - bo², LI Biao²

(¹Department of Central Laboratory, ²Department of Cardiology, The Fourth Affiliated Hospital of Jinan University/Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, China. E-mail: jianruiw@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the affecting factors of detecting platelet activation by flow cytometry (FCM). **METHODS:** Using decoagulant of natrium citricum, anticoagulated peripheral venous bloods from 6 healthy donors were labeled with the method of three-colour immunofluorescence assay. Platelet activation markers fibrinogen receptor (Fib-R, PAC-1) and P-selectin (CD62P) were measured. In the same time, the reproducibility of FCM was assessed. **RESULTS:** The platelet activation markers PAC-1 and CD62P at each time point showed significant difference ($P < 0.05$). The ratio was increased with time extending. The positive ratio of PAC-1 and CD62P immediately measured (within 10 min) was 2.7% and 3.5% less than those at time point of 30 min. The results were measured several times under different activation levels. The coefficient of variation was less than 5%. **CONCLUSION:** In room temperature and with decoagulant of natrium citricum, if the measurements of PAC-1 and CD62P are finished within 30 min after sampling, good reproducibility should be achieved.

[KEY WORDS] Flow cytometry; Blood platelets; Platelet glycoprotein GP II b-III a complex; CD62P

流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析血小板活化在血小板功能、出血性疾病、血栓性疾病的诊断与治疗、发病机制、抗血小板活化药物的研究中有广泛的应用价值。亦有学者观察糖尿病患者经皮冠状动脉介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)后的血小板活化水平的变化^[1]。血小板体外容易被活化,影响测定结果的准确性。本研究拟探讨流式细胞术检测血小板活化的影响因素,以期建立简便、可靠并适用于临床的检测血小板活化的方法。

材 料 和 方 法

1 仪器和试剂

1.1 仪器 BD公司FACSCalibur流式细胞仪。

1.2 试剂 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记纤维蛋白原受体(fibrinogen receptor, PAC-1);藻红蛋白(R-phycoerythrin, PE)标记P选择素(P-selectin, CD62P);叶绿素蛋白(peridinin chlorophyll protein, PerCP)标记血小板膜糖蛋白

[收稿日期] 2008-03-18 [修回日期] 2008-09-19

* [基金项目] 广东省科技厅科研基金资助项目(No. 53064);广州市医药卫生科技重点资助项目(No. 2004Z006)

△通讯作者 Tel: 020-34403962; E-mail: jianruiw@163.com

CD61;同型对照 Mouse IgM 和 Mouse IgG1 PE。以上单抗均购自 BD 公司。多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 购自广州试剂厂;二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 购自 Sigma。

2 方法

2.1 标本采集 选取无心血管疾病,一月内未接受过包括阿司匹林在内的任何药物治疗的健康志愿者 6 名,其中男性 3 名,女性 3 名,年龄 24-32 岁。采集健康志愿者空腹静脉血,用 106 mmol/L 枸橼酸钠真空抗凝管抗凝,血液与抗凝剂比例为 9:1。

2.2 方法

① 研究放置时间对血小板活化的影响 将各管血分别放置 5 min、10 min、30 min、60 min 和 180 min,三色荧光标记血小板后流式细胞仪检测 PAC-1 和 CD62P 表达百分率。

② 研究流式细胞术在不同血小板活化水平下检测结果的重复性 任取 1 支抗凝血,三色免疫荧光标记 10 次,分别检测 10 次免疫荧光标记后 PAC-1 和 CD62P 表达百分率。任取 1 支抗凝血与 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ADP 以 9:1 比例混合 5 min 后,三色免疫荧光标记 10 次,分别检测 10 次免疫荧光标记后 PAC-1 和 CD62P 表达百分率。

③ 流式细胞术三色免疫荧光标记方法 每个样本编号后,对照管中加入小鼠 IgM、mouse IgG1 PE、CD61 PerCP 各 20 μL 。在试验管中加入 PAC-1 FITC、CD62P PE 和 CD61 PerCP 三种抗体各 20 μL 。在对照管和试验管中各加入未激活或激活的血标本(抗凝血与 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ADP 以 9:1 比例混合 5 min) 5 μL 后轻轻混匀,室温暗处孵育 15 min。分别向各管加入 1 mL 预冷的 PFA 固定液 (2-8 $^{\circ}\text{C}$),充分混匀。2-8 $^{\circ}\text{C}$ 阴暗处放置 30 min 后立即进行流式细胞仪检测。

④ 流式细胞仪分析 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪检测,CellQuest 软件分析数据。在 CD61 PerCP 和侧向散射角 (side scatter, SSC) 双参数散点图中设门找血小板群。以 PAC-1 FITC 和 CD62P PE 作双参数散点图分析 PAC-1 和 CD62P 阳性百分率。

3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件分析。PAC-1 和 CD62P 阳性百分率以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 放置时间对血小板活化标志物 PAC-1 和 CD62P 表达的影响

将各管血分别放置 5 min、10 min、30 min、60 min

和 180 min 后三色免疫荧光标记血小板进行检测,结果发现随着放置时间的延长,PAC-1 和 CD62P 的表达百分率均有不同程度的增加。放置 60 min 后 PAC-1 和 CD62P 的表达百分率分别为 (5.40 ± 1.75)% 和 (4.60 ± 1.25)%。放置 180 min 后 PAC-1 和 CD62P 的表达百分率分别为 (10.12 ± 2.62)% 和 (9.50 ± 2.18)%,均有显著差异 ($P < 0.05$),见图 1-3。

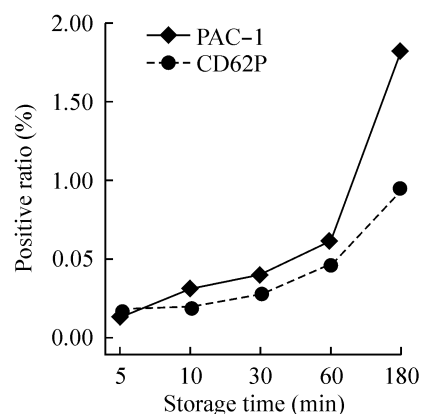


Fig 1 The change of platelet activating markers PAC-1 and CD62P with time extending.

图 1 随着放置时间的延长血小板活化标志物 PAC-1 和 CD62P 表达百分率的变化

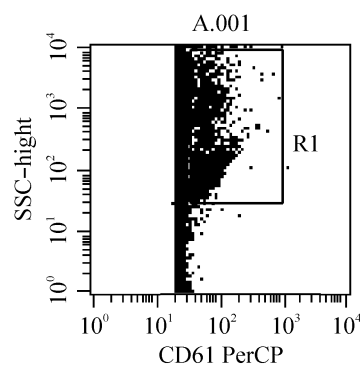


Fig 2 CD61 vs SSC double parameter dot plot showed platelet in the gate.

图 2 CD61 vs SSC 双参数设门分析血小板

2 在不同的血小板活化水平下进行重复性试验的结果

采血后任取 1 支抗凝血(低活化水平),10 min 内立即同时免疫荧光标记血小板 10 次,流式细胞仪检测。结果显示,PAC-1 和 CD62P 表达百分率的变异系数 (coefficient of variation, CV) 均 $< 5\%$ 。抗凝血与 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ADP 以 9:1 比例混合 5 min 后(高活化水平),10 min 内同时免疫荧光标记血小板 10 次,流式细胞仪检测。结果 PAC-1 和 CD62P 表达百分率的 CV 均 $< 10\%$ 。

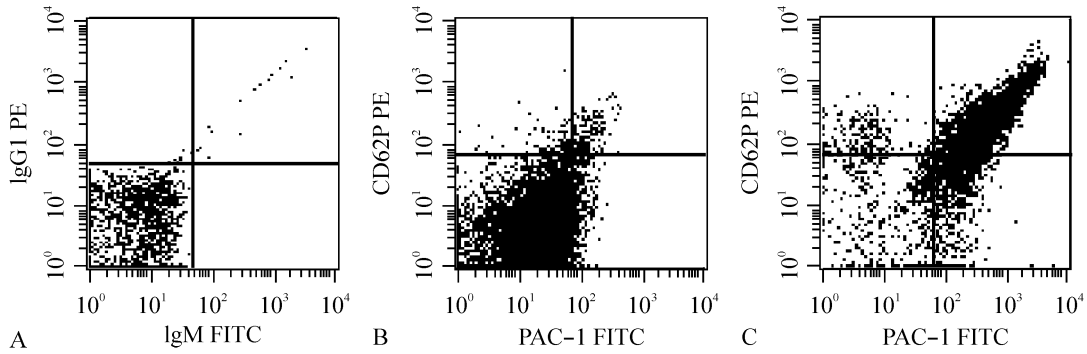


Fig 3 The expression of PAC - 1 and CD62P. A: negative control; B: low level; C: high level.

图3 不同活化水平下 PAC - 1 和 CD62P 表达百分率

讨 论

血小板活化在动脉血栓的形成中起着关键作用。血液中循环活化血小板增高可作为动脉血管病,如缺血性卒中、心肌梗死、周围血管病等疾病有局部血栓形成的标志^[2]。

在血小板活化的早期,血小板内释放的和表面的膜糖蛋白 II b/III a (glucoprotein II b/III a, GP II b/III a)复合物构象发生变化,暴露纤维蛋白原受体,才可与多种黏附蛋白(纤维蛋白原等)结合而发挥生理功能^[3]。PAC - 1 是抗人活化血小板的单克隆抗体,只能与活化的血小板 GP II b/III a 复合物结合,能反映血小板的早期活化。CD62P 又名血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白或 P - 选择素,是选择素家族中最的一种,是一种相当分子质量为 140 kD 的膜糖蛋白颗粒,定位于血小板内的 α 颗粒和内皮细胞棒管状 (Weible - Palade) 小体内。血小板活化时,血小板 α 颗粒膜与质膜融合,CD62P 暴露于血小板质膜表面,成为血小板活化的 1 个特征性指标。在体外试验中,CD62P 增加并不会随着时间的延长而发生逆转,因此 CD62P 被认为是血小板活化的“金标准”^[4]。

目前检测血小板功能的方法主要有血小板聚集仪检测血小板聚集、检测出血时间,酶联免疫吸附试验 (enzyme - linked immuno - sorbent assay, ELISA) 法检测血栓素 B2 (thromboxane, TXB2) 等,各有优缺点^[5]。张文超等^[6]用流式细胞术检测阿司匹林对冠心病患者血小板活化标志物的影响,扩展了 FCM 检测血小板活化的应用。FCM 检测全血中血小板更接近生理状态且操作简便,减少由于操作造成的血小板状态改变,是检测血小板活化状态很好的方法^[7]。

在本研究中,将各管血分别放置 5 min、10 min、30 min、60 min 和 180 min 后,三色免疫荧光标记血小板进行流式细胞仪检测。结果发现,随着放置时间的延长,PAC - 1 和 CD62P 的表达均有不同程度

的增加,且放置 60 min 和 180 min 后表达百分率显著增加 ($P < 0.05$)。因此,抽血后 30 min 内检测血小板 PAC - 1 和 CD62P 表达的百分率能反映体内血小板活化状态。为了实现操作的标准化,在今后的试验中均要求在 20 min 内染色即可最大限度地避免血小板的体外活化。在血小板不同活化水平下进行重复性试验显示,在血小板低活化状态下重复性越好。由于生理状态下或服用抗血小板药物后,血小板即处于较低或中度活化水平,因此该研究的重复性能满足试验要求。本研究认为可用流式细胞术检测血小板活化标志物 PAC - 1、CD62P 表达的百分率,从而了解患者血小板的活化状态及对抗血小板治疗的效果进行监测。

[参 考 文 献]

- [1] 张 斌, 冯 莹. 糖尿病患者冠状动脉血管成形术后血小板活性的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16 (9): 838 - 851.
- [2] Tran HA, Anand SS, Hankey CJ, et al. Aspirin resistance[J]. Thromb Res, 2007, 120(3): 337 - 346.
- [3] Newman PJ. Platelet GPIIb/IIIa: molecular variations and alloantigen[J]. Thromb Haemost, 1991, 66(1): 111 - 118.
- [4] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, et al. Circulating monocyte - platelet are a more sensitive marker of *in vivo* platelet activation than platelet surface P - selectin. Studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2001, 10(4): 1533 - 1537.
- [5] 阮淑萍. 阿司匹林抵抗[J]. 江西医药, 2007, 4(1): 85 - 86.
- [6] 张文超, 韦建瑞, 蒋作锋, 等. 流式细胞术检测阿司匹林对冠心病患者血小板活化标志物的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(2): 164 - 167.
- [7] 王建中. 临床流式细胞分析[M]. 第 1 版. 上海: 科学技术出版社, 2005. 401 - 404.