

白细胞过滤对手工浓缩血小板的质量和体外功能的影响

王丹¹ 王敏¹ 杨鹏² 完晓菊¹ 潘健¹ 张循善²

[摘要] **目的:**研究经血小板过滤器去除手工浓缩血小板中的白细胞后对血小板的质量及体外功能的影响。**方法:**从新鲜全血中制备手工浓缩血小板,用床边型白细胞过滤输血管器滤除白细胞,分别用细胞计数、离心、血小板质量检测技术及流式细胞术等方法,测定过滤前后血小板计数、白细胞计数、血小板压积、平均血小板体积、大血小板比率、血小板分布宽度、CD62p 表达率、血小板黏附、血小板聚集和低渗休克等指标,并观察临床输注反应。**结果:**经床边型血小板过滤器除去白细胞后,浓缩血小板回收率为 90.32%,白细胞去除率为 98.21%。除血小板计数和白细胞计数有明显下降外,血小板压积、平均血小板体积、大血小板比率、血小板分布宽度、血小板黏附和聚集、低渗休克反应和 CD62p 表达率均无统计学意义。临床血小板输注不良反应发生率明显降低。**结论:**浓缩手工血小板去除白细胞,过滤对血小板功能无明显影响,血小板回收率及剩余白细胞数符合相关要求,可以明显降低临床输注反应的发生。

[关键词] 浓缩血小板;白细胞滤除;血小板质量;血小板功能;体外

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.002

[中图分类号] R558 **[文献标志码]** A

Effect of leukocyte filtration on in vitro function of platelet concentrates

WANG Dan¹ WANG Min¹ YANG Peng² WAN Xiaojun¹ PAN Jian¹ ZHANG Xunshan²

(¹Department of Blood Transfusion, Anhui Provincial Hospital, Hefei, 230001, China; ²Department of Blood Transfusion, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University)

Corresponding author: ZHANG Xunshan, E-mail: zxs511@sina.com

Abstract Objective: To explore the effect of leukocyte filtration on in vitro function of platelet concentrates. **Method:** Platelet concentrates was prepared from fresh whole blood, then filtered with bedside filters. The counted numbers of platelet and leukocyte, PCT, MPV, P-LCR, PDW, CD62p expression, platelet aggregation, platelet adhesion and hypotonic shock response were detected before and after filtering. **Result:** After filtering leukocytes, the platelet recovery and leukocyte removal rate was 90.32% and 98.21%, respectively. Besides the WBC and PLT counts were declined obviously, PCT, MPV and PDW, P-LCR shock response, platelet adhesion, aggregation and hypotonic shock response and CD62p expression rate had no statistical significance. Transfusion reaction significantly decreased after filtering leukocytes. **Conclusion:** Leukocyte filtration would do not affect the platelet function in vitro. The platelet recovery and leukocyte removal rate were in accordance with the requirements. Leukocyte removal could significantly reduce the incidence of transfusion reactions.

Key words platelet concentrates; leukocyte filter; platelet quality; platelet function; in vitro

对于血小板数量减少或功能严重受损的患者,血小板输注在预防和治疗出血中起重要作用。临床上应用的血小板主要有 2 种:单采血小板和手工制备的浓缩血小板(platelet concentrates, PCs)。单采血小板用血细胞分离机采集自一个献血者,具有白细胞数量少的优点,但采集 1 个治疗量需 1~2 h,因此限制了许多无偿献血者捐献血小板。随着血小板临床使用的增加,目前各血站单采血小板难以满足临床需求,PCs 在临床发挥着越来越重要的作用。PCs 是从全血中用离心机分离得到,白细胞含量较高,输注容易引起的非溶血性发热性输血反

应(febrile nonhemolytic transfusion reaction, FNHTR)和人类白细胞抗原(HLA)同种免疫等输血不良反应^[1-2]。我们增加了床边过滤环节来减少 PCs 中白细胞,期待减少这些不良反应的发生,考察了过滤白细胞对 PCs 体外质量指标的影响,统计了进行白细胞去除前后输注 PCs 的 FNHTR 发生率,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 血液来源

据 GB18467-2001《献血者健康检查要求》标准^[3],从我市中心血站参加献血的人群进行体检,并经抗-HCV、HBsAg、抗-HIV、抗-TP 以及转氨酶(ALT)检测合格,随机选取献血前 72 h 内未服用过阿司匹林类药物献血者捐献的全血。

¹安徽省立医院输血科(合肥,230001)

²安徽医科大学第一附属医院输血科

通信作者:张循善, E-mail: zxs511@sina.com

回顾性分析了2011—2013年我院所有输注539人次PCs患者FNHR的数据,将未进行白细胞滤除设为未过滤组,进行白细胞滤除的设为过滤组。FNHTR诊断标准参照文献〔4〕判定,即输血前无发热,输血中或输血后24 h内体温高于38℃且升高大于1℃,可伴有寒战、出汗、皮肤潮红等症状,不能为患者病情所解释,可判定为FNHTR。

1.2 设备与试剂

大型离心机(J6-HC,美国Beckman公司);自动血细胞计数仪(XE-2100,日本Sysmex公司);无菌导管接口机(GZR-II,苏州医用仪器厂);美国Hausser血细胞计数板(Nageotte,美国Hausser公司);血小板聚集仪(APACT2型,宁波兰波美生实业有限公司);流式细胞仪(XL,美国Beckman-coulter公司);血小板聚集反应诱导剂ADP(美国sigma公司);白细胞过滤输血器(FTS-PL,南京双威生物公司);荧光标记抗血小板表面糖蛋白单克隆抗体(美国BD公司):CD62p-PE, C1361-Percep, PAC-1-FITC, RGDS(PAC-1阻断剂),含1%多聚甲醛及0.1%叠氮钠的PBS(pH值为7.2)。

1.3 PCs制备与白细胞过滤

符合国家标准〔3〕的健康献血者,在6 min内采集全血400 ml/人,在4~6 h内于22℃条件下以1 120 g×6 min离心,分离出上层富血小板(PRP)再以4 480 g×6 min离心获得2 U PCs,保留40 ml血浆。PCs在患者输注时使用床边过滤输血器进行过滤,过滤前后分别留样进行检测。

1.4 血小板计数、血小板压积、平均血小板体积、大血小板比率和血小板分布宽度

留取样本用血细胞计数仪进行检测;PCs浓度超出血细胞计数仪测量范围,用稀释液把样本稀释5倍后进行检测。

1.5 Nageotte计数法测定白细胞残余量

取洗涤样本100 μl,加入900 μl白细胞计数板中混匀、静置5 min后,吸取混合液滴入Nageotte计数板中,室温沉降15 min后,在显微镜下计数1个满格子(5 μl)上的白细胞,样本按1:10稀释,计算结果为每格中WBCs/μl,计算公式:白细胞数/μl=白细胞实测值×稀释倍数×容量/100 μl。

1.6 血小板黏附试验(PAdT)采用玻珠柱法

分别计数黏附前及黏附后血小板数。黏附功能(%)=(黏附前血小板数-黏附后血小板数)/黏附前血小板数×100%。

1.7 聚集实验

用血小板聚集仪分别测定2组血小板对诱导剂ADP(浓度为20 μm/L)的最大聚集率,调整血小板计数为 $250 \times 10^9/L$,加入25 μl诱导剂ADP,记录最大聚集率。

1.8 血小板低渗休克反应(hypotonic shock response, HSR)

相对变化率测定用分光光度计测定血小板在610 nm处的吸光度。HSR(%)=(样品A值-样品最小A值)/(对照A值-对照最小A值)×100%。

1.9 血小板CD62p的检测

对照管和测定管并分别加入同型对照mouse IgG1 FITC、IgG1 PE,测定管再加入CD61-FITC、CD62p-PE,加入处理好的样本,混匀避光15~20 min;1%多聚甲醛4℃固定血小板,用流式细胞仪测定CD62p阳性表达率。

2 结果

2.1 PCs过滤前后血小板和白细胞计数比较

PCs经白细胞滤器过滤以后,过滤前血小板计数由 $(5.23 \pm 0.77) \times 10^{10}/袋$,过滤后血小板计数为 $(4.65 \pm 0.64) \times 10^{10}/袋$,说明白细胞去除造成血小板一定损失($P < 0.05$),但平均回收率为90.32%,以上,在可接受范围;白细胞过滤后,PCs中白细胞污染量显著减少,白细平均去除率达到98.21%以上,见表1。

表1 PCs过滤前后血小板和白细胞计数比较

	$\bar{x} \pm s$	
	过滤前	过滤后
血小板/($\times 10^{10} \cdot 袋^{-1}$)	5.23 ± 0.77	4.65 ± 0.64
白细胞/($\times 10^6 \cdot 袋^{-1}$)	239.46 ± 67.73	0.30 ± 0.02

2.2 PCs过滤前后血小板形态学指标比较

血小板压积、平均血小板体积、大血小板比率和血小板分布宽度等形态学指标在过滤前后差异无统计学意义(见表2)。以上说明白细胞过滤对血小板的形态无显著影响。

表2 PCs过滤前后血小板形态学指标比较 $\bar{x} \pm s$

	过滤前	过滤后
血小板压积	0.264 ± 0.050	0.248 ± 0.052
平均血小板体积/fl	10.580 ± 0.045	10.630 ± 0.052
大血小板比例/%	27.320 ± 5.630	22.320 ± 3.210
血小板分布宽度/fl	12.320 ± 1.540	12.260 ± 1.430

2.3 2组血小板体外功能指标比较

过滤前CD62p表达率为 $(16.47 \pm 7.54)\%$,过滤后检测值为 $(17.26 \pm 7.43)\%$,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明经过滤除白细胞过程血小板未被激活;过滤前后血小板黏附率和最大聚集率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表3。

2.4 PCs过滤前后FNHTR发生率比较

2011—2013年我院共539人次输注5 390 U

PCs。数据比较发现经过白细胞滤除后 FNHTR 的反应率明显下降 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 3 PCs 过滤前后血小板体外功能指标比较

	$\bar{x} \pm s$	
	过滤前	过滤后
黏附率/%	62.18 ± 8.64	58.63 ± 7.95
最大聚集率/%	37.32 ± 6.63	48.37 ± 7.21
血小板低渗性休克/%	88.63 ± 11.23	89.00 ± 10.16
CD62p 表达率/%	16.47 ± 7.54	17.26 ± 7.43

表 4 白细胞滤除前后 FNHTR 发生率比较

分组	输注 PCs 数量/U	例数	发生率/%
未过滤组	2 860	44	1.54
过滤组	2 530	16	0.63

3 讨论

FNHTR 是血小板输注最常见的不良反应, 该反应是由于血小板制剂中含有白细胞引起。血制品中的白细胞不仅能引起 FNHTR, 同时也会增加嗜白细胞病原体的传播的风险、增加 TA-GVHD 的风险^[5]。去除血小板中的白细胞是预防和减少 FNHTR 的最直接和有效的措施, 对输血安全和临床治疗均有重要的作用。

研究表明, 1 次输入血液或者血液成分中的白细胞 $< 5 \times 10^6$ 就能减少和预防白细胞引起的 FNHTR、HLA 同种免疫和巨细胞病毒传播风险^[3]。目前最常用、最有效的清除白细胞的方法为过滤法, 其特点是白细胞清除率高、残留少、血小板回收率高。我国医药行业标准规定, 血小板回收率 $\geq 85\%$, 白细胞残留量 $< 2.5 \times 10^6$ 。本研究经白细胞过滤后 WBC $(0.30 \pm 0.02) \times 10^6$ / 袋, 即使一次性输入 10 U 的治疗量, 患者输入的白细胞约为 1.5×10^6 均符合相应的质量标准, 远高于预防 FNHTR 的要求。表明 PCs 经过滤除白细胞后, 既能有效去除其中白细胞, 又能使血小板回收率维持在高水平。进行白细胞过滤前输注 PCs 的 FNHTR 的反应率为 1.54%, 使用白细胞滤器后 FNHTR 的发生率大幅度减少为 0.63%, 说明 PCs 经过床边白细胞滤除后有效减少了 FNHTR 的发生。

输注入患者体内血小板回收率和体内存活期可以很好地反应血小板质量指标。但实验需要使用放射性标志物标志血小板, 实验成本昂贵, 程序复杂, 难以实行。所以体外评价的实验方法仍然在研究中广泛使用。血小板压积、平均血小板体积、大血小板比率和血小板分布宽度是评价血小板体外功能的适宜指标^[6-7]。血小板体积、平均血小板体积主要反映骨髓中巨核细胞增生、代谢及血小板生成情况, 同时也在一定程度上与血小板超微结构

和功能状态密切相关。平均血小板体积血小板分布宽度明显增加显示血小板体积变大, 且之间差异较大, 提示血小板可能发生聚集。大体积的血小板较为年轻, 其含有较多的致密颗粒, 并释放更多的活性物质, 聚结能力能明显增强^[6]。本研究结果显示, PCs 经过白细胞滤除以后, 血小板的形态学参数无显著变化 ($P > 0.05$), 从而在形态学角度, 我们可以推断 PCs 经过白细胞滤除, 对功能无明显影响。

除了形态学指标外, 本研究还在血小板的黏附功能、最大聚集率、HSR 和 CD62p 表达率这 4 项指标衡量血小板质量。血小板黏附功能在白细胞过滤后, 有轻微下降, 但下降并不显著 ($P > 0.05$); 血小板聚集功能是血小板的一种重要功能, 与血小板的止血作用关系密切, 而血小板的最大聚集率是反映血小板聚集功能好坏的一项重要标志。研究结果显示(见表 3), 白细胞滤除前后血小板的最大聚集率没有明显差异 ($P > 0.05$), 提示白细胞过滤并没有使血小板的聚集能力下降。HSR 试验检测血小板在低渗环境下体积膨胀后恢复其原有体积的能力, HSR 回复率越高, 血小板正常功能维持能力就越好, 血小板的体内存活能力就越强, 是反映血小板功能的重要指标。我们用分光光度计测定 2 组血小板在 610 nm 处吸收度 A 值的变化, 显示 HSR 无明显变化, 说明白细胞去除不会对血小板的抗低渗性休克能力造成影响。

CD62p 又称 P 选择素或者 GM140, 存在于血小板 a 颗粒的内表面, 血小板未活化时其外表面不表达 CD62p, 血小板受到各种刺激被激活时, 其颗粒膜与质膜发生系统融合, 导致 CD62p 在血小板质膜上表达, 成为活化血小板重要标志^[7]。PCs 白细胞滤除前 CD62p 表达率为 $(16.47 \pm 7.54)\%$, 过滤后表达率为 $(17.26 \pm 7.43)\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 PCs 经过白细胞滤器滤除, 未能造成血小板活化。

PCs 经过白细胞滤除以后, 白细胞已经减少至预防 FNHTR 和 CMV 感染的水平之下; 反映血小板体外功能的指标黏附功能、最大聚集率、HSR 和 CD62p 表达率等反应血小板体外功能的指标均无显著改变; 血小板数量经过过滤以后, 有所减少, 但其回收率也在在 90% 以上; 经过白细胞滤除以后, PCs 输注的 FNHTR 明显下降。

参考文献

- [1] 赵树铭. 血小板的制备及临床应用研究进展[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(9): 728-731.
- [2] Tobian AA, King KE, Ness PM. Prevention of febrile nonhemolytic and allergic transfusion reactions with pretransfusion medication: is this evidence-based medicine? [J]. Transfusion, 2008, 48: 2274-2276.

TNF- α 基因多态性与类风湿性关节炎相关性研究

王平¹ 贺艳丽² 曾筱倩¹ 王利民¹ 高云¹ 胡丽华¹

[摘要] 目的:探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)启动子区-308 基因多态性与湖北汉族人类类风湿性关节炎(RA)易感性的关系。方法:用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性(PCR/RFLP)的方法对 113 例 RA 患者及 126 例健康人进行 TNF- α 的-308 位点多态性分析。结果:RA 组与对照组 TNF- α 的-308 位点的基因型频率和等位基因频率 G/G、G/A、A/A 之间差异无统计学意义($P>0.05$);并且 TNF- α 的-308 位点的基因多态性与 RA 活动期指标 ESR 和 CRP 高低无关。结论:TNF- α 启动子区-308 基因多态性不是类风湿性关节炎易感性和严重程度的一个风险因子。

[关键词] 肿瘤坏死因子;类风湿性关节炎;基因多态性

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.003

[中图分类号] R593.22 **[文献标志码]** A

Correlation between tumor necrosis factor- α gene polymorphism and susceptibility of rheumatoid arthritis

WANG Ping¹ HE Yanli² ZENG Xiaolian¹ WANG Limin¹ GAO Yun¹ HU Lihua¹

(¹Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Center for Stem Cell Research and Application, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Abstract Objective: To investigate the correlation between tumor necrosis factor- α (TNF- α) -308 (G/A) gene polymorphism and susceptibility of rheumatoid arthritis(RA). **Method:** The polymorphism in the TNF- α -308 were determined by PCR-RFLP in 113 Rheumatoid arthritis patients and 126 controls. **Result:** There was no significant difference in the allele frequency of -308(G/A) site of TNF- α gene promoter region and genotype frequency G/G, G/A, A/A between RA patients and controls ($P>0.05$). Moreover, there was no association between TNF- α genotypes and disease activity measures, including the level of erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP). **Conclusion:** TNF- α -308 promoter polymorphism would be not a genetic risk factor for RA susceptibility and severity.

Key words tumor necrosis factor; Rheumatoid arthritis; Gene polymorphism

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性疾病,病因尚不明确。目前认为它和遗传及感染等因素有关。HLA-DR、白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor- α , TNF- α)等遗传因素造成了 RA 的易感性^[1-2],而感染因素可能触发该疾病。TNF- α 作

为一种重要的炎性介质,在 RA 的发病过程中起着重要作用。近来多项研究提示 TNF- α 启动子区-308 过高表达可影响 RA 的发生发展和预后^[3-4],但可能由于种族和地区因素,对两者相关性的结论尚不一致^[5,8-9]。因此,为进一步明确 TNF- α 启动子区-308 基因多态性与中国 RA 人群的相关性,我们研究了湖北地区汉族人群中 TNF- α 启动子区-308 位点基因多态性与 RA 发病的关系。

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)

²华中科技大学同济医学院附属协和医院干细胞中心

- [3] 中华人民共和国国家标准. GB18469-2001. 全血及成分血质量要求[S]. 北京:中国标准出版社,2002:9-10.
- [4] 田兆松. 临床输血学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:246-265.
- [5] 唐元艳,陈燕. 血液病患者血小板无效输注的原因探讨[J]. 临床血液学杂志,2005,18(4):223-225.
- [6] Tynngrd N. Preparation, storage and quality control

of platelet concentrates [J]. Transfus Apher Sci, 2009,41:97-104.

- [7] Cookson P, Sutherland J, Turner C, et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution [J]. Transfus Med, 2010,20:392-402.

(收稿日期:2014-06-03)