

3 种血细胞分离机采集血小板活化和功能的分析*

姚勇¹ 张欢欢² 孙振超¹ 吴运萍³ 唐梦怡¹

[摘要] 目的:分析 3 种机型血细胞分离机 Amicus、Trima 和 Mcs+ 采集血小板活化和功能的差异。方法:选择 2019 年单采血小板的献血者 60 例,按照 3 种机型所有献血者被随机分成 3 组,每组各 20 例。检测各组采集血小板活化指标 PAC-1、CD62P 和用血栓弹力图评估功能,进行统计分析。结果:3 种机型采集血小板活化指标 CD62P 均高于正常值,Amicus 采集血小板活化指标 CD62P 和 PAC-1 较另 2 种血细胞分离机比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 种机型血小板功能指标和血小板计数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:3 种机型血细胞分离机采集的血小板,均存在一定程度血小板活化;不同分离方式所采集的单采血小板其活化程度之间存在差异。

[关键词] 血细胞分离机;单采血小板;血小板活化;血小板功能;血小板输注

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.02.013

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Analysis of platelet activation and function in three types of blood cell separator

YAO Yong¹ ZHANG Huanhuan² SUN Zhenchao¹ WU Yunping³ TANG Mengyi¹

(¹Lianyungang Red Cross Blood Center of Jiangsu Province, Lianyungang, 222001, China; ²Department of Laboratory Medicine, Lianyungang First People's Hospital; ³Department of Blood Transfusion, Second People's Hospital of Lianyungang City)

Abstract Objective: To analyze the differences of platelet activation and function among Amicus, TrimA and MCS + blood cell separator. **Methods:** 60 cases of platelet donors in 2019 were selected. They were randomly divided into 3 groups according to the three machine models, with 20 cases in each group. The platelet activation indexes PAC-1 and CD62p were detected in each group. In addition, thromboelastography was used to evaluate platelet function. These data were statistical analyzed. **Results:** The platelet activation index CD62P collected by three models was higher than the normal value. The platelet activation indexes CD62P and PAC-1 collected by Amicus were significantly different from the other two blood cell separators ($P < 0.05$). There was no significant difference in platelet function index and platelet count among the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Platelets collected by three types of blood cell separators are activated to a certain extent. There are differences in the activation levels of apheresis platelets collected by different separation methods.

Key words blood cell separator; apheresis platelets; platelet activation; platelet function; platelet transfusion

单采血小板因其具有纯度高、数量多、输注安全的优点,已经成为临床血小板供应的主要来源^[1-2]。在影响血小板输注效果的诸多因素中,血小板表面 HLA 抗原、HPA、ABH 抗原的同种免疫作用是导致血小板输注无效的最主要因素,而采集的血小板数量和质量,尤其是血小板功能活化对血小板的输注效果影响关注度不高。血小板活化使血小板性质脆弱。血小板在采集、保存过程中受多种因素影响,其代谢和生理活性很容易发生改变和活化,而血小板体外活化是血小板保存损伤机制之一,影响其输注效果^[3]。目前采集血小板血细胞分离机主要有 3 种型号 Amicus、Trima、Mcs+,因采用不同的离心分离技术对采集的血小板的活化和

功能是否存在影响,本文进行比较研究。

1 资料与方法

1.1 标本来源

取自我站 2019 年单采血小板的献血者 60 例,献血者的体检和血液检测标准符合《献血者健康检查标准》,按照 3 种机型所有献血者被随机分成 3 组,每组各 20 例。血小板采集完毕后随即留取标本,并在 4 h 内完成留样标本的检测。

1.2 仪器与试剂

v3 种血细胞分离机及配套管路:Amicus(德国费森尤斯公司),Trima5.0(美国泰尔茂比斯特公司),Mcs+(美国血液技术公司);FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)及试剂荧光抗体 PAC-1 FITC(批号:8029876),CD62P PE-Cy5(批号:8088576)均购自美国 BD 公司;TEG-5000 血栓弹力图仪(美国 HAEMONETICS)及试剂活化凝血检测试剂盒(凝固法)(批号:HM04480)。批号:

*基金项目:江苏省输血协会英科科创科研基金(No: Js2018004)

¹连云港市红十字中心血站(江苏连云港,222001)

²连云港市第一人民医院检验科

³连云港市第二人民医院输血科

HM04480; SYSMEXSF-3000 全自动血细胞分析仪(日本希森美康公司)。

1.3 方法

1.3.1 PAC-1 和 CD62P 检测在流式试管中分别加入 1 μL 血小板、100 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)、荧光抗体 PAC-1-FITC 10 μL 和 CD62P-PE-Cy5 2 μL,混匀后室温避光孵育 15 min;然后加入 1% 多聚甲醛 400 μL,室温避光 10 min;400 × g 离心 5 min,弃上清,500 μL PBS 重悬,上流式细胞仪检测。计数 10 000 个血小板,分别检测血小板群中 PAC-1 和 CD62P 阳性血小板百分数,即 PAC-1 和 CD62P 表达水平。

1.3.2 TEG 血栓弹力图参数测定 抽取 1 000 μL 血小板标本加入至 kaolin 激活剂管内混匀,再从中抽取 340 μL 样品加入测试杯中,加入 0.2 mol/L CaCl₂ 20 μL,升起杯架,测试杆拨至 Test 位置,进行测定。

1.3.3 血小板计数测定 按照 Sysmex xs-800i 全

自动血液分析仪操作说明书检测。

1.4 统计学分析

试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

3 种机型采集血小板活性指标 CD62P 检查结果均高于正常值,CD62P、PAC-1 的正常值范围分别为:0~4%、0~10%^[4]。其中 Amicus 采集血小板活性指标 CD62P 和 PAC-1 显著高于另 2 种血细胞分离机采集血小板($P < 0.05$)。TEG 检测 R、K、Angle 值和 MA 值正常范围 5~10 min、1~3 min、53~72°、50~70 mm。检测结果发现 3 种机型血细胞分离机采集血小板反映凝血因子功能的 R、K 值在正常范围内,Angle 值和反映血小板功能的 MA 值高于正常值。3 种机型在血小板功能指标和血小板计数差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1、表 2。

表 1 3 种血细胞分离机采集血小板 CD62P、PAC-1 和 PLT 检测结果

检测项目					$\bar{x} \pm s$	
	Amicus	Trima	Mcs+	F	P	
CD62P/%	30.47±3.65	12.97±4.29	13.23±4.82	109.639	<0.05	
PAC-1/%	1.33±0.38	0.99±0.42	0.85±0.24	9.788	<0.05	
PLT/(×10 ¹¹ ·L ⁻¹)	10.16±0.75	10.29±0.87	10.38±0.92	0.341	>0.05	

表 2 3 种血细胞分离机采集血小板 TEG 参数检测结果

检测项目					$\bar{x} \pm s$	
	Amicus	Trima	Mcs+	F	P	
R/min	5.39±1.25	5.94±0.98	6.26±1.33	2.738	>0.05	
K/min	0.85±0.11	0.87±0.12	0.97±0.25	2.480	>0.05	
Angle/°	81.63±3.80	80.68±3.26	79.15±4.35	2.125	>0.05	
MA/mm	80.05±3.81	79.21±6.50	77.00±5.82	1.648	>0.05	

3 讨论

循环血液中血小板基本处于静息状态,在各种理化和生物因子的作用下,血小板受到刺激而成为活化血小板发挥聚集作用^[5]。PAC-1 是糖蛋白 II b-III a 复合物活化后暴露的纤维蛋白原受体,反映血小板活化的早期状态,可作为血小板活化的早期的、敏感的标志物。CD62P 是血小板 α-颗粒膜蛋白,介导活化血小板与中性粒细胞和单核细胞的黏附,是血小板活化晚期的、特异性的标志^[6]。血小板活化早期标志物 PAC-1 和活化晚期标志物 CD62P 的表达水平均与血小板活化程度呈正相关^[7]。血小板活化加速释放反应,使 GP II b/III a 数量和结构变化,血小板聚集功能出现异常,进而影响血小板输入体内后止血作用的发挥,从而影响血小板输注效果^[8]。

血小板活化标志物表达升高血小板贮存损伤表现特征之一。在研究中献血者个体差异、穿刺不

畅、抗凝剂比例不一致等可能会影响到血小板活化的因素均被排除^[9]。结果显示 3 种血细胞分离机采集的单采血小板活化指标 CD62P 均高于正常值,表明单采新鲜血小板在采集分离过程存在一定程度的活化,这与相关文献报道的血小板十分脆弱,体外血小板分离过程受离心等刺激,使血小板晚期活化率明显增加相一致^[7]。单采新鲜血小板中血小板浓度至少是全血中血小板浓度的 3~10 倍,血小板浓度高也可能导致血小板活化程度增加^[7]。对比 3 种分离机 Amicus 采集的血小板活化指标 CD62P、PAC-1 显著性高于 Trima 和 Mcs+。分析主要是因采用离心分离技术的不同血小板在采集过程中受剪切力、离心力、离心时间等诸多因素影响导致不同程度的活化^[10]。对比 4 种不同离心次数、离心力和离心时间制备富血小板血浆的方法发现,在其他条件一致的情况下,离心力过大,时间过长和离心次数过多都会导致血小板活化率的

升高。多项研究提示,由于各种血细胞分离机采集原理的差异,其对血小板体外活化程度的影响也不同^[11]。Mcs+原理是采集全血注入离心杯,通过梯度离心分离血小板,经过“淘洗”“冲浪”方式血浆逐渐增加的流速把血小板从离心杯里淘洗出来,导入血小板暂存袋里静止。Trima 采集全血在离心机中经过单段式分离方式收集的血小板和白细胞随血浆进入 LRS 舱,在 LRS 舱血小板形成流体式颗粒,在离心机产生的离心力再分离白细胞,利用 LRS 舱的形状、结构,无过滤网去除白细胞提高分离效果,最后随血浆进入血小板收集袋里静止。而 Amicus 采用梯度离心和两次分离的方式采集浓缩血小板其收集袋一直随离心机以 3280 r/min 高速旋转 90 min 直到采集结束,最后再进行转移血浆悬浮保存。可以看出不同于其他 2 种分离机每个循环分离出血小板都直接进入收集袋静止暂存,Amicus 每个循环分离出浓缩血小板在整个采集过程中长时间随离心机高速旋转刺激血小板膜,是导致其采集血小板活化程度高的主要原因。这里需要指出此次实验留样检测是在当日 4 h 内完成,在本研究中我们还对不同保存期血小板活性指标 CD62P、PAC-1 进行了对比,发现次日检测 CD62P、PAC-1 出现不同程度下降,而后才出现逐日增加的趋势。随着保存时间增加 3 种机型采集的血小板活性差异趋于变小有待进一步验证。相比其他 2 种机型 Mcs+ 采集单采血小板为非少白细胞血小板,其残留白细胞较高,随保存时间增加破碎的残留白细胞及已活化的血小板释放的激活物均可激活血小板,形成级联反应。

TEG 被广泛用于患者凝血功能的研究,可检测凝血因子活性、纤维蛋白原水平和血小板功能,并动态监测凝血和纤溶全过程。TEG 的主要参数包括 R 值、K 值、Angle 和 MA 值等。R 值表示被检标本中尚无纤维蛋白形成的时间,反映凝血因子的功能;K 值和 Angle 值反映纤维蛋白和血小板在凝血块开始形成时的相互作用,即凝血块形成的速率,受纤维蛋白原水平高低的影响。MA 值,最大振幅,是纤维蛋白和血小板通过 GPIIb/IIIa 受体结合,表现了纤维蛋白/血小板凝块的最大强度。MA 主要受血小板质量或数量的影响。结果显示 3 种血细胞分离机采集的血小板 R 值、K 值在正常范围内,Angle 值和 MA 值高于正常值,分析主要是受检测样本中高含量的血小板影响。因为常规 TEG 检测采用的是全血标本,而本研究留样标本是富血小板血浆,其含血小板浓度高达 $1\ 000 \times$

$10^9/L$ 以上。3 种血细胞分离机采集的单采血小板计数和 TEG 的主要参数 R 值、K 值、Angle 和 MA 值变化差异无统计学意义。表明 3 种机型采集的血小板在血块形成速率和最大血块强度方面均高于正常标准,但三者间没有显著性差异。

综合分析,3 种机型血细胞分离机采集的血小板,均存在一定程度血小板活化。因采用不同分离方式所采集的单采血小板其活化程度之间存在差异,在血小板功能和计数方面没有显著性差异。通过对不同机型采集的血小板在活化和功能方面差异分析,为单采血小板的保存和临床输注提供参考意义。

参考文献

- [1] 胡宇音,王晓平,陈筱华,等. 机采血小板采集方法改进的探讨[J]. 临床血液学杂志,2010,23(2):119-120.
- [2] 周明,沈建军,王敏,等. 单采和手工血小板治疗效果的 Meta 分析[J]. 临床输血与检验,2011,13(1):33-36.
- [3] 李丽,周群刚,王明元,等. 3 种制备方法对血小板活化状态的影响[J]. 临床血液学杂志 2010,23(4):196-197.
- [4] 山媛,胡军,赵瑞,等. PAC-1、CD62P 水平在早期诊治和预测脑梗死病情程度中的价值[J]. 中华保健医学杂志,2019,21(6):562-564.
- [5] 华晓东. 血小板活化标志物检测在临床研究中的应用进展[J]. 天津药学,2018,30(4):58-62.
- [6] 钟淑萍,李学刚,何志国,等. 系统性红斑狼疮患者血小板 PAC-1 和 CD62P 表达的研究[J]. 新医学,2013,(11):779-782.
- [7] 赵嘉美,赵丽云,刘飒,等. 自体富血小板血浆分离回输对主动脉手术患者血小板活化程度的影响[J]. 心肺血管病杂志,2016,35(12):962-966.
- [8] 丛培芳,赵林,温振科,等. 机采血小板保存期内活化分析及临床意义[J]. 中国输血杂志,2010,23(1):40-41.
- [9] 魏海燕,丁正年,史宏伟,等. 急性血小板分离回输对体外循环下心内直视手术患者血小板活化功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2015,35(3):274-278.
- [10] 李丽,王明元,周群刚,等. 不同方法制备的血小板在保存期内活化状态研究[J]. 临床输血与检验,2010,12(1):1-4.
- [11] Tynngård N, Lindahl TL, Trinks M, et al. The quality of platelet concentrates produced by COBE Spectra and TrimaAccel cell separators during storage for 7 days as assessed by in vitro methods[J]. Transfusion, 2008,48:715-722.

(收稿日期:2020-06-02)