

血小板功能分类及止血机制新探讨

丁国良¹ 徐群² 朱琳¹ 赵林园¹ 张珊珊¹ 薄玉芳¹

[摘要] 目的:探讨血小板功能分类及临床应用,并试图探讨血细胞冰冻的个体化。方法:将不同浓度的(DMSO)作为保护剂加入血小板中,在-80℃条件下进行冰冻,观察冰冻前后凝血及收缩块形成过程,检测冰冻前后及不同离心条件下血小板的计数、血浆中血小板第3因子(PF₃)、血小板第4因子(PF₄)、血小板体积分布宽度(PDW)及P-选择素(CD62P)对血小板的聚集、黏附、血块收缩功能的影响。对质控条件合格的冰冻血小板单独或合并新鲜血小板的临床应用进行回顾性分析。结果:血小板阻断后血液不凝集;血浆纤维蛋白收缩块形成过程分两个阶段:第一步血浆凝集,需要5~15 min;第二步纤维蛋白收缩块形成,约在2 h内完。血浆中PF₃、PF₄及CD62P对血小板的功能有促进凝集和抑制收缩两方面的影响。冰冻血小板和新鲜血小板搭配应用与单独的新鲜血小板的临床效果有明显差异;2%与5%的DMSO冻存血小板质量无明显差别。结论:血小板可进行功能分类,即因子释放类和血块收缩类;止血过程分两步进行,第一步为血浆凝集阶段第二步为血栓形成阶段,两类血小板分别参与不同的止血阶段,经典的止血机理值得商榷;冰冻血小板和新鲜血小板搭配应用效果较好;可用低浓度2%的DMSO做进行冻存。

[关键词] 血小板;功能分类;止血机制;冰冻;个性化;因子释放类;血块收缩类;临床应用

[中图分类号] R558 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)12-0784-06

New exploratory research of platelet functional classification and hemostatic mechanism

DING Guoliang¹ XU Qun² ZHU Lin¹ ZHAO Linyuan¹ ZHANG Shanshan¹ BAO Yufang¹

(¹Dongying Blood Center, Dongying, 257091, China; ²Blood Center of Shandong Province)

Corresponding author: DING Guoliang, E-mail: 13280373125@126.com

Abstract: By observing in vitro, the platelet concentrates(PC) were always originally jelly-like agglutinate followed by further shrinking. PLT could release procoagulant factors PF₃, PF₄ and CD62P, here we studied the platelet functional classification and discussed the new Hemostatic Mechanism of PLTs. We used apheresis fresh platelet concentrates(PC) and frozen PC with different concentrations of DMSO under -80 °C to observe the platelet(PLT) coagulation process, and tested PLTs count, plasma PLT factors (PF₃ and PF₄), platelet distribution width(PDW) and Human P-Selectin(CD62P), as well as their influences to the plateletic functions of aggregation, adhesion, systolic. We analyzed retrospectively the clinical effects of the qualified frozen PC alone or merger of the fresh PC to clinical application. There was no blood agglutination after blocking the plateletic functions; in vitro, the coagulation process in PC had two phases: the plasma jelly-like agglutination and then forming fibrin pieces, about 15 min and 2 hours. In frozen PC, there were more PF₃, PF₄ speeding plasma jelly-like agglutination and more CD62P inhibiting shrinking. There was better clinical effects to transfuse mixture of frozen and fresh PCy. **Conclusion:** PLTs could be functionally classified as cytokine releasing and contraction of blood clot, participating in different hemostatic phases of the plasma jelly-like agglutination stage and thrombus formation stage. The clinical effects of using frozen PC with fresh PC was better in emergency. For freezing PLTs individually, to freeze-stored platelet with 2% DMSO as protectants was feasible.

Key words platelet; functional classification; frozen; individual; cytokine releasing; contraction of blood clot; clinical application

我们对血小板进行冰冻研究时发现:1% DMSO冰冻血小板浓缩液凝固时间明显缩短,但不发生血块收缩现象的,将其进行离心并用新鲜血浆代替上清液后,血块收缩现象又重新出现。这说明破碎的血小板及其释放物可明显缩短血浆凝固时间,但抑制了部分血小板的收缩功能,我们对此进行了认真研究,现报告如下。

¹东营市中心血站(山东东营,257091)

²山东省血液中心

通信作者:丁国良, E-mail: 13280373125@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血小板来源 120袋血小板均由本站机采科提供。献血者为无偿随机健康的献血者,献血者体检均符合中华人民共和国《供血者健康检查标准》的要求。受检血小板样品均大于 2.5×10^{12} 个/250 ml,其中未冰冻原液、5%、2%和1% DMSO冰冻血小板各30袋。将4种标本又分为原液、2次离心上清液(离心速度均为3 000 r/min)。对上述4种标本的每份标本分别进行血小板的计数、血小

板第4因子(PF₄)、血小板体积分布宽度(PDW)及P-选择素(CD62P)含量的检测,并测定血小板的聚集、黏附、血块收缩功能。

1.1.2 临床用血者 210例临床用血者来自胜利油田中心医院和东营市人民医院。共输注血小板813袋,血小板质量及来源同1.1中所述。其中105例混合输注新鲜与冰冻血小板(2:1),妇科37例,骨外科68例,平均年龄33岁。另外105例输注新鲜血小板做对照,平均年龄32岁。每例患者每次输注最少3袋血小板,最多输注2次,实验组冰冻血小板的输注放在两袋新鲜血小板之间,3袋连续输完后,抽样进行各项指标的检测。

1.1.3 主要试剂 DMSO(美国RESEARCH ORGANICS提供),10%葡萄糖酸钙针剂(济南利民制药有限责任公司提供),测定PF₄ELISA试剂盒(上海江莱生物科技有限公司提供),凝血酶(美国Sigma公司产品提供),Human P-Selectin/CD62P/GMP140 ELISA试剂盒(美国RD公司产品),藻红素(PE)标记抗CD62单抗;PE标记的鼠IgG₁(Pharmingen公司)。

1.1.4 主要仪器设备 Epics 流式细胞仪(Coulter公司),HY-Z调速多用振荡器(江苏省金坛市金南仪器厂),PH-IA恒温循环解冻箱(潍坊普华医疗器械有限公司),KX-21细胞计数仪(日本希森美康),EL_x800酶标仪(美国),SANYO -80℃低温冷冻冰箱(日本),MCS⁺血细胞分离机(美国血技),APACT2聚集仪(四川美生实业责任有限公司产品),黏附玻璃珠栓(浙江进勇塑料综合厂产品),XSP-4C显微镜(上海光学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 复钙实验 取新鲜富含血小板原液、5%、2%、1%DMSO冰冻富含血小板血浆各5ml,注入塑料试管中,分别加10%的葡萄糖酸钙0.05ml,放置37℃水浴箱中,观察富含血小板血浆凝固时间、纤维退缩块的大小和密度。另取上述血小板样品5ml再分别以3000r/min的速度离心2次,取上清液,同样复钙后,观察离心后其凝固时间、纤维退缩块的大小和密度。血浆凝固时间:从加入钙剂开始计时,到血浆凝胶冻状为止。血块收缩时间:从加入钙剂开始计时,到有纤维蛋白析出为止。血块收缩率和致密度的观察:加入钙剂后2h,观察析出血清占注入试管血浆总体积的比率。

1.2.2 血小板计数 分别用KX-21细胞计数仪和XSP-4C显微镜对各样品进行血小板计数,并执行仪器设备说明书规定的操作步骤。

1.2.3 PDW检测 用KX-21细胞计数仪自动检测,并执行仪器设备说明书规定的操作步骤。

1.2.4 血小板聚集实验 以凝血酶作为致聚剂,按《全国临床检验操作规程》要求,用APACT2聚

集仪测定各样品的聚集率。

1.2.5 血小板黏附实验 按《全国临床检验操作规程》要求,用黏附玻璃珠栓进行血小板黏附实验检测。

1.2.6 PF₄检测 按《全国临床检验操作规程》要求,执行说明书操作步骤。

1.2.7 CD62P检测 用Human P-Selectin/CD62P/GMP140 ELISA试剂盒,按《全国临床检验操作规程》和试剂盒说明书要求进行操作。

1.2.8 血小板表达CD62P的检测 将300μl血小板样品用1%多聚甲醛固定10~20min,然后用PBS洗涤1~2次,向50μl经过洗涤的固定血小板中加入20μl的PE标记的抗CD62单抗,室温避光孵育20~30min,再用PBS洗涤并稀释至500μl,然后用流式细胞仪测定表达CD62的血小板百分数,每个样品均用PE标记的鼠IgG₁抗体作为对照,确定基线结合量。

1.2.9 血小板冰冻及融化 选择符合条件的供血者,用MCS⁺血细胞分离机采集合格的血小板制品($\geq 2.5 \times 10^{12}$ 个/250ml)。对需冰冻的血小板以5%、2%、1%的不同浓度加入DMSO,并放置-80℃低温冷冻冰箱进行冷冻保存。使用时放置PH-IA恒温循环解冻箱(40℃)进行融化。

1.2.10 血小板阻断实验 在不加任何抗凝剂的条件下,将血液置于管壁涂了一层硅胶的玻璃管中,使血小板不易解体,观察血液凝集情况。

1.2.11 血浆置换实验 1%DMSO冰冻血小板和新鲜血小板离心后互换上层血浆,观察凝血时间及收缩块形成的时间和质量。

1.2.12 临床治疗观察对比 将210例患者分成2组,每组105例,对每位患者在输血前都进行临床输血评估,血小板计数 $\leq 50 \times 10^9/L$ 且临床估计出血量均在1500~2000ml以上。对两组患者分别观察其平均输注血小板剂量、血小板增加数校正(CCI)、输血前后CT和输血后血块收缩实验。

1.3 统计学方法

采用 t 检验和 u 检验。

2 结果

2.1 血小板阻断实验证明

在不加任何抗凝剂的条件下,将血液置于管壁涂了一层硅胶的玻璃管中,使血小板不易解体,血液可保持液态达72h以上。

2.2 血浆置换实验

1%DMSO冰冻血小板用新鲜血浆置换后,重新出现收缩现象,新鲜血小板血浆置换后,血浆收缩块质量变差。

2.3 血小板冰冻前后血浆凝固时间、血小板收缩功能、血小板计数

血小板冰冻前后血浆凝固时间、血小板收缩功

能、血小板计数有明显变化,具体情况见表 1~3。

表 1 不同样本血小板计数、复钙实验变化表

样本	PLT/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) (分析仪)	复钙实验		
		血浆凝固/ min	血块收缩/ min	血块收缩/ %
原液	1 170 $\pm$ 130	11 $\pm$ 4.2	13 $\pm$ 3	89 $\pm$ 4
原液 ₂	50 $\pm$ 10	9.5 $\pm$ 2.3	无	0
原液半 ₂	600 $\pm$ 72	9 $\pm$ 2.4	13 $\pm$ 3	82 $\pm$ 2
5%冰冻	1 000 $\pm$ 43	9 $\pm$ 2.3	39 $\pm$ 5	69 $\pm$ 4
2%冰冻	1 000 $\pm$ 41	9 $\pm$ 2.2	38 $\pm$ 5	68 $\pm$ 3
1%冰冻	1 000 $\pm$ 44	8.3 $\pm$ 2.1	无	0
5%冰冻 ₂	50 $\pm$ 10	7 $\pm$ 1.2	无	0
2%冰冻 ₂	50 $\pm$ 10	7 $\pm$ 1.1	无	0
1%冰冻 ₂	120 $\pm$ 30	6 $\pm$ 0.9	无	0
5%半	1 000 $\pm$ 70	9 $\pm$ 2.2	19 $\pm$ 3	57 $\pm$ 3
2%半	1 000 $\pm$ 80	9 $\pm$ 2.3	19 $\pm$ 4	56 $\pm$ 4
1%半	1 100 $\pm$ 110	5 $\pm$ 1.3	25 $\pm$ 5	37 $\pm$ 2
5%半 ₂	500 $\pm$ 20	6 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 3	43 $\pm$ 4
2%半 ₂	490 $\pm$ 10	6 $\pm$ 0.7	19 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3
1%半 ₂	600 $\pm$ 30	5 $\pm$ 1.2	无	无
5%新 2:1	1 130 $\pm$ 110	6 $\pm$ 0.6	13 $\pm$ 2	90 $\pm$ 4
2%新 2:1	1 130 $\pm$ 120	6 $\pm$ 0.7	13 $\pm$ 3	91 $\pm$ 4
1%新 2:1	1 240 $\pm$ 137	5 $\pm$ 1.1	37 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3

注:表 1 所述原液、5%冰冻、2%冰冻、1%冰冻分别指新鲜血小板、5%、2%、1%DMSO 冰冻血小板。原液₂、5%冰冻₂、2%冰冻₂、1%冰冻₂ 分别是指上述血小板样品经离心 2 次处理。5%半、2%半、1%半是指分别取 5%、2%、1%冰冻血小板各 2.5 ml,再加新鲜血小板 2.5 ml 的样品。原液半₂、5%半₂、2%半₂、1%半₂ 是指分别取新鲜血小板、5%、2%、1%DMSO 冰冻血小板各 2.5 ml,离心 2 次后再加新鲜血小板各 2.5 ml 的样品。5%新 2:1、2%新 2:1、1%新 2:1 是指分别取新鲜血小板和 5%、2%、1%DMSO 冰冻血小板,并按 2:1 的比例所配置样品。上述概念使用于下列所有图表。

富含血小板血浆止血过程分为 2 步。第 1 步为血浆凝集过程,这个过程大约需要 5~15 min;第 2 步为收缩块形成过程,即血栓形成过程,这个过程在 120 min 内完成。在相同条件下收缩块形成的质量受血小板浓度的影响。血小板受损越严重血 PF₃、PF₄ 等致凝物质明显增高,浆凝集时间越短,收缩块质量越差,1%DMSO 冰冻血小板凝集时间最短,但无收缩块形成。血小板的收缩功能与血浆中游离的 CD62P 及血小板表达的 CD62P 呈负相关,而血浆呈胶冻状凝集所需的时间与血浆中游离的 CD62P 及血小板表达的 CD62P 呈正相关。三血浆置换实验说明 1%DMSO 冰冻血小板血浆中存在血小板收缩的抑制物。血细胞分析仪对冰冻血小板计数存在误差。1%冰冻血小板的血细胞分析仪计数与显微镜计数有明显差异,1%冰冻血小板离心 2 次后尤其明显,说明血小板破损较多,

血细胞分析仪误把血小板碎片计为完整的血小板,这样就造成了 PDW 值的增大,从 PF₃、PF₄ 等致凝物质来看,冰冻血小板的 PF₃、PF₄ 值均高于未冰冻血小板。

2.4 新鲜血小板与 5% DMSO 冰冻血小板混合剂 (2:1) 的临床输注

新鲜血小板与 5% DMSO 冰冻血小板混合剂 (2:1) 的临床输注效果见表 4。

3 讨论

体外血栓形成过程分 2 个阶段,即血浆凝集阶段和栓子形成阶段。通过我们的实验发现:第 1 个阶段为血浆凝集阶段,就是我们通常所说的血液凝集阶段,这一阶段主要为纤维蛋白原向纤维蛋白转化,并形成纤维蛋白索阶段,这一阶段大约在 5~15 min 内完成,平均 10 min。在我们所做的实验中,不管富含血小板血浆是否离心,每个试管首先出现的是血浆呈胶冻状凝固。但是,止血第一阶段需要时间的长短与血小板释放的促凝物质有关。通过表 1、2 可以看出:血浆中 PF₃、PF₄ 等致凝物质含量高和 CD62P 表达高的血浆凝集时间短,凝集时间与这些物质的含量呈负相关,这种情况发生在血小板激活或大量血小板被破坏时。离心并去除血小板的试管,实验就停留在这一阶段。不做离心处理的试管,实验就进入下一阶段,既栓子形成阶段(或凝块形成阶段)。这一阶段大都在 2 h 内完成。

体外实验证明:血小板从功能上分为因子释放类和血块收缩类,这 2 类血小板参与上述两个不同的阶段。血小板阻断实验证明,在没有血小板参与的情况下,血液不会发生凝集。而同时,在不对血小板进行阻断,进行离心处理后,血浆只凝集,但无栓子形成(血块收缩)。这说明一部分血小板参与了血液凝集过程,而且这部分血小板无收缩功能。我们称这一类为因子释放类(或以因子释放为主)血小板。它主要是释放 PF₃、PF₄ 等致凝物质,参与体外血栓形成的第一阶段。另一类血小板,既离心沉淀的血小板,具有伸出伪足和收缩功能的血小板。这类血小板的作用机理是:纤维蛋白索形成后,即血浆呈胶冻样状态后,那些处于生命旺盛阶段的血小板(离心后沉淀的血小板),受血浆内适量纤维蛋白索的刺激,伸出伪足并“锚”定于纤维蛋白索上,血小板呈向心性收缩,使纤维蛋白网眼缩小,血清被析出,形成牢固的凝块。血块收缩的质量与血小板的浓度呈正相关性。表 1 中新鲜血小板、2%和 5%冰冻血小板中血小板计数很高,凝块质量最好,而取新鲜血小板、5%、2%、1%DMSO 冰冻血小板各 2.5 ml,离心 2 次后再加新鲜血小板各 2.5 ml 的样品,血小板计数几乎减少一半,其凝块质量也较差。

表 2 不同样本血小板计数、PF₃、PF₄ 等促凝物质的检测

样本	PLT/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$) (分析仪)	PLT/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$) (显微镜)	PDW	PF ₃ /(ng $\cdot L^{-1}$)	PF ₄ /($\mu g \cdot L^{-1}$)
原液	1.17 $\pm$ 0.13	1.17 $\pm$ 0.11	16 $\pm$ 1.3		
原液 2	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01		1 877 $\pm$ 53	12 $\pm$ 1.3
2%冰冻	1.0 $\pm$ 0.041	1.0 $\pm$ 0.042	16 $\pm$ 1.8		
2%冰冻 2	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01		1 900 $\pm$ 62	14 $\pm$ 1.5
1%冰冻	1.0 $\pm$ 0.044	0.83 $\pm$ 0.04	>18		
1%冰冻 2	0.12 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	>2000	>16	

表 3 血小板收缩功能与 CD62P 的相关性

样本	游离 CD62P/(ng $\cdot ml^{-1}$)	血小板表达 CD62P/%	黏附功能/%	聚集功能	血浆凝固/min
原液	10.4 $\pm$ 0.52	0.9 $\pm$ 0.5	62.7 $\pm$ 14.7	90.6 $\pm$ 8.1	11 $\pm$ 4.2
5%冰冻	16.9 $\pm$ 0.61	21.1 $\pm$ 4.7	44.3 $\pm$ 6.8	76.9 $\pm$ 11.2	9 $\pm$ 2.3
2%冰冻	16.6 $\pm$ 0.62	20.9 $\pm$ 4.8	43.5 $\pm$ 6.7	76.7 $\pm$ 11.3	9 $\pm$ 2.2
1%冰冻	>20.8	40.9 $\pm$ 3.2	24.3 $\pm$ 4.3	42.5 $\pm$ 7.9	8.3 $\pm$ 2.1

表 4 新鲜血小板和冰冻血小板混合(2:1)输注临床效果观察

组别	例数	血小板计数		CCI/%	CT(试管法)		血块收缩功能	
		输注前	输注后		输注前	输注后	输注前	输注后
新鲜	105	47 $\pm$ 14	125 $\pm$ 21	21 $\pm$ 5	10.9 $\pm$ 1.1	5.1 $\pm$ 0.4	27 $\pm$ 6	58 $\pm$ 6
混合	105	46 $\pm$ 13	123 $\pm$ 19	19 $\pm$ 7	11.1 $\pm$ 1.3	4.2 $\pm$ 0.2	26 $\pm$ 5	56 $\pm$ 7

血小板收缩功能存在调节机制,具有收缩功能
的血小板破损后也释放促凝因子,促凝因子过多将
抑制血小板收缩功能。从表 1、表 2、表 3 我们可
以看出,随着血小板的破坏增多,血浆中游离的
CD62P 含量增高,血小板表达的 CD62P 能力增强,
PF₃、PF₄ 等致凝物质明显增高,止血过程第一阶
段明显缩短,但血块收缩明显减弱。其一说明受
损血小板增多,其二是血小板收缩功能受抑制。
通过表 1 我们可以看出血小板受损为次要原因,
主要原因为血小板收缩功能受抑制。无论是 1%
DMSO 冰冻血小板、1% DMSO 冰冻血小板离心
液止血只进行到第一阶段,既血浆凝集阶段,但
1% DMSO 冰冻血小板的计数仍为 $(1\,000 \pm 44) \times 10^9/L$,远远超出 $(100 \sim 300) \times 10^9/L$ 的正常一般血样的值。如果说这种计数差别是因血小板破损造成的误差,我们可以用显微镜进行目测,从而进行矫正。我们的矫正结果是 1% DMSO 冰冻血小板的目测值为 $(830 \pm 40) \times 10^9/L$,也远远超出 $(100 \sim 300) \times 10^9/L$ 的正常一般血样的值。从 1% DMSO 冰冻血小板及其离心液的计数我们也可以看出,血小板经 1% DMSO 冰冻保存后,其破损率大概在 30% 左右(KX-21 细胞计数仪对新鲜血小板计数-KX-21 细胞计数仪对冰冻血小板两次离心后计数/KX-21 细胞计数仪对新鲜血小板计数)。从血小板的 CD62P 表达功能来讲,假设所有表达的 CD62P 血小板均丧失收缩功能,那么,按着我们对 1% DMSO 冰冻血小板的检测,其 CD62P 表达率为 40.9 ± 3.2 ,我们

按显微镜目测的 $(830 \pm 40) \times 10^9/L$ 计数进行计算,表达 CD62P 约为 $320 \times 10^9/L$,不表达 CD62P 约为 $480 \times 10^9/L$,这两个数值均高于 $(100 \sim 300) \times 10^9/L$,理论上讲计数 $\geq 1\,000 \times 10^9/L$ 的血小板,经 1% DMSO 冰冻血小板仍具有良好的收缩功能,而实验结果恰恰相反。这说明血小板收缩功能存在反馈抑制机制。更有利的证明是血浆置换实验,1% DMSO 冰冻血小板用新鲜血浆置换后,重新出现收缩现象,新鲜血小板血浆置换后,血浆收缩块质量变差。从理论上讲,血小板在凝血过程中也理应存在一个反馈机制,否则,血液中一旦有血小板激活,血小板将无限制的消耗,发生血栓或消耗性出血。在 DIC 时,这一机制就可能遭到了破坏,因此用抗血小板凝集剂就可阻止这一过程的发生。这个反馈机制与血液凝固反馈机制有所区别。血液凝固机制实际上是纤维蛋白原的降解机理,是血浆凝固过程,发生在生理止血过程的第一阶段,大约出血后 15 min 以内(见表 1 中的血浆凝固时间),在其整个过程中需要具有释放功能的血小板释放 PF₃、PF₄ 等促凝物,并提供磷脂表面。首先发挥作用的血小板应是已经表达 CD62P 的血小板,这些血小板与网织相反,是寿命即将终结的血小板,这些血小板约占总血小板比例的 1%(见表 3 血小板表达 CD62P),是处于激活状态的,具有巡视功能的血小板。随着越来越多的血小板被激活,释放出促凝物质也增多,这些促凝物质反过来抑制血小板的破坏,使其保持完整的形态,并抑制收缩。

生理止血过程第一阶段完成后,即血浆凝固过程完成后,如促凝物质增多,过多的纤维蛋白索形成,不利于血小板发挥起收缩作用。这就是将 1% 冰冻血小板离心,然后用新鲜血浆替代 1% 冰冻血小板上层血浆并摇匀后,部分血小板收缩功能又重新出现的原因。

血小板存在分化,不同阶段的血小板具有不同的功能。目前已经确认的血小板形态有 3 种:一种是网织,即刚刚从巨核细胞脱落的小血小板,约占血小板总数的 2.8%~15.8%^[1]另一种是表达 CD62P 血小板,约占血小板总数的 0.8±0.4%,且再表达率与血小板的寿命相关,表达越低体内寿命越长^[2];这说明表达 CD62P 的血小板为即将老化或凋谢的血小板。第三种就是不表达 CD62P 血小板,这类血小板约占血小板总数的 90%(血小板总数-表达 CD62P 血小板),其中网织血小板占 2.8%~15.8%。综合上述,笔者认为血小板在一个生命周期内有不同的分化,不同分化阶段具有不同的功能。其中约占血小板总数的(0.8±0.4)%,能表达 CD62P 的血小板为血小板生命的最后阶段,这个阶段的血小板极易活化,在血管内起着“巡视”作用,一旦有血管内皮损伤,其立即黏附于相应的损伤处,并与血管内皮融合,同时释放出促凝物质,并激活其他血小板。而不表达 CD62P 的血小板主要功能为锚定纤维蛋白并起收缩作用。

止血理论新解释。经典血小板止血机理是:创伤发生后,血小板迅速黏附于创伤处,并聚集成团,形成松软的止血栓子,然后促进血凝并形成坚实的止血栓子。按着这一理论,血小板在止血过程的开始就已经大部分聚集于创伤处,当血液发生凝集后,血小板因不能均匀分布于凝集的血浆中,而无法发挥其收缩功能,所以也无法形成坚实的止血栓子。这一机制与我们的体外实验结果不一致。我们的实验结果是血浆先发生凝集反应,然后血块逐渐收缩,最终形成坚实的止血栓子。体外血小板的止血机理应该是:表达 CD62P 的血小板首先被激活并释放出促凝因子,促凝因子激活凝血系统,凝血过程形成纤维蛋白索,纤维蛋白索激活具有收缩功能的血小板,这类血小板均匀分布于血浆中,变形并伸出伪足,“锚”定于纤维蛋白索上,血小板呈向心性收缩,使纤维蛋白网眼缩小,血清被析出,形成牢固的凝块。体内止血过程应该是:血液中存在不同分化阶段的血小板,表达 CD62P 的血小板为最后分化阶段,极易被激活,是止血“巡查”员,在血管发生创伤立即黏附于相应的损伤处,并与血管内皮融合,同时释放出促凝物质,激活凝血系统,凝血过程发生,先形成胶冻样物质,胶冻样物质中含纤维蛋白索。这种胶冻样物质先堵塞于出血处,这一过程 5~15 min。其次,纤维蛋白索激活具有收缩

功能的血小板,这类血小板变形并伸出伪足,“锚”定于纤维蛋白索上,血小板呈向心性收缩,使纤维蛋白网眼缩小,血清被析出,形成牢固的凝块。这新的理论解释 DIC 的发病机制更有说服力。当组织因缺氧等原因造成组织损伤,表达 CD62P 的血小板首先被激活,与血管内皮融合并释放出促凝物质,微循环中的凝血机制发挥作用,血浆呈胶冻状并堵塞微循环血管,使组织缺氧,这一过程 5~15 min。然后均匀分布于胶冻状血浆中的血小板被纤维蛋白索激活,血小板呈向心性收缩,使纤维蛋白网眼缩小,血清被析出,形成牢固的凝块。同时,因血清析出,血块变小,血管部分畅通。但因血块的存在,血管腔变狭窄,随着纤溶系统的激活,血块逐渐溶解,血管畅通。血块若成片脱落,随血液流经狭窄处时便形成血栓。

混合输注血小板效果最好。其机理是冰冻血小板在冰冻、融化过程中有较多的被激活的表达 CD62P 的血小板^[3],这些血小板能释放出更多的促凝物质,缩短凝血时间。但随着血小板的破坏增多,收缩功能的血小板相对减少,影响止血栓子的形成。为此,我们可以加入新鲜血小板来增加具有收缩功能的血小板的数量,加固止血栓子。通过表 1 中 5% 新 2:1、2% 新 2:1、1% 新 2:1 的实验数据我们可以得出这一结论。表 4 的临床使用效果也是我们这一结论的有利证据。但从理论上讲,冰冻血小板不能应用于 DIC 的高凝阶段,因为冰冻血小板含有血小板释放的大量促凝因子,加速血液的凝固,促进血栓的形成和消耗性出血的形成。

血细胞冰冻应个性化。细胞冰冻损伤的机制有 4 种学说,即盐变学说、冰晶机械学说、化学损伤和细胞的融化反应。无论哪种学说都和细胞内外溶液的量 and 浓度有关,如果细胞内本来溶液含量少,浓度低,那么抗冰冻的能力就强。从血小板的结构来看,血小板膜是附着或镶嵌有蛋白质双分子层的脂膜。血小板胞浆中有两种管道系统:与表面相连的开放管道系统和致密管系统。前者是血小板膜内陷在胞浆中形成的错综分布的管道系统,管道的膜与血小板膜相连续,管道膜内表面也有与血小板膜一样的外覆层,通过此管道系统,血浆可以进入血小板内部,从而扩大了血小板与血浆的接触面积,由于存在这套与表面相连的发达的管道系统,使血小板形成与海绵相似的结构;后者即致密管系统的管道细而短,与外界不通,相当内质网。这样的结构使血小板内液体含量减少,按着上述学说,在冰冻过程中受损的可能变小,冰冻防护剂的剂量可减少。我们的实验结果证明:2% DMSO 冰冻血小板与 5% DMSO 冰冻血小板在血小板计数、聚集功能、黏附功能等各方面无明显差别,但 1% DMSO 冰冻血小板的质量明显受影响。这个实验

储存式自体输血在肝癌手术中的应用

曹奎杰¹ 周金安² 占少华² 李爱华³

[摘要] 目的:比较储存式自体输血和同种异体输血的术后恢复效果。方法:两组择期手术的肝癌患者,术中分别输注自体血和异体血 400 ml,比较术前、术后 1、3d 的 RBC、Hb、HCT、STB、UCB、K⁺。结果:2 组患者术后 1 d 各项检测指标较术前差异有统计学意义($P < 0.05$),但术后 3 d 试验组与术前差异无统计学意义($P > 0.05$),与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:储存式自体血输血患者较异体输血患者术后各项指标恢复快,红细胞破坏少。

[关键词] 储存式自体输血;肝癌;输血效果

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)12-0789-02

Application of stored autohemotransfusion in liver cancer surgery

CAO Kuijie¹ ZHOU Jin'an² ZHAN Shaohua² LI Aihua³

(¹Department of Blood transfusion, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Department of Blood transfusion, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; ³The People's Hospital of Yangxin County Shandong Province)

Abstract Objective: To compare the postoperative recovery effect of stored autohemotransfusion and homogeneous blood transfusion. **Method:** The liver cancer patients of selective operation were divided into two groups, and received 400ml autologous blood and homologous blood transfusion, respectively. The levels of RBC, Hb, HCT, STB, UCB and K⁺ before operation and after operation 1 day and 3 day were compared. **Result:** There were significant differences of the results of various indexes of the two group patients between 1 day after operation and before operation ($P < 0.05$), while there were no differences of the tested group between 3 day after operation and before operation ($P > 0.05$), and there were significant differences of the control group between 3 day after operation and before operation ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compared to the patients received homogeneous blood transfusion, the patients received stored autohemotransfusion had rapid recovery of various indexes and less erythrocytic injury.

Key words stored autohemotransfusion; liver cancer; transfusion effect

随着医疗事业的不断发展,医疗机构也逐日壮大,血液供应日益紧张,找到一种比较安全有效的替代异体输血方法非常重要,所以现在,自体输血越来越受到重视,特别是手术中的自体血回收输注已经广泛应用于胸外科、脑外科、和骨科的手术中^[1]。肝癌患者虽然术中一般都要输血,但考虑到肿瘤细胞残留等原因一般不能采用术中自体血回输,所以储存式自体输血在肝癌手术中应用越来越

广泛。为评定肝癌患者输注自体血和异体血后的红细胞增长及破坏情况,现对术前和术后 RBC、Hb、红细胞压积(HCT)、总胆红素(STB)、间接胆红素(UCB)、K⁺几个指标进行监测,分析患者恢复情况。

1 资料与方法

1.1 基本资料

选取 2011-01—2012-07 我院收治肝癌择期手术患者 78 例,年龄 35~79 岁,其中男 50 例,女 28 例。术前患者情况良好,术前 1 周 Hb:男 ≥ 110 g/L,女 ≥ 100 g/L, Hct $\geq 33\%$ 。将患者平分为 2 组,对照组为输注异体血患者,试验组为储存式自体输血组,每组 39 例。

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院输血科(武汉, 430022)

²华中科技大学同济医学院附属同济医院输血科

³山东省阳信县人民医院

通信作者:周金安, E-mail: zhjawlg@sohu.com

说明血细胞冰冻可以个体化。

参考文献

- [1] 孙德华,王前,郑磊,等.网织血小板的检测方法及临床意义[J].军医进修学院学报,2008,29(5):439—440.
- [2] 欧阳锡林,刘景汉,Dayong Gao,等.流式细胞术测定

保存血小板再表达 CD62P 方法的建立及应用[J].中国输血杂志,2002,15(2):77—81.

- [3] 丁国良.血小板保存 3 天后再冷冻保存的实验研究及临床应用[J].中国实验血液学杂志,2008,16(5):1196—1200.

(收稿日期:2012-06-25)