

## 血小板单采活化及个体差异\*

张开文<sup>1</sup> 潘洁<sup>1</sup> 杨文萍<sup>1</sup> 黄道斌<sup>1</sup> 李丽娜<sup>1</sup> 许亚亚<sup>2</sup> 陈琪<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:研究认识血小板单采活化的特点,分析单采血小板活化的相关因素,识别验证对单采过程诱导活化敏感个体,合理处置,减少血小板输注无效(PTR)发生频率。方法:随机收集台州市中心血站的单采血小板样本,在下机后 30 min 内用 PAC-1、CD62p 荧光抗体标记并用 1% 甲醛固定,随后及时上机检测活化百分率,同时收集该样本对应献血者的体检、献血前筛查、单采数据。对收集的各类数据进行相应的统计分析。结果:PAC-1、CD62p 阳性表达率分别为(35.3±23.5)%、(2.7±2.9)%,两者配对 *t* 检验统计分析显示两者的差异有统计学意义( $t=18.853, P<0.01$ );相关分析显示,PAC-1、CD62p 的阳性表达率分别与 HGB 和 HCT 呈负相关( $r=-0.257, P=0.001; r=-0.177, P=0.021; r=-0.262, P=0.001; r=-0.187, P=0.015$ ),与献血者年龄呈正相关( $r=0.237, P=0.002; r=0.242, P=0.002$ );以献血者为自变量、PAC-1 阳性表达率为因变量的单因素方差分析,差异有统计学意义。结论:单采活化是以 GP II b III a 构象改变暴露出纤维蛋白原结合位点为特征的血小板早期活化形式为主,而  $\alpha$  颗粒膜融合表达 CD62p 的晚期活化则处于较低的水平,且这 2 种活化形式存在正相关关系( $r=0.503, P<0.01$ );与活化百分率相关指标可以为献血者的筛查及单采血小板产品的合理处置提供参考;血小板单采 PAC-1 阳性表达存在个体差异,是献血者固有的血小板反应特性。

**[关键词]** 单采血小板;血小板活化;相关因素;个体差异

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.10.010

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A

## Platelet apheresis activation and individual differences

ZHANG Kaiwen<sup>1</sup> PAN Jie<sup>1</sup> YANG Wenping<sup>1</sup> HUANG Daobin<sup>1</sup>  
LI Lina<sup>1</sup> XU Yaya<sup>2</sup> CHEN Qi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Taizhou Central Blood Station, Taizhou, 318000, China; <sup>2</sup>Taizhou Central Hospital)

Corresponding author: ZHANG Kaiwen, E-mail: zhangkaiwenww@163.com

**Abstract Objective:** To study and understand the characteristics of platelet apheresis activation, analyze the related factors of platelet activation during apheresis, identify and verify individuals who were sensitive to activation induced by apheresis, and handle them rationally to reduce the frequency of platelet transfusion failure(PTR). **Methods:** Apheresis platelet samples from this station were randomly collected, labeled with PAC-1 and CD62p fluorescent antibodies and fixed with 1% formaldehyde within half an hour after getting off the machine, and then the activation percentage was detected on the machine in time, and the medical examination data, pre-donation screening data and apheresis data of the blood donors corresponding to the samples was collected. The collected data was statistically analyzed. **Results:** The positive expression rates of PAC-1 and CD62p were (35.3±23.5)% and (2.7±2.9)%, respectively. The paired t-test statistical analysis showed that the difference was statistically significant( $t=18.853, P<0.01$ ); correlation analysis showed that the positive expression rates of PAC-1 and CD62p were negatively correlated with HGB and HCT, respectively( $r=-0.257, P=0.001; r=-0.177, P=0.021; r=-0.262, P=0.001; r=-0.187, P=0.015$ ), positively correlated with the age of blood donors ( $r=0.237, P=0.002; r=0.242, P=0.002$ ); one-way ANOVA with blood donors as the independent variable PAC-1 positive expression rate as the dependent variable. It was statistically significant. **Conclusion:** Apheresis activation is mainly the early activation form of platelets characterized by the conformational change of GP II b III a exposing the fibrinogen binding site, while the late activation of  $\alpha$ -granule membrane fusion expressing CD62p is at a lower level, and there is a positive correlation between the two activation forms( $r=0.503, P<0.01$ ); the index related to the activation percentage can be used for the screening of blood donors and provide reference for the reasonable disposal of apheresis platelet product. There were individual differences in the positive expression of PAC-1 in platelet apheresis, which might be the inherent platelet reaction characteristic of blood donors.

\*基金项目:台州市科学技术局项目(No:20ywa62)

<sup>1</sup>台州市中心血站(浙江台州,318000)

<sup>2</sup>台州市中心医院

通信作者:张开文, E-mail: zhangkaiwenww@163.com

**Key words** apheresis platelet; platelet activation; related factors; individual differences

单采血小板由于数量多、纯度高等诸多优势已经越来越受到临床青睐,需求量也是与日俱增,但血小板输注无效(ineffective platelet transfusion, PTR)一直有着较高的发生率,在免疫性因素和非免疫性因素中,前者最被业界关注,开展各种血小板配型包括 HLA 配型<sup>[1]</sup>;然而活化的血小板寿命短疗效差,是血小板体内回收率和存活率的重要影响因素<sup>[2-3]</sup>,目前机采血小板储存活化损伤方面研究较多<sup>[4]</sup>,而机采血小板单采活化的特点和相关因素及献血者的个体差异目前国内外相关研究较少,本研究对这一问题进行探讨。

## 1 资料与方法

### 1.1 对象

随机收集我站献血者捐献的单采血小板样本 170 份(收集时间为 2021 年 6 月 10 日至 2021 年 7 月 31 日,每周不定期 2~3 d 收集当日全部样本),采集完成下机后立即混匀取样并在 30 min 内完成 FCM 样本制备。同时收集献血者体检数据(身高、体重、脉搏、血压、年龄、血小板捐献总次数、两次相邻血小板捐献间隔天数)、献血前筛查数据(WBC、HCT、HGB、ALT、PLT)、单采数据(循环血量、抗凝剂用量)与活化百分率进行统计分析。这些连续性变量均为正态分布。

### 1.2 试剂和设备

抗-PAC-1-FITC(批号 0349354,有效期至 2022-04-30,美国 BD BIOSCIENCE);同型对照(批号 9322641,有效期至 2022-08-31,美国 BD Pharmingen);抗-CD62p-FITC(批号 9273414,美国 BD Pharmingen);同型对照(批号 0030768,美国 BD Pharmingen);多聚甲醛(批号 abs9179,爱必信上海生物科技有限公司);单采血小板设备(MCS PLUS 美国血液技术公司,TRIMA 美国泰尔茂比司特公司,AMICUS 德国费森尤斯公司);流式细胞仪(FACSVia 美国 BD);血细胞计数仪(SYS-MEX XS-500i 日本希森美康公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 FCM 样本制备** 血小板单采完成下机后立即留样,无需稀释(合格成品单采血小板浓度约  $1 \times 10^6$  个/ $\mu\text{L}$ ,符合试剂公司推荐反应体系  $10^6$  量级细胞含量的要求,且 PAC-1 抗原抗体反应需要钙离子环境<sup>[5]</sup>,而 PBS 一般不能提供钙离子环境),取 2 只试管分别加入血小板原液 5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ,对应分别加入 5  $\mu\text{L}$  抗-PAC-1-FITC、10  $\mu\text{L}$  抗-CD62p-FITC 轻叩混匀室温避光反应 15 min(设立定时器),反应结束后立即加入 1%(2~8℃)的冷

多聚甲醛固定(甲醛固定后 48 h 内血小板活化情况维持稳定<sup>[6]</sup>),放置 2~8℃ 避光反应 10 min 后上机检测;用相同的方法制备同型对照样本备用。所有样本制备均在单采血小板下机后 30 min 内完成。

**1.3.2 FCM 检测** 用 BD Accuri C6 Software 软件对样本进行流式细胞术检测分析。设门策略:在流式散点图 FSC-SSC 中根据血小板形态圈出血小板群体,在血小板群体中看 FITC 通道的 PAC-1-FITC、CD62p-FITC 阳性表达量。检测 10 000 个血小板细胞,分析 PAC-1、CD62p 表达情况即活化百分率。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计学软件,对 PAC-1、CD62p 阳性表达率进行配对 *t* 检验以及描述性统计分析;对收集到多个样本的献血者活化数据作单因素方差分析;活化百分率与体检、筛查、单采数据分别作 Spearman 相关分析。

## 2 结果

### 2.1 FCM 检测

使用 PAC-1、CD62p FITC 染色流式细胞仪分析血小板活化状态,见图 1。

### 2.2 统计分析

对 PAC-1 和 CD62p 阳性表达率进行配对 *t* 检验分析( $t = 18.853, P < 0.01$ );PAC-1 和 CD62p 阳性表达率作描述性统计分析,分别为  $(35.3 \pm 23.5)\%$ 、 $(2.7 \pm 2.9)\%$ 。

### 2.3 表达 PAC-1 活化的个体差异

收集到多次捐献的 18 例捐献者数据,按 PAC-1 阳性表达率分为高反应组( $\geq 60\%$ )、中反应组( $< 60\%$ 且 $\geq 40\%$ )、低反应组( $< 40\%$ ),每组数据以其中最大者作分组依据,见表 1~3。其中有 13 例献血者在 TRIMA 上捐献双份血小板的 13 组活化数据和在 MCS PLUS 上捐献单份血小板的 5 例献血者(B、D、E、P、K)的 5 组活化数据,鉴于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<sup>[7]</sup>,对这 2 种机型的活化数据分别作单因素方差分析,结果为 TRIMA 组: $F = 6.445, P = 0.001$ ,组间均方(MSG) = 1242.472,组内均方(MSE) = 192.785;MCS PLUS 组: $F = 6.371, P = 0.024$ ,MSG = 1841.870.472, MSE = 289.124。

### 2.4 活化百分率与各变量进行 Spearman 双变量相关分析

分别将活化百分率与各变量进行 Spearman 双变量相关分析,见表 4。

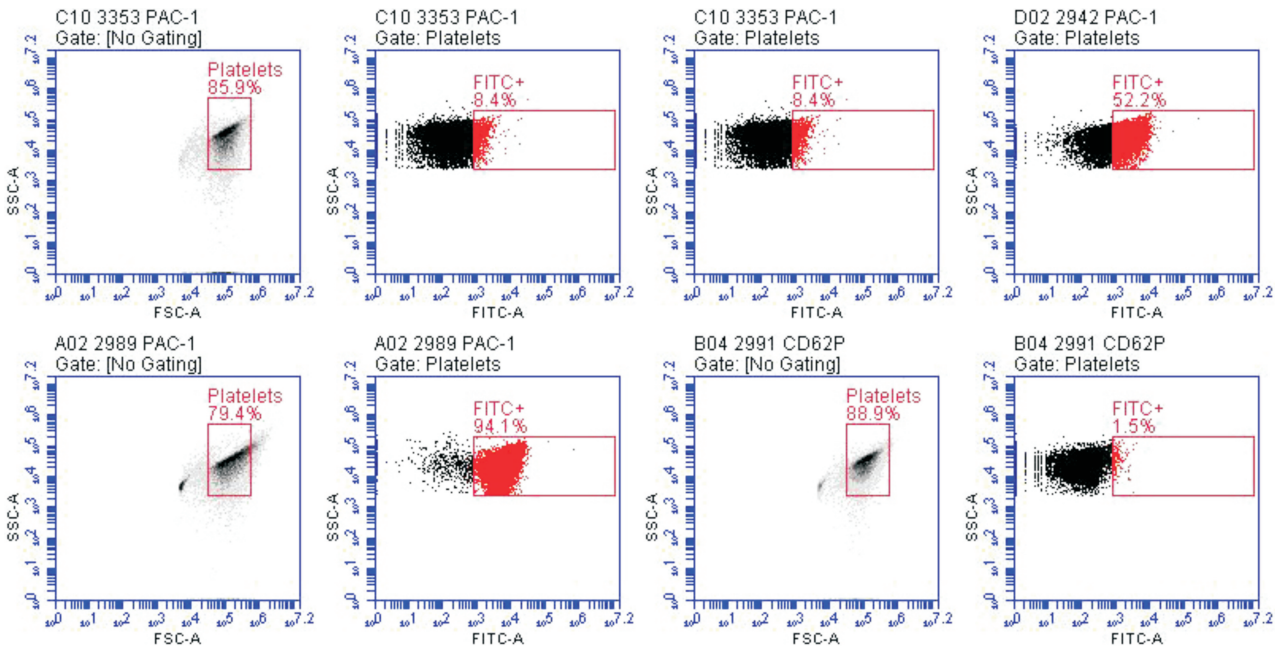


图 1 PAC-1、CD62p FITC 染色流式细胞仪分析血小板活化状态

表 1 高反应组阳性表达率 %

献血者	样本 1		样本 2		样本 3	
	PAC-1	CD62p	PAC-1	CD62p	PAC-1	CD62p
A	79.9	1.1	72.8	4.0	77.8	1.6
B	90.1	4.6	79.7	5.5	68.6	6.9
C	87.6	6.1	68.8	1.0		
D	81.9	2.3	71.0	1.8		
E	77.5	1.0	39.2	0.7		
F	72.1	3.6	47.4	2.2		

表 2 中反应组阳性表达率 %

献血者	样本 1		样本 2	
	PAC-1	CD62p	PAC-1	CD62p
N	54.0	2.6	22.3	0.5
O	21.4	0.6	52.1	7.1
P	45.7	2.7	14.8	0.9
Q	57.4	0.5	46.9	2.8
R	16.7	1.2	41.2	3.3

表 3 低反应组阳性表达率 %

献血者	样本 1		样本 2	
	PAC-1	CD62p	PAC-1	CD62p
G	17.9	1.2	5.2	0.7
H	29.1	1.2	9.7	0.2
I	28.1	3.0	1.9	0.3
J	35.2	2.4	26.4	1.8
K	24.5	1.2	2.9	2.4
L	13.8	0.3	6.0	0.8
M	27.4	1.0	8.4	0.7

表 4 Spearman 双变量相关分析结果

献血者	PAC-1		CD62p	
	r	P	r	P
CD62P	0.503	0		
身高	-0.121	0.116	-0.129	0.093
体重	-0.066	0.392	-0.026	0.739
脉搏	-0.125	0.105	0.032	0.683
收缩压	-0.001	0.986	0.132	0.086
舒张压	-0.064	0.406	0.038	0.624
年龄	0.237	0.002	0.242	0.002
总次数	-0.049	0.526	-0.020	0.793
间隔	0.031	0.689	0.093	0.226
WBC	0.125	0.105	0.048	0.538
HCT	-0.262	0.001	-0.187	0.015
HGB	-0.257	0.001	-0.177	0.021
ALT	-0.038	0.623	0.068	0.375
PLT	-0.051	0.510	0.029	0.705
循环血量	-0.229	0.003	0.041	0.599
抗凝剂	-0.229	0.003	0.030	0.698

总次数为血小板捐献者捐献血小板总次数;间隔为本次捐献与上次血小板捐献间隔天数。

### 3 讨论

循环血液里约 90% 以上的血小板处于静息状态,GP II b III a 受体和  $\alpha$  颗粒膜上的 P-选择素不表达或很少表达,GP II b III a 位于血小板膜内侧,当血小板活化变形后,GP II b III a 明显表达增多并发生分子构象改变,暴露出纤维蛋白原受体, $\alpha$  颗粒膜则与血小板外衣融合表达 CD62p<sup>[8]</sup>。由此可见血小板捐献者循环血液中绝大部分(90% 以上)血小板是不与 PAC-1 和 CD62p 抗体反应的静息状态血

小板<sup>[8-9]</sup>,而从本次流式细胞仪检测的数据看 PAC-1 阳性表达率为 $(35.3 \pm 23.5)\%$ ;CD62p 阳性表达率为 $(2.7 \pm 2.9)\%$ ,与傅晓岚等<sup>[6]</sup>研究结果相符,可见绝大多数单采血小板的活化程度都要高于其捐献者循环血液中的血小板,而且从 FSC 的情况可见看活化的细胞都是较大的细胞。

将 PAC-1、CD62p 阳性表达率进行配对 *t* 检验统计分析,结果  $t = 18.853, P < 0.01$ ,拒绝原假设认为两者的差异有统计学意义,且 PAC-1 和 CD62p 分别是血小板早期和晚期的活化标志物<sup>[10]</sup>,而且抗-PAC-1 抗体识别的位点位于纤维蛋白原受体上或紧邻纤维蛋白原受体,由此可知单采活化是以 GP II b III a 构象改变暴露出纤维蛋白原结合位点为特征的血小板早期活化形式为主(均值为 35.264%),而  $\alpha$  颗粒膜与血小板外衣融合表达 CD62p 的晚期活化则处于较低的水平(均值为 2.704%),且这 2 种活化形式存在正相关关系( $r = 0.503, P < 0.01$ )。由于配体结合 GP II b III a 的细胞膜外功能区,会导致血小板细胞膜整合蛋白 GP II b III a 簇集,同时整合蛋白细胞质内的功能区也发生构型改变,产生一系列信号,进而导致细胞骨架构型发生改变,颗粒分泌及促进凝聚活性,血小板活化<sup>[11]</sup>,因此纤维蛋白原与 GP II b III a 上的受体结合会进一步活化血小板,可能是这 2 种活化形式正相关的理论依据。

收集的数据中包含了同一献血者多次捐献的活化数据,从表 1~3 可以看出,献血者的 PAC-1 阳性表达率在一个区间内维持相对稳定的水平,即这种反应性随着时间的推移保持稳定<sup>[12]</sup>。18 例献血者捐献频次较高,一般都有固定的捐献习惯(坚持献单份或双份血小板甚至偏爱某台设备)且捐献双份血小板对捐献前的血小板基数有要求( $\geq 220 \times 10^9/L$ ),这也使得本研究各组数据均在相同机型下获得(双份在 TRIMA 采集,单份在 MCS PLUS 采集,AMICUS 仅 1 台设备也可采双份但使用频率低,本次仅收集到 2 份该机型样本)。由此将这 18 例多样本献血者的数据再按照其单采设备机型分组并分别作单因素方差分析,TRIMA 组和 MCS PLUS 组 PAC-1 阳性表达率的分析结果差异有统计学意义,且组间均方 MSG(1242.472, 1841.870)显示其组间变异非常大,而从较小的组内均方 MSE(192.785, 289.124)可以看出组内变异小而稳定,可见献血者个体作为自变量对 PAC-1 阳性表达率这一因变量是一个重要的影响因素,即单采 PAC-1 阳性表达存在个体差异。与 Garner 等<sup>[13]</sup>研究结果一致,根据献血者血小板体外对激动剂(ADP 等)的反应程度高低将血小板捐献者分为高反应组、中反应组、低反应组,由高反应组所采集的单采血小板对应有更高的活化水平,亦即有些

献血者体内的血小板对单采过程诱导的活化比其他人的更为敏感,是献血者固有的血小板反应特性。对单采过程敏感的献血者,有更多的血小板表达 GP II b III a 并发生构象改变暴露出纤维蛋白原结合位点(PAC-1 阳性表达率高),而与纤维蛋白原结合的血小板会迅速从受血者外周血中被清除<sup>[2]</sup>,因此,这样的单采血小板不适合预防性输注,更适合急性出血患者的快速止血<sup>[13]</sup>。因为个体的血小板反应性随时间推移是一致的<sup>[12,14]</sup>,所以应该对血小板捐献者进行筛查分类,对于高反应组建议用于急诊治疗,快速止血,而低反应组血小板则可用于储存备血,因为低活化水平相对易储存。有文献研究显示,单采血小板在采集这个时间点上的活化水平将是储存过程中持续活化的一个预测指标<sup>[15]</sup>。

各变量间的相关分析显示,血红蛋白和血细胞比容分别与 PAC-1 和 CD62p 阳性表达率呈负相关,可见血红蛋白偏低、血细胞比容低的献血者血小板更容易单采活化;另外,2 种活化形式均与年龄呈正相关,年轻人的血小板相对较不容易活化;PAC-1 阳性表达率还与机采循环血量、抗凝剂量的相关性有统计学意义;献血者血小板捐献总次数以及 2 次捐献间隔天数与活化百分率无相关性,这也与 Garner 等<sup>[13]</sup>研究结果一致。

本次研究的相关指标,多数在 0.01 水平上具有统计学意义,这其中是否存在某种机制还有待进一步研究,但这些相关性指标可以在献血者筛查和单采血小板的处置(如用于快速止血还是储存备血)方面为临床提供一个有意义的参考指标。同时也发现单采活化是以 GP II b III a 构象改变暴露出纤维蛋白原结合位点为特征的血小板早期活化形式为主,而且存在个体差异,可以根据这些个体差异将不同活化程度的单采血小板供给更合适的患者,从而减少 PTR 的发生率。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国医师协会输血科医师分会,中华医学会临床输血学分会.血小板抗体检测专家共识[J].临床输血与检验,2020,22(2):1-5.
- [2] Hughes DL, Evans G, Metcalfe P, et al. Tracking and characterisation of transfused platelets by two colour, whole blood flow cytometry[J]. Br J Haematol, 2005, 130(5):791-794.
- [3] Murphy S. Utility of in vitro tests in predicting the in vivo viability of stored PLTs[J]. Transfusion, 2004, 44(4):618-619.
- [4] 周明,陈洋,王敏,等.机采血小板储存损伤对临床疗效的影响[J].临床输血与检验,2019,21(2):129-133.

(下转第 743 页)

以上猜测。

综上所述,本研究通过本地区献血人群 41 例血清学 RHD 变异型基因多态性,初步了解其分布特征。对于出现定量缺陷的患者表达正常 D 抗原,尽管密度较低也可以安全地输注 RHD 阳性红细胞。相反,出现定性缺陷的患者表现出改变的 D 抗原,其特征在于没有一个或多个 D 表位,建议输注 D 阴性红细胞以防止同种异体免疫。尤其是不同 RHD 变异型在受血者、孕妇和献血者人群中应合理区别对待,为精准输血治疗及建立 RHD 变异型数据库提供样本来源及理论基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Souza Silva TC, Cruz BR, Costa SS, et al. RHD and RHCE molecular analysis in weak D blood donors and in patients with Rh antibodies against their own corresponding Rh antigen[J]. Blood Transfus, 2020, 18(4):295-303.
- [2] Westhoff CM, Nance S, Lomas-Francis C, et al. Experience with RHD\* weak D type 4.0 in the USA[J]. Blood Transfusion, 2019, 17:91-93.
- [3] 朱自严. 红细胞血型抗原的同种免疫[J]. 临床输血与检验, 2022, 24(1):1-5, 103.
- [4] Trucco Boggione C, Nogués N, González-Santesteban C, et al. Characterization of RHD locus polymorphism in D negative and D variant donors from Northwestern Argentina[J]. Transfusion, 2019, 59(10): 3236-3242.
- [5] 温机智,贾双双,廖志坚,等. 32 名 RhD 变异型献血者分子遗传背景研究[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(2): 154-157.
- [6] Gao M, Chen YP. The RhD variants in Chinese population[J]. Blood Genom, 2020, 4(1):31-38.
- [7] Yin Q, Srivastava K, Brust DG, et al. Transfusion support during childbirth for a woman with anti-U and the RHD\* weak D type 4.0 allele[J]. Immunohematology, 2021, 37(1):1-4.
- [8] 吴凡,梁爽,彭龙,等. 38 例血清学弱 D 表型献血者 RhCcEe 表型与 RHD 基因型检测情况分析[J]. 临床输血与检验, 2021, 23(5):632-639.
- [9] Thongbut J, Raud L, Férec C, et al. Comprehensive Molecular Analysis of Serologically D-Negative and Weak/Partial D Phenotype in Thai Blood Donors[J]. Transfus Med Hemother, 2020, 47(1):54-60.
- [10] Rupinder KB, Shaiji PS, Sehgal S. Testing for weak D Antigen; Spectrum and its applied role in rhesusnegative transfusions in Andaman and Nicobar Islands[J]. Tzu Chi Medical, 2020, 32(2):167-170.
- [11] 李菲,陈伟,李慧君,等. 新疆 RhD 阴性及其表型特点调查分析[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(2):126-129.
- [12] 王玉青,韩增林,张秀铮. RhD 阴性育龄妇女中 RHD1227A 基因型检测的临床意义[J]. 临床血液学杂志, 2020, 33(12):866-868.  
(收稿日期:2022-03-03 修回日期:2022-05-07)
- [5] Shattil SJ, Motulsky HJ, Insel PA, et al. Expression of fibrinogen receptors during activation and subsequent desensitization of human platelets by epinephrine[J]. Blood, 1986, 68(6):1224-1231.
- [6] 傅晓岚,陈兆珍,成晓玲,等. 流式细胞仪双色术检测机采血小板活化方法[J]. 第三军医大学学报, 2003, (18):1672-1673.
- [7] 姚勇,张欢欢,孙振超,等. 3 种血小板分离机采集血小板活化和功能的分析[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(2):127-129.
- [8] 夏薇,陈婷梅,王霄霞. 临床血液学检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2018:46-47.
- [9] 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.
- [10] 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, 44(11):779-782.
- [11] 李勇,李一. 实用血小板免疫生物学[M]. 北京:科学技术出版社, 2019:254-255.
- [12] Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, et al. Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals[J]. Blood, 2005, 106(8):2723-2729.
- [13] Garner SF, Jones CI, Stephens J, et al. Apheresis donors and platelet function: inherent platelet responsiveness influences platelet quality[J]. Transfusion, 2008, 48(4):673-680.
- [14] Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects[J]. Circulation, 2003, 108(8):989-995.
- [15] Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, et al. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage; a comparative flow cytometric study of different production methods[J]. Br J Haematol, 1997, 98(1):86-95.  
(收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-06-19)

(上接第 738 页)