

# 不同储存条件及不同样本类型对血样中 sCD40L 浓度分析的影响\*

蒋玉倩<sup>1</sup> 高昂<sup>2</sup> 王雅茹<sup>2</sup> 任晓艳<sup>2</sup> 姜媛媛<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探究不同储存条件及不同样本类型对血样中可溶性白细胞分化抗原 CD40 配体(sCD40L)浓度的影响,为临床更精确检测 sCD40L 提供保障。方法:随机选取正常人的血浆和血清标本,分别在 4℃ 和室温下储存 0、2、4、8、16、24、36、48 h,利用 ELISA 方法检测其中 sCD40L 的表达水平。结果:室温及 4℃ 条件下,血清中 sCD40L 浓度显著高于其血浆中 sCD40L 浓度( $P < 0.05$ );4℃ 条件下,同一检测者血浆和血清中 sCD40L 浓度随放置时间变化差异无统计学意义( $P > 0.05$ );室温条件下,血浆内 sCD40L 浓度随放置时间延长而升高,血清中 sCD40L 浓度随时间变化先升高再降低。结论:sCD40L 作为人体一种重要的炎性因子,在其精确检测的过程中,要确定待检标本是血清或血浆及不同的储存时间。

**[关键词]** sCD40L;血小板;ELISA;浓度分析

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2023.12.011

**[中图分类号]** R446.11 **[文献标志码]** A

## Effects of different storage conditions and different sample types on concentration analysis of sCD40L in blood samples

JIANG Yuqian<sup>1</sup> GAO Ang<sup>2</sup> WANG Yaru<sup>2</sup> REN Xiaoyan<sup>2</sup> JIANG Yuanyuan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, 210000, China; <sup>2</sup>Department of Blood Transfusion, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University)

Corresponding author: JIANG Yuanyuan, E-mail: jyy6616@163.com

**Abstract Objective:** To explore the effects of different storage conditions and different sample types on the concentration of soluble leukocyte differentiation antigen CD40Ligand(sCD40L) in blood samples, so as to provide guarantee for more accurate clinical detection of sCD40L. **Methods:** Normal plasma and serum samples were randomly selected and stored at 4℃ and room temperature for 0, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48 h, respectively. The expression level of sCD40L was detected by ELISA. **Results:** At room temperature and 4℃, serum sCD40L concentration was significantly higher than plasma sCD40L concentration( $P < 0.05$ ). At 4℃, sCD40L concentration in plasma and serum of the same test subjects had no significant difference with the time of placement( $P > 0.05$ ). At room temperature, plasma sCD40L concentration increased with time, while serum sCD40L concentration first increased and then decreased with time. **Conclusion:** sCD40L is an important inflammatory factor in human body. In the process of its accurate detection, it is necessary to determine whether the specimen to be tested is serum or plasma and the different storage time.

**Key words** sCD40L; platelets; ELISA; concentration analysis

白细胞分化抗原 CD40 配体(CD40L)及其受体 CD40 属于肿瘤坏死因子(TNF)和 TNF 受体家族的一对共刺激分子,CD40L 分子通过其受体 CD40 发出 CD40L 信号在适应性免疫反应中起着重要作用,包括抗体产生、生发中心形成和胸腺选择<sup>[1-2]</sup>。CD40L 是一种跨膜分子,CD40L 主要由 T

淋巴细胞和血小板表达,膜结合 CD40L 通过基质金属蛋白酶 MMP2 和 MMP9 水解<sup>[3]</sup>,以可溶性 CD40L(sCD40L)的形式释放,虽然 T 细胞和血小板在激活时都具有释放 sCD40L 的能力,但循环中高达 95% 的 sCD40L 都来源于血小板<sup>[4-5]</sup>。sCD40L 作为血小板活化及心血管疾病预后的重要标志,具有重要的诊断价值<sup>[6-7]</sup>。

本实验通过随机抽取健康人血液,吸取血浆和血清,利用 ELISA 学方法探究不同储存温度及存放时间是否对样本中 sCD40L 的检测产生影响,为临床相关血小板活化及其心血管疾病预后等方向

\*基金项目:南京市卫健委一般性课题项目(No: YKK21155)

<sup>1</sup>南京医科大学附属儿童医院检验科(南京,210000)

<sup>2</sup>南京医科大学附属儿童医院输血科

通信作者:姜媛媛,E-mail:jyy6616@163.com

提供更科学、准确的指导依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器及试剂

化学发光检测仪,多功能洗板机,低速涡旋振荡仪,温育箱,sCD40L 原装进口试剂,96 孔 ELASE 空白包被板,双蒸去离子水。

### 1.2 健康人血浆、血清标本采集以及处理

抽取健康人(共 6 例)早晨空腹血浆及非血浆各 9 份,其中 1 份立马离心取血浆及血清,剩余 8 份,每份一分为二,分为室温组和 4℃ 组,每隔 0、2、4、8、16、24、36、48 h 对 4 组标本进行离心处理(4 000 r/min,离心 10 min),取血浆及上清进行 sCD40L 浓度检测。

### 1.3 ELISA 检测板的预处理

对冷藏试剂进行室温复温;对标准品进行倍比稀释后备用;板条各孔加入 300 μL 洗液,浸泡 30 s 处理。

### 1.4 ELISA 方法对血浆/血清标本的检测

①标准品孔加入 100 μL 倍比稀释的标准品,空白孔加入 100 μL 标准品稀释液,样本孔加入 80 μL 检测缓冲液和 20 μL 血浆或血清样本。然后每孔各加入 50 μL 1 : 100 稀释的检测抗体。以上步骤在 15 min 内完成。封膜,室温孵育 2 h;②按照板条准备里的步骤进行洗板,洗涤 6 次;③洗涤完成后,每孔各加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(1 : 100 稀释)。封膜后室温孵育 45 min;④按照板条准备里的步骤进行洗板,洗涤 6 次;⑤洗涤完成后,在避光条件下,每孔迅速加入 100 μL 显色底物,室温孵育 5~30 min 即可;⑥每孔立即加入 100 μL 终止液;⑦30 min 内,利用紫外分光光度计 450 nm 波长检测各孔 A 值,参考波长为 570 nm。

### 1.5 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。各组不同时间点所测 A 值,以  $\bar{X} \pm S$  表示。组内不同时间点所测 A 值均与立即检测组进行比较,组间同一时间点所测 A 值相互比较,均采用配对 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

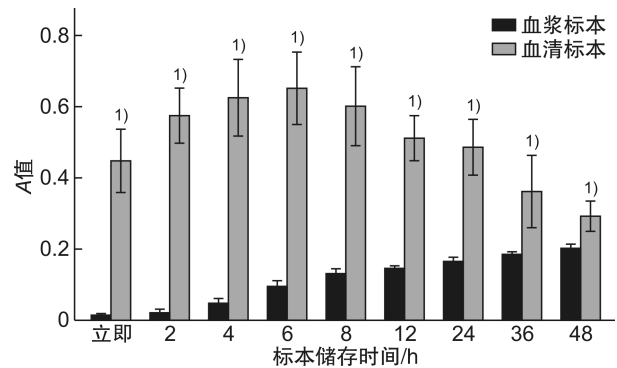
## 2 结果

### 2.1 不同储存温度对血清与血浆标本中 sCD40L 浓度的影响

通过比较同一人血标本,血清中 sCD40L 浓度显著高于血浆中 sCD40L 浓度,见图 1、2。

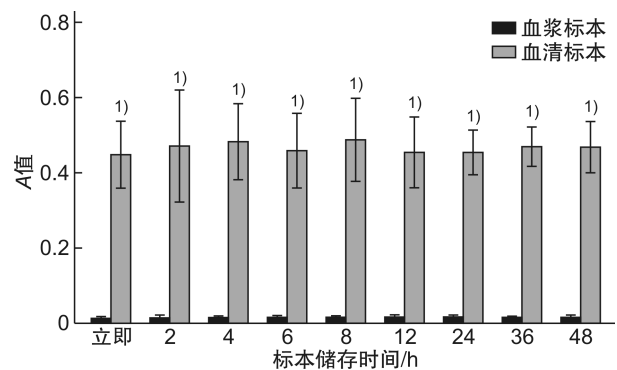
### 2.2 不同储存时间对血清与血浆标本中 sCD40L 浓度的影响

通过对同一人血标本,在 4℃ 保存条件下,血清和血浆中 sCD40L 浓度随保存时间延长变化不大,差异无统计学意义,见表 1。



与血浆标本比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 室温储存条件下血浆与血清标本中 sCD40L 差异对比



与血浆标本比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 4℃ 储存条件下血浆与血清标本中 sCD40L 差异对比

### 2.3 不同储存条件下血清与血浆标本中 sCD40L 浓度变化趋势

通过对同一人血标本,在室温保存条件下,血清中 sCD40L 浓度随时间变化先升高再降低,血浆中 sCD40L 浓度随保存时间延长而升高,见图 1。

## 3 讨论

血小板在凝血和止血系统中起着非常重要的作用,而 CD40L 作为重要的炎症和亲血栓介质,在血小板的活化过程中发挥着关键性作用<sup>[8-9]</sup>。从实验结果来看,我们对同一人抗凝血和非抗凝血之间 sCD40L 含量做了对比,发现在非抗凝血中 sCD40L 的含量明显高于抗凝血中含量,由此猜测,在非抗凝血中可能存在血小板的活化,进而引起 sCD40L 的释放增加,对真正因自身炎症反应而引起 sCD40L 含量的测定有一定误导作用。血小板是炎症反应的关键介质,活化的血小板可表达 P 选择素、CD40 及 CD40L,其可作为血小板激活的指标<sup>[10-11]</sup>。相较于室温,4℃ 储存条件下,抗凝血 sCD40L 含量随时间变化无显著性差异,因由低温条件下血小板活化减缓所致<sup>[12-14]</sup>。近几年较多专家和学者提出 4℃ 保存血小板的可实施性<sup>[15-18]</sup>,利用较低的温度延长血小板的保存有效期,同时有助于降低因输注高活化程度的血小板引发的血小板输注无效症,本次结果亦为此提供了佐证。

表 1 不同温度储存条件下,血浆及血清中 sCD40L(测量 A 值)随时间变化差异

 $\bar{X} \pm S$ 

不同时间	室温保存血浆标本	室温保存血清标本	4℃保存血浆标本	4℃保存血清标本
对照组(0 h)	0.015±0.003	0.448±0.090	0.015±0.003	0.448±0.090
2 h	0.022±0.008	0.574±0.076	0.017±0.004	0.475±0.144
4 h	0.047±0.013 <sup>1)</sup>	0.625±0.107	0.017±0.002	0.484±0.101
6 h	0.097±0.015 <sup>1)</sup>	0.652±0.102	0.017±0.003	0.461±0.098
8 h	0.133±0.013 <sup>1)</sup>	0.603±0.111	0.016±0.001	0.489±0.109
12 h	0.148±0.006 <sup>1)</sup>	0.512±0.062	0.018±0.004	0.454±0.095
24 h	0.166±0.010 <sup>1)</sup>	0.486±0.079	0.018±0.003	0.457±0.057
36 h	0.189±0.003 <sup>1)</sup>	0.362±0.101	0.018±0.001	0.473±0.050
48 h	0.202±0.012 <sup>1)</sup>	0.292±0.041	0.018±0.003	0.472±0.067

与对照组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

由此可见如何高效并准确地检测血浆中 sCD40L 的水平至关重要。从本实验结果分析,室温条件下,随着储存时间延长,血小板被不断激活,释放到血浆中的 sCD40L 浓度增加<sup>[19-21]</sup>,不建议作为 sCD40L 检测标本的常规处理条件;在 4℃条件下,利用常规离心力及离心时间获取的血浆标本中 sCD40L 浓度在 48 h 内变化不明显,可作为 sCD40L 检测标本的常规处理条件,虽与部分报道不完全一致<sup>[22]</sup>,但综合分析后,推断可能和选取标本检测时间点的长短有关。

综上所述,本实验通过 ELISA 方法,检测不同储存条件及不同样本类型中 sCD40L 浓度并对其分析,为临床科室高效精确地检测 sCD40L 水平变化提供了可靠的依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Alaaeddine N, Hassan GS, Yacoub D, et al. CD154: an immunoinflammatory mediator in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 490148.
- [2] Patoulias D, Stavropoulos K, Imprialos K, et al. Inflammatory markers in cardiovascular disease; lessons learned and future perspectives[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2021, 19(3): 323-342.
- [3] Henn V, Steinbach S, Büchner K, et al. The inflammatory action of CD40Ligand(CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40[J]. Blood, 2001, 98(4): 1047-1054.
- [4] Jensen J, Krakauer M, Sellebjerg F. Increased T cell expression of CD154(CD40-ligand) in multiple sclerosis[J]. Eur J Neurol, 2001, 8(4): 321-328.
- [5] Antoniadis C, Bakogiannis C, Tousoulis D, et al. The CD40/CD40Ligand system; linking inflammation with atherothrombosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(8): 669-677.
- [6] Aloui C, Prigent A, Sut C, et al. The signaling role of CD40Ligand in platelet biology and in platelet component transfusion[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12):

22342-22364.

- [7] Tascanov MB. May cystatin-c be associated with post-myocardial infarction complications? [J]. Ann Clin Anal Med, 2019, 10(1): 358-368.
- [8] Hassan GS, Merhi Y, Mourad W. CD40Ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases[J]. Immunobiology, 2012, 217(5): 521-532.
- [9] Seigner J, Basilio J, Resch U, et al. CD40L and TNF both activate the classical NF-κB pathway, which is not required for the CD40L induced alternative pathway in endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 1389-1394.
- [10] 原达, 朱国斌. 血小板 P 选择素及 CD40/CD40L 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2021, 42(10): 928-932.
- [11] Scheinowitz M, Pakala R, Ben-Dor I, et al. Platelet reactivity in diabetic patients subjected to acute exercise stress test[J]. Cardiovasc Revasc Med, 2011, 12(1): 20-24.
- [12] 潘宗岱, 薛静, 孙士鹏, 等. 血小板及其衍生物的保存方案和应用进展[J]. 临床血液学杂志, 2022, 35(12): 900-904.
- [13] 姚勇, 张欢欢, 孙振超, 等. 单采血小板保存期内活化状态及相关功能和代谢指标检测及分析[J]. 中国输血杂志, 2021, 34(2): 120-123.
- [14] 李文娟, 何芮, 尹湧华, 等. 4℃冷藏保存血小板的储存损伤与应用研究进展[J]. 中国输血杂志, 2021, 34(8): 926-930.
- [15] Wu XW, Darlington DN, Montgomery RK, et al. Platelets derived from fresh and cold-stored whole blood participate in clot formation in rats with acute traumatic coagulopathy[J]. Br J Haematol, 2017, 179(5): 802-810.
- [16] 罗娜维. 机采血小板保存期内血小板损伤与输注效果的相关性[J]. 临床医学, 2021, 41(6): 47-49.
- [17] Stubbs JR, Tran SA, Emery RL, et al. Cold platelets for trauma-associated bleeding: regulatory approval, accreditation approval, and practice implementation—just the "tip of the iceberg"[J]. Transfusion, 2017, 57(12): 2836-2844.

(下转第 901 页)

- 4(30):136-137.
- [14] 冯晨晨,肖建宇,史丽莉,等. 误判 O 型的疑难血型鉴定及安全输血策略的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2021,29(3):910-916.
- [15] 曹璐. 基于微柱玻璃珠技术的全自动血型分析仪在新生儿血型检测中的应用[J]. 天津医科大学学报, 2019,25(2):171-172.
- [16] Heo WY, Chung YN, Kim TY, et al. Analysis of ABO grouping discrepancies among patients from a tertiary hospital in Korea [J]. *Transfus Apher Sci*, 2021, 60(6):103230.
- [17] 雷航,范亮峰,蔡晓红,等. 中国人群血型 ABO 亚型的分子基础研究[J]. 诊断学理论与实践, 2020,19(4):364-369.
- [18] 谢惠益,周载鑫,杨玥,等. 抗-M 抗体影响血型鉴定及对临床输血的影响[J]. 临床输血与检验, 2022, 24(6):716-720.
- [19] 许亚莉,刘孟,张瑞宁,等. 高效价抗-M 抗体对血型鉴定的影响及解决策略[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(12):878-881.
- [20] 王晓茜,马春娅,于洋. 抗-M 致血型正反定型不符及交叉配血不合 1 例报告[J]. 北京医学, 2020,42(6):552-553.
- [21] 王雅茹,李萌,何婷,等. ABO 血型 B 抗原减弱分子生物学及家系分析[J]. 临床血液学杂志, 2021,34(8):583-585.
- [22] 陈萍,张水木,雷航,等. 血清学鉴定与基因检测互补验证 ABO 疑难血型的应用探讨[J]. 诊断学理论与实践, 2020,19(1):69-73.
- [23] 林秋燕,张进萍,黄震宇,等. ABO 疑难血型的基因型鉴定与序列分析[J]. 中国输血杂志, 2023,36(1):8-10.
- [24] 苏蔓,赵倩,郭霞,等. ABO 等位基因新变异引起正反定型不符 2 例[J]. 临床输血与检验, 2021,23(4):527-529.
- [25] 潘英芳,邵静茹,周娜,等. 围产期孕妇检出罕见 Cis-AB 血型及其备血策略探讨[J]. 临床血液学杂志, 2023,36(4):283-287.

(收稿日期:2023-08-23)

(上接第 895 页)

- [18] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage [J]. *Transfusion*, 2013, 53(7):1520-1530.
- [19] 李玮,谢如锋,任亚娜,等. 库存血小板血浆中 sCD40L 含量变化及其对 PMNs 呼吸爆发的作用[J]. 中国输血杂志, 2013,26(5):430-434.
- [20] Damien P, Cognasse F, Eyraud MA, et al. LPS stimulation of purified human platelets is partly dependent on plasma soluble CD14 to secrete their main secreted product, soluble-CD40-Ligand [J]. *BMC Immunol*, 2015,16(1):3.
- [21] 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):5.
- [22] 常远,高伟,田冰,等. 对血浆中 sCD40L 的诊断分析[J]. 健康大视野, 2021,(8):210.

(收稿日期:2023-06-13)