

柠檬酸洗脱血小板表面 HLA-Ⅰ类抗原的效率和対血小板功能的影响*

杨冬梅,程 福,王 洁,杨 倩,杨 莉,黄远帅[△]

(西南医科大学附属医院输血科,四川泸州 646000)

[摘要] 目的 探讨柠檬酸洗脱血小板表面 HLA-Ⅰ类抗原的效率和対血小板功能的影响。方法 用 pH=3 柠檬酸 0℃处理血小板。流式细胞仪分析血小板表面 HLA-Ⅰ类抗原和 CD62P 抗原的表达,血细胞分析仪检测血小板质量指标,显微镜和血细胞计数池下观察血小板的形态,分光光度计评估血小板的低渗休克反应(HSR)。结果 柠檬酸能洗脱接近 80%的 HLA-Ⅰ类抗原,血小板活化标志物 CD62P 的表达率从(4.17±3.54)%增至(8.88±5.70)%。酸处理的平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)分别从(8.59±0.84)、(8.66±0.53)增加至(11.30±0.73)、(11.26±0.83),镜下血小板没有明显的聚集,HSR 显示血小板质量降低。结论 柠檬酸能有效洗脱血小板表面的 HLA-Ⅰ类抗原,有望作为体内含有 HLA 抗体患者的紧急输血备选方案之一。

[关键词] HLA 抗原;血小板;输注;静脉内;无效血小板;酸处理

[中图法分类号] R446.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0969-04

Efficiency of citric acid for eluting HLA-Ⅰ antigens in platelets surface and its influence on platelet function*

YANG Dongmei, CHENG Fu, WANG Jie, YANG Qian, YANG Li, HUANG Yuanshuai[△]

(Department of Blood Transfusion, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the efficiency of citric acid for eluting HLA-Ⅰ antigens on platelets (PLTs) surface and its influence on PLT function. **Methods** PLTs were treated by pH=3 citric acid in 0℃. The expressions of HLA-Ⅰ antigens and CD62 antigen on the surface of PLTs were analyzed by using the flow cytometry. The PLT quality indicators and PLT morphology were examined by blood cell analyzer and microscope respectively. The hypotonic shock response (HSR) of PLTs was assessed by spectrophotometer. **Results** Citric acid could elute 80% of HLA-Ⅰ antigens. The expression of PLT activation marker CD62P was increased from (4.17±3.54)% to (8.88±5.70)%. MPV and PDW by acid treatment were increased from (8.59±0.84) and (8.66±0.53) to (11.30±0.73) and (11.26±0.83) respectively. PLTs had no obvious aggregation under microscope. HSR showed that the PLT quality was slightly decreased. **Conclusion** Citric acid can effectively elute HLA-Ⅰ antigens on the surface of PLTs, which is expected to be one of the emergency blood transfusion options for patients with HLA antibodies in vivo.

[Key words] HLA antigen; platelet; infusions, intravenous; ineffectiveness platelet; acid treatment

许多患者在输注充足剂量的血小板后,其未见有效地提升,有时甚至下降,临床出血未明显的改善,此为血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)^[1]。PTR 的原因基本可归结为非免疫因素和免疫因素^[2-4],非免疫因素主要是感染、发烧、脾功能亢进素,免疫因素为患者体内产生抗人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)和抗人血小板抗原(human platelet antigen, HPA)的抗体。据相关报道^[5],引起 PTR 的血小板同种抗体中 80%为 HLA 抗体。针对产生 HLA 抗体的患者,最佳的方法是输注 HLA 相合的血小板^[5]。但是在实际的临床工作中,常常难以获得和患者 HLA 相合的血小板。

早在 20 世纪 80 年代,不少研究报道柠檬酸可以处理血小板表面 HLA-Ⅰ抗原^[6-7]。近期又有学者提出^[8-10],pH=3 的柠檬酸可以洗脱血小板表面的 HLA-Ⅰ抗原,但是关于洗脱效率、对血小板功能的影响及洗脱的条件,不同的研究有所不同。本研究探讨柠檬酸洗脱血小板表面 HLA-Ⅰ类抗原的效率和対血

* 基金项目:学院自然科学基金(2014ZD-017)。 作者简介:杨冬梅(1992—),检验技师,在读硕士,主要从事临床输血研究。 △ 通信作者, E-mail: hys@live. cn.

小板功能的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有的血小板均来自四川省泸州市中心血站。献血者符合国家规定的献血者标准,均为提前 1 d 准备的新鲜血小板。每次实验前,用血球分析仪进行计数,验证其白细胞残留量、红细胞残留量、血小板数分别达到国家质量标准。其中性别、年龄、血小板计数差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 主要仪器与试剂 流式细胞分析仪(FACS-CANTO II,美国 BD 公司);722 分光光度计(棱光,上海精密科学仪器有限公司制造);光学显微镜(BX50,日本 Olympus 公司);血细胞分析仪(BC-6800,美国 Mindray 公司);血小板恒温振荡保存箱(山江电子科技);血细胞计数池(上海市求精生化试剂仪器有限公司);藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人 CD62P 抗体(批号:555749,美国 BD 公司);异硫氰荧光素(FITC)标记的鼠抗人 HLA-ABC 抗体(批号:555748,美国 BD 公司);FITC 标记的鼠抗人 IgG1 同型对照抗体(批号:555742,美国 BD 公司),PE 标记的鼠抗人 IgG1 同型对照抗体(批号:555749,美国 BD 公司);含 1%胎牛血清清蛋白(BSA)的 pH=3 的柠檬酸缓冲液;PBS 缓冲液。

1.3 方法

1.3.1 柠檬酸缓冲液的配制 pH=3 的柠檬酸缓冲液由等体积的 0.263 mol/L 柠檬酸和 0.123 mol/L Na_2HPO_4 配制而成,其中含 1% BSA,pH 计滴定微调,置于 50 mL 的无菌容器备用。

1.3.2 酸处理血小板 按照析因设计优化试验条件。反应时间 3 个水平(5、10、15 min),柠檬酸与标本的体积比($V_1:V_2$)5 个水平(5:1、4:1、3:1、2:1、1:1),每种组合重复 2 次。参考文献[8,11]的方法进行了部分改进。取 500 μL 浓缩血小板悬液(约含 5×10^8 个血小板)于试管中,离心(10 min,1 500 g),弃上清液,加入一定量的酸溶液,置于冰上 0℃反应一定的时间。加入过量 PBS 中止反应,后立即离心(10 min,1 500 g)洗涤血小板,最后将其重悬于乏血小板血浆(platelet poor plasma,PPP)。

1.3.3 血小板质量与功能的改变 析因设计选择的最佳实验条件处理血小板作为试验组,用 PBS 代替柠檬酸处理血小板作为对照,未处理为空白对照,进行如下质量与功能的检测。(1)血细胞分析仪上检测各组血小板计数、平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)。(2)取处理后的血小板 10 μL 于牛鲍计数板冲池,观察是否有大血小板及是否有聚集,同时革兰染色镜检。(3)使用 722 分光光度计,参考血小板聚集仪的检测原理^[12],检测血小板的低渗休克反应

(HSR),记录样本透光率的变化。样本最大透光率记录为 T_{MAX} ,透光率平衡后的最小样本透光率记录为 T_{MIN} ;另一测试杯中加入 PBS,记录为 T_{PBS} 。 $\text{HSR} = (T_{\text{MAX}} - T_{\text{MIN}}) / (T_{\text{MAX}} - T_{\text{PBS}}) \times 100\%$ 。

1.3.4 检测血小板表面 HLA-I 抗原及 CD62P 抗原

根据前向散射角(FCS)和侧向散射角(SSC)确定待检细胞群,确定血小板的检测范围。检测平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)的变化。取血小板 100 μL (约含血小板 1×10^6 个)置于试管中,加入 PE 标记的 CD62P 抗体、FITC 标记的 HLA-I 抗体各 20 μL ,同型对照管加入 PE、FITC 标记的鼠抗人 IgG 各 20 μL ,室温闭光孵育 30 min,加入 400 μL PBS,上机检测各组血小板表面 HLA-I 抗原和 CD62P 抗原。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析及 t 检验,多组间采用单因素方差分析。利用 GraphPad prism 5.0 软件进行绘图。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 析因设计 反应时间的延长并不会提高 HLA-I 类抗原的洗脱效率($P>0.05$),柠檬酸与血小板体积比为 5:1 时才能有效洗脱血小板表面的 HLA-I 类抗原($P<0.05$),见图 1。

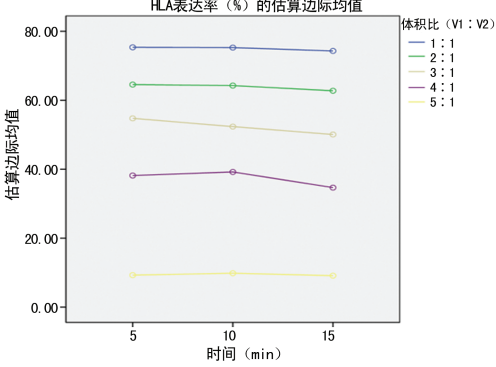


图 1 不同反应条件血小板表面 HLA-I 抗原表达率

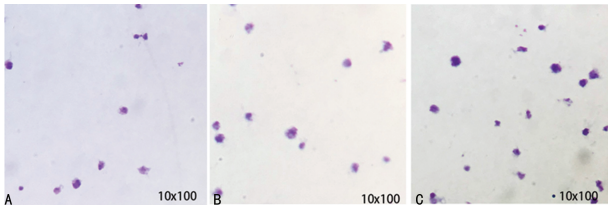
2.2 血小板常规质量指标 3 组血小板数量上的差异无统计学意义($P>0.05$)。PBS 和酸处理后的血小板 MPV、PDW 均高于未处理组($P<0.01$),酸处理组变化更明显($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组血小板常规质量指标比较($\bar{x}\pm s$)

指标	未处理组	PBS 处理组	酸处理组
血小板计数($\times 10^9/\text{L}$)	82.50 $\pm$ 7.99	77.60 $\pm$ 4.38	78.60 $\pm$ 5.54
MPV(fl)	8.59 $\pm$ 0.84	9.69 $\pm$ 0.79	11.30 $\pm$ 0.73
PDW(%)	8.66 $\pm$ 0.53	9.53 $\pm$ 0.73	11.26 $\pm$ 0.83

2.3 血小板形态 显微镜下见牛鲍计数板中的各组血小板散在分布,未见明显聚集。酸处理的血小板体

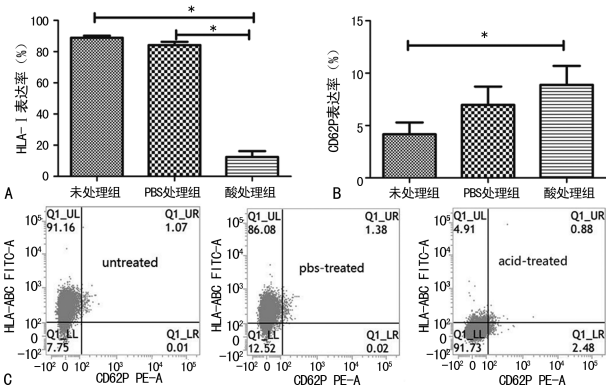
积稍有增大,染色稍深,见图 2。



A:未处理组;B:PBS 处理组;C:酸处理组

图 2 各组血小板涂片革兰染色

2.4 HLA-Ⅰ类抗原及 CD62P 抗原的表达 与未处理组比较,酸处理组 HLA-Ⅰ 表达率从 $(88.86 \pm 4.37)\%$ 降至 $(12.44 \pm 11.91)\%$ ($P < 0.01$),而 CD62P 的表达率从 $(4.17 \pm 3.54)\%$ 增至 $(8.88 \pm 5.70)\%$ ($P > 0.05$),见图 3。



A:各组 HLA-Ⅰ 类抗原表达率;B:各组 CD62P 的表达率;C:流式细胞图;*: $P < 0.05$

图 3 HLA-Ⅰ 类抗原及 CD62P 抗原的表达

2.5 血小板 HSR 酸处理组 HSR $(51.65 \pm 6.56)\%$ 较未处理组 $(62.05 \pm 8.14)\%$ 降低 ($P < 0.01$),与 PBS 处理组 $(54.95 \pm 6.32)\%$ 相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 4。

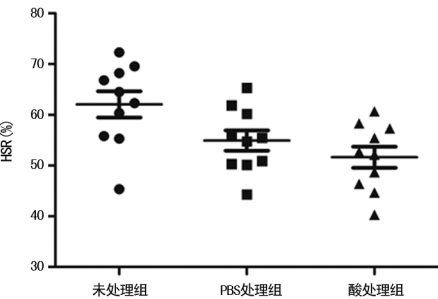


图 4 各组血小板 HSR 情况

3 讨 论

PTR 目前仍然是临床上一个严峻的问题,而 HLA-Ⅰ 类抗原是引起免疫相关的 PTR 的主要原因^[13]。虽然最佳的做法是输注 HLA 相配合的血小板,但是由于 HLA 分型成本高且费时^[14],目前还没有建立一个完整的 HLA 分型库,对 HLA-Ⅰ 类抗原引起的 PTR,研究一种新的方法作为其紧急输血策

略,完善临床输血非常重要。本试验一方面评估柠檬酸能否有效处理血小板表面的 HLA-Ⅰ 类抗原,另一方面通过评估该处理技术是否引起血小板形态及功能的改变,验证该技术的可行性。

按照析因设计的原理和方法,对影响试验结果的各个因素进行多水平重组分析,检测 HLA-Ⅰ 类抗原表达率的变化,发现反应时间并不会影响血小板表面抗原的表达率,而只有在 V1 : V2 为 5 : 1 的时候,柠檬酸洗脱血小板表面 HLA-Ⅰ 类抗原的效率最大。故考虑 pH=3,反应时间 5 min,反应体积 5 : 1 为最佳试验条件,以此作为试验组的反应条件。

本研究显示柠檬酸能有效洗脱血小板表面的抗原,与近期的研究结果一致^[8,15]。CD62P 是血小板活化的重要标志物之一,既往研究^[11]提示血小板在酸处理后活化明显增高。但在本研究中,血小板 CD62P 的表达只是稍有增高,推测既往的高活化水平一方面是试验的标本不是新鲜血小板,自身活化偏高,另一方面是酸作用的时间过长及终止反应不彻底。因为 HOLME^[16]的研究表明,当血小板 pH 值较低时,血小板的形态和功能将出现不可逆的损伤。

通过对血小板常规指标的分析,发现 3 组血小板计数的差异无统计学意义,酸处理组和 PBS 处理组 MPV 和 PDW 均高于未处理组 ($P < 0.05$),推测离心、洗涤等一系列操作步骤和柠檬酸的共同作用导致 MPV 和 PDW 的改变。镜下观察酸处理的血小板,体积稍有增大,染色较深,但没有聚集现象。MPV 和 PDW 的改变提示血小板质量的下降和存储损伤^[17-18],而血小板形态的改变,可能会缩短血小板体内的循环时间,进而影响血小板的回收率和存活率。

HSR 是血小板在低渗环境中体积膨胀之后,再恢复其正常体积的能力,反映血小板的体外功能及质量,是反映血小板回收率和存活率较好的指标^[19]。与血小板形态的改变结果一致,酸处理后的 HSR 低于未处理组 ($P < 0.05$)。说明酸处理会影响血小板的质量,但与文献^[20]相比较,HSR 值不算太低,故考虑酸处理后的血小板仍有应用于临床的价值。

综上所述,酸处理能有效洗脱血小板表面的 HLA-Ⅰ 类抗原,洗脱率高达 80%,血小板活化增加,MPV、PDW 稍增高,HSR 值降低,所以笔者认为酸洗脱血小板这一技术对血小板质量的影响尚可接受,针对 HLA-Ⅰ 类抗原引起的 PTR,有望将酸洗脱血小板作为其紧急输血的备选方案之一。今后的试验,一方面需要继续优化和改进酸处理这项技术,减少复温、离心、振荡等操作对血小板的损伤,建议操作步骤尽量流畅,不要室外放置过久。另一方面,补充相关试验,完善对血小板聚集、分泌、黏附、释放、代谢功能的

研究,全面评价该技术的临床可行性、有效性、切实性,为临床提供切实可靠的依据。

参考文献

- [1] STANWORTH S J, NAVARRETE C, ESTCOURT L, et al. Platelet refractoriness--practical approaches and ongoing dilemmas in patient management[J]. Br J Haematol, 2015, 171(3): 297-305.
- [2] 杨乾坤. 多次输血患者血小板抗体检测与血小板输注疗效相关性研究[J]. 中国输血杂志, 2017, 40(12): 1363-1365.
- [3] VASSALLO R R. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients[J]. Immunohematology, 2009, 25(3): 119-124.
- [4] SLICHTER S J, DAVIS K, ENRIGHT H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients[J]. Blood, 2005, 105(10): 4106-4114.
- [5] HOD E, SCHWARTZ J. Platelet transfusion refractoriness[J]. Br J Haematol, 2008, 142(3): 348-360.
- [6] CASTRO E, MUNCUNILL J, BAREA L, et al. Acid elution of platelets HLA-class I antigens in the treatment of a refractory patient[J]. Br J Haematol, 1998, 100(1): 245-246.
- [7] SIRCHIA G. HLA-reduced platelets to overcome platelet refractoriness: can lemons help? [J]. Transfusion, 1996, 36(5): 388-391.
- [8] MEINKE S, SANDGREN P, MÖRTBERG A, et al. Platelets made HLA deficient by acid treatment aggregate normally and escape destruction by complement and phagocytes in the presence of HLA antibodies[J]. Transfusion, 2016, 56(2): 370-382.

- [9] 邹勇, 刘相富, 刘文达, 等. 酸洗脱血小板表面 HLA-I 类抗原对血小板活化和凋亡的影响[J]. 中国输血杂志, 2011, 34(8): 669-671.
- [10] 刘相富, 邹勇, 刘文达, 等. 酸洗脱血小板 HLA-I 类抗原的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 25(10): 1995-1999.
- [11] YONG Z, XIANGFU L, WENDA L, et al. Effects of acid-stripped of HLA-I antigens on platelet activation and apoptosis[J]. Chin J Blood Trans, 2011(8): 669-671.
- [12] 邹旭群, 熊文, 鲍自谦, 等. 血小板低渗休克反应检测方法的建立及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 36(1): 6-8.
- [13] LAUNDY G J, BRADLEY B A, REES B M, et al. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia[J]. Transfusion, 2004, 44(6): 814-825.
- [14] THIAGARAJAN P, AFSHAR-KHARGHAN V. Platelet transfusion therapy[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2013, 27(3): 629-643.
- [15] XIANGFU L, YONG Z, WENDA L, et al. Study on the acid-stripped platelets of HLA-I antigen [J]. Chin J Pathophysiol, 2011, 28(10): 1995-1999.
- [16] HOLME S. Storage and quality assessment of platelets [J]. Vox Sang, 1998, 74(Suppl 2): 207-216.
- [17] SHRIVASTAVA M. The platelet storage lesion [J]. Transfus Apher Sci, 2009, 41(2): 105-113.
- [18] LIM Y A, HYUN B H. Evaluation of platelet parameters on the ADVIA 120 as the quality indicator for stored platelets[J]. Clin Lab Haematol, 2002, 24(6): 377-384.
- [19] 谢如锋. 血小板体外质量评价及其临床意义[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(3): 261-263.
- [20] 杨江存, 袁军, 孙杨, 等. 4℃ 冷藏保存血小板的代谢变化[J]. 中国输血杂志, 2017, 40(6): 558-562.

(收稿日期: 2018-10-11 修回日期: 2018-12-16)

(上接第 968 页)

- 干预[J]. 护理研究(下旬版), 2006, 20(18): 1605-1608.
- [9] 那彦群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [10] 姚嵩梅, 张耀中, 王叶蒂. 46 例脑卒中尿失禁综合治疗观察[J]. 吉林医学, 2011, 32(25): 5231-5232.
- [11] 郭丽. 广州市脑卒中住院患者尿失禁的现状调查及干预研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [12] 蔡文智, 陈思婧. 神经源性膀胱护理指南(2011 年版)(二)[J]. 中华护理杂志, 2011, 46(2): 210-216.
- [13] 覃艳玲, 曾海涓. 护理干预在脑卒中后尿失禁病人中的应用[J]. 当代护士(专科版), 2009(5): 15-16.
- [14] 陈泽波, 来永庆, 曹群朵, 等. ICIQ-SF 问卷中文版与尿动力学检查的相关性研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2011(5): 403-405.
- [15] 苏静, 文建国, 魏振玲, 等. 女性压力性尿失禁严重程度与

尿动力学参数的相关性分析[J]. 山东医药, 2006, 46(1): 18-19.

- [16] ARKAN G, BESER A, OZTURK V. Experiences related to urinary incontinence of stroke patients: a qualitative descriptive study[J]. J Neur Nurs, 2018, 50(1): 42-47.
- [17] 杜学慧. 分阶段护理干预促进脑卒中尿失禁康复的研究[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(18): 20-22.
- [18] 袁浩斌, 钱晓路, 张美娟. 盆底肌锻炼治疗压力性尿失禁效果的汇总分析[J]. 中华护理杂志, 2004, 39(3): 171-173.
- [19] 王建业, 钟晨阳. 老年尿失禁的病因和治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(1): 25-27.
- [20] 王娟, 潘速跃, 王静新, 等. 脑卒中后尿失禁近期预后的影响因素[J]. 中国老年学杂志, 2015(20): 5789-5791.

(收稿日期: 2018-10-30 修回日期: 2018-12-22)