

应用流式细胞术检测血小板抗体的临床研究

颀晓玲, 杜晓芸, 张 炜, 张晓薇, 赵 丽[△] (兰州大学第一医院中心实验室 730000)

【摘要】 目的 观察血小板自身抗体(PAIG)在特发性血小板减少性紫癜(ITP)疾病中的变化,探讨其在 ITP 诊断和治疗的意义。**方法** 应用流式细胞术(FCM)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)同时检测 52 例原发性血小板减少性紫癜(ITP)患者,20 例健康志愿者并对结果进行比较。**结果** 在 ITP 患者中,FCM 检测阳性率为 87.5%,ELISA 检测阳性率为 74%。同时检测 12 例 ITP 患者在通过 3 个月的激素治疗,FCM 检测其平均荧光强度由 65.23 ± 18.12 降低至 31.25 ± 12.23 ,血小板计数均升高。**结论** FCM 检测血小板自身抗体较 ELISA 方法更具有灵敏度高、简单、快捷的优点。应用 FCM 对 ITP 进行疗效评估,对提高 ITP 诊断水平及指导临床治疗有一定的意义。

【关键词】 血小板自身抗体; 特发性血小板减少性紫癜; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.006

中图分类号:R446.113

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)23-2571-02

Clinical research of platelet antibodies detected by FCM XIE Xiao-ling, DU Xiao-yun, ZHANG Wei, ZHANG Xiao-wei, ZHAO Li[△]. Central Laboratory, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 Objective To investigate the change of platelet-associated IgG(PAIG) in idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) and its significance in the diagnosis and treatment. **Methods** The flow cytometry(FCM) and ELISA were used to simultaneously detect PAIG in the samples from 52 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) and 20 normal volunteers. The results obtained from these two methods were compared. **Results** For ITP patients, the detection positive rate was 87.5% in FCM test and 74% in ELISA test. For simultaneous detection in 12 cases of ITP after three months of hormone treatment, the average fluorescence intensity detected by FCM decreased from 65.23 ± 18.12 to 31.25 ± 12.23 , platelet counts were increased. **Conclusion** FCM for detecting platelet antibody has the advantages of simplicity, shortcut and high sensitivity compared with ELISA. FCM for evaluating the curative effect has certain significance to increase the diagnostic level and guide the clinical treatment.

【Key words】 platelet autoantibody; idiopathic thrombocytopenic purpura; flow cytometry

血小板相关抗体(PAIG)是病理性免疫反应所产生的针对血小板膜糖蛋白Ⅱb/Ⅲa、I b/I X、I a/Ⅱa 等抗原的自身抗体,这些抗体在血小板膜上与其相应的抗原结合后,使血小板易被单核吞噬细胞系统大量破坏^[1],从而使血小板的寿命缩短,数量减少,临床表现为患者全身、局部出现紫癜、鼻、牙龈出血等。原发性血小板减少性紫癜(ITP)是一种免疫性疾病,患者自身体液免疫和细胞免疫功能异常,体内产生抗血小板自身抗体(PAIG)与血小板抗原结合,导致血小板破坏增多、生成减少为特征的血小板减少性疾病^[2]。90%左右的 ITP 患者血中 PAIG 增高,因此检测血小板抗体 PAIG 可以作为出血性疾病的诊断、判断疗效、估计预后的重要指标,避免使用大剂量糖皮质激素或免疫抑制剂而使患者出现较大的不良反应,提高 ITP 诊断的正确率和选择合适的治疗方案。流式细胞术(FCM)是一种单细胞定量分析,具有灵敏度高,重复性好,快速的优点,已广泛应用于基础医学与临床研究。本文用 FCM 分析 ITP 患者和非 ITP 患者 PAIG 的改变,并与 ELISA 法比较,评价 FCM 检测意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 ITP 患者 52 例,男 20 例,女 32 例,年龄 10~65 岁,诊断符合 1986 年全国血栓止血会议制定的标准,健康对照组 20 例(志愿者),年龄、性别与患者组相匹配。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 COULTER EPLCS-XL 流式细胞仪(贝克曼库尔特),迈瑞 BC5380 血液分析仪(迈瑞),WallAc-1420 多

功能时间分辨检测系统(PekinElmer 公司)。

1.2.2 主要试剂 PE-CD41、FITC-羊抗人 IgG 和 FITC-羊抗鼠 IgG 均为美国 CALTAG 公司产品。血液分析仪所用试剂为深圳迈瑞生物医疗股份有限公司 M-530D 稀释液。

1.3 方法

1.3.1 样本制备 (1)取晨空腹静脉血 3 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)-K₂ 抗凝管中,用 125 g 离心力离心 10 min,分离富含血小板血浆(PRP),继续以 650 g 离心力离心血小板血浆 10 min,去上清,加 2 mL 血小板清洗液(EDTA PBS-BSA)650 g 离心力离心 10 min,去上清,重复 2 次。(2)调整血小板浓度至 10^6 /mL。

1.3.2 流式细胞仪检测 PAIG (1)取试管内加入血小板 $5 \mu\text{L}$,再加入 5%小牛血清 $95 \mu\text{L}$ 与 $5 \mu\text{L}$ PE-CD41 试剂混匀,再依次分别加入 $10 \mu\text{L}$ 血小板抗体试剂及阴性对照抗体试剂,室温避光孵育 15 min,加 PBS-BSA 125 g 离心力离心 5 min,洗涤 1 次,去上清,加 2 mL PBS 重悬,上机分析。(2)流式细胞仪分析选用 488 nm 亚离子激发光,应用标准激光微球校准光路后依次检测样本,用 CD41-PE/SSC 散点图设门用羊抗鼠设定阴性区,测定 5 000~10 000 个血小板的荧光阳性百分率及平均荧光强度(MFFI)。(3)ELISA 竞争法检测血小板表面 PAIG:用人 IgG 包被 96 孔板,封闭,调整血小板浓度至 20×10^9 /L,加入血小板悬液或人 IgG 标准品,立即加入 HRP-羊抗人 IgG 稀释液,孵育,显色,WallAc-1420 多功能时间分辨检测系统测 OD490 值,计算。以超过健康对照组 $\bar{x} + 2s$ 判为阳

[△] 通讯作者。

性值。

1.4 统计与分析 采用 SPSS 16.0 软件进行处理,两组均值比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

表 1 给出了 FCM 与 ELISA 法检测 ITP 患者 PAIgG 的比较结果。FCM 检测 ITP 患者 PAIgG 阳性率 87.5%,平均荧光强度 59.61 ± 23.75 ,健康对照组平均荧光强度 16.11 ± 5.02 ,二者差异有统计学意义 ($P<0.05$),ELISA 检测 ITP 患者 PAIgG 阳性率为 73.0%。

表 1 FCM 与 ELISA 法检测 ITP 患者 PAIgG 的比较

FCM	ELISA	
	阳性	阴性
阳性	36	8
阴性	2	6

表 2 给出了 ITP 患者激素治疗前后 MFFI 以及血小板计数的变化,12 例患者其 MFFI 度由 65.23 ± 18.12 降低至 31.25 ± 12.23 ,血小板计数增高。

表 2 患者治疗前后 PLT 计数以及 MFFI 的变化

病例	PLT 计数($\times 10^9/L$)		MFFI	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
1	25	102	58.33	26.35
2	36	132	56.21	19.54
3	25	99	65.45	23.63
4	19	86	103.25	46.54
5	34	110	77.14	38.16
6	57	160	65.84	32.10
7	15	96	87.54	29.37
8	35	105	65.68	33.71
9	36	133	59.32	26.35
10	22	101	106.56	41.02
11	41	147	79.84	29.84
12	16	91	85.65	26.73

(上接第 2570 页)

释放更多的 NE 以及相关蛋白水解酶加重组织通透性,使颅脑损伤后病情迅速恶化。

中枢神经系统的损伤与众多因素有关,NE 作为其中一种,其表达水平与颅脑损伤程度成正相关。近年来,NE 作为神经保护作用的新靶点,通过抑制其活性可降低神经损伤程度。通过本实验研究证实,NE 抑制剂用于高原地区颅脑损伤,可能更有效的发挥其功能,具有较好的神经保护效应。

参考文献

[1] Ueno M, Moriyama Y, Toda R, et al. Effect of a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046 Na) on ischemia/reperfusion injury using the left-sided heterotopic canine heart transplantation model[J]. J Heart Lung Transplant, 2001, 20(8): 889-896.

[2] 梁芳,高春锦,王钢. 高压氧预处理对高原低氧大鼠白介素-6、中性粒细胞弹性蛋白酶的影响[J]. 辽宁医学杂志, 2007, 21(3): 155-159.

3 讨 论

血液中相关血小板抗体 (PAIgG) 检测用于协助诊断和鉴别诊断血小板减少性疾病。ITP 是一种自身免疫性疾病,系由循环中血小板自身抗体作用于血小板抗原造成血小板破坏所致。长期以来 PAIgG 一直作为 ITP 诊断的实验室指标,并在 ITP 患者治疗后检测显示 PAIgG 明显下降,血小板计数大幅上升^[3]。以 FCM 和 ELISA 检测相比较,FCM 简易、快速、敏感的特点,可以随时测定每个标本其阳性率稍高于 ELISA 法,可能比 ELISA 更敏感^[4]。虽然 FCM 可在疾病治疗过程中监测 PAIgG 的变化以判断疗效,但不能完全排除非血小板抗体成分,如循环免疫复合物,非特异性吸附于血小板表面的血浆免疫球蛋白。随着血小板特异性抗体检测方法的不断发展,作者采用了血小板特异性抗体羊抗人 IgG,结合其他血小板相关抗体 CD41 共同识别血小板抗体,排除了碎片及其他细胞的干扰,从而进一步提高 ITP 免疫诊断水平^[5]。

参考文献

[1] Farland JM. Pathophysiology of platelet destruction in immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura [J]. Blood, 2002, 16: 12-18.

[2] Tasi R, Evangelista ML, Stipa E, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management [J]. Thromb Haemost, 2008, 99(1): 4-13.

[3] 施纪文,王兆钺,张威,等. 流式细胞术在免疫性血小板减少症诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(1): 16-17.

[4] Stockelberg D, Hon M, Jacobsson S, et al. Detection of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA and an tigen capture ELISA [J]. Eur J Haematol, 1996, 56(1): 72-79.

[5] 姚慧臣,王宁遂,徐酉华,等. 血小板自身抗体的流式细胞术检测与意义[J]. 中国小儿血液, 2002, 7(1): 14-15.

(收稿日期:2010-07-13)

[3] Lungarella G, Cavarra E, Lucattelli M, et al. The dual role of neutrophil elastase in lung destruction and repair[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(6-7): 1287-1296.

[4] Tamakuma S, Oqawa M, Aikawa N, et al. Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2004, 17(5): 271-279.

[5] Armao D, Kornfeld M, Estrada EY, et al. Neutral proteases and disruption of the blood-brain barrier in rat [J]. Brain Res, 1997, 767(2): 259-264.

[6] 么改琦,吴咸中. 多形核粒细胞体外介导内皮细胞损伤的机制[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(1): 36-37.

[7] Ai S, Cheng XW, Inoue A, et al. Angiogenic activity of bFGF and VEGF suppressed by proteolytic cleavage by neutrophil elastase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 364(2): 395-401.

(收稿日期:2010-07-06)