

• 临床检验研究 •

流式细胞术检测血小板相关免疫球蛋白的临床应用

吴艾霖¹, 吴丽娟¹, 刘毓刚¹, 帖儒修²

(1. 成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042)

摘要:目的 研究流式细胞术检测血小板相关免疫球蛋白(PAIg)的特点及其在特发性血小板减少性紫癜(ITP)诊断中的意义。方法 用流式细胞术检测了 ITP 组、血液系统非免疫性血小板减少组(HN-TP 组)、其他疾病组以及健康对照组的外周血黏附血小板的 PAIg, 进行 PAIg 荧光阳性百分率和平均荧光强度检测结果的比较。结果 FCM 检测 ITP 患者血小板表面 IgG、IgA 和 IgM 荧光阳性百分率分别为 $(2.89 \pm 8.24)\%$ 、 $(8.16 \pm 18.58)\%$ 和 $(6.45 \pm 15.39)\%$; 平均荧光强度为 (5.73 ± 8.18) 、 (43.65 ± 42.72) 、 (40.70 ± 36.40) 。与健康对照组比较, ITP 组 IgA 和 IgM 的荧光阳性百分率和平均荧光强度均明显高于正常对照组($P < 0.01$); 与 HN-TP 组、其他疾病组比较, ITP 组 IgA 和 IgM 荧光阳性百分率明显高于 HN-TP 组和其他疾病组($P < 0.01$); ITP 组 IgA 和 IgM 平均荧光强度高于 HN-TP 组和其他疾病组($P < 0.05$)。流式细胞术 PAIg 测定荧光阳性百分率的诊断效率为 45.8%; 平均荧光强度的诊断效率为 72.5%; 两项指标联合的诊断效率为 74.2%。结论 FCM 检测血小板抗体具有快速、简便、灵敏、可靠等特点, 可用于免疫性血小板减少实验诊断与疗效监测。

关键词:流式细胞术; 紫癜, 血小板减少性, 特发性; 血小板相关免疫球蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2301-03

Application of monitoring platelet associated immunoglobulin by flow cytometry

Wu Ailin¹, Wu Lijuan¹, Liu Yugang¹, Tie Ruxiu²

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China;

2. Department of Medical Laboratory, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To analyze the features of platelet associated immunoglobulin (PAIg) detected by Flow Cytometry and investigate its diagnostic efficacy in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). **Methods** Flow Cytometry was used to detect peripheral blood PAIg in groups of ITP patients, hematologic system of non-immune thrombocytopenia (HN-TP) patients, other diseases and healthy controls. The percentages of PAIg fluorescent positive and mean fluorescence intensity were compared statistically. **Results** Platelet surface IgG, IgA and IgM fluorescent positive percentages in ITP patients were $(2.89 \pm 8.24)\%$, $(8.16 \pm 18.58)\%$ and $(6.45 \pm 15.39)\%$; and mean fluorescence intensity were (5.73 ± 8.18) , (43.65 ± 42.72) , (40.70 ± 36.40) . Percentages of PAIg IgA, IgM fluorescent positive were significantly higher in ITP patients than those in control people, HN-TP patients and other diseases patients ($P < 0.01$). It was also demonstrated that in the group of ITP patients, the IgA, IgM mean fluorescence intensity was higher than that in control group ($P < 0.01$), HN-TP patients and other diseases patients ($P < 0.05$). The diagnostic efficacy of PAIg fluorescent positive percentages and mean fluorescence intensity detected by flow cytometry were 45.8%, 72.5% respectively, and the diagnostic efficacy should improve to 74.2% if both of them were detected. **Conclusion** The detection of platelet antibodies by flow cytometry is fast, facilitated, sensitive and reliable, so it can be used for experimental diagnosis and effective monitoring in autoimmune thrombocytopenia.

Key words: flow cytometry; purpura, thrombocytopenic, idiopathic; PAIg

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是一种比较常见的、以出血和血小板减少为主的疾病。其发病机制是由于患者机体免疫系统失常, 体内产生血小板抗体(PAIg)增多, 导致血小板破坏增加。血小板自身抗体(即血小板相关免疫球蛋白)的检测是 ITP 诊断的重要指标^[1]。近年来, 随着流式细胞术(FCM)临床应用的兴起, 临床已越来越多地利用 FCM 来检测 ITP 患者血液中的 PAIg, 包括 PAIgG、PAIgM 和 PAIgA^[2]。本研究采用 FCM 检测 PAIg, 评价 FCM 在 PAIg 检测中的临床应用和价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 为 2006 年 1 月至 2009 年 4 月的住院患者, 共分 4 组。ITP 组 84 例, 其中男 33 例, 女 51 例, 年龄 0~82 岁, 平均 (47 ± 20) 岁。血液系统非免疫性血小板减少组(HN-TP 组)12 例, 其中男 4 例, 女 8 例, 年龄 12~75 岁, 平均 $(52 \pm$

18) 岁, 包括再生障碍性贫血(AA) 2 例, 珠蛋白生成障碍性贫血(MA) 3 例, 骨髓增生异常综合征(MDS) 5 例, 溶血性贫血(HA) 2 例。其他疾病组 24 例, 其中男 10 例, 女 14 例, 年龄 0~76 岁, 平均 (39 ± 23) 岁, 包括恶性肿瘤 1 例, 糖尿病 5 例, 先兆流产 8 例, 早产儿 2 例, 心脑血管病 4 例, 急性感染 4 例。上述疾病的诊断依据世界卫生组织相关疾病诊断及疗效标准 2 版。健康对照组 100 例, 其中男 50 例, 女 50 例, 年龄 18~61 岁, 为同期前往医院进行体检并经证实的健康人员。

1.2 仪器与试剂 美国 Beckman-Coulter XL4 MCL 流式细胞仪。羊 IgG-FITC、羊抗人 IgG-FITC、羊抗人 IgA-FITC、羊抗人 IgM-FITC, 标本细胞处理试剂盒(溶液 C)、PBS、Flow-check 等均为 Beckman-Coulter 原装试剂。

1.3 方法 采取清晨空腹静脉血 2 mL, 枸橼酸钠抗凝(蓝头真空采血管), 以离心机 1 500 r/min 离心 5 min 分离富含血小

板血浆,要求采集后 2 h 内完成检验。具体实验检测方法按照参考文献[3]执行。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Office Excel 2003 软件作平均数和标准差分析,所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的组间比较行 t 检验,率的比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FCM 血小板自身抗体检测结果 经统计学处理证实,

FCM 检测 PAIg,ITP 患者组 IgA 和 IgM 的荧光阳性百分率和平均荧光强度均明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 HN-TP 组、其他疾病组比较,ITP 患者组 IgA 和 IgM 荧光阳性百分率比较差异有统计学意义($P < 0.01$),IgA 和 IgM 平均荧光强度比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HN-TP 组 IgA 和 IgM 的平均荧光强度高于健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 流式细胞术血小板相关抗体检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PAIgA		PAIgG		PAIgM	
		%	平均荧光强度	%	平均荧光强度	%	平均荧光强度
健康对照组	100	1.28±0.64	12.65±6.32	4.50±2.25	5.5±2.75	2.77±1.38	17.90±8.95
ITP 组	84	8.16±18.58 ^a	43.65±42.72 ^a	2.89±8.24	5.73±8.18	6.45±15.39 ^a	40.70±36.40 ^a
HN-TP 组	12	1.26±1.55 ^c	35.98±26.97 ^{bd}	0.32±0.31	2.38±1.98	1.48±2.30 ^c	35.98±26.97 ^b
其他疾病组	24	0.87±1.19 ^c	22.83±15.11 ^d	0.61±1.81	3.29±2.76	0.87±1.19 ^c	28.24±20.95 ^d

^a, $P < 0.01$,^b, $P < 0.05$,与健康对照组比较;^c, $P < 0.01$,^d, $P < 0.05$,与 ITP 组比较。

2.2 FCM 诊断 ITP 的方法学评价 将 HN-TP 组和其他疾病组合为非 ITP 组并与 ITP 组进行比较。血小板表面 IgG、IgA 和 IgM 的荧光阳性百分率(FPP)和血小板表面 IgG、IgA 和 IgM 的平均荧光强度(MF),只要其中任何一项阳性,就统计为该患者 PAIg 阳性。以 FPP 指标结果异常为诊断,ITP 组阳性 26 例,非 ITP 组阳性 7 例;ITP 组阴性 58 例,非 ITP 组阴性 29 例。以 MF 结果异常为诊断,ITP 组阳性 72 例,非 ITP 组阳性 21 例;ITP 组阴性 12 例,非 ITP 组阴性 15 例。如果 FPP 和 MF 结果只要其中一项指标超出参考范围,就统计为异常,ITP 组阳性 76 例,非 ITP 组阳性 23 例;ITP 组阴性 8 例,非 ITP 组阴性 13 例。由下列公式计算,以 FPP 结果异常为诊断方法为例,设 ITP 组阳性例为 a,非 ITP 组阳性例为 b;ITP 组阴性例为 c,非 ITP 组阴性例为 d。其灵敏度= $a/(a+c)\%$,特异度= $d/(b+d)\%$,阳性预测值= $a/(a+b)\%$,阴性预测值= $d/(d+c)\%$,误诊率= $1 - \text{特异度}$,漏诊率= $1 - \text{灵敏度}$,诊断效率= $(a+d)/N\%$ 。得出流式细胞术 PAIg 测定的诊断价值,见表 2。

表 2 流式细胞术 PAIg 测定的诊断价值(%)

诊断指标	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	误诊率	漏诊率	诊断效率
FPP	31.0	80.6	78.8	33.3	19.4	69.0	45.8
MF	85.7	41.7	77.4	58.3	58.3	14.3	72.5
PP+MF	90.5	36.1	76.8	61.9	53.9	9.5	74.2

3 讨 论

ITP 是最常见的一种出血性疾病,临床以血小板减少及皮肤、黏膜出血为特征。ITP 临床诊断主要基于血小板数目的减少,骨髓中巨核细胞数正常或增多,患者血液中存在血小板抗体,这种由病理性免疫所产生的抗体特异地结合于血小板膜上,从而引起血小板的破坏加速^[4]。临床上 ITP 尚无特异的诊断方法,主要靠排除其他血小板减少性疾病作出诊断,容易造成误诊。目前,血小板相关免疫球蛋白的检测仍然是 ELISA 方法^[5-6],常规 ELISA 等检测方法以检测血浆内可溶性 Ig 分子为主,无法将表面 Ig 与胞内 Ig 分子区分开,因此会

导致血小板相关抗体假性升高,并且耗时长,需一批标本才能测定,不能随时测定单个标本。流式检测技术很好地克服了这些缺点,特异性地针对细胞膜表面进行检测^[7]。

本研究显示,ITP 患者组 PAIgA 和 PAIgM 的 FPP 和 MF 均明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 HN-TP 组、其他疾病组比较 PAIgA 和 PAIgM 的 FPP 差异有统计学意义($P < 0.01$),MF 差异有统计学意义($P < 0.05$)。HN-TP 组 PAIgA 和 PAIgM 的 MF 高于健康对照组差异有统计学意义($P < 0.05$);其他疾病组与健康对照组差异无统计学意义。ITP 患者组的阳性率也高于其他两组,也充分显示 PAIg 的测定对 ITP 的诊断有较高的敏感性。本组分析了 12 例 HN-TP 的患者,8 例 PAIg 阳性,阳性率 66.6%,这也容易与 ITP 的诊断混淆。作者分析 HN-TP 的患者组是由于此类疾病常可引起免疫性血小板减少,当然,从实验结果还可以看出,ITP 与 HN-TP 这两组中 PAIgA 和 PAIgM 的 MF 均高于健康对照组,而只有 ITP 组的 FPP 高于健康对照组,这也就更好地提示临床对 ITP 患者的结果判定。PAIg 的检测也将有助于 HN-TP 这些疾病免疫机制的研究。近年资料证明,86% 的 ITP 患者可检测到 PAIgG 增高^[8],可实验结果 ITP 患者组 PAIgG 的 FPP 和 MF 与健康对照组差异有统计学意义,这一结果与文献报道不一致。

作者也分析了各组之间 PAIg 的 FPP 和 MF 的比较的情况,测定血小板表面 IgG、IgA 和 IgM 的 FPP 和 MF,只要其中任何一项阳性,就统计为该患者 PAIg 阳性。最后得出,FPP 的灵敏度低、而特异度高、阴性预测值低、误诊率低而漏诊率高、其诊断效率为 45.8%;MF 的灵敏度高、特异度低、阴性预测值高于 FPP、误诊率高而漏诊率低、其诊断效率为 72.5%。总的来说,FPP 的诊断效率较 MF 差。作者又重新做了统计,把 FPP 和 MF 两项指标联合起来,再与 FPP 和 MF 的诊断价值相比较,其灵敏度高、特异度低、阴性预测值高、误诊率高于 FPP 而低于 MF、漏诊率低、其诊断效率 74.2% 高于 FPP 和 MF。由此可见,应该尽可能地将 PAIg 的 FPP 和 MF 都同时测定,才能提高 PAIg 测定的灵敏度、特异度,更好的减少误诊

率和漏诊率,从而提高 PAIg 的诊断效率给临床更准确的结果。因此,血小板减少性疾病检测 PAIg 时,应同时提供 PAIg 的 FPP 和 MF 的结果给临床,才能提高 ITP 的确诊率。

采用 FCM 方法检测血小板抗体操作简单,但是一些步骤仍然需要注意。血液标本的保存条件需要注意,保存和制备时所处环境温度以 16~20℃ 为宜;标本采集后应尽量在 2 h 内检验,因为结合自身抗体的血小板容易发生破裂造成假阴性结果;同型对照管十分重要;每天的每批检验必须进行同型对照管的平行测定,甚至每一份标本需要进行平行同型对照管的测定。一方面同型对照管可以用于每次测定各荧光通道电压是否合适的再次审核与调节参考,另一方面也有助于发现个别标本存在污染荧光物质的情况,如患者输入了某种可以自发特定荧光的药物。如果血小板上结合有大量自身抗体,这种血小板本身就容易破裂,使流式细胞仪很难捕捉到阳性信号。因此,病情较重的血小板减少症病例检验结果为阴性,这是方法学无法规避的问题,需要向临床解释清楚,至少流式检验的灵敏度还是很高的,对于免疫性血小板减少症的诊断与亚型分类仍然具有一定诊断价值。在平时工作中,一般是血小板总数在 $(50\sim 100)\times 10^9/L$ 的情况下进行加样,如果标本中血小板总数减少,应适当增加血浆标本用量,按比例减少 PBS 用量,甚至不加入 PBS;如果标本中血小板总数在 $100\times 10^9/L$ 以上,应减少血浆标本用量,按比例增加 PBS 用量。遇到血小板严重减少的病例,需要制备富含血小板血浆再行检验。

作者认为流式细胞仪检测具有以下优点:所需标本量少,即使血小板计数低于 $10\times 10^9/L$ 仍可分析,简便、省时并且可随时测定单个标本。开展 FCM 检测血小板抗体将给临床提供更多帮助,建议临床对于血小板减少的患者把血小板表面 IgG、IgA 和 IgM 的 FPP 和 MF 都进行测定,以更好提高 PAIg 的诊断效率给临床更准确的结果。

(上接第 2300 页)

促进黏附和吞噬细胞反应,使细胞溶解,其在炎症反应中起着积极作用,参与机体免疫系统防卫。hs-CRP 的个体变异较低,具有长期稳定性。hs-CRP 虽对疾病诊断无特异性,但其水平上升是各种原因引起的炎症和组织损伤的灵敏指标,可反映出炎症和组织损伤的程度。从本组资料显示,严重创伤患者伤后 1 周内 hs-CRP 的变化与健康对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$),说明机体一直处于高应激状态,其的动态变化对病情预测具有一定的价值。

非感染组 hs-CRP 水平先升高后降低,总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_4/T_8 的水平先降低后上升, T_8 细胞水平先升高后降低,说明严重创伤患者在无并感染的情况下,随着时间的推移,机体免疫功能逐步恢复,炎症得到控制,预后良好;而有感染组 hs-CRP 水平持续升高,总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_4/T_8 的水平持续降低,说明在 1 周内机体免疫功能持续低下,预后较差,从而进一步说明了 hs-CRP 和 T 淋巴细胞亚群的水平能够很好地反映患者病情的严重程度以及转归。严重创伤患者 hs-CRP 峰值与总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_4/T_8 的水平呈显著负相关(相关系数分别为 $r_1=-0.67$, $r_2=-0.71$, $r_3=-0.61$, $P<0.05$)。创伤后急性期 hs-CRP 的升高程度不仅与创伤严重程度呈正相关,而且与创伤感染的发生密切相关,hs-CRP 的持续升高和总 T 细胞、 T_4 细胞、 T_4/T_8 的水平持续降低提示患者预后

参考文献

- [1] 钟明华,廖军鲜,龙红,等.流式细胞术检测红细胞相关抗体及临床应用[J].中日友好医院学报,2001,15(1):3-6.
- [2] Alimardani G,Guichard J,Fichelson S,et al. Pathogenic effects of anti-glycoprotein Ib antibodies on megakaryocytes and platelets [J]. Thromb Haemost,2002,88(6):1039-1041.
- [3] 吴丽娟.临床流式细胞学检验技术[M].北京:人民军医出版社,2010:167-170.
- [4] Kokawa T,Nomura S,Yanabu M,et al. Detection of platelet antigen for antiplatelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura by flow cytometry, antigen-capture ELISA, and immunoblotting: a comparative study [J]. Eur J Haematol,1993,50 (2):74-80.
- [5] Nel JD,Stevens K. A new method for the simultaneous quantitation of platelet-bound immunoglobulin (IgG) and complement (C3) employing an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure [J]. Br J Haematol,1980,44:281-290.
- [6] Stockelberg D,Hou 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 antigen capture ELISA [J]. Eur J Haematol,1996,56:72-77.
- [7] 许艳丽,邓庆华.流式细胞术检测原发性血小板减少性紫癜患者外周血血小板相关抗体[J].国际检验医学杂志,2006,27(8):758.
- [8] Memillan R. The role of antiplatelet autoantibody assays in the diagnosis of immune thrombocytopenia purpura [J]. Curr Hematol Rep,2005,4(2):160-165.

(收稿日期:2011-08-08)

不佳。

总之,将 T 淋巴细胞亚群各指标和 hs-CRP 作为临床判断病情轻重及预后好坏的客观指标,为临床医生提供有力的参考依据,及时采取相应的救治方案和措施,针对患者的免疫状态情况,合理地调整其免疫功能,减轻机体的继发性损害,增强机体的抗感染能力,提高治愈率,有十分重要的临床价值。

参考文献

- [1] 吴丽娟.临床流式细胞学检验技术[M].北京:人民军医出版社,2010:79-82.
- [2] Uehara S,Gothoh K,Handa H,et al. Immune function in patients with acute pancreatitis [J]. J Gastroenterol Hepatol,2003,18(4):363-370.
- [3] Monneret G,Debard AL,Venet F,et al. Marked elevation of human circulating $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis [J]. Crit Care Med,2003,31:2068-2071.
- [4] 王触灵.重症颅脑损伤急性期 T 细胞亚群 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 和 $CD4^+/CD8^+$ 的变化及其临床意义 [J]. 兰州大学学报:医学版,2005,31(3):41-45.
- [5] 占世坤,胡秉诚,沈健康.重型颅脑外伤患者免疫功能的观察 [J]. 上海医学,1997,20(8):470-472.

(收稿日期:2011-08-18)