

• 临床检验研究论著 •

网织血小板在急性白血病中的检测和临床意义*

柴晓静, 张晓薇, 陆莉, 李娟, 赵丽[△]

(兰州大学第一医院中心实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要:目的 探讨网织血小板(RP)流式细胞仪检测方法及 RP 检测的临床意义。方法 以体检健康者 30 例作为对照, 动态监测 30 例急性白血病(AL)患者外周血小板(PLT)水平、RP 百分比(RP%)并计算 RP 绝对值(RPC)。结果 AL 患者 RP% 和 RPC 低于健康者($P < 0.05$)。经治疗达到临床缓解的 AL 患者 RP% 及 RPC 恢复正常。结论 RP% 及 RPC 能反映骨髓 PLT 生成情况, 且比 PLT 计数更加灵敏, 可作为 AL 治疗过程中的监控指标。

关键词:网织血小板; 急性白血病; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2194-02

Detection of reticulated platelets and its clinical significance in acute leukemia*

Chai Xiaojing, Zhang Xiaowei, Lu Li, Li Juan, Zhao Li[△]

(Central Laboratory, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To investigate detection methods of reticulated platelet (RP) by flow cytometry and its clinical significance in acute leukemia (AL). **Methods** A total of 30 AL patients and 30 healthy subjects were enrolled and detected for blood platelet count (BPC) and percentage of RP(RP%), and RP counts(RPC) was calculated. **Results** Compared with healthy subjects, levels of RP% and RPC were lower in AL patients ($P < 0.05$). RP% and PRC in AL patients with clinical remission could be recovered to normal level. **Conclusion** The percentage and absolute counts of RP could reflect the state of blood platelet producing potential in bone marrow, which could be used as monitoring marker for AL.

Key words:reticulated platelet; acute leukemia; flow cytometry

网织血小板(RP)可反映血小板(PLT)更新速度、增生情况以及骨髓造血系统的细胞动力学变化,是血液循环中最幼稚 PLT,是判断 PLT 生成能力的重要指标^[1-3]。流式细胞仪测定 RP 通常采用荧光染料噻唑橙(TO)染色 RP 内 RNA,TO 可特异性结合 RNA,且与 RNA 结合后荧光强度大大增强^[4-6]。向晓娟等^[7]研究显示 RP 百分率(RP%)与 RP 绝对计数(RPC)能反映骨髓 PLT 生成率,且 RP 百分率可作为外周血 PLT 计数恢复状况的预测指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于本院血液科确诊的急性白血病(AL)患者 30 例纳入病例组,均符合《血液病诊断和疗效标准》中的诊断标准^[8]。于本院体检健康者 30 例纳入对照组,

1.2 试剂与仪器 CD42b(CD41b-PE,苏州联科),TO 染料(美国 Sigma),流式细胞仪(美国贝克曼库尔特)。

1.3 方法 采集 EDTA-K₂ 抗凝静脉血 5 μ L,加入 10 μ L CD41b-PE 后分别加入不同浓度 TO(以生理盐水稀释),并染色不同时间,确定试验条件后对标本连续检测 10 次,确定该方法的重复性。流式细胞仪设门参考杨玉琼等^[9]的设门规则,将 PLT 与白细胞、红细胞及碎片分开,并用 CD41b 单抗确认 PLT 比例。以对照管(99%以上 PLT 位于阴性区域)确定阳性阈值,然后测定 TO 阳性 PLT 比率。设定 PLT 检测门,测得直方图,按空白对照设置标尺,使 TO 阳性 PLT 为 1%,测 20 000 个 PLT,计算 TO 染色阳性 RP 的百分率,即 RP%。以 RP%与 PLT 计数结果的乘积作为 RP 绝对值,即 RPC。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 染液浓度和染色时间筛选 取健康者抗凝静脉血 5 μ L,加入 10 μ L CD41b-PE 后分别加入 500 μ L 1:1、1:2、1:3、1:4 稀释的 TO,充分混匀后室温避光静置,于 20、30、60、90、

120 min 上流式细胞仪测定 RP%。TO 浓度 1:2、染色 30 min 时 RP% 相对稳定,是染色最佳试验条件。

表 1 染液浓度及染色时间对 RP% 检测结果的影响 (%)

TO 浓度	染色时间 (min)				
	20	30	60	90	120
1:1	20.54	27.07	29.53	31.59	34.51
1:2	11.33	16.72	18.59	21.92	22.96
1:4	5.75	10.54	12.08	15.52	18.91
1:8	2.54	5.08	7.52	9.75	12.71

2.2 RP% 及 RPC 检测结果 按上述确定的试验条件检测对照组及病例组外周血,对照组 RP% 及 RPC 检测结果为 (17.76 \pm 8.27)% 和 39.42 \pm 17.23,病例组为 (4.58 \pm 2.99)% 和 1.28 \pm 0.86,病例组 RP% 及 RPC 检测结果均小于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 AL 患者治疗后 RP% 及 RPC 检测结果 经治疗,AL 患者中临床缓解 21 例,RP% 及 RPC 检测结果为 (14.57 \pm 8.09)% 和 31.87 \pm 10.21,未缓解 9 例,检测结果为 (7.36 \pm 3.22)% 和 10.14 \pm 5.02,未缓解患者 RP% 及 RPC 检测结果小于健康者及缓解患者 ($P < 0.05$),缓解患者检测结果与健康者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

化疗、放疗易导致 AL 患者继发骨髓抑制或衰竭,进而导致 PLT 减少,甚至有出血倾向。输注 PLT 治疗上述不良反应的理想手段。有研究显示,对化疗后的 AL 患者输注 PLT 可恢复患者外周血 PLT 水平,预防因 PLT 减少而引起的出血^[10]。但对于 PLT 输注量、输注间隔时间及输注疗效评价却缺少有效的判断指标。

Stohlawetz 等^[11]对 AL 患者化疗期间 PLT 计数、RP% 及

* 基金项目:兰州大学第一医院青年基金资助项目[院发(2009)8号]。 [△] 通讯作者,E-mail:zhaoli@lzu.edu.cn。

RPC 进行了双盲法前瞻性研究,发现接受诱导化疗的 AL 患者自化疗第 22 天可出现外周血 PLT 水平的自行恢复,而 RPC 的恢复比 PLT 提前 2 d,认为在化疗期间对 AL 患者进行 RPC 监测更有意义,能提示诱导或强化治疗后骨髓造血功能的恢复,并能减少化疗患者预防性输注 PLT 的次数,甚至建议重新修订 AL 患者预防性输注 PLT 的外周 PLT 计数临界值。国内研究也发现自体干细胞移植患者 RPC 下降先于 PLT,而在骨髓造血恢复期,RPC 增加比 PLT 计数水平增加提前 4 d^[12]。

外周血和骨髓穿刺检查结果是主要的 AL 诊疗依据,但化疗后 PLT 动力学变化非常快,目前尚没有相关指标能够预示化疗后 PLT 恢复程度。本次试验显示,AL 患者 RP% 和 RPC 均低于健康者,临床缓解 AL 患者 RP% 和 RPC 上升,且与健康者比较没有统计学差异,而未缓解 AL 患者 RP% 和 RPC 水平上升不明显。

综上所述,RP 能提示诱导或强化治疗后骨髓造血功能的恢复,通过监测 AL 患者外周血 RP% 及 RPC 水平,可减少接受化疗的 AL 患者预防性输注 PLT 的次数,减轻患者经济负担,并为临床提供有意义的依据。

参考文献

[1] Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic patients[J]. Blood, 1990, 75(2): 116-120.
 [2] Saxon BR, Mody M, Blanchette VS, et al. Reticulated platelet counts in the assessment of thrombocytopenic disorders[J]. Acta Paediatr Suppl, 1998, 424(1): 65-70.
 [3] Takubo T, Yamane T, Hino M, et al. Clinical significance of simultaneous measurement of reticulated platelets and large platelets in idiopathic

thrombocytopenic purpura[J]. Haematologia (Budap), 2000, 30(3): 183-192.
 [4] Robinson MSC, Mackie IJ, Khair K, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelet: evidence for a large proportion of non-specific labeling of dense granules by fluorescent dyes[J]. Br J Haematol, 1998, 100(2): 351-357.
 [5] Bonan JL, Rinder HM, Smith BR. Determination of the percentage of thiazole orange (TO) positive reticulated platelets using autologous erythrocyte TO fluorescence as an internal standard[J]. Cytometry, 1993, 14(4): 690-695.
 [6] Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function[J]. Thromb Haemost, 1998, 79(7): 885-896.
 [7] 向晓娟, 邓承祺, 牛挺, 等. 流式细胞术检测网织血小板[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(9): 501-502.
 [8] 张之南. 血液病诊断和疗效标准[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 34-35, 258-280, 431-432.
 [9] 杨玉琼, 程小丽, 陈葳. CyFlowSpace 流式细胞仪 CD34⁺ 细胞绝对计数分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1471-1473.
 [10] 苏丽. 血小板输注在白血病化疗中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1145.
 [11] Stohlawetz P, Stiegler G, Knobl P, et al. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions[J]. Ann Hematol, 1999, 78(2): 271-273.
 [12] 陈兵, 欧阳健, 陈军浩. 网织血小板与造血干细胞移植后再造血重建的相关性研究[J]. 江苏医药杂志, 2003, 29(5): 751-752.

(收稿日期: 2012-02-12)

(上接第 2193 页)

2.3 血液、肝脏、脾脏 MCH 检测 90 d 组小鼠肝脏、脾脏、血液 MCH 检测结果见图 3, 不同处理组血液、脾脏和肝脏 MCH 检测结果组内比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 APS+EPO 处理组血液、脾脏和肝脏 MCH 检测结果与 EPO 组和 APS 组比较差异有统计学意义, 且 APS+EPO 组、APS 组、EPO 组检测结果与 NS 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

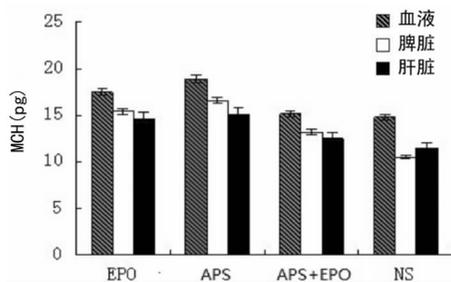


图 3 90 d 组小鼠肝脏、脾脏、血液 MCH 检测结果

3 讨论

EPO 是调节红细胞生成的主要因子,靶器官包括骨髓、肝脏和脾脏。多糖类物质可直接和(或)间接诱导造血微环境中的基质细胞、淋巴细胞等分泌造血生长因子,如集落刺激因子(CSF)、白细胞介素(IL)-23、IL-26, EPO 等,进而促进造血干祖细胞的增殖、分化^[6]。体内 EPO 含量与运动、血液 pH 值及年龄等因素有关^[7]。外周网 Ret 计数通常用来判断骨髓红细胞的造血情况,或用来鉴定各种贫血,而 MCH 也可用于贫血的鉴别^[3,8]。

本研究利用动物模型,通过比较外周血及 EPO 靶器官 Ret 数量,评价了 APS 对 rhEPO 的作用和影响,为阐明 APS 对红细胞系统成熟的促进作用提供了理论依据。本研究结果

(图 1)显示,APS 和 EPO 对成年小鼠的影响作用稳定。Ret 计数在反映骨髓红细胞系统造血能力方面很敏感。根据本研究结果(图 2),笔者认为 EPO 靶器官 Ret 计数超过 50% 即有研究意义。作为长期监测红细胞的指标,本研究结果(图 3)说明 MCH 也可用于 EPO 或 APS 药理作用评价,且监测成本低于免疫学检测定量技术。本研究通过分析 Ret 计数和 MCH,为探索 APS 对 EPO 在小鼠体内作用的影响提供科学依据。

参考文献

[1] Tong EM, Nissenson AR. Erythropoietin and anemia[J]. Semin Nephrol, 2001, 21(2): 190-203.
 [2] Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, et al. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance[J]. Med Sci Sports Exerc, 2000, 32(7): 1238-1243.
 [3] Breyman C. Erythropoietin test methods[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2000, 14(1): 135-145.
 [4] Birkeland KI, Hemmersbach P. The future of doping control in athletes issues related to blood sampling[J]. Sports Med, 1999, 28(1): 25-33.
 [5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 130-132.
 [6] 周国华, 于国萍. 黑木耳多糖降血脂作用的研究[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 46-48.
 [7] 刘志贤, 李剑鸿, 曾建武. 新生儿网织红细胞计数参考范围的探讨[J]. 生物医学工程与临床, 2008, 6(12): 487-489.
 [8] 周建中. 红细胞参数在缺铁性贫血诊断中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 32(7): 805-806.

(收稿日期: 2012-04-01)