

• 临床检验研究论著 •

## 流式细胞术检测血小板相关抗体在免疫性血小板减少症中的应用\*

任娜, 邱广斌, 王成彬

(中国人民解放军第二〇二医院检验科, 辽宁沈阳 110000)

**摘要:**目的 探讨流式细胞术检测血小板相关抗体在免疫性血小板减少症(ITP)的临床应用价值。方法 60例健康体检者、51例 ITP 患者(23例新诊断 ITP 患者、28例持续性 ITP 患者)和 21例非 ITP 继发性血小板减少症患者的血小板相关抗体, PAIg 的表达率及荧光强度, 与血小板、巨核细胞数量进行相关性分析;分析持续性 ITP 经过治疗后与治疗前的 PAIg 表达率。结果 ITP 患者组 IgG、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( $P < 0.01$ )。与非免疫性血小板减少组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与自身免疫病比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。非免疫性血小板减少组与健康对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ );自身免疫病组与健康对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ );在持续性 ITP 治疗患者中, 完全反应(complete response, CR)组的 PAIg 与治疗前进行组间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。有效(response, R)组的 PAIg 与治疗前组间比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 流式细胞术检测 PAIg 可以用于 ITP 诊断、鉴别诊断和病情监测。

**关键词:**流式细胞术; 血小板; 紫癜, 血小板减少性, 特发性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)13-1689-03

Application of flow cytometry detection of platelet associated antibody  
in patients with immune thrombocytopenic purpura\*

Ren Na, Qiu Guangbin, Wang Chengbin

(Department of Clinical Laboratory, the 202nd Hospital of PLA, Shenyang, Liaoning 110000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the value of the flow cytometry(FCM) for detecting platelet associated antibody in the diagnosis of immune thrombocytopenia(ITP). **Methods** Platelet associated antibody, expression rate and the fluorescence intensity of platelet-associated immunoglobulin(PAIg) were measured in 51 patients with ITP(23 cases of newly diagnosed ITP and 28 cases of persistent ITP), 21 patients with non-ITP and 60 healthy individuals. The correlation between the detection results with the platelet and megakaryocyte counts was performed; the expression rates of PAIg before and after treatment were compared. **Results** The fluorescence positive percentage and mean fluorescence intensity of IgG, Ig A and IgM in the patients group were significantly higher than those in the control group with statistical difference( $P < 0.01$ ). Compared with the non-ITP group, the difference had statistical significance( $P < 0.05$ ). Compared with the autoimmune disease group, the difference had no statistical significance( $P > 0.05$ ); the difference between the autoimmune disease group and the healthy control group had statistical significance( $P < 0.01$ ); in the persistent ITP group, PAIg in the complete response group had statistical difference between the groups before treatment. PAIg in the response group also had statistical difference between the groups before treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** FCM for detecting PAIg can be used in the diagnosis, differential diagnosis and the disease condition monitoring of ITP.

**Key words:** flow cytometry; blood platelets; purpura, thrombocytopenic, idiopathic

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia purpura, ITP), 既往称特发性血小板减少性紫癜, 是最常见的出血性疾病, 为不明原因的刺激引发的免疫反应导致血小板破坏过多, 超过骨髓代偿性产生血小板的速率。临床表现血小板计数降低, 自发性皮肤黏膜出血, 可引起出血性疾病, 颅内出血常为致死主要原因<sup>[1]</sup>, 成人 ITP 的年发病率约为(5~10)/10 万, 儿童 ITP 的年发病率约为(1.9~6.4)/10 万<sup>[2]</sup>。该类患者由于血液中存在抗血小板抗体或免疫复合物, 血小板膜糖蛋白 GP II b/III a(CD41/61) 为一种重要的靶抗原, 多数抗体易与血小板膜糖蛋白结合。本研究选取免疫性血小板减少症患者 51 例, 采用流式细胞术检测血小板相关抗体(PAIg)和膜糖蛋白, 分析在新诊断 ITP 患者、持续性 ITP 治疗患者中 PAIg、血小板、骨髓中巨核细胞变化, 比较不同治疗反应的持续性 ITP 治疗患者 PAIg 和血小板变化, 探讨血小板相关抗体在免疫性血小板减少症中的临床应用价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 72 例血小板减少患者为 2011 年 9 月至 2013 年 7 月本院门诊及住院的 ITP 患者 51 例(新诊断 ITP 患者 23 例, 持续性 ITP 治疗患者 28 例), 男 19 例, 女 32 例, 年龄 2~72 岁;非 ITP 继发性血小板减少症(non-secondary immune thrombocytopenia, NST)组 24 例, 其中男 13 例, 女 11 例, 年龄 15~76 岁, 包括自身免疫病 9 例, 再生障碍性贫血 4 例, 骨髓增生异常综合征 3 例。慢性肝病脾亢 4 例, 妊娠血小板减少 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第 2 版。健康对照组 60 例, 其中男 30 例, 女 30 例, 年龄 15~68 岁, 为同期体检并经证实的健康者。

**1.2 仪器与试剂** ADV2120 全血自动血细胞分析仪(美国西门子公司); FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); IgG-FITC、IgM-PE、IgA-FITC、CD61-PerCP 及同型对照均为 BD 公司产品。

\* 基金项目:军队医学科研十二五重大专项(AWS11Z005-4); 国家科技支撑计划(2013BAI17B05)。作者简介:任娜, 女, 主管技师, 主要从事实验诊断血液学研究。

1.3 方法

1.3.1 血小板计数 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血,全自动血细胞分析仪检测。骨髓涂片巨核细胞计数:选择骨髓取材、染色、涂片良好的标本进行巨核细胞标准化计数并分类。

1.3.2 血小板相关免疫球蛋白的检测 (1)分离与洗涤血小板,用柠檬酸钠抗凝真空采血管(BD 公司),采集静脉抗凝血,离心,收取富含血小板血浆,经 200×g 离心 5 min,吸取上层富含血小板血浆 (PRP) 于等体积 PBS 的专用塑料试管中混匀。500×g 离心 5 min,弃上清液,加 2 mL PBS 悬浮血小板,洗涤 3 次,调整血小板浓度为(50~100)×10<sup>6</sup>/L [3]。(2)免疫荧光标记,在标记管中加入 CD61FITC、GAH-IgG 各 10 μL,在对照管中加入 CD61 FITC、Goat-IgG PE 各 10 μL。然后在对照和标记管中均加入制备的血小板悬液 10 μL,混匀后置室温、避光反应 30 min,加入 1.8 mL PBS 悬浮血小板,再加 0.2 mL 10%多聚甲醛混匀,固定 10 min 后,可进行上机检测。(3)流式细胞仪检测及分析,检测前对流式细胞仪进行光流路质量调控和荧光补偿,使仪器各项指标在质量控制允许值范围。每份标本获取设门内细胞在 10 000 个以上。检测各个指标的阳性率表达百分率和荧光强度,数据分析使用 Cellquest 软件。PAIg 的测定参考范围小于 10%,为本实验室参考值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件统计分析,首先进行正态性检验和方差齐性检验;满足单因素方差分析条件进行单因素方差分析,然后进行 Multiple Comparisons LSD 两组之间分析;否则采用多个独立样本的非参数检验,然后进行两个独立样本的非参数检验,比较两组之间的差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组人群血小板与骨髓涂片的巨核细胞数 结果显示 ITP 组和 NST 组血小板计数与对照组相比明显降低,差异有统计学意义(P<0.01)。巨核细胞形态的观察,结果表明相

对于正常骨髓,ITP 患者巨核细胞数量明显增加,以原始、幼稚巨核细胞和成熟无血小板产生的巨核细胞为主,这些巨核细胞颗粒减少伴成熟障碍,胞质增多,退形变性增加,产板巨核细胞减少,与对照组相比差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 3 组人群血小板数量与骨髓巨核细胞绝对数量比较

组别	n	血小板(×10 <sup>9</sup> /L)	巨核细胞
对照组	15	193±49	27±8
ITP	51	35±27	67±13
NST	11	101±21	11±4
P		0.001	0.008

2.2 FCM 血小板抗体检测结果 ITP 患者组 IgG、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=0.008 9)。与非免疫性血小板减少组荧光百分率和平均荧光强度比较差异有统计学意义(P=0.029 2)。与自身免疫病荧光阳性百分率和平均荧光强度比较差异无统计学意义(P=0.42);非免疫性血小板减少与健康对照组荧光阳性百分率和平均荧光强度比较,差异无统计学意义;自身免疫病与健康对照组荧光阳性百分率和平均荧光强度差异有统计学意义(P<0.01)。在新发 ITP 的诊断中,PAIg 与血小板水平呈明显负相关。ITP 患者 PAIgG 阳性率 81.5%;PAIgA 阳性率为 66.12%,PAIgM 阳性率为 72.4%、PAIgG、PAIgM 和 PAIgA 三者阳性均为 71.14%。

2.3 持续性 ITP 药物治疗 4 周后 PAIg 的检测结果 应用泼尼松治疗 4 周后,完全反应(complete response,CR)组的 PAIg 与治疗前进行组间比较差异有统计学意义(P<0.01)。有效(response,R)组的 PAIg 与治疗前组间比较差异具有统计学意义(P<0.05)。无效(no response,NR)组与治疗前组间比较差异无统计学意义(P=0.41),见表 2。

表 2 持续性 ITP 治疗 4 周后 PAIg 及血小板比较

组别	n	血小板 (×10 <sup>9</sup> /L)	PAIgG		PAIgA		PAIgM	
			治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
CR	9	>100	21.12±8.65	3.21±0.76	16.95±6.63	2.69±1.42	10.22±4.62	1.98±1.46
R	11	>30	20.31±7.83	6.23±3.40	16.05±5.84	5.23±2.33	10.12±4.92	7.23±2.41
NR	8	<30	19.43±9.65	16.91±5.42	16.75±5.94	10.38±5.12	10.24±4.72	8.94±3.42

3 讨 论

免疫性血小板减少症因自身免疫缺陷或外来抗原(如病毒、幽门螺杆菌感染等)作用,产生抗血小板抗体(主要包括 PAIgA、PAIgG 和 PAIgM)破坏血小板引起其减少而导致出血[4-7]。目前 ITP 主要依据排除诊断,即需排除其他病因引起的血小板减少症,缺乏敏感的特异性诊断指标。本研究中新发 ITP 患者 PAIgG 阳性率为 81.5%;PAIgA、PAIgM 阳性分别为 66.12%和 72.4%;PAIgG、PAIgM 和 PAIgA 三者阳性均为 71.14%,说明 ITP 患者由于自身血小板抗原变异,刺激机体产生相应抗体的过程中,有多株的 B 淋巴细胞受到激活,产生多株的抗体;在持续 ITP 经过泼尼松周治疗 4 周后,完全反应 CR 组与 R 组的 PAIg、血小板计数均与治疗前比较具有统计学意义(P<0.01),NR 组不具有统计学意义(P=0.41)。说明动态观察 PAIg 可以为治疗提供依据。

关于 ITP 的分型与分期过去将 ITP 分为急性 ITP 和慢性 ITP,慢性 ITP 是指病程超过 6 个月仍未恢复的 ITP 患者。由于研究发现许多儿童 ITP 患者在血小板减少持续 1 年后仍然

有相当一部分能够自发缓解,因此新版的指南将慢性 ITP 的病程从过去的 6 个月延长至 12 个月。取消了过去分期中的“急性 ITP”,而代之以“新诊断的 ITP(确诊后 3 个月以内的 ITP 患者)”和“持续性 ITP(确诊 3~12 个月血小板持续减少的 ITP 患者)”[8-10]。

流式细胞术检测血小板相关抗体,应用了流式细胞仪可以在数秒钟内进行上万个细胞的计数,并可同时进行细胞表面多参数的分析特性,具有方便、迅速的优点,且标本需求量少。此外,本实验的关键在于血小板悬液的制备,在富集血小板过程中,一定要洗涤血小板,以避免游离免疫球蛋白对抗原、抗体结合过程的影响;既往检测血小板相关抗体多采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测,但对血小板极少的患者检测结果存在较大偏差,且操作过程中易破坏和激活血小板;本次研究应用 CD61 来标记血小板群,ITP 患者由于血液中存在抗血小板抗体或免疫复合物,使血小板膜糖蛋白 GP II b/III a(CD41/61)为一种重要的靶抗原,多数抗体易与血小板膜糖蛋白结合,通过设置血小板门,可以特异性地区分血小板,避免杂质(下转第 1693 页)

升高而抗心肌肥大,其抑制细胞内钙升高与外钙内流和内钙释放均有关。杜钢军等<sup>[11]</sup>报道灯盏花素对肺纤维化有保护作用,其机制可能是通过增加抗氧化防御系统和阻止 TGF- $\beta$  信号实现的,这一作用基础可能对防治组织纤维化及其相关的疾病具有积极意义。

**3.3 ET-1 和 NO** ET-1 是一种由 21 个氨基酸组成的多肽,是目前为止发现的作用最强的收缩血管的活性物质。在内皮细胞损伤及组织缺血、缺氧等情况下,内皮细胞大量合成 ET-1 释放入血,成为参与疾病病理、生理过程的重要体液因素之一;NO 又称内皮源性舒张因子,NO 能激活可溶性鸟苷酸环化酶,升高细胞 cGMP 水平,引起血管平滑肌松弛、外周阻力下降和血管扩张,是内皮素的生理拮抗剂<sup>[12]</sup>。以上两种生物活性物质在呼吸系统的生理、病理过程中发挥着重要的作用<sup>[13]</sup>。NO 与 ET-1 既是一对相互关联的因子,又是一对相互制约的因子,表现在抑制 NO 合成可强化 ET-1 的作用,ET-1 引起的剂量依赖性血管收缩,可因 NO 合成抑制而强化。因此,ET-1、NO 可能参与了肺心病患者慢性阻塞性肺疾病、肺动脉高压的发生、发展。

综上所述,本研究显示:治疗组临床疗效有效率高于对照组,有统计学意义;ET-1、NO 分析结果均显示两组治疗前后均有明显改善,治疗组改善优于对照组。两组均未出现明显不良反应。肺心病急性加重期经治疗后好转,NO 增高,ET-1 降低,未好转者 NO,ET-1 水平无明显变化,提示 NO 减少、ET-1 增高,可能是慢性肺心病病情恶化的重要原因,而它们的动态变化,尤其是 ET-1 和 NO 可作为肺心病病情观察及预后判断的参考指标。低分子肝素钙联合灯盏花素治疗老年肺心病优于常规治疗组,联合应用能明显改善老年性肺心病患者血液高凝状态,提高动脉血氧分压,减轻 CO<sub>2</sub> 潴留,改善心、肺功能,提高临床疗效,并且使用安全,不良反应小。

**参考文献**

[1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 13 版. 北京:人民卫生出版社,2009:1597.  
 [2] Vizza D, Letizia C, Petramala L, et al. Venous endothelin-1(ET-1) and brain natriuretic peptide(BNP) plasma levels during 6 month

bosentan treatment for pulmonary arterial hypertension[J]. Regulpept, 2008, 15(1): 48-53.  
 [3] 李常学. 低分子肝素治疗不稳定型心绞痛疗效观察[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(2): 78-80.  
 [4] Huang L, Dong R. Correlation between coagulation function of cor pulmonale and pulmonary function medical when intervening with low molecular heparin[J]. Chin J Hemorheol, 2009, 15(1): 83-85.  
 [5] 中华医学会呼吸病学会. 慢性肺源性心脏病临床诊断及疗效判断标准[J]. 中华结核与呼吸杂志, 1980, 3(1): 23-25.  
 [6] Kang H, Bae BS, Kim JH, et al. The relationship between chronic atrial fibrillation and reduced pulmonary function in cases of preserved left ventricular systolic function[J]. Korean Circ J, 2009, 39(3): 372-377.  
 [7] Duffels MG, Vander plas MN, Surie S, et al. Bosentan in pulmonary arterial hypertension: a comparison between congenital heart disease and chronic pulmonary embolism[J]. Neth Heart J, 2009, 17(3): 334-338.  
 [8] Wang C, Du M, Cao D, et al. Pathologic study on formation of pulmonary clots in chronic cor pulmonale acute stage[J]. Nat Med J China, 2011, 77(2): 123-125.  
 [9] Cai B. Respiratory Interal Medicine [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2012: 403.  
 [10] 张锐, 潘振伟. 灯盏花素抑制肾上腺素诱导的心肌细胞内钙升高的机制[J]. 黑龙江医学, 2010, 34(8): 588-590.  
 [11] 杜钢军, 张硕, 林海红, 等. 灯盏花素对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 160-163.  
 [12] Schuh R, Rassaf T, Massion PB, et al. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis [J]. Pharmacol Ther, 2005, 108(3): 225-256.  
 [13] Nikolau E, Trakada G, Prodmmakis E, et al. Evaluation of arterial endothelin-1 levels, before and during a sleep study, in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmnary disease [J]. Respiration, 2009, 70(6): 606-610.

(收稿日期: 2014-01-08)

(上接第 1690 页)

碎片的干扰,以保证结果有较好的重复性。

因此,流式细胞术检测血小板相关抗体在免疫性血小板减少症中的诊断、鉴别诊断以及治疗评估具有重要意义。

**参考文献**

[1] Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American Society Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2011, 117(30): 4190-4207.  
 [2] Terrell DR, Beebe A, Vesely SK, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: a critical review of published reports[J]. Am J Hematol, 2010, 85(2): 174-180.  
 [3] Nishioka T, Yamane T, Takubo T, et al. Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in immune thrombocytopenic purpura[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2005, 68(1): 37-42.  
 [4] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an interna-

tional working group[J]. Blood, 2009, 113(11): 2386-2393.  
 [5] Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura[J]. Curr Opin Hematol, 2007, 14(5): 511-514.  
 [6] 任娜, 赵威, 邱广斌. 系统性红斑狼疮患者的外周血淋巴细胞亚群结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20): 2449-2452.  
 [7] 中华医学会血液分会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识(修订版)[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(3): 214-216.  
 [8] 王琳, 侯明. 原发免疫性血小板减少症出血评分系统临床应用分析[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(6): 499-501.  
 [9] 秦平, 侯明. 2012 版成人原发免疫性血小板减少症诊治的中国专家共识解读[J]. 临床血液学杂志, 2013, 26(3): 151-155.  
 [10] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. Blood, 2009, 113(11): 2386-2393.

(收稿日期: 2013-12-28)