

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.16.011

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200403.0907.002.html\(2020-04-03\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200403.0907.002.html(2020-04-03))

细胞松弛素 D 在 TEG 中对血小板制品凝血功能检测的应用研究*

钟周琳,周燕,卢芳,李丽兰,吴国光[△]

(广西壮族自治区南宁输血医学研究所,南宁 530007)

[摘要] **目的** 应用细胞松弛素 D(CD)抑制血小板参与凝血,建立血栓弹力图(TEG)检测血小板制品凝血功能的方法。**方法** 通过优化实验条件,选择合适血小板浓度作为 TEG 检测血小板制品的工作浓度及合适浓度的 CD 抑制血小板,并与 Functional Fibrinogen(FF)试剂盒比较抑制血小板的效果。应用 CD 抑制血小板,TEG 检测获得血浆纤维蛋白原对最大振幅(MA)的贡献值 MA_{fib},计算血小板贡献值 MA_{plt};采用建立的方法检测 30 份单采血小板制品,获得正常参考范围。**结果** 选择血小板浓度 $100 \times 10^9/L$ 作为 TEG 检测血小板制品的工作浓度,终浓度为 $3.0 \mu\text{mol/L}$ 的 CD 用于抑制血小板。CD 可完全抑制浓度为 $50 \times 10^9/L \sim 500 \times 10^9/L$ 的血小板,而 FF 试剂盒无法完全抑制浓度大于 $200 \times 10^9/L$ 的血小板。检测 30 份不同献血者的单采血小板制品 MA 为 $(64.95 \pm 5.67)\text{mm}$,MA_{fib} 为 $(24.65 \pm 5.42)\text{mm}$,MA_{plt} 为 $(40.30 \pm 3.63)\text{mm}$ 。**结论** 本研究可应用于血小板制品功能的评估。

[关键词] 血栓弹力图描记术;血小板;细胞松弛素 D;血液凝固;最大振幅**[中图分类号]** R558.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)16-2663-04

Study on the application of cytochalasin D in platelet concentrates functional detection based on thromboelastography*

ZHONG Zhoulin,ZHOU Yan,LU Fang,LI Lilan,WU Guoguang[△]

(Nanning Institute of Transfusion Medicine,Nanning,Guangxi 530007,China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for platelet concentrates aggregation based on thromboelastography(TEG) using cytochalasin D (CD) to inhibit the contribution of platelet to clot strength. **Methods** Appropriate platelet concentration and CD concentration were selected for TEG assay and platelet inhibition,while Functional Fibrinogen (FF) kit was applied for comparing with CD for the effect of platelet inhibition. MA_{fib} of TEG was detected by using CD to inhibit platelet,then MA_{plt} was calculated. A total of 30 PCs from different donors were detected to obtain the reference range of normal value of MA_{plt}. **Results** Platelet $100 \times 10^9/L$ as a working concentration was selected for detecting PCs by TEG,and CD with a final concentration of $3.0 \mu\text{mol/L}$ was applied for platelet inhibition. CD could effectively inhibit $50 \times 10^9/L - 500 \times 10^9/L$ platelet,while FF kit could not effectively inhibit platelet $> 200 \times 10^9/L$. The reference range of MA was $(64.95 \pm 5.67)\text{mm}$,MA_{fib} was $(24.65 \pm 5.42)\text{mm}$,MA_{plt} was $(40.30 \pm 3.63)\text{mm}$,respectively. **Conclusion** This method can be applied to evaluate the platelet function.

[Key words] thromboelastography;blood platelets;cytochalasin D;blood coagulation;maximum amplitude

血小板制品在血液系统、肿瘤等血小板减少疾病中的应用越来越广泛,血小板质量是血小板有效输注的重要因素^[1-4]。根据《全血及成分血质量要求》(GB18469-2012),血小板制品的质量控制只有血小板计数、pH 值等少量指标,而血小板制品功能性检测的

文献报道较少。本研究通过血栓弹力图(thromboelastography,TEG)检测血小板制品,应用细胞松弛素 D(cytochalasin D,CD)抑制血小板细胞骨架重排,消除血小板对最大振幅(maximum amplitude,MA)的作用,区分纤维蛋白原对 MA 的贡献值(MA-

* 基金项目:广西壮族自治区自然科学基金面上项目(2016GXNSFAA380144),广西壮族自治区南宁市科学研究与技术开发计划项目(科技重大专项,20173117)。作者简介:钟周琳(1980-),副主任技师,硕士,主要从事血小板免疫生物学研究。△ 通信作者,E-mail:guangwu@szonline.net。

fib), 计算血小板对 MA 的贡献值 (MA_{plt}), 并与 Functional Fibrinogen (FF) 试剂盒比较抑制血小板的效果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

血液标本来自 2019 年 1—10 月南宁中心血站单采血小板制品标本, 献血者捐献单采血小板完成后留取 3 mL 标本, (22±2)°C 条件下震荡保存, 3 h 内完成检测。献血者男女比例为 1:1, 年龄 18~55 岁, 符合《献血者健康检查要求》, 献血前 5 d 内未服用抑制或损害血小板功能的药物, 献血者对本研究知情同意。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器

Hemostasis System Kaolin 试剂盒、FF 试剂盒、TEG5000 购于美国 Haemoscope 公司; CD 购于美国 Life technologies 公司; Sysmex-XT2000i 五分类血细胞计数仪购于日本 Sysmex 公司。

1.2.2 TEG 检测血小板制品浓度的选择

将血小板制品用 AB 型冰冻血浆分别稀释至 50、100、200、300、400、500×10⁹/L 浓度梯度, 按 Hemostasis System Kaolin 试剂盒说明书, 分别吸取 1 mL 不同浓度的血小板至含高岭土的活化试剂瓶, 轻轻颠倒混匀 5 次, 吸取 330 μL 至预先加入 30 μL 的 0.2 mmol/L CaCl₂ 的样品杯, TEG 用 CK 模式运行检测, 直到 MA 确定。分析血小板浓度对 TEG 检测结果的影响, 选择 TEG 检测敏感的血小板工作浓度。

1.2.3 CD 抑制血小板凝血功能的 TEG 检测

将 CD 试剂溶解于二甲基亚砜 (DMSO), 1 mmol/L, 分装冻存于 -20 °C 备用。实验前将 CD 与血小板充分混匀, 吸取 1 mL 至含高岭土的活化试剂瓶, 轻轻颠倒混匀 5 次, 吸取 330 μL 至预先加入 30 μL 的 0.2 mmol/L CaCl₂ 的反应杯, TEG 用 CK 模式运行检测, 直到 MA 确定。分别以终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μmol/L 的 CD 抑制血小板, 分析不同浓度的 CD 对抑制血小板凝血效果的影响, 选

择合适的浓度应用于抑制血小板; CD 分别与血小板孵育 0、5、10、20、30 min, 分析孵育时间对抑制血小板凝血效果的影响。

1.2.4 CD 与 FF 试剂盒抑制血小板凝血效果的比较

按 FF 试剂盒说明书将试剂盒放置室温平衡, 轻敲含 GP II b/III a 抑制剂的试剂瓶, 确保内容物在小瓶底部, 吸取 500 μL 血小板至试剂瓶, 轻轻旋转倒置混匀 5 次后, 吸取 330 μL 至预先加入 30 μL 的 0.2 mmol/L CaCl₂ 的反应杯, TEG 用有功能性纤维蛋白原检测功能 (CFF) 模式运行检测, 直到 MA 确定。分别检测浓度为 50、100、200、300、400、500×10⁹/L 的血小板, 同时按前述方法用 CD 处理抑制相同血小板浓度的血小板, 并用 TEG 检测。通过比较相同血小板浓度的 MA, 比较两种方法抑制血小板的效果。

1.2.5 MA_{plt} 的计算及检测 30 份单采血小板获得 MA_{plt} 的参考范围

应用前述血小板工作浓度, 按前所述检测 30 份不同献血者的单采血小板获得 MA, 按前述合适的 CD 抑制血小板实验条件检测单采血小板获得 MA_{fib}, 按公式 MA_{plt}=MA-MA_{fib} 计算 MA_{plt} 的参考范围。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 *t* 检验和 Bonferroni 校正法, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板浓度对 TEG 检测结果的影响

MA 随血小板浓度升高而升高, 血小板浓度高于 300×10⁹/L 时, MA 升高不明显, 血小板浓度为 300×10⁹/L、400×10⁹/L、500×10⁹/L 时 MA 比较, 差异无统计学意义 (*P*>0.05), 而血小板浓度低于 100×10⁹/L 时, MA 明显降低。血小板 50×10⁹/L、100×10⁹/L 分别与不同血小板浓度两两比较差异有统计学意义 (*P*<0.05), 血小板为 50×10⁹/L 时 MA 接近试剂盒参考范围的最低临界值, 见表 1。

表 1 不同浓度血小板的 TEG 检测结果 (*n*=6, $\bar{x} \pm s$, mm)

血小板浓度	MA	CD 抑制血小板		FF 试剂盒	
		MA _{fib}	MA _{plt}	MA _{fib}	MA _{plt}
50×10 ⁹ /L	51.54±2.35 ^a	24.58±1.64	26.96±2.04	24.14±1.38	27.40±3.50
100×10 ⁹ /L	63.64±1.61 ^a	24.36±1.33	39.28±2.82	24.40±1.73	39.24±2.54
200×10 ⁹ /L	67.48±1.23	24.22±1.98	43.26±3.09	27.68±1.81 ^a	39.80±2.87
300×10 ⁹ /L	69.08±2.48	24.34±1.94	44.74±3.75	34.06±1.84 ^a	35.02±1.28
400×10 ⁹ /L	68.88±2.41	24.22±1.85	44.66±3.69	36.88±1.93 ^a	32.00±3.84
500×10 ⁹ /L	70.80±3.00	24.54±1.90	46.26±3.00	41.88±2.12 ^a	28.92±3.78

^a: *P*<0.05, 与其他血小板浓度比较。

表 2 单采血小板血液制品 TEG 检测结果 ($n=30, \bar{x} \pm s$)

检测方法	R(min)	K(min)	α 角(度)	MA(mm)	MAplt(mm)
CK	15.00±7.06	1.40±0.88	68.44±9.76	64.95±5.67	40.30±7.11
CK-CD	14.94±8.60	5.22±4.28	40.99±11.41	24.65±5.42	—

R:凝血反应时间;—:无数据。

2.2 CD 的浓度对抑制血小板凝血效果的影响

浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 CD 抑制血小板,MAfib 分别为(38.12±1.78)、(32.94±1.75)、(26.80±1.67)、(24.10±1.76)、(24.14±1.32)、(24.18±1.66)mm。2.0、2.5、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 CD 抑制血小板的 MAfib 组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 CD 孵育时间对抑制血小板凝血效果的影响

3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 CD 与 $100 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板分别孵育 0、5、10、20、30 min,MAfib 分别为(24.36±1.33)、(25.16±1.86)、(24.87±1.74)、(24.43±1.92)、(24.15±1.82)mm,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 CD 与 FF 试剂盒抑制血小板凝血效果的比较

3.0 $\mu\text{mol/L}$ CD 抑制 $50 \times 10^9/\text{L} \sim 500 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板,MAfib 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。而 FF 试剂盒仅可以有效抑制 $50 \times 10^9/\text{L}$ 、 $100 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板,MAfib 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。血小板浓度大于 $200 \times 10^9/\text{L}$,则不能完全抑制血小板,而血小板浓度为 $200 \times 10^9/\text{L} \sim 500 \times 10^9/\text{L}$ 的 MAfib 两两比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.5 单采血小板血液制品 TEG 检测结果

以血小板 $100 \times 10^9/\text{L}$ 、CD 终浓度 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 抑制血小板,检测 30 份来自不同献血者的血小板制品发现,血小板被抑制后,TEG 其他参数也发生变化,血块形成时间(K)延长、 α 角变小,见表 2。

3 讨 论

TEG 可提供由凝血启动到血小板联结、纤维蛋白丝形成、血块形成及降解的全部信息,广泛应用于监控创伤、手术、肝移植等患者的凝血状态,对临床输血、抗血小板药物治疗指导^[5-10]。然而,应用于血小板制品检测上较少见,相关检测的过程更需标准化。由于血小板制品的浓度很高(约 $1\,000 \times 10^9/\text{L}$),可导致 TEG 检测的灵敏度降低,使凝血功能异常的血小板会有漏检现象产生。为提高 TEG 检测灵敏度,本研究用同一来源的 AB 型冰冻血浆稀释成不同的血小板浓度梯度,发现血小板浓度小于或等于 $100 \times 10^9/\text{L}$ 时,MA 明显随血小板浓度降低而减少,当血小板浓度小于 $50 \times 10^9/\text{L}$ 时,MA 接近试剂盒参考范围的最低临界值,从而本研究将血小板检测浓度设定为

$100 \times 10^9/\text{L}$ 。MA 反映血凝块最大强度或硬度,其影响因素有 2 个,即血小板和纤维蛋白原^[11-12],如何区分二者对血块凝集的贡献值是 TEG 检测血小板凝血功能的关键。

本研究探讨了在 TEG 技术中,应用细胞松弛素 D 中对血小板制品凝血功能的检测效果和 related 价值。血小板活化凝血过程从无黏性的圆盘状细胞变成有黏性的、有突起的胶状物,这种变化依赖于肌动蛋白聚合,血小板的肌动蛋白含量约占总蛋白 20%,其作为细胞骨架对血小板的生物学功能起关键作用^[13-14]。而细胞松弛素 D 是肌动蛋白聚合的抑制剂,其与 F-肌动蛋白的(+)端结合,干扰肌动蛋白丝的延长,减少微丝的形成,阻止 F-肌动蛋白的功能,抑制血小板细胞骨架重排,从而消除血小板对血块凝集的作用^[15],CD 浓度可影响抑制血小板的效果,本研究确定 CD 终浓度 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 可完全抑制浓度为 $50 \times 10^9/\text{L} \sim 500 \times 10^9/\text{L}$ 的血小板。本研究还比较了作用时间对抑制血小板凝血效果的影响,CD 分别与血小板作用 0、5、10、20、30 min,TEG 检测 MAfib 无显著性差异,表明 CD 不预先与血小板作用,混匀后即可检测。而 FINKENSTAEDT-QUINN 等^[16]通过荧光标记单细胞图像研究血小板细胞骨架动力学,发现血小板与 CD 接触后发生形状改变 40 s 内即可达到稳定的状态,从另一方面说明了 CD 抑制血小板的高效性。

FF 试剂盒通过阿昔单抗等 GP II b/III a 受体抑制剂,阻止纤维蛋白原与血小板 GP II b/III a 受体的结合,其抑制效果更依赖于抑制剂的浓度,SCHLIMP 等^[17]报道 FF 试剂盒不能完全抑制血小板,本研究发现血小板大于或等于 200 时 FF 试剂盒不能完全抑制血小板,MAfib 随血小板浓度升高而升高。与 FF 试剂盒相比,CD 用量少、可抑制更高浓度的血小板,成本大幅低于 FF 试剂盒,除了用于检测血小板制品以外,还可应用于检测患者纤维蛋白原功能等,具有推广价值。

综上所述,本研究应用细胞松弛素 D 抑制血小板凝血功能,区分血小板和血浆纤维蛋白原对 MA 的贡献值 MAplt 和 MAfib,建立了 TEG 检测血小板制品凝血功能的方法及本室的正常参考范围,可推广应用于血小板制品质量的监控。

参考文献

- [1] TISSOT J D, BARDYN M, SONEGO G, et al. The storage lesions: from past to future [J]. *Transfus Clin Biol*, 2017, 24(3): 277-284.
- [2] SATAKE M, KOZAKAI M, MATSUMOTO M, et al. Platelet safety strategies in Japan: impact of short shelf life on the incidence of septic reactions [J]. *Transfusion*, 2020, 60(4): 731-738.
- [3] HUMBRECHT C, KIENZ D, GACHET C. Platelet transfusion: current challenges [J]. *Transfus Clin Biol*, 2018, 25(3): 151-164.
- [4] JUSKEWITCH J E, NORGAN A P, DE GOEY S R, et al. How do I... manage the platelet transfusion-refractory patient? [J]. *Transfusion*, 2017, 57(12): 2828-2835.
- [5] SUNDAR V, BHASKAR E. Effect of platelet transfusion on clot strength in dengue fever with thrombocytopenia related bleeding: a thromboelastography-based study [J]. *Transfus Med Hemother*, 2019, 46(6): 457-461.
- [6] CORLISS B M, FREEDMAN R, BRENNAN M M, et al. Laboratory assessments of therapeutic platelet inhibition in endovascular neurosurgery: complication prediction using the VerifyNow P2Y12 assay and thromboelastography with platelet mapping [J]. *J Neurosurg*, 2020, 21: 1-9.
- [7] SATO K, KATORI N, SUGA Y, et al. Coagulation assessment with thromboelastography during abdominal endovascular aneurysm repair in a patient with hemophilia A [J]. *JA Clin Rep*, 2020, 6(1): 7.
- [8] 李朝晖, 李艳颖, 党瑜华, 等. 血小板功能及 CYP2C19 基因型检测指导 PCI 术后抗血小板治疗 [J]. *重庆医学*, 2018, 47(32): 4197-4199.
- [9] 张艳红, 刘磊, 郑娅琼, 等. 血栓弹力图监测肝病患者凝血功能及其对临床输血的指导意义 [J]. *中国输血杂志*, 2018, 31(10): 1149-1152.
- [10] CHOW J H, RICHARDS J E, MORRISON J J, et al. Viscoelastic signals for optimal resuscitation in trauma: kaolin thrombelastography cutoffs for diagnosing hypofibrinogenemia (VISOR study) [J]. *Anesth Analg*, 2019, 129(6): 1482-1491.
- [11] WHITING D, DINARDO J A. TEG and ROTEM: technology and clinical applications [J]. *Am J Hematol*, 2014, 89(2): 228-232.
- [12] SOLOMON C, RANUCCI M, HOCHLEITNER G, et al. Assessing the methodology for calculating platelet contribution to clot strength (platelet component) in thromboelastometry and thrombelastography [J]. *Anesth Analg*, 2015, 121(4): 868-878.
- [13] DASGUPTA S K, THIAGARAJAN P. Wdr-1 is essential for F-actin interaction with focal adhesions in platelets [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2018, 29(6): 540-545.
- [14] SORRENTINO S, STUDDT J D, MEDALIA O, et al. Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function [J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(3): 129-138.
- [15] SHOJI K, OHASHI K, SAMPEI K, et al. Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(1): 52-57.
- [16] FINKENSTAEDT-QUINN S A, GE S, HAYNES C L. Cytoskeleton dynamics in drug-treated platelets [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(10): 2803-2809.
- [17] SCHLIMP C J, SOLOMON C, RANUCCI M, et al. The effectiveness of different functional fibrinogen polymerization assays in eliminating platelet contribution to clot strength in thromboelastometry [J]. *Anesth Analg*, 2014, 118(2): 269-276.

(收稿日期: 2020-02-18 修回日期: 2020-05-26)