

· 临床研究报道 ·

# 流式细胞术检测儿童肾病综合征 血小板活化功能的研究

张广舫<sup>1</sup>, 顾小锋<sup>2</sup>, 吴玥<sup>2</sup>

(1. 中国中医血液病治疗中心, 廊坊市中医院儿科, 河北 廊坊 065000; 2. 复旦大学附属儿科医院儿研所血液室, 上海 200032)

**[摘要]** 目的 原发性肾病综合征(PNS)时存在着明显的高凝状态和血栓并发症, 肾内微血栓形成可能是促使疾病进展及导致肾小球硬化的主要原因之一, 血小板活化功能异常在儿童 PNS 的病理生理和血栓并发症中的作用仍然不完全清楚, 目前未见国内报道。故有必要了解儿童 PNS 时血小板活化状态和活化功能的变化, 探讨血小板活化在儿童 PNS 发病中的病理作用及其与病理类型的关系, 指导临床治疗。方法 利用流式细胞术(FCM)三色荧光标记法检测 15 例 PNS 患儿微量全血血小板活化特异性单克隆抗体 CD62P、PAC-1 ADP 激活前后血小板表面阳性表达的百分比, 同时选择 16 例外科畸形择期手术前儿童作为正常对照组。观察 PNS 患儿血小板 CD62P、PAC-1 阳性表达的变化并与正常对照组比较。结果 PNS 患儿 ADP 激活前后血小板 CD62P 阳性表达分别为  $3.97 \pm 4.01$  和  $34.38 \pm 17.05$  均高于正常对照组  $0.57 \pm 0.75$  和  $10.80 \pm 8.38$  ( $P < 0.01$ )。PAC-1 的表达分别为  $24.72 \pm 33.26$  和  $72.61 \pm 24.21$  与正常对照组  $21.16 \pm 14.72$  和  $80.41 \pm 18.37$  比较无显著变化 ( $P > 0.05$ )。结论 儿童 PNS 时体内血小板活化和 ADP 激活后血小板活化功能均增强。提示血小板活化增强在 PNS 高凝状态的发生中起一定作用, 并与 PNS 的病理机制、病理类型及预后密切相关, 为研究血小板活化与 PNS 的关系提供了一种快捷、准确、特异的检测方法, 为临床抗血小板治疗提供了实验室指标。

[中国当代儿科杂志, 2004, 6(2): 133 - 135]

**[关键词]** 流式细胞术; 肾病综合征; 血小板活化; 儿童

**[中图分类号]** R692 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008 - 8830(2004)02 - 0133 - 03

现已证明血小板在血栓与止血、免疫调节和炎症过程中起着重要作用。原发性肾病综合征(PNS)时存在着明显的高凝状态, 易致各种动、静脉血栓形成是高凝状态的并发症, 肾内微血栓形成是促使疾病进展及导致肾小球硬化的主要原因之一<sup>[1]</sup>。近年来研究表明, 血小板功能异常在肾小球肾炎的发病中起重要作用<sup>[2]</sup>。血小板活化功能异常在儿童 PNS 的病理生理和血栓并发症中的作用仍然不完全清楚, 目前未见国内报道。我们应用流式细胞术(FCM)结合血小板活化特异性单抗检测儿童 PNS 时外周血血小板活化状态和 ADP 激活后血小板活化功能, 旨在探讨儿童 PNS 时血小板功能异常及其与病理生理、病理类型及预后的关系, 为临床治疗提供实验室依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

主要试剂: 荧光标记的血小板单克隆抗体(单抗): PAC-1-FITC 为异硫氰荧光标记的抗活化 GP b/GP a 的单抗; CD62P-PE 为藻红素标记的抗 P-选择素单抗; CD61-PerCP 为多甲藻素叶绿素蛋白标记的抗血小板 GP a 单抗; MIgG 为藻红素标记的鼠 IgG; MIgM 为异硫氰荧光标记的鼠 IgM。以上单抗为美国 Becton-Dickinson 公司产品。ADP 激活剂:  $1 \times 10^{-1}$  M ADP PBS 溶液, ADP 为法国 AMRESCO 公司生产, 本室配制。固定液: 1% 多聚甲醛 PBS 溶液, 本室配制。ACD 抗凝剂: 3.8% 复方枸橼酸钠溶液, 上海市血液中心提供。

[收稿日期] 2003 - 07 - 07; [修回日期] 2003 - 12 - 02

[作者简介] 张广舫(1962 - ), 女, 大学, 副主任医师。主攻方向: 中西医结合小儿内科及小儿血液专业。

仪器: FACScan 流式细胞仪, CELLQUEST 分析软件, 美国 Becton-Dickinson 公司提供。

### 1.2 研究对象

全部患儿均为 2002 年 3 月至 2002 年 8 月间在我院住院患儿, 诊断和疗效判定符合文献<sup>[3]</sup>。正常对照组: 外科畸形择期手术前儿童 16 例, 男 12 例, 女 4 例, 年龄 7 个月至 10 岁, 平均 5 岁 8 个月, 其中产瘫 8 例, 先天斜颈 3 例, 足内翻 3 例, 先天性无肛(二期手术) 1 例, 先天性巨结肠 1 例。常规检查血常规、出凝血全套、肝肾功能均正常, 术后诊断为非炎症性疾病。于术前取静脉血检测, 检测前两周内未行任何治疗。PNS 组: PNS 患儿 15 例, 男 11 例, 女 4 例; 年龄 1 岁 7 个月至 14 岁, 平均 7 岁 2 个月; 初次诊治 11 例, 复发 4 例; 病程 7 d 至 1 个月, 复发患儿停药时间 3 个月至 6 年。临床类型: 单纯型 9 例, 肾炎型 6 例; 其中 11 例进行肾活检。病理类型: 微小病变型 8 例, 其中 4 例伴 IgM 阳性; 局灶节段增生性肾炎 2 例, 轻微局灶增生性肾炎 1 例。24 h 尿蛋白定量  $3.23 \pm 2.89$  g, 血浆白蛋白定量  $23.05 \pm 11.11$  g。全部患儿入院后常规检查时取血检测, 检测前未接受血小板输注及抗血小板药物(潘生丁、肝素及尿激酶等)治疗。

### 1.3 检测方法

标本采集: 用 5 ml 一次性注射器静脉穿刺, 抽取肘静脉血 2~4 ml, 留取最后抽出的全血 1 ml (余血送检其他项目) 加入 ACD 抗凝管(ACD 全血

为 1:3), 轻混 1~2 次静置, 10 min 内检测。ADP 激活: 装有  $1 \times 10^{-1}$  M ADP 50  $\mu$ l 的聚乙烯试管中加全血 450  $\mu$ l, 立即旋涡混匀即静置, 尽快标记单抗。

血小板膜 GP2P、PAC-1 表达测定: CD62P、PAC-1 表达的测定采用 FCM 三色荧光分析法<sup>[4]</sup>。ADP 激活前后的全血各 5  $\mu$ l 分别加入装有 PAC-1-FITC、CD62P-PE、CD61-PerCP 各 10  $\mu$ l 的测试管中, 轻轻混匀, 室温避光孵育 20 min, 分别加入 4% 多聚甲醛 0.5 ml 充分混匀, 置冰箱 4  $^{\circ}$ C 固定 30 min, 24 h 内上机(流式细胞仪)分析, 每一测试管均作同型对照, PAC-1-FITC 的同型对照为 MIgM-FITC, CD62P-PE 的同型对照为 MIgG-PE。调前向角、侧向角光散射和荧光信号均为对数放大, 以 CD61-PerCP 和侧向角光散射双参数设门, 以同型对照管设定阴性群体, 测定血小板 PAC-1、CD62P 表达阳性率。

### 1.4 统计方法

实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以 *t* 检验、*F* 检验进行统计学处理, 用 SPSS 10.0 统计分析软件完成处理过程。

## 2 结果

PNS 组与正常对照组 ADP 激活前后血小板膜 PAC-1、CD62P 阳性表达比较见表 1。从表 1 可见, PNS 组 ADP 激活前、后 CD62P 表达均高于正常对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。

表 1 PNS 组与正常对照组血小板膜 PAC-1、CD62P 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$  %)

分组	例数	ADP 激活前		ADP 激活后	
		CD62P	PAC-1	CD62P	PAC-1
对照组	16	0.57 $\pm$ 0.75	21.16 $\pm$ 14.72	10.80 $\pm$ 8.38	80.41 $\pm$ 18.37
PNS 组	15	3.97 $\pm$ 4.01	24.72 $\pm$ 33.26	34.38 $\pm$ 17.05	72.61 $\pm$ 24.21
<i>t</i>		3.224	0.382	4.836	1.014
<i>P</i>		<0.01	>0.05	<0.01	>0.05

## 3 讨论

PAC-1、CD62P 均为血小板活化特异性单抗。PAC-1 是 GP IIb/IIIa 活化后暴露的纤原结合位点单抗, 即活化的 GP IIb/IIIa 抗体为血小板活化的早期标志物。CD62P 是血小板颗粒膜蛋白单抗, 在静息血小板中颗粒膜蛋白(CD62P) 仅分布于颗粒膜上, 血小板活化时颗粒膜迅速与质膜融合而在

血小板表面表达 CD62P, 并持续至少 1 h, 因此 CD62P 为血小板活化的后期标志物<sup>[4]</sup>。我们选择这两个指标作为血小板活化标志物, ADP 激活前的表达代表血小板体内激活状态, ADP 激活后的表达代表着血小板活化功能。我们应用一次性聚乙烯注射器通过熟练的静脉穿刺技术保证抽血顺利, 采血静置后尽早(10 min 内)检测, 尽量将标本采集和保存过程中血小板的激活控制到最低。既往血小板功能的研究多采用血浆指标或分离富含血小板血浆

(PRP)的方法,本研究采用流式细胞技术结合血小板活化特异性单抗检测微量全血血小板活化状态和血小板活化功能,避免了PRP分离、洗涤等操作过程中造成的血小板损失、活化和膜蛋白的破坏,为研究PNS的血小板功能提供了简捷、准确、特异的方法。

PNS的发病机制尚不十分清楚,临床和病理表现复杂多样,且预后不尽相同。近年来研究表明血小板功能异常是肾病综合征发病机制之一。在免疫性肾小球疾病,所产生的各种炎症代谢产物如补体、免疫复合物以及破坏了的血管内皮细胞和暴露出的肾小球毛细血管基底膜都可以使血小板活化,从而使肾脏损害进展以及促进高凝状态的形成<sup>[3]</sup>。一般认为PNS患者体内存在免疫功能失调,导致组织炎症反应和损伤,伴有高凝、微血管病变和血栓形成。肾内微血栓形成是促使疾病进展及致肾小球硬化的一个主要原因,并与疾病严重程度密切相关。有研究证明在肾活检组织中显示CD62P表达于肾系膜区、毛细血管袢、肾间质和间质小血管袢,与外周血CD62P表达量密切相关,且发现CD62P肾脏表达与肾脏病理的损害部位和程度相一致,并证明CD62P可介导活化血小板、内皮细胞与中性粒细胞、单核细胞及淋巴细胞粘附,在早期炎症、血栓形成中起关键作用<sup>[1]</sup>。另一些研究发现,血小板活化增加是PNS复发、早期血栓并发症的独立危险因素。活化血小板的增加和血小板活化对尿的影响与IgA肾病时活动性肾小球间质损害有关<sup>[5]</sup>。增生性肾小球肾炎患者,肾小球和肾间质CD62P的水平上调,细胞明显增生的肾小球上CD62P的表达显著高于肾小球炎症轻微和以肾小球硬化为主的晚期病变的肾小球上表达。提示CD62P是增生性肾小球肾炎早期的重要参与因素。肾小球内的CD62P大多来源于活化的血小板而不是肾小球内皮细胞,所以,外周血CD62P可作为一个有用的指标来检测CD62P相关的肾小球毛细血管内皮增生性肾炎<sup>[6]</sup>。上述均提示外周血血小板膜CD62P表达可以敏感的提示肾小球病变严重程度。本研究证实了PNS患儿体内存在着血小板活化增加,且血小板活化功能增强。PAC-1的表达与正常对照组比较无显著差

异,可能由于PAC-1与活化血小板的纤原位点结合后,随着时间的延长PAC-1的表达逐渐减低有关<sup>[7]</sup>。本文结果提示,儿童PNS时存在着血小板活化功能的增强可能与肾小球病变程度相关,为临床早期选用抗血小板药物治疗提供了理论依据和实验室指标。

综上所述,利用血小板活化特异性细胞表面标志,流式细胞术为研究血小板活化与PNS的关系提供了一种快捷、准确、特异的检测方法,以CD62P为指标观察和鉴别患儿体内血小板激活状态和血小板活化功能,对PNS高凝状态和炎症反映损伤的诊断与治疗具有十分重要意义,同时可作为判断PNS患儿严重程度及预后指标<sup>[8]</sup>。

(致谢:本研究过程中受到复旦大学附属儿科医院徐虹教授及内六病房、儿研所全体医务人员的大力支持,特此致谢。)

#### [参 考 文 献]

- [1] 涂晓文,张爱平,尹格平,丁尧海,陈海英,王艳侠. 粘附分子P选择素在肾病综合征患者中表达水平的变化及临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2001,11(7):37-41.
- [2] 胡海云,贾汝汉,王学玉,姜诗琴,肖守平. 肾小球肾炎血小板功能及血小板抗体[J]. 中华肾脏病杂志,1994,10(1):292-294.
- [3] 易著文. 小儿临床肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998,346-354.
- [4] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry[J]. Methods, 2000, 21(3): 259-270.
- [5] Kamitsuji H, Nakajima M, Kawahara S, Nishimura T. Detection of activated platelets in urine by double immunofluorescence in children with IgA nephropathy[J]. Nephron, 1998, 78(2): 162-167.
- [6] 刘莉莉. CD62P与肾脏疾病[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2001, 21(3): 128-130.
- [7] 李绵洋,丛玉隆,邓新立,胡金麟,秦小玲. 剪切力作用对血小板膜糖蛋白分子表达的影响[J]. 中华医学杂志,2002,82(4):267-270.
- [8] 易著文. 儿童肾病综合征临床研究的展望[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(2):129-131.

(本文编辑:吉耕中)