

阶梯式离心法血小板提取及鉴定方法的建立^{*}

杨祥丽, 王佃鹏, 李培茂, 张志敏, 邓丽丹, 张艳芳, 周 飞, 黄先青

(深圳市职业病防治院, 广东深圳 518001)

摘要:目的 建立一种血小板提取及鉴定方法。方法 选择10名健康志愿者, 清晨空腹采集EDTA抗凝静脉血3管, 每管2 ml, 分为全血细胞管、富血小板血浆提取对照管(对照组)和阶梯式离心血小板提取实验管(实验组)。对提纯的血小板进行得率计算、显微镜下形态观察和血小板活性功能试验, 并对白细胞特有HGB基因和血小板线粒体ND1基因进行定量分析。结果 对照组和实验组均提取和检测到了血小板, 形态学观察发现实验组全部为血小板, 无白细胞和红细胞残留; 对照组可见血小板和零星的白细胞。实验组血小板获得率显著高于对照组, HGB基因含量显著低于对照组, 差异有统计学意义($t=-3.281, -2.865; P<0.05$)。实验组ND1基因含量高于对照组, 单个血小板活性功能吸光度值低于对照组, 差异无统计学意义($t=-0.046, -0.799; P>0.05$)。结论 建立了一种阶梯式离心血小板提取及鉴定方法, 该方法可用于血小板基因研究和活性功能等实验分析。

关键词: 血小板; 提取; 鉴定

中图分类号: R446.113 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)02-135-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.037

Isolation and Identification of Platelet by Stepped Centrifugal Method

YANG Xiang-li, WANG Dian-peng, LI Pei-mao,

ZHANG Zhi-min, DENG Li-dan, ZHANG Yan-fang, ZHOU Fei, HUANG Xian-qing

(Shenzhen Occupational Disease Prevention Hospital, Guangdong Shenzhen 518001, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the isolation and identification of platelets. **Methods** 10 healthy volunteers were selected to collect the EDTA anticoagulant venous blood of 3 tubes, each tube was 2 ml, which was divided into the whole blood cell tube, platelet rich plasma (control group), and stepped centrifugal platelet extract (experiment group). Platelet was isolated by simple centrifugation method (PRP) and stepped centrifugal method. The two groups were full blood count and analyzed by microscopic morphology and platelet activity test. Leukocyte-specific HGB gene and platelet mitochondrial ND1 gene content was analyzed by real time PCR. **Results** Platelets were extracted and detected in control group and experimental group. Platelets were found and white blood cells and red blood cells were not remained in experimental group. Platelets and sporadic white blood cells were found in control group. The platelet pick up rate of experiment group was significantly higher than control group, the difference was statistically significant. Experimental gene content HGB of experiment group was significantly lower than control group, the difference was statistically significant ($t=-3.281, -2.865, P<0.05$). ND1 gene content of experiment group higher than the control group, the difference was not statistically significant. There was no significant difference for platelet activity test between experimental group and control group ($t=-0.046, -0.799, P>0.05$). **Conclusion** A isolation and identification method of stepped centrifugal platelet was established. The method can be used for the study of platelet gene and the functional analysis of platelets.

Keywords: platelets; isolation; identification

血小板是血液中的有形成分之一, 是巨核细胞成熟后脱颗粒释放到血液中, 形状多样不规则, 正常血小板直径 $2\sim 4\ \mu\text{m}$, 无细胞核。血小板具有特定的形态结构和生化组成, 在正常血液中具有较恒定的数量, 在止血、伤口愈合、炎症反应、血栓形成及器官移植排斥等生理和病理过程中有重要作

用^[1,2]。血小板内含有多种生长因子, 富血小板血浆的修复等功能在临床中的运用日益增多^[3], 而血小板在血液中是与其他细胞混合存在的, 分离纯净的血小板对血小板功能的研究非常必要^[4]。本研究旨在建立一种简易而分离纯度高的血小板提取纯化方法。

^{*} 基金项目: 深圳市卫生计生系统科研项目(编号: 201607059), 深圳市科技计划项目(编号: JCYJ20160429090813380)。

作者简介: 杨祥丽(1982-), 女, 大学本科, 主管检验师, 从事临床检验工作, E-mail: lizi8332@163.com。

通讯作者: 张艳芳(1970-), 女, 硕士, 主任技师, 从事临床检验研究, E-mail: 13923431511@139.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 随机选取健康体检者 10 例作为研究对象,其中男性 9 例,女性 1 例,年龄 50.8 ± 8.7 岁。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI Stepone plus 荧光 PCR 扩增仪、德国 eppendorf 可调定量移液器,美国 Beckman 水平式电动离心机,日本 Sysmex XE-5000 血液分析仪,日本 Olympus BX-43 生物显微镜,美国伯乐 iMark 全自动酶标仪。MTT 细胞活性功能试剂购自上海生工生物工程公司,DNA 提取试剂购自北京天恩泽基因公司天净沙系列柱式血液 DNA 提取试剂,荧光 PCR 反应试剂购自大连宝生物公司 RR820A 荧光 PCR 反应试剂,双蒸水及引物合成物购自上海生工生物工程公司,血细胞计数试剂购自 Sysmex 公司,瑞氏染色液购自珠海贝索生物公司。

1.3 方法

1.3.1 样本采集:清晨空腹抽取研究对象静脉血 3 管,EDTA 抗凝,分为全血细胞管、对照管、实验管备用。样本的收集和研究工作得到深圳市职业病防治院医学伦理委员会批准。

1.3.2 血小板提取:对照组采用离心力为 100g 离心时间为 15 min 分离提取的富血小板血浆 (PRP)^[5]待测,测量血小板提取液体积,取部分样品涂片并瑞氏染色,显微镜检观察 100 个高倍视野。血小板实验管小心来回轻轻颠倒 8 次以上混匀,以 100 g 离心力离心 10 min,取上清液加入 EP 管;取剩余上清液与红细胞混合液 800 μ l 于另一支 EP 管以 170 g 离心力离心 10 min,取上清液加入到第一次分离上清液的 EP 管中,小心轻轻混匀 30 s;将收集的所有上清液 210 g 离心 3 min,取上清液小心轻轻混匀 30 s;将收集的上清液 210 g 离心 3 min;取上清液小心轻轻混匀待测,测量血小板提取液体积,取部分样品涂片并瑞氏染色,显微镜检观察 100 个高倍视野。

1.3.3 细胞计数:采集的全血细胞管进行全血细胞计数,记录血小板浓度。对照组与实验组在血小板提取完成后,进行全血细胞计数,并记录血红蛋白、红细胞、白细胞及血小板浓度。

1.3.4 血小板获得率的计算:血小板获得率 = $C_2 \times V_2 \times 100\% / (C_1 \times V_1)$, (V_1 指提取前体积; V_2 指提取后含血小板血浆体积; C_1 指提取前血小板浓度; C_2 指提取后血小板浓度)。

1.3.5 血小板活性功能试验:严格按照试剂说明书的方法进行操作,在酶标仪上以 490nm 波长读取吸光度值,计算单个血小板吸光度值。

1.3.6 DNA 的提取:取血小板提取物 200 μ l,按照北京天恩泽基因公司天净沙系列柱式血液 DNA 提取试剂说明书提取 DNA。

1.3.7 血小板纯度鉴定荧光 PCR 反应体系:所用引物采用 Primer5.0 设计。HGB 上游引物:AAAGGTGCCCTTGAGGTTGTC (5' \rightarrow 3'), HGB 下游引物:TGAAGGCTCATGGCAAGA A (5' \rightarrow 3')。NDI 上游引物:GCTGACGCCATA-AACTCTTCA (5' \rightarrow 3'), NDI 下游引物:GGCGGTGATGTAGAGGGTGAT (5' \rightarrow 3')。反应体系采用大连宝生物公司 RR820A 荧光 RT PCR 反应试剂,总体积 20 μ l。ND1 基因扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 10s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 62 $^{\circ}$ C 35s, 40 Cycles。HGB 基因扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 10s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 56 $^{\circ}$ C 35s, 40 Cycles。两对引物分别扩增,加入系列浓度外标准品建立标准曲线进行定量。

1.4 统计学分析 实验数据采用 SPSS16.0 统计软件处理,所有统计结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组均数比较采用成组设计资料的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 提取后涂片显微镜镜检结果 对照组涂片在镜下观察可见大量血小板及零星的白细胞,血小板散在分布,有小部分发生聚集,其形态多为圆形、椭圆形或略不规则;实验组涂片在镜下只观察到大量血小板,未观察到红细胞及白细胞,血小板部分散在分布,可见大片聚集的血小板,其形态为圆形、椭圆形和稍欠规则。结果显示实验组提取的血小板单个视野数量多,但部分发生聚集。

2.2 对照组和实验组血小板提取后血细胞计数及血小板获得率 见表 1。

表 1

血小板提取后血细胞计数及血小板获得率

项 目	对照组	实验组	t 值	P 值
血红蛋白(g/L)	0.889 ± 0.333	0.800 ± 0.422	0.557	0.591
红细胞($\times 10^{12}$ /L)	0.012 ± 0.007	0.013 ± 0.005	-0.557	0.591
白细胞($\times 10^9$ /L)	0.138 ± 0.17	0.016 ± 0.016	2.450	0.037
血小板($\times 10^9$ /L)	265.667 ± 122.820	303.400 ± 105.135	-1.855	0.097
PLT 获得率(%)	51.297 ± 13.262	58.286 ± 10.660	-3.281	0.010

2.3 血小板纯度鉴定实时荧光定量PCR结果见表2。白细胞HGB基因和线粒体NDI基因扩

增。所有阳性扩增结果显示扩增曲线平滑完好,溶解曲线具有单一的峰,表明实验特异性好。

表2 实时荧光定量PCR扩增结果

项目(copies/ml)	对照组	实验组	t值	P值
HGB基因扩增	$(1.583 \pm 1.532) \times 10^3$	$(0.398 \pm 0.291) \times 10^3$	2.865	0.019*
NDI基因扩增	$(6.036 \pm 3.128) \times 10^6$	$(6.077 \pm 4.148) \times 10^6$	-0.046	0.965

注:*表示t检验 $P < 0.05$ 。

2.4 血小板活性功能试验结果 血小板活性试验结果显示对照组和实验组的吸光度值(0.454 ± 0.099 , 0.582 ± 0.127),单个血小板吸光度值(4.66×10^{-13} , 2.46×10^{-13})差异无统计学意义($t = -1.956$, -0.799 , $P > 0.05$)。

3 讨论 血小板是外周血的主要成分之一,在出血凝血生理病理抗菌感染过程中发挥重要作用^[6~8]。高纯度的血小板对于其分类计数、基因表达等功能研究非常重要。

血小板提取纯化的方法主要有磁珠吸附法、流式细胞仪分离法、分离胶分离法和富血小板血浆简易离心分离法^[4,9]。前两种方法过程繁琐、试剂成本高;后两种方法分离纯度低,污染率高。传统的富血小板血浆简易离心分离法所用时间短、步骤少,纯度较高^[5]。但制出的血小板数量少,获得率在51.30%左右,红细胞和白细胞含量高。

本研究首次采用阶梯式提升速度法提取血小板,通过多次分阶段离心提取到高浓度的血小板,有效去除小红细胞、白细胞及白细胞碎片。提取血小板可用于基因研究。血小板活性功能试验结果显示对照组与实验组差异无统计学意义。说明阶梯式离心方法所增加的离心力和离心时间未对血小板功能造成显著影响。本方法不需要特殊实验器材,使用EP管、普通移液器、离心机就可以提取到高浓度血小板。

本研究选择白细胞特有基因-人血红蛋白基因(hemoglobin, HGB)作为分离纯度的定量基因^[10]。HGB基因在白细胞内稳定表达,血小板内不含有该基因,通过实时荧光PCR定量方法可以确定所提取血小板的白细胞残留污染和纯度。阶梯式离心血小板提取方法提取的血小板中白细胞残留污染显著低于传统离心分离法。

外周全血和单纯血小板都含有线粒体,ND1基因是线粒体基因中最保守的,其表达产物为NADH脱氢酶(复合体I)亚单位1^[11],因此选取线粒体ND1基因作为提取有效性检测靶目标。实验结果显示阶梯式离心血小板提取方法提取的血小板中线粒体ND1基因含量比传统简易离心分离法

高,说明其提取的有效基因含量更高,印证了本方法提取的血小板纯度更高。

本研究初步建立了一种阶梯式离心血小板提取及鉴定方法,并且通过HGB基因和NDI基因的实时定量荧光PCR的基因含量分析,验证了提取血小板的获得率、白细胞残留污染量、纯度和有效基因含量。本研究存在着收集样本较少以及手工操作步骤多产生误差大、机率高局限性。血小板的构造和功能存在特殊性,经多次离心,离心力的增加可增加改变血小板形态的机会,导致血小板产生聚集式破坏。未来的研究方向是规范标准化操作流程提高提取效率,降低血小板受破坏程度。总之,本研究建立的血小板纯化方法相对经典的流式细胞法具有简易、快速、纯度高特点,可在血小板相关基因分析和活化功能等方面的基础研究实验中应用。

参考文献:

- [1] Uesugi T, Baba Y, Kohara S, et al. Clinical utility of platelet function testing following non-cardioembolic stroke[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2015, 40(4): 178-184.
- [2] Ma X, Wang Y, Sheng H, et al. Prognostic significance of thrombocytosis, platelet parameters and aggregation rates in epithelial ovarian cancer[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2014, 40(1): 178-183.
- [3] 赵运凤,任军伟,丛玉隆.光电比浊法血小板聚集仪与流式细胞仪检测氯吡格雷药效[J].现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 23-26.
Zhao YF, Ren JW, Cong YL. CD62p using light transmission aggregometry and flow cytometry to examine the effect of clopidogrel[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 23-26.
- [4] Mammoto T, Jiang A, Jiang E, et al. Platelet rich plasma extract promotes angiogenesis through the angiopoietin1-Tie2 pathway[J]. Microvasc Res, 2013, 89(9): 15-24.
- [5] 徐仙赞,刘潜,谢琼,等.梯度离心法分离人富含血小板血浆条件的优化[J]. (下转140页)

L, 女性总铁结合力的含量为 $52.17 \pm 9.75 \mu\text{mol/L}$, 二者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。老年人血清铁和总铁结合力参考范围的上限和下限均低于厂家提供的参考范围。由于国内外调查老年人血清铁、总铁结合力参考区间的相关文献较少, 由于种族、经济水平、饮食结构和检测方法原理不同, 所以每个实验室应该建立自己适合的参考区间^[9]。因此我们结合临床诊断、生化、尿常规、血常规结果和实验室设计科学的参考个体筛选条件, 经过剔除离群值后, 进一步分析数据, 从而建立老年人血清铁和总铁结合力生物参考区间。

实验中调查的研究对象只针对首都医科大学附属北京同仁医院的60岁以上老年人血清铁、总铁结合力进行研究, 所以研究对象比较单一, 且样本例数不足, 应该加大样本例数并且细化分组。此外, 每个实验室应该建立自己的参考区间, 不同地区、民族、饮食习惯等都可能影响老年人血清铁、总铁结合力的参考区间, 应严格按照操作手册规范实验操作。

参考文献:

- [1] 杨阳, 张艳, 罗浪, 等. 铁代谢异常与人体疾病研究进展[J]. 吉林医学, 2011, 32(2): 328-331.
 - [2] Zwart SR, Morgan JL, Smith SM, et al. Iron status and its relations with oxidative damage and bone loss during long-duration space flight on the International Space Station[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2013, 98(1): 217-223.
 - [3] Liu K, Kaffes AJ. Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and management[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24(2): 109-116.
 - [4] Khanbhai M, Dubb S, Patel K, et al. The prevalence of iron deficiency anaemia in patients undergoing bariatric surgery[J]. Obes Res Clin Pract, 2015, 9(1): 45-49.
 - [5] 曾洁, 陈文祥, 申子瑜. 参考区间研究现状概述[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6): 570-573.
 - [6] 王治国. 临床检验生物学变异与参考区间[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
 - [7] Ludwig H, Müldür E, Endler G, et al. Prevalence of iron deficiency across different tumors and its association with poor performance status, disease status and anemia[J]. Ann Oncol, 2013, 24(7): 1886-1892.
 - [8] 徐淑静, 孙雪, 孙燕, 等. 初发2型糖尿病患者铁代谢指标的变化及分析[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(1): 49-50.
 - [9] 王薇, 钟堃, 白玉, 等. 全国常规化学检验项目参考区间现状调查分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(12): 1139-1143.
Wang W, Zhong K, Bai Y, et al. Investigation and analysis of reference intervals of routine clinical assays in China[J]. Chin J Lab Med, 2011, 34(12): 1139-1143.
- 收稿日期: 2016-10-26
修回日期: 2016-12-23
-
- (上接 137 页)
- 赣南医学院学报, 2010, 30(6): 859-861.
- Xu XX, Liu Q, Xie Q, et al. Optimizing the centrifugal separation of human platelet-rich plasma[J]. Journal of Gannan Medical University, 2010, 30(6): 859-861.
- [6] Colak A, Yilmaz H, Temel Y, et al. Coagulation parameters and platelet function analysis in patients with acromegaly[J]. J Endocrinol Invest, 2016, 39(1): 97-101.
 - [7] Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease[J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(1): 118-123.
 - [8] 李贞贞, 徐金梅, 顾顺利, 等. 血小板抗表皮葡萄球菌生长的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 42-45, 49.
Li ZZ, Xu JM, Gu SL, et al. Antibacterial effect of platelets on *Staphylococcus Epidermidis*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 42-45, 49.
 - [9] Ramstrom S, Sodergren AL, Tynngard N, et al. Platelet function determined by flow cytometry: new perspectives? [J]. Semin Thromb Hemost, 2016, 42(3): 268-281.
 - [10] Carugno M, Pesatori AC, Dioni L, et al. Increased mitochondrial DNA copy number in occupations associated with low-dose benzene exposure[J]. Environ Health Perspect, 2012, 120(2): 210-215.
 - [11] Akouchekian M, Houshmand M, Akbari MH, et al. Analysis of mitochondrial ND1 gene in human colorectal cancer[J]. J Res Med Sci, 2011, 16(1): 50-55.
- 收稿日期: 2016-11-28
修回日期: 2017-02-07