

temperature group preserved for 4, 8 and 24 h were detected by hematological analyzer. Flow cytometry was used to detect the expression of platelet activation marker CD62P in the control group, 4 °C group and room temperature group preserved for 4, 24 hours. The all-wavelength scanning multifunctional reading instrument was used to check the Ca^{2+} concentration of platelets in the control group, 4 °C group and room temperature group preserved for 4, 24 hours. **Results** With the prolongation of preservation time, the platelet volume of the room temperature group and 4 °C group became larger and larger. And the platelet volume in the room temperature group increased more significantly, with cavitation phenomenon, and platelet structure was loose. Compared with the control group, the P-LCR, MPV and PDW in the 4 °C group and room temperature group stored for 4, 8 and 24 hours was significantly increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the P-LCR, MPV and PDW by paired-comparisons among the preserved time of 4, 8 and 24 hours in the room temperature group ($P > 0.05$). Compared with the 4 °C group preserved for 4 hours, the P-LCR and MPV was higher than that in the 4 °C group preserved for 8 hours and 24 hours ($P < 0.05$). There was no significant difference in the P-LCR and MPV between the preserved time of 8 hours and 24 hours in the 4 °C group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the PDW between the preserved time of 4 hours and 8 hours in the 4 °C group ($P > 0.05$). The PDW in the 4 °C group preserved for 4 hours and 8 hours was higher than that preserved for 24 hours ($P < 0.05$). Compared with the same time point in room temperature group, the P-LCR, MPV and PDW in the 4 °C group preserved for 4, 8 hours were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the P-LCR, MPV and PDW between the 4 °C group and room temperature group preserved for 24 hours ($P > 0.05$). There was no significant difference in the the number of platelet among the control group, 4 °C group and room temperature group preserved for 4, 8 and 24 hours ($P > 0.05$). Compared with the control group, the level of CD62P in the room temperature group and 4 °C group preserved for 4 and 24 hours was higher ($P < 0.05$). Compared with the same time point in room temperature group, the level of CD62P in the 4 °C group preserved for 4 and 24 hours was lower ($P < 0.05$). There was no significant difference in the level of CD62P between the preserved time of 4 hours and 24 hours in the room temperature group ($P > 0.05$). The level of CD62P in the 4 °C group preserved for 24 hours was higher than that in the 4 °C group preserved for 4 hours ($P < 0.05$). Compared with the control group, the level of Ca^{2+} concentration of platelets in the room temperature group preserved for 4, 24 hours was higher ($P < 0.05$). There was no significant difference in the level of Ca^{2+} concentration of platelets by paired-comparisons between the control group and the 4 °C group preserved for 4 hours and 24 hours ($P > 0.05$). Compared with the same time point in room temperature group, the level of Ca^{2+} concentration of platelets in the 4 °C group preserved for 4 hours and 24 hours was lower ($P < 0.05$). The level of Ca^{2+} concentration of platelets in the room temperature group preserved for 24 hours was higher than that in the room temperature group preserved for 4 hours ($P < 0.05$). **Conclusion** The whole blood samples were stored at 4 °C and tested within 4 hours, which can maintain the original state of platelets as much as possible and improve the accuracy of relevant indicators of platelets.

Key words: platelet morphology; platelet volume; platelet activation; platelet releasing function

血小板数量及形态是血常规检测的重要内容, 不仅可以帮助医生诊断血小板相关性疾病, 还可以评估患者的治疗效果^[1]。血小板对温度和保存时间较为敏感^[2], 不当的保存温度和时间会影响血小板的形态及功能。在临床工作中, 为了避免血小板激活, 不能及时检测的全血标本均为室温保存。然而, 温度越高, 细胞的代谢会越旺盛^[3], 在营养得不到及时供给的情况下, 细胞的结构和功能会发生改变。因此, 室温保存全血有可能不利于血小板形态和功能的维持。本研究将全血分别于室温和 4 °C 条件下保存, 观察血小板形态和功能的变化, 旨在为临床合理选择全血样本的保存温度提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 30 例健康志愿者为研究对象, 男 10 例, 女 20 例, 年龄 18 ~ 22 (20 ± 2) 岁, 入选标准: (1) 出生至现在均居住于河南省; (2) 无菌血症; (3) 无高脂血症; (4) 无糖尿病; (5) 无感染; (6) 无呼吸系统疾病; (7) 无免疫系统疾病; (8) 无血液系统疾病。本研究经新乡医学院伦理委员会审核批准, 受试对象均知情并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗人 CD61 抗体 (FITC anti-human CD61 抗体) 购自美国 Biolegend 公司, 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的抗人 CD62P 抗体 (PE anti-human CD62P 抗体) 购自美国 Invitrogen 公司, Sysmex KX-21 血细胞分析仪配套稀释液、溶血剂和清洗液购自日本 sysmex 公司, 钙荧光探针 Fluo-3AM 购自北京索莱宝科技有限公司, 瑞氏-姬姆萨复合染色液购自珠海贝索生物技术有限公司, 无钙镁酚红的磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) 购自美国 Hyclone 公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 购自德国 Merck 公司; 含乙二胺四乙酸二钾 (ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium, EDTA-K2) 抗凝剂的一次性真空采血管购自上海康健医疗器械有限公司, Sysmex KX-21 血细胞分析仪购自日本 Sysmex 公司, 全波长扫描式多功能读数仪购自美国 Thermo Scientific 公司, Guava easyCyte HT 流式细胞仪购自美国 Millipore 公司, BX51/52 显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 血小板形态观察及血小板数量、体积检测 采集志愿者清晨空腹肘静脉血 2 mL, 置于含 EDTA-

K2 抗凝剂的真空管中,立即 8 字颠倒混匀,充分抗凝,作为对照组微量吸管虹吸取血 7~8 μL ,将血液滴于载玻片一端,并制备头体尾分明的舌形血涂片,血涂片完全干燥后,使用瑞氏-姬姆萨复合染色液染色,BX51/52 显微镜下观察血涂片的质量及染色情况,在血涂片的体尾交界处观察血小板的形态、结构;同时,将其余血液标本置于 SYSMEX-21 血细胞分析仪,全血模式下检测血小板数量、大血小板比例(platelet large cell ratio, P-LCR)、平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)和血小板分布宽度(the platelet volume distribution width, PDW);然后将血液标本分为 2 份,其中 1 份 4℃ 保存(4℃ 组),另 1 份室温保存(室温组),分别于保存 4、8、24 h 后按上述方法制作血涂片,观察 4℃ 组和室温组血液标本中血小板的形态、结构;并使用 SYSMEX-21 血细胞分析仪检测 4℃ 组和室温组血液标本的血小板数量、P-LCR、MPV 和 PDW。

1.4 血小板活化表面标志物 CD62P 检测 采集志愿者清晨空腹肘静脉血 10 mL,置于含有 EDTA-K2 抗凝剂的真空管,8 字颠倒混匀,分为对照组、4℃ 4 h 组、4℃ 24 h 组和室温 4 h 组、室温 24 h 组,每组 2 mL。将对照组血液标本即刻进行梯度离心,将室温 4 h 组、室温 24 h 组和 4℃ 4 h 组、4℃ 24 h 组血液标本分别于保存相应时间进行梯度离心,获得血小板^[4],DPBS 洗涤 3 遍,40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛室温固定 30 min,DPBS 洗涤 3 遍,100 μL DPBS 重新悬浮血小板,分别加入 FITC anti-human CD61 抗体和 PE anti-human CD62P 抗体,室温孵育 30 min,DPBS 洗涤 3 遍,300 μL DPBS 重新悬浮血小板,100 目细胞过滤器过滤,将细胞悬液接种到 96 孔板中,Guava easyCyte HT 流式细胞仪检测,观察血小板的绝对计数和荧光强度(arbitrary unit, AU),计算血小板的平

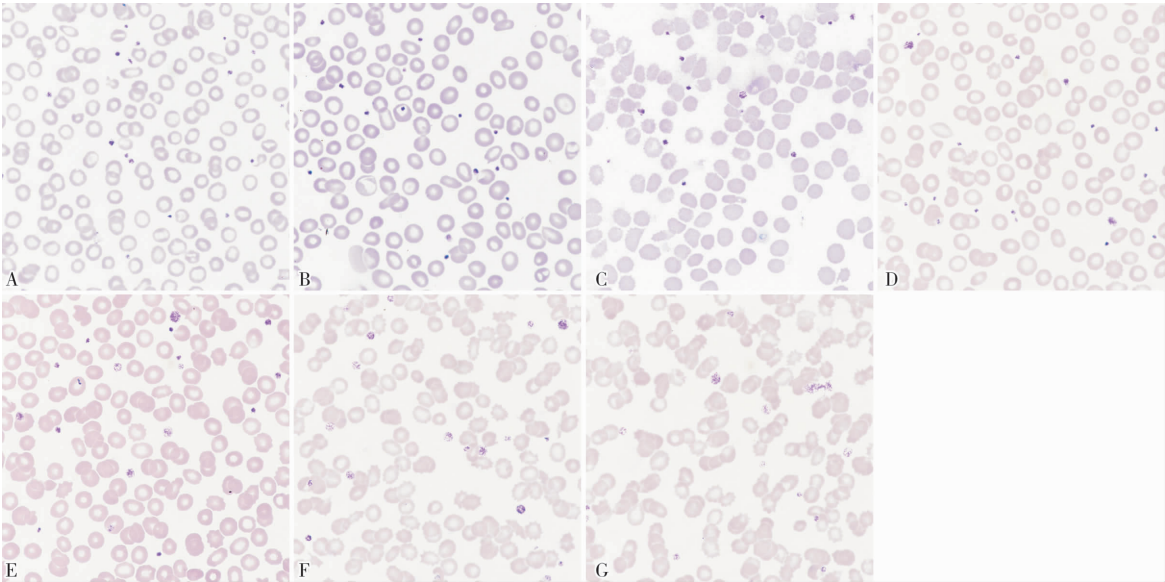
均荧光强度^[12-18]。

1.5 血小板内 Ca^{2+} 水平检测 采集志愿者清晨空腹肘静脉血 10 mL,置于含有 EDTA-K2 抗凝剂的真空管,8 字颠倒混匀,分为对照组、4℃ 4 h 组、4℃ 24 h 组和室温 4 h 组、室温 24 h 组,每组 2 mL。将对照组血液标本即刻进行梯度离心,将室温 4 h 组、室温 24 h 组组和 4℃ 4 h 组、4℃ 24 h 血液标本分别于保存相应时间进行梯度离心,获得血小板^[4],并进行计数,将血小板浓度调整为 $10 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。用含有 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fluo-3 AM 的 DMSO 溶液和细胞一起在室温下孵育 30 min 进行荧光探针装载,DPBS 洗涤 3 遍,100 μL DPBS 重新悬浮血小板,将细胞悬液接种到 96 孔板中,在激发波长为 488 nm 的条件下使用全波长扫描式多功能读数仪检测样本的荧光强度^[5]。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血液标本血小板形态变化 结果见图 1。与对照组相比较,随着血液标本保存时间延长,4℃ 组血小板体积稍增大,24 h 时大血小板比例明显增多(图 1A、图 1B、图 1C、图 1D),室温组血小板体积明显增大,并出现空泡现象(图 1E、图 1F、图 1G)。全血保存 4 h 时,室温组大血小板明显增多,血小板结构较疏松(图 1B、图 1E);全血保存 8 h 时,室温组大血小板明显增多,血小板结构较疏松并出现空泡现象(图 1C、图 1F);全血保存 24 h 时,室温组畸形血小板明显增多,血小板结构较疏松,空泡现象更加明显(图 1D、图 1G)。



A:对照组;B:4℃组保存4 h;C:4℃组保存8 h;D:4℃组保存24 h;E:室温组保存4 h;F:室温组保存8 h;G:室温组保存24 h。
图1 各组血液标本血小板形态(瑞氏-姬姆萨复合染色,×1 000)
Fig.1 Comparison of platelet morphology in blood samples of each group (Wright-Giemsa composite staining, ×1 000)

2.2 各组血液标本血小板数量、P-LCR、MPV 和 PDW 比较 结果见表 1。对照组及室温和 4 ℃ 组保存 4、8、24 h 组各组之间的血小板数量两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 室温组和 4 ℃ 组血液标本保存 4、8、24 h 的 P-LCR、MPV、PDW 均显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。室温组血标本保存 4、8、24 h 的 P-LCR、MPV 和 PDW 两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 ℃ 组血标本保存 8、24 h 的 P-LCR 和 MPV 与 4 h 时比较显著增大, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 ℃ 组血液标本保存 24 h 的 P-LCR 和 MPV 与 8 h 时比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 ℃ 组血标本保存 4、8 h 的 PDW 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 保存 24 h 的 PDW 与 4、8 h 时比较显著增大, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4 ℃ 组保存 4、8 h 的 P-LCR、MPV 和 PDW 与室温组比较显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 ℃ 组与室温组保存 24 h 的 P-LCR、MPV 和 PDW 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组血液标本血小板数量、P-LCR、MPV 及 PDW 比较

Tab. 1 Comparison of platelet PLT, P-LCR, MPV and PDW in blood samples of each group					($\bar{x} \pm s$)
组别	n	血小板数量/($\times 10^9 L^{-1}$)	P-LCR/%	MPV/fL	PDW
对照组	30	294.67 \pm 67.18	0.19 \pm 0.03	9.18 \pm 0.33	10.76 \pm 0.96
室温组	30				
4 h		294.33 \pm 64.18	0.28 \pm 0.03 ^a	10.37 \pm 0.40 ^a	12.71 \pm 1.36 ^a
8 h		291.00 \pm 64.33	0.27 \pm 0.04 ^a	10.23 \pm 0.40 ^a	12.41 \pm 1.36 ^a
24 h		297.22 \pm 65.17	0.26 \pm 0.04 ^a	10.18 \pm 0.37 ^a	12.30 \pm 1.30 ^a
4 ℃ 组	30				
4 h		294.67 \pm 69.51	0.23 \pm 0.04 ^{ab}	9.77 \pm 0.42 ^{ab}	11.67 \pm 1.14 ^{ab}
8 h		289.67 \pm 66.63	0.24 \pm 0.03 ^{abc}	9.93 \pm 0.36 ^{abc}	11.73 \pm 1.06 ^{ab}
24 h		300.67 \pm 63.99	0.25 \pm 0.04 ^{ac}	9.96 \pm 0.41 ^{ac}	12.47 \pm 1.29 ^{acd}

注: 与对照组比较^a $P < 0.05$; 与室温组比较^b $P < 0.05$; 与 4 h 比较^c $P < 0.05$; 与 8 h 比较^d $P < 0.05$ 。

2.3 各组血液标本血小板表面活化标志物 CD62P 表达水平比较 对照组、室温组保存 4、24 h 时及 4 ℃ 组保存 4、24 h 时血小板表面 CD62P 表达水平分别为 (65.57 \pm 2.86)、(84.36 \pm 2.69)、(85.79 \pm 3.11)、(77.18 \pm 3.22)、(83.8 \pm 2.12) AU。与对照组比较, 室温组保存 4、24 h 及 4 ℃ 组保存 4、24 h 的血小板表面 CD62P 表达水平均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与室温组同时间点比较, 4 ℃ 组保存 4、24 h 的血小板表面 CD62P 表达水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。室温

组保存 24 h 的血小板表面 CD62P 表达水平与 4 h 时比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 ℃ 组保存 24 h 的血小板表面 CD62P 表达水平与 4 h 时比较显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 各组血小板内 Ca^{2+} 水平比较 对照组、室温组保存 4、24 h 时及 4 ℃ 组保存 4、24 h 时血小板内 Ca^{2+} 水平分别为 (539.25 \pm 130.39)、(714.00 \pm 81.70)、(963.25 \pm 58.25)、(535.75 \pm 98.87)、(605.00 \pm 220.40) AU。与对照组比较, 室温组保存 4、24 h 血小板内 Ca^{2+} 水平显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组及 4 ℃ 组保存 4、24 h 的血小板内 Ca^{2+} 水平两两比较均无显著差异 ($P > 0.05$)。与室温组同时间点比较, 4 ℃ 组保存 4、24 h 的血小板内 Ca^{2+} 水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。室温组保存 24 h 的血小板内 Ca^{2+} 水平与 4 h 比较显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

血小板是巨核细胞脱落的细胞质颗粒^[6], 在机体凝血、肿瘤发生和免疫过程中发挥着重要作用^[7-9]。准确检测血小板的数量、体积、形态和功能不仅可以帮助医生诊断和鉴别疾病, 还可以促进科学研究的发展。目前临床上不能及时检测的血液标本均为室温保存, 有可能不利于血小板形态和功能的维持。因此, 有研究探讨 4 ℃ 条件下保存血液对血小板形态和功能的影响, 旨在为临床合理选择血液样本保存方法提供参考。

龚庆辉等^[10]研究显示, 室温保存血液 2 h, 血小板的 P-LCR、MPV 和 PDW 已经发生显著变化; 而 4 ℃ 保存 24 h, 可以观察到血小板的 P-LCR、MPV 和 PDW 发生显著变化。在该研究中, 4 ℃ 保存组的样本进行血常规检测前, 需要提前取出并使其恢复至室温, 这个过程可能导致 4 ℃ 保存组的小血小板受到影响, 发生显著变化; 并且 4 ℃ 保存组与室温保存组标本检测时间点不一致, 4 ℃ 保存组未对保存 2 ~ 8 h 的血液进行检测, 导致无法确定 4 ℃ 保存组标本 P-LCR、MPV 和 PDW 发生变化的时间点。李清泽等^[11]研究发现, 4 ℃ 保存血液 3 h, 血小板 MPV 即发生显著变化; 室温保存血液 4 h, 血小板的 MPV 才发生显著变化; 在该研究中, 尽管 4 ℃ 保存组与室温保存组检测时间点一致, 但 4 ℃ 条件下存放的标本在测定前也均恢复至室温。因此, 4 ℃ 保存组的检

测结果同样无法排除室温的影响。

在本研究中,为了排除室温对4℃保存组检测结果的影响,进行相关检测前对4℃组标本不进行室温复温处理;同时,为了明确血小板功能是否受全血保存温度影响,本研究根据相关文献^[5,12-18]的检测方法对血小板活化和Ca²⁺释放功能进行了研究。本研究结果显示:(1)对照组、室温和4℃组保存4、8、24 h组各组之间的血小板数量两两比较差异均无统计学意义,提示不同温度和保存时间对血小板数量无显著影响;(2)随着保存时间的延长,4℃组和室温组血小板体积均增大,且室温组血小板体积增加更加明显,并出现空泡现象,血小板结构较疏松;随着保存时间的延长,与对照组比较,4℃组和室温组P-LCR、MPV和PDW均显著增大,血小板表面CD62P表达水平显著升高。与对照组比较,室温组4和24 h的血小板内Ca²⁺水平均显著升高,4℃组4和24 h的血小板内Ca²⁺水平无显著变化。同时,4℃组24 h时血小板表面CD62P表达水平与4 h时比较显著升高,室温组24 h时血小板内Ca²⁺水平与4 h时比较显著升高;提示在4℃和室温保存状态下,随着保存时间的延长,会对血小板形态和功能造成一定的影响;(3)室温组保存4、8、24 h的P-LCR、MPV和PDW两两比较差异均无统计学意义;4℃组保存4、8 h的P-LCR、MPV和PDW与室温组比较显著降低,4℃组与室温组保存24 h的P-LCR、MPV和PDW比较差异无统计学意义;而4℃组保存8、24 h的P-LCR、MPV与4 h时比较显著增大,保存24 h的PDW与4、8 h时比较显著增大;提示血小板对保存温度比较敏感,室温保存4 h以后即会对血小板P-LCR、MPV和PDW造成较大的影响,而在一定时间内,4℃保存对血小板的影响低于较室温保存。

综上所述,全血标本4℃保存并在4 h内完成检测,可以最大限度维持血小板原始状态,提高血小板检测相关指标的准确性。

参考文献:

[1] BERARDI S,BERZIGOTTI A,CAPPELLI A. *et al.* Routine blood tests? Helping you live(r) longer[J]. *Lancet*,2011,378(9808): 2048-2048.

[2] 刘登海. 时间温度对血小板计数检测的影响[J]. *医药论坛杂志*,2009,30(5):81-82.

[3] 官浩,贾赤字,陈璧,等. 不同复温温度对-10℃处理的体外培养人成纤维细胞形态和I型胶原代谢的影响[J]. *中华烧伤杂志*,2005,21(5):370-373.

[4] 翟晴,田阿勇. 富血小板血浆分离应用于体外循环心脏手术的研究进展[J]. *中国医科大学学报*,2019,48(2):180-183.

[5] GROZOBOSKY R,GIANNINI S,FALET H, *et al.* Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond[J]. *Blood*,2015,126(16): 1877-1884.

[6] GETZ T M. Physiology of cold-stored platelets[J]. *Trans Apher Sci*, 2019,58(1):12-15.

[7] KOUPENOVA M,CLANCY L,CORKREY H A, *et al.* Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis [J]. *Circ Res*,2018,122(2):337-351.

[8] HAEMMERLE M,STONE R L,MEMTER D G, *et al.* The platelet lifeline to cancer: challenges and opportunities[J]. *Cancer Cell*, 2018,33(6):965-983.

[9] XU X R,YOUSEF G M,NI H. Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents[J]. *Blood*,2018,131(16):1777-1789.

[10] 龚庆辉,银广悦,张龙. 不同温度和时间对血常规参数检测结果的影响[J]. *检验医学与临床*,2013,20(2):101-105.

[11] 李清泽. 血常规标本存放条件对血细胞计数的影响[J]. *检验医学与临床*,2011,8(18):2179-2180,2182.

[12] KHALIULIN A V,GUSYAKOVA O A,KOPZLOV A V, *et al.* Metabolism processes and mechanisms of regulation of platelet activity[J]. *Klin Lab Diagn*,2019,64(3):164-169.

[13] WELCH E L,CROOKS M G,HART S P. Agreement between blood draw techniques for assessing platelet activation by flow cytometry [J]. *Platelets*,2019,30(4):530-534.

[14] LI L,QU C,LU Y, *et al.* The platelet surface glycosylation caused by glycosidase has a strong impact on platelet function[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*,2019,30(5):217-223.

[15] BARRACHINA M N,SUEIRO A M,IZQUIERDO I, *et al.* GPVI surface expression and signalling pathway activation are increased in platelets from obese patients: elucidating potential anti-atherothrombotic targets in obesity[J]. *Atherosclerosis*,2019,281: 62-70.

[16] REDDY E C,WANG H,CHRISTENSEN H, *et al.* Analysis of pro-coagulant phosphatidylserine-exposing platelets by imaging flow cytometry[J]. *Res Pract Thromb Haemost*,2018,2(4):736-750.

[17] MARX S,SPLITTSTOHSER M,KINNEN F, *et al.* Platelet activation parameters and platelet-leucocyte-conjugate formation in glioblastoma multiforme patients[J]. *Oncotarget*,2018,9(40): 25860-25876.

[18] ABDULLAH S,AYUB Q,SABOOR M, *et al.* Pre and post apheresis platelet CD markers evaluation using flow cytometry[J]. *J Pak Med Assoc*,2016,66(11):1440-1443.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)