

γ 射线辐照单采血小板功能及临床应用研究^{*}

何其通,余晋林,郭如华,罗益红(广东省佛山市中心血站 528000)

【摘要】 目的 研究不同剂量辐照灭活淋巴细胞及对血小板活性的影响并观察 γ 射线辐照单采血小板临床应用效果。**方法** 将单采血小板分装于 5 个血袋中,分别作为未辐照组(对照组)和 25、30、35、40 Gy 不同剂量辐照组,将上述经辐照前后的血小板标本经淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞后,用植物血凝素(PHA)刺激 T 淋巴细胞,使其转化为淋巴母细胞,经瑞氏染色后用显微镜分别计数转化为母细胞的百分率;用流式细胞仪检测经 35 Gy 剂量辐照后的血小板的 CD41a、CD62p;选取 40 例接受化疗的急性白血病患者,随机分为对照组和治疗组,其中对照组 20 例,治疗组 20 例,分别输单采血小板和辐照单采血小板,观察血小板纠正增加指数(CCI)及输注后临床表现。**结果** 剂量为 35 Gy 时,淋巴细胞的转化率为 0;35 Gy γ 射线辐照前后血小板 CD41a、CD62p 阳性率的比较差异无统计学意义($P>0.05$);治疗组和对照组血小板输注有效率的比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 适当剂量的辐照可以有效减少血液中有活性淋巴细胞的数量,同时又对血小板的活性没有显著的损伤。

【关键词】 辐照; 血小板; 移植抗宿主病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.04.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)04-0390-02

Study of the function and clinical application in gamma irradiated apheresis platelet^{*} HE Qi-Tong, YU Jin-Lin, GUO Ru-Hua, LUO Yi-Hong (Foshan Central Blood Station, Foshan, Guangdong 528000, China)

【Abstract】 Objective To study the influence of the activity of platelet by different dose of irradiation, and to evaluate the function and clinical application of gamma irradiated apheresis platelets. **Methods** Apheresis platelets were divided into 5 parts. Then the divided platelets were divided into control group and test group which accepted 25 Gy, 30 Gy, 35 Gy and 40 Gy. The lymphocytes were separated from irradiated platelets and T lymphocytes were transformed into lymphoblast stimulated by PHA, then the percent of lymphoblast was calculated by microscope after exposed to Wright strain, CD41a and CD62p of 35 Gy irradiated platelets were examined by flowcytometry. 40 acute leukemia patients were divided into control group and test group, with 20 cases in each group, they were transfused apheresis platelets and irradiated apheresis platelets, then CCI and clinical manifestation were observed. **Results** The percent of lymphoblast was 0 of 35 Gy irradiated platelets and there was no significant difference of the positive rate of CD41a and CD62p before and after irradiation ($P>0.05$). There was no significant difference of the efficiency of platelet transfusion between test group and control one ($P>0.05$). **Conclusion** Appropriate dose can decrease the activity of lymphocytes but don't impaired the activity of platelets.

【Key words】 irradiation; platelet; graft-versus-host disease

输血相关移植抗宿主病(TA-GVHD)是输血反应中最严重的并发症之一,因其临床表现缺乏特异性,易漏诊和误诊并且病死率高达 80%~90%,目前该病主要以预防为主^[1]。TA-GVHD 的主要原因是与输入血液(成分)中含有活性的 T 淋巴细胞有关。国外从 20 世纪 70 年代就发现 γ 、X 射线可以有效破坏淋巴细胞活性,从而射线辐照血液被认为是一种预防 TA-GVHD 的惟一有效、可靠的方法。怎样的辐照剂量可以最大限度的灭活淋巴细胞而又可以最大限度的保持血小板的功能是一个值得探讨的课题。本文就不同剂量的 γ 射线辐照单采血小板,对血小板的功能及临床应用效果进行了观察,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器 血液辐照仪 Gammacell GC-3000Elan-I 加拿大诺迪安公司,放射源为¹³⁷Cs,活度为 50.7E+12 Bq。流式细胞仪 FACS Cabibur 美国 BD 公司。显微镜 Olympus CX32 RTSF 日本 Olympus 公司。

1.2 试剂 植物血凝素(PHA)、淋巴细胞分离液、瑞氏染液、

CD41a、CD62p。

1.3 血液标本的制备辐照 将单采血小板分装于 5 个血袋中,分别作为未辐照组(对照组)和 25、30、35、40 Gy 不同剂量辐照组。辐照组样本分不同剂量置于血液辐照仪中辐照。

1.4 实验方法 将上述经辐照前后的血小板标本经淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞后,用植物血凝素(PHA)刺激 T 淋巴细胞,使其转化为淋巴母细胞,经瑞氏染色后用显微镜分别计数转化为母细胞的百分率,选取转化率为零的起始辐照剂量为实验剂量。取 80 份用实验剂量辐照前后的血小板按文献[2]的方法用 CD41a、CD62p 标记后,用流式细胞仪检测其阳性率。

1.5 临床分组 选取 40 例接受化疗的急性白血病患者随机分为对照组和治疗组,其中对照组 20 例,男 13 例,女 7 例,年龄 17~49 岁,中位数年龄 32.5 岁,其中急性淋巴细胞性白血病 12 例,急性粒细胞性白血病 5 例,急性单核细胞性白血病 3 例;治疗组 20 例,男 15 例,女 5 例,年龄 16~51 岁,中位数年龄 29.8 岁,其中急性淋巴细胞性白血病 8 例,急性粒细胞性白血病 5 例,急性单核细胞性白血病 7 例。输注前血小板计数均

^{*} 基金项目:广东省佛山市科技发展专项资金项目(编号 03080061)。

小于 $20 \times 10^9/L$,并伴有不同程度的出血表现。治疗组病例输注 1 个治疗量经 γ 射线辐照单采血小板,对照组病例输血 1 个治疗量单采血小板。记录患者输前的小血小板计数和输血后 1 h 血小板计数。

1.6 临床疗效判断 血小板纠正增加指数(CCI)=(输后血小板计数-输前血小板计数) $\times$ 体表面积(m^2)/输入血小板总数(10^{11}),CCI >10 为输注有效^[3]。

1.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,两计量资料的比较用 t 检验,计数资料率的比较用 χ^2 检验。

2 结 果

表 1 不同剂量照射前后淋巴细胞转化结果 (n=12)

辐照剂量(Gy)	平均转化率(%)	
	辐照前	辐照后
25	0.85	0.12
30	0.85	0.04
35	0.85	0.00
40	0.85	0.00

注:各辐照剂量组辐照前、后平均转化率比较, t 值分别为 76.3、91.2、87.0、87.0, $P<0.01$ 。

由表 1 可知,经过 4 种不同的剂量辐照后,淋巴细胞转化率均有显著性变化,剂量为 35 Gy 时,淋巴细胞的转化率开始为 0,说明 35 Gy 能使淋巴细胞全部灭活。

表 2 35 Gy γ 射线辐照前后血小板 CD41a、CD62p 阳性率的比较 (n=80)

项目	平均阳性率(%)	
	辐照前	辐照后
CD41a	96.75 $\pm$ 13.35	97.34 $\pm$ 14.78*
CD62p	74.38 $\pm$ 23.12	75.46 $\pm$ 25.26**

注: * $t=0.98,P>0.05$, ** $t=1.47,P>0.05$ 。

表 3 观察组和对照组血小板输注有效率的比较

组别	n	有效输注(n)	无效输注(n)	有效率(%)
观察组	20	17	3	85
对照组	20	15	5	75

注: $\chi^2=0.625,P>0.05$ 。

3 讨 论

TA-GVHD 是因为输入的血液中 CD4 辅助 T 淋巴细胞识别宿主表达的异源性主要和次要组织相容性抗原(MHC)而激活,进而分泌可溶性细胞因子如白细胞介素-2(IL-2),促使宿主抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞活化增殖,从而形成效应细胞,诱导 TA-GVHD 的发生^[4-5]。大量的实验报道证实了辐照可以有效地诱导淋巴细胞的凋亡^[6-7]。

(上接第 389 页)

[7] 丁淑琴,王洁,张焱,等.结核分枝杆菌 phoS2 基因的克隆及序列分析[J].宁夏医科大学学报,2010,32(6):669-673.

[8] 冯杉.T7 表达系统及自诱导蛋白产出策略[J].北京教育学院学报(自然科学版),2009,4(3):10-15.

[9] Studier FW,Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J].Protein Exper Purif,2005,41

CD41a、CD62p 是血小板功能的检测指标,检测 CD41a 可反映血小板的聚集功能,检测 CD62p 可知血小板是否处于激活状态,也反映血小板的释放功能^[8]。CD62p 在活化和非活化血小板间差别最显著,而且不被血浆蛋白所掩盖,不随时间的推移而在活化血小板表面消失,是目前所知反映血小板活化与释放最特异性的标志物^[9]。

血液制品的最佳辐照剂量以既能灭活淋巴细胞又能维持其他血液成分的功能与活力和最小的损伤为选择。早期国外推荐剂量为 15 Gy,后来分别报道了接受 15~20 Gy 辐照血液后仍产生 TA-GVHD 的报道^[10]。FDA 把辐照中心靶剂量定为 25 Gy,其他部位不得低于 15 Gy,欧洲学术委员会制定的辐照剂量为 25~40 Gy。本研究探讨了不同剂量辐照后淋巴细胞的灭活和对血小板功能的影响,结果表明剂量达到 35 Gy 时,对血小板功能没有明显的损伤,可以有效地诱导淋巴细胞的凋亡,减少活性淋巴细胞的数量,起到预防 TA-GVHD 发生的效果,是一个比较适合辐照剂量。

参考文献

[1] Moroff G,Luban NLC. The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease; Technical issues and guidelines[J].Cancer,1997,11(1):15.

[2] 王书奎,周振英.实用流式细胞术彩色图谱[M].上海:第二军医大学出版社,2004:43-44.

[3] 田兆嵩.临床输血学[M].北京:人民卫生出版社,1998:35-36.

[4] 刘荷中.移植物抗宿主病的研究进展[J].国外医学输血及血液分册,1999,1(22):22.

[5] 陈志哲.警惕输血相关性移植物抗宿主病[J].中华内科杂志,1997,5(36):291.

[6] Klassen NV,Walker PR,Ross CK,et al. Two-stage cell shrinkage and the OER for radiation-induced apoptosis of rat thymocytes[J].Int J Radiat Biol,1993,64:571.

[7] 吴玮,孔宪淘,李莉,等.亚致死量 γ 射线照射后小鼠脾脏 CD95 阳性淋巴细胞变化规律的研究[J].中华放射医学与防护杂志,1997,5(17):305.

[8] 李家增,王鸿利,韩忠朝.血液实验学[M].上海:上海科学技术出版社,1997:302.

[9] MertenM,Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis [J].J Cardiol,2004,93:855-860.

[10] Sproul AM,Chalmers EA,Mills KI,et al. Use of a radiation-sensitive rejection Irradiation of blood products[J].Br J Hamatol,1992,80:251.

(收稿日期:2012-06-11 修回日期:2012-11-21)

(2):207-234.

[10] Tabor S,Richardson CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes[J].Proc Natl Acad Sci USA,1985,82(3):1074-1078.

(收稿日期:2012-08-07 修回日期:2012-09-25)