

[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(5): 1-4.

[14] 张金波, 罗佳滨. 荧光定量 PCR 技术原理及在分子诊断中的应用进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(12): 13-14.

[15] Buh Gasparic M, Cankar K, Zel J, et al. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms[J]. BMC Biotechnol, 2008, 8(1): 26.

[16] 卢亦愚, 严菊英, 冯燕, 等. TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 技术快速检测 H5 亚型禽流感病毒[J]. 中国病毒学, 2006, 21(5): 472-476.

[17] 毛晓露, 陶志华, 陈晓东, 等. 荧光实时定量 RT-PCR 检测 DD3 mRNA 方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(5): 335-337.

[18] 赵锦荣, 白玉杰, 罗明, 等. 新型 TaqMan-MGB 探针在结核分枝杆菌实时 PCR 检测中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 12(19): 807-810.

[19] Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards[J]. Mol Cell Probes, 2000, 14(2): 127-135.

[20] 杜秀敏, 齐法莲, 徐军, 等. 临床诊断中的实时 PCR 技术[J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17(6): 461-462.

[21] 章晓波, 徐洵. 分子信标探针用于 PCR 检测对虾白斑杆状病毒[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3): 277-280.

[22] 张立国, 张璐. 实时定量 PCR 技术的介绍[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 39-40.

[23] 白恩琪, 陈华云. 荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 基因诊断, 2009, 3(35): 22-27.

[24] Wang X, Li X, Currie RW, et al. Application of real-time polymerase chain reaction to quantitate induced expression of interleukin-1 beta mRNA in ischemic brain tolerance[J]. J Neurosci Res, 2000, 59(2): 238-246.

[25] 雷学忠, 陈守春. 定量 PCR 技术研究进展[J]. 四川医学, 2000, 21(11): 22-27.

[26] 赵清, 许颂霄, 袁军, 等. 一种快速检测 HBV 基因的荧光定量 PCR 法的建立[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(4): 244-246.

(收稿日期: 2011-12-02)

• 综 述 •

血小板免疫介质分泌及与免疫病理关系研究进展

高淑芳 综述, 李培成 审校

(上海中医药大学附属龙华医院检验科 200032)

关键词: 血小板; 免疫介质; 动脉粥样硬化; 脓毒症; 类风湿关节炎
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 05. 023 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2012)05-0560-03

最早关于血小板与免疫系统联系的认识来自血小板自身免疫攻击(免疫性血小板减少症)和同种异体免疫攻击(胎儿或新生儿同种异体血小板减少和输血后紫癜),以后逐步证实血小板在调节天然免疫和获得性免疫中有重要作用^[1]。

1 血小板结构

血小板为小、卵圆盘形,浆膜表面一般光滑,可被损伤的血管壁激活,形状变为多刺环形,促使血小板膜表面黏附蛋白和凝固蛋白受体数增加,活化血小板吸引其他血小板相互聚集,形成血栓,阻塞血管渗漏处。该过程也导致很多细胞因子、趋化因子和细胞表面分子的表达,不仅激发生止血,也可诱导白细胞聚集到损伤组织,例如活化血小板表达 P 选择素,促进淋巴细胞滚动和黏附至高内皮小静脉^[2]。

2 血小板颗粒

血小板有 3 种主要颗粒:α 颗粒、密集颗粒和溶酶体。α 颗粒占 40%~80%,其内部蛋白包括凝血因子、趋化因子、黏附蛋白、丝裂原因子和血管生成调节因子。有研究发现 α 颗粒也含有纤维蛋白原和血管性血友病因子(vWF),推测血小板颗粒有不同的促炎性反应和抗炎性反应亚群^[3-4]。

3 血小板合成介质

血小板不仅贮存生物活性介质,也能合成分子,在止血和炎性反应过程中可形成自身蛋白^[5]。血小板与凝血酶活化后能分泌 300 种以上蛋白质,其中部分蛋白质,如白细胞介素-1(IL-1)、Toll 样受体(TLR)和 CD154,可参与血液凝固以外的过程,使血小板功能十分复杂^[6-7]。

活化血小板表达的生物活性物质和黏附蛋白有利于血小板与不同免疫细胞群相互作用,例如活化血小板介导中性粒细胞黏附至内皮,亦上调其促炎性反应功能。血小板与树突状细

胞(DC)相互作用使 DC 迁移至组织损伤处,刺激 DC 释放炎性反应趋化因子和细胞因子。因此,血小板在炎性反应过程中是细胞交流的关键介质。

4 血小板表达的免疫介质

4.1 细胞因子和趋化因子 血小板颗粒内贮存有很多分子,如血小板衍生生长因子(PDGF)、腺苷二磷酸(ADP)和血栓素 A₂(TXA₂),均与止血功能有关。PDGF 有助于炎性反应部位的激发和调节伤口愈合。血小板颗粒亦含许多促炎性反应和抗炎性反应细胞因子及趋化因子,例如转化生长因子 β(TGFβ),在调节 TGFβ 方面具有重要作用。免疫性血小板减少症患者血体内 TGFβ 减少,治疗后血小板数正常, TGFβ 恢复正常^[8]。近年来有报道认为,免疫性血小板减少症患者 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)减少,经治疗(静脉注射免疫球蛋白、地塞米松、血小板生成素)能恢复 Treg 数量和功能^[9],说明 Treg 分化依赖 TGFβ,可能与血小板贮存的 TGFβ 有助于 Treg 细胞内环境稳定有关。血小板内贮存的其他细胞因子和趋化因子功能尚未清楚,是当前研究热点之一。

4.2 CD40 和 CD154 淋巴细胞和抗原递呈细胞间的 CD40 和 CD154 是一对受体-配体,其中心作用是促进相互作用,在血栓性疾病中有重要作用。现知血小板表达 CD154,可与内皮细胞上 CD40 相互作用,上调内皮细胞表达细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1),释放单核细胞趋化蛋白 1(CCL2),促进白细胞募集至炎性反应部位^[10]。另外,活化血小板释放的可溶性 CD154 可通过相同途径促使白细胞募集至炎性反应部位,也可与血管细胞(包括内皮细胞)相互作用,诱导 E 选择素和 P 选择素上调,释放 IL-6 和组织因子。事实上人血浆中大多数可溶性 CD154 来自活化血小板,

可溶性 CD154 是机体内血小板活化程度的指示剂^[11-12]。

血小板表达的 CD154 可增强 CD8⁺ T 细胞反应,可提高单核李斯德菌感染患者体内保护性 T 细胞反应。因而血小板表达 CD154 在连接天然免疫和获得性免疫反应,以及促进保护性免疫方面有重要作用。CD154 可干扰树突状细胞(DC)的成熟。静止或活化血小板表达的 CD154 可减少 DC 促炎性反应细胞因子 IL-12_{p70} 与肿瘤坏死因子(TNF)的产生,促进 DC 介导抗炎性反应性细胞因子 IL-10 的产生,表明血小板可通过对 DC 的作用而影响获得性免疫^[13]。上述证据表明血小板表达 CD154 参与获得性免疫反应的调节^[14]。

5 血小板与人髓样细胞触发受体-1(TREM-1)

血小板可通过与 TREM-1 的相互作用促进天然免疫。TREM-1 属 γ 型免疫球蛋白超家族,主要由中性粒细胞和单核细胞表达。在微生物产物刺激下,TREM-1 表达增加,激活粒细胞效应反应,包括呼吸爆炸、吞噬作用和释放 IL-8^[15]。Haselmayer 等^[16]证明,人血小板表达 TREM-1 配体,而重组可溶性 TREM-1 可与血小板特异结合,当中性粒细胞和血小板在脂多糖(LPS)存在下相互作用,TREM-1 可增强中性粒细胞介导活性氧产生和分泌 IL-8。脓毒症及并发弥散性血管内凝血(DIC)患者血小板 α 颗粒内 TREM 样转录物-1(TLT-1)明显增加可能与此有关。总之,在炎症反应过程中 TREM-1 配体和 TREM 样家族可促进中性粒细胞和血小板相互作用,且该受体系统在脓毒症时可抑制潜在的血小板诱导的炎症反应。

6 血小板在免疫和免疫病理中的作用

6.1 血小板 α 颗粒内的具有细菌作用的蛋白质分子称血栓素(thromboxin),包括 Thromboxin-1 和 Thromboxin-2,对多种细菌(包括枯草杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等)有致死作用,亦能杀死新型隐球菌^[17]。血小板可与感染恶性疟原虫的红细胞结合,引起红细胞破坏而杀灭细胞内寄生虫^[18-19]。在乙型肝炎病毒感染期间,血小板可促进细胞毒性 T 细胞介导的抗病毒免疫,但亦对肝细胞造成免疫病理损伤^[20]。

总之,血小板可直接或间接杀灭病原体,但在某些情况亦可造成有害的免疫病理反应。

6.2 血小板与动脉粥样硬化的进展直接相关。炎症反应可改变内皮的促凝和抗凝特性,增加白细胞、内皮细胞和血小板间的信号通讯。这些相互作用主要由血小板表达的 P 选择素介导^[21-23]。血小板黏附至炎症动脉粥样硬化内皮,激活并分泌促炎性反应介质,包括 CD154、IL-1 β 和 RANTES,促进内皮激活及增强单核细胞募集。

6.3 血小板减少症常见于危重的脓毒症患者,且导致死亡率增加。脓毒症可导致白细胞和血小板激活并诱发 DIC,最终导致多系统器官衰竭。脓毒症患者体内活化血小板 P 选择素表达增加伴血小板微粒形成增加,血小板微粒的表面受体易黏附各种细胞,可激活内皮细胞、白细胞和其他血小板。更重要的,这些微粒可通过可溶性介质,如 CCL5,作为信使传递信号^[24]。

6.4 类风湿关节炎(RA)患者滑液内含血小板微粒,而骨关节炎(OA)患者滑液内无血小板微粒。RA 患者滑液内血小板微粒可激活成纤维细胞样滑液细胞释放 IL-1。微粒相关 IL-1 是增强 RA 炎症反应的关键因子,例如 IL-1 可引起关节滑膜细胞产生其他促炎性反应细胞因子和趋化因子(如 IL-8),促使关节内中性粒细胞募集和活化,提示血小板及其微粒与 RA 发病及疾病进展密切相关^[25]。

参考文献

[1] Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, et al. Platelet functions be-

yond hemostasis[J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(11): 1759-1766.

[2] Diacoro TG, Puri KD, Warnok RA. Platelet mediated lymphocyte deliver to high endothelial venules[J]. Science, 1996, 273(3): 252-255.

[3] Sehgal S, Storrie B. Evidence that differential packing of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(10): 2009-2016.

[4] White GC, Rampietti R. Platelet Secretion indiscriminately spewed forth or high orchestrated[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(10): 2006-2008.

[5] Lindemann S, Gawaz M. The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell[J]. Semin Thromb Haemost, 2007, 33(2): 144-150.

[6] Copping JA, O'Connor R, Wynne K, et al. Moderation of the platelet releasate response by aspirin[J]. Blood, 2007, 109(11): 4786-4792.

[7] Denis MM. Escaping the nuclear confines: Signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets[J]. Cell, 2005, 122(3): 379-391.

[8] Andersson PO, Olsson A, Wadenvik H. Reduced transforming growth factor- β 1 production by mononuclear cells from patients with active chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Br J Haematol, 2002, 116(4): 862-867.

[9] Ling Y, Cao X, Yu Z, et al. Circulating dendritic cells subsets and CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone[J]. Eur J Haematol, 2007, 79(4): 310-316.

[10] Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, et al. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease[J]. Circulation, 2002, 106(8): 896-899.

[11] Hammuhner M, Jttenson A, Dierkes J. Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation[J]. Exp Bio Med, 2007, 232(4): 581-589.

[12] Henn V, Steinbach S, Büchner K, et al. The inflammatory action of CD40 ligand (CD152) expressed on activated human platelets is temporally limited by co expressed CD40[J]. Blood, 2001, 98(4): 1047-1054.

[13] Kissel K, Berber S, Nockher A, et al. Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines[J]. Transfusion, 2006, 46(5): 818-827.

[14] Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20(2): 197-216.

[15] Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna H. The TREM receptor family and signal integration[J]. Nature Immunol, 2006, 7(11): 1266-1273.

[16] Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, et al. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation[J]. Blood, 2007, 110(3): 1029-1035.

[17] Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, et al. Thromboxins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-Terminal deletion products of CXC chemokines[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20374-20381.

[18] Cox D, McConkey S. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(11): 557-568.

[19] McMorran BJ. Platelets kill intraerythrocyte malarial parasites and mediate survival to infection[J]. Science, 2009, 323(2): 797-800.

- [20] Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in APOE-deficient mice[J]. *Circulation*, 2000, 101(5): 2290-2295.
- [21] Davi G, Patrono C. Platelet, activation and atherothrombosis[J]. *N Eng Med*, 2007, 357(12): 2482-2494.
- [22] Iannacone M, Sitia G, Isogawa M, et al. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage[J]. *Nature Med*, 2005, 11(11): 1167-1169.
- [23] Langer HF, Daub K, Braun G, et al. Platelets recruit human dendritic cells Via MAC-1/JAM-C interaction and modulate dendritic

cell function in vitro[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(6): 1463-1470.

- [24] Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum[J]. *Nature Immunol*, 2011, 11(4): 264-274.
- [25] Kniiff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, et al. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(6): 1498-1503.

(收稿日期: 2011-12-01)

• 综 述 •

新生儿败血症实验诊断方法现状及研究进展

张玉东 综述, 陈贻骥[△] 审校

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心 400014)

关键词: 败血症; 诊断方法; 婴儿, 新生; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)05-0562-03

新生儿败血症是新生儿期的危重病症,也是造成新生儿死亡的主要原因之一,存活者可留有严重后遗症,应高度重视。现有实验室检查不能提供敏感、特异的早期诊断依据,早期诊断败血症非常困难。近年来国内外学者做了大量相关工作。

1 临床常用新生儿败血症实验室诊断依据

1.1 外周血象 外周血象检查是败血症高危儿的常规检查。该检查操作技术难度小,80%败血症新生儿外周血可有1项或多项指标异常^[1]。

1.1.1 白细胞计数(WBC)及分类 WBC增多在感染性疾病的诊断中易引起重视。出生12 h后采血结果较为可靠;WBC减少($WBC < 5 \times 10^9/L$)或增多(年龄小于或等于3 d者, $WBC > 25 \times 10^9/L$;大于3 d者, $WBC > 20 \times 10^9/L$);杆状核细胞/中性粒细胞(I/T) ≥ 0.16 ,均提示感染^[2]。Berger等^[3]指出50%的新生儿败血症患儿WBC可处于正常范围内。WBC异常也可能出现于其他病理状态下,故对于早期诊断新生儿败血症,WBC既缺乏敏感性又缺乏特异性。与WBC相比,I/T具有较好的临床诊断价值。健康新生儿在出生后24 h内I/T明显升高,但最高不会超过0.14。通常以I/T > 0.2 作为诊断新生儿败血症的实验室依据,其灵敏度为60%~90%^[4]。

1.1.2 白细胞形态改变 在WBC无明显增高的败血症中,白细胞形态改变的诊断价值更大。新生儿败血症时,中性粒细胞出现球形包涵体常占50%,空泡变性可达100%,中毒颗粒、核溶解等改变也很常见。但白细胞形态学检查采用血涂片标本,并需严格复核以便发现特殊异常细胞,这与检验人员专业素质密切相关,误差大。

1.1.3 血小板计数(PLT)减少 有文献报道,约22%重症监护新生儿中可发生PLT减少,而败血症是导致PLT减少的明确因素^[5]。感染导致PLT减少可作为新生儿败血症诊断的重要依据之一, $PLT < 100 \times 10^9/L$ 有明确的诊断价值^[3]。Mavrommatis等^[6]报道约35%~59%新生儿败血症患儿PLT减少。但PLT减少还常见于呼吸窘迫综合征、窒息等,故PLT减少作为诊断新生儿败血症的特异度不高。

1.1.4 红细胞沉降率(ESR) 有学者曾采用简单微量方法对

患儿发现感染当天进行ESR检测,多数患儿在24 h内ESR有异常改变,认为 $ESR > 15 \text{ mm/h}$ 有诊断意义^[3]。但ESR明显增加也可出现在血型不合溶血、纤维蛋白原上升及结缔组织病,且ESR变化相对较迟缓。

1.2 急性时相蛋白(APP) C反应蛋白(CRP)在急性感染早期即增多,是机体应激状态下由肝脏合成的正性APP,反应灵敏,在炎症反应及急性损伤后6~8 h内即可上升($CRP \geq 8 \text{ mg/L}$)。细菌感染后常在12~24 h内升高,2~3 d达峰值。8%的健康新生儿出生后24~48 h可出现暂时性、生理性CRP升高。因此,新生儿出生48 h后CRP持续性升高才提示细菌感染^[7]。CRP同感染的严重程度呈正相关,所以动态观察CRP变化非常重要,CRP峰值可超过正常值数百倍以上,而在感染控制后又可迅速降低。祁从辉等^[8]采用免疫比浊法对428例细菌感染性疾病患者和55例病毒感染患者血清CRP浓度及ESR、WBC、中性粒细胞百分数进行测定,结果显示在细菌感染急性期ESR、WBC及中性粒细胞百分数变化与CRP浓度变化具有相关性,但不如CRP浓度升高敏感。同外周血象中白细胞计数及分类、PLT、ESR等相比较,CRP对早期诊断新生儿败血症的意义更大,其灵敏度和特异度最高(分别为64.7%和81.4%)。

1.3 细菌培养 细菌培养是诊断新生儿败血症的“金标准”,但大约在感染后72 h,最早也要在36~48 h才能得到检测结果,并且存在假阳性与假阴性。Griffin和Morman^[4]的研究中30%~40%的临床诊断败血症的新生儿血培养出现假阴性结果。必须在抗菌药物使用前进行血培养,抽血时应严格消毒,怀疑有肠源性感染者须同时进行厌氧菌培养,长时间用青霉素类和头孢类药物者应同时进行L型细菌培养,上述方法均可提检测阳性率。抽血过少可导致假阴性,所以取血量至少为0.5 mL。国外一般主张从2个部位取血以减少皮肤污染所致假阳性结果,但国内一般推荐1个部位取血^[4]。此外,耻骨上膀胱穿刺取尿液、脑脊液、浆膜腔液、脓腔液,以及拔除的留置导管头等均应进行细菌培养。细菌培养出现假阳性或假阴性结果的可能性均较高,灵敏度低,并且耗时较长,易错过最佳治

[△] 通讯作者, E-mail: chenyyji55@yahoo.com.cn。