

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

臺灣地區分離式捐血人血小板 CD36 表現缺乏、相關基

因變異調查及其對血小板血品品質影響之研究

Investigating platelet CD36-deficiency and related *CD36* genetic variations among the platelet-apheresis donors in Taiwan and the effect of CD36 deficiency on the quality of platelet components prepared by apheresis

林冠孝

Kuan-Hsiao Lin

指導教授：胡忠怡 博士

羅仕錡 醫師

Advisor: Chung-Yi Hu, Ph.D.

Shyh-Chyi Lo, M.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

臺灣地區分離式捐血人血小板 CD36 表現缺乏、相關

基因變異調查及其對血小板血品品質影響之研究

Investigating platelet CD36-deficiency and related *CD36*
genetic variations among the platelet-apheresis donors in
Taiwan and the effect of CD36 deficiency on the quality of
platelet components prepared by apheresis

本論文係 林冠孝 君 (R96424029) 在國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學研究所完成之碩士學位論文，於民國 99 年 7 月 27 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

胡忠怡

(簽名)(指導教授)

羅仕錫

林冠孝

許祥如

系主任、所長

鄧麗珍

(簽名)

誌謝

時光飛逝，歲月如梭，三年的時光很快就過去了，如今，碩士班的生活已進入了尾聲。回想當初雖已在捐血中心服務四年了，但深感大學時之所學已趕不上這知識爆炸的時代，所以在王秋華醫師的鼓勵之下，我毅然地決定重返校園，很幸運地考上了台大醫技所，並進入了胡忠怡老師實驗室。

感謝胡忠怡老師這3年來的指導，在學識、實驗技術、思考邏輯、論文寫作和專題報告等方面，讓我學習到許多寶貴的知識和經驗，感謝羅士錡醫師對論文研究方向和實驗設計的寶貴建議，感謝林淑華老師在口試時的意見和對論文的修正。感謝絨羚學姐在實驗上的協助和教導；感謝佩蓉學姊，勝凱學長在資料查詢上的教導，及提供許多不錯的想法；感謝衍儒幫同學忙通知實驗室的活動，和提供寶貴的實驗流程，感謝學弟昱宏、學妹映君教導我許多實驗的技巧，並提醒我該進行的行政流程，感謝明曄學妹在實驗上的幫忙和指教。

感謝台灣血液基金會對於本研究計畫的支持，感謝王秋華醫師的鼓勵及經驗的分享，感謝白舜仲組長對於研究計畫撰寫及申請上的協助，感謝謝輝和醫師在口試時所提出的想法。感謝王喬鳳護理長在排班方面的幫忙及對於收集檢體方面的建議和配合，感謝南海捐血室所有的同仁幫忙募集參與此研究計畫的捐血人，及協助檢體的收集和資料的整理。感謝所有參與此研究計畫的捐血人，有你們的加入和提供寶貴的檢體，此研究才能順進行。

最後感謝我的家人在生活上的支持及精神上的鼓勵，使我有動力完成這段既艱辛又充實的旅程。這三年研究所生涯的學習對我來說是開始並不是結束，相信未來還有機會可以再回到校園，探究更多生命的現象。

中文摘要

CD36為一種血小板上的特異性抗原，又稱 glycoprotein IV(GP IV)。過去文獻報告關於台灣地區血小板CD36缺乏的頻率約為1.6%~4%間¹⁻²。CD36缺乏有兩種型態：第一型CD36缺乏為血小板和單核球上都偵測不到CD36；第二型CD36缺乏只有血小板上偵測不到CD36³，至今陸續有關於CD36缺乏和可能的基因變異的研究發表。CD36抗原缺乏受血者若因異體免疫產生anti-CD36抗體，除了會導致血小板輸注無效，輸血後紫斑，各種免疫性血小板減少等臨床症狀；也有研究指出CD36缺乏與高血脂症有關聯⁴。近來CD36基因剔除的小鼠研究發現，血小板可經由CD36接受微顆粒(microparticles)的刺激而活化，CD36缺乏血小板被微顆粒活化的能力會降低，因而使止血時間延長⁵。

本研究旨在調查台灣地區血小板分離術捐血人其血小板和單核球上 CD36 的表現，並區分出第一型和第二型的 CD36 缺乏，以預估國人因 CD36 抗原缺乏導致輸血後輸注無效的風險機率，並探討引起 CD36 缺乏可能的基因變異、以及 CD36 缺乏對血小板血品品質的影響。共募集 640 位健康的分離術血小板捐血人，檢測其 CD36 結果，在國人發生血小板完全缺乏（CD36 deficiency）之比率為 1.6%，屬第一型 CD36 缺乏者有 4 人（0.6%）、第二型 CD36 缺乏有 6 人（1%）。血小板上 CD36 表現低於一般分佈之 25%者定義為 CD36 reduced (CD36 低下)共 160 人。分析國人 CD36 基因序列，在 CD36 缺乏/低下受試個案發現與 CD36 缺乏/低下有關的變異有 1163A>T、1200-5 49bp inv、1254+6 del TATTTG 等。檢測並比較 CD36 缺乏/低下受試個案與對照組間全血及所捐血小板濃厚液血品止血功能差異，以及查詢曾有因脂血而無法捐血之記錄，得到以下結論：1、國人血小板 CD36 缺乏的發生率為 1.6%，CD36 基因變異種類與國外常見之 268 C>T 和 975 T>G 變異型不同。掌握慣常血小板分離術捐血人中 CD36 缺乏者名單，對於因異體免疫產生 anti-CD36 抗體而合併血小板輸注無效的受血者，則可輸注特定 CD36 缺乏捐血人所捐之的血品，以提升輸血效果。2、血小板 CD36 缺乏捐血人臨床上並無止血

異常情形，雖然其全血 TEG 檢測凝血功能各項參數與血小板 CD36 正常表現者有顯著差異，但仍屬正常參考範圍。3、CD36 缺乏的分離術收集之血小板濃厚液血品在第五天末效時，和 CD36 正常血品比起來雖然 TEG 檢驗各項參數與 CD36 正常血小板有差異，但均在正常範圍內，其血品止血的品質應是可接受的。4、血小板 CD36 缺乏和低下之捐血人較正常人產生脂血的機會較高($p<0.0001$)，所以需加強宣導其捐血前飲食的控制。

關鍵詞： CD36 缺乏、分離式血小板、基因變異、脂血、Thrombelastograph (TEG)

凝血功能檢測



英文摘要

CD36, also known as platelet (PLT) glycoprotein IV (GPIV), is a class B scavenger receptor on platelets. Previously, prevalence of PLT CD36-deficiency in Taiwanese was reported to be 1.6-4%¹⁻². There are two types of CD36 deficiency. Type I CD36-deficiency was characterized as CD36 deficiency on both monocytes and platelets, while in type II CD36-deficiency, CD36 is expressed on monocytes but not on PLTs. Study on CD36 deficiency with possible *CD36* genetic variations has been published in the past few years. CD36 deficiency subjects might be immunized by transfusion and induce anti-CD36 antibody, which could result in platelet transfusion refractoriness, post-transfusion purpura, and other types of immune-related thrombocytopenia. Moreover, studies also pointed out that CD36 deficiency was associated with hyperlipidemia. Studies in CD36 knockout mice revealed that microparticles could stimulate platelets activation through CD36. Platelets with CD36 deficiency will reduce platelet interaction with microparticles, and resulted in prolongation of bleeding time.

The aims of this study are 1) to clarify the expression of CD36 on monocytes and platelets from apheresis donors in Taiwan and classified CD36-deficient Taiwanese subjects into types I and II, and 2) to study the *CD36* genetic variations in each subject and their relation to CD36 deficiency, 3) to investigate the possible effect of CD36 deficiency on the quality of platelet components. A total of 640 apheresis donors were recruited in this study. Type I and type II deficiency were found in 4 (0.6%) and 6 (1%) of the donors, respectively. One hundred and sixty donors (25%) were found to have reduced expression of CD36 on their platelets. In molecular analysis of the coding sequence of *CD36* gene in subjects with deficiency/reduced PLT CD36, we found three

previously un-published variations: 1163A>T 、1200-5 49bp inv and 1254+6 del TATTTG. Coagulation of whole blood as well as the platelet concentrate was assessed to see if CD36 deficiency would cause delayed hemostasis. Records of lipemia-related events in blood donation were inspected. The results indicated that: 1. the incidence of CD36 deficiency in Taiwanese is 1.6%. The genetic variations of *CD36* gene identified in Taiwanese CD36 deficient subjects are differed from those reported in Japanese and Africans. The database of the Taiwanese CD36-deficient apheresis donors may be useful in the future for providing platelets for patients with CD36 iso-immunized. 2. Apheresis donors with CD36 deficiency do not show abnormal whole blood Thrombelastograph (TEG) coagulation test. Although the results of whole blood TEG test in CD36-deficient donors were significantly different from that of the controls, that they were still within normal range. 3. After 5 days of storage, the platelet TEG test results of components prepared from CD36 deficient subjects were significantly different from that of the controls, but still fall within normal range. The platelet function of platelet components prepared from CD36 deficient donors is acceptable. 4. The donors with deficient/reduced platelet CD36 have higher chance of lipemia than the CD36 normal donors ($p<0.0001$), so health education should be stressed in these donors to reduced the possibility of hyperlipidemia-associated problems in blood donation.

Keywords: CD36 deficiency, apheresis, genetic polymorphism, lipemia,

Thrombelasto-graph (TEG) coagulation test

目錄

口試委員會審定書	ii
誌謝	iii
中文摘要	iv
英文摘要	vi
第一章 緒論	1
1.1. CD36 介紹及 CD36 缺乏	1
1.1.1. NaK ^a 抗原的發現與 CD36 缺乏	1
1.1.2. CD36 缺乏的類型及發生率	1
1.1.3. CD36 缺乏的相關基因變異	2
1.1.4. CD36 基因結構和 CD36 蛋白表現	2
1.1.5. CD36 的功能及 CD36 缺乏的影響	3
1.2. 血小板輸血介紹	4
1.2.1. 血小板血品之種類	4
1.2.2. 分離術血小板之簡介	5
1.2.3. 血小板輸血療效之評估	5
1.3. 血小板濃厚液血小板數目及血漿品質評估	7
1.3.1. 血小板數目	7
1.3.2. 血漿品質	8
1.4. 血小板止血功能的選擇	9
1.4.1. 血小板止血功能測試方法的選擇	9
1.4.2. Thrombelastography (TEG) 的介紹	10
1.5. CD36 缺乏對血小板血品品質可能造成的影響	11

1.5.1.	血小板數目	11
1.5.2.	血小板止血功能	11
1.5.3.	血漿方面	11
1.6.	研究目的與實驗設計	13
第二章 材料與方法		14
2.1.	試劑與器材清單	14
2.2.	實驗材料	14
2.3.	以流式細胞儀(Flow cytometry)分析血小板 CD36 表現	15
2.3.1.	血小板懸浮血漿(platelet-suspension plasma , PSP)的製備	15
2.3.2.	血小板上 CD36 的表現	15
2.3.3.	單核球上 CD36 的表現	15
2.4.	CD36 基因變異分析	16
2.4.1.	抽取 DNA	16
2.4.2.	聚合酶連鎖反應(PCR)之引子設計及反應條件設定	16
2.4.3.	CD36 缺乏之捐血人基因變異前趨調查	17
2.4.4.	1200(-5) 49bp inv 篩檢	17
2.4.5.	序列特異性寡核苷酸探針	17
2.5.	Thrombelastography(TEG)5000 series analyzer 測試	18
2.5.1.	捐血人飲食用藥問卷調查	18
2.5.2.	全血測試	18
2.5.3.	缺乏血小板血漿(platelet-poor plasma , PPP)的製備	18
2.5.4.	血小板濃厚液(PC)測試	18
2.6.	乳糜血紀錄調查	19
2.6.1.	脂血判斷標準	19
2.6.2.	分離式捐血人脂血資料整理	19
2.7.	統計分析方法及軟體	19

第三章	實驗結果	20
3.1.	分離式捐血人基本資料分析	20
3.2.	流式細胞儀分析 CD36 在血小板上的表現	20
3.2.1.	血小板懸浮血漿中血小板計數之評估	20
3.2.2.	血小板懸浮血漿與 FITC Mouse Anti-Human CD36 適當體積之分析	20
3.2.3.	血小板上 CD36 平均螢光強度的分布	21
3.3.	血小板上 CD36 表現缺乏或低下的捐血人之基因變異分析	21
3.4.	各種 CD36 基因變異與血小板 CD36 表現缺乏的關聯性	22
3.4.1.	1200(-5) 49bp inv	22
3.4.2.	329AC del	23
3.4.3.	1163 A>T	23
3.4.4.	1228-1239 del	23
3.4.5.	1200(-13) A>G	24
3.4.6.	1254(+6) TATTTG del	24
3.5.	流式細胞儀分析特定 CD36 基因型捐血人 CD36 在單核球上的表現	25
3.6.	血小板上 CD36 表現不同之捐血人全血血小板功能之分析	26
3.6.1.	TEG R 值	26
3.6.2.	TEG Angle 值	26
3.6.3.	TEG MA 值	26
3.7.	血小板上 CD36 表現不同之血品在儲存期間血小板計數及功能之分析	27
3.7.1.	血小板計數	27
3.7.2.	TEG R 值	27
3.7.3.	TEG Angle 值	28
3.7.4.	TEG MA 值	28
3.8.	血小板上 CD36 表現不同之捐血人脂血產生機會之分析	28
第四章	討論	29

參考文獻	35
圖	39
表	51
附錄	61



圖目錄

圖一、全血血小板計數與血小板懸浮血漿血小板計數對照圖.....	39
圖二、血小板之數目與 CD36 平均螢光強度之關係圖.....	40
圖三、流式細胞儀分析 CD36 於血小板及單核球上表現的螢光點狀分布圖.....	41
圖四、血小板 CD36 平均螢光強度點狀分布圖.....	42
圖五、CD36 缺乏相關基因變異前趨測試結果.....	43
圖六、1200(-5~-53) 49bp inv 篩檢引子設計圖及洋菜膠電泳結果圖.....	44
圖七、329AC deletion 特異性序列寡核苷酸探針(SSOP)測定結果圖.....	45
圖八、1163 genotypes 特異性序列寡核苷酸探針(SSOP)測定結果圖.....	46
圖九、CD36 基因變異與單核球上 CD36 表現 MFI 關係圖.....	47
圖十、TEG 分析儀全血測試各參數分析圖.....	48
圖十一、血小板成品血小板計數值與儲存時間關係圖.....	49
圖十二、TEG 分析儀血小板濃厚液測試各參數與儲存時間關係圖.....	50

表目錄

表一、分離術捐血人基本資料.....	51
表二、640 名捐血人血小板與單核球 CD36 表現統計.....	52
表三、CD36 基因變異檢測之捐血人基本資料及變異結果分析	53
表四、1200(-5)49bp inv 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析	54
表五、329AC del 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析	55
表六、1163 (A>T)基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析	56
表七、1228-1239 del 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析.....	57
表八、1200(-13) A>G 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析	58
表九、1254(+6) TATTTG del 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析	59
表十、血小板 CD36 Deficeincy/Reduction 與脂血紀錄之關聯性分析	60



第一章 緒論

1.1. CD36 介紹及 CD36 缺乏

1.1.1. NaK^a 抗原的發現與 CD36 缺乏

日本學者 Ikeda 於 1989 年在輸注 HLA 相容的血小板，卻仍產生血小板輸注無效的病人血清中發現了 anti-NaK^a 抗體，並利用免疫螢光法確認此抗體可結合血小板上新發現的特異性抗原(稱為 NaK^a)⁶，次年 Tomiyama 利用免疫沉澱法及西方墨點法證明此抗原是位於血小板主要的醣蛋白 Glycoprotein IV 上⁷，同一年 Yamamoto 也利用相同的方法證明出 NaK^a 捐血人的血小板上偵測不到 Glycoprotein IV⁸。而 1987 年 Stephen 等人研究即指出 Glycoprotein IV 在免疫學上就等同於 CD36⁹。因此 NaK^a 為 CD36 上的一個抗原決定位(epitope)，若偵測不到 NaK^a 就表示 CD36 缺乏。

1.1.2. CD36 缺乏的類型及發生率

在日本人調查血小板 CD36 缺乏的發生率約為 3%~11%^{3, 10-11}，在美國黑人約為 2.4%¹²，白人約為 0%¹²，在台灣約為 1.6%~4%¹⁻²。1994 年日本學者 Yamamoto 等人以流式細胞儀發現 CD36 缺乏有兩種類型，第一型為血小板和單核球上都偵測不到 CD36；第二型為只有血小板上偵測不到 CD36³；2000 年 Yanai 等人調查日本北海道居民 CD36 的表現，發現血小板 CD36 缺乏發生率為 6.8%，第一型 CD36 缺乏約為 1%，第二型 CD36 缺乏約為 5.8%；1999 年法國學者 Lee 等人調查法國人及撒哈拉以南非洲(sub-Saharan)住民 CD36 的表現，結果發現法國人血小板 CD36 缺乏發生率為 0%，而撒哈拉以南非洲(sub-Saharan)住民血小板 CD36 缺乏發生率約為 7.77%，第一型 CD36 缺乏約為 2.6%，第二型 CD36 缺乏約為 5.2%。台灣地

區有關血小板 CD36 缺乏的發生率，1992 年時長庚醫院調查結果約為 1.6%¹；1993 年時馬偕醫院調查結果約為 4%²，但均未進一步分析其第一型和第二型 CD36 缺乏的發生率。

1.1.3. CD36 缺乏的相關基因變異

在日本人中，至少已發現 5 種可以導致第一型 CD36 缺乏的基因變異，分別為：*CD36* 基因 exon4 上的 C268T、exon10 上的 949insA、exon5 上的 329 AC del、exon13 上的 1228-1239del 和 exon7 上的 5bp insertion(629-631 AAAAC)等¹¹，其中以 C268T 的對偶基因頻率最高，在第一型 CD36 缺乏者間約為 55%~70%¹³；在非洲裔人種中，則以 *CD36* 基因 exon10 上 975 T>G 對偶基因頻率最高，在第一型 CD36 缺乏者間約為 80%¹⁴。此外已有研究發現相對於第一型 CD36 缺乏的人皆可找到相對應的 *CD36* 基因變異，第二型 CD36 缺乏的人仍約有 40%~50%尚未找到任何的 *CD36* 基因變異^{10, 15}。比較 CD36 在單核球和血小板上的表現，可以觀察到單核球上 CD36 的表現和基因變異是有關係的，如果影響 CD36 表現的基因變異為同型合子，單核球上幾乎就偵測不到 CD36，若為基因變異異型合子，其單核球 CD36 表現降為正常的一半；血小板上 CD36 的表現除部分可能會受到基因變異的影響，但也有一部分人血小板上 CD36 表現為正常血小板的一半，但卻找不到任何 *CD36* 基因變異，有關影響血小板上 CD36 表現的決定因子尚未完全確定¹⁵。台灣地區還未有影響 *CD36* 表現相關基因的研究報告。

1.1.4. *CD36* 基因結構和 CD36 蛋白表現

CD36 基因位在染色體 7q11.2，基因片段全長超過 46Kb，其中包含 15 個 exons，轉譯區域包含部份的 exon 3，exon 4 到 exon 13 及部分 exon 14。轉譯序列長度 1420bp，蛋白質產物 471 個胺基酸，預期的分子量約為 53kDa，因為其膜外區域有許多和醣類結合的位置，實際分子量約為 80~90kDa，蛋白結構包含一個細

胞膜外區域，兩個穿過細胞膜的區域，蛋白分子的 N 端和 C 端分別位於細胞質內，其膜外區域可接受 collagen、apoptotic cells、oxidized low density lipoprotein (oxLDL)、long-chain fatty acid 和 thrombospondin 等物質的刺激，在細胞質內 N 端和 C 端附近的胺基酸上有 palmitoylation 的位置，可傳遞刺激的訊號¹⁶。CD36 為一種 B 型細胞膜清道夫受體，其別名很多，包括：platelet glycoprotein IV、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、fatty acid translocase (FAT)和 thrombospondin (TSP) receptor 等，CD36 在許多細胞或組織上有表現，包含血小板、微血管上皮細胞、單核球和巨噬細胞、心肌和骨骼肌細胞、小腸細胞、脂肪細胞等¹⁷。

1.1.5. CD36 的功能及 CD36 缺乏的影響

CD36 在不同的細胞上具有不同的功能。在脂肪細胞、肌肉細胞、腸細胞和肝臟細胞等，CD36 可幫助長鏈脂肪酸的攝取和利用；在上皮細胞，CD36 受 thrombospondin 活化後可以抑制生長因子所引起的血管新生作用並促使細胞凋亡；在血小板，CD36 與 oxLDL 結合可促使血小板活化和凝集；在巨噬細胞和單核球，CD36 除可以促進發炎反應和吞噬作用，亦促使生物活性脂質的攝取，進而活化 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)的轉錄路徑¹⁸。若人體缺乏 CD36，則細胞代謝脂肪酸的能力會降低，因此容易產生代謝相關的疾病，如：高三酸甘油脂、高血糖、高血壓、低 High-density lipoprotein (HDL)、高 Low-density lipoprotein (LDL)和胰島素耐受性等¹⁹，2005 年時 Drover 等人發現，CD36 缺乏會減少小鼠小腸細胞對脂質的分泌並降低血液中乳糜微粒清除的速度⁴。在 CD36 缺乏對血小板的影響方面，2008 年 Ghosh 等人研究發現，CD36 缺乏的小鼠，其頸動脈受刺激後產生血栓的時間較正常小鼠長，此乃因血小板透過 CD3 與上皮細胞、單核球和血小板等所釋放出之微顆粒(Microparticle)上的 phosphatidyl serine (PS) 結合，而刺激血小板的活化，若血小板上 CD36 缺乏，則血小板受微顆粒活化的能力會降低，因而血栓形成所需時間會比較長。⁵

1.2. 血小板輸血介紹

當血管損傷而流血時，為防止體內血液的流失，體內止血機轉會立即啟動。止血機轉可簡單分成三個階段：(一)血管期：血管痙攣收縮、以減少血液流失，(二)血小板期：血小板吸附、形成暫時性栓塞，(三)凝固期：凝血作用、纖維蛋白(fibrin)之形成。在血小板期的實驗室檢查主要是 bleeding time、血小板計數和血小板凝聚功能試驗，若檢驗結果異常且臨床上出現出血傾向，就需輸注血小板²⁰。在臨床上顯著之血小板減少或機能低下所引起之嚴重出血或大出血者，例如：先天性血小板機能不良及後天化學療法引起的血小板減少症、開心手術中使用心肺機所引起血小板功能不良或巨量輸血後之血小板稀釋現象等，均適於輸用血小板製品²¹。

1.2.1. 血小板血品之種類

目前台灣地區各捐血中心所提供的血小板濃厚液有兩種來源。

- 1、多位捐血人血小板混合的傳統血小板濃厚液 (pooled random platelet concentrates, PL)：由250mL新鮮全血分離所得，1單位約含 0.3×10^{11} 血小板懸浮於30-40 mL血漿中，並含有少量的白血球及紅血球。通常由血庫實驗室發出前匯集4~6單位，以產生供應治療劑量的血小板 (therapeutic dose of platelet)²² 提供臨床使用。
- 2、單一捐血人的分離術血小板(single donor platelet)：單一捐血者利用血液成份分離機所分離之血小板，每袋平均含 3×10^{11} 個血小板，並均勻的懸浮於200~300ml的血漿中，相當於12單位傳統血小板濃厚液²³。單一捐血者的血小板濃厚液之使用，可以防止暴露於多個給血者的危險，以減低輸血病患可能產生感染及異體免疫(Alloimmunization)的機率²⁴，此外單一捐血人的分離術血小板還可以利用在分離耗材上加裝過濾器，或減白系統等方法而製備出減除白血球之分離術血小板(其白血球殘餘量低於 5×10^6 /袋)，可

以減少非溶血性發燒輸血反應發生率，並減少誘發human leukocyte antigen (HLA) 抗體及其所致之血小板輸血無療效等。已有研究指出使用的血品若於儲存前即先減除白血球，降低輸血反應的效果會比輸血前才對儲存血品進行減除白血球為佳²⁵。依據2009年全年度的統計，台北捐血中心全年共供應一般分離術血小板42,597單位，減白分離術血小板24,921單位，傳統血小板濃厚液221,668單位²⁶。

1.2.2. 分離術血小板之簡介

分離術捐血的原理是經由捐血人靜脈扎針，把血引流出來，流入裝有無菌拋棄式分離套內之血液分離機，利用離心的原理將比重不一樣的血球分層，再利用不同機型的收集原理，捐血人所捐的血小板濃厚液就會被收集入無菌的收集袋。目前台北捐血中心有兩種分離式血小板的機器，1) Heamonetics公司的MCS+ED 9000 system (簡稱MCS)，其收集過程為非連續式，原理為利用離心鉢將血液分層，再利用捐血人的血漿將血小板沖出，成品有減白和一般非減白血小板濃厚液，2) CaridianBCT公司的Trima Accel® Collection System (簡稱Trima)，其收集過程為連續式，原理為利用扁平的離心帶將血液分層，再利用血小板和紅血球在離心帶的位置不同，而將血小板分出，設計有減白室，利用二次分離技術將所收集血小板中的白血球回輸捐血人，所以其成品皆為減白血小板濃厚液。

1.2.3. 血小板輸血療效之評估

Harker 和 Slichter 等人在 1972 年所做的研究得知，當血液中血小板濃度高於 $100 \times 10^9/L$ ，其 bleeding time 可保持正常，但小於 $100 \times 10^9/L$ 時，bleeding time 會隨著血小板濃度降低而延長²⁷，可知血小板的數目可當作人體止血功能的一個指標。已知每天人體固定需要消耗 $7.1 \times 10^3/\mu L$ 的血小板，且血小板在體內的生命週期約為 10.5 天²⁸，但是輸入病人體內的血小板在很多因素影響下並不能存活這麼久，

輸血小板後必須追蹤病人血小板數目的變化及臨床止血效果，才能知其療效。一般每單位血小板濃厚液可使成人血小板數增加 5,000-10,000/ μ L。若需正確測定輸血小板的反應，可以於輸血小板後測校正增加數 (Corrected count increment, CCI)(附錄一)。輸注血小板後 1 小時的 CCI 若有兩次(含)以上不能高於 7.5/L 則稱為「血小板輸血無效」(platelet transfusion refractoriness)，其原因可分免疫因素：如異體免疫、自體抗體、HLA 及 Human platelet alloantigens (HPA)不合等，疾病因素：如感染、急性出血、脾腫大、瀰漫性血管內凝固等，藥物因素：如化學治療、抗生素 vancomycin 和抗黴菌藥 amphotericin B 等，血品因素：血小板收集及儲存品質等²⁹。



1.3. 血小板濃厚液血小板數目及血漿品質評估

1.3.1. 血小板數目

由於血小板相關血品中血小板數目對於臨床上的療效是非常重要的，因此美國血庫協會 American Association of Blood Bank (AABB) standard 5.7.5.19 的規範指出，血液成分分離機所收集分離術血小板的血袋中，必須 90% 以上的血袋中含有 3.0×10^{11} 個血小板/袋，根據這個規範捐血中心制定了一套評估血小板血品內血小板數量的作業程序，其方法為每台分離機每月至少抽樣一袋，採樣細菌檢測合格但未供出且接近 5 天末效之分離術血小板血品，每袋血小板數量需 $\geq 3 \times 10^{11}$ ，若低於此目標數目，則再採集同分離機血品樣品一袋檢測，若連續兩袋同分離機所採集之成品血小板皆低於 3×10^{11} ，則需進行原因分析及改善措施，並列入每月品質績效。

影響分離術血品中血小板數目的因素可歸納出四個：

- 1、全血計數儀 Complete Blood Counter (CBC) 的準確性：CBC 負責偵測分離術捐血人捐血前全血血小板的濃度，此測試值會影響到分離機的設定，若 CBC 高估了捐血人體內血小板的濃度，所收集的成品血小板量會低於分離機所設定的預估值，因而造成成品的血小板量不足。為了確保 CBC 的準確性，捐血中心每台 CBC 每日測試捐血人檢體前皆須用品管液測試有無在品管規則內；每月會進行一次內部的能力測試 (Proficiency test)，每半年會進行一次外部的能力測試，但若在檢體上 CBC 儀器測量之前，沒有充分均勻混合，取樣也會有誤差的狀況。
- 2、分離機的影響：若分離機的偵測血小板的感應器老化，帶動血液流動的幫浦故障，或離心轉速不夠以致血液分層不佳等，都有可能影響血小板的收集。

3、捐血人的因素：捐血中心已有評估報告指出，若捐血人的平均紅血球體積小於 80fl，就有可能干擾 MCS 分離機收集血小板，而造成成品血小板收集量會不足，以及增加紅血球衝入成品袋的機會。

4、血小板的保存狀況：根據 AABB Reference Standard 5.1.8A 的規範，血小板血品於 20-24℃ 恆溫震盪箱內持續搖盪，可保存 5 天。但若儲存或運送過程溫度發生改變，或沒有持續搖盪，血小板可能會被活化而凝集，因而減少可用的血小板數目。

1.3.2. 血漿品質

捐血中心關於血漿方面的異常而造成不適用血的檢查項目有：偏紅、脂血、色異和體積不足等(附錄二、附錄三)，其中以脂血所佔的比率較高，依據 2004 年台北捐血中心的統計，脂血約佔分離式血小板不適用血的 17%，減白分離術血小板不適用血的 12%，新鮮冷凍血漿不適用血的 81%，脂血的產生會影響檢驗結果，尤其是肝功能指標 Alanine transaminase (ALT) 會有異常偏高之現象，嚴重程度的脂血在冷藏中乳糜顆粒可能凝集，較多量之乳糜顆粒輸注病人血液中可能造成微血管之阻塞。若血品發現有脂血現象就不能使用，因此會造成捐血材料及檢驗花費。為了減少脂血的捐入，自 2005 年開始分離術的捐血人在每次捐血前都要先抽一支全血於抗凝試管，離心待血漿和血球分層後，判斷捐血人血漿有無脂血現象；而全血捐血人，若上次捐血的血品有脂血的紀錄，本次捐血前也必須先同上抽血檢查，無脂血現象才能捐血。在此措施實行後，至 2009 年的統計，脂血佔分離式血小板不適用血比率降為 2%，減白分離術血小板不適用血比率降為 1%，新鮮冷凍血漿不適用血比率降為 67%，有明顯的改善。而在這個過程中，可以發現有部分捐血人常產生脂血的現象，即使捐血前一餐特別吃清淡的食物仍無發法改善，判斷此捐血人可能對血液中的乳糜顆粒代謝比較緩慢，若能知道是何種因素造成此現象，就可以建議容易產生脂血體質的捐血人在捐血前一兩天就必須吃低油脂食物，以減少脂血的產生而浪費捐血人的寶貴時間和減少捐血作業的浪費。

1.4. 血小板止血功能的選擇

1.4.1. 血小板止血功能測試方法的選擇

2007 年時新竹捐血中心彭柏硯等人使用 PFA-100，以 Collagen-ADP (Col/ADP) 和 Collagen Epinephrine (Col/EPI) 兩種試劑，測試 189 位分離術捐血人捐血前的全血，發現 Col/ADP 異常有 3.7%，Col/EPI 異常有 7.9%，造成異常的原因可能與捐血人服用健康食品葡萄籽或中草藥有關³⁰，全血測試異常的捐血人所捐的血小板血品若再加上血液分離機及儲存時間的影響，其血小板止血功能異常的狀況可能會更加嚴重，不利輸注使用，但是現今捐血中心對於分離術成品血小板的品管，僅有血小板含量、pH 值的測量及細菌檢測三項，對於血小板止血功能則尚未有有效的品管方法。2005 年時台中捐血中心吳榕竣等人利用 Platelet aggregometry 測試血品血小板在儲存期間第一、三、五、七天凝集功能的變化，結果發現 ADP 及 Collagen 所誘發之凝集能力，儲存七天後有比較顯著的下降³¹，但曾有研究報告血小板濃厚液雖在儲存 24 小時後其凝集(aggregation)功能就會降低，可旦輸入人體後其凝集功能會迅速恢復到與剛採集時的水準相當³²，因此除了利用 Platelet aggregometry 測試血小板止血功能隨著儲存時間的變化外，應該還須選用其他平台來做對照。2008 年時，台北捐血中心陳明鴻等人利用流式細胞儀偵測血小板上 CD62P 和 Annexin V 來評估血小板存放第一天、五、七天之活化及凋亡狀況，結果發現血小板 CD62P(-)/Annexin V(+) 的表現並無明顯改變，但血小板 CD62P(+)/Annexin V(-) 及血小板 CD62P(+)/Annexin V(+) 的表現則會隨儲存時間而增加，儲存至第五、第七天分別較採集第一天高出 6% 和 10%³³，以流式細胞儀評估血小板的優點是所需檢體的體積少，但是需貴重的儀器，並且需要有經驗的人員操作³⁴，其只是間接測出血小板活化時所表現分子，並沒有真正評估血小板止血的能力。若能有一個所需血品體積量少，又能有效評估血小板血品止血功能的方法，相信對提升捐血中心所供應血品的品質是很有幫助的。

由於本研究並不直接拿血小板血品來做研究，只能取剩餘在分離術耗材中體積有限的血小板血品，因此必須選擇所需檢體量最少的測試方法，評估現在市面上測試血小板功能的技術，其中以 Thrombelastography (TEG) 所需檢體量較少³⁴。

1.4.2. Thrombelastography (TEG)的介紹

TEG 監測血凝塊的物理特性的原理是將待測血液放在一特製的圓柱狀杯內，以 $4^{\circ}45'$ 的角度旋轉，每一次轉動持續 10 秒。透過一根由螺旋絲懸掛且浸泡在血液中的探針來監測血液的運動。當纖維蛋白和血小板複合物形成後，能將杯和探針結合在一起，杯旋轉所產生的旋轉力就能傳遞至探針上。纖維蛋白和血小板複合物的強度能影響探針運動的幅度，血凝塊的強度最終能使探針的運動與杯的運動同步進行。因此，探針的運動幅度與已形成的血凝塊的強度有直接關係。當血凝塊回縮或溶解時，探針與血凝塊的聯結解除，杯的運動則不再傳遞給探針。探針的旋轉程度被機器轉換成電子信號，再經由電腦分析，就能得到圖形資訊和以下的參數³⁵(附錄四)：

- 1、R 值：R 值是待測血液開始檢測，直到第一個纖維蛋白凝塊形成的這段時間，主要反應凝血因子的功能。
- 2、K 值或 Angle 值(α 值)：纖維蛋白塊形成及相互聯結的反應速率，主要反應纖維蛋白原的活性和血小板功能。
- 3、MA 值：纖維蛋白與血小板相互聯結形成纖維蛋白凝塊的最終強度，反應血小板功能及聚集的能力。

1991 年時 Tuman 等人比較 TEG 和 platelet aggregometry，發現 TEG 所測出的 Angle 值和 MA 值與 platelet aggregometry 加入 ADP 及 Collagen 刺激所測出來的結果有顯著的正相關³⁶。1993 年時 Essell 等人以心肺繞道手術後病人的全血檢體，比較 TEG 與 bleeding time 及標準凝血測試結果的差異，發現以 TEG 來評估病人止血異常的敏感性和 bleeding time 的結果一樣，特異性則比 bleeding time、PT、aPTT 等結果高，若再比較手術後止血功能正常和異常的兩組病人 TEG 所測出 Angle 值和 MA 值，結果有顯著的差異³⁷。綜合以上兩篇研究，Angle 值和 MA 值可以當作血小板止血功能的指標。

1.5. CD36 缺乏對血小板血品品質可能造成的影響

1.5.1. 血小板數目

2009 年 Valery 等人研究指出血小板血品儲存的時間越久，血小板產生凋亡的狀況和所釋放出的微顆粒的量會越多³⁸，已知 CD36 接受 thrombospondin 等物質的刺激可促使細胞產生凋亡³⁹，而且 CD36 也可以和微顆粒結合而促使血小板活化⁴⁰，所以血小板上若缺乏 CD36 和血小板儲存時活化與數目減少的程度是否較低，值得探究。

1.5.2. 血小板止血功能

CD36 是血小板的主要糖蛋白之一，已知可以和 collagen 結合⁴¹，但是其在血小板的止血功能上所扮演的角色還不是很明瞭。1992 年 Yamamoto 等人找了 7 位血小板上 CD36 缺乏的血小板來做凝集的試驗，結果不論是用 collagen、ADP、epinephrine、arachidonic acid 和 thrombin 刺激的結果都和血小板上有 CD36 的人一樣是正常的，所以推測 CD36 缺乏不會影響血小板凝集的能力⁴²，但是如果經過血液分離機及儲存時間的影響，CD36 缺乏的血小板血品止血功能是否會和正常的血小板血品一樣，需要進一步探討。

1.5.3. 血漿方面

CD36 缺乏的捐血人若曾經輸注 CD36⁺血品或懷孕，其血漿就有機會產生 anti-CD36 的抗體，所捐出的血小板血品給病人使用時就可能產生血小板輸注無效，輸血後紫斑，嚴重甚至可能造成輸血後肺損傷⁴³⁻⁴⁵。若為 CD36 缺乏的病人則須輸注 CD36 缺乏的血小板才不易產生耐受性，因此建立 CD36 缺乏捐血人的資料庫是重要的。已有許多研究指出 CD36 與脂質的代謝很有關係^{4, 13, 46-48}，CD36 缺

乏可能會增加脂血產生的可能性，CD36 缺乏或表現減少之捐血人產生脂血的機會是否較 CD36 表現正常的人為高，這也是本研究所要探討的。



1.6. 研究目的與實驗設計

本研究目的以血小板分離術捐血人為研究樣本

- 1、調查 CD36 在國人血小板及單核球上缺乏的情形，以了解第一型和第二型 CD36 缺乏在國人發生的比率，建立血小板 CD36 缺乏之捐血人資料庫。
- 2、分析與 CD36 缺乏之相關的基因變異。
- 3、探究 CD36 的缺乏或減少對血小板血品中的血小板數目和功能及血漿品質可能會造成的影響。

首先進行 CD36 基因表現型與基因型關係的實驗，以流式細胞儀的方法偵測捐血人血小板上 CD36 表現的平均螢光強度，依所測得捐血人平均螢光強度分布的情形定出 CD36 表現減少的範圍，並偵測單核球上 CD36 的表現，以區分出第一型和第二型 CD36 的缺乏。根據 Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) 基因資料庫所提供之 CD36 基因序列設計適當引子，將 CD36 缺乏或 CD36 減少的捐血人 CD36 基因 12 個外顯子(exon)序列及其周邊部分內含子(intron)序列片段放大，進行基因定序以觀察是否有序列變異，發現可能會影響 CD36 表現的變異後，再設計適當的序列特异性寡核苷酸探針，分析這些基因變異在所有捐血人中的發生率以及與血小板及單核球上 CD36 表現的關係。

在 CD36 的表現的缺乏和減少對血小板血品品質影響方面，分為血小板計數、血小板止血功能和脂血漿發生率等三部分來探討。CD36 缺乏之血小板血品在儲存前後，血小板計數及血小板止血功能的變化是否與 CD36 正常者有差異，並藉由統計分離術捐血人捐血前常規脂血檢查的紀錄，以比較 CD36 表現的不同與捐血人血漿產生脂血狀況的關聯性。

第二章 材料與方法

2.1. 試劑與器材清單

詳見附錄五

2.2. 實驗材料

本計畫執行收檢遵循台灣血液基金會醫學倫理規範，已申請研究計畫審查同意書在案(IRB 編號：PM-98-TP-01)，所有受試者均經告知同意提供血液樣本，並紀錄所有個案於收集期間之捐血紀錄及各項體檢數據。

1、研究個案：收集民國九十八年初至年九十九年初，南海捐血室 640 位健康的分離術血小板捐血人。

2、受測樣本採集：捐血人於捐血前接受常規全血計數檢查所剩餘的 3ml K2 EDTA 全血，取血液內血小板懸浮血漿及少量全血，利用流式細胞儀技術分析血小板及單核球上 CD36 表現。剩餘血液用於備製 DNA 樣本，供 CD36 基因變異分析。接受血小板功能測試個案，於分離術進行中，利用分離式耗材的取樣袋，收集特定捐血人 3ml 的全血於含 3.2% sodium citrate 試管中，於兩小時內進行新鮮全血血小板功能實驗。進行分離式捐血人之血小板濃厚液(PC)檢體之血小板功能測試，採樣機型為 Heamonetics MCS+ED，保存袋 995E，抗凝劑 ACD-A。捐血人捐血後，將銜接成品袋和耗材之間管路殘留的血小板濃厚液轉流入緩衝血袋中，利用封口機將緩衝血袋前約十公分的管路融封，並將緩衝血袋取下，先放於 22°C 恆溫箱中靜置一小時，之後再置於恆溫箱中的搖盪器，以每分鐘 70 下搖盪的頻率保存血小板濃厚液，供不同儲存時間下血小板功能測試。

2.3. 以流式細胞儀(Flow cytometry)分析血小板 CD36 表現

2.3.1. 血小板懸浮血漿(platelet-suspension plasma, PSP)的製備

收集分離術捐血人全血計數檢驗所剩下的 3ml K2 EDTA 全血於室溫保存，以 2,100rpm(700g)的轉速離心 9 分鐘，所得上層液即為血小板懸浮血漿(PSP)。收集 30 位捐血人的 PSP，以 Nihon Kohden 6318J 全血計數儀測試其所含血小板的濃度，和全血血小板濃度比較。

2.3.2. 血小板上 CD36 的表現

隨機找一捐血人以全血計數儀測試其 PSP 所含血小板的濃度，以 PBS 調整成 $9 \times 10^5/10\mu\text{l}$ 至 $4.8 \times 10^6/10\mu\text{l}$ 等不同濃度梯度的 PSP，分別加入 1 μL 的 FITC Mouse Anti-Human CD36 及 PE- Mouse Anti-Human CD42b(血小板特異性抗體)，避光於 37°C incubator 反應 15 分鐘，以 PBS 將體積調整成 500 μL 後上流式細胞儀(Beckman Coulter EpicsXL)分析。以 EXPO32 ADC 操控分析軟體圈選欲分析之細胞落群 (CD36-FITC/CD42b-PE)，再以 IgM-FITC/IgG1-PE 設定陰性螢光強度位置，最後分析血小板表面 CD36 之平均螢光強度(分析 5,000 個血小板) 【實驗步驟 1】。擷取資料與 PSP 中血小板數量繪圖，以確定螢光抗體之最佳用量。確定 PSP 使用螢光抗體的最佳體積之後，則以固定實驗設定條件開始分析所收案 640 位捐血人其血小板上 CD36 表現。

2.3.3. 單核球上 CD36 的表現

依抗體製造商建議分析法，50 μL 的全血加入 5 μL 的 FITC Mouse Anti-Human CD36 及 4 μL PE-Mouse Anti-Human CD14(單核球特異性抗體)，於室溫反應 15 分

鐘後，再加入 450 μ L 含有 1X BD Pharm Lyse™ lysing solution 的 PBS，避光於室溫每分鐘 80 下搖盪 15 分鐘，將紅血球溶解後上流式細胞儀(BD FACSCalibur)分析。以 CellQuest 軟體圈選欲分析之細胞落群 (CD36-FITC/CD14-PE)，以 IgM-FITC/IgG1-PE 設定陰性螢光強度位置，最後分析單核球表面 CD36 之平均螢光強度(分析 2,000 個單核球) 【實驗步驟 2】。

2.4. CD36 基因變異分析

2.4.1. 抽取 DNA

抗凝全血加入 RBC lysis buffer 清洗兩次後，加入適量 Mixed Proteinase K buffer，37°C 以每分鐘 80 下的頻率搖盪 16-18 小時，以鹽析/異丙酮沉澱出 DNA，經過沖洗及離心留下 DNA 沉澱物，以適量無菌水回溶 DNA 後【實驗步驟 3】，進行初步定性及定量，包括進行洋菜膠電泳並以分光光度計測量 OD 值【實驗步驟 4】來推算 DNA 濃度，最後取適量 DNA 將其稀釋成 100ng/ μ L，以備後續 PCR 實驗之用。

2.4.2. 聚合酶連鎖反應(PCR)之引子設計及反應條件設定

自 NCBI (National Center for Biotechnology Information)下載 *CD36* 基因全部的序列(NCBI Reference Sequence:NM_000072)，針對其含有 *CD36* 轉譯序列(coding sequence)的 exon 3 至 exon14 設計十二組引子，引子的序列參照附錄。每個引子合成完後，首先依據廠商所給的 T_m 值，設定 3 個 T_m 的反應梯度，並以 genomic DNA 為模板，於聚合酶連鎖反應機器(PCR machines, peqSTAR 96 Universal Gradient)進行反應，反應完成後產物進行洋菜膠電泳，依據膠圖上的訊號，選擇最佳 T_m 值。純化 PCR 產物【實驗步驟 5】委託台大醫院第二共研進行定序分析，以確認所增

幅之序列是否為該區域之序列。

2.4.3. CD36 缺乏之捐血人基因變異前趨調查

選取 4 位第一型 CD36 缺乏，6 位第二型 CD36 缺乏及 5 位 CD36 減少的捐血人之 genomic DNA，利用所設計的引子以聚合酶連鎖反應將 CD36 基因 exon 3 至 exon14 的序列增幅【實驗步驟 6】，純化 PCR 產物後送台大醫院第二共研進行定序分析，比對所得序列與 Ensembl 所下載之 CD36 基因參考序列之差異。針對全部個案進行基因檢測，將結果以統計的方法分析，以了解所發現的變異是否和 CD36 的缺乏有相關。

2.4.4. 1200(-5) 49bp inv 篩檢

除了增幅 Exon 13 和部分周邊 Intron 序列片段的正向引子和反向引子外，在 Intron 12 和 Exon 13 交界附近發生 49 個鹼基對倒置的位置序列上再設計第三條引子，則可依其 PCR 產物的洋菜膠電泳結果判斷倒置的發生【實驗步驟 7】。

2.4.5. 序列特異性寡核苷酸探針(Sequence-specific oligonucleotide probe, SSOP)

本研究選擇三個在 CD36 基因轉譯序列(coding sequence)發現的變異來進行此實驗，分別為在 exon5 發現的 329AC del，在 exon12 發現的 1163A>T，在 exon13 發現的 1228-1239 del，及 exon13 週邊 intron 發現的 1200(-13) A>G 和 1254(+6) TATTTG del。由於除了 1228-1239 del 外，其他兩個變異只有找到異形合子(heterozygote)，所以先利用 TA cloning 的方法【實驗步驟 8】產生只帶有變異的質體 DNA，純化並稀釋成適合濃度的質體 DNA【實驗步驟 9】來當後續基因檢測中陽性控制組(positive control)。特定基因片段經 PCR 方法擴增後，將 PCR 產物固定到 Nylon 膜上，再設計適合的序列特異性寡核苷酸探針(SSOP)，並在探針上接上 biotin，由於探針與 PCR 產物在特定條件下結合具有高度的特異性，所以可再加入

streptavidin-POD conjugate 和探針上的 biotin 結合，利用 ECL 呈色可以分析此序列特異性探針和哪些 PCR 產物是否有結合，進而鑑定其基因型【實驗步驟 10】。

2.5. Thrombelastography(TEG)5000 series analyzer 測試

2.5.1. 捐血人飲食用藥問卷調查

選定血小板上 CD36 表現不同的特定捐血人，並在血小板功能測試前請他們先填寫一份有關最近飲食用藥的問卷(附錄七)，如果捐血人沒有食用可能會對血小板功能有影響的食物或藥物，則可進行血小板功能測試。

2.5.2. 全血測試

利用分離式耗材的取樣袋收集 3ml 的全血於 Coagulation sodium citrate 3.2%, 7.4pH(1:9 dilution)試管中，於兩小時內進行 TEG 實驗【實驗步驟 11】。

2.5.3. 缺乏血小板血漿(platelet-poor plasma, PPP)的製備

利用分離式耗材的取樣袋，收集於同一日 30 位分離式捐血人 3ml Coagulation sodium citrate 3.2%, 7.4pH(1:9 dilution)全血，以 3,000rpm(1500g)離心 10 分鐘，所得上層液即為缺乏血小板血漿(PPP)，將 30 位捐血人的 PPP 用小吸管取出，混合到 50ml 的離心管中，即得混合的缺乏血小板血漿，各取 1mL 分裝到微量試管中，於-20℃冰箱保存。

2.5.4. 血小板濃厚液(PC)測試

分離式捐血收完成品當日為第一天，測定儲存第一、五、七、九天的血小板數目和功能【實驗步驟 12】。

2.6. 乳糜血紀錄調查

2.6.1. 脂血判斷標準

捐血人分離術捐血前全血計數所剩的全血，以 3000rpm 的轉速離心 1 分鐘，將血漿和紅血球分層，再依據台灣血液基金會標準作業程序 SP-B2-060 中的血漿瑕疵判定標準(附錄四)判斷捐血人血漿脂血狀況【實驗步驟 13】。

2.6.2. 分離式捐血人脂血資料整理

調查自 2005 年初台北捐血中心開始實施分離式捐血前乳糜血檢查後至今，所收案的 640 位捐血人的捐血紀錄，如果曾有一次因為脂血而不能捐血的紀錄，則登記有脂血紀錄，如果沒有的話則登記無脂血紀錄，比較並分析血小板 CD36 表現的差異與脂血紀錄的關係。

2.7. 統計分析方法及軟體

以 GraphPad Prism 5.0 製作血小板上 CD36 表現平均螢光強度的點狀分布圖，並定義 CD36 表現缺乏，減少及正常的範圍，並分析基因變異與血小板 CD36 表現結果，另外配合 TEG 血小板功能及脂血紀錄結果，以卡方檢定進行統計分析(雙尾)，當 p 值小於 0.05 則認為有統計上的顯著差異。若有樣本數 n 值小於 5 以下，則使用費雪精確檢定(Fisher's exact test)，勝算比 (odds ratio)及 95 %信賴區間皆以統計分析軟體 GraphPad Prism 5.0 進行分析。

第三章 實驗結果

3.1. 分離式捐血人基本資料分析

本研究共收集 640 名來自台北捐血中心南海捐血室分離式血小板捐血人的檢體。男性為 547 人(85.5%)，女性為 93 人(14.5%)；年齡中位數為 46 歲(範圍 19~69 歲)，全血血小板計數中位數為 $251 \times 10^9/L$ (範圍 $161 \sim 475 \times 10^9/L$)，ABO 血型比率為 A：28.1%，B：25.3%，O：40.3%，AB：6.3%，和全台灣地區一般人口 ABO 血型分布的比率相近⁴⁹ (表一)。

3.2. 流式細胞儀分析 CD36 在血小板上的表現

3.2.1. 血小板懸浮血漿中血小板計數之評估

隨機找 30 位捐血人，以 3ml EDTA 試管抽取其全血，並以 Nihon Kohden 6318J 全血計數儀測試其全血血小板計數並和所製備之血小板懸浮血漿之小板計數比較 (圖一)。以線性回歸分析，其 $R^2=0.1051$ 所以線性關係不大，分析結果可知所製備的血小板懸浮血漿其血小板計數範圍為 $1.2 \times 10^4 \sim 1.28 \times 10^5$ per μL ，10 μL 血小板懸浮血漿血小板數目範圍為 $1.2 \times 10^5 \sim 1.28 \times 10^6$ 。

3.2.2. 血小板懸浮血漿與 FITC Mouse Anti-Human CD36 適當體積之分析

由於螢光抗體單位成本較高，所以固定螢光抗體每次所加的量為 1 μL ，與不

同數量的血小板反應，並比較流式細胞儀所測出的平均螢光強度(MFI)(圖二)，由此結果可知只要血小板數量小於 1.8×10^6 ，1 μ L 的螢光抗體是過量的，而已測試出 10 μ L 血小板懸浮血漿血小板數目最高為 1.28×10^6 ，因此訂定流式細胞儀試驗所需之血小板懸浮血漿體積為 10 μ L，FITC Mouse Anti-Human CD36 為 1 μ L。

3.2.3. 血小板上 CD36 平均螢光強度的分布

以 Beckman Coulter EpicsXL 流式細胞儀偵測 640 位捐血人血小板上 CD36 表現的點狀分布與平均螢光強度(圖三)，表二血小板與單核球 CD36 表現統計結果。定義平均螢光強度(MFI)小於 1 為 CD36 缺乏，共 10 人(1.6%)，MFI 平均值(\pm 標準偏差)：0.5(\pm 0.12)，範圍：0.4~0.7；圖四為所有捐血人測得之血小板上 CD36-MFI 的分布，由於沒有明顯的分群，所以定義低於一般分佈的 25% ($MFI \leq 9.2$) 為 CD36 低下，共 160 人(25%)，MFI 平均值(\pm 標準偏差)：6.2(\pm 1.9)，範圍：1.3~9.2；定義 MFI 大於 9.2 為 CD36 正常，共 470 人(73.4%)，MFI 平均值(\pm 標準偏差)：17.1(\pm 5.5)，範圍：9.2~43.8。血小板 CD36 缺乏之捐血人再以 BD FACSCalibur 流式細胞儀偵測其單核球上 CD36 的表現，若平均螢光強度小於 15 則為單核球上 CD36 缺乏，也就是第一型 CD36 缺乏，共 4 人(0.6%)，MFI 平均值(\pm 標準偏差)：9.7(\pm 0.4)，範圍：9.7~10，其餘 6 人(1%)單核球上 CD36 MFI 大於 15，為第二型 CD36 缺乏，MFI 平均值(\pm 標準偏差)：35(\pm 3.7)，範圍：30~41。

3.3. 血小板上 CD36 表現缺乏或低下的捐血人之基因變異分析

比對 4 位第一型 CD36 缺乏，6 位第二型 CD36 缺乏及 5 位 CD36 低下的捐血人，CD36 基因 exon 3 至 exon14 的轉譯序列及其周邊部分內含子(intron)序列與 Ensembl 基因資料庫(<http://www.ensembl.org/>)所下載之 CD36 基因參考序列之差異，分析所發現的變異和捐血人的基本資料(圖五)(表三)，篩檢所得的基因變異中

329AC del 和 1228-1239 del 是在日本已發現的變異¹¹，1163 A>T、1200(-5)49bp inv、1200(-13) A>G 和 1254(+6) TATTTG del 是在國人中所發現的新變異。在第一型 CD36 缺乏的 4 個人中，編號 4 為變異 1228-1239 del 的同型合子，編號 3 為 329AC del 和 1163 A>T 的混合異型合子，但有兩個人只發現一種變異，分別為編號 2 的 1200(-13) A>G 和編號 1 的 1163 A>T；在第二型 CD36 缺乏的 6 個人中，有編號 6 和編號 8 沒有找到任何變異；在 PLT CD36 低下的 5 個人中，只有編號 12 沒有找到任何變異，其餘 4 人各找到一種基因變異。此 15 位捐血人皆為男性，除了有兩第二型 CD36 缺乏的捐血人未知其族群外，其餘皆為閩南人。

3.4. 各種 CD36 基因變異與血小板 CD36 表現缺乏的關聯性

利用不同基因變異檢測技術，針對所有捐血人之各 CD36 基因變異點做分析，比較 170 位血小板 CD36 缺乏/低下和 470 位血小板 CD36 表現正常捐血人之間的差異，以確定各種基因變異型與國人血小板上 CD36 表現缺乏/低下之相關性。

3.4.1. 1200(-5) 49bp inv

設計 Primer 1 和 Primer 2 可以把 Exon 13 和部分周邊 Intron 的序列片段給夾出來，如果在 Intron 12 和 Exon 13 交界附近發生 49 個鹼基對倒置的位置序列上再設計一條 Primer 3，則可用來偵測倒置的發生(圖六之 A)。利用這三條 Primer 偵測 1200(-5) 49bp inv，正常的基因型只會產生 530bps 和 216bps 這兩條 band，若是帶有 1200(-5) 49bp inv 的基因型，則會產生長度 375bps 的 band(圖六之 B)。以此方法偵測 640 位捐血人，結果發現共有 4 位捐血人帶有 1200(-5) 49bp inv，皆為 WT/INV 異型合子，對偶基因頻率為 0.31%，其中 1 人為第二型 CD36 缺乏，3 人為 CD36 減少；若以血小板 CD36 的表現來區分，1200(-5) 49bp inv 在血小板 CD36 缺乏/低下這 170 人的對偶基因頻率為 1.2%，在血小板 CD36 正常的 470 人其對偶基因頻率為 0% (表四)，此變異與國人血小板上 CD36 表現缺乏/低下有顯著的關聯

性(以 Fisher's exact test 進行校正， $p=0.0048$)。

3.4.2. 329AC del

以 PCR/SSOPH 的方法偵測捐血人 CD36 基因中 329ACdel 的變異(圖七)，結果發現 640 位捐血人中，22 人帶有 329AC del，皆為 WT/DEL 異型合子，對偶基因頻率為 1.72%，其中 1 人為第一型 CD36 缺乏，1 人為第二型 CD36 缺乏，15 人為血小板 CD36 表現低下，5 人為血小板 CD36 表現正常；若以血小板 CD36 的表現來區分，329AC del 在血小板 CD36 缺乏/低下這 170 人的對偶基因頻率為 5%，在血小板 CD36 正常的 470 人其對偶基因頻率為 0.5% (表五)，此變異與國人血小板上 CD36 表現缺乏/低下有顯著的關聯性($p<0.0001$)。

3.4.3. 1163 A>T

以 PCR/SSOPH 的方法偵測捐血人 CD36 基因中 1163 A>T 的變異(圖八)，結果發現 640 位捐血人中，有 5 人帶有 1163T allele，且皆為 A/T 異型合子，對偶基因頻率為 0.39%，2 人為第一型 CD36 缺乏，3 人為血小板 CD36 表現低下。若以血小板 CD36 的表現來區分，1163T 在血小板 CD36 減少和缺乏這 170 人的對偶基因頻率為 1.5%，在血小板 CD36 正常的 470 人其對偶基因頻率為 0% (表六)，此變異與血小板上 CD36 表現缺乏或減少有顯著的關聯性(以 Fisher's exact test 進行校正， $p=0.0013$)。

3.4.4. 1228-1239 del

以 PCR/SSOPH 的方法偵測捐血人 CD36 基因中 1228-1239 del 的變異，結果發現 640 位捐血人中，有 18 人帶有此變異，1 人為同型合子，17 人為 WT/DEL 異型合子，對偶基因頻率為 1.48%。帶有 DEL/DEL 同型合子者 1 人為第一型 CD36 缺乏，帶有 WT/DEL 異型合子者 17 人，2 人為第二型 CD36 缺乏，9 人為血小板

CD36 表現低下，6 人為血小板 CD36 表現正常；若以血小板 CD36 的表現來區分，1228-1239 del 在血小板 CD36 缺乏/低下這 170 人的對偶基因頻率為 3.8%，在血小板 CD36 正常的 470 人其對偶基因頻率為 0.6% (表七)，此變異與國人血小板上 CD36 表現缺乏/低下有顯著的關聯性($p=0.0003$)。

3.4.5. 1200(-13) A>G

以 PCR/SSOPH 的方法偵測捐血人 CD36 基因中 1200(-13) A>G 的變異，結果發現 640 位捐血人中，有 10 人帶有 1200(-13) G 對偶基因，皆為 A/G 異型合子，對偶基因頻率為 0.78%，帶有 G 對偶基因的 10 人中，1 人為第一型 CD36 缺乏，4 人為血小板 CD36 表現低下，5 人為血小板 CD36 表現正常；若以血小板 CD36 的表現來區分，1200(-13) G 在血小板 CD36 缺乏/低下這 170 人的對偶基因頻率為 1.5%，在血小板 CD36 正常的 470 人其對偶基因頻率為 0.53% (表八)，但此變異與國人血小板上 CD36 表現缺乏或減少無顯著的關聯性($p\leq 0.183$)。此外，1200(-13) A>G 雖然位於 1200(-5) 49bp inv 的序列範圍內，但本研究並沒有發現有捐血人同時帶有這兩種變異。

3.4.6. 1254(+6) TATTTG del

以 PCR/SSOPH 的方法偵測捐血人 CD36 基因中 1254(+6) TATTTG del 的變異，結果發現 640 位捐血人中，只有 1 人帶有此變異，為 WT/DEL 異型合子，對偶基因頻率為 0.08%，此人為血小板 CD36 表現低下，若以血小板 CD36 的表現來區分，1254(+6) TATTTG del 在血小板 CD36 減少和缺乏這 170 人的對偶基因頻率為 0.29%，在血小板 CD36 正常的 470 人其對偶基因頻率為 0% (表九)，由於人數太少，所以此變異與血小板上 CD36 表現缺乏或低下的關聯性無法分析。

3.5. 流式細胞儀分析特定 CD36 基因型捐血人 CD36 在單核球上的表現

640 位捐血人中共有 59 位發現有 CD36 基因變異，在不考慮血小板 CD36 表現的狀況下選擇其中 27 位捐血人，測試其單核球上 CD36 的表現，並與隨機挑選沒有發現 CD36 基因變異的 27 位捐血人(11 位血小板 CD36 表現正常，15 位血小板 CD36 表現低下)單核球上 CD36 表現 MFI 做比較(圖九)，血小板 CD36 表現正常且未發現基因變異的 11 位捐血人其單核球 CD36 MFI 平均為 68，範圍 55~79；第一型 CD36 缺乏的 4 位捐血人其單核球 CD36 MFI 平均為 9.7，範圍 9~10；CD36 基因有發現變異的捐血人共有 27 位，8 人為血小板 CD36 表現正常，15 人為血小板 CD36 表現低下，4 人為第二型 CD36 缺乏，其單核球 CD36 MFI 總平均為 32，範圍 23~44，與血小板 CD36 表現正常且未發現基因變異的 11 位捐血人比較有顯著的差異($p < 0.0001$)，若以基因型來區分，329AC del 的 9 個人單核球 CD36 MFI 平均為 32，範圍 23~41，1163 T 的 3 個人單核球 CD36 MFI 平均為 31，範圍 23~35；1200(-5) 49bp inv 的 4 個人單核球 CD36 MFI 平均為 34，範圍 27~44；1200(-13) G 的 4 個人單核球 CD36 MFI 平均為 31，範圍 23~36；1228-1239 del 的 6 個人單核球 CD36 MFI 平均為 30，範圍 23~38；1254(+6) TATTTG del 只有 1 人，其單核球 CD36 MFI 為 32；在隨機選擇的血小板 CD36 表現低下但沒有發現基因變異的 15 位捐血人中，依其單核球上 CD36 表現的 MFI 可將其分為兩群，第一群為 CD36 MFI 平均為 65，範圍 55~76，共有 10 人且分布和 Normal 的分布無顯著差異($p = 0.49$)；第二群為 CD36 MFI 平均為 32，範圍 25~40，共有 5 人且其分布第一群人有顯著的差異($p < 0.0001$)而和有發現 CD36 基因變異的捐血人單核球分布無顯著差異($p = 0.81$)，且這兩群捐血人其血小板上 CD36 表現的 MFI 並無顯著差異($p = 0.43$)，推測可能其 CD36 基因在本研究中未檢測的部分含有尚未發現的基因變異。綜合以上結果可知，本研究所發現 CD36 基因變異異型合子的捐血人，其單核球上 CD36 表現的 MFI 約只有沒有基因變異捐血人的一半。

3.6. 血小板上 CD36 表現不同之捐血人全血血小板功能之分析

選擇 8 位血小板缺乏 CD36 之捐血人(第一型和第二型各為 4 位),16 位血小板 CD36 表現低下之捐血人還有 9 位血小板 CD36 表現正常之捐血人進行此試驗。

3.6.1. TEG R 值

在針對受試者全血 TEG 所測試出的 R 值,血小板 CD36 缺乏組之中位數為 16.3 分鐘(25%-75%範圍:12.7-23.1 分鐘);血小板 CD36 低下組之中位數為 16.3 分鐘(25%-75%範圍:11.4-16.4 分鐘);血小板 CD36 正常組之中位數為 10.7 分鐘(25%-75%範圍:7.8-13.2 分鐘),所有測試的檢體 R 值都在參考正常範圍 (9-27 分鐘)⁵⁰ 內,利用非成對 t 檢定可觀察到相較於血小板 CD36 正常組的全血,血小板 CD36 缺乏組的全血有較長的 R 值 ($p=0.031$)(圖十之 A)。

3.6.2. TEG Angle 值

全血 TEG 所測試出的 Angle 值,血小板 CD36 缺乏組之中位數為 41.7°(25%-75%範圍:30.6°-46.4°);血小板 CD36 低下組之中位數為 46.2°(25%-75%範圍:38.7°-50.1°);血小板 CD36 正常組之中位數為 50.9°(25%-75%範圍:45.8°-55.1°),所有測試的檢體 Angle 值都在參考正常範圍 (22°-58°)⁵⁰ 內,利用非成對 t 檢定可觀察到相較於血小板 CD36 正常組之全血,血小板 CD36 缺乏組之全血有較低的 Angle 值 ($p=0.039$)(圖十之 B)。

3.6.3. TEG MA 值

全血 TEG 所測試出的 MA 值,血小板 CD36 缺乏組之中位數為 53.5mm(25%-75%範圍:50.3-54.7mm);血小板 CD36 低下組之中位數為 55.3mm(25%-75%範圍:53.7-56.8mm);血小板 CD36 正常組之全血中位數為

54.7mm(25%-75%範圍：54.3-58.1mm)，所有測試的檢體 MA 值除了一位捐血人為 43.2 外，其餘都在參考正常範圍 (44-64mm)⁵⁰ 內，利用非成對 t 檢定可觀察到相較於血小板 CD36 正常之全血，血小板 CD36 缺乏之全血其 MA 值並無顯著之差異 ($p=0.620$)(圖十之 C)。綜合以上結果可知 CD36 缺乏的全血最後產生的止血作用 (MA 值)和正常的血小板是一樣的，但是所需的時間會比較長(R 值增加和 Angle 值降低)。

3.7. 血小板上 CD36 表現不同之血品在儲存期間血小板計數及功能之分析

選擇 8 位血小板缺乏 CD36 (第一型和第二型各為 4 位)，9 位血小板 CD36 表現低下還有 9 位血小板 CD36 表現正常之捐血人，採集其分離術血小板捐血結束後殘留在分離術耗材管路中的血小板成品進行此試驗。

3.7.1. 血小板計數

以自動化血球分析儀(廠牌：Nihon Kohden，型號：MEK-6318J)檢測血小板 CD36 正常與血小板 CD36 缺乏的血小板濃厚液血品，在儲存 9 天期間血品中血小板數目變化，以了解血小板濃厚液品質是否因 CD36 缺乏而有差異。血小板 CD36 表現正常和低下的血品在儲存的第 7 天血小板的數目開始有顯著的降低($p<0.05$)，儲存的第 9 天降低更顯著 ($p<0.01$)；血小板 CD36 缺乏之血品在儲存的 9 天內，血小板計數皆無顯著的降低(圖十一)。

3.7.2. TEG R 值

在 R 值方面，可發現血小板 CD36 正常的血品，儲存第 5 天、第 7 天 R 值有顯著的下降($p<0.05$)；血小板 CD36 低下的血品，至儲存第 7 天 R 值才有顯著的下降($p<0.05$)；血小板 CD36 缺乏的血品儲存第 9 天內 R 值皆無顯著的差異；比較這 3 組血品在相同儲存時間下，發現儲存第 5 天時血小板 CD36 缺乏的血品與血小板

CD36 正常的血品比較，R 值有顯著的增加($p<0.05$) (圖十二之 A)。

3.7.3. TEG Angle 值

在 Angle 值方面，可發現血小板 CD36 正常的血品在儲存第 9 天時 Angle 值有顯著的下降($p<0.05$)；血小板 CD36 低下和血小板 CD36 缺乏的血品儲存第 9 天內 Angle 值皆無顯著的差異；比較這 3 組血品在相同儲存時間下，發現在第 5 天時血小板 CD36 缺乏的血品與血小板 CD36 正常的血品比較，Angle 值有顯著的降低($p<0.05$) (圖十二之 B)。

3.7.4. TEG MA 值

在 MA 方面，可發現血小板 CD36 正常的血品，儲存第 7 天有顯著的上升；血小板 CD36 低下的血品，儲存第 5 和 7 天有顯著的上升($p<0.05$)；血小板 CD36 缺乏的血品儲存第 7 天有顯著的上升($p<0.05$)，比較這 3 組人在相同儲存時間下，發現在測試的 4 個時間點 MA 值皆無顯著的差異 (圖十二之 C)。綜合以上結果可知，CD36 缺乏的血小板濃厚液血品在第五天末效時，和 CD36 正常血品比起來雖然 TEG 檢驗各項參數與 CD36 正常血小板有差異，但均在正常範圍內，其中血小板止血的品質應是可接受的。

3.8. 血小板上 CD36 表現不同之捐血人脂血產生機會之分析

調查自 2005 年分離術捐血人的捐血紀錄，結果發現在血小板 CD36 表現缺乏和減少的 170 位捐血人中，有 79 人(46.5%)曾有因脂血而不能捐血的紀錄；而血小板 CD36 表現正常的 470 位捐血人中，有 117 人(24.9%)曾因脂血而不能捐血的紀錄，利用 Chi-square 檢定分析可觀察到相較於血小板 CD36 正常之捐血人，血小板 CD36 缺乏/低下之捐血人有較高產生脂血紀錄的機會 ($p\leq 0.001$)(表十)，其勝算比(odds ratio)為 2.6(95% C.I. of odds ratio:1.8-3.8)。

第四章 討論

本研究首先分析 640 位捐血人血小板 CD36 的表現，結果發現有 10 位捐血人 (1.6%) 其血小板偵測不到 CD36 的表現 (表二)，此結果和 1992 年時長庚醫院曹國倩等人調查之結果 (1.6%) 接近¹，再偵測單核球上 CD36 的表現以區分第一型和第二型 CD36 缺乏，結果發現第一型 CD36 缺乏的捐血人有 4 位 (0.6%)，和日本所測出的結果 (0.6%~1%) 接近；第二型 CD36 缺乏的捐血人有 6 位 (1%)，則少於日本的結果 (4%)³。利用點狀圖 (圖四) 分析 CD36 在不同捐血人血小板之表現的情形，由於無法從點狀圖區分出明顯的分群，所以定義低於分布 25% 的人，也就是 MFI 小於 9.2 的人為 CD36 表現低下。

圖五與表三為比對 4 位第一型 CD36 缺乏，6 位第二型 CD36 缺乏及 5 位 CD36 低下的捐血人，前驅試驗其 CD36 基因的轉譯序列及其周邊部分內含子 (intron) 序列與 Ensembl 基因資料庫所下載之 CD36 基因參考序列之比對結果，其中 329AC del 和 1228-1239 del 是在日本已發現的變異¹¹，1163 A>T、1200(-5) inv 49bp、1200(-13) A>G 和 1254(+6)del TATTTG 是在國人所發現的新變異，以往並未有文獻報導。268 C>T 為日本人 CD36 缺乏的人中對偶基因發生率最高的變異^{10, 13}，且已有研究指出此變異可以造成 CD36 基因轉譯蛋白的過程中產生異常，而造成 CD36 蛋白無法表現⁵¹；975 T>G 為非洲裔人種 CD36 缺乏的人中對偶基因發生率最高的變異，且已有研究指出此變異會在第 325 個胺基酸產生終止密碼子 (stop codon)，而使 CD36 蛋白無法表現⁴⁷；但在本研究中卻沒有任何第一型及第二型 CD36 缺乏的人帶有 268C> T 和 975 T>G 這兩種變異。此外，日本的研究發現只要是第一型 CD36 缺乏的人在其 CD36 基因的轉譯序列都能找到相關的基因變異¹¹，但是在本研究所發現的 4 位第一型 CD36 缺乏的捐血人中，卻有一個人在其 CD36 基因的轉譯序列皆無找到任何變異，而只有在 Intron12-13 和 Exon13 交界附近找到

1200-13A/G 的變異，推測應該還有其它未檢出的 CD36 基因變異可以造成第一型 CD36 缺乏。本研究在第二型 CD36 缺乏的 6 個人中，有 2 人沒有找到任何 CD36 基因變異，有一人只在 Intron 中找到變異，所以國人第二型 CD36 缺乏的人其 CD36 基因的轉譯序列沒有發現變異的比率為 50%，和日本的結果(46%)接近¹⁰。

以 PCR/SSOPH 的方法偵測本研究所發現之 *CD36* 基因變異於 640 位捐血人中的發生率，並比較這些基因變異與造成血小板 CD36 表現缺乏和減少的關聯性。結果發現於前趨測試中所發現的 *CD36* 基因變異：329AC del、1228-1239 del、1163A>T、1200(-5) 49bp inv、1254(+6) TATTTG del 與血小板 CD36 表現缺乏和減少有關聯性，但 1200(-13) A>G 則無關聯性。統計帶有與血小板 CD36 表現缺乏和減少有關聯性基因變異的捐血人共 49 人，約佔所有收案人數的 7.7%。

以流式細胞儀分析特定基因變異捐血人之單核球上 CD36 的表現方面，可以發現只要是為發現為 CD36 基因變異異型合子的捐血人，其單核球上 CD36 表現的 MFI 只有沒有基因變異的一半(圖九)。2002 年時 Makoto 等人曾提出「gene-dosage-dependent effects」的假設來解釋這個現象¹⁵，認為當兩條 CD36 對偶基因都發生變異的話，單核球上就不表現 CD36，為第一型 CD36 缺乏；若只有一條對偶基因發生變異，其單核球 CD36 的表現只有正常的一半，若是兩條對偶基因都沒有發生變異，單核球 CD36 的表現為正常。但是，本研究所發現的 4 位第一型 CD36 缺乏的捐血人，有兩位只檢出一種 CD36 對偶基因變異，此外也有發現少數捐血人的單核球 CD36 表現只有正常的一半，卻沒有帶有任何本研究所發現的任何變異，推測可能有其他未發現的變異，因為本研究的變異是由 10 位 CD36 缺乏和 5 位 CD36 減少的人之中找出來的，相對於 640 人這個數量並不多，如果採檢困難得以克服的話，想要了解完整基因變異的狀況，應該要偵測所有 640 位捐血人其單核球上 CD36 的表現，並比對所有單核球上 CD36 表現只有一半的人其 CD36 基因的轉譯序列及其周邊部分內含子(intron)序列是否發生變異，如此才能確認 CD36 基因變異與單核球上 CD36 表現下降的關係。

相對於單核球，血小板上 CD36 的表現則不能完全由轉譯序列基因的變異來解釋，根據本研究的結果，有一些人發現其有轉譯序列基因變異，但是血小板 CD36 表現正常，有一些人在轉譯序列中都沒有發現任何基因變異，但是血小板 CD36 表現卻缺乏或低下，因此推測有非轉譯序列基因變異的因素影響血小板上 CD36 的表現¹⁵。Kashiwagi 等人曾提出” platelet-specific silent allele” 的假設，並預期這個 allele 會與 CD36 基因第三個 Intron 的(TG)_n 重複次數互相關聯⁵²，但至今這個假設尚未被證實。

雖然 Yamamoto 和 Take 等人的研究都表示只有第一型 CD36 的缺乏的人才會有因輸血或懷孕而產生 anti-CD36 抗體的風險，但是在 Lee 等人的研究中卻發現第二型 CD36 的缺乏的人也有同樣的風險⁵³。根據本研究的結果，捐血中心可以掌握血小板分離術捐血人中血小板 CD36 缺乏者名單，對於國人因血小板 CD36 缺乏而可能會因輸血異體免疫產生 anti-CD36 抗體的受血者，則可輸注這些捐血人所捐之的血品，以減少血小板輸注無效等臨床症狀發生的機會。

本研究以 TEG 進行全血血小板功能的試驗，發現血小板 CD36 缺乏的全血，其 R 值、Angle 值和 MA 值都在正常範圍，但和血小板 CD36 正常的全血結果比較起來，其 R 值顯著的增加(p=0.0391)，Angle 值顯著的降低(p=0.0156)，MA 值無顯著的差異，由此結果可知，CD36 缺乏的血小板最後產生的止血作用，也就是 MA 值和正常的血小板是一樣的，但是所需的時間會比較長(因為 R 值增加和 Angle 值降低)。血小板有許多醣蛋白(glycoprotein)會和相對應的物質作用而進行血小板的生理功能，例如 glycoprotein GPIb-IX-V receptor 會與 vWF (von Willebrand factor) 結合而使血小板附著到受傷的組織；GPIIb/IIIa 及 GPVI 會與 collagen 作用，引發一連串的訊息傳遞，最後促使 GPIIb/IIIa 活化而形成血栓；GPIIb/IIIa 是血小板上的 fibrinogen receptor，當血管受傷時血小板會和 subendothelium 上的 collagen 和 vWF 結合而使 GPIIb/IIIa 產生構形改變，變成高親和力的 $\alpha_{IIb}\beta_3$ ，fibrinogen 和 $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ 作用後會使血小板形成穩定的凝集塊，使 dense granule 和 alpha

granule 分泌出內容物，並產生 thromboxan A_2 而放大血小板凝集反應⁵⁴。CD36 為血小板上的 glycoprotein IV，但是它在血小板上的生理功能至今仍然不明瞭，已知 CD36 可以和 collagen 結合⁴¹，但重要性不如 GPVI。2008 年 Ghosh 等人由 CD36 基因剔除的小鼠研究發現，正常血小板在低劑量的 ADP 下，可經由 CD36 接受微顆粒(microparticles)的刺激而活化⁵，因此作者推論 CD36 可以當作 resting 狀態的血小板對其他刺激物(agonists)如 ADP 的啟動器或感應器，可促使血小板的過活化(hyperreactivity)，對照於本研究的結果，CD36 缺乏的血小板，可能因為缺少了 CD36 這個啟動器，所以血小板形成血栓的時間會較 CD36 正常的血小板稍長，不過本研究並沒有加入任何刺激物，只是利用 TEG 偵測全血血小板自然狀態下形成血栓的狀況，所以檢測結果並未呈現很明顯的差異。

在血小板血品品質測試方面，本研究選擇剩餘在分離式耗材內的血小板血品做為研究材料，並將這些約 2 毫升的血品經由封閉的管路流入分離式耗材上體積約 100 毫升的血袋中，將此血袋置於恆溫振盪器中保存，以模擬血小板血品儲存時的狀況，但是真實的血袋在儲存時其血小板血品體積約為 250 毫升左右並儲存在約 1000 毫升的血袋中，所以這種儲存血袋和血小板血品體積的差異使本研究的儲存狀況跟實際比起來更為嚴苛，因為這種狀況會使儲存的血小板血品內的營養成分較不易接觸到所有血小板，若用真實的血小板血品來做，結果應該會有些許差異。從血小板計數的結果可以得知，血小板上 CD36 表現正常或低下的血品，在儲存的第七天時，血小板計數開始有顯著的降低，而 CD36 缺乏的血品在儲存的九天內，血小板計數的結果皆無顯著的差異。已知血小板在儲存的過程中隨著時間的增加凋亡的現象會越明顯³⁸，此結果可能是血小板 CD36 缺乏的血品產生血小板凋亡的現象比血小板有表現 CD36 的血品還少，而造成其血小板計數降低的狀況比較不明顯，不過還要比較血小板上 CD36 表現不同的血品，儲存時和凋亡有關的指標如 caspase-3 activation 等的變化才能證明此推論。本研究並沒有精確測出血品之體積，無法評估儲存期間總血小板數目的變化，而僅能以每 μL 血小板數目的

變化來表示，若以血小板總數來評估儲存時間的影響，應該在 CD36⁺ 缺乏的血品中可觀查到與一般血品間存在更顯著差異。

以 TEG 偵測血小板濃厚液血品上 CD36 表現不同的血品，在儲存期間血小板功能的變化，結果可知血小板 CD36 缺乏的血品在第 5 天末效時，和 CD36 正常血品比起來雖然 TEG 檢驗的 R 值顯著較長($p<0.05$)及 Angle 值顯著較低($p<0.05$)，但尚在正常範圍，且 MA 值無顯著差異，所以其血品在第 5 天末效時血小板功能的品質是可接受的。此外，本研究也發現，所有測試的血小板濃厚液血品在儲存的第 7 天時，其 MA 值皆在可接受範圍內，可見若把現今血小板效期規定由 5 天改成 7 天，血小板功能品質應該是沒問題的，不過效期延長還要考慮血小板血品中細菌污染的機會可能會上升，以及血小板和白血球所釋放的刺激物如 $\text{TNF } \alpha$ 、Interleukin α 、Platelet factor 4 等也會增加的問題，因此還需要評估對受血者的影響。

本研究分析分離術捐血人捐血前脂血紀錄的結果（表三、表十），血小板 CD36 缺乏和低下之捐血人較血小板 CD36 正常捐血人脂血紀錄的機會較高($p<0.0001$)，根據捐血中心分離術體檢的做法，遇到捐血人有脂血的狀況，會請捐血人等候 30 分鐘至 1 小時的時間，再抽血檢驗其脂血狀況，若無改善則會請捐血人下次再捐，並記錄此捐血人因脂血所以無法捐血，所以脂血紀錄可以間接反映出捐血人對所攝取食物中脂肪酸代謝的速度，由本研究結果推測血小板 CD36 缺乏和低下的人，若捐血前攝取吃油質含量高的食物，產生脂血的機會就增加。CD36 又稱 fatty acid translocase (FAT)，是幫助人體細胞吸收和利用脂肪酸的接受體之一，已知血小板 CD36 缺乏或低下並不代表身體其它細胞 CD36 表現也會缺乏或低下，但是本研究分析的結果顯示血小板 CD36 的表現可預測脂血發生的狀況。本研究間接反應捐血人對所攝取食物中脂肪酸代謝的速度，未來應該再詳細檢測血小板 CD36 表現缺乏或低下的捐血人其空腹或高油脂飲食後的相關生化值，如膽固醇、三酸甘油酯、HDL、LDL 等的變化，才能確認這些捐血人脂質代謝的狀況。

綜合本研究的結果可以得知國人血小板 CD36 缺乏的發生率比日本人和非洲裔

人種低，與國人無 268 C>T 和 975 T>G 變異型有關，而有些新發現的基因變異則可能是國人特有的。掌握慣常血小板分離術捐血人中 CD36 缺乏者名單，對於因異體免疫產生 anti-CD36 抗體的受血者，則可輸注特定 CD36 缺乏捐血人所捐之的血品，以減少血小板輸注無效等臨床症狀發生的機會。血小板 CD36 缺乏捐血人並無止血異常情形，雖然其全血 TEG 檢測凝血功能各項參數與血小板 CD36 正常表現者有顯著差異，但仍屬正常參考範圍。CD36 缺乏的分離術收集血小板濃厚液血品在第五天末效時，和 CD36 正常血品比起來雖然 TEG 檢驗各項參數與 CD36 正常血小板有差異，尚在正常範圍，其血品止血的品質是可接受的。血小板 CD36 缺乏和低下之捐血人較正常人產生脂血的機會較高，所以需加強宣導其捐血前飲食的控制。

CD36 相關研究未來的發展可朝以下方向進行：（1）利用流式細胞儀偵測 HLA 相容但血小板輸注無效的病人其血小板 CD36 表現的狀況，若發現病人血小板 CD36 有缺乏的情形，則設計適當的方法進一步偵測這些病人血清中是否有 anti-CD36 抗體，以了解血小板 CD36 缺乏對臨床輸血的影響和風險。（2）檢測血小板 CD36 表現缺乏或低下的捐血人其空腹或高油脂飲食後的相關血脂肪生化值的變化，以評估 CD36 缺乏對脂質代謝的影響。

參考文獻

1. Tsao KC, Sun CF, Lai NC: The phenotype and gene frequencies of human platelet specific antigens among Chinese in Taiwan, *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1992, 25:48-55
2. Lin M, Shieh SH, Yang TF: Frequency of platelet-specific antigens among Chinese in Taiwan, *Transfusion* 1993, 33:155-157
3. Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H, Tanoue K: Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes, *Blood* 1994, 83:392-397
4. Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, Tso P, Abumrad NA: CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood, *J Clin Invest* 2005, 115:1290-1297
5. Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E, Silverstein RL: Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice, *J Clin Invest* 2008, 118:1934-1943
6. Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T, Sekiguchi S: A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion, *Vox Sang* 1989, 57:213-217
7. Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, Mitani T, Furubayashi T, Mizutani H, Yamamoto N, Tandon NN, Sekiguchi S, Jamieson GA, et al.: Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV, *Blood* 1990, 75:684-687
8. Yamamoto N, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Mitani T, Sekiguchi S, Lipsky R, Kralisz U, Jamieson GA: A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka- platelets lack detectable GPIV (CD36), *Blood* 1990, 76:1698-1703
9. Shaw S: Characterization of human leukocyte differentiation antigens, *Immunology Today* 1987, 8:1-3
10. Yanai H, Chiba H, Fujiwara H, Morimoto M, Abe K, Yoshida S, Takahashi Y, Fuda H, Hui SP, Akita H, Kobayashi K, Matsuno K: Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II, *Thromb Haemost* 2000, 84:436-441
11. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, Kiyoi T, Tadokoro S, Matsumoto K, Honda S, Kosugi S, Kurata Y, Matsuzawa Y: Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel

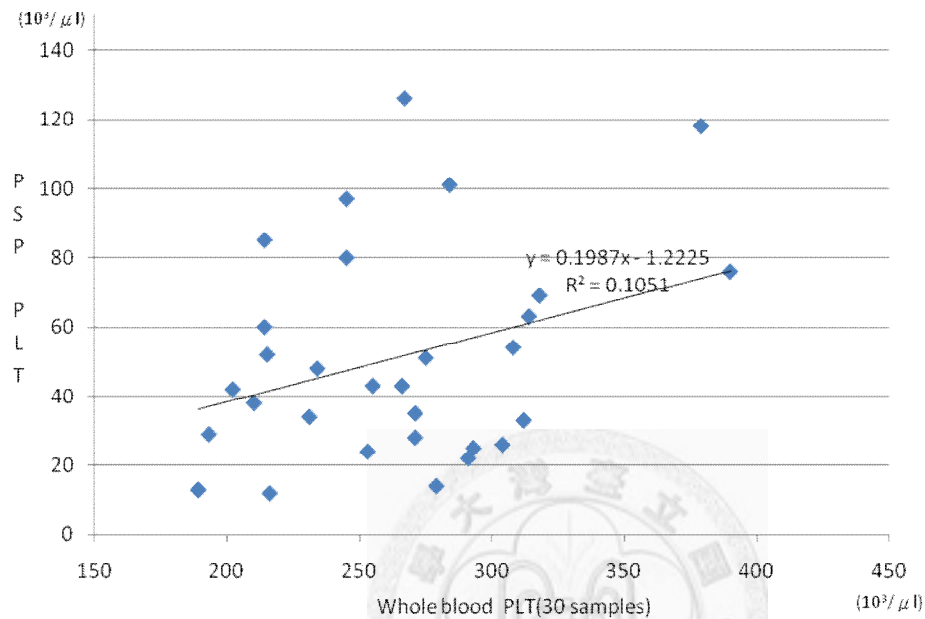
- mutations that cause CD36 deficiency in man, *Hum Genet* 2001, 108:459-466
12. Curtis BR, Aster RH: Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians, *Transfusion* 1996, 36:331-334
 13. Tanaka T, Nakata T, Oka T, Ogawa T, Okamoto F, Kusaka Y, Sohmiya K, Shimamoto K, Itakura K: Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations, *J Lipid Res* 2001, 42:751-759
 14. Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, McKeigue PM, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Snow RW, Hill AV, Scott J: Malaria susceptibility and CD36 mutation, *Nature* 2000, 405:1015-1016
 15. Imai M, Tanaka T, Kintaka T, Ikemoto T, Shimizu A, Kitaura Y: Genomic heterogeneity of type II CD36 deficiency, *Clin Chim Acta* 2002, 321:97-106
 16. Rac ME, Safranow K, Poncyljusz W: Molecular basis of human CD36 gene mutations, *Mol Med* 2007, 13:288-296
 17. Febbraio M, Silverstein RL: CD36: implications in cardiovascular disease, *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39:2012-2030
 18. Silverstein RL, Febbraio M: CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior, *Sci Signal* 2009, 2:re3
 19. Miyaoka K, Kuwasako T, Hirano K, Nozaki S, Yamashita S, Matsuzawa Y: CD36 deficiency associated with insulin resistance, *Lancet* 2001, 357:686-687
 20. 林媽利: 輸血醫學. Edited by 健康文化事業股份有限公司, 2005
 21. 張進祿: 輸血手冊. Edited by 合記圖書出版社, 2004
 22. 雍建輝 薛, 林炯熙, 邱宗傑: 臨床醫師對血小板輸血適應症的新認識, *當代醫學* 2009, 36:81
 23. 臺灣血液基金會: 血液成分精要, 2005,
 24. Patel IP, Ambinder E, Holland JF, Aledort LM: In vitro and in vivo comparison of single-donor platelets and multiple-donor pooled platelets transfusions in leukemic patients, *Transfusion* 1978, 18:116-119
 25. Vamvakas EC, Blajchman MA: Prestorage versus poststorage white cell reduction for the prevention of the deleterious immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusion, *Transfus Med Rev* 2000, 14:23-33
 26. 台灣血液基金會: 98 年年報, 2009, 94
 27. Harker LA, Slichter SJ: The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function, *N Engl J Med* 1972, 287:155-159
 28. Hanson SR, Slichter SJ: Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement, *Blood* 1985, 66:1105-1109
 29. Hod E, Schwartz J: Platelet transfusion refractoriness, *Br J Haematol* 2008, 142:348-360
 30. 彭柏硯: 捐血前分離術捐血人血小板功能測定之研究, *台灣輸血學會會刊*

2007, 21

31. 吳榕竣: 血小板濃厚液儲存期間生理活性之探討, 台灣輸血學會會刊 2005, 252
32. Miyaji R, Sakai M, Urano H, Nakata K, Sakamoto H, Shirahata A: Decreased platelet aggregation of platelet concentrate during storage recovers in the body after transfusion, *Transfusion* 2004, 44:891-899
33. 陳明鴻: 評估七天期血小板之代謝、活化及凋亡狀況, 台灣輸血學會會刊 2008, 136
34. Lindahl TL, Ramstrom S: Methods for evaluation of platelet function, *Transfus Apher Sci* 2009, 41:121-125
35. Reikvam H, Steien E, Hauge B, Liseth K, Hagen KG, Storkson R, Hervig T: Thrombelastography, *Transfus Apher Sci* 2009, 40:119-123
36. Tuman K MR, Patel R, Patel R, Ivankovich A,: Comparison of Thrombelastography and platelet aggregometry., *Anesthesiology* 1991, 75:A433
37. Essell JH, Martin TJ, Salinas J, Thompson JM, Smith VC: Comparison of thromboelastography to bleeding time and standard coagulation tests in patients after cardiopulmonary bypass, *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 1993, 7:410-415
38. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J: Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage, *British Journal of Haematology* 2008, 142:494-497
39. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis, *J Clin Invest* 1992, 90:1513-1522
40. Silverstein RL: Type 2 scavenger receptor CD36 in platelet activation: the role of hyperlipemia and oxidative stress, *Clin Lipidol* 2009, 4:767
41. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA: Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion, *J Biol Chem* 1989, 264:7576-7583
42. Yamamoto N, Akamatsu N, Yamazaki H, Tanoue K: Normal aggregations of glycoprotein IV (CD36)-deficient platelets from seven healthy Japanese donors, *Br J Haematol* 1992, 81:86-92
43. Bierling P, Godeau B, Fromont P, Bettaieb A, Debili N, el-Kassar N, Rouby JJ, Vainchenker W, Duedari N: Posttransfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Naka) isoimmunization, *Transfusion* 1995, 35:777-782
44. Mark A. Popovsky M: Transfusion reactions. Edited by AABB Press, 2007, p
45. Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, Okazaki H, Tadokoro K: Role of anti-Nak(a) antibody, monocytes and platelets in the development of

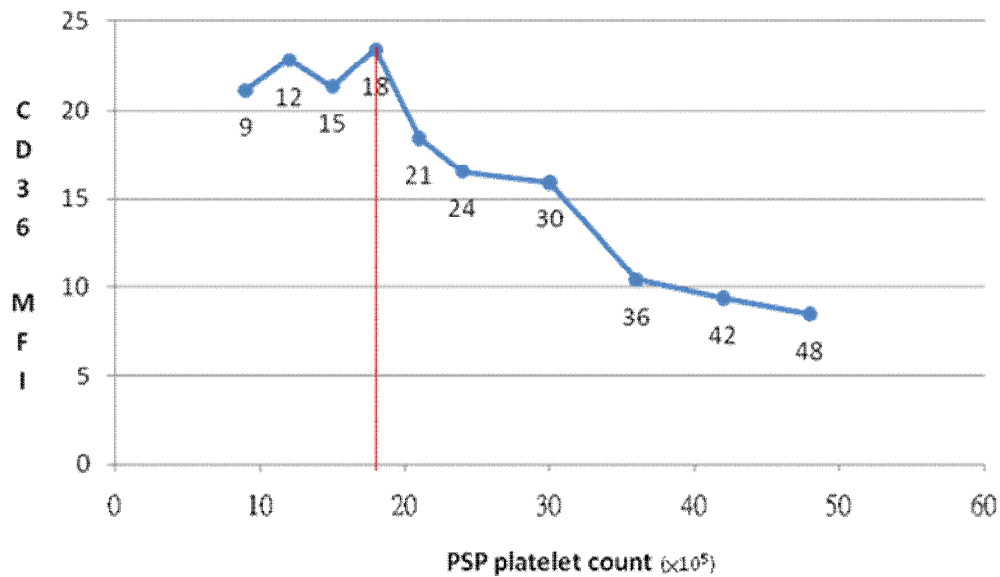
- transfusion-related acute lung injury, *Vox Sang* 2008, 95:318-323
46. Kuwasako T, Hirano K, Sakai N, Ishigami M, Hiraoka H, Yakub MJ, Yamauchi-Takahara K, Yamashita S, Matsuzawa Y: Lipoprotein abnormalities in human genetic CD36 deficiency associated with insulin resistance and abnormal fatty acid metabolism, *Diabetes Care* 2003, 26:1647-1648
 47. Love-Gregory L, Sherva R, Sun L, Wasson J, Schappe T, Doria A, Rao DC, Hunt SC, Klein S, Neuman RJ, Permutt MA, Abumrad NA: Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol, *Hum Mol Genet* 2008, 17:1695-1704
 48. Masuda D, Hirano K, Oku H, Sandoval JC, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Yamashita Y, Takada M, Tsubakio-Yamamoto K, Tochino Y, Koseki M, Matsuura F, Nishida M, Kawamoto T, Ishigami M, Hori M, Shimomura I, Yamashita S: Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency, *J Lipid Res* 2009, 50:999-1011
 49. 台灣血液基金會: 九十八年年報, 2009, 96
 50. Corporation H: TEG 5000 User Manual Edited by Corporation H. Haemoscope Corporation, 2007, p.178
 51. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, Kosugi S, Shiraga M, Nagao N, Sekiguchi S, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y: Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency, *J Clin Invest* 1995, 95:1040-1046
 52. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi S, Shiraga M, Lipsky RH, Nagao N, Kanakura Y, Kurata Y, Matsuzawa Y: Family studies of type II CD36 deficient subjects: linkage of a CD36 allele to a platelet-specific mRNA expression defect(s) causing type II CD36 deficiency, *Thromb Haemost* 1995, 74:758-763
 53. Lee K, Godeau B, Fromont P, Plonquet A, Debili N, Bachir D, Reviron D, Gourin J, Fernandez E, Galacteros F, Bierling P: CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans, *Transfusion* 1999, 39:873-879
 54. Clemetson KJ, Clemetson JM: Platelet receptor signalling, *Hematol J* 2004, 5 Suppl 3:S159-163

圖



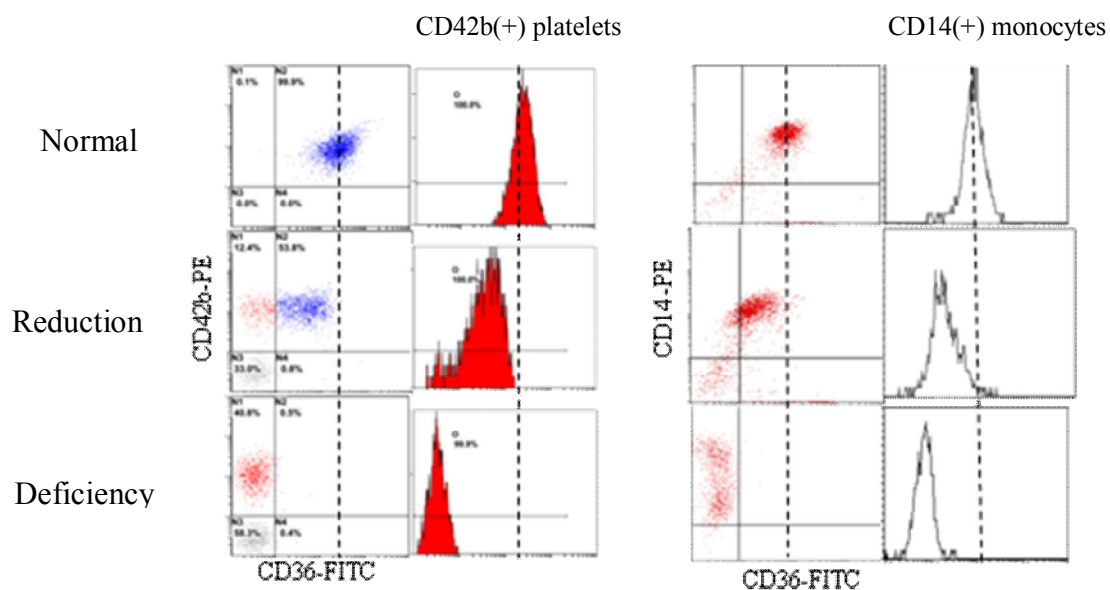
圖一、全血血小板計數與血小板懸浮血漿血小板計數對照圖

說明：在進行血小板流式細胞儀試驗前，測試所分離之血小板懸浮血漿 (platelet-suspension plasma, PSP) 中所含血小板計數，以評估血小板懸浮血漿與螢光抗體反應的適當體積。隨機找 30 位捐血人，抽取其 3ml 全血，以 Nihon Kohden 自動全血球計數儀分析其血小板每 μL 的數量，再以 2,100rpm(700g) 的轉速離心 10 分鐘，並分析所分離之血小板懸浮血漿血小板每 μL 的數量。結果顯示全血的血小板計數結果和所分離之血小板懸浮血漿血小板計數結果線性關係不大 ($R^2=0.1051$)，血小板懸浮血漿每 μL 血小板數目範圍為 $1.2 \times 10^4 \sim 1.28 \times 10^5$ 。



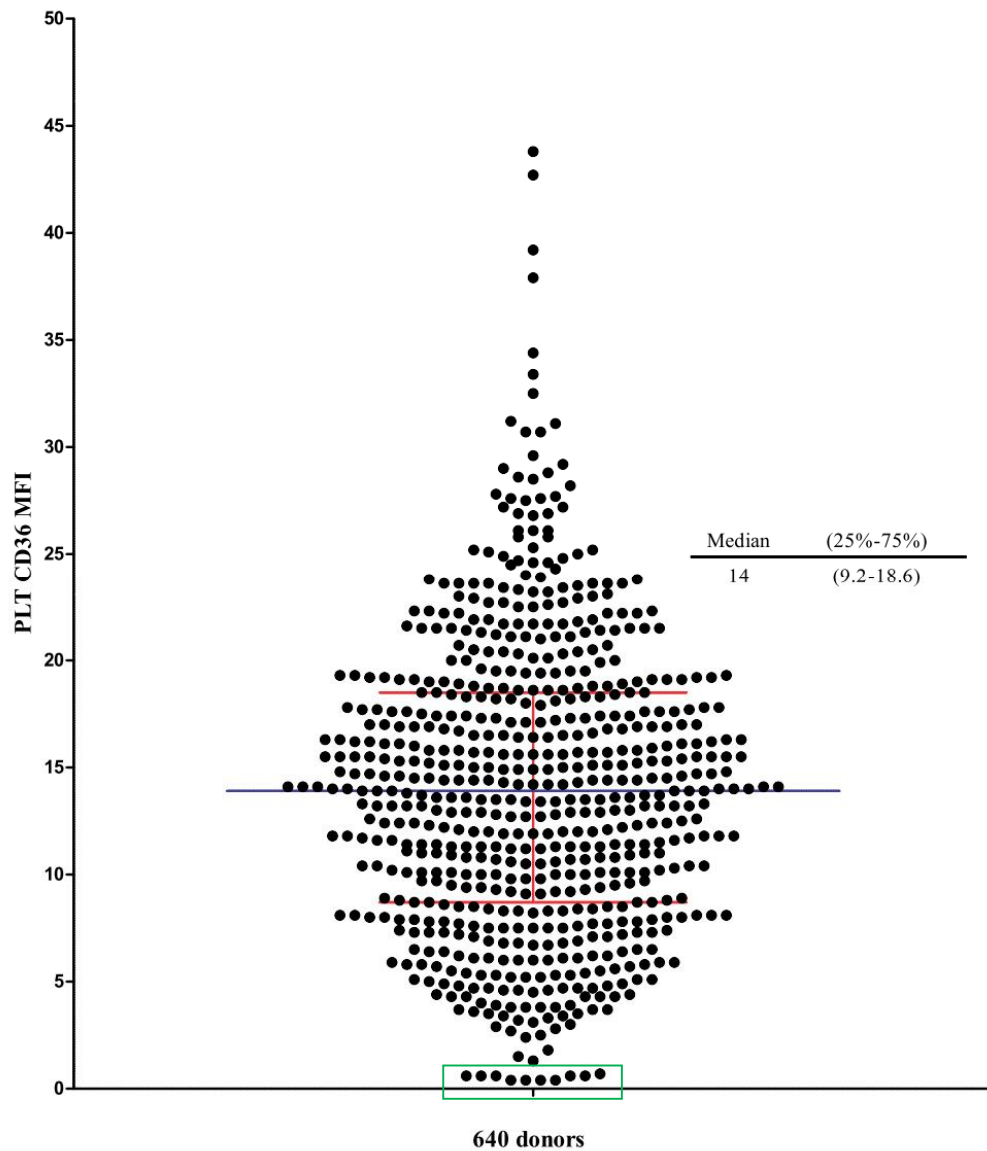
圖二、血小板之數目與 CD36 平均螢光強度之關係圖

說明：在進行流式細胞儀試驗前，為評估血小板懸浮血漿與螢光抗體反應的適當體積比率。將固定 1 μ l 的 FITC Mouse Anti-Human CD36 加入不同數目的血小板中，以了解螢光抗體能維持飽和狀態的最大血小板數目。結果測得血小板數目在 1.8×10^6 以下時，1 μ l 的螢光抗體能維持血小板 CD36 染色的飽和狀態。



圖三、流式細胞儀分析 CD36 於血小板及單核球上表現的螢光點狀分布圖

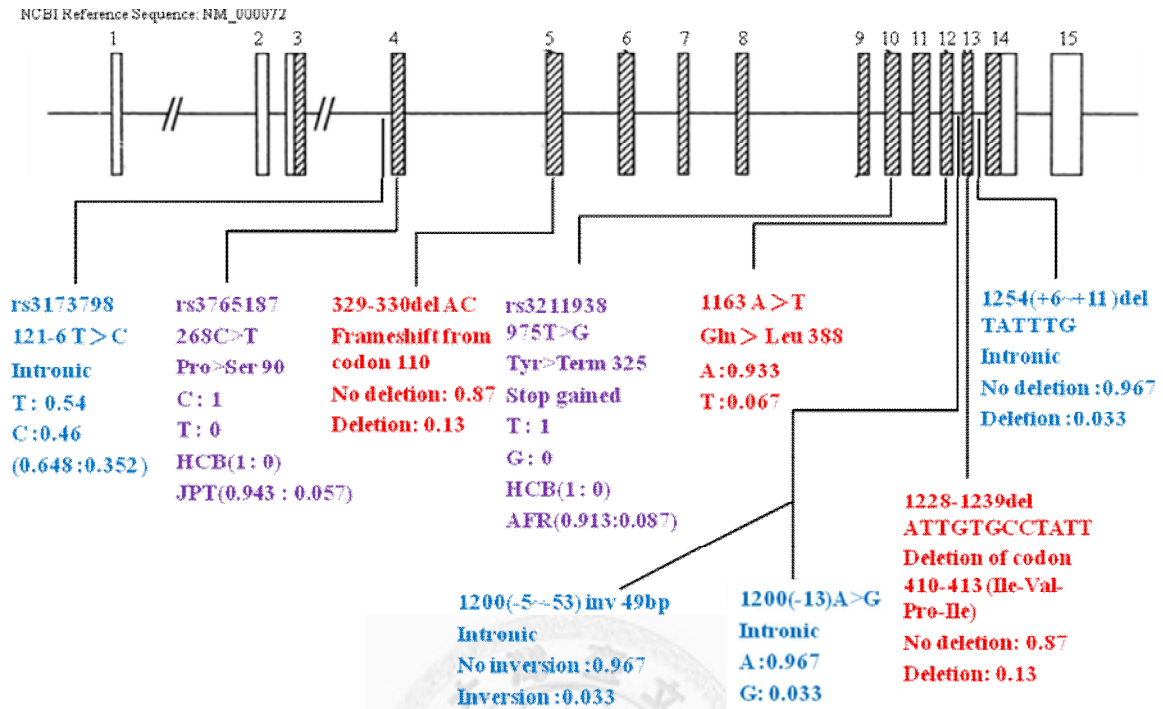
說明：左圖為圈選 anti-CD42b-PE 的血小板特異性抗體所染出之細胞後，再分析這群細胞中 anti-CD36-FITC 的螢光分布，由上而下分別為 Normal、Reduction 和 Deficiency 等三種分布型態。右圖為圈選 anti-CD14-PE 的單核球特異性抗體所染出之細胞後，再分析這群細胞中 anti-CD36-FITC 的螢光分布，由上而下分別為 Normal、Reduction 和 Deficiency 等三種分布型態。



圖四、血小板 CD36 平均螢光強度點狀分布圖

說明：將 640 位捐血人血小板 CD36 表現的 MFI 以點狀分佈圖分析，藍色線為中位數的位置，紅色線分別為 25%和 75%的位置，綠色方框所標示為血小板 CD36 缺乏的位置。定義 MFI 小於等於 9.2(25%)且大於 1 為 CD36 低下，大於 9.2 為 CD36 正常。（每次流式細胞儀實驗的電壓條件皆一致，並利用 IgG1-FITC 及 IgG1-PE 當作陰性控制組）

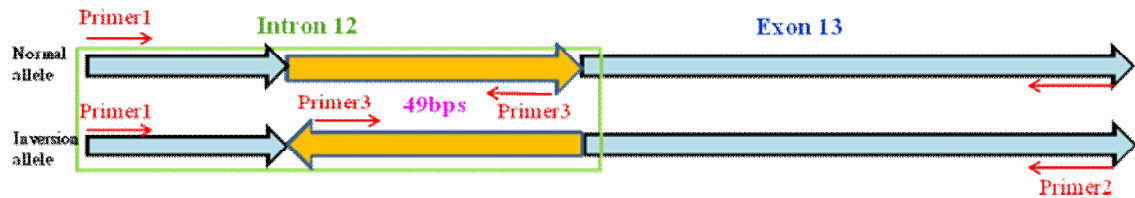
CD36 基因



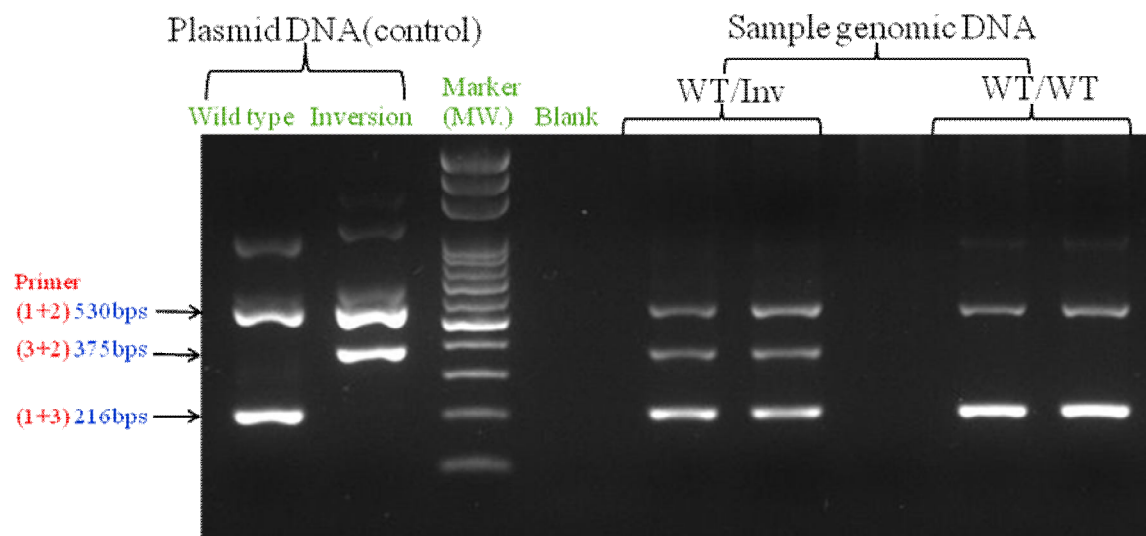
圖五、CD36 缺乏相關基因變異前趨測試結果

說明：比對 4 位第一型 CD36 缺乏，6 位第二型 CD36 缺乏及 5 位 CD36 低下的捐血人其 CD36 基因 exon 3 至 exon14 的轉譯序列及其周邊部分內含子(intron)序列與 Ensembl 所下載之 CD36 基因參考序列之差異，並將所發現的變異標示於 CD36 基因的相對位置上。長方形上的阿拉伯數字標示外顯子(exon)的順序；紫色標示為國外常見有關 CD36 缺乏的變異，但在本試驗中並沒有發現這些變異；藍色標示為發生在內含子(intron)上的變異；紅色標示為發生在外顯子(exon)上的變異。HCB 為 Ensembl 中漢人族群的簡寫；JPT 為日本人族群的簡寫；AFR 為非洲裔族群的簡寫。

A、引子設計圖

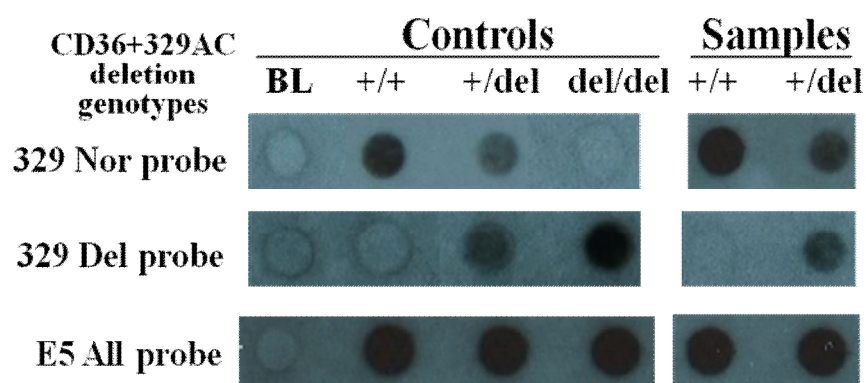


B、洋菜膠電泳結果圖



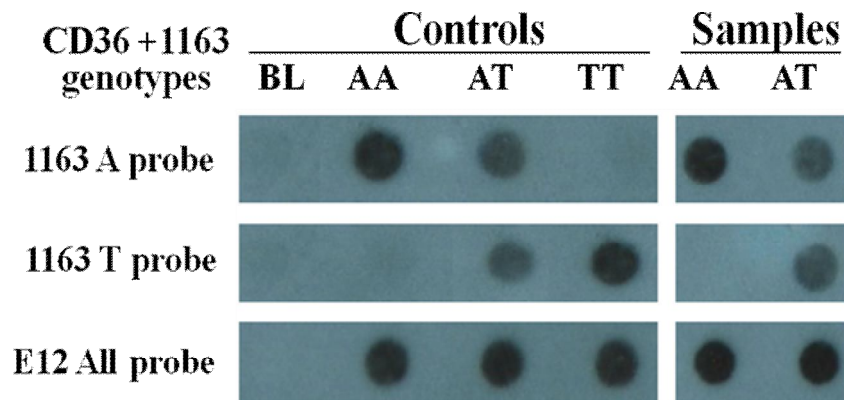
圖六、1200(-5~53) 49bp inv 篩檢引子設計圖及洋菜膠電泳結果圖

說明：A 圖顯示在 Intron 12 和 Exon 13 互相交界附近發生 49 個鹼基對倒置的位置，設計 Primer 1 和 Primer 2 可以把 Exon 13 和部分周邊 Intron 的序列片段給夾出來，如果在倒置的序列再設計一條 Primer 3，則可用來偵測倒置的發生。B 圖為利用這三條 Primer 偵測 1200(-5~53) inv 49bp 的洋菜膠電泳結果圖，正常的基因型只會有 530bps 和 216bps 這兩條 band，若是帶有 1200(-5~53) inv 49bp 的基因型，則會產生長度 375bps 的 band。



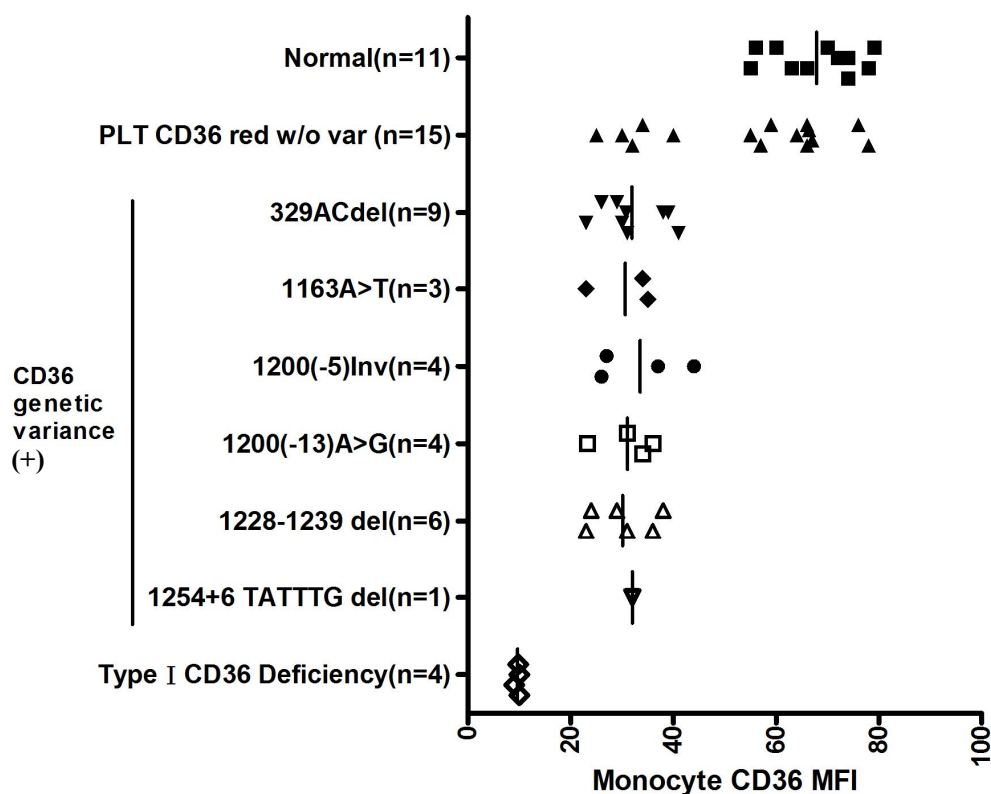
圖七、329AC deletion 特異性序列寡核苷酸探針(SSOP)測定結果圖

說明：PCR 產物利用強鹼將其變性成單股 DNA 後點到尼龍膜上，再利用特異序列探針去偵測 CD36 +329AC deletion 位點的變異。329Nor probe 可以偵測 CD36 +329 AC 正常的序列，329 Del probe 可以偵測 CD36+329 AC 刪除的序列。(BL: Blank 控制組；All Probe：positive loading control；SSOP: Sequence-specific oligonucleotide probe)



圖八、1163 genotypes 特異性序列寡核苷酸探針(SSOP)測定結果圖

說明：PCR 產物利用強鹼將其變性成單股 DNA 後點到尼龍膜上，再利用特異序列探針去偵測 CD36 +1163 位點的變異。1163A probe 可以偵測 CD36 +1163A 的序列，1163T probe 可以偵測 CD36+1163T 的序列。(BL: Blank 控制組；All Probe : positive loading control ；SSOP: Sequence-specific oligonucleotide probe)



圖九、*CD36* 基因變異與單核球上 *CD36* 表現 MFI 關係圖

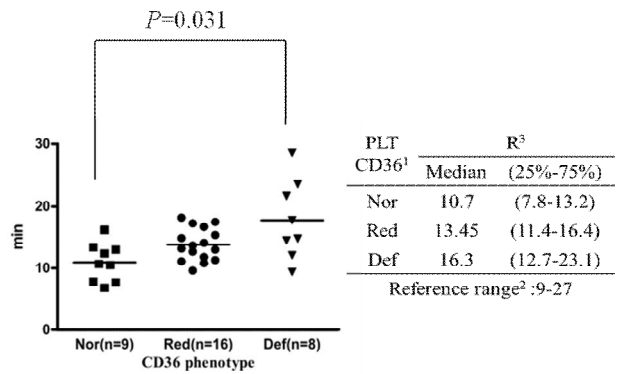
說明：(1) Normal 為未發現基因變異的捐血人共 11 人。

(2) PLT *CD36* red w/o var 為血小板上 *CD36* 表現低下且沒有發現基因變異的捐血人，依其單核球上 *CD36* 表現的 MFI 可將其分為兩群，一群為 *CD36* MFI 表現分布和 Normal 的分布類似，共有 10 人；另一群為 *CD36* MFI 表現分布低下，共有 5 人。

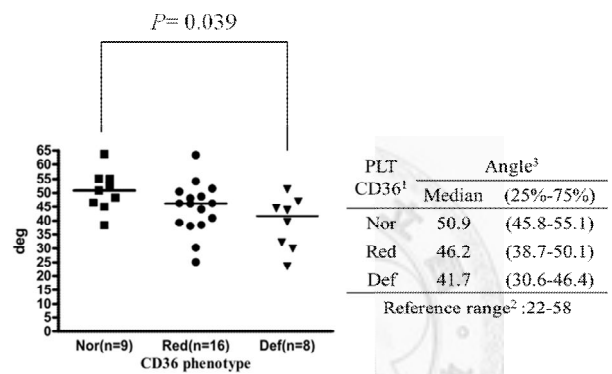
(3) *CD36* genetic variance(+) 為帶有圖上所列基因變異異型合子之捐血人。

(4) 第一型 *CD36* 缺乏捐血人共有 4 位其血小板和單核球皆不表現 *CD36*。
(MFI: Mean Fluorescence Intensities)

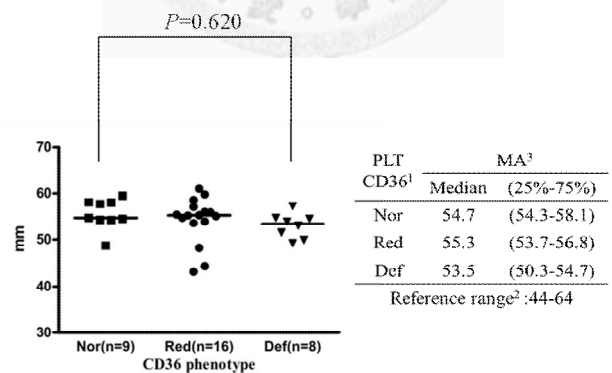
A、R 值



B、Angle 值



C、MA 值

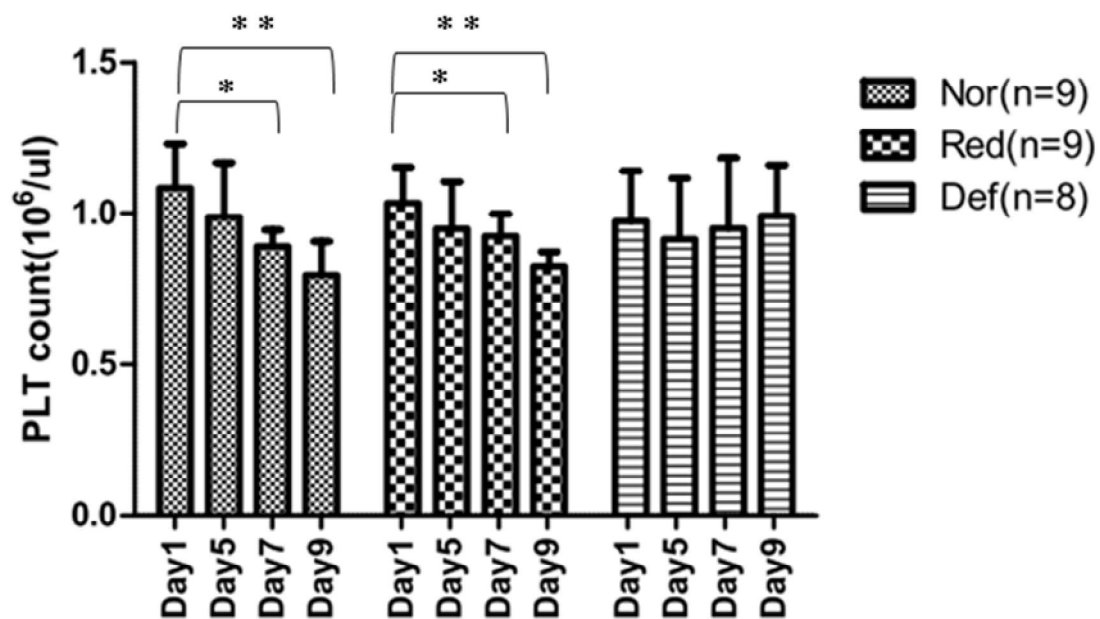


圖十、TEG 分析儀各參數分析圖

說明：1、PLT CD36: Def: deficiency, Red: reduced, Nor: normal

2、Reference range：參照 Haemoscope TEG 5000 User Manual 2007 操作手冊

3、R 值、Angle 值和 MA 值等參數意義說明請參照緒論 1.4.2 TEG 介紹

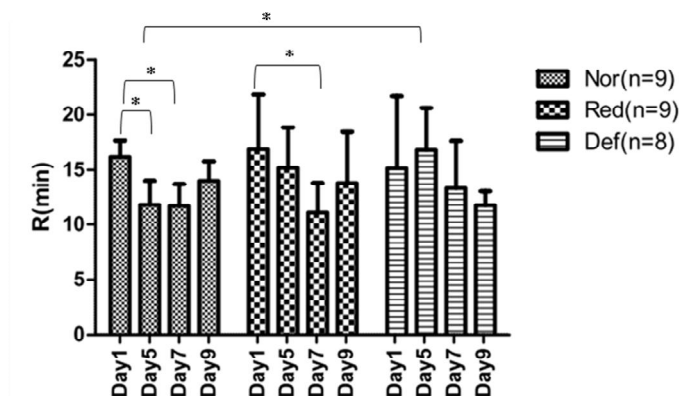


圖十一、血小板成品血小板計數值與儲存時間關係圖

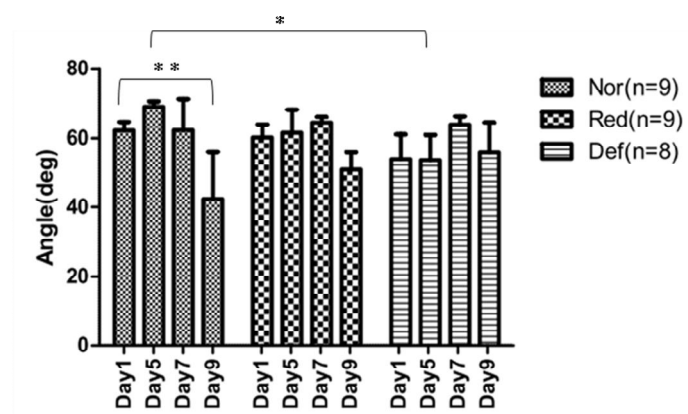
說明：比較 3 組不同血小板 CD36 表現的血品，儲存時間對其血小板計數的影響。

血小板 CD36 正常的血品和血小板 CD36 減少的血品在儲存的第 7 天和第 1 天比較每 μL 血小板的數目有顯著的降低($p<0.05$)，儲存的第 9 天與第 1 天比較差異更顯著 ($p<0.01$)；血小板 CD36 低下之血品在儲存的第 5、7、9 天和第一天比較，皆無顯著的降低。數值均以各組血小板血品血小板計數的中位數 \pm 四分位數呈現。(* $p<0.05$ ，* * $p<0.01$)

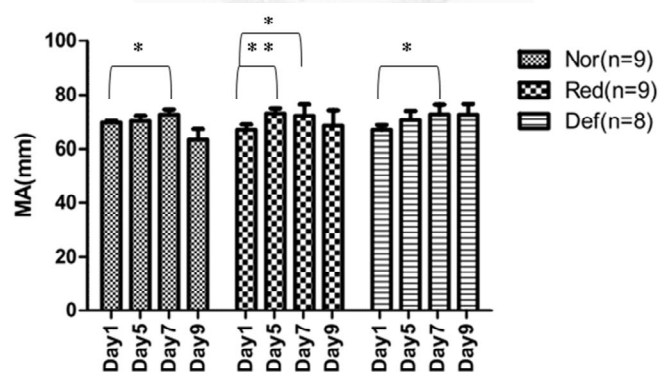
A、R 值



B、Angle 值



C、MA 值



圖十二、TEG 分析儀血小板濃厚液測試各參數與儲存時間關係圖

說明：數值均以各組血小板血品血小板計數的中位數±四分位數呈現。(* $p < 0.05$,

* * $p < 0.01$)

表

表一、分離術捐血人基本資料

	n (%)
<i>Total*</i>	640
<i>Gender</i>	
male	547 (85.5)
female	93 (14.5)
<i>Age, year-old</i>	
17~30	69 (10.8)
31~40	157 (24.5)
41~50	186 (29.1)
51~60	196 (30.6)
>61	32 (5)
median (range)	46 (19-69)
<i>Whole blood PLT count (per μL)</i>	
<200,000	84 (13.1)
200,000 ~ 250,000	233 (36.4)
250,000 ~ 300,000	222 (34.7)
300,000~ 400,000	96 (15.0)
> 400,000	5 (0.8)
median (range)	251 (161-475)
<i>ABO blood group</i>	
A	180 (28.1)
B	162 (25.3)
O	258 (40.3)
AB	40 (6.3)

*檢體來源:台北捐血中心南海捐血室

表二、640 名捐血人血小板與單核球 CD36 表現統計

PLT CD36	n(%)	Monocyte CD36	n(%)
Normal ¹	470(73.4)	NA	
Reduction ²	160(25)	NA	
Deficiency ³	10(1.6)	Normal ⁴ : 0(0)	
		Reduction ^{5,7} : 6 (1)	
		Deficiency ^{6,8} : 4(0.6)	

說明：1.血小板上 CD36 表現 MFI 大於 9.2 定義為 CD36 正常。

2.血小板上 CD36 表現 MFI 大於 1 小於 9.2 定義為 CD36 減少。

3.血小板上 CD36 表現 MFI 小於 1 定義為 CD36 低下。

4.單核球上 CD36 表現 MFI 大於 50 定義為 CD36 正常，但由於沒有偵測所有 640 位捐血人的單核球 CD36 表現，所以無法計算百分比。

5.單核球上 CD36 表現 MFI 大於 15 小於 50 定義為 CD36 減少。

6.單核球上 CD36 表現 MFI 小於 15 定義為 CD36 低下。

7. Type II CD36 deficiency

8. Type I CD36 deficiency

表三、CD36 基因變異前趨檢測之捐血人基本資料及變異結果分析

個數 編號	年齡	性別	族群	CD36 表現型	脂血 紀錄	所發現之 CD36 基因變異 ¹
1.	51	M	閩南	第一型 CD36 缺乏	有	1163 A/T
2.	32	M	閩南	第一型 CD36 缺乏	有	1200(-13) A/G
3.	51	M	閩南	第一型 CD36 缺乏	有	329AC del & 1163 A/T
4.	47	M	閩南	第一型 CD36 缺乏	無	1228-1239 (del/del)
5.	42	M	閩南	第二型 CD36 缺乏	有	329AC del (WT/del)
6.	40	M	閩南	第二型 CD36 缺乏	有	無發現變異 ²
7.	37	M	未知 ³	第二型 CD36 缺乏	無	1228-1239 del (WT/del)
8.	24	M	閩南	第二型 CD36 缺乏	有	無發現變異 ²
9.	66	M	閩南	第二型 CD36 缺乏	無	1228-1239 del (WT/del)
10.	32	M	未知 ³	第二型 CD36 缺乏	無	1200(-5) 49bp inv (WT/inv)
11.	50	M	閩南	CD36 低下	有	1163 A/T
12.	27	M	閩南	CD36 低下	有	無發現變異 ²
13.	58	M	閩南	CD36 低下	有	329AC del (WT/del)
14.	54	M	閩南	CD36 低下	有	1254(+6) TATTTG del (WT/del)
15.	45	M	閩南	CD36 低下	有	329AC del (WT/del)

說明：1. 變異型以粗體表示

2. CD36 基因的轉譯序列及其周邊部分內含子(intron)序列與 Ensembl 所下載之 CD36 基因參考序列比對無差異。

3. 此捐血人從採集檢體後就不再來捐血，所以無法詢問其族群資料。

表四、1200(-5)49bp inv 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析

1200(-5)49bp inv	PLT CD36	PLT CD36	OR(95% C.I.)	p^1
	Deficeincy/reduction (N=170)	normal (N=470)		
Genotype	n [def/reduc]	n		
WT/WT	166 [9/ 157]	470	1	
WT/INV	4 [1/ 3]	0	25.43(1.36-475.2)	0.0048
INV/INV	0 [0/ 0]	0	-	
Allele	n(%)	n(%)		p^1
WT	336 (98.8)	940(100)	-	0.0049
INV	4 (1.2)	0(0)		

1. 因 WT/INV 的樣本數少，所以利用 Fisher's exact test 進行校正



表五、329AC del 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析

329AC del	PLT CD36 Deficeincy/reduction (N=170)	PLT CD36 normal (N=470)	OR(95%C.I.)	<i>p</i>
	n [def/reduc]	n		
Genotype				
WT/WT	153 [8/ 145]	465	1	<0.0001
WT/Del	17 [2/ 15]	5	10.33(3.75-28.48)	
Del/Del	0 [0/ 0]	0	-	
Allele	n(%)	n(%)		<i>p</i>
WT	323 (95)	935(99.5)	-	<0.0001
Del	17 (5)	5(0.5)		



表六、1163 (A>T)基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析

1163 (A>T)	PLT CD36	PLT CD36	OR(95%C.I.)	p^1
	Deficeincy/reduction (N=170)	normal (N=470)		
Genotype	n[def/reduc]	n		
AA	165 [8/ 157]	470	1	0.0013
AT	5 [2/ 3]	0	31.27(1.72-569)	
TT	0 [0/ 0]	0	-	
Allele	n(%)	n(%)		p^1
A	335 (98.5)	940(100)	-	0.0013
T	5 (1.5)	0(0)		

1. 因 AT 的樣本數少，所以利用 Fisher's exact test 進行校正



表七、1228-1239 del 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析

1228-1239 del	PLT CD36 Deficeincy/reduction (N=170)	PLT CD36 normal (N=470)	OR(95%C.I.)	<i>p</i>
Genotype	n[def/reduc]	n		
WT/WT	162 [7/ 151]	464	1	
WT/Del	11 [2/ 9]	6	5.38(1.96-14.8)	0.0003
Del/Del	1 [1/ 0]	0	8.31(0.34-204.98)	NA ¹
Allele	n(%)	n(%)		<i>p</i>
WT	327 (96.2)	934(99.4)		
Del	13 (3.8)	6(0.6)		<0.0001

1.因 Del/Del 只有 1 人，所以無法算 P 值



表八、1200(-13) A>G 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析

1200(-13) A>G	PLT CD36	PLT CD36	OR(95%C.I.)	p^1
	Deficeincy/reduction (N=170)	normal (N=470)		
Genotype	n[def/reduc]	n		
AA	165 [8/ 157]	465	1	
AG	5 [1/ 4]	5	2.81(0.85-9.29)	≤ 0.183
GG	0 [0/ 0]	0	-	
Allele	n(%)	n(%)		p^1
A	335 (98.5)	935(99.5)		
G	5 (1.5)	5(0.5)	-	≤ 0.185

1.因 AG 的樣本數少，所以利用 Fisher's exact test 進行校正



表九、1254(+6) TATTTG del 基因型篩檢結果與血小板 CD36 表現關聯性分析

1254(+6) TATTTG del	PLT CD36 Deficeincy/reduction (N=170)	PLT CD36 normal (N=470)	OR(95%C.I.)	<i>p</i>
Genotype	n[def/reduc]	n		
WT/WT	169 [10/ 159]	470	1	
WT/Del	1 [0/ 1]	0	8.33(0.34-205.6)	NA ¹
Del/Del	0 [0/ 0]	0	-	
Allele	n(%)	n(%)		<i>p</i>
WT	339 (99.7)	940(100)	-	NA ¹
Del	1 (0.3)	0(0)		

1.因 WT/Del 只有 1 人，所以無法算 P 值



表十、血小板 CD36 Deficeincy/Reduction 與脂血紀錄之關聯性分析

脂血紀錄	PLT CD36 Deficeincy/Reduction (N=170) n(%)	PLT CD36 normal (N=470) n(%)	X^2	OR(95%C.I.)	<i>p</i>
有	79(46.5)	117(24.9)	27.36	2.62(1.82-3.78)	<0.0001
無	91(53.5)	353(75.1)			



附錄

附錄一、「校正增加數」(Corrected count increment , CCI)

$$\text{CCI} = \frac{\text{Body Surface Area (m}^2\text{)} \times \text{Post-transfusion platelet increment (/}\mu\text{l)}}{\text{Number of Platelets Transfused (multiples of } 10^{11}\text{)}}$$

註：一般輸血小板後 10 分鐘到 1 小時的 CCI 應大於 7500/ μl ，為有效的輸血，輸血小板後 18~24 小時的 CCI 應大於 4500/ μl ，為有效的輸血。

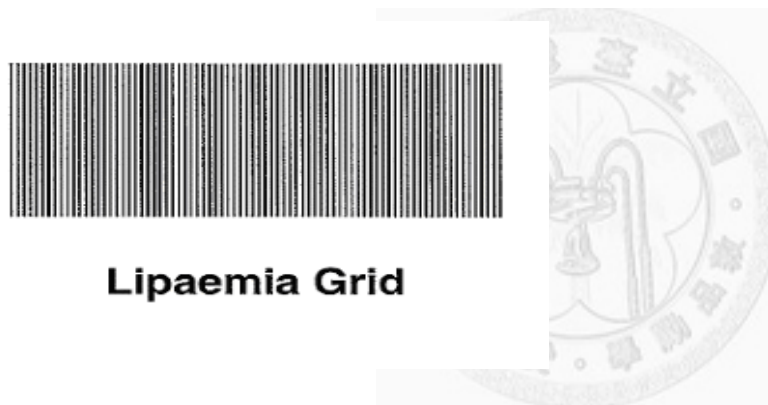
摘錄自輸血醫學，林媽利著，健康文化事業股份有限公司出版, 2005, p282



附錄二、血漿瑕疵判定標準

原因	處理方式
重量不足	1.來自 250cc 全血之血漿：<100g 則不適合提供醫療輸用 2.來自 500cc 全血之血漿：<200g 則不適合提供醫療輸用
異 色	1.脂血漿：將血漿血段置放於脂血格線（Lipaemia Grid）上 (1) 透過血段仍可看到格線，則適合提供醫療輸用 (2) 透過血段無法看到格線，則不適提供醫療輸用 2.偏紅：血漿顏色較樣本血漿（Hb=1g/L）為深，則不適提供醫療輸用 3.其他顏色：例如綠色、棕色等，則不適提供醫療輸用

註：脂血格線（CSL 提供）



摘錄自台灣血液基金會標準作業文件表 SP-B2-060-6.2

附錄三、分離術血小板瑕疵判定標準

項 目	處 理 方 式
體積不足	<180 mL/袋: 不提供醫療輸用
顏 色	衝紅: 先離心, 除去多餘紅血球, 再取檢體送交 QC 人員進行血小板含量及體積測定, 技術督導再依結果於「分離術捐血異常處理紀錄表」中「成品處理」之「成分單位」欄位提出處理方式後, 依醫師批示交核對人員處理。
	乳糜: 透過血段可看到格線, 先取檢體送交 QC 人員進行血小板含量及體積測定, 技術督導再依結果於「分離術捐血異常處理紀錄表」中「成品處理」之「成分單位」欄位提出處理方式後, 依醫師批示交核對人員處理。
	乳糜: 透過血段無法看到格線, 技術督導於「分離術捐血異常處理紀錄表」中「成品處理」之「成分單位」欄位上, 紀錄以不適用血銷毀方式處理, 醫師批示後再交核對人員處理。
	異色: 例如綠色、棕色等, 應註記異色, 不提供醫療輸用。
血小板含量	$<1.5 \times 10^{11}$ /袋: 不提供醫療輸用。 $1.5-2.5 \times 10^{11}$ /袋: 配合相同血型的血小板一袋, 計算平均含量 $\geq 2.5 \times 10^{11}$ /袋, 套袋 (或掛牌) 註明提供同一位病患使用。 $\geq 2.5 \times 10^{11}$ /袋: 正常供出。

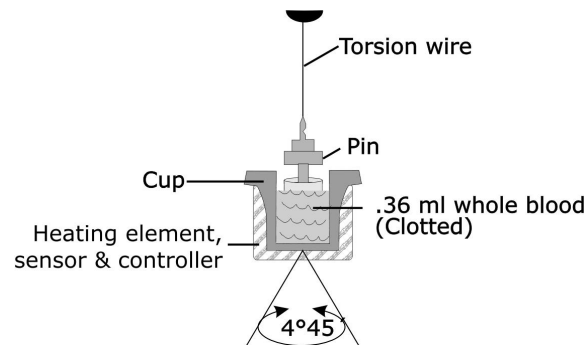
註一：成分課於收到「分離術捐血異常處理紀錄表」中「情況說明」為乳糜血時，需先將該表單與成品交技術督導，依血漿瑕疵判定標準 SP-B2-060-6.2 進行脂血判定。

註二：未設技術督導中心，由指定人員負責。

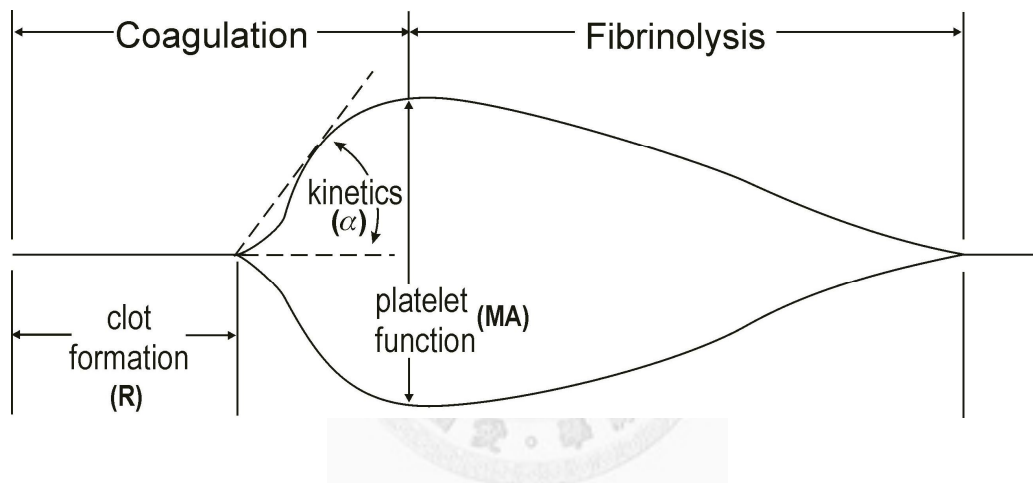
摘錄自台灣血液基金會標準作業文件表 SP-B2-060-6.3

附錄四、TEG 分析儀的原理

A、TEG 測試杯的設計



B、TEG 圖形參數



摘錄自 Haemoscope 公司 TEG 5000 User Manual 2007 操作手冊

附錄五、試劑與器材清單

一、試劑清單

品名	備註
Agarose	Infinigen
Ampicillin	BIOLOGICAL INDUSTRIES
Bio-100TM DNA Ladder	Protech Technology Enterprise
dNTP	Fermentas
Ethanol	台灣菸酒公賣局、Merck
Glycine	SIGMA
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck
MgCl ₂	Wako
NaCl	SIGMA
NaOH	和光純藥工業株會社
PBS	Ameresco
SSC	Ameresco
SSPE	Ameresco
SDS	Ameresco
Streptavidin-POD conjugate	Roche
Sucrose	SIGMA
TBE Buffer ready pack	Ameresco
Tris-HCl	Ameresco
Triton X-100	SIGMA
Tween-20	SIGMA
X-Gal	PROMEGA



二、抗體、試劑組

抗體	廠牌	Catalog number
FITC Mouse Anti-Human CD36	BD	555454
FITC Mouse IgM Kappa Isotype Control	BD	555583
PE Mouse Anti-Human CD42b	BD	555473
PE Mouse IgG1, κIsotype Control	BD	555749
PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD14	BD	557742

試劑組	廠牌
Gel/PCR DNA Fragments Extration Kit	Geneaid
TOPO TA cloning kit (含 pCR [®] 4-TOPO [®] vector)	Invitrogen
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid
PCR/Gel Clean UP Kit	Geneaid
Streptavidin-POD	Roche
TEG [®] Disposable Cups and Pins	Haemoscope
Lysing Buffer	BD

三、酵素、PCR buffer、其它耗材清單

酵素(enzymes)		廠牌
AmpliTaq [®]		Applied Biosystems
Proteinase K		Merck
Dream Taq [™]		Fermentas
10x PCR buffer		廠牌/cat. number
10x DreamTaq [™] buffer		Fermentas
KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgCl ₂		#B65
TaKaRa 10x PCR buffer		TaKaRa Bio INC
100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl ₂		R001A
其它耗材清單		
品名	廠牌	
感光底片	Kodak, BioMax Light Film	
尼龍膜	PerkinElmer, GeneScreen Plus Hybridization Transfer Membrane	

四、CD36 基因聚合酶鏈鎖反應引子序列

名稱	序列	備註
CD36E3.1	5'- AATAAAACATCTGTTACCATAC-3'	
CD36E3.2	5'- ATA AAGCAGGTAAATACAAAGC-3'	
CD36E4.1	5'- TGCAAACAATCTTCCAGAAGTG-3'	
CD36E4.2	5'- TAAGTACATTTCAATACAATGAC-3'	
CD36E5.1	5'- AGATCTAATGTTCACATATG-3'	
CD36E5.2	5'- GATTAATTACATGAGTTCTAG-3'	
CD36E6.1	5'- AGCTCAATATTAGCATTTAATC-3'	
CD36E6.2	5'- AGATCAGCAATAAGACTAATG-3'	
CD36E7.1	5'- AGTCATTTG AGTAACCAGTG-3'	
CD36E7.2	5'- CATACATGCACATTTTACCAG-3'	
CD36E8.1	5'- ATGGCATCAGGTACATTGC-3'	
CD36E8.2	5'- AACTGTGATGACCACAAAAC-3'	
CD36E9.1	5'-ACTTAGGCAGTTTGCATTAC-3'	
CD36E9.2	5'- GGACTTGATCGTTAATAGAC -3'	
CD36E10.1	5'- AGTTCAGGTTCTGGAATGC-3'	
CD36E10.2	5'- ATGGACTGTGCTACTGAGGT-3'	
CD36E11.1	5'- GACATATTACTGCCTGAAAGC-3'	
CD36E11.2	5'- CCAAATCAGATCAATAAGGTG-3'	
CD36E12.1	5'- CAAGTAACTCACAAATCTAAC -3'	
CD36E12.2	5'- AAGTGTGGATTTTTCCTTTCA -3'	
CD36E13.1	5'- AAAGGAAAAATCCACACTTG -3'	
CD36E13.2	5'- AGTAAAAATACCTTGTCAGG -3'	
CD36E13.4	5'- ATACGTTGAAAATAATTATGAAC -3'	偵測 1200(-5) 49bp inv
CD36E14.1	5'- GCCTTATAGATACTGATGAC -3'	
CD36E14.2	5'- ATGATCAGTGGCTAGACATG -3'	

五、CD36 基因序列特異性寡核苷酸探針序列

名稱	序列	備註
CD36 E5 329-330 AC del	5'-Biotin-GAGGACAACAGTCTCT	
CD36 E5 329-330 Normal	5'-Biotin-GAGGACAACACAGTCTCT	
CD36 E5 all	5'-Biotin-GTTGGAACAGAGGCTG	
CD36 E12 1163A	5'-Biotin-AACGGCTGCAGGTCAACCT	
CD36 E12 1163T	5'-Biotin-AACGGCTGCTGGTCAACCT	
CD36 E12 all	5'-Biotin-TGGTCAAGCCATCAGAA	
CD36 E13 1228-1239 del	5'-Biotin-GGAACTATCTTTGGCT	
CD36 E13 1228-1239 Nor	5'-Biotin-ATATTGTGCCTATTCT	
CD36 E13 all	5'-Biotin-GTATTAAAGAATCTGA	
CD36 E13 tatttg del	5'-Biotin-GAGGTTTGCAGCTGTT	
CD36 E13 A>G	5'-Biotin-TATTTTCAGCGTATAT	



六、重要儀器清單

實驗儀器	廠牌	型號
自動全血球計數儀	Nihon Kohden	MEK-6318J
血小板分離機	Haemonetics	MCS+ED
血小板恆溫振盪器	W-ESPR	PLTI-48PH-6E-35
桌上型離心機	Hermle	Z200A
桌上型低溫微量離心機	Hermle	Z233 MK-2
落地型冷卻離心機	KUBOTA	8800(轉軸：RS-3010)
微量離心管離心機	KUBOTA	1700(轉軸：RA-150AM)
水平震盪器	KS Orbital shaker	OS701
自動恆溫機	DENG YNG incubator	DB45
恆溫培養箱	KS Orbital shaking incubator	OSI500
聚合酶鏈鎖反應器 (PCR machines)	PEQLAB Biotechnologie GmbH	peqSTAR 96 Universal Gradient
分光光度計(NanoDrop)	J&H	ND-1000
血小板功能分析儀	Haemoscope	TEG 5000
流式細胞儀	Beckman Coulter	Epics-XL-MCL
流式細胞儀	BD	FACSCalibur
洗片機	Kodak	X-MOAT 2000 Processor
12x8 Dot Blot apparatus	Bio-Rad	
Gel dryer	Bio-Rad	Model 583

七、軟體及網路工具

名稱(版本)	開發單位/網址	用途
Chromas Lite(2.01)	Technelysium Pty Ltd	定序圖形檔顯示
DNAMAN(4.1.5.1)	全傑科技	序列分析、比對
Prizm(5.0)	GraphPad Software, Inc.	統計軟體
JMP(5.0.1)	SAS Institute Inc	統計軟體
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	網路基因資料庫
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html	網路基因資料庫



八、試劑配方

1. TA cloning

	LB broth	LB plate
deionized H ₂ O	to 950 ml	to 450 ml
bacto-tryptone	10 g	5 g
bacto-yeast extract	5 g	2.5 g
NaCl	10 g	5 g
Bacto-agar (for plate)	15 g	0
total volume	1000 mL	500 mL

Ampicillin 終濃度: 150 μ g/mL

2. DNA extraction

2.1. 1X RBC Lysis Buffer (5 liter)

材料	用量	Final concentration
Sucrose (M.W.=342.3)	547.68g	0.32M
Triton-X100	50ml	1%
1M Mg ₂ Cl-6H ₂ O	25ml	5mM
1M Tris-HCl, pH 7.5	60ml	12mM

加水稀釋至 5L，分裝滅菌，冷卻後 4°C 保存。

2.2. Proteinase K Stock (10mg/ml)

材料	用量
Proteinase K	100mg
10mM Tris-HCl pH 7.5	10ml

分裝後-20°C 保存

2.3. 5X Proteinase K buffer (50ml)

材料	用量	Final concentration
2M NaCl	9.375ml	0.375M
0.5M EDTA (pH 8.0)	12ml	0.12M
ddH ₂ O	28.625ml	
total volume	50ml	

0.45μm 濾膜過濾後，室溫保存。

2.4. Mixed Proteinase K buffer (700 μl for each specimen)

材料	用量	Final concentration
5X PK buffer	160 μl	1X PK buffer
Proteinase K (10mg/ml)	40 μl	0.5mg/ml
10%SDS	80 μl	1%SDS
ddH ₂ O	420 μl	
total volume	700 μl	

3. Dot blot-Hybridization

3.1. Hybridization buffer(1~5X SSPE , 0.5% SDS)

材料	5X	4X	3X	2X	1X
20X SSPE	125ml	100ml	75ml	50ml	25ml
10%SDS	25ml	25ml	25ml	25ml	25ml
ddH ₂ O	350ml	375ml	400ml	425ml	450ml
total volume	500ml	500ml	500ml	500ml	500ml

3.2. Wash buffer

材料	用量	Final concentration
20X SSPE	2.5ml	0.1X SSPE
10%SDS	5ml	0.1% SDS
ddH ₂ O	492.5ml	
total volume	500ml	

3.3. 變性溶液 (Denature Buffer)

材料	用量	Final concentration
500mM(0.5M)EDTA	25ml	25mM EDTA
5N NaOH	40ml	0.4N NaOH
ddH ₂ O	435ml	
total volume	500ml	

3.4. 2X SSC

材料	用量	Final concentration
20X SSC	50ml	2X SSC
ddH ₂ O	450ml	
total volume	500ml	

附錄六、實驗步驟

【實驗步驟 1】 以流式細胞儀偵測血小板上 CD36 的表現

1. 將分離術捐血前 CBC 檢測所剩餘的 3ml EDTA 全血試管於室溫保存。
2. 以 2,100rpm(700g)的轉速離心 9 分鐘，所得上層液即為血小板懸浮血漿(PSP)。
3. 取 10 μ L PSP，分別加入 1 μ L 的 FITC Mouse Anti-Human CD36 及 PE- Mouse Anti-Human CD42b，避光於 37°C 反應 15 分鐘。
4. 以 PBS 將體積調整成 500 μ L 後上流式細胞儀(Beckman Coulter EpicsXL)。
5. 以 EXPO32 ADC 軟體進行分析。



【實驗步驟 2】 以流式細胞儀偵測單核球上 CD36 的表現

1. 將因取 PSP 而分層的 3ml K2 EDTA 全血混合均勻。
2. 取 50 μ L 的全血。
3. 加入 5 μ L 的 FITC Mouse Anti-Human CD36 及 4 μ L PE-Mouse Anti-Human CD14，於室溫反應 15 分鐘。
4. 加入 450 μ L 含有 1X BD Pharm Lyse™ lysing solution 的 PBS。
5. 避光於室溫每分鐘 80 下搖盪 15 分鐘，將紅血球溶解後上流式細胞儀(BD FACSCalibur)。
6. 以 CellQuest 軟體圈行分析。
7. 將剩餘的 3ml K2 EDTA 全血放於 4°C 冰箱保存，於一週內純化其 DNA。



【實驗步驟 3】 從血液純化 DNA

1. 將分離式捐血人 3ml EDTA 全血加入適量的 1X RBC lysis buffer，混合均勻後，室溫下 3,000rpm 離心 10 分鐘。
2. 倒除上清液部份，再次加入 RBC lysis buffer 清洗殘存紅血球，使用震盪混合器 (Vortex) 打散細胞沉澱後，室溫下 3,000rpm 離心 10 分鐘。
3. 倒除上清液部份，觀察細胞沉澱之色澤，若有明顯紅色殘留則重複步驟 2 一次。
4. 將 700 μ l mixed Proteinase K buffer 加入細胞沉澱，打散後混合液移入 1.5ml 微量離心管，置於 37°C 孵育箱中以旋轉混合器緩速混合作用 24 小時。
5. 取出檢體冷卻至室溫，加入 6M NaCl 250 μ l，vortex 混合至均勻。
6. 以桌上型低溫微量離心機 4°C 13000rpm 離心 10 分鐘。
7. 上清液移至新的微量離心管後，以桌上型低溫微量離心機 4°C 13000rpm 離心 10 分鐘。
8. 將上清液分裝至兩個新的微量離心管(約各 450 μ l)，各加入等量(450 μ l) isopropanol，緩慢搖晃混合均勻，室溫下靜置 20 分鐘待 DNA 完全析出。
9. 以桌上型低溫微量離心機 4°C 13,500rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 70% ethanol 250 μ l 輕拍清洗 DNA 沉澱物。
10. 以桌上型低溫微量離心機 4°C 13,500rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，DNA 沉澱物靜置於室溫待其風乾，以適量滅菌過的 ddH₂O 回溶。
11. 完全溶解後，取 2 μ l DNA 樣品進行 1% 洋菜膠電泳確認 DNA 品質。
12. 以 Nanodrop 定量 DNA 濃度，分裝少量稀釋為 100ng/ μ l，保存於 4°C 備用；stock 保存於 -30°C。

【實驗步驟 4】 以 Narodrop 定量 DNA

1. 每一次從主畫面選擇樣品種類後，必須先進行空白對照才能開始樣品檢測。
2. 打開取樣臂，取 1-2.5 μl 空白樣品滴於測量平台上(所謂空白樣品，就是樣品的溶劑，一般核酸樣品常溶於二次水或 TE buffer)。
3. 闔上取樣臂。
4. 單擊軟體中 Blank 的按鈕，程式會測量 1 mm 與 0.2 mm 兩種光徑下的值，並自動記錄空白值。
5. 測量完成後，打開取樣臂，將乾淨的無塵紙(例如：Kimwipe)折成 2、3 折後，以單一方向擦拭上下測量平台上的空白對照用溶劑。
6. 測量檢體，步驟同上。



【實驗步驟 5】 PCR 產物純化

1. 於 PCR 產物內加入 5 倍體積的 DF Buffer (PCR 產物有 25 μ l, 即加入 125 μ l), 並混勻。
2. 將 DF Column 置 2ml Collection Tube 上, 並將步驟 1 之混合物加至 DF column 內, 13,000rpm 離心 30 秒鐘, 丟棄離下來的溶液。
3. 加入 600 μ l Wash Buffer 至 DF column 內, 靜置 1 分鐘後再 13,000rpm 離心 30 秒鐘, 丟棄離下來的溶液後再 13,000rpm 離心 3 分鐘。
4. 將 DF column 放置新的 1.5ml 微量離心管上, 加入 25 μ l Elution Buffer (預熱至 60°C) 後, 靜置 2 分鐘, 再 13,000rpm 離心 2 分鐘, 所得溶液即為 DNA 溶液。



【實驗步驟 6】 CD36 基因第三至第十四轉錄子區域聚合酶鏈鎖反應

一、配置混合液 (for each sample)

材料	體積(μl)	終濃度
template	1	--
ddH ₂ O	22.465	--
Dream 10x PCR buffer	3	1×
2.5mM dNTPs	2.4	0.2mM
10μM Forward primer	1	0.3μM
10μM Reverse primer	1	0.3μM
Dream Taq™ (5 units/μl)	0.135	0.675 unit
Total	30	--

二、PCR 溫控程式設定

Hot start	Denature	annealing	extension	final extension
94°C 1 min	94°C 1 min	溫度隨轉錄子區域而不同 1 min	72°C 30 sec	72°C 10 min
35 cycles				

三、不同 CD36 轉錄子區域之 annealing 溫度

轉錄子區域	annealing 溫度°C	轉錄子區域	annealing 溫度°C
Exon 3	50	Exon 9	48
Exon 4	50	Exon 10	52
Exon 5	53	Exon 11	51
Exon 6	48	Exon 12	52
Exon 7	48	Exon 13	51
Exon 8	48	Exon 14	50

【實驗步驟 7】 1200(-5) 49bp inv 篩檢

一、配置混合液 (for each sample)

材料	體積(μl)	終濃度
template	1	--
ddH ₂ O	21.465	--
Dream 10x PCR buffer	3	1×
2.5mM dNTPs	2.4	0.2mM
10μM CD36 13.1(Forward)	1	0.3μM
10μM CD36 13.2(Reverse)	1	0.3μM
10μM CD36 13.4(Reverse)	1	0.3μM
Dream Taq™ (5 units/μl)	0.135	0.675 unit
Total	30	--

二、PCR 溫控程式設定

Hot start	Denature	annealing	extension	final extension
94°C	94°C	50°C	72°C	72°C
1 min	1 min	1 min	30 sec	10 min
35 cycles				

三、PCR 產物洋菜膠電泳

正常的基因型只會有 530bps 和 216bps 兩條 bands，若是帶有 1200(-5) 49bp inv 的基因型，則會產生長度 375bps 的 band。

【實驗步驟 8】 TA cloning

1. 若 PCR 產物為當天反應完成，則無須加 A tail。

材料	體積(μl)
PCR 產物	6
ddH ₂ O	1.8
TaKaRa 10x PCR buffer	1
10 mM dATP	1
TaKaRa Taq TM (5 units/μl)	0.2
Total volume	10

2. TOPO Cloning reaction:

材料	體積(μl)
PCR product 或加 A 產物	4
salt solution	1
TOPO vector	1
Total volume	6

將上述表格內各項混合均勻，置於室溫 20 分鐘。

3. 將上述 6μL 全部加入溶至碎冰狀的 DH5α 中，靜置冰上 30 分鐘。
4. 插入 42°C 水浴中 Heat shock 1 分鐘，馬上插回冰上 1-2 分鐘。
5. 加入 800μL LB broth，240rpm 37°C 培養 1.5 小時。
6. 取 100μL 塗於 selective plate (1/10)，剩餘菌液 13000rpm 離心 30 秒，吸去上清液，留 100μL 拍散細胞，塗於第二片 selective plate (9/10)。

*selective plate: 將 36μL 50 mg/mL X-gal 與 40μL 100 mg IPTG 塗於含有 150μg/mL Ampicillin 的 LB plate，37°C 烘乾。

7. 將 selective plate 靜置於 37°C 培養箱、培養 16~18 小時。
8. 先將 1 ml LB broth 加入 3ul ampicillin (50mg/ μ l)，再加入一顆白色 colony。
以 300rpm、37°C，培養 16~18 小時。



【實驗步驟 9】 抽 plasmid DNA (mini-prep.)

1. 將隔夜培養之菌液以 3000rpm 離心 10 分鐘後，扣乾
2. 加入 200 μ l PD1 Buffer，使之重新成懸浮液。
3. 加入 200 μ l PD2 Buffer 後翻轉試管 10 次（切勿 vortex！）。
4. 加入 300 μ l PD3 Buffer 並立即翻轉 10 次（切勿 vortex！），全速離心 3 分鐘。
5. 將 PD column 放在 2ml collection tube 上，將步驟 4 之上輕易加入 PD column 後離心 30 秒鐘，丟棄離心下來之溶液。
6. 加入 400 μ l W1 Buffer 至 PD column，全速離心 30 秒，丟棄離心下來之溶液，再加入 600 μ l Wash Buffer 至 PD Column，全速離心 30 秒，丟棄離心下來之溶液，再離心 3 分鐘。
7. 將 PD column 放置新的 1.5ml 微量離心管上，加入 50 μ l Elution Buffer（預熱至 60°C）後，靜置 2 分鐘，再全速離心 2 分鐘。

【實驗步驟 10】 Dot blot-Hybridization

- 1.將每個 PCR 產物取出 16 μ l 置入塑膠管中，按照工作單上次序擺到塑膠管盒中。
- 2.在每個塑膠管中加入 100 μ (150 μ) 變性溶液 (Denature Buffer) 以使雙股 DNA 變性成單股 DNA(至少 20 分鐘，但不可超過 40 分鐘)。
- 3.將尼龍膜(8 \times 12cm Nylon paper 先剪掉一角，缺角對缺角) 淨泡於 2X SSC 中，之後放入 Dot blot set 中，抽氣 10 分鐘。
- 4.以微量吸管取 56 μ l 已靜置 20~40 分鐘之檢體，放入 Dot blot set 中，抽氣 15 至 20 分鐘。
- 5.將尼龍膜取出放入 3M 紙內壓乾，以 gel dryer 烘乾至少 15 分鐘。
- 6.將尼龍膜用保鮮膜包好，置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
- 7.點完 DNA 的尼龍膜，使用前需以含有 10% SDS 的沸水浸泡 15 分鐘。
- 8.將 hybridization buffer(1X~5X SSPE, 0.5%SDS), wash buffer(0.1X SSPE, 0.5%SDS) 放在水浴槽中 15 至 20 分鐘直到其溫度上升到探針結合所需之溫度。
- 9.將尼龍膜浸泡於 50ml hybridization buffer 中，並置於恆溫震盪箱中以保持探針結合所需之溫度 10 至 15 分鐘。
- 10.將 50ml hybridization buffer 倒掉，再加入混有 20 μ l 探針及 6 μ l conjugated 的 50ml hybridization buffer，並置於恆溫震盪箱中以保持探針結合所需之溫度 10 至 15 分鐘。
- 11.將 50ml hybridization buffer 倒掉，加入 50ml wash buffer 並置於恆溫震盪箱中以保持探針結合所需之溫度 10 至 15 分鐘。
- 12.將尼龍膜取出，浸泡於 1X PBS 中 15 分鐘。
- 13.將尼龍膜取出，浸泡於 ECL kit 中 1 分鐘後，放入 3M 紙內以吸乾多餘 ECL。
- 14.將尼龍膜以 X 光感片顯影。

【實驗步驟 11】 全血 TEG 試驗

- 1.利用 MCS 分離式耗材的取樣袋收集 3ml 的全血於 3ml Coagulation sodium citrate 3.2%試管中，於兩小時內進行 TEG 實驗。
- 2.依照機器的說明，將測試杯正確放置於機器的杯架上。
- 3.於杯中加入 20 μ L 0.2mmol/L CaCl_2 ，再從試管中取出 340 μ L 的全血加入杯中。
- 4.升起杯架，將 Lever 桿移到測試的位置。
- 5.按下操作軟體的”start”鍵開始測定。

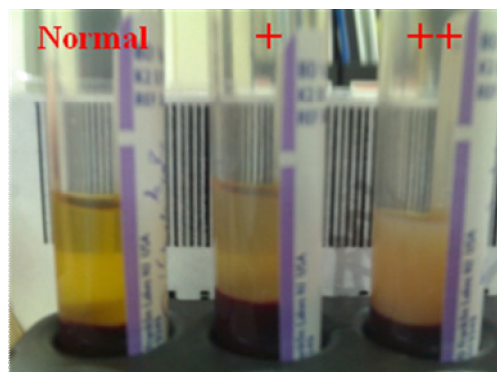


【實驗步驟 12】 血小板濃厚液 TEG 試驗

1. MCS 分離式捐血收完成品當日將殘餘在 MCS 耗材中的血小板濃厚液，經由耗材中的管路流至緩衝血袋中。
2. 將血袋靜置於 22℃ 恆溫箱中 1 小時。
3. 將血袋置於 22℃ 恆溫箱中的震盪器上，以 70 下/分鐘的頻率震盪保存。測定第 1、5、7、9 天這四天的血小板計數和功能功能。
4. 每次測試時將一管混合的 PPP 由 -20℃ 冰箱取出，使其自然回溶至室溫。
5. 將暫存血小板濃厚液的血袋由恆溫搖盪器中取出，於用 70% 酒精消毒過的換藥車檯面上，將約 500 μ L 的血小板濃厚液流入 1.5ml 的微量試管中。
6. 以 Nihon Kohden 6318J 全血計數儀測試其所含血小板的計數及平均血小板體積(MPV)。
7. 以回溫的混合 PPP 將血小板濃厚液調整成血小板濃度約 $(2-3) \times 10^5 / \mu\text{L}$ 。
8. 依照機器的說明，將測試杯正確放置於機器的杯架上。
9. 於杯中加入 20 μ L 0.2mmol/L CaCl_2 。
10. 從微量試管中取出 340 μ L 的 PRP 加入杯中。
11. 升起杯架，將 Lever 桿移到測試的位置，按下操作軟體的”start”鍵開始測定。

【實驗步驟 13】 捐血人血漿脂血檢測

- 1、將測試過 CBC 之 EDTA 全血試管放置於離心機對稱平衡的位置(試管標籤朝外)。
- 2、離心轉速 3000rpm，時間 1 分鐘。
- 3、將分層之血漿以脂血格線比對判斷乳糜血的程度，若透過血漿無法看到格線則無法捐血(如下圖右側試管)。



脂血比較圖

附錄七、捐血人飲食用藥習慣對血小板功能影響問卷

親愛的捐血朋友您好，歡迎您參與本研究計畫，本計畫的目的為探討基因的變異對血小板功能的影響，但是一些日常的飲食用藥也有可能會影響到血小板，因此設計了此問卷，感謝您熱心的作答。

一、基本資料(請打√)：

1. 捐血卡號：_____
2. 血型：☐A ☐B ☐O ☐AB
3. 性別：☐男 ☐女
4. 年齡：☐17~30 歲 ☐31~40 歲 ☐41~50 歲 ☐51~60 歲 ☐60 歲以上
5. 族群：☐閩南人 ☐客家人 ☐其他_____
6. 捐血次數：☐100 次以內 ☐100~300 次 ☐300~500 次 ☐500 次以上
7. 最近一次分離式捐血間隔：☐2 週 ☐一個月 ☐一個半月 ☐兩個月 ☐三至六個月
8. 最近一年分離式捐血次數：☐21~24 次 ☐10~20 次 ☐10 次以下

二、飲食習慣(請打√)：

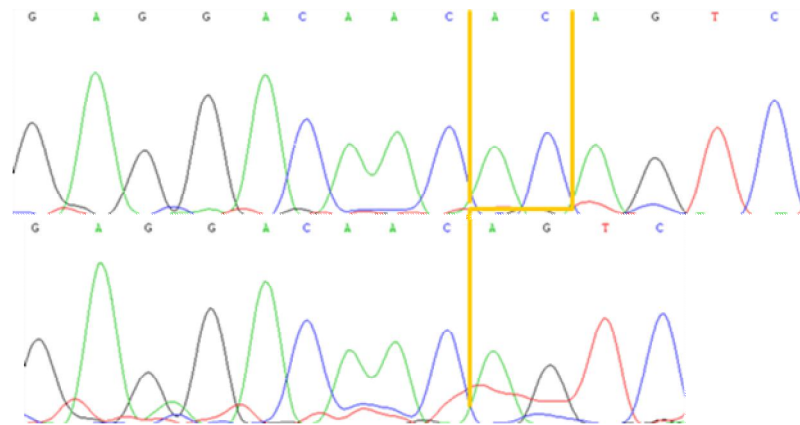
1. 請問有吸菸的習慣嗎？☐是 ☐否
2. 請問有飲酒的習慣嗎？☐是 ☐否 ☐偶爾
3. 請問吃素或葷食的習慣？☐全素 ☐蛋奶素 ☐葷食
4. 請問有服用健康食品的習慣嗎？☐是 ☐否(若勾「否」，請跳第 6 題)
5. 請問最近一週內有服用過下列哪些健康食品?(可複選)
☐銀杏 ☐當歸 ☐人參 ☐枸杞 ☐四物 ☐大蒜膠囊 ☐善存 ☐VitB 螺旋藻 ☐巴西蘑菇 ☐葡萄籽 ☐維骨力 ☐魚油 ☐綜合維他命 ☐金線蓮 ☐苦茶 ☐青草茶 ☐七葉蘭 ☐靈芝 ☐其他_____ (請填健康食品名稱)
6. 請問最近一週內的飲食中常吃的食物(超過三次)有包含下列哪些?(可複選)
☐大蒜 ☐洋蔥 ☐薑 ☐木耳或菇類食物 ☐菠菜、甘藍菜及綠色花椰菜
☐辣椒 ☐苦瓜 ☐高純度巧克力 ☐麥芽汁 ☐綠茶 ☐藍莓 ☐櫻桃
☐紅色/紫色葡萄產品(葡萄汁，紅葡萄酒，葡萄乾) ☐葡萄
☐山楂 ☐魚類 ☐海參 ☐其他_____

三、日常用藥(請打√)：

1. 請問最近一週內有服用下列哪些藥物?(可複選)
☐阿斯匹靈(Aspirin) ☐百服寧(Bufferin) ☐其他非類固醇類之抗發炎藥(如 Acemetacin, Piroxicam) ☐心臟用藥如 Dipyridamole (Persantin 百靈佳) ☐胃藥 ☐胃乳(片) ☐運功散 ☐正露丸 ☐黃蓮丸 ☐六神 ☐胃散 ☐利尿劑 ☐減肥茶(藥丸) ☐促孕劑 ☐痛風藥物 ☐普拿疼 ☐肌肉鬆弛劑 ☐抗憂鬱藥(鋰鹽) ☐鎮靜劑 ☐精神安定劑 ☐口服避孕藥 ☐鎮靜劑 ☐降血脂藥 ☐抗高血壓藥物 ☐口服降血糖劑 ☐口服雌性荷爾蒙 ☐其他_____ (請填藥物名稱)

附錄八、基因變異序列圖

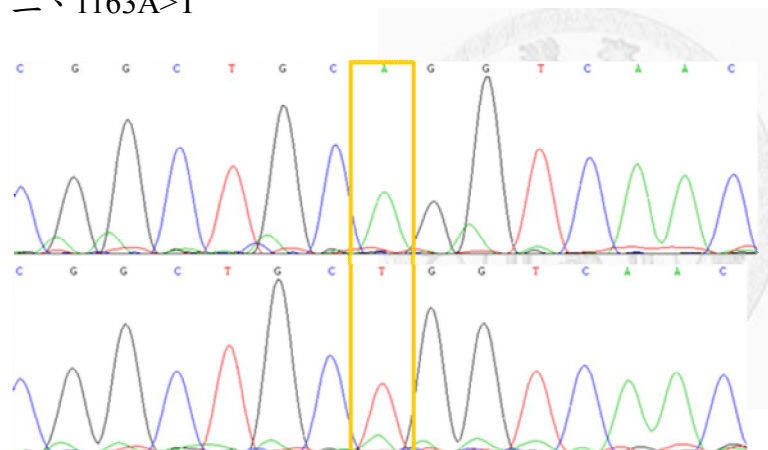
一、329AC del



Wild type

329AC del

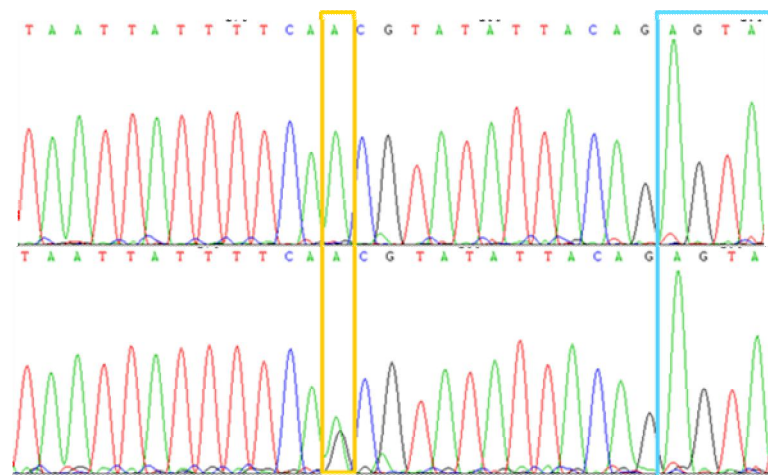
二、1163A>T



Wild type(1163A)

1163T

三、1200(-13) A>G

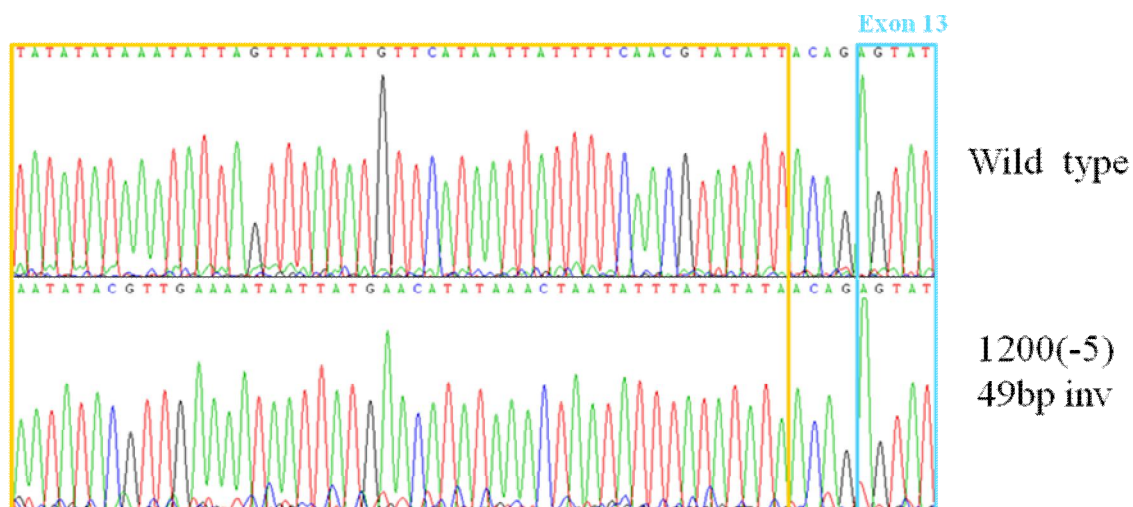


exon 13

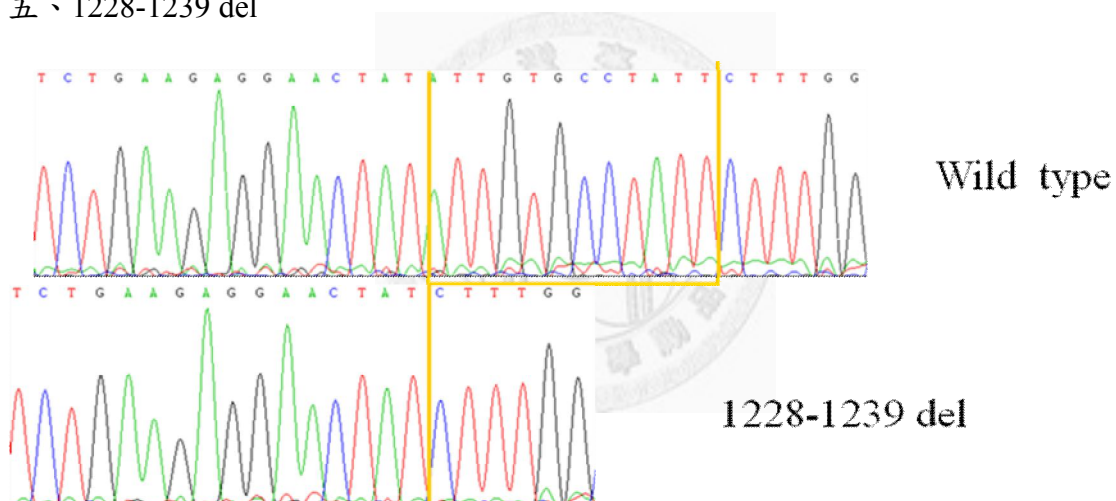
1200(-13) A

1200(-13) A/G

四、1200(-5) 49bp inv



五、1228-1239 del



六、1254(+6) TATTTG del

