

区域极性增强、疏水性减弱的错误结论。而ANS和脱辅基血红蛋白结合常数的测定是相当麻烦的。而在毫微秒荧光技术中,荧光寿命与荧光物质分子的多少、荧光标记物的结合常数大小都是无关的,因此就不会产生上述问题。

Stryer 指出^[6] ANS和脱辅基血红蛋白的亲合能力在pH低于5时有明显的减弱。在pH10时,ANS-脱辅基血红蛋白荧光较pH7时,减弱了24%,而荧光寿命却有所延长,量子产率增加,因此我们认为在pH10时ANS-脱辅基血红蛋白的结合力发生很大的变化。

在ANS和脱辅基血红蛋白的结合反应中,ANS是过量的,但我们并没有除去过量的ANS,

这是因为ANS在水中的量子产率仅0.004,荧光寿命仅0.55ns,因此,它对ANS-脱辅基血红蛋白的荧光寿命的影响是完全可以忽略的。

参 考 文 献

- [1] Yuerabid. J.: *Methods in Enzymology*, 26, Part C, 498, 1972.
- [2] 阮康成、江寿平等:《毫微秒脉冲荧光计》《生物化学与生物物理学报》(待发表)。
- [3] Famelli.: *Biochemi. Biophys. Acta*, 30, 608, 1958.
- [4] Weber, G.: *J. B. C.*, 239, 1424, 1964.
- [5] A. 怀特等:《生物化学原理》, (中译本), 科学出版社, 1979年, 第118页。
- [6] Stryer, L.: *J. Mol. Biol.*, 13, 482, 1965.

[本文于1981年8月26日收到]

细胞电泳观察 ADP 对血小板和红细胞表面的作用

施永德 梁子钧 步燕芳 唐镇生 肖保国 吕传真

(上海第一医学院)

血小板是止血和血栓形成的主要成分和激发因素之一^[1]。随着血小板生理功能研究的进展,有关它在心肌梗塞和动脉硬化性脑梗塞等病发作中的作用,已逐步引起注意^[2]。研究血小板功能常用聚集、粘附和比浊等方法^[3],但至今用细胞电泳观察ADP对血小板和红细胞表面的作用,以及观察血小板表面电荷变化对其粘聚行为间的关系的报道甚少。本文报道我们就这个问题所作的探讨。

方 法 和 结 果

1. 血小板和红细胞悬液制备

用硅油化器皿采血,肝素抗凝,300 × g离心10分钟,上清液即含丰富血小板血浆。用自身血浆稀释之,获取含2万个/立方毫米浓度的血小板悬液。为了平行观察红细胞的作用,在其中加入适量红细胞,使其浓度为5000个/立方毫米。

2. ADP 浓度的选择和电泳观察方法

将正常人和脑梗塞病人血小板血浆中,加入ADP(西德Boehringer Mannheim产品)使之最终浓度为0.5, 1, 2, 4, 30, 75和150微克/毫升。作用10分钟测定血小板电泳减缓率。

$$\text{减缓率} = \frac{t_{\text{ADP}} - t_0}{t_0} \times 100\%, \text{式中 } t_{\text{ADP}} \text{ 示 ADP}$$

作用下血小板电泳时间, t_0 为无ADP的电泳时间。系采用梁子钧等设计的细胞电泳装置^[5]。为了同时观察血小板和红细胞两者的电泳时,采用两个电子计时器^[6]间隔记时。血小板和红细胞各观察10个,记录它们在静止层上往返33微米所需时间。各种ADP浓度作用10分钟后的电泳减缓率见图1。与正常人比较,脑梗塞病人在较低浓度时就出现减缓。在4—30微克/毫升时,两者有较大区别,故本文采用这一区间的浓度。在高浓度时两者均达最大减缓。

3. ADP 作用时间的选择

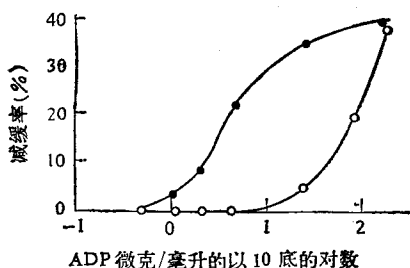


图 1 ADP 浓度与血小板电泳减缓率间关系
(○ 示健康人 ● 示脑梗塞病人)

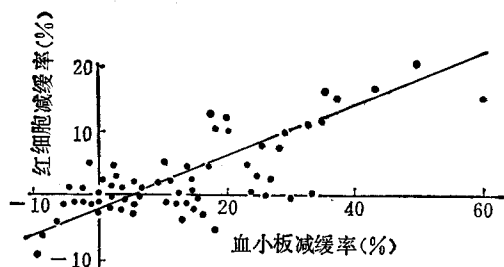


图 2 ADP 诱导后血小板与红细胞电泳减缓率的关系
相关系数 $r = 0.7$ ($P < 0.01$)
回归方程为 $y = 0.32x - 1.66$

将脑梗塞病人血小板在 ADP 为 4 和 30 微克/毫升浓度下分别作用 5, 10, 15 和 20 分钟, 其电泳率在 10, 15 和 20 分钟时已达最大减缓, 故本文定 ADP 作用 10 分钟后测定。

4. 血小板和红细胞经 ADP 诱导后电泳减缓率的比较

从表 1 可见, ADP 诱导血小板电泳减缓

率, 在脑梗塞、TIA (一过性脑缺血发作) 和冠心病病人中多数人比正常人高, 其平均数显示统计学上的明显区别。而 ADP 诱导红细胞的电泳减缓率, 仅冠心病病人统计学上有区别。从图 2 可见, ADP 诱导血小板和红细胞的电泳减缓率之间存在着相关性, 相关系数 $r = 0.71$, $P <$

表 1 ADP 诱导四组不同人的血小板和红细胞电泳减缓率的比较*

编 号	红 细 胞	血 小 板	编 号	红 细 胞	血 小 板	编 号	红 细 胞	血 小 板
1	-1	-6	23	0	12	45	11	31
2	4	17	24	2.5	25	46	16.5	35
3	0.5	33	25	0.5	0	47	13	17
4	15	60	26	0	2	48	11	2
5	2	10	27	-6.5	18	49	-1	9
6	-2.5	13	28	-3	2.2	50	1	-3
7	-4.5	13	29	0	24	51	-3	5
8	-1	14	30	-12	-10.5	52	-3	0
9	-0.5	-3	31	9.5	29	53	-3	2
10	-0.5	25	32	10.9	31	54	4	2
11	-3	15	33	17.0	35	55	2	2
12	-3	-2.5	34	12.9	17	56	5	-2
13	-0.5	-4	35	10.9	17.1	57	0	3
14	-0.5	30	36	-2	4	58	5	1
15	-2.5	10	37	7	28	59	5	10
16	-4	15	38	7	23	60	-1	5
17	4.5	23	39	3	12	61	-2	0
18	0	3.5	40	2	12	62	2	0
19	20	49	41	0	12	63	0	-3
20	2.5	25	42	-1	11	64	-8	-9
21	16	43	43	-3	2			
22	0	3	44	-6	-8			

* 各组红细胞和血小板的平均值和标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 为: 1—35 脑梗塞, 2.39 ± 1.22 ($P > 0.05$), 16.59 ± 2.74 ($P < 0.01$); 36—44TIA, 0.78 ± 1.47 ($P > 0.05$), 10.67 ± 3.59 ($P < 0.05$); 45—48 冠心病, 12.88 ± 1.3 ($P < 0.001$), 25.00 ± 4.69 ($P < 0.001$); 1—48 三组病人, 3.00 ± 1.03 ($P > 0.05$), 16.18 ± 2.16 ($P < 0.001$); 49—64 正常人, 0.19 ± 0.90 , 1.75 ± 1.13 。以上 P 值均与正常人相比。以上四组间进行了方差分析: 结果为红细胞 $F = 5.0$, 血小板 $F = 6.5$, $n_1 = 3$, $n_2 = 60$ 均显示四组间有明显区别。本表采用 ADP 浓度为 30 微克/毫升。

表 2 9 例脑梗塞病人丹参治疗后, ADP 诱导电泳减缓率的变化*

例 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均值±标准误
治 前	47	13.4	21	15	11	11	6.6	32.5	27.8	20.59±4.34
治 后	12.5	-6	13	6	5	13.9	1.0	8.9	21.7	8.44±2.70
差 值	34.5	19.4	8	9	6	-2.9	5.6	23.6	6.1	12.15±3.83 $P<0.05$

* ADP 浓度=30 微克/毫升

0.01,某回归方程为 $y = 0.32x - 1.66$ (如将这些数据分组进行直线回归,则脑梗塞组 $r = 0.73$, $y = 0.33x + 3.1$; TIA 组 $r = 0.96$, $y = 0.39x + 3.43$; 冠心病组 $r = 0.53$, $y = 0.15x + 9.2$; 正常人组 $r = 0.48$, $y = 0.371x - 0.32$ 。以上四组的相关系数除了冠心病以外,其余三组均为 $P < 0.01$ 或 0.05 。我们认为这与所作冠心病组例数过少有关)。用方差分析表明以上四组间的红细胞和血小板的减缓率间有明显区别。

5. 丹参治疗前后 ADP 诱导血小板电泳率的变化

结果如表 2。9 例脑梗塞病人经丹参治疗后,其减缓率明显下降。

讨 论

1. 用血小板电泳方法,检查 ADP 激发血小板表面所发生的生理反应,不需要十分贵昂的仪器,只需简便的方形毛细管式细胞电泳装置。在分离血小板的纯度上,也要求不高,即是血小板中有一定数量红细胞,也不会影响实验结果;此外,所需血小板量很少,每次实验仅需 0.2 毫升血小板悬液,而所得结果,既能区别某些疾病与正常人间差异,也能反映红细胞和血小板之间一定程度的相关性。

2. ADP 诱导血小板电泳减缓试验,对于诊断各种缺血性血管病血小板功能异常性有一定的参考价值。这可能对临床应用抗血小板凝聚性药物有一定指导意义,而且可做为评价可改善血小板凝聚功能的各种药物的一个动态观察指标。

3. 本实验结果表明血小板和红细胞表面均有 ADP 的受体,但数量差异明显。不论是正

常人或是缺血性血管病病人的血小板表面,其单位面积上具有的 ADP 受体,均比红细胞上的多得多。如果把血小板和红细胞均看做球体,直径分别为 $2\mu\text{m}$ 和 $8\mu\text{m}$,且 ADP 诱导血小板电泳减缓率与受体数成正比,那么正常人血小板表面单位面积上所具有的 ADP 受体比他们自身红细胞的大 146 倍;而三组病人血小板单位表面上的 ADP 受体比正常人的红细胞大 1361 倍。

相同的是不论是血小板,或是红细胞表面,均有 ADP 的受体,均可受 ADP 诱导电泳减缓。当血小板表面受体增加时,红细胞表面受体也相应增加,故两者电泳率呈一定程度的相关性。但以往谈到 ADP 对血细胞的作用,仅仅注意到对血小板的作用的重要性,而忽视了红细胞的类似作用。本文资料表明红细胞表面也有可观的 ADP 受体。大体上说,似乎可以从一种减缓率推知另一种减缓率,但因红细胞的数值变异系数增大,从红细胞推知血小板似不准确,从血小板电泳减缓率推知红细胞电泳减缓率似乎是可行的。

参 考 文 献

- [1] Weiss, H. J.: *The New Eng. J. Med.*, **293**, 531, 1975.
- [2] Gentem, E. et al.: *The New Eng. J. Med.*, **293**, 1174, 1296, 1975.
- [3] Mustard, J. F. et al.: *Pharmacol. Rev.*, **22**, 97, 1970.
- [4] 李承珠等:《上海第一医学院学报》,1979 年,第 6 期,第 144 页。
- [5] 梁子钧、施永德等:《生物化学与生物物理学报》,1979 年,第 11 期,第 199 页。
- [6] 梁子钧等:《生理学报》,1980 年,第 36 卷,第 92 页。

[本文于 1981 年 9 月 22 日收到]