

用核孔滤膜过滤法研究红细胞的变形性

王世成 崔浣华 吴日升

(中国科学院高能物理所, 北京)

张之南 肖 威 李德高

(北京协和医院)

正常红细胞有很大的变形能力, 因此能够通过比本身小得多的微孔和微血管。若红细胞因病变, 变形能力减少, 则不能或较难通过上述微孔, 这样就会影响血流及红细胞的运氧功能。红细胞通过微孔的能力——可滤过性, 能反映出红细胞的变形性。孔径均匀, 孔形规则的核孔滤膜是测定红细胞可滤过性的理想滤膜。用它研究红细胞可滤过性, 方法简单, 能为研究某些缺血性疾病的发生机理提供重要资料^[1-5]。

一、方法原理

在一定的负压下, 将红细胞悬浮液通过孔径 5 微米的核孔滤膜, 测量红细胞悬浮液的滤速 FR (Filtration Rate) 和红细胞压积 PCV (packed cell volume) 按(1)式计算红细胞的滤速 EFR (Erythrocyte Filtration Rate):

$$EFR = FR \cdot PCV \dots \dots (1)$$

EFR 值是红细胞可滤过性的量度, 我们把 EFR 值作为衡量红细胞变形性的指数, EFR 值愈大, 说明红细胞的变形能力愈大。

二、实验方法

1. 过滤装置 (见图 1)

用 50 ml 注射器抽出真空贮槽内的空气, 使系统保持负压。水柱上升高度是系统内负压大小的量度。装置的接头部分用玻璃磨口连接, 以保证系统有良好的密封性。

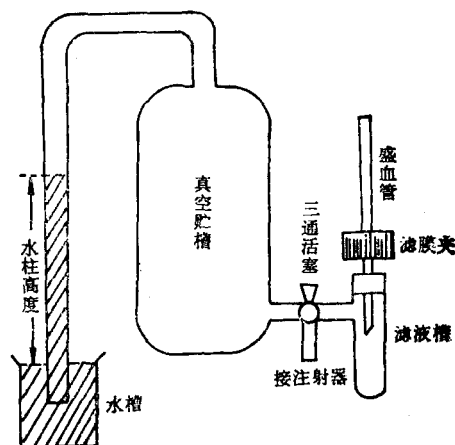


图 1 过滤装置的示意图

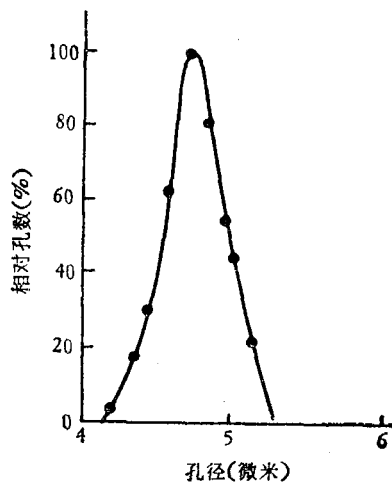


图 2 核孔滤膜的孔径分布

2. 核孔滤膜: 它是用反应堆的中子照射浓

[9] Capel M. et al.: 同文献 [3] pp. 1029—1043, 1982.

[10] 丁家炳等: 《遗传》, (5), 39—41, 1980.

[本文于 1985 年 7 月 17 日收到]

缩铀靶所产生的裂变碎片轰击聚碳酸酯塑料膜,然后将聚碳酸酯塑料膜置于温热的氢氧化钠溶液中蚀刻一定时间得到的。实验中所用的核孔滤膜的平均孔径为 4.75 ± 0.10 微米,孔密度为 $4-5 \times 10^5$ 孔/厘米²,孔径的变化小于 20%。滤膜厚度为 7—8 微米。膜的孔径分布见图 2。红细胞在滤膜上的扫描电镜照片见图 3。

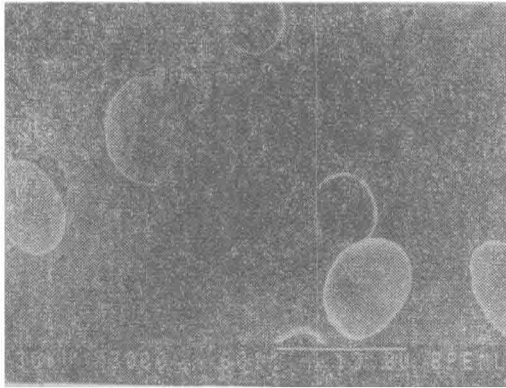


图 3 红细胞在滤膜上的电镜照片

3. 血标本的制备

抽手臂静脉血,置于已加抗凝剂的试管中,充分摇匀,离心弃去血浆及白细胞层,留红细胞。用生理盐水洗红细胞三次,然后将红细胞悬浮在悬浮介质中。悬浮介质的组成是 0.9% NaCl, 10 mM Tris-HCl 缓冲液,用 HCl 调至 pH 为 7.4。

4. 滤速测定

在滤膜夹上装好滤膜,转动三通活塞使真空贮槽与注射器相通。用注射器抽出空气直到水柱高度达 10.5 厘米;关闭三通活塞。在盛血管中加入悬浮介质,转动三通活塞使滤液槽与真空贮槽相通,此时水柱将下降约 0.4 厘米,记下过滤 1 毫升悬浮介质所需时间。在过滤过程中水柱高度变化甚小 (< 0.2 厘米)。因此过滤时的实际负压相当于 10 厘米水柱。测量悬浮介质的滤速是为了对滤膜进行筛选,使结果具有较好的重复性。用同样的方法测量 1 毫升红细胞悬浮液的滤过时间 t 。滤速 $FR = \frac{1}{t}$ (毫升/分)。用离心法测定红细胞悬浮液的红细胞的

压积,按 (1) 式计算 EFR 值。

三、影响红细胞可滤过性测定的各种因素

1. 红细胞悬浮液的压积

悬浮液中红细胞数量的多少对 EFR 测量影响很大。图 4 的结果表明,当 PCV 在 0.05—0.15 以内,EFR 值基本上保持不变。PCV 过大时,实验结果不稳定,起伏较大;PCV 过小时,EFR 值明显减小。因此,配制红细胞悬浮液使 PCV 在 0.1 左右比较合适。

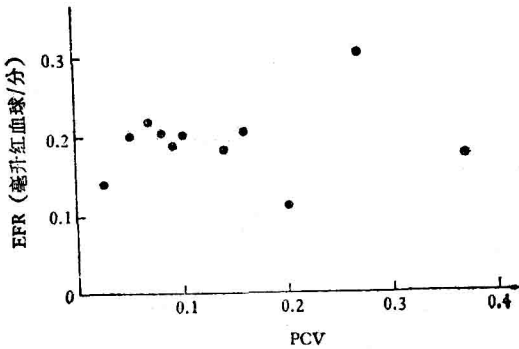


图 4 红细胞悬浮液压积 PCV 的影响

2. 抗凝剂的种类

抗凝剂种类对 EFR 值影响不大,用 ACD (酸性枸橼酸钠葡萄糖保养液)、草酸钠和枸橼酸钠三种抗凝剂测得的 EFR 值结果相近(见表 1)。我们习惯用 25 体积%的 ACD 作抗凝剂。

表 1 抗凝剂对 EFR 的影响

抗凝剂	ACD	草酸钠	枸橼酸钠
FR(毫升/分)	2.15	1.96	2.43
PCV	0.08	0.09	0.085
EFR (毫升红细胞/分)	0.17	0.18	0.21

3. 血标本放置时间

从抽静脉血到滤速测定之间血标本的放置时间对 EFR 影响很大(图 5)。放置少于 1.5 小时,EFR 值随放置时间延长略有减小;超过 1.5 小时,EFR 值迅速减小。因此,取血后要尽快测定,放置不应超过 1.5 小时。

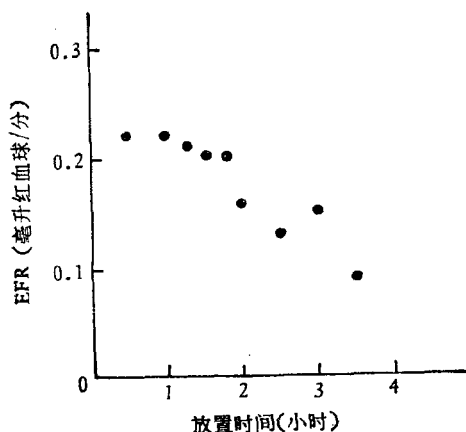


图5 血标本放置时间的影响

4. 滤膜的孔径和厚度

在 10 厘米水柱负压下,分别测定悬浮介质和红细胞悬浮液通过平均孔径为 4.1、4.6 和 4.9 微米的三种滤膜的时间,并计算 EFR 值。由图 6 可见,滤过时间随孔径增大明显变短,滤速随孔径增大而变大。为使结果的重复性好,滤膜孔径的变化应尽可能小,为此,我们在实验中尽量选用同一批滤膜。

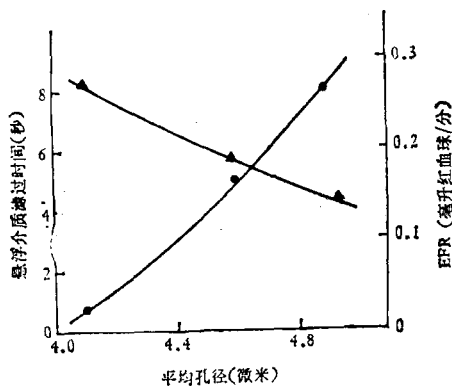


图6 滤膜孔径的影响

平均孔径相同,滤膜厚度不同,滤过时间也不同(见图7)。由图7可见,1毫升悬浮介质的滤过时间与滤膜厚度成正比。一般用7—8微米厚的滤膜。

5. 压力

随装置内负压增加,悬浮介质的滤过时间减小,EFR 值增大,故测定前应仔细调节水柱高度,以减小误差,压力的影响见图8。

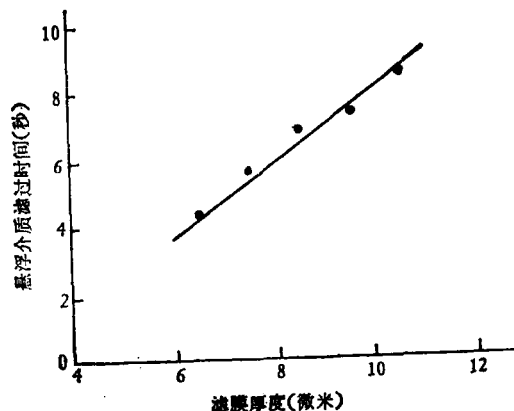


图7 滤膜厚度的影响

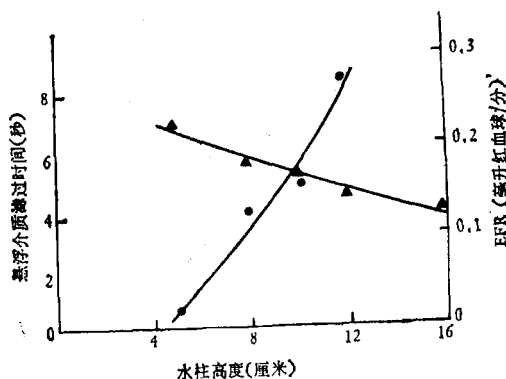


图8 压力的影响

根据以上结果,我们测定红细胞 EFR 值的最佳实验条件是:用平均孔径为 4.65—4.85 微米,孔密度为 $4-5 \times 10^5$ 孔/厘米²,厚度 7—8 微米的聚碳酸酯核孔滤膜;按 PCV 为 0.1 配制红细胞悬浮液;室温下,在 10 厘米水柱高度的负压下测定滤速。取血后在一个半小时内完成测定。

四、方法的灵敏度和准确度

在用生理盐水洗过的正常红细胞中加入适量 2% 戊二醛,室温下固定 1 小时。然后用生理盐水洗三次。这时红细胞已轻度变硬,变形能力减小。将已变硬的红细胞以不同比例掺入正常红细胞中,测定 EFR 值,结果列在表 2。由表 2 可见,在 1000 个正常红细胞中含有 5 个变硬红细胞就能使 EFR 值明显减小,这说明本方法具有较高的灵敏度。

高效液相色谱法分析胎盘制剂中脂溶性维生素

王玉梅 王善莲* 高子仪**

(中国科学院生物物理研究所)

准确地分析和定量胎盘制剂中脂溶性维生素,对了解其生化和药物性质是十分必要的。

用高效液相色谱法分析与定量脂溶性维生素已有报道^[1-4]。这种方法快速、简便,回收率可达 95% 以上,优于目前常用的其他方法。

本文采用反相高效液相色谱法对胎盘制剂中四种脂溶性维生素进行了分离及定量测定。

一、方 法

仪器: 日立 635 A 高效液相色谱仪,检测器——单波长紫外分光光度计;记录器——日立 056;分离柱为内径 4 毫米,长 250 毫米不锈钢柱,填料为无定形硅胶键合十八烷基 (YWG

C₁₈H₃₇), 粒度 10±2 微米,填充压力为 350 公斤/厘米²,柱效为 1 万理论塔板数/米(苯)。

试剂: 维生素 A (英 Koch-Light 公司产品), 维生素 D. E. K (德国 E. Merck 产品), 其余试剂均为国产分析纯。

人胎盘粉试样由北京生物制品研究所提供。牛胎盘粉由天津杏林生物药厂提供。

样品前处理: 取适量试样经皂化反应和石油醚-乙醚 (1:1) 提取处理,然而进行色谱测定。

色谱条件: 色谱柱为 $\phi 4 \times 250$ mm, YWG-

* 北京第三制药厂 ** 北京生物制品研究所

同一份血标本,平均测定三个样品的 EFR 值,其变化在 20% 左右。同一正常人间隔一段时间两次取样测定 EFR 值,变化小于 15%。

表 2 变硬红细胞含量对 EFR 的影响

变硬红细胞数 (%)	100	1.0	0.5	0.1	0.01	0.005	0
EFR (毫升红细胞/分)	<0.001	<0.01	0.013	0.22	0.22	0.26	0.27

五、正常人与脑血栓形成病人的 EFR 值的比较

根据测定正常人和脑血栓病人的 EFR 值 (表 3) 可见,后者的红细胞可滤过性明显低于前者,从而证明脑血栓形成与红细胞变形性减小有关。

上述装置和方法有可能成为一种临床观察手段,还可用来研究血流不畅、血栓形成机理、微循环障碍等的病因和药物疗效,及活血化痰

中草药的作用机理等。

表 3 正常人和脑血栓形成病人 EFR 值的比较

	正常人 (n = 30)	脑血栓形成病人 (n = 20)
PCV	0.086±0.010	0.077±0.007
FR (毫升/分)	2.43±0.06	0.93±0.53
EFR (毫升红血球/分)	0.21±0.04	0.07±0.04

参 考 文 献

- [1] Reid, H. L. et al: *Journal of Clinical pathology*, **29**(2), 855, 1976.
- [2] Buchan, P. C.: *British Journal of Haematology*, **45**, 97, 1980.
- [3] 会村敏治 et al.: 《日本血液会杂志》, **45**(2), 245, 昭和 57 年.
- [4] 前田俊秀 et al.: 《日本血液会杂志》, **45**(2), 245, 昭和 57 年.
- [5] Usami, S. et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **86** (2), 274, 1975.
- [6] 崔浣华等: 《核技术》, **1**, 67, 1982.
- [7] 王世成: 《膜分离科学与技术》, **3**(4), 71, 1983.

[本文于 1985 年 2 月 18 日收到]