DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.020

[2] Bradbury G, Benjamin J, Thompsen J, *et al*. Avascular necrosis of bone after cardiac transplantation: prevalence and relationship to administration an dosage of steroids[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1994, 76(9): 1 385—1 388.

[3] Ono K, Tohjima T, Komazawa T. Risk factors of avascular necrosis of the femoral head in patients with systemic lupus erythematosus under high-dose corticosteroid therapy[J]. Clin Orthop, 1992, 227: 89—97.

[4] Felson D T, Anderson J J. Across-study evaluation of association between steroid dose and bolus steriods and avascularnecrosis of bone[J]. Lancet, 1987, 8 538(Ⅰ): 902—906.

[5] Jones J P Jr. Fat embolism and osteonecrosis[J]. Orthop Clin Nouth America, 1985, 16(4): 595—633.

[6] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, *et al*. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction[J]. Clin Orthop, 1995, 316: 235—243.

[7] Steinberg M E, Hayken G D, Steinberg D R. A quantitative system for staging avascular necrosis[J]. J Bone Joint Surg(Br), 1995, 77(1): 34—41.

(编辑 谢义霞)

经验与短篇

文章编号:1000-5404(2000)03-0252-01

22 ℃和—80 ℃保存血小板磷脂的改变

Changes of platelet phospholipid in course of the storage at 22 ℃and —80 ℃

成小玲[1], 尤忠义[2], 林武存[1], 黎汝青[1], 任德惠[1], 曾 杰[1], 王凤君[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]输血科;[2]烧伤研究所;重庆 400038)

采用HPLC-UV分析在22 ℃和—80 ℃保存条件下血小板的4种主要磷脂PC、PE、PS、PI的变化情况,并就血小板磷脂改变对血小板聚集功能的影响和在血小板贮存损伤(Platelet storage lesion, PSL)发展过程中的作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 浓缩血小板的制备

20位健康献血者,按血库操作规程采血,每人捐献400 ml全血;经二次离心制成浓缩血小板悬液20单位(从400 ml全血中提取的血小板为1单位)。血袋为ACD-B三联袋(上海血液中心产品)。

1.2 分组

将每单位浓缩血小板分装成两份,分别编为甲,乙两组,每组20个样本。采血当天的新鲜血小板为对照组。甲组于22 ℃水平振摇保存(XHZ-1型血小板恒温振荡保存箱,60次/min,苏州产),分别在第3天、第5天取样检测,与对照组比较作动态观察。乙组用二甲亚砜(DMSO)作为防冻剂,终浓度为5%,—80 ℃冰箱(Scien Temp Model 85-6.8,美国产)保存,分别在1月,3月,6月取样测定,与对照组比较进行动态观察,用前在37 ℃水浴快速融化。

1.3 实验方法

1.3.1 提取脂质 按文献[1]报道,将血小板悬液用冷生理盐水(4 ℃)洗涤,直到完全去除血浆。再用冷生理盐水将血小板调至400×10^9/L,白细胞和红细胞污染数量少于1/4 000血小板。将洗涤后的血小板在冰水浴中匀浆。取3 ml血小板匀浆液+2倍的氯仿—甲醇提取液(2∶1, v/v),离心去上层液;再加入甲醇-水提取液,离心去上层液;取1 ml氯仿液,用氮气吹干,—20 ℃保存备用[2]。

1.3.2 试剂 4种磷脂标准品:磷脂酰胆碱(Phosphatidylchuline, PC),磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE),磷脂酰丝氨酸(Phosphalidylserine, PS),磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PI)均为Sigma公司产品;乙腈、甲醇为HPLC(色谱)纯级,上海吴泾化工厂生产;其它试剂均为分析纯。

1.3.3 仪器与色谱条件 高效液相色谱系统(法国Gilson公司);色谱工作数据站(中科院大连化物所)。色谱柱:μPorasil silica, 300×4.0 mm,粒径10 μm;流动相:乙腈-甲醇-磷酸(90∶3∶1, v/v);流速:0.8 ml/min;进样量:20 μl;紫外检测波长203 nm;时间25 min;柱温:室温;色谱数据:工作站进行数据处理。

1.4 血小板聚集功能测定

诱导剂:ADP,浓度分别为0.2, 0.1, 0.05 mmol/L;测定5 min,记录血小板最大聚集率(PAG);仪器:TYXN-91型血液凝集仪(上海产)。

(下转256页)

作者简介:成小玲(1954.12),女,山西省兴县人,主任技师,主要从事血液成分制备与保存方面的研究,发表论文14篇。电话:(023)68754198

收稿日期:1999-05-23;修回日期:1999-12-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

[1] Mbela T K M, Poupaert J H, Dumont P. Poly (diethylmethy-lidene malonate) nanoparticles as primaquine delivery system to liver[J]. Int J Pharm, 1992, 79(1): 29—38.

[2] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al*. Biodegradable submicron carriers for peptide drugs: preparation of DL-lactide/glycolide copolymer(PLGA) nanospheres with nafarelin acetate by a novel emulsion-phase separation method in an oil system[J]. Int J Pharm, 1995, 121(1): 45—54.

[3] Weller I V D, Carreno V, Fowler M J F, *et al*. Acyclovir inhibits hepatitis B virus replication in man[J]. Lancet, 1982, 1(8266): 273.

[4] Brannon-Peppas L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery[J]. Int J Pharm, 1995, 116(1): 1—9.

[5] Thomasin C, Nam-Tran H, Merkle H P, *et al*. Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics[J]. J Pharm Sci, 1998, 87(3): 259—268.

[6] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al*. In vitro drug release behavior of DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method[J]. J Pharm-Sci, 1994, 83(5): 727—732.

[7] 山东大学编. 物理化学与胶体化学实验[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 124—128.

[8] 方开泰. 均匀设计-数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363—372.

[9] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al*. Preparations of biodegradable nanospheres of watersoluble and insoluble drugs with DL-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior[J]. J Controlled Release, 1993, 25(1): 89—98.

[10] 王鹏, 王玉珠, 沈建民. 均匀设计及其在药学中的应用[J]. 沈阳药学院学报, 1989, 6(4): 297—306.

(编辑 潘式文)

(上接252页)

2 结果

新鲜血小板4种主要磷脂的总量为71.4 μg/ml, 各自含量依次为PC＞PE＞PS＞PI。22℃水平振摇保存3 d、5 d, 4种磷脂的总量分别下降5.8%, 31.8%; 保存5 d PC, PE, PS, PI的下降具有统计学意义($P<0.01$)。

血小板－80℃保存1、3、6月, 4种磷脂总量比新鲜血小板分别减少了33.3%、34.6%、36.3%, $P<0.01$; 3者之间相比较, 磷脂改变差异不显著($P>0.05$)[3]。

血小板聚集功能改变: 22℃保存24 h, 血小板PAG下降约50%; 保存72 h, PAG降至10%以下; 保存96 h的血小板对ADP诱导无明显的聚集反应。与对照组相比较, －80℃保存的血小板融化后PAG显著下降($P<0.01$), 即使增加ADP浓度也不能提高PAG, 血小板在－80℃冰冻保存1、3、6月, PAG分别为9.2%、9.7%、10.9%, 3者之间差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

保存期间血小板膜脂质结构发生了变化, 血小板活化和细胞溶解使磷脂释放到血浆中。实验显示, 22℃保存血小板, 随保存时间延长, 磷脂丢失呈持续状态, 血小板聚集功能亦表现为持续下降。－80℃冰冻保存血小板, 冻融后磷脂减少约1/3, 但是随着保存时间延长, 磷脂的丧失却没有增加, 而是保持在一相对稳定的水平, 同时反映血小板功能的PAG的变化趋势与磷脂的改变极为相似。提示: ①血小板磷脂丧失与血小板功能下降有密切关系。②－80℃冰冻保存血小板, 其损伤主要来自冻-融过程, 与保存时间长短无明显关系。

贮存期间血小板磷脂丧失的机制目前还不完全明确, 有以下几种可能: ①提前消耗。某些非生理性刺激, 如采集技术、贮存容器、保存介质、保存温度等影响, 引起血小板活化, 释放颗粒, 进而聚集, 脂质被提前消耗。②酶的作用。如血小板释放磷脂酶、脂质酶或受白细胞污染等使血小板膜脂质消耗或丢失。③脂质过氧化作用。在贮存期间血小板内源性抗氧化物(如谷胱甘肽)逐渐耗尽, 使得氧分子能够对无保护功能的脂质进行过氧化反应, 最终导致脂链破碎。由于维持血小板生理功能的花生四烯酸前体缺乏, 以及能破坏生物膜的脂肪酰基醛生成, 使血小板膜脂质双层稳定性下降, 磷脂丧失[4], 最终导致血小板止血功能下降, 存活时间缩短。血小板的活化使磷脂PS、PE在脂质膜外侧暴露形成血小板第三因子(PF_3)。PF_3能大大加快凝血酶产生的速度, 引起血小板广泛聚集。

防止PSL发生已成为输血工作亟待解决的问题。据报道, 使用抗氧化剂如维生素E和硒蛋氨酸, 能抑制脂质过氧化作用, 延长血小板的保存时间[5]。在制备中减少白细胞污染有助于提高血小板贮存质量。

关键词 血小板贮存损伤; 磷脂; 高效液相色谱分析; 血小板聚集功能

中图法分类号 R318.52; R331.143 文献标识码 B

参考文献

[1] Kawasaki T, Kambayashi J, Mori T, *et al*. Analysis of platelet phospholipids by high performance liquid chromatography[J]. Thrombosis Research, 1984, 36(4): 335—338.

[2] 王凤君, 赵 云, 谢尔凡, 等. 高效液相色谱法测定生物样品中磷脂含量[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(1): 67—68.

[3] 成小玲, 林武存, 黎汝青, 等. 储存损伤对血小板超微结构和聚集功能的影响[J]. 重庆医学, 2000, 29(2): 106—110.

[4] Seghatchian J M J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion[J]. Transfusion Medicine Reviews, 1997, 11(2): 130—134.

[5] Klinger M H F. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects[J]. Ann Hematol, 1996, 73(2): 103—106.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net