

研究简报

电离辐射对血小板超微结构的影响

盛民立 郁爱国

(上海医科大学, 放射医学研究所)

摘要 血小板是指从巨核细胞周围脱落的胞浆小片, 因此, 血小板没有核。把血小板固定在有钨红存在的戊二醛内以增加血小板外壳的反差(黑)。大的空隙出现形成了部分开放性管道系统, 微管束的末梢伸向界膜, 颗粒在大小和电子密度方面呈异样, 血小板含有糖元和线粒体, 因此, 能利用糖分解或氧化磷酸化等代谢途径。经 500 拉德 γ 射线照射的大鼠血小板, 微管在纵、横断面上可见排列紊乱、管道系统显示极度和明显扩张, 受照的血小板既无糖元也没有线粒体。细胞器都受到不同程度的损害。

关键词 血小板; 微管; 管道; 糖元; 线粒体; 照射。

引言

自 1960 年起对血小板的研究兴趣大大增加, 可能是由于新技术的发展及血小板与血栓形成有关, 由于血小板在止血过程中起很重要的作用, 因此我们注意到血小板与血管壁的关系及其量和质的变化。血小板可以认为是止血的最基本的东西, 它是凝血前为止血而准备的“药箱”, 为了进一步研究这个问题, 我们在研究正常血小板的基础上进一步观察了受照射大鼠血小板超微结构的改变。

实验材料和方法

(1) 实验动物 Wistar 大鼠, 对照组和实验组各 5 只。

(2) 照射 ^{60}Co γ 线剂量 5 Gy, 剂量率为 $261.2 \times (2.58 \times 10^{-4}) \text{c/kg} \cdot \text{min}$, (261.2 R/min)。

(3) 血小板的分离和固定步骤

① 用硅化注射器, 从心脏取血, 以 3.8% 枸橼酸钠(1:5)抗凝。② 置血于 37℃ 水浴 5~10 分钟; 500 r/min 离心 10 分钟。③ 吸取上层富含血小板的血浆(PRS); ④ 以温浴过 0.1~0.12% 戊二醛(用 0.1 mol/L 二甲胂酸盐缓冲液配制), 1:1 固定富含血小板血浆, 10 分钟(充分混和, 置温浴中) ⑤ 离心 2500 r/min 10 分钟, 获得血小板沉淀物 ⑥ 去上清液, 血小板沉淀物加 2.5% 戊二醛, 固定 2 小时。⑦ 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液小心清洗三次; ⑧ 1% 锇酸固定 1.5 小时(固定前把沉淀剥落下来, 以便四面完全固定。⑨ 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗三次; ⑩ 加 50% 酒精 15 分钟; ⑪ 放入饱和醋酸铀过夜。⑫ 加 90% 酒精脱水, 90%:90% 酒精:丙酮, 90% 丙酮, 纯丙酮 $\times$ 3 梯度, 脱水各 15 分钟; ⑬ 1:1 丙酮 618 包埋液, 浸透 2 小时, ⑭ 纯包埋液浸 2 小时, 最后包埋。

(4) 超薄切片 用金钢石切片刀(或玻璃刀), LKB III 型超薄切片机切片, 取银灰色切片于铜网上, 待干燥后作醋酸铀, 枸橼酸铅染色, 用 JEM 100 CX 电子显微镜观察。

结果

在罗氏染色涂片中, 血小板呈圆形, 椭圆形或有小突起, 细胞质呈浅蓝色, 中央部有紫色颗

粒,称作颗粒区,周围部透明,称作透明区,而电镜所见血小板有层厚约15~20 nm的细胞膜,细胞质内散在有二类颗粒^[1-2]:(1) α 颗粒,直径0.15—0.2 μm ,外包一层膜,内容物中等电子密度,有的 α 颗粒中央还有电子密度高的芯,因此颗粒呈牛眼状,有时在芯可见相交隔的条纹,因此 α 颗粒不是一种均一的颗粒。(2) 致密颗粒,外包一层膜,内容物电子密度极高,在内容物与膜之间常有窄的间隙,血小板内散在有许小线粒体,过去曾误作为 β 颗粒。糖原颗粒分散或聚集成堆,曾称作 ϵ 颗粒。在血小板内

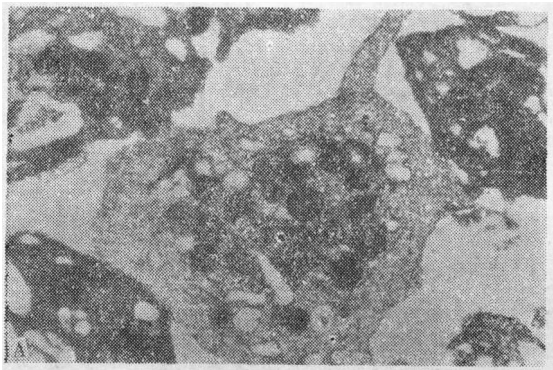


图1 正常大鼠血小板,有较多的颗粒,致密体,开放小管系统(DCS),致密小管系统,糖原颗粒,膜复合物和微管周围束带。 $\times 32500$

Fig. 1 Normal Rat Platelet

The cell in this example has been sectional in the equatorial plane. A circumferential band of microtubule (MT) supports the discoid configuration. Numerous granules (G). A few mitochondria (M) and occasional electron-dense bodies (DB) are randomly dispersed in the cytoplasmic Matrix. Glycogen (GLY) is concentrated in masses or occurs as single particles. Clear channels of the open canalicular system (OCS) follow tortuous courses through the cytoplasm. Elements of the dense tubular system (DTS) of channels are often associated with the circumferential bundle of microtubules. Interactions between the two-channel systems result in formation of a twisted mass of membraneous elements referred to as the membrane complex (MC)

$\times 32500$

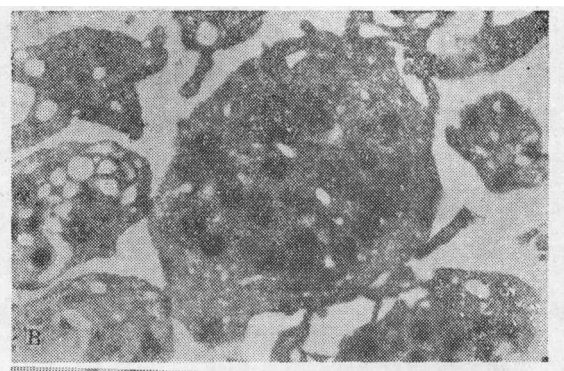


图2 正常血小板 $\times 32500$

Fig. 2 Normal Rat Platelet. $\times 32500$



图3 5 Gy γ 线照射后第一天,细胞器受损,各种颗粒减少,小管系统相互沟通形成大空泡,表面管导与开放小管系统接触与细胞表面沟通 $\times 32500$

Fig. 3 one day later after The platelet was irradiated by γ -ray with 5Gy.

A variety of organelles damaged. Granules reduced among microtubules and open canalicular system (OCS) connected directly with the cell surface and formed large vesicle.

$\times 32500$

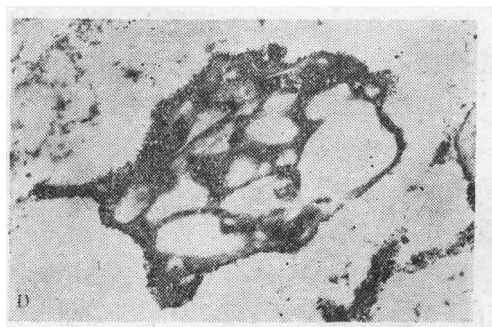


图4 5 Gy γ -线照射后第五天,细胞器遭受严重破坏,整个细胞结构呈蜂窝状。 $\times 32500$

Fig. 4 5 days later after platelets were irradiated by γ -ray with 5 Gy. organelles were damaged seriously

The structure of whole cell formed areolar. $\times 32500$

有两套管道系统:一与表面相连管道系统(Surface Connecting System, SCS)是指把血小板外界和内部相互沟通的一套错综分布的管道系统,二为密管系统(dense tubular system, DTS),这种管道细而且短,不和外界相通,管道内容物的电子密度和管外细胞层的相同,(见图1、2)照射后血小板发生多种形态学改变,其在极期表现伪足模糊不清或消失,血小板表面平滑,偶尔可见到个别似乎发生变性的伪足,明区和粒区界限不清,可见大量界限清楚而形状大小各异的空泡。大鼠血小板在5 Gy照射后1天和5天其超微结构的改变出现明显的不同(见图3、4)。致密体(5-HT细胞器)减少,颗粒膨胀与液化, α -颗粒空泡化,进而颗粒溶解,透明质和颗粒质界限模糊。

讨 论

近年来,由于实验技术的发展,特别是同位素标记技术和电子显微镜的广泛应用,对血小板的形态、功能及生成调节的认识逐渐深化^[1-5]。

血小板和纤维蛋白同样是首先利用电子显微镜研究的生物学课题,因为它们形态都比较小而且都能在自己的表面伸展。1939年,Wolpers和Ruska对经固定和干燥的在火棉胶片上的血小板和纤维样品进行结构和功能的观察。他们的发现包括了纤维蛋白纤维的胶粒和血小板的形态改变。

至今血小板的大小已有个基本概念,直径为2—4 μm 平均容积为5—7 μm^3 ,为红细胞直径的1/4,在血循环中形态如圆盘。用戊二醛和锇酸处理的血小板切片,在电镜下观察呈双凸透镜状、小扁豆状的,其周围都有微管周围束环绕着,横切面显示在椭圆形细胞的一端,这些微管呈一簇空圈状,血小板中有少量的线粒体存在,通常是椭圆形的,比颗粒稍小,但呈长柱形或不规则形,其线粒体内膜有折裂,呈嵴状,与其它细胞不同,电子致密体在血小板中不多见。血小板中二个管道系统成份随机地散布在细胞浆中^[6-7],表面的管道与开放小管系统(ocs、open canalicular system)接触,直接与细胞表面沟通,有时成簇、成堆,每个管道可随着弯弯曲曲的小道进入细胞浆,膨大和狭窄处不透明,管道在进入细胞浆后可重复与膜表面其它区域接触,小管之间相互融合,从这侧伸展到另一侧,形成蜘蛛网状管道。

管道的致密小管系统(DTS)是封闭的,它不能与开放管道系统成份和细胞表面沟通^[7],类似致密体的,无定形物质环绕着细胞浆充满着致密小管系统管道,能清楚地与开放管道系统区别开来^[8],致密小管系统狭窄,没有膨大的交错处,在开放管道系统的成份中狭窄的片断是很明显的^[9]。而经 γ 射线5 Gy照射后1天和5天,血小板所有这些结构都遭到不同程度的破坏。血小板内形成大量界限清楚形状大小各异的空泡,个别血小板整个呈空泡状严重的变性,分泌凝血因子的各种细胞器功能消失。因此,我们以为血小板不但当数量减少时会影响机体凝血的功能,而当血小板微细结构受到损伤时也必然阻抑了在凝血过程中其凝血功能而导致出血。此外在正常情况下,在血液循环中的血小板表面带有负电荷,血管内皮细胞的表面也带负电荷,由于电荷的同性相斥,血小板不能附着在正常健全的血管内皮细胞上面。血液的激流难免有时会损伤血管壁内皮细胞表面,受伤的内皮细胞表面逐出现正电荷,这样,血小板就能附着它的上面。假若由于射线的作用,血小板结构受到破坏,电荷也随之改变,那么要血小板再参与血管内皮细胞的修复是困难的。因此,我们可以推论血小板超微结构的破坏是导致放射病出血的主要原因之一。

参 考 文 献

- [1] J. M.; Gerrard, J. G; White. G. H. R; Rao, D; Townsed, Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. AM. J. Path. 83: 283—298 (1976)
- [2] J. G.; White, The dense bodies of human platelets: origin of serotonin storage particles from platelet granules. AM. J. Path. 53: 791 (1968)
- [3] J. G.; White, Origin and function of platelet dense bodies. Ser. Haematol. 3:17 (1970).
- [4] J. G.; White, Platelet morphology; in Johuson. The circulating platelet. P. 45 (Academic Press. New York 1971).
- [5] J. G.; White, Interaction of membrane systems in blood platelets. AM. J. Path. 66: 295—312 (1972)
- [6] J. G.; White, Is the canalicular system the equivalent of the muscle sarcoplasmic reticulum? Hemostasis 4: 185—191 (1975).
- [7] J. G.; White, C. C.: Clawson, The surface-connected canaliular system of blood platelets - a fenestrated membrane system. AM. J. Path. 101: 353—364 (1980).
- [8] E., Morgenstern. G.: Stark, Morphometric analysis of platelet ultrastructure in normal and experimental conditions. -In: O. N. Ulutin (Ed.), Platelets, PP. 37—42. Excerpta Medica, Amsterdam O. N. Ulutin (Ed.), Platelets, PP. 37—42. Excerpta Medica, Amsterdam 1975.
- [9] O.: Behnkl, Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. - Anat. Rec. 158, 121—138(1967 a).

(收到日期 1985 年 5 月 2 日)

INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON ULTRASTRUCTURE OF PLATELETS

Sheng Minli Yu Aiguo

(Institute of Shanghai Radiation Medicine Shanghai Medical university)

ABSTRACT Platelets represent small pieces of cytoplasm released from the periphery of megakaryocytes. Therefore, the cells have no nucleus and normal blood platelet fixed in glytaraldehyde in the presence of ruthenium red to enhance contrast of the platelet coat (black). The large empty appearing spaces form part of the open canalicular system. The band of microtubules runs peripheral to the membrane-bound granules which appear heterogeneous in size and electron density. The platelet possesses glycogen particles as well as mitochondria and it is able to use either metabolic pathway glycolysis or oxidative phosphorylation. The platelets from rat irradiated by γ -ray with 500 rad. appear to be a disorderly array of microtubules in longitudinal and across section. The canalicular system appears excessive and markedly dissended. There is neither granules nor mitochondria in irradiated platelets.

KEY WORDS Platelet; Microtubule; Canalicular; Granules; Mitochondria Radiation.