

◇ 临床医学研究 ◇

体外贮存致悬浮红细胞凋亡损伤的研究

马文娟¹, 卞茂红¹, 郑美娟², 乔金平², 王峰³, 许哲³, 马胜利⁴, 沈继龙⁵

摘要 目的 探讨贮存期内不同保存时间致悬浮红细胞凋亡损伤及可能的机制。方法 采集 12 例健康献血员血液, 常规去除白细胞和血浆。取保存后 3、11、19、27、35 d 5 个时相点的红细胞, 用凋亡试剂染色经流式细胞仪检测红细胞凋亡率及红细胞体积大小变化, 用 Fluo-3 AM 染色经流式细胞仪检测细胞内 Ca^{2+} 浓度。同时留取上清液, 利用酶标仪检测血红蛋白在 405 nm 的吸光度。结果 与保存 3 d 的红细胞比较, 红细胞凋亡率和细胞内 Ca^{2+} 浓度逐渐增加, 至 27 d 与 35 d 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 溶血率早期增加不明显, 至 35 d 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而

红细胞体积逐渐变小, 至 27 d 与 35 d 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 体外贮存的悬浮红细胞随着保存时间的延长, 凋亡逐渐增加, 可能是储存损伤的原因之一。 Ca^{2+} 内流可能是凋亡主要的发生机制。

关键词 悬浮红细胞; 储存损伤; 红细胞凋亡; 钙离子

中图分类号 R 333.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0189-05

目前临床使用的血液成分绝大多数是悬浮红细胞, 保存期为 35 ~ 42 d^[1]。血液在储存过程中由于受多种因素的影响, 其形态、功能和生化特性等均发生不同程度的变化; 且随着储存时间的延长, 变化更加显著, 这些变化统称为红细胞储存损伤, 严重影响血液的质量及患者的输注效果, 给临床输血带来安全隐患^[2]。储存损伤可能由红细胞自身代谢产物、氧化损伤、酶和红细胞程序性死亡即红细胞凋亡引起^[3]。然而对其研究报道非常有限。该研究旨在进一步明确悬浮红细胞贮存过程中的凋亡损伤情况及可能的发生机制, 为研究储存损伤积累科学依据。

2014-10-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30940067)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 输血科、² 检验科, 合肥 230022

河南省永城市人民医院³ 麻醉科、⁴ 感染科, 永城 476600

⁴ 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 马文娟, 女, 硕士研究生;

卞茂红, 男, 副教授, 副主任技师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: mhbian@126.com

group (HD group, $n = 30$). 16 weeks later, obese models ($n = 16$) were established from HD group and were randomly divided into obesity group (OB group, $n = 8$) and sitagliptin group (SITA group, $n = 8$). Measure body weight (BW), fasting blood glucose (FBG), triglyceride (TG), total cholesterol (TCH), high-density lipoprotein (HDL-C), low-density lipoprotein (LDL-C), fasting insulin (FINS), serum RBP4 respectively before and after the 6 weeks of treatment, and calculate homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR). Western blot was used to detect the epididymal adipose tissue and liver RBP4 protein expression levels. **Results** ① The levels of BW, FBG, TG, TCH, LDL-C, FINS, HOMA-IR and serum RBP4 in HD group increased while the levels of HDL-C decreased compared with those of ND group with a statistical significance ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The differences between OB group and SITA group were of no statistical significance. After treatment with sitagliptin, the levels of FBG, TG, TCH, LDL-C, FINS, HOMA-IR and serum RBP4 of SITA group decreased while the levels of HDL-C increased compared with those of OB group with a statistical significance ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ② Epididymal adipose tissue RBP4 protein expression levels in OB group increased compared with ND group ($P < 0.05$), epididymal adipose tissue RBP4 protein expression levels in SITA group decreased compared with OB group ($P < 0.01$). ③ Pearson correlation analysis showed that in ND group, serum RBP4 was positively correlated with TG. In HD group, serum RBP4 and FINS, HOMA-IR, TG, epididymal adipose tissue RBP4 were positively correlated and negative correlation existed between serum RBP4 and HDL-C. **Conclusion** Serum and epididymal adipose tissue RBP4 protein levels are elevated in obesity rats. Sitagliptin intervention can lower serum and epididymal adipose tissue RBP4 protein levels in obesity rats and improve the glucose and lipid metabolism.

Key words obesity; insulin resistance; sitagliptin; retinol binding protein 4

1 材料与方法

1.1 病例资料 在安徽省血液中心无偿献血合格者中,随机选择 12 例自愿者,其中男 7 例,女 5 例;年龄 19~42 岁,中位年龄 28 岁,获得书面知情同意。利用一次性三联血袋(血液保存液为 CPDA-1,即含枸橼酸钠、磷酸盐、葡萄糖和腺嘌呤)分别采集 200 ml 全血后,6 h 内以 3 800 r/min 离心 12 min。去除白细胞和血浆,加入红细胞保存液,制备成悬浮红细胞,置 4℃ 贮血冰箱后,在相应的时间内混匀悬浮红细胞,无菌操作留取 0.5 ml 的标本,分别进行有关实验。

1.2 主要试剂和仪器 三联采血袋购自山东威高集团医用高分子制品股份有限公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒和流式细胞检测仪(FACS Calibur)购自美国 BD 公司; Fluo-3 AM(钙离子荧光探针)购自日本同仁化学研究所; 配制 Fluo-3 AM 母液的二甲基亚砷购自美国 Sigma 公司; 酶标仪(Infinite F50)购自瑞士 TECAN 公司; 高速冷冻离心机(5415R)购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 Annexin V-FITC 标记流式细胞术检测红细胞凋亡及红细胞大小 分别取不同保存时间的悬浮红细胞 50 μ l, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 1 \times Annexin V 结合液重悬, 使细胞数为 1 $\times 10^6$ 个/ml; 取 100 μ l 细胞悬液, 加入 5 μ l Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min; 再加入 400 μ l 1 \times Annexin V 结合液, 立即上流式细胞仪检测, 选择激发波长 488 nm、发射波长 530 nm。每组重复 3 次, 取平均值, 应用 FCS Express V3 软件分析流式数据, 其中前散射光(forward scatter, FSC)代表红细胞体积。

1.3.2 用 Fluo-3 AM 标记流式细胞术检测红细胞内 Ca^{2+} 浓度 分别离心收集不同保存时间的悬浮红细胞, 用含 Ca^{2+} 的 HBSS 溶液重悬使细胞数为 1 $\times 10^6$ 个/ml; 取 500 μ l 细胞悬液和浓度为 2 μ mol/L Fluo-3 AM 工作液 500 μ l 混匀, 置 CO_2 培养箱中孵育 40 min; 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 500 μ l 含 Ca^{2+} 的 HBSS 溶液重悬, 流式细胞仪检测, 设定激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm。每组实验重复 3 次, 取平均值。

1.3.3 不同保存时期溶血率的测定 取不同保存时期悬浮红细胞样本, 室温下 1 500 r/min 离心 5 min, 取上清液; 利用酶标仪检测上清液血红蛋白

(hemoglobin, Hb) 吸光度, 每组实验重复 3 次, 取平均值。选择测定波长为 405 nm, 其吸光度与 100% 溶血的吸光度比值代表溶血率, 用蒸馏水完全溶解相应贮存红细胞的上清液作为 100% 溶血。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较运用单因素方差分析, 方差齐性 Levene 检验, $P > 0.05$ 时, 组间均数比较采用 LSD 法; 反之采用 Dunnett's T3 法。

2 结果

2.1 Annexin V-FITC 标记法检测红细胞磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 外翻率 取保存后 3、11、19、27、35 d 5 个时相点的悬浮红细胞, 经流式细胞仪检测, PS 外翻率呈时间依赖性增强。统计分析显示, 方差有齐次性, 组间差异有统计学意义 ($F = 47.946, P < 0.01$)。用 LSD 法比较组间 PS 外翻率, 结果表明, 与保存 3 d 的悬浮红细胞比较, PS 外翻的红细胞比例逐渐增多, 但保存 11 d 和 19 d 的差异无统计学意义, 至 27 d 与 35 d PS 外翻率增多差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 1。

2.2 不同保存时间悬浮红细胞体积变化 流式细胞术中 FSC 代表红细胞体积。经流式细胞仪检测悬浮红细胞体积的直方图结果显示, 保存 35 d (红线) 的悬浮红细胞与保存 3 d (黑线) 的悬浮红细胞比较, 体积明显变小。统计分析结果显示, 方差有齐次性, 组间差异有统计学意义 ($F = 18.489, P < 0.01$)。用 LSD 法比较各组间红细胞体积, 与保存 3 d 的悬浮红细胞比较, PS 外翻的红细胞比例逐渐增多, 但保存 11 d 和 19 d 的差异无统计学意义, 至 27 d 与 35 d 明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 2。

2.3 Fluo-3 AM 标记法检测不同保存时期悬浮红细胞内 Ca^{2+} Fluo-3 AM 是一新型的高度特异性 Ca^{2+} 荧光指示剂, 可以灵敏地反映细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的变化, 其荧光强度与游离 Ca^{2+} 浓度成正比。流式细胞仪检测结果显示, 与保存 3 d (黑线) 的悬浮红细胞相比, 保存 35 d (红线) 的悬浮红细胞内 Ca^{2+} 浓度明显变多。统计分析显示, 方差有齐次性, 组间差异有统计学意义 ($F = 16.466, P < 0.01$)。用 LSD 法比较各组间胞内 Ca^{2+} , 与保存 3 d 的悬浮红细胞比较, 细胞内 Ca^{2+} 浓度逐渐增多, 但保存 11 d 和 19 d 增多差异无统计学意义, 至 27 d 与 35 d 细胞内 Ca^{2+} 浓度增多差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 3。

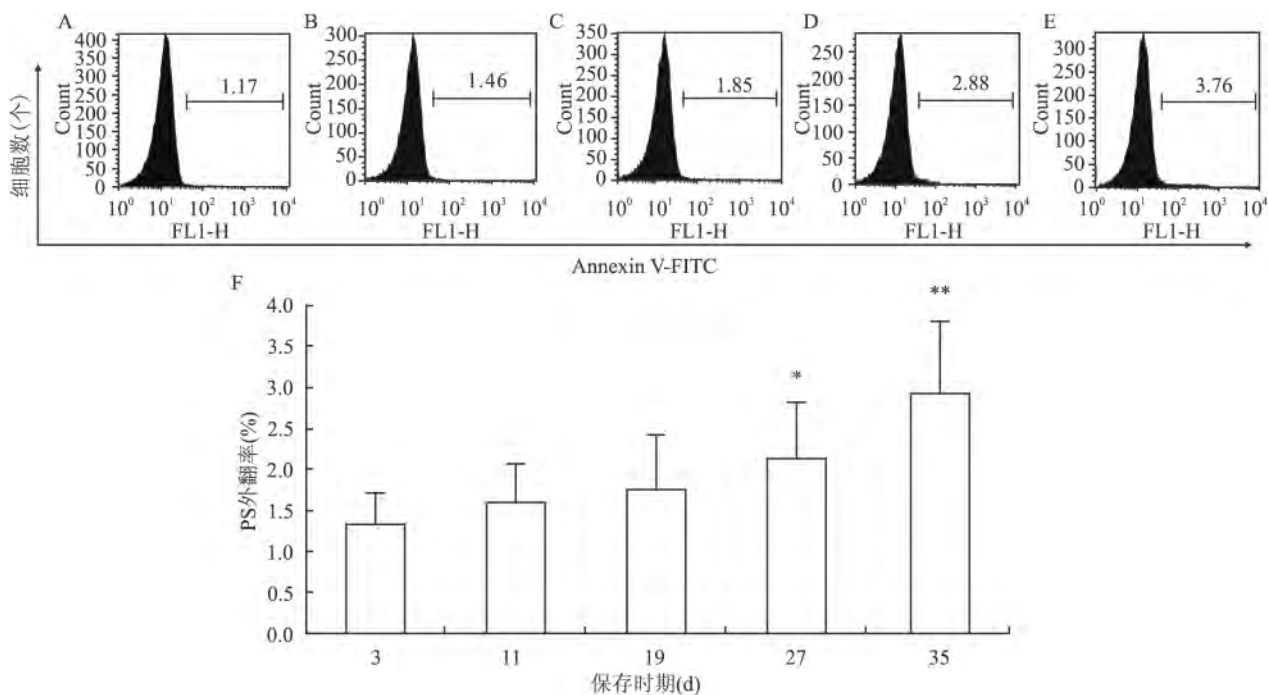


图1 不同保存时期悬浮红细胞 PS 外翻率变化

A: 保存 3 d; B: 保存 11 d; C: 保存 19 d; D: 保存 27 d; E: 保存 35 d; F: 不同保存时期悬浮红细胞 PS 外翻率 ($n = 12, \bar{x} \pm s$); 与保存 3 d 红细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

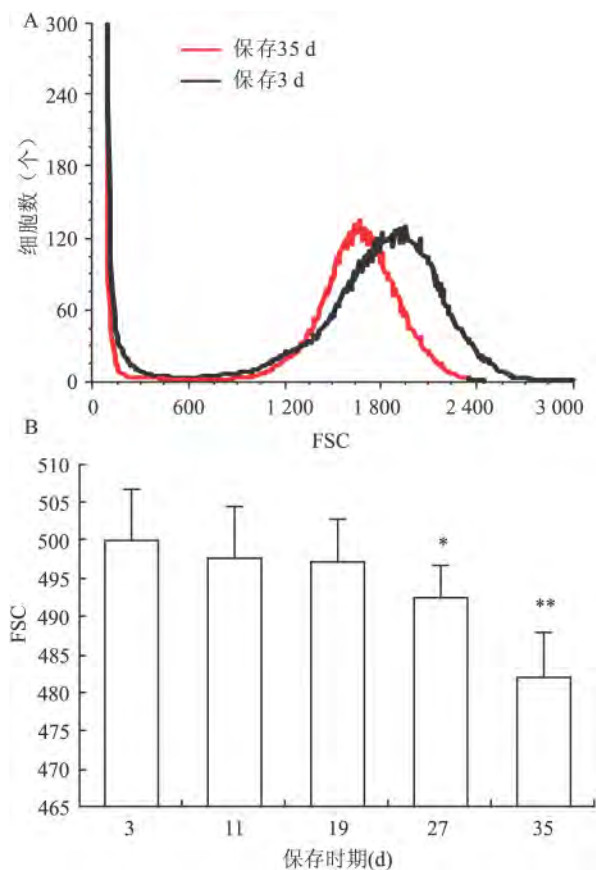


图2 不同保存时间悬浮红细胞体积变化

A: 不同保存时期悬浮红细胞体积的直方图; B: 不同保存时期悬浮红细胞的 FSC ($n = 12, \bar{x} \pm s$); 与保存 3 d 红细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 比色法检测悬浮红细胞的溶血率 以酶标仪检测悬浮红细胞上清液 Hb 在 405 nm 的吸光度, 其与 100% 溶血的吸光度比值代表溶血率。结果显示, 方差有齐次性, 组间差异有统计学意义 ($F = 10.120, P < 0.01$)。用 LSD 法比较各组间溶血率, 保存 3、11、19、27 d 悬浮红细胞溶血率, 早期差异无统计学意义, 至 35 d 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4。

3 讨论

血液保存液问世后, 临床输血都是输注保存期内的库存血。成分输血因具有一血多用、节约血源及减少疾病传播等优点而普遍被接受, 其中又以悬浮红细胞应用最为广泛, 及时输注, 可以有效地纠正贫血, 改善机体缺氧, 确保机体生命体征平稳。

目前我国规定, 悬浮红细胞保存标准为输血后 24 h 内红细胞存活率的平均值至少为 70%, 溶血率不能超过 1%, 而这又取决于红细胞内 ATP、2,3-二磷酸甘油酸等的水平^[4]。随着保存时间的延长, 红细胞出现储存损伤, 并发生一系列形态学和生化特性的改变, 如细胞膜由光滑双凹盘状变为球状, 红细胞内 ATP、2,3-DPG 的降低, pH 下降, 使细胞膜上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性逐渐下降, 红细胞内外离子平

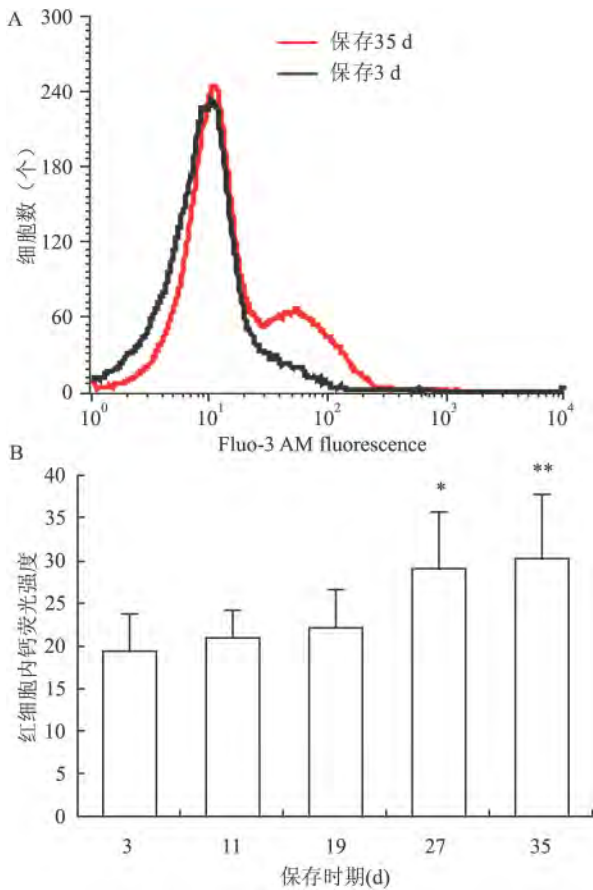


图3 不同保存时期红细胞内Ca²⁺浓度变化

A: 不同保存时期悬浮红细胞内Ca²⁺浓度直方图; B: 不同保存时期悬浮红细胞内Ca²⁺浓度 (n = 12, $\bar{x} \pm s$); 与保存3 d红细胞比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

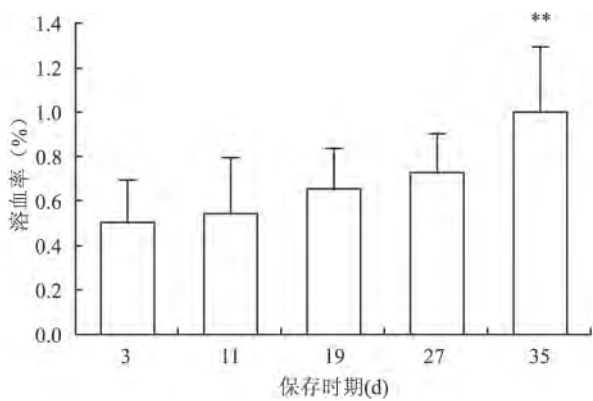


图4 不同保存时期红细胞溶血率变化
与保存3 d红细胞比较: ** P < 0.01

衡改变等,即悬浮红细胞发生了储存损伤^[5]。

理化损伤可能导致细胞凋亡,而细胞凋亡是细胞主动死亡过程,并且是调节细胞生命活动进程的重要机制之一^[6]。红细胞无细胞核和细胞器,是否发生凋亡一直存在争议。Lang et al^[7]提出与有核细胞相区别的红细胞凋亡概念后,即红细胞在受到

内外因素作用下也能发生自杀性死亡才逐渐被接受。能量消耗、氧化应激、弱酸及一些药物等因素都可诱导红细胞凋亡,特征性表现为PS从胞膜内侧翻转到外侧,暴露于细胞表面即PS外翻,细胞皱缩及细胞体积缩小。

本研究经Annexin V-FITC荧光染色,利用流式细胞仪检测不同保存期红细胞PS外翻率和细胞体积。采用Annexin V-FITC可标记出PS外翻的红细胞,即进入衰亡程序的红细胞,所以PS外翻率代表红细胞凋亡率^[8]。结果证实悬浮红细胞在保存过程中发生凋亡性改变,同时也显示悬浮红细胞保存的早期凋亡不明显,后期才发生明显变化,可能是miRNA在保存早期发挥抗凋亡作用^[9]。有文献^[10]报道红细胞在保存24 d以后,PS外翻率明显增多,本研究结果与之基本一致。

为深入探讨凋亡损伤机制,本研究也进行细胞内Ca²⁺浓度的检测,结果显示随着保存时间的延长,细胞内Ca²⁺到后期差异有统计学意义。其机制可能是随着保存时间延长,细胞内的ATP含量下降、氧化应激等因素,使红细胞内Ca²⁺浓度增加,进一步刺激Ca²⁺敏感的K⁺通道。细胞丢失KCl后使细胞因渗透性失水而收缩,更重要的是细胞中的Ca²⁺刺激使细胞膜内部的PS转移到细胞表面,使细胞膜上磷脂成分不对称,引起结构紊乱,使红细胞进入凋亡程序^[11]。

本研究表明红细胞的溶血率开始无明显改变,到35 d明显提高,差异有统计学意义,而细胞凋亡发生比溶血早。一方面,这间接暗示红细胞凋亡的发生,可以阻止细胞溶解,抑制Hb释放入血浆,减轻炎症反应^[12];另一方面,红细胞发生凋亡时,暴露在红细胞膜表面的PS可以和巨噬细胞表面的PS受体结合,使红细胞被巨噬细胞识别并吞噬,很快从循环系统中被清除^[13],也影响患者输注悬浮红细胞效果。

有核细胞凋亡现象目前已有深入阐述,然而无核红细胞的凋亡研究起步较晚。虽然有研究^[14-15]表明致红细胞凋亡的发生还存在通过氧化应激活化半胱天冬酶裂解Band3,使膜蛋白降解,引起红细胞PS外翻;或高渗状态下使红细胞神经酰胺形成,增加由细胞内Ca²⁺浓度升高引起红细胞衰亡的敏感性增加等形式。但是悬浮红细胞在保存过程中发生凋亡是否通过以上机制,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hess J R . Red cell storage [J]. *J Proteomics* ,2010 ,73(3) : 368 - 73.
- [2] Opdahl H , Strømme T A , Jorgensen L , et al. The acidosis - induced right shift of the HbO₂ dissociation curve is maintained during erythrocyte storage [J]. *Scand J Clin Lab Invest* , 2011 , 71 (4) : 314 - 21.
- [3] Hess J R. Measures of stored red blood cell quality [J]. *Vox Sang* , 2014 ,107(1) : 1 - 9.
- [4] Zubair A C. Clinical impact of blood storage lesions [J]. *Am J Hematol* , 2010 , 85(2) : 117 - 22.
- [5] Timmouth A , Fergusson D , Yee I C , et al. Clinical consequences of red cell storage in the critically ill [J]. *Transfusion* , 2006 , 46 (11) : 2014 - 27.
- [6] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. *Toxicol Pathol* , 2007 , 35(4) : 495 - 516.
- [7] Lang K S , Lang P A , Bauer C , et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death [J]. *Cell Physiol Biochem* , 2005 , 15(5) : 195 - 202.
- [8] Lang K S , Duranton C , Poehlmann H , et al. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes [J]. *Cell Death Differ* , 2003 , 10 (2) : 249 - 56.
- [9] Kannan M , Atreya C. Differential profiling of human red blood cells during storage for 52 selected microRNAs [J]. *Transfusion* , 2010 , 50(7) : 1581 - 8.
- [10] Stewart A , Urbaniak S , Turner M , et al. The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin - associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry [J]. *Transfusion* , 2005 , 45(9) : 1496 - 503.
- [11] Akel A , Hermle T , Niemoeller O M , et al. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine [J]. *Eur J Pharmacol* , 2006 , 532(1 - 2) : 11 - 7.
- [12] Basu S , Banerjee D , Ghosh M , et al. Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome [J]. *Hematology* , 2010 , 15(4) : 236 - 9.
- [13] Kempe D S , Lang P A , Duranton C , et al. Enhanced programmed cell death of iron - deficient erythrocytes [J]. *FASEB J* , 2006 , 20 (2) : 368 - 70.
- [14] Mandal D , Baudin-Creuzat V , Bhattacharyya A , et al. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1(band 3) [J]. *J Biol Chem* , 2003 , 278(52) : 52551 - 8.
- [15] Lang F , Gulbins E , Lang P A , et al. Ceramide in suicidal death of erythrocytes [J]. *Cell Physiol Biochem* , 2010 , 26(1) : 21 - 8.

The study on apoptotic lesion of suspended erythrocytes during storage

Ma Wenjuan¹ , Bian Maohong¹ , Zheng Meijuan² , et al

(¹Dept of Transfusion ,²Dept of Clinical Laboratory ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To discuss the effect of different blood storage time on apoptotic lesion of suspended erythrocytes and possible mechanisms in the preservation period. **Methods** The blood was collected from 8 healthy volunteers. After the leukocyte and plasma were depleted , the suspended erythrocytes were preserved as usual. At 5 time points including 3 , 11 , 19 , 27 , 35 days of blood storage , erythrocyte apoptotic rate and the change of cell volume were measured by Annexin V-FITC apoptosis detection reagent staining and flow cytometry. Fluo 3-AM staining and flow cytometry were used to measure the intracellular free calcium. At the same time the supernatant of the samples was harvested. Using microplate reader , the hemoglobin (Hb) absorbance of the supernatant was determined at 405 nm. **Results** Compared with the stored erythrocyte suspensions of 3rd day , erythrocyte apoptotic rate and intracellular free calcium were increasing gradually. After 27 days of storage , there was significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$) ; the increase of hemolytic rate was not obvious in the early days , but there was statistically significant difference on 35 days of storage ($P < 0.01$) ; the cell volume was small gradually , but which was remarkably smaller on 27 day than that of 3rd day ($P < 0.05$, $P < 0.01$) . **Conclusion** With increase in storage time , the increase of erythrocyte apoptotic rate that may be one of the causes of storage lesion. The change of intracellular free calcium may play pivotal roles in apoptosis of erythrocyte.

Key words suspended erythrocytes; storage lesion; erythrocyte apoptosis; calcium ions