维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0210-03

血液经白细胞过滤后红细胞膜的损伤

王云英[1],李兴禄[1],张莉萍[2],陈安明[1]

(1.重庆医科大学附属第二医院检验科,重庆 400010;2.重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨血液经白细胞过滤器去除白细胞对红细胞膜的损伤,为研究改进过滤血液保养液的成分提供依据。方法:采集的 20 名健康供血者的血液 400ml,根据配对设计方法,将血液等量分为两份,分别设为对照组和过滤组,对 2 组的红细胞膜蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用 BandScan 蛋白质分析软件分析膜蛋白的组成。用荧光偏振法测定 2 组红细胞膜的荧光偏振度,并计算出膜微粘度。分别在 0、1、2、3、4、5 周检测 2 组血浆游离血红蛋白(FHb)。结果:膜骨架蛋白带Ⅰ、Ⅱ和带Ⅶ蛋白在过滤组中明显减少($P<0.01$),过滤组的荧光偏振度和微粘度均高于对照组($P<0.01$),血浆 FHb 浓度在 0 周无差异,而在 1、2、3、4、5 周均有显著性差异,血浆 FHb 过滤组均高于对照组($P<0.01$)。结论:白细胞过滤器会破坏红细胞膜蛋白的组成成分,膜微粘度升高,流动性降低,血浆中的游离血红蛋白升高。

【关键词】白细胞过滤;红细胞膜蛋白;膜流动性;游离血红蛋白

【中国图书分类法分类号】R446.11+9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-31

Study on the change of red blood cell membrane after leukocyte filteration

WANG Yun-ying, et al

(*Department of Clinical Laboratories, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the change of membrane protein composition of red blood cells after the blood being filtered by leukocyte filter. *Methods*: A total of 400ml blood from 20 healthy donors were equally divided into control group and filtered group according to the paired design. SDS-PAGE electrophoresis was done for the red blood cell membrane protein of both groups. Bandscan protein analysis software was used to analyze the composition of membrane protein. Fluorescence degree of polarization was detected by fluorescence polarization method and membrane flowability was counted. Plasma concentration of free hemoglobin(FHb) was detected weekly. *Results*: The band Ⅰ, Ⅱ and Ⅶ parotein of membrane skeleton of the filtered group decreased significantly compared with those of the control group($P<0.01$), and the fluorescence degree of polarization and microviscosity of the filtered group was higher($P<0.01$). There was significant difference of plasma FHb between filtered group and control group at each week except week 0, and that of the filted group was higher($P<0.01$). *Conclusion*: Leukocyte filter can bring damage to erythrocyte membrane protein composition. Membrane microviscosity and plasma concentration of free hemoglobin increase and membrane flowability decreases.

【Key words】 Leukocyte filtration; Membrane protein of red blood cells; Membrane flowability; Free hemoglobin

目前在我国以及全世界去白细胞的血液制品在临床上得到广泛的应用,因为输注去除白细胞的血液制品,可以大大减少白细胞引起的输血不良反应。血液经过白细胞过滤器,白细胞去除率可以达到 99.99%,红细胞回收率可以达到 98%~99%[1],然而过滤后红细胞的质量却有所改变。本文通过对过滤前后红细胞膜蛋白、膜流动性的变化以及血浆中游离血红蛋白浓度,探讨血液经过白细胞过滤器后红细胞膜蛋白的变化,为临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 标本来源

从 20 名正常健康供血者采集 ACD-A 抗凝全血 400ml,根据配对设计方法,将血液等量分为 2 份,分别设为对照组和过滤去除白细胞组(简称"过滤组")。过滤组于采血后 1~3h 内使用去白细胞联袋进行过滤,对照组不作特殊处理。2 组血液均按美国血库协会(AABB)全血保存要求放置 -40℃血库冰箱内保存 35d。所有血液均来自重庆市血液中

作者介绍:王云英(1972-),女,主管技师,研究方向:输血医学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

心。

1.2 主要仪器及试剂

白细胞过滤器(南京生物医学研究所生产),高速冷冻离心机(日立 SRC 20BA 型),Olympus-Au560,RF-540 型荧光分光光度计,BandScan 蛋白质分析软件,电泳仪及 721 分光光度计,游离血红蛋白测定试剂(由南京生物建成公司提供),标准分子量蛋白(MBI Fermentas 公司生产),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 红细胞膜样品的制备 按程正江等[2]低渗溶血法,分别取过滤组和对照组中的血 5ml,在低温(4℃)条件下用 PBS 反复洗涤 3 次后用 0.01mol/L tris-Hcl 溶血破膜,然后以 10 000r/min 离心 15min,反复洗涤 3 次后的乳白色提取物即为红细胞膜样品。

1.3.2 红细胞膜蛋白浓度测定 Olympus-Au560 全自动生化仪用磺基水杨酸法测定[3]。

1.3.3 红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳 将样品配成相同浓度,参考文献方法[4]进行电泳,结果用考马斯亮蓝染色,BandScan 蛋白质分析软件分析膜蛋白的组成。

1.3.4 红细胞膜的荧光标记和荧光偏振度 P 的测定 取新鲜配制的红细胞膜悬液 2ml,加入荧光标记物 1.6-二苯基-1.3.5 乙三烯(DPH)液 2ml,25℃温育 30min,以 10 000r/min 离心 15min,用 PBS 液洗涤 1 次,悬浮在 4ml 的 PBS 中。用 RF-540 型荧光分光光度计,激光波长 362nm,发射波长 432nm,测定其荧光偏振度 P。利用 P 与 η(微粘度)的定量关系 $\eta=2P/(0.46-P)$计算出红细胞膜的微粘度。

1.3.5 血浆 FHb 浓度的测定 分别在 0、1、2、3、4、5 周检测 2 组血浆 FHb 浓度。

1.4 统计学处理

所测数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,配对资料 t 检验采用 SPSS 软件包分析。

2 结 果

2.1 红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳分析(见图 1)

BandScan 蛋白质分析软件分析出过滤组和对照组中红细胞膜各区带蛋白百分含量比较(见表 1)。带Ⅰ、Ⅱ和带Ⅶ蛋白在过滤组中明显减少,而带Ⅲ蛋白在过滤组中则相对增加。

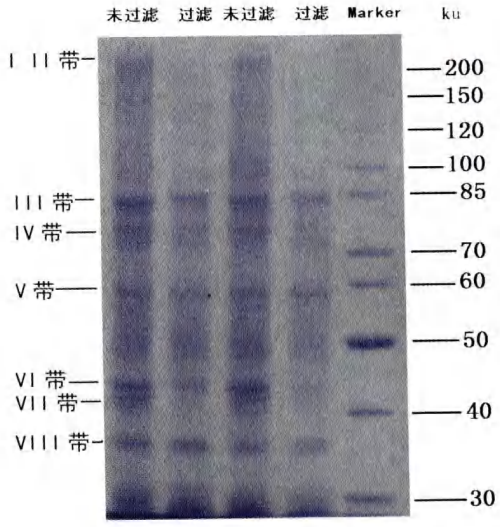


图 1 过滤组与对照组红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳分析图谱

2.2 白细胞过滤组与对照组红细胞膜荧光偏振度和微粘度测定结果(见表 2)

过滤组的荧光偏振度和微粘度均高于对照组($P<0.01$),提示过滤后的红细胞膜流动性降低。

2.3 不同保存期血浆 FHb 含量测定(见图 2)

过滤组和对照组血浆 FHb 浓度在 0 周无差异,

表 1 白细胞过滤组与对照组红细胞膜各区带蛋白百分含量比较($\bar{x}\pm s$)

蛋白区带	过滤组(%)(n=20)	对照组(%)(n=20)	t 值	P 值
带Ⅰ、Ⅱ	3.63 ± 0.87	12.62 ± 1.25	4.223	$P<0.01$
带Ⅲ	37.23 ± 2.78	24.68 ± 2.45	3.257	$P<0.01$
带Ⅳ	18.24 ± 1.37	18.89 ± 1.43	0.852	$P>0.05$
带Ⅴ	6.26 ± 0.76	6.46 ± 1.03	0.735	$P>0.05$
带Ⅵ	9.68 ± 2.27	10.08 ± 0.97	1.023	$P>0.01$
带Ⅶ	15.68 ± 3.24	18.48 ± 3.52	3.125	$P<0.01$
带Ⅷ	9.28 ± 1.32	8.79 ± 0.98	1.223	$P>0.01$

表 2 白细胞过滤组与对照组红细胞膜荧光偏振度和微粘度比较($\bar{x}\pm s$)

	过滤组(n=20)	对照组(n=20)	t	P
荧光偏振度(p)	0.317 ± 0.098	0.251 ± 0.035	3.851	$P<0.01$
微粘度(η)	4.434 ± 0.602	2.402 ± 0.451	2.956	$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

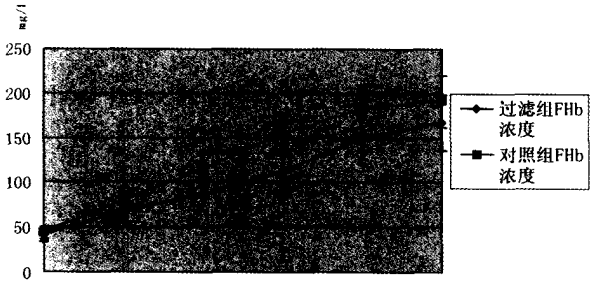


图 2 过滤组和对照组血浆游离血红蛋白浓度

而在 1、2、3、4、5 周均有明显差异，血浆 FHb 过滤组均高于对照组($P<0.01$)。

3 讨 论

一次性使用去白细胞滤器工作原理是依靠血液自身的重力，通过机械阻滞和吸附的原理去除白细胞和血液中的凝聚物。过滤介质由 0.3~3 μm 的超细聚脂纤维构成，交错成非编织网状结构，通过改变纤维表面介质密度而控制和改变纤维间的有效孔径。由于血小板体积小而红细胞可塑性大容易通过过滤介质，而白细胞体积大，可塑性差则被阻止截流。去白细胞输血可以防止异体免疫反应，预防非溶血性输血反应，降低血小板输注无效和预防病毒感染[5]。在临床上已经广泛使用去白细胞血液制品。

正常红细胞的平均直径 7.2 μm，具有较强的变形能力，当经过狭窄处可以从盘状变为细条状而得以通过，而老化的红细胞变形性差，易被扣捕。正常人红细胞平均寿命为 120d，在生存了 60d 的红细胞 ATP 的生成即减少[6]，影响红细胞的能量代谢和生理功能，变形能力下降。因此供血者的血液经过过滤器时，可能就会有 3 种情况发生，(1)衰老的红细胞由于变形能力差被阻止截流；(2)变形能力较好，刚能通过过滤器，这时红细胞虽然能通过过滤器但其表面的膜成分会受到损伤；(3)年轻红细胞的变形能力好，能通过过滤器而不受任何的损伤。红细胞膜以脂质双层为膜的支架，膜蛋白镶嵌在脂质双层中又相互连结形成膜的骨架。膜骨架由收缩蛋白(带Ⅰ、Ⅱ)、肌动蛋白(带Ⅴ)，锚蛋白(2、1)、原球蛋白(带Ⅶ)、肌球蛋白、加合素、4.1 蛋白、4.2 蛋白和 4.9 蛋白相连接构成。这些蛋白在整个细胞膜的胞质面下形成可变形的网架结构，在支撑细胞形态、维持细胞变形和运动方面起着重要作用，也是决定膜力学特性以及整个细胞流变特性的重要因素，其分子结构或成分上的异常均可导致红细胞上述性质的变化。经过对过滤前后红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 电泳分析，由图 1 和表 1 可以看出，膜骨架蛋白在过滤组中明显减少，因而使红细胞的稳定性和变形性降低，这不仅造成膜蛋白本身运动性发生改变，而且由于膜蛋白的损伤，影响了膜脂质的流动性，使红细胞膜的微粘度升高。由于红细胞膜在维持红细胞的正常生理功能中具有重要作用，膜蛋白的损伤和膜流动性的改变可能会使血液输入人体后的存活期缩短，另外使保存的红细胞寿命缩短，从而使血浆中游离血红蛋白升高。在对照组中，由于白细胞破坏释放生物活性物质产生氧自由基，会导致红细胞膜蛋白和脂质分子化学改变，造成膜分子构象及膜整体结构改变。因此随着血液保存期的延长，血浆中的游离血红蛋白也升高[7]。但由图 2 可以看出，随着血液保存期的延长，过滤组和对照组游离血红蛋白均升高，但过滤组升高更为明显，二者有显著性差异($P<0.01$)，与王海宝等的报道[8]有一定差异。输入高游离血红蛋白血液会对机体造成影响，特别是一些本身游离血红蛋白高和处理游离血红蛋白能力不足的病人，如血液病患者和肝病患者。

综上所述，白细胞过滤器会破坏红细胞膜蛋白的组成成分，主要是膜骨架蛋白的减少，使红细胞的稳定性和变形性降低，影响了膜脂质的流动性，使红细胞膜的微粘度升高，血浆中的游离血红蛋白升高，对机体造成不良影响。因此，为了提高输血质量，应研究改进过滤血液保养液的成分，以改善红细胞膜的稳定性、变形性和流动性，降低游离血红蛋白的含量，提高输血质量。

参 考 文 献

[1] 胡丽华，曹奎杰.白细胞过滤器的临床应用[J]. 临床血液学杂志，2000;13:267-268.

[2] 程正江，田兴亚.G6PD 缺乏患者红细胞膜蛋白质的改变[J]. 中华血液学杂志，2001;22(4):211-212.

[3] 宋 敏，赖国旗，耶宗荫，等. HeLa 细胞蛋白质双向电泳技术的建立[J]. 重庆医科大学学报，2007;32(2):117-120.

[4] 金东雁，黎孟枫，译.萨姆布鲁克 J，弗里奇 EF 编.第 2 版.分子克隆实验指南[M]. 北京：科技出版社，1993.881-886.

[5] Higgins VL. Leukocyte-reduced blood components:Benefits and practical applications[J]. Oncol Nurs Eorum,1996;23(4):659.

(下转第 225 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

患者的影像学检查也未见钙化斑点。

病理组织学上 RB 基本上是未分化的神经母细胞,可起源于视网膜的任一核层[3]。最具特征性的病理改变为 Rossette 结节的形成[1-3]。典型的 FW rossette 结节由立方形细胞组成,中央围绕 1 空腔,在光镜下近中央腔边缘有 1 环状膜[12]。Homer-Wright rossette 结节瘤细胞胞突交错伸出占据中心[12]。Fleurettes 结节为瘤细胞胞突呈花束状,具有光感受器分化[12]。回顾以往 27 例病案报道中,18 例发现 rossette 结节[8-11,13],其中 9 例为 FW,5 例为 Homer-Wright, 其余形态为非典型性,但未见 fleurettes 结节的报道。本例未见 Rossette 结节,可能由于切片损失了较多瘤体细胞。目前 RB 尚无特征免疫组化标记,但对脉络膜恶性黑色素瘤 HMB-45 和转移癌角蛋白染色均呈阴性。在本例中, 神经元异性烯醇化酶(NES)RB 瘤细胞及视神经呈阳性,SYN 瘤细胞呈阳性,神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)呈阳性反应的细胞多位于肿瘤边缘及血管周围。S-100 以及 HMB-45 瘤细胞呈阴性反应。

视网膜细胞瘤(Retino cytoma,RC)是一种视网膜良性肿瘤,由表型 RB1 基因点突变而来,携带与 RB 相似关联的基因[14]。成人 RB 究竟是原发或是由 RC 恶变而来,尚不得而知。如果在成人 RB 中发现良性形态的区域,支持这种可能性的存在,并能部分解释患者对出现症状和体征后长时间的耐受。Singh[15]和他的同事阐述了由 RC 向 RB 恶性转化的危险性为 4%。但回顾以往 27 例病案,发现 3 例与 RC 相关联,本例在病理检查中也未发现瘤体内有良性细胞形态的区域,故 RB 可能由 RC 发展而来的假说还需要对 RC 患者进行长期临床观察来证实。

参 考 文 献

[1] Nork TM,Schwartz TL,Doshi HM,et al. Retinoblastoma. Cell of origin[J]. Arch Ophthalmol,1995;113:791-802.

[2] Pendergrass TW,Davis S. Incidence of retinoblastoma in the United States[J]. Arch Ophthalmol,1980;98:1204-1210.

[3] McLean IW,Burnier MN,Zimmerman LE,et al. Atlas of tumor pathology. 3rd series,fascicle 12[J]. Tumors of the eye and ocular adnexa. Washington(DC):Armed Forces Institute of Pathology,1994. 100-127.

[4] 许建平,应月玲.48 岁视网膜母细胞瘤 1 例[J]. 实用眼科杂志,1991;9:184

[5] 岳红云,杨 波.54 岁成人视网膜母细胞瘤一例[J]. Chin Ophthal Res,2003;21:600.

[6] 闻祥根,倪 明.高龄家族性视网膜母细胞瘤病例报告[J]. 实用医学杂志,1989;5.

[7] 彭广华,王国军.成人患视网膜母细胞瘤 1 例. 成人患视网膜母细胞瘤 1 例[J]. 肿瘤基础与临床,1991;4.

[8] Biswas J,Mani B,Shanmugam MP,Patwardhan D,Kumar KS, Badrinath SS. Retinoblastoma in adults:report of three cases and review of the literature[J]. Surv Ophthalmol,2000;44:409-414.

[9] Alexandre Nakao Odashiro,Retinoblastoma in an adult:case report andliterature review Can J Ophthalmol,2005;40:188-191.

[10] Mietz H,Hutton WL,Font RL. Unilateral retinoblastoma in an adult. Report of a case and review of the literature[J]. Ophthalmology 1997;104:43-47.

[11] Nork TM,Millecchia LL,de Venecia GB,et al. Immunocytochemical features of retinoblastoma in an adult[J]. Arch Ophthalmol, 1996;114:1402-1406.

[12] 武忠弼,杨光华.中华外科病理学[M].北京:人民卫生出版社,2002.2954-2956.

[13] Lash H. Ein Retinoblastomrezidiv im Erwachsenenalter[J]. Klin Monatsbl Augenheilkd,1964;144:268-272.

[14] Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DH,et al. Retinoma: Spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation[J]? Br J Cancer,1982;45:513-521.

[15] Singh AD,Santos MCM,Shields CL,et al. Observations on 17 patients with retinocytoma[J]. Arch Ophthalmol,2000;118:199-205.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 212 页)

[6] 谭齐贤,主编.临床血液学及血液检验[M]. 第 3 版.北京:人民卫生出版社,2003.106.

[7] 黄益民,赵 辉.自由基损伤红细胞膜分子的机理研究[J].生物物理学报,1997;13(2):315-322.

[8] 王海宝,刘景汉.保存前去除白细胞对浓缩红细胞保存质量影响研究[J]. 中国实验血液学杂志,2003;11(6):650-653.

(责任编辑:谭乐勤)