

海藻糖联合葡萄糖负载红细胞不同时间下溶血情况*

姚根宏¹ 汪海蓉¹ 陈虎诚¹ 吴永政² 栾建凤¹ 朱培元¹ 叶东¹ 严京梅¹

[摘要] 目的:探索海藻糖和葡萄糖联合负载红细胞的最适时间,为冷冻干燥红细胞提供基础。方法:分别采用 0、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mol/L 的海藻糖联合葡萄糖在 37℃ 负载红细胞 4、6 和 8 h。然后检测上清液中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶含量。结果:负载液浓度为 1 mol/L 时,3 种负载时间下的细胞溶血程度较重,即上清中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶浓度较高。在浓度低于 1 mol/L,负载时间为 4、6 h 时,上清中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶浓度较低。而负载时间延长至 8 h 时,红细胞溶血程度较高。结论:在浓度小于 1 mol/L 时,海藻糖联合葡萄糖在 37℃ 情况下负载红细胞 6 h 时对细胞的损伤较小,能够满足冻存要求。

[关键词] 红细胞保存;冷冻干燥;最适时间;海藻糖;葡萄糖

[中图分类号] R318.52 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)02-0074-03

Hemolytic effect of trehalose and glucose loading red blood cells at different time

YAO Genhong¹ WANG Hairong¹ CHEN Hucheng¹ WU Yongzheng²LUAN Jianfeng¹ ZHU Peiyuan¹ YE Dong¹ YAN Jingmei¹

(¹Department of Transfusion, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, 210002, China; ²School of Life Science, Jinling Nanjing College of Jinling University)

Corresponding author: YAO Genhong, E-mail: yaogenhong@sohu.com

Abstract Objective: To explore the optimum time of trehalose and glucose loading red blood cells for lyophilization. **Method:** The red blood cells were loaded with 0, 0.125, 0.250, 0.500 and 1.000 mol/L trehalose and glucose respectively in 37℃ for 4, 6, and 8 hours. Then, the levels of free hemoglobin and lactate dehydrogenase in the supernatants were determined. **Result:** The results showed that free hemoglobin and lactate dehydrogenase significantly increased in three groups of 1 mol/L trehalose and glucose (4, 6, and 8 h). When red blood cells were loading with 0.125, 0.250, and 0.500 mol/L trehalose and glucose for 4 and 6 h, the free hemoglobin and lactate dehydrogenase were low. However, when the incubation time extend to 8h (0.125, 0.250, and 0.500 mol/L), the red blood cells showed significant hemolysis. **Conclusion:** These results suggested that loading with trehalose and glucose (0.125, 0.250, and 0.500 mol/L) at 37℃ for 6h had little hemolytic effect on red blood cells and were qualified for loading red blood cells for purpose of lyophilization.

Key words human red blood cell preservation; Lyophilization; optimum time; Trehalose; Glucose

冰冻干燥红细胞便于长期保存、运输,对保障未来战争和突发性自然灾害的紧急供血、改善临床用血短缺和提高灾害医学救治水平有重要意义

义^[1-2]。近年来,理想的冻干保存剂和保存条件一直在研究和优化之中。我们以往的研究表明,用一定浓度海藻糖和葡萄糖联合组成的保护剂来负载红细胞,可以使细胞内海藻糖和葡萄糖含量达到冻干的要求,同时并不造成红细胞严重溶血^[3-4]。我们最近的研究表明,37℃时负载红细胞,不会造成红细胞严重溶血。但是,海藻糖和葡萄糖联合负载

* 基金项目:南京军区医学科技创新资助项目(No: 09MA087),南京军区南京总医院科研基金(No: 2011048)

¹ 南京军区南京总医院输血科(南京, 210002)

² 南京大学金陵学院化学与环境生物科学系

通信作者:姚根宏, E-mail: yaogenhong@sohu.com

- Survivin, an inhibitor of apoptosis proteins [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1474-1482.
- [8] TARNAWSKI A, PAI R, CHIOU S K, et al. Rebamipide inhibits gastric cancer growth by targeting Survivin and Aurora-B [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334: 207-212.
- [9] KAGA S, ZHAN L, ALTAF E, et al. Glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and Survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium [J]. J Mol Cell Cardio, 2006, 40: 138-144.
- [10] GUO Q, CHEN Y, ZHANG B, et al. Potentiation of the effect of gemcitabine by emodin in pancreatic cancer is associated with survivin inhibition [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77: 1674-83.
- [11] KUNNUMAKKARA A B, GUHA S, KRISHNAN S, et al. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products [J]. Cancer Res, 2007, 67: 3853-3861.

(收稿日期: 2011-10-25)

红细胞的最佳时间还有待于进一步研究。本研究应用海藻糖联合葡萄糖分别负载红细胞 4、6 和 8 h,观察负载后细胞的溶血情况,为两者联合冻干红细胞提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

iMark™酶标仪(Bio-Rad 公司);乳酸脱氢酶和微量游离血红蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;海藻糖(分子量 378.33)购自国药集团化学试剂有限公司,其余试剂皆为分析纯。

1.2 红细胞负载

分别配制 0、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mol/L 的海藻糖联合葡萄糖的红细胞负载液。取健康献血员新鲜血制备的压积红细胞,将压积红细胞与负载液以 1:3 体积混匀,然后在 37℃ 恒温水浴锅中分别孵育 4、6 和 8 h。混匀孵育后的样品溶液,离心后留取上清用于游离血红蛋白和乳酸脱氢酶测定。

1.3 游离血红蛋白检测

具体操作方法按试剂盒说明进行。其测定原理为:血红蛋白分子中亚铁血红素具有类过氧化物酶活性,能催化 H_2O_2 释放新生态氧 $[O]$, $[O]$ 使酚和 4-AAP 氧化生成红色物质,反应颜色深浅与血红蛋白含量成正比。根据标准曲线拟合计算公式计算出游离血红蛋白含量。

1.4 乳酸脱氢酶测定

详细操作步骤按试剂盒说明书进行。其测定原理是乳酸在乳酸脱氢酶作用下生成丙酮酸,丙酮酸和 2,4-二硝基苯肼在碱性环境和 37℃ 下生成棕红色丙酮酸二硝基苯腙,最后根据比尔定律,计算出乳酸脱氢酶活性。

1.5 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,2 组样本比较采用双样本 t 检验;多组之间比较采用单因素方差分析,再进行 Student-Newman-Keul t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

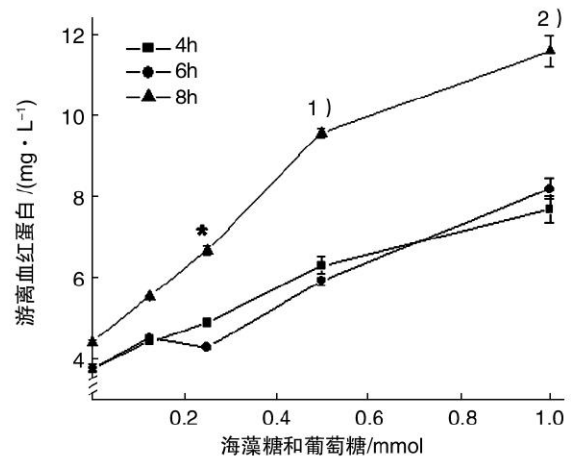
2 结果

2.1 红细胞负载后上清游离血红蛋白

在相同负载时间下,随着负载液中海藻糖和葡萄糖浓度的增加,上清中血红蛋白浓度也随之增加。负载 6 h 的各浓度组与 4 h 组相应浓度组相比,上清中游离血红蛋白没有明显差异($P > 0.05$)。负载时间为 8 h 时,海藻糖和葡萄糖浓度大于 0.25 mol/L,游离血红蛋白浓度与相应的 4 h 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。尤其是浓度为 1 mol/L,负载 8 h 后,游离血红蛋白达到 $(11.57 \pm 0.39) \text{ mg/L}$ (图 1)。

2.2 红细胞负载后上清乳酸脱氢酶

在同一负载时间下,随着海藻糖和葡萄糖浓度的增加,红细胞负载后上清乳酸脱氢酶也随之增



相同海藻糖和葡萄糖浓度下与 4 h 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

图 1 不同负载时间下上清游离血红蛋白

加。尤其是 1 mol/L 海藻糖和葡萄糖组,乳酸脱氢酶分别为 $(195.90 \pm 26.35) \text{ U/L}$ (4 h)、 $(200.00 \pm 22.15) \text{ U/L}$ (6 h) 和 $(453.10 \pm 31.40) \text{ U/L}$ (8 h)。红细胞负载 6 h 时,0.125、0.250、0.500 mol/L 海藻糖和葡萄糖组均较 4 h 时各组明显增加($P < 0.05$)。随着负载时间延长至 8 h,各个浓度海藻糖和葡萄糖组及对照组的乳酸脱氢酶,均较相应负载 4 h 组明显升高($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 不同负载时间下上清中乳酸脱氢酶 U/L

海藻糖和葡萄糖/(mol · L ⁻¹)	4 h	6 h	8 h
0	2.3 ± 1.80	8.2 ± 2.60	61.2 ± 5.80 ²⁾
0.125	16.3 ± 2.20	57.2 ± 4.30 ¹⁾	106.1 ± 9.80 ²⁾
0.250	36.6 ± 3.10	81.6 ± 6.70 ²⁾	138.8 ± 12.35 ²⁾
0.500	40.8 ± 9.60	102.0 ± 6.94 ²⁾	440.8 ± 23.90 ²⁾
1.000	195.9 ± 26.35	200.0 ± 22.15	453.1 ± 31.40 ²⁾

相同海藻糖和葡萄糖浓度下与 4 h 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

研究表明,海藻糖是低温生物领域最佳的保护剂,而葡萄糖可以保护红细胞和血红蛋白,降低冻干后红细胞的溶血率^[5]。利用葡萄糖和海藻糖在红细胞冰冻干燥保存过程中各自不同的保护作用,可能会提高冰冻干燥红细胞的保存效果。我们以前的研究显示在浓度小于 1 mol/L 时,海藻糖联合葡萄糖负载红细胞后对细胞的损伤较小,能够满足冻存的负载要求^[3-4]。而且,我们最近的研究表明,37℃ 条件下负载红细胞不会造成严重溶血。但是,负载时间长短对进入红细胞内的海藻糖和葡萄糖含量有明显的影响,而且不同的负载时间,红细胞的溶血情况也会不同。因此,有必要探索不同时间下海藻糖联合葡萄糖负载红细胞的效果。

红细胞负载时,部分红细胞发生溶血,上清中乳酸脱氢酶含量也发生改变。众所周知,红细胞发生溶血时,细胞内的血红蛋白会释放出来,造成上清中出现血红蛋白。同时,细胞溶解时,细胞内的乳酸脱氢酶也会释放出来^[6-7]。为了探索海藻糖和葡萄糖联合负载红细胞的最佳负载时间,我们观察了不同负载时间条件下红细胞的溶血情况(负载后上清液中的游离血红蛋白和乳酸脱氢酶含量)。结果表明,在相同海藻糖和葡萄糖负载浓度下,负载 8 h 后,上清液中游离血红蛋白和乳酸脱氢酶均较 4 和 6 h 明显升高。从游离血红蛋白的检测情况来看,负载时间为 6 h,各浓度的海藻糖和葡萄糖组与相应的 4 h 组相当。从乳酸脱氢酶的水平来看,红细胞负载 6 h 时,0.125、0.250、0.500 mol/L 海藻糖和葡萄糖组均较 4 h 时各组有所增加。但是,与我们以前的结果比较后,仍然可以满足冷冻干燥的需要。

总之,我们的研究结果表明,在浓度小于 1 mol/L 时,海藻糖联合葡萄糖负载红细胞 8 h 后,红细胞溶血比较严重,不能够进行冻存研究。而 4、6 h 情况下负载红细胞,对细胞的损伤较小,红细胞没有严重溶血,能够满足冻存的负载要求。但是,4、6 h 负载红细胞后,进入红细胞内的海藻糖和葡萄糖浓度如何,以及这 2 个温度下负载后用于冻干和水化后的细胞存活和功能的影响,还有待于

进一步观察。只有综合这些研究后,我们才能确定负载红细胞的最佳时间。

参考文献

- [1] 姚根宏,栾建凤,朱培元,等.汶川大地震期间无偿献血的组织、实施和启示[J].医学研究生学报,2009,22(1):68-70.
- [2] LYNCH A L, CHEN R, SLATER N K. pH-responsive polymers for trehalose loading and desiccation protection of human red blood cells[J]. Biomaterials, 2011, 32: 4443-4449.
- [3] 姚根宏,栾建凤,叶东,等.海藻糖联合葡萄糖联合负载红细胞后溶血效果[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2010,23(2):82-83.
- [4] 姚根宏,栾建凤,叶东,等.海藻糖和葡萄糖联合负载红细胞效果评价[J].临床输血与检验,2010,12(1):4-6.
- [5] ZHOU X, YUAN J, LIU J. Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying[J]. Cryo Letters, 2010, 31: 147-156.
- [6] KATO G J, MCGOWAN V, MACHADO R F, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease[J]. Blood, 2006, 107: 2279-2285.
- [7] 杨发达,贾璋林,谭桂彩,等.溶血血清标本中血红蛋白自动化分析方法的建立[J].检验医学与临床,2010,7(15):1537-1541.

(收稿日期:2011-08-15)

昆明全国临床输血学术研讨大会会讯

11月2日至5日,由中国输血协会临床输血工作委员会主办的2011年全国临床输血学术研讨大会在昆明市滇池国际花园大酒店隆重召开。来自全国各省市医院输血科主任、采供血机构领导及与输血相关人员共160余人参加了为期4天的学术研讨大会,大会共有专家9名国内知名专家教授作了临床输血学术研讨专题报告。

卫生部医政司血液管理处申子瑜处长亲自到会,并作了重要讲话。针对当前临床用血现状申子瑜处长作了感人肺腑的讲演,特别强调临床要合理用血,节约用血,要尊重无偿献血者提供的宝贵的血液资源。他充分肯定了临床输血委员会近几年取得的成绩,指出了今后临床输血工作发展的方向。使与会代表受到极大的鼓舞,更进一步明确了今后临床输血工作的方向。

临床输血工作委员会主任委员胡丽华教授致开幕词。随后胡丽华主任委员作了《输血质量管理与临床输血安全》的专题研讨报告。

来自全国输血界其他几位知名专家、教授在大会上做了专题报告,使与会代表受益匪浅。本次研讨会加深了代表之间的友谊与了解。会上,代表们充分利用这次宝贵的学习机会,积极参与了学习活动,加强了与同行间的交流,探讨热点问题、分享经验、共商发展大计。此次大会得到了与会代表的广泛好评。

通过本次学术研讨大会,拓展了临床输血的发展思路,深入了解了存在的问题和发展机遇。代表们一致表示今后一定要团结在卫生部医政司和中国输血协会周围,携手共进,同舟共济,共同建设临床输血事业更加美好的明天。

中国输血协会临床输血工作委员会

2011.12.11