

去白细胞洗涤红细胞保存期内膜蛋白 CD47 和 磷脂酰丝氨酸表达变化*

杨宜承¹ 郑井滨¹ 毕聪玺¹ 王东¹ 康炜¹

[摘要] 目的:研究运用甘露醇-腺嘌呤-磷酸盐红细胞保养液(mannitol adenine phosphate red blood cell maintenance solution, MAP)重悬去白细胞洗涤红细胞对红细胞 pH 值、膜蛋白 CD47 分子和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)表达变化。方法:随机选取 10 袋全血,滤除白细胞后,每袋去白细胞全血平均分成 2 份,分别制备成去白细胞悬浮红细胞和 MAP 去白细胞洗涤红细胞,分别于采血第 2、7、14、21、28 和 35 天,检测 CD47 蛋白平均荧光强度、PS 蛋白阳性率和 pH 值。结果:去白细胞洗涤红细胞组 CD47 平均荧光强度降低,第 2、7、14 和 21 天与去白细胞悬浮红细胞第 35 天比较,差异有统计学意义(457.35±81.67、421.93±54.01、304.03±26.08、288.79±107.07 vs 209.81±26.17, $P<0.05$);去白细胞洗涤红细胞组 PS 蛋白阳性率逐渐升高,第 2、7、14、21 和 35 天与去白细胞悬浮红细胞第 35 天比较,差异有统计学意义(0.08±0.13、0.07±0.13、0.03±0.02、1.34±0.56、4.14±1.53 vs 2.29±0.31, $P<0.05$);相同时间点 MAP 去白洗涤红细胞 pH 值均低于去白细胞悬浮红细胞,差异有统计学意义(第 2 天:6.82±0.04 vs 6.9±0.09、第 7 天:6.64±0.04 vs 6.72±0.07、第 14 天:6.57±0.03 vs 6.66±0.08、第 21 天:6.49±0.02 vs 6.58±0.04、第 35 天:6.45±0.02 vs 6.52±0.03, 均 $P<0.05$;第 28 天:6.46±0.02 vs 6.55±0.03, $P<0.01$)。结论:保存期内 MAP 去白细胞洗涤红细胞膜 CD47 蛋白表达降低,PS 蛋白外翻增加,损伤加重与 pH 相关,建议第 21 天为 MAP 去白洗涤红细胞最佳保存期。

[关键词] 甘露醇-腺嘌呤-磷酸盐红细胞保养液;洗涤红细胞;CD47;磷脂酰丝氨酸

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2023.06.007

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Effects of saline washing and MAP resuspension on protein expression of erythrocyte membrane

YANG Yicheng ZHENG Jingbin BI Congxi WANG Dong KANG Wei

(Dalian Blood Center, Dalian, 116001, China)

Corresponding author: YANG Yicheng, E-mail:277745091@qq.com

Abstract Objective: To investigate the effects of saline washing and(mannitol adenine phosphate red blood cell maintenance solution, MAP)resuspension red blood cells on pH value and expression of membrane protein CD47 and phosphatidyl serine(PS). **Methods:** Ten bags of whole blood were randomly selected, each bag of whole blood was prepared into leukocyte-reduced suspended red blood cells(L-SRBC) and MAP resuspended leukocyte-reduced washed red blood cells(MAP-WRBC). On the 2nd, 7th, 14th, 21st, 28th and 35th day of blood sampling, sterility test, pH value, CD47 protein average fluorescence intensity and PS protein positive rate were detected. **Results:** The mean fluorescence intensity of CD47 was significantly decreased on days 2, 7, 14 and 21 in MAP-WRBC compared with L-SRBC on days 35(457.35±81.67, 421.93±54.01, 304.03±26.08, 288.79±107.07 vs 209.81±26.17, $P<0.05$). The positive rate of PS protein was significantly decreased on the 2nd, 7th, 14th, 21st and 35th days in MAP-WRBC compared with L-SRBC on the 35th(0.08±0.13, 0.07±0.13, 0.03±0.02, 4.14±1.53, 1.34±0.56 vs 2.29±0.31, $P<0.05$). The pH value of MAP-WRBC was significantly lower than that of L-SRBC(day 2: 6.82±0.04 vs 6.9±0.09, day 7: 6.64±0.04 vs 6.72±0.07, day 14: 6.57±0.03 vs 6.66±0.08, day 21: 6.49±0.02 vs 6.58±0.04, day 35: 6.45±0.02 vs 6.52±0.03, $P<0.05$; day 28: 6.46±0.02 vs 6.55±0.03, $P<0.01$). **Conclusion:** Multiple addition of low pH solution can aggravate the damage of erythrocyte membrane, decrease the expression of CD47 protein, and increase PS protein ectropion of MAP-WRBC. The damage of erythrocyte membrane at 21 days was lower than that at the end of the preservation period of L-SRBC. It is suggested that 21 days should be the preservation period of MAP-WRBC.

Key words mannitol adenine phosphate red blood cell maintenance solution; washed red blood cells; CD47; phosphatidylserine

*基金项目:大连市医学科学研究计划项目(No:2011037)

¹大连市血液中心(辽宁大连,116001)

通信作者:杨宜承, E-mail:277745091@qq.com

去白细胞洗涤红细胞属于临床常用红细胞制品,主要用于血浆蛋白过敏肾功能不全等患者^[1],通过向去白细胞悬浮红细胞中多次添加氯化钠溶液并离心的方式除去其残留血浆。通常最后以氯化钠溶液混悬,如在密闭系统中洗涤且最后以保存液混悬,保存期与洗涤前的红细胞悬液相同。但制备过程中的洗涤液和保存液的溶液损伤都会对红细胞造成损伤,由于红细胞无核,其损伤情况主要表现在其膜蛋白^[2],因此本试验对红细胞损伤相关膜蛋白连续检测分析,旨在为制定甘露醇-腺嘌呤-磷酸盐红细胞保养液(mannitol adenine phosphate red blood cell maintenance solution,MAP)去白细胞洗涤红细胞制备及保存提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 原料血液

10份400 mL全血均为无偿献血者捐献的合格血液,保存液为MAP红细胞保存液。

1.2 仪器与试剂

BD FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD),TSCDII 无菌接合机(日本 Terumo),RC12BP 低温离心机(美国 Thermo),多参数测试仪(Mettler Toledo SG78),一次性使用去白细胞塑料血袋(山东威高),FITC Annexin V(生产批号:B335811),Annexin V Binding Buffer(生产批号:B341944),APC anti-CD47(生产批号:B338988)均购自于 Bilegend(美国),氯化钠注射液(上海输血技术)。

1.3 方法

随机选取采集的400 mL全血于6 h内完成滤白、离心、分离操作,制成去白细胞悬浮红细胞,保存于(4±2)℃备用。采集第2天(48 h内),将合格

的去白悬浮红细胞作为起始血液,通过无菌接合机将血液分装成2等份,分为去白洗涤红细胞组和去白悬浮红细胞组。去白洗涤红细胞组通过无菌接合机与预冷的氯化钠注射液连接,添加氯化钠溶液150 mL,充分混匀,以3 500 g/min离心8 min,离心后去除上清,重复3次,最后一次去除上清后添加50 mL MAP保存液,混匀后于(4±2)℃保存;去白悬浮红细胞组不进行任何处理于(4±2)℃保存。2组分别于采集后第2、7、14、21、28、35天对血液检测。

1.4 流式细胞术检测

采用APC anti-CD47标记CD47分子,采用FITC Annexin V标记PS蛋白。用PBS调整红细胞浓度至10⁶个/mL,离心后分别重悬与PBS和Annexin V Binding Buffer,取100 μL悬液,分别加入5 μL APC anti-CD47和FITC Annexin V,流式细胞仪测定不同储存时间红细胞膜表面CD47分子和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)蛋白表达情况。

1.5 pH检测

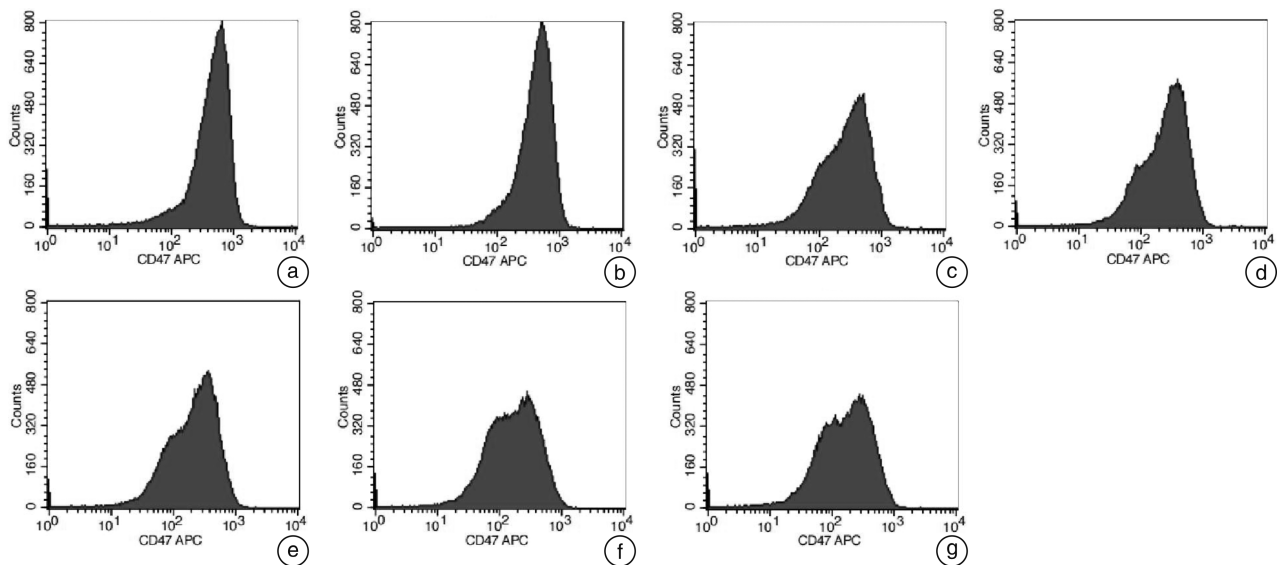
按照仪器使用说明书进行pH检测。

1.6 统计学处理

使用Graphpad prism 8统计软件分析处理数据,以 $\bar{X} \pm S$ 表示,组间采用独立样本t检验两两比较,相关性分析采用Pearson相关性分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

去白悬浮红细胞组和去白洗涤红细胞组CD47平均荧光强度比较,见图1、表1。



a~f:分别为去白细胞洗涤红细胞组第2、7、14、21、28、35天CD47分子平均荧光强度;g:去白细胞悬浮红细胞第35天CD47分子平均荧光强度。

图1 2组红细胞CD47分子流式检测结果

表 1 2 组 CD47 平均荧光强度比较

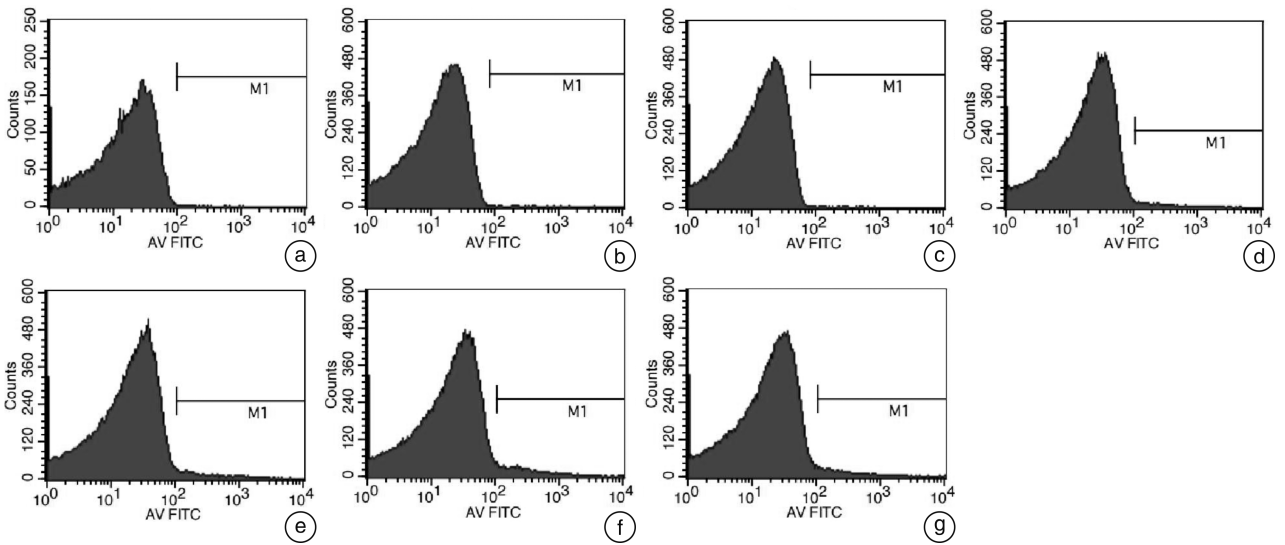
$\bar{X} \pm S$

组别	第 2 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
去白细胞洗涤红细胞	457.35±81.67	421.93±54.01	304.03±26.08	288.79±107.07	235.46±45.17	220.95±31.40
去白细胞悬浮红细胞						209.81±26.17
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05	>0.05

去白细胞悬浮红细胞组和去白细胞洗涤红细胞组 Annexin V(AV)阳性率比较,见图 2、表 2。

去白细胞悬浮红细胞组和去白细胞洗涤红细胞组 pH 值比较见表 3。

Pearson 相关性分析显示,pH 值与 CD47 平均荧光强度呈正相关, $P < 0.01, R^2 = 0.5557$;pH 值与 PS 蛋白阳性率呈负相关, $P < 0.01, R^2 = 0.3856$,见图 3、图 4。



a~f:分别为去白细胞洗涤红细胞组第 2、7、14、21、28、35 天 AV 染色阳性率;g:去白细胞悬浮红细胞第 35 天 AV 染色阳性率。

图 2 2 组红细胞 AV 染色流式检测结果

表 2 2 组 AV 标记阳性率比较

$\bar{X} \pm S$

组别	第 2 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
去白细胞洗涤红细胞	0.08±0.13	0.07±0.13	0.03±0.02	1.34±0.52	2.19±0.56	4.14±1.53
去白细胞悬浮红细胞						2.29±0.31
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05	<0.01

表 3 2 组 pH 值比较

$\bar{X} \pm S$

组别	第 2 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
去白细胞洗涤红细胞	6.82±0.04	6.64±0.04	6.57±0.03	6.49±0.02	6.46±0.02	6.45±0.02
去白细胞悬浮红细胞	6.90±0.09	6.72±0.07	6.66±0.08	6.58±0.04	6.55±0.03	6.52±0.03
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01	<0.05

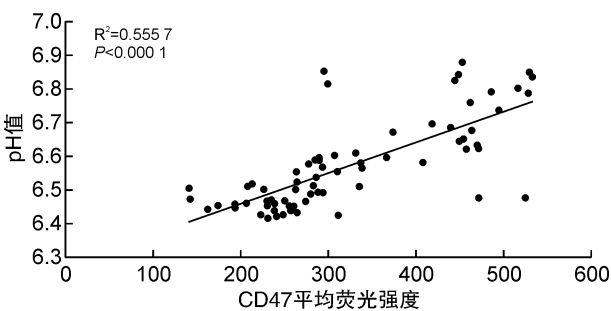


图 3 pH 值与 CD47 平均荧光强度相关性分析

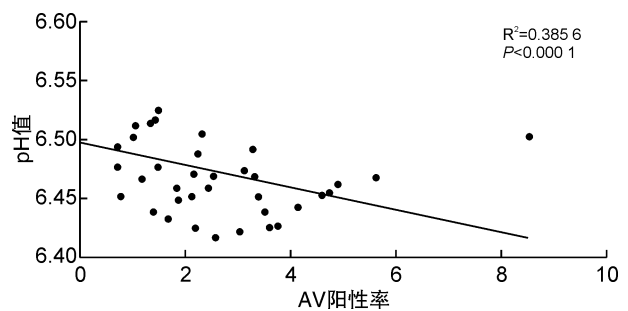


图 4 pH 值与 AV 阳性率相关性分析

3 讨论

去白细胞洗涤红细胞属于临床常用红细胞制品,主要用于血浆成分过敏者、IgA 缺乏者、非同性造血干细胞移植者及肝肾功能障碍、新生儿输血、宫内输血及换血等患者。由于去白细胞洗涤红细胞制备步骤多,耗时长,保存期仅 24 h,目前临床应用过程中采用现用现洗方法,极大的限制了去白细胞洗涤红细胞的应用推广。《血站技术操作规程(2019 版)》规定如果是在密闭系统中洗涤且最后以红细胞保存剂混悬,保存期与洗涤前的红细胞悬液相同。国内已有多位学者针对 MAP 洗涤红细胞保存期内常规质控指标进行报道,与氯化钠溶液保存洗涤红细胞比较,结果显示其钾离子、钠离子、溶血率和上清蛋白质含量升高明显^[3-5],各研究对于 MAP 洗涤红细胞最佳保存期的结论存在分歧,从第 1~28 天不等。由于成熟红细胞无核,缺乏合成蛋白质的能力,因此红细胞的损伤信号主要来自自身膜蛋白^[2]。红细胞膜表面蛋白发生变构或聚集,从而暴露相应抗原决定簇被巨噬细胞识别、清除。因此本试验关注点在于 MAP 重悬去白细胞洗涤红细胞 pH 值和膜蛋白表达变化。

通过检测红细胞膜 CD47 分子平均荧光强度和 PS 蛋白阳性率发现:MAP 去白细胞洗涤红细胞 CD47 平均荧光强度随储存时间延长降低,与去白细胞悬浮红细胞保存期末(第 35 天)比较,MAP 去白细胞洗涤红细胞 CD47 平均荧光强度第 21 天时较高,差异有统计学意义,而第 28 天时差异无统计学意义。MAP 去白细胞洗涤红细胞 PS 蛋白阳性率随储存时间延长升高,与去白细胞悬浮红细胞保存期末(第 35 天)比较,MAP 去白细胞洗涤红细胞 PS 蛋白阳性率第 21 天时较低且差异有统计学意义,而第 28 天时差异无统计学意义,第 35 天时较高且差异有统计学意义。王伟等^[6]研究报道,红细胞体外储存时间延长,其结构与功能受到损伤,红细胞膜和膜蛋白发生损伤后,PS 暴露增加,CD47 分子含量降低。CD47 属于整合素相关蛋白,是免疫球蛋白超家族的成员,广泛表达于体内各种细胞,如红细胞和血小板等。红细胞老化过程中 CD47 表达缺失被认为是正常老化过程中红细胞清除的一种机制。红细胞表面 CD47 分子可与巨噬细胞表面分子信号调节蛋白 α 结合,抑制吞噬细胞对其的吞噬作用,若细胞损伤导致 CD47 分子丢失,可被机体视为“异物”,迅速在脾脏被巨噬细胞清除,从而发生溶血,影响输血的效果^[7]。新生红细胞中 PS 位于细胞膜内侧,不会被巨噬细胞识别,当衰老红细胞时 PS 蛋白细胞内外动态分布失衡并外翻增加,可被巨噬细胞表面 PS 分子的受体特异性识别并结合,促进巨噬细胞对 PS 外翻红细胞的吞噬作用^[8-9]。由此推测,MAP 去白细胞洗涤

红细胞制备和储存过程中,由于机械和溶液损伤导致红细胞膜损伤加重,致使 CD47 蛋白表达降低,PS 蛋白外翻增加。

本试验进一步对 pH 值检测发现,相同时间点 MAP 去白细胞洗涤红细胞均低于去白细胞悬浮红细胞,并分析 pH 值与 CD47 平均荧光强度和 PS 蛋白阳性率,结果显示 pH 值与 CD47 平均荧光强度呈正相关,与 PS 蛋白阳性率呈负相关。究其原因发现,低 pH 值环境与红细胞膜损伤相关,与去白细胞悬浮红细胞比较,CD47 平均荧光强度降低,PS 蛋白阳性率升高,这种改变可能与红细胞 pH 值降低程度有关。红细胞为了实现携带氧气和二氧化碳功能,就需要维持在稳定的 pH 环境中,正常情况下,循环血液 pH 值在 7.35~7.45。有研究显示,过低的 pH 值将损伤红细胞,改变红细胞膜形态结构,降低其变形能力、流动性及血红蛋白的携氧能力,进而导致红细胞运输氧气和二氧化碳的功能受阻^[10-11]。Alex 等^[12]研究显示,在低 pH 值环境中,储存期末红细胞的氧化应激水平升高、膜稳定性降低,红细胞半衰期缩短且输注后存活率降低。而根据血液制备技术要求,洗涤过程中红细胞需要经历多次与氯化钠溶液相混合,且洗涤后需再次离心并添加 MAP 添加剂,而 MAP 添加剂和氯化钠溶液 pH 值均为 5.5,多次洗涤和重悬会降低红细胞的储存期 pH 值,使其远离最佳的 pH 值,这将导致红细胞膜受损加重,输注后更快速被脾脏清除,最终影响输血效果。

综上所述,在制备过程中多次添加低 pH 值溶液将降低 MAP 去白细胞洗涤红细胞储存环境 pH 值,并损伤红细胞膜蛋白。此外,MAP 去白细胞洗涤红细胞第 21 天时与去白细胞悬浮红细胞保存期末 CD47 平均荧光强度和 PS 蛋白阳性率差异有统计学意义,说明储存第 21 天时红细胞膜损伤低于去白细胞悬浮红细胞保存期末,质量优于去白细胞悬浮红细胞保存期末,为保证输注有效建议将第 21 天作为 MAP 去白细胞洗涤红细胞保存期限。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郑井滨,张丽,姚美辰,等. 添加液去白洗涤红细胞在保存中的质量观察[J]. 临床输血与检验, 2020, 22(2):122-126.
- [2] 强书毓,董晏榕,张玉龙,等. 储存红细胞体内外质量指标相关性分析研究[J]. 临床输血与检验, 2022, 24(2):182-188.
- [3] 胡连训. 高海拔地区洗涤红细胞经 MAP 液悬浮后的质量观察[J]. 青海医药杂志, 2016, 46(6):57-58.
- [4] 段志倩,石洁,郑建勇,等. MAP 保存洗涤红细胞质量评价[J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(2):144-145.

(下转第 422 页)

- 化杂志,2018,38(5):292-311.
- [8] Kamat N, Vuyyuru SK, Kedia S, et al. Correlation of fecal calprotectin and patient-reported outcome measures in patients with ulcerative colitis[J]. *Intest Res*, 2022,20(2):269-273.
- [9] 韩娟,华文龙. 炎症标志物对溃疡性结肠炎临床价值比较[J]. *临床血液学杂志*, 2021,34(6):390-393.
- [10] Hart L, Chavannes M, Kherad O, et al. Faecal Calprotectin Predicts Endoscopic and Histological Activity in Clinically Quiescent Ulcerative Colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2020,14(1):46-52.
- [11] 陈金敏,高山,童旭东. 非侵入性分子标志物对溃疡性结肠炎内镜活动度的判断价值[J]. *胃肠病学*, 2019,24(5):298-301.
- [12] Kamat N, Vuyyuru SK, Kedia S, et al. Correlation of fecal calprotectin and patient-reported outcome measures in patients with ulcerative colitis[J]. *Intest Res*, 2022,20(2):269-273.
- [13] 张宪波,刘月皎,陈云峰. 粪便钙卫蛋白在肠易激综合征和炎症性肠病鉴别诊断中的意义分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2021,36(1):124-127.
- [14] 金健威,卢光荣,宋丽,等. 粪便钙卫蛋白在溃疡性结肠炎活动性及病变严重程度评估中的应用价值[J]. *重庆医学*, 2020,49(7):1140-1144.
- [15] 张怡婷,钱香,任真,等. 粪便钙卫蛋白联合血液指标在诊断及评估溃疡性结肠炎活动度中的临床价值[J]. *实用医学杂志*, 2021,37(9):1199-1202.
- [16] 宁萌,孙妍,郑长清,等. 上海市嘉定区炎症性肠病患者的粪便钙卫蛋白检测研究[J]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2021,11(5):193-195.
- [17] 陈伦虎,宋方敏,李和平,等. 粪便钙卫蛋白联合血清降钙素原、C反应蛋白在评估溃疡性结肠炎病情严重程度中的价值[J]. *吉林医学*, 2020,41(10):2340-2341.
- [18] 林美英,黄江山,唐熟能. 溃疡性结肠炎患者粪便中 FCP 及 CRP 水平与病情程度的相关性[J]. *医学理论与实践*, 2021,34(20):3619-3621.
- [19] Patel A, Panchal H, Dubinsky MC. Fecal calprotectin levels predict histological healing in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017,23(9):1600-1604.
- [20] 韩牧洲,朱思莹,施海韵,等. 粪便钙卫蛋白联合粪便免疫化学试验在溃疡性结肠炎患者黏膜愈合中的诊断价值[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2022,27(3):297-301.
- [21] 赵尚飞,姜娜,宋明全. 粪钙卫蛋白、血小板、D-二聚体及降钙素原与溃疡性结肠炎的相关性分析[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021,29(6):431-435.
- [22] 安玉秋,王惠娟. 溃疡性结肠炎中医证型分布及与肠镜象相关性研究进展[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021,29(5):373-376.

(收稿日期:2022-10-29)

(上接第 416 页)

- [5] 何亚琴,吴敏,马天虹,等. 红细胞保存液悬浮洗涤红细胞的动态质量观察[J]. *临床血液学杂志*, 2015,28(10):841-843.
- [6] 王伟,严京梅,王淑君,等. 红细胞代谢产物及其表面分子对巨噬细胞免疫功能影响的研究进展[J]. *中国输血杂志*, 2019,32(10):1076-1079.
- [7] Klei TR, Meinderts SM, van den Berg TK, et al. From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis [J]. *Front Immunol*, 2017,8:73.
- [8] Arias CF, Arias CF. How do red blood cells know when to die? [J]. *R Soc Open Sci*, 2017,4(4):160850.
- [9] 彭明喜,戴梦玲,许德义,等. 丙酮酸钠与贮存红细胞膜磷脂酰丝氨酸暴露的相关性研究[J]. *临床血液学杂志*, 2019,32(8):571-574.
- [10] Barkur S, Lukose J, Chidangil S. Probing Nanoparticle-Cell Interaction Using Micro-Raman Spectroscopy: Silver and Gold Nanoparticle-Induced Stress Effects on Optically Trapped Live Red Blood Cells [J]. *ACS Omega*, 2020,5(3):1439-1447.
- [11] Bouchard BA, Orfeo T, Keith HN, et al. Microparticles formed during storage of red blood cell units support thrombin generation [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2018,84(4):598-605.
- [12] Chang AL, Kim Y, Seitz AP, Schuster RM, Pritts TA. pH modulation ameliorates the red blood cell storage lesion in a murine model of transfusion [J]. *J Surg Res*, 2017,212:54-59.

(收稿日期:2022-11-03 修回日期:2022-12-11)