

红细胞沉降速率Ⅲ

—红细胞可变形性的实验研究

①5
97-103

R 318.01
⊕

Erythrocyte Sedimentation Rate Ⅲ

—Experimental Study on Deformability of Erythrocyte

龙 勉

Long Mian

(重庆大学生物工程研究中心, 重庆, 630044)

坂西明郎 ✓

Akio Sakanishi

(日本群馬大学工学部生物及化学工程系)

邵江涛

Shao Jiangtao

土桥敏明

Toshiaki Dobashi

A **摘 要** 介绍了一种利用红细胞沉降过程测量评价红细胞可变形性的新方法,并用它考查了猪红细胞在生理盐水溶液及SF60溶液中的可变形性,实验得到的可变形性参数分别为0.862和0.971.

关键词 红细胞; 变形; 可变形性参数

中国图书资料分类法分类号 R318.01

ABSTRACT In this study, a new method to evaluate erythrocyte deformability by measurements of erythrocyte sedimentation process, introduced by authors, was adopted to investigate the deformability of swine erythrocytes in a physiological saline solution and in a SF60 solution. Experimental results indicated that the deformability factors are 0.862 and 0.971 for erythrocytes suspended in a physiological saline solution and in a SF60 solution, respectively.

KEYWORDS erythrocyte; deformation; deformability factor

0 前 言

红细胞是动物体内重要的气体交换单位。血液将氧和营养物质输送到组织和器官,同时将废物带走。血液流动时,红细胞因受力而变形。特别是在微循环中,由于微血管尺寸与红细胞尺寸相差无几,甚至更小,因此,在微循环中的红细胞将承受很大的变形。由于红细胞是血液中氧、营养物质及废物的主要载体,而微循环又是血液进行新陈代谢活动的最重要场所,因此,红细胞变形能力的好坏,将直接影响到人体正常生理活动的维持,具有重要的生理、生化、病理及临床意义。

本文考察猪红细胞在生理盐水溶液和在 SF60 溶液中的可变形性。作为一种红细胞抗冻保存剂, SF60 溶液由 60% 丙三醇、1.8% 乳酸钠、0.02% 氯化钾、0.2% 磷酸钠盐及水组成。一般情况下, 用枸橼酸盐抗凝的红细胞在 4℃ 时在生理盐水溶液中只能无畸变地保存三周, 在深度冷冻条件下保存则易发生红细胞溶血现象*, 相反, 悬浮于抗冻保存剂 SF60 溶液中的红细胞能够克服霜冻危害在 -80℃ 的低温下半永久性地保存下来。从这个意义上讲, 考虑红细胞在 SF60 溶液中的特性, 尤其是可变形性, 具有重要的临床价值。目前受血者对血液及其成分的需求急增与血库血样的匮乏之间的矛盾是一个全球性的问题, 而有限的血液及其成分的长期、有效保存和使用是解决此难题的一个重要方面。

1 理论基础

迄今已有多种测定红细胞可变形性的方法^[1,2], 笔者^[1]介绍了一种利用红细胞沉降过程测量来评价红细胞可变形性的新方法。即通过测量红细胞沉降速率 $v(H)$ 、红细胞及其悬浮液密度 ρ_2 及 $\rho(H)$ 、悬浮液及悬浮介质粘度 $\eta(H)$ 及 η_0 、以及红细胞有效半径 R_{eff} 等参数, 最终根据 Oka 公式^[3]和定解条件计算出红细胞可变形性参数 f 值, 这里 H 是血球压积, Oka 公式可写为

$$v(H) = \frac{2}{9} \frac{[\rho_2 - \rho(H)]gR_{eff}^2 \Phi(H)}{\eta(H) f} \quad (1)$$

这里 $\Phi(H)$ 为悬浮介质上升流对红细胞沉降速率的影响^[1], 改写(1)式, 有

$$\frac{\Phi(H)}{f} = \frac{9}{2} \frac{v(H) \cdot \eta(H)}{[\rho_2 - \rho(H)]gR_{eff}^2} \quad (2)$$

根据实验得到的 $\Phi(H)/f$ 对血球压积依赖性的经验公式, 并结合 $\Phi(H)$ 的定解条件^[1], 即可求出红细胞可变形性参数值 f , f 应在 $2/3 \sim 1$ 的范围内^[1]。

2 材料和方法

新鲜猪血液用 A、C、D(酸—枸橼酸—葡萄糖)、按 10 份血液: 1 份抗凝剂的比例进行抗凝处理。抗凝后的血液在 1500 r/min 下离心作用 10 分钟除去血浆和缓冲层(白细胞及血小板等)后, 收集的红细胞用生理盐水溶液(145 mmol NaCl + 5 mmol K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 值为 7.4)在 3000 r/min 下离心作用 10 分钟, 两次清洗红细胞。所得到的沉积红细胞一分为二: 一部分红细胞再一次在 SF60 溶液中以 3500 r/min 离心作用 10 分钟进行清洗, 得到的上清液作为分散介质, 而沉积红细胞则重新悬浮于 SF60 溶液, 经过压积调制(体积稀释法, 微量离心血球压积仪检验), 得到最后所需试样; 另一部分红细胞直接重新悬浮于生理盐水溶液中, 经过压积调制得到最后的试样。

本文中红细胞 SF60 悬浮液实验组的血球压积分别调制为 $H=0.0240, 0.0687, 0.0970, 0.1300$ 及 0.1523 , 而红细胞生理盐水悬浮液对照组的压积分别为 $H=0.0223, 0.0717, 0.0997, 0.1447$ 及 0.1800 。

* 龙勉, 红细胞沉降现象的电动力学和流变学研究, 重庆大学博士论文, 1990

除红细胞有效半径 R_{eff} 在显微镜下直接测量外,其它参数的测试均在 $20 \pm 0.02^\circ\text{C}$ 的温度下进行,以消除温度变化对测试结果的影响。

3 实验结果

3.1 红细胞沉降速率

选用标准 Westergren 沉降管(长300 mm,内径2.55 mm)为实验管,试样注入高度约200 mm,两端密封后置于恒温水浴槽内.管的倾斜角 $\Theta < 0.06^\circ$ [4]。

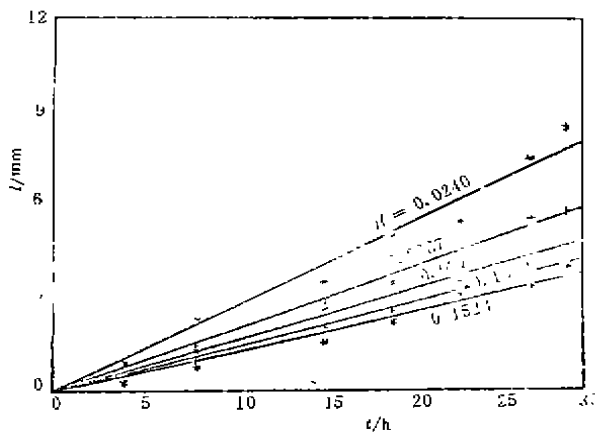


图1 红细胞在SF60溶液中的沉降曲线

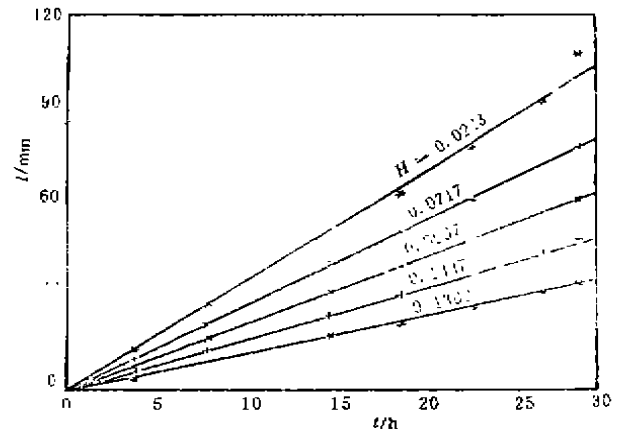


图2 红细胞在生理盐水溶液中的沉降曲线

图1和图2分别给出了红细胞在SF60溶液中和在生理盐水溶液中的沉降曲线(为使沉降曲线清晰,仅选用部分典型实验点)。可见,在实验时间范围内,红细胞在两种溶液中沉降的时间过程均满足如下线性关系

$$l = ct \tag{3}$$

这里 l 为时刻 t 时上清液的高度; c 为直线的斜率.用最小二乘法拟合所有的实验数据而得到的 $l = ct$ 直线分别绘于图1和图2中.定义红细胞沉降速率为沉降曲线的初始斜率,即

$$v(H) = \left. \frac{dl}{dt} \right|_{t=0} \tag{4}$$

可见,此时红细胞沉降速率 $v(H)$ 就是沉降曲线 $l = ct$ 的斜率 c .实验得到不同压积的红细胞沉降速率如表1所示。

表1 红细胞沉降速率的压积依赖性

$H(\text{SF60悬浮液})$	0.0240	0.0687	0.0970	0.1300	0.1523
$v(H)$ (mm/h)	0.271	0.199	0.164	0.145	0.129
$H(\text{生理盐水悬浮液})$	0.0223	0.0717	0.0997	0.1447	0.1800
$v(H)$ (mm/h)	3.478	2.654	2.080	1.589	1.162

运用最小二乘法还可得到红细胞沉降速率对于血球压积依赖性的经验公式:

SF60溶液
$$v(H) = 0.308 \exp(-5.804H) \tag{5}$$

生理盐水溶液

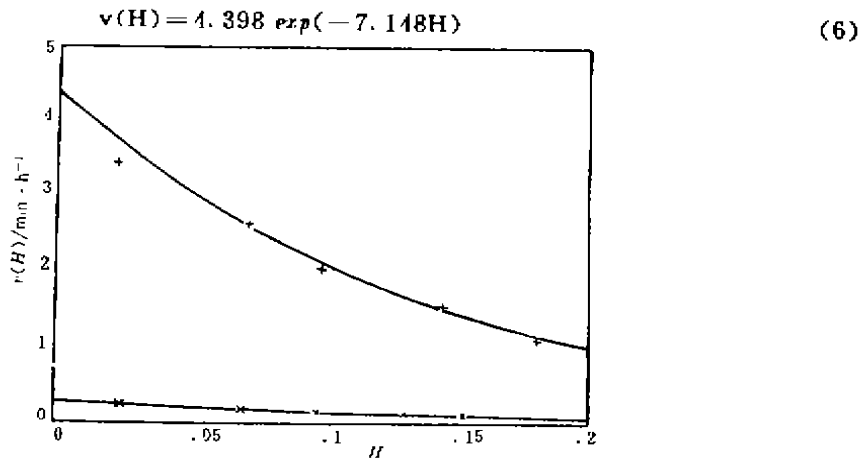


图3 红细胞沉降速率对血球压积的依赖性

— 拟合曲线

* 红细胞 SF60 悬浮液

+ 红细胞生理盐水悬浮液

图3给出了红细胞沉降速率对血球压积依赖性的实验值和理论拟合曲线。

3.2 红细胞及其悬浮液的密度

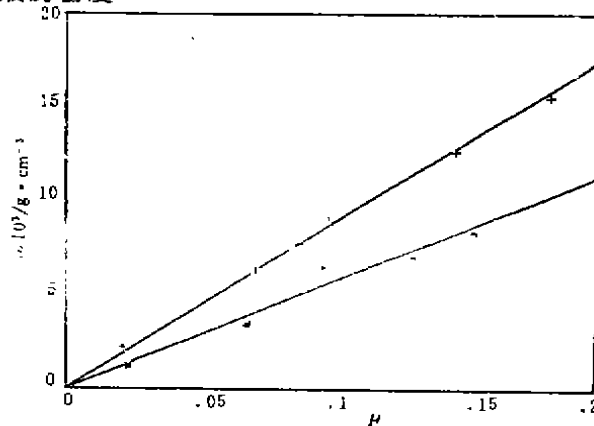


图4 红细胞悬浮液密度对血球压积的依赖性

* 红细胞 SF60 悬浮液

+ 红细胞生理盐水悬浮液

采用超声波振动密度计(DMA602, Anton Parr)进行红细胞及其悬浮液的密度测试。振动密度计测试单元的固有振动周期 T_ρ 与试样密度 ρ 之间满足如下关系*：

$$T_\rho^2 = A\rho + B = A(\rho + \rho_{00}) \quad (7)$$

其中, A 为与温度有关的装置常数; $\rho_{00}(=B/A)$ 为测试单元的“表观”密度; B 为常数。对于实验用 DMA602 型振动密度计, 装置常数 A 为

$$A = A_0 + A_1T \quad (8)$$

这里, T 为温度(C), $A_0 = 2681.8293 \pm 0.0355$, $A_1 = -0.3337 \pm 0.0011$, 而 $\rho_{00} =$

* 龙勉. 红细胞沉降现象的电动力学和流变学研究. 重庆大学博士论文, 1990

1.0328 g/cm³.

实验中,分别测定两种红细胞悬浮液及其相应的分散介质的固有振动周期 T_p ,由(7)式可计算得到不同压积下红细胞悬浮液的密度 $\rho(H)$ 和分散介质密度 ρ_0 . 已知密度差 $\Delta\rho = \rho(H) - \rho_0$ 相对于血球压积 H 满足如下线性关系^[1]:

$$\Delta\rho = KH \tag{9}$$

而

$$\rho_2 = \rho_0 + K^{[1]} \tag{10}$$

因此,可将实验结果用图4的形式表示,图中还给出用最小二乘法拟合得到的直线 $\Delta\rho = KH$. 实验结果表明,对于红细胞 SF60 悬浮液, $\rho_0 = 1.1351 \text{ g/cm}^3$, $\Delta\rho = 0.0576 \cdot H \text{ g/cm}^3$, $\rho_2 = 1.1927 \text{ g/cm}^3$; 对于红细胞生理盐水悬浮液, $\rho_0 = 1.0051 \text{ g/cm}^3$, $\Delta\rho = 0.0882 \cdot H \text{ g/cm}^3$, $\rho_2 = 1.0933 \text{ g/cm}^3$. 而红细胞与其悬浮液密度差满足如下关系:

$$\text{SF60 悬浮液} \quad \rho_2 - \rho(H) = 0.0576(1-H) \tag{11}$$

$$\text{生理盐水悬浮液} \quad \rho_2 - \rho(H) = 0.0882(1-H) \tag{12}$$

3.3 红细胞悬浮液及其分散介质粘度

采用修改的 Ubbelohde 毛细管粘度计在三个不同的切应力 σ 下(对应于三支尺寸不同的毛细管)测定红细胞悬浮液及其分散介质的粘度,并将其外推至 $\sigma=0$ 处,此时的粘度值作为红细胞沉降时其悬浮液的粘度. 实验采用粘度计的几何参数和三个不同的切应力状态 σ 已在另文中有所论述*.

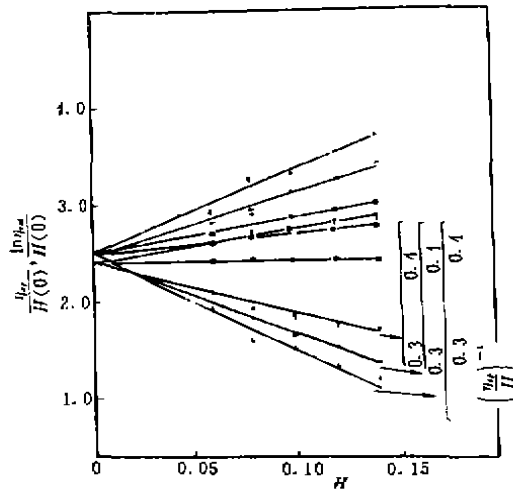


图5 红细胞 SF60 悬浮液粘度对血球压积的依赖性

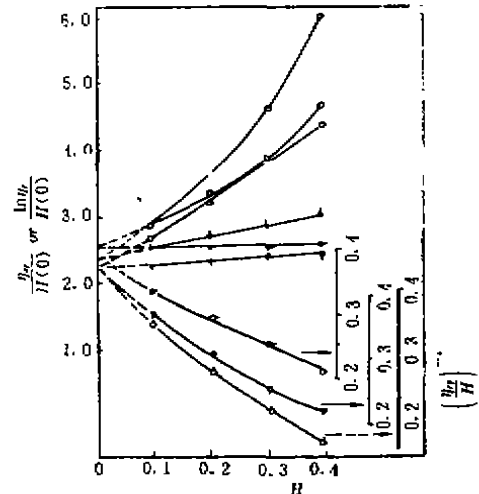


图6 红细胞生理盐水悬浮液对血球压积的依赖性

分别测定红细胞悬浮液以及相应的分散介质的粘度,外推至 $\sigma=0$ 处,并参照同一研究小组 Dobashi 等人的实验数据^[5],采用非线性最小二乘法拟合实验数据,得到如下经验公式:

红细胞 SF60 悬浮液

$$\frac{\eta(H)}{\eta_0} = 1 + 2.48H + 6.33H^2, \eta_0 = 6.380 \text{ mPa} \cdot \text{s} \quad (H < 0.2) \tag{13}$$

* 龙勉. 红细胞沉降现象的电动力学和流变学研究. 重庆大学博士论文, 1990

红细胞生理盐水悬浮液

$$\ln[\eta(H)/\eta_0]/H = 2.72 - 0.21H + 7.87H^2 - 8.88H^3, \eta_0 = 1.014 \text{ mPa} \cdot \text{s}, (H < 0.2) \quad (14)$$

实验结果如图5和图6所示。两图中实线为拟合曲线。

3.4 红细胞形状及其有效半径

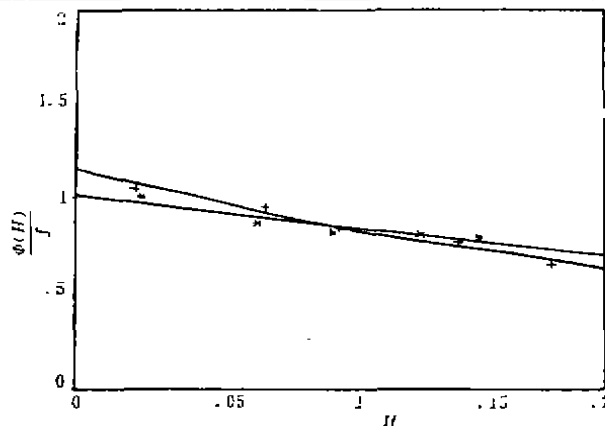
在光学显微镜(物镜40倍,目镜10倍)下测量红细胞主轴半径 R_{\max} 。分别取红细胞SF60悬浮液及红细胞生理盐水悬浮液中红细胞各60个,逐一测量其主轴半径 R_{\max} 并求算术平均值。实验结果表明,红细胞在SF60溶液中 $R_{\max} = 2.94 \mu\text{m}$,在生理盐水溶液中 $R_{\max} = 3.22 \mu\text{m}$ 。根据红细胞有效半径 $R_{\text{eff}} = 0.71 R_{\max}^{[1]}$,可以得到红细胞在SF60溶液及生理盐水溶液中的有效半径分别为 $R_{\text{eff}} = 2.09 \mu\text{m}$ 及 $R_{\text{eff}} = 2.29 \mu\text{m}$ 。此外,显微观察表明,红细胞在不同的压积下、在不同分散介质中,其形状无明显变化。

3.5 红细胞可变形性参数

根据上述得到的有关 $v(H)$ 、 ρ_2 及 $\rho(H)$ 、 $q(H)$ 以及 R_{eff} 等实验数据,应用方程(2),可以得到 $\Phi(H)/f$ 对血球压积的依赖性,如表2所示。

表2 $\Phi(H)/f$ 对血球压积的依赖性

$H(\text{SF60 悬浮液})$	0.0240	0.0687	0.0970	0.1300	0.1523
$\Phi(H)/f$	1.02	0.88	0.83	0.82	0.80
$H(\text{生理盐水悬浮液})$	0.0223	0.0717	0.0997	0.1447	0.1800
$\Phi(H)/f$	1.06	0.97	0.85	0.78	0.66

图7 $\Phi(H)/f$ 对细胞压积的依赖性

* 红细胞SF60悬浮液

+ 红细胞生理盐水悬浮液

采用最小二乘法拟合表2中的实验数据,得到 $\Phi(H)/f$ 相对于血球压积的依赖性满足如下经验公式:

$$\text{SF60 悬浮液} \quad \Phi(H)/f = 1.03 \exp(-1.81H) \quad (15)$$

$$\text{生理盐水悬浮液} \quad \Phi(H)/f = 1.16 \exp(-2.97H) \quad (16)$$

式中标准差均为0.03。

根据定解条件: $H = 0$ 时, $\Phi(0) = 1^{[1]}$,可得到红细胞在SF60溶液中及在生理盐水溶液中的可变形性参数分别为 $f = 0.971$ 及 $f = 0.862$ 。

图7给出了 $\phi(H)/f$ 对血球压积依赖性的实验数据和拟合曲线。

4 讨 论

本文是对笔者提出的利用红细胞沉降过程测量评价红细胞可变形性的新方法^[1]的实验验证。作为该新方法的第一步基础验证,本文选取了猪红细胞作为实验样本(这是由于在日本,非医学院校难以获取人血作为研究对象);同时考虑到聚集效应对红细胞可变形性的显著影响,为突出研究重点,采取了生理盐水溶液洗涤红细胞、消除聚集影响的实验方法。通过实验得到的红细胞沉降速率、密度、粘度等参数对血球压积的依赖性以及红细胞有效半径,不仅可以计算出红细胞可变形性参数值,而且可以通过上述多参数信息的获取,对红细胞沉降过程及变形状况有一个更全面、综合的认识和了解。

根据红细胞可变形性参数所代表的物理意义^[1],从本文的实验结果可以看出:红细胞在SF60溶液中 $f = 0.971$,说明红细胞可变形性较差,但能保持相对稳定的形状和几何尺寸。从能量耗散观点出发,这一结果在一定程度上阐明了红细胞能在SF60溶液中长期保存下来的原因。实际上,临床输血时先将深度冷冻保存在SF60溶液中的红细胞在常温下解冻,再用生理盐水溶液三次洗涤后即可应用。相反,悬浮于生理盐水溶液中的红细胞($f = 0.862$)具有较好的可变形性,但易产生溶血现象。

进一步要做的研究工作包括:应用该新方法考查人体血液红细胞的可变形性;考查在有聚集影响下红细胞变形—聚集的藕合作用;比较该新方法与已有红细胞可变形性测量方法的优劣、测试结果的异同。

5 结 论

本文选取猪红细胞悬浮于抗冻保存剂SF60溶液及生理盐水溶液中形成的两组红细胞悬浮液作为实验样本,根据利用红细胞沉降测量评价红细胞可变形性的新方法,通过测试红细胞沉降速率、密度、粘度以及红细胞有效半径等参数,得到 $\phi(H)/f$ 对血球压积的依赖性;由 $\phi(H)$ 所满足的定解条件可求得红细胞在SF60溶液及生理盐水溶液中的可变形性参数分别为 $f = 0.971$ 及 $f = 0.862$ 。

本文工作得到日本国立心血管疾病研究中心冈小天教授、重庆大学生物工程研究中心吴云鹏教授的热心指导,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 龙勉等. 红细胞沉降速率Ⅱ——一种评价红细胞可变形性的新方法. 重庆大学学报, 1992, 15(3), 19~23
- 2 翁维良等. 血液流变学研究方法及其应用. 北京: 科学出版社, 1989, 96~120
- 3 Oka S. A physical theory of erythrocyte sedimentation. *Biorheology*, 1985, 22, 315~321
- 4 Dobashi T, et al. Erythrocyte sedimentation rate II Dependence of tilt angle in saline solution. *Biorheology*, 1988, 25, 157~164
- 5 Dobashi T, et al. Steady-shear viscosity of red cell suspension I. *Reports on Progress in Polymer Physics of Japan*, 1984, 27, 661~664