

力竭运动诱导的氧化应激对大鼠红细胞 Band 3蛋白的影响及其机制探讨

熊延连 熊艳蕾 李遥金 唐福州 赵押金 王翔*

(重庆大学生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘要 为了探讨力竭运动诱导的氧化应激反应对大鼠红细胞Band 3蛋白的影响, 该文以大鼠跑步运动为模型, 对三种不同运动条件下(静坐组、适度运动组和力竭运动组)大鼠红细胞抗氧化能力和氧化损伤程度进行了检测, 并对氧化应激反应诱导的红细胞膜Band 3蛋白表达和分布情况及其调控的阴离子通道活性进行了分析。结果表明: 力竭运动条件下大鼠红细胞受到严重的氧化应激损伤, 红细胞内抗氧化能力下降; 导致膜Band 3蛋白巯基交联为主的蛋白聚簇化反应及其阴离子转运能力的下降。Band 3蛋白的损伤将进一步诱导红细胞携氧和变形能力的下降, 成为运动相关疾病的潜在致病因素。

关键词 力竭运动; 红细胞; 氧化应激; Band 3

Influence of Exhaustive Exercise Induced Oxidative Stress on Band 3 of Rat Erythrocyte

Xiong Yanlian, Xiong Yanlei, Li Yaojin, Tang Fuzhou, Zhao Yajin, Wang Xiang*

(Key Laboratory of Biorheology and Technology, Chongqing University College of Bioengineering, Chongqing 400044, China)

Abstract The aim of the present study was to explore the effect of exhaustive exercise-induced oxidative stress on the Band 3 of rat erythrocytes. Rats were divided into sedentary control (C) and exercise test (ET) groups. The ET group was divided further into exhaustive running exercise (ERE) and moderate running exercise (MRE) subgroups. Oxidative stress-induced erythrocyte injury and antioxidant capacity were analyzed. Erythrocytes from control and running exercise groups were evaluated for the expression of erythrocyte Band 3 through immunoblot and immunofluorescence studies. Besides, the anion-transport activity was investigated. The results showed that red blood cells were subjected to severe oxidative stress under exhaustive exercise conditions. Lipid peroxidation and protein sulfhydryl cross-link based clustering of membrane was found after exhaustive exercise, and exhaustive exercise also led to significant increments in the levels of clustering of erythrocyte Band 3 and the decrease of anion-transport activity. Our results suggested that exhaustive running exercise resulted in elevated oxidative stress in erythrocytes, and this change could be associated with the alterations in the structure and function of erythrocyte Band 3.

Key words exhaustive exercise; erythrocytes; oxidative stress; Band 3

收稿日期: 2013-12-13 接受日期: 2014-01-20

国家自然科学基金(批准号: 31271229、11072275、10572159)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

Received: December 13, 2013 Accepted: January 20, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271229, 11072275, 10572159)

*Corresponding author. Tel: +86-23-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

网络出版时间: 2014-05-05 10:13 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0418.html>

引言

运动,尤其是力竭运动过程中,机体会产生大量的自由基,导致包括肌肉、心血管损伤在内的多种运动性氧化应激反应^[1-3]。在对运动性氧化损伤的研究过程中,红细胞(red blood cell, RBC)因其在机体内清除自由基、维系氧化还原平衡过程中所起的重要作用逐渐受到人们的关注^[4-5]。研究力竭运动过程中RBC抗氧化、清除自由基能力的变化,自身受到氧化损伤程度的变化,以及氧化应急条件下RBC力学性质和携氧功能的改变将对运动诱发的休克、缺氧损伤、红细胞凋亡等多种生理和病理现象的探索提供重要的理论依据。由于Band 3(SLC4A1; EB 3)在调控RBC代谢和维持膜结构稳定方面具有重要作用^[6],阐明不同运动条件下RBC的结构和功能的变化及其分子机制,也将对研究运动诱导的贫血、机体疲劳、蛋白尿等多种疾病的治疗具有重大意义。

Band 3蛋白约占红细胞膜总量的25%,包含三个大的结构域:短的N末端胞浆区、长的C端胞浆区和跨膜结构域。跨膜结构域由跨膜14次的多肽链组成,通过大量亲水性 α 螺旋组成的通道介导Cl⁻/HCO₃⁻阴离子转运^[7];N末端胞浆区结合血红蛋白和糖酵解酶等代谢物质,并通过与收缩蛋白、Band 4.1等骨架蛋白连接介导膜脂和骨架网络的连接;C端胞浆区主要结合碳酸酐酶(carbonic anhydrase II, CAII),形成代谢区室,并与跨膜区和水通道蛋白(aquaporin, AQP1)共同作用介导O₂/CO₂的转运^[8]。自Alderman等^[9]首先提出红细胞膜蛋白-抗体复合物的概念,红细胞氧化损伤与Band 3之间的关系开始逐渐受到人们的关注。Kriebardis等^[10-11]发现,在血液保存过程中氧化变性的血红蛋白逐渐聚集在细胞膜和细胞骨架上,并初步证明了氧化导致的Band 3聚簇化与体外RBC老化损伤之间关系密切。Low等^[12]提出,高铁血色原与Band 3结合能够促使Band 3聚簇的产生,聚簇化的Band 3与IgGs的亲性和增加,同时在C3b的协助下介导吞噬细胞对老化RBC的调理吞噬。由此可见,Band 3蛋白结构和功能的稳定是RBC正常行使变形、携氧等生理功能的基础,也是评估RBC损伤程度的重要依据。而针对Band 3蛋白在力竭运动诱导的氧化应激损伤过程中对RBC携氧功能和流变学性质的影响仍有待研究,本文对不同运动情况下大鼠RBC氧化应激对Band 3蛋白的影响进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗鼠Band 3蛋白一抗购于美国Abcam公司;辣根过氧化物酶和FITC标记的山羊抗兔二抗购于加拿大Immune Chem Pharmaceuticals Inc(ICP)公司;肝素钠和PVA购于美国Sigma公司;电泳和转膜设备及相关耗材购于美国Bio-rad公司。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、巯基基团(thiol groups或SH-groups)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒均购于南京凯基生物公司;动物跑台购自淮北正华公司。

1.2 实验对象和动物模型

选用雄性SD大鼠30只(8周龄,体重200~250 g,由第三军医大学提供),国家标准啮齿类动物饲料喂养,自由进食及饮水。相对湿度45%~55%,室温(22±5)℃,光照时间8:00~20:00的条件下饲养。适应性喂养5 d后,大鼠随机分到为对照组(control, C)和运动组(exercise test, ET),运动组又分适度运动组(moderate running exercise, MRE)和力竭运动组(exhaustive running exercise, ERE),每组10只。

大鼠跑步运动在特制的跑台上进行,动物跑台由马达驱动,可调节跑步速度和坡度。力竭运动组大鼠运动参照Davies等^[13]的运动模型,大鼠运动前20 min保持5%的坡度和20 m/min的速度,20 min后调整为15%的坡度和25 m/min的速度,直至运动力竭。力竭标准为将大鼠置于平面后不能完成翻正反射。适度运动组大鼠在5%的坡度和20 m/min的速度下跑40 min。对照组大鼠静置于跑台中,不进行跑台运动。

对照组和运动组的大鼠采用心脏取血的方法采集血液。用PBS洗涤4次,然后3 000 r/min离心3 min,获取RBC,冷冻备用。

1.3 红细胞膜蛋白提取

RBC经洗涤后,置于其体积30倍左右的低渗缓冲液(pH7.4, 5 mmol/L磷酸盐缓冲液,内含1 mmol/L PMSF和1 mmol/L EDTA)中进行破溶,约1.5 h后在4℃、13 500 r/min条件下离心15 min,洗涤4~5次后得到白色的RBC膜,前两次洗涤用上述低渗缓冲液,后面几次则用不加PMSF的低渗缓冲液。所提得的膜中加入大约膜体积4倍的2% SDS进行裂解,用BCA法测定膜蛋白含量。

1.4 红细胞抗氧化和氧化损伤指标检测

在红细胞裂解液中加入全血体积2倍的无水乙醇(2 mL),在漩涡振荡器上充分混匀30 s。再加全血体积2倍的三氯甲烷(2 mL)漩涡振荡器上充分混匀1 min,1 500×g离心10 min。此液体分3层,上层即为CAT与SOD抽提液,然后按照试剂盒操作说明检测CAT与SOD活力。

按照试剂盒操作说明,样品提取好后,加入DTNB反应液,测412 nm处吸光值,并通过标准曲线计算膜蛋白-SH和GSH含量。膜脂质过氧化产物MDA通过TBARS试剂盒检测。

1.5 Band 3蛋白原位免疫荧光染色

取100 μ L压积RBC,等渗PBS清洗3次,去上清。加终浓度为2%的多聚甲醛和0.005%的戊二醛混合溶液固定1 h。等渗PBS清洗3次后,0.1% Triton X-100打孔10 min。5% BSA封闭1 h。等渗PBS稀释的兔抗大鼠Band 3一抗(稀释比例1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。等渗PBS稀释过的FITC标记羊抗兔二抗(稀释比例1:2 000),室温摇床孵育2 h。清洗后的红细胞悬浮于适量等渗PBS缓冲液中。取10 μ L悬浮红细胞滴加在载玻片上,封片。荧光显微镜下观察。

1.6 Band 3蛋白Western blot

电泳采用5%~15%的线性梯度胶,还原性电泳样品经含DTT的上样缓冲液充分还原后上样,非还原性电泳样品缓冲液不含DTT,上样量为15 μ g。电泳条件为70 V转120 V恒压电泳。电泳结束后,在200 mA条件下湿转30 min。1×TBST清洗3遍后,用5%的脱脂奶粉封闭1 h。加封闭液稀释的兔抗大鼠Band 3一抗(稀释比例1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。1×TBST洗去一抗,1×TBST稀释过的辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(稀释比例1:2 000),室温摇床孵育2 h。1×TBST

洗去二抗后,显色处理。使用Versa Doc凝胶成像系统扫描图像,并用Quantity One软件分析蛋白条带灰度值。

1.7 阴离子转运能力检测

阴离子转运活性检测根据Teti等^[14]的方法,取压积红细胞100 μ L,离心去上清后加入含下述物质的等渗溶液(115 mmol/L SO_4^{2-} , 20 mmol/L HEPES, 15 mmol/L葡萄糖和0.1 mmol/L哇巴因)中,使红细胞比容为3%。每隔5 min取5 mL样品,加入5 μ mol/L的4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonate(DIDS)阻断Band 3阴离子通道,阻止 SO_4^{2-} 继续跨膜转运。等渗PBS清洗3次,测量前后 SO_4^{2-} 离子差值,并取5 mmol/L DIDS阻断处理组作为对照。

SO_4^{2-} 检测方法:加蒸馏水与三氯乙酸破溶红细胞后,离心,去沉淀。依次加入体积比为1:1的蒸馏水与丙三醇溶液、体积比为1:12的4 mmol/L NaCl和HCl(37%)溶液以及124 mmol/L $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液沉淀胞内 SO_4^{2-} 离子。然后在425 nm处测吸光值,通过已知浓度 SO_4^{2-} 溶液标准曲线计算红细胞内 SO_4^{2-} 离子含量。

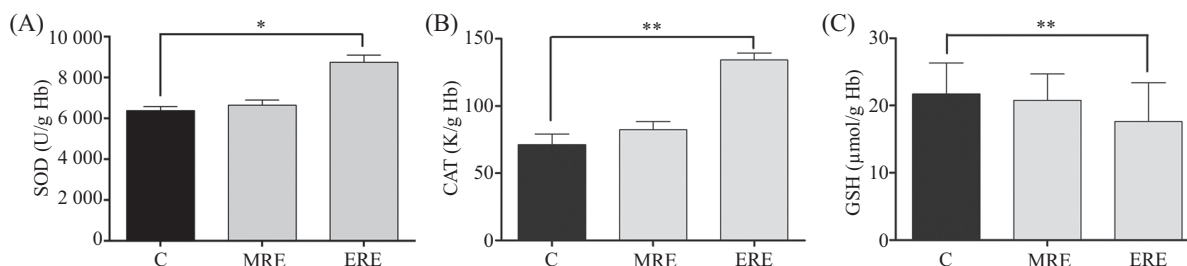
1.8 统计学处理

所有数据从3组或3组以上的重复实验中得出,以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ S.D.)的形式表示。组间统计学显著性差异通过Origin 7.5软件One-way ANOVA分析。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极其显著。

2 结果

2.1 运动对RBC抗氧化能力的影响

我们对不同运动组大鼠RBC抗氧化指标SOD、CAT和GSH进行了检测。结果表明:力竭运动后大鼠红细胞抗氧化酶SOD和CAT的活性显著增加,与

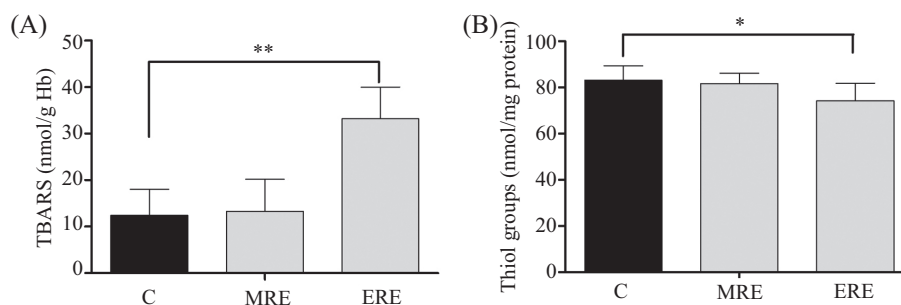


运动组与对照组大鼠红细胞超氧化物歧化酶活性(A)、过氧化氢酶活性(B)和还原型谷胱甘肽含量(C)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

The levels of SOD (A), CAT (B) and GSH (C) were determined in erythrocytes collected from exercised and control animals. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图1 不同运动组红细胞抗氧化参数

Fig.1 Erythrocyte antioxidant stress parameters in different groups

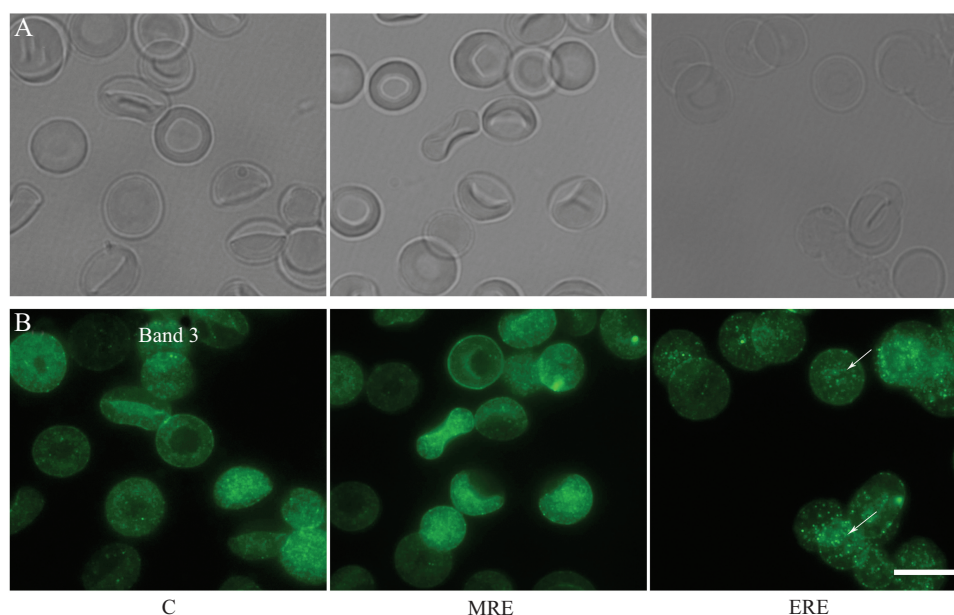


A: 不同运动组大鼠红细胞膜脂质过氧化水平; B: 膜蛋白巯基水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

The levels of TBARS (A) and thiol groups (B) were determined in erythrocytes collected from exercised and control animals. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 不同运动组红细胞氧化应激参数

Fig.2 Erythrocyte oxidant stress parameters in different groups



A: 普通光源下各组红细胞; B: Band 3蛋白荧光标记各组红细胞。箭头表明力竭运动诱导的Band 3聚簇化现象。标尺=10 μm 。

A: bright field micrographs of stained RBCs; B: fluorescent micrographs for control and exercised RBCs after immunostaining with monoclonal antibodies to Band 3. The arrows indicated protein clusters after exercise-induced oxidative stress. Scale bar=10 μm .

图3 红细胞Band 3蛋白免疫荧光显微术检测

Fig.3 Erythrocyte Band 3 was detected by fluorescent micrograph

此同时, 胞内主要的非酶类抗氧化物GSH含量出现显著降低(图1)。

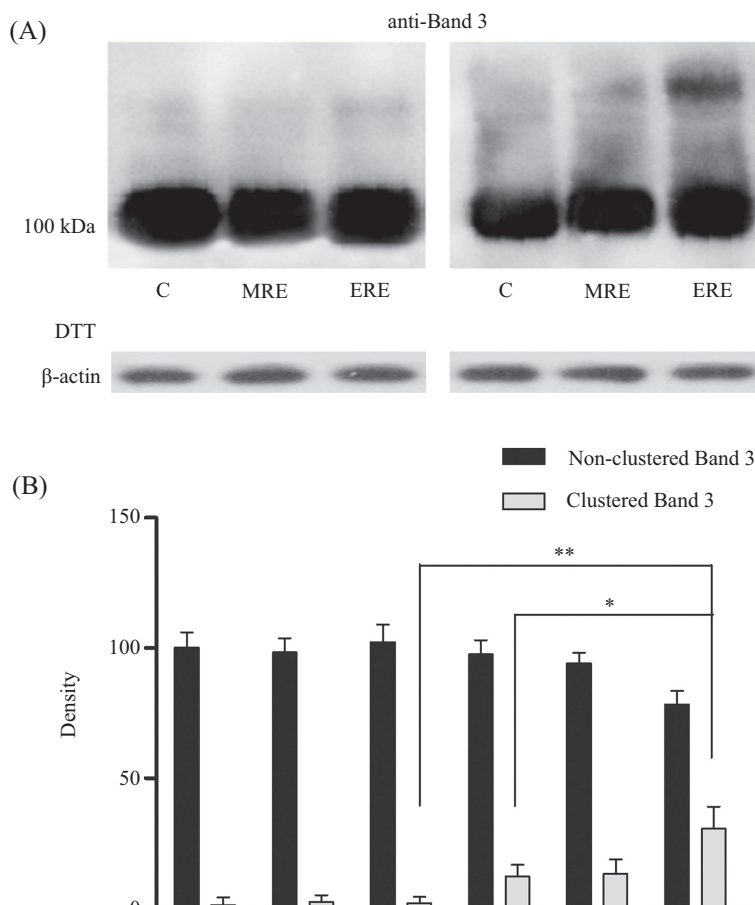
2.2 运动对RBC膜脂质过氧化和膜蛋白巯基含量的影响

我们通过TBA法检测膜脂质TBARS水平, 结果表明, 力竭运动导致大鼠红细胞膜脂TBARS水平显著升高(图2A); 红细胞膜蛋白含有丰富的-SH, 它们对维系RBC膜上众多酶类和功能蛋白的正常结构功能起到重要作用。与对照组相比, 力竭运动后红细胞膜蛋白-SH含量显著下降(图2B)。

2.3 运动对红细胞Band 3蛋白的影响

通过原位免疫荧光染色的方法, 我们对红细胞膜骨架蛋白Band 3进行了检测。明场下, 对照组和普通运动组的红细胞在免疫荧光染色后红细胞形态仍能保持完美的双凹碟盘形态; 而力竭运动组大量细胞形态已经严重变形(图3)。ERE组中出现大量荧光聚集点(图3B), 表明力竭运动导致红细胞膜Band 3蛋白发生严重的交联。

对Band 3蛋白Western blot检测结果表明, 力竭运动导致Band 3蛋白交联, 是SDS-PAGE检测结果



A: 不同运动组大鼠红细胞膜Band 3蛋白免疫印迹, 左侧条带为非还原性电泳, 右侧为还原性电泳; B: 蛋白条带灰度值分析, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: erythrocytes from control and exercised groups were incubated in the absence (left) or presence (right) of DTT; B: densitometric analyses of immunoblots of erythrocytes ghosts (insets) were used to probe for Band-3. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 Western blot检测对照组与运动组红细胞Band 3蛋白

Fig.4 Erythrocyte Band 3 in different groups detected by Western blot

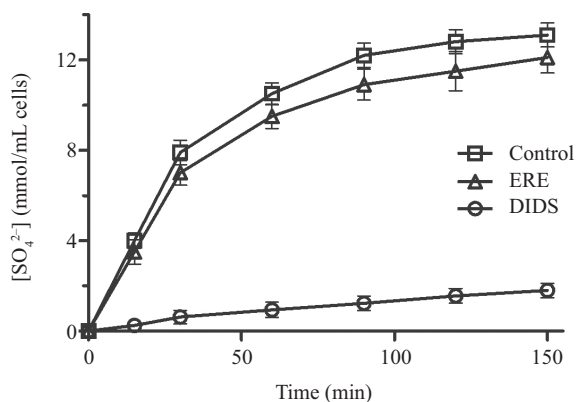


图5 红细胞 SO_4^{2-} 转运能力比较

Fig.5 Time course of SO_4^{2-} uptake in erythrocytes

中HMW条带的重要组成部分。为了探讨蛋白交联与运动诱导的氧化损伤之间的关系, 我们对各组大鼠红细胞在含5.0 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)的缓冲液中孵育30 min。结果表明, DTT处理后Band 3交联程度显著降低($P<0.05$)(图4)。

2.4 运动对红细胞阴离子转运能力的影响

以5 mmol/L的DIDS作为负面对照(pH7.4, 37 °C), 通过对力竭运动组 and 对照组大鼠红细胞 SO_4^{2-} 离子转运能力的检测, 我们发现, 力竭运动后大鼠红细胞阴离子转运活性普遍降低(图5)。

3 讨论

近年来的研究表明, 力竭运动过程中机体产生大量自由基, 导致包括肌肉、心血管损伤在内的多种运动性氧化应激性损伤^[15-16]。Band 3蛋白作为红细胞骨架蛋白连接的枢纽, 与Band 4.1、Band 4.2、ankyrin以及CD47等主要的膜骨架蛋白相连, 并通过这些蛋白组成的Band 3蛋白复合体与spectrin为基础的网膜骨架系统的链接维持红细胞膜的结构稳定^[17]。此外, Band 3蛋白作为红细胞内唯一的阴离子通道, 它对RBC离子转运和携氧功能也有重要

的调控作用。因此, Band 3结构的稳定和功能的健全是红细胞维持正常形态和行使多种生理功能的基础^[17]。近年来, 涉及多种生理病理条件下红细胞Band 3蛋白损伤及其对携氧和变形性等红细胞功能影响的研究也逐渐受到人们的关注。

RBC含有包含酶类和非酶类抗氧化物在内的一整套抗氧化体系, 其核心是超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽(GSH)^[18]。正常情况下, 它们协同作用能够清除包括 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot -}$ 和 $OH^{\cdot}$ 在内的绝大部分自由基, 维持细胞的氧化还原平衡^[19]。不同运动条件下大鼠抗氧化能力检测结果表明: 力竭运动后大鼠红细胞内GSH含量显著降低, 伴随着运动强度的增加RBC通过GSH维系氧化还原平衡的能力逐渐减弱。这种削弱一方面是由于清除自由基过程中GSH的大量消耗; 另一方面, 由于红细胞内GSH-GSSH循环体系的还原力主要来自于RBC糖代谢戊糖磷酸途径产生的NADPH^[20]。我们推测, 在力竭运动过程中红细胞的能量代谢途径也可能发生相应改变。此外, SOD与CAT活性在力竭运动后显著增加。力竭运动过程中红细胞内主要抗氧化物GSH消耗的增加、SOD与CAT活力的增强都暗示着力竭运动诱导的自由基爆发与细胞抗氧化应激反应机制的启动。然而, 伴随着运动强度的增加, RBC的抗氧化能力达到极限, 无法继续抵御持续产生的ROS, 进而受到氧化应激损伤。

在力竭运动过程中, 红细胞持续不断地受到来自胞内和组织来源的活性氧簇(ROS)的攻击, 在此过程中这些膜脂质极易受到氧化损伤^[21]。本实验中, 力竭运动后大鼠红细胞脂质过氧化产物MDA含量显著增加。这表明, 在力竭运动过程中大鼠红细胞膜脂质发生了严重的脂质过氧化反应。由于膜流动性与膜脂肪酸的饱和程度密切相关, PUFA的氧化将导致红细胞流动性的下降。此外, 脂质过氧化过程中生成的ROS将诱导红细胞膜组分(如膜酶和膜骨架蛋白)的进一步损伤。膜蛋白-SH检测结果表明, 力竭运动后大鼠红细胞膜-SH含量显著降低, 表明在力竭运动过程中自由基攻击导致膜蛋白SH交联产生-S-S-。-SH含量的降低一方面表明红细胞膜蛋白通过膜上大量巯基基团抵抗氧化损伤能力的降低; 另一方面, 也意味着红细胞膜蛋白已经受到ROS攻击而发生结构上的改变。

为了检测上述力竭运动诱导的自由基损伤是

否对大鼠红细胞Band 3蛋白结构和功能产生影响, 本实验中, 通过原位免疫荧光标记的方法对不同运动组的大鼠红细胞Band 3蛋白免疫荧光染色发现, 力竭运动后大鼠部分红细胞Band 3蛋白出现严重的聚簇化现象。进一步对其进行Western blot分析也证实了这个现象。此外, 为了探讨力竭诱导的大鼠RBC膜Band 3蛋白交联的原因, 对各组红细胞进行了一定时间的体外DTT孵育处理。结果表明, 体外还原处理后, 膜Band 3蛋白交联程度明显减弱。由于DTT常被用于蛋白质中二硫键的还原, 可用于阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键^[22]。这意味着力竭运动所诱导的蛋白聚集主要是通过-S-S-键连接的。而在引起红细胞膜蛋白交联的相关理论中, 只有自由基攻击蛋白巯基(-SH)才能导致-S-S-键的大量产生。在红细胞膜上, -SH大量存在于多种功能蛋白中, 而且多种代谢酶类都以包含-SH的半胱氨酸作为必需氨基酸, 如Ca-ATPase、Na,K-ATPase等。因此, -SH的氧化交联无疑会对红细胞形态结构的稳定和多种代谢功能造成严重损伤。有研究表明, 红细胞膜蛋白-SH水平与细胞黏弹性呈正相关关系。由此可见, 由自由基攻击所引发的膜蛋白巯基交联所导致的Band 3在内的多种膜蛋白的损伤是力竭运动诱导的红细胞结构和功能性损伤的重要原因。

介导RBC内外阴离子的跨膜转运是Band 3蛋白在红细胞内的主要功能之一。Band 3蛋白通过1:1的介导胞内外 HCO_3^-/Cl^- 使红细胞内外离子浓度维持平衡状态, 并可通过 HCO_3^- 浓度的改变影响胞内pH, 从而对受波尔效应影响的红细胞携氧-释氧过程起调控作用^[23]。本实验中我们的结果表明: 力竭运动组在单位时间内转运阴离子的能力出现了下降。这意味着, 力竭运动诱导的氧化损伤通过以蛋白内或蛋白间二硫键的形成使膜上主要的结构和功能蛋白Band 3发生聚簇化。而这种蛋白构象上的变化进一步导致了Band 3蛋白功能性障碍, 并将潜在地影响RBC的携氧功能。

在未经训练的大鼠力竭运动过程中, 伴随自由基的增加与抗氧化能力下降, 红细胞受到严重的氧化应激损伤, 导致RBC主要结构和功能蛋白Band 3巯基交联为主的蛋白聚簇化反应及其阴离子转运能力的下降。Band 3蛋白的损伤将进一步诱导红细胞

变形能力和携氧功能的下降, 成为运动相关疾病中组织局部供血不足的潜在致病因素。

参考文献 (References)

- 1 Smith JA. Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med* 1995; 19(1): 9-31.
- 2 Smith JA, Kolbuech-Braddon M, Gillam I, Telford RD, Weidemann MJ. Changes in the susceptibility of red blood cells to oxidative and osmotic stress following submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1995; 70(5): 427-36.
- 3 Szygula Z. Erythrocytic system under the influence of physical exercise and training. *Sports Med* 1990; 10(3): 181-97.
- 4 Xiong Y, Li Y, Zhao Y, Zhao Y, Tang F, Wang X. Exhaustive running exercise induce tyrosine phosphorylation of band 3 in rat erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(4): 1060-71.
- 5 Berzosa C, Gómez-Trullén EM, Piedrafita E, Cebrián I, Martínez-Ballarín E, Miana-Mena FJ, *et al.* Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111(6): 1127-33.
- 6 Alper SL. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 549-64.
- 7 Perrotta S, Borriello A, Scaloni A, de Franceschi L, Brunati AM, Turrini F, *et al.* The N-terminal 11 amino acids of human erythrocyte band 3 are critical for aldolase binding and protein phosphorylation: Implications for band 3 function. *Blood* 2005; 106(13): 4359-66.
- 8 von Rückmann B, Schubert D. The complex of band 3 protein of the human erythrocyte membrane and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Stoichiometry and competition by aldolase. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1559(1): 43-55.
- 9 Alderman EM, Fudenberg HH, Lovins RE. Isolation and characterization of an age-related antigen present on senescent human red blood cells. *Blood* 1981; 58(2): 341-9.
- 10 Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med* 2007; 11(1): 148-55.
- 11 Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion* 2007; 47(7): 1212-20.
- 12 Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985; 227(4686): 531-3.
- 13 Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107(4): 1198-205.
- 14 Teti D, Crupi M, Busa M, Valenti A, Loddo S, Mondello M, *et al.* Chemical and pathological oxidative influences on band 3 protein anion-exchanger. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16(1/2/3): 77-86.
- 15 Rosa EF, Freymüller E, Ihara SS, Aboulafia J, Nouailhetas VL. Damaging effects of intense repetitive treadmill running on murine intestinal musculature. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 104(5): 1410-7.
- 16 Rosa EF, Takahashi S, Aboulafia J, Nouailhetas VL, Oliveira MG. Oxidative stress induced by intense and exhaustive exercise impairs murine cognitive function. *J Neurophysiol* 2007; 98(3): 1820-6.
- 17 Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, *et al.* A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003; 101(10): 4180-8.
- 18 Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005; 38(11): 981-6.
- 19 Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189(1): 41-54.
- 20 Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, Fazzina G, Tuttobene M, Giardina B, *et al.* Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267(3): 684-9.
- 21 Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, *et al.* Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Applied Physiol* 2001; 84(1/2): 1-6.
- 22 Zipser Y, Piade A, Kosower NS. Erythrocyte thiol status regulates band 3 phosphotyrosine level via oxidation/reduction of band 3-associated phosphotyrosine phosphatase. *FEBS Lett* 1997; 406(1): 126-30.
- 23 van den Akker E, Satchwell TJ, Williamson RC, Toye AM. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 45(1): 1-8.