

血液保存过程红细胞力学性质变化及其机制探讨

熊延连¹ 于振海¹ 赵押金² 熊艳蕾¹ 陈东² 赵冬梅^{1*} 王翔^{2*}

¹滨州医学院基础医学院人体解剖学教研室, 烟台 264000;

²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 该文探讨了血液保存过程中随着保存时间的增加红细胞的细胞力学性质改变及其分子基础。应用原子力显微镜分别对不同保存时间的库存血红细胞力学性质进行检测, 获得相应的力-距离曲线。对不同保存时间的红细胞硬度、变形性进行评估。对不同存储时间的红细胞脂质过氧化和膜蛋白巯基含量进行检测。对红细胞膜蛋白进行SDS-PAGE和免疫荧光染色, 分析其膜骨架蛋白分布、含量和相互作用的变化, 探讨力学性质变化分子机制。研究发现, 血液保存过程中, 保存3周后红细胞杨氏模量显著增加, 细胞硬度增大, 力学性质下降(1 d: 0.54 ± 0.27 kPa; 21 d: 0.71 ± 0.57 kPa; 42 d: 1.33 ± 0.70 kPa)。此时, 红细胞脂质过氧化程度增加, 膜蛋白巯基含量下降, 膜蛋白巯基交联聚集化, 形成高分子聚合物(high molecular weight, HMW)。研究证明, 库存血存储时间过长会导致细胞力学性质下降, 成为影响输血质量的重要因素。

关键词 血液保存; 红细胞; 力学性质; AFM

Investigation of the Mechanical Properties Change of RBCs in Different Storage Stages

Xiong Yanlian¹, Yu Zhenhai¹, Zhao Yajin², Xiong Yanlei¹, Chen Dong², Zhao Dongmei^{1*}, Wang Xiang^{2*}

¹Department of Human Anatomy, College of Basic Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264000, China;

²Key Laboratory of Biorheology and Technology, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract The aim of the present study is to explore the mechanical properties change of red blood cells (RBCs) in different storage stages. Atomic force microscopy (AFM) were applied to detect the viscoelasticity of RBCs of different storage times to obtain the force-distance curve and Young's modulus. The level of lipid peroxidation and membrane protein thiol content were detected. Erythrocyte membrane skeleton protein distribution, content and interaction were detected by SDS-PAGE and immunofluorescence staining to explore the underline molecular mechanism of mechanical properties changes. The results showed that the Young's modulus of RBCs increased significantly after three weeks blood preservation which were 0.54 ± 0.27 kPa in early phase (the first day), 0.71 ± 0.57 kPa in metaphase (the 21th day) and 1.33 ± 0.70 kPa in telophase (the 42th day) respectively. As the lipid peroxidation degree increased, membrane protein thiol crosslinked with each other and formed high molecular polymer (high molecular weight, HMW), which resulted in a decreased amount in membrane protein thiol. The results suggested that the mechanical properties of RBCs were decreased gradually with the increasing of the storage time, and this change could be an important factor affecting the quality of blood transfusion.

Keywords blood storage; red blood cells; mechanical properties; AFM

收稿日期: 2014-08-30 接受日期: 2014-11-06

滨州医学院科技重点计划(批准号: BY2012KJZD05)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0535-6913493, E-mail: zhdm76@126.com; Tel: 023-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

Received: August 30, 2014 Accepted: November 6, 2014

This work was supported by the Binzhou Medical University Science and Technology Program (Grant No. BY2012KJZD05)

*Corresponding author. Tel: +86-535-6913493, E-mail: zhdm76@126.com; Tel: +86-23-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

网络出版时间: 2014-12-25 10:54 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141225.1054.006.html>

在标准的血库保存条件下,红细胞(red blood cells, RBCs)会经历一系列可逆的和不可逆的变化,这些变化统称为“存储损伤”^[1]。红细胞“存储损伤”大致可以分为三个主要的方面:生化、生物力学和免疫学。红细胞存储过程中生化方面的变化主要与细胞能量代谢相关,包括2,3-DPG和ATP的耗竭、脂质过氧化、膜磷脂的丢失和交联。生物力学方面的改变主要有:红细胞变形性、聚集性、渗透脆性和细胞内黏性。由于毛细血管的直径只有3~8 μm ,红细胞变形性的微小改变会极大地影响库存血在微循环中的运输。与此同时,红细胞形态由变形性高的双凹碟状转变为变形能力低的棘红细胞,最终变为没有变形能力的球形红细胞。

红细胞“存储损伤”的可能产生机理以及它所导致的各种输血并发症一直是近几年的研究热点^[2-3]。Zallen等^[4]发现,输入保存超过14 d的RBC与导致多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)的风险之间存在联系。基于这个结果,他们指出输入保存时间长的RBCs是导致MOF的一个独立的影响因素。Wolfe等^[5]发现了RBCs在血液储存过程中膜蛋白氧化损伤的现象,证明在6周保存的过程中RBCs膜蛋白会逐渐地受到氧化损伤,而且这个损伤会影响红细胞骨架蛋白之间的连接,从而影响到红细胞膜骨架系统。红细胞力学性质的维系是组织微循环畅通和有效携氧的重要保障。在大量缺血缺氧病例中,患者对库存血力学性质的要求则更加显著。因此,血液保存过程中红细胞力学性质的正常,是保障安全输血、避免输血诱发MOF的前提。本文应用原子力显微镜探讨了血液保存过程中不同保存时间RBCs力学性质的变化,并进一步对其潜在的分子机制进行了初步研究。希望我们的工作能够对增加库存血保存时间及保存质量的改善提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 血液采集及处理

本实验所用血样均来自查体合格的成人外周血,由滨州医学院附属医院提供。10人份ACD-B抗凝新鲜全血样品(每份200 mL)的在封闭条件下分离大部分血浆,加入MAP红细胞添加液制备悬浮红细胞,经剂量为25Gy辐照后采用无菌接口技术将每单位血样平分为5份。实验期间放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,

在0, 14, 21, 35, 42 d分别取样测定。

1.2 仪器与试剂

苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)购自Sigma-Aldrich公司。巯基和MDA试剂盒购自南京建成生物工程研究所,其余均为国产试剂(分析纯)。鼠抗人Band 3(ab11012)多克隆IgG抗体购自美国Abcam公司。肝素、L-多聚赖氨酸(poly-L-lysine, 分子量70 000~150 000)均购自美国Sigma公司。AFM探针TR400PSA购自日本Olympus公司。标记DyLight 488的山羊抗兔多克隆IgG抗体和DyLight549标记的山羊抗鼠多克隆IgG抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司。电泳设备及相关耗材购于美国Bio-Rad公司。分光光度计购于美国Thermo Scientific公司。

1.3 理化性质的测定

用pH计测定pH值。电位法测定pH系利用电极在不同溶液中所产生的电位变化来测定溶液pH值。

用电解质分析仪检测 K^+ 、 Na^+ 浓度变化。采用离子选择性电极(Thermo Scientific Orion, ISE),由微处理机控制,层级菜单式软件结构,准确而快速地测定全血、血清、血浆等生物体液中的 K^+ 、 Na^+ 浓度。

邻联甲苯胺法检测血浆游离血红蛋白浓度。测试管内各加入待测血浆20 μL ,空白管加去离子水20 μL ,标准管加血红蛋白标准液20 μL 。于上述各管中加入1.0 mL 0.2%邻甲联苯胺溶液,再加入1.0 mL 1%过氧化氢溶液,混匀放置10 min,各管加入10 mL 10%冰乙酸溶液,于723分光光度计波长为435 nm下测定浓度。

1.4 原子力显微镜测量RBCs力学性质

实验采用L-多聚赖氨酸(poly-L-lysine)固定红细胞。将现配的500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的L-多聚赖氨酸溶液均匀涂布于洁净的直径3.5 cm培养皿底部,过夜晾干,待用。不同保存阶段悬浮红细胞经PBS缓冲液按体积比1:1稀释,带负电的红细胞通过静电作用固定在带正电的L-多聚赖氨酸包被的培养皿底部。取适量(两滴)该液体均匀涂布于L-多聚赖氨酸包被的培养皿底部,放置30 min。用PBS缓冲液反复冲洗培养皿底部3次,以去除部分未固定的细胞。

采用接触模式获得不同保存阶段红细胞力谱曲线,力的大小范围在0.1~0.5 nN之间,进针速度为1.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。使用标准氮化硅悬臂,其弹性系数为0.03 N/m。探针形状为金字塔形,针尖侧面角为17.5度。每组

样品随机选取10个红细胞,每个红细胞在中心位置附近测量10次。整个测量过程在室温下进行,红细胞则完全浸没在PBS中。红细胞的局部弹性可以通过原子力显微镜力-距离的曲线进行定量检测。每组样品的测量可以获得100个曲线。实验采用Hertz模型计算杨氏模量,描述进针加载过程中红细胞的弹性形变难易程度。进针加载曲线与回针曲线之间的差异可反映红细胞的黏性。

1.5 红细胞膜蛋白巯基(thiol groups, SH)和膜质过氧化(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS)

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),在漩涡振荡器上充分混匀1 min,700 r/min离心10 min。此液体分三层,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反应液后测412 nm处吸光值。并通过标准曲线计算膜蛋白SH含量。

TBARS的测量采用MDA试剂盒。取上述裂膜液100 μ L为加样量,空白组则不加TBA反应液,以532 nm处的净吸光值求算MDA浓度,最终以每毫克膜蛋白所对应的MDA含量表示膜质TBARS水平,即nmol MDA/mg protein。

1.6 细胞膜的制备

RBC经洗涤后,置于其体积30倍左右的低渗缓冲液(pH7.4, 5mmol/L磷酸盐缓冲液,内含1 mmol/L的PMSF和1 mmol/L的EDTA)中进行破溶,约1.5 h后在4 $^{\circ}$ C、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,膜裂解液存放于-80 $^{\circ}$ C环境。

1.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE应用5%~15%的梯度浓度分离胶,上样8 μ g,电泳条件在10 $^{\circ}$ C左右进行,以恒压30 V开始电泳,样品进入分离胶后电压增至110 V,溴酚蓝到达边缘时停止电泳,把胶置于固定液中固定30 min后进行过夜染色(至少12 h),最后脱色,直至胶底色近于无色。用GS-800 Calibrated Densitometer扫描成像,Quantity One软件进行条带分析。

1.8 免疫荧光染色

取4% PFA和0.05%戊二醛各100 μ L加入到1 mL PBS缓冲液中,配成混合溶液。将此混合溶液加入到洗涤过的60 μ L红细胞中。室温放置40 min后700 r/min离心5 min, PBS洗涤3次。取0.5% Triton X-100 60 μ L加入到1 mL PBS中,将此溶液加入到固定好的红细胞中。3 700 r/min离心1 min,然后用PBS洗涤3次。5% BSA 1 mL室温封闭40 min。PBS洗涤3次。取一抗按1:200稀释后加入到细胞中,室温摇床孵育4 h。洗涤同上,取两种二抗按1:2 000稀释后加入到细胞中,室温摇床孵育4 h。操作过程避光,洗涤同上。弃上清,制成0.2 mL细胞悬液。将样品滴片,于OLYMPUS IX71荧光显微镜(激发波长492 nm, 100 \times 油镜)下观察结果。

1.9 统计学处理

所有数据从三组或三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。组间统计学差异通过Origin 7.5软件的一元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

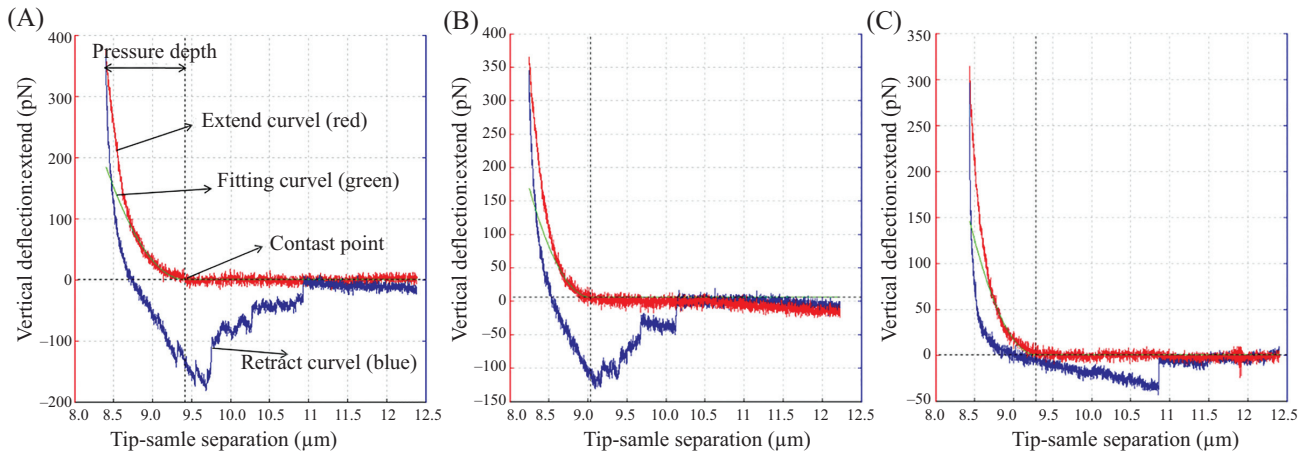
2.1 电解质及游离Hb变化

表1显示随保存时间的延长,悬浮红细胞的pH

表1 不同保存时间悬浮红细胞K⁺、Na⁺、游离Hb浓度及pH的变化

Table 1 The concentrations of K⁺, Na⁺, free Hb and pH of RBCs in different storage times

保存时间 Storage time	pH	钠离子(mmol/L) Na ⁺ (mmol/L)	钾离子(mmol/L) K ⁺ (mmol/L)	游离Hb(g/L) Free hemoglobin (g/L)
1 d	7.42	135.33	26.54	0.05
14 d	7.36	122.96	36.57	0.06
21 d	7.38	120.59	42.23	0.09
35 d	7.10	116.89	48.45	0.20
42 d	7.07	114.56	49.56	0.26

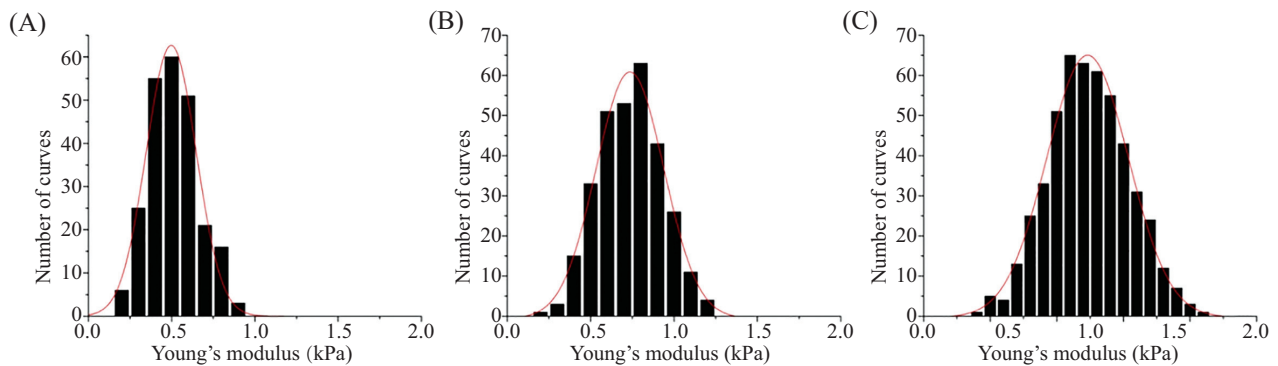


A: 保存前期(第1 d); B: 保存中期(第21 d); C: 保存末期(第42 d)。

A: early phase of blood preservation (the 1st day); B: metaphase of blood preservation (the 21th day); C: telophase of blood preservation (the 42th day)。

图1 不同保存阶段红细胞AFM力-距离曲线

Fig.1 AFM force-distance curves of RBCs in different storage times



A: 保存前期(第1 d); B: 保存中期(第21 d); C: 保存末期(第42 d)。

A: early phase of blood preservation (the 1st day); B: metaphase of blood preservation (the 21th day); C: telophase of blood preservation (the 42th day)。

图2 不同保存阶段红细胞杨氏模量分布直方图

Fig.2 Histograms of the Young's modulus of RBCs in different storage times

值逐渐下降; 游离Hb逐渐增加且在14 d以后增大更快; Na^+ 浓度呈进行性下降, 而 K^+ 浓度逐渐增加。

2.2 红细胞黏度的变化

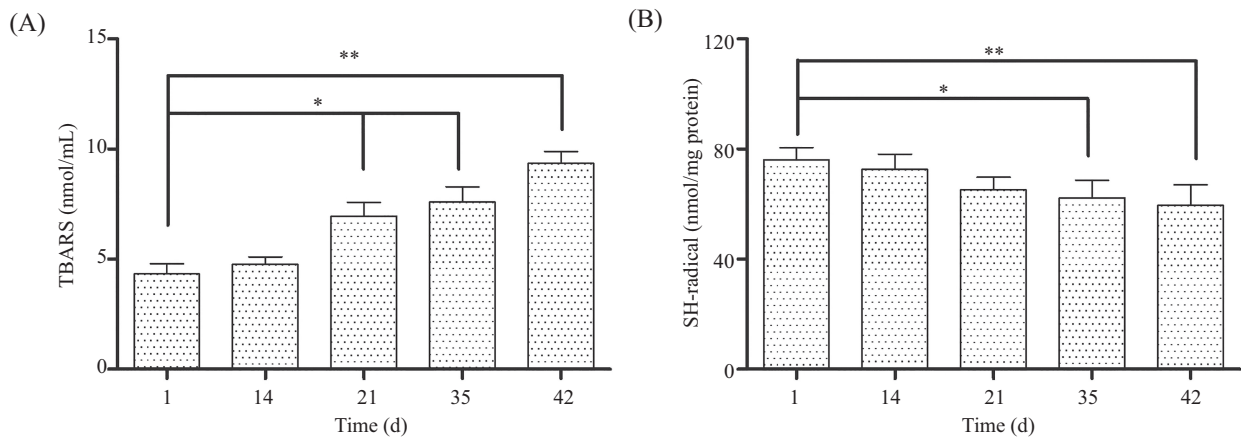
原子力显微镜通过记录作用力的大小与进针距离之间的关系对特定材料的黏弹性进行定量测量。针尖的压入深度 (Indentation) 为记录曲线与校准曲线之间的水平距离。图1为保存初期(保存第1 d)、中期(保存第21 d)和末期(保存第42 d)红细胞的AFM力-距离曲线。其中的红色曲线为进针加载曲线 (Extend), 主要表征细胞的弹性; 蓝色曲线为回针曲线 (Retract), 主要表征细胞的黏性; 而绿色曲线则为进针曲线的拟合曲线。

与保存前中期相比, 保存末期RBC回针曲线与

进针曲线更加接近(图1)。在三组检测结果中, 回针曲线与进针曲线均没有完全重合, 这是由于探针尖端在脱离红细胞的过程中受到黏附力的作用, 导致回针曲线记录的探针所感受到的力为负值。故细胞表面局部黏附力越强, 针曲线记录的力的负值越大, 直观表现在图中封闭区域的面积也越大。由此可以定性推测, 在血液保存过程中RBC黏度在血液保存中后期快速降低。

2.3 红细胞的弹性变形能力变化

采用JPK Image Processing软件对AFM力-距离曲线进行分析, 由进针曲线的拟合曲线确定杨氏模量, 拟合曲线主要拟合了作用力在0~200 pN之间的进针加载曲线。因此, 每条曲线都有一个确定的杨

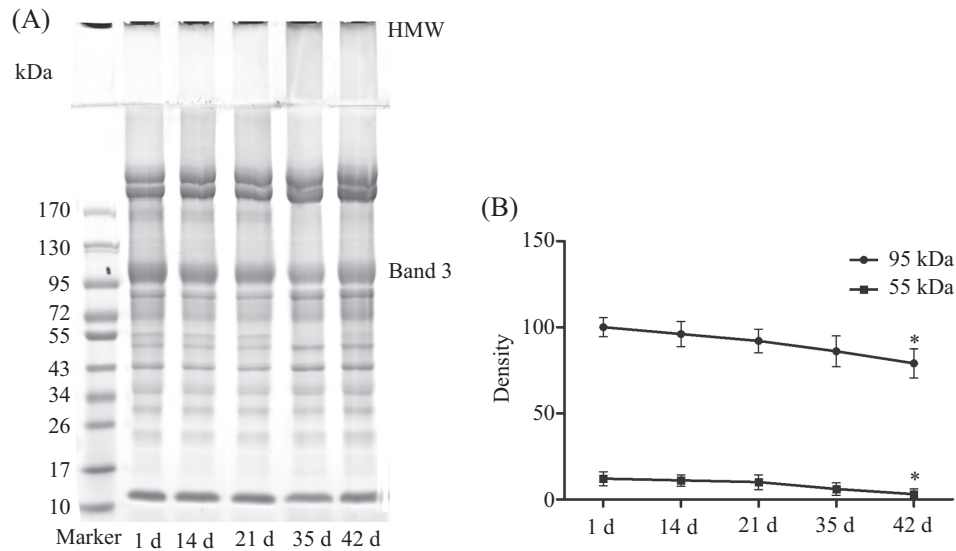


A: 红细胞膜脂质TBARS水平; B: 膜蛋白巯基水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: the levels of TBARS of RBCs in different storage times; B: the levels of thiol groups of RBCs in different storage times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 不同保存阶段红细胞氧化损伤参数

Fig.3 Erythrocyte oxidant stress parameters of RBCs in different storage times



A: 红细胞蛋白SDS-PAGE条带, 箭头表示不同保存阶段膜蛋白交联或聚集情况; B: 电泳条带灰度分析, * $P < 0.05$, 与1 d组比较。

A: SDS-PAGE analysis of erythrocyte membrane proteins. The arrows indicate protein clusters or degradation in different storage time; B: the densitometric analysis of electrophoretic bands of RBCs membrane protein at different storage time, * $P < 0.05$ vs 1 d group.

图4 红细胞膜蛋白SDS-PAGE分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of RBCs membrane proteins

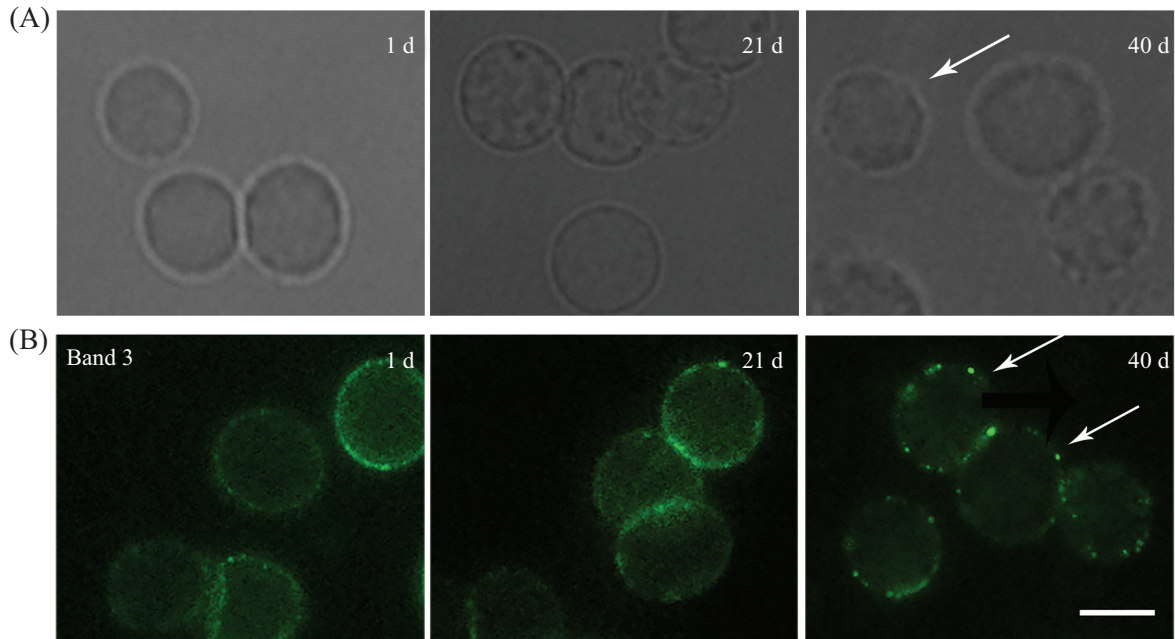
氏模量值与之对应。统计落在不同区间(每个区间长度为0.1 kPa)内的杨氏模量值所对应的曲线数目得到杨氏模量分布直方图(图2)。

对直方图(图2A~图2C)进行高斯分布拟合, 分别得到不同样品对应杨氏模量的均值, 误差为高斯峰的半峰宽。故保存初期、中期和末期红细胞的杨氏模量测量值分别为 0.54 ± 0.27 kPa、 4.01 ± 0.57 kPa和 1.33 ± 0.70 kPa。由此可见, 伴随着库存血保存时间的延长, 红细胞的弹性变形能力

逐渐降低。

2.4 运动对RBCs膜脂质过氧化和膜蛋白巯基含量的影响

通过TBA法检测膜脂质TBARS水平, 结果表明, 伴随保存时间的增加红细胞膜脂TBARS水平显著升高(图3A)。红细胞膜蛋白含有丰富的SH, 它们对维系RBCs膜上众多酶类和功能蛋白的正常结构和功能起到重要作用。在血液保存6周后, 红细胞膜蛋白SH含量显著下降(图3B)。



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5 红细胞Band 3蛋白免疫荧光显微术检测

Fig.5 Band 3 of RBCs detected by fluorescent micrograph

2.5 膜蛋白SDS-PAGE分析

对不同保存阶段红细胞膜蛋白进行SDS-PAGE电泳分析,结果表明,红细胞膜蛋白在保存3周左右时开始发生显著的变化。在200 kDa以上出现高分子聚合条带(high molecular weight, HMW)(图4A),且伴随保存时间的延长逐渐增加。与此同时,55 kDa和95 kDa处的蛋白含量开始减少(图4B)。

2.6 膜蛋白荧光标记

保存初期红细胞在明场下观察大小均一,在倒置荧光显微镜下观察到膜骨架蛋白Band 3分布均匀、轮廓清晰(图5)。保存中期的血样中出现棘红细胞,少数红细胞肿胀呈球形,边缘不整齐。荧光显微镜下可以看到细胞膜上出现点状物,表明Band 3出现蛋白交联。保存末期,棘红细胞数量进一步增加,并出现囊泡或荷叶状边缘。荧光观察可看到细胞膜上分布着明显的点状物,表明此时细胞膜骨架蛋白已经发生严重的蛋白交联,并伴随着囊泡的产生。

3 讨论

人类红细胞具有独特的力学性质,它赋予红细胞黏弹性和可变形性,使其可以通过管径更狭窄的

毛细血管网络,是维系机体高效率的新陈代谢和保障各种生理平衡的基础^[6]。库存血在保存过程中,随着保存时间的延长,红细胞会发生一系列生理、生化和机械性质的改变。例如细胞皱缩、小囊泡形成、膜蛋白交联以及磷脂酰丝氨酸PS外露等,这些变化会极大地影响红细胞的变形性、聚集性和携氧能力等力学性质^[7-9]。其中,膜结构和膜蛋白的变化是影响血液品质和临床输血效果的重要因素。

红细胞膜蛋白和结构的变化与力学性质的变化密切相关^[10]。红细胞经原子力显微镜检测的杨氏模量,即弹性模量,是生物领域中用来表征细胞表面性质的一个物理量,仅由材料本身的物理性质所决定,杨氏模量值的大小标志着细胞的刚性程度,杨氏模量越大,越不容易发生形变^[11-12]。本实验中不同保存时期红细胞杨氏模量检测结果表明,在血液保存的最初两周内,细胞膜蛋白能够保持正常的含量和分布,从而维持细胞正常的力学性质。当保存时间达到3周左右的时候,膜蛋白开始出现部分的交联或降解,维系力学性质的膜骨架系统被破坏。此时,细胞黏弹性降低,细胞硬度增加,变形能力下降。在保存的末期,随着膜蛋白和脂质过氧化程度的进一步加深,红细胞形态由变形性高的双凹碟状转变为

变形能力低的棘红细胞, 最终变为没有变形能力的球形红细胞。

血液保存过程中红细胞内 Na^+ 、 K^+ 等电解质的浓度及酸碱平衡对血液质量和临床输血效果有重要影响。本研究中关于电解质和 pH 值变化的检测结果与国内外其他报道一致^[13-15]。 Na^+ 浓度随保存时间增加逐渐降低, K^+ 浓度持续升高, pH 则缓慢下降。导致 K^+ 浓度升高主要有两方面的因素, 一是少量红细胞破裂细胞内液外泻所致, 二是红细胞膜上重要的 Na^+ - K^+ -ATP 酶(钠泵)功能受影响, 细胞内 K^+ 的逸出。在保存过程中, 红细胞膜和膜蛋白的损伤以及葡萄糖的持续消耗引起的 ATP 供能减少都会影响 Na^+ - K^+ -ATP 酶功能的正常发挥, 从而使血浆 K^+ 浓度不断升高。随着储存时间的增加, 红细胞内代谢底物逐渐耗竭, 代谢产物积累, 尤其是 SOD、谷胱甘肽、过氧化氢酶逐渐消耗殆尽, 胞内氧化还原平衡逐渐被打破^[16]。本文对不同保存阶段红细胞脂质过氧化和膜蛋白巯基含量检测结果表明, 从保存 3 周左右开始, 红细胞内脂质过氧化物逐渐增加。与此同时, 红细胞膜蛋白巯基含量逐渐下降。这意味着, 在血液保存的中后期, 红细胞内对力学性质稳定和维系起着重要作用的膜脂质和膜蛋白均受到氧化损伤的影响。

以 Band 3 蛋白为中心的蛋白复合体在维系红细胞膜结构完整性和稳定性, 以及调控红细胞能量代谢和气体转运的过程中都起到重要作用^[17]。其跨膜区域负责 Cl^- 和 HCO_3^- 的跨膜装运, 维持酸碱平衡; 其 N 末端区域位于质膜以内, 是膜骨架蛋白、胞浆蛋白、糖酵解酶等的结合位点^[18]。有学者认为, RBCs 老化源于氧化损伤。RBCs 内血红蛋白被氧化后与细胞骨架结合促使高铁血色原的产生, 后者与 Band 3 蛋白结合后促使大分子量 Band 3 蛋白聚簇的产生^[19-20]。本文对膜蛋白 Band 3 的免疫荧光染色结果表明, 在血液保存的初期红细胞膜蛋白还没有遭受到来自 ROS 和高铁血红蛋白等氧化分子的攻击, 能够保持细胞的形态和膜蛋白的正常分布。但是在保存时间到达 3 周左右的时候, 由于细胞内氧化还原平衡被打破、自由基含量增加, 导致膜蛋白开始出现交联和棘红细胞出现。随着保存时间的进一步增加, 细胞膜骨架蛋白发生严重的蛋白交联, 并伴随着囊泡的产生。

综上所述, 本文应用 AFM 对不同保存阶段红细胞杨氏模量进行检测, 证实了库存血保存过程中细胞膜硬度增加、力学性质下降的现象。初步证实了血

液保存库存血保存过程中, 随着细胞抗氧化能力的降低和自由基含量的增加红细胞膜脂和膜蛋白受到过氧化损伤。而由膜蛋白氧化损伤引起的包括骨架蛋白 Band 3 在内的蛋白交联、断裂等因素可能是影响血液保存过程中细胞力学性质变化的重要因素。血液保存过程中红细胞氧化、衰老过程复杂, 胞内外多种结构和功能蛋白如磷脂酰丝氨酸、CD47、Spectrin 等都有受到氧化损伤的风险。因此, 血液保存过程中多种对红细胞力学性质和结构稳定性的维系起重要调控作用的蛋白其氧化损伤状况仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Kor DJ, van Buskirk CM, Gajic O. Red blood cell storage lesion. *Bosn J Basic Med Sci* 2009; 9 Suppl 1: 21-7.
- 2 Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT. Storage lesion: Role of red blood cell breakdown. *Transfusion* 2011; 51(4): 844-51.
- 3 Hamasaki N, Yamamoto M. Red blood cell function and blood storage. *Vox Sang* 2000; 79(4): 191-7.
- 4 Zallen G, Offner PJ, Moore EE, Blackwell J, Ciesla DJ, Gabriel J, *et al.* Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999; 178(6): 570-2.
- 5 Wolfe LC, Byrne AM, Lux SE. Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored red cells. Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation. *J Clin Invest* 1986; 78(6): 1681-6.
- 6 Nash GB, Johnson CS, Meiselman HJ. Mechanical properties of oxygenated red blood cells in sickle cell (HbSS) disease. *Blood* 1984; 63(1): 73-82.
- 7 Meiselman HJ, Evans EA, Hochmuth RM. Membrane mechanical properties of ATP-depleted human erythrocytes. *Blood* 1978; 52(3): 499-504.
- 8 Barshtein G, Gural A, Manny N, Zeliq O, Yedqar S, Arbell D. Storage-Induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation. *Transfu Med Hemother* 2014; 41(3): 197-204.
- 9 Daly A, Raval JS, Waters JH, Kameneva MV. Effect of blood bank storage on the rheological properties of male and female donor red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013; 56(4): 337-45.
- 10 Baskurt OK. Red blood cell mechanical stability. *Engineering* 2013; 4: 8.
- 11 唐福州, 王翔, 熊延连, 邓雪茹, 李遥金, 王若峰. 蛋白激酶 C 调控脊椎生物红细胞膜骨架蛋白间亲和力的进化演变. *中国细胞生物学学报* (Tang Fuzhou, Wang Xiang, Xiong Yanlian, Deng Xueru, Li Yaojin, Wang Ruofeng. Evolution of the vertebrate erythrocytes membrane skeleton protein affinity is caused by protein kinase C. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(4): 460-8.
- 12 Kiss R, Bock H, Pells S, Canetta E, Adya AK, Moore AJ, *et al.* Elasticity of human embryonic stem cells as determined by atomic force microscopy. *J Biomech Eng* 2011; 133(10): 101009.
- 13 刘灿征, 杨晨曦, 武峰, 李宗生, 许虹. 血液在不同保存期有形成份及理化指标变化的研究. *齐鲁医学检验* (Liu Canzheng, Yang Chenxi, Wu Feng, Li Zongsheng, Xu Hong. Study on the change of the visible component and the physics and chemistry

- indexes in the difference conservation phase of the whole blood. Qilu Journal of Medical Laboratory Science) 2004; 15(4): 34-6.
- 14 Kennedy SA, Constable PD, Sen I, Couëtil L. Effects of syringe type and storage conditions on results of equine blood gas and acid-base analysis. *Am J Vet Res* 2012; 73(7): 979-87.
- 15 Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 2010; 50(2): 376-89.
- 16 Donadee C, Raat NJ, Kaniyas T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, *et al.* Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* 2011; 124(4): 465-76.
- 17 熊延连, 熊艳蕾, 李遥金, 唐福州, 赵押金, 王翔. 力竭运动诱导的氧化应激对大鼠红细胞 Band3 蛋白的影响及其机制探讨. *中国细胞生物学学报* (Xiong Yanlian, Xiong Yanlei, Li Yaojin, Tang Fuzhou, Zhao Yajin, Wang Xiang. Influence of exhaustive exercise induced oxidative stress on band 3 of rat erythrocyte. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(5): 617-23.
- 18 于青, 刘嘉馨, 王红, 曹晔, 贺曾, 何语良. NO 对不同天龄红细胞保存质量影响的初步研究. *中国输血杂志* (Yu Qing, Liu Jiaxin, Wang Hong, Cao Ye, He Zeng, He Yuliang. The effect of NO on the quality of RBCs in different storage condition of cell age. *Chin J Blood Transfusion*) 2012; 25(4): 341-5.
- 19 Kay M, Flowers N, Goodman J, Bosman G. Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 86(15): 5834-8.
- 20 Lutz HU. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells. *Transfus Med Hemother* 2012; 39(5): 321-7.