

# 能量耗竭诱导红细胞锚蛋白外翻触发巨噬细胞对红细胞的黏附

王玉林<sup>1,2</sup> 隆耀航<sup>1</sup> 叶远浓<sup>2</sup> 周厚明<sup>2</sup> 陈晋<sup>2</sup> 黄江涛<sup>1</sup> 唐福州<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>贵州医科大学贵州省免疫细胞与抗体工程研究中心, 贵阳 550025;

<sup>2</sup>贵州医科大学生物与医学工程重点实验室, 贵阳 550025)

**摘要** 该研究的目的是探讨能量耗竭能否诱使红细胞锚蛋白外翻, 且巨噬细胞能否黏附锚蛋白外翻的红细胞。在能量耗竭孵育后, 该研究分别检测了红细胞锚蛋白外翻水平、胞内ATP浓度、胞内钙离子水平、胞内蛋白激酶C的激活和巨噬细胞对红细胞的黏附数。结果表明, 红细胞经能量耗竭孵育后, 胞内ATP水平孵育2 h后显著减少, 6 h后ATP基本被耗尽; 能量耗竭和胞外钙离子的共同孵育, 促使红细胞胞内蛋白激酶C的激活以及红细胞锚蛋白外翻; 锚蛋白外翻的红细胞能够被巨噬细胞黏附, 且整合素 $\alpha_v\beta_3$ 明显抑制了巨噬细胞对红细胞的黏附。结果分析表明, 能量耗竭和胞外钙离子的共同孵育促使红细胞锚蛋白的外翻, 这可能是在能量耗竭情况下红细胞被巨噬细胞清除的一个潜在机制, 从而为研究能量代谢异常红细胞的清除提供潜在的分子基理。

**关键词** 能量耗竭; 红细胞; 锚蛋白外翻; 黏附; 程序性死亡

## Ankyrin Exposure Induced by Energy Exhaustion Triggers the Adhesion of Macrophages

WANG Yulin<sup>1,2</sup>, LONG Yaohang<sup>1</sup>, YE Yuannong<sup>2</sup>, ZHOU Houming<sup>2</sup>, CHEN Jin<sup>2</sup>, HUANG Jiangtao<sup>1</sup>, TANG Fuzhou<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Immune Cells and Antibody Engineering Research Center of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guizhou 550025, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, Guizhou Medical University, Guizhou 550025, China)

**Abstract** The aim of this paper is to study whether the energy exhaustion is associated with ankyrin exposure, and whether erythrocytes with ankyrin exposure adhere to macrophages. The energy exhaustion-induced protein kinase C (PKC) activation, ankyrin exposure, and the levels of intracellular calcium and ATP were separately tested. Results showed that the level of intracellular ATP decreased significantly after incubation for 2 h, and the energy exhaustion showed after incubation for 6 h. The treatment of erythrocytes with energy exhausting in a calcium-containing buffer led to ankyrin exposure and PKC activation. Moreover, ankyrin exposure induced erythrocyte adhesion to macrophages. Analyses of results suggested that the energy exhaustion induced calcium influx into the erythrocytes and PKC activation, ultimately leading to ankyrin exposure. This maybe provide a potential mechanism for studying the clearance of erythrocytes under the condition of energy depletion as well as insights into the molecular mechanisms of the removing of diseased erythrocytes induced by the energy exhaustion.

**Keywords** energy exhaustion; erythrocyte; ankyrin exposure; adhere; eryptosis

收稿日期: 2019-04-27 接受日期: 2019-07-17

国家自然科学基金(批准号: 31760264、31660320)和贵州省科技计划项目(批准号: (2019) 1253、KY (2016) 146、(2017) 30-15)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0851-88174045, E-mail: tangfuzhou@163.com

Received: April 27, 2019 Accepted: July 17, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31760264, 31660320) and the Foundation of the Science and Technology Project of Guizhou Province (Grant No. (2019) 1253, KY (2016) 146, (2017) 30-15)

\*Corresponding author. Tel: +86-851-88174045, E-mail: tangfuzhou@163.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:27:15 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1105.022.html>

红细胞具有携带氧气, 运输二氧化碳、电解质、血液酸碱平衡等生理功能, 维持生物体正常的生命活动。成熟红细胞缺乏细胞核和线粒体这两个与细胞凋亡有关的重要细胞器, 然而在正常生理状态下衰老及老化的红细胞却能被很好地去除。巨噬细胞对红细胞的黏附是细胞清除的重要步骤<sup>[1-4]</sup>。红细胞的过早清除及凋亡不足均与多种疾病相关, 如: 血细胞凋亡过渡和再生障碍性贫血<sup>[5]</sup>、骨髓红系祖细胞凋亡不足和高原红细胞增加症<sup>[6]</sup>。糖酵解是成熟红细胞的主能量来源。老化红细胞胞内糖酵解水平明显低于正常红细胞<sup>[7]</sup>, 且老化红细胞呈现带3蛋白交联<sup>[8]</sup>、PS 外翻等细胞凋亡的信号<sup>[9]</sup>。同时, 在多种血液疾病中研究人员也发现, 其红细胞胞内存在能量代谢障碍及细胞凋亡信号<sup>[10-11]</sup>。因此, 探索能量耗竭对红细胞程序性死亡的影响为研究红细胞异常死亡的相关血液疾病提供分子基础, 具有潜在的生理、病理意义。

红细胞程序性死亡往往起始于胞内钙离子水平的升高, 增加的钙离子一方面诱导胞内混杂酶的激活, 继而诱使磷脂酰丝氨酸的非对称性破裂, 最终促使磷脂酰丝氨酸的外翻<sup>[12-13]</sup>; 另一方面使胞内离子浓度发生改变, 从而导致红细胞体积的减少、膜蛋白的磷酸化、带3蛋白交联以及细胞力学性能的变化<sup>[14-17]</sup>。红细胞锚蛋白的外翻也能促使巨噬细胞对红细胞的黏附, 最终导致红细胞程序性死亡<sup>[11,17]</sup>。红细胞锚蛋白为膜内在蛋白, 其与蛋白4.2、血影蛋白及带3蛋白相互结合, 维护细胞膜的稳定。锚蛋白由89 kDa的N末端膜蛋白结合区域, 中间的血影蛋白结合区域及C末端的调控区域构成, 其中N末端的膜蛋白结合区域含有由4个独立的褶曲子结构域构成的球状形态, 且膜蛋白结合区域含有24个串联重复序列组成的超螺旋物。该区域有类似弹簧的弹性性能, 在力的作用下可以被拉伸30 nm<sup>[18-20]</sup>。红细胞在钙离子孵育, 同时伴随剪切力的作用下, 含有RGD序列端的锚蛋白能够外翻到细胞表面, 与巨噬细胞表面的整合素 $\alpha\text{v}\beta_3$ 识别, 促使巨噬细胞与红细胞的黏附, 继而诱发噬红细胞作用<sup>[1]</sup>。

能量耗竭能够激活红细胞胞内的可通透性的钙离子通道, 从而诱使胞内钙离子水平的增加, 进一步促使细胞磷脂酰丝氨酸的外翻, 及胞内蛋白激酶C(PKC)的激活、膜蛋白的磷酸化, 巨噬细胞对红细胞的黏附, 最终红细胞的程序性死亡。然而关于能量耗竭能否诱导红细胞锚蛋白的外翻促使红细胞程

序性死亡还尚未清楚。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

ATP检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Anti-PKC $\alpha$ 抗体和山羊抗兔IgG-HRP购自Abcam公司; 整合素 $\alpha\text{v}\beta_3$ 购自美国Bio-Techne公司; Anti-ankyrin抗体和山羊抗小鼠IgG-HRP购自Santa Cruz公司; THP-1(TIB-202)购自American Type Culture Collection公司; 佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自北京四正柏生物公司; Fluo-3 AM和钙离子载体A23187购自Sigma公司。

### 1.2 红细胞能量耗竭孵育

首先, 取健康成年人的血液5 mL(经贵州医科大学医学伦理委员会审查批准, 并获得志愿者本人知情同意), PBS洗涤, 离心分离红细胞。其次, 配制Buffer H(10 mmol/L HEPES, pH7.4, 145 mmol/L NaCl)。在Buffer H溶液中加入10 mmol/L glucose、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>配制含有钙离子和葡萄糖缓冲液, Buffer H溶液中加入10 mmol/L glucose, 1 mmol/L EGTA配制含有葡萄糖、不含钙离子的缓冲液。然后, 配制能量耗竭液<sup>[21-22]</sup>(10 mmol/L HEPES、130 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、1 mmol/L EGTA、10 mmol/L inosine、6 mmol/L iodoacetamide、5 mmol/L sodium tetrathionate)。含有钙离子能量耗竭液用2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>替代1 mmol/L EGTA)。分别孵育红细胞0 h、2 h、6 h和12 h。含有钙离子组用Ca<sup>+</sup>组, 不含钙离子组于Ca<sup>-</sup>组表示, 含有钙离子和葡萄糖用Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>+</sup>表示, 不含钙离子和含有葡萄糖用Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>+</sup>表示。

### 1.3 胞内ATP浓度检测

对孵育的红细胞离心(2 000 r/min, 2 min)弃上清, PBS洗涤2次, 按1:4的体积比加入双蒸水进行稀释, 再混匀使溶血完全, 制备成溶血液, 取10  $\mu$ L测血红蛋白。然后将制好的溶血液沸水中加热煮10 min, 取出混匀抽提1 min, 4 000 r/min, 离心10 min, 取上清。然后根据南京建成生物工程研究所ATP检测试剂盒进行胞内ATP含量检测。

### 1.4 锚蛋白外翻检测

首先, 取待测红细胞样品, 加入预冷至4  $^{\circ}$ C的4%多聚甲醛溶液, 4  $^{\circ}$ C孵育过夜, 对细胞进行固定。其次, 洗涤后再加入5%的BSA溶液孵育, 对细胞进行封闭。接着用锚蛋白鼠抗人单克隆抗体(1:100)

孵育红细胞, 4 °C过夜。然后, 洗涤后用山羊抗鼠 IgG-FITC的二抗室温37 °C孵育2 h。洗涤, 最后将红细胞调整浓度在 $10^6$ /mL, 免疫荧光及流式检测。

### 1.5 胞内钙离子水平检测

取待测红细胞样品, 悬浮在终浓度为 4  $\mu$ mol/L Fluo-3 AM溶液中, 混匀, 37 °C恒温避光孵育30 min。离心、洗涤后, 用含有1% BSA的HBSS缓冲液(HBSS: 138 mmol/L NaCl、5.3 mmol/L KCl、4.2 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、0.45 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.34 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、5.5 mmol/L glucose, pH7.4)孵育30 min。洗涤后将红细胞调整浓度在 $10^6$ 个/mL, 流式检测。阳性对照组中在孵育Fluo-3 AM溶液前, 加入终浓度4  $\mu$ mol/L钙离子载体A23187孵育5 min。

### 1.6 蛋白激酶C激活检测

首先, 提取红细胞膜蛋白。将孵育好的红细胞, 离心、洗涤, 溶于pH7.4, 0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>和0.1 mmol/L PMSF), 置于4 °C, 2 h后, 12 000 r/min离心洗涤3次, 得到白色红细胞膜蛋白。然后, 用BCA法测定膜蛋白含量。最后, 采用SDS-PAGE(8%)对膜蛋白进行电泳(上样量为20  $\mu$ g), 待结束后, 转膜, 封闭, 加入兔单克隆抗体anti-PKC $\alpha$ 抗体(1:1 000), 4 °C孵育过夜后, 洗去一抗, 加入辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(1:2 000), 室温孵育1.5 h, 清洗, 显色。

### 1.7 巨噬细胞噬红细胞检测

首先, 将培养好的 THP-1细胞, 悬浮在 RPMI-1640培养基中, 调整浓度为 $10^5$ 个/mL。再加入终浓

度为50 ng/mL的PMA, 37 °C、5%的CO<sub>2</sub>孵育48 h, 洗涤去悬浮细胞, 贴壁即为巨噬细胞。最后, 将调整浓度为 $10^6$ 个/mL的红细胞与巨噬细胞共同培养2 h, 洗去没有黏附的红细胞, 计数。

在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导的巨噬细胞噬红细胞作用的抑制实验中, 将终浓度6 nmol/L  $\alpha_v\beta_3$ 与 $10^6$ 个/mL的红细胞室温共同孵育2 h, 然后再进行巨噬细胞黏附红细胞实验。

### 1.8 数据统计

用SPSS 11.5软件对所得数据进行统计学分析, 统计指标均以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。组间比较采用两个样本均值的 $t$ 检验。\* $P$ <0.05有显著性差异, \*\* $P$ <0.01有极显著性差异。

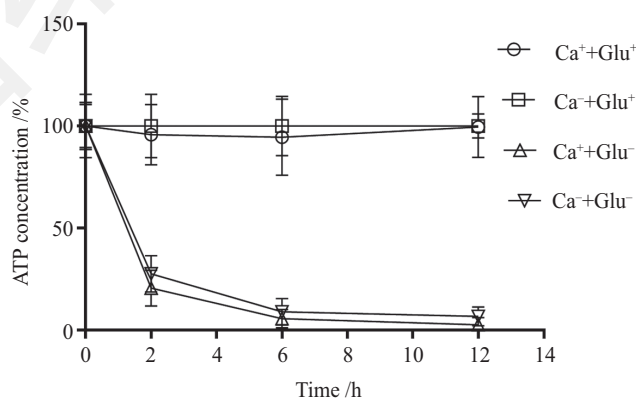
## 2 结果

### 2.1 胞内ATP含量

在有、无胞外钙离子孵育的能量耗竭溶液中, 分别在孵育0 h、2 h、6 h、12 h时取待测细胞进行ATP含量检测, 结果如图1所示(设定各组分的初使ATP浓度为100%): 在有胞外葡萄糖存在的情况下, 有、无胞外钙离子的孵育, 在不同的时间点, 红细胞胞内ATP含量均不变。在没有胞外葡萄糖的孵育, 同时伴随能量耗竭液的孵育, 及有、无胞外钙离子的条件下, 红细胞胞内ATP含量在孵育2 h后显著减少, 并在6 h后ATP基本耗尽。

### 2.2 红细胞锚蛋白外翻

孵育6 h后, 在有、无胞外钙离子及无胞外葡萄



红细胞孵育在不同的条件下, 含有钙离子和葡萄糖(Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>+</sup>)、含有钙离子和不含葡萄糖(Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>-</sup>)、不含钙离子和葡萄糖(Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>-</sup>)、不含钙离子和含有葡萄糖(Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>+</sup>), 孵育不同时间(0 h、2 h、6 h、12 h)后胞内ATP水平。

Erythrocytes were incubated in different conditions (containing calcium and/or glucose, without calcium or glucose) for 0 h, 2 h, 6 h and 12 h, respectively.

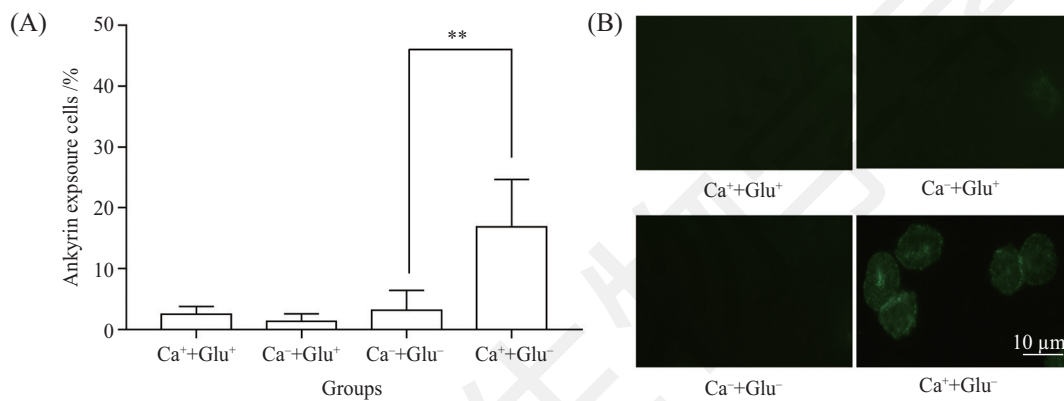
图1 胞内ATP水平

Fig.1 The level of intracellular ATP

糖的情况下, 红细胞胞内ATP基本耗尽, 且在孵育更长的时间后(超过12 h), 红细胞开始溶血。因此, 在研究中, 我们分别选取孵育红细胞6 h, 对其进行锚蛋白外翻检测。结果表明, 在存在胞外钙离子及无胞外葡萄糖的情况下, 红细胞的能量耗竭诱导红细胞锚蛋白外翻(图2A)。进一步在孵育6 h后, 对不同处理组的细胞进行锚蛋白外翻的免疫荧光检测, 结果显示, 在能量耗竭并伴随胞外钙离子孵育的情况下, 能够检测到红细胞锚蛋白外翻的信号(图2B)。

### 2.3 胞内钙离子水平的变化及PKC的激活

孵育6 h后, 在胞外钙离子及无胞外葡萄糖的能量耗竭溶液孵育的条件下, 红细胞胞内钙离子水平明显增加, 然而并不是所有的红细胞都能检测胞外钙离子的信号(图3A)。在钙离子水平检测的阳性对照中, 对胞外钙离子和葡萄糖共同孵育组进行钙离子载体A23187的孵育, 结果表明, 其诱导几乎所有红细胞呈现胞内钙离子水平的增加。红细胞存在蛋白激酶表达系统, 位于胞质间的PKC, 在PMA、能量耗竭等情况下被激活, 从而转移到

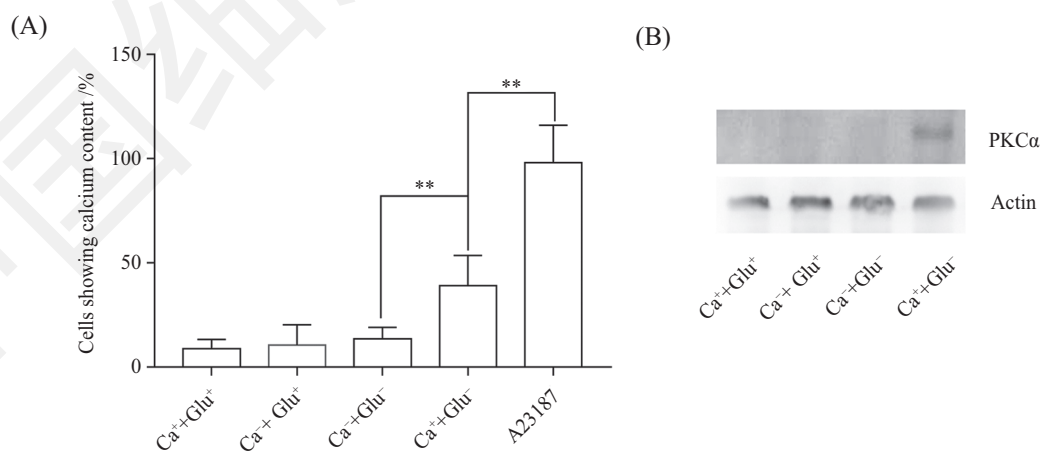


A: 红细胞孵育在不同的条件下, 含有钙离子和葡萄糖(Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>+</sup>)、含有钙离子和不含葡萄糖(Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>-</sup>)、不含钙离子和葡萄糖(Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>-</sup>)、不含钙离子和含有葡萄糖(Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>+</sup>), 孵育6 h后锚蛋白外翻的红细胞占总红细胞数的比例; B: 锚蛋白外翻红细胞的免疫印迹。

A: erythrocytes were incubated in different conditions (containing calcium and/or glucose, without calcium or glucose) for 6 h, respectively, and energy exhaustion induced ankyrin exposure in a subpopulation of erythrocytes; B: fluorescent micrographs for ankyrin exposure of erythrocytes.

图2 能量耗竭诱导红细胞锚蛋白外翻

Fig.2 Energy exhaustion induced ankyrin exposure of erythrocytes



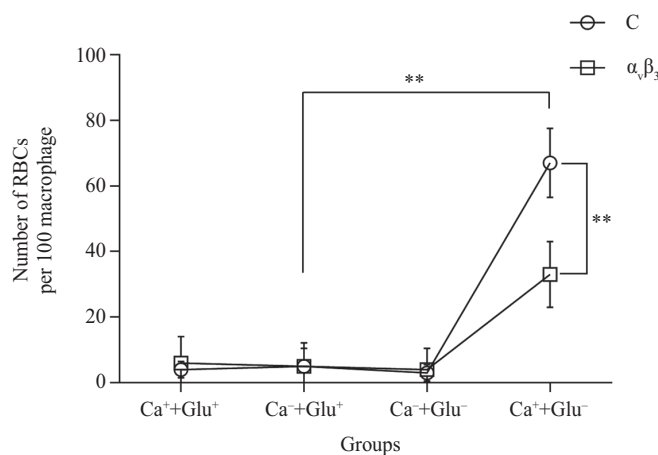
A: 红细胞孵育在不同的条件下, 含有钙离子和葡萄糖(Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>+</sup>)、含有钙离子和不含葡萄糖(Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>-</sup>)、不含钙离子和葡萄糖Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>-</sup>、不含钙离子和含有葡萄糖(Ca<sup>-</sup>+Glu<sup>+</sup>), 孵育6 h后含有钙离子的红细胞占总红细胞数的比例; B: 不同条件下红细胞膜上PKCα的蛋白水平。

A: percentage of erythrocytes showed intracellular calcium content in different conditions (containing calcium and/or glucose, without calcium or glucose) for 6 h, respectively; B: PKC activation was induced by energy exhaustion in different conditions (containing calcium and/or glucose, without calcium or glucose) for 6 h, respectively.

图3 能量耗竭对胞内钙离子水平和PKC激活的影响

Fig.3 Effects of energy exhaustion on the intracellular calcium levels and PKC activation





巨噬细胞对不同处理组红细胞的黏附, 以及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 对黏附的抑制。 \*\* $P<0.01$ 。

Erythrocytes adhered to macrophages in different groups, and the adhesion was inhibited by  $\alpha_v\beta_3$  integrin. \*\* $P<0.01$ .

图4 巨噬细胞对红细胞的黏附

Fig.4 Erythrocytes adhesion to macrophages

细胞膜上<sup>[21]</sup>。对不同处理组红细胞膜的Western blot检测结果表明, 仅在能量耗竭并伴随胞外钙离子孵育的情况下, 能够激活红细胞胞内的PKC。这暗示能量耗竭诱导红细胞锚蛋白外翻与胞内离子的孵育, 及胞内PKC的激活有关。

#### 2.4 巨噬细胞噬红细胞作用

在处理6 h后, 不同处理组的红细胞与巨噬细胞的黏附实验结果表明, 仅在能量耗竭并伴随胞外钙离子孵育的情况下, 红细胞能够被巨噬细胞黏附。在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 介导的巨噬细胞噬红细胞作用的抑制实验中, 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 明显抑制了巨噬细胞对红细胞的黏附(图4)。这暗示, 能量耗竭并伴随胞外钙离子孵育能够诱导红细胞锚蛋白外翻的巨噬细胞噬红细胞作用。然而整合素并没有完全抑制巨噬细胞的锚蛋白外翻红细胞的黏附。

### 3 讨论

异常及老化红细胞的清除是维持机体正常生命活动的基础, 红细胞的过早清除及凋亡不足均与多种疾病的发生有关系。如红细胞膜蛋白异常诱导的红细胞过早清除的阿尔茨海默症、down症、血红蛋白疾病; 骨髓红系祖细胞凋亡障碍诱发的高原红细胞增多症<sup>[6]</sup>。红细胞缺乏线粒体和细胞核这两个对细胞凋亡重要的细胞器, 红细胞的清除主要通过巨噬细胞对其表面受体的识别来实现。包括红细胞磷脂酰丝氨酸外翻诱导的巨噬细胞表面的磷脂酰丝氨酸受体(PSR)的识别<sup>[23]</sup>, 及红细胞带3蛋白交联形

成的带3蛋白与其IgG的复合体诱导的巨噬细胞表面的CR1或FC受体的识别<sup>[24]</sup>。近年来, 也有研究表明, 红细胞锚蛋白外翻能够诱导巨噬细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的识别、吞噬<sup>[1]</sup>。红细胞程序性死亡与其能量代谢异常紧密相关。能量耗竭能够诱导红细胞胞内钙离子水平的增加, 从而诱发红细胞磷脂酰丝氨酸外翻的细胞程序性死亡<sup>[21]</sup>。能量耗竭也能够诱导红细胞胞内PKC的激活, 从而与胞内带3蛋白交联有关的磷酸酪氨酸激酶(phosphotyrosine kinase, PTKs)和磷酸酪氨酸酶(phosphotyrosine phosphatase, PTPs)的活性有关<sup>[25-26]</sup>。然而, 能量耗竭在诱导红细胞程序性死亡的关系中其与红细胞锚蛋白外翻的关联还尚未清楚。

红细胞缺乏胞内钙离子的存储系统, 胞内钙离子水平的增加来源于胞外钙离子的孵育。在生理情况下, 由于血流剪切的作用, 红细胞在经历形变的膜骨架重构、重排过程中, 胞外钙离子大量流入红细胞, 然后在红细胞内钙泵ATP酶耗能的作用下, 将胞内钙离子泵出胞外, 从而维持胞内钙离子的动态稳定<sup>[27]</sup>。在能量耗竭及胞外钙离子孵育下明显观察到胞内钙离子水平的增加, 同时锚蛋白的外翻(图1~图3中的Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>+</sup>组)。然而, 并不是所有的红细胞都显现锚蛋白的外翻(16.89±7.8, n=4)。表明能量耗竭诱导红细胞锚蛋白外翻依赖胞内钙离子水平的增加, 然而增加的胞内钙离子水平的红细胞数目明显多于锚蛋白外翻的红细胞数目(图2和图3中的Ca<sup>+</sup>+Glu<sup>-</sup>组), 意味着胞内钙离子水平的增加与红细胞锚蛋白

的外翻并不呈一一对应的关系。因此, 红细胞胞内钙离子水平的增加可能是锚蛋白外翻的必要条件。

红细胞存在蛋白激酶信使表达系统, 激活的PKC由胞浆转移到细胞膜上, 从而诱导红细胞膜蛋白的磷酸化以及红细胞程序性死亡信号的磷脂酰丝氨酸外翻。研究人员发现, 激活的PKC(通过PMA孵育或能量耗竭诱导)均能够诱导红细胞胞内钙离子水平的增加, 继而诱导红细胞程序性死亡<sup>[21]</sup>。我们先前的研究中也发现, PMA诱导PKC的激活与红细胞锚蛋白外翻存在密切的相关关系<sup>[17]</sup>。激活的PKC能够诱导红细胞膜蛋白4.1、红细胞膜蛋白4.9、内收蛋白及锚蛋白的磷酸化, 进一步诱使胞外钙离子的内流和红细胞磷脂酰丝氨酸的外翻<sup>[14,28]</sup>。在本研究中, 仅在能量耗竭并伴随胞外钙离子孵育的情况下, 对锚蛋白外翻的红细胞组进行进一步分析, 检测到其胞内的PKC被激活(图3B)。这表明, 在能量耗竭的情况下, 红细胞胞内PKC的激活与红细胞胞外钙离子的孵育密切相关。在能量耗竭情况下, 对锚蛋白外翻的红细胞组进行进一步分析, 检测到其胞内钙离子水平的增加和胞内PKC的激活。这表明在能量耗竭情况下, 红细胞锚蛋白外翻与胞内钙离子水平的增加且和胞内PKC的激活均有关。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 孵育明显抑制巨噬细胞对能量耗竭和钙离子共同孵育红细胞的黏附(图4), 表明锚蛋白外翻的红细胞能够被巨噬细胞黏附。然而能量耗竭也能诱导红细胞PS外翻, 进而诱使巨噬细胞表面的PS受体分子与磁脂酰-L-丝氨酸的识别, 黏附<sup>[21,23]</sup>。因此整合素并没有完全抑制巨噬细胞的锚蛋白外翻红细胞的黏附。锚蛋白外翻可能是在能量耗竭情况下红细胞被巨噬细胞清除的一个新机制, 可以为研究能量代谢异常红细胞的清除提供潜在的分子基理。

### 参考文献 (References)

- Peng WY, Sung LA. RGD-containing ankyrin externalized onto the cell surface triggers  $\alpha_v\beta_3$  integrin-mediated erythrophagocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; (407): 466-71.
- Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(7): 1183-92.
- Wieder T, Lang PA, Lang KS, Kempe DS, Niemoeller OM, Duranton C, *et al.* Studying mechanisms of eryptosis. *Cytotechnology* 2005; 49(2/3): 117-32.
- Lisa R, Margaretha JA. "Eryptosis: an erythrocyte's suicidal type of cell death." *BioMed Research International* 2018; 2018: 1-10.
- Philpott N. Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp Hematol* 1995; 23(14): 1642-8.
- 孙敏敏, 崔森, 李占全, 杨发满, 冀林华, 柴克霞, 等. 慢性高原病患者骨髓有核红细胞凋亡及Bcl-2表达研究. *中华临床医师杂志(Sun Minmin, Cui Sen, Li Zhanquan, Yang Faman, Ji Linhua, Chai Kexia, et al. Studies on expression of Bcl-2 and apoptosis of hematopoietic cells in chronic mountain sickness. Chin J Clinicians)* 2013; 7(10): 4281-4.
- Seaman C, Wyss S, Piomelli S. The decline in energetic metabolism with aging of the erythrocyte and its relationship to cell death. *Am Journal of Hemato* 2010; 8(1): 31-42.
- Arashiki N, Kimata N, Manno S, Mohandas N, Takakuwa Y. Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry* 2013; 52(34): 5760-9.
- Veale MF, Healey G, Sparrow RL. Longer storage of red blood cells is associated with increased *in vitro* erythrophagocytosis. *Vox Sang* 2014; 106(3): 219-26.
- Lang E, Lang F. Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death. *Biomed Res Int* 2015; 2015(4): 513518.
- Fang Z, Jiang C, Tang J, He M, Lin X, Chen X, *et al.* A comprehensive analysis of membrane and morphology of erythrocytes from patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Struct Biol* 2016; 194(3): 235-43.
- Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, *et al.* Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2003; (10): 249-56.
- Nguyen DB, Wagner-Britz L, Maia S, Steffen P, Wagner C, Kaestner L, *et al.* Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 2011; (28): 847-56.
- Boivin P. Role of the phosphorylation of red blood-cell membrane-proteins. *Biochem J* 1988; (256): 689-95.
- Chien S. Red-cell deformability and its relevance to blood-flow. *Annu Rev Physiol* 1987; (49): 177-92.
- Lu PW, Soong CJ, Tao M. Phosphorylation of ankyrin decreases its affinity for spectrin tetramer. *J Biol Chem* 1985; (260): 4958-64.
- Tang F, Ren Y, Wang R, Lei X, Deng X, Zhao Y, *et al.* Ankyrin exposure induced by activated protein kinase C plays a potential role in erythrophagocytosis. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860(1): 120-8.
- Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, *et al.* Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* 2010; 328(5981): 1031-5.
- Lee G, Abdi K, Jiang Y, Michaely P, Bennett V, Marszalek PE. Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature* 2006; (440): 246-9.
- Hall TG, Bennett V. Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem* 1987; 262(22): 10537-45.
- Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, *et al.* Protein kinase c mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(1): 244-53.
- Jong DK, Larkin SK, Eber S, Franck PFH, Roelofsen B, Kuypers

- FA. Hereditary spherocytosis and elliptocytosis erythrocytes show a normal transbilayer phospholipid distribution. *Blood* 1999; 94: 319-25.
- 23 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; (148): 2207-16.
- 24 Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005; (16): 133-46.
- 25 Zipser Y, Piade A, Barbul A, Korenstein R, Kosower NS.  $Ca^{2+}$  promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3. *Biochem J* 2002; (368): 137-44.
- 26 Ferru E, Giger K, Pantaleo A, Campanella E, Grey J, Ritchie K, *et al.* Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood* 2011; (117): 5998-6006.
- 27 Noji S, Taniguchi S, Kon H. Spin label study of erythrocyte deformability- $Ca^{2+}$ -induced loss of deformability and the effects of stomatocytogenic reagents on the deformability loss in human-erythrocytes in shear-flow. *Biophys J* 1987; (52): 221-7
- 28 de Jong K, Rettig MP, Low PS, Kuypers FA. Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. *Biochemistry* 2001; 41: 12562-7.