

红细胞在钙离子和离子载体 A23187 作用下的流变特性研究*

王淳怡¹⁾ 曾衍钧^{1)**} 文宗曜²⁾ 喀蔚波²⁾ 姚伟娟²⁾ 廖东华¹⁾

(¹⁾北京工业大学生物医学工程中心, 北京 100022; ²⁾北京大学医学部生物物理学系, 北京 100083)

摘要 用新激光衍射法研究了钙离子及离子载体 A23187 对红细胞流变特性的影响. 用不同浓度的钙离子及离子载体 A23187 分别处理红细胞后, 测量其取向指数和小变形指数. 结果表明离子载体 A23187 较细胞外钙离子浓度对红细胞流变特性的影响更大. 而且, 最大取向指数和最大小变形指数随着钙离子及离子载体 A23187 浓度的增加而降低. 离子载体 A23187 浓度增加导致红细胞变形能力明显降低.

关键词 新激光衍射法, 钙离子, 离子载体 A23187, 红细胞变形性

学科分类号 R318.01

在镰刀型贫血红细胞和遗传性球形红细胞中, 还有正常红细胞衰老过程中, 都可以发现红细胞内钙的增多, 细胞形状改变, 膜的流动性也会发生一些变化. 还在严重高血压患者体内发现钙的不正常新陈代谢, 红细胞内自由钙增多, 红细胞液内与钙连结的蛋白质浓度较正常血压的健康人低. 另外, 初期甲状腺功能亢进、阿尔茨海默病等疾病也都与细胞内 Ca^{2+} 有密切的关系^[1,2].

近十几年以来, 研究重点侧重于 Ca^{2+} 对红细胞变形性内因 (如细胞体积与表面积比、细胞内粘度、细胞膜机械特性和膜蛋白) 的影响. Anderson 等^[3]发现, 在加入离子载体 A23187 的同时, 增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 红细胞的体积会减小, 变形能力下降, 并进一步推动盘状红细胞向棘状红细胞转变. Shiga 等^[4]报道, 红细胞内粘度的增加 (血红蛋白浓度的增加) 是 Ca^{2+} 导致红细胞变形能力完全丧失的一个主要原因; 由于在对血影细胞的研究中发现细胞内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 ATP 浓度都可以影响膜组织, 所以, 由于钙的积累而造成膜机械特性的改变也是一个不容忽视的原因. Noji 等^[5]用一种新的电子顺磁共振探针标记法检测 Ca^{2+} 对红细胞变形能力的影响, 认为 Ca^{2+} 导致红细胞变形能力丢失主要是细胞内 K^+ 和水的流出引起细胞内粘度上升 (Gardos 效应) 造成的. Friederichs 等^[6]用 CTA 系统 (the cell transit analyzer) 测量红细胞的平均流变特性与某一个红细胞群中细胞流变特性的分布. 研究发现 Ca^{2+} 浓度的增高将导致细胞内血红蛋白 (Hbm) 含量显著提高, 红细胞变形能力下

降. 不同亚群红细胞中, 血红蛋白含量与流变特性受 Ca^{2+} 浓度的影响显著不同; 离子载体 A23187 处理“年轻”细胞, 细胞硬度没有显著变化, 而“老年”细胞在离子载体 A23187 处理后, 细胞硬度明显增加. 这说明血红蛋白与膜的相互作用是影响细胞变形性的一个重要因素, 它可能与红细胞衰老有关.

为进一步了解钙离子通透性及红细胞形状改变对红细胞微观变形性的影响, 我们使用 Wen 等^[7]提出的新激光衍射法, 比较了分别加入 Ca^{2+} 及离子载体 A23187 两种处理方式对红细胞取向指数和小变形指数的影响, 以此研究离子载体 A23187 在 Ca^{2+} 改变红细胞变形能力中的作用; 发现了细胞外 Ca^{2+} 浓度、离子载体 A23187 浓度对增加细胞内 Ca^{2+} 浓度的不同作用.

1 方 法

1.1 钙离子浓度对红细胞变形性的影响

1.1.1 从大白兔耳缘静脉取 0.3% 肝素抗凝的兔血 3 ml, 离心 (2 000 r/min) 15 min 后, 弃上清液, 再用 PBS 清洗三次, 每次离心 (2 000 r/min) 10 min.

1.1.2 处理后的红细胞取出 900 μl , 平均分成九

* 国家自然科学基金 (10072006) 及北京市自然科学基金 (3982005) 共同资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-67391685, E-mail: yjzeng@bjpu.edu.cn

收稿日期: 2001-02-28, 接受日期: 2001-05-17

份, 分别悬浮于不同浓度的 CaCl_2 缓冲液 (100 mmol/L KCl, 46 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 枸橼酸钠, 10 mmol/L Tris, pH=7.6) 中, 每一份中 CaCl_2 的终浓度分别为: 0 、 0.5×10^3 、 1.25×10^3 、 2.5×10^3 、 5.0×10^3 、 8.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.25×10^4 、 $1.5 \times 10^4 \mu\text{mol/L}$.

1.1.3 将各份血样放置在 37°C 的温箱内孵育 30 min 后取出. 用 PBS 清洗三次 (离心 2 000 r/min, 每次 10 min).

1.1.4 将每一份血样按红细胞浓度为 1.05×10^7 个/ml 分别悬浮于磷酸缓冲液 PBS (NaCl 0.12 mol/L, Na_2HPO_4 0.02 mol/L, KH_2PO_4 0.5×10^{-2} mol/L, 渗透压 290 mOsm/kg, pH=7.4) 中, 每一份待测血样中的牛血清白蛋白终浓度为 0.04 g/L.

1.1.5 用新型激光衍射法, 测量切变率从 0~

300 s^{-1} 范围内每一份血样的取向指数 $(DI)_{\text{or}}$ 和小变形指数 $(DI)_{\text{d}}$ 值. 分别取 $(DI)_{\text{or}}$ 、 $(DI)_{\text{d}}$ 的最大值, 每个值测 5 次, 取平均值并计算方差.

1.2 离子载体 A23187 浓度对红细胞变形性的影响

除与 1.1 中所使用的方法 1.1.1, 1.1.3 和 1.1.5 相同外, 与 1.1.2 不同的是:

将处理后的血细胞, 取出 600 μl , 平均分成 6 份, 分别悬浮于含有不同浓度钙离子载体 A23187 的 PBS 缓冲液中, 每一份缓冲液中 A23187 的终浓度分别为: 0 、 0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0 、 $2.5 \mu\text{mol/L}$.

2 结 果

2.1 钙离子浓度对红细胞变形性的影响

用不同浓度的钙离子处理红细胞后, 测出红细胞最大取向指数 $(DI)_{\text{or, max}}$ 和最大小变形指数 $(DI)_{\text{d, max}}$ 的结果见表 1.

Table 1 The values of maximum orientation index $(DI)_{\text{or, max}}$ and maximum small deformation index $(DI)_{\text{d, max}}$ were measured after RBCs treated with different concentration of Ca^{2+}

	$c(\text{CaCl}_2) / 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$								
	0	0.5	1.25	2.5	5.0	8.0	10.0	12.5	15.0
$(DI)_{\text{or, max}} / \%$	38.10 ± 0.85	36.30 ± 0.75	34.50 ± 1.40	30.90 ± 0.71	32.80 ± 0.84	33.60 ± 0.40	$31.20 \pm 1.15^{1)}$	$30.30 \pm 0.20^{1)}$	$31.70 \pm 0.25^{1)}$
$(DI)_{\text{d, max}} / \%$	4.48 ± 0.18	4.29 ± 0.18	4.11 ± 0.61	3.48 ± 0.22	4.34 ± 0.06	3.97 ± 0.12	4.01 ± 0.11	4.01 ± 0.23	4.31 ± 0.13

¹⁾ $P < 0.05$.

对不同浓度 Ca^{2+} 处理后红细胞的 $(DI)_{\text{or, max}}$ 和 $(DI)_{\text{d, max}}$ 值用统计软件 SPSS 作 t 检验, Ca^{2+} 浓度大于 $1 \times 10^4 \mu\text{mol/L}$ 的各实验组 $(DI)_{\text{or, max}}$ 值与对照组相比有统计意义 ($P < 0.05$), 不同浓度 Ca^{2+} 处理后红细胞的 $(DI)_{\text{d, max}}$ 值与对照组相比没

有统计意义 ($P > 0.05$).

2.2 离子载体 A23187 浓度对红细胞变形性的影响

用不同浓度的离子载体 A23187 处理红细胞后, 测得的红细胞最大取向指数 $(DI)_{\text{or, max}}$ 和最大小变形指数 $(DI)_{\text{d, max}}$ 如表 2 所示.

Table 2 The values of maximum orientation index $(DI)_{\text{or, max}}$ and maximum small deformation index $(DI)_{\text{d, max}}$ were measured after RBCs treated with different concentration of ionophore A23187

	$c(\text{A23187}) / 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
$(DI)_{\text{or, max}} / \%$	37.97 ± 0.42	$33.27 \pm 0.33^{1)}$	$25.88 \pm 0.87^{1)}$	$25.81 \pm 0.87^{1)}$	$26.23 \pm 1.20^{1)}$	$27.29 \pm 1.22^{1)}$
$(DI)_{\text{d, max}} / \%$	5.88 ± 0.18	$5.44 \pm 0.05^{2)}$	$4.49 \pm 0.12^{1)}$	$4.52 \pm 0.21^{1)}$	$3.94 \pm 0.25^{1)}$	$3.76 \pm 0.05^{1)}$

¹⁾ $P < 0.01$; ²⁾ $P < 0.05$.

对不同浓度离子载体 A23187 处理后红细胞的 $(DI)_{\text{or, max}}$ 和 $(DI)_{\text{d, max}}$ 值用统计软件 SPSS 作 t 检验, 加入离子载体 A23187 的各实验组与对照组相比 $(DI)_{\text{or, max}}$ 值有显著性差异 ($P < 0.01$); 离子载

体 A23187 浓度大于 $1 \mu\text{mol/L}$ 的各实验组 $(DI)_{\text{d, max}}$ 值与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$). A23187 浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 的实验组 $(DI)_{\text{d, max}}$ 值与对照组相比有统计意义 ($P < 0.05$).

3 讨 论

细胞膜中央存在一个疏水区, Ca^{2+} 很难通过, 以维持细胞内外 Ca^{2+} 的浓度差. 因而 Ca^{2+} 在通过细胞膜时, 要靠特定的载体来转运. 这样的载体分为通道载体和离子载体两部分. 其中离子载体的功能在于选择性地与 Ca^{2+} 形成外部亲脂的配合物或复合物, 并把它们从膜的一侧转移到另一侧, 在这一过程中并不改变膜的性质, 离子载体 A23187 是链状离子载体, 与 Ca^{2+} 配位后形成外部亲脂的配合物 Ca^{2+} -A23187, 它是 1:2 配合物, 两个 A23187 分子相互首尾相连. Ca^{2+} 的运送是靠载体配合物在膜内运动实现的^[8].

正常红细胞内 Ca^{2+} 维持在一个较低的浓度 (0.1~1.0 $\mu\text{mol/L}$), 当由于某种原因使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高后, 将发生一系列复杂的生化反应, 其中包括与钙联结的钙调蛋白激活钙泵、膜脂的新陈代谢和组成的改变、细胞内 K^+ 和水的流失等等^[5].

通过对以上两个实验的数据进行分析, 我们得到以下结果.

3.1 A23187 增加胞内 Ca^{2+} 浓度而影响细胞流变特性

单独增加红细胞外 Ca^{2+} 浓度或离子载体 A23187 的浓度, 都可以改变红细胞的流变特性. 随着红细胞外 Ca^{2+} 浓度从 0 增加到 $1.25 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$, 取向指数 $(DI)_{\text{or, max}}$ 相应减少了 20% (表 1). 从表 2 可以看到, 随着加入的离子载体 A23187 浓度从 0 增加到 1 $\mu\text{mol/L}$, 红细胞取向指数 $(DI)_{\text{or, max}}$ 同样呈迅速下降趋势; 当 A23187 浓度大于 1 $\mu\text{mol/L}$ 后, 取向指数 $(DI)_{\text{or, max}}$ 基本上不随 A23187 浓度变化. 当 A23187 浓度等于 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 取向指数比 A23187 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时减少了 35%.

从 Ca^{2+} 和离子载体 A23187 分别作用于红细胞的实验结果可以看出, 只增加红细胞外 Ca^{2+} 浓度或只增大红细胞外离子载体 A23187 的浓度, 都使红细胞最大取向指数 $(DI)_{\text{or, max}}$ 降低, 这表明 Ca^{2+} 和离子载体 A23187 均可以降低红细胞变形性. 但从表 1 与表 2 的比较可以看出, 离子载体 A23187 对红细胞变形能力的影响大于 Ca^{2+} 的影响. 这是由于只增加红细胞外 Ca^{2+} 浓度, 细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性没有明显的变化, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高的程度有限; 而离子载体 A23187 的

作用是增加 Ca^{2+} 通过细胞膜的能力, 提高细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性, 细胞外高浓度的 Ca^{2+} 借助于离子载体 A23187 进入红细胞内. 因此增加红细胞外离子载体 A23187 的浓度更有利于细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, 进而降低红细胞的变形能力.

新激光衍射法是在低粘切变流场中, 将传统激光衍射法的红细胞变形指数 DI 分为反映红细胞形状的取向指数 $(DI)_{\text{or}}$ 和反映红细胞膜性质的小变形指数 $(DI)_{\text{d}}$ 两部分. 它具有比传统激光衍射法更高的灵敏度. Wen 等^[9] 用不同浓度的小麦胚凝集素 (WGA) 或伴刀豆球蛋白 A (ConA) 及唾液酸酶作用于红细胞膜蛋白或膜质受体以研究微观红细胞变形性的变化, 将新激光衍射法的测量结果与电子自旋共振法和荧光偏振法的测量结果比较后得出: 红细胞的生理状态越好, 取向指数 $(DI)_{\text{or}}$ 越高; 低粘切变流场中的小变形指数 $(DI)_{\text{d}}$ 主要反映红细胞膜流动性的改变, 它与红细胞表面电荷的多少无明显关系. 我们的实验结果表明, 只增加红细胞外 Ca^{2+} 浓度, $(DI)_{\text{d, max}}$ 没有明显改变; 而增加离子载体 A23187 浓度时, $(DI)_{\text{d, max}}$ 明显降低. A23187 浓度等于 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, $(DI)_{\text{d, max}}$ 下降程度最大, 下降了约 30% (表 2). 由于低粘切变流场中的小变形指数 $(DI)_{\text{d, max}}$ 反映了红细胞膜的流动性^[9], 故上述事实表明只增加细胞外 Ca^{2+} 浓度对红细胞膜的流动性无明显影响, 加入离子载体 A23187 后才能改变红细胞膜的流动性, 即在由细胞内 Ca^{2+} 浓度增加而影响红细胞膜流动性的现象中, A23187 浓度起着重要的作用.

3.2 Ca^{2+} 浓度增加改变细胞流变特性的原因

在离子载体 A23187 的作用下, 由于红细胞在恢复血浆的环境中孵育, 在 30 min 孵育过程中, 细胞外环境类似于生理条件下的 ATP 浓度和 K^+ 浓度, 有利于防止由于 ATP 含量降低引起细胞变成棘状而导致红细胞变形性下降. 我们通过显微镜观察细胞形态, 没有发现棘状红细胞出现. 实验结果证明, 随离子载体 A23187 浓度增加或孵育时间增长, $(DI)_{\text{or, max}}$ 和 $(DI)_{\text{d, max}}$ 都减小, 即随离子载体 A23187 孵育时间和浓度的增加, 细胞变形能力下降, 膜的流动性下降. 这说明离子载体 A23187 浓度在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 以内时, 形态改变不是红细胞变形性下降的主要原因.

因此细胞内 Ca^{2+} 浓度增加引起细胞内 K^+ 和水分大量流出, 从而导致细胞内粘度升高是引起红细胞变形性下降的主要原因之一^[10]. 另外, 用离子

载体 A23187 处理红细胞后, Ca^{2+} 浓度升高引起细胞膜上发生的改变, 例如粘附在细胞膜上的血红蛋白增多, 并导致膜硬度增大, 可能是影响细胞的流变特性的因素之一. 即由于钙的积累而造成膜上大分子的相互作用的改变也是一个不容忽视的原因^[11].

参 考 文 献

- 1 Lew V, Hockaday A, Sepulveda M-I, *et al.* Compartmentalization of sickle cell calcium in endocytic inside out vesicles. *Nature*, 1985, **315** (13): 586~ 589
- 2 Soldati L, Spaventa R, Vezzoli G, *et al.* Characterization of voltage-dependent calcium influx in human erythrocytes by fura-2. *Biochem Biophys Res Commu*, 1997, **236** (3): 549~ 554
- 3 Anderson R, Lovrien R. Erythrocyte membrane sidedness in lectin control of the Ca^{2+} -A23187-mediated diskocyte \rightleftharpoons echinocyte conversion. *Nature*, 1981, **292** (9): 158~ 161
- 4 Shiga T, Sekiya M, Maeda N, *et al.* Cell age dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1985, **814** (2): 289~ 299
- 5 Noji S, Taniguchi S, Kon H. Spin label study of erythrocyte deformability: Ca^{2+} -induced deformability and the effects of stomatocytogenic reagents on the deformability loss in human erythrocytes in shear flow. *Biophys J Biophys Soci*, 1987, **52** (2): 221~ 227
- 6 Friederichs E, Farley R, Meiselman H. Influence of calcium permeabilization and membrane-attached hemoglobin on erythrocyte deformability. *American Hematology*, 1992, **41** (3): 170~ 177
- 7 Wen Z Y, Ma W Y, Gao T, *et al.* Effect of suspending medium viscosity on orientation and deformation of RBCs in a shear flow field. *Clinical Hemorheology*, 1995, **15** (4): 619~ 625
- 8 Garcia-Sancho J, Lew V. Detection and separation of human red cells with different calcium contents following uniform calcium permeabilization. *Physiology*, 1988, **407** (12): 505~ 522
- 9 Wen Z Y, Yan Z Y, Gao T, *et al.* A study of effects of WGA and ConA on RBC membrane receptors using a new ektacytometric method. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1997, **17** (6): 467~ 478
- 10 Shields M, Celle P, Waugh R, *et al.* Effects of intracellular Ca^{2+} and proteolytic digestion of the membrane skeleton on the mechanical properties of the red blood cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **905** (1): 181~ 194
- 11 翁维良, 廖福龙, 吴云鹏, 等. 血液流变学研究方法及其应用. 北京: 科学出版社, 1989. 96~ 99
Weng W L, Liao F L, Wu Y P, *et al.* Research Method and Application in Hemorheology. Beijing: Science Press, 1989. 96~ 99

Rheology Characteristics of Erythrocytes Under the Influence of Calcium Ions and Ionophore A23187*

WANG Chun-Yi¹⁾, ZENG Yan-Jun^{1)**}, WEN Zong-Yao²⁾, KA Wei-Bo²⁾,
YAO Wei-Juan²⁾, LIAO Dong-Hua¹⁾

¹⁾Biomedical Center of Beijing Polytechny University, Beijing 100022, China;

²⁾Biophysics Department, Medical School of Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract In order to study effect of extracellular Ca^{2+} and ionophore A23187 on erythrocyte deformation, the new ektacytometry is used. After erythrocytes were treated with different concentrations of intercellular Ca^{2+} and ionophore A23187 respectively, the orientation index $(DI)_{or}$ and small deformation index $(DI)_d$ of the erythrocytes were measured. It is suggested that the effect of ionophore A23187 on the rheology of erythrocytes is more notable than that of intercellular Ca^{2+} . Furthermore, the $(DI)_{or, \max}$ and $(DI)_{d, \max}$ decrease as the concentration of intercellular Ca^{2+} or ionophore A23187 is increased. The deformability of erythrocytes was obviously reduced after treated with ionophore A23187.

Key words new ektacytometry, calcium ions, ionophore A23187, erythrocyte deformation

* This work is supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (10072006) and Beijing Natural Sciences Foundation (3982005).

** Corresponding author. Tel: 86-10-67391685, E-mail: yjzeng@bjpu.edu.cn

Received: February 28, 2001 Accepted: May 17, 2001