

## 大分子吸附对低粘切变流场中红细胞取向的影响

文宗曜 陶祖莱\* 孙大公

(北京医科大学物理教研室 100083)

李田勋

(山东潍坊医学院物理教研室 261042)

### 摘要

采用一种在低粘切变流场中,将红细胞变形指数  $DI$  分解为转向指数  $(DI)_{or}$  与小变形指数  $(DI)_d$  的新型激光衍射法,比较了用不同分子量右旋糖酐或 PVP(分子量 4 万)处理的红细胞与正常对照组红细胞的  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  曲线,发现上述两类曲线间存在明显差异。这一事实表明,这种新型激光衍射法有助于分子水平的微观流变学的研究。

关键词: 激光衍射法 RBC 变形 取向指数

### 引言

1990 年本文作者等<sup>[1]</sup>曾经提出用廉价低粘度 PBS 缓冲悬浮介质代替昂贵的高粘悬浮介质的激光衍射法,实际上,也就是利用红细胞在低切应力流场中  $C=O$  轨道上的取向与小变形信息来研究红细胞的微观流变特性。1991 年本文作者等<sup>[2]</sup>,根据红细胞在低粘切变流动中的动力学行为的研究指出,用激光衍射仪测量红细胞在 PBS 和右旋糖酐(或 PVP)两种悬浮介质中应力松弛过程中,红细胞在低粘悬浮介质中的动力学行为与它在高粘悬浮介质(如右旋糖酐)中的动力学行为有显著差异,除了变形外,还有一个从沿  $C=O$  轨道取向到随机取向的变化过程。红细胞在松弛过程中的变形指数  $DI$  随时间的变化是由红细胞的变形指数  $(DI)_d$  和取向指数  $(DI)_{or}$  两部分构成,即  $DI=(DI)_d+(DI)_{or}$ ,而且变形特征时间(约为 20ms)比取向过程特征时间(约几十秒)小 2-3 个数量级,这就使得我们有可能从测得的  $DI-t$  动态曲线中,通过微机处理,将  $(DI)_d$  与  $(DI)_{or}$  随切变率变化的曲线分别测量出来,从而获得更多的微观流变学信息。采用我们提出的新型激光衍射法与国外研究红细胞在切变流动中的变形、取向的 EPR (Electron Paramagnetic Resonance) 法相比<sup>[3,4]</sup>,前者经济实用,方便快捷,可反映红细胞膜分子水平变化引起的流变学量的变化,为微观流变学研究的一种有力手段。

本文作者用分离变形与取向的激光衍射法研究红细胞的流变特性表明,红细胞的变形性与形态皆明显影响红细胞的取向指数  $(DI)_{or}$ ,这一事实提示了我们红细胞膜发生细微变化(生化的或生物物理变化)时,可能用它在低粘切变流场中取向信息  $(DI)_{or}$  来定量描述。

在大分子缓冲液悬浮介质中(右旋糖酐、PVP)静置一定时间(30min)的红细胞,由于红细胞膜与大分子之间的范德瓦尔斯力,使这些大分子吸附于红细胞表面。本文主要考查这种非生化作用引起的红细胞微观流变特性的变化。实验结果表明,吸附于红细胞膜上的大分子明显影响红细胞的取向指数  $(DI)_{or}$ ,用相同分子量的不同物质的大分子(右旋糖酐, PVP)处理的红细胞的  $(DI)_{or}$  明显不同;用相同物质(右旋糖酐)不同分子量的大分子处理的红细胞的

\* 中国科学院力学研究所 100080.

$(DI)_{or}$  亦各不相同,而这种微观流变特性的改变是难以用传统的激光衍射法来测量的。用生化方法引起的红细胞膜微观结构变化所反映的  $(DI)_{or}$  的变化的定量研究,将另有专文讨论。

## 材料与方法

1. 取新鲜肝素抗凝兔静脉血约 10ml,用 PBS 缓冲液清洗二次后,将离心分离的红细胞按下列方法配制血样。

2. 将红细胞各 200 $\mu$ l 分别放入浓度为 15% 各 1 毫升的 PVP,右旋糖酐 Dex 40(分子量 4 万),Dex200, Dex500 等四种大分子缓冲液中,在 24 $^{\circ}$ C 下静置 30 分钟后,离心分离,以 PBS 为悬浮介质,用我们提出的分离取向指数  $(DI)_{or}$  与变形指数  $(DI)_d$  的激光衍射法,分别测量上述各血样和对照血样的  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  (切变率),  $(DI)_d-\dot{\gamma}$  曲线。

3. 将红细胞各 200 $\mu$ l 分别放入浓度 15%, 7.5%, 1.5% 的各 1ml 的 Dex 500 缓冲悬浮介质中,在 24 $^{\circ}$ C 下静置 30 分钟后,将离心分离的红细胞以 PBS 为悬浮介质。分别测定上述各血样,及对照血样的  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  及  $(DI)_d-\dot{\gamma}$  曲线。

4. 将红细胞各 200 $\mu$ l 分别置于 15% 的 1 毫升 Dex40, Dex200, Dex500 缓冲液中,在 24 $^{\circ}$ C 下静置 30 分钟,离心分离出红细胞后,再以 15% Dex40 缓冲液为悬浮介质,用传统的激光衍射法测量上述各血样及对照血样的  $DI$ (变形指数)  $-\dot{\gamma}$  曲线。

### 5. 变换处理悬浮介质实验

(1) 将各 200 $\mu$ l 血红细胞分别放入 15% 的一毫升右旋糖酐 Dex40(分子量 4 万)与 Dex500 中,在 24 $^{\circ}$ C 下,静置 30 分钟后,分别测定上述血样及对照血样的  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  曲线。

(2) 将上述血样用 PBS 清洗三次后,再交换处理悬浮介质,即原来用 Dex40 处理的改为用 Dex500 处理,而 Dex500 处理的改用 Dex40 处理,在 24 $^{\circ}$ C 下,静置 30 分钟后,分别测定上述血样及对照血样的  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  曲线。

6. 摄制用右旋糖酐 Dex500 处理的及对照红细胞的扫描电子显微镜照片。

## 结 果

1. 对于方法“2”中各血样测得的结果,如表 1 与图 1 所示。由此不难看出,相同分子量的 PVP 与右旋糖酐 Dex40 处理的红细胞的取向  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  曲线明显不同, PVP 的最大取向指数小于同分子量右旋糖酐的最大取向指数,同样右旋糖酐,不同分子量的 Dex40, Dex200, Dex500 的  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  曲线,也各不相同,与对照血样相比,分子量越大的右旋糖酐处理的红细胞的取向指数越小。但所有血样的  $(DI)_d-\dot{\gamma}$  曲线的差异却并不明显。

**Table 1** Maximum orientation index and deformation index for RBCs treated with dextrans of different molecular weights and PVP in shear flow field of PBS suspending medium.

(maximum)	control	PVP	Dx40	Dx200	Dx500
$(DI)_{or}$	30.7 $\pm$ 0.3	18.7 $\pm$ 0.4	26.6 $\pm$ 0.4	14.4 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.2
$(DI)_d$	6.5 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 3

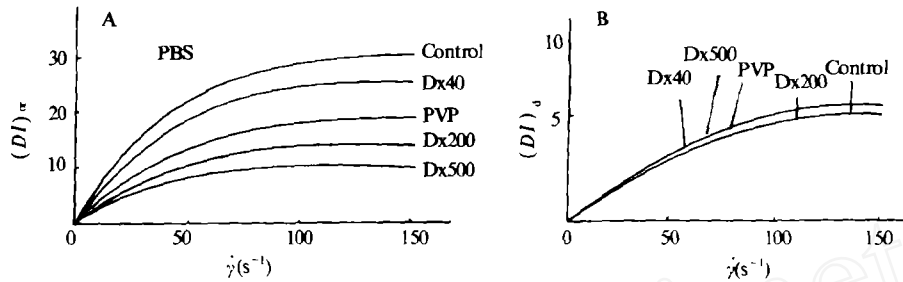


Fig.1  $(DI)_{\alpha} - \dot{\gamma}$  curves (A) and  $(DI)_{\beta} - \dot{\gamma}$  (B) measured with a new Ektacytometry for RBCs treated with dextran of different molecular weights.

2. 在第“3”实验中,不同浓度的 Dex500 处理的血样所测得的结果,如表 2 与图 2 所示,由此看出,同一大分子物质处理红细胞所测得的取向指数与其处理物质的浓度有关,浓度越大,相同切变率下的取向指数  $(DI)_{\alpha}$  越小,而变形指数  $(DI)_{\beta}$  却无明显差异。

Table 2 Maximum orientation index and deformation index for RBCs treated with Dx500 of different concentrations in shear flow of RBS suspending medium.

(maximum)	control	15%	7.5%	1.5%
$(DI)_{\alpha}$	$33.4 \pm 0.3$	$17.3 \pm 0.3$	$26.1 \pm 0.4$	$29.8 \pm 0.3$
$(DI)_{\beta}$	$7.5 \pm 0.2$	$6.5 \pm 0.2$	$6.9 \pm 0.3$	$7.2 \pm 0.3$

3. 在第“4”种实验中,不同分子量的 15% 的右旋糖酐,及对照血样,以 Dex40 为激光衍射仪的悬浮介质的传统激光衍射法所测得的  $DI - \dot{\gamma}$  曲线和最大变形指数如图、表 3 所示。由此可见,不同分子量的右旋糖酐处理的红细胞的变形性并无明显改变。

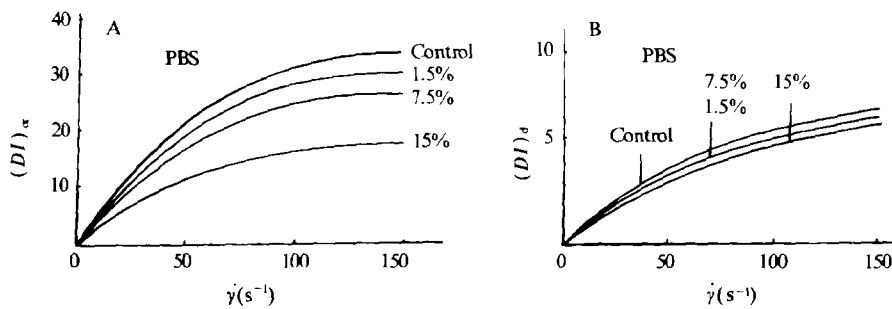


Fig.2  $(DI)_{\alpha} - \dot{\gamma}$  curves (A) and  $(DI)_{\beta} - \dot{\gamma}$  curves (B) measured with a new Ektacytometry for RBCs treated with Dx500 of different concentrations.

Table 3 Maximum deformation index  $DI$  for RBCs treated with dextrans of different molecular weights by means of traditional Ektacytometry (15% Dx40 suspending medium)

(maximum)	control	Dx40	Dx200	Dx500
$DI$	$46.2 \pm 0.3$	$45.9 \pm 0.4$	$44.5 \pm 0.6$	$43.6 \pm 0.5$

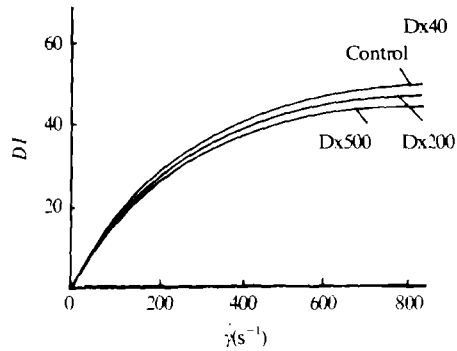


Fig.3  $DI-\dot{\gamma}$  curves for RBCs treated with dextrans of different molecular weights with traditional Ektacytometry (15% Dx40 suspending medium).

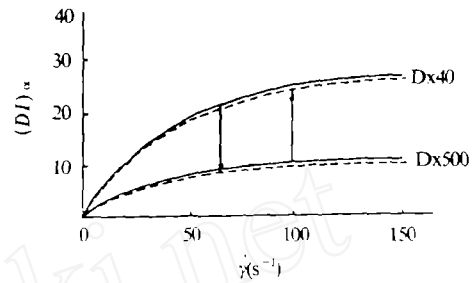


Fig.4  $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$  curves obtained by changing the molecular weight of Dextran of suspending media from Dx40 to Dx500 and vice versa.

4. 图4给出了交换处理悬浮介质的血样,用PBS作为悬浮介质所测得的 $(DI)_{or}-\dot{\gamma}$ 曲线,由图可见,悬浮介质本身对红细胞膜未产生性质上的变化,交换悬浮介质处理后的红细胞其流变特性无明显差异,仍是较低分子量右旋糖酐处理的红细胞比高分子量右旋糖酐处理的红细胞的取向指数 $(DI)_{or}$ 大,而不因交换处理悬浮介质而发生改变。

5. 图5给出了未经右旋糖酐处理的对照血样(A)及用右旋糖酐Dex500处理后的血样(B)所获得的扫描电镜图片。由此图可见,高分子量的右旋糖酐,通过桥连作用使红细胞形成缢钱状体,不难推测,当解聚时,在两红细胞表面仍吸附了大量的右旋糖酐的大分子。

## 讨 论

1. 用电子自旋标记法(EPR)<sup>[3,4]</sup>可以研究红细胞在切变流场中的取向、变形,但这种方法相当复杂昂贵,难以在临床上推广应用,我们提出的用低粘度悬浮介质,将红细胞在切变流场中的 $C=0$ 轨道取向与小变形信息分开的激光衍射法,使我们有可能用较为经济与简便的方法实现上述目的。由于低粘度的缓冲悬浮介质较高粘悬浮介质更接近生理条件,而且所测得的取向信息对红细胞膜的细微变化十分敏感,使得有可能用于研究由于某种生化或生物物理原因引起的红细胞膜的细微变化。基于这一想法,我们研究了不同分子量的右旋糖酐以及相同分子量(4万)的PVP,通过范德瓦尔斯力吸附于红细胞膜表面所引起的红细胞微观流变特性的变化。

通过研究不同分子量的右旋糖酐处理的红细胞发现,聚合物分子量越大,桥连作用越强,如图5中,用15%Dex500处理的红细胞的扫描电镜照片指出的那样,由于大分子桥连作用形成了红细胞的缢钱状聚集体<sup>[5]</sup>。用这种处理血样测量红细胞在流场中的取向信息时,由于这些血样在PBS低粘切变流场中,可能保留部分未解聚的红细胞缢钱状体,以及解聚后的红细胞表面仍吸附了大量的右旋糖酐分子,其红细胞在切变流场中取向较难,因而取向指数 $(DI)_{or}$ 越小,而15%Dex40低分子量右旋糖酐处理的红细胞,虽然无红细胞聚集,但大量右旋糖酐分子吸附于红细胞表面,也明显阻碍了红细胞在切变流场中取向,因而取向指数比对照组小,比Dex200、Dex500处理组大。至于相同分子量的PVP与Dex40处理的血样,所测得的 $(DI)_{or}$ 的

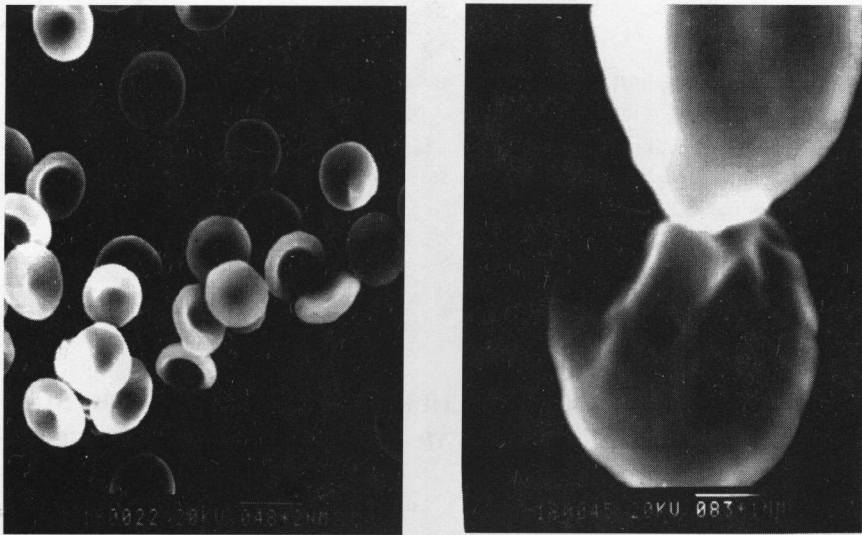


Fig.5 Photographs of scanning electron microscope (A) control RBCs in PBS. (B) RBCs treated with Dx500 buffer.

差异,可能与其分子形状与结构差异而使吸附于红细胞膜表面的分子数不同,造成这两种处理血样在流场所受取向阻碍不同,因而测得的 $(DI)_{or}$ 也明显不同。由此可见,如果测量出两种未知的不同分子量的某种物质(例如, Dex40, Dex500)处理红细胞的取向指数 $(DI)_{or}$ ,则可以由 $(DI)_{or}$ 的差异来判断其分子量的大小差异。

2、Brooks 与 Seaman<sup>[6]</sup>曾用 3H 标记大分子量的右旋糖酐处理的红细胞,实验证明:吸附于红细胞表面的大分子数几乎线性地随右旋糖酐浓度而增加,右旋糖酐浓度越大,吸附于红细胞表面分子数越多,红细胞在切变流场中取向越困难,取向指数越小。这与我们实验所得结果一致。反之,如果测得两种未知浓度的聚合物(如右旋糖酐, Dex500)处理的红细胞的取向指数 $(DI)_{or}$ ,则可由此判断出这两种处理悬浮介质的浓度。

3、图 3、表 3 指出,用不同分子量右旋糖酐处理的红细胞,以 15% Dex40 的缓冲液为激光衍射仪的悬浮介质的传统的激光衍射法,测得的 $DI-\dot{\gamma}$ 曲线,与对照血样测得的曲线相比,并无显著差异,即不同分子量右旋糖酐处理的血样没改变细胞膜的变形性。但是,用我们提出的以低粘度 PBS 缓冲悬浮介质,分离出变形与取向指数的方法,测得它们的 $(DI)_{or}$ 存在明显差异,这一事实证明我们测量方法的优越性。

4、在用不同分子量聚合物(Dex40、Dex500)交换处理血样的实验中,我们将两种不同分子量处理的红细胞,在测得它们的取向指数 $(DI)_{or}$ 后,再用 PBS 清洗三次,去掉吸附于红细胞表面大分子后,再将上述血样交换悬浮介质处理,此时大分子又重新吸附于红细胞膜表面,原来是较小分子量 Dex40 吸附于红细胞膜表面,现在变为较大分子量的 Dex500 吸附于细胞膜表面,因而取向指数 $(DI)_{or}$ 减小,反之亦然。由此可见,交换处理悬浮介质实验表明,这一处理过程,并未引起细胞膜性质的改变。

5、关于用分子生物学方法,使红细胞膜微观结构改变后,研究红细胞的微观流变特性量 $(DI)_{or}$ 、 $(DI)_s$ 的变化,我们将在另外的文章中详细探讨<sup>[7]</sup>

## 参考文献

- 1 文宗曜等: *Clinical Hemorheology*, 1991, 11: 459-464.
- 2 陶祖莱等: *生物物理学报*, 1991, 7: 233-237.
- 3 Sumihare Noji et al.: *Bio phys.* 1984, 46: 349-355.
- 4 Yasunori Fukuhima et al.: *J. Membrane Biol.*, 1988, 104: 265-273.
- 5 Shu Chien et al.: *Microrascular Research*, 5.
- 6 Kung-Ming et al.: *The Journal of General Physiology*, 1973, 61: 638-654.
- 7 文宗曜等: *中国生物医学工程学报*, in press.

**THE INFLUENCE OF MACROMOLECULE ADSORPTION ON RBC SURFACE  
UPON RBC ORIENTATION IN A SHEAR FLOW FIELD OF LOW VISCOSITY**

Wen Zongyao    Tao Zulai\*    Sun Dagong    Li Tianxun\*\*

(*Department of Medical Physics, Beijing Medical University Beijing 100083, P.R. China*)

(\* *Institute of Mechanics, Science Academy of China, Beijing 100083, P.R. China*)

(\*\**Department of Medical physics, Weifang Medical College, Shandong Province, 261042 P.R. China*)

**ABSTRACT**

Using new Ektacytometry, the deformation index of RBCs in a shear flow field of low viscosity were separated into two components, orientation index  $(DI)_{or}$  and small deformation index  $(DI)_d$ . The difference between  $(DI)_{or} - \dot{\gamma}$  curves of RBCs treated with dextrans of different molecular weights or PVP of molecular weight 4000 and  $(DI)_{or} - \dot{\gamma}$  curve of control RBCs is significant ( $p < 0.01$ ). But using traditional Ektacytometry, no obvious difference between these two can be found. These results indicate that the new Ektacytometry is advantageous to microrheology at molecular level.

**Key Words:** RBC    Orientation    Deformation index    Dextran  
PVP    Ektacytometry

本文于1992年12月17日收到。