

PBS作为悬浮介质代替PVP用于红细胞 变形性测量的可能性

文宗曜 陶祖莱* 曹实 赵玉衡 韩振山 王鸿儒

(北京医科大学医学物理学教研室; *中国科学院力学研究所, 北京)

徐家鸽 栗刚 于桂芬 刘淑华 吴本玠

(北京医科大学生物物理教研室, 北京)

本文用两种悬浮介质, PBS与15% PVP的四种不同类型的血样, 用北京医科大学与北京地质仪器厂共同研制的激光衍射仪进行了测量, 并作了系统对比, 结果表明: (1) 对每一种血样, 用PBS悬浮介质与PVP悬浮介质所测得的结果定性一致, 而PBS缓冲液中所受到的切应力要比PVP中低得多, 因而更接近生理条件下的应力。(2) 用甲醛固化在PBS切变流场中不同切变率下的红细胞, 显微镜下观察证明红细胞在切变率低至 $\dot{\gamma}=20\text{s}^{-1}$ 下仍发生变形, 这与前人(如R. Hardeman等)所得结论不同。因此, 我们认为在我国条件下用激光衍射仪观测红细胞变形性时完全可以用价格低廉的PBS悬浮介质代替价格昂贵的高粘度悬浮介质(如PVP、右旋糖酐等)。

关键词: 红细胞变形性 PBS PVP 悬浮介质激光衍射仪

引言

在Mohandas^[1,2]和Morris等^[3]研究的基础上, 人们一般要求用粘度较高的($\eta \geq 18\text{cp}$)液体作为悬浮介质, 用于红细胞(RBC)的变形性的激光衍射观察。因为在这种情况下测得的变形指数DI与RBC的变形呈简单的相关关系^[4]。常用的悬浮介质为PVP($\eta \approx 21\text{cp}$)或不同浓度的右旋糖酐溶液。这在理论与实践上带来两个问题:

1. RBC在这种高粘悬浮介质中测量时所受切应力远远超过了它在生理条件下的切应力范围。据估计^[5], 人体体循环系统里平均切变率范围约为40(腔静脉)~530 s^{-1} (毛细血管), 壁面切变率变化范围约为60~800 s^{-1} , 血液粘度约为4cp, 故生理条件下RBC所受切应力变化约为 $1.6 \times 10^{-5}\text{N/cm}^2 \sim 32 \times 10^{-4}\text{N/cm}^2$ (最高值的估计是偏高的, 因为在毛细管里RBC是挤过去的, 周围介质是血浆, 血浆粘度 $\approx 1.6\text{cp}$)。若用 $\eta \sim 20\text{cp}$ (PVP或右旋糖酐溶液)作为悬浮介质, 而又要求在生理切变率的范围(40~800 s^{-1}), 则RBC所受切应力范围约为8—160 $\times 10^{-5}\text{N/cm}^2$ 。 $\dot{\gamma} > 160\text{s}^{-1}$ 以后, 切应力就超出了正常生理范围, 而当 $\dot{\gamma} = 800\text{s}^{-1}$ 时, 测量时的剪切应力为生理应力5倍以上。尽管血液流变学研究实际上是血液及其

本文1990年4月28日收稿, 1991年6月20日修回。

本研究由国家自然科学基金资助

组元的动态响应,但超过生理应力那么多毕竟是一个值得怀疑的问题。

2. **PVP溶液**、特别是高质量的右旋糖酐的价格比较昂贵,其广泛使用将使得医疗费用增长,而医疗保健费用的急剧上升,正是当前各国生物医学工程学科发展中面临的一个重要问题,这违背了当初发展生物医学工程的本意(因为‘工程’本身就有经济性的含义),连北美,西欧等发达国家都感到不堪重负,要求更弦易辙、注意‘工程’本来的经济性含义。而这一点对于我们中国这样一个社会主义的大国来讲,更为重要。这是涉及我国临床血液流变学技术发展的前途问题,这要求我们寻求用于激光衍射测量RBC变形性的廉价的悬浮介质。

根据前面分析,则所用悬浮介质粘度最好和血液相近($\approx 4\text{cp}$)。但我们的实验表明^[4],在低粘区用激光衍射法测得的变形指数(DI)影响因素很多,行为复杂,对于 η 的选择十分敏感,我们研究的目的在于寻求接近或符合上述条件的悬浮介质,以用于临床实践,并为规范的建立提供依据。

本文通过不同方法处理的各种红细胞血样,使其具有不同程度的变形性模型,对PBS与PVP作为红细胞悬浮介质所测结果对照,表明廉价的PBS悬浮介质所测的DI— $\dot{\gamma}$ 曲线确能反应红细胞变形性。

方 法

1. 血样制备:

(1) 从健康家兔耳静脉取血,肝素抗凝,用PBS清洗三次,再将血样按浓度为 2×10^7 个/ml悬浮于PBS、15%PVP缓冲液中作为正常对照血样。

(2) 不同程度硬化的红细胞悬浮液:在 2×10^7 个/ml红细胞悬浮液中加甲醛(浓度为0.04%, 0.1%),在37℃下处理半小时,清洗后,用PBS和15%PVP配成浓度为 2×10^7 个/ml红细胞悬浮液。

(3) 用胰蛋白酶处理:方法同前。

(4) 取临床病人(白血病,骨髓异常增生综合症)静脉血1ml,肝素抗凝,用PBS缓冲液清洗3次,再将血样配成浓度为 2×10^7 个/ml的PBS, 15%PVP红细胞悬浮液。

(5) 取清洗血与未清洗血,悬浮于PBS中。

以上血样各25ml(可测量5次),均加牛血清白蛋白(2g/l), ATP(0.02%),在室温 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 下进行,每个血样测5次,取DI(800s^{-1})进行平均。

2. 实验步骤

(1) 采用北京医科大学医学物理学教研室与北京地质仪器厂共同研制的激光衍射仪进行上述各血样的红细胞变形性测量,所测得的曲线如图1、图2所示。

(2) 将PBS悬浮液正常血样置于激光衍射仪内,分别使仪器的切变率为 10s^{-1} 、 20s^{-1} 、 800s^{-1} 下转动,同时从外部注入甲醛(使血样甲醛浓度为4%),按上述切变率继续工作30分钟后停机。

(3) 同时取PBS悬浮液正常血样用相同浓度甲醛固定,作观察红细胞变形情况对照用。

(4) 在倒置显微镜下,观察切变率分别为 10s^{-1} 、 20s^{-1} 、 200s^{-1} 、 400s^{-1} 、 800s^{-1} 等的变形红细胞并记下变形百分数(取几个视野平均),同时拍照。

(5) 对相应切变率下的激光衍射图进行拍照。

(6) 作相应切变率下扫描电镜照相。

(7) 将正常情况与未清洗的血样(共8组)进行每半小时一次测量。

结 果

1. 图1、图2分别给出了PBS、PVP作为悬浮介质测定的不同浓度甲醛处理,胰蛋白酶处理,患血液病红细胞血样的DI— $\dot{\gamma}$ 曲线。

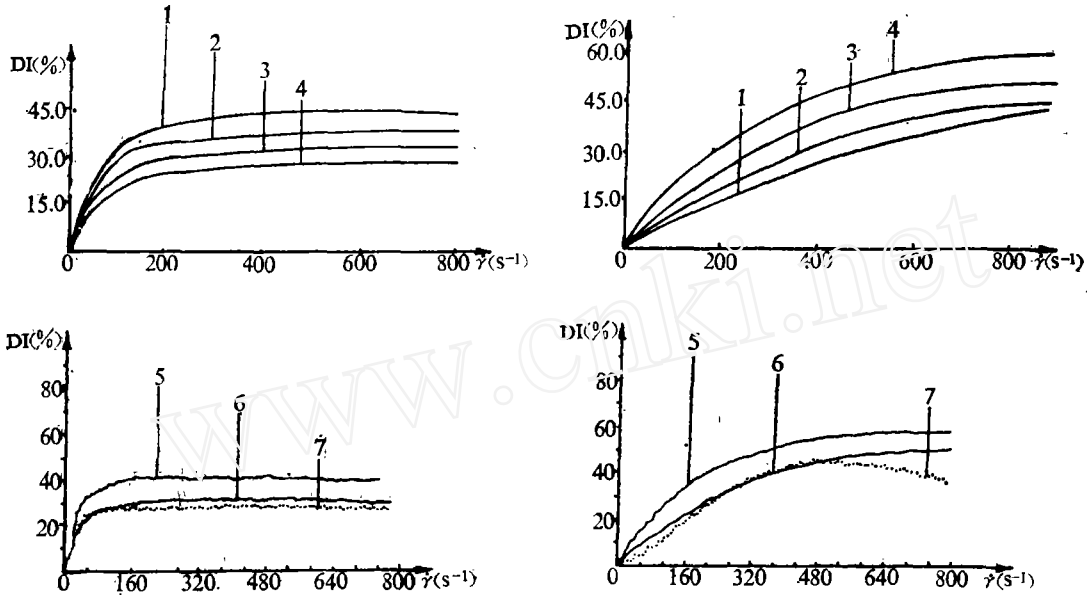


图1 给出了PBS作为悬浮介质测定的不同浓度甲醛处理,胰蛋白酶处理,患血液病红细胞血样的DI— $\dot{\gamma}$ 曲线

1. PBS对照; 2. 0.04%甲醛处理; 3. 0.1%甲醛处理; 4. PBS胰蛋白酶处理; 5. PBS正常; 6. PBS白血病; 7. PBS骨髓异常增生综合症

图2 给出了PVP作为悬浮介质测定的不同浓度甲醛处理,胰蛋白酶处理,患血液病红细胞血样的DI— $\dot{\gamma}$ 曲线

1. 15%PVP胰蛋白酶处理; 2. 0.1%甲醛处理; 3. 0.04%甲醛处理; 4. 15%PVP对照; 5. 15%PVP正常; 6. 15%PVP白血病; 7. 15%PVP骨髓异常增生综合症

以上两图中变形曲线都清楚表明这些血样的变形性皆有明显差异,而且所反映的红细胞的硬化情况都完全一致,即PVP中最大对应PBS中最大,PVP中最小对应PBS中最小;

各血样模型所测结果的 DI_{max} (%)列入了表1之中。

表1 各血样模型所测结果

血样	PBS悬浮介质				15%PVP悬浮介质			
	正常	0.4%甲醛	1.0%甲醛	胰蛋白酶	正常	0.4%甲醛	1.0%甲醛	胰蛋白酶
DI_{max} (%)	42.8	37.9	34.2	30.5	59.9	52.3	44.6	42.0

2. 图3给出了PBS悬浮介质正常红细胞的DI— $\dot{\gamma}$ 曲线,曲线上标明了所在切变率处变形红细胞的百分数。相应的数据列入了表2之中。

3. 图4、图5分别给出了固化血样对照组(零切变率)与某些特定切变率下固化红细胞的显微镜照片、扫描电镜照片及相应的激光衍射图照片(见铜版页)。

4. 表3给出了清洗与未清洗正常血样连续3小时(每半小时一次共6次)的DI值。

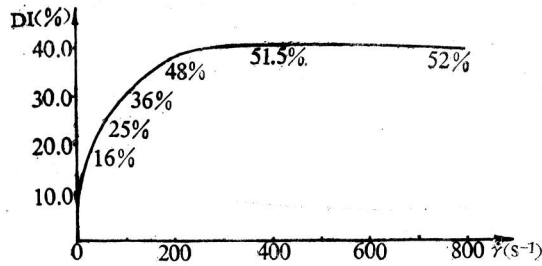


图3 PBS中不同切变率处红细胞的百分数

表2

PBS中各切变率处变形红细胞的百分数

切变率 s^{-1}	10	20	40	60	80	150	400	800
变形红细胞百分数	10.0	14.0	16.0	25.0	48.0	36.0	51.5	52.0
DI(%)	15.0	22.5	27.0	28.5	30.0	38.0	39.0	40.0

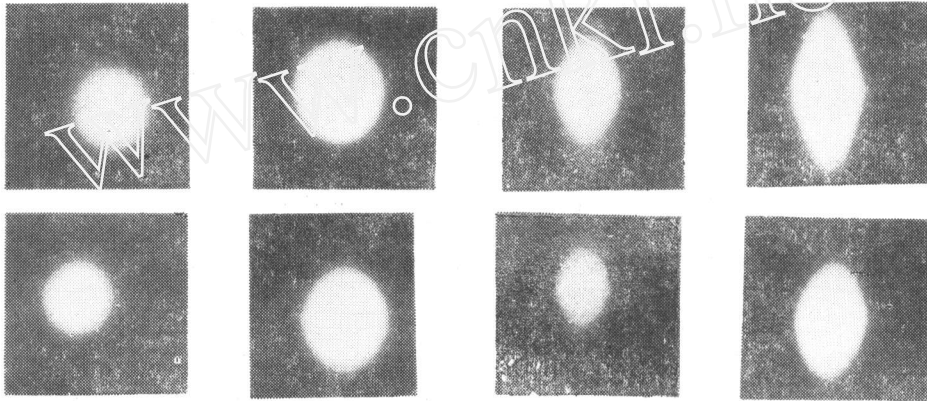


图5 在 $0s^{-1}$, $20s^{-1}$, $200s^{-1}$, $800s^{-1}$ 下, 15% PVP及PBS的激光衍射图照片

表3 清洗与未清洗血样变形指数DI($800s^{-1}$)
3小时连续测量值

次数	1	2	3	4	5	6
清洗血样DI	39.7	38.7	41.6	41.5	39.4	39.9
未清洗血样DI	40.4	43.8	41.2	42.0	43.9	41.1

力比较接近生理范围,而且PBS的价格低廉,不到右旋糖酐的1%。显然,PBS是既能获得规律而且稳定的结果(这一点和右旋糖酐或PVP高粘介质等效),而又能解决使用高粘悬浮介质所带来的问题以及既符合生物医学工程本来的目标,又可用于RBC群体流变行为测量的一种合适的悬浮介质。

2.从图1、图2清楚说明,无论是PBS或PVP皆能反映红细胞变形性的变化,而且反映它们是一致的。图1、图2还给出了PBS及PVP测得的临床病例情况(白血病、骨髓异常增生综合症),说明用PBS作为激光衍射仪测红细胞变形性的悬浮介质在临床上是切实可行的。

讨 论

1.根据Taylor的理论分析和实验结果^[6],当外筒静止、内筒旋转时,同心圆筒间隙间剪切流动的特征参数Taylor数为 $Ta = \rho\Omega/\eta$, ρ 是介质密度, Ω 是内筒转速。剪切流场失稳(产生Taylor涡)的临界Taylor数 $[Ta]_{cr} = 68.75$,而我们所用的激光衍射仪内筒最高转速

为160周/分,所用悬浮介质中粘度最低者为PBS, $\eta = 0.89cp$, $\rho = 1.05g/cm^3$,故整个实验过程中, $[Ta]_{max} = 19.77 \ll [Ta]_{cr}$ 。所以,不存在剪切流场因Taylor涡而失稳的问题。由图1可见,用PBS作为悬浮介质所得的DI- $\dot{\gamma}$ 曲线在整个切变率范围内是有规律而又稳定的,而此时RBC所受的切应力

3. 从用甲醛固化在切变流场中运动红细胞所拍摄的显微照片、电镜照片(图4)表明,无论在PBS悬浮介质的低切变流场 20s^{-1} 或高切变流场 800s^{-1} ,皆可见到发生变形的红细胞。而实验发现变形红细胞百分数与变形大小随切变率增加而增大。这一事实似乎与Hardeman等^[7]认为的“在PBS低粘度悬浮介质中之所以不能用于测红细胞变形是因为红细胞仅在切变流场中翻滚”的看法不一致。Ficher^[8]等用流变仪研究高切变流场中红细胞运动情况发现,切变流场中红细胞具有两种类型的运动,即象刚体样的红细胞翻滚或转动,以及红细胞膜包裹体的在流场中稳定取向与伸张,并围绕内部胞浆作“坦克履带式”运动。从刚体运动到液滴样行为的转变是由红细胞硬度决定的,因此,对于红细胞存在一个十分重要的液体切应力的临界值,该值是超过红细胞弹性阻力而产生的变形而施于红细胞表面所必须的力。Evans等^[9]曾指出,此临界切应力的数量级仅为 $0.1\text{--}1\text{dyn/cm}^2$ 。超过此应力,则红细胞将作“坦克履带式”运动,即细胞膜将以正比于所加的切应力作逐渐增加速率绕胞浆的环形运动。这就使得更加难以确定加给整个细胞的切应力,因为降低切应力受到膜的动态应力与胞浆内粘度耗散的重要影响。以上论断与我们实验中观察到的结果一致。在 20s^{-1} 左右(即 0.2dyn/cm^2)固化实验证明确有红细胞变形,当切应力增加时,而沿着流场取向,变形红细胞百分数也增加。变形指数亦增大(在切变流场中逐渐伸长),当达到一定切变率(150s^{-1})时增加切变率所增大的切应力受到膜的动态应力与胞浆内粘度耗散的阻碍,所以变形指数不再增加。在低粘度悬浮介质中,红细胞的伸长决定于红细胞的变形几何参数,细胞膜表面积以及胞浆粘度等,由此可见,以PBS作为激光衍射仪的悬浮介质所测得的DI包含有反映红细胞变形,取向等一系流变特性的信息。

4. 在低粘度红细胞悬浮液所产生的切变流场中,红细胞既产生滚翻运动,也产生变形,从显微镜照片和扫描电镜照片可见,在低粘度悬浮介质的低切变流场中,红细胞产生等容变形(照片中变形红细胞仍保持双凹长椭圆形),这与高血细胞压积的红细胞悬浮液产生流动所需极小(远小于 $1\times 10^{-6}\text{N/cm}^2$)屈服应力的事实是一致的^[10]。

5. 图5给出了以PBS作悬浮介质,在 $0, 20, 200, 800\text{s}^{-1}$ 切变率下所测得的衍射图,除 0s^{-1} 外,其他切变率下衍射图皆为椭圆而随切变率增加,椭圆变长, Bessis等曾指出在不存在切变流场时,悬浮介质中红细胞松弛,随机取向,衍射图第一暗环为圆环,如图4、图5中零切变率照片所示。当切变率增加图4、图5中其它切变率下的第一衍射环呈椭圆,而且它的主轴垂直于沿红细胞伸长的切变流场方向。正如我们在激光衍射仪的原理中所提到的, Zahalak^[11]根据Frankofer衍射理论计算所证明的,第一衍射环的长轴与短轴之比等于该变形为椭球形红细胞长轴与短轴之比,我们实验中PBC悬浮液的切变流场中所得的衍射图证明了红细胞确实发生了变形,取向。

表3中清洗与未清洗血样对照,说明清洗血样变形性较未清洗血样的DI(800s^{-1})小,这可能与红细胞在清洗过程有微小损伤有关,但两者的测量都较稳定,这表明在某些情况下,可直接用未清洗血样进行测量。

综合上述,用廉价的PBS悬浮介质代替昂贵的高粘度悬浮介质,用未清洗血样代替清洗血样用于激光衍射仪测量RBC的变形性是可行的。这种经济、省时省事的方法值得推广。

参 考 文 献

- [1] Mohandans N, et al. A new approach to identification of factors influences red cell deformability Blood. 1979; 54: 39
- [2] Mohandans N, et al. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability J, Clin, Invest. 1980; 66: 563
- [3] Morris DR, Williams AR. The effects of suspending medium viscosity on erythrocyte deformation and hemolysis in vitro. Biochimica Biophysica. 1979; 550: 288
- [4] 文宗耀. 悬浮介质粘度对红细胞变形性测量的影响. 中国生物医学工程第四届学术会议论文汇编. 1979; 17
- [5] 冈小天. 生物流变学(第二版), 吴云鹏, 陶祖莱等译. 科学出版社. 1988
- [6] Taylor GI, Phil Trams Roy. Soc London. Sera. 1923; 223
- [7] Hardeman R, et al. RBC laser diffractometry and RBC aggregometry with a rotational visometer: comparison with rheoscope and Myrenne aggregometer. Clinical Hemorheology. 1988; 8: 581
- [8] Fisher T, et al. Tank tread motion of red cell membranes in viscometric flow: behavior of intracellular and extracellular markers. Blood Cells. 1977; 3: 351
- [9] Evans EA. Intra cellular Developments in red cell rheology at in the institute of Pathologic cellulaire. Blood Cells. 1986; 12: 13
- [10] 冯元桢. 生物力学. 科学出版社. 1983; 15
- [11] Zahalak GL, et al. Fraunhofer diffraction pattern of an oriented monodisperse system of prolate ellipsoids. J. Coll. Inter. 1981; 82: 423

COULD WE USE PBS INSTEAD OF DEXTRAN AS SUSPENDING MEDIUM FOR EKTACYTOMETRIC MEASUREMENT ?

Wen Zong-yao, Tao Zu-lai*, Cao Shi, Zhao Yu-heng,
Han Zhan-shan, Wang Hong-ru

(Medical Physics Lab., Beijing Medical University)

Xu Jia-ling, Li Gong, Yu Gui-fen, Liu Shu-hua, Wu Ben-jie

(Biophysics Lab., Beijing Medical University)

ABSTRACT

In order to find a new suspending medium for Ektacytometric measurement, systematic comparison of measured rheological properties of erythrocytes suspended in different buffer has been carried out. Two kinds of buffer were used, e.g. PBS(0.12M NaCl, 0.02M NaHPO, 0.005 M KHPO, 0.1% bovin serum albumin, pH=7.4, 295mOsm/kg, 0.89cp) and PVP (PVP 40000 15%, 0.02M Na₂HPO, 0.005M KHPO, pH=7.4, 295mOsm/kg, 61.71cp). And four types of erythrocyte were measured

* (Institute of Mechanics, Academia Sinica)

by using both suspending media, that is, normal rabbit's RBC, rabbit's RBC hardened by formalin with different concentrations, rabbit's RBC treated by trypsin and human erythrocyte sampled from patients. Under testing microscope and scanning electron microscope, photographs of erythrocytes rigidized at constant shear rate were observed. Results show that (1) For each of the four types of erythrocytes, measured deformation index (DI) -shear rate ($\dot{\gamma}$) curves in PBS are similar qualitatively to those measured in PVP. (2) Microscope and scanning electron microscope photographs show that erythrocytes indeed deformed when the shear rate of flow field is as low as $\approx 20\text{s}^{-1}$. It supports the measured results by using PBS as suspending medium and the fact shows that, as suspending medium for Ektacytometric measurement, PBS would be better than PVP, especially in low shear rate area.

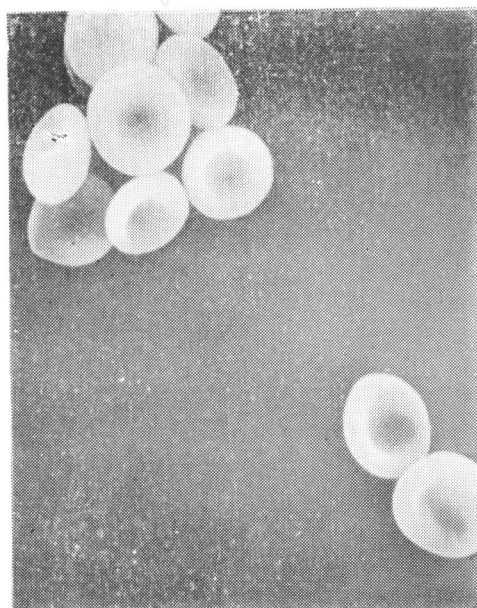
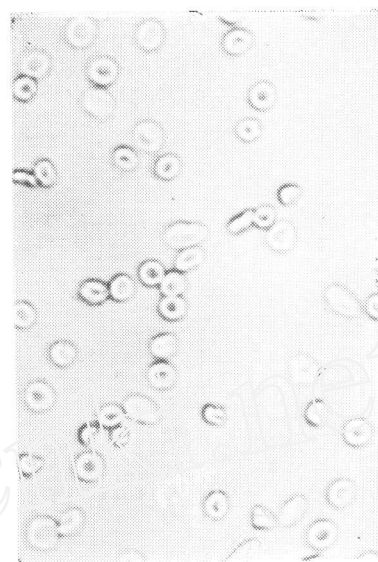
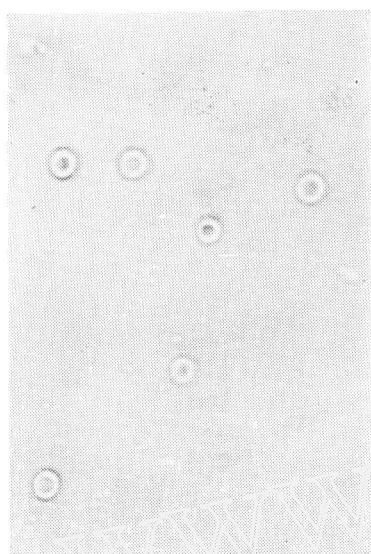
Therefore, we believe that for Ektacytometric measurement, we suggest to use PBS instead of PVP as suspending medium since PBS is much cheaper than PVP.

Key words: RBC deformability; PBS; PVP; Suspending Medium Ektacytometes

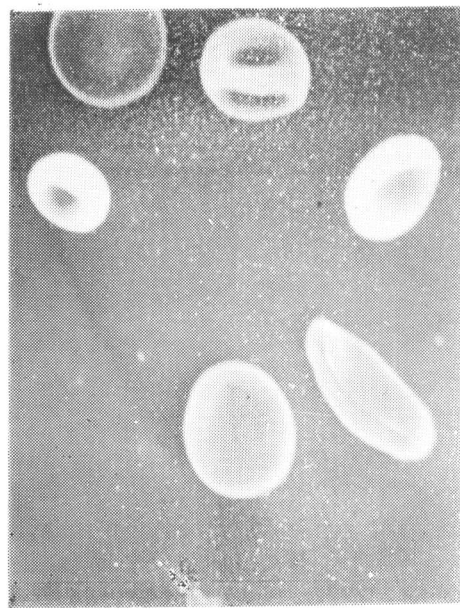
(Acknowledgement: This research was supported by the National Science Foundation of China)

PBS作为悬浮介质代替PVP用于红细胞变形性测量的可能性

(正文见52页)



$0s^{-1}$



$20s^{-1}$

PBS作为悬浮介质代替PVP用于红细胞变形性测量的可能性

(正文见52页)

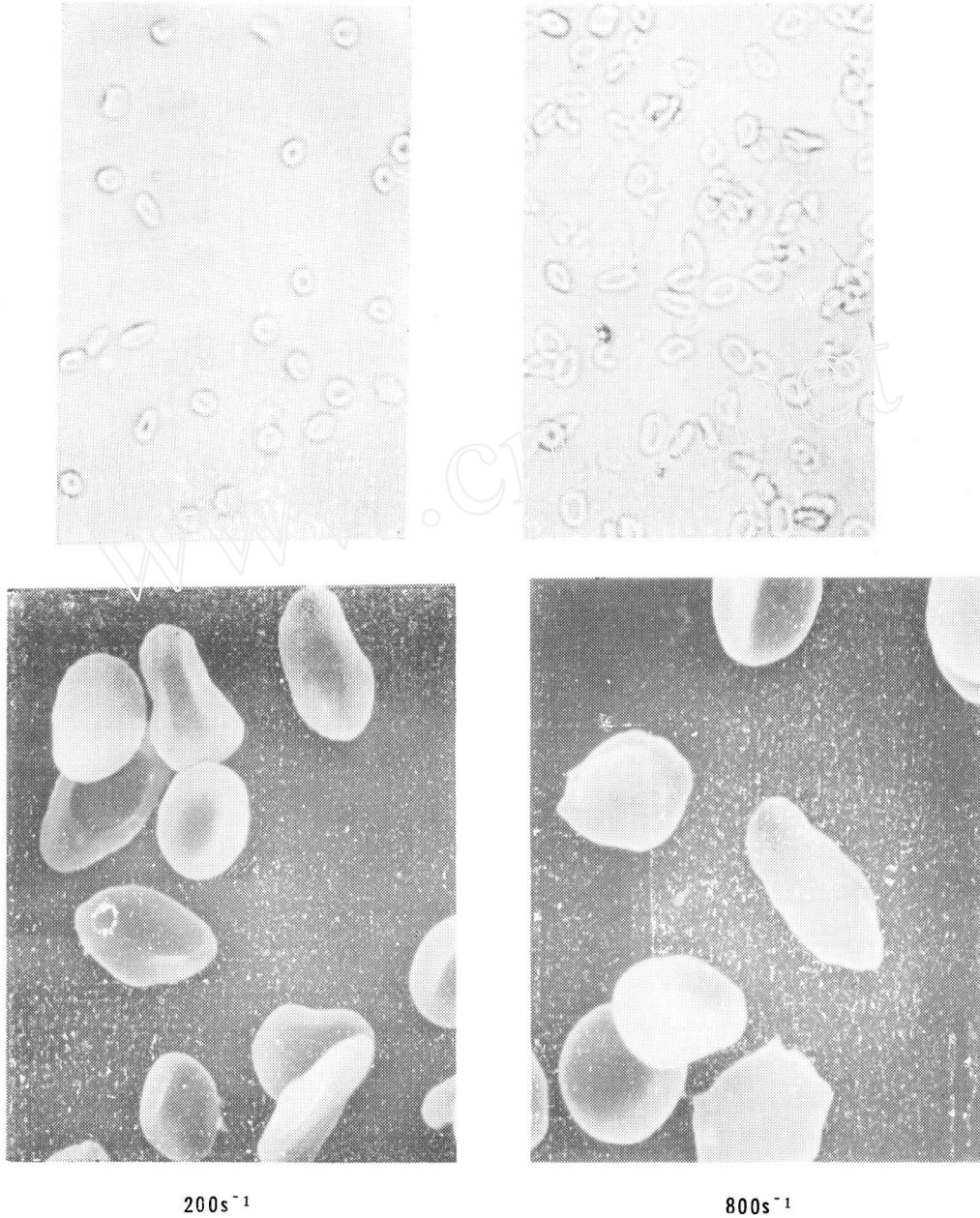


图4

200s⁻¹

800s⁻¹

在0, 20, 200, 800S⁻¹固化红细胞的显微镜照片及相应的扫描电镜照片