

# 悬浮介质对红细胞变形性测量的影响\*

文宗曜<sup>1</sup> 陶祖莱<sup>2</sup> 曹 实<sup>1</sup> 赵玉衡<sup>1</sup> 李玉梅<sup>1</sup>  
徐家鸽<sup>3</sup> 栗 刚<sup>3</sup> 于桂芬<sup>3</sup> 刘淑华<sup>3</sup> 吴本玠<sup>3</sup>

(1北京医科大学物理教研室, 2中国科学院力学研究所, 3北京医科大学生物物理教研室, 北京)

本文研究了悬浮介质粘度对激光衍射仪测量红细胞变形性的影响, 所得结果表明: (1) 在一定切变率下 ( $800\text{s}^{-1}$ ,  $480\text{s}^{-1}$ ) DI- $\eta$ 曲线的高粘度区与前人 (如D.R.Morris等) 一致, 但低粘度区有一极小值。(2) 即使在相同切应力下, DI- $\eta$ 曲线相当复杂, 特别是在低切应力水平更是如此, 但是当 $\eta \geq 15\text{cP}$ 时, DI趋于定值。(3) 利用红细胞在切变流场中旋转、取向与变形时间尺度上的明显差异, 可以把红细胞旋转取向的贡献从变形中区分出来。实验结果表明, 低粘度DI- $\eta$ 复杂行为主要起因于红细胞的旋转和取向。文中对实验观测到的现象进行了讨论。

关键词: 激光衍射仪, 红细胞变形性, 悬浮介质粘度

## 引 言

自1975年Bessis等<sup>[1]</sup>提出用激光衍射法测定红细胞(RBC)变形性以来, 这种方法受到了人们广泛的关注。但是, 作为血液流变学的一种方法应用于临床, 激光衍射法的规范化是必不可少的, 其中一项重要内容就是对RBC悬浮介质的流变特性的规定, 而这一规范的制订必须以悬浮介质粘度 $\eta$ 对激光衍射法测量RBC变形性影响的研究为基础。对此, Morris等<sup>[2]</sup>曾经作过研究, 但所用介质粘度变化范围不够宽, 结果表明, 在同一切变率下, 测得的RBC变形指数DI, 在粘度较低时随 $\eta$ 增大而增大, 当 $\eta > 20\text{cP}$ 时, DI $\rightarrow$ 常数。 $\eta$ 越高, DI随 $\eta$ 的变化越不明显, 故为获得具有横向可比性的测量结果, 一般都选用高粘度悬浮介质, 如高粘度右旋糖酐溶液、PVP等, 其粘度远高于血液(4cP), 因而用激光衍射法测量RBC变形性时, 所加的切应力远高于生理范围, 这是一个问题。能不能用低粘度悬浮介质获得具有横向可比性的测量结果呢? 这需要进一步研究用激光衍射法测得的RBC变形指数与悬浮介质粘度的关系, 尤其是低粘度区的行为。

## 材料与方 法

### 1. 血样制备:

(1) 取新鲜的兔耳静脉血约5ml, 用肝素抗凝, 经PBS(0.12M NaCl, 0.02M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.005M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH = 7.4, 295mOsm/kg) 缓冲液清洗3次, 将红细胞分别悬浮于浓度为

\*国家自然科学基金资助课题  
本文1990年4月28日收稿, 1991年1月9日修回

0%, 0.5%, ... 18%右旋糖酐(平均分子量200000, 0.02M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.005M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 加NaCl, 调整渗透压到300mOsm/kg, pH = 7.4)之中。每种血样 $3 \times 5\text{ml}$ , 红细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个/ml。

(2) 将清洗后的红细胞, 用浓度为 $2 \times 10^7$ 个/ml悬浮于PBS中, 加胰蛋白酶(浓度为1.5mg/ml), 在37℃下处理半小时, 清洗后, 按细胞浓度为 $2 \times 10^7$ 个/ml, 分别悬浮于PBS和15%PVP中(PVP: polyvinylpyrrolidone MW = 40000, 加0.02M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.005M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 再加NaCl调整渗透压到295mOsm/kg), 每种血样 $3 \times 5\text{ml}$ 。

以上所有血样皆加牛血清(2g/l)及ATP(0.02%), 实验在 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 下, 5小时内完成。

## 2.方法:

(1) 用奥氏粘度计测量上述不同浓度的右旋糖酐悬浮介质粘度。

(2) 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测定各种血样的红细胞变形性。

(3) 用激光衍射仪转筒在三种固定切变率(480、400、 $800\text{s}^{-1}$ )转动时, 从外筒注入甲醛, 使悬浮液中甲醛含量3%, 以固化PBS中变形的红细胞。

(4) 用上述相同方法, 将 $\eta = 2.3\text{cP}$ 的右旋糖酐介质的红细胞悬浮液, 在切变率为 $800\text{s}^{-1}$ 时固化。

(5) 用倒置显微镜观察上述固化后的红细胞变形情况, 并拍摄照片。

(6) 用扫描电镜观察上述固化红细胞的细节, 并拍摄照片。

(7) 拍摄 $800\text{s}^{-1}$ 下, 在PBS, 2%、18%右旋糖酐中红细胞悬浮液的激光衍射图。

## 结 果

1. 表1给出了不同浓度右旋糖酐悬浮介质所对应的粘度。

表1 不同浓度右旋糖酐-PBS悬浮介质所对应的粘度

浓度(%)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	11	13	18
粘度(cP)	0.89	1.52	2.29	3.12	4.52	5.82	8.08	9.99	13.79	34.66	40.11	94.64

2. 图1给出了不同浓度的右旋糖酐悬浮介质, 激光衍射仪所测得的变形指数 $DI-\dot{\gamma}$ (切变率)曲线(未全部画出), 不难看出, 悬浮介质浓度 $C = 2\%$ ( $\eta \approx 2.3\text{cP}$ )的 $DI-\dot{\gamma}$ 曲线较其他 $DI-\dot{\gamma}$ 曲线低, 此时, 主要反映的是红细胞的取向。

3. 图2给出了PVP( $C = 15\%$ )及PBS( $C = 0\%$ )作为悬浮介质所测得的正常红细胞及用胰蛋白酶处理红细胞(改变其红细胞变形性)的 $DI-\dot{\gamma}$ 曲线, 不难看出, 用PBS悬浮介质仍可反映出红细胞变形性的改变。

4. 通过图1及表2可以得到两种切变率( $480\text{s}^{-1}$ 、 $800\text{s}^{-1}$ )的 $DI-\eta$ 函数曲线, 如图3所示, 从图中可见 $480\text{s}^{-1}$ 、 $800\text{s}^{-1}$ 曲线在 $\eta \approx 2.3\text{cP}$ (相当于右旋糖酐 $C = 2\%$ )处有一极小值。

5. 通过图1得表3, 从而可以求出三种恒定切应力( $\tau = \eta\dot{\gamma}$ )下(5、10、50  $\text{dyn/cm}^2$ )的 $DI-\eta$ 曲线, 如图4所示。注意到由于低粘度悬浮液内受恒定切应力作用的红细胞有取向, 及小变

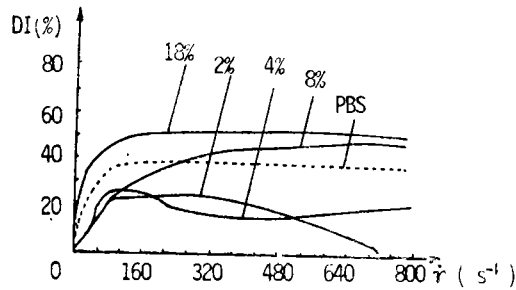


图1 不同浓度右旋糖酐及PBS的DI- $\dot{\gamma}$ 曲线

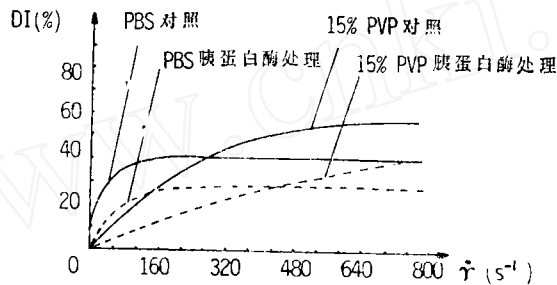


图2 对照的红细胞与胰蛋白酶处理的DI- $\dot{\gamma}$ 曲线

形，故同一切应力下DI并不相等。

表2 两种恒定切变率下 $\eta$ 与DI的关系

浓度(%)	PBS	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	12%	13%	18%
粘度(cP)	0.89	1.52	2.29	3.12	4.516	5.823	8.083	9.993	13.79	34.66	40.11	94.65
DI 480s <sup>-1</sup>	37.5	28.5	18.0	5.1	13.8	28.5	30.0	36.0	45.0	45.2	45.2	52.0
(%) 800s <sup>-1</sup>	40.0	23.4	1.0	1.2	17.6	33.0	37.5	42.5	46.5	47.6	48.4	52.0

6.图5 a、b分别给出了PBS及粘度 $\eta \approx 2.3\text{cP}$  (浓度 $c = 2\%$ )右旋糖酐悬浮介质内，当切变率为 $800\text{s}^{-1}$ 时的激光衍射图片以及固化后的红细胞显微照片。注意到2%右旋糖酐悬浮介质没有显示红细胞明显变形。

7.图6 a、b、c分别给出PBS悬浮介质中三种切变率(0、200、 $800\text{s}^{-1}$ )固化的红细胞显微照片及对应的扫描电镜照片。可见确实存在红细胞变形性。

表3 恒定切应力下 $\eta$ 与DI的系关

右旋糖酐浓度%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	11	18	18
粘度(cP)	0.891	1.515	2.289	3.119	4.516	5.823	8.083	9.993	13.79	34.66	40.11	94.65
5dyn/cm <sup>2</sup>	37.5	30.0	24.0	21.0	24.0	21.0	11.6	10.5	9.0	5.5		
DI(%)10dyn/cm <sup>2</sup>		27.3	20.5	17.3	18.0	20.7	17.4	18.8	21.0	18.5	18	
50dyn/cm <sup>2</sup>							33.0	38.7	44.4	44.4	44.4	45.3

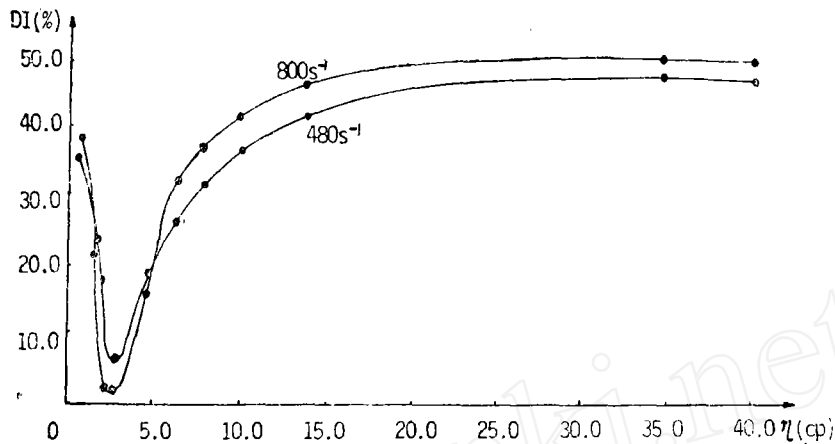


图3 两种切变率(480s<sup>-1</sup>、800s<sup>-1</sup>)下的DI-η曲线

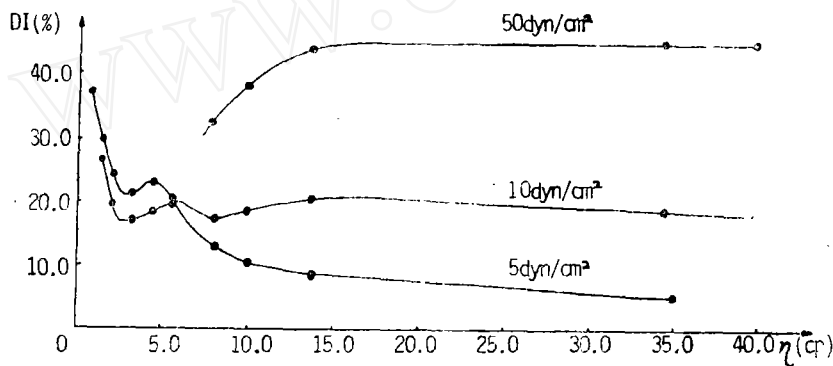


图4 在三种恒定切应力下的DI-η曲线(在η=2cP附近有一极小值)

## 讨 论

1. 图1各曲线表明悬浮介质粘度明显地影响激光衍射法对红细胞变形性的测量,当 $\eta \approx 2\text{cP}$ (约相当于右旋糖酐浓度2%),DI- $\gamma$ 曲线的DI(800s<sup>-1</sup>)最低,其他无论是 $\eta > 2\text{cP}$ 或 $\eta < 2\text{cP}$ 曲线的DI皆高于前者。

2. 图3给出了两种切变率下(480、800s<sup>-1</sup>)的DI-η曲线,存在一极小值(约在 $\eta = 2.5\text{cP}$ )。在5-10cP区,红细胞变形指数随粘度增加线性增大,此时细胞膜内几乎不存在阻止红细胞变形的切向张力,即为等容变形,该区的变形率(增量)较大。当粘度 $\eta$ 大于10cP后红细胞受到更大切应力作用,因而细胞膜内产生了阻止变形的切向张力,即红细胞发生非等容变形。

在悬浮介质粘度小于2cP区,激光衍射仪测得的变形指数随粘度减小而增大,当右旋糖酐浓度为零,即为PBS悬浮介质时,在800s<sup>-1</sup>时的变形指数可达15%右旋糖酐作为悬浮介质在800s<sup>-1</sup>时测得的DI值的80%。变形红细胞的百分数以及变形大小随切变率增加逐渐增大到某一恒定值。

图3中极小值右测的  $DI-\eta$  曲线与 Morris 等所得的曲线大致相似, 但他们没有考察到小于  $2cP$  区, 即曲线极小值左侧的  $DI-\eta$  情况, 而正是这一区域反映了切变流场中红细胞许多方面流变特性。中等 ( $480s^{-1}$ ) 与切变率  $DI-\eta$  曲线与高切变率 ( $800s^{-1}$ ) 有些差异,  $DI$  值较低, 但趋势雷同。

3. 右旋糖酐浓度为零的 PBS 悬浮介质, 用于激光衍射仪测量红细胞变形性, 对于正常红细胞, 其最大变形指数 ( $800s^{-1}$ ) 可达 40% 以上, 约相当于 18% 浓度右旋糖酐悬浮介质测得最大变形指数 ( $800s^{-1}$ ) 的 80%, 与右旋糖酐悬浮介质测量结果相比, 它的  $DI-\dot{\gamma}$  曲线在低切变率曲线变形率 (增量) 较大, 它反映的是红细胞在低粘度悬浮介质流场中的取向、滚翻、等容变形等流变特性。这一事实提示我们, 可以用价廉的低粘度 PBS 悬浮介质代替昂贵的高粘度的 PVP 或右旋糖酐悬浮介质。图 2 给出了用胰蛋白酶处理的红细胞与正常红细胞, 用 15% PVP 和 PBS 作为悬浮介质所测得的  $DI-\dot{\gamma}$  曲线, 不难看出, 两种悬浮介质所测得反映红细胞变形性的结果是一致的。

4. 用激光衍射仪测出的 RBC 变形指数  $DI$  并不是一个 RBC 的变形, 而是在剪切流场中 RBC 流变行为的群体效应, 这种效应反映为激光衍射图象的光强变化, 在本文中

$$DI = \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \quad (1)$$

$I_A$  和  $I_B$  是象屏上在两个垂直方向上距中心等距两点 A 和 B 处的光强。因此, 所有能影响剪切流场中 RBC 群体衍射模式 (patter) 的因素都对测得的  $DI$  有贡献。在定常剪切流条件下, 可能导致 RBC 群体激光衍射图象改变的主要因素有三: (1) RBC 变形; (2) RBC 的取向。因为 RBC 是双凹碟形旋转体, 在剪切流中其取向与流动切变率等有关。若把 RBC 看作不可变形的刚性颗粒, 那末当它随机取向时, 衍射图象光强应呈圆环状分布,  $DI \rightarrow 0$ ; 若 RBC 取向有序, 则衍射图象等光强线将变为椭圆形。此时, 有序程度越高,  $|I_A - I_B|$  越大,  $DI$  越大; (3) RBC 的三维旋转。在定常剪切流中, RBC 的运动不一定是完全定常的, 它有可能失稳而发生旋转 (包括翻滚、振动等等)。一般来讲, RBC 旋转倾向于使得衍射图象光强分布趋于对称, 因此对 RBC 变形性测量来说起着‘噪声’的作用。据此, 在定常剪切流中测得的  $DI$  主要来源于 RBC 变形 ( $(DI)_d$ ) 和 RBC 取向 ( $(DI)_{or}$ ), 而旋转的贡献 ( $(DI)_{ro}$ ) 很可能表现为‘噪声’而湮没 RBC 变形的信息 (即  $DI = 0$  时, 不一定意味着 RBC 没有发生变形)。

据 Bitbol<sup>[3]</sup>、Evans<sup>[4]</sup> 等人研究, RBC 的取向方位和百分比, 与流动切变率、悬浮介质粘度、RBC 形态等有关, 因此  $(DI)_{or}$  本身是 RBC 与悬浮介质的相互作用和 RBC 形态因子的综合, 它和 RBC 在循环系统中的流变行为是相关的, 因而在生理 (病理生理) 上是有意义的。其次, 如果 RBC 仅仅是一个可变形颗粒, 那么,  $(DI)_d$  完全取决于 RBC 所受的切应力和 RBC 整体的力学性质。但实际上 RBC 不是一个简单的可变形颗粒, 而是一个 (从力学观点来看) 内部充满粘性流体的薄膜胶囊, 膜在切应力作用下有可能发生相对 (相对于内部流体) 运动, 称为‘坦克履带运动’。因此, 宏观流场剪应力所作的功一部分使 RBC 变形, 而另一部分用于驱动 RBC 膜的坦克履带运动。而坦克履带运动是否发生以及其运动特性 (能耗规律) 则取决于膜内外流体粘度之差、膜的力学性质、RBC 整体的形状以及流动切变率等; 第三, 在流动起始过程中, RBC 由随机分布趋于定向取向 (按一定的概率) 分布, 在此过

程中RBC作旋转运动是必然的。但一旦定常剪切流场建立,RBC群体的取向的统计概型(数量分布和方位分布)趋于定态,旋转运动将是少数RBC个体的行为,它对于衍射图象的贡献表现为噪声;若RBC群体取向概型定态失稳而趋于无序,则(DI)<sub>ro</sub>更表现为噪声。不论哪种形式,(DI)<sub>ro</sub>都是干扰因子,而其强度与介质粘度、RBC形状、流动切变率、RBC个体之间的流体动力学相互作用、RBC浓度等有关。所以,在定常剪切流场中,流体动力对RBC群体所作的功W有:

$$W = E_d + E_t + E_{or} + E_{ro} \quad (2)$$

$E_d$ 、 $E_t$ 、 $E_{or}$ 、 $E_{ro}$ 分别相应于用于RBC变形、膜运动、取向(定态的维持)和旋转等所消耗的能量,而所有这些因素中 $E_t$ 、 $E_{or}$ 、 $E_{ro}$ 都和介质粘度 $\eta$ 有直接关系(在同一切应力水平下)。它们的综合表现为如图3和图4所示的行为。总的来看,当介质粘度很高(比如说 $>15\text{cp}$ )时,阻尼作用增大, $E_{ro} \rightarrow 0$ ,RBC取向分布概型趋于恒定(不随 $\eta$ 变化), $E_t$ 亦趋于常量,此时 $E_d(\tau, \text{RBC变形性})$ 将与 $W(\tau)$ 是比较简单的正相关:

$$E_d = W(\tau) - \text{Const} = f(\tau, \text{RBC力学性质}) \quad (3)$$

因而此时用激光衍射法测得的DI与用流变仪直接观测得到的RBC的可变形性的结果的相关性很强,Mehandas等人<sup>[5]</sup>的实验已证实这一点。而当 $\eta$ 较低时,

$$\begin{aligned} E_d &= W(\tau) - E_t(\eta - \eta_0, \dots) - E_{or}(\eta, \dots) - E_{ro}(\eta, \dots) \\ &= f(\tau, \eta, \dots, \text{RBC可变形性}) \end{aligned} \quad (4)$$

这样测得DI将是上述诸因素的综合。此时,若能区分诸因素的作用,则用激光衍射仪测得的DI将能表征RBC群众流变行为的更多的信息。

根据低粘介质中RBC松弛过程的特点<sup>[6]</sup>,我们发展了一种新的方法<sup>[7]</sup>,可将RBC取向对DI的贡献和RBC变形等的作用区分开来。并已给出了在不同剪应力水平下 $DI - \eta$ 、 $(DI)_{or}$ 和 $(DI) - (DI)_{or} \approx (DI)_d$ 随 $\eta$ 变化的行为。可见(1)在低剪应力(比如说 $\tau = 5\text{dyn/cm}^2$ )作用下RBC仍然可能发生变形(这和Morris、Evans等人在生理状态下的观察结果相符),图6所示电镜观察结果也证明了这一点;(2)在低粘区 $DI - \eta$ 的复杂行为主要来源于RBC群体取向分布概型随 $\eta$ 的变化;(3)粘度不同时测得DI的行为对于介质粘度是相当敏感的,欲得良好的结果必须作慎审的选择。图5是当 $\dot{\gamma} = 800\text{s}^{-1}$ 时,同一RBC试样,在PBS和在2%右旋糖酐—PBS溶液里测得的衍射图象,后者的剪应力水平为前者的2倍有余,而图6所示电镜观察的结果已证明在相当于前者的切应力水平下RBC确实发生了变形,但前者能够灵敏地显示RBC的变形,而后者却不能显示。看来这是因为在这种粘度( $\sim 2\text{cP}$ )下,RBC旋转等引起的‘噪声’湮没了RBC变形的信息。由此看来,所谓低粘度介质不宜用于激光衍射法测RBC变形性这一结论是过于简单化了。实际上,只要悬浮介质的粘度选择得适当(比如说 $\approx 1\text{cP}$ ),可以大大提高激光衍射法测量RBC变型性的灵敏度,且可重获得更多的关于RBC流变行为的信息。在此基础上我们提出设想用低粘度而又经济的RBC溶液作为悬浮介质,代替昂贵的高粘度的PVP溶液或右旋糖酐溶液,并进行了详细的评估研究<sup>[8]</sup>。

至于具体的机理尚有待进一步研究。(本文图5、图6请见铜版页)

### 参 考 文 献

- [1] Bessis M, et al. A diffractomic method for the measurement of cellular deformabi-

- lity. Blood Cells, 1975; ( 1 ) : 307
- [ 2 ] Morris DR and Williams AR. The effects of suspending medium viscosity on erythrocyte deformation and hemolysis in vitro. Biochimica Biophysica, 1979; 550 : 288
- [ 3 ] Bitbol M, et al. Biophys J. 1988; 49 : 1055
- [ 4 ] Evens EA. Membrane visco-elasticity. Biophys J. 1975; 16 : 13
- [ 5 ] Mohandas N, et al. Blood, 1979; 54 : 30
- [ 6 ] 陶祖莱, 文宗曜等. 红细胞变形指数的动力学行为. 生物物理学报. 1991; 2 : 233
- [ 7 ] Chen S, et al. Deformation and orientation: how can we get more information from ektacytometry? to The Far Eastern BME Conf. 1990
- [ 8 ] Wen ZY, et al. Could we use PBS instead of dextran as suspending medium for Ektacytometric Measurement? Clinical Hemorheology. 1991; 11 : 459

## EFFECTS OF VISCOSITY OF SUSPENSION MEDIUM ON EKTACYTOMETRIC MEASUREMENT

Wen Zong-Yao<sup>[1]</sup>, Tao Zu-Lai<sup>[2]</sup>, Cao Shi<sup>[1]</sup>, Zhao  
Yu-Heng<sup>[1]</sup>, Li Yu-Mei<sup>[1]</sup>

Xu Jia-Ling<sup>[3]</sup>, Li Gang<sup>[3]</sup> Yu Gui-Fen<sup>[3]</sup>,  
Liu Shu-Hua<sup>[3]</sup>, Wu Ben-Jie<sup>[3]</sup>

((1) Medical Physics Lab., Beijing Medical University, Beijing)

((2) Institute of Mechanics, Academia Sinica, Beijing)

((3) BioPhysics Lab., Beijing Medical University, Beijing)

### ABSTRACT

Buffers with different viscosity (ranges from 0.89 to 94.64cp) were used as suspending media. Using Ektacytometric, we have measured deformation index of rabbits red blood cells suspended in different buffers under the same conditions (concentration of red blood cells;  $2 \times 10^7/\text{ml}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ , osmotic pressure = 295 mOsm/kg, temperature:  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Results show that:

1. For the same shear rate (ranging from 0 to  $800\text{s}^{-1}$ ), deformation index (DI) measured varies with the viscosity ( $\eta$ ) of suspending medium. Different from results of previous works (e.g, D.R Morris et al), there is a minimum DI on each DI- $\eta$  curve, and the  $\eta(\text{DI})_{\text{min}}$  varies with imposed shear rate, and ranges from 2 to 6 cp. And DI will tend to be constant when  $\eta \rightarrow \infty$  (In fact that,  $\text{DI} \approx \text{constant}$ , when  $\eta \geq 15\text{cp}$ ).

2. Even at the same shear stress level, DI also vary with  $\eta$  and the behavior of DI- $\eta$  curve with the same shear stress is rather complicated, especially at low shear stress level. However, DI measured will tend to be constant too, when  $\eta \geq 15\text{cp}$ .

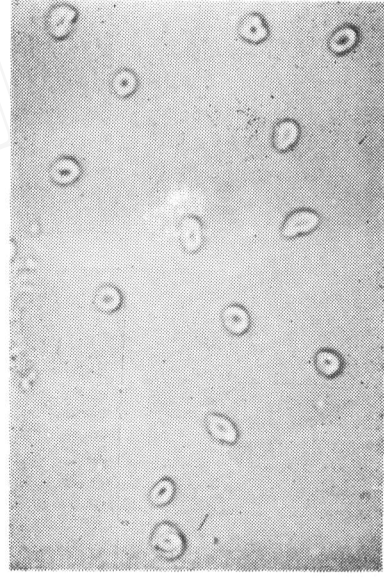
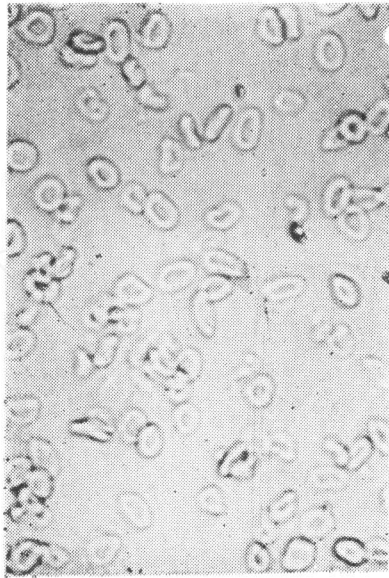
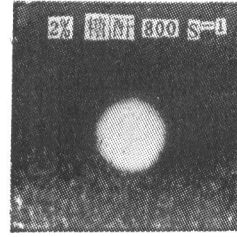
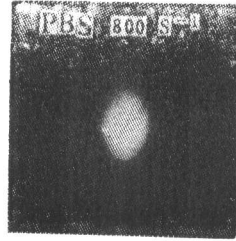
The explanation and meaning of these phenomena are discussed. Particularly, we have distinguished the contribution of small deformation for DI from that of the orientation with PBS buffer.

**Acknowledgement** This research was supported by the National Science Foundation of China.

**Key Words**, Ektacytometer, RBC deformability, Viscosity, Suspending medim.

# 悬浮介质对红细胞变形性测量的影响<sup>1</sup>

(正文见167页)



a. PBS悬浮介质

b. 右旋糖酐悬浮介质 ( $\eta = 2.3 \text{cP}$ )

图5 激光衍射图片及固化后的显微镜照片



## 悬浮介质对红细胞变形性测量的影响<sup>2</sup>

(正文见167页)

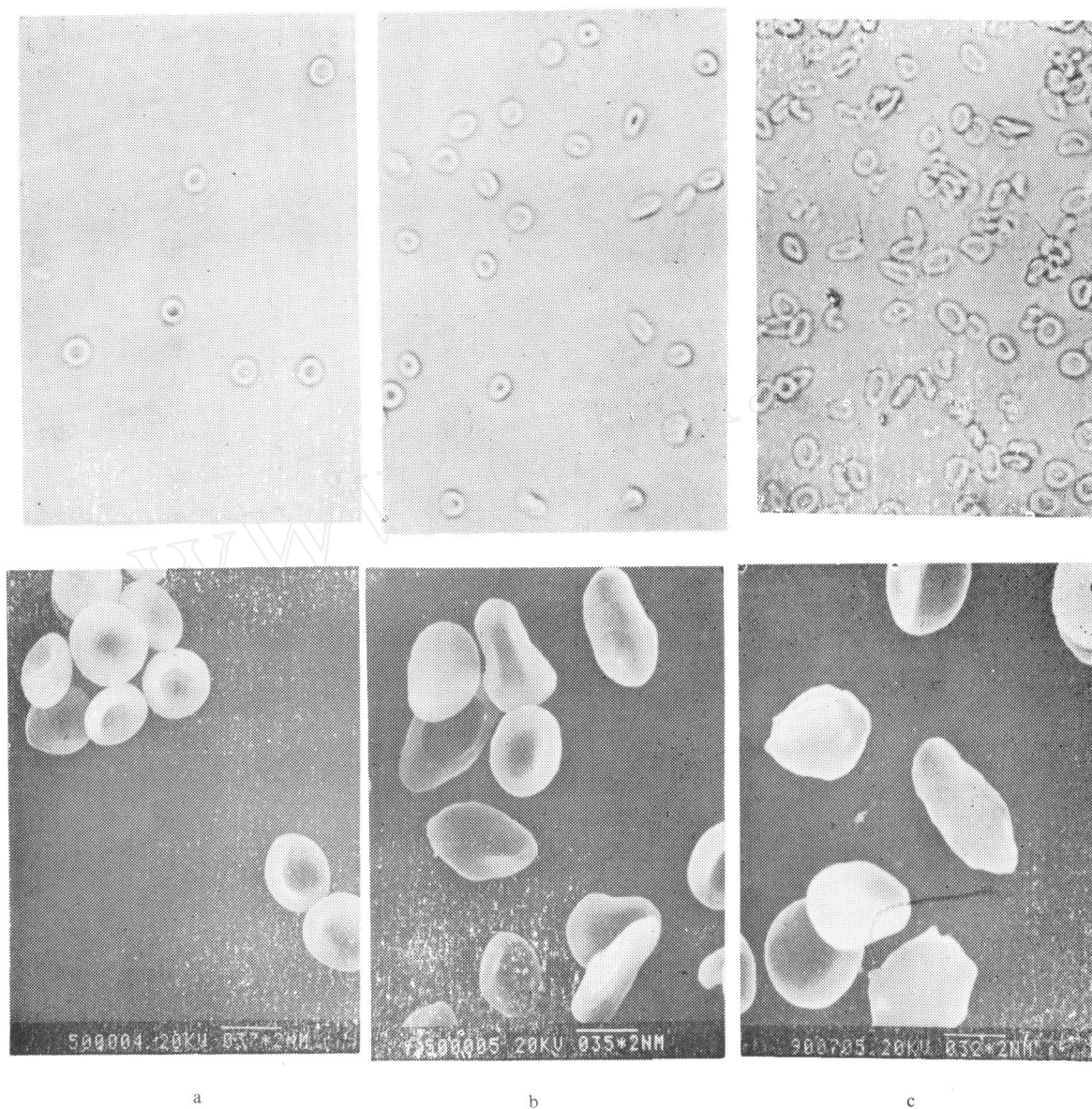


图6 a.b.c分别为三种切变率(10, 200, 800s<sup>-1</sup>)固化后的红细胞显微镜照片及扫描电镜照片