

研究简报

^{60}Co 辐射对网织红细胞微观流变学特性的影响*

谢利德^{1,2)} 杨海杰³⁾ 张卫光²⁾ 孙大公²⁾ 文宗曜²⁾** 谭文长¹⁾

(¹⁾ 北京大学力学与工程科学系, 北京 100871; (²⁾ 北京大学基础医学院物理教研室, 北京 100083;

(³⁾ 承德体育运动学校, 承德 067000)

摘要 采用 ^{60}Co 大剂量全身均匀急性辐射的方法, 造成一种辐射贫血的动物模型. 以便在几天内连续研究 ^{60}Co 辐射对新生的网织红细胞及红细胞流变学特性的影响. 采用一种在低粘切变流场中能将红细胞变形指数 DI 分解为取向指数 (DI)_o 和小变形指数 (DI)_s 的新型激光衍射法, 对网织红细胞及红细胞的变形指数、取向指数、综合变形指数 (IDI) 等血液流变学特性参数进行测量, 发现在 ^{60}Co 大剂量辐射后, 新生的网织红细胞及红细胞流变学特性存在明显异常. 将这种 ^{60}Co 辐射造成的贫血模型与文宗曜等提出的用抗体诱导的大量同步化的球形红细胞贫血模型相比较, 后者更具有明显的优点. 同时为研究辐射对血液流变特性的影响及正确地挑选红细胞衰老模型提供了理论与实验的基础.

关键词 新型激光衍射法, 网织红细胞, 微观流变特性, 变形指数, 取向指数

学科分类号 R318.01

随着医疗水平的不断提高, 放射线在诊断与治疗等方面的应用越来越多, 人们接触射线的机会也大量增加, 射线泄漏引起贫血的事故也时有发生. 辐射对动物体的影响是医学放射生物学的研究重点. 辐射对动物体循环系统的影响是全方位的, 就循环系统而言, 急性放射病对大、中型血管病变较轻, 而以小动静脉及毛细血管的变化最为显著. 慢性放射病时, 小血管的放射损伤在机体许多重要器官的损伤发病过程中起着重要的作用^[1]. 以往许多科学家从白细胞的角度研究了辐射的影响^[2], 对网织红细胞及红细胞的流变特性的影响研究甚少, 而红细胞是动物体循环系统中最多的有形成分, 其流变特性不仅决定了其本身的寿命, 而且在很大程度上决定了整个机体微循环的好坏, 进而影响脏器的生理状况. 所以, 在研究辐射对机体微循环系统的影响时, 有必要考虑网织红细胞及红细胞流变特性的变化. 因此我们研究了由于强剂量 ^{60}Co 急性辐射造成贫血后, 在病理条件下产生的大量代偿性新生红细胞微观流变学特性的变化规律^[3]. 同时发现在动物受到 ^{60}Co 急性辐射后的相当长时间内, 全血中含有大量 (20% 左右) 尚未成熟的红细胞——网织红细胞, 而网织红细胞流变学特性与生物物理特性的研究在中外文献中均未有见. 因此, 弄清网织红细胞流变学特性的变化规律, 以及网织红细胞对全血流变学特性的影响, 不仅有重

要的基础理论意义, 更具有重大的临床意义.

同时我们还对用强剂量 ^{60}Co 急性辐射造成贫血, 是否是获得网织红细胞的最佳方法作了评价, 为以后研究网织红细胞, 提供获得网织红细胞的最好方法作了充分的实验准备.

1 材料与方法

1.1 材料

北京普利生仪器中心生产的 LBY-BX2 型激光衍射仪, 北京大白兔 (体重 2.5 ~ 3 kg, 年龄 8 个月左右, 由北京医科大学动物实验部提供), 肝素 (Sigma 公司), 肝素化红细胞压积管, 橡皮泥板, 红细胞压积测量尺, 3F-2 型多功能微量高速离心机.

等渗 PBS 缓冲液 (磷酸二氢钾 0.5 mmol/L, 磷酸氢二钠 0.02 mmol/L, 氯化钠 0.13 mmol/L, pH 7.4, 渗透压为 300 mOsm/kg); PVP 溶液 1 (分子质量 30 ku, pH 7.4, 渗透压 300 mOsm/kg, 3% PVP, 粘度 1.2 cP, 含 0.004% 的牛血清白蛋白); PVP 溶液 2 (分子质量 30 ku, pH 7.4, 渗透压 300 mOsm/kg, 15% PVP, 粘度 8 cP, 含 0.004% 的牛血清白蛋白), 网织红细胞染液 (煌

* 国家自然科学基金 (30170244 和 10172009)、中国博士后基金 (2003034083) 和河北省博士基金 (B20031158) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-82802419, E-mail: rheol@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2003-11-24, 接受日期: 2004-02-25

焦油蓝 1 g, 枸橼酸钠 0.5 g, 加生理盐水至 100 ml).

1.2 方法

1.2.1 取 10 只正常北京大白兔, 混合饲料喂养, 每次每只耳缘静脉取血 2 ml (新鲜肝素抗凝), 作以下测量.

- a. 用微压积管测定红细胞压积.
- b. 用 LBY-BX2 型激光衍射仪测红细胞在切变率为 $50 \sim 1\,000\text{ s}^{-1}$ 范围内的变形指数 DI (5 ml 溶液 2 配成浓度为 2×10^7 个/ml 的红细胞悬液), 和在切变率为 $50 \sim 140\text{ s}^{-1}$ 范围内的取向指数 $(DI)_{or}$ (5 ml 溶液 1 配成浓度为 2×10^7 个/ml 的红细胞悬液).

以上测量连续 5 天, 将每天所测结果取平均值, 作为辐射前的正常对照.

1.2.2 取方法 1 中的 7 只兔 (3 雌, 4 雄), 用 ^{60}Co (由北京医科大学钴源室提供) 一次性全身均匀辐射 7 Gy, 辐射后的第 2 天起, 每天每只耳缘静脉取血 1 ml (新鲜肝素抗凝), 用肝素化微压积管测定红细胞压积, 注意观察压积的变化情况, 从压积由最低点 (出现在辐射后的第 15 天左右) 开始上升时起, 对所取血液进行染色 (染液为黄焦油蓝, 染色 15 min), 制成涂片后在光学显微镜下计数网织红细胞个数, 并计算出网织红细胞占全血中红细胞的百分比.

1.2.3 当网织红细胞百分比达到 20% 左右时, 每隔 6 h 取血一次 2.5 ml (新鲜肝素抗凝), 作以下测量. 另外 3 只未照射兔 (2 雄, 1 雌) 同时作相应测量作为对照.

- a. 取 0.5 ml 全血, 用于激光衍射仪的各种测量.

- b. 用密度梯度离心法从余下的 2ml 全血中分离出网织红细胞, 待做各种测量.

- c. 用 LBY-BX2 型激光衍射仪分别测全血中的红细胞和分离出的网织红细胞, 在切变率为 $50 \sim 1\,000\text{ s}^{-1}$ 范围内的变形指数 DI (5 ml 溶液 2 配成浓度为 2×10^7 个/ml 的红细胞悬液及浓度为 2×10^7 个/ml 的网织红细胞悬液).

- d. 用 LBY-BX2 型激光衍射仪, 分别测全血中的红细胞和分离出的网织红细胞在切变率为 $50 \sim 1\,000\text{ s}^{-1}$ 范围内的综合变形指数 IDI (5 ml 溶液 2 配成浓度为 2×10^7 个/ml 的红细胞悬液及浓度为 2×10^7 个/ml 的网织红细胞悬液).
- e. 用 LBY-BX2 型激光衍射仪分别测全血中的

红细胞和分离出的网织红细胞, 在切变率为 $50 \sim 140\text{ s}^{-1}$ 范围内的取向指数 $(DI)_{or}$ (5 ml 溶液 1 配成浓度为 2×10^7 个/ml 的红细胞悬液及浓度为 2×10^7 个/ml 的网织红细胞悬液).

以网织红细胞百分比最大时为计时起点, 每隔 6 h 取血进行上述测量一次, 连续测量 72 h, 并将 0 ~ 72 h 的各种测量结果加以归纳总结.

1.3 统计分析

对上述结果采用 SAS 数理统计软件进行统计分析.

2 结 果

用微压积管测得的 ^{60}Co 照射后 0 ~ 60 天红细胞压积与正常对照组红细胞压积的变化曲线见图 1.

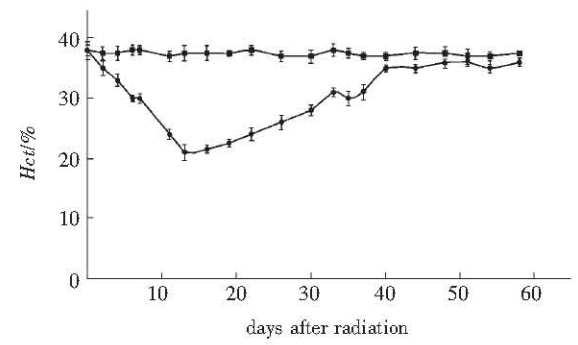


Fig. 1 A Hematocrit-days curve from 0 to 60 days after ^{60}Co radiation
■—■: Control; ●—●: After radiation.

在显微镜下, 用细胞计数板计数网织红细胞占全血红细胞百分比 (图 2).

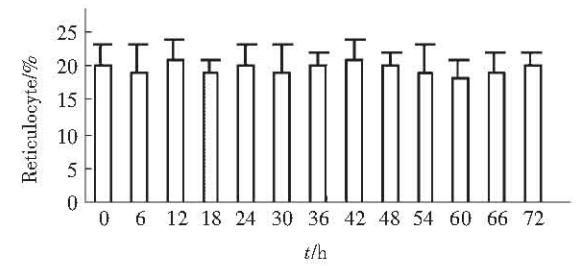


Fig. 2 The percent of reticulocyte in red blood cell

用激光衍射仪分别测全血中的红细胞和分离出的网织细胞, 在切变率为 $1\,000\text{ s}^{-1}$ 时的变形指数 DI (图 3).

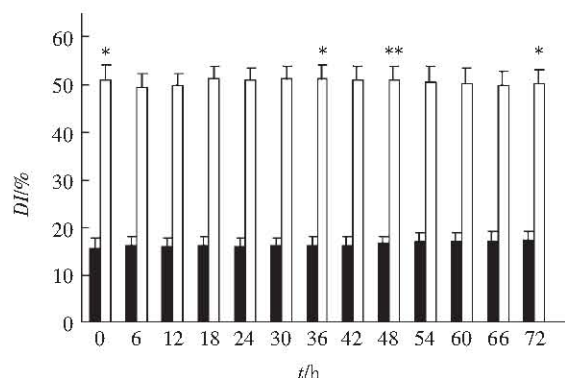


Fig. 3 The changing of maximum deformation index of reticulocyte and red blood cell

用激光衍射仪, 测得全血中红细胞和分离出的网织红细胞综合变形指数 IDI 的变化 (图 4)。

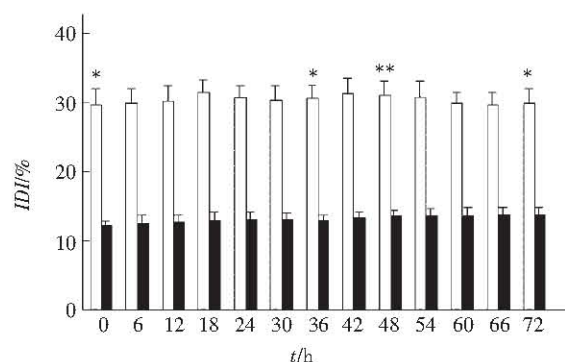


Fig. 4 The changing of deformation index (IDI) of reticulocyte and red blood cell

用激光衍射仪, 测得全血中红细胞和分离出的网织红细胞的取向指数 (DI_{or}) (图 5)。

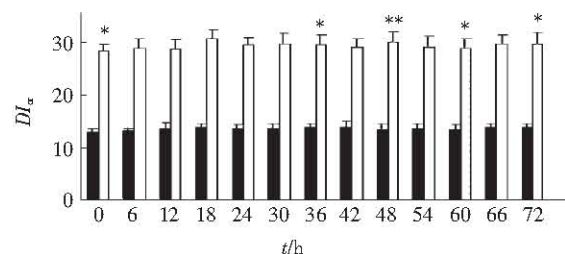


Fig. 5 Orientation index (DI_{or}) of reticulocyte and red blood cell

3 讨 论

由图 1 可见, 在照射后 16 天内红细胞压积总的变化趋势是逐渐减小, 16 ~ 19 天达到最低点, 这是因为动物体在受到大剂量急性辐射时, 造血系统中造血干、祖细胞和幼稚祖细胞对射线十分敏感, 受照射后很快分裂增殖受抑^[1], 甚至完全丧失, 使外周血中成熟血细胞的来源匮乏, 加上成熟红细胞消耗增加和死亡加速, 因此全血中的红细胞逐渐减少, 导致红细胞压积逐渐减小, 照射剂量越大, 造血损伤越重, 外周血细胞的减少越甚, 从而红细胞压积减小越显著且越早, 但照射剂量大于 8.5 Gy 会使动物在短期内死亡。照射 15 天以后, 随着机体辐射损伤的逐渐恢复, 血液中尚未成熟的红细胞——网织红细胞生成大量增多, 红细胞压积逐渐增大, 43 天以后, 达到一相对稳定值, 此值略小于照射前对照值, 是因为造血系统受辐射后, 造血机能减弱所致。值得注意的是由于新生的网织红细胞及其转变成的红细胞是逐渐增加的, 故这些网织红细胞并不是同步生长的, 因此导致各种测量得到的指标只是各个不同时期网织红细胞的平均结果, 而无法得到由网织红细胞转变为成熟红细胞过程中某个具体阶段网织红细胞的流变学结果。

由图 2 可见, 自从动物受辐射后 15 天左右在全血中大量出现网织红细胞起, 在相当长的时间内网织红细胞在全血中所占的比例在 20% 左右。这是因为动物体在受到大剂量急性辐射时, 一方面新生红细胞的生成受抑, 外周血中成熟红细胞的来源匮乏, 另一方面成熟红细胞消耗增加和死亡加速, 因此全血中的红细胞逐渐减少, 在此情况下, 为补偿生理需求, 并随着机体受辐射的恢复, 血液中有大量尚未成熟的红细胞——网织红细胞生成, 但由于原有红细胞死亡是逐渐进行的, 并且持续的时间也较长, 是不同步的。因此导致新生网织红细胞的不同步。同时, 由于机体受辐射的恢复是逐渐的, 因此产生网织红细胞的能力也是有限的, 网织红细胞在全血中所占的比例也不会太高, 只能逐步补偿生理需求, 持续的时间也较长。43 天以后, 网织红细胞在全血中所占的比例小于 5%, 基本达到正常。

由图 3 可见, 在照射 15 天后, 从全血中分离出的网织红细胞变形指数 DI 在 72 h 内的各点均为

15% ~ 20%，而与此相应各点的全血中红细胞的变形指数均为 50% 左右，两者之间存在着显著性差异。这主要是由于辐射对造血干细胞、祖细胞、幼稚红细胞等早期细胞的损伤要远比对成熟红细胞的损伤大^[1]，因此由这些早期受辐射过的幼稚细胞分化而得到的网织红细胞变形能力，自然不如循环系统中原有的、对射线不敏感的成熟红细胞的变形性好，其变形指数 DI 也就与成熟红细胞的变形指数之间存在着显著性差异。另外在网织红细胞中仍然留有大量的染色质颗粒^[2]，这些染色质颗粒的存在自然会影响到其自身的变形性，使其变形能力不如成熟红细胞好。还有，网织红细胞的双凹圆盘形远不如成熟红细胞的双凹圆盘形好，表面积与体积比远没有成熟红细胞的表面积与体积比大^[4,5]，因此也使其变形性不如成熟红细胞好。

在此过程中，受辐射后的红细胞变形指数 50% 左右，与辐射前及对对照动物红细胞的变形指数 60% 左右之间也存在着显著性差异，这主要由于受照后，全血中的新生红细胞来源匮乏，原有红细胞普遍逐渐老化，老化的红细胞变形能力降低^[6]，因而导致其变形指数 DI 下降，另外还由于造血系统辐射损伤后所产生的新生红细胞功能下降，血液中还存在着大量的 20% 网织红细胞，因此，使受辐射后的红细胞变形指数与辐射前及对对照动物红细胞变形指数之间存在着显著性差异。

由图 4 可见，受照射从全血中分离出的网织红细胞的综合变形指数 IDI 在 72 h 内的各点均为 12% ~ 15%，而与此相应各点的全血中红细胞的综合变形指数均为 30% 左右，两者之间存在着显著性差异。综合变形指数 IDI 也叫积分指数，是指细胞在剪切应力的作用下其变形达到最大之前，每一时刻变形值对时间的积分，它反映的是细胞内容物与细胞膜二者整体变形能力的总和。因此，在网织红细胞的变形指数 DI 与红细胞的变形指数存在显著性差异的情况下，自然要影响到它们响应的综合变形指数。另外，辐射对幼稚细胞的影响要远大于对成熟红细胞的影响，对新生网织红细胞膜的损伤也大于对成熟红细胞的损伤，这一点从对网织红细胞表面电荷的测试中得到证明，因此，使网织红细胞膜的变形能力也有所下降，导致网织红细胞的综合变形指数 IDI 明显低于全血中红细胞的综合变形指数。

由图 5 可见，受照射从全血中分离出的网织红细胞的取向指数 $(DI)_{or}$ 在 72 h 内的各点均为 11%

~ 13%，而与此相应各点的全血中红细胞的取向指数均为 27% 左右，两者之间存在着显著性差异。取向指数 $(DI)_{or}$ 是指细胞在流场中沿剪切应力的方向流动时，沿 $C=0$ 轨道^[7]运动的细胞占有细胞的百分数，它反映的是细胞变形性与细胞整体形状的好坏，变形性越好，双凹圆盘形越好，形状越完整，取向指数越大，反之越小。因此，在网织红细胞的变形指数 DI 与红细胞的变形指数存在显著性差异的情况下，自然要影响到它们响应的取向指数。另外，辐射对幼稚红细胞的影响要远大于对成熟红细胞的影响，对新生网织红细胞的双凹圆盘形的损伤也大于对成熟红细胞的损伤，因此，使网织红细胞的取向能力也有所下降，导致网织红细胞的取向指数 $(DI)_{or}$ 明显低于全血中红细胞的取向指数。

由于辐射对机体的损伤是全方位的，恢复期较长，通常为几周或几个月，网织红细胞大量出现的时间就在 30 天左右或更长。因此，本模型在造成动物贫血的程度上受很大限制，过量照射易造成动物死亡（正如实验过程中所证实的那样，有几只因此而死亡），本模型造成贫血时的最小压积在 20% 以上，贫血程度小，贫血后的恢复期很长，不利于网织红细胞的同步产生与生长。所以本模型造成贫血的效果不理想。

此模型作为网织红细胞在体同步转化为成熟红细胞的模型是不合适的，但作为辐射对网织红细胞流变学特性影响的研究仍存在重要意义。

参 考 文 献

- 1 夏寿萱. 放射生物学. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 196 ~ 217
Xia S Y. Radiobiology. Beijing: Science Publishing Company of Military Affairs Medicine, 1998. 196 ~ 217
- 2 刘树伟. 医学放射生物学. 北京: 原子能出版社, 1986. 30, 202
Liu S Z. Radiobiology of Medicine. Beijing: Publishing Company of Atomic Energy, 1986. 30, 202
- 3 陈凯, 谢利德, 张平, 等. ^{60}Co 辐射对红细胞膜剪切弹性模量和表面粘度的影响. 生物医学工程学杂志, 2001, 18 (2): 206 ~ 209
Chen K, Xie L D, Zhang P, et al. Journal of Biomedical Engineering, 2001, 18 (2): 206 ~ 209
- 4 Wen Z Y, Song L C, Yan Z Y, et al. A new animal model of erythrocyte senescence: the alteration of surface charge and the rheological properties of erythrocyte during its life span. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 1998, 7 (2): 75 ~ 86
- 5 谢利德, 孙大公, 姚伟娟, 等. 在体网织红细胞微流变学特性的研究. 中国科学 (C 辑), 2001, 31 (1): 78 ~ 83
Xie L D, Sun D G, Yao W J, et al. Science in China (series C), 2001, 31 (1): 78 ~ 83

- 6 宋立川, 吕智红, 孙大公, 等. 红细胞衰老过程中的密度变化. 中国生物医学工程学报, 1997, **16** (3): 219 ~ 222
Song L C, Lv Z H, Sun D G, *et al.* Chinese Journal of Biomedical Engineering, 1997, **16** (3): 219 ~ 222

- 7 Wen Z Y, Yan Z Y, Gao T, *et al.* A study of the biophysical meanings of orientation and deformation of RBCs in shear flow field of low viscosity with new Ektacytometry. Science in China (Series C), 1998, **41** (1): 195 ~ 202

Study of The Microrheological Characteristics of Reticulocytes With ^{60}Co Radiation *

XIE Li-De^{1,2)}, YANG Hai-Jie³⁾, ZHANG Wei-Guang²⁾,
SUN Da-Gong²⁾, WEN Zong-Yao²⁾ **, TAN Wen-Chang¹⁾

(¹⁾ Department of Mechanics and Engineering Science, Peking University, Beijing 100871, China;

²⁾ Department of Medical Physics, Medical College of Beijing University, Beijing 100083, China;

³⁾ School of Physical Education of Chengde City, Chengde 067000, China)

Abstract The microrheological characteristics of reticulocytes *in vivo* was studied. Method of anemia in rabbits induced by ^{60}Co radiation was used. The measurements of percent of reticulocytes, deformation index, orientation index, etc in the processes of reticulocytes changing into erythrocytes *in vivo* for 72 h were performed. It was shown that there were obvious changes in the reticulocytes rheological characteristics in the courses of this changing. Therefore, the found had some basic theoretical and clinical significance.

Key words new ektacytometry, reticulocytes, microrheological characteristics, deformation indexes, orientation indexes

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30170244, 10172009), The China Postdoctoral Science Foundation (2003034083) and The Hebei Doctoral Foundation (B20031158).

** Corresponding author. Tel: 86-10-82802419, E-mail: rheol@bjmu.edu.cn

Received: November 24, 2003 Accepted: February 25, 2004