

• 基础实验研究 •

高原人附红细胞体致家兔红细胞损伤的实验研究*

石泉贵, 鞠明兵, 陈洪章, 陈微微, 黄学文, 齐宝宏

(西藏军区总医院检验科, 拉萨 850007)

摘要:目的 通过不同剂量人工接种, 采用人附红细胞体感染移居高原(海拔 3 700 米)的成年家兔, 观察感染后家兔红细胞渗透脆性和血浆游离血红蛋白的变化。方法 选取移居高原适应 30 d 以上的成年家兔 150 只, 随机分为 5 组, 每组 30 只, 经耳静脉接种人附红细胞体之后, 连续 30 d 观察相关指标, 分别于接种前 1 d、窗口期、高峰期和消失期对家兔耳采静脉抽血测定红细胞渗透脆性及血浆游离血红蛋白。结果 窗口期观察 2 组、观察 3 组红细胞脆性增加, 高峰期各观察组红细胞脆性均增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 消失期各观察组接近接种前和对照组($P > 0.05$); 窗口期、高峰期各观察组血浆中游离血红蛋白均升高, 消失期观察 2 组、观察 3 组血浆中游离血红蛋白升高($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 观察 1 组接近接种前和对照组($P > 0.05$)。结论 高原环境条件下人附红细胞体感染成年家兔, 红细胞脆性增加, 致红细胞损伤破坏, 血浆中游离血红蛋白升高, 变化与接种量有关。

关键词: 红细胞; 兔; 创伤和损伤; 高原; 人附红细胞体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2079-03

Injury of rabbit red blood cell at high altitude caused by human Eperythrozoon*

Shi Quanguai, Ju Mingbing, Chen Hongzhang, Chen Weiei, Huang Xuewen, Qi Baohong

(Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Tibet Military Command, Lhasa 850003, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the influence of human Eperythrozoon on the osmotic fragility of red blood cell (RBC) and the level of plasma free hemoglobin in adult rabbits, immigrated to the plateau with altitude of 3 700 meters. **Methods** 150 adult rabbits, adapting to plateau migration for more than 30 days, were randomly divided into 5 groups with 30 rabbits for each group and were inoculated via ear vein with human Eperythrozoon. Relevant indicators were observed for 30 days after inoculation, and the osmotic fragility of RBC and the level of plasma free hemoglobin were detected 1 day before inoculation, window period, peak period and disappearance period. **Results** The osmotic fragility of RBC in observed group 2 and 3 during window period increased, also in all groups during peak period ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but that in all observed groups during disappearance period had no significance with that detected before inoculation and that in control group ($P > 0.05$). During window and peak period, the plasma free hemoglobin in all observed groups increased, but during disappearance period, only that in observed group 2 and 3 still remained increasing ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and that in observed group 1 was close to that detected before inoculation and that in control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The infection of human Eperythrozoon in adult rabbits at high altitude might increase the osmotic fragility of RBC, causing the destruction of RBC and the increase of plasma free hemoglobin, the changes of which might be related to the inoculation dose.

Key words: erythrocytes; rabbits; wounds and injures; plateau; eperythrozoon

人附红细胞体(eprethrozoon)是寄生于人或动物红细胞表面、血浆和骨髓中的一群多形态单细胞原生物, 它可引起一种新的人兽共患病——人附红细胞体病(eprethrozoonosis), 该病以发热、贫血、黄疸等为主要临床表现。人附红细胞体病被发现后, 已有 30 多个国家和地区相继报道, 其中多为动物和家畜感染^[1-3]。由于人附红细胞体病传播广泛, 对畜牧经济造成的危害较大, 越来越引起全世界畜牧兽医界、外经贸检疫界重视, 但其对人体危害尚未引起医学界足够重视。现对西藏人畜禽人附红细胞体感染进行了流行病学调查, 并在收治人附红细胞体病患者的实践中, 积累了一定的临床经验^[4-5]。为进一步认识人附红细胞体病, 探讨高原环境条件下人附红细胞体病的发病机制, 对高原人附红细胞体致成年家兔红细胞损伤进行了实验观察, 旨在为高原地区人附红细胞体病防治积累更多的资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1) 阳性血液标本选择经该院(海拔 3 700 m)确诊、血涂片染色镜检为重度感染的(100 个红细胞中有 60 个以上红细胞被人附红细胞体寄生)人附红细胞体病住院患者, 于治疗前采静脉血置干燥无菌含有双草酸盐抗凝剂容器内, 轻轻转动容器混匀, 防止血液凝固, 4 ℃冰箱保存备用。(2) 阴性血液标本选择拉萨市区经健康体检、血液涂片染色光镜镜检 3 次并行电镜检查无人附红细胞体感染的献血者, 与阳性血液标本同一时间按相同方法采静脉血轻轻混匀, 4 ℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 接种动物 健康成年家兔(4 月龄)150 只, 平均体质量($2\ 369 \pm 14$)g, 雌雄均可, 由第三军医大学动物实验中心提供, 经空运至拉萨(海拔 3 700 米), 饲养适应 30 d 以上, 连续 3 次

* 基金项目: 西藏自治区“十五”重点科技项目(2001-100)。

血涂片光镜检查无人附红细胞体感染。

1.2.2 分组及接种 双盲法随机分为 5 组, 每组 30 只。分别

于耳静脉接种阳性血液(观察组)、阴性血液(对照组)、生理盐水(盐水对照组), 分组饲养。见表 1。

表 1 分组及接种剂量情况

组别	例数(<i>n</i>)	接种样品	接种剂量	接种方式
观察 1 组	30	阳性血液	血液 0.5 mL+生理盐水 1.5 mL	耳静脉接种
观察 2 组	30	阳性血液	血液 1.0 mL+生理盐水 1.0 mL	耳静脉接种
观察 3 组	30	阳性血液	血液 2.0 mL	耳静脉接种
阴性对照组	30	阴性血液	血液 2.0 mL	耳静脉接种
盐水对照组	30	生理盐水	盐水 2.0 mL	耳静脉接种

1.2.3 检测项目 不同剂量耳静脉人工接种后, 每天定时观察动物临床症状, 测量体温, 采静脉血、涂片、瑞氏染色, 镜检人附红细胞体, 以确定家兔有无感染人附红细胞体及感染的窗口期、高峰期和消失期。分别于接种前 1 d、窗口期、高峰期和消失期对家兔耳采静脉血测定红细胞渗透脆性及血浆游离血红蛋白, 红细胞渗透脆性测定采用红细胞孵育渗透脆性试验, 血浆游离血红蛋白测定采用邻-甲联苯胺法, 均按常规方法进行

操作。

1.3 判定方法和标准 (1)阳性标准: 检测 100 个视野, 只要查到 1 个人附红细胞体存在即判为阳性。(2)感染强度: 计数 100 个视野红细胞上人附红细胞体数量, 计算平均每个红细胞上人附红细胞体数量, 将人附红细胞体感染强度分为轻度、中度和重度三级。平均 100 个红细胞中有 30 个以下被人附红细胞体寄生者定为轻度, 有 31~60 个定为中度, 有 60 个以上定为重度。(3)窗口期: 指人工感染成年家兔后血液涂片检查, 首次检出人附红细胞体的天数。即检查 100 个视野, 查到第 1 个人附红细胞体时的时间。(4)高峰期: 指人工感染成年家兔后血液涂片检查, 检出平均 100 个红细胞有 80 个以上红细胞被人附红细胞体寄生时, 表示人附红细胞体感染达到高峰。(5)

消失期: 指人工感染成年家兔已出现窗口期和高峰期后, 血液涂片检查, 未检出人附红细胞体的天数。即检查 100 个视野, 未查到 1 个红细胞被人附红细胞体寄生的时间, 表示人附红细胞体已从成年家兔体内消失。

1.4 统计学处理 实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示, 显著性检验采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 不同剂量接种致成年家兔感染结果 见表 2。

2.2 高原人附红细胞体感染成年家兔红细胞渗透脆性测定结果 见表 3。

2.3 高原人附红细胞体感染成年家兔血浆游离血红蛋白测定结果 见表 4。

2.4 家兔临床表现实验过程中, 在窗口期观察 1 组有 6 只、观察 2 组有 12 只、观察 3 组有 18 只出现食欲减退和精神不佳; 高峰期各观察组均出现食欲减退和精神不佳, 其余均无异常表现。在窗口期、高峰期各观察组体温均高于 39.0℃(健康家兔体温为 38.0~39.0℃), 最高达 41.9℃; 在消失期观察 3 组仅有 1 只成年家兔体温为 39.7℃, 其余均无体温升高。

表 2 不同剂量接种致成年家兔感染结果

组别	例数(<i>n</i>)	接种方式	接种剂量	窗口期(d)	高峰期(d)	消失期(d)
观察 1 组	30	耳静脉接种	血液 0.5 mL + 生理盐水 1.5 mL	6	16	27
观察 2 组	30	耳静脉接种	血液 1.0 mL + 生理盐水 1.0 mL	5	16	28
观察 3 组	30	耳静脉接种	血液 2.0 mL	4	15	29
阴性对照组	30	耳静脉接种	血液 2.0 mL	0	0	0
盐水对照组	30	耳静脉接种	盐水 2.0 mL	0	0	0

表 3 人附红细胞体感染成年家兔红细胞渗透脆性测定结果($\bar{x}\pm s$, g/L)

组别	例数 (<i>n</i>)	接种前		窗口期		高峰期		消失期	
		开始溶血	完全溶血	开始溶血	完全溶血	开始溶血	完全溶血	开始溶血	完全溶血
观察 1 组	30	4.39±0.110	3.33±0.111	4.75±0.136	3.49±0.145	5.600±0.134 ^{②△}	3.96±0.123 ^{②△}	4.40±0.169	3.36±0.112
观察 2 组	30	4.34±0.117	3.22±0.101	4.91±0.128 ^{①*}	3.55±0.157 ^{①*}	5.760±0.116 ^{②△}	4.10±0.116 ^{②△}	4.28±0.156	3.41±0.106
观察 3 组	30	4.35±0.117	3.39±0.123	5.63±0.128 ^{①*}	3.63±0.106 ^{①*}	6.120±0.133 ^{②△}	4.22±0.124 ^{②△}	4.22±0.145	3.57±0.162
阴性对照组	30	4.33±0.111	3.37±0.118	4.36±0.133	3.38±0.110	4.320±0.154	3.75±0.119	4.18±0.158	3.46±0.117
盐水对照组	30	4.36±0.161	3.35±0.117	4.38±0.109	3.37±0.101	4.360±0.135	3.30±0.108	4.26±0.134	3.59±0.127

①、②: 分别与接种前比较, *P*<0.05, *P*<0.01; *、△: 分别与对照组比较, *P*<0.05, *P*<0.01。

表 4 人附红细胞体感染成年家兔血浆游离血红蛋白测定结果($\bar{x}\pm s$,mg/L)

组别	例数(<i>n</i>)	接种前	窗口期	高峰期	消失期
观察 1 组	30	34.10±2.45	61.33±10.41 ^{①*}	145.00±13.26 ^{②△}	36.51±5.40
观察 2 组	30	34.30±2.59	67.53±11.49 ^{①*}	174.00±12.70 ^{②△}	39.48±4.39 ^{①*}
观察 3 组	30	33.87±2.89	81.53±10.38 ^{①*}	224.00±16.30 ^{②△}	48.54±5.66 ^{①*}
阴性对照组	30	33.70±2.69	32.30±3.31	34.18±4.06	33.65±3.17
盐水对照组	30	33.90±2.70	33.43±2.42	35.24±3.63	32.71±3.06

①、②:与接种前比较, $P<0.05$, $P<0.01$;*:△与对照组比较, $P<0.05$, $P<0.01$ 。

3 讨 论

人附红细胞体在人群中感染虽然较高,但发病率较低。多数学者认为,人附红细胞体的毒力较低,致病力较弱,多呈潜伏状态,只有当机体处于应激状态下才可能发病^[6-8]。人附红细胞体感染机体后引起人附红细胞体病的发病机制,目前还不十分清楚,有学者认为人附红细胞体病的发病主要是自身免疫和吞噬细胞的作用所致^[9-10]。选用红细胞渗透脆性实验和血浆游离血红蛋白作为红细胞损伤指标,观察高原人人附红细胞感染高原适应 1 个月的成年家兔红细胞损伤状况,以探讨高原环境条件下人附红细胞体病的发病机制。

3.1 接种剂量与各期出现时间 本实验结果显示,在高原低氧、低气压、强幅射、低湿度的特殊自然环境条件下,高原人附红细胞体感染成年家兔后,相同的接种方式,不同的接种剂量窗口期出现时间为 4~6 d,高峰期出现时间为 15~16 d,消失期出现的时间为 27~29 d。接种量多者窗口期出现时间早,高峰期出现时间早,而消失期出现时间晚,接种量少者则与之相反。这一现象对人附红细胞体病病情的判断与评估具有重要的临床意义。

3.2 接种剂量与红细胞脆性 红细胞渗透脆性是红细胞损伤破坏的重要指标,以开始溶血和完全溶血表示。相同的接种方式,随着接种剂量加大,人附红细胞体感染成年家兔后,窗口期时红细胞渗透脆性实验开始溶血与完全溶血的值均有不同程度的增加,并随接种人附红细胞体感染剂量的增加而升高;高峰时期各观察组红细胞渗透脆性实验开始溶血与完全溶血的值均增加;消失期随接种人附红细胞体感染剂量的增加开始溶血与完全溶血的值也有不同程度的增加。说明人附红细胞体感染机体、黏附红细胞后影响红细胞的变型性,红细胞脆性增加致红细胞损伤,破坏溶血。

3.3 接种剂量与血浆游离血红蛋白 血浆中游离血红蛋白系血管内溶血的血红蛋白超过触珠所能结合的量时出现,常因机体内红细胞破坏增加、增速、超过造血补偿能力范围所致。本实验结果显示,相同的接种方式,不同的接种剂量,人附红细胞

体感染成年家兔后,各观察组在窗口期和高峰期血浆中游离血红蛋白均明显增加,与接种前和对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 和 $P<0.01$);消失期观察 1 组血浆中游离血红蛋白接近接种前水平($P>0.05$),观察 2 组、观察 3 组血浆中游离血红蛋白仍高于接种前和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明人附红细胞体虽已在体内消失,红细胞未能继续损伤破坏,红细胞脆性未能再增加,但血浆中游离血红蛋白仍在分解代谢,提示机体仍处于恢复期。

参考文献

[1] 尚德秋. 附红细胞体病研究进展[J]. 中华流行病学杂志,1994,15(4):234-236.

[2] 尚德秋,李兰玉,栾景辉,等. 附红细胞体感染人畜的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志,1995,16(3):143-146.

[3] 陶小润,王显军,孙桐,等. 山东省附红细胞体的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志,2001,22(5):359-361.

[4] 石泉贵,陈洪章,卢永周,等. 西藏附红细胞体感染人畜禽的流行病学调查[J]. 中华医药卫生杂志,2004,2(4):7-9.

[5] 石泉贵,李素芝,陈洪章,等. 高原附红细胞体的临床特点[J]. 中华临床医学研究杂志,2004,10(89):987-989.

[6] 侯安祖. 猪病诊断与防治[M]. 北京:中国农业科技出版社,2000:332-335.

[7] 张伟清,徐丽华. 猪犬人坠附红细胞体对小鼠的感染试验[J]. 中国兽医科技,2003,33(6):50-53.

[8] 李芬,刘毅,晏霞. 反刍兽源附红细胞体感染小鼠的研究[J]. 中国实验动物学报,2004,12(3):166-168.

[9] 华修国,李宏全. 附红细胞体患者病理组织学血液学变化的研究[J]. 上海农学院学报,1998,16(2):116-119.

[10] 杨玉芝. 附红细胞体病研究进展[J]. 安徽医药,1999,20(4):67-69.

(收稿日期:2011-06-19)

(上接第 2078 页)

程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:168-171.

[3] Scott MD,Murad KL,Koumpouras F,et al. Chemical camouflage of antigenic determinants:“Stealth” erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(14):7566-7571.

[4] 李璐,李平,顾光煜,等. 甲氧基聚乙二醇修饰红细胞解决自身免疫性疾病所致配血困难研究[J]. 临床检验杂志,2009,27(2):94-96.

[5] 张之南,李蓉生. 红细胞疾病基础与临床[M]. 北京:科学技术出

版社,2000:16-22.

[6] 欧阳红梅,张芹,甸自金,等. CD55 和 CD59 在健康者红细胞及中性粒细胞上表达的研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(2):109-110.

[7] 袁育康. 医学免疫学[M]. 北京:科学技术出版社,2010:281-283.

[8] 和迎春,宋建新,张群智. CD55 和 CD59 在特发性血小板减少性紫癜发病中的研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):238-239.

(收稿日期:2011-04-18)