

• 论 著 •

显微相衬技术分析去白细胞悬浮红细胞上清液不同 存储期内细胞碎片及微粒的图像变化*

邓智豪¹, 官亚妹^{1△}, 伍伟健¹, 陀伟为², 黄耀熊²

(1. 广东省佛山市中心血站 528000; 2. 暨南大学生物医学工程系, 广州 510632)

摘要:目的 探索库存去白细胞悬浮红细胞, 随着保存时间的延长, 红细胞破损或溶血而产生的细胞碎片及微粒变化, 为输血安全提供启示性实验基础。方法 取不同保存天数(3、7、14、21 d)的库存去白细胞悬浮红细胞进行上清液制备, 通过显微静态图像分析技术对上清液中的微粒进行观察和形态分析。结果 保存 3 d 和 7 d 的样品上清液中可见少量微粒, 微粒大小和细胞相仿; 从 14 d 开始微粒的数量显著增加, 微粒粒径更小, 到 21 d 微粒铺满了整个视场, 呈现碎片化。结论 保存期超过 14 d 的库存去白细胞悬浮红细胞, 其上清液的细胞碎片及微粒显著增多, 较保存期不到 14 d 的细胞均有显著的差异。这些外源细胞碎片或微粒可能会成为抗原并引起机体的免疫反应, 导致输血不良反应发生, 建议临床上给患者输注保存期在 14 d 以内的去白细胞悬浮红细胞。

关键词:去白细胞悬浮红细胞; 不同存储期; 显微相衬图像

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)14-1939-03

Analysis on aleukocytic suspending red blood cell supernatant fragment and particle image changes at different stored periods by microscopic phase contrast technology*

DENG Zhihao¹, GUAN Yamei^{1△}, WU Weijian¹, TUO Weiwei², HUANG Yaoxiong²

(1. Foshan Municipal Central Blood Station, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cellular fragments and particle image changes of inventory aleukocytic suspending RBC produced by the storage time extension, RBC damage or hemolysis in order to provide the revelatory experimental basis for the transfusion safety. **Methods** The supernatant was prepared from different stored days (3, 7, 14, 21 d) of stock aleukocytic suspending RBC. The particles in supernatant were observed and morphologically analyzed by using the microscopic static image analytic technology. **Results** There were a small amounts of visible particles in the sample supernatant preserved for 3, 7 d and the particles' sizes are similar to cells'; the number of particles began to significantly increase from 14 d and the diameter became smaller. The particles filled the entire field until 21 d, showing fragmentary status. **Conclusion** The cellular fragments and particles in the supernatants of stock aleukocytic suspending RBC with the storage period exceeding 14 d are significantly increased and have significant difference compared with those stored for less than 14 d. These exogenous fragments and particles may become antigens and induce the body immune response, lead to transfusion adverse reactions. It is recommended that the patients should be transfused with stock aleukocytic suspending RBC within a storage period of 14 d.

Key words: aleukocytic suspending red blood cell; different stored periods; microscopic phase contrast image

长时间库存的血液制品是否存在隐患已吸引了学界越来越多的关注, 时有报道的因输注旧血而导致的医疗事故也引起了人们恐慌。2006 年, Timmouth 等^[1]报道, 输注了保存时间超过 14 d 的库存红细胞的患者出现并发症的概率明显比输注保存时间短(少于 7 d)的红细胞的患者高。Offner 等^[2]在对因外伤而需要接受输血的患者的研究中发现输注保存超过 14 d 红细胞的患者比输注保存时间少于 14 d 的患者更容易发生感染。Koch 等^[3]分析了 1998~2006 年 2 872 例接受心脏搭桥手术的患者手术结束当天、术后 3 d 及术后恢复 1 年内发生并发症的情况, 发现输注保存超过 2 周的红细胞会明显增加术后并发症的发生概率, 并提出将保存超过 14 d 的血液划分为旧血。在通常情况下, 库存红细胞在储存过程中会发生一系列生物化学与结构上的改变, 且随着储存时间的延长变化更加显著, 这些改变通常被统称为红细胞的储存损伤, 临床数据显示全血及红细胞制品储存时间越长输血效果越差且可增加输血相关不良反应发生的风险^[4-6]。其中, 细胞碎片或微粒是红

细胞储存损伤的 1 种重要产物, 会在红细胞破损时释放到基质液体中, 具有免疫调节作用, 与输血相关不良反应(炎症、血栓等)的发生密切相关^[6-7]。Belizaire 等^[8]利用小鼠模型证明储存红细胞来源的细胞碎片或微粒能活化中性粒细胞并且引起输血相关肺损伤; 同样还有研究证实储存红细胞制品中的细胞碎片或微粒可通过与补体和 IgG 结合, 活化中性粒细胞来介导输血相关急性肺损伤^[9]。因此, 这些保存时间较长的红细胞, 引起的副作用有一部分可能是由于库存红细胞在保存和处理过程中溶血所产生的细胞碎片或微粒导致的。为了了解库存去白细胞悬浮红细胞的溶血情况及其溶血产物状态随存储时间的变化, 本文在标准的血站采集、制备、运输和保存条件下, 对不同保存期的库存去白细胞悬浮红细胞进行溶血情况及其溶血产物方面的系统研究。本文主要采用了相衬显微成像技术来对库存去白细胞悬浮红细胞上清液中的细胞碎片及微粒进行图像拍摄及分析, 观察红细胞老化与溶血、细胞碎片生成等一系列变化。

* 基金项目: 广东省佛山市卫计局科研课题项目(2014162)。

作者简介: 邓智豪, 男, 主管检验技师, 主要从事血液成分制备与检测方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: 455300438@qq.com。

1 材料与方法

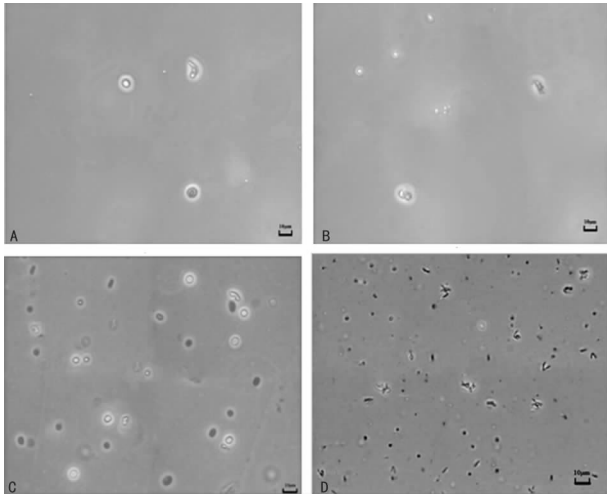
1.1 材料 本文所用到的去白细胞悬浮红细胞均是由本站根据标准规范完成制备,放置于专用储血冰箱中 2~6℃ 保存;随机选取 5 份库存去白细胞悬浮红细胞,在保存到第 3、7、14、21 天时,在无菌环境下从血袋中各取出 2 mL 作为样品,进行平行试验;剩余的去白细胞悬浮红细胞则在血袋热合封口后待下一次实验使用。

1.2 仪器与试剂 0.9% NaCl 溶液(生理盐水);日立 CF7D2 离心机;NikonTE300 倒置显微镜。

1.3 方法 使用日立 CF7D2 离心机在 4℃ 下以 1 500 r/min 速度将样品离心 10 min,制备上清液,并做好标记;离心后各取 30 μL 上清液滴加到载玻片上,并置于 NikonTE300 倒置显微镜下,然后调节到相衬图像模式,使用 40 倍物镜观察,再通过 Panasonic 高灵敏度 CCD 摄取显微镜观察到的图像。对保存时间为 3、7、14、21 d 的库存去白细胞悬浮红细胞上清液进行了显微相衬图像的拍摄和研究,每份样品均进行 25~30 个视场拍摄,然后再使用显微静态图像分析技术进行图像处理和

2 结果

5 组平行样品在不同时期的显微图像均无显著差异,各选取 1 张典型显微相衬图片来反映库存去白细胞悬浮红细胞上清液在保存过程中微粒数量和粒径大小的变化,如图 1 所示。从图 1 中 4 张较有代表性的显微图像可观察到,从细胞碎片及微粒数量上比较,保存 3 d 和 7 d 样品上清液中可见少量微粒,从 14 d 开始微粒的数量显著增加,到 21 d 微粒铺满了整个视场。从细胞碎片及微粒粒径上比较,保存 3 d 和 7 d 的样品上清液中微粒大小和细胞相仿,从 14 d 开始观察到的微粒粒径更小,到 21 d 时逐渐呈现碎片化。细胞碎片及微粒整体变化趋势为:微粒数量在不断增多,微粒的粒径分布也有差异,形状在改变,到 21 d 时逐渐呈现碎片化。



注:A~D 分别表示保存 3、7、14、21 d 的去白细胞悬浮红细胞上清液。

图 1 不同保存期库存去白细胞悬浮红细胞上清液的显微相衬图像

3 讨论

随着科学的发展,人们对血液的了解越来越深,血液保存技术的进步促使了库存血的产生。输库存血已成为现今输血治疗中应用最广泛和最重要的一种方式,如何让新鲜血液获得最有效的保存,使血细胞生命力和活力不在保存过程中损失,使血液在保存过程中保持新鲜,如何保证库存血的输注安全已成为现今临床医学治疗中最关注的问题之一。库存血液从收

集、检测、分离、保存,再配送到临床上输注使用,无法避免的有一定时间的周转过程。需要输注进入人体内的红细胞制品均存在一个保存时间的问题,从理论上来说,血液从献血者身上采集到制备成红细胞制品,再到入库编排保存,再发放到临床使用至少需要 3 d,那就是说,在医院临床上使用到的由血站配送的红细胞制品至少是 3 d 以前采集的血液了。随着时间的变化,正常状态的红细胞在内外环境等物理及化学因素的影响下,会发生不同程度的改变。这个改变是整体的,除了包含红细胞本身的储存损伤之外,还包括了随着红细胞破损而释放到其悬液基质中的微粒,红细胞破损后而产生的细胞碎片以及其他由于细胞溶血而产生的微粒会被释放到库存去白细胞悬浮红细胞液体基质的改变。但是研究人员往往将注意力集中在红细胞本身的变化。任素萍等^[10]在用电子显微镜研究延期保存的红细胞的超微结构时发现,在使用超氧化物歧化酶保存液条件下,红细胞随着储存时间的延长,棘形红细胞和畸形红细胞越来越多。王爱梅等^[11]在用不同保存时期的全血制备洗涤红细胞的时候,发现用保存 15 d 以上的全血制备的洗涤红细胞的形态发生不正常的变化,观察到了棘形红细胞的出现。许利民等^[12]研究了红细胞在不同温度环境下长期冻存后平均体积的变化后,发现长期冻存的红细胞平均体积均比正常的红细胞大。本研究通过对不同保存时间的库存去白细胞悬浮红细胞上清液的观察发现,随着保存时间的延长,库存去白细胞悬浮红细胞上清液样品的单位体积内的微粒数量呈不断上升的趋势,微粒数目随着保存时间的增长而上升,更突出的是,保存期在 14 d 以内,样品中的微粒数目的增长速度较为缓慢,而在保存期达到了 14 d 以后,从保存的第 3 周开始,微粒数目的增长明显。从保存 14 d 的上清液显微图像中可以发现,形态尺寸也发生了变化,尺寸更小,形态更像一些囊泡和细胞碎片,到了保存后期(21 d)的上清液显微图像中的微粒已铺满整个视场,并且形态已呈现碎片化。结果表明,保存期超过 14 d 的库存去白细胞悬浮红细胞,红细胞会由青龄红细胞加速向老龄红细胞发展,其上清液的细胞碎片及微粒显著增多,较保存期不到 14 d 的细胞均有显著差异。

综上所述,库存去白细胞悬浮红细胞保存质量的评价不应当只关注红细胞本身,其上清液的变化同样有着重要的意义。外源细胞碎片或微粒可能会成为抗原并引起机体的免疫反应,导致输血不良反应发生。因此,建议临床上给患者输注保存期在 14 d 以内的去白细胞悬浮红细胞,以减少输血不良反应的发生。

参考文献

- [1] Tinmouth A, Fergusson D, Yee IC, et al. Clinical consequences of red cell storage in the critically ill[J]. Transfusion, 2006, 46(11): 2014-2027.
- [2] Offner PJ, Moore EE, Biffl WL, et al. Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury[J]. Arch Surg, 2002, 137(6): 711-717.
- [3] Koch CG, Li L, Sessler DI, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery[J]. N Engl J Med, 2008, 358(12): 1229-1239.
- [4] Gkoumassi E, Margriet J, Hoentjen D, et al. Hemolysis of red blood cells during processing and storage[J]. Transfusion, 2012, 52(3): 489-492.
- [5] Doctor A, Spinella P. Effect of processing and storage on red blood cell function in vivo[J]. Semin Perinatol, 2012, 36(4): 248-259.

显低于正常组,提示甲状腺疾病孕妇体内的抗氧化能力下降,表明氧化应激可能在妊娠期甲状腺疾病中起着重要作用,同时表明了甲状腺疾病孕妇处于氧化应激激活状态。

低浓度碘可刺激甲状腺内 H_2O_2 的产生,高浓度碘则抑制 H_2O_2 的产生^[6],碘缺乏时,TSH 的慢性刺激使 H_2O_2 产生增多,碘离子相对不足, H_2O_2 作为电子受体和供体,可单独与 TPO 发生级联反应,产生更多的氧自由基^[7];碘过量时可刺激机体产生更多的自由基,但抗氧化酶活性没有明显升高,机体不能有效地清除过多的自由基,同时高碘可降低甲状腺潜在的抗氧化能力,而甲状腺潜在的抗氧化能力下降,将降低甲状腺抵御自由基损伤的能力,使甲状腺更易于发生氧化损伤,增加进展为自身免疫性甲状腺疾病的危险性。人类胚胎期脑神经发育时主要依赖于甲状腺激素^[8],在 20 周前供给胎儿脑发育所需的甲状腺激素主要来源于母体,因此,妊娠期间甲状腺功能异常可直接影响其后代的发育^[9]。本次实验发现,碘适量组孕妇 SOD 浓度明显高于碘异常组,说明碘异常组孕妇易出现氧化应激反应,从而证明了碘与氧化应激反应密切相关,因此,监测孕妇 SOD 浓度变化来了解妊娠期氧化应激状态,氧化应激可能是碘缺乏导致甲状腺疾病的机制之一,协助诊断妊娠期甲状腺疾病对妊娠结局的影响具有重要意义。

有学者认为妊娠处于高氧化应激状态,Jauniaux 等^[10]实验证明胎盘外周血液中高氧浓度可以引起局部区域的绒毛退化性改变,从而促进平滑绒毛膜的形成。研究发现孕妇抗氧化能力下降或生成减少,则可导致妊娠妇女流产。妊娠期可能由于胎盘功能减退,母胎液体循环障碍使得氧自由基与代谢废物过多堆积,容易使宫内局部环境的炎症与氧化应激平衡被打破,机体抗氧化能力下降可造成胎儿宫内窘迫、新生儿窒息率等发生率上升,从而影响妊娠结局^[11-12]。本次研究表明甲状腺疾病孕妇不良妊娠结局明显高于对照组,且不良妊娠结局孕妇 SOD 浓度明显低于妊娠者,提示体内抗氧化应激能力的下降可能造成不良妊娠的发生。

综上所述,分析甲状腺疾病孕妇尿碘、SOD 及甲状腺激素之间互相关系,对预防甲状腺疾病孕妇不良妊娠的发生具有重要意义。

参考文献

- [1] 中华医学会内分泌学会,中华医学会围产医学分会.妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南[J].中华内分泌代谢杂志,2012,28(5):354-371.
- [6] 张宁洁,卜艳红,王勇军.红细胞血液制品中红细胞微粒检测方法的建立[J].中国输血杂志,2015,28(10):1218-1221.
- [7] Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation[J]. Blood, 2010, 115(21):4284-4292.
- [8] Belizaire RM, Prakash PS, Richter JR, et al. Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation[J]. J Am Coll Surg, 2012, 214(4):648-655.
- [9] Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, et al. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfu-

- [2] Aslan M, Cosar N, Celik H, et al. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism[J]. Endocrine, 2011, 40(2):285-289.
- [3] Abalovich M, Llesuy S, Gutierrez S, et al. Peripheral parameters of oxidative stress in Graves' disease: the effects of methimazole and 131 Iodine treatments[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2003, 59(3):321-327.
- [4] Rostami R, Aghasi MR, Mohammadi A, et al. Enhanced oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis: inter-relationships to biomarkers of thyroid function[J]. Clin Biochem, 2013, 46(4/5):308-312.
- [5] 宋长虹.甲状腺功能减退与亚临床甲减症患者氧化应激指标变化分析[J].中国医学创新,2012,9(27):61-62.
- [6] Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia[J]. J Soc Gynecol Investig, 2004, 11(6):342-352.
- [7] Jenkins C, Wilson R, Roberts J, et al. Antioxidants; their role in pregnancy and miscarriage[J]. Antioxid Redox Signal, 2000, 2(3):623-628.
- [8] Patel J, Landers K, Li H, et al. Thyroid hormones and fetal neurological development[J]. J Endocrinol, 2011, 209(1):1-8.
- [9] Casey BM, Dashe JS, Wells CE, et al. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes[J]. Obstet Gynecol, 2005, 105(2):239-245.
- [10] Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, et al. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies[J]. Am J Pathol, 2003, 162(1):115-125.
- [11] Lagód L, Paszkowski T, Sikorski R, et al. The antioxidant-prooxidant balance in pregnancy complicated by spontaneous abortion[J]. Ginekol Pol, 2001, 72(12):1073-1078.
- [12] 马秀菊,肖文霞.氧化应激与胎膜早破的相关性研究[J].中国优生与遗传杂志,2006,14(1):69-70.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-22)

(上接第 1940 页)

- sion complications[J]. Transfusion, 2011, 51(4):886-893.
- [10] 任素萍,马恩普,刘秀珍,等.4℃延期保存红细胞超微结构的动态变化[J].中国实验血液学杂志,2003,11(5):524-526.
- [11] 王爱梅,梁文华,王群,等.不同保存期全血制备洗涤红细胞的超微结构变化[J].临床输血与检验,2007,6(3):173-176.
- [12] 许利民,冯江,张荷,等.红细胞不同温度长期冻存后形态和免疫功能的变化及其临床意义[J].重庆医学,2002,31(6):461-462.

(收稿日期:2016-01-12 修回日期:2016-03-23)