

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.02.005

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191225.1659.010.html>(2019-12-26)

## 芦丁对体外储存悬浮红细胞凋亡和 ATP 的影响及机制研究

陈雄燕<sup>1</sup>, 肖倩<sup>1△</sup>, 欧阳清<sup>2</sup>, 蒋延芳<sup>1</sup>, 蒋利星<sup>3</sup>

(1. 广西壮族自治区桂林市人民医院 541002; 2. 桂林医学院第一附属医院, 广西桂林 541001;

3. 广西壮族自治区桂林市中心血站 530001)

**[摘要]** **目的** 探究不同浓度芦丁对体外储存悬浮红细胞凋亡及腺苷三磷酸(ATP)水平的影响,并探究其凋亡相关蛋白表达的变化。**方法** 通过流式细胞术及 Western blot 分析不同浓度芦丁处理 20 和 40 d 后悬浮红细胞的凋亡及其凋亡相关蛋白的变化。同时,通过 ATP 水平检测分析不同浓度的芦丁处理后体外储存悬浮红细胞在第 20、40 天时 ATP 水平。**结果** 芦丁处理第 20 天 10、20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  芦丁处理组红细胞凋亡率分别为  $(2.21 \pm 0.09)\%$ 、 $(1.97 \pm 0.09)\%$  和  $(1.81 \pm 0.08)\%$ ,均低于 0  $\mu\text{mol/L}$  [ $(2.51 \pm 0.16)\%$ ],差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。芦丁处理第 40 天 10、20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  芦丁处理组红细胞凋亡率分别为  $(6.99 \pm 0.36)\%$ 、 $(6.10 \pm 0.31)\%$ 、 $(5.69 \pm 0.27)\%$ ,均低于 0  $\mu\text{mol/L}$  [ $(9.30 \pm 0.77)\%$ ],差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。芦丁处理第 20、40 天 10、20 和 40  $\mu\text{mol/L}$  芦丁处理组 Bcl-2 蛋白表达升高,Bax 蛋白表达降低,Bcl-2/Bax 比例明显升高,且储存悬浮红细胞中 ATP 水平也明显升高( $P < 0.05$ ),且有一定的浓度依赖性。**结论** 芦丁可通过上调 Bcl-2/Bax 抑制红细胞凋亡,其可升高储存悬浮红细胞中 ATP 的水平。

**[关键词]** 红细胞;芦丁;细胞凋亡;腺苷三磷酸;储存损伤**[中图分类号]** R311.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)02-0192-05

## Study on the effect of Rutin on the apoptosis and ATP in suspended red blood cells in vitro and its mechanism

CHEN Xiongyan<sup>1</sup>, XIAO Qian<sup>1△</sup>, OUYANG Qing<sup>2</sup>, JIANG Yanfang<sup>1</sup>, JIANG Lixing<sup>3</sup>

(1. People's Hospital of Guilin, Guilin, Guangxi 541002, China; 2. The First Affiliated

Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China; 3. Center Blood Stations of Guilin, Guilin, Guangxi 530001, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of rutin on the apoptosis and content of adenosine triphosphate (ATP) in stored suspended red blood cells in vitro, and analyze the change of apoptosis-related protein expression. **Methods** The percentage of apoptotic suspended red blood cells treated with rutin for 20 or 40 days was analyzed by flow cytometry. Western blot assay was performed to detect the expression of apoptosis-related protein of erythrocytes. The content of ATP in suspended red blood cells was detected and analyzed on 20th and 40th days. **Results** The percentage of apoptotic RBC treated with rutin at 10, 20 and 40  $\mu\text{mol/L}$  on the 20th day was  $(2.21 \pm 0.09)\%$ ,  $(1.97 \pm 0.09)\%$  and  $(1.81 \pm 0.08)\%$ , respectively, which were lower than that at 0  $\mu\text{mol/L}$  [ $(2.51 \pm 0.16)\%$ ], the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The percentage of apoptotic RBC treated with rutin at 10, 20 and 40  $\mu\text{mol/L}$  on the 40th day was  $(6.99 \pm 0.36)\%$ ,  $(6.10 \pm 0.31)\%$  and  $(5.69 \pm 0.27)\%$ , respectively, which were lower than that at 0  $\mu\text{mol/L}$  [ $(9.30 \pm 0.77)\%$ ], the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). On the 20th and 40th days of rutin treatment, the expression of Bcl-2 protein increased, the expression of Bax protein decreased, the ratio of Bcl-2/Bax increased, and the ATP level in stored suspended RBC increased ( $P < 0.05$ ), and there was a certain concentration dependence. **Conclusion** Rutin can inhibit RBC apoptosis by up-regulating Bcl-2/Bax, which can increase the level of ATP in stored suspended RBC.

**[Key words]** erythrocytes; rutin; apoptosis; adenosine triphosphate; storage lesion

芦丁又名芸香苷,是一种从植物中提取的黄酮类化合物,也是一种生物活性强、临床应用广泛的中药,具有抗自由基活性、抗脂质过氧化、抗病毒、抗急性胰腺炎等药理作用<sup>[1]</sup>。经过长期研究发现,芦丁疗效确切,使用安全性较高,已广泛应用于心血管疾病如动脉硬化、高血压、冠状动脉供血不全、心绞痛、心肌梗死、高脂血症、脑梗死、脑血管痉挛及老年性痴呆防治等疾病<sup>[2-3]</sup>。早期研究发现黄酮类化合物具有抑制过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)引起的红细胞溶血和红细胞脂质过氧化的作用<sup>[4]</sup>,本文就芦丁对体外储存悬浮红细胞的凋亡及腺苷三磷酸(ATP)的影响进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

血液标本 50 mL/人,采自 5 例 22~35 岁 O 型健康献血者,本研究获得桂林市人民医院伦理委员会批准。

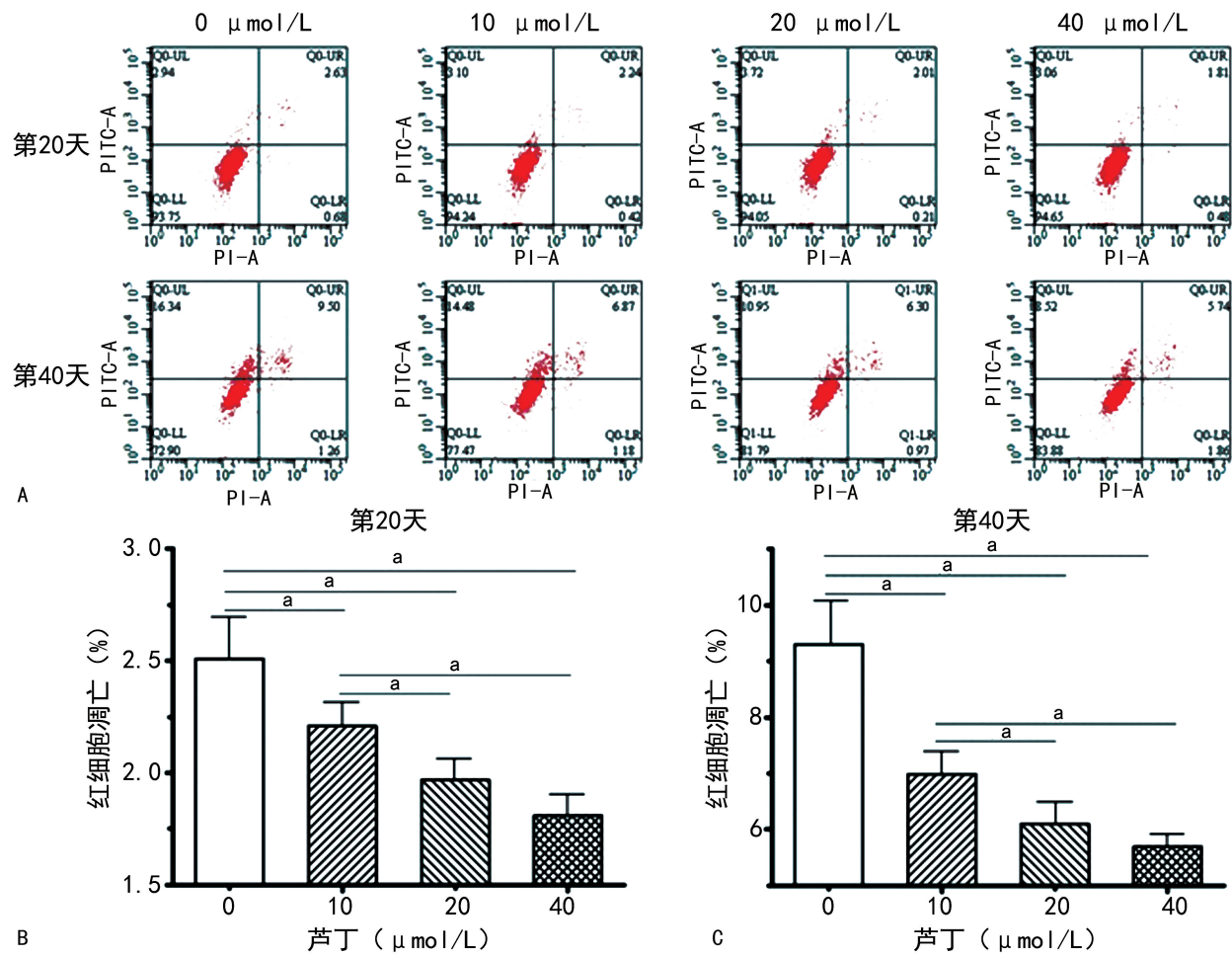
1.2 方法

1.2.1 悬浮细胞制备

将血液标本在无菌条件下与腺嘌呤(CPDA-1)保存液混合制成悬浮红细胞后分为 4 组,分别向 10 mL 红细胞悬液中加入浓度为 10 mmol/L 的芦丁(上海试剂二厂粉剂,以二甲基亚砷配制母液)溶液 0、10、20 和 40  $\mu$ L,使其终浓度为 0、10、20 和 40  $\mu$ mol/L,然后将其放入(4 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 的红细胞储存冰箱中分别保存至第 20、40 天,实验开始前将所有实验标本中的红细胞均调整为 4.0 $\times$ 10<sup>12</sup> 个/L 备用。

1.2.2 红细胞凋亡率检测

取 CPDA-1 保存液保存至第 20、40 天的红细胞进行凋亡检测,检测试剂为膜联蛋白 V 标记的异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)试剂盒(美国 Ebioscience 公司),具体操作如下:取红细胞悬液 100  $\mu$ L(1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/L),每管加入 200  $\mu$ L Binding buffer 稀释液,重新悬浮并混匀后加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 试剂,然后将其置于室温下避光孵育 15 min,在实验管中加入 10  $\mu$ L PI 试剂后,室温下避光孵育 15 min 后上流式细胞仪(美国 Becton and Dickinson 公司)进行流式检测并分析红细胞的凋亡情况。



A:流式细胞图;B:芦丁处理第 20 天各处理组红细胞凋亡率柱状图;C:芦丁处理第 40 天各处理组红细胞凋亡率柱状图。

图 1 不同浓度芦丁对储存悬浮红细胞凋亡的影响

1.2.3 ATP 水平检测

采用 ATP 水平测试盒(南京建成)检测各组红细胞中 ATP 水平,操作步骤严格按照试剂盒说明书执行,具体操作步骤如下:首先裂解红细胞和热沉淀血红蛋白(Hb),然后用肌酸激酶催化 ATP 和肌酸,生成肌酸激酶,最后在 636 nm 波长处,通过磷钼酸比色法检测红细胞中 ATP 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 供者红细胞及 Hb 分析

在对红细胞进行凋亡分析及 ATP 水平检测前,首先对供者储存红细胞的计数及 Hb 水平进行了分析,分析发现供者红细胞计数为  $(5.01 \pm 0.32) \times 10^{12} / L$ ,Hb 为  $(141 \pm 12) g/L$ 。

2.2 芦丁对红细胞的凋亡影响

芦丁处理第 20 天,10、20 和 40  $\mu mol/L$  芦丁处理组红细胞凋亡率分别为  $(2.21 \pm 0.09)\%$ 、 $(1.97 \pm 0.09)\%$  和  $(1.81 \pm 0.08)\%$ ,与 0  $\mu mol/L$   $[(2.51 \pm 0.16)\%]$  比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。芦丁处理第 40 天,10、20 和 40  $\mu mol/L$  芦丁处理组红细胞凋亡率分别为  $(6.99 \pm 0.36)\%$ 、 $(6.10 \pm 0.31)\%$  和  $(5.69 \pm 0.27)\%$ ,与 0  $\mu mol/L$   $[(9.30 \pm 0.77)\%]$  比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

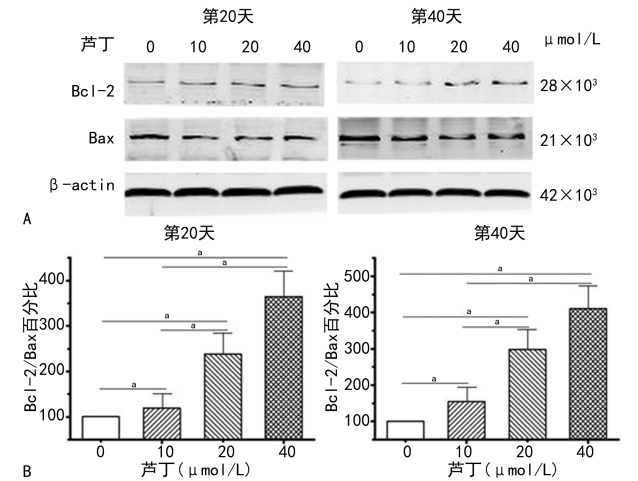
2.3 芦丁对血小板凋亡相关蛋白表达的影响

芦丁处理第 20 天,悬浮红细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达上调,促凋亡蛋白 Bax 表达下调,10、20 和 40  $\mu mol/L$  芦丁处理组 Bcl-2/Bax 比值分别为  $(1.19 \pm 0.32)$ 、 $(2.38 \pm 0.45)$ 、 $(3.65 \pm 0.58)$ ,与 0  $\mu mol/L$  比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。芦丁处理第 40 天,10、20 和 40  $\mu mol/L$  芦丁处理组 Bcl-2/Bax 比值分别为  $(1.54 \pm 0.40)$ 、 $(2.98 \pm 0.56)$ 、 $(4.11 \pm 0.64)$ ,与 0  $\mu mol/L$  比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

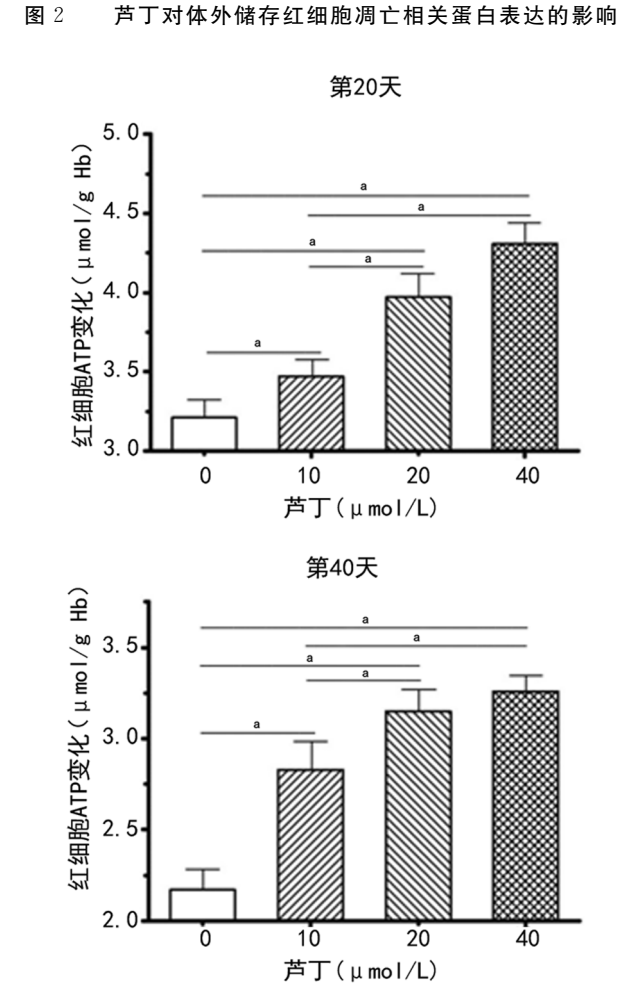
2.4 储存悬浮红细胞及其添加不同浓度芦丁后 ATP 水平的变化

芦丁处理第 20 天,与 0  $\mu mol/L$   $[(3.21 \pm 0.10) \mu mol/g Hb]$  比较,10、20 和 40  $\mu mol/L$  芦丁处理组可明显提升储存悬浮红细胞中 ATP 水平  $[(3.47 \pm 0.11)$ 、 $(3.97 \pm 0.13)$  和  $(4.31 \pm 0.10) \mu mol/g Hb]$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着芦丁浓度的增

高,ATP 水平逐渐升高。芦丁处理第 40 天,与 0  $\mu mol/L$   $[(2.17 \pm 0.13) \mu mol/g Hb]$  比较,10、20 和 40  $\mu mol/L$  芦丁处理组可明显提升储存红细胞中 ATP 水平  $[(2.83 \pm 0.12)$ 、 $(3.15 \pm 0.12)$  和  $(3.26 \pm 0.05) \mu mol/g Hb]$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且有一定的浓度依赖性,见图 3。



A: Western blot; B: 芦丁处理第 20、40 天体外循环红细胞凋亡相关蛋白表达水平柱状图;  $a: P < 0.05$ 。



$a: P < 0.05$ 。

图 3 芦丁处理后红细胞 ATP 水平变化情况



### 3 讨 论

芦丁是一种存在于蔬菜水果及其他日常饮食中的黄酮类化合物<sup>[1-2]</sup>,可有效清除体内氧自由基、抑制细胞膜脂质过氧化、降低过氧化脂质的水平、提高红细胞超氧化物歧化酶(SOD)的活性等<sup>[3-5]</sup>。通过大鼠红细胞氧化溶血实验研究发现,芦丁等黄酮类化合物对各种氧自由基均有明显的清除和抑制作用,其抗氧化能力以芦丁最为显著,且有明显的剂量效应。在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的大鼠红细胞膜损伤实验中研究发现,芦丁等黄酮类化合物对红细胞溶血的抑制率明显升高,且红细胞悬液中丙二醛(MDA)水平明显降低、SOD及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性明显升高。悬浮红细胞在体外储存过程中随着储存时间的延长,细胞内的ATP和2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)水平逐渐降低,导致红细胞膜氧化损伤,进一步引起红细胞活性降低、变形性及弹性下降等变化,最终导致其凋亡的发生,这些变化可能与红细胞膜类脂过度氧化等因素有关<sup>[6-8]</sup>。在细胞凋亡或坏死的过程中可将膜上的磷脂酰丝氨酸移至膜外,可借助Annexin V易于结合磷脂酰丝氨酸的特性及细胞膜完整的细胞对PI拒染的特性用于红细胞凋亡检测<sup>[9]</sup>。本研究发现在体外储存的红细胞悬液中添加一定浓度芦丁可抑制红细胞的凋亡,并且随着芦丁浓度的增高,红细胞的凋亡率逐渐降低,即芦丁对其凋亡的抑制有一定的浓度依赖性。

Bcl-2 蛋白家族是迄今研究得最深入、最广泛的凋亡调控基因之一,编码产物 Bcl-2 蛋白可抑制细胞凋亡,参与细胞增殖与凋亡动态平衡的调控<sup>[4]</sup>; Bcl-2 是一种通过抗氧化和抑制 Ca<sup>2+</sup> 向细胞内流动来抑制细胞凋亡的原癌基因<sup>[3]</sup>。细胞膜造孔蛋白 Bax 能促进细胞色素 C 的释放,进而引发含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)介导的细胞凋亡<sup>[9]</sup>。本研究发现芦丁处理悬浮红细胞 20、40 d, Bcl-2 蛋白的表达上调,而 Bax 蛋白表达降低, Bcl-2/Bax 蛋白比例的上调可抑制 caspase-3 蛋白的活化引起的线粒体凋亡,即表明芦丁可通过调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达来拮抗悬浮红细胞的凋亡。此外,芦丁对悬浮红细胞凋亡的抑制作用,还可能与其抗氧化、清除自由基、抗炎症作用有关<sup>[3,10]</sup>。

ATP 是红细胞中唯一的供能物质,直接反映红细胞的代谢能力,被公认为最重要的血液质量指标之一<sup>[10]</sup>。在临床输血实践中,患者输注储存红细胞 24 h 后体内红细胞存活率大于 70%、ATP>1 500 μmol/

g Hb 是对储存红细胞血液质量合格的客观要求与明确规定<sup>[10]</sup>。此外,红细胞中 ATP 水平的高低也是红细胞储存损伤的重要影响因素<sup>[11-12]</sup>。本研究发现芦丁可明显提高储存悬浮红细胞中 ATP 水平,且有一定的浓度依赖性;芦丁提升悬浮红细胞中 ATP 水平的作用,可能与其抗氧化、保护相关代谢酶的活性有关,如细胞膜上 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及 ATP 合成酶等,这些酶的活性容易在储存损伤过程中遭到破坏,基于芦丁的清除氧自由基、抑制细胞膜脂质过氧化及提高红细胞超氧化物歧化酶的活性可有效保护蛋白酶的活性免遭破坏<sup>[13-15]</sup>。

综上所述,体外添加芦丁能够抑制储存悬浮红细胞的凋亡,有效改善储存红细胞中 ATP 水平,进而为延长红细胞在体外的储存时间,降低其储存损伤提供了某种可能。但芦丁在储存红细胞中具体的作用机制及安全性仍需进一步探讨和研究。

### 参考文献

- [1] OLIVEIRA V M, CARRARO E, AULER M E, et al. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp[J]. *Braz J Biol*, 2016, 76(4):1029-1034.
- [2] 王金宏, 潘琪, 石钰桐, 等. 芦丁的提取及抑菌活性研究进展[J]. *黑龙江医药*, 2018, 31(1): 22-24.
- [3] 刘楠楠, 蒋水星. 乙醇浸提法提取大枣芦丁及其抗氧化性的研究[J]. *生物资源*, 2018, 40(4): 371-376.
- [4] UMARANI V, MUVVALA S, RAMESH A, et al. Rutin potentially attenuates fluoride-induced oxidative stress-mediated cardiotoxicity, blood toxicity and dyslipidemia in rats[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(2):143-149.
- [5] SINGH S, DUBEY V, MEENA A, et al. Rutin restricts hydrogen peroxide-induced alterations by up-regulating the redox-system; an in vitro, in vivo and in silico study[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 835:115-125.
- [6] 邢艳粉, 吴千羽, 解绪红, 等. 添加 SNP 的储存红细胞在 37℃ 孵育后 NO 及 ATP 含量变化[J]. *中国输血杂志*, 2016, 29(8):791-794.
- [7] SUT C, TARIKET S, CHOU M L, et al. Duration of red blood cell storage and inflammatory marker generation[J]. *Blood Transfus*, 2017, 15

- (2):145-152.
- [8] ALMIZRAQ R J, HOLOVATI J L, ACKER J P. Characteristics of extracellular vesicles in red blood concentrates change with storage time and blood manufacturing method[J]. *Transfus Med Hemother*, 2018, 45(3):185-193.
- [9] GEHRKE S, SRINIVASAN A J, CULP-HILL R, et al. Metabolomics evaluation of early-storage red blood cell rejuvenation at 4 °C and 37 °C[J]. *Transfusion*, 2018, 58(8):1980-1991.
- [10] FREITAS LEAL J K, ADJOBO-HERMANS M J W, BROCK R, et al. Acetylcholinesterase provides new insights into red blood cell ageing in vivo and in vitro[J]. *Blood Transfus*, 2017, 15(3):232-238.
- [11] LAGERBERG J W, KORSTEN H, VAN DER MEER P F, et al. Prevention of red cell storage lesion: a comparison of five different additive solutions[J]. *Blood Transfus*, 2017, 15(5):456-462.
- [12] SUN K, D'ALESSANDRO A, XIA Y. Puriner-gic control of red blood cell metabolism: novel strategies to improve red cell storage quality[J]. *Blood Transfus*, 2017, 15(6):535-542.
- [13] TZOUNAKAS V L, KARADIMAS D G, ANASTASIADI A T, et al. Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels[J]. *Transfusion*, 2018, 58(1):34-40.
- [14] AL-OMAIR M A, SEDKY A, ALI A, et al. Ameliorative potentials of quercetin against lead-induced hematological and testicular alterations in Albino rats[J]. *Chin J Physiol*, 2017, 60(1):54-61.
- [15] ZBIKOWSKA H M, ANTOSIK A, SZEJK M, et al. A moderate protective effect of quercetin against  $\gamma$ -irradiation- and storage-induced oxidative damage in red blood cells for transfusion[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(12):1201-1210.

(收稿日期:2019-05-18 修回日期:2019-09-12)

(上接第 191 页)

- Ophthalmology, 2016, 123(11):2352-2367.
- [14] 吴学志. 健脾化痰方联合雷珠单抗对湿性老年黄斑变性患者氧化应激及血液流变学的影响[J]. *实用医院临床杂志*, 2018, 15(3):243-245.
- [15] AL-SHEIKH M, AKIL H, PFAU M, et al. Swept-source OCT angiography imaging of the foveal avascular zone and macular capillary network density in diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(8):3907-3913.
- [16] 赵度然, 李志, 李寿玲. Ranibizumab 治疗渗出型老年黄斑变性的 1 年疗效观察及视力恢复的预测因素分析[J]. *临床眼科杂志*, 2017, 25(3):223-227.
- [17] DU J, LI R, XU L, et al. Increased serum chemerin levels in diabetic retinopathy of type 2 diabetic patients[J]. *Curr Eye Res*, 2016, 41(1):114-120.
- [18] 石蕊, 杨乐, 齐贇, 等. 康柏西普和雷珠单抗治疗黄斑水肿有效性的 Meta 分析[J]. *国际眼科杂志*, 2017, 17(12):2242-2247.
- [19] LEASHER J L, BOURNE R R, FLAXMAN S R, et al. Erratum. Global estimates on the number of People blind or visually impaired by diabetic retinopathy: a Meta-analysis from 1990—2010. *Diabetes care* 2016; 39:1643-1649[J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(11):2096-2096.
- [20] 蔡锡安, 彭惠. 两种抗 VEGF 药物治疗渗出性年龄相关性黄斑病变的疗效[J]. *国际眼科杂志*, 2016, 16(8):1501-1503.

(收稿日期:2019-05-10 修回日期:2019-08-02)