

脐血血红蛋白体外氧化还原研究

苏秀兰¹, 王翔²

(1. 四川文理学院化学化工学院, 四川 达州 635000; 2. 天津工业大学环境与化学工程学院, 天津 300387)

摘要:研究无基质脐血血红蛋白体外条件下的氧化和还原反应,在血红蛋白溶液中加入一定量的氧化剂和还原剂,测定氧饱和度和高铁血红蛋白含量随时间的变化。结果表明:自氧化时,4 h 内高铁血红蛋白含量由 5% 升高至 35%;叠氮钠催化氧化时,4 h 内高铁血红蛋白含量由 5% 升高至 65%;加入 VC 后,3 h 内高铁血红蛋白含量由 45% 降至 5% 左右。无基质血红蛋白在体外条件极易被氧化;VC 的加入能够有效抑制高铁血红蛋白含量,且其对血红蛋白溶液的还原顺序为:先清除溶解氧,再清除结合氧,最后还原高铁血红蛋白;同时加入氮氧自由基,并不能加速 VC 对高铁血红蛋白的还原,但明显缩短了还原时间。

关键词:血液代用品;脐血血红蛋白;氮氧自由基;氧化还原

中图分类号:Q51

文献标志码:A

引言

输血是临床最常用的医疗手段之一。目前,医院输血所采用的血源多是购买或者志愿者捐献的未经处理的血液^[1]。这种血液使用起来简单方便,但也存在一些问题,如血液来源不足,经常性库存紧张^[2];容易造成病毒的交叉感染^[3-4];可能引起多种副作用,如脑血管收缩^[5]和肾损伤^[6]等。正因如此,开发出一种安全可靠的血液代用品是世界性的研究课题。

脐带血是胎儿娩出断脐后残留在脐带和胎盘绒毛血管内的血。每只胎盘可采血 80 ~ 150 mL。全国每年新出生婴儿数量巨大,因此,如果把胎盘血应用于血液代用品的制备,可在一定程度上解决红细胞代用品的血源受限问题^[7-8]。血红蛋白(Hb)表面的膜基质及其它杂蛋白能够引起肾毒性和凝血,血红蛋白类氧载体(HBOC)采用的多是经过一定破膜、离心处理的无基质血红蛋白^[9-10]。但处理后得到的无基质血红蛋白同时也失去了细胞内还原酶系统(如超氧化物歧化酶、过氧化物酶和高铁血红蛋白还原酶)的调节,可能造成 Fe²⁺ Hb 被氧化成 Fe³⁺ Hb(Met-Hb),失去携氧能力,且易导致细

胞自由基损伤^[11-12]。

维生素 C(VC)是 HBOC 中最常用的 Fe³⁺ Hb 还原剂,但 VC 对血红蛋白溶液的还原顺序,目前研究得仍不够充分。氮氧自由基(TEMPO)是一种高效的可控活性自由基,生物实验证实氮氧自由基具有淬灭生物体内过量自由基的作用^[13]。刘有成^[14-15]等发现,TEMPO 能与 VC 发生氧化还原反应,生成相应的羟胺。VC 为水溶性还原剂,而羟胺则是油溶性还原剂,推测其应该更易接近血红蛋白。但在 VC 还原体系中加入 TEMPO,是否能加速 VC 对高铁血红蛋白的还原速率,仍需进一步验证。

1 材料和仪器

1.1 血液

新鲜脐带血由天津协和干细胞基因工程公司提供。

1.2 试剂

TEMPO(Sigma 公司);叠氮钠(阿拉丁试剂);维生素 C(天津文达);高纯氮(成都和平气体)。

1.3 仪器

752 型紫外-可见分光光度计(上海精科仪器设备有限公司);TGL-16M 离心机(长沙湘智离心机仪器有限公

收稿日期:2016-01-18

基金项目:国家自然科学基金项目(21202117/B020703)

作者简介:苏秀兰(1988-),女,安徽阜南人,助教,硕士,主要从事血液代用品方面的研究,(E-mail)suxiulan@126.com

司);DF-101S 集热式恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);SHZD(Ⅲ)型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂);微量移液器(大龙医疗设备有限公司);MIK-DO530 溶氧仪(美控(中国)仪器有限公司);高压灭菌釜(力辰科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 无基质脐血血红蛋白制备

参考文献[16]方法制备无基质脐血血红蛋白。

2.2 Met-Hb 含量及氧饱和度测定^[17]

分别测定血红蛋白溶液在 523 nm、540 nm、554 nm 和 576 nm 波长处的吸光度,经过计算可得 Met-Hb 含量及氧饱和度。

$$1.8814 \times \text{OxyHb}\% + 1.4773 \times \text{DeoxyHb}\% + 0.8419 \times \text{MetHb}\% = A540/A523$$

$$1.2539 \times \text{OxyHb}\% + 1.8095 \times \text{DeoxyHb}\% + 0.6161 \times \text{MetHb}\% = A554/A523$$

$$2.0201 \times \text{OxyHb}\% + 1.3345 \times \text{DeoxyHb}\% + 0.5473 \times \text{MetHb}\% = A576/A523$$

$$Y = \text{OxyO}_2\text{Hb} / (\text{OxyHb} + \text{DeoxyHb})$$

其中,Oxy-Hb、Met-Hb 和 Deoxy-Hb 分别为氧合血红蛋白、高铁血红蛋白和脱氧血红蛋白,A523、A540、A554 和 A576 分别为 523 nm、540 nm、554 nm 和 576 nm 下的吸光度。

2.3 脐血血红蛋白氧化实验^[18]

2.3.1 脐血血红蛋白自氧化

取无基质脐血血红蛋白,用 PBS(0.2 mol/L,pH7.4)稀释至 25 $\mu\text{mol/L}$ 。加入一定量的 EDTA,使其终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 。转入已灭菌的锥形瓶中,37 $^\circ\text{C}$ 水浴密封保存。每隔 1 h 取出适量,在 500 ~ 700 nm 波长范围内进行全波长扫描,并计算 Met-Hb 含量,4 h 后终止。

2.3.2 叠氮钠催化脐血血红蛋白氧化

如 2.3.1 所述配制脐血血红蛋白的 EDTA 溶液,加入一定量的叠氮钠,使其终浓度为 0.1 mol/L。转入灭菌处理的锥形瓶中,37 $^\circ\text{C}$ 水浴密封保存。每隔 0.5 h 取出适量,在 500 ~ 700 nm 波长范围内进行全波长扫描,并计算 Met-Hb 含量,3 h 后终止。

2.4 脐血血红蛋白还原实验

2.4.1 封闭体系内 Met-Hb 的还原

用 PBS(0.2 mol/L,pH7.4)将制得的无基质脐血血红蛋白溶液稀释至 2.5 $\mu\text{mol/dL}$,分别加入一定量的 VC(终浓度为 100 $\mu\text{mol/dL}$),TEMPO(终浓度为 30 $\mu\text{mol/dL}$)及其混合体系。37 $^\circ\text{C}$ 水浴密封保存。每隔 20 min 取出适量测吸光度,计算 Met-Hb 含量及氧饱和度。

2.4.2 脱氧-封闭体系内 Met-Hb 的还原

用 PBS(0.2 mol/L,pH7.4)将制得的无基质脐血血红蛋白溶液稀释至 2.5 $\mu\text{mol/dL}$,不间断脱氧-通氮,直至溶液中的溶解氧被完全除去。然后分别加入一定量的 VC(终浓度为 100 $\mu\text{mol/dL}$),TEMPO(终浓度为 30 $\mu\text{mol/dL}$)及其混合体系。37 $^\circ\text{C}$ 水浴密封保存。每隔 20 min 取出适量测吸光度,计算 Met-Hb 含量及氧饱和度。

2.5 溶氧量测定

用 PBS(0.2 mol/L,pH7.4)将制得的无基质脐血血红蛋白溶液稀释至 2.5 $\mu\text{mol/dL}$,加入 3 倍量 VC,每隔 10 min 测一次溶氧量。根据溶氧量、氧饱和度以及 Met-Hb 含量随时间的变化关系,即可知还原剂对血红蛋白溶液的还原顺序。

3 结果与讨论

3.1 血红蛋白氧化

3.1.1 血红蛋白自氧化

图 1(a)为 37 $^\circ\text{C}$ 时,脐血血红蛋白溶液在 500 ~ 700 nm 范围内随时间变化的全波长扫描图。由图 1(a)可知,吸光度的峰值出现在 541 nm 和 576 nm 处,并在 625 nm 处出现一小的吸收峰,两个等吸收点分别为 524 nm 和 589 nm。图 1(b)为 Met-Hb 含量随时间的变化趋势(4 h),每隔 1 h 测一次,体外条件下,脐血无基质血红蛋白极易被氧化,MetHb 含量随时间不断升高,4 h 内由 5% 升至 35%。

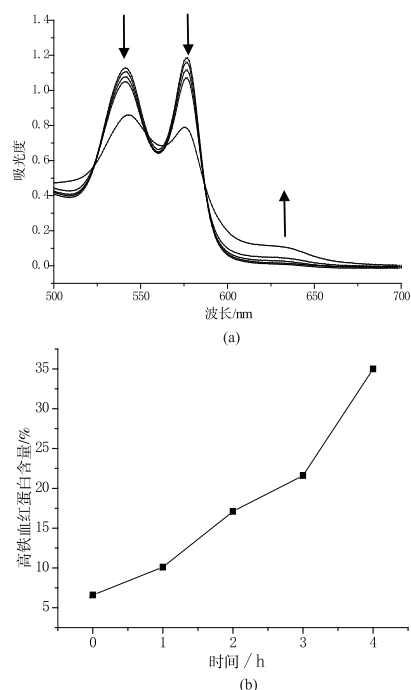


图 1 血红蛋白自氧化的影响

3.1.2 叠氮钠催化血红蛋白氧化

图 2(a) 为 37 °C 时,叠氮钠催化作用下脐血血红蛋白溶液在 500 ~ 700 nm 范围内随时间变化的全波长扫描图(3 h)。经对比可知,其与自氧化全波长扫描图曲线走势相似。图 2(b) 为 Met-Hb 含量随时间的变化趋势(3 h)。每隔 0.5 h 测一次,叠氮钠的催化作用加速了血红蛋白的氧化, Met-Hb 含量 3 h 内由 5% 升高至 65%。

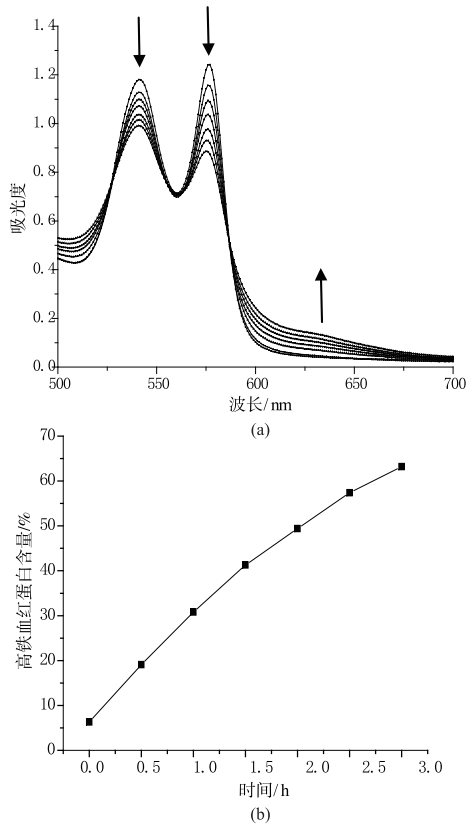


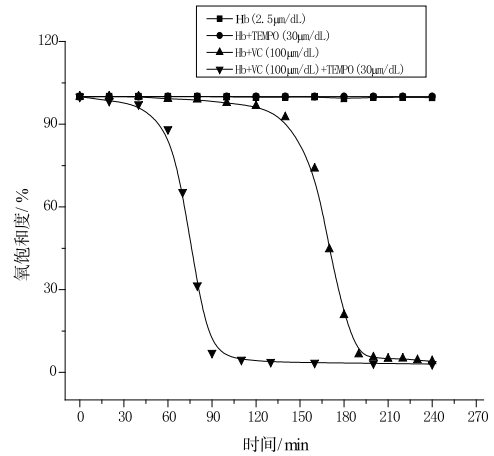
图 2 叠氮钠催化下血红蛋白氧化的影响

3.2 VC、TEMPO 及其复合体系对血红蛋白溶液的还原

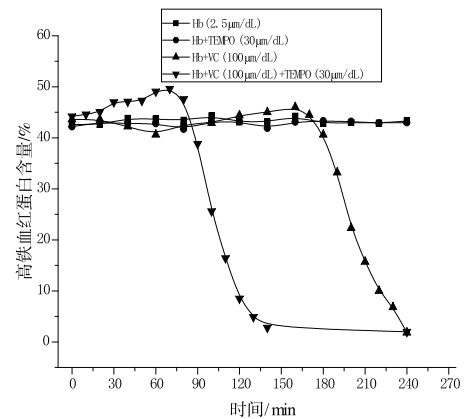
3.2.1 封闭体系内血红蛋白溶液的还原

由图 3 可知,不加入还原剂时,溶液氧饱和度和 Met-Hb 含量均不随时间变化。加入还原剂 VC 或者 VC 与 TEMPO 的复合体系后,氧饱和度和 Met-Hb 含量均随时间有显著下降。且从时间上看,血红蛋白氧饱和度下降到接近零时, Met-Hb 含量才开始下降。图 3(b) 显示,三条曲线下落的斜率接近,而斜率反映的是下降速率,即无论加入 TEMPO 与否及加入量多少, VC 对 Met-Hb 的还原速率并未发生变化。这可能是因为,虽然 TEMPO 与 VC 反应生成的羟胺更易靠近血红蛋白,但由于所加 VC 已是过量,而羟胺的还原性并不是很强,因此对反应的加速并不明显。但加入 TEMPO 后,发现曲线下落位点左移,即 TEMPO 的加入能够改变 VC 还原 Met-Hb 的

起始时间。



(a) 加入 VC、TEMPO 及其复合体系后溶液氧



(b) 加入 VC、TEMPO 及其复合体系后 Met-Hb 含量随时间的变化趋势

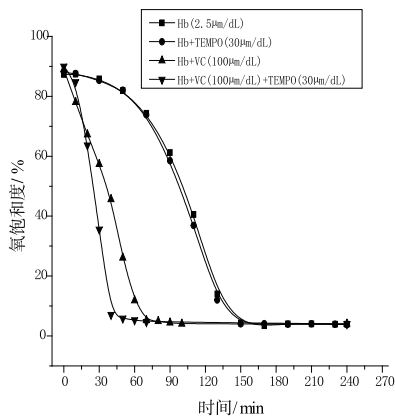
图 3 封闭体系内脐血血红蛋白的还原

3.2.2 脱氧-封闭体系内血红蛋白溶液的还原

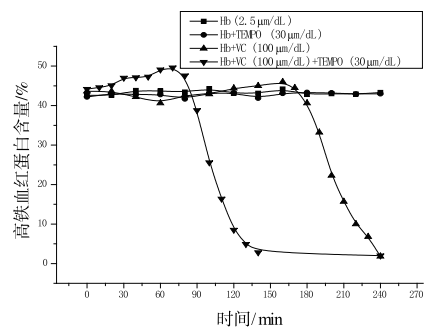
通过抽真空及充氮的处理,血红蛋白溶液中的溶解氧基本被除去。图 4(a) 显示,加入还原剂后,还原剂直接开始清除结合氧,氧饱和度立即下降。不加入任何还原剂时,氧饱和度仍下降。这是因为脱氧处理使溶液中氧分压过低,血红蛋白的一部分结合氧被释放到溶液中。脱氧-封闭体系内 Met-Hb 含量的变化趋势与封闭体系相似,即脱氧-封闭体系加入 TEMPO 后, VC 还原 Met-Hb 的速率基本无变化。但同样还原 Met-Hb 的时间也提前。

3.3 VC 对血红蛋白溶液的还原顺序

图 5(a) 显示,加入还原剂 VC 后,血红蛋白溶液溶解氧量随时间迅速下降,大约在 50 min 溶液中溶解氧被清除殆尽。由图 5(b) 可知溶液氧饱和度大约在 50 min 时开始下降,90 min 时下降到最低值。而 Met-Hb 在 80 min 之后才开始被还原。从时间上,三者依次进行。可以认为 VC 对血红蛋白溶液的还原顺序为:先除溶液中的溶解氧,再清除血红蛋白的结合氧,最后还原 Met-Hb。

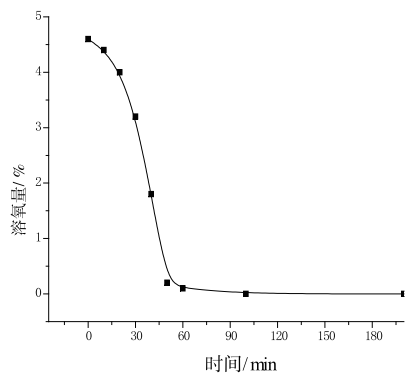


(a) 加入VC、TEMPO及其复合体系后溶液氧饱和度随时间的变化趋势

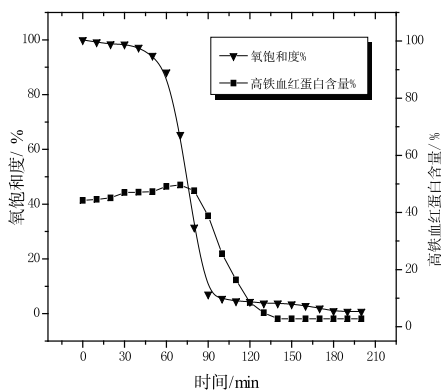


(b) 加入VC、TEMPO及其复合体系后Met-Hb含量随时间的变化趋势

图4 脱氧-封闭体系脐血血红蛋白的还原



(a) 加入VC后溶液溶氧量随时间变化趋势



(b) 加入VC后血红蛋白氧饱和度随时间的变化趋势

图5 VC对血红蛋白溶液的还原顺序

4 结论

(1) 无基质脐血血红蛋白在体外条件下, 极易被氧化成 Met-Hb。自氧化时, Met-Hb 含量 4 h 内由 5% 升高至 35%, 而叠氮钠催化作用下, 氧化更明显, Met-Hb 含量 3 h 内由 5% 升高至 65%, 完全丧失携氧能力。

(2) VC 的加入能够有效抑制 Met-Hb 的升高, 但同时引入自由基清除剂 TEMPO, 却不能加速 VC 对 Met-Hb 的还原, 仅缩短了还原的时间。

(3) VC 对脐血血红蛋白溶液的还原顺序为: 先清除溶液中的溶解氧, 再清除血红蛋白结合氧, 最后还原 Met-Hb。

参考文献:

[1] SIBINGA C S, DAS P C, FRATANTONI J C. Alternative Approaches to Human Blood Resources in Clinical Practice[M]. Europe: Springer Netherlands, 2013.

[2] 吴红, 吴道澄, 李晓晔, 等. 血液代用品-血红蛋白修饰物的研究进展[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(2): 116-118.

[3] CARSON J L. Blood transfusion and risk of infection: new convincing evidence[J]. JAMA, 2014, 311(13): 1293-1294.

[4] NAMULULI B A, GUERRIERI C, DRAMAIX M W. Prevalence and incidence of HIV and hepatitis B among blood donors and estimated residual risk of transmission of HIV and HBV virus by blood transfusion[J]. Rev Epidemiol Sante Publique, 2013, 61(2): 139-144.

[5] DOU Y H, FUH J L, CHEN S P, et al. Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome after Blood Transfusion [J]. Headache, 2014, 54(4): 736-744.

[6] NUIS R J, ROODES C J, SINNING J M, et al. Blood transfusion and the risk of acute kidney injury after transcatheter aortic valve implantation [J]. Circ Cardiovasc Interv, 2012, 5(5): 680-688.

[7] 杨成民, 李家增, 季阳. 基础输血学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001.

[8] 周文涛, 李桑, 李凤娟, 等. 人胎盘血红蛋白聚合工艺的优化研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2013(6): 1336-1342.

- [9] GREENBURG A G, KIM H W. Hemoglobin-based oxygen carriers[J]. *Critical Care*, 2004, 8(2): 61-64.
- [10] HEMELRIJCK V, JAN M D, LEWIS J, et al. A Safety and Efficacy Evaluation of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier HBOC-201 in a Randomized, Multicenter Red Blood Cell Controlled Trial in Noncardiac Surgery Patients[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2014, 119(4): 766-776.
- [11] SIMONI J S, VILLANUEVA J, MOELLER J F, et al. Control of oxidative reactions of hemoglobin in the design of blood substitutes: Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system[J]. *Artificial Organs*, 2009, 33(2): 115-126.
- [12] VIGNERON C, SMANI Y, FAIVRE B. Blood substitutes: state of the art and technical setbacks and why we are still disappointed[J]. *Bull Acad Natl Med*, 2007, 191(4): 837-847.
- [13] ARJAN E J, NOOY D, ARIE C, et al. On the use of stable organic nitroxyl radicals for the oxidation of primary and secondary alcohols [J]. *Synthesis*, 1996 (10): 1153-1176.
- [14] 刘有成, 吴隆民, 刘中立, 等. 氮氧自由基的研究[J]. *化学学报*, 1980, 1(2): 67-74.
- [15] 张发, 刘有成. 吡啶类氮氧自由基的电子转移反应[J]. *科学通报*, 2010(24): 2447-2447.
- [16] 杨成民. 用于红细胞代用品的高纯度无热原无基质血红蛋白的制备方法: CN01108643.2 [P]. 2002-01-25.
- [17] 解瑞宝, 王翔, 刘丽丽, 等. 血红蛋白为基础的红细胞代用品以 [P(O₂)]₅₀ 测定方法的研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2010, 14(4): 290-293.
- [18] HU Tao, LI Dongxia, BELUR N, et al. Autoxidation of the Site-Specifically PEGylated Hemoglobins: Role of the PEG Chains and the Sites of PEGylation in the Autoxidation[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(41): 10981-10990.

The Redox Reaction of Placenta Hemoglobin in Vitro

SU Xiulan¹, WANG Xiang²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sichuan University of Arts and Science, Dazhou 635000, China;
2. School of Environmental and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China)

Abstract: The purpose of this paper is to research the redox reactions of hemoglobin in vitro. The content of methemoglobin and oxygen saturation is measured with time going by when oxidant and reductant is added into hemoglobin solution. The content of methemoglobin is climbing from 5% to 35% by autoxidation and from 5% to 65% by sodium azide mediated oxidation; however, the content of methemoglobin is reducing from 45% to 5% when VC is added. Placenta hemoglobin is oxidized easily in vitro; VC could reduce the content of methemoglobin effectively and the restore sequence is cleaning dissolved oxygen firstly, then consuming bound oxygen, and reducing methemoglobin lastly; TEMPO could shorten the time of reducing, but it could not led to faster reduction rate.

Key words: blood substitute; placenta hemoglobin; TEMPO; redox reaction