

表面活性剂溶血能力及其在微核制片中的选择研究*

林芝源, 吴圻荣, 李 灏, 彭彩霞 (茂名市职业病防治院, 广东茂名 525011)

摘要:目的 通过对表面活性剂溶血特性的研究, 阐明表面活性剂用于微核制片的作用机制。方法 将表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基硫酸钠(SDS)、辛基苯基聚氧乙烯醚(TritonX-100)和辛基苯酚聚氧乙烯(10)醚(OP-10)等配制成一定浓度的溶液, 等渗条件下, 与红细胞悬液进行溶血试验, 利用吸光度比较溶血程度, 用显微镜观察白细胞形态的改变, 并探讨表面活性剂分离血液淋巴细胞的可行性。结果 溶血能力强弱依次为: CTAB>SDS>TritonX-100>OP-10; 当RBC含量过剩时, 溶血程度随着RBC含量的增加而降低; RBC浓度(v/v)一定时, 溶血程度随着平均红细胞体积(MCV)的减小而降低; 未洗涤RBC悬液其溶血程度低于洗涤组($Z=-2.366, P<0.02$); 在0.05 g/L CTAB和1.5% RBC混合液中, RBC溶解后, WBC胞浆可保持一段时间。结论 阳离子表面活性剂CTAB的溶血能力最强, 溶血能力与RBC含量、MCV大小、RBC洗涤与否等有关。CTAB对RBC的破坏作用较WBC强, 是微核制片的较理想溶血剂。

关键词: 表面活性剂; 溶血能力; 微核制片; 红细胞; 淋巴细胞

中图分类号: R446.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)04-135-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.033

Study on the Hemolytic Ability of Surfactant and Its Selection in Micronuclear Production

LIN Zhi-yuan, WU Qi-rong, LI Hao, PENG Cai-xia (Maoming Occupational Disease Prevention and Control Institute, Guangdong Maoming 525011, China)

Abstract: **Objective** To study the mechanism of action of surfactants on micronucleus production by studying the hemolysis characteristics of surfactants. **Methods** Surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS), octylphenyl polyoxyethylene ether (Triton X-100) and octylphenol polyoxyethylene (10) ether (OP-10) was formulated into a solution of a certain concentration. Under isotonic conditions, a hemolysis test was performed with the RBC suspension, the degree of hemolysis was compared by absorbance, the change of WBC morphology was observed by a microscope, and explored the feasibility of separating blood lymphocytes from the blood with surfactant. **Results** The order of hemolysis ability was: CTAB>SDS>TritonX-100>OP-10. When the RBC content was excessive, the degree of hemolysis decreased with the increase of RBC content. When the RBC concentration (v/v) was constant, the degree of hemolysis decreased with the decrease of MCV. The unwashed RBC suspension had a lower degree of hemolysis than the wash group ($Z=-2.366, P<0.02$). In the 0.05 g/L CTAB and 1.5% RBC mixture, after RBC dissolution, WBC cytosolasm could maintained for a period of time. **Conclusion** The cationic surfactant CTAB had the strongest hemolysis ability, and the hemolysis ability was related to RBC content, MCV size and RBC washing. CTAB had a stronger destructive effect on RBC than WBC, and it is an ideal hemolytic agent for micronucleus production.

Keywords: surfactant; hemolysis ability; micronucleus tablet; red blood cells; lymphocytes

表面活性剂有多种功能, 应用广泛。某些表面活性剂能使血液细胞发生裂解, 具有溶血作用, 在医学检验中常用来配制溶血剂或清洗剂^[1]。国内关于表面活性剂溶血能力的研究报道较少, 曾有学者用鸭血来做实验样本的溶血研究^[2], 但人与动物的红细胞(RBC)有差异。微核测试是遗传毒理学检测方法, 是评价辐射损伤的指标之一, 微核制片过程须除去RBC, 对溶血剂的选择还是一大难题, 目前采用的KCl低渗溶血法^[3], 其溶血时间长, 溶血程度较难把握, 影响结果的准确性。本文采用人外周血液为实验样本, 探讨了阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、阴离子表面活性剂

十二烷基硫酸钠(SDS)、非离子表面活性剂辛基苯基聚氧乙烯醚(TritonX-100)、乳化剂辛基苯酚聚氧乙烯(10)醚(OP-10)等的溶血特性, 对选择表面活性剂CTAB用于微核制片的作用机制进行了研究, 为临床应用溶血试验以及提高微核制片的质量提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 来自职业体检的参检人员, 静脉抽血, EDTA-K₂抗凝, 通过体检结果查询RBC各项数据, 选取MCV在85~97 fl之间、Hb在120~168 g/L之间的新鲜血液。另外, 选择MCV分别为: 98.1, 92.3, 86.2, 79.8, 73.5, 67.5和61.7 fl

* 作者简介: 林芝源(1965—), 男, 副主任检验师, 主要从事临床检验与遗传毒理检验工作, E-mail: 13929722578@139.com。

的血液样本 7 例,每例样本一分为二,其中一份作为对照组。

1.2 仪器和试剂 721 分光光度计(上海精密仪器有限公司),光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。CTAB(山东济宁化工研究所,AR);SDS(广州市中南化工仪器有限公司,AR);TritonX-100(博美生物科技有限公司,进口分装,纯度 > 99.0%);OP-10(天津市北联精细化工有限公司,CP)。

1.3 研究方法

1.3.1 样本处理:抗凝血液用生理盐水 1:4 稀释洗涤 2 次(对照组除外),按比容配制成一定浓度的 RBC 悬液(v/v)。

1.3.2 试剂配制:称量一定重量的表面活性剂,用热蒸馏水溶解后配制成 20 g/L 的原液,再用生理盐水稀释为应用液。

1.3.3 溶血试验:等渗条件下,红细胞悬液与表面活性剂溶液混合,溶血 15 min,离心吸取上清液稀释一定的倍数,于 540 nm 波长比色,用吸光度(A)来比较溶血程度。溶血能力比较试验:50%(v/v) RBC 悬液 0.50 ml 与 2.0 g/L 表面活性剂溶液 0.2 ml 混合,重复 3 次;溶血敏感度比较试验:3.0%(v/v) RBC 悬液与不同浓度的表面活性剂溶液等体积混合(混合液最终浓度为原液的 1/2),观察 5s~10s 内完全溶血时(悬液透明)所需表面活性剂的最低浓度,重复 5 次;悬液 RBC 含量对溶血能力的影响试验:RBC 悬液倍比稀释成 7 个梯度(50.00%, 25.00%, 12.50%, 6.25%, 3.12%, 1.56%和 0.78%),分别取 0.50 ml 与 1.0 g/L 的表面活性剂溶液 0.15 ml 混合,重复 3 次;MCV 大小、RBC 洗涤与否对溶血能力的影响试验:7 例

MCV 不同的样本,洗涤组和对照组(未洗涤)同时配成 25% RBC 悬液,分别取 1.00 ml 与 1.0 g/L 的 CTAB 溶液 0.20 ml 混合,重复 3 次。

1.3.4 白细胞形态改变的观察与判断标准:取浓度分别为 0.1,0.5 和 1.0 g/L 的 CTAB 溶液与 3%(v/v) RBC 悬液等体积混合(混合液最终浓度为原液的 1/2),完全溶血后(约 10 s)用显微镜观察白细胞形态的变化,重复 5 次。判断标准:白细胞形态完整,胞膜圆滑(-);出现胞浆膨出或胞膜陷入的细胞(±);胞浆膨出或胞膜陷入的细胞占 20%以上(+);见到胞浆消失的裸核(++);裸核占 20%以上(+++)。

1.4 统计学分析 利用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,两组间比较采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溶血能力比较 4 种表面活性剂 CTAB, SDS, TritonX-100 和 OP-10 的溶血结果(相对 A 值)分别为:0.635,0.382,0.205 和 0.198,溶血能力强弱依次为:CTAB>SDS>TritonX-100>OP-10。

2.2 溶血敏感度比较 10 s 内完全溶解 1.5%(v/v) RBC 悬液时,混合液所需各种表面活性剂的最低浓度分别为 CTAB:0.05 g/L,SDS:0.08 g/L, TritonX-100:0.14 g/L 和 OP-10:0.15 g/L。

2.3 RBC 含量对溶血能力的影响 结果见表 1。RBC 浓度由低到高,4 种表面活性剂的吸光度(相对 A 值)在一定范围内与 RBC 浓度呈正比,当溶血不完全时,随着 RBC 含量的增加而降低,溶血程度曲线表现为两边低中间高的峰形。

表 1 RBC 含量对溶血能力的影响(相对 A 值)($n=3$)

活性剂种类	50.00%	25.00%	12.50%	6.25%	3.12%	1.56%	0.78%
CTAB	0.322	0.454	0.373	0.188	0.097	0.045	0.022
SDS	0.185	0.220	0.291	0.175	0.088	0.044	0.023
TritonX-100	0.125	0.138	0.142	0.181	0.092	0.046	0.023
OP-10	0.121	0.130	0.136	0.172	0.091	0.042	0.020

2.4 MCV 大小、RBC 洗涤对溶血能力的影响 结果见表 2。对照组吸光度(相对 A 值)低于洗涤

组,差异有统计学意义($Z = -2.366$, $P = 0.018$);两组的吸光度(A 值)都随着 MCV 的减小而降低。

表 2 MCV 大小、RBC 洗涤对溶血能力的影响(相对 A 值)($n=3$)

组别	98.1(fl)	92.3(fl)	86.2(fl)	79.8(fl)	73.5(fl)	67.5(fl)	61.7(fl)
洗涤组(A1)	0.485	0.458	0.426	0.393	0.358	0.319	0.283
对照组(A2)	0.278	0.260	0.241	0.214	0.185	0.157	0.135

2.5 CTAB对白细胞形态的影响 结果见表3。在0.05 g/L CTAB混合液中,RBC溶解后白细胞(粒细胞和淋巴细胞)胞浆仍保持完整,60 s出现胞浆膨出或胞膜陷入的不规则形状,300 s后或CTAB浓度增大时,可见到胞浆消失的裸核。

表3 CTAB对白细胞形态的影响($n=5$)

混合液组分浓度		30s	60s	120s	300s
CTAB(g/L)	RBC(%)				
0.05	1.5	—	±	+	+
0.25	1.5	±	+	+	++
0.50	1.5	+	++	+++	++++

3 讨论

3.1 目前,表面活性剂溶血机理尚未清楚,一般认为是表面活性剂对细胞膜上的脂类有特殊作用,能使细胞膜发生变化,低浓度时可改变细胞膜的结构,提高细胞膜的渗透性,使细胞吸水后膨胀破裂而导致溶血;当浓度高达一定范围时,表面活性剂在细胞膜上达到饱和,使细胞膜发生溶解导致溶血^[4]。另一方面,细胞膜表面的脂蛋白对表面活性剂有淬灭作用,膜表面的脂蛋白越多,表面活性剂对细胞膜的破坏作用越弱^[5]。

本课题用人外周血液探讨了各种表面活性剂的溶血特性,研究发现,阳离子表面活性剂CTAB的溶血能力最强,这与文献[2]报道的TritonX-100溶血能力最强、SDS溶血能力大于CTAB的结果不相符,这是否为试验方法或是试验材料的差异,有待以后深入研究。本研究结果显示,当溶解液中RBC过剩时,溶血程度随着RBC含量的增加而降低,可能是红细胞膜表面的脂蛋白对表面活性剂有淬灭作用,出现抗溶血作用的缘故,因为RBC含量越多,膜表面积越大,脂蛋白含量越多。此外,本研究结果还显示,RBC浓度(v/v)一定时,溶血程度随着MCV的减小而降低,也可能与红细胞膜表面积比例增大有关,因为相同比容的悬液,RBC体积越小,其含细胞数越多,膜表面积也越大。这些研究结果提示红细胞膜对表面活性剂有一定的抗溶血作用,一定浓度的混合液红细胞膜表面积越大,溶血程度越低。另外,本研究结果还显示,未洗涤RBC悬液其溶血程度低于洗涤组($P<0.02$),可能是未洗涤RBC悬液含有较多的血浆,血浆中的脂质或蛋白质等成分消耗了部分表面活性剂的缘故。这表明血浆对表面活性剂有一定的降溶血作用。

本实验表3结果显示,在0.05 g/L CTAB溶解液中,红细胞溶解后,白细胞胞浆仍保持一定的时间,最后才变为裸核。这表明,在低浓度的

CTAB溶解液中,CTAB对红细胞膜的破坏作用较白细胞强。

3.2 微核制片过程的主要步骤是除去红细胞,获得足够数量的淋巴细胞,如何去除红细胞而又保证淋巴细胞的完整是微核制片的关键^[6],因此,微核制片所用的溶血剂必须具有对红细胞的破坏作用较淋巴细胞强、或者选择性地破坏红细胞的功能。本研究结果表明,低浓度的CTAB溶液具有对红细胞的破坏作用较淋巴细胞强的特性,适用于微核制片。这是由于红细胞膜与淋巴细胞膜的结构和成份比例有差异^[7],对表面活性剂的敏感性不同,可以作如下解释:①红细胞表面带负电荷,易与阳离子表面活性剂CTAB通过静电作用吸附于其表面^[8],加速其溶解过程。②低浓度的表面活性剂能改变细胞膜的渗透性,使细胞吸水膨胀,而红细胞膜结构简单,对膨胀的耐受能力较差,易破裂。③脂蛋白对表面活性剂有淬灭作用,在各种细胞中,红细胞膜表面含脂蛋白最少^[9],在同一溶解液中比其他细胞先溶解。④随着RBC的溶解,CTAB本身被消耗,使其在溶液中的游离浓度逐渐降低,随后减弱了溶解液对淋巴细胞的破坏作用。因此,在合适的CTAB浓度和一定的溶血时间内,能使红细胞完全溶解,而淋巴细胞维持原有体积状态,然后经固定剂固定,使胞浆得以保留^[9]。可见,用表面活性剂CTAB溶血除去红细胞,与常规低渗法相比较,更容易获得胞浆完整的淋巴细胞。

综上所述,表面活性剂溶血能力与RBC含量、MCV大小、RBC洗涤与否等有关,阳离子表面活性剂CTAB的溶血能力最强,对红细胞的破坏作用较各种白细胞强,是分离血液淋巴细胞的较理想溶血剂,但是,如果浓度过高或溶血时间过长,超出了其承受的限度,细胞膜也会受损甚至成为裸核,因此,掌握表面活性剂的溶血特性,调试合适的浓度比例和溶血时间,是获得高质量微核制片的关键。

参考文献:

- [1] 岳玉林. 德灵特蛋白分析仪比色皿清洗剂的研制与应用[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1): 125.
YUE Yulin. Development and application of color filter cleaning agent for Deling protein analyzer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2008, 23(1): 125.
- [2] 刘新露, 潘训海, 譙康全. 表面活性剂对红细胞膜的作用研究[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2007, 20(4): 96-98.
LIU Xinlu, PAN Xunhai, QIAO Kangquan. Effects of different surfactants on erythrocyte membrane[J]. Journal of Sichuan University of Science & Engineer-

- ing(Natural Science Edition),2007,20(4):96-98.
- [3] 李丽梅,张文,刘征宇,等.人外周血淋巴细胞微核制片方法的改良[J].国际检验医学杂志,2015,36(1):143-144.
LI Limei,ZHANG Wen,LIU Zhengyu,et al. Improvement of micronucleus method for human peripheral blood lymphocyte[J]. International Journal of Laboratory Medicine,2015,36(1):143-144.
- [4] 刁兆玉,成朋,王仲妮.表面活性剂溶血作用的研究进展[J].食品与药品,2010,12(3):125-129.
DIAO Zhaoyu,CHENG Peng,WANG Zhongni. Progress in hemolytic action of surfactants[J]. Food and Drugs,2010,12(3):125-129.
- [5] 周洪华,颜箫,高航云,等.溶血剂对白细胞形态的影响[J].中华医学检验杂志,1997,20(2):87-89.
ZHOU Honghua,YAN Xiao,GAO Hangyun,et al. Effects and mechanism of lysis on white cell morphology[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 1997,20(2):87-89.
- [6] 廖亚平,张鼎,孙梓桢,等.全血培养胞质分裂阻断微核(CBMN)实验方法的改进[J].复旦学报(医学版),2014,41(3):395-399.
LIAO Yaping,ZHANG Ding,SUN Zian,et al. A modified protocol for the cytokinesis-block micronucleus(CBMN) assay using whole human blood[J]. Fudan Univ J Med Sci (Medical Edition),2014,41(3):395-399.
- [7] 谭齐贤,张树平.临床血液学和血液检验[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005:95-97.
TAN Qixian,ZHANG Shuping. Clinical hematology and blood testing[M]. 3th Edition. Beijing: People's Health Publishing House,2005:95-97.
- [8] 崔颖鹏,俞纯山.血细胞自动分析与溶血剂[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2000,21(1):29,32.
CUI Yingpeng,YU Chunshan. Automated analysis of blood cells and hemolytic agents[J]. Foreign Medical Clinical Biochemistry and Laboratory Sciences,2000,21(1):29,32.
- [9] 林芝源,吴圻荣,陈燕萍,等.十六烷基三甲基溴化铵制片法检测人周围血淋巴细胞微核[J].中国职业医学,2014,41(6):719-722.
LIN Zhiyuan,WU Qirong,CHEN Yanping,et al. Production method with cetyl trimethyl ammonium bromide for detection of human peripheral blood lymphocytes micronucleus[J]. China Occupational Medicine, 2014,41(6):719-722.
- 收稿日期:2018-11-12 修回日期:2019-05-03
-
- (上接 134 页)
- YU Peijuan,ZHANG Gaolin,YAN Ruhong,et al. Urinary sediment analysis combined with serum procalcitonin determination in the diagnosis of urinary tract infection[J]. Laboratory Medicine,2018,33(4):299-304.
- [8] 刘小宁.尿常规亚硝酸盐检测对细菌性尿路感染的诊断价值研究[J].中国医药指南,2018,16(7):97.
LIU Xiaoning. Diagnostic value of urine routine nitrite detection for bacterial urinary tract infection[J]. Guide of China Medicine,2018,16(7):97.
- [9] 刘宝芹.尿液分析仪检测结果的影响因素及对策[J].医疗装备,2018,31(5):203-204.
LIU Baoqin. Influencing factors of urine analyzer test results and countermeasures[J]. Medical Equipment, 2018,31(5):203-204.
- [10] 王东.尿液试纸暴露时间对尿液分析仪检测结果的影响[J].医疗装备,2018,31(12):49-50.
WANG Dong. Effects of exposure time of urine dipsticks on urine analyzer results[J]. Medical Equipment,2018,31(12):49-50.
- [11] 冯玉青,黄素素,罗靖,等.UF-1000i全自动尿液分析仪的细菌通道检测与中段尿培养的正确度分析[J].检验医学,2018,33(1):60-62.
FENG Yuqing,HUANG Susu,LUO Jing,et al. Consistency rate of UF-1000i automatic urine analyzer bacterial channel and mid-stream urine culturing[J]. Laboratory Medicine,2018,33(1):60-62.
- [12] CONKAR S,MIR S. Urine flow cytometry in the diagnosis of urinary tract infection[J]. The Indian Journal of Pediatrics,2018,85(11):995-999.
- [13] MONSEN T,RYDEN P. A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,2017,36(9):1691-1703.
- [14] 曾仲麟,林雅媛,李健茹,等.UF-1000i尿沉渣分析仪在尿路感染诊断的评价[J].实验与检验医学,2017,35(3):420-422.
ZENG Zhonglin,LIN Yayuan,LI Jianru,et al. Evaluation of UF-1000i urinary sediment analyzer in diagnosis of urinary tract infection[J]. Experimental and Laboratory Medicine,2017,35(3):420-422.
- [15] 刘肖肖,孔德友,刘广宇,等.基于融合算法的尿沉渣显微图像有形成分边缘检测方法研究[J].中国医学装备,2018,15(11):28-31.
LIU Xiaoxiao,KONG Deyou,LIU Gusngyu,et al. Research on the detection method of external edge of morphological components of microscopic images of urine sediment based fusion algorithms[J]. China Medical Equipment,2018,15(11):28-31.
- 收稿日期:2019-04-04 修回日期:2019-04-29