

## 超氧歧化酶(SOD)对人红细胞膜的保护作用

秦德安 何学民 王永江\*

(华东师范大学生物系,上海)

### 提 要

前文曾报道,红细胞膜经外源  $O_2^-$  自由基(碱性条件下,邻苯三酚自氧化产生)处理后有明显损伤作用。在此基础上,本文研究猪红细胞 SOD 对人红细胞膜氧化损伤的保护作用。结果表明,外源 SOD 对人红细胞膜有明显保护作用,表现为膜流动性和膜重封闭能力保持正常水平,膜蛋白交联作用有显著减小。

超氧阴离子( $O_2^-$ )是生物体内主要的自由基,在很多情况下, $O_2^-$ 对机体是有害的,是导致炎症、衰老及癌变等的原因之一<sup>[1]</sup>。超氧歧化酶(SOD)是一类重要的氧自由基清除酶,具抗炎、抗衰和抗辐射的作用,作为一类新型的治疗酶制剂已受到广泛重视<sup>[2,3]</sup>。目前国内 SOD 产品多数由猪红细胞提取,其药理作用尚少见报道。本文将在前文<sup>[3]</sup>基础上,研究猪红细胞 SOD 对外源  $O_2^-$  所致红细胞膜氧化损伤的保护作用。

### 材 料 与 方 法

新鲜健康成人静脉血购自血库,邻苯三酚为分析纯,SOD系苏州生物化学制药厂生产的猪红细胞 SOD,经测定酶活性为 1000 U/mg。

**1. 红细胞膜制剂** 按 Dodge<sup>[4]</sup> 低渗溶血法制备,缓冲液改用 pH 8.35, 5 mmol/L 磷酸缓冲液(简称 5 p8.35)。封闭红细胞膜(resealed ghost)制剂按 Steck 报道<sup>[5]</sup>的等渗法制备。

**2. SOD 抗氧化试验** 取上述 pH 8.35 红细胞膜悬浮液 5 ml,先加入一定量 SOD,然后加 50  $\mu$ l 新鲜配制的 0.1 mol/L 邻苯三酚溶液(最终浓度为 1 mmol/L)在 37℃保温 10 分钟,立即用 6 倍的 pH 7.4, 10 mmol/L 磷酸缓冲液(简称 10 p 7.4)稀释并离心(15,000r/min

4℃)40 分钟,取膜沉淀备用。同时以不加 SOD 直接用邻苯三酚氧化处理为对照。

**3. 膜脂流动性** 以荧光试剂 DPH (1, 6-二苯基-1,3,5-己三烯,Fluka AG 产品)为探针,用日立 850 型荧光分光光度计测定 DPH 荧光偏振度(P值)<sup>[6]</sup>。

**4. 膜蛋白组分测定** 按 SDS-PAGE 法进行<sup>[7]</sup>。用 Beckman CDS-200 型光密度计,530 nm 处测定膜蛋白组分相对百分含量。

**5. 红细胞膜封闭度** 用 Steck 报道的酶法<sup>[5]</sup>测定。红细胞膜重封闭后,位于膜内侧表面的 NADH-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 氧化还原酶活性不能检测,当用皂素处理后即可消除通透屏障显示其最大酶活力。根据这一原理,封闭度可按下式计算:

$$\text{封闭度(\%)} = \frac{\text{加皂素酶活力} - \text{不加皂素酶活力}}{\text{加皂素酶活力}} \times 100$$

### 结 果 与 讨 论

#### 一、SOD 对邻苯三酚自氧化速率的影响

邻苯三酚在碱性条件下,能迅速自氧化,放出  $O_2^-$ ,生成中间产物(在 420 nm 处有强烈光

\* 浙江省丽水师专进修教师。

吸收)。如图 1 中曲线 A 所示,在反应初始阶段,中间产物量与时间成线性关系;而在含 SOD 的体系中,由于 SOD 有消除  $O_2^-$  的能力,故邻苯三酚自氧化速率明显下降,而且随 SOD 酶量增加而抑制作用益趋显著(见图 1 中曲线 B—F)

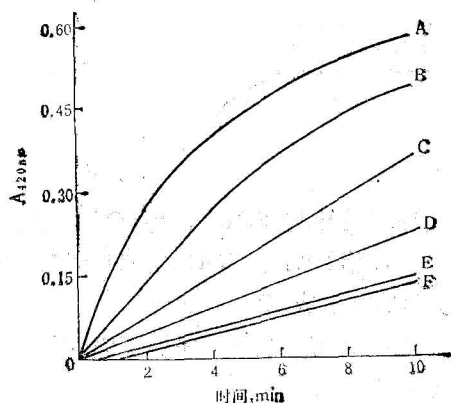


图 1 不同 SOD 酶量对邻苯三酚自氧化的影响

A. 不加 SOD, B. 加 7.5 U/ml SOD, C. 加 15 U/ml SOD, D. 加 30 U/ml SOD, E. 加 60 U/ml SOD, F. 加 120 U/ml SOD

## 二、 $O_2^-$ 对红细胞膜流动性的影响及 SOD 的保护作用

生物膜的流动性是表现生物膜正常功能的必要条件。 $O_2^-$  等氧自由基最易使不饱和脂肪酸氧化引起脂质过氧化链锁反应,损害细胞膜的结构和功能<sup>[8]</sup>。图 2 表明,人红细胞膜经 1 mmol/L 邻苯三酚处理后,其流动性明显下降(偏振度  $P$  为  $0.271 \pm 0.001$ ),而事先加入一定量 SOD 后,能使红细胞膜免遭  $O_2^-$  氧化,如图 2 所示,当 SOD 最终浓度为 120 U/ml 以

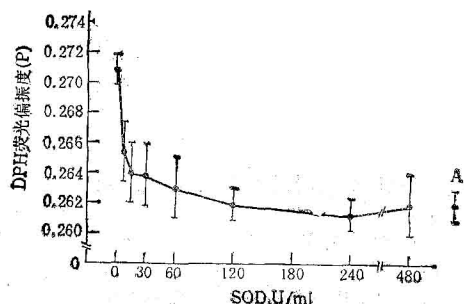


图 2 在不同 SOD 酶量体系中,人红细胞膜经 1 mmol/L 邻苯三酚处理后 DPH 荧光偏振度的变化

上时,流动性保持正常水平(偏振度  $P$  为  $0.262 \pm 0.001$ ,接近正常红细胞膜偏振度)。

## 三、SOD 对膜蛋白交联作用的影响

红细胞膜氧化后除膜流动性有明显变化外,膜蛋白亦被氧化而发生交联作用,形成高聚物(HMP)。据 Hochstein 报道<sup>[9]</sup>,细胞受氧化损伤时,膜收缩蛋白(Spectrin 即带 1,带 2 蛋白)与带 4.1 蛋白交联形成高聚物(HMP)。前文的结果<sup>[3]</sup>支持了这一论点,但也不排斥脂质过氧化产物(丙二醛)通过 Schiff's 碱和膜蛋白交联形成 HMP 的机理<sup>[8]</sup>。图 3 为人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 图谱,图中 A 为正常红细胞膜蛋白电泳图谱, B 为 1 mmol/L 邻苯三酚处理后人红细胞膜蛋白电泳图谱,其中带 1,带 2 蛋白减少而在其前面清晰地出现一条膜蛋白高聚物(HMP)区带,表明膜氧化导致膜蛋白发生了交联作用,而事先加入最终浓度 120 U/ml 以上的 SOD,红细胞膜经同样的氧化反应后,HMP 明显减少(见图 3 和表 1)。但为何 HMP 不能完全消除?可能与  $O_2^-$  歧化产生的  $H_2O_2$

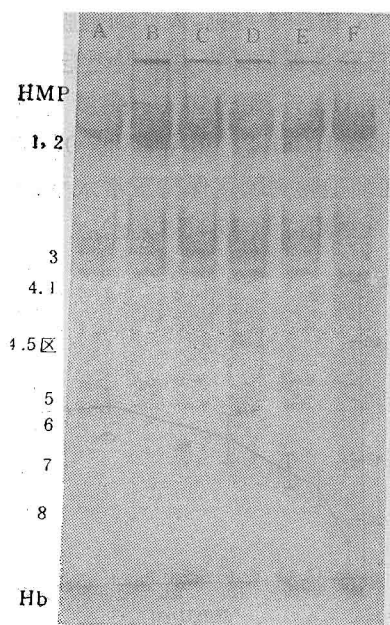


图 3 人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 图谱

A 为正常人红细胞膜蛋白组分, B—E 为经 1 mmol/L 邻苯三酚氧化的红细胞膜蛋白组分,其中 B 不加 SOD, C 加 30 U/ml SOD, D 加 60 U/ml SOD, E 加 120 U/ml SOD, F 加 240 U/ml SOD

表 1 SOD 对红细胞膜过氧化生成 HMP 百分含量\*的影响

| 例 数              | 正常红细胞膜 | 经 1 mmol/L 邻苯三酚处理红细胞膜 |                 |                 |                 |                 |
|------------------|--------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |        | 0                     | 30              | 60              | 120             | 240**           |
| 1                | 0      | 2.35                  | 1.90            | 1.25            | 0.94            | 1.10            |
| 2                | 0      | 1.92                  | 1.40            | 1.13            | 0.50            | 1.00            |
| 3                | 0      | 1.65                  | 0.38            | 0.21            | 0.23            | 0.35            |
| 4                | 0      | 1.78                  | 0.89            | 0.58            | —               | 0.11            |
| 5                | 0      | 1.92                  | —               | 0.80            | —               | 0.40            |
| $\bar{X} \pm SD$ | 0      | $1.92 \pm 0.26$       | $1.13 \pm 0.67$ | $0.79 \pm 0.42$ | $0.56 \pm 0.36$ | $0.59 \pm 0.43$ |

\* HMP 占红细胞膜蛋白(扣除 Hb)的百分含量。

\*\* 此行数字为 SOD 酶量 (U/ml)。

有关。由于  $H_2O_2$  及其与  $O_2^-$  反应生成的羟自由基 ( $OH\cdot$ ) 均是具有很强的氧化能力, 仍可使膜氧化损伤<sup>[10]</sup>。为此, 采用 SOD 和过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶联合作用, 以期提高抗氧化能力, 值得进一步研究。

#### 四、SOD 对红细胞膜重封闭能力的保护作用

正常红细胞膜在等渗溶液中能重新封闭起来, 恢复对大分子和阳离子的通透屏障, 形成封闭影泡<sup>[4]</sup>。由图 4 可见, 人红细胞膜经 1 mmol/L 邻苯三酚处理后即丧失重封闭能力, 其平均封闭度为 11.8%, 事先加入一定量 SOD 后(最终浓度 120 U/ml 以上)能阻止  $O_2^-$  的氧化作用, 使红细胞膜封闭度保持正常水平(正常红细胞膜制剂封闭度为 55.1% 以上)。

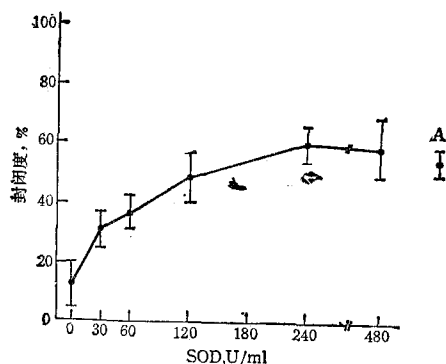


图 4 在不同 SOD 酶量体系中, 人红细胞膜经 1 mmol/L 邻苯三酚处理后封闭度的变化

综上所述, 一定量猪红细胞 SOD(120 U/ml) 对红细胞膜氧化损伤有明显的保护作用,

其主要原因显然与 SOD 消除  $O_2^-$  有关。由图 1 可见, 猪红细胞 SOD 能抑制邻苯三酚自氧化, 即抑制生成  $O_2^-$ , 从而使红细胞膜上脂质和蛋白质免遭  $O_2^-$  侵害, 保护了膜的正常结构和功能。

由于近年来  $O_2^-$  在生物衰老问题的研究中已占重要地位<sup>[1]</sup>, 本文结果无疑可为 SOD 用作抗衰药物提供一定的理论依据。此外, 上述红细胞膜氧化损伤实验模型为筛选其他消除氧自由基的药物提供了一种较简便的方法。

刘光万, 尤永进同学参加部分测试工作, 特此致谢。

#### 参 考 文 献

- [1] 王文杰:《生理科学进展》, 1985, 16(3), 196。
- [2] 袁勤生:《国外医学分子生物学分册》, 1982, 4(6), 278。
- [3] 秦德安等:《生物化学与生物物理进展》, 1988, 15(2), 121。
- [4] Dodge, J. T. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 100, 119。
- [5] Steck, T. L. and Kant, J. A.: *Methods in Enzymology*, 1974, 31, 172。
- [6] 林克椿、袁松青:《生理科学进展》, 1985, (1), 83。
- [7] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, 1971, 10(13), 2607。
- [8] 曹锡清等:《生物化学与生物物理进展》, 1986, (2), 17。
- [9] Hochstein, P.: *Federation Proceeding*, 1981, 40(2), 183。
- [10] 冯立明、潘华珍等:《中华血液学杂志》, 1987, 18(6), 328。

[本文于 1988 年 2 月 2 日收到]