

简 报

老化红细胞 SOD, LPO 与脂膜流动性的关系研究

姜招峰 周 翔

(白求恩医科大学生物化学教研室, 长春)

细胞老化是机体老化的基础^[1]。红细胞由于直接暴露在高氧分压下, 又有铁离子催化, 特别易受脂质过氧化的损伤, 因而成为研究细胞老化的较好材料。膜在细胞老化的过程中起着重要作用, 日益受到人们的注意和重视。个体衰老过程中关于红细胞膜的研究有过一些报道^[2,3]然而细胞水平上的研究工作较少。本文首先把红细胞分离为老化红细胞和年轻红细胞, 而后分别进行膜流动性 (LFU)、过氧化脂质 (LPO)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的研究, 并进行对照比较, 为研究红细胞老化过程及其与自由基代谢的关系提供一些实验资料。

材 料 和 方 法

1. 样品 29—37 岁健康成人 10 名, 男女各半。常规取抗凝全血样品, 离去白细胞和血小板待用。

2. 老化红细胞的分离 按文献 [4] 所述葡聚糖不连续密度梯度离心法进行。用生理盐水将 40% 的葡聚糖配成五种稀释度, 即 27%, 26%, 24%, 25%, 23%, 其比重分别为 1.093, 1.090, 1.086, 1.080, 1.074, 各取 1ml, 从比重大到小依次加到离心管中。取红细胞用生理盐水洗涤, 离心得压紧红细胞, 用生理盐水等体积稀释, 加 1ml 于盛有葡聚糖密度梯度的离心管中, 3000 r/min 离心一小时, 可见分层, 将最上一层收集待用。把最下一层收集、洗涤, 再加到上述密度梯度离心管中, 2500 r/min 离心一小时。而后收集最下层再进行梯度离心一次, 2000 r/min, 一小时。必要时可重复此过程。收集最下层待用。

3. 红细胞脂质过氧化物测定 参考 Uchlyma 的方法^[5]进行。取压紧红细胞 0.5ml, 用双蒸水 1:1 稀释, 向此溶血液中加入乙醇-氯仿 (5:3V/V) 混合液 0.42ml, 冰浴提取 1 分钟。然后, 加入 0.16ml 双蒸水, 3000 r/min 离心 5 分钟。取出上清液 0.5ml, 加入 20% 醋酸 1.2ml, 1% 硫代巴比妥酸 1.3ml, 95℃ 水浴 1 小时, 再用 3ml 正丁醇抽提振荡 1 分钟。3000 r/min 离心 10 分钟。在 532nm 波长处测定抽提液光密度。TEP (四乙氧基丙烷) 为标准, 结果以每克血红蛋白所

含丙二醛毫微克分子表示。

4. 红细胞 SOD 含量测定 参考 Misra 的方法^[6]进行。取上述溶血液 0.025ml, 加 6×10^{-4} mol/L 联大茴香胺 1ml, 3.9×10^{-5} mol/L 核黄素 1.0ml, 混合液用 40 瓦日光灯照 8 分钟, 距离 3cm, 在 460nm 波长处测定光密度。SOD 标准品同样处理, 结果以每克血红蛋白所含 SOD 微克数表示。

5. 红细胞膜脂流动性的测定 生理盐水洗过三次的红细胞, 浓度为 500 万/mm³, 用 0.01mol/L PBS 稀释 400 倍后, 取 2ml 与等量的 2×10^{-6} mol/L DPH (1,6-二苯基-1, 3,5-己三烯) 标记, 按文献 [7] 的方法测定红细胞膜的荧光偏振度 *P* 值。

6. 血红蛋白含量、红细胞数量测定 用微量血球计数仪 (Microcellcounter) 测定。

7. 仪器

MPF-66 荧光分光光度计。

Shimazu-210 可见/紫外分光光度计。

Sysmex CC-150 微量血球计数仪。

8. 试剂

SOD 标准品为长沙生化制药厂产品, 活力为 7000 U/mg。

TEP 标准品为日本产品。

DPH 为 Fluka 产品。

结 果 和 讨 论

用葡聚糖不连续密度梯度离心法, 将细胞分层, 第一次离心后可见分为三层, 据有关文献 [8] 我们分得的下层是比重大的老化红细胞。其体积约占 1/3, 大于老化红细胞的含量 (1%), 可见分离的纯度较低。我们通过将第一次分离得到的下层细胞再进一步分离纯化, 最后得到占体积 5% 的较纯的老化红细胞。年轻组仍采用第一次离得的上层细胞。

由表 1 可以看到, 老化红细胞的 SOD 较低, LPO 较高, 荧光偏振度 *P* 较大 (即膜脂流动性较小), 与年轻组比较, 均有显著差异。

自由基对生物体系损伤的重要方面是产生脂质过

表1 老化红细胞的 SOD、LPO、荧光偏振度的变化

样品	例数	SOD ($\mu\text{g/g.Hb.}$)	LPO (nmol/g.Hb.)	P(偏振度)
年轻红细胞	10	481.43 ± 10.13	2.31 ± 0.14	0.237 ± 0.031
老化红细胞	10	421.24 ± 27.17	3.97 ± 0.25	0.281 ± 0.026
P 值 (T-test)		$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.005$

氧化物^[9],其中最重要的是丙二醛,它能交联蛋白质,脂类,核酸及糖类,使生物膜变性,致使组织破坏和老化。当机体处于正常生理状态时,自由基不断产生,也不断被清除。但老化细胞内的各种抗氧化剂减少,因而对自由基及过氧化物的清除能力也减弱,脂质过氧化物的含量因之增高。有学者报道^[10],氧化是导致衰老的主要原因。体内自由基及脂质过氧化物随年龄的增长而升高^[11]。本文结果说明在细胞水平也是如此,随着细胞的增龄,LPO 也升高。

SOD 的功能是催化超氧阴离子自由基(O_2^-)的歧化反应,清除自由基,从而阻断自由基的链锁反应,对机体起保护作用^[12]。本文结果,SOD 含量随红细胞的增龄而减少,这与有关的个体水平的报道一致^[13]。

已知不饱和脂肪酸的凝固点低于饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸发生过氧化后,由于不饱和键减少,凝固点就会升高,膜的流动性就会变小,使膜丧失了正常的生理功能。本文结果,老化红细胞膜脂流动性下降,可能是由于 SOD 降低导致膜脂质过氧化程度加大所致^[14]。也有人说:可能是血红蛋白受超氧离子的侵袭氧化变成变性血红蛋白,再进一步分解成高铁卟啉,

后者可使膜脂质变性^[15]。我们觉得膜蛋白之间及其与脂质之间的氧化交联作用也是不容忽视的重要因素。

总之,据本文结果及有关资料,自由基在红细胞老化过程中起着重要作用,膜的过氧化损伤可能是红细胞老化的主要原因。

参 考 文 献

- [1] 吕维善等:《中华医学杂志》,1982,62,181。
- [2] 张南之等:《生理科学进展》,1984,15(3),222。
- [3] P. Hochstein and C. Rice-Evans: In *Lipid peroxidation in Biology and Medicine*, K. Yagi ed. Orlando Academic Press, 1982, 81~88。
- [4] Nakai, T. et al., *Acta Hematology Japan*, 1984, 47, 1230。
- [5] Uchlyma, M. et al., *Anal. Biochem.*, 1978, 86, 271。
- [6] Misra, H. P. et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1977, 181, 308。
- [7] 聂松青:《北京医学院学报》,1983,15(4),249。
- [8] 曹锡清等:《生物化学与生物物理进展》1986,(4),53。
- [9] Leibovitz, B E. et al., *J. Gerontology*, 1980,35(1), 24。
- [10] Roy, D. et al., *J. Neurochem*, 1984, 42, 628。
- [11] 佐佐木:《最新医学》,1978,33(5),863。
- [12] 李文杰:《生命的化学》,1982,2(5),49。
- [13] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(6),35。
- [14] Dobretsov, G. E. et al: *FEBS Lett.*, 1977, 84, 125。
- [15] 忻文娟等:《中华医学杂志》,1987,67(12),641。

[本文于1988年4月11日收到]

(上接第236页)

泳图谱,有二个峰。进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定收集酶液的均质性,结果发现在自然状态下也有二个峰。说明收集的酶液中主要含有二种蛋白质。

表1 MspI 的纯化步骤及结果

纯化步骤	蛋白质		活力	
	体积 (ml)	总量 (mg)	总单位 (U)	比活 (U/mg)
磷酸纤维素层析	21	6.3	4200	666
(NH_4) ₂ SO ₄ 处理 后浓缩液	14	3.6	3500	972

图版 IV 是 MspI 和 HpaII 降解 λ DNA 和

PBR 322 的酶切图谱。从图可见二种酶的酶谱完全相同。当用二种酶共同降解 λ DNA 和 pBR322 时,也无新片段产生。从而说明: MspI 与 HpaII 是同裂酶^[1]。

酶的稳定性: MspI 在上述未加牛血清白蛋白的条件下保存3个月,活性无明显损失。

参 考 文 献

- [1] Roberts, R. J.: *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13, supplement, r165。
- [2] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265。
- [3] Weber, K. and Osborn, M.: *The Proteins*, Acad. Press, New York, 1975, Vol. 1 (3rd), 180~206。

[本文于1988年3月5日收到]