

研究工作

丙二醛对红细胞的作用

潘华珍 冯立明 许彩民

陈曦* 刘晓冰

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

根据我们过去的工作^[1], 红细胞在体外与过氧化氢反应后, 可产生丙二醛 (MDA), 它是脂质氧化的主要产物, 可交联磷脂及蛋白质, 也可使蛋白质的巯基氧化, 从而损伤红细胞膜, 使之容易产生溶血。因此, 用 MDA 处理正常红细胞, 研究其与溶血的关系, 将有助于阐明溶血性贫血的发病机制及寻找治疗溶血的药物。本文用 MDA 在体外与红细胞作用, 观察其对红细胞的溶血作用及对红细胞膜的影响, 并观察抗氧化剂抗氧化保护红细胞膜的作用, 为寻求有效的抗氧化溶血药物提供依据。

一、材料与 方法

1. 材料 红细胞取自正常人静脉血, 用生理盐水洗三次, 配成红细胞悬液备用。丙二醛 (MDA) 为 Aldrich Chemical Company 产品, 维生素 E 来自 Hoffmann La Roche Inc., 50 mg/ml, 亚硒酸钠为北京化工厂产品, Ampholine 为 LKB 产品, 醋酸纤维膜为浙江黄岩曙光化工厂产品。

2. MDA 直接溶血试验 用生理盐水将 MDA 稀释至不同浓度, 取 0.1ml 红细胞悬液加 0.1ml MDA, 使终浓度分别为 5、10、15、20、25、30、40、60 μM , 37°C 保温 1 小时, 取出加 4ml 生理盐水, 离心后于 415nm 测上清溶血度, 与红细胞在蒸馏水中溶血作对比算出溶血度 (%)。

3. Vit E 和亚硒酸钠抗氧化溶血试验 取红细胞悬液 0.1ml 加 0.1ml MDA, 分别加入 0.1ml 的 Vit E 及亚硒酸钠溶液, MDA 终浓度均为 30 μM 。于 37°C 保温 1 小时, 离心后于 415nm 测上清算出溶血度 (%)。

4. MDA 对红细胞膜的影响 按 Dodge 法^[2]制备红细胞膜, 加入不同浓度 MDA, 于 37°C 保温 30 分钟, 离心弃上清, 处理后的红细胞膜作 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析^[3]及测膜巯基 (SH) 的含量^[4]。

5. Vit E 和亚硒酸钠对红细胞膜的保护作用 取新鲜红细胞膜, 加入 MDA, 终浓度为 30 μM , 再分别加入 Vit E 和亚硒酸钠, 使终浓度分别为 10 微克和 $3 \times 10^{-7} \text{M}$ 。然后于 37°C 保温 30 分钟, 离心后红细胞膜作 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及测膜巯基含量。

6. MDA 对血红蛋白 (Hb) 的影响 取经不同浓度 MDA 处理后的红细胞, 加入等体积的水和 0.5 体积的四氯化碳, 振荡 3 分钟, 离心取上清即为 Hb 液。然后作醋酸纤维膜电泳^[5], 同时按 Basset 法^[6]作等电点聚焦电泳。胶浓度 5%, 交联度 3%, 内含 Ampholine 2% (pH 6—8), 2% pH 7—9, 胶厚 0.5 毫米。电泳液阳极 1 M 磷酸, 阴极 1 N 氢氧化钠, 恒功率 9 W, 电泳 3 小时。

二、结 果

1. MDA 直接溶血试验 MDA 对红细胞

表 1 不同浓度的 MDA 对红细胞的作用

MDA 浓度 (μM)	5	10	15	20	25	30	40	60
溶血度 (%)	0	2.4	3.8	4.9	13.9	50.1	37.8	42.8

* 北京阜外医院生化室。

作用的结果见表 1。

从以上结果看,MDA 对红细胞有破坏作用,可使之产生溶血。当 MDA 浓度为 $30\mu\text{M}$ 时溶血度最高,而当 MDA 浓度为 $30\mu\text{M}$ 以上时,由于红细胞部分或全部变成絮状沉淀物,可能是 Hb 与膜结合产生沉淀,结果溶血度反而下降。

2. Vit E 及亚硒酸钠抗氧化溶血作用 分别见表 2 及表 3。

表 2 不同量的 Vit E 抗溶血作用

Vit E 含量 (μg)	0	0.1	1	5	10	20	30
溶血度(%)	61.0	57.6	46.7	24.8	16.2	16.6	15.8

表 3 不同浓度亚硒酸钠的抗溶血作用

亚硒酸钠浓度 (M)	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
溶血度(%)	12.8	9.3	9.5	9.7	61.0

从结果看,当 Vit E 含量为 $1\mu\text{g}$ 时溶血作用减少,含量为 $5\mu\text{g}$ 时则比较明显, $10\mu\text{g}$ 以上,即使 VitE 的量再增加溶血度亦无明显减少。

从表 3 结果来看,亚硒酸钠也有降低 MDA 对红细胞的溶血作用。

3. 红细胞膜巯基的测定及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 经不同浓度的 MDA 处理后红细胞膜巯基测定结果见表 4, SDS 电泳结果

表 4 不同浓度的 MDA 对红细胞膜巯基的影响

MDA (μM)	0	15	20	30	60
膜巯基 (nm/mgpr)	75.0	68.6	55.1	43.3	16.4
相当于原来巯基(%)	100	91.5	73.5	57.5	21.9

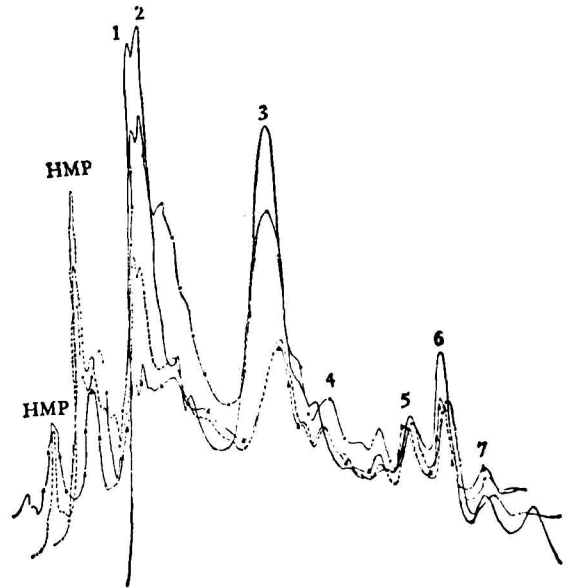


图 2 正常红细胞膜经不同浓度 MDA 处理后 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱

—— 未经 MDA 处理 —·—·— 经 $15\mu\text{M}$ MDA 处理
----- 经 $30\mu\text{M}$ MDA 处理 —▲—▲— 经 $60\mu\text{M}$ MDA 处理

见图 1 及图 2。从表 4 可见随着 MDA 浓度增大,膜巯基含量逐渐减少。从图 1 及图 2 可见

MDA 浓度增大,区带 1.2.3 逐渐减少,而在分离胶的前沿有高分子聚合物(HMP)存在,MDA 浓度愈高,HMP 的聚合度就愈大。经 $60\mu\text{M}$ MDA 处理后,分离胶前沿的 HMP 减少,而浓缩胶前沿出现大量沉淀,说明聚合物分子量很大,不能通过浓缩胶。

4. 抗氧化剂对红细胞膜巯基的保护作用 Vit E 和亚硒酸钠对抗 MDA 保护膜的结果见表 5。

从以上结果可看出, Vit E 对膜巯基有保护作用,而亚硒酸钠没有。

5. Hb 醋酸纤维膜电泳 从电泳图谱及扫描图谱(图 3)显示,随着

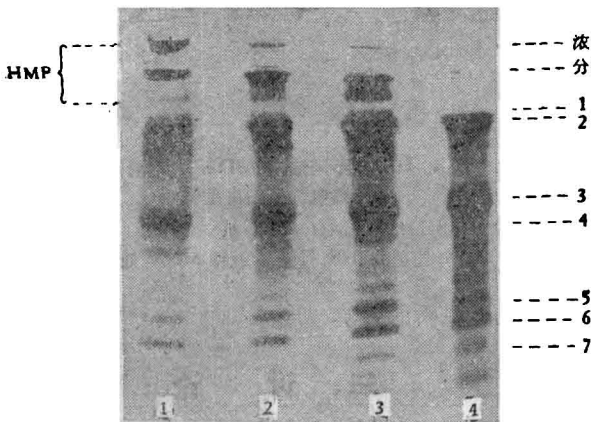


图 1 正常红细胞膜经不同浓度 MDA 处理后 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

注: 1. 经 $60\mu\text{M}$ MDA 处理 2. 经 $30\mu\text{M}$ MDA 处理
3. 经 $15\mu\text{M}$ MDA 处理 4. 未经 MDA 处理

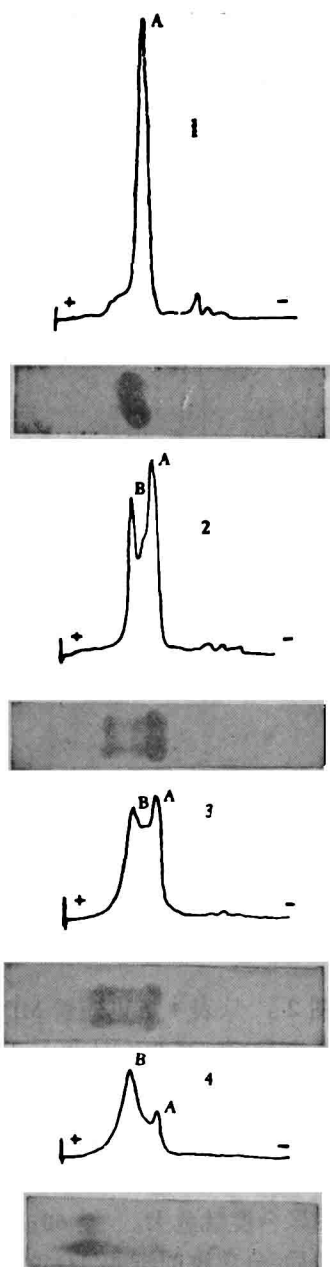


图3 Hb 经不同浓度 MDA 处理后等电点
纤维膜电泳及扫描图谱

1.正常 Hb 2.经 $15\mu\text{M}$ MDA 处理
3.经 $30\mu\text{M}$ MDA 4.经 $60\mu\text{M}$ MDA

MDA 浓度的加大, HbA (A 峰) 逐渐减少, 同时出现一个负电荷较强, 在电场中泳动较快的峰(B 峰)且随 MDA 浓度加大而增多。

6. Hb 等电点聚焦电泳 从等电点聚焦电泳及扫描图谱(图4)显示 Hb A₂ 及 HbA 峰随 MDA 浓度加大而逐渐降低, 在 pH6.5—6.7

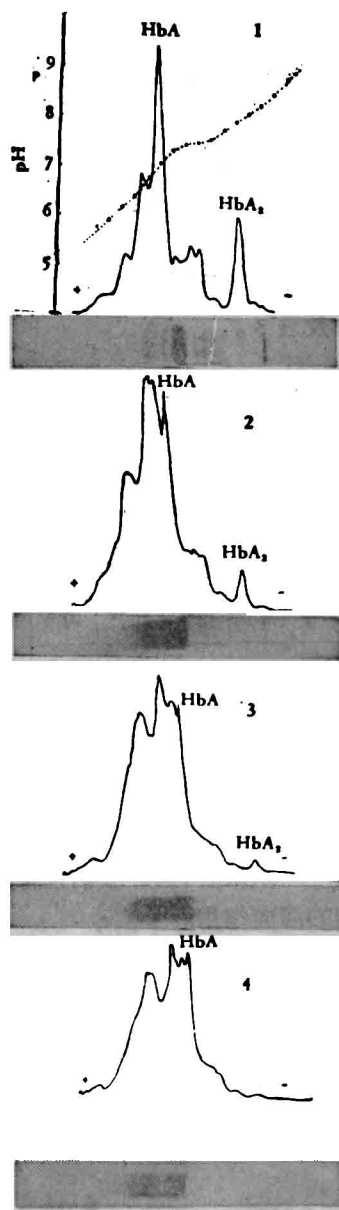


图4 Hb 经不同浓度 MDA 处理后等电点
聚焦电泳及扫描图谱

1.正常 Hb 2.经 $15\mu\text{M}$ MDA 处理的 Hb 3. 经 $30\mu\text{M}$ MDA 处理的 Hb 4.经 $60\mu\text{M}$ MDA 处理的 Hb

之间出现新区带。

三、讨 论

丙二醛(MDA)是红细胞膜脂质过氧化的产物, Carrel^[7] 曾报道 MDA 可交联蛋白质及磷脂的氨基, 生成 Schiff 氏碱, 细胞脆性增加, 变形性减低。本实验也观察到同样的情况, 经

表5 Vit E 和亚硒酸钠对膜巯基的保护作用

试 剂 \ 管 号	1	2	3	4
红细胞膜 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
MDA (ml)	—	1.0	1.0	1.0
Vit E (ml)	—	—	1.0	—
亚硒酸钠 (ml)	—	—	—	1.0
膜巯基含量 (nM/mgpr)	80.8	62.6	70.1	58.0

MDA 处理的红细胞易于溶血,溶血度随 MDA 浓度加大而增高。

红细胞膜经 MDA 处理后,在 SDS 电泳图谱上膜收缩蛋白(区带 1.2)及区带 3 都有明显减少,在分离胶前沿出现高分子聚合物,当 MDA 浓度加大到 $60\mu\text{M}$ 时,不仅在分离胶前沿,而且在浓缩胶前沿也有高分子聚合物出现。说明 MDA 浓度高时,分子聚合加剧。从巯基测定结果可见随着 MDA 浓度加大,巯基含量趋减少,可能区带 1.2.3 形成二硫键的聚体,这种聚体在 SDS 中也难以解链,以区所带 1.2.3 逐渐减少而高分子聚合物逐渐增多。Hochstein^[8], Jain^[9] 等报告中也发现红细胞膜经过氧化作用后出现高分子聚合物,与本实验结果一致。Hoshlein 提出老化红细胞与红细胞氧化的结果相似,他认为细胞长期受过氧化损伤是细胞老化的原因之一。

血红蛋白经 MDA 处理后,随着 MDA 浓度增加,在等电点聚焦的电泳图谱中,可清楚地看到 HbA, HbA₂ 逐渐减少。在等电点 pH

6.5—6.7 处出现新的蛋白质。这结果与醋酸纤维膜电泳结果一致,当 MDA 处理后也是 HbA 逐渐减少,而出现一个在电场中泳动较快的带(图 3 中的 B 带),可能这 B 带是 HbA 氧化断裂的产物。

抗氧化剂 Vit E 和亚硒酸钠可降低 MDA 使红细胞产生溶血。从本实验结果看来, Vit E 对膜巯基有保护作用。Lucy^[10] 报道 Vit E 是生物膜组成成分之一。VitE 缺乏的病人,其红细胞对过氧化作用比正常人红细胞敏感^[11]。亚硒酸钠虽可降低红细胞的溶血,但对红细胞膜的作用尚不清楚,还有待进一步研究。综合以上结果,可见 MDA 对红细胞的影响是多方面的,不仅对红细胞膜有影响,对 Hb 也有影响,从而导致红细胞溶血。

参 考 文 献

- [1] 潘华珍等: 待发表。
- [2] Dodge, Z. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119, 1963.
- [3] Fairbank, G.: *Biochemistry*, **10**, 2606, 1971.
- [4] 荣康泰: 未发表资料。
- [5] 陈松森: 《血液方法学讲义》, 中册, 70 页 1981。
- [6] Basset, P.: *Blood*, **51**, 971, 1978.
- [7] Carrel, W. R.: *Brit. J. of Hematol.*, **30**, 259, 1975.
- [8] Hochstein, P.: *Federation Proceeding*, **40**, 183, 1981.
- [9] Jain, S. K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 683, 1980.
- [10] Lucy, J. A.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **203**, 4, 1972.
- [11] Groso, S.: *Seminars in Hematol.*, **13**, 187, 1976.

[本文于 1983 年 5 月 20 日收到]

玉米籽粒超弱发光及其抗冷性研究

杨 起 简

(北 京 农 学 院)

1954 年 L. Colli 发现利用高灵敏度的光电倍增管装置可以探测到植物自身发出的超微弱光^[1]。随后又发表了许多这方面的研究结

果^[2-5,9]。这种广泛存在于生物体内的自发化学发光与机体代谢活动、能量转化之间的内在联系,以及利用生物体超弱光作为代谢指标的研