

阿魏酸钠抗红细胞膜脂质过氧化的作用

北京协和医科大学 潘华珍 冯立明 许彩民 张之南

美国北加州儿童医院医学中心 赵崇义 余潮洁

中国医学科学院药物研究所 徐理纳

内容提要 本文报道在体外用各种方法使正常人及溶血性贫血患者红细胞氧化, 同时加入从当归提取的纯品阿魏酸钠, 观察其对红细胞脂质过氧化的影响。结果表明阿魏酸钠可减少 H_2O_2 及 $\cdot O_2^-$ 引起的脂质过氧化反应; 有抗 $\cdot OH$ 及MDA的溶血作用。对其作用机理进行探讨, 发现阿魏酸钠有直接抗 H_2O_2 作用; 对MDA无影响; 可与膜磷脂酰乙醇胺结合, 可能是阿魏酸钠保护膜脂质不受氧化的原因之一。

体内代谢过程中不断产生超氧化物阴离子自由基($\cdot O_2^-$), 过氧化氢(H_2O_2)及氢氧自由基($\cdot OH$), 使膜脂质发生过氧化。脂质过氧化是使红细胞破坏的重要原因之一。某些溶血病的红细胞在体外实验中易被氧化, 其脂质过氧化产物—丙二醛(MDA)产量增高, 如阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)⁽¹⁾及镰刀型贫血⁽²⁾。MDA可与氨基结合, 损害脂质、蛋白质及核酸, 在一定浓度时可直接破坏红细胞产生溶血。阿魏酸钠是当归及川芎中的一种有效成分, 有抑制血小板聚集作用。当血小板聚集时, 花生四烯酸氧化产物MDA增多, 从而推测阿魏酸钠可能有抗脂质过氧化作用⁽³⁾。本文以MDA为主要指标, 观察阿魏酸钠有无减少红细胞膜脂质过氧化作用, 为临床用以防治细胞氧化损伤提供依据。

材料与方 法

一、红细胞取自献血员或患者静脉血, 用生理盐水洗三次备用。

二、阿魏酸钠由中国医学科学院药物研究所药理室提供, 实验时用生理盐水溶解。

三、阿魏酸钠抗过氧化氢对红细胞脂质过氧化作用: 将PNH红细胞与 H_2O_2 (终浓度为100mM) 于37°C保温1小时, 然后按Menge¹法⁽⁴⁾测MDA含量。加药组在保温液中加入阿魏

酸钠(终浓度为1%)。

四、阿魏酸钠抗超氧化物阴离子自由基对红细胞脂质过氧化作用: 按王世中法⁽⁵⁾分离白细胞, 加酵母多糖激活, 使之产生超氧化物阴离子自由基($\cdot O_2^-$), 与红细胞一起于37°C保温2小时, 然后测MDA含量。在上述体系中加入阿魏酸钠为加药组。

五、阿魏酸钠抗氢氧自由基对红细胞溶血作用: 在甲状腺素(L-T₄)存在下, 用黄嘌呤氧化酶氧化次黄嘌呤可产生氢氧自由基($\cdot OH$), 用此氧化体系与红细胞作用可产生溶血⁽⁶⁾。同时加阿魏酸钠为加药组, 测定其对 $\cdot OH$ 溶血的影响。

六、阿魏酸钠抗丙二醛对红细胞溶血作用⁽⁶⁾: 取正常及PNH红细胞悬液加MDA (终浓度30 μ M) 于37°C保温1小时, 加药组在保温液中加入阿魏酸钠。保温后用日立分光光度计在415nm波长测光密度, 计算溶血度。

七、阿魏酸钠对过氧化氢的影响: 取 H_2O_2 (终浓度100mM) 加阿魏酸钠于37°C保温1小时, 然后用LKB 1250型发光仪, 用化学发光法⁽⁷⁾测加药与不加药 H_2O_2 浓度的变化。

八、阿魏酸钠对丙二醛的影响: 取MDA (终浓度30 μ M) 加阿魏酸钠于37°C保温1小时, 测加药与不加药MDA浓度的变化。

九、阿魏酸钠与红细胞膜磷脂结合实验:

取 ^3H -标记的阿魏酸钠与红细胞于 37°C 保温 1 小时, 然后洗去多余的阿魏酸钠。红细胞加异丙醇及氯仿提取磷脂, 在硅胶 G 板上作薄层层析, 刮下分离开的四个磷脂加甲醇提取, 在 Beck-MAN LS-8000 计数器计数 (cpm)。

结 果

一、阿魏酸钠抗 H_2O_2 对 PNH 红细胞膜脂质过氧化作用结果见表 1, 结果表明阿魏酸钠可以抑制 H_2O_2 引起红细胞膜脂质过氧化作用。由于 PNH 患者红细胞可分为三种类型, 各型对氧化作用敏感性不同。因此, 阿魏酸钠对某些患者有效, 对个别患者作用不明显, 统计学上无显著差异。

表 1 阿魏酸钠对 H_2O_2 引起 PNH 红细胞膜脂质过氧化的影响

	MDA 产量 (nM MDA/g.Hb) $M \pm \text{SD}$	P 值
未加药 ($n=18$)	227.74 ± 63.98	>0.05
加 药 ($n=10$)	190.11 ± 62.04	

二、阿魏酸钠抗 $\cdot\text{O}_2^-$ 对镰刀型贫血红细胞脂质过氧化作用结果见表 2。白细胞在酵母多糖刺激下可产生 $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{O}_2^-$ 可直接作用于红细胞膜脂质使之过氧化。从表 2 看出在阿魏酸钠存在下, 镰刀型贫血患者红细胞脂质过氧化产物 MDA 随阿魏酸钠浓度增加而减少。

表 2 阿魏酸钠抗 $\cdot\text{O}_2^-$ 对镰刀型贫血红细胞膜脂质过氧化作用*

阿魏酸钠 浓度 (g%)	MDA 产量 (nMMDA/g.Hb)	抑 制 率 (%)
0	28.5	0
0.1	24.2	15.9
0.5	21.3	25.3
1.0	17.8	37.6

* 为两次实验之结果

三、阿魏酸钠抗 $\cdot\text{OH}$ 对红细胞溶血作用结果见表 3。从表中可见阿魏酸钠在低浓度时

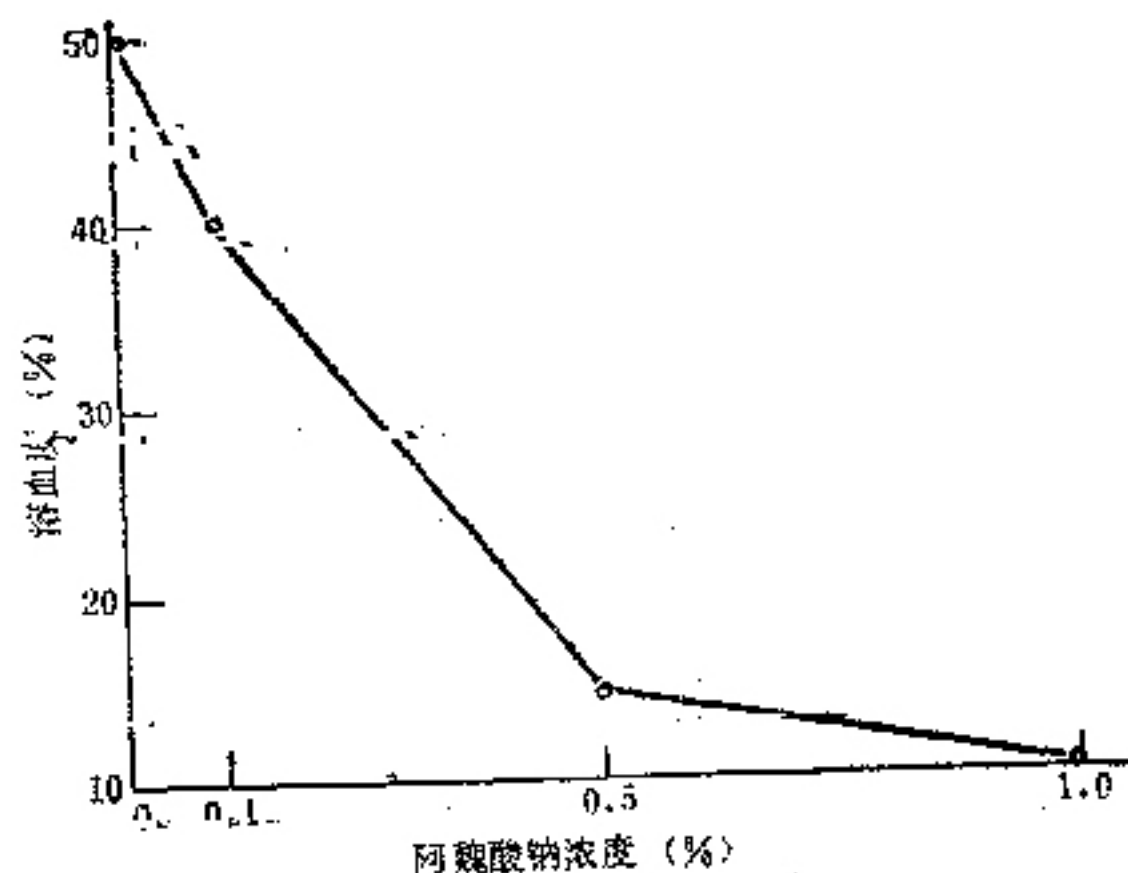
(0.01%) 就有抑制 $\cdot\text{OH}$ 的溶血作用, 浓度为 1.0 % 时溶血度虽略升高, 但仍明显低于未加药的溶血度。

表 3 阿魏酸钠抗 $\cdot\text{OH}$ 溶血作用*

阿魏酸钠浓度 (g%)	0	0.01	0.1	0.5	1.0
溶血度 (%)	63.0	2.5	2.5	3.0	6.0

* 为两次实验之结果

四、阿魏酸钠抗 MDA 直接溶血作用: 不同浓度阿魏酸钠抗 MDA 直接溶血作用结果见附图。可见随阿魏酸钠浓度增大, 溶血度明显降低, 当浓度为 1 % 时作用尤为显著, 因此在以下试验中阿魏酸钠用 1 % 浓度。



附图 不同浓度阿魏酸钠对 MDA 溶血作用的影响

阿魏酸钠抗 MDA 对正常人及 PNH 患者红细胞溶血作用见表 4。结果表明阿魏酸钠对

表 4 阿魏酸钠抗 MDA 溶血作用

	溶血度 (%) $M \pm \text{SD}$		P 值
	未加药	加 药	
正常人 ($n=15$)	50.55 ± 10.78	5.57 ± 2.17	<0.001
PNH ($n=13$)	37.85 ± 10.18	19.14 ± 12.35	<0.01

正常人及 PNH 患者红细胞都有明显降低溶血作用。

五、阿魏酸钠对 H_2O_2 的作用：从表 5 可见阿魏酸钠可直接与 H_2O_2 作用，随着浓度的增加，可测出的 H_2O_2 越少。

表 5 阿魏酸钠对 H_2O_2 的影响

阿魏酸钠浓度(%)	0		0.1	0.5	1.0
	保温前	保温后			
H_2O_2 含量(μM)	30	20	19	6	1

六、阿魏酸钠对 MDA 的影响：表 6 结果表明阿魏酸钠对 MDA 几乎没有影响。

表 6 阿魏酸钠对 MDA 的影响

阿魏酸钠浓度(%)	0	0.1	0.5	1.0
MDA 含量(μM)	30	30	30	29

七、阿魏酸钠与红细胞膜磷脂结合测定结果见表 7，结果表明阿魏酸钠主要与磷脂酰乙醇胺(PE)结合，而不与鞘磷脂(SM)、磷脂酰胆碱(PC)及磷脂酰丝氨酸(PS)结合。

表 7 阿魏酸钠与红细胞膜磷脂的结合

	空白	SM	PC	PS	PE
cpm	160	182	111	116	917

讨 论

从以上结果(表 1、表 2)看，阿魏酸钠有抗 $\cdot O_2^-$ 及 H_2O_2 对红细胞的氧化作用，使膜脂质过氧化产物 MDA 减少。阿魏酸钠抗脂质过氧化作用机理可能有两方面，一是阿魏酸钠可直接影响 H_2O_2 (见表 5)，减少 H_2O_2 对红细胞膜的损伤。第二阿魏酸钠与膜 PE 结合(见表 7)，使其不易受 $\cdot O_2^-$ 或 H_2O_2 的侵袭而发生过氧化。PE 含多不饱和脂肪酸远较膜其它磷脂为多，最易被氧化，其氧化产物为 MDA。阿魏酸钠与 PE 结合后，使之不易被氧化，因而膜脂质过氧化产物 MDA 减少。

$\cdot OH$ 是已知体内氧化能力最强的一个自

由基⁽²⁾，可作用于红细胞膜导致溶血，可能是使膜脂质过氧化产生 MDA 而破坏红细胞。MDA 是一种化学性质很活跃的物质，易与蛋白质及磷脂氨基结合，形成 Schiff 碱，使生物分子之间发生交联，破坏了蛋白质及脂质正常结构，从而影响膜结构与功能，导致红细胞溶解。阿魏酸钠可明显降低由 $\cdot OH$ 及 MDA 引起的溶血作用(见表 3、表 4 及图 1)，推测有阿魏酸钠存在时，使 $\cdot OH$ 产生减少；或是阿魏酸钠与 PE 结合，减少了 MDA 对 PE 氧化而引起的交联。已知 PE 有一部分位于膜脂质双层的外层，因此 MDA 主要是氧化损伤 PE。阿魏酸钠保护 PE 不被氧化，从而维持了膜的正常结构，红细胞溶血减少。

机体内代谢过程中不断产生自由基，自由基的袭击，也是细胞老化原因之一。体内虽有一些抗氧化物质及酶类(如 VitE、VitC、谷胱甘肽及过氧化氢酶等)，但是药物中，特别是水溶性溶物中，可用于抗氧化者不多见。阿魏酸钠是当归和川芎中提取的一种纯品，不仅说明这些中药可能具有抗氧化作用，而且阿魏酸钠也可作为研究防止氧化损伤所致溶血及老化的工具。

(本工作由中国科学院科学基金资助)

参 考 文 献

1. Mengel C E, et al. Studies of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes: increased lysis and lipid peroxide formation by hydrogen peroxide. J Clin Invest 1967; 46:1715.
2. Chiu D, et al. Free radicals in biology. Vol. V. New York: Academic Press, inc, 1982:115—155.
3. 尹钟洙, 等. 阿魏酸钠对血小板的作用. 中国药理学学报(待发表).
4. 王世中, 等. 主编. 细胞免疫测定法. 北京: 科学出版社 1980:164—167.
5. Richard W, et al. Aging of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1976; 174:463.
6. 潘华珍, 等. 丙二醛对红细胞的作用. 生物化学与生物物理进展 1984; 2:34.
7. White E H, et al. Chemiluminescence of luminol: The chemical reaction. J A C S 1964; 86:940.

A Study of ^3H -TdR Lymphocyte Transfer Value and Plasma cAMP and cGMP Level in Patients with Chronic Gastric Diseases due to Spleen Deficiency and Its Clinical Significance

Yin Guangyao (尹光耀), et al
Wuxi Third People's Hospital, Wuxi

The relationship between the intestinal metaplastic changes and plasma cAMP and cGMP level and ^3H -TdR lymphocyte transfer rate in 51 cases of chronic gastric diseases with spleen deficiency has been observed. The cAMP level and ^3H -TdR lymphocyte transfer in patients with spleen deficiency were found lower than those in normal subjects ($P < 0.001$). There was significant difference in these between patients with deficiency of spleen-energy and spleen deficiency with energy stagnation, between patients with or without metaplasia, between patients with severe or mild metaplasia, and between patients with spleen deficiency in a changing process ($P < 0.05 \sim 0.001$). However, no marked alteration of plasma cGMP level was observed. All these findings suggest that cAMP might affect through its quantitative alteration the chronic gastric diseases with spleen deficiency changes and cell metabolism, atypical and cancerous changes in mucosa. The quantitative alteration of cAMP may serve as a means to regulate the cell immune capacity when cAMP is very low, cell immune capacity could be restricted; The regulating function of cGMP upon cell generation and cell immunity does not depend on its quantitative alteration. Therefore, cAMP and cGMP cannot be regarded as material basis of "Yin-Yang" theory.

(Original article on page 671)

On the Theory that Fat Persons Are Subject to Deficiency of Yang and Phlegm-Damp While Thin Persons to Deficiency of Yin and Vigorous Fire — An Investigation of Relationship Between Bodily Form and Health Condition Made among 1257 cases

He Yumin (何裕民), et al
Shanghai TCM College, Shanghai

Synchronous investigation was made of 1257 subjects in Yi Wu in Southeast China, Yan An in Northwest China and Shanghai, to study relationship between bodily form and health condition. It has been found that the proportion of cases with deficiency of Yang and phlegm-damp of fat persons is obviously higher than that of the other two types, while thin persons are more susceptible to deficiency of Yin-blood or deficiency Yin and vigorous fire induced by it. The old saying was thus confirmed by the investigation. It has been pointed out by the author that the theory cannot serve as a determinant in making diagnosis of deficiency of Yin or Yang, but only as a reference since it is relative. Furthermore, the relationship between bodily form and constitution has been found to vary slightly with different districts and seasons. So locality and time should be taken into consideration while this theory is applied to clinical practice. In this connection Zhu Dangxi's (朱丹溪) theory on geographical background was expounded.

(Original article on page 674)

The Effect of Sodium Ferulate on Lipid Peroxidation of Erythrocyte Membrane

Pan Huazhen (潘华珍), *Zhao Chongyi (赵崇义), **Xu Lina (徐理纳), et al
Peking Union Medical College; *Children's Hospital, Medical Center of Northern California;
**Institute of Materia and Medica, Chinese Academy of Medical Sciences; Beijing

Sodium ferulate (SF) is an active ingredient from a Chinese herb, *Angelica sinensis*, used for inhibition of platelet aggregation. It was attempted to see if SF could inhibit lipid peroxidation of red blood cells and prevent hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) erythrocytes. Normal and PNH erythrocytes were incubated with melonyl dialdehyde (MDA) and SF, percentage of hemolysis was measured, SF could remarkably reduced hemolysis induced by MDA. Sick-cell anemia erythrocytes was incubated with zymosan activated neutrophils and SF. The concentration of peroxidation product MDA was measured. It showed that the higher the concentration of SF, the lower the MDA product. SF was incubated with MDA and H_2O_2 separately and concentrations of MDA and H_2O_2 were measured. MDA concentration did not change after SF treatment, where H_2O_2 concentration was significantly reduced. SF could combine with phosphorylethanoamine, which may be the main cause of protection of lipid peroxidation.

(Original article on page 678)