

肾上腺素加冷刺激对大鼠红细胞膜的影响

——“血瘀”模型红细胞膜特性初探

生物物理教研室 聂松青 薄惠卿 林克椿
北京医科大学 中西医结合研究室 毛腾敏

内容提要 本文观察用肾上腺素加冷刺激造成大鼠“血瘀”模型后, 红细胞表面形态、渗透脆性、膜脂区微粘度的变化, 并和老年大鼠就以上各项指标进行对比。结果表明: 模型大鼠异常红细胞增多, 膜渗透脆性、膜微粘度升高, 老年大鼠红细胞出现类似变化。文章对红细胞膜以上性质的变化在形成“血瘀”中的作用以及老化过程中出现的类似现象进行了讨论。

为了研究中医学“血瘀”的本质, 作者曾利用肾上腺素加冷刺激造成实验性大鼠“血瘀”模型, 进行了初步的分析和讨论^①。本文试从细胞水平观察大鼠“血瘀”模型红细胞膜表面形态、渗透脆性及膜脂区微粘度的变化, 并和老年大鼠红细胞膜的上述性质进行对比, 为深入研究“血瘀”形成和活血化瘀治疗原理提供一些线索和资料。

材料和方法

实验动物为杂交 Wistar 种大鼠, 雄雌各半, 体重 200~220g, 本校动物室提供。“血瘀”模型按毛腾敏等的方法^②制作。

扫描电镜观察: 实验动物腹腔注射 1% 戊巴比妥 0.5ml/100g 体重。麻醉后从腹主动脉取血, 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 抗凝液与血液体积比为 1:10。取抗凝血一滴, 按扫描电镜要求制作标本^③, 在 HITACHI S-450 扫描电子显微镜下观察, 连续记录 200 个红细胞进行形态学计算和比较。

渗透脆性比较: 按 Baloni 方法^④, 抗凝血用生理盐水洗三次, 计数。血球浓度调到 500 万/mm³, 然后用 0.01M 磷酸缓冲液生理盐水 (PBS) 稀释三倍, 取 50 μ l 稀释血液, 立即放入用 2mM 磷酸缓冲液 (PB) 稀释的 90mM NaCl 溶液 3ml 中, pH7.4。摇匀, 室温 22~25℃ 放置 2 小时, 1000r/min 离心, 取上清液, 在 751 型分光光度计上 540nm 测 OD 值。

红细胞膜微粘度测定: 用生理盐水洗过三次的红细胞, 浓度为 500 万/mm³, 然后用 0.01M PBS 稀释 400 倍, 取 2ml 稀释的血液与等量的 2×10^{-6} M 1,6-二苯基 1,3,5-己三烯 (DPH) 标记, 按文献^{⑤,⑥}的方法测定红细胞膜的荧光偏振度 P 值, 并计算出膜微

粘度 η 。

结 果

一、红细胞表面形态扫描电镜观察: 雄性“血瘀”模型组 5 只, 对照组 5 只; 雌性模型组鼠 7 只, 对照组 5 只, 老年雄性组鼠 6 只。正常大鼠红细胞外形呈扁平双凹圆盘形, 大小基本一致, 膜表面光滑, 变形细胞数目平均占 6.5%, 其中大部分为口形细胞。“血瘀”模型组的红细胞大小不一, 表面形态异常的红细胞数明显增加, 其中有口形、嵴形、帽形等各种形状, 变形细胞红细胞数所占比例从 21~66% 不等。雄性模型变形红细胞平均为 34.9%, 雌性模型为 36.5%, 这些细胞近似于球形, 膜比表面积明显降低。老年大鼠红细胞中, 变形细胞约占 30%, 其中嵴形增多, 约占变形细胞的 20%, 其余多为口形。在没有变形的红细胞中出现中心反射电子能力较弱的现象, 似乎血红蛋白含量明显减少。这部分细胞占总数的 30~40%, 因而完全正常的红细胞只有 30%。

二、红细胞膜渗透脆性: 在取血及处理细胞过程中发现模型大鼠比正常大鼠容易溶血。本实验比较了模型大鼠、老年大鼠及正常大鼠红细胞的渗透脆性, 结果见附表。从表可以看出, 当红细胞外液渗透压较低时, 正常鼠也有溶血现象, 表现为上清液有一定范围的 OD 值。但“血瘀”模型组, 无论雄性或雌性, 均比正常大鼠红细胞膜脆性明显增加 ($P < 0.05$)。老年大鼠红细胞膜脆性比正常大鼠也明显增加 ($P < 0.05$), 模型鼠和老年鼠二者都出现膜脆性增大即容易溶血的现象。从表也可以看出, “血瘀”模型大鼠比老年鼠红细胞渗透脆性升高更明显。

三、红细胞膜微粘度: 我们用荧光偏振法测定了

红细胞膜脂区微粘度⁽⁵⁾(见附表)。由表可以看出“血瘀”模型大鼠红细胞膜微粘度比正常大鼠明显升高, 老年大鼠红细胞膜脂区微粘度也比正常大鼠明显升高, 二者均出现膜微粘度升高即流动性降低的现象。

附表 红细胞膜脂区渗透脆性及膜脂区微粘度 $\bar{\eta}$

组别	n	膜渗透脆性 OD _{540nm} M \pm SD	膜脂区微粘度 $\bar{\eta}$	
			\bar{P}	$\bar{\eta}$
对照♂	5	0.033 \pm 0.003	0.243 \pm 0.008	2.24 \pm 0.10
模型♂	5	0.063 \pm 0.015*	0.257 \pm 0.005*	2.53 \pm 0.05*
对照♀	9	0.033 \pm 0.006	0.251 \pm 0.010	2.40 \pm 0.10
模型♀	9	0.055 \pm 0.011*	0.274 \pm 0.005**	2.98 \pm 0.05**
对照♂	5	0.033 \pm 0.003	0.243 \pm 0.016	2.24 \pm 0.10
老年♂	5	0.043 \pm 0.007*	0.274 \pm 0.004**	2.98 \pm 0.04**

注: 与该对照组比, *P<0.05, **P<0.01, n为动物数

讨 论

过去我们在用本法形成的“血瘀”大鼠模型中, 发现血液呈高凝状态即全血粘度、血浆粘度和红细胞压积增高, 纤维蛋白原浓度增大等血液流变性改变。这些变化提示我们考虑血液的重要组成部分红细胞, 特别是红细胞膜有无变化。

本实验用扫描电镜法发现“血瘀”模型大鼠红细胞表现有膜表面形态异常的口形、嵴形、帽形等多种变形细胞, 提示红细胞膜结构发生了异常。红细胞膜脆性实验及荧光偏振研究说明“血瘀”模型大鼠红细胞膜渗透脆性升高, 膜脂区微粘度增大。

由于膜结构及其生物物理特性发生了变化, 其功能不可避免地将发生变化。正常红细胞表面为双凹圆盘形, 具有较好的可塑性即变形性。“血瘀”模型大鼠的红细胞, 正常细胞数目减少, 异常细胞增多, 膜微粘度升高、脆性升高, 变形性降低, 通过毛细血管时容易受到障碍造成血流瘀滞。所以红细胞的这些变化

和血瘀的形成是密切相关的。我们曾经用高胆固醇食喂大鼠, 发现红细胞膜 $\bar{\eta}$ 比正常大鼠高, 而用蜂王精治疗 $\bar{\eta}$ 又可下降至正常, 膜形态也得到恢复⁽⁵⁾。事实上寻找一些改善红细胞膜特性的药物, 已经成为一个新兴的研究领域。这也完全可能作为研究活血化瘀药物的一条新途径。

值得注意的是, 我们发现“血瘀”大鼠的红细胞膜的各种变化, 几乎都和老年大鼠红细胞膜的变化平行, 老年大鼠红细胞膜表面形态也出现变形细胞增多的现象, 所不同的只是老年大鼠红细胞中心反射电子能力较弱的现象更为严重, 其渗透脆性、膜微粘度也都比正常鼠高, 而与血瘀大鼠接近。膜在老化过程中的变化和重要性日益受到人们的注意和重视^(3~8)。

“血瘀”时红细胞膜变化的生化基础是什么, 尚待今后进一步研究。

参 考 文 献

1. 毛腾敏, 等。“血瘀”模型病理探索(一). 北京医学院学报 1985; 17(4): 252.
2. 程 时, 等。几种贫血性疾患红细胞的扫描电子显微镜观察. 北京医学院学报 1982; 14(1): 35.
3. Baleni B, et al. Elevated microviscosity in membrane of erythrocytes affected by hereditary Spherocytosis. British J of Haematology 1975; 31: 117.
4. 法祥光, 等。红细胞膜流动性的测定及其初步应用. 中华血液学杂志 1984; 5(2): 132.
5. 聂松青, 等。蜂王精对大鼠红细胞膜流动性的影响. 北京医学院学报 1983; 15(4): 249.
6. 张之南, 等。红细胞膜研究的意义. 生理科学进展 1984; 15(3): 222.
7. Jain Sk, et al. Polymerization of membrane components in aging red blood cells. Biochem Biophys Res Commun 1980; 92: 247.
8. Paul, et al. Lipid peroxidation and membrane alterations in erythrocyte survival. In: Kunio yagi ed. Lipid peroxides in biology and medicine. Orlando Academic press, 1982: 81.

• 消 息 •

欢迎订阅1986年中西医结合杂志合订本

本刊开始函购1986年《中西医结合杂志》合订本, 每本售价11.50元(含邮费); 另备有1985年合订本, 每本售价9.50元(含邮费), 欲购者从速汇款、以汇款先后售完为止。此外, 本刊余有创刊以来部分各期杂志, 有需要者按杂志原定价出售, 免收邮费。为方便边远山区及交通不便的读者, 有欲订今后本刊杂志者, 可直接来函向本刊订购。邮局汇款请寄: 北京西苑中西医结合杂志编辑部; 有从银行转帐者, 请注明: 北京工商银行海淀区办事处。帐号: 4601 89。

(本刊编辑部)

Effects of Ginsenosides on Myocardial Lactic Acid, Cyclic Nucleotides and Ultrastructural Myocardial Changes of Anoxia on Mice

Fang Yunxiang (方云祥), Chen Xiu (陈修)
Dept. of Pharmacology, Hunan Medical College, Changsha

Mice were placed in hermetically sealed flask for 10, 20, 30, 40 min. or to a minimal residual oxygen content of 7 %. The whole heart was used to determine the lactic acid, cAMP and cGMP level. Specimens from endocardium and apical part of heart were examined with electronmicroscope. The results revealed that ginsenosides (540 mg/kg ip) reduced the cerebral and myocardial lactic acid level and restored the reduction of cAMP/cGMP under severe anoxic state. The damage of myocardial capillaries and the ultrastructural change of mitochondria showed slight swelling, and nearly all of the capillaries remained normal. The present study suggests that ginsenosides protected both metabolic disturbances and ultrastructural damage of myocardium during severe anoxia.

(Original article on page 354)

Effect of Ginseng Saponins on Insulin Release from Isolated Pancreatic Islets of Rats

Li Guodong (李国栋), Lu Zhongqi (陆钟琦)
Dept. of Physiology, Peking Union Medical College, Beijing

The effect of ginseng saponins on insulin release from isolated pancreatic islets of rats was studied. It was shown that ginseng saponins could stimulate insulin release from incubated or perfused islets and promote its release induced by highly concentrated glucose. When containing 2.8 mM glucose in medium which could not stimulate insulin release, the dose, response curve of correlation between ginseng saponins and insulin release displayed as "S" type, and the concentrations of ginseng saponins which could cause the maximum insulin release was between 0.10 to 0.35 mg/ml. The effects of ginseng saponins on insulin release at different glucose concentrations were not significantly affected by adding 55 μ M verapamil to prevent the influx of Ca^{++} into the pancreatic cells or depriving Ca^{++} in solution, showing that it was not dependent on extracellular calcium. Adrenaline (1 g/ml) could not inhibit insulin release induced by ginseng saponins from incubated or perfused rat islets. It was suggested that the mechanism of effect of ginseng saponins on insulin release was different from that of glucose.

(Original article on page 357)

Effects of Adrenaline and Cold Stimulation on Erythrocyte Membrane of Rat

Nie Songqing (聂松青), et al
Dept. of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing

This paper reports the surface structure and osmotic fragility and microviscosity of erythrocyte membrane of rat blood stasis model, which was formed after injecting adrenaline and cold stimulation. The experimental results showed: (1) Rate of abnormal cells of model rat (36.5 %) was higher than that of control (6.5 %) by scanning electronmicroscope. (2) The osmotic fragility of model rat was higher than that of control, which was nearer to the old rats. (3) The microviscosity of erythrocyte membrane of model rat was also higher than that of control and approached that of old rats. The changes of function caused by the abovementioned abnormalities were discussed.

(Original article on page 360)