

红细胞羰基毒化及谷胱甘肽的保护作用

彭密军^{1,2}, 刘婷婷¹, 蔡建光^{1,3}, 贺洪¹, 朱泽瑞¹, 汤婷¹, 王硕¹, 印大中^{1*}

(1. 湖南师范大学 生命科学学院 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 生物学博士后流动站, 中国湖南 长沙 410081; 2. 吉首大学 林产化工工程湖南省重点实验室, 中国湖南 张家界 427000; 3. 湖南省计划生育研究所 现代优生技术湖南省重点实验室, 中国湖南 长沙 410007)

摘 要: 探索丙二醛(MDA)对红细胞的羰基毒化过程, 以及谷胱甘肽(GSH)的拮抗作用。采用血液粘度测量、扫描电镜观察、羰基化蛋白含量测定以及荧光偏振度检测等方法, 从红细胞表面粘度、红细胞形态、红细胞膜上羰基化蛋白含量以及红细胞膜脂流动性 4 个指标上进行研究。MDA 导致的羰基应激造成红细胞损伤和血液粘度增加, 而 GSH 可阻止羰基应激或还原羰-氮反应产物, 且具有浓度依赖性。揭示了羰基应激可能是血瘀证的关键生化原因之一, 为抗应激、抗衰老提供了理论和实验的重要依据。

关键词: 红细胞; 羰基毒化; 谷胱甘肽; 血瘀证; 亚健康

中图分类号: Q66

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)03-0215-07

Carbonyl Stress on Erythrocytes and the Protective Effects of Glutathione

PENG Mi-jun^{1,2}, LIU Ting-ting¹, CAI Jian-guang^{1,3}, HE Hong¹, ZHU Ze-rui¹, TANG Ting¹, WANG Shuo¹, YIN Da-zhong^{1*}

(1. Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, Postdoctoral Station of Biology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, Hunan, China; 3. Key Lab of Modern Medical Genetics of Hunan Province, Family Planning Institute of Hunan Province, Changsha 410007, Hunan, China)

Abstract: To study various deleterious alterations of malondialdehyde (MDA) on erythrocytes and the inhibitive effect of glutathione (GSH) on the MDA-related carbonyl stress. The MDA induced carbonyl stress was assayed by studying the blood viscosity, the electromicroscopic morphology of erythrocytes, protein carbonyl content and fluorescence polarization of membrane of erythrocytes. MDA induced various deleterious alterations of erythrocytes and GSH inhibited the MDA-related carbonyl stress. The results implied that carbonyl stress may be one of the key factors in blood stasis and provided important theoretical and experimental foundation in anti-stresses as well as anti-aging.

Key words: erythrocyte; carbonyl stress; glutathione; blood stasis; sub-health

(Life Science Research, 2008, 12 (3) : 215 -221)

有关老年色素的最新研究成果表明, 羰-氮交联反应是生物体内最典型的和最重要的衰老生化过程。这个过程造成结构蛋白的交联、功能

蛋白的损伤, 甚至导致老年退行性疾病和机体衰老的种种改变^[1-4]。进一步的研究还发现, 羰-氮交联反应可能与血瘀证和亚健康密切相关^[1,2,5]。

收稿日期: 2008-03-10; 修回日期: 2008-06-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2007AA02Z433); 湖南省博士后科研基金资助项目 (2007RS4017)

作者简介: 彭密军 (1967-), 女, 湖南湘潭人, 吉首大学教授, 博士, 主要从事衰老生化研究, E-mail: pengmj163@163.com; * 通讯作者: 印大中 (1955-), 男, 江苏扬州人, 湖南师范大学教授, 博士生导师, 主要从事衰老生化研究, Tel: 0731-8872786, E-mail: dazhongyin@hotmail.com

谷胱甘肽是生物体内重要的含巯基的三肽,在人体肝脏、眼睛晶状体及红细胞中含量较高。大量研究表明它的存在状态是身体健康以及长寿的重要指标^[6]。最近的研究表明,GSH在人体内含量的高低与许多老年疾病(如糖尿病、慢性肾衰竭、白内障、癌症以及帕金森病)有关^[7,8]。

考虑到血液中的红细胞是自由基氧化和非酶糖基化应激首当其冲的细胞,也是血瘀证最可能相关的细胞,本文研究了脂质过氧化产生的关键毒性中间产物MDA对红细胞的与羰-氨交联相关的损伤作用,以及GSH的抗羰基毒化作用。本实验采用血粘测量、电镜扫描、羰基化蛋白含量测定以及荧光偏振度检测等方法,从红细胞表观粘度、红细胞形态、红细胞膜上羰基化蛋白含量以及红细胞膜脂流动性4个指标上研究了MDA对血液组织的羰基毒化过程,以及谷胱甘肽的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

四甲氧基丙烷(TMP),购自Fluka公司(瑞士);GSH、1,6-二苯基-1,3,5-三己烯(DPH)均购于Sigma公司(美国);盐酸胍 Genview 分装购于北京鼎国生物技术有限公司;羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES);2,4-二硝基苯肼(DNPH);三氯乙酸(TCA);乙酸乙酯;配制磷酸缓冲液(pH 7.4)的磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等试剂均为国产分析纯;新鲜悬浮红细胞(悬浮于复方枸橼酸注射液中)、血浆购于长沙市血液中心。

200 mmol/L MDA 储存液的配置:将 0.338 mL TMP 与 2 mL 1 mol/L 的 HCl 混合,并在 40 水浴约 2 min,水解得到 MDA,然后置于冰浴上加 0.4 mL 6 mol/L 的 NaOH 调至 pH=7.4,加入 pH 值为 7.4 的 HEPES 缓冲液或磷酸缓冲液定容至 10 mL(现配现用)。

1.2 仪器设备

DV-+锥板式血液粘度计(美国 Brookfield 公司);Lambda Bio 40 型紫外可见分光光度计(美国 PerkinElmer 公司);JSM-6360LV 扫描电镜(日本 TEOL 公司);F-4500 型荧光分光光度计(日本 Hitach 公司);D-37520 高速冷冻离心机(德国 Heraeus Biofuge 公司)。

1.3 方法

1.3.1 两种红细胞悬浮液表观粘度的测定

将新鲜的红细胞分别悬浮于血浆和 HEPES 缓冲液中,红细胞压积为 40%。分 5 个处理组:1)空白对照组;2)MDA 处理组,以 MDA 分别处理两种红细胞悬浮液,MDA 终浓度为 10 mmol/L;3)GSH 处理组,以 GSH 分别处理两种红细胞悬浮液,GSH 终浓度为 0.5、1、5 mmol/L;4)先加 GSH 后加 MDA 组,两种红细胞悬浮液中先加入 GSH(最终浓度为 0.5、1、5 mmol/L),37 水浴 15 min 后加入 MDA(最终浓度为 10 mmol/L);5)先加 MDA 后加 GSH 组,两种红细胞悬浮液中先加入 MDA(最终浓度为 10 mmol/L),37 水浴 15 min 后加入 GSH(最终浓度为 0.5、1、5 mmol/L)。然后将各组置于 37 水浴 30 min 后用 DV- 锥板式粘度计测定其不同剪切率(100~400 s⁻¹)下的表观粘度,由 Rheocalc32 软件记录和处理相关数据。

1.3.2 红细胞形态学检测

取新鲜的悬浮红细胞用 0.9% 生理盐水清洗 3 次,得到压积红细胞,然后分为 4 组,按以下操作分别进行不同处理:1)空白对照组;2)MDA 处理组,MDA 处理压积红细胞,终浓度为 10 mmol/L;3)先加 GSH 后加 MDA 组,压积红细胞中先加入 GSH(最终浓度为 50 mmol/L),37 水浴 15 min 后加入 MDA(最终浓度为 10 mmol/L);4)先加 MDA 后加 GSH 组,压积红细胞中先加入 MDA(最终浓度为 10 mmol/L),37 水浴 15 min 后加入 GSH(最终浓度为 50 mmol/L)。处理好之后将红细胞涂布于小盖玻片上,接着用 3% 戊二醛 4 固定 2 h;然后用磷酸缓冲溶液冲洗 3 次,每次间隔 10 min;再依次用 30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%, 100% 乙醇脱水各 10 min;玻片置于叔丁醇中浸泡 2 h 后置于冷冻干燥仪中干燥,喷金后在 JSM-6360LV 扫描电镜下观察并拍照。

1.3.3 红细胞膜的提取

取新鲜的悬浮红细胞按 1:2 的比例加入生理盐水,2 000 r/min 离心 10 min 后吸去上层清液,重复 2 次得压积红细胞。按 1:10 比例加入预冷的双蒸水并轻轻摇匀,置于 4 冰箱中 2 h 以上,使其充分溶血。然后混匀,于 6 000 r/min 离心 10 min,反复离心 5 次,直至沉淀部分呈乳白色,得到红细胞膜,置于 -20 冰箱中备用。

1.3.4 红细胞膜羰基化蛋白的测定

在文献[9]的方法上略有改进,取上述提取的

红细胞膜加磷酸缓冲液悬浮分成 3 组: 1) 空白对照组 (红细胞膜仅加磷酸缓冲液); 2) MDA 处理组 (MDA 最终浓度为 10 mmol / L); 3) GSH 加 MDA 组 红细胞膜悬浮液中先加入 GSH, 后加入 MDA, GSH 最终浓度为 20、50、100 mmol / L, MDA 最终浓度为 10 mmol / L) .

材料处理好后在 37 ℃ 下保温 60 min, 加入 1 mL 20 % 的 TCA, 以 6 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 往沉淀中加入 10 mmol / L 的 DNPH 1

mL, 于 37 ℃ 保温 60 min, 加入 1 mL 20 % 的 TCA, 6 000 r/min 离心 10 min, 所得沉淀再用 2 mL 20 % 的 TCA 洗涤离心 2 次, 然后再用 1 mL 的乙酸乙酯洗 2 次, 将蛋白质相关沉淀物用 3 mL 6 mol / L 的盐酸胍溶解, 37 ℃ 孵育 10 min 后置于紫外 / 可见分光光度计上进行测定. 用 6 mol / L 的盐酸胍溶液调零, 读取 370 nm 吸光度值, 计算羰基化蛋白含量, 公式如下:

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b}$$

A=吸光度 (absorbance) ;
=摩尔吸光系数, 为 22 000 L·mol⁻¹·cm⁻¹;
C=浓度 (mol / L), 转算成羰基化蛋白含量 (μmol / g pro)
b=吸光杯的内径或光程厚度 (cm) .

GSH 对蛋白质羰基化的抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率 \%} = \frac{\text{MDA 组} - \text{GSH 组}}{\text{MDA 组} - \text{空白组}} \times 100\%$$

1.3.5 红细胞膜流动性的测定

取自制的红细胞膜悬浮液, 分为 3 组: 1) 空白对照组; 2) MDA 处理组 (MDA 终浓度为 50 mmol / L); 3) GSH 加 MDA 处理组 先加入 GSH, 后加入 MDA, GSH 最终浓度为 20、50、100 mmol / L,

MDA 最终浓度为 50 mmol / L) .

材料处理好后用等体积的 2×10⁻⁶ mol / L DPH 标记, 然后测定荧光强度 (激发波长 λ_{ex} 为 362 nm, 发射波长 λ_{em} 为 432 nm), 按照下面公式计算荧光偏振度 P 值.

$$P = \frac{I_w - G I_{vh}}{I_w + G I_{vh}}$$

I_w: 为起偏器和检偏器光轴均在垂直方向时的荧光强度;
I_{vh}: 为起偏器光轴在垂直方向、检偏器光轴在平行方向时的荧光强度;
G: 为校正因子, G=I_{hw}/I_{hh};
I_{hh}: 为起偏器和检偏器光轴均在水平方向时的荧光强度;
I_{hw}: 为起偏器光轴在平行方向、检偏器光轴在垂直方向时的荧光强度.

求得 P 值后, 可进一步计算微粘度 (cP) .

$$= \frac{2P}{0.46 - P}$$

1.3.6 统计学方法

所有数据以均数 ±标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个样本比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 红细胞表观粘度值的变化

将两种红细胞悬浮液、3 个浓度的 GSH 分别做加入或不加 MDA, 以及先加或后加 MDA 处理 (如实验方法 1.3.1 所述). 用 DV- + 锥板式血液粘度计测定红细胞悬浮液表观粘度, 试验结果如下 (图 1) .

2.1.1 MDA 对两种红细胞悬浮液表观粘度值

(cP) 的影响

从图 1a 可以看出, 无论加或不加 MDA, “ 红细胞-血浆悬浮液 ” 的表观粘度值均高于 “ 红细胞-HEPES ” 悬浮液; 在同种悬浮液中, 加 MDA 的表观粘度均高于对照.

血浆、血浆+MDA、HEPES 和 HEPES+ MDA 4 种处理的平均数分别是: 2.05 ±0.120 8; 2.17 ±0.110 8; 1.64 ±0.058 7; 1.74 ±0.097 3 (图 1a), 方差分析表明, 4 种处理间的差异达到极显著水

平 ($F = 1\,170.27$, $P < 0.01$). 多重比较相互之间的差异均达到极显著 $P < 0.01$).

这说明 MDA 造成的羰基应激引起了红细胞

表面的蛋白质或是红细胞表面的电荷发生了某种改变, 如羰-氮交联反应或电负性下降, 从而引起了血液粘度的增加.

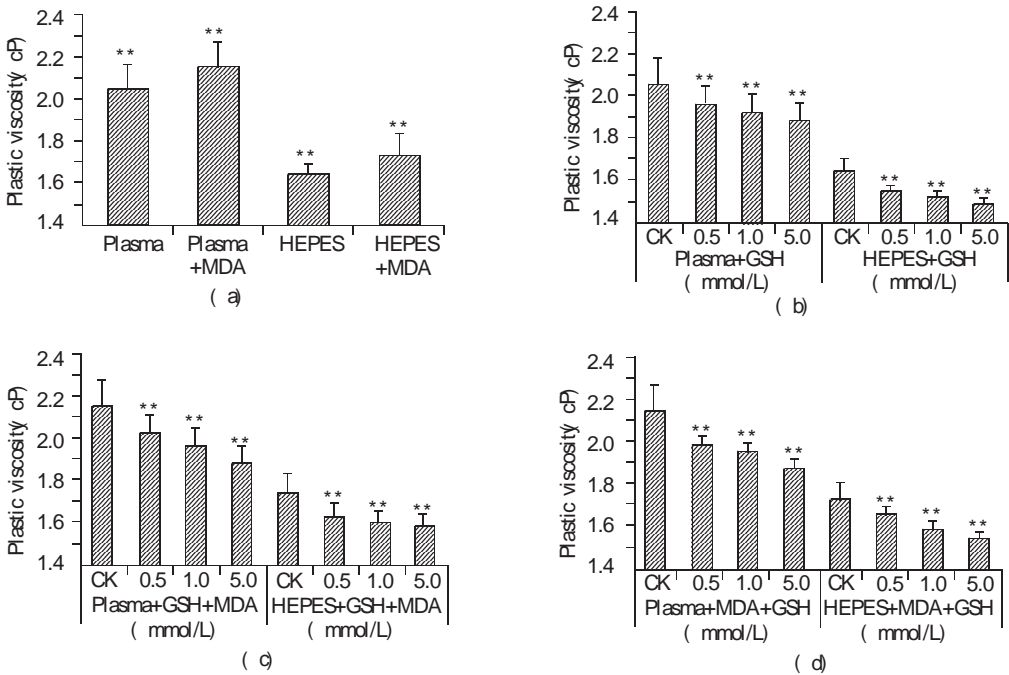


图 1 各种处理条件下红细胞表观粘度值的平均数差异比较(CK=对照组,** 为 $P < 0.01$)
(a) 10 mmol/L MDA 导致的红细胞在血浆、HEPES 两种悬浮液中表观粘度值的增加; (b) 不同浓度 GSH 导致的红细胞在血浆、HEPES 两种悬浮液中表观粘度值的降低; (c) 先加 GSH 后加 MDA 导致的两种红细胞悬浮液表观粘度值的变化; (d) 先加 MDA 后加 GSH 导致的两种红细胞悬浮液表观粘度值的变化. 图中数据均为相应剪切率下红细胞表观粘度值的平均数和标准差(平均值 \pm 标准差 $n = 5$).

Fig.1 Erythrocyte plastic viscosity under different conditions(CK=control, ** $P < 0.01$)

(a) Increase of erythrocyte plastic viscosity in plasma and HEPES suspensions induced by 10 mmol/L MDA; (b) Decrease of erythrocyte plastic viscosity in plasma and HEPES suspensions induced by different GSH; (c) Plastic viscosity of two erythrocyte suspensions (added different GSH firstly and then MDA); (d) Plastic viscosity of two erythrocyte suspensions (added MDA firstly and then different GSH). All data were means and standard deviation of erythrocyte plastic viscosity under corresponding shear rates(means \pm sd, $n = 5$).

2.1.2 GSH 对红细胞表观粘度值的浓度效应

图 1b 清楚地显示了 GSH 对红细胞悬浮液表观粘度影响的浓度效应. 在一定条件下, 红细胞悬浮液表观粘度随 GSH 终浓度的增高而降低. 无论是血浆或是 HEPES 悬浮液, 在 5 mmol/L GSH 浓度下, 红细胞表观粘度值均最低, 分别为: 1.88 和 1.49; 其次是 1 mmol/L, 分别是: 1.92 和 1.51; 再其次是 0.5 mmol/L, 分别为: 1.96 和 1.54; 而对照组的表观粘度值最高, 分别为: 2.05 和 1.64. 统计分析表明, 各处理组与对照组的差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$), 且 GSH 的浓度越高, 对粘度值的影响就越显著 (T 值越大).

这说明 GSH 确实具有改善红细胞表观粘度的作用, 且浓度越高作用越强. 在本研究选用的

范围内具有明显的浓度梯度效应.

2.1.3 GSH 与 MDA 的拮抗作用

向两种悬浮液中按一定的先后次序加入 GSH 和 MDA. 在血浆中, 先加或后加 GSH 所造成的红细胞表观粘度值的变化趋势基本一致. 但在 HEPES 中, 先加 GSH 后加 MDA (图 1c), 红细胞表观粘度值基本呈现 GSH 浓度梯度效应; 而先加 MDA 后加 GSH (图 1d), 红细胞表观粘度值除了 0.5 mmol/L GSH 略高于空白对照外, 其余两个浓度也呈现浓度梯度效应. 统计分析表明: 先加 GSH 后加 MDA, 在两种红细胞悬浮液中的总体平均数为: 1.774 4; 先加 MDA 后加 GSH 两种红细胞悬浮液中的总体平均数为: 1.780 0; 差异未达到显著水平, $T = -0.683\,7$.

2.2 MDA 对红细胞形态的影响以及 GSH 的保护修复作用

为直观地研究羰基应激对红细胞表面结构

造成的影响和变化, 将空白对照 (a)、MDA 处理 (b)、先加 GSH 后加 MDA (c)、以及先加 MDA 后加 GSH (d) 共 4 组处理的扫描电镜照片列于图 2.

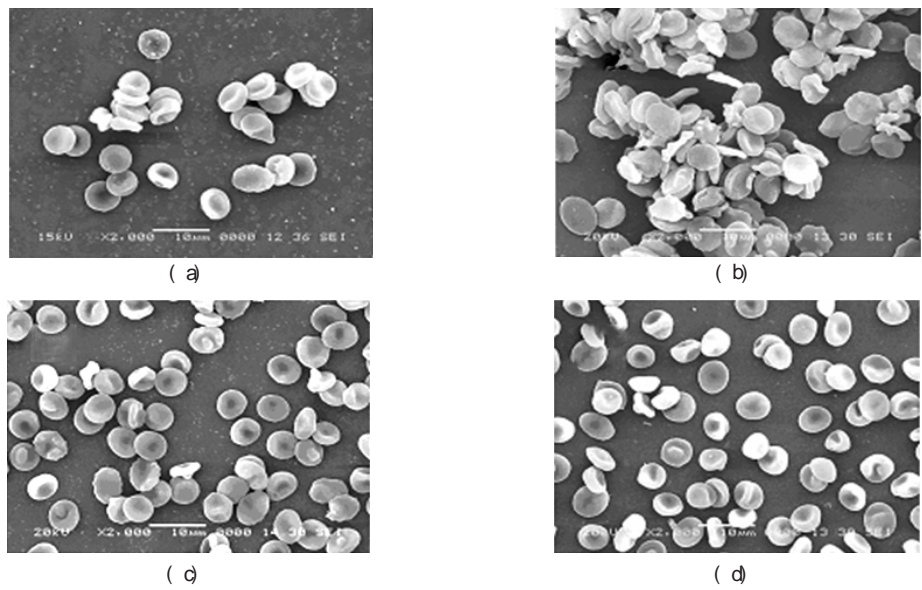


图 2 4 种处理条件下红细胞形态学差异比较($\times 2\,000$)
(a) 空白对照; (b) 10 mmol / L MDA 处理; (c) 先加 50 mmol / L GSH, 后加 10 mmol / L MDA; (d) 先加 10 mmol / L MDA, 后加 50 mmol / L GSH.
Fig.2 Difference of erythrocyte morphology under four conditions($\times 2\,000$)
(a) Control; (b) Treatment of 10 mmol / L MDA; (c) Added MDA 10 mmol / L after GSH 50 mmol / L; (d) Added GSH 50 mmol / L after MDA 10 mmol / L.

在 2 000 \times 倍率下观察, 经 10 mmol / L MDA 处理的红细胞 图 2b) 形态与正常组 空白对照, 图 2a) 比较有明显的不同, 其差别主要表现在: 1) 红细胞圆盘边缘有不规则凹凸; 2) 红细胞明显聚集; 3) 红细胞出现多个棘突, 形成棘球红细胞, 出现毛刺; 4) 红细胞双凹面渐显消失 (图 2b) . 这从形态学上反映了 MDA 能引起红细胞表面结构甚至内部结构的改变, 因而可能是引起血液粘度升高的原因.

在同样倍率下观察, 先加 GSH 后加 MDA (图 2c) 或先加 MDA 后加 GSH (图 2d) , 红细胞圆盘的边缘都很光滑、规则; 红细胞比较分散; 红细胞的双凹面很明显. 这说明 GSH 对 MDA 造成的损伤具有防御甚至修复的作用, 从另一侧面支持了 GSH 可降低羰基应激引起的与血液粘度升高相关的红细胞损伤.

2.3 红细胞膜羰基化蛋白含量的变化

为进一步探讨 MDA 和 GSH 与红细胞表面的作用机理, 按实验方法 1.3.4 处理, 分离提取得到红细胞膜, 进而以 DNPH 方法测定羰基化蛋白的

含量.
2.3.1 不同浓度的 MDA 对红细胞膜蛋白的羰基毒化作用

MDA 处理组与空白对照组的红细胞膜羰基化蛋白含量结果如下 图 3) .

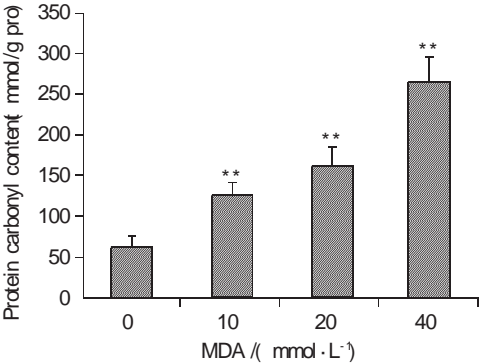


图 3 不同浓度的 MDA 对红细胞膜羰基化蛋白含量的影响($n = 9$)
** : 表示处理组与对照组差异达到极显著水平, $P < 0.01$.
Fig.3 Effects of the concentrations of MDA on protein carbonyl content of erythrocyte membrane($n = 9$)
** : The differences between control and treated groups were extremely significant, $P < 0.01$.

图 3 表明,MDA 在 0~40 mmol / L 的浓度范围内均能诱导红细胞膜蛋白羰基化,且随着 MDA 浓度的增加蛋白羰基化程度增大. 统计分析表明,对照与各处理组之间的差异均达到极显著水平($P < 0.01$). 说明 MDA 导致了红细胞膜

蛋白质的羰基化.

2.3.2 GSH 抑制羰基毒化的作用

向上述反应体系 1.3.4 中先加入不同浓度的 GSH, 然后加 MDA 处理, 检测羰基化蛋白含量, 结果见表 1.

表 1 GSH 对红细胞膜蛋白羰基毒化的抑制作用
Table 1 Effect of GSH on the protein carbonyl content of erythrocyte membrane (n = 9)

Group	Concentrations of MDA (mmol.L ⁻¹)	Concentrations of GSH (mmol.L ⁻¹)	Protein carbonyl content (mmol · g ⁻¹ pro, $\bar{x} \pm s$)	Inhibition rate/%	T value
Control	0	0	61.013 ±12.055		
MDA group	10	0	125.677 ±13.312 ^{**}		10.802
	10	20	95.429 ±15.887	46.78	4.378
MDA+GSH groups	10	50	85.922 ±12.631	61.48	6.499
	10	100	69.716 ±15.343	86.54	8.265

注: 与空白组相比 $P < 0.01$ 用 ^{**} 表示; 与 MDA 组相比 $P < 0.01$ 用 ^{表示}.
Notes: ^{**}: Compared with blank group; ^{表示}: Compared with MDA group. $P < 0.01$.

表 1 说明, 在 20~100 mmol / L 浓度范围内, GSH 可抑制 MDA 诱导的红细胞膜蛋白羰基化; 且 GSH 浓度越高, 作用越强; 当浓度达到 100 mmol / L 时, 抑制率高达 86.54%. 统计分析表明: 处理与对照的差异达到极显著水平 $P < 0.01$).

2.4 红细胞膜流动性变化

将空白对照、MDA 处理、GSH 和 MDA 共同处理 (共 3 组) 的两个红细胞膜流动性指标 (荧光偏振度和微粘度) 分别整理如下 (图 4).

统计分析表明: 除了 20 mmol / L 的 GSH 处理与对照比较未达到显著水平 ($P > 0.05$) 外, 其余各处理与对照比较均达到极显著水平 ($P < 0.01$).

3 讨论与分析

关于血瘀过程及其机理, 以往往往侧重对于血小板造成的凝血过程的研究, 本文认为红细胞的生理生化改变才是问题的症结所在. 本研究从生物体能量代谢会不可避免的产生自由基氧化和非酶糖基化为出发点, 重点探讨了这两个生化副反应导致的共性生理性生化损伤过程—羰基应激—与血细胞的改变之间的相关性, 包括对红细胞的相对纯净状态 (HEPES 悬浮) 和近似人体内部真实状态 (血浆悬浮) 的羰基应激研究.

本研究从理论和实验, 形态和生化等多个角度探索了血瘀证和亚病态 (应激态) 可能的生化起因. 考虑到谷胱甘肽是身体抵抗 (氧化) 应激的第一道防御和第二道防御的通用分子, 即有所谓既抗氧化, 又抗羰基毒化的双重作用^[2], 本文重点研究了在无酶条件下和药理浓度时谷胱甘肽的作用.

1) 结果充分表明 MDA 导致的羰基应激造成了红细胞悬浮液表观粘度的明显增高, GSH 则可使红细胞表观粘度值下降 (图 1). MDA 和 GSH 对红细胞表观粘度的上升或下降的影响都存在

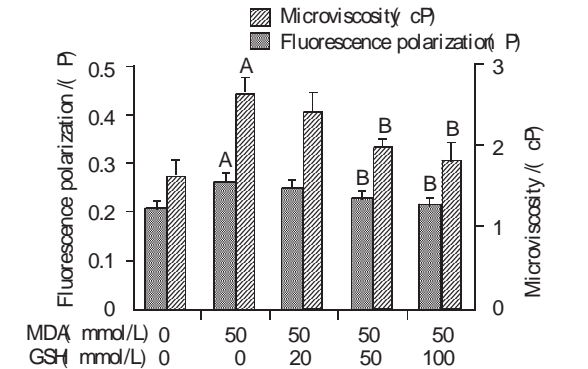


图 4 GSH 及 MDA 对红细胞膜流动性 (荧光偏振度和微粘度) 的影响
A: 与空白组相比 ($P < 0.01$); B: 与 MDA 组相比 ($P < 0.01$).
Fig.4 Effects of GSH and MDA on erythrocyte membrane fluidity (fluorescence polarization and microviscosity)
A: Compared with blank group. B: Compared with MDA group.

图 4 表明, 50 mmol / L MDA 可使红细胞膜的荧光偏振度和微粘度上升; 0~100 mmol / L 的 GSH 均可降低红细胞膜的荧光偏振度和微粘度.

着浓度效应, 这与我们以前用不同浓度的 MDA 对红细胞表观粘度的研究结果相符^[5]。在本实验的条件下, 这种对红细胞表观粘度的影响似乎与 MDA 或 GSH 加入反应体系的先后次序关系不大 (图 1c, d), 其主要原因可能是因为 MDA 先加入体系与红细胞作用的时间只有短短的 15 min, 不足以形成蛋白质分子之间稳定的交联结构, 从而容易被反应活性更强的 GSH 分子中的巯基从蛋白质分子中替代下来。当然从表 1 可看出, 这个替代并非达到了 100 % 的效果 (本试验在无外加酶的条件下进行)。

红细胞表观粘度值的测定结果说明: 血浆和红细胞中均含有增加红细胞表观粘度的影响因素。用 HEPES 代替血浆, 可消除血浆中这一因子的影响, 从而可以看到 MDA 对于红细胞的直接作用。向红细胞的 HEPES 与血浆两个悬浮反应体系中加入 MDA 或 GSH, 均能导致红细胞表观粘度值发生上述的变化, 即 MDA 导致了红细胞悬浮液表观粘度的明显增高, GSH 可使红细胞表观粘度值下降。

这些结果表明在正常的血液中普遍存在着羰-氨反应, MDA 导致的羰基应激使得维护红细胞膜表面的电负性的氨基和巯基被遮蔽或耗竭, 造成了红细胞之间负电性排斥力下降, 羰基基团更造成了红细胞之间静电亲和力的增加, 从而表现为红细胞悬浮液表观粘度值的增加。GSH 的加入则可阻止或以某种方式逆转这一反应, 例如对羰-氨反应的产物进行还原, 从而使红细胞膜表面的应激损伤得到一定程度地修复, 红细胞又彼此分散。

2) 扫描电镜照片直观地证实了 MDA 的羰基毒化作用造成红细胞形态发生了多种损伤性改变, 趋于聚集, 甚至彼此交联。因为成熟红细胞内没有细胞核和亚细胞器, 一般细胞在受到应激损伤后所出现的与信号转导和蛋白质表达相关的细胞应答不会在此系统中体现。因此可以认为, 羰基应激所造成的影响确为对于红细胞膜的影响。由于红细胞在体内是自由基氧化和非酶糖基化首当其冲的细胞, 本研究的结果对于加深理解和思考体内红细胞的迅速更新 (人体内的红细胞约 120 d 完全更换一遍) 也含有重要的科学价值。

3) 在疾病和衰老过程中, 人体组织中的蛋白质羰基含量增高, 这与老年色素的增龄性积累

同步进行。从生化反应的角度其反应机理是共同的, 所谓自由基氧化和非酶糖基化生化副反应导致老化的积累^[4]。这些应激在病理状态下 (如炎症过程产生大量的过氧化氢) 被加速。许多研究证实, 羰基应激过程既是衰老和许多老年病的起因, 又是诸多生化应激伤害的后果, 甚至还是衰老过程的核心反应和关键指标^[2]。本研究关于红细胞膜羰基化蛋白含量的测定, 进一步定量地证实了 MDA 的羰基毒化过程在红细胞膜蛋白上的损伤作用, GSH 的去羰基毒化作用也许正是体内抗应激, 抗血瘀或亚病态的极为重要的积极保护和恢复机制之一。另外, 关于 MDA 在红细胞膜蛋白上的作用位点将在本实验室另外的文章中专门报道。

4) 对于红细胞膜流动性的测定从另一个角度证实了 MDA 的羰基毒化作用。MDA 可与镶嵌在红细胞膜脂中的蛋白质分子发生羰-氨反应, 使红细胞膜脂流动性下降; 而 GSH 则同样可阻止镶嵌在红细胞膜脂中羰-氨反应的进行, 或对已发生羰-氨反应的产物进行还原。

综上所述, 本研究的结果表明, 血瘀证相关的血液粘度的增加与羰-氨反应产物的累积成正相关。MDA 可导致血液中红细胞的羰基应激损伤, GSH 可有效地阻止羰-氨反应或部分地还原羰-氨反应产物。

参考文献 (References):

- [1] 陈可冀, 史载祥. 实用血瘀证学[M]. 北京: 人民卫生出版社 (CHEN Ke-ji, SHI Zai-xiang. Practical Blood Stasisology[M]. Beijing: People Health Press), 1999.1-94.
- [2] YIN D Z, CHEN K J. The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions [J]. Exp Gerontol, 2005, 40 (6): 455-465.
- [3] YIN D Z. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores[J]. Free Radic Biol Med, 1996, 21 (6): 871-888.
- [4] YIN D Z. Studies on age pigments evolving into a new theory of biological aging[J]. Gerontology, 1995, 41 Suppl 2: 159-172.
- [5] LIU X B, QIN W H, YIN D Z. Biochemical relevance between oxidative/carbonyl stress and elevated viscosity of erythrocyte suspensions[J]. Clin Hemorheol Micro, 2004, 31 (2): 149-156.
- [6] PAMELA M. The effects of stress and aging on glutathione metabolism[J]. Ageing Res Rev, 2005, 4 (2): 288-314.
- [7] CALABRESE V, SULTANA R, SCAPAGNINI G, et al. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease[J]. Antioxid Redox Sign, 2006, 8 (11-12): 1975-1986.
- [8] LUO J, JANKOWSKI V. Endogenous coenzyme A glutathione disulfide in human myocardial tissue[J]. J Endocrinol Invest, 2006, 29 (8): 688-693.
- [9] DECKER E A, IVANOV V, ZHU B Z, et al. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by carnosine and histidine[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49 (1): 511-516.