

- [9] Tollefsen, S. E. et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 258: 5165.
- [10] Lang, I. et al., 1982, *Immunology*, 46: 769.
- [11] Berrih, S. et al., 1981, *J. Immunol. Meth.*, 41: 235.
- [12] Ptak, W. et al., 1986, *J. Immunol.*, 137: 1822.
- [13] Conzelmann, A. et al., 1980, *Eur. J. Immunol.*, 10: 860.
- [14] Flood, P. M. et al., 1987, *Immunol. Letters*, 16: 297.
- [15] North, R. J. et al., 1986, *J. Exp. Med.* 164: 1652.

低密度脂蛋白介导的红细胞过氧化—抗过氧化和 n-3型—n-6型多不饱和脂肪酸的平衡失调与衰老

应赛亚 陈松鹤 李旭日 孙丽云 舒素珍

(上海医科大学附属中山医院内科)

长期受自由基过氧化损伤是细胞老化、机体衰老的重要原因之一^[1]。脂质过氧化物(LPO)可由多不饱和脂肪酸(PUFA)及其酯经自由基连锁反应氧化而成,而低密度脂蛋白(LDL)与过氧化关系密切^[2]。本文通过观察不同年龄人红细胞中脂质过氧化物丙二醛(MDA),超氧歧化酶(SOD)、PUFA和功能状态的变化,以及LDL, n-3型PUFA的影响,探讨体内过氧化—抗过氧化, n-3和n-6型多不饱和脂肪酸两个体系的平衡失调与人体衰老的关系。

材 料 和 方 法

低密度脂蛋白的分离 用密度梯度超速离心法^[3]在Hitachi 709-72型超速离心机上分离。用酶法测定LDL的胆固醇量(LDL-Ch)。

洗涤红细胞和红细胞膜的制备 健康志愿者25名,包括青中年(21—44岁)6名,老年前期(45—59岁)7名,老年期(60—83岁)12名。抽血前两周未用任何药物,抽血前两天无高脂饮食,未进多量海鱼和藻类。空腹静脉抽血,ACD抗凝,离心获压积红细胞,用生理盐水洗涤并配制洗涤红细胞悬液。加入冰冷蒸馏水,离心、洗涤,得红细胞膜。

洗涤红细胞的处理 (1)对照组的红细胞在20℃孵育120 min; (2) LDL组的红细胞在20℃孵育60 min后,加入终浓度1 mg/ml的LDL-Ch再孵育

60 min; (3) 二十碳五烯酸(EPA)组的红细胞加入终浓度0.2 mg/ml的EPA(Sigma), 20℃孵育120 min; (4) EPA + LDL组的红细胞先与上述浓度EPA孵育60 min,再加入上述浓度LDL孵育60 min。

鱼脂酸丸的成份 鱼脂酸丸由上海东海制药厂提供,内含二十碳五烯酸10%,二十二碳六烯酸(DHA)33%。7名健康老年志愿者服鱼脂酸丸,每日6 g共4周。

红细胞丙二醛含量测定 MDA与硫代巴比妥酸反应,产物被正丁醇提取。用荧光法^[4]在Hitachi 650-60荧光分光光度计上测定荧光强度,激发波长515 nm,发射波长553 nm。1,1,3,3-四甲基丙烷(Sigma)为标准品,制作标准曲线。

红细胞超氧歧化酶活性测定 用极谱氧电极法^[5]在SP-3型微量液相极谱测氧仪上测定。邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生超氧自由基, SOD使后者歧化成分子氧,用极谱氧电极检测SOD歧化前后氧量变化,则可算出酶的活性。一个SOD活性单位(u)表示: 30℃, pH 9.0条件下,每分钟产生1微升氧的SOD量。

红细胞膜脂肪酸成分测定 用气相色谱法在岛津GC-9A型气相色谱仪上测定n-3型的EPA、DHA和n-6型的AA。条件为:柱2 m × 3 mm, 10% unisole-3000(信和化工株式会社);温度22℃;检出器FID。

红细胞变形能力测定 用核孔筛法^[6]在上海医科大学DXC-300型红细胞变形能力测定仪上测定。结果以滤过指数(IF)显示。IF大则红细胞变形能力小。

红细胞膜流动性测定 用荧光偏振法^[7]在Hitachi 650-60型荧光分光光度计上测定膜流动性。结果用荧光偏振度(P)表示, P大则膜流动性小。

本文中两组样本差异的统计学比较采用t检验。

结 果

不同年龄3组健康志愿者洗涤红细胞分别与纯化LDL、EPA孵育前后MDA、SOD、FUPA、IF、P的测定数值列于表1。(1)与年龄的关系 MDA、AA、IF、P随年龄增高,在中青年期呈一定正相关($r=0.76-0.79, P<0.05$);在老年前期和老年期呈显著正相关($r=0.84-0.91, P<0.01$);SOD、EPA、DHA随年龄降低,同样在老年前期,老年期显著负

相关($r=0.85-0.90, P<0.01$),而中青年期负相关较差。($r=0.67-0.71, 0.05<P<0.1$);(2)LDL的影响 在中青年期LDL使MDA、AA、IF、P增高和SOD、EPA、DHA降低,但无显著性差异,在老年前期,老年期上述变化明显;(3)EPA的影响 在老年前期和老年期EPA孵育后SOD、EPA、DHA显著增高,MDA、IF、P显著降低,AA改变不明显,红细胞EPA、DHA与SOD增高正相关($r=0.72-0.79, P<0.05$)。在中青年期各项数据改变不明显;(4)此外在老年前期,老年期LDL对EPA孵育红细胞的作用明显弱于对未用EPA孵育的红细胞。

表2显示:服用鱼脂酸丸后SOD、EPA、

表1 LDL、EPA对不同年龄志愿者红细胞两个平衡和功能状态的影响

分 组	过氧化-抗过氧化		n-3型-n-6型多不饱和脂肪酸			功能状态	
	MDA (nM/gHb)	80 D (u/gHb)	AA(%)	EPA(%)	DHA(%)	IF	P
中 对照	2.4±0.3	770±121	4.8±0.7	1.0±0.2	1.2±0.2	0.22±0.03	0.23±0.02
青 LDL	2.6±0.3	737±140	5.2±0.8	0.9±0.2	1.0±0.1	0.24±0.04	0.25±0.04
年 EPA	2.2±0.3	799±149	4.2±0.7	1.3±0.3*	1.3±0.2	0.20±0.03	0.22±0.03
期 EPA+LDL	2.3±0.5	786±136	4.7±0.6	0.9±0.2	1.1±0.2	0.23±0.03	0.24±0.05
老 对照	3.8±0.4	611±114	5.9±0.6	0.8±0.1	0.9±0.1	0.35±0.05	0.29±0.03
年 LDL	4.6±0.6*	527±174*	7.0±0.6*	0.6±0.1*	0.7±0.1*	0.42±0.15*	0.34±0.04*
前 EPA	3.1±0.6*	689±201*	5.5±0.5	1.2±0.2*	1.2±0.2*	0.29±0.04*	0.25±0.07*
期 EPA+LDL	3.5±0.8 ^Δ	610±142 ^Δ	6.0±0.6	0.1±0.2 ^Δ	0.9±0.1 ^Δ	0.34±0.14 ^Δ	0.30±0.06 ^Δ
老 对照	4.9±0.9	519±144	6.7±0.9	0.7±0.1	0.7±0.1	0.43±0.12	0.33±0.04
年 LDL	6.1±1.7*	501±107*	7.9±1.0*	0.4±0.1**	0.5±0.1	0.59±0.17*	0.38±0.04*
期 EPA	3.9±0.8*	638±118*	6.3±1.1	1.2±0.2**	1.1±0.1**	0.37±0.11*	0.28±0.03*
EPA+LDL	4.4±1.2 ^Δ	589±101 ^Δ	6.8±0.9 ^Δ	0.9±0.1 ^{ΔΔ}	0.7±0.2 ^Δ	0.48±0.19 ^Δ	0.31±0.03 ^{ΔΔ}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与LDL组比较: ^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$

表2 服鱼脂酸丸前后LDL对老年志愿者红细胞两个平衡和功能状态的影响

分 组	过氧化-抗过氧化		n-3型-n-6型多不饱和脂肪酸			功能状态	
	MDA (nM/gHb)	SOD (u/gHb)	AA(%)	EPA(%)	DHA(%)	IF	P
服鱼脂 对照	5.0±0.8	561±133	6.5±1.1	0.6±0.1	0.8±0.1	0.42±0.13	0.31±0.04
酸丸前 LDL	6.3±1.8*	497±110*	7.8±1.0*	0.3±0.1**	0.5±0.1*	0.60±0.20*	0.49±0.05**
服鱼脂 对照	3.6±0.7 ^Δ	636±126 ^Δ	5.2±0.7 ^Δ	0.9±0.2 ^Δ	1.0±0.2 ^Δ	0.31±0.08 ^Δ	0.20±0.02 ^Δ
酸丸后 LDL	4.2±1.1 ^Δ	590±151 ^Δ	5.5±0.6 ^Δ	0.8±0.2 ^{ΔΔ}	0.8±0.2 ^Δ	0.34±0.05 ^{ΔΔ}	0.28±0.03* ^{ΔΔ}

与服鱼脂酸丸前相应组比较: ^Δ $P<0.05$ ^{ΔΔ} $P<0.01$

DHA增高明显,MDA、AA、IF、P下降显著,且EPA、DHA的增高与SOD正相关($r=0.73-0.77$, $P<0.05$);LDL则使服鱼脂酸丸前红细胞的MDA、AA、IF、P增高,SOD、EPA、DHA降低,而对服鱼脂酸丸后红细胞的上述改变明显减弱。

讨 论

自由基是一类具强氧化活性的原子、原子团或分子。自由基随年龄而增,而能清除自由基的超氧歧化酶等抗过氧化活性却随年龄而减,从而导致细胞老化,机体衰老^[1,2,8,9]。自由基学说已成为目前公认的衰老机理之一。脂质是研究衰老和老年病另一个热点。已经证实血浆中的脂蛋白以及不少细胞(如血管内皮细胞、心肌细胞、单核细胞、平滑肌细胞)膜上的多不饱和脂肪酸易受自由基过氧化攻击并产生丙二醛等脂质过氧化物,使细胞的功能发生改变^[1,2,8]。n-6型(AA等)和n-3型(EPA、DHA等)是体内两个不同类型的多不饱和脂肪酸。最近有学者指出体内二型PUFA平衡的重要性^[10]。我们的工作也提示红细胞、血小板的功能变化与二型PUFA的平衡有关(另文总结)。

本文中增龄、LDL两个因素对红细胞过氧化-抗过氧化,n-3型-n-6型PUFA和功能状态的影响基本一致。当老年前期、老年期两个因素叠加时,以过氧化、n-6型PUFA亢进、抗过氧化、n-3型PUFA低下,为表现的平衡失调发生、红细胞变形能力、流动性受损。从LDL介导的两个平衡失调的角度认识红细胞老化,对于进一步提示人体衰老机理有不可忽视的意义。

PUFA是人体必需脂肪酸。主食中含足量n-6型PUFA,远超出体内需要。但主要存于海洋生物的n-3型PUFA,体内易缺乏。尽管志愿者均生活在有海鱼供应的上海,但他们中老年前期、老年期红细胞的n-3型PUFA明

显减少,当体外、体内用EPA、DHA调整这一平衡失调时,过氧化-抗过氧化平衡也获改善,红细胞EPA的增高与SOD增高显著相关同时,LDL不仅对PUFA平衡,而且对过氧化-抗过氧化平衡的影响也明显削弱。这些结果提示两个平衡之间的内在联系以及富含n-3型多不饱和脂肪酸作为抗衰老药物的应用可能。

摘 要

纯化的生理浓度低密度脂蛋白引起老年前期,老年期志愿者洗涤红细胞中丙二醛,二十碳四烯酸含量增高,超氧歧化酶活性、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸含量以及变形能力、膜流动性降低。当服用含二十五碳五烯酸,二十二碳六烯酸的鱼脂酸丸后或在体外用二十碳五烯酸孵育后,红细胞中上述的变化明显减小。探讨低密度脂蛋白介导的过氧化-抗过氧化和n-3型-n-6型多不饱和脂肪酸的平衡失调,有益于深入认识红细胞老化和人体衰老的机理。

参 考 文 献

- [1] Slater, T. F., 1984, *Biochem. J.*, 222: 1-15.
- [2] Stringer, M. D., et al., 1989, *Br. Med. J.*, 298: 281-283.
- [3] Redgrave, T. G., et al., 1975, *Anal. Biochem.*, 65: 42-49.
- [4] Yagi, K., 1976, *Biochem. Med.*, 15: 212-218.
- [5] Moscone, D., 1988, *Analytica. Chimica. Acta.*, 24: 195-204.
- [6] 戴稼禾等, 1986, *医疗器械*, 10: 10-14.
- [7] 余竹元等, 1986, *上海医科大学学报*, 13: 141-145.
- [8] Yagi, K., 1982 in: Yagi, K. (Eds), *Lipid peroxides in biology and medicine*, p. 223-242, Academic.
- [9] 王赞舜等, 1985, *中华老年医学杂志*, 4: 193-197.
- [10] 奥山治美, 1990, *化学と生物*, 28: 175-181.