

• 实验研究 •

阿魏酸钠对补体溶血的影响

北京协和医科大学 冯立明 李彩华 潘华珍 张之南

内容提要 本文以正常人及阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)患者的红细胞为对象,观察阿魏酸钠对补体溶血的影响及其机理。结果说明阿魏酸钠可明显降低补体溶血,抑制补体 C_3b 与红细胞膜的结合;对补体激活及红细胞变形性无影响。

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)是一种对补体异常敏感的溶血病。根据临床过去的观察,当归、川芎等活血化瘀药对治疗PNH有一定疗效。本文主要报告从当归及川芎中提取的纯品阿魏酸钠在体外对补体溶血及补体与红细胞膜结合的影响。

材料与方法

一、红细胞取自献血员或 PNH 患者静脉血,用生理盐水洗三次备用。

二、阿魏酸钠由医科院药研所药理室提供,实验时用生理盐水溶解,终浓度为 1%。

三、阿魏酸钠对补体溶血的影响:取 PNH 红细胞,按张之南法⁽¹⁾作蛇毒因子(CoF)溶血试验,与此同时加阿魏酸钠,与不加药作对比,观察溶血度的变化。

四、阿魏酸钠对 CoF 及补体 C_3 的影响:将阿魏酸钠分别与 CoF 及 C_3 于 37°C 保温 1 小时,然后作聚丙烯酰胺凝胶电泳。

五、阿魏酸钠对红细胞变形性的影响:取正常红细胞先与阿魏酸钠于 37°C 保温 1 小时,然后用 PBS 洗 3 次,再用变形仪(ektacytometer)测其变形性,在不同剪切力下,测出红细胞变形性指数(DI),以剪切力为横坐标,DI 为纵坐标绘图。

六、阿魏酸钠对 C_3b 与红细胞膜结合的影响:将正常红细胞按 Dodge 法⁽²⁾制成红细胞膜,各取 0.2ml 红细胞膜分别加到 6 支试管中,再加入酶标 C_3b 0.2ml,使酶标 C_3b 蛋白含量分别为 0.15、0.25、1.0、2.0 及 4.0 μ g,另一组再加入阿魏酸钠,然后于 37°C 保温 1 小时;保温后用 PBS 洗 2 次,加入酶标底物溶液 50 μ l,反应 10 分钟后,加入终止液 100 μ l 终止反应,于 492nm 比色,以测得光密度为纵坐标,以 C_3b 蛋白量为横坐标绘图。

结 果

一、阿魏酸钠对补体溶血的影响:从图 1 可见随着阿魏酸钠浓度的增加,溶血度逐渐下降,浓度为 1% 时

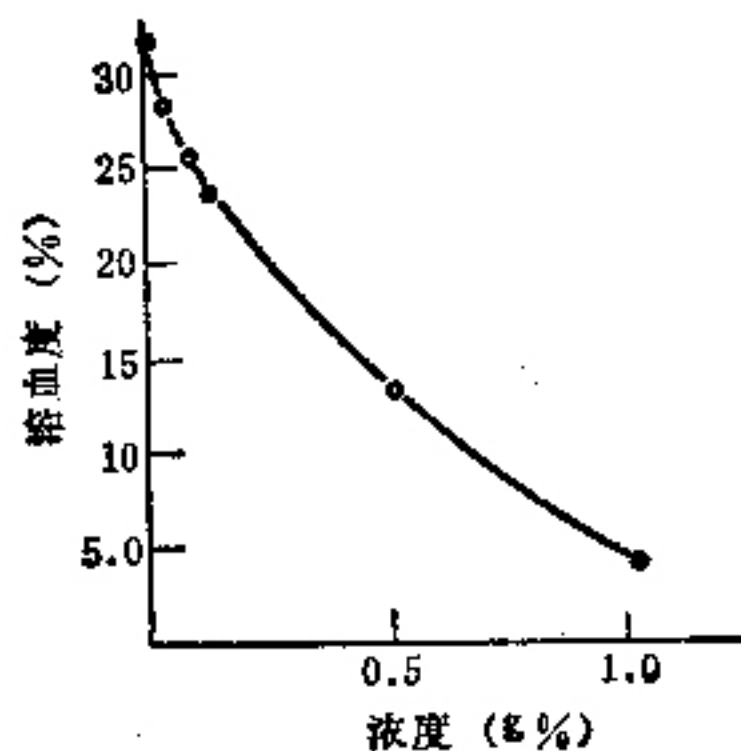


图 1 不同浓度阿魏酸钠对 CoF 溶血的影响

效果最明显,所以下面实验阿魏酸钠浓度均为 1%。阿魏酸钠对 15 例 PNH 红细胞 CoF 溶血的影响见表 1,结果表明阿魏酸钠可使溶血度明显降低($P < 0.001$)。

表 1 阿魏酸钠对 PNH 红细胞 CoF 溶血的影响

	溶血度(%) ($\bar{M} \pm SD$)	P 值
未加药(n=15)	30.63 $\pm$ 11.93	<0.001
加药(n=15)	5.57 $\pm$ 2.79	

二、阿魏酸钠对 CoF 及 C_3 的影响:CoF 及 C_3 分别与阿魏酸钠作用后聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 2 及图 3。从图谱看 CoF 及 C_3 无变化,说明阿魏酸钠对 CoF 及 C_3 无聚集或降解作用。

三、阿魏酸钠对补体激活的影响:阿魏酸钠对补体激活影响的实验步骤及结果见表 2。表中 1 管为对

表2 阿魏酸钠对补体激活的影响

管 号	步 骤①	保温时间	步 骤②	保温时间	溶 血 度 (%)
1	S+CoF	60'	+RBC	60'	36.3
2	S+CoF	60'	+RBC+阿魏酸钠	60'	22.5
3	S+CoF+阿魏酸钠	60'	+RBC	60'	20.0

注: S, 血清 CoF, 蛇毒因子 RBC, PNH红细胞 保温时间共 2 小时

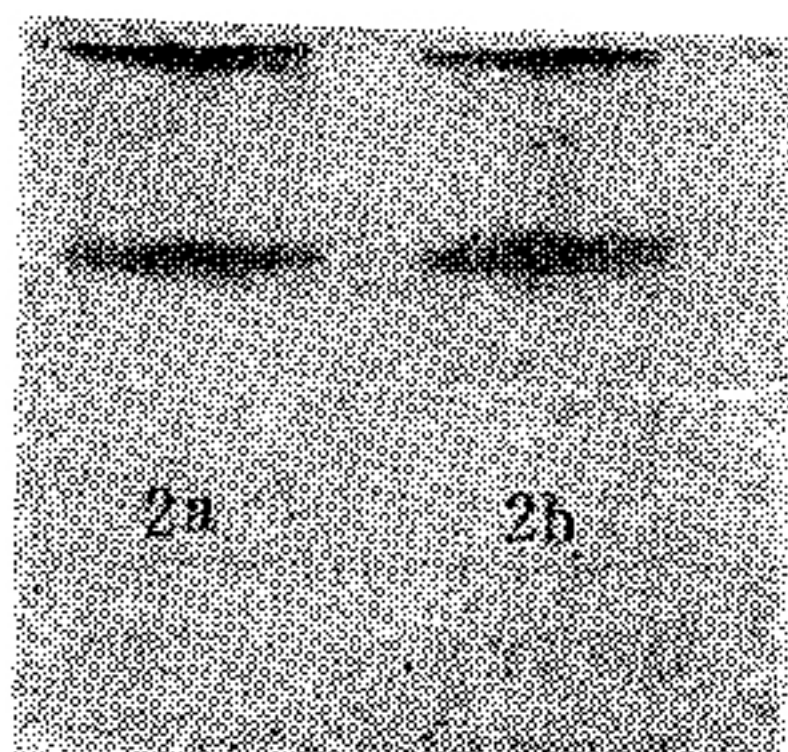
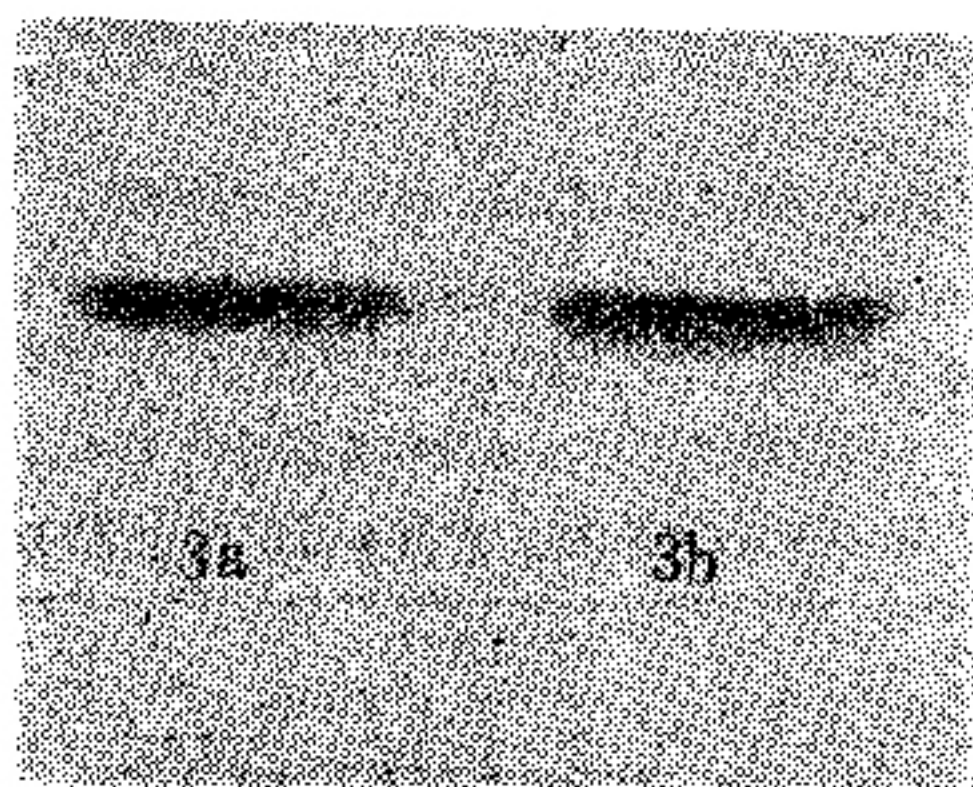


图2 阿魏酸钠对CoF影响的聚丙烯酰胺电泳图谱

2a, 无阿魏酸钠 2b, 加阿魏酸钠

图3 阿魏酸钠对C₃影响的聚丙烯酰胺电泳图谱

3a, 无阿魏酸钠 3b, 加阿魏酸钠

照管, 无阿魏酸钠时的溶血度; 2 管是补体激活后加阿魏酸钠及红细胞; 3 管为补体激活时有阿魏酸钠存在。结果 2、3 管溶血度相差不多, 说明阿魏酸钠对补体激活无大影响, 其作用可能在补体激活成 C₃b 后与红细胞反应的阶段。

四、阿魏酸钠对红细胞变形性的影响: 从图 4 结果看, 加阿魏酸钠后红细胞变形性无变化。

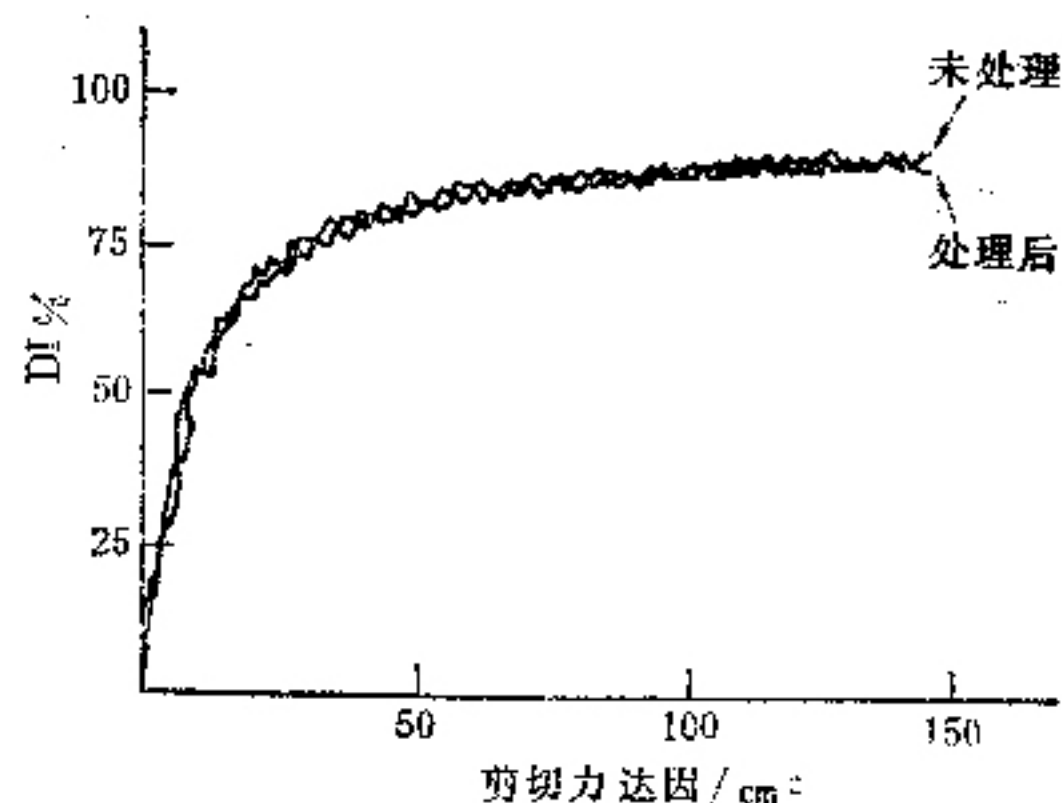
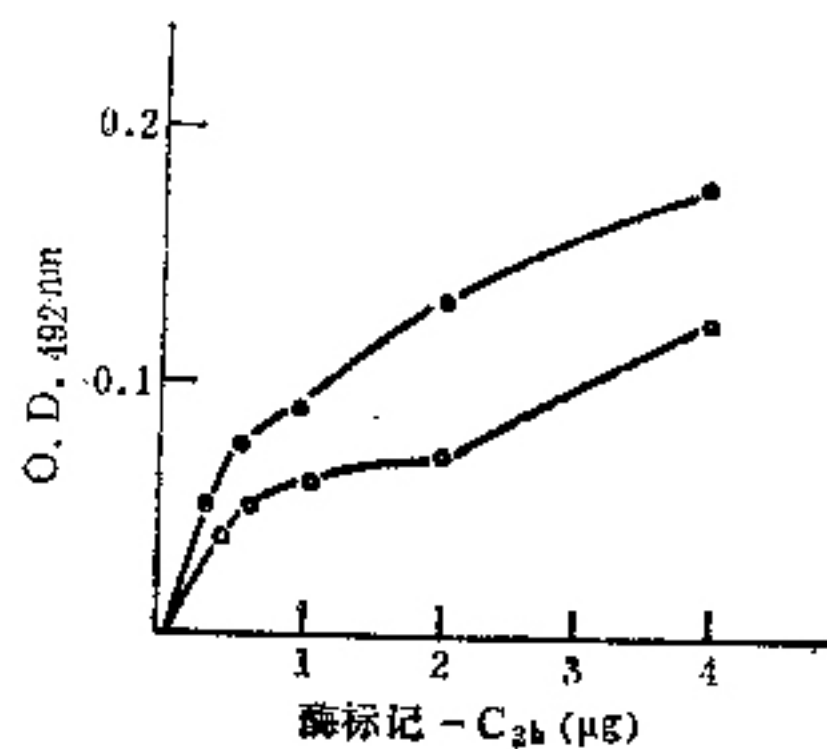


图4 阿魏酸钠对红细胞变形性的影响

五、阿魏酸钠对 C₃b 与红细胞膜结合的影响: 从图 5 结合曲线可看出, 红细胞膜与阿魏酸钠作用后, 结合 C₃b 量明显降低, 说明阿魏酸钠可直接影响 C₃b 与红细胞膜的结合。

图5 阿魏酸钠对C₃b与红细胞膜结合的影响

• — • 无阿魏酸钠
• — • 加阿魏酸钠

讨 论

表 1 结果说明阿魏酸钠在体外能明显降低由 CoF 激活补体引起的溶血。为了探讨阿魏酸钠降低溶血机理, 我们从几方面进行研究。

一、阿魏酸钠使 CoF 及 C₃ 有无变性? 从图 2 及图 3 电泳图谱分析, 阿魏酸钠对这两种蛋白无降解或聚集作用。

二、阿魏酸钠对红细胞变形性有无影响? 从图 4 结果看, 红细胞与阿魏酸钠保温后变形性无变化。测定变形性是反应红细胞膜结构与功能的一项较好指标, 因为红细胞能维持正常形态和变形性, 与其表面积、水合、脂质组分与排列和骨架蛋白结构等都有密切关系⁽³⁾, 其中某一方面有改变都会影响其变形性。变形性无改变, 说明红细胞膜经阿魏酸钠作用后, 其结构与功能仍维持正常状态。

三、阿魏酸钠在 C₃ 激活过程中有无作用? 表 2 说明在 C₃ 激活反应中加阿魏酸钠, 与激活反应后再加阿魏酸钠溶血度相差很少, 所以阿魏酸钠对 C₃ 激活无影响。

四、阿魏酸钠对 C₃b 与红细胞膜结合的影响: 图 5 表明, 阿魏酸钠对 C₃b 与红细胞膜结合确有抑制作用, 红细胞与阿魏酸钠作用后, 结合的 C₃b 明显减少。根据我们的实验, C₃b 与红细胞膜血型糖蛋白结合。

推测阿魏酸钠作用可能是与血型糖蛋白结合, 使其构型发生变化, 从而 C₃b 不易与之结合, 结果降低对补体的敏感性, 溶血减少。

(本文由中国科学院基金资助; 红细胞变形性由美国加州大学旧金山医学院 N. Mohandas 教授测定; 阿魏酸钠由中国医学科学院药物研究所徐理纳教授提供。在此谨向上述两位教授致谢)

参 考 文 献

1. 张之南, 等. 蛇毒因子溶血试验的改进及临床应用. 中国医学科学院学报 1979; 1(1):57.
2. Dodge ZT. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1983; 100: 119.
3. Mohandas N, et al. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. Seminars in Hematology 1983; 20:225.

侧位皮下内括约肌切断术结合指扩法治疗肛裂 58 例

浙江省上虞县中医院痔外科 叶德超

1983 年 4 月~1984 年 12 月采用侧位皮下内括约肌切断术(简称内侧切术)结合指扩法治疗肛裂 58 例, 经临床随访观察, 疗效满意。

临床资料 本组 58 例, 男 17 例, 女 41 例, 男女之比为 1:2.4。年龄最大 56 岁, 最小 18 岁, 其中 21~40 岁 39 例, 占 70.7%。病程最长 23 年, 最短 15 个月, 以 3~6 年为最多。肛裂部位: 后位 48 例, 前位 6 例, 前后位同时存在裂口者 4 例。并发哨痔者 43 例, 肛乳头肥大 12 例, 肛管静脉曲张 3 例。全部病例均按 1978 年银川全国肛裂专题会议拟定标准, 二度 26 例, 三度 32 例。本疗法适应于肛裂便血、灼痛及反复发作或并发哨痔, 肛乳头肥大经保守治疗无效者。肛周炎症、腹泻、直肠脱垂、妊娠期、凝血机制异常及心、肝、肾疾病者禁用。

治疗方法 (1)术前准备: 术前排空大、小便, 肛周、会阴部皮肤准备。(2)手术操作: 取俯卧位, 抬高臀部, 两侧用宽胶布牵拉固定, 充分暴露肛门, 皮肤常规消毒, 局部浸润麻醉或腰俞麻醉术者, 左手食指伸入肛内作诱导指示, 右手持 11 号三角尖头手术刀, 在肛门左侧或右侧距肛缘 1.5cm 处, 用刀片平放刺入皮下与肛管平行进至齿线(切忌刺肛破管皮肤)转动刀刃,

将内括约肌向外侧方切开 0.3~0.5cm, 此时左手可有松懈感, 平行抽出刀片后, 肛管皮下切口可及一纵行间隙, 并用两手食、中指伸入肛内缓缓对抗扩张, 如仍有紧箍感时稍加撕拉, 使尚未断裂的内括约肌分离。对并发哨痔、肛乳头肥大者均切除。陈旧性肛裂溃疡面予以搔刮, 以便于引流。术毕切口压迫止血, 丁字带加压包扎。

结果 临床症状完全消失, 肛裂愈合为痊愈; 症状基本消失, 肛裂基本愈合, 偶有便血及轻微肛门疼痛为好转; 症状、体征无明显变化为无效。本组门诊手术 23 例, 35 例住院(平均 3.8 天)手术, 全部痊愈, 近期治愈率 100%。术后第一次排便疼痛消失者 49 例, 占 84.5%, 其余均在 3~5 天内逐日减轻消失。术后 5 个月至 1 年随访 43 例, 除 1 例习惯性便秘尚有轻微疼痛和间歇性便血外, 其余均未见复发。

体会 内侧切术结合指扩法治疗肛裂, 有操作简便、疗程短、见效快、痛苦小等优点, 改变了过去肛裂切除术创面过大、愈合和住院时间长、痛苦大的弊病。特别是在保守治疗或其它手术方法失败后, 内侧切术结合指扩法被认为是一种成功的方法, 值得推广。

The Effect of Sodium Ferulate on Complement-Activated Hemolysis

Feng Liming (冯立明), Li Caihua (李彩华), Pan Huazhen (潘华珍), *Zhang Zhinan (张之南)

*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; *Beijing Union Hospital, Beijing*

Sodium Ferulate (SF) is one of the ingredients derived from *Radix Angelicae Sinensis* and *Rhizoma Ligustici* Chuanxing. Red blood cells from normal persons or paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients were incubated with SF and the effect of SF on Cobra Venom Factor (CoF) hemolysis test, activation of complement (C_3), the binding of C_{3b} with red blood cell membrane and red cell deformability was observed. The result revealed that SF could definitely reduce the hemolysis induced by CoF and the binding of C_{3b} to red cell membrane was decreased, but no influence on the activation of complement through alternate pathway or effect on red cell deformability was observed. The mechanism of action was briefly discussed. (Original article on page 681)

Observation on Inhibitory Actions of Tanshinone on Leukocyte Chemotaxis

Gao Jiyan (高骥媛), et al

Department of pathophysiology, China Medical University, Shenyang

As has been demonstrated by a series of clinical practices and experimental researches, Tanshinone (ether extract from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge) possesses antibiotic and antiinflammatory actions. However it has not been reported whether Tanshinone has inhibitory action on leukocyte chemotaxis in vitro. This paper reports the observation of actions of Tanshinone on leukocyte random locomotion and chemotaxis in vitro by agarose plate assay for elucidation of Tanshinone's action. The results shows though human leukocytes chemotaxis was inhibited when Tanshinone (50 ng/ml) and leukocytes suspensions (10^7 /ml) preincubated for 1 hour at 37°C , random locomotion showed no changes. When action of Tanshinone on leukocytes lasted 19 hours, both chemotaxis and random locomotion were inhibited by Tanshinone with the same concentration. The results demonstrate and confirm the antiinflammatory action and mechanism of Tanshinone. (Original article on page 684)

Effect of Disodium Cantharidate and Injectio Herbae Sar Candrae on Energy and Cyclic Nucleotide Metabolism in Hepatoma 22 Cells and Liver Tissues of Tumor-Bearing Mice

Zhang Yinghua (张英华), *Chen Xing (陈兴), et al

Institute of Chinese Materia Medica, Academy of TCM;

**Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing*

Effect of Disodium Cantharidate (DSC) and injectio herbae Sarcandrae on oxygen consumption, respiratory control ratio, oxidative phosphorylation efficiency, succinate dehydrogenase activity, catalase activity, cAMP and cGMP levels and phosphodiesterase activities in Hepatoma 22 cells and liver tissues of tumor-bearing mice were studied in vivo and in vitro.

The present data suggest that these two drugs are respiration inhibitors and can improve the energy metabolism of tumor cells and tumor-bearing mice. They also increase the catalase activity, showing a decrease in toxohormone level of these mice. The improvement of energy metabolism may be one of their ways to control or moderate carcinogenesis.

The cAMP/cGMP ratio was found much lower in Hepatoma cells than in livers of normal mice. It was also found that DSC not only elevated the intracellular cAMP level and cAMP/cGMP ratio, but also inhibited cAMP phosphodiesterase activity (low K_m) in Hepatoma cells. These results suggest that the antitumor mechanism of DSC may be partly due to modulating cAMP level by inhibiting the activity of cAMP phosphodiesterase.

(Original article on page 686)