

葛根素与牛磺酸配伍对红细胞稳定性的影响

吴亚运¹, 侯少贞¹, 黄晓其¹, 李耿¹, 苏子仁¹, 赖小平¹, 周华², 刘良²(1. 广州中医药大学, 广东广州 510006; 2. 澳门科技大学, 澳门)

摘要: **目的** 初步研究葛根素与牛磺酸配伍对红细胞膜稳定性、膜流动性及形态影响。**方法** 采用体外溶血实验, 比较葛根素与牛磺酸配伍前后红细胞溶血的程度; 采用荧光染料技术, 比较葛根素与牛磺酸配伍前后红细胞膜流动性的变化; 体内试验以血细胞涂片观察葛根素与牛磺酸配伍前后对红细胞形态的影响。**结果** 葛根素能直接导致红细胞溶血, 牛磺酸可抑制葛根素所致的溶血现象。葛根素能显著提高红细胞膜流动性, 牛磺酸对葛根素此作用无明显影响。静脉注射葛根素可引起部分红细胞呈棘形, 牛磺酸能抑制葛根素对红细胞形态的改变。**结论** 牛磺酸体外能对抗葛根素的溶血现象, 体内可抑制葛根素诱导的红细胞形态异常。

关键词: 葛根素; 牛磺酸; 红细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)05-0532-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.003

Effect of Combination of Puerarin and Taurine on Stability of Erythrocytes

WU Yayun¹, HOU Shaozhen¹, HUANG Xiaoqi¹, LI Geng¹, SU Ziren¹, LAI Xiaoping¹, ZHOU Hua², LIU Liang²
(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Macau University of Science and Technology, Macau)

Abstract: **Objective** To measure the effect of the combination of puerarin and taurine on membrane stability, membrane fluidity and membrane histology of erythrocytes. **Methods** Hemolysis tests in vitro were performed for puerarin and puerarin-taurine mixture. Membrane microviscosity of erythrocytes was tested after treating with puerarin or puerarin-taurine mixture. Erythrocytes smear of the rats treated with intravenous injection of puerarin or puerarin-taurine mixture was used for the observation of morphological changes of erythrocytes under light microscope. **Results** Puerarin caused obvious hemolysis directly while taurine had no effect on the hemolysis induced by puerarin. Both puerarin and puerarin-taurine mixture showed similar effect on the membrane microviscosity of erythrocytes. Intravenous injection of puerarin induced thorn-like morphological changes of some erythrocytes in rats, while taurine showed an inhibition of morphological changes of some erythrocytes. **Conclusion** Taurine could suppress the hemolysis induced by puerarin in vitro, and relieve the morphological changes of erythrocytes induced by puerarin.

Keywords: Puerarin; Taurine; Erythrocytes

牛磺酸是中药牛黄的有效成分之一, 亦是人体内含量较高的一种 β -氨基酸, 具有广泛的生物学功能, 其主要作用包括调节细胞内钙稳态、稳定细胞膜、抗脂质过氧化、抑制肿瘤细胞增殖及胶原形成, 对外源性化合物有解毒作用等^[1]。大量研究^[2-5]表明, 牛磺酸对红细胞膜有明显的保护作用, 能减轻

各种损伤对红细胞(Red Blood Cell, RBC)的破坏。考虑到葛根素致溶血与 RBC 膜稳定性的改变有关, 我们尝试将葛根素与牛磺酸配伍, 观察牛磺酸对葛根素影响 RBC 稳定性的作用。本课题组预实验未发现牛磺酸对正常 RBC 有明显影响, 而葛根素能直接引起正常 RBC 生理形态功能的改变^[6]。本研究考察葛根

收稿日期: 2013-12-31

作者简介: 吴亚运, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药研究与开发。Email: 659984113@qq.com。通讯作者: 侯少贞, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管及代谢性疾病药物的药理与毒理研究。Email: hsz0214@gzucm.edu.cn。

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(20114425120012); 广东省自然科学基金博士启动基金项目(S2011040003141)。

素与牛磺酸配伍前后对 RBC 形态、膜流动性的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 350 ~ 450 g, 香港中文大学实验动物中心, 批号: 080613。

1.2 药品及试剂 葛根素注射液, 含葛根素 50 mg·mL⁻¹, 丙二醇 0.5 mL·mL⁻¹, 广州大日生物科技有限公司, 批号: 07030101; 葛根素、牛磺酸混合液(葛根素:牛磺酸=1:5;用注射生理盐水(NS)溶解, 微孔滤膜过滤, 高温高压灭菌), 广州中医药大学新药开发研究中心苏子仁研究员提供, 批号: 20080912; 人血浆 (buffer coat), 香港红十字会; 牛磺酸 (taurine), 广东大地食用化工有限公司, 批号: 20060503; 四氢呋喃、1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯(DPH)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、乌拉坦(Urethane)、丙酮酸钠(Pyruvate), 均为美国 Sigma 公司产品。

1.3 仪器 22XLJ-II 型离心沉淀机, 上海医用仪器厂; Milli-Q 纯水系统, 美国 Millipore 公司; 连续光波酶标仪, BIO-RAD Benchark & microplate spectrophotometer, 美国 Bio-Rad 公司; J-25I 高速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司; LS55 荧光分光光度计, 美国 PerkinElmer 公司; 相差倒置显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.4 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 的溶血作用 往不同编号的洁净玻璃试管分别加入适量的葛根素注射液, 并用生理盐水稀释成葛根素终浓度分别为 1, 2, 4, 8 mmol·L⁻¹ 的对照溶液。另取洁净玻璃试管若干, 加入适量的葛根素与牛磺酸混合液, 并调整至葛根素终浓度分别为 1, 2, 4, 8 mmol·L⁻¹。各试管分别再加入 50 μL 50 % 大鼠 RBC 悬液的混合液, 置 37 °C 生化培养箱孵育 6 h, 同时设阴性(NS)及阳性(Milli-Q 纯水)对照管。育毕, 室温下冷却, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液, 于 540 nm 下测吸光度(OD)值, 计算各组不同浓度溶液中 RBC 溶血率。溶血率=(样品管 OD 值-阴性对照管 OD 值)/(阳性对照管 OD 值-阴性对照管 OD 值)×100 %。实验重复 6 次, 每次采用不同动物的 RBC 进行试验, 求 6 次结果的平均值。以相同的方法检测葛根素与牛磺酸混合液对人 RBC 的溶血作用。

1.5 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 膜流动性的影响

取经 NS 洗涤 3 次后的 80 % 人 RBC 悬液 5 mL, 加入 20 倍体积、4 °C PBS 溶液(5 mmol, pH 8.0) 使 RBC

充分破裂, 4 °C 16000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 用相同的 PBS 反复洗涤至 RBC 膜呈淡黄色或无色, 最后用等渗 PBS(pH 7.4) 稀释至 5 mL, 制成 RBC 膜悬液备用。采用四氢呋喃溶解 DPH, 配成 2×10⁻³ mmol·L⁻¹ DPH 母液, 于 4 °C 冰箱中避光保存, 临用前用 NS (pH 7.0) 稀释成 2×10⁻⁶ mmol·L⁻¹。配置不同浓度的葛根素与牛磺酸混合液, 使葛根素终浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 8 mmol·mL⁻¹, 并将相同浓度的葛根素溶液作对照。再分别往各管加入 RBC 膜悬液 50 μL, 于 37 °C 避光孵育 1 h。同时设定空白对照管(NS)。孵育完后加入等体积 DPH 稀释液, 室温下避光放置 1 h 后, 用荧光分光光度计测定测定 RBC 膜悬液荧光偏振度 P, 并计算微黏度(激发波 365 nm, 发射波 430 nm)。其数值越大, 膜流动性越小。根据其大小比较葛根素与牛磺酸配伍前后对人 RBC 膜流动性的影响。RBC 的微黏度公式:

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

1.6 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 形态的影响 取健康雄性大鼠 18 只, 分为 3 组: 空白对照组、葛根素 + 牛磺酸组及葛根素组, 每组 6 只。给药组分别按 50 mg·kg⁻¹(以葛根素的量计算)的剂量静脉注射葛根素牛磺酸混合液及葛根素注射液, 空白对照组给予等容量的 NS, 连续给药 5 d, 末次给药后 45 min, 采血、涂片、染色, 进行 RBC 形态学观察。

1.7 统计学处理方法 所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS16.0 统计软件, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 的溶血作用 随着孵育时间的延长、浓度的增加, 葛根素注射液的溶血作用越来越明显。葛根素浓度为 8 mmol·L⁻¹ 时大鼠 RBC 的溶血率为(44.7 ± 6.4)%。葛根素与牛磺酸相配伍后, 溶血作用未随着浓度增加而增大; 不同浓度组的溶血率均低于 5 %, 说明牛磺酸能显著抑制葛根素的溶血作用, 见表 1。与大鼠 RBC 相比, 等浓度的葛根素对人 RBC 的溶血率更为明显, 当葛根素浓度为 4 mmol·L⁻¹ 时, 溶血率为(42.4 ± 4.5)%; 当葛根素浓度为 8 mmol·L⁻¹, 溶血率增大至(59.9 ± 5.2)%。葛根素 + 牛磺酸组人 RBC 未出现明显溶血, 溶血率未随葛根素浓度的增加而增大, 溶血率均小于 5 %, 见表 2。

表 1 葛根素与牛磺酸配伍对大鼠 RBC 的溶血作用($\bar{x} \pm s, n=6$)
 Table 1 The homolyzation of puerarin and taurine on the erythrocytes of rat

葛根素浓度 /mmol·L ⁻¹	溶血率 /%	
	葛根素 + 牛磺酸组	葛根素组
1.0	2.6 ± 2.2	8.1 ± 5.8
2.0	2.4 ± 1.5**	11.2 ± 7.8
4.0	2.1 ± 0.3**	13.7 ± 3.1
8.0	2.2 ± 0.1**	44.7 ± 6.4

注: 与葛根素组比较, ***P* < 0.01。

表 2 葛根素与牛磺酸配伍对人 RBC 的溶血作用($\bar{x} \pm s, n=6$)
 Table 2 The homolyzation of puerarin and taurine on the erythrocytes of human

葛根素浓度 /mmol·L ⁻¹	溶血率 /%	
	葛根素 + 牛磺酸组	葛根素组
1.0	0.3 ± 0.4	0.8 ± 0.4
2.0	1.0 ± 0.8**	12.4 ± 6.4
4.0	2.2 ± 0.9**	42.4 ± 4.5
8.0	2.8 ± 0.8**	59.9 ± 5.2

注: 与葛根素组比较, ***P* < 0.01。

表 3 葛根素与牛磺酸配伍对细胞膜微黏度的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 The co-effect of puerarin and taurine on membrane microviscosity of erythrocytes

组别	空白对照	葛根素浓度 /mmol·L ⁻¹							
		0.05	0.1	0.2	0.4	1	2	4	8
葛根素组	5.2 ± 0.06	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.00	0.3 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.01
葛根素 + 牛磺酸组	5.2 ± 0.06	0.4 ± 0.02	0.2 ± 0.02**	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02

注: 与葛根素组比较, ***P* < 0.01。

2.2 牛磺酸与葛根素配伍对 RBC 膜流动性的影响

细胞膜微黏度与流动性互为倒数关系, 即细胞膜流动性越小, 膜微黏度越大。空白对照组红细胞膜微黏度为 5.2 ± 0.06。葛根素注射液能显著降低细胞膜微黏度, 各组膜微黏度值均小于 0.5, 提示膜流动性显著提高。当葛根素浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 时, 葛根素 + 牛磺酸组的膜微黏度小于葛根素组, 差异有统计学意义(*P* < 0.01); 但其他浓度下, 葛根素与牛磺酸配伍后对红细胞膜流动性的改变则与葛根素组相似(*P* > 0.05), 见表 3。

2.3 牛磺酸与葛根素配伍对 RBC 形态的影响

空白对照组、葛根素 + 牛磺酸组静脉注射给药后, RBC 形态未见发生明显异常, 细胞边缘光滑, 中间浅色的圆形区域提示细胞呈正常双凹面。葛根素组部分 RBC 表面呈突刺状, 即细胞呈棘形、皱缩, 中间浅色区域变小, 提示红细胞双凹面形状发生改变、细胞形态异常, 见图 1。

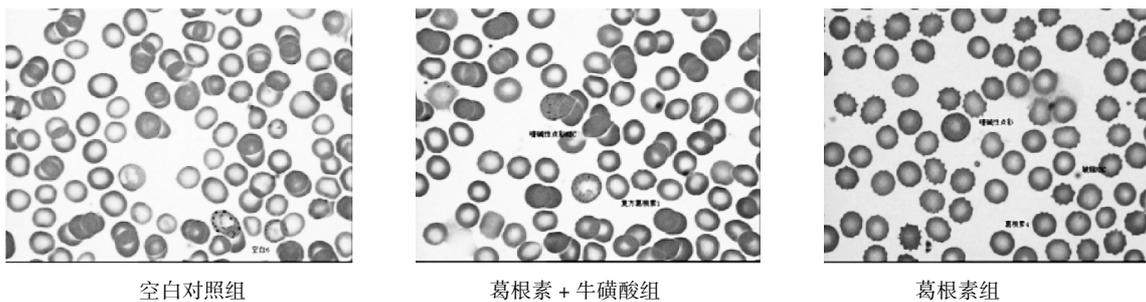


图 1 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 形态的影响

Figure 1 The co-effect of puerarin and taurine on the morphology of erythrocytes

3 讨论

3.1 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 溶血及膜流动性改变的影响

葛根素溶液对大鼠或人 RBC 的溶血作用均随着浓度的增加、孵育时间的延长而增强; 葛根素与牛磺酸配伍后对大鼠或人 RBC 均无溶血作用, 表明牛磺酸能够抑制葛根素的溶血作用。

基于任何溶血反应都必然涉及到红细胞膜的损

伤, 本研究首先考察牛磺酸能否改变葛根素对红细胞膜流动性的影响, 结果发现葛根素能显著提高红细胞膜流动性。由于红细胞膜的流动性决定于细胞膜的组成、结构以及组成物质的状态。细胞膜结构上的磷脂双分子层可以形成两种相态, 既凝胶相和溶胶相, 处于凝胶相时, 细胞膜脂肪链排列整齐致密, 脂质双分子层流动性小, 可使 RBC 的变形能力

降低。溶胶相时，脂肪链排列整齐疏松，脂质双分子层流动性大^[7-9]。实验表明，葛根素显著提高膜的流动性，推测大量葛根素嵌入红细胞膜磷脂层，除增加磷脂分子之间的静电斥力，还可能引起磷脂相态的改变，脂质双层分子的规整性下降，显著提高细胞膜流动性，进而改变膜通透性和细胞渗透压。这与其他两亲分子如氯丙嗪^[10]、丙咪嗪^[11]、黄酮类化合物^[12-13]对红细胞膜临界相态的影响相似。

本实验中，牛磺酸能抑制葛根素的溶血作用，但对葛根素致红细胞膜流动性的提高未见明显的影响。这可能是由于牛磺酸能够与磷脂分子相结合^[14]，通过稳定膜磷脂分子的排列，减少葛根素对膜稳定性的影响有关。由于牛磺酸具有调节细胞渗透压的作用^[15-16]，而两亲分子诱导的 RBC 溶血过程中常常伴随着胶体渗透压的改变。因此我们推测牛磺酸还可能通过干预葛根素对 RBC 渗透压的改变而抑制葛根素的溶血作用。

3.2 葛根素与牛磺酸配伍对 RBC 形态的影响 本实验中，葛根素静脉注射过程中未发现其诱发大鼠血管内溶血或其他明显不良反应，但细胞形态学检查发现葛根素注射后部分 RBC 呈棘形，但空白对照组、葛根素 + 牛磺酸组则未出现 RBC 形态异常。因此我们推测牛磺酸能够拮抗高浓度葛根素对红细胞的不良影响。

葛根素注射液的主要使用对象及出现严重不良反应的患者多患有缺血性心脑血管疾病，如动脉粥样硬化、冠心病、糖尿病、心肌梗死、休克、脑血栓等。RBC 变形能力减弱往往是这些疾病的重要临床表现之一^[6]。因此，推测长期大剂量静脉给药后，葛根素在体内蓄积，大量葛根素与 RBC 结合时会改变其正常生理形态，这些形态异常、变形能力差的红细胞最终会出现破裂，或激活体内吞噬细胞对其进行吞噬^[7]，最终产生严重不良反应。同时，由于棘状 RBC 释氧能力较正常 RBC 弱，血液中存在大量的棘红细胞可能会引起组织器官局部供氧不足^[18]，引发不良反应。葛根素与牛磺酸配伍后，不会诱导棘状红细胞的出现，因此推测葛根素与牛磺酸配伍可能可以减少葛根素引起的不良反应。

参考文献：

[1] Petrosian AM, Haroutounian JE. Taurine as a universal carrier of lipid

soluble vitamins: a hypothesis[J]. *Amino Acids*, 2000, 19(2): 409-421.

[2] 周宝宽, 林静. 牛磺酸膜稳定作用的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(3): 277-278.

[3] 张秀珍, 段建华. 牛磺酸对细胞膜脂流动性的影响[J]. *青岛医学院学报*, 1996, 32(2): 106-108.

[4] 门秀丽, 张连元. 牛磺酸对肢体缺血再灌注后红细胞的保护作用[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2002, 4(2): 137-138.

[5] 魏智清, 芮键, 杨涓. 牛磺酸对 H₂O₂ 诱导的红细胞溶血率的影响[J]. *生物学杂志*, 2007, 24(1): 38-40.

[6] Hou SH, Su ZR, Chen SX, et al. Role of the interaction between puerarin and the erythrocyte membrane in puerarin-induced hemolysis [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 192(3): 184-192

[7] O'Leary TJ, Ross PD, Levin IW. Effects of anesthetic tetradecenols on phosphatidylcholine phase transitions. Implications for the mechanism of the bilayer pretransition[J]. *Biophys J*, 1986, 50(6): 1053-1059.

[8] Heimburg T. A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition[J]. *Biophys J*, 2000, 78(3): 1154-1165.

[9] 何莹, 杜文经, 刘雪峰. 临床常用的血液流变计算指标的差异分析 [J]. *中国血液流变学杂志*, 2004, 14(1): 114-116.

[10] Ahyayauch H, Goni FM, Bennouna M. pH-dependent effects of chlorpromazine on liposomes and erythrocyte membranes[J]. *J Liposome Res*, 2003, 13(2): 147-155.

[11] Ahyayauch H, Goni FM, Bennouna M. Interaction of electrically neutral and cationic forms of imipramine with liposome and erythrocyte membranes[J]. *Int J Pharm*, 2004, 279(1-2): 51-58.

[12] Maniewska J, Gryniewicz G, Szeja W, et al. Interaction of genistein benzyl derivatives with lipid bilayers—fluorescence spectroscopic and calorimetric study[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(6): 2592-2597.

[13] Lehtonen JY, Adlercreutz H, Kinnunen PK. Binding of daidzein to liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1285(1): 91-100.

[14] Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ. The in vivo and in vitro protective properties of taurine[J]. *Gen Pharmacol*, 1995, 26(3): 453-462.

[15] Schaffer S, Takahashi K, Azuma J. Role of osmoregulation in the actions of taurine[J]. *Amino Acids*, 2000, 19(3-4): 527-546.

[16] Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(1): 193-277.

[17] Bratosin D, Estaquier J, Petit F, et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(12): 1143-1156.

[18] Kon K, Maeda N, Shiga T. The influence of deformation of transformed erythrocytes during flow on the rate of oxygen release[J]. *J Physiol*, 1983, 339: 573-584.

(编辑：梁进权)