

电离辐射对狗红细胞膜的作用及氧的影响

唐仲雄 刘 福 张卿西

(军事医学科学院放射医学研究所)

摘要 本文以ANS荧光探针方法观察不同剂量 γ 线照射狗红细胞膜后的变化及 O_2 对此效应的影响。结果表明:随照射剂量的增加而荧光强度相应减弱,无论在照射前或照射后一段时间内增加红细胞膜悬液中 O_2 的含量均可加重辐射效应,对此结果文中略加讨论。

关键词 辐射效应;红细胞膜;氧效应;辐照后氧效应。

引 言

电离辐射对生物膜的作用近年来日益受到重视,其中对于红细胞膜的作用已有较多的报道。电离辐射可改变红细胞脆性、电泳迁移率及对 K^+ 、 Na^+ 的通透性等。这些现象一般均可归因于生物膜结构或功能的改变所致^[1~4]。Yonei^[5]及Purobit^[6]等用荧光探针的方法观察到羊或人的红细胞膜受照射后发生变化,而且 O_2 能加强此作用。这被认为 O_2 促使生成更多的 $O_2^{\cdot-}$ 或 $OH^{\cdot}$ 作用于红细胞膜而加强了辐射效应。本文应用荧光探针ANS(1-苯胺基8-萘磺酸盐)观察 ^{60}Co γ 射线对于狗红细胞膜的辐射作用及照射时或照射以后改变 O_2 含量对于辐射效应的影响,以便为进一步了解、减轻或加重辐射效应提供资料。

实验材料及方法

取健康成年雄性杂种狗的静脉血,肝素抗凝,存放冰箱内(不超过二天)供制备红细胞膜用。

制备红细胞膜方法基本按照Dodge氏^[7]法及Yonei氏^[5]法进行。先将3 ml狗静脉血加至30 ml盐水磷酸钠缓冲液(1份生理盐水加1份等渗缓冲液,pH为7.4)中混匀4℃,3000 rpm离心5 min,弃上清液,再洗涤二次,红细胞沉淀中加入30 ml按1:13(V/V)稀释的磷酸钠缓冲液(约24 mOsm,pH为7.4),使细胞溶破,4℃,10000 rpm(9000 g)离心15 min,洗涤三次,往红细胞膜下沉物中加等渗磷酸钠缓冲液10 ml,置于37℃水浴保温90 min,再稀释到150 ml。此为乳白色或略带粉红色的悬液(残存血色素<2.5%,蛋白质含量5~7 mg/100 ml)放冰箱中保存备用,四天后即废弃。

红细胞膜荧光强度测定系应用ANS荧光探针法进行,取市购ANS重结晶后按Azzi氏^[8]法制备镁盐精制品,以磷酸钠缓冲液配成20 μ M溶液保存备用。

每次试验取上述红细胞膜悬液5 ml,受不同剂量 γ 线照射,或于照射前、后不同时间在悬液中缓慢通入氧气(O_2)、氮气(N_2)或空气(A)(通气时间15 s,流速约25 ml/min)后置于37℃水浴中保温30 min,加入等量ANS溶液轻轻混匀,避光静置30 min,用日立MP-4型荧光分光光度

计描绘 200~420 nm 之间的激发光谱图(固定发射波长 468 nm), 分析 285 nm 及 380 nm 二个峰值的变化。

照射源为 ^{60}Co γ 射线, 距离 30 cm, 照射剂量率 750~780 rad/min, 照射剂量为 1000, 2000 或 4000 rad。

本实验系在室温(15~25℃)下进行。每个实验数据为四只狗红细胞膜悬液作八次测量值的平均数, 取同时试验的各组间差量作统计处理。

实 验 结 果

ANS 与红细胞膜结合后可以发出很强的荧光。经电离辐射作用后, 由于膜结构发生变化结合能力也相应减弱致使荧光强度渐见下降(图 1)尤其在 285 nm 及 380 nm 处的峰值改变较为明显, 因此在不同剂量 γ 线照射后, 分析这二波峰的相对荧光强度百分数的变化, 结果如表 1 所示: 随着照射剂量的增加, 荧光强度相应减弱; 而且在 285 nm 处比 380 nm 处荧光强度下降得更迅速一些。

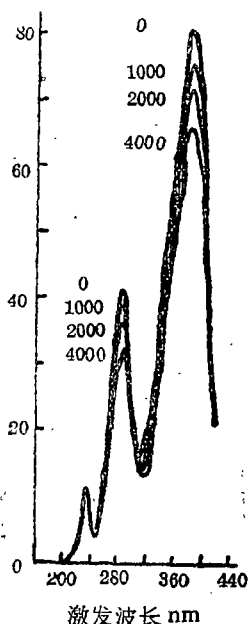


图 1 不同剂量(rad)照射狗红细胞膜后的荧光激发光谱(发射波长 468 nm)

表 1 不同剂量照射狗红细胞膜后相对荧光强度的变化

照射剂量 (rad)	相 对 荧 光 强 度(%)	
	285 nm	380 nm
0	100.0	100.0
1000	88.2±2.3	89.4±2.2
2000	82.6±2.4	85.4±2.2
4000	71.2±1.6	76.9±1.2

注: $\bar{X} \pm S.E.$

表 2 照射前给氮、氧对于相对荧光强度变化的影响

组 别	相对荧光强度(%)	
	285 nm	380 nm
1000 rad		
N ₂	96.9±1.8	95.6±2.3
A	88.5±1.6	89.3±1.5
O ₂	83.4±2.1	86.4±1.9
2000 rad		
N ₂	92.2±1.6	97.3±1.4
A	86.5±1.5	93.3±1.5
O ₂	77.1±2.4	85.4±1.0
4000 rad		
N ₂	84.8±3.0	91.6±2.7
A	79.2±2.6	87.3±2.1
O ₂	70.6±2.4	83.5±1.8

注: $\bar{X} \pm S.E.$

表 3 照射后立即给氮、氧对于相对荧光强度变化的影响

组别	相对荧光强度(%)	
	285 nm	380 nm
1000 rad		
N ₂	96.0±1.7	96.7±1.6
A	92.6±1.2	94.0±1.4
O ₂	85.0±1.3	88.7±1.1
2000 rad		
N ₂	90.4±1.9	95.6±1.5
A	85.9±2.2	92.6±1.7
O ₂	78.9±3.1	88.0±2.1
4000 rad		
N ₂	84.2±1.3	91.2±1.4
A	79.5±1.8	88.7±1.4
O ₂	69.8±1.8	83.3±0.9

注: $\bar{X} \pm S.E.$

表 4 照射后不同时间给氮、氧对
于相对荧光强度变化的影响

组 别	相对荧光强度(%)	
	285 nM	380 nM
10 min		
N ₂	87.5±2.2	90.3±1.9
A	81.7±3.0	87.2±2.0
O ₂	72.8±2.3	82.7±1.6
20 min		
N ₂	85.6±1.2	89.4±0.8
A	82.9±2.3	88.0±2.0
O ₂	74.3±1.2	82.0±0.8
1 小时		
N ₂	83.2±1.2	87.5±1.1
A	79.3±1.6	85.1±1.1
O ₂	68.3±1.4	79.6±0.9

注: $\bar{X} \pm S$, E. 照射 2000 rad.

如在红细胞膜悬液中分别通以 O₂、N₂ 或空气(A)之后再行照射, 则荧光强度的变化就有所不同。与通以空气者相比较, 通 N₂ 者变化减轻而通 O₂ 者荧光强度下降明显加剧($P < 0.05$)(见表 2)。

如果先照射红细胞膜悬液而后立即(约 2 min 左右)分别通以不同气体, 再测定其荧光强度的变化, 结果与上述规律相似(见表 3)。通 O₂ 者荧光强度下降亦明显加剧($p < 0.05$)

为观察照射后较长一段时间内通以上述气体是否还会出现这种现象, 在红细胞膜悬液经 2000 rad 照射后 10 min, 20 min 或 1 小时通以不同气体再测定荧光强度的变化, 结果仍然出现同样的效应, 通 O₂ 者荧光强度下降明显加剧($p < 0.05$)(见表 4)。

由上述实验结果可见狗红细胞膜悬液的荧光强度随照射剂量的增加而相应减弱。当照射前此悬液中充以 N₂ 则荧光强度改变得轻, 充以 O₂ 则改变加剧。如在照射之后一段时间内在此悬液内充以 N₂ 仍可见荧光强度改变得轻而充以 O₂ 则改变明显加重。

讨 论

Yonei 以羊红细胞膜, Purohir 以人红细胞膜作为研究对象, 均见到不同剂量射线照射后其 380 nM 峰的荧光强度相应地减弱, 并认为系由于生物膜的流动性及结构改变所致。本实验在狗红细胞膜试验中亦见到其荧光强度的变化确与照射剂量有一定的关系。但本实验中尚见到不同剂量照射后 285 nM 峰值的变化较之 380 nM 峰者更大(见表 1、2、3)。这可能说明红细胞膜受到电离辐射作用之后不仅与 ANS 结合的能力有所下降, 而且此流动镶嵌体中不同组份似还有各自独特的变化。这是值得进一步探索的。

在红细胞膜悬液中照射时 O₂ 的含量不同可使辐射效应有所改变, 这在 Purohit 的实验中已得到证实。本实验也见到此现象。一般可解释为: 电离辐射使水解质产生活泼的 OH[·], O₂^{·-} 等自由基作用于生物膜而使之受到损伤, 溶液中 O₂ 含量的多少对于上述自由基的生成有一定影响, 因此可导致不同的辐射效应。但本实验在照射的一段时间内改变红细胞膜悬液中 O₂ 含量仍然出现氧效应, 这就很难以上述机制解释。Bacq^[9], Kong^[10] 等曾提出: 二元机制, 即 O₂ 对于辐射的间接效应和直接效应均参与作用。Samuni^[11] 认为 O₂ 效应是由于 O₂ 与生物分子上已受损伤的部位直接作用之故。这些认识似有助于本实验中照射后 O₂ 效应现象的解释。可能是由于电离辐射导致红细胞膜的损伤, 而照射后 O₂ 仍可与此已受损伤的红细胞膜作用而加重辐射效应。如电离辐射可诱发红细胞膜脂质的过氧化作用, 进行有 O₂ 参与作用的自由基链式反应及链式支链反应^[12-13], 而根据脂质过氧化曲线看来, 它又可有数分钟至数小时的引导期而后直线上升^[14], 因此就有可能在照射后的一段时间内 O₂ 含量的不同会对脂质损伤的发展起相当的影响。而这又可影响膜蛋白质的变化^[12], 以致加重辐射效应。由此似可认为辐射损伤的 O₂ 效应根据时相而分可有二类: 一者对辐射当时的致

敏作用, 一者对辐射以后的加重作用。前者可以用二元机制解释, 后者乃直接促进损伤分子之发展, 而后者不可忽视。从本实验结果看来, 无论在照前或照后一定时间内改变 O_2 的含量, 对于辐照效应均能产生大体相同的影响。

(本文经刘雪桐、夏寿萱教授审改, 谨此致谢)

参 考 文 献

- [1] T. Alper, in J. F. Duplan and A. Chapiron ed., "Advances in Radiation Research", Vol. 1, p. 445, London, 1973.
- [2] D. K. Myers and R. W. Bide, *Radiation Research.*, 27, 250(1966).
- [3] C. Sato, K. Kojima and K. Nishizawa, *Radiation Research.*, 69, 367(1977).
- [4] H. Rink and H. J. Meyer-Techendorff, *Radiation Research.*, 72, 317(1977).
- [5] S. Yonei and M. Kato, *Radiation Research.*, 75, 31(1978).
- [6] S. C. Purohit, R. H. Bisby and R. B. Cundall, *Intern. J. Rad. Biol.*, 38, 147(1980).
- [7] J. T. Dodge, C. Mitchell and D. J. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119(1963).
- [8] A. Azzi, in S. Fleisher and L. Packer ed., "Methods in English Enzymol", Vol. 32 p. 234, New York, 1974.
- [9] Z. M. Bacq and P. Alexander, *Foundamentals of Radiobiology*, Academic Press, p. 45~69, 280~292 New York, 1961.
- [10] S. Kong and A. J. Davison, *Arch. Biochem. Biophys.*, 204, 18(1980).
- [11] S. Samuni and G. Czapski, *Radiation Research.*, 76, 624(1978).
- [12] S. C. Purohit, R. H. Bisby and R. B. Cundall, *Intern. J. Rad. Biol.* 38, 159(1980).
- [13] A. L. Tappel, *Federation Proceedings.*, 32, 1870(1973).
- [14] T. M. Yau and J. Mencl, *Intern. J. Rad. Biol.*, 40, 47(1981).

(1983年3月15日收到)

RADIATION EFFECT ON DOG ERYTHROCYTE MENBRANES WITH PRE-AND POST-RADIATION OXYGEN ENHANCEMENT

Tang Zhongxiong Liu Fu Zhang Qingxi

ABSTRACT Dog erythrocyte membrane specimens were irradiated by ^{60}Co γ -ray at the doses of 1000~4000 rads. The radiation effect and the influence of oxygen on it were studied by means of ANS fluorescence probe. It was revealed that the membrane associated ANS fluorescence decreased with the increase of radiation doses, and this effect could be enhanced by oxygenation of the suspension medium either before or after irradiation. The possible causes of oxygen enhancement of radiation damage are discussed briefly.

KEY WORDS Radiation effect; erythrocyte membranes; Oxygen effect; Post-radiation oxygen effect.