

钼靶软 X 射线所致人血红细胞膜 电 荷 的 变 化

胡 天 喜

(华东师范大学)

摘要 离体人血红细胞受到低能的软 X 射线照射后,如同受到硬 X 射线照射一样,细胞表面电荷明显下降,这种变化可用细胞电泳率的下降来表示。剂量在 43.9~1754.0 rad 范围内,红细胞电泳率的变化与剂量呈正比。受 43.9 和 1052.4 rad 软 X 射线照射后,红细胞电泳率随时间的推移逐渐下降,照后 4 小时降到最低点,以后逐渐恢复,43.9 rad 照后 24 小时可以恢复到未受照射的对照水平,而 1052.4 rad 照射组则不能。

红细胞悬浮于自身血浆中,其电泳率比悬浮于生理盐水中低。照射的血浆加到红细胞悬液中并不能改变红细胞的电泳率;而受照的红细胞悬浮于生理盐水中,却可降低其电泳率。加胞二磷胆碱到照后的红细胞悬液中,可使红细胞表面电荷得到恢复。

关键词 软 X 射线,受照红细胞膜电荷,电泳率,血浆,胞二磷胆碱。

引 言

除了 DNA 是辐射最敏感的靶分子之外,生物膜也是辐射最敏感的部位之一,以致有人提出了“膜靶学说”。近年来研究表明,两种辐射敏感的靶子,通过 DNA—膜复合体相互联系又相互影响。细胞膜表面电荷是生物膜的属性之一,膜电荷的变化可以部分地反映膜结构和功能的变化。细胞电泳技术是测量细胞膜电荷的简便、快速、灵敏的方法之一。70 年代以来,国内外不少学者^[1-16]利用这一技术,研究了辐射线对人和哺乳动物的红细胞、淋巴细胞、胸腺细胞等正常细胞;小鼠乳腺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、腹水癌细胞等肿瘤细胞;分离的细胞核以及酵母等生物膜的影响。所用的辐射多数为 γ 和硬 X 射线,也曾用过 α 粒子和质子^[16]。软 X 射线对生物膜的电荷的影响尚未见有报道。

在过去研究钼靶软 X 射线对人血离体培养淋巴细胞 DNA 合成能力影响的基础上^[17],本文进一步报道了用细胞电泳技术来研究软 X 射线对人的离体红细胞膜的损伤作用。还以细胞电泳率(Electrophoretic mobility, EPM)为指标,研究了血浆因子和胞二磷胆碱(Cytidine diphosphate choline CDP-C)对红细胞膜电荷变化的影响。

材 料 与 方 法

1. 红细胞悬液的制备

抽取健康献血者的外周血,肝素抗凝,1500 转/min 离心 10 分钟,吸去上层的血浆和红细胞层表面的白细胞,然后用生理盐水(0.9%NaCl, pH 7.2~7.4)悬浮红细胞,再用离心清洗法重复清洗两次。洗净浓集的压积红细胞经 5 倍体积的生理盐水稀释后供照射之用,若暂不使用,可存

贮于4℃冰箱中,在临用前仍需离心清洗一次,并经5倍体积的生理盐水稀释后使用,一般保存3~5天。射线处理以后,置4℃冰箱中保存3.5小时,再加15倍体积的生理盐水制成红细胞悬液,供细胞电泳之用。

试验血浆因子作用时,取用自身血浆,按离心浓集的红细胞:血浆=1:1的比例加入,供照射之用。医用CDP-C以最终浓度为0.12~0.98 μM加入5倍体积生理盐水的红细胞悬液中,供照射处理,走电泳之前的处理与前述相同。

2. 软X射线照射

使用DGX-4型钼靶软X射线机,输出的软X射线特征波长为0.62和0.71 Å,有效能量视使用的电压而定,10~30 kV范围内为8~14 KeV,剂量用Farmer剂量计(带0.3 C.C软X射线电离室)标定。本试验的照射条件是:20 kV,5 mA,焦距10 cm,剂量率12.7 rad/s,分组剂量由曝光时间来控制。

由于软X射线能量低,穿透能力弱,为了防止空气和介质的吸收,照射距离缩短,细胞悬液的稀释度较少,而且铺样很薄。样品铺在Φ=6 cm的小培养皿中,培养皿置于冰浴中,对准X光管的管口,开口进行照射。

3. 细胞电泳

基本上参照梁子均等^[18]的方法。除了测量照后时间效应一组外,一般都在照后4小时测量红细胞的EPM。测量时的温度为25±0.5℃。每一人的血样分若干份,供不同剂量X射线照射和药物处理之用,每份数10个细胞往返各走一次(3格=49.5微米)所需的时间,求出电泳率,电泳率的单位是μ/s/v/cm。

实 验 结 果

1. 受照红细胞膜表面电荷的动态变化

43.9 rad低剂量和1052.4 rad高剂量照射后,随着时间的推移,红细胞膜表面电荷出现时相性变化。两组剂量照后2小时,已可看到EPM下降,至照后4小时,下降到最低限,随后逐渐恢复,至照后24小时,43.9 rad组恢复到未受照射的对照水平,而1052.4 rad组则不能完全恢复。试验做了两次,其趋向相似。这一动态变化说明了,受射线照射的红细胞膜电荷的变化是暂态性的,在一定的剂量范围内,随剂量而变,可以得到不同程度地恢复。因为照后4小时红细胞的EPM变化最明显,所以以下的实验都以照后4小时的EPM变化作为观察的指示。

2. 照射剂量与效应的关系

所用的照射剂量有0、43.9、87.7、350.8、701.6、1052.4、1754.0 rad,试验共做了三批,每批用六个人的血,三批共十八人,三批试验的剂量响应曲线相似,现在列出其中一批的试验结果(表1和图1)。由图和表可见:红细胞EPM随剂量的增大而下降,43.9 rad已经能引起红细胞EPM明显变化,350.8 rad之内,剂量响应曲线的斜率较大,而350.8 rad以上,斜率趋向平坦,呈现出二次曲线的图象(图1)。也曾对比过生理盐水和磷酸缓冲液两种不同介质下,红细胞EPM变化的剂量相应曲线,两组曲线相类似。还对比过软X射线和相应剂量的硬X射线所致红细胞EPM变化的剂量响应曲线,两组曲线的形状也相似。这说明了:软X射线与硬X射线一样,可以引起受照红细胞膜表面电荷起变化。

3. 血浆因子的作用

红细胞在血浆中的EPM明显地比在生理盐水中低。350.8 rad照射过的血浆,以1:1的比例

表 1 不同剂量软 X 射线照射下红细胞电泳率的变化
Table 1 Erythrocyte EPM changes induced by different soft X-ray doses

剂量(rad) doses(rad)	0	43.9	87.7	350.8	701.6	1052.4	1754.0
样品Sample							
1	1.35	1.29	1.22	1.13	1.15	1.15	1.12
2	1.36	1.28	1.20	1.15	1.06	1.14	1.14
3	1.31	1.13	1.05	1.09	1.03	1.02	1.09
4	1.32	1.20	1.12	1.07	1.08	1.13	1.13
5	1.31	1.13	1.08	1.06	1.09	1.14	1.14
6	1.30	1.29	1.18	1.18	1.21	1.23	1.12
$\bar{X} \pm SD$	1.33 ± 0.02	1.22 ± 0.08	1.14 ± 0.07	1.11 ± 0.05	1.10 ± 0.07	1.13 ± 0.07	1.12 ± 0.02
t 测验 t test		9.523	8.279	11.399	7.567	6.826	9.251
P 值 p value		$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$

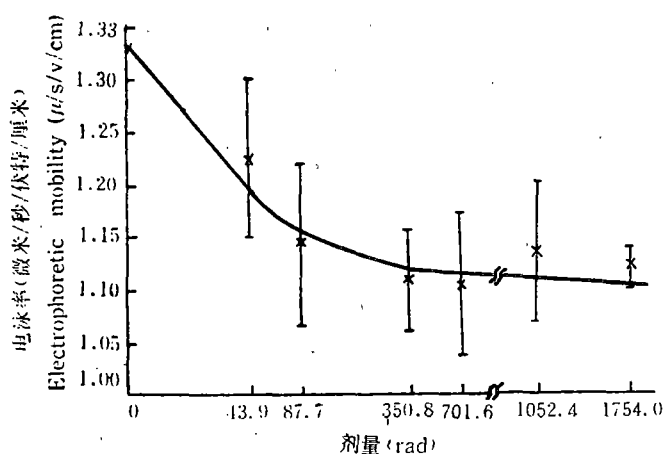


图 1 软 X 射线所致红细胞表面电荷变化的剂量响应曲线(半对数座标)
Figure. 1 Dose-response curve of erythrocyte EPM changes induced by soft X-ray

加到浓集的红细胞中,未见对红细胞 EPM 有何影响。相反,350.8 rad 照过的红细胞悬浮于生理盐水中,可使红细胞的 EPM 下降,但是照射过的和未照射过的红细胞悬浮于自身血浆中,则未见其 EPM 有明显的差异(表 2)。推想,射线直接损伤红细胞的几率要高于通过微环境间接损伤红细胞的几率。

4. CDP-胆碱对红细胞膜辐射损伤的修复作用

受 350.8 rad 软 X 射线照射后,红细胞 EPM 下降,如果在照射前向细胞悬液中加入 CDP-胆碱(最终浓度为 0.12~0.98 μM),并不能缓和辐射所致红细胞的 EPM 的下降。但是,在照射后即刻或间隔 5~20 分钟加入同样浓度的 CDP-胆碱,都可促进红细胞膜电荷的恢复,CDP-胆碱表现出对膜的损伤的修复作用(表 3)。在所用的 CDP-胆碱的浓度的范围内,随着浓度的增加,其促红细胞膜电荷恢复的效应类同,并没有出现什么规律性的变化。

表 2 血浆因子对红细胞电泳率的影响
Table 2 Effects of plasma factor on erythrocyte EPM

处理方式 sample	1	2	3	4	5
1	1.34	1.15	1.15	1.14	1.19
2	1.30	1.13	1.13	1.12	1.09
3	1.32	1.28	1.27	1.24	1.24
X±SD	1.32±0.02	1.19±0.08	1.18±0.08	1.17±0.06	1.17±0.08

- * 1. 未受照红细胞 + 等渗 NaCl

2. 未受照红细胞 + 自身血浆

3. 照射血浆 + 红细胞悬液

4. 受照的红细胞 + 等渗的 NaCl

5. 受照的红细胞 + 自身血浆
1. un-irradiation erythrocytes + iso-osmotic NaCl

2. un-irradiation erythrocytes + own Plasma

3. irradiation plasma + erythrocytes suspension

4. irradiation erythrocytes + iso-osmotic NaCl

5. irradiation erythrocytes + own plasma

表 3 CDP-胆碱的辐射防护作用
Table 3 Radiation protective effects of CDP-choline

处理方式* Sample	1	2	3	4
1	1.30	1.23	1.22	1.34
2	1.30	1.19	1.16	1.24
3	1.30	1.21	1.22	1.32
4	1.30	1.21	1.18	1.38
5	1.34	1.26	1.23	1.33
6	1.31	1.21	1.23	1.29
X + SD	1.31±0.02	1.22±0.02	1.21±0.03	1.32±0.05
t 检验 t test		15.52	10.00	0.515
p 值 p value		p<0.01	p<0.01	p<0.05

- * 1. 对照

2. 照射, 不加药

3. 照射前加 CDP-胆碱

4. 照射后加 CDP-胆碱
1. control

2. irradiation, without added drug

3. added CDP-C before irradiation

4. added CDP-C after irradiation

讨 论

低能 X 射线, 由于它的穿透能力弱, 防护问题往往为人们所忽视。然而它却与中能和高能硬 X 射线一样, 能引起生物细胞染色体畸变^[10], 抑制离体培养的淋巴细胞的 DNA 合成^[17], 本试验进一步证明, 它还能降低红细胞的 EPM, 改变生物膜表面的电荷特性。膜电荷的改变是细胞膜损伤的早期表现。膜电荷的改变是暂态性的。Sato 等^[7, 12]认为, 细胞膜的表面电荷主要由唾液酸的羧基所提供, 受到射线照射以后, 这类酸性糖向膜的深层移位, 减少了外露的羧基, 从而降低了膜的负电荷。低剂量照射以后, 这种移位可以复原, 使 EPM 得到恢复; 高剂量射线照射则会导致分子链断裂, 使膜电荷成为不可逆地降低。因为膜和细胞核 DNA 休戚相关, 膜的损伤

会影响细胞核 DNA 的结构和功能, 最终会引起细胞死亡、机体受伤。由此可见, 一切有软 X 射线的场所, 例如硬 X 射线的散射场, 有万伏以上高压的电器—彩电、高频电焊、大型真空管等处, 软 X 射线的防护应引起足够的重视。

理论上讲, X 射线的生物效应是: 随着能量的降低, 线性能量转移(L. E. T)增大, 相对生物效应(R. B. E)也增大。然而, 由于软 X 射线穿透能力弱, 在空气和介质中能量损耗也大, 细胞所吸收的剂量与照射量有一定的差距, 所以与硬 X 射线相比, 并未显示出更大的 RBE 值。

介质为血浆, 粘度比生理盐水大, 从而降低了细胞的 EPM。照射血浆再加入到浓集的红细胞中, 与含血浆的红细胞悬液的 EPM 并无差异; 而照射浓集的红细胞, 再将其悬浮于生理盐水中, 红细胞的 EPM 明显减少。照射的红细胞悬浮于自身血浆中与未受照射红细胞加入到自身血浆中, 其 EPM 并无明显的差异, 这一结果与文献 3 有所不同, 是否与血浆成分中存在有辐射防护物质有关, 还待深入研究。

CDP-胆碱参与卵磷脂, 脑磷脂和鞘磷脂的生物合成, 临床上已用于治疗脑震荡等疾病, 设想它与膜的脂质的损伤修复有关。本试验也表明, CDP-胆碱对软 X 射线损伤的红细胞膜也有一定的修复作用。这一结果与我们的另一试验, CDP-胆碱抑制辐射所致红细胞溶血相一致(待发表)。不过 CDP-胆碱抑制辐射所致红细胞溶血是照前或照后加药都有显著的效果; 而防止红细胞膜电荷降低上, 只有在照后加才有效。机理如何, 尚不清楚。

本系 78、79、80 级毕业生陈艳华、丁银娣、陆静怡等都参加过本项试验, 生化教研室左大钰副教授指导做 CDP-胆碱的防辐射试验, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 李素云, 细胞电泳方法及对红细胞电泳的研究, 核防护 4:28(1978).
- [2] 李素云, 张昇慧, 辐射对大鼠淋巴细胞电泳率的影响, 辐射防护, 1:47(1982).
- [3] 王汝勤, 王秀成, 李进, 张宝林, 李志旺, $^{60}\text{Co}\gamma$ 照射对家兔和大鼠红细胞膜表面电荷和 ^{32}P 掺入量的影响, 辐射研究与辐射工艺学报, 1:(1)69(1983).
- [4] C. Sato, and K. Kojima, *Exp. Cell. Res.*, 69:435(1971).
- [5] C. Sato, and K. Kojima, *Radiat. Res.*, 60:506(1974).
- [6] C. Sato, K. Kojima, T. Matsuzawa, and Y. Hinuma, *Radiat. Res.*, 62:250(1975).
- [7] C. Sato, K. Kojima, and K. Nishizawa, *Radiat. Res.*, 69:367(1977).
- [8] C. Sato, K. Kojima, and T. Matsuzawa, *Int. J. Radiat. Biol.*, 20:97(1971).
- [9] C. Sato, K. Kojima, M. Onozawa, and T. Matsuzawa, *Int. J. Radiat. Biol.*, 22:479(1972).
- [10] C. Sato, K. Nishizawa, and K. Kojima, *Int. J. Radiat. Biol.*, 35:221(1979).
- [11] C. Sato, K. Kojima, K. Nishizawa, S. Shimizu, and M. Inone, *Biochem. Biophys. Acta.*, 448:379(1976).
- [12] D. M. Cersten, and H. B. Bosmann. *Exp. cell. Res.*, 96:215(1975).
- [13] N. D. Lalwani, K. A. Chaubal, *Int. J. Radiat. Biol.*, 37:337(1980).
- [14] H. Rink, and H. J. Meyer-Teschendorf, *Radiat., Res.*, 72:317(1977).
- [15] M. H. Repacholi, *Nature.*, 227:166(1970).
- [16] Ts. G. Vranska, T. P. Pantev, I. T. Nikolov, N. I. Ryzhov, V. I. Popov., *Int. J. Radiat. Biol.*, 40:455(1981).
- [17] 胡天喜, 陈松涛, 低剂量软 X 射线对人外周血淋巴细胞 DNA 合成能力的影响, 华东师范大学学报(自然科学报), 3:21(1981).
- [18] 梁子均, 施永德, 章谷生, 陈启光, 陈网华, 简便、微量的方形玻璃毛细管式细胞电泳装置, 生物化学与生物物理学报. 11(3):199(1979).
- [19] R. P. Virsik, D. Harder, I. Hansmann, *Rad. and Environm. Biophys.*, 14:109(1977).

(1984 年 8 月 30 日收到)

CHANGES OF CELL MEMBRANE CHARGE INDUCED BY MO TARGET SOFT X-RAY ON HUMAN ERYTHROCYTES

Hu Tianxi

(*Department of Biology, East China Normal University*)

ABSTRACT When human erythrocytes were irradiated in vitro with lower energy soft x-ray, their EPM dropped markedly. This is of similar effect as treated with hard x-ray. Within the range of 43.9–1754.0 rad, the drop of erythrocyte EPM varied in proportion to irradiation dosages. When erythrocytes underwent irradiation of 43.9 and 1052.4 rad, its EPM changed with the lapse of time. At 4 hrs after irradiation, the erythrocyte EPM dropped to its minimum, then gradually recovered. For samples irradiated with 43.9 rad, their EPM recovered to its original level 24 hrs later, but not for samples with 1052.4 rad irradiation.

When the erythrocytes were suspended in their own plasma, their EPM was lower than in normal saline, but when irradiated plasma was added (1:1) into saline suspension of normal erythrocytes, no EPM change was induced. However, when irradiated erythrocytes were suspended in normal saline, their EPM dropped markedly. Furthermore, the dropped EPM might be recovered if CDP-choline was added into irradiated erythrocyte suspension.

KEY WORDS Soft x-ray; Irradiated erythrocyte; Cell membrane charge; Electrophoretic mobility (EPM); Plasma; Cytidin diphosphate choline (CDP-c).