

γ 辐射对完整红细胞及红细胞膜的辐射损伤

程龙生 李翔* 王家珍 秦静芬

(中国科学院生物物理研究所 北京)

摘要 红细胞受 γ 射线照射后,需在37℃保温4小时和6小时,溶血程度随剂量增加而增加。照射 $2 \times 10^3 \text{Gy}$ 时溶血达94%,加 $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ PABGA到红细胞悬液中,可以防止溶血,说明溶血主要是OH自由基对膜作用而引起的。 γ 射线对完整红细胞和对红细胞膜的作用是有差别的。辐射能使红细胞膜形成交联,不能引起完整红细胞的膜形成交联,能使红细胞和红细胞膜类脂过氧化形成脂褐素。 γ 辐射对红细胞膜膜蛋白巯基的氧化和膜类脂过氧化作用要比对红细胞的作用为大。

关键词 γ 辐射;红细胞膜;溶血;脂褐素。

引言

关于电离辐射对细胞的作用,过去认为DNA是主要的靶,近20年来人们又强调细胞膜在辐射细胞中是重要的靶,特别在氧效应中占重要的位置。实验表明真核细胞核的核膜是辐射对真核细胞最敏感的部分,而在原核细胞中,细胞核的核膜也是辐射最敏感的地方,它的核膜有着类似如真核细胞的功能。因此辐射对生物膜的损伤引起了广泛的兴趣,做了不少的工作。发现辐射能引起生物膜上酶活性的降低、膜蛋白巯基和类脂过氧化等变化,这些变化能导致膜功能的丧失,最终引起细胞死亡。

辐射对红细胞膜的损伤已有报道^[1~4],但 γ 射线对完整红细胞的影响报道却不多。本文主要研究 γ 辐射对完整红细胞的损伤,选用数种化学修饰剂、自由基清除剂和抗氧化剂对辐射损伤进行研究。同时与辐射对红细胞膜的损伤作比较。

材料与方 法

1. 试剂

PABGA: N-(P-Aminobenzoyl)-L-Glutamic acid N-对氨基苯甲酰基-L-谷氨酸系美国Sigma公司产品。

NEM: N-Ethylmaleimide N-乙基顺丁烯二酰亚胺系Sigma公司产品。

PCMBs: P-Chloromercuriphenylsulfonic acid 对氯汞苯基磺酸系Sigma公司产品。

BHT: Butylated Hydroxytoluene 2,6-双-特丁基对甲苯酚系Sigma公司产品。

2. 红细胞膜的制备、膜蛋白含量和巯基的测定、类脂过氧化的测定,以及膜蛋白SDS凝胶电泳等测定均参照前文^[5]。

3. 红细胞溶血的测定

人红细胞购自血库,在4℃保存,每次实验时加等渗的磷酸缓冲液(pH 7.4),离心去掉白细

* 中国科技大学毕业生

胞和 Buffer Coat。洗净的红细胞用 PBS 溶液稀释, 在 540 nm 处测 O.D 值, 以此作为标准红细胞浓度。每次实验时将红细胞校准到此浓度, 取定量红细胞用 γ 射线照射不同剂量和温育不同时间后的样品先用 PBS 稀释一倍, 然后离心取上清液 1 ml 再加 PBS 一定量, 在 540 nm 处比色。对照组取相等量的红细胞, 用水稀释一定量作为 100 溶血。实验组样品与它比较则可算出溶血百分数, 即为溶血度。

4. 脂褐素(lipofuscin)的测定

经 γ 辐照的红细胞在 37℃ 保温 4 小时后, 用氯仿与甲醇的混合液(1:2)充分萃取, 然后取出脂溶部分, 在日立 850 型荧光分光光度计上测定荧光强度。激发波长为 360 nm, 发射波长为 420 nm 时, 如有荧光峰出现, 则表明有脂褐素生成。

5. 辐射条件

样品放置离 ^{60}Co γ 辐射源中心 30 cm 处, 剂量率为 52 Gy/min。

实 验 结 果

1. 照射后红细胞的溶血

红细胞经 γ 射线照射后, 溶血程度见图 1。可以看出照射后立即测溶血度, 溶血很少。在 37℃ 温育 4 小时和 6 小时后, 随 γ 辐照剂量的增加而溶血也增加, 表明 γ 辐射对红细胞膜的作用,

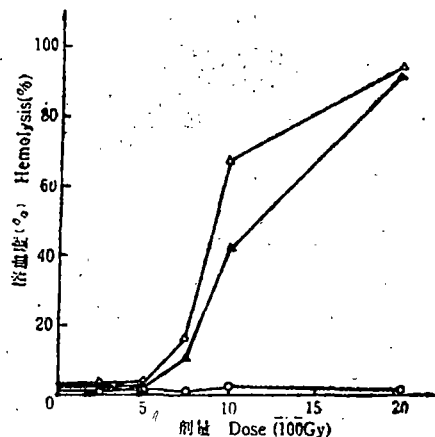


图 1 γ 辐照红细胞后溶血程度

○ 辐照后置 37℃ 温育 0 h
 ▲ 辐照后置 37℃ 温育 4 h
 △ 辐照后置 37℃ 温育 6 h
 Fig. 1 Hemolysis after irradiation with γ -ray

○ Irradiated red blood cells incubated for 0 h at 37℃
 ▲ Irradiated red blood cells incubated for 4 h at 37℃
 △ Irradiated red blood cells incubated for 6 h at 37℃

主要表现在辐射的后效应, 这意味着 γ 辐射对膜的损伤, 可能是间接的自由基链式反应的结果。此外从图 1 还可看出, γ 射线对红细胞溶血影响的阈值是在 $5 \sim 7.5 \times 10^2$ Gy 之间, 低于此值未发现红细胞溶血。

2. 自由基清除剂、抗氧化剂和巯基修饰剂对辐照红细胞溶血的影响

各种化学试剂加入后对红细胞溶血的影响见表 1。由表中可以看出, OH·清除剂 N-对氨基苯甲酰-L-谷氨酸(PABGA)对红细胞溶血有很好的保护作用, 浓度为 2.5 mmol/L 时, 虽照射 2×10^3 Gy 也能防止溶血。而甲酸钠浓度需在 0.5 mol/L 时才能有效地保护膜防止溶血。抗氧化剂 BHT 和 VitE 对膜无保护作用。巯基修饰剂 PCMBs 和 NEM 对膜也无保护作用。从以上的实验结果来看, 辐射引起红细胞溶血主要是 OH·的作用, 不是巯基氧化和膜类脂过氧化作用。

3. 膜蛋白巯基的变化

γ 射线照射红细胞不同剂量后, 在 37℃ 保温 4 小时, 然后制备红细胞膜, 并测定膜蛋白巯基含量的变化。受 2×10^3 Gy 照射后的红细胞, 巯基含量减少 32%, 加入 PABGA 对红细胞的膜蛋白巯基的辐射损伤无保护作用(图 2 A)。 γ 射线 2×10^3 Gy 照射红细胞膜, 膜蛋白巯基含量下降 44%(图 2 B), 比辐射对完整红细胞的影响要大些。

4. 膜类脂过氧化作用

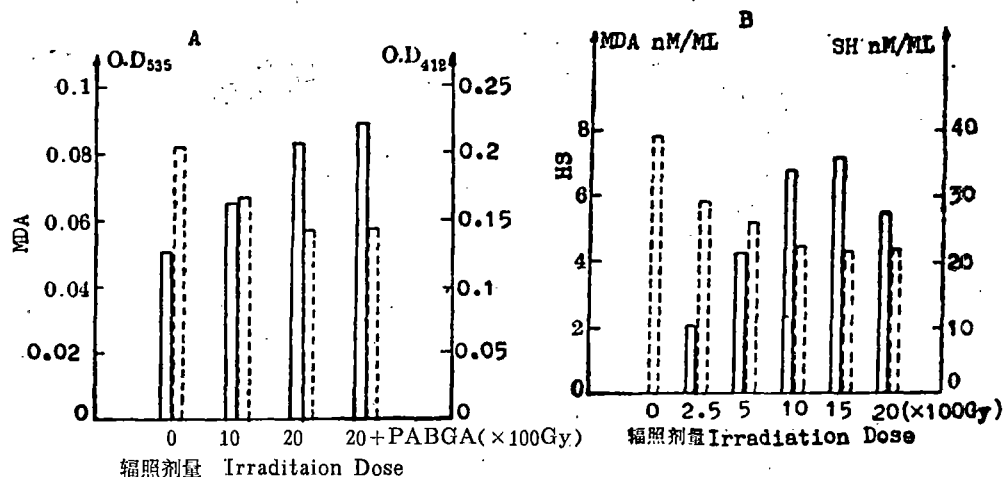
红细胞受照后, 在膜上没有检测到丙二醛, 但在红细胞悬液中却测到了丙二醛, 其含量随照射剂量的增加而增加, 剂量达 $2 \times 10^3 \text{Gy}$ 时, 丙二醛的量增加 40%, 加入 PABGA 对膜类脂过氧

表 1 化学修饰剂对 γ 辐照红细胞的影响Table 1. Effect of chemical modifier on γ -ray irradiated human erythrocytes

Modifier 修饰剂	Function 功能	Concentration 浓度	Time 时间	0 hour (时)	4 hours (时)	6 hours (时)
			Haemolysis (%)溶血度 剂量 Dose(Gy)			
Control 对照	Control 对照	0	0	0.7	1.4	0.9
			1×10^3	0.7	43.1	68.3
			2×10^3	1.5	92.9	94.1
PABGA N-对氨基苯甲酸 基-L-谷氨酸	Scavenging $\text{OH}\cdot$ 清除 $\text{OH}\cdot$	$2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	0	1.5	2.1	1.8
			1×10^3	2.1	2.4	3.0
			2×10^3	4.1	4.6	7.1
Sodium Formate 甲酸钠	Scavenging $\text{OH}\cdot$ 清除 $\text{OH}\cdot$	$5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	0	0.9	2.3	1.5
			1×10^3	0.4	3.2	8.1
			2×10^3	0.4	73.0	86.8
		$83.4 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	0	0.9	2.3	1.5
			1×10^3	6.1	6.5	8.5
			2×10^3	6.1	16.0	64.7
		0.5 mol/L	0	8.7	13.6	13.0
			1×10^3	7.5	13.1	18.0
			2×10^3	8.6	15.0	18.7
BHT 2,6-双- 特丁基对 甲 苯 酚	Antioxidation 抗氧化作用	$0.2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	0	8.0	19.7	33.5
			1×10^3	10.9	85.3	89.7
			2×10^3	14.9	85.2	87.1
		$1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	0	4.2	28.0	33.6
			1×10^3	4.5	93.4	94.3
Vt.E 维生素 E	Antioxidation 抗氧化作用	$0.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	2×10^3	5.3	81.5	88.0
			0	4.0	5.1	12.5
			1×10^3	4.4	34.4	73.4
			2×10^3	2.7	81.4	88.5

(续表)

Modifier 修饰剂	Function 功能	Concentration 浓度	Time 时间	Oshorr (时)	4 hours (时)	6 hours (时)
			Haemolysis% 溶血度 Dose(GY) 剂量			
NEM N-乙基 顺丁烯二 酰亚胺	Modifying-SH 修饰-SH	$0.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$	0	0.9	1.6	1.4
			1×10^3	0.9	82.1	88.2
			2×10^3	1.8	86.7	87.3
		$2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$	0	0.5	2.4	1.7
			1×10^3	1.0	76.0	79.6
			2×10^3	34.4	73.4	75.4
PCMBS 对氯汞苯基磺酸	Modifying-SH 修饰-SH	$0.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$	0	4.9	42.3	61.2
			1×10^3	2.8	88.4	92.1
			2×10^3	3.4	74.6	72.1

图2 γ 辐射引起完整红血细胞和红细胞膜巯基和类脂过氧化变化

A: 红细胞

□ O.D. 535 MDA

□ O.D. 412 SH

Fig. 2 γ -radiation induced change in SH groups and lipid peroxidation in intact red blood cells and erythrocyte membranes

A: Red blood cells

□ O.D. 535 MOA

□ O.D. 412 SH

B: 红细胞膜

□ MDA

□ SH

B: Erythrocyte membranes

□ MDA

□ SH

化没有抑制作用(图2A)。当红细胞膜受照, 剂量达 $1.5 \times 10^3 \text{ Gy}$ 时, 膜类脂过氧化最厉害, 丙二醛的量也随剂量增加而增加70%, 但剂量增至 $2 \times 10^3 \text{ Gy}$ 时, 丙二醛的量有些下降(图2B)。从辐射对膜类脂过氧化程度来看, 辐射对红细胞膜的影响比对红细胞影响为大。

5. 交联的生成

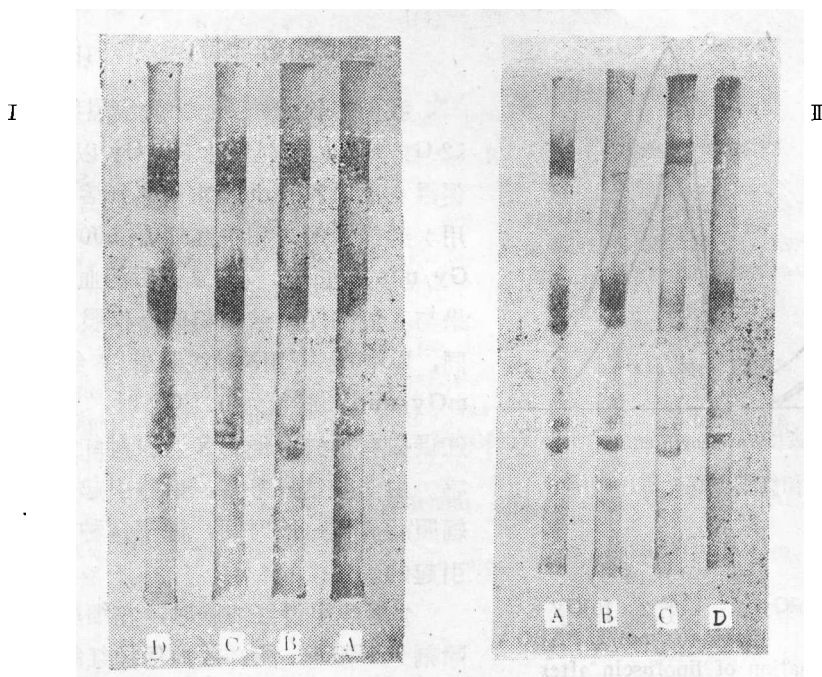


图3 完整红细胞和红细胞膜受照后膜蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

I: 红细胞

A: 对照

C: 照射 $2 \times 10^3 \text{Gy}$ + $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ PABGA

细胞照射 γ 射线不同剂量后, 在 37°C 保温 4 小时再进行电泳分析。所有样品均加 DTT。

Fig. 3 SDS polyacrylamide gel electrophorograms of membrane proteins of irradiated red blood cells and erythrocyte membranes

I: Red blood cells

A: Control

C: $2 \times 10^3 \text{Gy}$ + $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ PABGA

Cells were irradiated with different γ -ray doses and subsequently incubated for 4 h at 37°C . DTT was added to all the samples

II: 红细胞膜

B: 照射 10^3Gy

D: 照射 $2 \times 10^3 \text{Gy}$

II: Erythrocyte membranes

B: $1 \times 10^3 \text{Gy}$

D: $2 \times 10^3 \text{Gy}$

γ 射线照射红细胞后的膜蛋白 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 3 I, 未见膜蛋白发生变化。但红细胞膜受照后, 膜蛋白发生交联; 照射 10^3Gy 后, 交联生成较少, 膜蛋白的收缩蛋白(spectrin, 即条带 1 和 2)消失较快; 照射 $2 \times 10^3 \text{Gy}$ 后, 交联生成较多。如照射时膜中加入 PABGA, 能清除 $\text{OH}\cdot$ 对膜的作用, 膜收缩蛋白被保护, 免受 γ 辐射的影响, 但其他膜蛋白(条带 3 和 4)的含量有些减少, 交联仍然发生(见图 3 II)。这些结果表明: 膜收缩蛋白在辐照时主要受 $\text{OH}\cdot$ 的攻击, 也表明 γ 辐照引起的膜蛋白交联的一部分是来自收缩蛋白的辐射损伤, 另外还有其他膜蛋白受损而形成的。在电泳前所有膜样品均加 DTT 处理, 电泳后交联未见消失, 表明交联不完全是膜蛋白巯基氧化形成-S-S-的原因。

6. 脂褐素(lipofuscin)的生成

受照的红细胞和红细胞膜在 37°C 保温 4 小时后, 用甲醇与氯仿的混合液萃取, 取抽提液测荧光, 结果见图 4。发现红细胞和红细胞膜的抽提液在激发波长 360nm , 发射波长为 $415 \sim 420 \text{nm}$ 处有荧光峰, 表明有荧光物质即脂褐素生成。照射剂量为 $2 \times 10^3 \text{Gy}$ 时, 荧光强度最高, 如在红细胞悬液中加入 $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ PABGA 照射, 能有效地抑制脂褐素的生成。

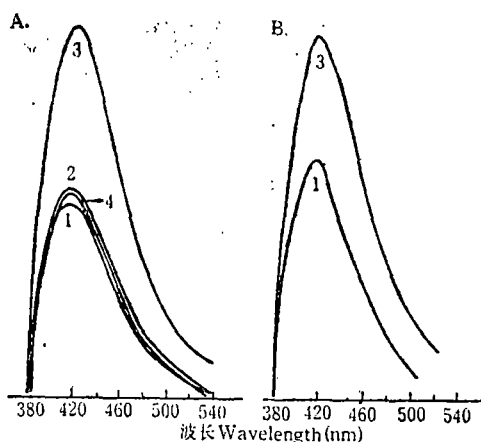


图4 红细胞和红细胞膜受照后脂褐素的生成

A: 红细胞 B: 红细胞膜
1: 对照 2: 照射 10^3 Gy
3: 照射 2×10^3 Gy 4: 照射 2×10^3 Gy +
 2.5×10^{-3} mol/L PABGA

Fig. 4 Formation of lipofuscin after irradiation of red blood cells and erythrocyte membranes

A: Red blood cells
B: Erythrocyte membranes
1: Control 2: 1×10^3 Gy 3: 2×10^3 Gy
4: 2×10^3 Gy + 2.5 mM PABGA

讨 论

我们实验的结果： γ 射线照射人红细胞剂量率为52 Gy/min，总剂量达500 Gy以上时，照后在37℃保温4小时和6小时才观察到溶血现象。Miller^[6]等用 γ 射线照射人和牛红细胞500 Gy，剂量率为136 Gy/min，在4℃放置4天后溶血可达90%多，这结果与我们的实验结果相似，仅照后放置时间和温度不同，Konings^[7]用X射线照射牛红细胞剂量率为1.3 mGy/min，剂量为0.1 Gy时，就发现牛红细胞中血红蛋白有损失，说明X射线对红细胞溶血较 γ 射线敏感。由实验结果来看，射线引起红细胞溶血均发生在辐照后放置一段时间，说明这种辐射效应是间接作用引起的。

γ 射线照射红细胞时，在细胞悬液中加入OH·清除剂PABGA，能有效地保护红细胞防止溶血，但加入巯基保护剂和抗氧化剂，在我们实验所用的试剂浓度不仅未看到对红细胞溶血的抑制作用，反而增加红细胞溶血。Miller等^[8]使用乙醇、乙二醇和二甲基亚砷能很好地抑制 γ 射线对牛红细胞的溶血，但二甲基亚砷不能抑制人红细胞的辐射溶血。这些药物主要清

除辐照过程所产生的OH·，因此认为 γ 射线引起红细胞的溶血是OH·的作用。OH·引起溶血的机理可能与光致溶血相同，是辐射作用于膜，引起膜的阳离子通透性增加，导致胶质渗透而溶血^[9]。

γ 辐射对红细胞及红细胞膜蛋白的辐射损伤是不同的， γ 辐照红细胞膜，膜的收缩蛋白对辐射是非常敏感的，在电泳图谱上很快消失，出现交联物。在膜液中加入OH·清除剂PABGA，则能有效地保护收缩蛋白，但在电泳图谱上仍出现交联物，用还原剂DTT（二硫苏糖醇）处理膜试样，交联不消失。说明交联的形成可能是，其他膜蛋白辐射氧化或膜类脂过氧化产生的丙二醛与蛋白质、类脂作用的结果。 γ 辐照完整红细胞则未见膜蛋白形成交联。而X射线对红细胞的辐射作用则不同，Schuurhuis^[9]等用X射线照射红细胞后，随保温时间的延长和照射剂量的增加，所形成的各种不同分子量的多聚物也随之增加，并证明多聚物的形成主要是SH基氧化成-S-S键，同时收缩蛋白不完全消失，这一点也不同于 γ 射线对红细胞膜的影响。

γ 射线照射完整红细胞和红细胞膜均能生成脂褐素，在激发波长360 nm，发射波长在415~420 nm处有荧光峰。Shimasaki^[10]等用脂质体作实验，所测得的脂褐素荧光峰发射波长为435 nm，可能是样品的差异，而发射波长稍有不同。脂褐素的生成可能是红细胞和红细胞膜，受 γ 辐照后引起不饱和脂肪酸过氧化产生丙二醛，丙二醛与含游离氨基的蛋白质、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸及核酸等形成Shiff碱，产生大分子交联物，此交联物具有特征的荧光峰，称为荧光色素，又称脂褐素。

参 考 文 献

- [1] J. C. Edwards, D. Chapman, W. A. Cramp, and M. B. Yatvin, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 43, 71~93 (1984).
- [2] S. C. Purohit, R. H. Bisby, and R. B. Cundall, *Int. J. Radiat. Biol.*, 38(2), 147~158 (1980).
- [3] S. C. Purohit, R. H. Bisby, and R. B. Cundall, *Int. J. Radiat. Biol.*, 38(2), 159~166 (1980).
- [4] J. Van der Zee, T. M. A. R. Dubbelman, and J. Van Steveninck, *Biochimica et Biophysica Acta*, 818, 38~44 (1985).
- [5] 程龙生, 王家珍, “实验生物学报”, 18(1), 89~97 (1985).
- [6] G. G. Miller, and J. A. Raleigh, *Int. J. Radiat. Biol.*, 43(4), 411~419 (1983).
- [7] A. W. T. Konings, *Int. J. Radiat. Biol.*, 40(4), 441~444 (1981).
- [8] T. M. A. R. Dubbelman, C. Haasnoot, and J. Van Steveninck, *Biochim. Biophys. Acta*, 601, 220~227 (1980).
- [9] G. J. Schuurhuis, J. Hommes, J. Vos, I. Molenaar, and A. W. T. Konings, *Int. J. Radiat. Biol.*, 45(2), 159~177 (1984).
- [10] H. Shimasaki, N. Ueta, H. O. Mowri, and K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, 792, 123~129 (1984).

(稿件收到日期: 1987 年 3 月 7 日)

γ -RADIATION INDUCED DAMAGE OF INTACT RED BLOOD CELLS AND ERYTHROCYTE MEMBRANES

Cheng Longsheng Li Xiang Wang Jiazhen Qin Jingfen

(*Institute of Biophysics, Academia Sinica*)

ABSTRACT When intact red blood cells were irradiated with γ -ray and subsequently incubated for 4 and 6 h at 37°C, an increase in radiation haemolysis was observed with increasing dose. Irradiation, especially at 2×10^3 Gy, resulted in a 94.1% haemolysis. When 2.5×10^{-3} mol/L PABGA was added to the irradiated samples, haemolysis was inhibited. It indicated that haemolysis was mainly due to the effect of OH· radicals on erythrocyte membrane. The γ -irradiation effect of intact blood cells and erythrocyte membrane was different. γ -irradiation can induce formation of protein cross-linking of erythrocyte membrane, but not the cross-linking of the red blood cell membranes. Formation of lipofuscin after irradiation was observed in the erythrocyte membrane and red blood cells. In the case of erythrocyte membrane there was a greater change in protein SH groups and lipid peroxidation than in the case of intact red blood cells.

KEY WORDS γ -irradiation; Erythrocyte membrane; Haemolysis; Lipofuscin.