

用自旋标记技术观察离体与整体照射对大鼠红细胞膜巯基状态的影响

康 鑫 方允中 忻文娟* 孙存普

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 用 MAL-6(2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-maleimide-piperidin-1-oxyl)作为自旋标记物研究了电离辐射对大鼠红细胞膜蛋白的影响。本文探索到:(1) 100—400 Gy 离体照射对红细胞膜中自旋标记巯基显示的 ESR 波谱无明显影响。(2) 8.5 Gy 全身照射可使红细胞膜的 ESR 波谱中弱固定化与强固定化波峰高度之比(W/S)增加。上述结果表明了动物体或红细胞中内源性活性氧产生与清除的不平衡导致活性氧的损伤作用。

关键词 自旋标记, 膜蛋白巯基, 离体照射, 整体照射

自旋标记是将理化性质已十分清楚的顺磁体作为标记物嵌到或连接到生物大分子的某基团上,然后通过电子自旋共振(ESR)参数的变化,可以探测到生物大分子的空间构象变化。采用自旋标记技术,可应用于研究电离辐射对红细胞膜巯基状态的影响^[1],如将马来亚酰胺氮氧自由基与膜蛋白的巯基结合, Grezelinska 等^[2]曾观察到 10^3 — 10^4 Gy 照射后自旋标记红细胞膜 ESR 波谱中弱固定化波峰高度(W)与强固定波峰高度(S)之比(W/S)随着照射剂量增高而增加,但小于 10^3 Gy 照射后 W/S 是否会有类似变化以及致死剂量全身照射后 W/S 的变化,尚未见报道,为此,我们用自旋标记技术观察了离体照射与整体照射对大鼠红细胞膜巯基状态的影响。

材 料 与 方 法

1. 实验动物,照射条件与生化试剂

实验动物为体重 250 ± 20 g 的雄性 Wister 大鼠。

离体照射大鼠红细胞或红细胞膜时,用 ^{60}Co γ 射线,分别照射 0、100、200 或 400 Gy,剂量率为 4812 Gy/min。全身照射大鼠时,一次剂量为 8.5 Gy,剂量率为 140.8 Gy/min。

自旋标记试剂为 MAL-6(2, 2, 6, 6-tetra-methyl-4-maleimide-piperidine-1-oxyl),购自 Aldrich 公司。

2. 离体与全身照射后样品的检测

(1) 样品来源及处理 离体照射时,从 Wister 大鼠的眼眶取血,肝素抗凝,离心,取出红细胞。红细胞数为 1×10^9 个/ml,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释 100 倍,配成悬液,置于 5 ml 离心管内,照射后在 37℃ 水浴中 1 h。或者将提取的红细胞膜均分成四等分,分别照射不同剂量,照射后在 37℃ 水浴中 30 min。整体实验时样品来源为经全身照射大鼠的眼眶血。除不再照射外,处理方法与离体实验相同,而且所有样品自旋标记和 ESR 信号检测手续也一致。

* 中国科学院生物物理研究所

(2) 红细胞膜的提取 按照 Dodge 等^[3]方法提取红细胞膜, 但稍改动。以 3000 rpm/min 将全血离心 5 min, 弃去上清液, 用 pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤红细胞两次。按 1:20 的比例, 加入冰冻的含有 1 mmol/L EDTA 的 pH 7.4 的 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 搅拌 5 min。放置 30 min, 使成溶血液。以 15000 rpm/min 离心 40 min, 弃去上清液, 将沉淀用 0.05 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗 3—4 次, 或洗至沉淀显白色, 再用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 1—2 次, 在 4℃ 放置, 但放置时间不超过两天。红细胞膜蛋白含量是以牛血清白蛋白作为标准, 用 Lowry 法^[4]测定。

(3) MAL-6 标记红细胞膜 将 MAL-6 用无水乙醇溶解, 加入 pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 使 MAL-6 的浓度为 1×10^{-3} mol/L, 乙醇浓度不超过 0.5% (v/v)。MAL-6 标记完整红细胞膜时 MAL-6 加入到照射后的红细胞悬液中, 使其浓度为 1.5×10^{-4} mol/L, 振荡后, 置 37℃ 保温 2 h, 然后将被标记的红细胞洗涤 4 次。MAL-6 标记提取的红细胞膜时, MAL-6 加入到 3 mg/ml 的膜悬液中, 使其最终浓度为 10^{-4} mol/L, 搅拌 3 min, 4℃ 过夜。次日用 pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 3—4 次, 直至上清液不出现游离的自旋标记物信号为止, 表示实验中所测量到的 ESR 波谱信号确系来自红细胞膜的自旋标记物。所有样品均用无 ESR 信号的、内径约 0.5 mm 石英毛细管封装, 外加石英套管, 放入 ESR 波谱仪的谐振腔中, 于 20~25℃ 进行检测。

(4) ESR 波谱及测定条件^[5] 使用 Bruker ESP-350 ESR 波谱仪测定。条件为: 中心磁场 0.35 T, 扫描宽度 100.0 G, 调制频率 100 MHz, 调制幅度 2 G, 增益 2.002, 时间常数 81.92 ms, 功率 10 mW, 频率 9.767。

结果和讨论

MAL-6 能特异地与膜蛋白巯基结合^[6]。忻文娟等^[7]将羊红细胞预先用 10^{-3} mol/L HgCl_2 处理封闭膜上的巯基, 再进行自旋标记所得的 ESR 波谱, 其信号强度显著下降, 也证明了马来酰



Fig 1. ESR spectrum of 10^{-4} mol/L MAL-6 solution
Room temperature



Fig 2. ESR spectrum of MAL-6 spin label membrane of normal rat erythrocyte

亚胺氮氧自由基主要结合到膜上巯基。从 MAL-6 水溶液得到等强度、等距离的三峰谱线的 ESR 波谱(见图 1)。

MAL-6 与正常大鼠红细胞膜结合后的 ESR 波谱(见图 2), 其三条等距离的谱线的裂距和线宽逐渐增加, 是弱、强固定化成分的叠加。弱固定化和强固定化的两种波谱对应着巯基的两种不同位置。弱固定化(W)表示马来酰亚胺氮氧自由基与处于表面结构的巯基形成特异结合, 具有较大

的自由度。强固定化(S)表示马来酰亚胺氮氧自由基与处于内部结构的巯基形成特异结合,其运动受到限制,通过测定 ESR 波谱的弱、强固定化波峰高度之比(W/S),以表征膜蛋白巯基结合的性质^[8]。

自旋标记方法十分灵敏,因此,比较不同样品的 W/S 值,样品的环境(如 pH、温度、离子强度等),标记物的浓度,标记时间及 ESR 测定参数都必须严格控制^[5,9,10]。

1. 离体照射对红细胞膜巯基的影响

照射 200 Gy 和正常红细胞的 W/S 值,其平均值±标准误分别为: 3.603 ± 0.338 与 3.05 ± 0.198 。照射 400 和 800 Gy 的红细胞出现明显的溶血现象。因此,我们在另一实验中,将红细胞膜提取出来,分别照射 0、100、200 和 400 Gy 来观察离体照射对红细胞膜巯基的影响。表 1 是经不同照射剂量照射后红细胞膜巯基自旋标记后的 ESR 波谱的 W/S 值的变化,但从表中看出, W/S 值随着照射剂量的增加并无增高的倾向, W/S 没有明显的改变。刘智峰与方允中^[11]离体照射卵磷脂脂质体,也观察到 100—400 Gy 未引发明显脂质过氧化,但 1,000 Gy 照射后脂质过氧化值异常增加。Grezelinska 等^[11]用 10^3 — 10^4 Gy 照射牛红细胞膜后,自旋标记膜 SH 的 ESR 波谱中的 W/S 值增高, W/S 值变化明显。我们认为,100—400 Gy 照射所产生的氧自由基可能不易使红细胞膜发生明显脂质过氧化,从而也不易导致膜蛋白巯基状况变化。

Tab 1. Effect of irradiation on W/S of MAL-6 spin label membrane of rat erythrocyte

Irradiation dose(Gy)	W/S
0	3.11 ± 0.113
100	2.53 ± 0.277
200	2.45 ± 0.121
400	2.36 ± 0.246

Estimated values; mean±SE n=3

2. 全身照射对红细胞膜巯基的影响

全身照射大鼠 8.5 Gy 后第 1、3 和 5 d 分别取血,提取红细胞膜,用 MAL-6 标记,测定 ESR 信号。表 2 为全身照射后不同时间红细胞膜 W/S 值的变化。照射后第 1 d 的 W/S 值与正常组比较,相差不显著,但第 3 d 和第 5 d 的 W/S 值较正常组显著增加。

Tab 2. W/S of MAL-6 spin label membrane of rat erythrocyte at different intervals after whole-body irradiation

Post-irradiation(days)	w/s
0	$4.57 \pm 0.302(6)$
1	$4.44 \pm 0.205(4)$
3	$5.60 \pm 0.358^*(5)$
5	$5.84 \pm 0.277^*(5)$

Estimated values; mean±SE (); animals number

* Compared with control, $p < 0.05$

从整体实验结果来看,随着照射时间的延长, W/S 升高,说明致死剂量照射的效应已相当于比它高百倍以上的离体照射剂量的效应。在整体照射对小鼠组织脂质过氧化影响研究中,方允中与刘智峰^[12]也得到类似结果。W/S 增高反映照射使膜结构发生了改变,膜蛋白的三级结构趋于松散,使 MAL-6 更易于与内部巯基结合,因而呈现出一部分弱固定化组分的波谱。照射的瞬间

产生的活性氧对膜蛋白虽有损伤作用,但照射后膜蛋白的继续损伤在很大程度上来自内源性活性氧。虽然照射后活性氧产生是否增加尚无直接证据,但根据全身照射后红细胞膜脂质过氧化增加的实验结果^[13],氧自由基引发的脂质过氧化过程中 $\text{LO}^\bullet$ 、 $\text{LO}_2^\bullet$ 及 LOOH 一定增加,其中 $\text{LO}^\bullet$ 有较强的损伤作用^[14],而一些重要的氧自由基清除剂如维生素 $\text{E}^{[15]}$,超氧化物歧化酶^[15]等在全身照射下清除能力下降,照射后活性氧的产生和清除的不平衡会导致氧自由基对膜蛋白和其它生物大分子的损伤^[14],我们拟进一步研究其机制。

参 考 文 献

- [1] O. H. Griffith, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 55, 8(1966).
- [2] E. Grzelinska, G. Bartosz, K. Gwozdzinski and W. Leykc, Int. J. Radiat. Biol., 36(4), 325(1979).
- [3] J. T. Dodge, C. Mitchell and D. J. Hanahan, Arch. Biochem. Biophys., 100, 199 (1963).
- [4] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265(1951).
- [5] H. M. Hornblow, R. Laverty, B. J. Logan and P. M. Peake, J. Pharmae. Methods., 14, 229 (1985).
- [6] H. E. Sandberg, R. G. Pryant and L. H. Piette, Arch. Biocnem. Biophys., 133, 144(1969).
- [7] 忻文娟, 赵保路, 张建中, 科学通报, 2, 142(1985).
- [8] 忻文娟, 赵保路, 张建中, 中国科学, 5, 429 (1984).
- [9] D. M. Ziegler, Annu. Rev. Biochem., 54, 305 (1985).
- [10] L. W-M. Fung and A. S. Ostrowski, Am. J. Hum. Genet., 34, 469(1982).
- [11] 刘智峰, 方允中, 军事医学科学院院刊, 11(1), 1 (1987).
- [12] 方允中, 刘智峰, 军事医学科学院院刊, 11(4), 246(1987).
- [13] 康 鑫, 方允中, 陈吉中, 辐射研究与辐射工艺学报, 7(3), 60(1989).
- [14] 方允中, 生物物理学报, 3(4), 424(1987).
- [15] 陈 缓, 周 玫, 辐射研究与辐射工艺学报, 3(2), 33(1985).
- [16] 方允中, 刘智峰, 李益新, 科学通报, 15, 943 (1984).

(稿件收到日期:1989年1月9日)

OBSERVATIONS ON THE EFFECTS OF IRRADIATION IN VITRO AND IN VIVO ON THE SH-GROUP OF RAT ERYTHROCYTE MEMBRANE BY SPIN LABEL TECHNIC

Kang Xin, Fang Yunzhong, Xin Wenjuan* and Sun Chungpu
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences)

ABSTRACT MAL-6(2, 2,6,6,-tetra-methyl-4-malaimide-piperidin-1-oxyl) was used as spin label in studying the effects of ionizing radiation on rat erythrocyte membrane protein. By this approach, It was found out: (1). 100-400 Gy irradiation in vitro gave no obvious effects on ESR spectra revealed by spin label-SH group in the erythrocyte membrane. (2). Whole-body irradiation with 8.5 Gy caused increase of w/s ratio for the erythrocyte membrane.

It was suggested that the above-mentioned results might be attributed to the damage action of the endogeneous active oxygen species produced from imbalance between their generation and scavenging in erythrocyte or living body.

KEY WORDS Spin label, SH group of membrane protein,
Irradiation in vitro and in vivo

*Institute of Biophysics, Academia Sinica