

用荧光探针法观察离体与整体照射 对大鼠红细胞膜流动性的影响

康 鑫 方允中

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 ANS(1-苯胺-8-萘磺酸)和DPH(1,6-二苯基-1,3,5-己三烯)作为探针,用于检测 γ 射线对大鼠红细胞膜的作用。离体照射大鼠红细胞膜,随着剂量的增加(10—40 Gy),ANS结合红细胞膜的荧光强度降低。用DPH作为荧光探针,在整体实验中也得到了同样的结果,全身照射8.5 Gy之后的第1、3和5 d,DPH结合大鼠红细胞膜的荧光强度下降,荧光偏振度增加。这些结果反映了照射使膜的流动性降低,可能是由于 γ 射线离体与整体照射诱导的膜不饱和脂肪酸的脂质过氧化及膜蛋白构象改变引起的。

关键词 荧光探针,红细胞膜流动性, γ -射线,离体照射,整体照射

用荧光探针法研究离体照射红细胞膜结构的改变,已有较多的研究,但对整体照射后膜结构的变化,尚未见报道。我们用ANS(1-苯胺-8-萘磺酸)与DPH(1,6-二苯基-1,3,5-己三烯)两种荧光探针分别观察离体与整体照射对大鼠红细胞膜流动性的影响,均得到膜结构改变的实验依据。

材 料 与 方 法

1. 实验动物与照射条件

选择健康的雄性Wister大鼠,体重为 250 ± 20 g。

(1) 离体照射:从大鼠体内取出血液,用肝素抗凝,分离出红细胞膜。分成四等份,分别用 ^{60}Co γ 射线照射0、10、20和40 Gy,剂量率为48.12 Gy/min。

(2) 整体照射:将大鼠全身照射8.5 Gy,剂量率为1.408 Gy/min。照射后第1、3和5 d取出血液,分离红细胞膜。

2. 红细胞提取

按照Dodge等^[1]方法,稍加改动。以3000 r.p.m将抗凝血离心5 min,用0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤红细胞2次。按照红细胞体积以1:20比例加入冰冷的、含有1 mmol/L EDTA的5 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4),使红细胞溶破,搅拌5 min,放置30 min,以1500 r.p.m离心40 min。用0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)将沉淀洗3—4次,或洗至沉淀显白色,4℃下放置待用,但不得超过3 d。红细胞膜蛋白含量系以牛血清白蛋白作为标准,用改良Lowry法^[2]测定。

3. 荧光探针标记及其测定方法

用ANS标记时,可将ANS溶解于0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,并加入到细胞膜悬液,使ANS最终浓度为20 $\mu\text{mol/L}$,膜蛋白浓度为0.3 mg/ml。用DPH标记时,可将DPH溶

解于四氢呋喃，成为 2 mmol/L，然后用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释成为 2×10^{-3} mol/L。从中取出 0.5 ml 加入到 0.3 mg/ml 的红细胞膜悬液，其最终浓度为 1×10^{-6} mol/L。

将 ANS 及 DPH 标记液分别放置 20 min 及 1 h 后测定荧光强度。用 MPF-4 型荧光分光光度计，在 15—25℃ 下进行荧光强度测定。采用 ANS 作用荧光探针时，发射波长为 468 nm，激发波长为 285 nm 或 380 nm，但用 DPH 作为探针时发射波长为 428 nm，激发波长为 378 nm。荧光偏振度的测定方法详见程龙生等^[3]报道，按以下公式求出校正因子 G、荧光偏振度 P 及各向异性 r。膜中微粘度按 Perrin 公式^[4]计算。

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}, \quad P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}, \quad r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} = \frac{2P}{3 - P},$$
$$\bar{\eta}(\text{微粘度}) = \frac{2P}{0.42 - 0.92P}$$

结 果

1. ANS 结合红细胞膜的荧光光谱

图 1 是 ANS 与红细胞膜结合后的荧光光谱，激发波谱在 220、285 和 380 nm 处各有一峰值，发射波谱在 468 nm 处有一峰值，测定时取 285 nm 和 380 nm 的激发波长，于发射波长 468 nm 处测定荧光强度。

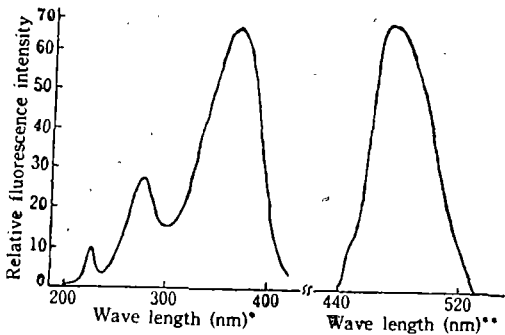


Fig 1 Fluorescence spectrum of erythrocyte membrane of associated ANS
(• Excitation spectrum,
•• Emission spectrum)

2. 离体照射对 ANS 结合红细胞膜荧光强度的影响

ANS 与红细胞膜结合后发出很强的荧光，照射后由于膜结构发生改变，结合能力相应减弱致使荧光强度下降(表 1)，但用 λ_{EX} 为 285 nm 时荧光强度下降程度较 380 nm 处更大，这与唐仲雄等^[5]用狗红细胞膜照射后，与 ANS 结合而测定其荧光强度的变化相一致。

3. 整体照射对 DPH 结合红细胞膜荧光强度与荧光偏振度的影响

ANS 是两性分子，能与膜脂端的极性头部结合，用于探测膜-水介面变化。DPH 是疏水性

Tab 1. Effect of dose on erythrocyte membrane-associated ANS

Irradiation dose (Gy)	Relative fluorescence intensity	
	285 nm *	380 nm *
0	42.40 ± 3.22	85.13 ± 10.92
10	33.57 ± 2.06*	76.00 ± 6.32
20	29.43 ± 5.15*	70.30 ± 13.07
40	26.45 ± 2.72**	66.27 ± 6.86*

Estimated values = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)
*Excitation wavelength, •P<0.05, ••P<0.01

Tab 2. Effect of whole-body irradiation on erythrocyte membrane-associated DPH

Post-irradiation (d)	Relative fluorescence intensity
0	54.54 ± 4.04
1	34.39 ± 1.69**
3	43.06 ± 2.74**
5	36.04 ± 2.53**

dose 8.5 Gy, Estimated values, $\bar{x} \pm SD$ (n = 8)
•• Compared with control (post-irradiation 0 day), P<0.01

能结合到膜脂碳氢区, 用于观察膜脂的变化。已知离体照射对 ANS 或 DPH 结合红细胞膜荧光强度均有降低的效应, 但在整体照射实验中膜脂易发生过氧化, 遂采用 DPH 作为探针观察红细胞膜荧光强度与荧光偏振度的影响。测定中根据 DPH 与红细胞膜结合的荧光光谱, 用 378 nm 作为激发波长, 并用 428 nm 作为发射波长。

(1) DPH 结合红细胞膜的荧光强度变化 表 2 显示, 照射后第 1、3 和 5 d, 红细胞膜荧光强度下降, 第 3 d 虽略有回升, 但仍低于照射前水平, 其中照射后第 1 d 荧光强度下降得最为明显, 而且照射后第 1、3 和 5 d 的荧光强度与正常值相比较, 差别都非常显著。

(2) DPH 结合红细胞膜的荧光偏振度的变化 照射后第 1、3 和 5 d, DPH 与红细胞膜结合的荧光偏振度(P)、各向异性 r 因子与微粘度($\bar{\eta}$)增加, 表明膜脂的流动性减少。

Tab 3. The changes of P, γ , $\bar{\eta}$ of erythrocyte membrane labelled with DPH in rats at different days after post-irradiation (8.5 Gy)

Post-irradiation(d)	P	γ	$\bar{\eta}$
0	0.315±0.006	0.234±0.001	4.829±0.029
1	0.377±0.024**	0.287±0.007**	10.228±0.246**
3	0.387±0.005**	0.295±0.002**	12.101±0.061**
5	0.367±0.016**	0.275±0.004**	8.912±0.143**

Estimated values of $P = \bar{x} \pm SD (n=8)$

** Compared with control (post-irradiation 0 day), $P < 0.01$

讨 论

ANS 和 DPH 作为探针, 已广泛用于生物膜结构的研究, 因为探针分子的荧光对膜中的微环境高度敏感, 故可用于检测膜结构的微小变化。离体照射时所产生的活性氧可影响膜中微环境, 但较大剂量照射才能使红细胞膜发生明显的脂质过氧化。程龙生等^[3]曾在离体照射实验中观察到 ANS 标记红细胞膜的荧光强度的影响远高于 DPH 标记, 我们在探索性实验中也得到类似结果。

整体照射后, 不仅瞬产生活性氧会影响红细胞膜中微环境, 而且在照后不同时间, 由于内源性活性氧的产生和清除失去平衡, 活性氧可引发膜脂质过氧化^[6]。在整体照射实验中, 首次采用 DPH 作为膜荧光探针, 显示该技术的独特性及优越性。在另外实验中, 也曾观察到红细胞膜的脂质过氧化变化^[7], 其结局是不饱和脂肪酸发生过氧化后, 不饱和键减少。由于饱和脂肪酸的凝固点高于不饱和脂肪酸, 预料凝固点会升高, 膜的流动性应变小^[8]。整体照射后第 1、3 和 5 d, 大鼠红细胞膜不仅显示标记 DPH 的荧光强度减少, 而且从 P、 r 与 $\bar{\eta}$ 的增加反映膜流动性确实变低。据此认为红细胞膜正常功能受到了影响。活性氧以及脂质过氧化产物如 $LO^{\cdot}$ 、 LO_2 还可引起膜蛋白-SH 氧化, 使蛋白构象发生变化, 更使膜的结构出现更明显的改变。离体照射时红细胞膜的损伤主要是瞬产生活性氧对膜分子的攻击, 而整体照射后不同时间内红细胞膜的损伤可能是内源性活性氧产生与清除的不平衡所致。循此途径深入研究, 可能会进一步阐明辐射损伤与自由基的关系, 亦可促进自由基辐射生化研究的进展。

参 考 文 献

- [1] J. T. Dodge, C. Mitchell and D. J. Hanahan, Arch. Biochem. Biophys., 100, 199(1963).
- [2] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265(1951).

- [3] 程龙生, 王家珍, 秦静芳, 唐祥, 乌恩, 实验生物学报, 16, 409(1983)。
[4] 林克椿, 聂松青, 薄惠卿, 齐玉兰, 生物化学与生物物理进展, 6, 32(1981)。
[5] 唐仲雄, 刘福, 张卿西, 辐射研究与辐射工艺学报, 2, 21(1984)。
[6] 方允中, 生物物理学报, 3, 424(1987)。
[7] 康鑫, 方允中, 陈吉中, 辐射研究与辐射工艺学报, 7(4), 60(1989)。
[8] 中华医学杂志编辑委员会, 中华医学杂志, 67, 641(1987)。

(稿件收到日期: 1989年3月20日)

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON ERYTHROCYTE MEMBRANE IN RATS BY FLUORESCENT PROBES IN VITRO AND IN VIVO

Kang Xin and Fang Yunzhong

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science)

ABSTRACT Fluorescent dyes, 1-anilino-naphthalene sulfonate (ANS) and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), were used as probes to examine the effect of γ -irradiation on the rat erythrocyte membrane.

After irradiation of rat erythrocyte membrane in vitro, the fluorescence intensity of membrane-associated ANS decreased with the increase of irradiation dose (10-40 Gy).

Similar results were also observed in the experiment of irradiation in vivo as showed by the decrease of fluorescence intensity of DPH probe in the erythrocyte membrane as well as the increase of its polarization on the 1st, 3rd, 5th day following whole body irradiation with 8.5 Gy.

Those results reflected the decrease of membrane fluidity which was suggested to be resulted from lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acid in membrane induced by γ -irradiation in vitro and in vivo.

KEY WORDS Fluorescent probe, Erythrocyte membrane, γ -ray, Irradiation in vitro, Irradiation in vivo