

用荧光偏振法研究人胚肺二倍体成纤维细胞膜脂流动性

姜招峰

杨世杰 周翔

(齐齐哈尔医学院生化教研室) (白求恩医科大学生生化教研室, 长春)

关键词 人胚肺二倍体成纤维细胞, 荧光偏振, 膜脂流动性, 荧光探针

细胞膜的正常功能有赖于膜结构的完整和膜脂的恒定流动^[1], 细胞膜脂流动性是细胞膜的主要动力学特性。许多资料说明, 膜的这种特性与细胞发育、分化增殖、免疫反应和信息传递等生物学基本功能密切相关^[2,3]。可以用差示扫描量热法 (DSC)、X 射线衍射、电子自旋共振 (ESR)、核磁共振 (NMR) 及荧光偏振法等从不同角度对膜流动性进行研究^[3,4]。其中荧光偏振法比较简便, 理论解释比较容易, 荧光偏振度参数能定量地说明膜脂分子的运动情况或其微粘度。用于研究膜脂流动性的荧光探针有多种^[4,5], 其中 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯 (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH) 被认为是一种比较敏感的常用探针。通过荧光偏振度的测定, 计算其微粘度及流动性。本文以人胚肺二倍体成纤维细胞为实验对象, 探讨了荧光偏振法用于测定此类细胞的实验条件。

一、材料与方法

1.1 人胚肺二倍体成纤维细胞 常规培养传代细胞, 36 代 (20 万个/ml) 及 46 代 (20 万个/ml) 两组。生理盐水洗涤一次, 1000r/min 离心 10min, 再用 PBS 溶液洗涤一次, 最终细胞浓度为 200 万个/ml。

1.2 DPH 的配制^[2,4] DPH (Fluka 产品) 使用前先以四氢呋喃作溶剂配成浓度为 2×10^{-3} mol/L 的储备液, 低温保存在棕色瓶中可使用一个月。实验需要的 DPH 溶液, 于使用前新鲜配制, 用 PBS 稀释上述储备液, 使 DPH 浓度为 2×10^{-6} mol/L。因四氢呋喃为有机溶剂, 配制 2×10^{-6} mol/L DPH 溶液时, 需剧烈振摇 10 分钟。

用 DPH 标记细胞, 取已准备好的细胞 1ml, 离心, 用 PBS 洗涤一次, 离心, 加入 $1\text{ml } 2 \times 10^{-6}$ mol/L DPH, 25℃ 温育 30min, 再用 PBS 洗涤一次, 最后悬浮在 2ml PBS 溶液中, 作出 DPH 标记的人胚肺二倍体成纤维细胞的激发光谱与荧光光谱。

1.3 荧光偏振度的测量 仪器为 MPF-66 荧光分光光度计。光源为 150W 氙灯, 激发波长 365nm, 发射波长 436nm。按下列公式计算荧光偏振度 (P)

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

式中 I_{VV} : 起偏器光轴为垂直方向, 检偏器光轴也为垂直方向时所测得的荧光强度。 I_{VH} : 起偏器光轴为垂直方向, 检偏器光轴为水平方向时的荧光强度。 G 为校正因子。 $G = I_{HV}/I_{HH}$, 其中 I_{HV} 为起偏器光轴是水平方向, 检偏器光轴为垂直方向的荧光强度, I_{HH} 为起偏器光轴是水平方向, 检偏器光轴也为水平方向时的荧光强度。求得 P 值后可用 Perrin 公式计算微粘度 (η), 用 Einstein 硬粒子溶液粘度公式计算脂质流动性 (Lipid fluidity, LFU)

$$= \frac{2P}{0.46 - P};$$

$$LFU = \frac{\frac{P_{\max}}{P} - 1}{P}$$

$P_{\max}$ 为极限 P 值, 当 $P = 0$ 时, LFO 为 ∞ , $P = P_{\max} = 0.5$ 时, LFO 为 0, 即理论上荧光偏振度 P 的上限值为 0.5, 下限值为 0。

DPH 掺入到细胞膜的烃链区^[4]以后, 介质粘度变大, 顺反异构化受到抑制, 成为全反构型即唯一能发荧光的构型。由于 DPH 分子长轴接近于和脂肪链分子长轴平行, 所以荧光偏振度能很好地反映脂膜区域的微粘度。 P 值越大, 微粘度越大, 流动性越小; P 值越小, 微粘度越小, 流动性越大。

二、结果和讨论

2×10^{-6} mol/L DPH 溶液的激发光谱与荧光光谱 (图略), 激发峰位于 384nm, 峰值 8.202; 荧光峰位于 440nm, 峰值 0.619。二者波形, 峰位与 Sigma 产品 (DPH) 略有差异, 可能是本实验所用 Fluka 产品 (DPH) 中杂质部分 (1%) 所致。

人胚肺二倍体成纤维细胞悬浮在 PBS 溶液中, 36 代组在 384nm 处没有激发峰位, 在 440nm 处也没有荧光峰位; 46 代组在 384nm 处激发峰位不明显, 而在 440nm 处出现一个小峰, 重复性好, 峰值不大。

(下转第 218 页)

0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 充分混匀, 供作空白测定, 称为 B 液。将 A 液与等量的酪氨酸 (0.05mmol/L) 和等量的多巴 (0.05mmol/L) 充分混匀, 供作酶活性测定, 称为 E 液。

将样品 10 μ l 与 15 μ l E 液充分混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1h 后, 取出 20 μ l 加入 0.98ml 含 0.1g Celite 545 和 0.1g Norit A 的 5% (W/V) 三氯乙酸中, 于室温下震荡 2h, 8800g 离心 10min, 取 0.4ml 上清液再离心一次, 最后取 0.2ml 上清液加进 10ml 水溶胶 (Aquasol) 中进行放射性测量, 以其每分钟的计数值作为“酶样品 dpm”。另外, 再取 20 μ l 反应混合物加入 0.98ml 不含 Celite 545 和 Norit A 的 5% 三氯乙酸中, 进行同样的操作, 以其每分钟的计数值作为“总的 dpm”。

为了得到空白的计数值, 还须用不加酶样品而代之以 10 μ l 1mol/L 磷酸缓冲液与 15 μ l B 液进行与上述步骤相同的操作, 所得的总计数与本底计数之差即为“空白 dpm”。

酶活性的计算, 以在实验条件下每 min 代谢 1 μ mol/L 酪氨酸所需的酶量作为该酶的一个活性单位。

酪氨酸酶活性 (U)

$$= \frac{\text{总的酪氨酸 } (\mu\text{mole}) \times 2}{60 \text{ 分(时间)}}$$

$$\times \frac{\text{酶样品 dpm} - \text{空白 dpm}}{\text{总的 dpm} - \text{空白 dpm}}$$

(2) 多巴染色

将各个含酶样品通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (浓缩胶 5%, 分离胶 10%) 进行分离。待染料到达电泳胶的前沿时, 取出凝胶先浸入 0.4 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 中, 摇动两次, 每次约 5min。再用 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 重复此项操作。之后, 将凝胶浸入多巴液 (每 ml 0.1mol/L、pH6.8 的磷酸缓冲液中含 2mg 多巴) 染色, 在室温下温和震荡 14h 左右, 便可见深棕色的酶带逐渐显现出来。当酶带的颜色不再继续加深时, 可用含 10% 冰醋酸和 25% 甲醇的溶液浸洗凝胶两次, 每次约 10 min。接着用 50% (W/V) 三氯乙酸固定 2h, 再用上述溶液浸洗两次, 最后用清水洗净, 直接将凝胶置于玻板上进行光密度扫描。根据各酶带吸收峰的高度, 即可测出酶活性的相对变化。

参 考 文 献

- 1 Hearing V J *et al. Biochem J*, 1976; 157: 549
- 2 Holloway P. *Anal Biochem*, 1973; 53: 304
- 3 Kuan K N *et al. Biochem J*, 1979; 177: 981
- 4 Townsend D *et al. Anal Biochem*, 1984; 149: 345

[本文于1989年4月3日收到]

(上接第238页)

这个现象提示: 随着细胞的增龄, 细胞内荧光物质增加。这与有关报道^[4]一致。在 365nm(EX) 与 436nm(EM) 处也有类似现象。

人胚肺二倍体成纤维细胞和 DPH 溶液温育后的荧光光谱与激发光谱 (图略), 激发峰位出现蓝移, 由 384nm 移至 366.4nm, 荧光峰位也出现蓝移现象, 由 440nm 移至 436nm, 荧光强度比单纯 DPH 溶液增大 60 多倍, 比单纯人胚肺二倍体成纤维细胞增大 20 多倍。从荧光理论可知, 在极性溶剂中, 由于被激发分子处于 Franck-Condon 激发态很不稳定, 很快到达平衡激发态并消耗能量, 而在非极性溶剂中或极性较小的溶剂中, 无此现象或消耗能量较小。因此, 发荧光的分子, 当它由极性溶剂转到非极性溶剂或极性较小的溶剂时, 荧光峰位往往出现蓝移。由此可见, DPH 是结合在脂肪分子上非极性的烃链区。

36 代细胞 P 值为 0.27 ± 0.024 (4 例), 46 代细胞 P 值为 0.34 ± 0.031 (4 例), 差异显著。由此可知 46 代细胞膜脂流动性显著小于 36 代细胞膜脂流动性, 人胚肺二倍体细胞膜脂流动性随传代而减小的原因, 尚需进一步研究。可能与老化红细胞膜脂流动性下降^[7]相似, 与膜脂质过氧化损伤有关。

参 考 文 献

- 1 野沢义则, 生化学, 1975; 47(2): 52
- 2 Inbar M *et al. Europ J Cancer*, 1977; 13: 1231
- 3 Lenaz G *et al. J Bioenergetics*, 1975; 7: 223
- 4 Shinitzky M *et al. Biochim Biophys Acta*, 1978; 515: 367
- 5 Watford R *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1977; 76: 869
- 6 曹锡清等, 生物化学与生物物理进展 1986; (4): 53
- 7 姜招峰等, 生物化学与生物物理进展 1989; 16(3): 234

[本文于1989年5月20日收到]