

荧光偏振法测定肺细胞线粒体膜的流动性*

殷玲豫 张凤竹

(山东省医学科学院分子生物学研究室, 济南 250001)

关键词 肺细胞线粒体, 荧光偏振, 微粘度, 膜流动性

本文在线粒体膜能量偶联 ATP 酶与矽肺发病关系研究的基础上进一步作矽尘对肺细胞线粒体膜流动性的影响。

材 料 和 方 法

1. 动物 纯系 Wistar 雄性大白鼠体重 250g 左右, 每个剂量组 40 只, 按 10 mg/ml、30 mg/ml 和 50 mg/ml 三种不同剂量的石英粉尘一次气管注入, 染尘后于 15 天、2 个月、9 个月和一年处死动物。

2. 石英粉尘 中国医学科学院卫生研究所提供, 含 SiO₂ 99% 以上, 颗粒直径全部 < 5 μm, 其中 2 μm 占 89%。

3. 肺细胞线粒体制备 取不同染尘时间的大鼠肺用线粒体缓冲液 (0.25 mol/L 蔗糖 + 0.002 mol/L EDTA + 0.01 mol/L Tris-SO₄, 用 3.75 mol/L H₂SO₄ 调 pH 至 7.4) 制备线粒体^[1], 经洗涤 2 次后备用。

4. 荧光偏振测定 实验中用荧光探针标记线粒体膜脂区, 通过测量荧光偏振度 P 求得微粘度 $\bar{\eta}$ 。DPH 液: 将 1, 6 二苯基-1, 3, 5-己三烯 (1, 6-diphenyl-

1, 3, 5-hexatriene, 美国 Sigma 公司出品) 溶于四氢呋喃中, 配成浓度为 2×10^{-3} mol/L DPH 贮备液。低温避光保存, 应用时以磷酸缓冲液 (PBS) 稀释成 2×10^{-6} mol/L 的应用液。

(1) 线粒体膜标记 在 4.8 ml 2×10^{-6} mol/L DPH 液中, 加入 0.2 ml 肺细胞线粒体溶液, 于 30℃ 水浴保温 1h 后进行荧光偏振测定。

(2) 线粒体蛋白测定 用紫外分光光度计 280nm 测定。

(3) 荧光偏振测量 用日立 850 型荧光分光光度计加起偏器及恒温装置, 激发波长为 361nm, 发射波长为 430nm, 荧光偏振度按下列公式^[2,3]计算: $P = \frac{I_p - GI_{\perp}}{I_p + GI_{\perp}}$, 微粘度根据下列公式^[4,5]计算: $\bar{\eta} = \frac{2P}{0.46 - P}$ 。

结 果 与 讨 论

正常组和不同矽尘浓度及不同染尘时间肺细胞线

表 1 不同矽尘剂量及不同染尘时间肺线粒体膜微粘度的变化¹⁾

线粒体来源	动物数	实验次数	微 粘 度 $\bar{\eta}$ (泊)			
			染尘 15 天	染尘 2 个月	染尘 9 个月	染尘 1 年
正常对照组	40	3	12.82 ± 0.315	8.86 ± 0.49 $P < 0.001$	7.63 ± 0.87 $P < 0.001$	7.04 ± 0.26 $P < 0.001$
10mg 矽尘组	40	3	8.76 ± 0.36 $P < 0.001$	7.59 ± 0.95 $P < 0.001$	6.42 ± 0.30 $P < 0.001$	6.21 ± 0.36 $P < 0.001$
30mg 矽尘组	40	3	9.93 ± 0.21 $P < 0.001$	5.07 ± 0.04 $P < 0.001$	4.50 ± 0.37 $P < 0.001$	4.35 ± 0.06 $P < 0.001$
50mg 矽尘组	40	3	8.84 ± 0.22 $P < 0.001$	4.73 ± 0.07 $P < 0.001$	3.40 ± 0.69 $P < 0.001$	4.09 ± 0.06 $P < 0.001$

1) 微粘度 $\bar{\eta}$ (泊) 以 mg 线粒体蛋白计, P 值均为和染尘 15 天的正常对照组比较。

粒体膜流动性变化见表 1。

从表 1 可见正常对照组随染尘后时间延长鼠龄增大, 染尘一年的高龄鼠肺线粒体膜微粘度明显低于染尘 15 天的低龄组 ($P < 0.001$), 此外, 肺线粒体微粘

度; 低剂量组仅染尘 15 天就明显低于正常对照组, 且随染尘时间的延长而明显降低。大剂量组在染尘 15

* 国家自然科学基金资助项目。

单体在正二十面体衣壳中的聚集形式及其参数间的关系

王继科 褚桂芳 吴东来 尹训南 刘 洪 蔡 虹

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

关键词 单体, 寡聚体, 正二十面体, 参数

单体(或称蛋白亚单位)在正二十面体病毒衣壳中按一定数量“等价”和“准等价”的原则聚集成各种形式的寡聚体和壳粒。本文通过三角形坐标和病毒的构型分析了单体在衣壳上的各种排列、组合, 并阐述了单体数与其它衣壳参数之间的关系。同时, 对各种正二十面体病毒衣壳中的单体总数进行了计算。

1. 单体在正二十面体衣壳中的聚集形式

单体是构成病毒衣壳较为简单的结构单位, 它以

一定的数目(单体数通常用 M 表示)和排列方式聚集成各种寡聚体, 诸如: 二聚体、三聚体、五聚体(或五邻体)、六聚体(或六邻体), 并且, 每一种寡聚体都具有相应条坐标轴。五邻体和六邻体皆属于构成衣壳的形态亚单位——壳粒, 它们是在电镜下唯一能分辨出来的小区。因此我们可以说衣壳构成至少有两级: 一、衣壳是由形态亚单位——壳粒构成的。二、壳粒又是由结构单位——单体构成的(图 1)。

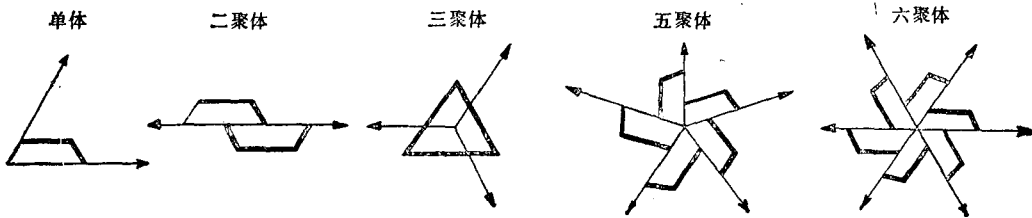


图 1 构成衣壳的各种寡聚体示意图

包括有: 单体、二聚体、三聚体、五聚体和六聚体; $\rightarrow$ 表示坐标

下面我们将进一步分析单体是怎样以“等价”和“准等价”的原则构筑成二十面体衣壳的^[1,2]。首先,

我们以级数(通常用 P 表示), $P = 1$, 三角形剖分数(用 T 表示), $T = 1$ 的病毒粒子为例, 从坐标中可以看

天和低剂量组比较变化不大, 但都比正常组明显降低, 且随染尘时间的延长呈正相关。分析讨论如下:

1. 正常组随着鼠龄增大, 高龄(一年)鼠正常组肺线粒体膜微粘度明显小于正常低龄(15 天)组, 说明衰老肺细胞线粒体膜脂有序性降低, 膜流动性增高。

2. 低剂量组仅在染尘 15 天肺线粒体膜微粘度明显降低, 膜流动性增高, 说明通过用荧光偏振法测定肺线粒体微粘度, 可以看出膜的流动性是判断矽尘对肺细胞影响的敏感指标。

3. 染尘不同时间, 不同剂量使肺细胞线粒体膜脂区微粘度均较正常组明显降低 ($P < 0.001$), 而线粒体膜流动性明显增高。由于膜的流动性改变既包括膜脂有序性, 也包括膜蛋白的运动状态的变化, 线粒体膜的各种重要功能如能量转换, 物质运送, 信息传递

等都与膜的流动性密切相关, 此外, 线粒体膜的流动性改变对线粒体能量偶联功能及对肺细胞氧化磷酸化代谢的改变起重要作用。由此可见, 用荧光偏振法测定肺细胞线粒体膜的流动性可作为判断矽尘对肺细胞作用的指标。也为矽肺发病机理提供了依据。

参 考 文 献

- 1 殷玲豫. 中华结核和呼吸系疾病杂志, 1984; 7(3): 149
- 2 Azumi T, McIllynn S P. J Chem Phys, 1962; 37: 2413
- 3 聂松青等. 北京医学院学报, 1983; 15: 249
- 4 Shinitzky M et al. Biochim Biophys Acta, 1978; 515: 367
- 5 林克椿等. 生物化学与生物物理进展, 1981; (42): 32

[本文于 1989 年 11 月 14 日收到,]

1990 年 3 月 5 日修回]