

- the inducible form (HO-1). Arch Biochem Biophys, 1988, **260** (2): 732~ 739
- 3 Braggins P R, Trakshel G M, Kutty R K. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. Biochem Biophys Res Commun, 1986, **141** (2): 528~ 533
- 4 Trakshel G M, Kutty R K, Maines M D. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. J Biol Chem, 1986, **261** (24): 11131~ 11137
- 5 Ishikawa K, Sato M, Yoshida T. Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. Eur J Biochem, 1991, **202** (1): 161~ 165
- 6 Ishikawa K, Sato M, Yoshida T. Importance of histidin residue 25 of rat heme oxygenase for its catalytic activity. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **182** (3): 981~ 986

The Study on Microsomal Heme Oxygenase Isoforms in Liver and Brain Tissues of Rat. XIA Zhen-Wei, LI Yun-Zhu, CHEN Shun-Nian, SHEN Qing-Xiang, SHAO Jie, WANG Jian, YU Shan-Chang (*Rui Jin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China*).

Abstract Heme oxygenase (HO) isoforms in hematin and phenylhydrazine-induced Sprague-Dawley rat liver and brain were purified using DEAE-Sephacel and hydroxylapatite. Rat liver HO-1 and

brain HO-2 were determined by the Western blotting analysis. The results showed that two isoforms were purified and identified from the induced rat liver, and the HO-1 was the predominant form with a ratio of 2:1. In the native state, the activity of HO-2 was detected to be fully refractory to hematin and phenylhydrazine, whereas the activity of HO-1 was increased in response to these agents. The apparent molecular weights of HO-1 and HO-2 were about 30 ku and 36 ku respectively. In the untreated liver and treated brain, only one peak of HO activity (HO-2) was detected. The antiserum against liver HO-2 was employed in Western blotting analysis, cross-reactivity of HO-2 in the brain was observed, and that of HO-1 in the liver was not observed. The study suggests that HO-1 and HO-2 exist in the hematin and phenylhydrazine treated rat liver, HO-1 is an inducible enzyme, and only HO-2 exists in the treated rat brain. Two constitutive forms were different in molecular weight, inducibility and immunochemical properties.

Key words heme oxygenase, isoform, purification, Western blotting

对地贫红细胞的显微激光散射和图象分析*

李平阳 王江成 谭润初 李永龙 贺奇才

黄耀熊¹⁾

(中山医科大学物理教研室, 广州 510089)

(暨南大学生物医学工程研究所, 广州 510632)

摘要 应用显微准弹性激光散射 (MQLS) 技术与显微生物医学图象分析技术对地中海贫血红细胞及胞内血红蛋白动态特性进行了研究. 在实验中, 比较了正常人及地贫患者红细胞胞内血红蛋白聚集体的平均流体力学半径、平均平动扩散系数及红细胞膜的搏动频率等动态特性参数, 以及细胞的截面积、规化形状因子、长径、短径、灰度等图象分析数据, 发现地贫红细胞的血红蛋白聚合物平均流体力学半径远远大于正常人红细胞的, 其大小变异亦较正常人大, 且其膜搏动频率也较为缓慢, 细胞的截面积也变小. 这反映了地贫红细胞内有较大的蛋白质聚合物存在和红细胞变形能力差的特性. 研究还表明, 显微准弹性激光散射技术结合图象分析技术, 可使测量的可比性和准确性大大提高, 预期可广泛适用于各种活细胞动态特性的研究.

关键词 显微准弹性激光散射, 图象分析, 红细胞膜, 血红蛋白动态特性

学科分类号 Q63

* 国家教委博士点基金资助项目 (9503087). ¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-11-21, 修回日期: 1998-05-04

地中海贫血是由于珠蛋白链基因突变, 导致一种或几种正常的珠蛋白链合成缺少所造成的一组高度异质性综合征. 虽然临床表现差异极大, 但地贫患者都有红细胞膜脂质流动性降低, 膜硬度增加, 红细胞变形能力差等特点. 珠蛋白链多聚体和包涵体的存在还使得细胞膜面积减少, 从而进一步降低了膜的变形性^[1]. 目前对地贫的研究虽然已很多, 但是由于研究手段的限制, 这些研究大都要么是在对样品进行包埋处理, 在细胞已固定的情况下作测量; 要么使细胞破碎后, 把胞内蛋白及其他内涵物抽提出来再作测量, 这样所得到的认识不仅难以反映活细胞内的真实情况, 更不能对细胞在各种条件下的动态变化进行实时测量.

显微准弹性激光散射技术 (MQLS) 是一门可以同时测量细胞内大分子和胞膜动态特性的新技术. 它可在亚微观水平, 作为分子动态行为的探针, 实现在不干扰细胞自然状态的情况下, 对单个活细胞内大分子及分子聚集体 (如蛋白质等) 的大小结构及聚合情况、扩散和跨膜运输以及细胞膜和细胞骨架的刚性、柔韧性、表面张力和粘性等的测量, 并可对细胞的动态过程进行实时监控^[2~5]. 以往报道表明利用显微准弹性激光散射技术可对单个镰状红细胞内血红蛋白聚合物的动态过程进行测量并监测其聚集状态的变化^[6,7], 还可实时测定因改变细胞质和细胞膜物理性质而对膜的动态特性产生的影响^[8,9]. 我们亦曾报道结合各种显微准弹性光散射装置的优点, 成功地设计装配出一新型的显微准弹性激光散射装置. 该装置对比其他同类装置在信噪比、散射体积、散射矢量的不确定度等各有关性能参数都有较好的改善^[10]. 从对红细胞等样品的比较测量中亦证明了该装置可更加准确可靠地测定红细胞胞内血红蛋白聚合物及胞膜的动态特性. 故将其用于对地贫及正常红细胞的比较测量, 可望在分子及亚细胞水平上监测出两者的病理生理和生化条件的微小变化, 从而有助于对地贫的诊治. 但是, 以往的 MQLS 测量表明, 由于活细胞从大小到形状都存在个体差异, 使得 MQLS 测量的结果有较大的标准差. 因而在测量时需要测较大的细胞. 利用图象分析技术对具有类似大小和形状 of 细胞先进行分类分析, 再对之分组进行 MQLS 测定, 不仅使测量的误差减少、增加实验的可比性, 减少测量的细胞量, 而且还可以分析比较出胞内分子和胞膜动态特性与细胞大小和形状间的关系. 此外, 通过对细胞图象的大小、形状和灰

度的分析, 还可进一步判别正常和异常细胞. 为此, 我们结合使用了 MQLS 和显微生物医学图象分析技术, 对地贫和正常红细胞进行了较为系统的分析测量. 本文将报道有关的研究结果.

1 实验

1.1 样品制备

血液样品取自 25~27 岁的女性正常人及 β 杂合子地贫患者. 血样由静脉采血, 以肝素抗凝, 注入装有等渗的 HEPES-Ringers^[11] 缓冲液的试管内. 再在缓冲液中加入 1 g/L 的 BSA, pH 值 7.35~7.40 下离心 (2 000 r/min, 10 min) 洗涤红细胞三次. 再经密度梯度离心^[12] 后, 抽取最上层 (对应于最年轻的红细胞) 然后稀释使红细胞间距为几个红细胞的直径, 最后悬于缓冲液中. 制备好的红细胞悬浮液与大气相通平衡 40 min 左右, 使其氧分压约为 1.99×10^4 Pa. 所用试剂均为分析纯.

1.2 实验装置和原理

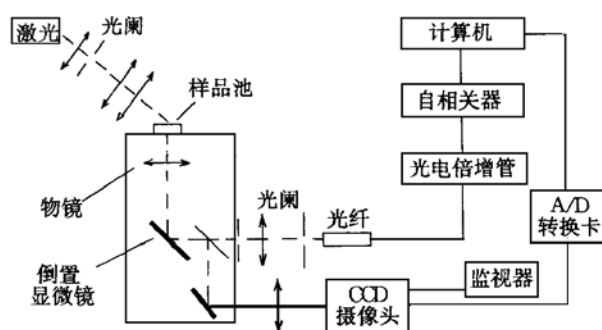


图 1 显微准弹性激光散射装置

实验装置由两部分组成: 一为显微激光散射装置, 所用激光为 $\lambda = 632.8$ nm 的 He-Ne 激光, 输出功率约为 2 mW, 通过光纤引入显微镜后照射到样品上的激光光斑为约 $1 \mu\text{m}$ 直径, 功率密度约 0.5 W/cm^2 . 这么弱的功率密度已在实验中证明不会对细胞及其胞内蛋白的正常生长造成干扰以至损伤. 因此, 将此激光投射到直径约为 $7.6 \mu\text{m}$ 的红细胞内, 再利用显微镜和光纤检出其散射光, 将其输入至自相关器, 对其自相关函数进行分析计算, 便可实现对活细胞的不干扰其天然状态下的无损、在位测量.

激光散射测量的原理是: 当激光投射到样品上时, 由于样品分子的热力学涨落, 引起激光散射光强随时间变化, 其自相关函数可以下式描述:

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle \quad (1)$$

其中 $I(t)$ 为 t 时刻的散射光强, $I(t+\tau)$ 为延

迟一段时间 τ 后即 $(t + \tau)$ 时刻的散射光强. 当样品中存在两个动态因素时, 其散射光强的自相关函数随时间的变化关系为:

$$G(\tau) = B + [A_f \exp(-\Gamma_f \tau) + A_s \exp(-\Gamma_s \tau)]^2$$

(2)

在我们的实验中, 散射光强主要由两种因素引起, 一是因红细胞内血红蛋白分子的布朗运动而引起, 其幅度为 A_f , 而衰减因子 $\Gamma_f = D_f q^2$. D_f 是血红蛋白分子的平均平动扩散系数, q 为散射矢量, 可由入射光波长 λ , 散射角 θ , 折射率 n 通过 $q = 4\pi n \sin(\theta/2)/\lambda$ 计算出. 根据 Stokes-Einstein 方程:

$$D_f = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

(3)

还可得出散射粒子的平均流体力学半径 R_h , 式中 k 为玻尔兹曼常数, η 为悬浮介质的粘滞系数, T 为热力学温度. 另一项则由红细胞膜表面搏动引起, 其幅度为 A_s , 膜的搏动与膜的弹性形变有关, 其中的 Γ_s 对应于细胞膜的搏动频率. 此外 (2) 式中的 B 是由散射装置决定的待定系数. 在实验中由光电倍增管、前置及箝位放大器将获得的散射光强信号作箝位放大后进入自相关器进行相关运算, 得到的数据经过用 (2) 式拟合后可直接得到 D_f . 整个数据的拟合, 包括 Γ 、 D_f 和 R_h 的求取都全部由相关器完成, 且具有同样的标准偏差.

另一部分为由 CCD 摄像头 (MINTRON MTV-8055MK II)、电视监视器、A/D 转换卡、带有图象摄录、贮存和图象分析处理系统软件的计算机所组成的图象分析仪. CCD 摄像头将倒置显微镜中所观测到的样品图象摄录下来, 其视频信号经过 A/D 转换卡转换成数字信号输入计算机. 所摄录的图象被贮存在计算机后用于进一步的分析处理.

实验时, 将样品置于显微镜下, 通过摄像系统获得所需的细胞图象, 并显示于监视器及计算机上. 取样测定时选取形状为球形 (剔除棘形及镰形等变异细胞)、面积大致相同的细胞, 用图象分析软件统计分析其面积、规化形状因子、长径、短径、灰度等指标. 根据分析计算的结果, 选定各参数均近似相同的细胞作为实验测定组, 然后分别将微束激光照射到单个细胞上, 进行光散射测量. 每个细胞连续测量五次取平均值. 共测量地贫红细胞 59 个, 正常人红细胞 87 个.

2 结 果

图 2a、2b 分别为典型的地贫与正常人红细胞

图象及其分析结果. 图 3、4 则分别示出它们的光散射自相关函数曲线. 根据自相关函数曲线得到各红细胞内血红蛋白流体力学半径及膜搏动频率分布的直方图在图 5、6 所示. 表 1 是根据这些数据经统计分析后的结果, 表 2 则列出地贫与正常人红细胞图象分析的有关参数. 从表 1 可见, 地贫患者红细胞内血红蛋白聚合物的平均流体力学半径要明显大于正常人红细胞的 ($P < 0.01$), 并且变异性要大于正常人. 地贫患者的膜搏动频率则小于正常人的, 二者也存在显著性差异 ($P < 0.01$). 从表 2 图象分析的结果来看, 地贫红细胞和正常红细胞大小、形状亦有明显的差异.

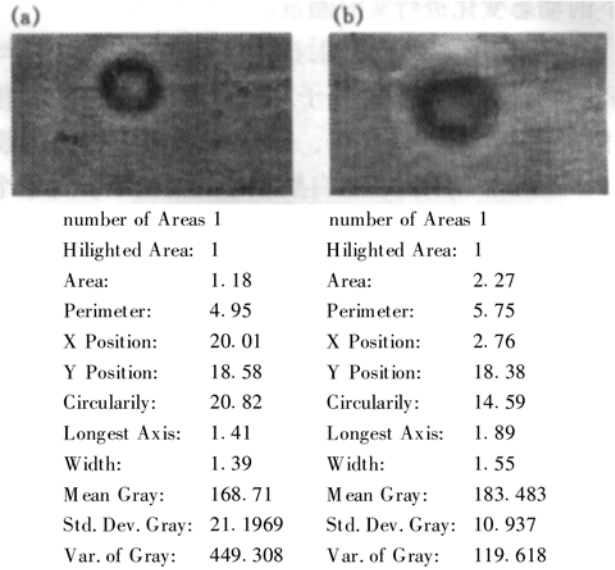


图 2 地贫 (a) 和正常人 (b) 红细胞图象分析示例

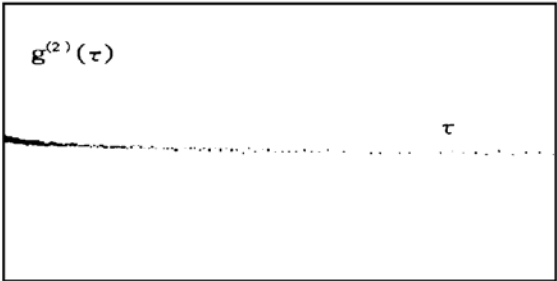


图 3 地贫红细胞自相关函数曲线

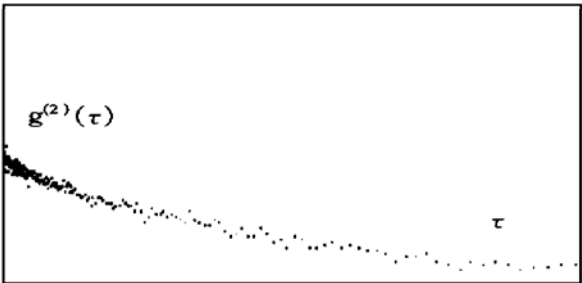


图 4 正常红细胞自相关函数曲线

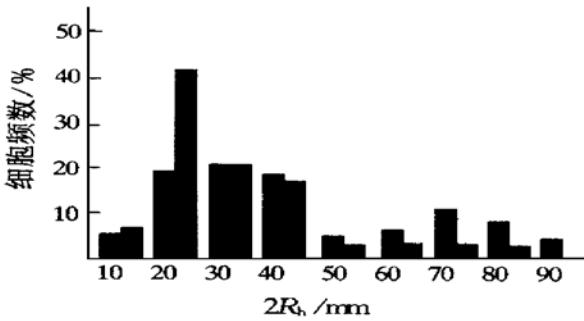


图 5 血红蛋白平均流体力学半径频数分布
■: 地贫; ■: 正常人.

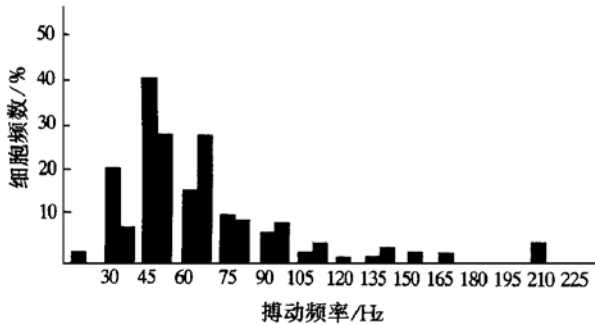


图 6 膜波动频率频数分布
■: 地贫; ■: 正常人.

表 1 地贫与正常人红细胞光散射统计结果

	Γ_s / Hz	$D_f / \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$2R_h / \text{nm}$	$CV(2R_h) / \%$
地贫(T_1)	62 ± 21	1.38 ± 0.76	52 ± 29	56
正常人(T_2)	80 ± 42	2.88 ± 1.46	25 ± 12	48

sample time = 5 μs , $\lambda = 632.8 \text{ nm}$, $\theta = 45^\circ$, $T_1 = 29^\circ\text{C}$, $\eta_1 = 0.8148 \text{ cp}$, $T_2 = 28^\circ\text{C}$, $\eta_2 = 0.8327 \text{ cp}$.

表 2 典型的地贫与正常人红细胞图象分析结果

	截面积 $/\mu\text{m}^2$	周长 $/\mu\text{m}$	规化形 状因子	长轴 $/\mu\text{m}$	短轴 $/\mu\text{m}$	平均 灰度	灰度 方差
地贫	14.92	17.60	0.68	5.01	4.94	168.71	449.31
正常人	28.71	20.45	0.93	6.72	5.51	183.48	119.62

3 讨 论

本实验的结果表明,地贫患者红细胞内血红蛋白分子聚合物的平均流体力学半径要比正常人红细胞的大得多,这表明其血红蛋白分子会聚合成较大的聚合物.其机制是由于 β 杂合子地贫患者缺少 β 珠蛋白链从而导致过剩的 α 珠蛋白链聚集成 α_2 、 α_3 、 α_4 等.它们很不稳定,容易在幼红细胞内沉淀成包涵体.这些包涵体颗粒较粗大,表现为使胞内血红蛋白聚合物平均流体力学半径变大.且由于不同细胞的珠蛋白链聚集状态不同,这就使得胞内血红蛋白聚合物流体力学半径平均值的变异度较大.

同时这些包涵体还使红细胞膜僵硬,膜脂质流动性降低,表现为膜波动频率降低.用图象分析处理技术测量同一密度梯度的两组样品红细胞的截面积,发现地贫患者红细胞的截面积明显小于正常人红细胞,这是由于包涵体可在脾中被巨噬细胞摘除而使得膜面积缩小,红细胞变为球形,从而使红细胞面积体积比率下降,致使红细胞变形性能进一步下降.地贫红细胞内血红蛋白的平均平动扩散系数要小于正常人红细胞,这也可反映出地贫红细胞内部粘滞性较大的特性.胞膜本身的柔韧性、红细胞面积体积比率、细胞内部粘滞性均是影响红细胞变形性能的主要因素.红细胞的形态及其组成、代谢及功能状态密切相关.红细胞疾病在形态学多具其特征性变化.这些特征性变化常作为临床上诊断的依据,但对于红细胞在贫血状态时多种形态学参数研究较少报道,所以一般这些依据又缺乏客观数据说明,本文的测量表明用图象分析仪对红细胞进行图象分析,不但可通过分类测定使MQLS的测量更具可比性,提高其测量的准确性,还可以提供有关形态学的客观依据.由于地贫患者都有低色素小红细胞和靶形细胞出现,红细胞内也有不同程度的聚合物和包涵体的特点,所以可以通过大量统计地贫红细胞和正常红细胞灰度(或光密度)分布的区别,找到一个判别函数,便可对一个未知细胞进行判别.由此可见显微准弹性激光散射结合图象分析技术不仅可以用来研究地贫红细胞的生化变化,还可以用来监测细胞的病理生理变化的影响,特别是跟踪测定单个红细胞在各种病理生理条件下如不同氧分压、渗透压及添加有关药物等情况下的相应变化,可以实现在活细胞自然状态情况下,同时在分子和亚细胞水平上对地贫的病理生理现象有更确切的认识.监测各种病理变化过程,并有助于临床诊断,本文报道了这两门技术的结合使用,显示了比以往单用MQLS测量对活细胞的研究有突出的优点,预期有极广阔的应用前景,值得进一步深入研究.

参 考 文 献

- 1 郁知非. 现代血液病学. 杭州: 浙江科技出版社 (Yu Z F. Modern Hematopathy. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press), 1989. 217~ 235
- 2 黄耀熊 (Huang Y X). 激光生物医学的最新进展和发展趋势. 国外激光 (Overseas Lasers & Photonics Focus), 1993, (7): 1 ~ 3
- 3 Tansks T, Imanishi Y, Nishio I, et al. Hemoglobin aggregation in single red blood cells of sickle cell anemia. Science, 1983, (220): 1173~ 1175
- 4 Kam Z, Hofrichter J. Quasi-elastic light scattering from solutions

- and gels of hemoglobin S. *Biophysical Journal*, 1987, (50): 1015~1020
- 5 黄耀熊 (Huang Y X). 对盐和 C8-卵磷脂水溶液的准弹性激光散射研究. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1991, 7 (2): 140~144
 - 6 Peetermans J, Tanaka T, Nishio I, *et al.* Microscope laser light scattering spectroscopy of single biological cells. *Cell Biophysics*, 1985, (7): 91~105
 - 7 Peetermans J, Nishio I, Ohnishi S T, *et al.* Light-scattering study of depolymerization kinetics of sickle hemoglobin polymers inside single erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83 (1): 352~356
 - 8 Tishler R B, Carison F D. Quasi-elastic light scattering studies of membrane motion in single red blood cells. *Biophysical Journal*, 1987, 51 (6): 993~997
 - 9 Tishler R B, Carison F D. A study of the dynamic properties of the human red blood cell membrane using quasi-elastic light-scattering spectroscopy. *Biophysical Journal*, 1993, 65 (6): 2586~2600
 - 10 王江成, 黄耀熊, 谭润初, 等 (Wang J C, Huang Y X, Tan R C, *et al.*). 一新型显微准弹性光散射装置. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1998, 14 (1): 170~178
 - 11 Schindler M, Koppel D, Sheet Z M, *et al.* Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77 (3): 1457~1461
 - 12 郝刚, 冯玮 (Hao G, Feng W). 红细胞衰老过程中临床血液参数、红细胞免疫粘附功能的改变及其临床意义. *中华老年学杂志 (Chinese Journal of Gerontology)*, 1995, 15 (5): 262~263

Microscope Laser Light Scattering Studies on Red Cells of Thalassemia with Image Processing and Analysis. LI Ping-Yang, WANG Jiang-Cheng, TAN Run-Chu, LI Yong-Long, HE Qi-Cai

(*Department of Physics, Sun-Yat Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China*); HUANG Yao-Xiong (*Institute of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China*).

Abstract Microscopic quasi-elastic laser light scattering technique and image processing and analysis technology were used to study thalassemia erythrocytes. The mean hydrodynamic radius and average diffusion coefficient of hemoglobin polymers in the intact red cells, the membrane motion frequency, cross area, regular form factor, longest axis, shortest axis and mean gray were measured for thalassemia erythrocytes and normal red cells. It is found that, compared with normal red cells, the mean hydrodynamic radius and its variance of thalassemia erythrocytes are larger, the membrane motion frequency is slower and the cross area of the cell is smaller. This suggests that thalassemia erythrocytes have large hemoglobin polymers and worse deformability.

Key words microscopic quasi-elastic laser light scattering (MQLS), image processing and analysis, erythrocyte membrane, dynamic properties of hemoglobin

神经节苷脂类抑制 BT325 细胞系生长机理的初步探讨

李爱华 杨典洱 陈红 黄如彬

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 用¹²⁵I-EGF 与人多形胶质细胞瘤 BT325 细胞系膜上 EGF 受体的饱和结合实验, 竞争抑制实验研究 GM3, BBG (bovine brain gangliosides) 对 EGF 受体最大结合量, 亲和常数及受体数目的影响; 放射受体法观察 EGF-EGFR 复合物内吞过程, 测定胞质和培养基中 EGF 含量. 结果表明: BT325 细胞质膜上存在高亲和力 EGF 结合位点, GM3 对 EGF 与其受体的亲和力无明显抑制作用 ($P > 0.05$), 但能明显减少其受体的数目 ($P < 0.05$); GM3 能明显延长 EGF-EGFR 复合物内吞过程; GM3 处理的胞质中 EGF 浓度比对照组显著升高 ($P < 0.05$), 培养液中无明显差异, 这可能是由于 GM3 抑制 EGF 分泌所致.

关键词 多形胶质细胞瘤 BT325 细胞系, 神经节苷脂 GM3, 牛脑神经节苷脂, 表皮生长因子, 抑制作用, 作用机理

学科分类号 Q546