

老化红细胞膜的脂质及蛋白质变化

曹锡清 毕 蕾 潘华珍

(中国协和医科大学,北京)

近年来许多学者从两个方面对机体衰老的机制进行了研究:机体的衰老过程与细胞老化过程,后者是机体衰老的基础。^[1]红细胞由于直接暴露在高氧分压下,又有铁离子催化,特别易受脂质过氧化的损伤,所以成为研究细胞老化的最好材料之一。本文仅以老化红细胞为对象,研究其膜脂、膜蛋白及脂质过氧化与老化的关系。

部切割,因而有部分 cDNA 片段仍留在载体上,如与 HUK 同源仍可杂交。XbaI 片段在胶片上显现浓黑区带,与 HUK 杂交强阳性,表明二者同源性很高;(2)未经酶解的三种构型的 pYN-15 均为杂交阳性,因为它们同样含有猪 uPA cDNA 序列,与 HUK 同源即能杂交;(3) pHUK-8 质粒的 P_uI 片段(HUK)杂交最强,此系阳性对照。但在 HUK 片段上方可见两个微弱杂交带,可能是酶解不全残留微量完整的 pHUK-8 所致;(4) pBR322 质粒及 λ DNA Hind III 片段均杂交阴性。因此, pYN-15 质粒 DNA 的 XbaI 片段与 HUK 片段杂交阳性不是由于非特异性显影,而是由于二者具有同源序列。即人 uPA cDNA 与猪 uPA cDNA 具有显著的同源性。由于 HUK 是一个靠近人 uPA cDNA 3' 端且含有内含子的片段,因此作为探针有一定局限性;而猪 uPA cDNA 是全长序列,5' 端与 3' 端序列均完整又无内含子,同时又显著地与 HUK 同源,二者结合使用可能有助于从 cDNA 或基因组文库中钓取人 uPA 克隆。

材料与方法

一. 老化红细胞的分离^[2]

用生理盐水将 40% 的葡聚糖配成五种稀释度(27%、26%、25%、24%、23%),其比重分别为 1.093、1.090、1.086、1.080 及 1.074,各取 1ml 加到离心管中。取正常人全血,弃血浆用生理盐水洗去白细胞及血小板,离心得压紧

小 结

菌落原位杂交及 Southern 吸印杂交均证明, pYN-15 重组质粒中的猪 uPA cDNA 片段与 pHUK-8 质粒中的人 uPA cDNA(HUK)片段,具有明显的同源性;二者均可作为探针从人的基因组或 cDNA 文库中钓取人 uPA 克隆。

参 考 文 献

- [1] 逮好英等: dG-dC 同聚物接尾法构建人胚肾 cDNA 文库(内部资料) 1983。
- [2] 丁少宏: 胎儿食管粘膜基因文库的构建(医科院研究生论文), 1985。
- [3] Blasi, F. et al., *PNAS*, **81**: 4727, 1984。
- [4] Nagamine, Y. et al., *Nucl. Acids Res.*, **12**(24): 9525, 1984。
- [5] 王嘉玺, 孙苏华: 《军事医学科学院院刊》6: 1985。
- [6] 王嘉玺: 《中国遗传学第二次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编》, 28—29, 1983。
- [7] Davis, R. W. et al., in *Methods in Enzymology*, Vol. **65**, 407—408, Academic Press, New York, 1982。
- [8] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning a laboratory manual*, 383, CSH, 1982。
- [9] *ibid.*, 326
- [10] *BRL Catalog and Reference Guide*, 15, 1983。

【本文于 1985 年 12 月 30 日收到】

实验结果

红细胞,用生理盐水等体积稀释,加 1ml 于盛有葡聚糖密度梯度的离心管上,3000rpm 离心一小时,即可分成三层,将三层分别收集待用。

二、红细胞 G-6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G-6-PD) 活性测定 参照 Beutler^[3] 法,酶活性以每克 Hb 含国际单位数表示 (IU/gHb)。

三、红细胞膜脂质过氧化物 按 Mengel^[4] 法测定脂质过氧化物终产物丙二醛 (MDA) 含量,以每克 Hb 含毫微克分子 MDA 数表示 (nM MDA/gHb)。

四、红细胞膜磷脂测定 按 Rose^[5] 法,结果以磷脂各组分所占总磷脂百分比表示。

五、脂肪酸的测定 按 Rose 法提取脂质,取用生理盐水洗过的红细胞,加水破溶,用异丙醇及三氯甲烷(两者内含 0.05% 2, 6-2, 3-丁基羟甲苯以防氧化)萃取,吹氮浓缩,低温保存待用。吹干的样品,加无水甲醇:苯:氢氧化钠(30:20:1)试剂甲酯化,充分反应后,加甲醇盐酸液中和,再用正己烷萃取脂肪酸甲酯。将此样品浓缩,用毛细管柱气相色谱法分析 (OAR5 型气相色谱仪, Carlo Erba Strumen Iazione 产,毛细管柱长 50 英尺,直径 0.22mm)。以标准脂肪酸保留时间为对照,确定样品的脂肪酸量。脂肪酸的量以 $C_{18:0}$ mg/ml 为 1 作标准,以计算其他各种脂肪酸的相对重量。

六、荧光物质的测定 用 Rose 法提取膜脂质。提取液用日立 MPF4 型荧光分光光度计测定其荧光物质。激发波长 360nm,狭缝 4nm,发射在 440nm 波长,狭缝 8nm。以异丙酮—三氯甲烷溶剂系统作空白,以 $0.05 \mu\text{g}/100$ $0.1N$ H_2SO_4 的硫酸奎宁为标准荧光单位,分别测定年轻及老化细胞脂质提取液中的荧光物质含量。

七、红细胞膜巯基(-SH)含量 按荣康泰法(未发表)测定,结果以每毫克膜蛋白含毫微克分子 SH 数表示 (nM SH/mg Pr)。

八、红细胞膜提取 按 Dodge^[6] 法,然后按 Laemmli^[7] 法作膜 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。

一、用葡聚糖不连续密度梯度离心法,将红细胞分层,结果见图 1 (见封三)。从图 1 可见离心后分为三层,上层为年轻红细胞,下层为老化红细胞。其 G-6-PD 活性分别为 4.87 ± 1.4 及 3.74 ± 1.39 (IU/gHb)。老化红细胞 G-6-PD 活性明显低于年轻者。 (P 值 < 0.05)

二、年轻及老化红细胞脂质过氧化产生丙二醛 (MDA) 含量分别为 0.77 ± 0.23 及 2.64 ± 1.89 (nM MDA/gHb)。红细胞经 6% H_2O_2 处理后,老化红细胞 MDA 产量远远高于年轻细胞。

三、老化红细胞磷脂变化不大,只有丝氨酸磷脂有明显改变,其他都与年轻者一样。

表 1 年轻及老化红细胞磷脂百分含量

	年轻 M $\pm$ SD	老化 M $\pm$ SD	P 值
磷脂酰乙醇胺	28.83 $\pm$ 4.2	28.75 $\pm$ 2.48	>0.5
磷脂酰丝氨酸	18.57 $\pm$ 5.33	15.64 $\pm$ 5.82	<0.05
磷脂酰胆碱	25.89 $\pm$ 4.44	27.19 $\pm$ 3.32	>0.2
磷脂酰鞘氨醇	26.73 $\pm$ 4.38	28.94 $\pm$ 5.43	>0.1

四、年轻和老化红细胞脂肪酸含量。从表 2 可看出,老化细胞的饱和脂肪酸 ($C_{16:0}$) 明显减少,不饱和脂肪酸 ($C_{20:4}$) 增高。

表 2 年轻与老化红细胞脂肪酸百分含量

	年轻 M $\pm$ SD	老化 M $\pm$ SD	P 值
$C_{14:0}$	2.16 $\pm$ 1.47	2.26 $\pm$ 0.74	>0.1
$C_{16:0}$	20.15 $\pm$ 6.61	17.29 $\pm$ 5.88	<0.05
$C_{18:0}$	15.93 $\pm$ 4.29	12.66 $\pm$ 4.55	>0.2
$C_{18:1}$	12.68 $\pm$ 3.67	9.28 $\pm$ 3.11	>0.1
$C_{18:2}$	10.27 $\pm$ 3.02	10.40 $\pm$ 2.83	>0.5
$C_{20:4}$	31.85 $\pm$ 11.09	43.48 $\pm$ 13.29	<0.01

五、年轻及老化红细胞荧光物质含量分别为 0.43 ± 0.21 及 1.34 ± 1.05 (荧光单位/gHb)。老化红细胞所含荧光物质远远高于年轻细胞。 (P 值 < 0.01)

六、年轻及老化红细胞膜巯基含量分别为 64.08 ± 3.00 及 52.85 ± 3.04 (nM SH/mg P_r)。老

化红细胞巯基比年轻者明显减少。(P 值 < 0.05)

七、SDS-PAGE 电泳图谱:

从 SDS-PAGE 图谱(图 2 见封三)中可看出老化与年轻红细胞膜蛋白无大差别,但可清晰可见老化细胞在胶前沿有高聚物存在。

讨 论

一、分离老化细胞方法很多,但多用密度梯度离心法。我们用葡聚糖梯度方法,可分成三层。Nakai^[2] 提出 G-6-PD 减少及脂质过氧化产物 MDA 含量的增高是老化细胞的标志。按他提出的指标,我们分得的下层是老化细胞。至于老化细胞密度增加的原因看法有多种。最近 Wagner^[7] 提出红细胞在血循环过程中由于种种内部的或环境因素(如感染、溶血性贫血等)有少量的膜脱落,形成小囊泡,因此细胞膜面积缩减,膜体积减小,密度增加。我们推测老化细胞的密度增加也有此原因。

二、由表 1 可见老化细胞磷脂改变不大,只有 PS 明显增高。结合荧光物质测定结果,可以看出老化细胞荧光物质也增高。Kiyomi^[8] 提出老化细胞的荧光物质是由一系列的荧光物质组成,统称褐脂质(lipofuscin)。这些物质是丙二醛与磷脂交联的产物。结合我们的实验结果,老化红细胞不饱和脂肪酸(C_{20:4})增高,不饱和脂肪酸氧化产物是丙二醛。我们实验结果丙二醛含量也增高。Freeman^[9] 提出老化的主要原因之一是细胞长期受过氧化的袭击。老化

理论中交联学说^[10]越来越受到人们重视。综合以上结果分析老化细胞内过氧化反应较强,使不饱和脂肪酸氧化成丙二醛,丙二醛又与磷脂(特别是 PS)交联,形成荧光物质,进一步证实细胞老化与过氧化有密切关系。

三、从 SDS-PAGE 图谱看出,老化红细胞膜蛋白改变不大,主要是出现高聚物。Hochstein 报道,细胞受氧化损伤时,膜收缩蛋白易与区带 4,1 交联形成高聚物。我们实验结果中老化细胞膜巯基含量减少。红细胞膜收缩蛋白是富含巯基的蛋白,所以可能在老化过程中巯基相互交联形成高分子化合物。所以巯基减少,高分子化合物增多。

参 考 文 献

- [1] 吕维善等: 中华医学杂志, **62**, 181, 1982。
- [2] Nakai, T. et al: *Acta Hematology Japan*, **47**, 1230, 1984.
- [3] Beutler, E.: *Red blood cell metabolism* (2 Ed), New York, 1975.
- [4] Mengel, G. E. et al: *J. Clin. Invest.*, **46**, 1715, 1967.
- [5] Rose, W. et al: *J. Lip. Res.*, **6**, 428, 1965.
- [6] Dodge, J. T.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **100**, 119, 1963.
- [7] Wagner, G. M. et al: *Clin. in Hematology*, **14**, 183, 1985.
- [8] Kiyomi, K. et al: 卫生化学(日文), **30**, 333, 1984.
- [9] Freeman, B. A. et al: *Lab. Invest.*, **47**, 412, 1982.

[本文于 1985 年 9 月 28 日收到]

曹锡清等：《老化红细胞膜的脂质及蛋白质变化》一文的图 1、2

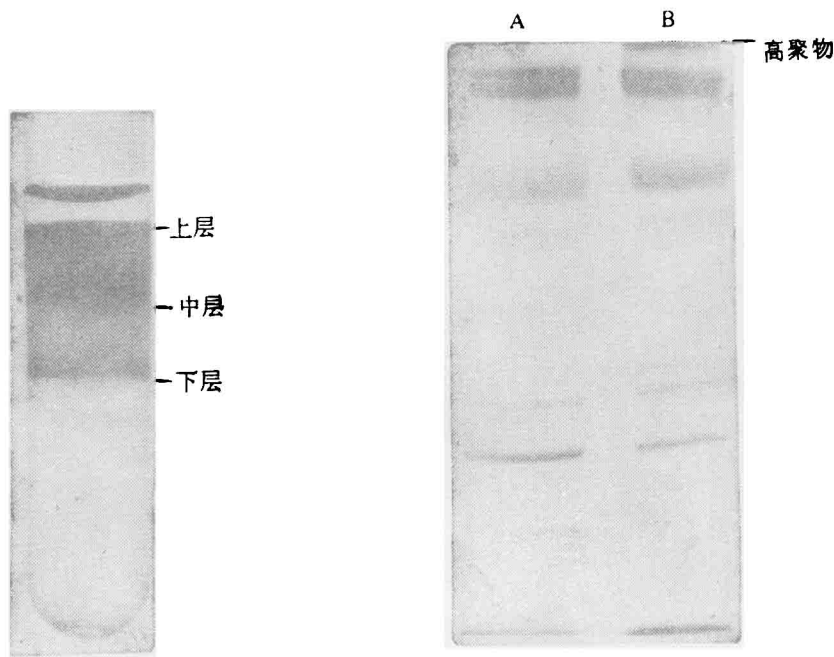


图 1 红细胞密度梯度离心结果

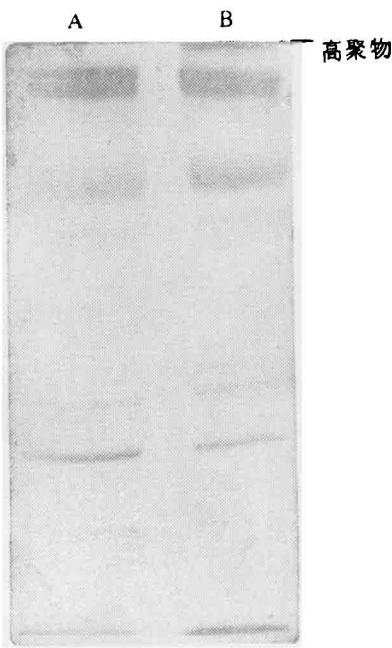


图 2 SDS-PAGE 图谱

A——年轻红细胞膜
B——老化红细胞膜

梁念慈等：《聚丙烯酰胺凝胶的蛋白质荧光染色法》一文的图 1

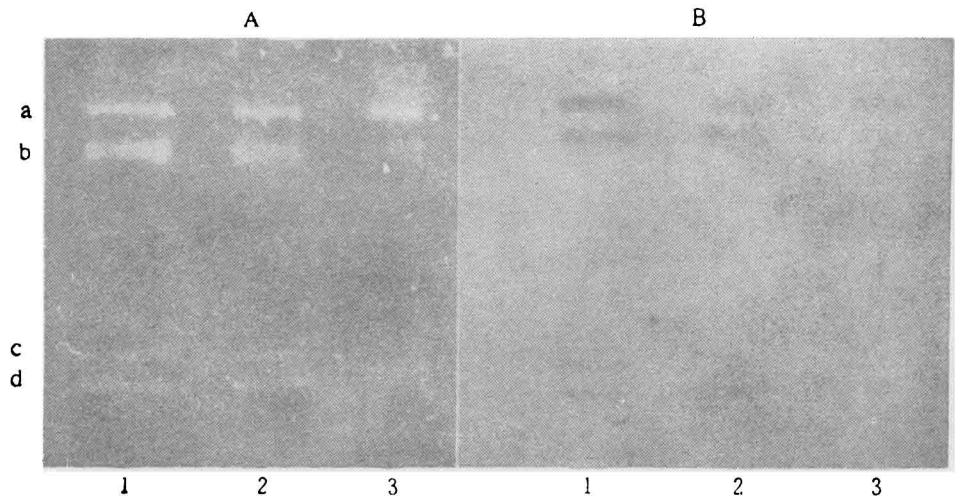


图 1 荧光染色法(A)和考马斯亮蓝染色法(B)的对比

a. 牛血清白蛋白。b. 卵白蛋白。c. 肌红蛋白。d. 溶菌酶。1, 2, 3 行含各种蛋白质分别为 $2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$ 和 $0.5\mu\text{g}$