

对-二甲氨基苯酚通透红细胞膜的研究

叶 玲 黄如衡

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京)

提 要

根据抗氰药对-二甲氨基苯酚 (DMAP) 穿透红细胞膜使 Hb 变成 MetHb 的反应特性及 DMAP 的荧光性质, 分别采用光密度法和荧光法对 MetHb 生成速度与血球外的 DMAP 浓度变化进行定量分析, 建立红细胞膜对 DMAP 的通透性研究方法, 计算出 DMAP 穿透速率常数为 0.153 min^{-1} , $t_{1/2}$ 等于 4.53 min, 推测 DMAP 的透过方式为易化扩散。

物质运送是生物膜的主要功能之一。认识物质通透细胞膜的速度规律, 对于揭示物质通透细胞膜的机理具有重要意义。生物膜通透性研究多采用同位素示踪技术观察 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等离子的通透特点。本文首次利用抗氰药对-二甲氨基苯酚^[1] (4-Dimethylaminophenol 简称 DMAP) 通过红细胞膜后形成的高铁血红蛋白 (MetHb) 的特征吸收, 用分光光度法监测通透速率并用荧光法测定 DMAP 浓度变化, 计

算 DMAP 通透小鼠红细胞膜的动力学参数, 研究药物浓度对通透速度的影响, 推测 DMAP 的穿透方式。

一、仪器与材料

DMAP 本所合成室提供, 用生理溶液配制成 0.1M, 置冰箱低温保存。

血标本 昆明种♂小鼠, 收集新鲜血液, 肝素抗凝。

用时参考。

本所菌种保藏室和周慧玲同志提供筛选菌种, 张树政教授提出宝贵意见, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Hayaishi, O. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 5450.
- [2] Hayaishi, O.: *in Oxygenases*, Academic Press, New York, 1962.
- [3] Doelle, H. W.: *Bacterial Metabolism*, 2nd Edition, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975, 499—557.
- [4] Nakazawa, H. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, 1963, 54, 65.
- [5] Ornston, L. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3776, 3787.
- [6] Ornston, L. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3800.
- [7] Patel, R. N. et al.: *J. Bacteriol.*, 1976, 127, 536.
- [8] Dorn, E. et al.: *Biochem. J.*, 1978, 174, 73.
- [9] Nakai, C. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, 195, 12.
- [10] Lawrence, Q. Jr.: *Adv. Inorg. Biochem.*, 1983, 5, 167.
- [11] 钱存柔、董碧红:《微生物学基础知识与实验指导》, 科学出版社, 北京, 1979, 262—263.
- [12] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组:《生物化学与生物物理进展》, 1976, (4), 36.
- [13] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [14] 沈同等编:《生物化学》, 人民教育出版社, 北京, 1980, 235—238.

[本文于 1987 年 2 月 9 日收到]

磷光分光光度计 日立 MPF-2A 荧光分光光度计加装磷光镜组成。

二、方法与结果

(一) DMAP 与 MetHb% 相互关系

取血红蛋白 (Hb) 溶液在 20℃ 分别与 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 5×10^{-5} , 10×10^{-5} , 15×10^{-5} , 20×10^{-5} (M) DMAP 作用 60 min, 测定 628 nm 及 588.7 nm 处的光密度值, 计算 MetHb%^[2], 得 MetHb 浓度曲线如下:

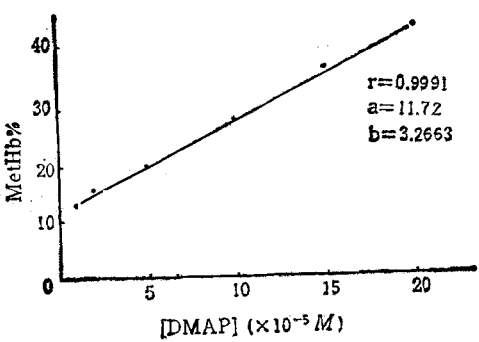


图1 DMAP-MetHb% 关系曲线

由图 1 可见,在一定范围内 DMAP 浓度与 MetHb% 成直线关系,故可用 MetHb% 作为 DMAP 通透红细胞膜的定量指标。

(二) DMAP 穿透红细胞膜 形成 MetHb 速度

取全血 0.05 ml, 加 0.9% NaCl 0.35 ml, 分别与 100 μl 2.5, 5.0, 7.5($\times 10^{-4}$ M) DMAP 作用不同时间 (20℃), 2000 × g 离心 2min, 沉淀用 0.9% NaCl 洗涤, 立即离心, 弃去上清液, 红细胞加水 3.0 ml 溶血, 离心 10 min, 上清液测

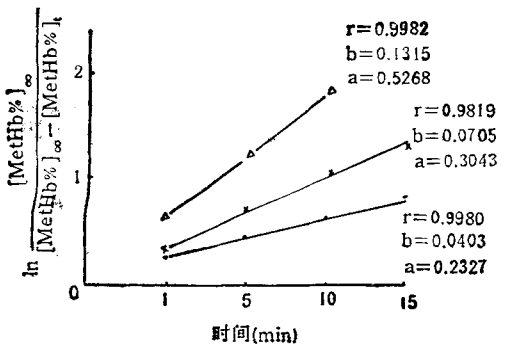


图2 DMAP 浓度对 MetHb 生成速度的影响
 2.5×10^{-4} M (---·), 5.0×10^{-4} M (×-×), 7.5×10^{-4} M (△-△)

MetHb, 计算反应速度。
参照一级动力学方程式^[3], 以
$$\ln \frac{[\text{MetHb}\%]_{\infty}}{[\text{MetHb}\%]_{\infty} - [\text{MetHb}\%]_t}$$
 对时间 t 作图 (图 2): 直线斜率即为 MetHb 生成速率常数 k。从图 2 可见, 随着 DMAP 浓度增高, MetHb 生成速度加快。速率常数分别为 0.0403, 0.0705, 0.132 (min^{-1})。

(三) DMAP 直接与 Hb 作用形成 MetHb 的速度

上述 DMAP 穿透红细胞膜生成 MetHb 是 DMAP 通透膜及其与 Hb 作用的综合过程, 故进而观察 DMAP 直接与 Hb 作用形成 MetHb 的速率, 以确定红细胞膜对 DMAP 的通透速度。

同前(二)取血, 分别加 1% TritonX-100 0.35 ml。溶血后加 5.0×10^{-4} M DMAP 各 100 μl, 20℃ 作用, 按设计时间分别加水 (4℃) 2.6 ml 稀释, 离心, 取上清液比色。经校正, 测定算得 MetHb% 为:

表1 5.0×10^{-4} M DMAP 与 Hb 作用生成的 MetHb%

时间 (min)	1	3	5	7	10	15	∞*
MetHb%	3.67	10.05	16.60	19.66	23.71	28.45	38.53

*∞ 代表平衡时

以时间 t 对 $\ln \frac{[\text{MetHb}\%]_{\infty}}{[\text{MetHb}\%]_{\infty} - [\text{MetHb}\%]_t}$ 回归, 得直接形成 MetHb 的速率常数 K 为 0.0879 (min^{-1}), 相关系数为 0.9950。

(四) DMAP 直接与 Hb 作用及与红细胞作用生成 MetHb 速率比较

将 $5.0 \times 10^{-4} M$ DMAP 在 $20^{\circ}C$ 与 RBC 和 Hb 平行操作所得的速率常数 0.0705 和 $0.0879(\text{min}^{-1})$ 进行比较,发现两者仅差 0.0174 min^{-1} ,表明 DMAP 穿透膜的速度相当快。

(五) DMAP 穿透红细胞膜的可能方式

非电解质通过细胞膜有三种方式。简单扩散与易化扩散不同于主动转运,无需另外供给能量,易化扩散具有饱和性和结构特异性,扩散速率 V 随细胞外液浓度 C_e 而增长,但有一最大值 V_{max} 。简单扩散不具这种性质,扩散速率 V_0 与 C_e 为直线关系。

易化扩散速率方程^[4-6]为:

$$V = \frac{C_e}{C_e + K_m} \times V_{\text{max}}$$

将 $20^{\circ}C$ 时不同浓度 DMAP 穿透红细胞膜生成 MetHb 的速率对 DMAP 浓度作图,如图 3: 从图中可见,速率曲线为非线性的,表明 DMAP 的穿透可能为易化扩散。

(六) DMAP 通透膜速率的浓度测定法

DMAP 有强的磷光,可用磷光法测定膜外

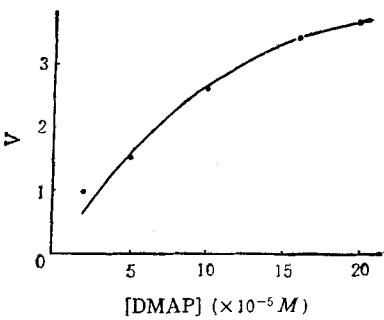


图 3 DMAP 穿透红细胞膜速率曲线

液中剩余 DMAP 量来计算 DMAP 透膜速度,进一步观察红细胞膜的通透性。

取全血 0.05 ml ,加 0.9% NaCl 0.35 ml ,在 $0-4^{\circ}C$ 加 $100 \mu\text{l}$ $10^{-3} M$ DMAP 作用不同时间,离心,将 0.1 ml 上清液与 0.3 ml 无水乙醇混合,离心,取 0.25 ml 上清液加 $30 \mu\text{l}$ $1 N \text{HCl}$,于激发/发射波长 $280/388 \text{ nm}$ 处测磷光强度。标准管取无血球的上清液与 DMAP 平行作用。计算 DMAP 浓度。

实验测得小鼠红细胞平均压积为 47% 。进入红细胞的 DMAP 量等于样品中 DMAP 的总量与血球外液中 DMAP 量二者之差。结果见表 2:

表 2 $10^{-3} M$ DMAP 穿透红细胞膜的磷光分析结果

时间 (min)	DMAP 含量 ($\times 10^{-4} \text{ mol}$)		$\ln \frac{[\text{DMAP}]_{\infty}}{[\text{DMAP}]_{\infty} - [\text{DMAP}]_t}$	回 归
	膜外	膜内		
1	0.773	0.227	0.324	$r = 0.9955$ $b = 0.153$ $t_{1/2} = 4.53(\text{min})$
2	0.676	0.324	0.502	
3	0.580	0.420	0.717	
4	0.525	0.475	0.865	
5	0.483	0.517	0.995	
6	0.455	0.545	1.090	
7	0.414	0.586	1.251	
8	0.372	0.628	1.447	
∞	0.179	0.821	—	

* $[\text{DMAP}]_{\infty}$ 代表平衡时的 DMAP 含量。 $[\text{DMAP}]_t$ 代表不同时间进入 RBC 的 DMAP 量。

从表 2 可见,DMAP 穿透红细胞膜的速度符合一级动力学反应,这与光密度法的结果是一致的。

三、讨 论

用光密度法测得 DMAP 穿透 RBC 生成

MetHb 的速率常数为 0.0705 min^{-1} ,这个过程被 DMAP 与 Hb 作用形成 MetHb 所延滞。 DMAP 实际穿透膜的速度相当快,其速率常数应为 DMAP 与 RBC 作用和直接与 Hb 作用的速率常数之和,等于 0.158 min^{-1} , $t_{1/2}$ 为 4.38 min 。这个结果恰与磷光法所得的 $K = 0.153$

min^{-1} , $t_{1/2} = 4.53 \text{ min}$ 相吻合。

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 也是高铁血红蛋白形成剂, 在它作为药物模型的实验中发现 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 不能穿透细胞膜, 只能与溶血后的 Hb 作用形成 MetHb。分析其原因, 可能是 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 分子量较大, 且为无机化合物, 脂溶性小。电离后带三个负电荷, 与膜上易化扩散系统的转运蛋白缺乏特异性结合, 甚至相斥(电荷与转运蛋白的不合), 无法通透红细胞膜, 故不能作为抗氰药使用。然而, DMAP 穿透红细胞膜的机制究竟如何, 分子结构与膜上转运蛋白的构型之间有什么关系, 还待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Weger, N.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3, 387, 1983.
- [2] 刘兰廷等:《军事医学科学院院刊》, 10(3), 229, 1986.
- [3] Price, N. C. et al.: *Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, p. 102, 1979.
- [4] 程极济等:《生物物理学》高等教育出版社, p. 150, 1981.
- [5] Kotyk, A. et al.: *Cell Membrane Transport Principles and Techniques*, 2nd ed., Plenum Press, New York, p. 75, 1974.
- [6] Hall, J. L. et al.: *Cell Membranes and Ion Transport*, Longman, London, p. 45—52, 1977.

[本文于 1987 年 2 月 19 日收到]

经验交流

垂直板型凝胶电泳灌胶时防止漏胶方法的改进

聂崇兴 陈代雄

(湖南医学院寄生虫学教研室, 长沙)

垂直板型凝胶电泳不仅用在普通凝胶电泳上, 还可用于凝胶浓度梯度电泳、SDS-凝胶电泳、SDS-凝胶浓度梯度电泳和双向电泳等方法上。垂直板型凝胶电泳比盘状电泳具有灌胶方法简单、取胶容易、电泳结果可比性强等优点。

垂直板型凝胶电泳的传统灌胶方法是在垂直板型电泳槽的前壁和玻璃板间的胶槽内灌入配制好的凝胶溶液, 让它们在室温下聚合成凝胶。灌胶前在玻板和电泳槽前壁两边涂抹凡士林后再贴合在一起, 两边夹上铁夹以封闭两边, 底端用 1% 的琼脂封闭。这种方法往往难以封闭严密, 在灌胶中容易漏胶, 有人认为这是一个难以克服的弊病, 因此许多学者在防止漏胶的方法上作了许多改进^[1-3]。我们结合他们的经验和自己多年的体会, 在防止漏胶上作了下列几点改进:

1. 改良垂直板型电泳槽, 在电泳槽的两边各贴上一条 1 cm 宽的硅橡胶条, 使之与电泳槽前壁居于同一平面。在玻板两边也各贴上一条 1.5 cm 宽的硅橡胶条, 用铁夹夹紧时, 由于硅橡胶有一定的弹性, 故两边贴合更紧密。由于凝胶板的厚度由玻板两边的硅橡胶条的厚度决定, 因此只要在不同玻板上贴不同厚度的硅橡胶条, 即可在同一电泳槽上进行不同厚度的垂直板型凝胶电泳。

2. 在两条硅橡胶条之间涂抹吸水性基质软膏(羊毛脂: 凡士林=1:1V/V), 可使之与琼脂边缘结合紧

密, 其原理可参考文献[1]。

3. 在灌胶前先灌 1—2 ml 快速聚合凝胶。由于快速聚合胶可在 1 分钟左右成胶, 故极易填补胶槽底部的微小裂隙。还由于液体的表面张力, 使快速聚合凝胶液面呈凹面, 可更好地填补胶槽中最易渗漏的左右下角。

快速聚合凝胶的配方为: 凝胶缓冲液 0.375 ml, Acr 和 Bis 贮存液 0.5 ml, 1% TEMED 1.5 ml, 1.4% AP 液 0.625 ml, 体积共 3 ml, 摇匀后应用。

4. 灌胶时, 将电泳槽置入比其稍大的有机玻璃缸或玻璃缸内, 同时往缸内注入清水, 使水面较凝胶面稍高, 可防止凝胶液压造成的渗漏。待凝胶聚合后, 取出电泳槽进行电泳。

此外, 当气温较低时, 凝胶聚合时间显著延长, 凝胶即使聚合, 也会形成所谓有缺陷的分子筛凝胶。这时可在缸中注入 25°—30°C 的温水, 即可控制凝胶在 40 分钟左右聚合。

我们通过上述四点改进, 施用于垂直板型凝胶电泳的灌胶, 取得了满意的效果。

参 考 文 献

- [1] 聂崇兴:《中华医学检验杂志》6(3), 155, 1983.
- [2] 薛建华:《生物化学与生物物理进展》(1), 78, 1986.
- [3] 张绍斌等:《生物化学与生物物理进展》(1), 68, 1984.

[本文于 1986 年 12 月 4 日收到]