

ax-cAMP-丁酯为我院药理学系王序教授提供; 本室卫之滔、于桂芬、白俊海等同志参加了有关技术工作, 谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Cho-Chung, Y. S.: in *Influences of hormones in tumor development*, Vol. 1, 55—94, CRC Press, Inc., 1979.
- [2] Prasad, K. N.: *Exp. Cell Res.*, **70**, 27, 1972.
- [3] Johnson, G. S. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **185**, 413, 1971.
- [4] Klein, D. M. et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 813, 1977.
- [5] 张孙曦等: 《生物膜的结构与功能学术讨论会论文摘要汇编》126页, 1982, 北京。
- [6] 樊景禹等: 《生物化学与生物物理进展》, **2**, 40, 1983。

- [7] 樊景禹等: 《北京医学院学报》, **2**, 81, 1983。
- [8] Williams, M. A.: in *Practical methods in electron microscopy* (ed. by A. M. Glauret), Vol. 6, Part 2, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 1977.
- [9] Froehlich, J. E. et al.: *J. Cell Biol.*, **55**, 19, 1972.
- [10] Sheppard, J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1316, 1971.
- [11] Coffino, P. et al.: *Am. J. Pathol.*, **81**, 199, 1975.
- [12] Willingham, M. C. and Pastan, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1263, 1975.
- [13] Trotter, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 8781, 1979.
- [14] Iuly, P. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **282**, 447, 1972.
- [15] Grinnell, F. et al.: *J. Cell Biol.*, **66**, 470, 1975.
- [16] Skutelsky, E. et al.: *J. Cell Biol.*, **43**, 8, 1969.

[本文于1983年12月5日收到]

^{60}Co γ 射线对人红血球光散射特性的影响

薛良琰 张仲伦

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

关于辐射引起红血球溶血以及膜的通透性和流动性增加方面的工作, 国内外已有很多报道^[1-3]。本文报道一种红血球膜受射线照射后发生变化的散射光强度测定法, 并探索散射光随剂量变化与细胞膜结构和功能变化之间的关系。

一、材料和方法

红血球取自健康的人血。离心除去血浆后, 再用 pH7.4 的缓冲液洗两次, 然后配制成红细胞压积为 0.50 的红血球悬浮液, 存放于冰箱中备用。

按程龙生等人^[3]的方法除去血红蛋白的红血球影 (ghost)。缓冲液用 PBS 溶液。

实验所用的缓冲液有四种: Tris-KCl 缓冲液 (即 153mM KCl + 17mM Tris), Tris-NaCl 缓冲液 (153mM NaCl + 17mM Tris), PBS 缓冲液 (5mM PO_4^{3-} + 150mM NaCl), 生理盐水 (0.9% NaCl)。

压积为 0.50 的红血球样品用缓冲液稀释

到适当浓度, 然后用 ^{60}Co γ 射线在室温下照射, 剂量率为 1Krad/min。浓度为 100 μg 膜蛋白/ml 的红血球胞影在同样条件下照射。照射后样品和对照样品在冰箱中存放 24 小时后测量光散射强度。

散射光强度是用生物物理所研制的荧光分光光度计在与入射光成 90 度方向上测量的。

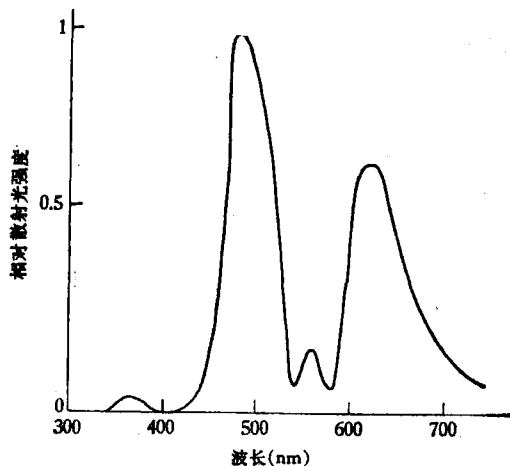


图 1 散射光强度随激发波长变化

光散射强度随溶液性质和激发波长而变化。图 1 表示人红血球悬浮液的散射光强度与激发波长的关系。

本工作选择激发波长为 620nm, 因为在此条件下散射光较强, 且强度随波长变化较小。

为研究散射光强度变化与溶血和细胞膜表面结构破坏之间的关系, 我们测量了照射前后的溶血, 并拍摄了扫描电镜照片。溶血程度的测量是把红血球悬浮液以 2000 转/分离心 20 分钟, 然后将上清液稀释到适当浓度, 再用紫外分光光度计测 415nm 处的吸收峰高度, 溶血度以用蒸馏水处理的全溶血组血红蛋白量作 100%, 然后用计算的相对血红蛋白量来表示。扫描电镜使用日本产的 JSM-35CF。

二、实验结果

1. 红血球散射光强度随照射剂量增加而减小

图 2 是压积 0.50 的人红血球, 用 Tris-KCl 缓冲液稀释 100 倍, 及浓度为 $100\mu\text{g}$ 膜蛋白/ml 的胞影, 用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射 24 小时后所测散射光强度与剂量关系。由图可见, 胞影的光散射强度与剂量几乎无关, 而红血球散射光强度随剂量增加而下降。对 Tris-KCl 缓冲液, 照射 10 Krad 后的散射光强度减小将近一半, 而照射 60 Krad 后降至对照组的 1.2%, 超过 60 Krad 后的光强度趋于稳定值。对 PBS 缓冲液, 在初始段散射光强度随剂量变化不如 Tris-KCl 缓冲液明显。当使用 Tris-NaCl 缓冲液时, 得到与 Tris-KCl 相近的结果, 而用生理盐水时得到类似于 PBS 的结果。关于不同缓冲液间的行为差异, 有待进一步探讨。

2. 红血球浓度对光散射特性的影响

图 3 表示压积为 0.50 的人红细胞用 Tris-KCl 缓冲液稀释 200 倍、100 倍和 66 倍(相对浓度分别为 0.25%、0.50% 和 0.75%) 后所测光散射特性与剂量关系。由图可见, 在 0—20 Krad 剂量范围, 三条曲线几乎重合, 因此在较低剂量范围内, 浓度的影响可忽略。但随剂量增加, 浓度越高, 相对散射光强度越小。超过

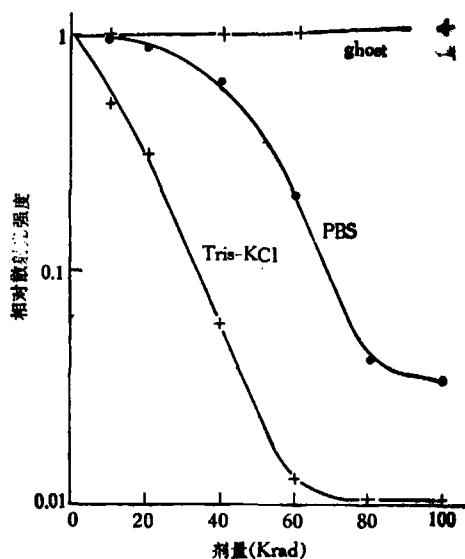


图 2 散射光强度与剂量的关系

纵坐标是以对照组为 100% 的相对散射光强度。

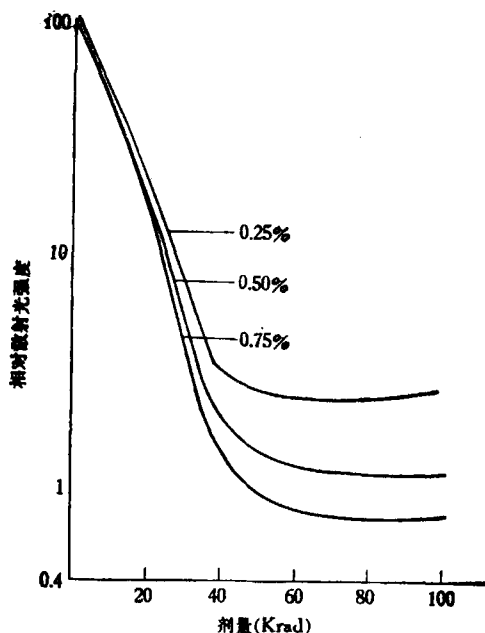


图 3 散射光强度随剂量变化与红血球浓度的关系

60 Krad 后, 分别趋于各自的稳定值; 浓度高的样品所趋的稳定值低。这是由于未照射的样品, 浓度高的散射光强度较高所造成的。

3. 红血球散射光随剂量变化的时间效应

图 4 为未照射的、10Krad 及 40Krad γ 线照射后的人红血球不同时间的散射光强度, 图 5 是照射后 4 小时、24 小时、28 小时和 48 小时

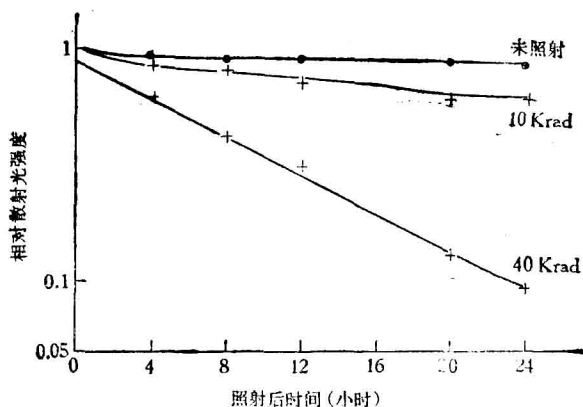


图 4 散射光强度随照射后时间的变化

的红血球散射光强度与剂量关系。

图 4 表明,对照组在 24 小时内散射光强度变化很小,照射组随剂量增加,散射光的时间效应也增大。然而照射后 24 小时,10Krad 组的曲线已趋于平坦,40Krad 组,照后 24 小时散射光随时间变化已较小。图 5 也表明,照射后 4 小时所测曲线与其它三条有明显差别,而过 24 小时后各剂量组的结果基本类似。因此我们选择照射后 24 小时进行测量,获得了良好的重复性。

4. 散射光强度变化与溶血的关系

图 6 中曲线可分 0—20Krad; 20Krad—60 Krad; 60Krad 以上。这三部分曲线有不同的斜率,这表明在不同的剂量范围内,散射光强度与溶血有不同的依赖关系。

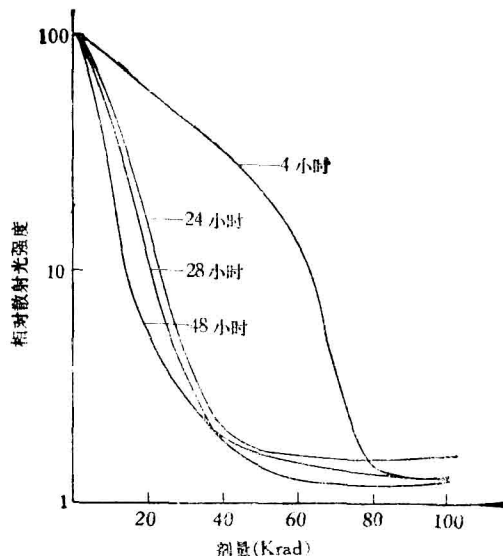


图 5 照射后不同时间所测散射光强度与剂量关系

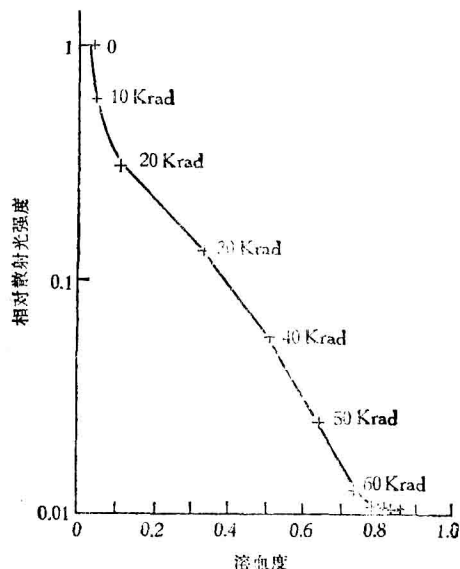


图 6 散射光强度与溶血的关系



图 7 人红血球扫描电镜照片

a. 对照(8000 $\times$); b. 20Krad 照射(10000 $\times$); c. 40Krad 照射(3000 $\times$).

5. 辐射对红血球膜表面结构的破坏

图7为正常的及 γ 线照射后的人红血球扫描电镜照片。可以看出,辐射导致红血球膜结构明显破坏。

三、讨 论

1. 辐射引起红血球散射光特性变化的可能原因。

在悬浮溶液中,一种分子量为 M 、浓度为 C 的粒子溶液所产生的散射与乘积 CM 成正比,因此小颗粒的散射能力比大颗粒小。此外,一个伸展了的粒子的散射强度比紧密的同分子量粒子要小^[4]。据此,图2、图3中曲线下降或表示红血球在质量不变情况下的膜松弛,或表示红血球质量变小(溶血或膜破损)。

我们从图6看到,在0—20 Krad 剂量范围内溶血很少,而散射强度急剧下降(20Krad 照射后散射强度降至对照组的30%),这说明在较低剂量范围内的散射强度变化与溶血近乎无关。这可能是由于红血球受照射后对缓冲液中水的通透性增加,导致细胞体积增大(但血红蛋白未流出),因而散射光强度下降。从图7的照片可看到,正常人红血球表面很光滑,而受20 Krad 照射后的红血球表面十分粗糙,出现很多颗粒状的皱纹,细胞膜明显地变得很松弛。这表明红血球膜结构变化也是散射光强度下降的原因之一。

图6,在20 Krad—60 Krad 剂量范围内,散射光强度基本随溶血度增加而呈指数下降,在此范围内,除上述的膜通透性增加及膜表面结构变化外,溶血对光散射下降也起重要作用。由于血红蛋白的散射光比红血球几乎小十个量级,从红血球中流出的血红蛋白对散射的影响

可忽略。因此散射光变化主要由红血球引起,因溶血使红血球质量变小,以致散射光强度下降。从图7看到,受40 Krad 照射后的红血球几乎完全破损,破损后的红血球碎片比原来小很多。

图2和6都表明,对 Tris 缓冲液,当剂量超过60 Krad 时,散射光强度下降缓慢,且渐趋于稳定值。这是因为此时血红蛋白已几乎全部流出,红血球只剩碎片(或胞影),剂量再增加,悬浮液中碎片的大小、密度、数量等不再变化。

2. 为进行比较,我们也测定了红血球胞影受照射后散射光强度与剂量关系。实验结果表明,当照射剂量高达100 Krad 时,其散射光强度与对照组无明显差别。这说明,胞影受照射后损伤情况与红血球不完全一样,因此用红血球做离体实验比胞影更接近于整体损伤情况。

3. 红血球散射光强度敏感地随照射剂量而变化,它综合反应了红血球膜受照后功能和结构的变化。红血球散射光与剂量的关系曲线类似于细胞存活曲线,因此散射光强度是一项能反应红血球受射线照射后损伤情况的指标,且测量方法简便。

本工作得到沈淑敏教授、程龙生教授的直接指导,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Shozo, Suzuki: *Int. J. Radiat. Biology*, Vol. 34, (6) 1978, P. 513.
- [2] Yonei, S.: *Radiat. Res.*, 75, 1978, p.31.
- [3] 程龙生等:《实验生物学报》,1983年,第4期.
- [4] Van Holde, K. E.: *Physical Biochemistry*, 1971.

[1983年12月5日]