

某些抗氧化剂对体外辐射诱导的红细胞钾离子渗漏的影响

陈 媛 孔 华

(第一军医大学, 广州)

脂质体辐射研究^[1]说明钾离子的渗漏量是照射剂量的函数, 并与脂质过氧化物的生成相平行。Kocmierska Grodzka^[2]对全身照射大鼠肝体外灌注试验观察到灌注液中钾离子含量增加, 并与肝溶酶体脂质过氧化物含量升高相关。Prince 等^[3]对缺乏和不缺乏维生素 E(VE) 小鼠的红细胞(RBC)体外辐射研究发现, 前者钾离子的渗漏远较后者为明显。以上事实说明, 辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏与 RBC 膜的脂质过氧化作用有关。辐射脂质过氧化作用的特点之一是剂量率效应^[4]。最近 Konings^[5]报道了辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏与剂量率有关。本文目的是对体外辐射诱导 RBC 钾离子渗漏的规律及某些抗氧化剂的保护作用进行研究。

一、材料和方法

1. RBC 悬液的制备及照射条件 体重为 120—300 克正常雄性大鼠, 断头取血(肝素抗凝), 离心分离 RBC 并以生理盐水洗涤三次, 最后一次以 3000 转/分离心 30 分钟, 用生理盐水制成 50% 压积的 RBC 悬液。RBC 悬液按用量盛于 10ml 带塞圆底离心管中, 分成○号管 and 不同剂量照射管。照射条件为 ⁶⁰Co γ 源, 中心距离 20 cm, 剂量率为 750 伦/分。

2. 试剂及测定方法 抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)(BDH)、维生素 C(VC)(分析纯广州化学试剂厂)和 VE(DL-2-to-Tocopherol)(E.Merck)以及小牛血清按与 RBC 共同温育所要求的最终浓度配制成不同浓度的生理盐水溶液。VE 溶液经超声处理(cps-1 型超声波机)10 分钟。

取 50% 压积的 RBC 悬液 0.2 ml 加入 1.8 ml 生理盐水或抗氧化剂溶液或小牛血清。所得的 5% 压积的 RBC 悬液, 在 37° 或 4 °C(冰箱)温育一定时间后离心分离上清液, 取 0.2 ml 以锂为内标的稀释液(S₃₃₈₆)稀释 25 倍。在丹麦制 FLM 3 型火焰光度计上测定钾含量。100% 钾离子渗漏管是由 50% 压积的 RBC 悬液 0.2 ml 加 1.8 ml 重蒸馏水使之全溶。溶解液离心后, 取 0.2ml 上清液以锂为内标的稀释液稀释 100 倍。

二、结果与讨论

1. RBC 钾离子渗漏量与照射剂量、温育温度和温育时间的关系 表 1 和 2 所示分别为 RBC 在不同剂量照射后在 4 °C 和 37°C 温育不同时间后钾离子渗漏率变化。渗漏率计算以全溶血钾离子含量为 100。

表 1 RBC 在不同剂量照射和 4°C 温育不同时间后钾离子渗漏率(%)的变化

照射剂量 (千伦)	温育时间(小时)		
	1	24	48
0	3.44	10.07	16.39
5	4.67	15.11	25.54
20	7.74	30.30	50.12
50	11.92	62.40	81.45
100	14.13	80.71	95.78

由表 1、2 可见 RBC 钾离子的渗漏率随着照射剂量和温育时间的增加而增加。但在不同温育温度时增加的幅度则不同。如在 37°C 温

表 2 RBC 在不同剂量照射和 37℃ 温育不同时间后钾离子渗漏率(%)的变化

照射剂量 (千伦)	温育时间(小时)			
	0.5	1	2	4
0	5.50	9.63	11.88	22.75
5	6.25	11.50	14.00	24.25
20	8.88	12.13	17.38	27.00

育时 RBC 钾离子渗漏率的增加较 4℃ 为快。以 0—2 万伦为例 37℃ 温育 4 小时的渗漏率达 22—27%；4℃ 温育 24 小时才达 10—30%。但在 37℃ 温育的各时间组随着照射剂量的增加，RBC 钾离子渗漏率的增加则远较 4℃ 温育的缓慢。以 5 千和 2 万伦为例，4℃ 温育各时间组钾渗漏率增加都近达 1 倍；37℃ 温育各时间组渗漏率的增加只及 0.1—0.4 倍。37℃ 温育钾离子的渗漏率随温育时间延长增加较快，可能与升高温度加速了脂质过氧化反应有关。

但为什么在 4℃ 温育时，RBC 钾渗漏率随照射剂量的增加而增加的幅度远较在 37℃ 温育时为明显，值得进一步探讨。

2. 水溶性抗氧化剂 VC 和 GSH 对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏的影响 由表 3 可见，4℃ 温育 24 小时 VC 对 RBC 自发性钾离子渗漏有一定的保护作用，5 mM VC 可使钾离子渗漏率降至 77.88%。但对辐射诱导 RBC 钾离子渗漏的影响则不明显，当浓度较大时显示相反作用，特别是在照射剂量较大时。GSH 在本实验剂量范围内不论是对自发性还是辐射诱导 RBC 钾离子渗漏均无效，较大剂量 (5 mM) 时呈现明显的反作用。

在 37℃ 温育下(表 4) 1mM 的 VC 和 GSH 对 RBC 钾离子的渗漏都无作用。文献资料[4]说明水溶性抗氧化剂只是在照射时与生物体同时存在才有保护作用，照后应用无作用。VC 和 GSH 在较大剂量时出现的反作用可能是，在这

表 3 4℃ 温育 24 小时 VC 和 GSH 对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量 (千伦)	对 照	VC(mM)			GSH(mM)		
		0.05	1	5	0.05	1	5
0	100	91.15	86.73	77.88	111.34	124.74	222.68
5	100	97.10	95.65	121.02	107.86	109.29	210.00
20	100	97.86	91.88	141.03	102.09	102.51	172.80

表 4 37℃ 温育不同时间 VC 和 GSH 对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量(千伦)	温育时间(时)	对 照	VC(1mM)	GSH(1mM)
0	1	100	116.92	118.46
	4	100	100.68	108.16
20	1	100	114.86	116.22
	4	100	97.02	98.53

表 5 4℃ 温育 24 小时 VE 对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量(千伦)	VE μ g				
	0	5	50	250	500
0	100	104.41	104.41	104.41	105.88
5	100	101.96	100.98	98.04	113.73
20	100	96.08	86.76	95.10	84.31
50	100	97.53	86.81	83.79	84.07

样的浓度时,它们作为还原剂与 RBC 络合铁共同作用成为脂质过氧化作用的引发剂^[6,7],从而加重了 RBC 膜的损伤。

3. 脂溶性抗氧化剂 VE 对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏的影响 由表 5、6 可见,4℃ 温育 24 小时对 RBC 自发性钾渗漏无作用,对辐射诱导的 RBC 钾渗漏,当剂量大至 2—5 万伦时显示一定的保护作用,而且大剂量 VE 较小剂量 VE 明显。但在 37℃ 温育时对自发性和辐射诱导的 RBC 钾渗漏都无效。文献报道 VE 是有效的抗氧化剂,对体外照射的 RBC 有明显的保护作用,但实验都是用缺 VE 动物 RBC 作模型或 RBC 照射后再受 H₂O₂ 攻击^[4]。

4. 小牛血清对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏的影响 文献中提到小牛血清对辐射诱导的 RBC 脂质过氧化作用有很好的抗性^[3,8]。我们用不同浓度小牛血清对辐射诱导的 RBC 钾渗漏的保护作用进行了研究。由表 7 和表 8 可见,它对 RBC 钾渗漏在 4℃ 时的保护作用与 37℃ 相比较很不明显,而且随着浓度的增加保护作用也无明显改变。但 37℃ 温育则有明显保护作用,可使钾的渗漏率减低到 20% 左右。其特点是,随着小牛血清浓度增加,保护作用也随之增加;对自发性钾渗漏的保护作用要比辐射诱导的明显;对较小剂量照射的保护作用又较对大剂量照射的显著以及随着温育时间的增加保护效果不断下降。

表 6 37℃ 温育不同时间 VE 对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量 (千伦)	温育时间 (时)	VE μ g		
		0	50	500
0	1	100	109.09	106.82
	4	100	111.47	109.17
20	1	100	104.35	101.74
	4	100	107.80	104.96

为了进一步了解小牛血清中的抗氧化物是否进入膜内,预先将小牛血清与受照 RBC 37℃ 温育 1 小时后,用生理盐水洗涤二次,再温育 4 小时,观察其保护作用(表 9)。由表可见随着

表 7 4℃ 温育 24 小时小牛血清对辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量 (千伦)	血清浓度(%)			
	0	0.5	5	20
0	100	86.08	70.89	74.19
5	100	81.51	78.15	87.31
20	100	101.51	92.96	92.64

表 8 37℃ 温育不同时间小牛血清对辐射诱导的钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量 (千伦)	温育时间 (时)	血清浓度(%)		
		0	5	20
0	0.5	100		20.95
	1	100		37.66
	2	100		49.91
	4	100	87.36	55.49
5	0.5	100		40.00
	1	100		40.22
	2	100		50.89
	4	100	90.72	55.67
20	0.5	100		53.52
	1	100		53.61
	2	100		59.71
	4	100	99.07	62.04

表 9 小牛血清与受照 RBC 37℃ 温育 1 小时对其钾离子渗漏率(%)的影响

照射剂量(千伦)	血清浓度(%)	
	0	20
0	100	96.94
20	100	96.11
50	100	86.74
100	100	81.82

照射剂量的增加,显示一定的保护作用,如再经 20% 小牛血清 37℃ 预先温育 1 小时 10 万伦照射,可使钾渗漏降低到 81.82%。似乎说明小牛血清中的抗氧化物已有部分进入膜内。

关于小牛血清抗脂质过氧化作用的机理,Prince 等^[3]根据小牛血清与受照射的缺 VE 小

鼠 RBC 共温育具有很好的抗溶血作用,提出小牛血清的作用在于它含有较高量的 VE。但我们的实验结果说明 VE 对受照射 RBC 的钾渗漏无保护作用。本实验也表明 GSH 在 37℃ 温育时无保护作用,说明小牛血清的保护作用与巯基化合物无关。

根据不同温度温育时辐射诱导的 RBC 钾离子渗漏率变化、小牛血清在 37℃ 温育时有明显的保护效果及保护作用、小牛血清与受照 RBC 预先 37℃ 温育 1 小时对以后钾的渗漏有保护作用等特点,我们推测,小牛血清的保护作用可能与酶物质有关;或是一种酶物质,或是某种成分进入 RBC 通过其中的酶物质发挥保护作用,

用,或二者兼有。这有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Кравцов, Г. М. Др: *Радиобиол.*, **16** (5) 762, 1976.
- [2] Kocmierska Grodzka: *Pharmacol. Dept. Med. Acad.*, **143**(6), 705, 1972.
- [3] Prince, E. W. et al.: *Radiat. Res.*, **52**, 49, 1973.
- [4] 陈媛,周玫:《中华放射医学与防护杂志》**4**(6)63, 1984.
- [5] Konings A. W. T.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **40**(4), 441, 1981.
- [6] Tappel, A. L.: *Fed. Proc.*, **32**(8), 1870, 1973.
- [7] Mead, J. F.: in "Free Radicals in Biology" (Pryor, W. A. ed.), Vol. 1, 51, Academic Press, New York, 1976.
- [8] Myers, D. K. et al.: *Radiat. Res.* **27**, 250, 1966.

[本文于1984年1月15日收到]

技术与方法

电 场 诱 导 细 胞 融 合^[1,2]

汪 和 睦

鲁 玉 瓦

(南开大学 物理系)

(南开大学 生物系)

细胞在电场中极化成偶极子,并沿电力线排列成串;在加直流脉冲后,膜被击穿而导致融合。这是一种空间定向、时间同步的可控式的细胞融合新技术。

膜的融合是自然界中可以广泛观察到的一种现象。分泌、胞饮、次生溶酶体的形成、受精以及肌纤维的形成等,都涉及膜的融合过程。而离体细胞融合在膜的研究、膜重组和基因图谱方面,都有重要的应用。种间和种内不同体细胞的融合,能产生具有新的性质、有生活力的杂种细胞,这对植物育种和工业微生物育种具有重要的意义。通过细胞杂交来培养出高产作物、固氮作物、耐盐碱作物,也具有诱人的前景。在医学方面,用骨髓瘤细胞和淋巴细胞杂交,已成为生产单克隆抗体的有效途径。

近廿多年来,细胞融合已崛起而成为一项主要的细胞工程学技术。1958年日本的冈田善雄发现灭活的仙台病毒可以诱发细胞融合,

几年内就发展成为细胞融合的一种标准方法。从1970年后,采取高浓度钙离子、聚乙二醇(PEG)等化学诱导因子也取得相当的成效,足以使人期望,能随意地融合各种各样的细胞,并可避免被未安全灭活的病毒所感染^[3]。

寻找更理想的诱导剂和诱导方法,一直是细胞融合研究的中心问题之一^[4]。1980年西德的 U. Zimmermann 首先报告了电场诱导细胞融合的新技术,简要地说,就是细胞在电场中极化成偶极子,并沿电力线排列成串,在加直流脉冲后,膜被击穿而导致细胞融合。

这种目前仍处于初创阶段的生物技术具有明显的特点。它以空间定向、时间同步的可控方式实现细胞融合;改变了病毒和化学诱导的