

研究工作

邻苯三酚对红细胞膜的过氧化损伤作用

秦德安 何学民 王永江*

(华东师范大学生物系)

提 要

本文用邻苯三酚碱性条件下自氧化产生的超氧阴离子自由基 (O_2^-) 处理分离的红细胞膜,研究外源自由基对红细胞膜的过氧化作用。结果表明,邻苯三酚对红细胞膜结构和功能有明显的损伤作用,导致膜流动性下降,膜荧光物质增加,膜蛋白发生交联作用以及膜重新封闭能力下降。

超氧阴离子 (O_2^-) 是生物体内主要的自由基,通过自由基反应引起细胞膜过氧化,导致膜的损伤和破坏^[1]。由于细胞膜过氧化反应在体内的进程很难掌握,故本文用邻苯三酚碱性条件下自氧化产生的 O_2^- 处理分离的红细胞膜,以研究外源自由基对红细胞膜上脂质和蛋白质的过氧化作用。结果表明,邻苯三酚对红细胞膜有明显的过氧化损伤作用,因此可作为一种研究膜过氧化损伤的实验模型,为进一步研究膜老化机理以及寻找新抗衰老药物提供理论依据。

材料与方 法

1. 人红细胞来自苏州中心血站。红细胞膜按低渗溶血方法制备^[2],但缓冲液改用 pH8.4, 5mmol/L 磷酸缓冲液 (简称 5P8.4), 最后用 5P8.4 缓冲液稀释为 1:5 膜悬浮液备用;取 5ml 红细胞膜悬浮液 (pH8.4) 加入一定量新鲜配制的 1mol/L 邻苯三酚溶液 (邻苯三酚为分析纯),混匀后于 37℃ 水浴保温 10 分钟,立即用 6 倍的 pH7.4, 10mmol/L 磷酸缓冲液稀释并离心 (15000rpm, 4℃) 40 分钟,沉淀为过氧化红细胞膜;封闭红细胞膜制剂按等渗法制备^[3]。

2. 膜脂流动性以荧光试剂 DPH(1,6-二苯基-1, 3, 5-己三烯, Fluka, AG 产品)为探针,用日立 850 型荧光分光光度计测定 DPH 荧光偏振度^[4],激发波长为 362nm,发射波长为 432nm,仪器在测定过程中对 G 因子作了自动校正。

3. 荧光物质测定,基本按 Dodge^[2] 报道的方法即甲醇:氯仿(1:2)混合液提取膜脂质,并用日立 850 型荧光分光光度计测定抽提液(氯仿相)中红细胞膜荧光物质含量,激发波长 360nm,狭缝 4nm,发射波长 440nm,狭缝 8nm,以甲醇:氯仿(1:2)为空白对照,以 0.05 μ g/100ml 奎宁的 0.05mol/L H_2SO_4 溶液为标准荧光单位。

4. 膜蛋白交联的测定,按 Fairbanks^[5] 方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶板状电泳分离红细胞膜蛋白,经考马斯亮蓝染色,用 Beckman CDS-200 光密度计 530nm 处测定膜蛋白组份相对百分含量并扫描膜蛋白电泳图谱。

5. 红细胞膜封闭度按 Steck 报道的酶法^[6]测定。

* 浙江省丽水师专进修教师。

结 果

1. 邻苯三酚对红细胞膜流动性的影响

取不同剂量邻苯三酚处理过的红细胞膜加入 DPH 荧光探针测定荧光偏振度 (P 值), 而 P 值与 η (微粘度) 的定量关系为 $\eta = 2P / (0.46 - P)$, 因此由 P 值可计算 η , 而 η 越大, 流动性越小。红细胞膜荧光偏振度与邻苯三酚剂量的关系如图 1 所示。邻苯三酚浓度在 1mmol/L 以上对红细胞膜荧光偏振度产生较大影响, 使 P 值增高, 即微粘度增加。其中 10mmol/L 的影响反低于 5mmol/L 可能与邻苯三酚氧化后使溶液呈浅棕色干扰测定有关。

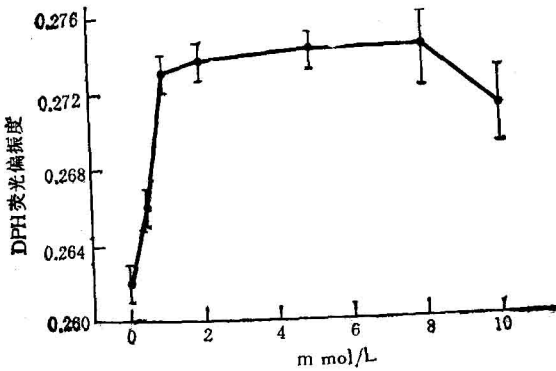


图 1 不同剂量邻苯三酚对红细胞膜荧光偏振度的影响

2. 荧光物质含量变化

已知膜脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 能与磷脂交联形成一系列荧光物质, 统称褐脂质^[6], 因此可用膜荧光物质质量来衡量膜脂质的过氧化程度。实验表明, 红细胞膜经 5mmol/L 邻苯三酚处理后荧光物质明显增加 ($P < 0.01$), 含量为 3.66 ± 0.1 荧光单位/gHb ($n = 5$), 而对照组红细胞膜荧光物质含量为 2.11 ± 0.01 荧光单位/gHb ($n = 7$)。

3. 膜蛋白交联作用

红细胞膜经 1mmol/L, 5mmol/L 和 10mmol/L 邻苯三酚处理后在 SDS-PAGE 的原点附近清晰地出现一条高分子聚合物(HMP)区带(图 2, 3)。由表 1 可见, 这区带的百分含量与邻苯三酚剂量有一定关系, 正常红细胞膜

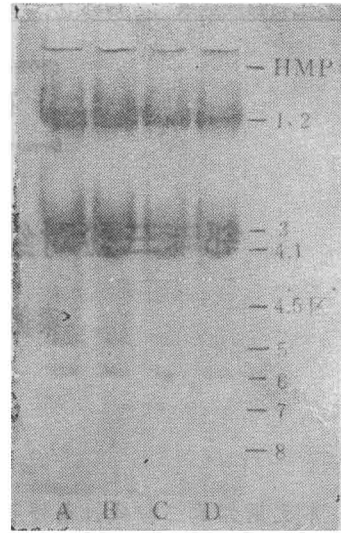


图 2 人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 图谱

A 为正常红细胞膜, B 为经 1mmol/L 邻苯三酚处理, C 为 5mmol/L 邻苯三酚处理, D 为 10mmol/L 邻苯三酚处理。电泳条件: 1% SDS, 5.6% 聚丙烯酰胺凝胶, 膜蛋白浓度均为 75 微克, 电压 100V, 电流 42mA, 电泳时间 3.5 小时。

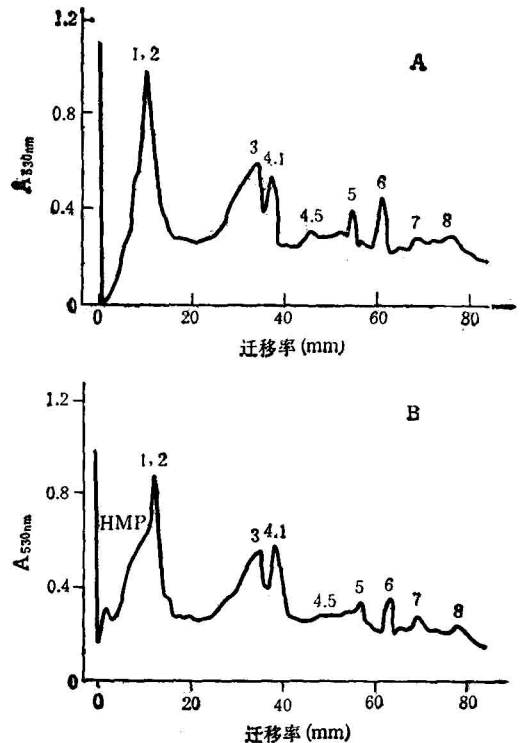


图 3 人红细胞膜蛋白 SDS-PAGE 扫描图谱

A 为正常红细胞膜, B 为经 5mmol/L 邻苯三酚处理红细胞膜。

中 HMP 为 0, 经 5mmol/L 邻苯三酚处理产生的 HMP 为 5%, 比 1mmol/L 邻苯三酚处理的样品高 1 倍, 而邻苯三酚浓度增加到 10mmol/L 时, HMP 量反而有所下降, 为 4.7%。其他膜蛋白含量变化不大, 但收缩蛋白(带 1, 2 蛋白)有明显减少。

4. 邻苯三酚对红细胞膜封闭度的影响

红细胞膜在等渗溶液中能重新封闭起来, 恢复对大分子和阳离子的渗透屏障, 形成封闭影泡 (resealed ghost)。这时, 位于膜内侧表面的 NADH-K₃Fe(CN)₆ 氧化还原酶活力不能检

测, 经表面活性剂(皂素)处理后, 即可消除渗透屏障, 显示其最大酶活力。根据这一原理, 封闭度可按下式计算:

$$\text{封闭度}(\%) = \frac{\text{加皂素酶活力} - \text{不加皂素酶活力}}{\text{加皂素酶活力}} \times 100$$

由表 2 可见, 经 5mmol/L 邻苯三酚处理的红细胞膜丧失重新封闭能力, 其平均封闭度为 11.8% 左右, 而正常红细胞膜制剂封闭度为 55.1% 左右。

表 1 人红细胞膜蛋白组分百分含量变化*

膜蛋白区带		HMP	1,2	3	4,1	(4,5,5)	6	7	8
正常红细胞膜		0	26.0	26.4	6.1	18.6	7.0	6.4	9.5
邻苯三酚剂量	1mmol/L	2.5	23.4	25.5	7.4	18.3	7.8	6.6	8.3
	5mmol/L	5.0	24.0	27.1	6.6	17.5	5.1	6.6	7.6
	10mmol/L	4.7	24.2	26.4	6.1	17.6	7.5	5.8	7.7

* 已扣除 Hb.

表 2 邻苯三酚对人红细胞膜封闭度的影响

红 细 胞 膜	NADH-K ₃ Fe(CN) ₆ 氧化还原酶活力* ($\bar{X} \pm SD$)		-封闭度 (%)
	-皂素	-皂素	
对照(不加邻苯三酚)	0.0057 ± 0.0013 (n = 7)	0.0127 ± 0.0033 (n = 7)	55.1
样品(加邻苯三酚)**	0.0097 ± 0.0013 (n = 7)	0.011 ± 0.0013 (n = 7)	11.8

* 相对酶活力 = $\Delta O \cdot D / \text{min}$.

** 经 5mmol/L 邻苯三酚 37°C, 10 分钟处理。

讨 论

邻苯三酚在碱性(pH8.3 左右)条件下自氧化能产生超氧阴离子自由基(O₂⁻)^[7]。O₂⁻ 寿命极短, 可通过连锁反应产生羟自由基(OH·), 单线态氧(¹O₂)和过氧化氢(H₂O₂), 这些活性氧能直接或间接促使细胞膜过氧化, 并导致膜结构和功能的损伤^[1]。红细胞膜经邻苯三酚处理后, 膜脂流动性下降; 膜蛋白交联形成高聚物(HMP); 膜上荧光物质(脂质过氧化产物)含量增加; 膜重新封闭能力丧失。上述变化表明, 邻苯三酚通过自由基反应对红细胞膜有明显的损伤作用。

关于自由基反应对细胞膜的作用机理可以从两方面阐述: (1) Carrel^[8] 认为自由基反应引起膜中脂质发生过氧化形成丙二醛(MDA), 而丙二醛与膜蛋白或脂质上的游离氨基交联形成 Schiff's 碱, 导致膜结构的改变。本文结果膜流动性下降, 反映了膜结构的损伤。丙二醛还可与磷脂交联, 使膜上荧光物质含量增加^[6]。(2) 自由基反应可直接作用于膜蛋白质, 造成肽链断裂或交联。Hochstein 指出^[9]细胞受氧化损伤时, 膜上收缩蛋白(Spectrin)易与带 4.1 蛋白交联形成高聚物(HMP)。由表 1 可见, (下转第 114 页)

由能成线性关系,进一步研究还发现蛋白质中残基的疏水自由能与其可及性之比近似为 25 Cal/Å²[12]。这样,在不同的生化过程中,只要计算出可及性的变化值,就有可能探索到溶剂和疏水性所起的作用。例如,当蛋白质卷曲和交联时,通过对可及性变化的估计,可以显示出在盘绕和聚合过程中,疏水性是一种主要的作用因素。

此外,人们运用可及性这一重要概念,讨论和计算了蛋白质分子面积、体积和堆积密度。为揭示生物大分子的结构特征以及结构-功能关系做出了许多有益的工作。饶有兴趣的是可及性还可以为确定反应位置提供依据。近来,已经开始利用计算机来研究蛋白质可及性与静电势的关系,讨论不同 pH 下蛋白质分子可及性的变化情况,使可及性的生物学意义越来越明显。

参 考 文 献

[1] Lee, B. and Richards, F. M.: *J. Mol. Biol.*, 1971,

- 55, 379.
 [2] Richards, F. M.: *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, 6, 151.
 [3] Shrake, A. and Rupley, J. A.: *J. Mol. Biol.*, 1973, 79, 351.
 [4] Connolly, M. L.: *QCPE Bull.*, 1981, 1, 75.
 [5] Connolly, M. L.: *Science*, 1983, 221, 709.
 [6] Finney, J. L.: *J. Mol. Biol.*, 1978, 119, 415.
 [7] Richards, T. J.: *J. Mol. Biol.*, 1984, 178, 63.
 [8] Wedak, S. J. and Janin, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 1736.
 [9] Lesk, A. M. and Rose, G. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 4043.
 [10] Micheal, H. et al.: *Biopolymers*, 1985, 24, 2511.
 [11] Chothia, C.: *Nature (London)*, 1975, 254, 304.
 [12] Chothia, C.: *J. Mol. Biol.*, 1976, 105, 1.
 [13] McDonald, M. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1985, 183, 105.
 [14] Tüchsen, E. and Woodward, C.: *J. Mol. Biol.*, 1985, 185, 421.
 [15] Cohen, F. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1982, 156, 821.
 [16] Lesk, A. M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1985, 183, 267.

[本文于 1987 年 4 月 25 日收到]

(上接第 123 页)

红细胞膜经不同剂量邻苯三酚处理后,均出现 HMP,同时收缩蛋白(带 1,2 蛋白)减少。说明 HMP 的出现与收缩蛋白减少有一定的对应关系,但 HMP 的出现究竟是 O₂⁻ 直接作用还是其它活性氧作用的结果还有待进一步研究。

由于红细胞膜上蛋白质和脂质的过氧化,必然导致膜功能的改变。由表 2 可见,氧化红细胞膜丧失重新封闭能力(封闭度为 11.8%)。我们曾经报道^[3]红细胞重新封闭能力与细胞“年龄”有关。随着细胞老化,红细胞失去重封闭能力(年轻红细胞膜封闭度为 92.9%,老化红细胞膜封闭度为 35.7%)。由此启示老化红细胞膜不能重封闭的原因可能与膜的过氧化损伤有关。

综上所述,邻苯三酚能通过自由基反应直接或间接地引起红细胞膜脂质和蛋白质过氧化导致膜损伤,因此可作为研究衰老机理的参考。

同时,由于邻苯三酚对红细胞膜体外反应重复性好,方法简便,拟可作为一种膜过氧化损伤实验模型验证和筛选抗衰药物。

刘光万、尤永进同学参加部分测试工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 曹锡清等:《生物化学与生物物理进展》,1986,2,17。
 [2] Dodge, J.T. et al.: *Arch. Biochem Biophys.* 1963, 100, 119.
 [3] 秦德安等:《生物化学与生物物理进展》,1986,5,56。
 [4] 林克椿,袁松清:《生理科学进展》,1985,1,83。
 [5] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry.* 1971, 10 (13), 2607.
 [6] Kiyomi, K. et al.:《卫生化学》(日文),1984,30,333。
 [7] Marklund, S. et al.: *Eur. J. Biochem.* 1974, 47, 469.
 [8] Carrel, W. R.: *Brit. J. Haematol.* 1975, 30, 259.
 [9] Hochstein, P.: *Federation Proceeding.* 1981, 40, 183.

[本文于 1987 年 5 月 18 日收到]