

研究工作

Zn 对细胞保护作用机理的研究*

章净霞 黄萍 徐世文 安丽芝

(北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

肖延安 潘巨祥 巢志瑜

(北京正负电子对撞机同步辐射实验室, 北京 100039)

姚惠英

(复旦大学核科学系, 上海 200433)

朱节清 邬显慷

(上海原子核研究所, 上海 201800)

摘要 应用扫描质子微探针和同步辐射 X 荧光分析技术测定了细胞中元素的分布和组成, 为确定 Zn 是细胞结构成分提供了直接的实验依据. 用上述核技术结合有关生化指标, 分析测定了正常和损伤细胞(脂质过氧化损伤)中 Fe, Zn 和丙二醛、SH 基含量变化的相互关系. 实验结果表明, 当细胞发生脂质过氧化损伤时, Fe 含量和丙二醛含量同步增高, 而 Zn 含量和 SH 基量则降低. 给细胞补充 Zn 后, 提高了细胞质膜中的 Zn 含量, SH 基量也随之增加, 同时丙二醛量降低. 提示 Zn 保护细胞完整性的作用机理之一是控制脂质过氧化作用. Zn 可保护膜蛋白的 SH 基, 减少和阻止被 Fe 所催化的过氧化反应.

关键词 扫描质子微探针和同步辐射 X 荧光微探针, 脂质过氧化, Zn, 保护

Zn 是人体必需微量元素之一, 它在体内的生理和营养作用已有很多报道. 目前多数文献认为, Zn 最重要的作用之一是维持细胞质膜结构和功能稳定以保护细胞的完整性. 但有一些基本问题尚不完全清楚. 如 Zn 是否细胞质膜的组成成分? 外加的 Zn 能否参与细胞结构成分? Zn 对细胞的保护作用机理是什么? 本文应用扫描质子微探针 (scanning proton microprobe SPM) 和同步辐射 X 荧光微探针 (synchrotron radiation X fluorescence microprobe SRXMF) 这两种核分析手段, 结合有关生化指标对上述问题进行了分析, 为认识 Zn 对细胞的保护作用机理提供了实验依据.

1 实验条件和方法

1.1 仪器装置 本文应用上海原子核研究所的扫描质子微探针装置. 加速器产生的质子能量为 3Mev, 质子束点 $5\mu\text{m}$. 束流强度 120pA, 同步辐射 X 荧光微探针测定在北京正负电子对撞机国家实验室荧光站进行. 电子束能量为

2.2Gev, 流强 $\leq 60\text{mA}$, 光斑 $80\mu\text{m}-2\text{mm}$. 样品内激发出各种元素的 X 射线由 Si (Li) 探测器和 X 射线能谱仪测得, 用 AXIL 等计算机软件处理数据.

1.2 细胞靶样制备 肝细胞采用成年大鼠用胶原酶 (IV 型) 灌注法^[1]分离获得. 要求细胞活力 85% 左右. 经低速离心除去培养液后, 用 Tris-HCl 等渗缓冲液洗涤细胞, 用微量推进器吸取稀释的细胞悬液约 $0.5\mu\text{l}$ 置洁净的 Mylar 膜上, 空气干燥. 分析前用光学显微镜选出独立和形态完整的细胞作单细胞分析用. 群体细胞靶是选择细胞分散无重叠的细胞液滴, 准确计数其中的细胞数.

1.3 损伤肝细胞的实验方法 是在细胞培养液中加入 Fe^{2+} -EDTA 体系产生的羟自由基 2mmol/L 37°C 温育 2h. 补 Zn 细胞是在培养基中加入一定浓度 ZnSO_4 培养 16—18h 后, 再加入羟自由基培养.

* 国家自然科学基金资助课题.

收稿日期: 1993-01-05, 修回日期: 1993-07-16

1.4 丙二醛 (MDA) 定量用 TBA 法测定^[2].
SH 基定量按 Ellman's Reagent 法^[3].

2 实验结果

2.1 两种核分析技术测定结果

两种核分析技术测定结果表明, Zn 是细胞结构的组成成分.

2.1.1 用 SR-XMF 技术测得肝细胞的元素组成, 结果见图 1.

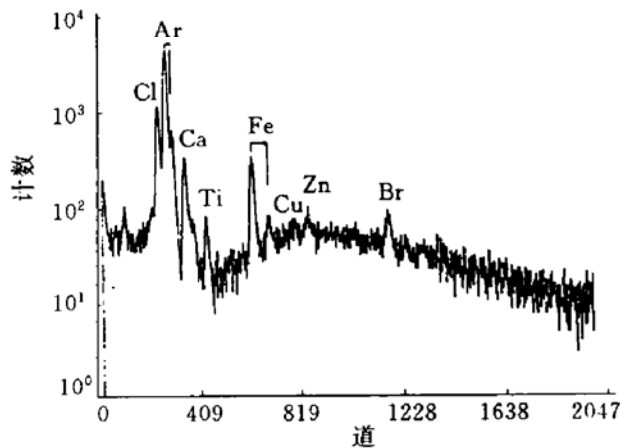


图 1 单个肝细胞的 SR-XMF 能谱

图 1 表示单个肝细胞的元素组成, 同时测定细胞群体靶 (即靶中含一定数量的肝细胞) 作为对比, 见图 2.

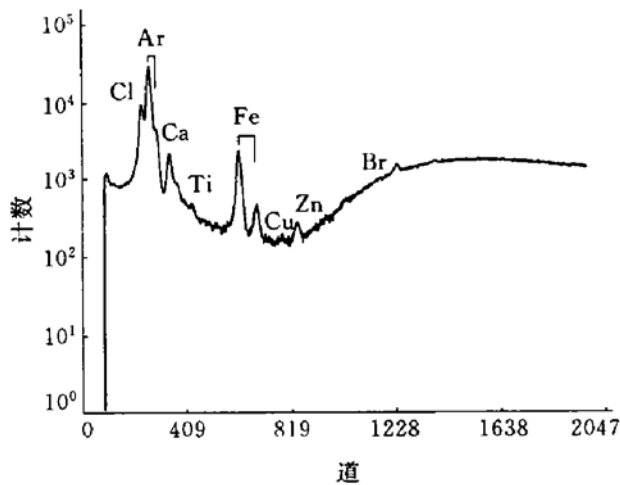


图 2 肝细胞群体的 SR-XMF 能谱

本法测定为 $Z > 12$ 的元素, 两者测得肝细胞中的元素组成是相同的. 用标准靶求得单个细胞中微量元素的含量为 10^{-12} — 10^{-13} g. 衬底

(Mylar 膜) 及缓冲液经测定均不含 Zn.

2.1.2 用 SPM 技术测定单个肝细胞中的元素分布, 结果见图 3.

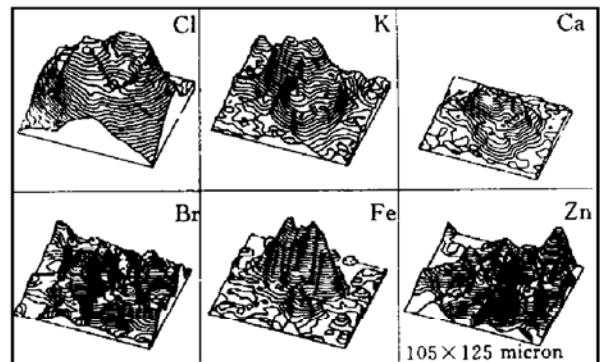


图 3 肝细胞的元素分布图

图 3 是肝细胞中元素分布的三维图形, 可见各种元素在细胞中的分布位置不尽相同, 如 Fe 与 Zn 相比, 前者较集中于细胞核, Zn 则分散于整个细胞, 结合亚细胞结构形态分析, 来源于细胞膜和线粒体、内质网等亚细胞器质膜.

2.2 Fe, Zn 在细胞产生脂质过氧化损伤时的相互关系

用 SPM 和 SR-XMF 技术分别测定了正常和损伤肝细胞的元素谱. 从元素谱中计算 Fe, Zn 的净峰面积即代表元素的相对含量 (元素谱如图 1, 2) 两种方法测得相同规律, 见表 1. 即细胞产生脂质过氧化损伤时, 显示 MDA 量增加, Fe 含量明显增高而 Zn 含量下降.

表 1 正常和损伤细胞丙二醛和 Fe, Zn 含量的变化

组别	丙二醛 /nmol	SR-XMF		SPM	
		Fe	Zn	Fe	Zn
正常细胞	11.00 ± 2.93	99.2	53.2	807	27
损伤细胞	17.80 ± 2.66	626.3	28.1	1190	5

注: 丙二醛值: 各组 5 管 (10⁶ 细胞/管), 每 100mg 蛋白的含量. Fe, Zn: 为单个细胞的平均含量.

2.3 Zn 对脂质过氧化的抑制作用

丙二醛是脂质过氧化的分解产物, 其含量在一定程度上可反映脂质过氧化程度, 实验结果 (表 2) 表明, 在肝细胞培养基中预先补充 Zn

后,可使细胞产生的脂质过氧化损伤程度减轻,即丙二醛量降低.

表 2 在培养基加入 ZnSO₄ 后, 细胞内丙二醛含量的变化

组别	[ZnSO ₄] /(μmol/L)	[EDTA-Fe ²⁺] /(mmol/L)	样本 数 <i>n</i>	MDA nmol/10 ⁶ 细胞
正常 细胞组	0	0	5	4.75±2.54
损伤 细胞组	0	1	6	10.92±2.66 ¹⁾
加 Zn 细胞组	20	1	6	7.13±3.12 ²⁾
	60	1	6	6.27±2.62 ³⁾

¹⁾与正常细胞组比较 $P < 0.001$; ²⁾与损伤细胞组比较 $P < 0.01$; ³⁾与损伤细胞组比较 $P < 0.001$.

2.4 Zn 对细胞中巯基含量的影响

巯基(SH基)是膜蛋白上的功能基团,其含量和细胞完整性紧密有关.实验结果表明(见表3)细胞产生脂质过氧化损伤时,细胞内SH基含量显著减少,预先补充Zn后,和损伤组相比,SH基含量增加,表明Zn可促进SH基和膜蛋白结合.

表 3 在培养基加入 ZnSO₄ 后, 细胞内总巯基含量的变化

组别	[ZnSO ₄] /(μmol/L)	[EDTA-Fe ²⁺] /(mmol/L)	样本 数 <i>n</i>	T-SH ¹⁾ /μmol
正常 细胞组	0	0	6	0.255±0.044
损伤 细胞组	0	2	6	0.225±0.031 ²⁾
加 Zn 细胞组	40	2	7	0.247±0.025 ³⁾
	80	2	7	0.261±0.034 ⁴⁾

每 mg 蛋白的含量; ²⁾与正常细胞组比较 $P < 0.001$; ³⁾与损伤细胞组比较 $P < 0.01$; ⁴⁾与损伤细胞组比较 $P < 0.001$.

2.5 在培养基中加入 ZnSO₄ 后, 细胞内 Fe/Zn 比值的变化

用 SR-XMF 技术测得补 Zn 后细胞中 Fe/

Zn 比值变化,见表4.实验结果表明,培养基中加入的 Zn 可以参入细胞组分,细胞 Zn 含量增加,和损伤组比较,Fe/Zn 比值明显降低.

表 4 在培养基加入 ZnSO₄ 后, 细胞内 Fe/Zn 比值的变化

组别	[ZnSO ₄] /μmol/L	细胞数	Fe/Zn/细胞
正常细胞组	0	59	1.15
损伤细胞组	0	83	5.15
加 Zn 细胞组	40	64	3.49
	80	50	3.59

3 讨 论

Zn 在维持细胞质膜结构和功能的稳定性中有重要作用已被公认.但有些基本问题尚未完全阐明,如 Zn 是否细胞质膜的组成成分,限于测试手段未见直接的实验依据.多数资料限于推论和分析,如 O' Dell^[4]根据机体缺 Zn 时红细胞膜 Zn 浓度降低同时亦降低了细胞稳定性而推测 Zn 是细胞质膜的组成成分.本文应用扫描质子微探针和同步辐射 X 荧光微探针技术直接测定单个细胞中元素的分布和组成.扫描质子微探针是国际上 70 年代发展起来的超微量核分析技术,灵敏度比电子探针高 2—3 个数量级,经聚焦装置可将质子束点直径聚焦至微米级,最小可达 0.1 μm,配合扫描装置,能获得细胞中元素分布的信息^[5].同步辐射 X 荧光微探针是 80 年代才迅速发展起来的核分析技术,由于同步辐射光的固有特性,比带电粒子 X 荧光分析更为优越,特别是光亮度大,而且对样品没有辐射和热损伤效应,更适宜于生物样品中元素的定量分析^[6].本文结合两种核分析技术的特点,分别进行了肝细胞中元素的分布和定量测定,为确定 Zn 是细胞质膜组成成分提供了直接的实验依据.

目前有些文献认为,Zn 对细胞保护作用的途径之一是基于控制过氧化作用^[7],作用机理可能是由于 Zn 离子和 S 的配体有高度亲和

力,与膜蛋白的巯基形成稳定的硫醇盐,并可与Fe, Cu等过渡金属元素竞争性地和巯基结合,保护它抵制氧化成二硫键^[8]. 本文应用核分析技术直接测得细胞发生脂质过氧化作用时Fe, Zn在细胞内含量和比值变化,结合MDA和SH基含量变化,为确认这一推论提供了有力的实验依据. 本实验在细胞培养基中引入的羟自由基是通过FeSO₄-EDTA体系在有氧环境中形成. FeSO₄和EDTA按1:1配制溶液,EDTA和Fe²⁺络合成EDTA-Fe²⁺外,溶液中必然还存在少量的游离Fe²⁺,参入细胞后,不仅在羟自由基引发的链式反应中起着催化作用,并与Zn竞争与膜上SH基结合并将其氧化为二硫化物,致使Zn从膜上的结合部位脱落,造成细胞Fe含量增高,Zn含量降低. 当在培养基中补充Zn后,对脂质过氧化反应表现出明显的抑制作用,和损伤组相比,细胞Fe/Zn比值降低,表明外加的Zn可参入细胞结构成分,细胞Zn含量提高,增加了Fe与SH基的结合,即SH基量增加,从而减少Fe与SH基所产生

的催化反应,表现为MDA量明显减少. 这一实验结果提示,Zn对细胞的保护作用途径之一是与Fe竞争性的与膜蛋白的SH基结合,阻止和抵制被Fe所催化的脂质过氧化反应.

参 考 文 献

- 1 Per O Seglen. In: Prescott D M ed, Methods in cell biology, New York: Academic Press, 1976: 29
- 2 Ohkawa H. Anal Biochem, 1979; **95**: 351
- 3 Jozef sedlak, Raymond H L. Anal Biochem, 1968; **25**: 192
- 4 William J B, Boyd L O' Dell. Life Science, 1981; **28**: 1425
- 5 Uif Lindh. Nucl Instr and Meth in Phys Res, 1991; B54: 160
- 6 Keith W jomes, Barry M G. Anal Chem, 1989; **61** (5): 341 A
- 7 Tammy M B, William F B. Free Rad Biol Medi, 1990; **8**: 281
- 8 Boyd L, O' Dell. In: Grawthorne J M *et al.* eds, Trace element metabolism in man and animals, Australia: Griffin press, 1981: 319

酰化菌紫质的动力学光谱及光电特性研究*

胡坤生 施 桦 黄 莹¹⁾ 余 滔²⁾

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用人工双分子膜(BLM)技术及动力学光谱研究了赖氨酸残基在紫膜的结构和功能中所起的作用. 酰化基团与菌紫质(bR)分子中的赖氨酸残基的ε氨基作用,使光照后bR的跨膜质子迁移信号及膜的充放电速度变慢,光循环中间产物M412的产量下降,半衰期延长. 但UV/Vis吸收光谱表明酰化并未破坏bR中视黄醛的构象环境. 在高pH或高盐浓度下,酰化的影响降低. 这些结果表明:赖氨酸残基并不是泵出质子的提供者,没有直接参与质子的跨膜运输,而是通过表面电位来影响bR的质子泵功能.

关键词 菌紫质, 光电响应, 酰化, 人工双层脂膜

菌紫质(bR)是嗜盐菌(Halobacterium halobium)紫膜中的唯一蛋白质,其分子量为26 000,有248个氨基酸残基,视黄醛通过质子化的Schiff碱基与第216位赖氨酸的ε氨基

相连. 吸收光子后,bR发生一毫秒级的光化

*国家自然科学基金及浙江省自然科学基金资助.

¹⁾现在青岛医学院工作.

²⁾浙江大学光学实验仪器工程系.

收稿日期: 1993-02-16, 修回日期: 1993-07-01

(CA)

Study on the Mechanism of Protective Effect of Zinc to Cells. Zhang Jingxia, Huang Ping, Xu Shiwen, An Lizhi, Yao Huiying, Xiao Yanan, Pan Juxiang, Chao Zhiyu, Zhu Jieqing, Wu Xiankang. (*Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (2): 147

On analyzing the distribution and composition of element in single cell with scanning proton microprobe (SPM) and synchrotron radiation X-Ray fluorescence microprobe (SR-XMF) it shows that zinc is a constituent of cell plasma. The levels of cellular zinc and iron were detected by above nuclear technique and the contents of MDA, SH group were estimated respectively by biochemical method for both normal and injured cell induced an peroxidation damage by hydroxyl-free radical. It was found that MDA content increased, SH group decreased, as well as Fe/Zn ratio raised during lipoperoxidation. By supplementation of zinc to culture medium, the inhibitory effect of zinc on lipoperoxidation was obvious from following experiment results that MDA content decreased, SH group content increased as well as Fe/Zn ratio reduced. The results suggest that zinc plays a role in maintaining the integrity of the cell and protects SH group of membrane protein thus preventing catalytic peroxidation reaction of iron.

Key words scanning proton microprobe (SPM), synchrotron radiation X-ray fluorescence microprobe (SR-XME), lipoperoxidation, zinc, protect

Studies on the Photoelectric and Kinetic Spectroscopic Properties of Acetylation Bacteriorhodopsin. Hu Kunsheng, Shi Hua, Huang

Ying, Yu Bi. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (2): 150
The role of lysine residues in the structure and function of bacteriorhodopsin (bR) was studied by the chemical modification method—acetylation. After acetylation, the photoreponse signals and the decay of photocycle intermediate M412 were slowed down while the yields of M412 were decreased. But UV/VIS absorption spectra did not show that the conformation around retinal chromophore was disturbed by acetylation. The effect of acetylation was weakened by high pH or salt media. The results imply that lysine residues do not directly participate in the proton translocation, instead, they affect this process by their contribution to the surface potentials.

Key words bacteriorhodopsin, photoreponse, acetylation, lipid bilayer

Studies on Preparation and Properties of Lauric Acid-Modified Superoxide Dismutase. Yan Jiaqi, Xie Wenzheng. (*Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450045*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (2): 154

Superoxide dismutase is modified with lauric acid to improve its stability. Activated lauric acid was reacted with bovine Cu, Zn-superoxide dismutase at 40°C for 1h and it was further purified by a Sephacryl S-200 column. There are 93% recovery of enzyme activity from the resulting lauric acid-superoxide dismutase conjugate. The specific activity of this enzyme product was 6000U/mg. The modified enzyme showed enhanced stability, substantially free from immunogenicity and prolonged its half-life in blood. As a consequence, it can beneficially be used as an enzyme for cosmetics and