

红细胞膜生物物理特性的测定方法*

许红 周汉清 张志鸿

(复旦大学生理学和生物物理学系 上海 200433)

血液流贯全身,许多生理现象、病理变化都可能在红细胞膜的结构和功能变化中得到反映。红细胞取材容易,其膜结构、骨架结构及胞内主要组分——血红蛋白(Hb)的结构均是目前生物材料中了解得最为详情的,因而作为模型被广泛用于理论研究和各种疾病的病因、诊断及治疗的研究中。

目前,对红细胞膜的研究重点已从简单的膜组分含量、流动性变化等转向功能特异性指标的研究,现有的常用有关方法有各自特点,但也存在不足:有的难以追踪快速的动力学过程(如同位素标记、酶-底物反应法等),有的需特制或昂贵的大型测定装置(如光散射、磁共振波谱仪等),有的仅适用于血影膜(如荧光探针法等)。

本实验室用于红细胞膜生物物理特性的系列测定方法是由同一套以常用分光光度计为基础、配上微机实时控制采样及数据处理的装置组成,能快速、方便地检测完整红细胞膜对阴离子的通透性、对葡萄糖的跨膜运输、渗透脆性及低渗溶血速率等结构和功能性指标,且样品用血量约1 ml即可完成上述所有指标的测定。本文中多数方法我们已陆续作过初步报道^[1-5],但鉴于这些指标的理论意义和应用价值,最近又对这些测定方法作了进一步的改进、完善和综合,期望能引起有关研究工作者的兴趣或有所启发。

材料与方 法

一、材料

购自上海中心血站的少浆全血或由医院提供的患者血样,用pH 7.4、155 mmol/L NaCl/5 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤三次(1500 rpm, 5 min)获得人

红细胞。然后根据不同测定要求对细胞进行预处理并将细胞浓度调整到测定范围($\sim 3 \times 10^8$ 细胞/ml)。所用试剂均为分析纯级。

二、红细胞膜生物物理特性的测定装置

本实验所用的系列测定方法,主要是根据不同测定条件下由于细胞体积或吸收光谱的改变而导致悬浮液光密度值发生变化的原理设计的,因而用一台常用的722型光栅分光光度计即可。测量时用定量加液器将50 μ l红细胞样品悬浮液快速注入含2 ml测量液的比色皿中,在某一特定波长处采集悬浮液光密度的经时变化电信号,经12位A/D转换器(型号AD 574,最高采样频率40 kHz)输至286微机,采集数据存盘。一次测定的总采样点为1000,采样频率及总时间随不同测定要求而定。在对测定作5次以上累加平均后,根据不同测定要求用相应的Quick BASIC程序对数据进行处理和拟合,并给出相应的表征特性的参数。

测定时为保证加入的红细胞和比色皿中的测定液快速混合,在分光光度计的比色皿架下改装安置了电磁搅拌装置,比色皿中放一1 cm的圆柱形搅拌子即能达到充分的混合,混合死时间约1 s。另外,在样品架四周设置了循环水恒温夹层。以下诸种测定,除特别指明温度外,都是16—21℃下的测定值。

三、红细胞低渗溶血速率、渗透脆性的测定

低渗条件下,红细胞膜破裂的时间进程和膜流动性、粘弹性、膜-Hb相互作用等密切相关,通过测定低渗溶血速率及渗透脆性参数能给出红细胞膜在这方面的结构信息。本实验室根据“渗透休克”的原理,设计了测定红细胞溶血速率的方法^[1],将样品悬浮液注入低渗液(31 mmol/L NaCl/5 mmol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.4)中,红细胞就会快速膨胀并溶血。大于620 nm波长时,Hb及溶血后的血影膜对光吸收的贡献很

* 国家自然科学基金资助项目。

本文中有关尿毒症、糖尿病患者的血样由上海第二医科大学附属新华医院内科冯茵芳医生提供,其他血液病患者血样由第二军医大学附属长海医院血液科李津婴医生提供,在此一并致谢。

小,因此可选取在660 nm波长处进行细胞悬浮液的OD值测定,根据尚剩细胞的OD值追踪溶血的进程^[1,6]。一般认为低渗溶血速率应包括快速过程 k_1 及慢速过程 k_2 两个分量,整个过程符合两个分量的指数函数加和^[7]: $OD_t/OD_0 = A \exp(-k_1 t) + B \exp(-k_2 t)$ 。为此,对测量数据按该方程进行了拟合,求出 k_1 及 k_2 值。

渗透脆性的测定则是用恒流泵定速(0.016 ml/s)地将低渗液(5 mmol/L磷酸盐缓冲液, pH 7.4)泵入红细胞悬浮液中,悬浮液的盐浓度逐渐下降,达到一定浓度时开始溶血,同样在660 nm处追踪包含整个溶血过程的光密度变化,换算成各低渗盐浓度下红细胞的溶血百分率(H%),从而得到100 s测定期间内 $H\% \sim NaCl\%$ 渗透脆性曲线,并由微机搜寻出与溶血量50%对应的盐浓度 H_{50} 及溶血量从25—75%间变化时对应的盐浓度变化 $H_{25} - H_{75}$ 这两个表征渗透脆性的特征参数。

四、红细胞膜对阴离子通透性的测定

红细胞膜对阴离子的通透特性是红细胞最重要的功能之一,这一过程主要由膜上的阴离子交换蛋白——带3蛋白(Band 3)所介导,由此通过 Cl^-/HCO_3^- 的跨膜交换完成组织和肺泡之间 CO_2 和 O_2 的交换^[8]。文献中经常采用 ^{36}Cl 等同位素标记法进行测定^[9]。本实验室近几年来则建立了两种快速的测定法。

① 铵盐等渗膨胀法^[12]——在等渗 NH_4Cl (157 mmol/L NH_4Cl /5 mmol/L磷酸盐缓冲液, pH 7.4)中,通过红细胞膜上Band 3对 OH^-/Cl^- 的交换运输,介质中 NH_3 不断进入细胞,造成 NH_4^+ 在细胞内积累,细胞逐渐膨胀并最终溶血。追踪660 nm处体积膨胀过程而导致的细胞悬浮液光密度值OD的经时变化,按 $Y = [(300/A_2') (OD_0/OD - 1) + 1]^2 = 1 + 66525 Pt$ 方程拟合,即可得到膜对 OH^-/Cl^- 交换运输的通透系数P值(cm/s),式中 OD_0 为 $t=0$ 时的OD值; A_2' 为红细胞悬浮液光密度倒数和介质渗透压 π 倒数之间的比例常数($OD_0/OD = A_1 + A_2'/\pi$),该数值由实验给出(典型值为193 mOsm)。基本测定原理参见文献^[3]。

② NO_2^- 测定法^[4]——在含15.5 mmol/L NO_2^- 的PBS(pH 7.4)测量液中,通过Band 3的介导, NO_2^- 跨膜扩散进入红细胞,并与细胞内氧合血红蛋白(HbO_2)作用使之变成高铁血红蛋白(MetHb),从而改变细胞的光谱吸收特性。在576 nm处(此处 HbO_2 和MetHb光谱差异最大)追踪这一过程的光密度经时变化,得到光密度下降幅度达50%时所需时间 T_{50} ,

并通过 $K_T - T_{50}$ 关系图,得出膜对 NO_2^- 的跨膜通透速率常数 K_T 。

五、葡萄糖跨膜运输的测定

几乎所有的细胞膜上都存在着葡萄糖的运输载体,籍此将葡萄糖有效地运输进细胞供代谢之用。本测定法以红细胞膜上的葡萄糖运输体(GLUT-1)为对象^[10],采用细胞内侧和葡萄糖呈饱和结合后糖分子向外输出(Infinite-cis exit)的方式^[5]。测定前首先进行红细胞预载葡萄糖处理,即将压积红细胞按1:15(V/V)之比和含76 mmol/L葡萄糖的PBS溶液混合,37℃振荡温育30 min使细胞内外的葡萄糖浓度达到平衡,然后注入浓度为C(0—12 mmol/L)葡萄糖的PBS溶液中,红细胞在瞬间膨大后,因糖分子的跨膜外流使细胞体积缩小直至重新平衡。35℃时,在660 nm处追踪这一过程的光密度经时变化,按 $At = (\pi_i^2 / (\pi_i^2 - CC_i^2)) t = (t_0/K_m)C + t_0$ 方程拟合得 t_0 及 K_m 值。式中 π_i 为PBS渗透压(300 mOsm),C为测定介质中葡萄糖浓度(mmol/L), C_i^2 是红细胞预载葡萄糖时介质中的糖浓度(76 mmol/L),t为细胞内葡萄糖量从 C_i^2 降至C时所需的时间(s),由1/OD的时间关系曲线外推而得。 K_m 是表征葡萄糖跨膜通透性的一个参数——半饱和浓度(或亲和常数),另一重要参数——最大速率 V_{max} ,则由 $V_{max} = (C_i^2 + K_m)/t_0$ 给出。详细测定原理参见文献^[5]。

结果与讨论

1. 红细胞低渗溶血速率及渗透脆性参数

在低渗溶血研究中,采用反映溶血快速过程及慢速过程的两参数 k_1 及 k_2 作为指标,图1为一例典型的溶血速率测定曲线,图中 $k_1 = 0.232 s^{-1}$, $k_2 = 0.068 s^{-1}$ 。 k_1 主要与膜流动性相关, k_2 则与Hb-膜结合程度相关^[11]。结合荧光猝灭实验,我们曾研究过红细胞内Hb状态的改变对溶血速率参数的影响^[12,13],发现脱氧血红蛋白、MetHb及苯胍作用后形成的高铁血色原都能增强和膜的相互作用;应用到病例上,对15例血小板减少性出血不止病人的测定结果表明, k_1 增加12%,可见这种病人的膜流动性出现了异常。

图2为一例典型的渗透脆性测定曲线,图中 $H_{50} = 0.376 NaCl\%$, $H_{25} - H_{75} = 0.059 NaCl$

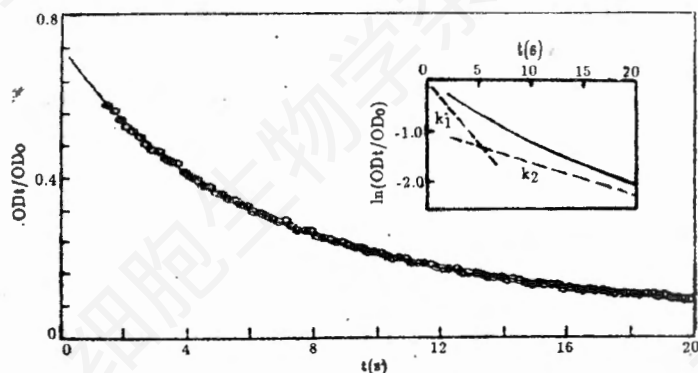


图 1 典型的溶血速率测定曲线

圆圈为测定值，点线为拟合曲线。

插图为半对数坐标图，图中同时表明了 k_1 和 k_2 组分。

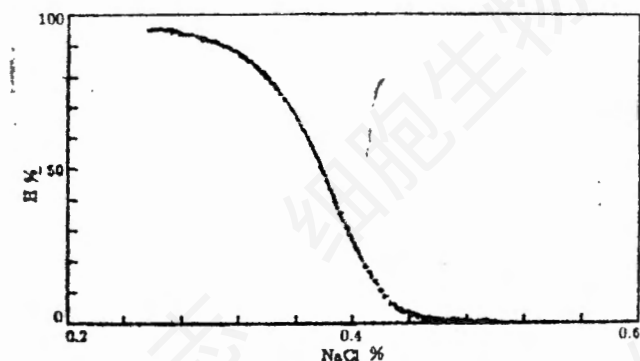


图 2 典型的渗透脆性测定曲线

%。红细胞渗透脆性主要用来表征红细胞膜的抗张能力，它和红细胞骨架结构密切相关，本实验室曾做过精胺对渗透脆性的影响^[3]，结果显示精胺作用后渗透脆性减小，这与精胺作用于收缩蛋白(spectrin)使膜骨架更为坚固是一致的；应用到病例上，本实验室对糖尿病患者做过初步的研究，结果显示大多数患者的渗透脆性有减小的趋势。本测定法是一种快速的连续法，在精度、血量及用时上都要优于传统的“多试管法”。

2. 红细胞膜对阴离子的通透性

本实验室早先用 NO_2^- 作为“探针”来研究膜对阴离子的通透特性，图 3 为一例 T_s 的测定曲线，图中 $T_s = 24.5 \text{ s}$ ，对应 $K_T = 0.30 \text{ mmol/L/s}$ ，之后，我们又建立了铵盐等渗胀

法，图 4 为一测定实例，得到的 $P_{c1} = 1.40 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ 。我们的研究曾表明，Band 3 介导的阴离子交换过程对周围环境的变化较为敏感，胞质组分、细胞骨架蛋白甚至膜上的其他蛋白质的改变都能影响到这一通透特性^[13]。概括起来，我们发现：① 凡能增强胞质组分 Hb 和膜相互作用的因子看来都会导致红细胞膜对阴离子通透性的增加^[6,9]。② 作用于细胞骨架蛋白的因子因作用机制不同而产生不同的效应，如低浓度 ($< 1 \text{ mmol/L}$) pCMBS (作用于 Band 4.1、4.2 或锚定蛋白(Ankyrin)) 能抑制膜对 Cl^- 的通透，而精胺 (能抑制收缩蛋白四聚体的解聚) 则加快了膜对 Cl^- 的通透^[3]。③ 膜上其他蛋白质 (如 Na^+ 、 K^+ -ATPase 及 GLUT-1) 通过和 Band 3 结成复合体的形式也

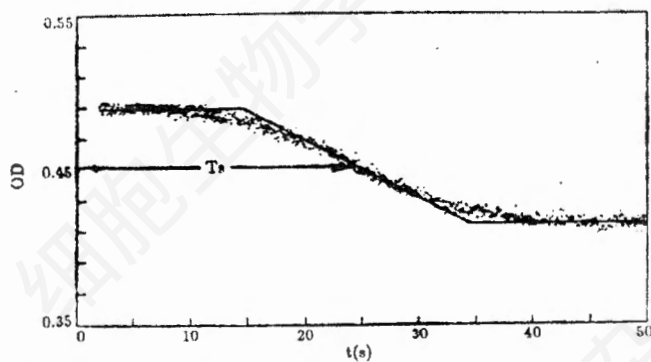
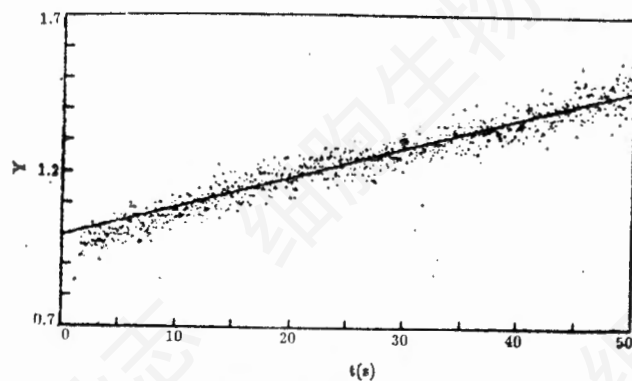


图3 Ts测定曲线

折线为拟合曲线，由此定出Ts值。

图4 P_{Cl}测定曲线

P_{Cl}值由拟合直线的斜率算出。

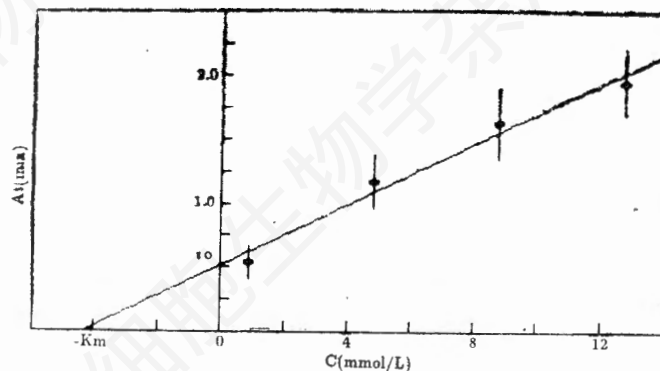


图5 葡萄糖跨膜通透参数的测定曲线

能对阴离子通透产生影响，其中用乌本苷对 Na^+ , K^+ -ATPase 进行专一性抑制，导致膜对 NO_2^- 的通透增大，加入葡萄糖直接作用于

GLUT-1，膜对 NO_2^- 的通透也有增大的趋势。应用到病例上，本实验室曾对尿毒症做过较系统的研究^[14]，发现患者对 NO_2^- 的通透速率仅

为健康人的一半,且可能与 Band 3 细胞外侧片段受损有关;此外,血小板减少性出凝血不止患者的阴离子通透为健康人的 1.69 倍,而淋巴性、巨噬性白血病患者通透约为正常的 0.62 倍。

3. 葡萄糖的跨膜运输

图 5 为一例葡萄糖跨膜运输通透特性参数的测定曲线,由拟合方程得, $K_m = 4.3 \text{ mmol/L}$, $V_{max} = 147 \text{ mmol/L/min}$, 和文献值^[10]一致,表明了红细胞膜上的葡萄糖运输体主要通过类似于酶-底物反应的促进扩散模式对葡萄糖进行跨膜运输^[15]的机理。在这基础上,我们将系统研究细胞骨架、胞质组分及膜上其他蛋白质、脂质组分对葡萄糖跨膜运输的影响;此外,新近 Bistrizter 等^[16]的研究报道,非胰岛素依赖型糖尿病患者红细胞膜上 GLUT-1 存在缺陷,其对葡萄糖的吸收量较正常人为高,我们正就这一病例在细胞分子水平上病理变化的机理进行探讨。

上述诸种参数的测定将有助于我们对红细胞膜的结构和功能有较为深入的了解,我们期待本法也能在细胞分子病理研究中得到进一步的推广和应用。

摘 要

本文介绍几种完整红细胞膜生物物理特性的系列测定方法,包括膜对阴离子的通透性、膜对葡萄糖的跨膜运输、渗透脆性、低渗溶血速率等,以期对红细胞膜结构和功能特性的研究在完善理论意义的同时更具临床等实用意

义。

参 考 文 献

- [1] 张志鸿, 1984, 复旦学报 (自然科学版), 23: 1—6.
- [2] 周汉清, 张志鸿, 1993, 生物化学与生物物理学报, 25: 111—117.
- [3] 许红等, 1993, 生物物理学报, 9: 70—73.
- [4] 张志鸿, Deyev, A. I., 1990, 生物物理学报, 6: 254—261.
- [5] 张志鸿等, 1993, 生物物理学报, 9: 402—406.
- [6] Araki, K. and M. Rifkind, 1981, *Biochim. Biophys. Acta*, 645: 81—90.
- [7] Anderson, P. C. and R. E. Lovrien, 1977, *Biophys. J.*, 20: 181—191.
- [8] Jennings, M. L., 1989, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18: 397—430.
- [9] Gunn, R. B. and O. Frohlich, 1989, *Methods in Enzymology*, V. 173, Ed. by S. Fleischer and B. Fleischer, Academic Press, New York, 54—80.
- [10] Carruthers, A., 1990, *Physiol Rev*, 70: 1135—1176.
- [11] Zhang Z. -h, et al., 1988, In: 2nd Japan-China bilateral symposium on biophysics, Book of Abstracts. Kyoto, Japan, 91—92.
- [12] 许红, 张志鸿, 1992, 生物物理学报, 8: 481—486.
- [13] 胡 船等, 1992, 生物物理学报, 8: 507—511.
- [14] 贾若飙等, 1990, 复旦学报 (自然科学版), 29: 393—398.
- [15] Widdas, W. F., 1989, *Methods in Enzymology*, V. 173, Ed. by S. Fleischer and B. Fleischer, Academic Press, New York, 231—250.
- [16] Bistrizter, T. et al., 1991, *Horm Metab Res*, 23: 70—73.

简讯 宁波经济技术开发区科生仪器厂引进美国先进技术自行研制而成的系列化超声波细胞粉碎机,有 250 W、450 W、900 W、1200 W 电功率等不同规格。适用于生物工程的科研、中试和批量生产。厂方为用户提供能够在 2 ml 至 500 ml 范围超声的各档尺寸钛合金变幅杆。国内广大生物工程科研人员应用本厂系列的超声波细胞粉碎机后已取得了良好的科研成效和经济效益。用户认为该产品可替代同类进口产品。

欲购该厂产品可与宁波经济技术开发区科生仪器厂业务联络处曹友生联系 (地址: 宁波市云石街 1 号, 邮编 315010, 电话 0574-7365842, 传真 0574-7365842, 传真 0574-6221349)。

(曹友生)