DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.010

失血性休克时红细胞膜脂流动性及其相变温度的变化*

陆松敏 刘建仓 郭素清 王成英 刘光海 陈惠孙 (第三军医大学野战外科研究所第二研究室) 重庆,630042

提 要 采用家兔失血性休克模型,测定红细胞膜脂的流动性,膜脂区微粘度及相变温度。结果说明失血性休克后红细胞膜的荧光偏振度(P)升高,从0.260±0.020升至0.289±0.015($P<0.01$),膜流动性降低。膜脂双层分子排列有序性增加。相变温度伤前为17.5℃,低血压3h后相变温度为24.5℃,分子活化能升高。说明失血性休克后红细胞膜从相对比较流动变为相对固化,细胞膜更趋于凝胶相。

关键词 休克,失血性;红细胞膜;膜流动性
中图法分类号 R605,971;Q75

细胞膜的流动性是一个细胞水平较为灵敏的检测指标,它反映细胞膜脂区分子的运动状态和分子排列的有序性,它是维持细胞正常生命活动所必需的。为了更好地从细胞和分子水平研究休克机理,我们研究了失血性休克条件下红细胞膜的流动性、微粘度、膜脂区相变温度、脂双层分子排列有序性系数及分子运动所需活化能。

1 材料和方法

采用体重2.5 kg左右健康雄性家兔20只,分为对照组和失血性休克组,每组10只。采用改良Wigger's模型,快速放血至5.3 kPa,维持2 h,然后继续观察至5 h。分别于失血性休克前、低血压后1、2、3、5h抽取静脉血3 ml,测定红细胞膜脂流动性;微粘度($\bar{\eta}$)和脂分子排列有序性系数(r)。

2 红细胞膜的制备

全血3 ml,300×g离心10 min,去上清及界面白色膜、留压积红细胞。再用pH7.8～8.0 0.01 mol/L磷酸盐缓冲生理盐水溶液(PBS)洗3次(0～4℃),每次离心5 min,转速为300×g,得3 ml PBS红细胞悬液,以体积1:80的比例,用5 mmol/L Tris-HCl(pH:7.5～7.6)缓冲液实行一次性溶血,于4℃静置1～2 h取出,以1000×g 4℃离心15 min,反复洗涤离心4次得白色红细胞膜,用Lowry法定蛋白。

取膜悬液(300 μg/ml)3 ml,加入2×10^{-6}浓度的DPH(1.6-Dipheny-1,3,5 Hexatrine,Sigma,Chemical Co)30 μl,于25℃温育30 min,在MPF－4型荧光分光光度计上测定荧光偏振度(P),计算微粘度($\bar{\eta}$)和分子排列有序性系数(r)。测定时激发波长为365 nm,发射波长为440 nm。

$$P=\frac{I_{VV}-GI_{VH}}{I_{VV}+GI_{VH}} \qquad \bar{\eta}=\frac{2P}{0.46-P} \qquad V=\frac{2P}{3-P}$$

式中I_{VV}为起偏器光轴为垂直方向,检偏器光轴为垂直方向时荧光强度,I_{VH}为起偏器光轴为垂直方向,检偏器光轴为水平方向时荧光强度。G为校正因子,$G=I_{HV}/I_{HH}$,I_{HV}为起偏器光的水平向、检偏器垂直向时荧光强度。I_{HH}:二者均为水平向。

膜相变温度的测定采用荧光偏振法:将已用DPH标记好的红细胞膜悬液,置0℃冰浴后,从0℃至45℃每升高5℃测定一次荧光偏振度,再以log(P)对1/T作图,其曲线的拐点即红细胞膜的相变温度。

$\bar{\eta}=A\cdot e^{\Delta E/RT}$,式中ΔE为分子运动所需之活化能。$\ln\bar{\eta}=\ln A+\frac{1}{RT}\Delta E$,R为阿伏加德罗气体常数,以$\ln\bar{\eta}$对$\frac{1}{T}$作图,曲线的斜率代表分子运动活化能。

3 实验结果

3.1 失血性休克对红细胞膜流动性、膜脂区微粘度($\bar{\eta}$)及脂双层分子排列有序性系数(r)的影响

在失血性休克低血压2 h后红细胞膜荧光偏振度升高($P<0.01$),膜流动性降低,微粘度显著升高($P<0.01$),脂双层分子排列有序性增加($P<0.01$)。随着休克时间的延长脂分子排列更有序,分子运动减少。三者变化关系基本平行(表1)。

表1 红细胞膜荧光偏振度(P)、微粘度($\bar{\eta}$)有序性系数(r)

Tab 1 Erythrocytic membrane polarization (P), microviscocity ($\bar{\eta}$) and order parameter (r)

		Polarization (P)	Microviscocity ($\bar{\eta}$)	Order parameter (r)
Control	(n=10)	0.260±0.002	2.605±0.495	0.192±0.003
After shock	1 h(n=10)	0.264±0.003	2.693±0.082	0.193±0.002
	2 h(n=10)	0.281±0.007※※	3.186±0.220※※	0.207±0.005※※
	3 h(n=10)	0.274±0.036※※	3.098±0.940※※	0.215±0.018※※
	5 h(n=10)	0.289±0.015※※	3.406±0.497※※	0.216±0.014※※

※:$P<0.05$,※※:$P<0.01$ *vs* control

* 全军"八五"攻关项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.2 失血性休克时红细胞膜相变温度的变化

伤前、失血性休克后2、3、5h红细胞膜在不同温度下的荧光偏振度(P)变化见表2。以logp对$\frac{1}{T}$作图，曲线的拐点即为相变温度。结果为：伤前红细胞膜相变温度为17.5℃，失血性休克后2h为21℃，3h为24.5℃，5h为25.0℃。说明失血性休克后红细胞膜分子结构和化学组成发生了变化。

表2 不同温度下红细胞膜荧光偏振度(P)

Tab 2 Erythrocytic membrane polarization (P) in different temperature

Temperature ℃	5	10	15	20	25	30	35	40
°T	278	283	288	293	298	303	308	313
Control	0.297 ±0.027	0.304 ±0.037	0.290 ±0.032	0.287 ±0.027	0.269 ±0.030	0.258 ±0.019	0.256 ±0.028	0.232 ±0.020
After shock 2 h	0.349 ±0.013	0.346 ±0.013	0.336 ±0.096	0.339 ±0.070	0.306 ±0.044	0.296 ±0.025	0.266 ±0.031	0.254 ±0.006
After shock 3 h	0.318 ±0.056	0.303 ±0.055	0.289 ±0.064	0.282 ±0.051	0.256 ±0.046	0.257 ±0.048	0.222 ±0.062	0.207 ±0.030
After shock 5 h	0.264 ±0.048	0.252 ±0.042	0.252 ±0.044	0.231 ±0.069	0.244 ±0.051	0.222 ±0.042	0.207 ±0.040	0.195 ±0.031

3.3 分子运动活化能

$\bar{\eta}=A\cdot e^{\triangle E/RT}$，式中$\triangle E$为分子运动活化能，$\ln\bar{\eta}=\ln A+\frac{\triangle E}{R}\cdot\frac{1}{T}$，以$\ln\bar{\eta}$对$\frac{1}{T}$作图，其斜率可代表分子活化能的相对大小。失血性休克后，随着休克难逆程度增加，微粘度逐渐升高，曲线斜率逐渐升高，分子运动所需的活化能增加。

4 讨论

细胞膜的流动性指细胞膜、内质网膜、线粒体膜系统具有类似于液体那样容易流动的一种物理性质。1972年Singer和Nicolson提出细胞膜的结构的液态镶嵌模型，即膜中脂和蛋白质分子处于不停息的运动中，从而使膜处于一种动态结构中。这些运动和温度有关。所以在不同温度下膜扩散速度和旋转速度及烃链的活动均不同，使得膜在高温下更接近液态，而在低温下更接近固态，两种状态的转折点称之为相变温度。

细胞膜的流动性和通透性是细胞的基本和最重要的生物物理性质，膜流动性不仅能影响膜通透，且影响膜上的酶的活性、受体功能及能量传递，也影响细胞膜的保护功能。膜流动性反映着膜磷脂的分子运动状态，包括侧向扩散，绕分子长轴的旋转，异构运动和翻转运动。流动性是脂双层中磷脂分子各种运动状态的总和的平均表现。流动性越大，则意味着磷脂分子的活动度增大[1]。

膜流动性可用核磁共振，电子自旋共振，荧光偏振等方法来测定。本研究采用稳态荧光偏振法。因为DPH能嵌于脂双层中和磷脂分子平行排列，烃链不活动，则DPH排列整齐，荧光偏振度大，膜流动性小；如果分子运动大，脂分子呈不同程度的倾斜，则荧光偏振度小，流动性就越大。

影响膜流动性的因素很多，从构成膜的磷脂和蛋白质来看，磷脂分子中脂肪酸链的不饱和程度，脂与脂、脂和蛋白质之间的相互作用均十分重要。膜磷脂的化学组成，不饱和程度，脂肪链的长短均起作用。Orly和Sehram报告减少不饱和程度，增加链长均可减少膜流动性。磷脂中不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸比值越高，则膜流动性就越大。此外膜脂的构型、酸碱、氧张力、乙醇胺等对流动性均有影响。

磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺均是天然哺乳动物生物膜的主要成份。Hirata和Axelrod报告[2]磷脂酰乙醇胺甲基化形成磷脂酰胆碱，从而增加膜流动性。休克时膜成份分析指出：肝细胞膜中磷脂酰胆碱较多地被水解，而磷脂酰乙醇胺水解较少。磷脂酰胆碱含量下降，所以流动性下降，相变温度升高。

磷脂酶A_2(PLA_2)在许多生化过程中和细胞膜改变中是一个关键性的酶，是休克的重要启动因子。外源性PLA_2和嵌于细胞膜深层的PLA_2对细胞膜流动性起重要调控作用，调节着膜结构，改变膜流动性。外源性PLA_2能消化细胞膜，水解不饱和脂肪酸的C－2位，从而增加饱脂肪酸/不饱和脂肪酸之比，故此改变流动性，使细胞膜从相对地流动变得权对固体化。Liu－Maw－Shung等指出PLA_2激活是内毒素休克的重要机制之一。我们的实验已证明失血性休克、内毒素休克时，血浆、肝、心、肠中PLA_2显著升高[3,4]。

本实验结果说明：失血性休克早期和晚期细胞膜流动性降低，膜相变温度升高与分子排列有序性增加和分子活化能升高有关。细胞膜从相对较流动变得更

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

趋于凝胶相。造成膜流动性变化的原因可能与磷脂酶激活、膜脂成份改变、不饱和脂肪酸水解、不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸之比改变有关。Stark 等[5]指出：磷脂成份变化主要原因是花生四烯酸及大量脂介质的释放，如溶血性磷脂酰胆碱、血小板激活因子、烷酸类、白三烯等大量不饱和脂肪酸释放于脂肪池从而影响膜的流动性。

在休克时膜的蛋白和脂肪酸上的 NH_2 可与脂质过氧化物丙二醛交联，使流动性下降。同时不饱和脂肪酸氧化后，不饱和键大量减少，膜脂相凝固点相对升高，流动性降低，相变温度升高。Petkova 等证明膜流动性与膜上内源性 PLA_2 呈负相关，即膜的硬化可激活内源性 PLA_2。同时又指出：改变脂质体的脂成份就改变了膜的流动性[6]。影响细胞膜流动性的因素很多，各种细胞毒素因子的调控作用、酰基转移与基因表达的关系等均待进一步深入研究[6]。

实验证明决定低血容量休克复苏后的存活率和存活时间的因素之一是休克状态持续的时间。严重创伤出血后第1个小时之后活存率明显下降，第1小时被称为"黄金小时"。朝鲜和越南战争的经验使军医相信这段时间是关键时刻。而本实验报告了失血性休克后红细胞膜生物物理参数的变化，说明休克后细胞膜流动性下降、细胞膜从相对比较流动变得比较固化，红细胞膜更趋于凝胶相。分子排列有序性增加，电子活化能升高，电子在能级间传递和跃迁困难。同时流动性改变也必然影响到膜上酶、受体等的功能。这与休克的发生发展有关。本实验中细胞膜的流动性和膜脂相变温度在失血性休克后1h 无显著改变，2h 后产生了显著改变，提示了以上临床改变的分子生物学基础。

参考文献

1 林克椿. 细胞膜的流动性. 生理科学进展，1985；16(1)：83

2 Hirate F，Axelrod J. Phospholipid methylation and biological signal transmission. Science，1980；209：1082

3 Liu Maw-Shung，Ghosh S，Yang Yong-Sok. Change in membrane lipid fluidity induced by phospholipase A activation：A mechanism of endotoxic shock. Life Sciences，1983；33：1995

4 Lifer AM. Significance of lipid mediators in shock states. Circulatory Shock，1989；27：3～12

5 Stark JM，Jackson SK. Sensitivity to endotoxin is induced by increased membrane fatty-acid unsaturation and oxidant stress. J Med Microbiol，1990；32：217

6 Petkova DH，Monchilova-pankova AB，Kounanov KS. Effect of liver plasma membrane fluidity to endogenous phospholipase A_2 aetivity. Biocheme，1987；69：1251～1255

（收稿：1995-03-18；修回：1995-10-02）

Studies of erythrocytic membrane fluidity and phase transition temperature in hemorrhagic shock in rabbits

Lu Songmin，Liu Jianchang，Guo Suqing，Wang Chenyin，Liu Guanghai，Chen Huisun (Research Institute of Field Surgery，Third Military Medical University，Chongqing，630042)

Abstract The changes of erythrocytic membrane fluidity and phase transition temperature were determined with the fluorescence polarization technique，in which 1，6 diphenyl－1，3，5－hexatriene was used as the fluorecence probe，in the rabbit model of hemorrhagic shock. It was found that in the hemorrhagic shock with an average blood pressure of 40 mmHg for 3 h，erythrocytic membrane polarization was elevated from 0.260±0.020 to 0.289±0.015 ($P<0.01$)，membrane fluidity was decreased，microviscocity of membrane lipid regions was elevated from 2.605±0.495 to 3.406±0.497 and the lipid order parameter of membrane bilayer was increased significantly. The phase transition temperature was increased. The findings suggest that the erythrocytic membrane changed from a relative fluid to a relative solid during hemorrhagic shock.

Key words shock，hemorrhagic；erythrocyte membrane；membrane fluidity；rabbit

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net