DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.008

急性缺氧对大鼠红细胞膜生物物理特性影响的研究*

糜漫天 杨家驹 陈东升 石元刚 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室) 630038

提 要 本实验通过在低压舱模拟高原的缺氧环境,研究了急性缺氧条件下,大鼠红细胞膜生物物理特性的变化。实验选择1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)荧光探剂标记膜脂质,反映膜脂微粘滞性,另外还观察了膜蛋白内源性荧光光谱的变化,结果显示:急性缺氧条件下,红细胞膜脂质有序性增加,流动性降低,在模拟4 000 m、6 000 m、8 000 m高度维持8 h,膜脂流动性比平原对照显著降低;动物在6 000 m分别减压8、12和24 h,发现随缺氧时间延长,流动性进一步降低。另外本研究显示,在急性缺氧条件下,红细胞膜蛋白内源性荧光光谱峰型及最大发射波长无明显改变,但荧光强度有所降低,碘化钾(KI)荧光淬灭效应也有一定差异。

关键词 缺氧症;红细胞膜;大鼠
中图法分类号 R331.141

急性缺氧将引起机体一系列代谢及生理功能的异常变化。有研究显示,缺氧时,红细胞脆性增加,膜屏障作用减小,膜上一些酶活性降低,离子通透性改变,红细胞寿命缩短。推测缺氧条件下红细胞膜功能的变化与其膜生物物理特性改变有关。为此本实验通过模拟不同缺氧环境,观察了急性缺氧时,大鼠红细胞膜脂质流动性、膜蛋白内源性荧光谱的变化,该研究有助于阐明缺氧时红细胞膜功能异常的可能机理。

1 材料与方法

1.1 动物

实验动物为雄性Wistar大鼠(本校实验动物中心饲养),随机分为8组,每组10只,动物体重202±11 g,自由进食和饮水。

1.2 减压方法

5 000 m模拟高度以下时,以1 000 m/min速度上升;5 000 m以上时,在5 000 m处停留3min,然后以500 m/min速度上升至相应高度,动物分别在3 000、4 000、6 000和8 000 m维持8 h。为观察不同缺氧时间的作用,动物需在6 000 m分别连续减压8、12及24 h。对照为未进低压氧仓处理的动物(平原对照,海拔高度300 m)。

1.3 大鼠红细胞膜制备

红细胞膜制备按低渗一步溶血法进行,膜蛋白含量测定用Lowry法[1]。

1.4 红细胞膜的DPH标记及荧光测量

取新鲜制备的红细胞膜2 ml(膜蛋白浓度为200 μg/ml),加2×10^{-6} mol/L DPH(1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene,Sigma产品)2 ml,置25℃温育30 min后,在带偏振附件的MPF-4型荧光分光光度计上测荧光值(激发波360 nm,发射波430 nm。偏振度和微粘度计算详见文献[2]。

1.5 膜蛋白内源性荧光扫描及碘化钾(KI)淬灭效应

方法详见文献[3]。

1.6 统计处理方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPLM软件作t检验比较各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 不同模拟高度下红细胞膜荧光偏振度及膜微粘滞性变化

图1显示3 000 m高度大鼠红细胞膜微粘滞度与对照组无明显差异,但4 000 m以上高度膜微粘滞度均较对照组显著升高,表明在严重缺氧时大鼠红细胞膜脂质有序性增大,流动性降低。

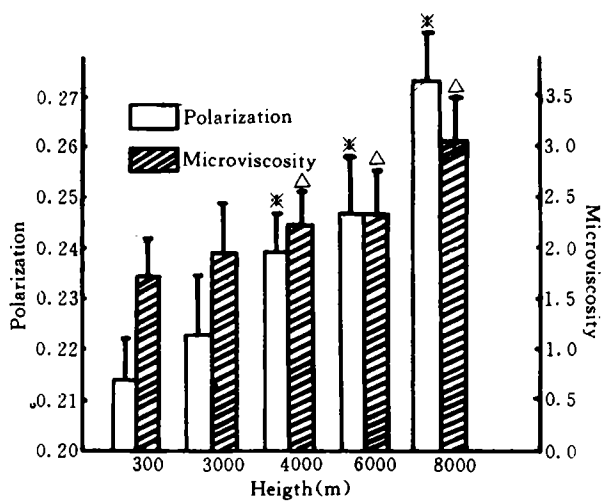


图1 不同高度红细胞膜偏振度及微粘滞性变化

Fig 1 The changes of polarization and microviscosity of RBC membrane at different height

※, △ Compared with the control $P<0.05$

* 全军"八五"攻关课题

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

2.2 6 000 m 高度维持不同时间对荧光偏振度和膜微粘滞性的影响

图2显示，在6 000 m 高度，随缺氧时间延长，大鼠红细胞膜荧光偏振度及微粘滞度增大，膜脂流动性降低，这种变化在动物急性缺氧早期（减压8 h）尤为明显，减压8～12 h，两者波动较小。

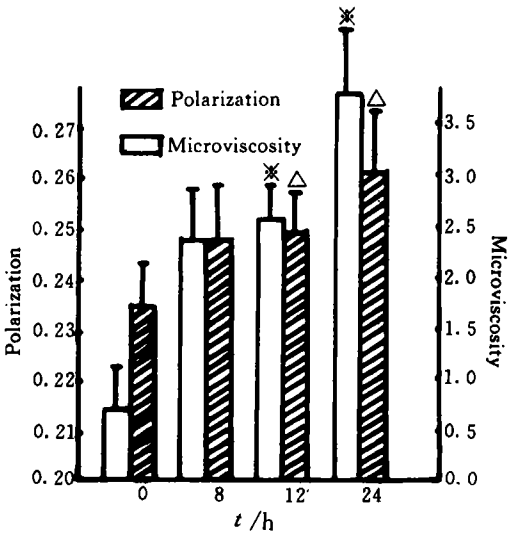


图2 6 000 m 作用不同时间偏振度及微粘滞性变化

Fig 2 The changes of polarization and microviscosity at 6 000 m for various time

※，△ Compared with the control $P<0.05$

2.3 膜蛋白内源性荧光及 KI 淬灭效应

图3是正常大鼠（对照）和减压至6 000 m 维持8h 大鼠红细胞膜蛋白内源性荧光光谱图，图显示在急性缺氧条件下，红细胞膜蛋白内源性荧光强度有所减弱，但波形和最大发射波长无明显变化；图4为 KI 荧光淬灭效应图，它显示缺氧时 KI 对膜蛋白内源性荧光的淬灭作用较对照减弱（曲线下降比较平稳）。

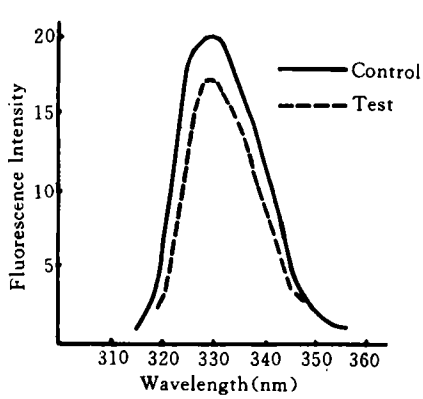


图3 红细胞膜蛋白内源性荧光光谱图

Fig 3 The map of interior fluorescence spectra of RBC membrane protein

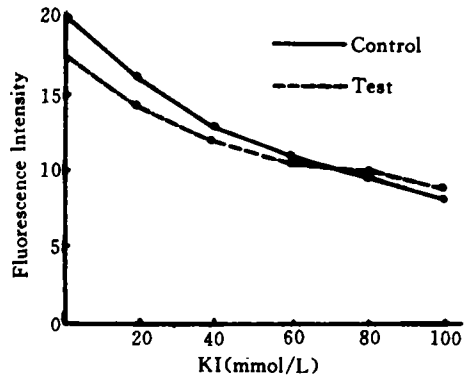


图4 碘化钾荧光淬灭效应图

Fig 4 The map of quenching effect of KI

3 讨论

生物膜主要由磷脂、胆固醇和膜蛋白组成，膜脂质微环境对膜蛋白结构与功能有调节作用。膜脂维持一定的流动性对物质的跨膜转运、信息传递和能量转换是必要的，膜生物物理特性的变化将对膜功能产生显著影响。

本研究显示，在急性缺氧时，大鼠红细胞膜脂质有序性增加，流动性降低；在缺氧不严重时，机体尚有一定代偿能力，但随缺氧加重，作用时间延长，膜脂流动性进一步降低。急性缺氧条件下，膜脂物理特性的这种变化可能与膜脂质过氧化作用增强有关。本室曾发现急性缺氧时，多核粒细胞（PMN）O_2^- 产生及血浆丙二醛（MDA）含量显著升高。Van den 等用不同的荧光探剂在体外研究了脂质过氧化可致膜流动性降低。目前认为脂质过氧化使膜脂流动性改变的可能机理有：①膜多不饱和脂肪酸双键断裂；②MDA 进入水相，使膜蛋白 NH_2 与膜脂交联形成 Schiff's 键，膜流动性下降[4]；③脂质过氧化过程中，相邻脂质与自由基共价结合，导致膜脂酰键排列有序性增强。

蛋白质内源性荧光主要与色氨酸和酪氨酸有关，在激发波长为285 nm 时，内源性荧光来自色氨酸，它的强度和最大发射波长受蛋白质高级结构的影响[5]；I^- 可与蛋白质中色氨酸残基随机碰撞而淬灭其内源性荧光，淬灭效应也与蛋白质空间构象有关。本实验表明，在急性缺氧时，红细胞膜蛋白质内源性荧光光谱形态，最大发射波长无明显变化，但荧光强度有所降低，KI 淬灭效应也有不同，据此推测缺氧时红细胞膜蛋白质构象或膜蛋白分布发生改变，这种改变可能是膜脂质过氧化作用增强，致膜蛋白交联，形成高分子蛋白多

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

聚体的缘故[6]。

综上所述，在急性缺氧条件下，大鼠红细胞膜脂微粘滞性升高，流动性降低，膜蛋白空间构象或膜蛋白分布也有一定改变，这些变化可能与缺氧时红细胞膜功能的异常有关。关于缺氧时，红细胞膜生物物理特性改变的确切机制，以及其对膜功能的影响尚需进一步研究。

参考文献

1 聂松青，薄惠卿，林克春. 峰王精对大鼠红细胞膜流动性的影响. 北京医学院学报，1983，15(4)：249
2 陈建文，张兰萍，宋剑陶. 脂质过氧化对人红细胞膜流动性的影响. 生物物理学报，1992，8(3)：502
3 程极济，周培林，陈水月. 汞化合物对红细胞膜作用的研究. 生物物理学报，1986，2(1)：42
4 Van denberg JM, Kuypers FA, Qiu JH. The use of cisparinaric acid to determine lipid peroxidation in human erythrocyte membranes. Comparision of normal and sickle erythocyte membranes. Biochim Biophys Acta，1988，944：29
5 Alexander Ross JB, Herman RW, Richard AP. Correlation of tryptophan fluorescence intensity decay parameters with ' H-NMR-determined ronamer conformations. Biochemisity，1992，21：1585
6 程 时，谢一琳，华 明. 金属硫蛋白对大鼠红细胞膜受羟自由基损伤保护作用的自旋标记-ESR 研究. 生物物理学报，1992，8(1)：104

(收稿：1994-01-19；修回：1994-10-04)

Studies of the effects of acute hypoxia on the biophysical properties of erythrocyte membrane in rats

Mi Mantian, Yang Jiaju, Chen Dongshen, Shi Yuangang (Department of Food and Nutrient Hygiene, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The changes of the biophysical properties of the cell membrane of erythrocytes during acute hypoxia were observed in rats. The fluorescence probe, DPH, was used to label the lipids of the cell membrane to determin its microviscosity and fluorescence spectra of the menbrane protein.

It was found that under the conditions of acute hypoxia at the simulated altitude of 4 000 m for 8 hours, there was an increase of the regularity of the membrane lipids of eryhtrocytes and the microviscosity was also increased significantly. When the rats were kept at a simulated altitude of 6 000 m for 8 to 24 hours, the membrane fluidity was further decreased along with the prolongation of time. The map of interior fluorescece spectra of membrane proteins and the quenching effect of the fluorescence of potassium iodide suggested that the structure or the distribution of membrane proteins of erythrocytes could be changed under acute hypoxia.

Key words anoxia; erythrocyte membrane; rats

重型肝炎合并上消化道出血的护理体会

Nursing care for severe viral hepatitis complicated with upper gastrointestinal bleeding

宋 音 (第三军医大学西南医院传染科) 630038

由于重型肝炎(重肝)患者凝血机制障碍，加之部份慢重肝患者存在食道静脉曲张，常出现上消化道出血，致病情恶化。因此在积极治疗肝病的同时，提高上消化道出血的防治水平，对提高重肝的存活率有重要意义。我科1990年1月至1992年12月收治重肝合并上消化道出血32例，经积极抢救，止血效果满意。现将抢救过程中护理工作的协调作用及其体会总结如下。

1 临床资料

本组32例病例患者系1990年1月至1992年12月的住院病人。男22例，女10例，年龄20～60岁(平均32.8岁)，血清胆红素为201～480 μmol/L，凝血酶原活动度13.1%～38.7%，出血前明确有食道静脉曲张者12例，临床诊断亚重肝8例，慢重肝24例。

本组病例首发显性出血症状均为呕血，呕血量为600～2 000 ml，在呕血前，全部患者均有不同程度的心慌，15例上腹部有烧灼感及原有腹胀加重，部份患者还有烦躁、出汗、频繁呃逆。

出血后在医生指导下进行综合抢救，对明确有食道静脉曲张的患者均下三腔管压迫止血，另有5例留置胃管给药及监测出血情况。 (下转 421 页)

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