

文章编号:1000-582x(1999)04-0074-04

⑮
74-77

遗传球形红细胞增多症 红细胞膜力学特性研究

R555.1

宋关斌, 吴泽志, 龙勉, 王翔, 蔡绍哲
(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044)

摘要:采用微管吸吮实验技术并结合十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等生化方法研究遗传性球形红细胞增多症(HS)红细胞膜粘弹特性及膜骨架蛋白的变化。结果表明:HS红细胞膜的弹性模量和正常对照组比较无明显差异而粘性系数显著高于正常值,细胞粘滞性增大,变形能力降低;在红细胞膜骨架蛋白中,收缩蛋白、带3蛋白和带5蛋白的含量低于正常细胞,膜骨架蛋白的巯基含量低于正常细胞。这一结果提示在膜骨架蛋白网络中,其结构和成分的完整性在决定红细胞变形行为上起着重要作用。

关键词:遗传性球形红细胞增多症;红细胞膜;粘弹性;巯基;微管吸吮技术
中图分类号: Q66

文献标识码:A
HS, 球形红细胞, 力学特性

红细胞膜骨架蛋白在支撑细胞形态、维持细胞变形和运动方面起着重要作用,也是决定膜力学特性以及整个细胞流变特性的重要因素,其分子结构或成分上的异常均可导致红细胞上述性质的变化,引起系列临床疾病。HS是一种重要的红细胞膜蛋白遗传性疾病,以溶血、黄疸、脾大为主要体征,外周血中球形红细胞明显增多且渗透脆性增加。患者中大多数有膜骨架蛋白成分的异常,并且异常的程度与红细胞渗透脆性及临床严重程度有关^[1-3]。

为了探讨HS红细胞膜骨架蛋白成分和结构与其力学行为的相互关系,笔者以微管吸吮技术(Micropipette Aspiration Technique)研究了HS病人红细胞膜的粘弹性变化,并进一步以SDS-PAGE等生化技术研究了红细胞膜骨架蛋白组成、巯基含量,以期为研究HS的分子病理机制提供定量的细胞流变学依据。

1 材料和方法

1.1 病例及红细胞制备

HS患者,中国人民解放军第三军医大学新桥医院随诊病人。按常规方法抽取患者静脉血经肝素抗凝,加适量悬浮介质 Hanks 液, 500~800 r/min, 离心 5 min, 弃上清液后加 Hanks

• 收稿日期:1998-04-22

基金项目:霍英东基金资助项目(0401016)

作者简介:宋关斌(1968-),男,重庆人,重庆大学讲师,硕士。从事生物医学工程研究。

液重复离心 3~5 次, 取红细胞配制成 Hanks 悬液备用。正常对照组血液由重庆市中心血站提供, 同前操作制成细胞悬液备用。

1.2 实验方法

1) 红细胞膜骨架蛋白的制备按张龙翔等的方法^[4], 蛋白浓度按 Lowry 法^[5]测定。

2) SDS-PAGE 按 Laemmli 方法进行^[6]。Acr 为 BDH 产品, Bis 为 Fluka 产品, 其它试剂均为国产分析纯。电泳时令 HS 与正常对照组的样品浓度与点样体积的乘积相等, 凝胶用 160-光密度扫描仪在 540 nm 处扫描, 测量 HS 红细胞膜骨架蛋白的变化。

3) 膜骨架蛋白巯基含量测定按 Takeo 等^[7]的方法, 巯基含量以 nmol/mg 蛋白质表示。

4) 红细胞膜粘弹性的测量: 采用微管吸吮实验系统, 该系统由倒置显微镜 (Axiovert 35, Zeiss Co, 德国)、显微操作器 (MR5170, ependorf Co, 德国)、图象处理仪 (Vidas 21, Kontron Co, 德国)、摄录系统 (含时标发生器, VTG-FOR. A Co, 日本)、压力控制和记录系统 (本院自行设计) 及微管等部分组成 (图 1)。微管由普通毛细波管在微管控制器 (P-87, Sutter Ins Co, 美国) 上控制而成, 内半径 0.53~0.73 μm 。将约 0.5 ml 细胞悬液注入一特定的

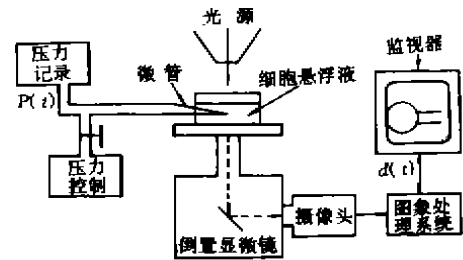


图 1 微管吸吮实验系统

圆形小腔 (Chamber) 内, 置于倒置显微镜的载物台上, 利用显微操作器控制微管尖部靠近细胞表面, 通过压力控制系统给细胞施以一定的负压以吸吮细胞, 使红细胞膜的一小部分被吸入微管, 细胞在微管内的变形时间过程由电视摄录系统记录, 通过回放到图象处理系统测量细胞在微管内的变形值。所有实验均在室温 (约 25 $^{\circ}\text{C}$) 下 4 h 内完成。整个系统在图象监视器上的放大倍数约为 3 500 倍, 并用 40 μm 的光栅尺进行标定。

5) 计算与数据处理, 参照 Chien 等的方法^[8], 用 Kelvin 模型 (一弹性元件和一弹性元件并联) 拟合实验结果。以弹性模量 μ 和粘性系数 η 表征红细胞膜的粘弹特性, 定量比较 HS 与正常红细胞膜的弹性参数, 组间数据比较用两样本均数的 t 检验。

2 实验结果

2.1 HS 红细胞膜的粘弹特性

利用微管吸吮实验技术定量研究 HS 红细胞膜的粘弹特性, 根据 Chien 的方法拟合实验数据, 结果见图 2。

HS 红细胞膜的弹性模量为 $(5.65 \pm 2.27) \times 10^{-8} \text{ N} \cdot \text{cm}^{-1}$, 粘性系数为 $(6.29 \pm 2.97) \times 10^{-9} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($n=23$), 正常红细胞的弹性模量为 $(5.36 \pm 0.56) \times 10^{-8} \text{ N} \cdot \text{cm}^{-1}$, 粘性系数为 $(1.91 \pm 0.96) \times 10^{-9} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($n=14$), 二者的弹性模量无明显差异 ($P < 0.05$), 而 HS 红细胞的粘性系数明显升高 ($P < 0.001$), 说明 HS 患者红细胞的粘滞度增大, 变形能力降低。

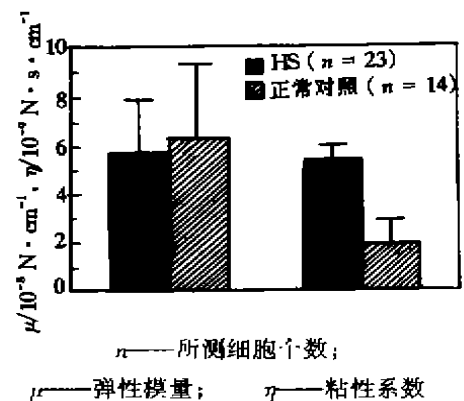


图 2 正常及 HS 病人红细胞膜的粘弹特性

2.2 HS红细胞膜骨架蛋白的变化

提取HS与正常红细胞膜骨架蛋白,经SDS-PAGE分析,结果见图3。

从图3可见,HS红细胞膜骨架蛋白中,收缩蛋白、带3蛋白和带5蛋白颜色明显浅、淡。电泳凝胶经光密度扫描仪在540 nm处扫描,发现HS红细胞膜骨架蛋白的收缩蛋白、带3蛋白和带5蛋白的相对含量分别为 $(36.61 \pm 2.28)\%$ 、 $(8.01 \pm 2.05)\%$ 和 $(4.46 \pm 0.91)\%$,而正常对照组分别为 $(52.84 \pm 4.65)\%$ 、 $(26.19 \pm 5.23)\%$ 和 $(9.25 \pm 1.92)\%$,这一结果提示HS红细胞膜骨架蛋白中收缩蛋白、带3蛋白和带5蛋白有明显的缺乏($P < 0.05$)。

2.3 HS红细胞膜骨架蛋白的巯基含量

按Takeo的方法,所测正常红细胞膜骨架蛋白巯基含量为 (152.05 ± 10.32) nmol/mg蛋白质,HS红细胞膜骨架蛋白巯基含量为 (71.05 ± 3.25) nmol/mg蛋白质($n=3$),明显低于正常对照组($P < 0.05$),提示其巯基发生了氧化,膜骨架蛋白之间的缔合交联度增加。

3 讨论

微管吸吮实验技术是本世纪70年代中末期发展起来的一种研究单个细胞或细胞对变形和粘附的重要手段,笔者采用该技术研究了HS红细胞膜的粘弹特性,发现其弹性模量与正常红细胞比较无明显差别,但粘性系数明显高于正常值,细胞粘滞性增大,表明红细胞变形能力降低。HS是一种红细胞膜骨架缺陷疾病,这种缺陷可能是引起膜力学特性改变的重要原因。迄今已发现HS病人红细胞膜骨架蛋白中有收缩蛋白、带4.1蛋白和带4.2蛋白含量缺乏和带3蛋白增高等缺陷^[1],亦有报道带3蛋白缺乏的^[2]。我们采用SDS-PAGE法观察骨架蛋白的变化,发现收缩蛋白、带3蛋白明显缺乏,这一结果与文献[3]关于HS患者收缩蛋白缺乏的报道基本一致。我们还发现带5蛋白也有一定缺乏,这一结果至今未见报道过,尚需进一步的实验验证。这种骨架蛋白的缺失可能造成红细胞膜表面电荷减少,从而使红细胞间的粘附力增大,聚集性增强,红细胞的瘀滞造成红细胞代谢功能改变,变形性降低,故难以通过脾脏而被其网状系统拦截,在脾微循环中被破坏,造成血管外溶血。

为了进一步探讨引起HS红细胞膜力学特性及膜骨架蛋白变化的原因,我们研究了HS红细胞膜骨架蛋白巯基含量的变化,结果表明,其膜骨架蛋白巯基含量低于正常细胞。从理论上说,膜骨架蛋白巯基含量是膜蛋白交联程度的一个重要生化指标,巯基含量减少意味着膜骨架蛋白巯基发生氧化,膜骨架蛋白交联程度增加,这可能是膜力学特性改变的重要原因。但是,有关膜蛋白的巯基含量和交联度与SDS-PAGE图谱的关系却有待于深入研究。

HS患者红细胞膜分子成分的异常,使 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、ATP酶活性降低,造成 Ca^{2+} 沉积在红细胞膜上和胞内,红细胞变得僵硬而粘滞,其粘弹性参数均应比正常值高,结果发现该HS患者红细胞膜的弹性模量和正常红细胞比较无明显差别,其原因尚需进一步研究。

目前,脾切除是治疗HS症的有效方法,脾切除后,贫血可获得永久性治愈,但球形红细

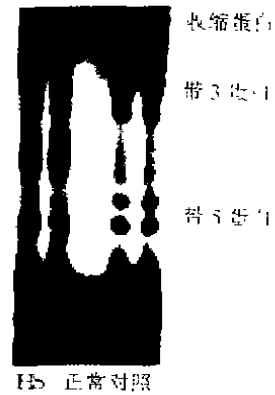


图3 正常及HS病人红细胞膜骨架蛋白的SDS-PAGE图谱

胞增多及红细胞脆性试验增加可持续存在,而且脾切除后,病人发生感染机会增多,同时可能产生并发症(如再生性危象及胆结石),因此从HS患者的发病机制入手,寻找一条治疗因膜骨架缺陷而引起的细胞形态、分子成分、变形能力和代谢功能异常的方法,可能会取得更好疗效。

4 结 语

HS是一种重要的红细胞膜骨架蛋白缺陷性疾病,其致病的原因很多。传统的观念认为HS主要是由于膜骨架蛋白的缺失造成,而本实验发现膜骨架蛋白巯基含量的减少可能也起着重要作用,其具体发病机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 丁训结. 实用血液病学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1992.65~70.
- [2] 邵宗鸿. 我国临床血液学研究现状与展望[J]. 中华血液学杂志,1995,16(4):171~174.
- [3] 方芳. 遗传性球形红细胞增多症红细胞膜收缩蛋白的改变[J]. 中华血液学杂志,1994,15(8):409~410.
- [4] 张龙翔. 生物化学实验技术和方法[M]. 北京:高等教育出版社,1982.49~51.
- [5] LOWRY O H. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193:265~269.
- [6] LEAMMLI J K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. [J]. Nature, 1970, 227:680~684.
- [7] YAMAGUCHI T. Effects of chemical modification membrane thiol groups on hemolysis of human erythrocytes under by diostatic pressure[J]. Biochim Biophysica Acta, 1994, 1195:205~210.
- [8] CHIEN S. Theoretical and experimental studies on viscoelastic properties of erythrocyte membrane[J]. Biophys J, 1978, 24:463~479.

Studies on the Mechanical Properties of Erythrocyte membrane for Hereditary Spherocytosis

SONG Guan-bin, WU Ze-zhi, LONG Mian, WANG Xiang, CAI Shao-xi

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT: A SDS-PAGE technique is adopted to investigate the change of membrane cytoskeleton protein for hereditary spherocytosis(HS). The membrane viscoelastic properties are determined by the micropipette aspiration technique. The results show that the membrane elastic modulus of HS erythrocyte has no remarkable difference but the viscosity is significantly higher than normal cells and the deformability of HS erythrocyte is reduced. It is discovered that spectrin, band 3 and band 5 of HS erythrocyte are partly deficient; the membrane thiol groups concentration of HS erythrocyte is lower than normal cells. These results suggest that the integrity of the structure and ingredient of the cytoskeleton protein networks plays an important role in deformability of erythrocyte.

KEYWORDS: hereditary spherocytosis; erythrocyte membrane; viscoelasticity; thiol groups; micropipette aspiration technique

(责任编辑 李胜春)