

山莨菪碱对红细胞膜流动性和膜内源荧光的影响

杨国栋 周文华* 徐飞 朱波

(宁波市微循环与莨菪类药研究所, 宁波 315010)

摘要 应用荧光探针DPH测定完整红细胞膜流动性。山莨菪碱显著增加红细胞膜流动性。山莨菪碱对红细胞膜内源荧光的淬灭呈药物浓度依赖, 钙和山莨菪碱对红细胞膜内源荧光的淬灭有协同作用, 提示山莨菪碱对膜疏水区有作用, 并且直接与膜蛋白反应导致能量转移。

关键词 山莨菪碱 红细胞膜 膜流动性 钙

山莨菪碱是我国首先合成的胆碱神经阻断药。它不仅具有改善微循环和血液流态, 而且能阻止钙离子载体诱导的细胞内游离钙升高^[1]。有作者报告山莨菪碱与不同组分的脂质体的互相作用^[2], 但对完整红细胞膜脂质流动性和膜蛋白构象的影响未见报道。本文以1,6-二苯基己三烯(DPH)荧光探针, 用荧光偏振测定山莨菪碱对完整红细胞脂质区流动性的影响; 用红细胞膜内源荧光的扫描光谱观察山莨菪碱对红细胞膜蛋白质构象的作用。

材料和方法

材料 红细胞采自健康日本大耳兔, DPH, Sigma产品, 配成 2×10^{-3} mol/L DPH四氢呋喃贮存液, 低温保存。山莨菪碱系杭州民生药厂出品。其余均为市售分析纯试剂。

方法 完整红细胞膜流动性测定: 参照Arduini等^[3]和Shinitzky等^[4]报告的方法修改而成。DPH贮存液用pH 7.4的磷酸缓冲液稀释成 2×10^{-6} mol/L DPH使用液, 应剧烈振荡至溶液无气味。兔血红细胞经磷酸缓冲液洗液后, 用磷酸缓冲液制成红细胞悬液。取红细胞悬液2 ml加2 ml DPH使用液

(红细胞数为 5×10^8 个/ml) 37℃温育1 h。离心去除未标记的DPH。细胞加入磷酸缓冲液用日立F-3000荧光分光光度计测定荧光强度。激发波长361 nm, 狭缝5 nm, 发射波长450 nm, 狭缝5 nm。荧光偏振用稳态荧光各向异性(r_s)表示。 $r_s = (I_v - I_h) / (I_v + 2I_h)$, I_v 和 I_h 分别为起偏器垂直方向, 检偏器垂直或水平方向的荧光强度。每次测定 I_v 和 I_h 必须校正以清除内源荧光和光散造成的误差。脂质有序度(s), $s = r_{\infty} / r_0$, 详细计算参见文献^[5]。 r_s 和 s 的变化直接与探针的旋转弛豫时间相关, 与流动性成反比。

红细胞膜内源荧光测定: 红细胞膜制备用低渗破膜的方法, 膜蛋白用Lowry法定量。红细胞膜内源荧光的测定按文献^[6]的方法。取0.2 mg/ml的红细胞膜溶液, 用日立F-3000荧光分光光度计作波长扫描, 激发波长270 nm, 扫描波长范围300~500 nm。

结 果

山莨菪碱对完整红细胞膜流动性的影响 将标记DPH的完整红细胞悬液加入不同浓度的山莨菪碱温育1 h后, 测定稳态荧光各向异性。单纯的药物对荧光测定没有影

* 周文华, 27岁, 中国医科院协和医科大学研究生院毕业, 病理生理专业。

响,当山萆若碱浓度2 mmol/L时能明显降低 r_s 和 s 值,说明山萆若碱增加红细胞膜流动性。红细胞悬液加入 2 mmol/L 钙离子,红细胞膜 r_s 和 s 值与对照组相比无显著差异,提示钙对完整红细胞膜流动性没有显著影响。钙离子也不影响山萆若碱(4 mmol/L)对完整红细胞膜 r_s 的作用(Tab. 1)。

Tab. 1 Effect of Ani on the erythrocyte membrane r_s & s ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Group	r_s	s
Controlled	0.26 ± 0.02	0.65 ± 0.08
Ani(0.2 mmol/L)	$0.27 \pm 0.01^*$	$0.65 \pm 0.05^*$
Ani(1 mmol/L)	$0.25 \pm 0.02^*$	$0.60 \pm 0.05^*$
Ani(2 mmol/L)	$0.23 \pm 0.01^*$	$0.54 \pm 0.03^*$
Ani(4 mmol/L)	$0.23 \pm 0.02^*$	$0.53 \pm 0.06^*$
2 mmol/L CaCl ₂	$0.25 \pm 0.06^*$	$0.61 \pm 0.02^*$
2 mmol/L CaCl ₂ + Ani (4 mmol/L)	$0.23 \pm 0.01^*$	$0.53 \pm 0.03^*$

in contrast with controlled, $p > 0.05$.

* in contrast with controlled, $p < 0.01$.

山萆若碱对红细胞膜蛋白内源荧光的影响

Fig 1 中的 A、B、C 扫描曲线分别是单纯红细胞膜荧光扫描曲线、红细胞膜和山萆若碱作用 15 min 后的扫描曲线以及单纯山萆若碱的扫描曲线。图中可见山萆若碱与红细胞膜作用后大幅度降低红细胞膜内源荧光强度,但对膜内源荧光的峰值位置没有改变。单纯山萆若碱的荧光峰值在 310 nm 左右,与 B 曲线相比可发现山萆若碱与红细胞膜作用后,其自身的荧光峰值也下降(图中箭头所指)。

不同浓度的山萆若碱对红细胞膜内源荧光的淬灭率见 Tab. 2, 荧光的淬灭率根据红细胞膜内源荧光峰值降低的百分率计算。山萆若碱对红细胞膜内源荧光的淬灭呈药物浓度依赖。2 mmol/L 钙离子淬灭红细胞膜内源荧光达 $37 \pm 5\%$ ($\bar{x} \pm s$, $n=4$), 当再加入 1 mmol/L 山萆若碱, 荧光峰值的淬灭达

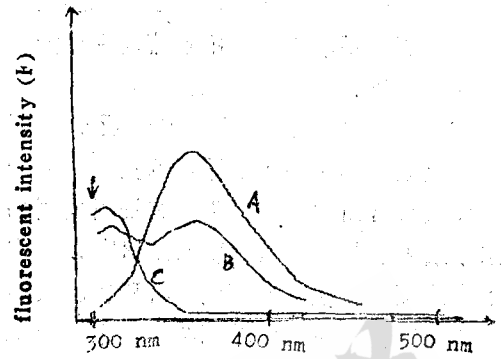


Fig. 1 Changes in the intrinsic fluorescence emission spectra of ghost following interaction with Ani.

A, ghost, the protein concentration of 0.2 mg/ml.

B, ghost + Ani(4 mmol/L).

C, Ani (4 mmol/L).

Tab. 2 Dose-dependence of Ani-induced quenching of intrinsic fluorescence of ghost ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Ani (mmol/L)	0.2	0.5	1	2	4
rate of quenching (per cent)	4 ± 1	9 ± 3	17 ± 4	24 ± 5	44 ± 8

$48 \pm 6\%$ ($\bar{x} \pm s$, $n=4$), 表明钙离子和山萆若碱对红细胞内源荧光淬灭具有协同作用。

讨论

在红细胞膜脂质区探针 DPH 的运动取决于荧光寿命和细胞膜粘度。一般认为荧光寿命在一定温度下是常数, 荧光偏振直接与膜粘度相关。但当药物作用于细胞膜必须考虑药物对探针荧光寿命的影响^[6]。本文检测总的荧光强度 F 来反映荧光寿命, 对照组和山萆若碱组的 F 值是一致的, 表明山萆若碱增加细胞膜流动性可能是它直接嵌入细胞膜疏水区作用于磷脂脂肪酸链有序结构的结

果。红细胞膜流动性增加可加强红细胞变形能力,山莨菪碱增加红细胞膜流动性可能与改善血液流态和微循环有关。

红细胞内源荧光的变化主要反映色氨酸、酪氨酸及其它们所处环境的变化,从一侧面反映膜蛋白构象的变化。有资料表明钙作用于细胞膜脂质与蛋白质联结区^[7],有作者报告山莨菪碱在室温下促进心磷脂脂双层形成类脂结构,与钙作用相似^[8]。本文结果显示钙和山莨菪碱对红细胞膜内源荧光的淬灭有协同作用,说明山莨菪碱除了作用于细胞膜疏水区域,还有其他作用途径。山莨菪碱不仅明显淬灭红细胞膜内源荧光,其自身荧光峰值也下降,推测山莨菪碱与红细胞膜蛋白发生直接作用。山莨菪碱对细胞膜钙通道,对蛋白激酶C有抑制作用,提示山莨菪碱与蛋白质的直接作用可能是发挥它药理效应的机理之一。

参 考 文 献

1 杨国栋,周文华. 山莨菪碱对A23187诱导的血小板内游离钙升高的影响. 中国药理学通报, 1991, 7(5):378

2 何琦,黄芬. 山莨菪碱与神经鞘磷脂脂质体的相互作用. 一荧光偏振和自旋标记顺磁共振的研究. 生物物理学报, 1986, 2(1):14

3 Arduini A, Chen Z, Stern A. Phenylhydrazine-inducing changes in erythrocyte membrane surface lipid packing. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 826:65

4 Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 515:367

5 郑建华,程龙生. 竹红菌甲素引起红细胞膜蛋白的光敏交联实验. 生物学报, 1986, 19(4):446

6 Deliconstantinos G, Kopeikina-Tsiboukidou L. Evaluation of membrane fluidity effects and enzyme activities alterations in adriamycin neurotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 1987, 36(7):1153

7 Cullis PR, Verkleij AJ, Ververgaert P. Polymorphic phase behaviour of cardiolipin as detected by ³¹P NMR and freeze-fracture techniques. *Biochim Biophys Acta*, 1978, 513:11

8 黄芬,王苏昆. ³¹P-核磁共振波谱研究山莨菪碱对磷脂酰乙醇胺脂质体多形性的影响. 科学通报, 1985, 13:1107.

Effect of Anisodamine on the fluidity of erythrocyte membrane and the intrinsic fluorescence of ghost

Yan Goudong, Zhou Wenhua, et al.

(Ningbo microcirculation & herb drugs institute, Ningbo 315010)

Abstract Anisodamine(Ani) could increase significantly the intact erythrocyte membrane fluidity in the presence or absence of CaCl₂. The intrinsic fluorescence of erythrocyte ghost was depressed by Ani in a dose-dependent manner. In the presence of 2 mmol/L CaCl₂ and Ani at 1 mmol/L in the medium, the rate of quenching of intrinsic fluorescence was higher than that of ghost treated by CaCl₂ or Ani alone. These data indicate that Ani has an effect on the hydrophobic region of the membrane, and causes the energy transfer by interacting directly with the membrane protein.

Key words Anisodamine Erythrocyte membrane membrane fluidity Calcium

收稿日期: 1992-03-06