

脉冲微波辐照影响心肌细胞膜蛋白构象及其机制的研究

邓桦¹, 宋占军², 王德文³, 杨鸿¹, 马春全¹, 卢玉葵¹

1. 佛山科学技术学院生命科学院, 广东 佛山 528231

2. 国家生物医学分析中心, 北京 100850

3. 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850

摘要 应用显微傅里叶变换红外光谱技术研究了脉冲微波辐照对心肌细胞膜蛋白质构象、功能的影响和相关分子机制。结果表明, 辐照可对心肌细胞的细胞膜蛋白质结构产生明显影响。细胞膜脂质中—CH₂—、磷脂结构中 C=O、蛋白质酰胺 I、II 带的伸缩振动峰消失或位移。辐照后心肌细胞膜蛋白质二级结构也出现明显变化, α -螺旋和 β -折叠结构减少, 二级结构无序化程度增加。上述变化均与辐照剂量呈正相关。结果提示受脉冲微波辐照后, 心肌细胞膜蛋白构象的完整性受损, 膜稳定性及流动性下降, 膜上多种生物活性结构被破坏, 上述变化构成了细胞膜功能丧失、细胞形态和结构损伤、细胞凋亡等病理学效应的生物化学基础。文章首次从蛋白质构象角度阐述了微波辐照对心肌细胞膜损伤的分子病理机制。

主题词 傅里叶变换红外光谱; 脉冲微波; 心肌细胞; 细胞膜; 蛋白质构象

中图分类号: Q648 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)08-1437-04

引言

心肌细胞膜是包括微波在内的非电离辐射致伤的靶部位^[1]。辐照后心肌细胞膜电穿孔, 细胞形态、结构和功能均受到严重影响。但非电离辐射对心肌细胞膜的致伤机制至今尚未阐明, 国内外尚未见非电离辐射对心肌细胞膜蛋白质结构与功能影响的相关研究报道。

傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrum, FTIR)是近年来新发展起来的一种光谱技术, FTIR 吸收谱带频率和强度的变化直接反映了生物大分子组成和结构的变化。运用 FTIR 显微技术和计算机辅助解析, 可直接提供有关细胞分子结构的多种信息, 研究不同蛋白质的构象随温度、酸度、湿度和光照等因素的变化规律, 从分子水平上了解细胞内蛋白质的结构与功能的关系^[2]。

本文以不同剂量脉冲微波(pulse microwave, PMW)辐照原代培养大鼠心肌细胞的方法, 采用显微傅里叶变换红外光谱技术, 研究脉冲微波对心肌细胞膜蛋白分子构象和功能的影响, 旨在探索非电离辐射致心肌细胞损伤的分子病理机制。

1 实验部分

1.1 仪器

Bio-Rad FTS-65A 傅里叶变换红外光谱仪及 UMA500 红外显微镜联用系统; 脉冲微波辐照源: 频率 9 GHz, 波长 3.2 cm, 峰值功率密度 950 mW·cm⁻², 脉宽 0.35 μ s。

1.2 心肌细胞培养与实验分组

心肌细胞分为对照组和辐照组。辐照组又分为三个剂量组, 辐照时间分别为 30, 60, 120 s。乳鼠心肌细胞的培养和鉴定参照有关文献进行^[1]。应用改良差速离心法提取心肌细胞膜, 经透射电镜形态学鉴定并结合细胞膜标识酶证实。辐照后各组取细胞膜悬液 0.5 mL(膜蛋白浓度 4 g·L⁻¹)滴加于特制镀金片, 真空干燥, 供光谱测试用。

1.3 傅里叶变换红外光谱测定与计算机辅助解析

红外光谱在 Bio-Rad FTS-65A 傅里叶变换红外光谱仪/UMA500 红外显微镜上测定, 仪器由干燥净化空气吹扫, 以降低水气吸收的干扰。分辨率为 4 cm⁻¹, 使用液氮冷却的 MCT 检测器, 红外检测光栏为 50 μ m×50 μ m, 每个样品扫描 128 次, 获得原始红外光谱。将原始红外光谱与相同条件下测得的背景红外光谱做差谱处理, 差减以保证在 2 000~1 700 cm⁻¹之间无吸收峰特征。导数和去卷积采用 Bio-Rad

收稿日期: 2006-01-26, 修订日期: 2006-03-12

基金项目: 全军医药卫生指令性课题(01L023)和广东省自然科学基金(04300712)资助项目

作者简介: 邓桦, 女, 1968年生, 佛山科学技术学院生命科学院副教授

FTS- 65A 3200 Date Station 软件。在光谱的二级导数中, Boxcar 切趾函数的带通边参数取值 0.4~0.6, 傅里叶去卷积采用 Bessel 切趾函数, 洛伦兹半高宽 16 cm^{-1} , 分辨率增强因子(k)为 2.3。对去卷积谱的谱带拟合采用 BANDFIT 程序, 以洛伦兹+高斯谱带拟合, 各组分的相对含量由最终拟合的酰胺 I 谱带面积计算得到。

2 结果与讨论

2.1 对照组心肌细胞膜蛋白质原始红外光谱的谱带归属

根据组织细胞生物大分子的红外光谱研究^[3, 4], 结合本实验结果, 对照组心肌细胞膜主要的 FTIR 吸收谱带及归属如表 1。

Table 1 Characteristic absorption frequencies and assignments of normal myocardial cell membrane

峰位/ cm^{-1}	归属	峰位/ cm^{-1}	归属
3 271~3 071	NH 伸缩与酰胺 II 带	1 624~1 534	酰胺 I 带和酰胺 II 带
2 956~2 871	膜脂质末端和膜蛋白中— CH_3	1 451	膜脂质中— CH_3 和— CH_2 —
2 925~2 854	脂质中— CH_2 —	1 397	— CH_3
2 960	蛋白质、脂类和 DNA 的— CH_3	1 238~1 169	细胞膜中磷脂磷酸二酯基团
1 736	细胞膜磷脂结构中 $\text{C}=\text{O}$ 基团	1 083	糖类 $\text{C}-\text{O}$ 基团

2.2 辐照后心肌细胞膜蛋白质 FTIR 的变化

对照组和不同剂量辐照组小鼠心肌细胞的傅里叶变换红外光谱见图 1。

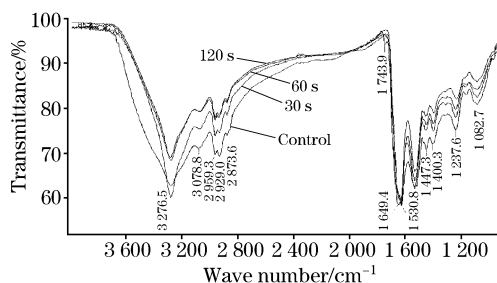


Fig. 1 FTIR spectra of the myocardial cell membrane irradiated by PMW with different dosage

2.2.1 辐照对细胞膜脂质结构的影响

辐照后各辐照组红外光谱在 $2\,929$, $2\,959\text{ cm}^{-1}$ 处属于磷脂脂质中— CH_2 —的伸缩振动峰强度明显减弱并向高波数位移, 减弱及位移程度与辐照剂量呈正相关。提示辐照后细胞膜中磷脂分子碳氢链构象的无序化和扭式构型增加。由于脂类多含有较长的烃链, 所以其振动方式的变化可以反映脂类的变化。实验结果说明, 辐照后细胞膜脂类物质中亚甲基的数目相对于甲基减少, 即脂肪烃链缩短, 从而使膜的流动性下降, 通透性降低^[5, 6]。同时, 细胞膜磷脂直接参与凋亡的发生, 并且是凋亡过程中的早期事件之一。辐照可引起心肌细胞凋亡已经得到病理学研究的证实^[7], 因此, 本实验发现辐照引起细胞膜磷脂结构的改变, 可能使微波辐照诱导心肌细胞发生凋亡的分子机制之一。

2.2.2 辐照对细胞膜磷脂结构的影响

辐照后各辐照组红外光谱在 $1\,743\text{ cm}^{-1}$ 处属于细胞膜中磷脂和脂肪酸所含酯类结构中 $\text{C}=\text{O}$ 基团的伸缩振动峰明显减弱甚至消失, 并呈现剂量效应关系, 该峰也可作为细胞脂类相对含量的标志。这一变化提示心肌细胞膜中磷脂的构象发生改变, 磷脂分子碳氢链处于凝胶态, 碳氢链间相互作用增强, 酯类成分含量减少甚至消失, 在功能上也可以反映出细胞膜流动性的下降^[8, 9]。细胞膜的流动性是保证其正常

功能的必要条件, 跨膜物质运输、细胞信息传递、细胞识别、细胞免疫、细胞分化以及激素的作用等等都与膜的流动性密切相关。当膜的流动性明显降低可使多种酶活性降低、跨膜运输停止, 膜功能受到严重影响。

2.2.3 辐照对细胞膜蛋白质结构的影响

辐照后各辐照组红外光谱在 $1\,649\text{ cm}^{-1}$ 处属于蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带的伸缩振动峰均消失, 并位移于 $1\,626\text{ cm}^{-1}$ 。 $1\,534\text{ cm}^{-1}$ 的酰胺 II 谱带和 $1\,312\text{ cm}^{-1}$ 处的酰胺 III 谱带明显增高, 提示 $\nu_{\text{C}-\text{N}}$ 和 δ_{NH} 的偶合呈缔合态^[10]。这一变化也导致了蛋白质侧链基团暴露, 使 $1\,400\text{ cm}^{-1}$ 处吸收增强。上述变化均表明辐照后心肌细胞膜蛋白质分子间有强氢键的形成, 使蛋白质发生变性和不可逆聚合。

本课题组的前期研究^[1, 7]已经证实心肌细胞膜是脉冲微波辐照致伤的靶部位, 辐照后心肌细胞膜电穿孔, 细胞形态、结构和功能均受到严重影响, 在病理学上可表现为心肌细胞自律性搏动减慢或停止, 心肌酶谱紊乱及活性下降, 坏死率和凋亡率显著增高, 本实验结果发现, 脉冲微波辐照可直接改变细胞膜蛋白的分子构象, 膜蛋白变性和不可逆聚合, 膜完整性和流动性下降, 通透性增高, 使膜上多种功能基团结构受损和功能改变, 从而在生化角度解释了微波辐照致心肌细胞膜损伤的分子病理机制。

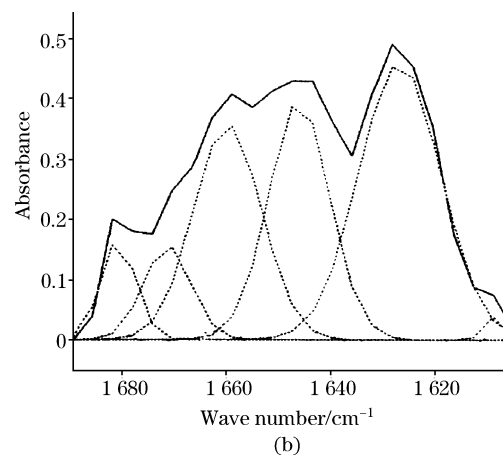
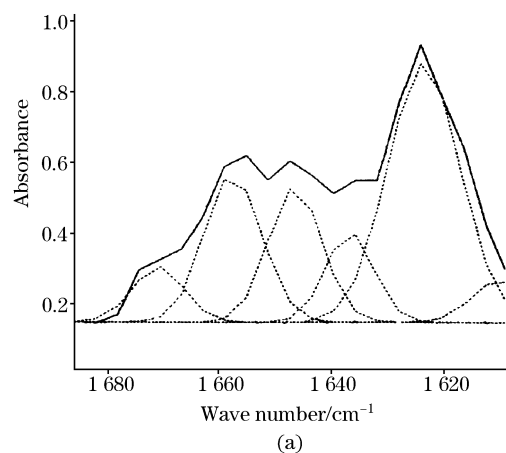
2.3 辐照对心肌细胞膜蛋白质二级结构的影响

FTIR 谱中酰胺 I 带包含着蛋白质二级结构的 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲等多种信息, 而它所对应的这些振动吸收峰又相互重叠在一起, 形成一宽峰。因此需采用曲线拟合的方法, 对酰胺 I 带进行去卷积、二阶导以及拟合处理, 定量计算心肌细胞膜蛋白分子中各种二级结构的相对含量。辐照后心肌细胞膜蛋白二级结构的变化见表 2, 酰胺 I 谱带的红外光谱曲线拟合分析见图 2。

由实验结果可见, 脉冲微波辐照可明显影响心肌细胞膜蛋白质二级结构, 与对照组相比, 辐照组 α -螺旋和 β -折叠结构明显减少, 无规卷曲和转角结构明显增加, $1\,647\text{ cm}^{-1}$ 位置的 β -折叠片的吸收峰消失而在 $1\,683\text{ cm}^{-1}$ 位置出现一个转角结构的弱峰。上述改变与辐照剂量呈正相关。

Table 2 The changes of secondary structure components in myocardial cell membrane irradiated by PMW (%)

组别	α -螺旋	β -折叠		转角		无规卷曲
	1 657 cm^{-1}	1 623 cm^{-1}	1 647 cm^{-1}	1 671 cm^{-1}	1 683 cm^{-1}	1 645 cm^{-1}
Control	20.5 \pm 3.2	51.3 \pm 6.8	6.1 \pm 0.3	4.7 \pm 0.2	—	17.5 \pm 0.7
30 s	17.5 \pm 1.4	41.0 \pm 2.1	—	7.2 \pm 0.4	4.7 \pm 0.3	28.2 \pm 1.1
60 s	16.6 \pm 1.1	39.0 \pm 1.9	—	7.4 \pm 0.5	7.6 \pm 0.4	30.5 \pm 1.3
120 s	16.4 \pm 1.3	34.8 \pm 2.8	—	8.0 \pm 0.4	9.0 \pm 0.6	32.1 \pm 1.5

**Fig. 2** FTIR deconvoluted spectra of the amide I region in myocardial cell membrane

(a): Control group; (b): 60 s irradiated by PMW

细胞膜是由磷脂双层、镶嵌蛋白及支持于膜内侧的膜骨架蛋白构成,膜蛋白二级结构中的 α -螺旋伸入到膜脂双层中,而 β -折叠多位于膜表面,转角结构是一种能使肽链产生 180° 。转折的二级结构,大多数转角结构都处于蛋白质表面。

实验结果表明,辐照对蛋白二级结构造成明显损伤,不但使膜表面 β -折叠结构明显改变、含量减少,同时也使膜脂双层中的 α -螺旋结构明显减少,无规卷曲和转角结构明显增加,并且表现出一定的剂量效应关系。 α -螺旋是蛋白质二级结构中最有序、最稳定的构型,因此膜的稳定在很大程度上依赖于 α -螺旋结构的稳定。上述变化说明辐照可导致膜蛋白质二级结构无序化程度增加,致使膜蛋白空间结构稳定性的下降,细胞膜功能受损。同时,细胞膜离子通道、酶活性部位等也都大多对应于膜蛋白质的 α -螺旋结构,我们的前期研究也已发现辐照后细胞膜多种受体功能受损,膜通透性增高,细胞内 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , P^{3+} 等多种离子成分外流,心肌酶活性降低。本实验结果说明,微波辐照作用可通过改变蛋白质二级结构,从而影响心肌细胞膜的多种生物学功能。

3 总 结

相关研究已经发现心肌细胞膜是包括微波在内的非电离辐照损伤的靶部位,细胞膜破坏是细胞损伤特别是细胞不可逆损伤的关键环节。本文首次从蛋白质分子构象角度阐述了脉冲微波致心肌细胞膜损伤的分子病理机制。

蛋白质广泛参与细胞的功能及调节,蛋白质组决定细胞乃至组织和器官的表型,使用蛋白质组学研究细胞或分子,可用于解释心血管病理过程中许多复杂的、多因素问题^[10]。在脉冲微波导致心肌细胞急性损伤的过程中,辐照可引发蛋白质迅速的翻译后修饰,这些修饰将会极大的影响其功能,同时,这些修饰也可继续影响其他蛋白质,从而使得蛋白质表达及修饰成为一个动态和连续的过程。因此,脉冲微波辐照引起的蛋白质分子构象的改变,影响了细胞膜的结构和功能,导致了心肌细胞形态和功能的变化,从而在病理学损伤效应上,表现为辐照后心肌细胞出现形态异常、搏动减慢、细胞活力下降,凋亡和坏死率增加,细胞膜受体活性降低,心肌酶活性紊乱等变化^[1]。

参 考 文 献

- [1] DENG Hua, WANG De-wen, PENG Rui-yun, et al(邓 桦, 王德文, 彭瑞云, 等). Journal of Biomedical Engineering(生物医学工程杂志), 2004, 22(4): 672.
- [2] Hering J A, Innocent P R, Haris P I. Appl. Bioinformatics, 2004, 3(1): 9.
- [3] Erukhimovitch V, Talyshinsky M, Souprun Y, et al. Photochemistry and Photobiology, 2002, 76(4): 446.
- [4] Argov S, Ramesh J, Salman A, et al. J. Biomed., 2002, 7(2): 248.
- [5] Gasparri F, Muzio M. Biochem. J., 2003, 369: 239.
- [6] LIU Ming-jie, WANG Zhao, SUN Su-qin, et al(刘明杰, 王 钊, 孙素琴, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 688.
- [7] DENG Hua, WANG De-wen, PENG Rui-yun, et al(邓 桦, 王德文, 彭瑞云, 等). Journal of Environment and Health(环境与健康杂志), 2004, 21(3): 137.
- [8] Kotting C, Gerwert K. Methods Mol. Biol., 2005, 305: 261.
- [9] DONGYE Guang-zhi, MENG Qing-yong, ZHANG Pei-hua, et al(东野广智, 孟庆勇, 张培华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 270.
- [10] Roach P, Farrar D, Perry C C. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(22): 8168.

Study on the Membrane Protein Conformational Changes and Mechanisms of Myocardial Cell Irradiated by Pulse Microwave

DENG Hua¹, SONG Zhan-jun², WANG De-wen³, YANG Hong¹, MA Chun-quan¹, LU Yu-kui¹

1. College of Life Science, Foshan Science Technology University, Foshan 528231, China

2. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China

3. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract Micro-Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique was applied to study the membrane protein conformational and functional changes of myocardial cell irradiated by pulse microwave. The results show that pulse microwave could influence the membrane protein structure markedly. The stretching vibration of lipid $-\text{CH}_2-$, lecithoid $\text{C}=\text{O}$, amide I and II region was decreased or displaced. The secondary structures of membrane protein were also changed by irradiation. The percentage of α -helix and β -pleated sheet structure decreased remarkably, and the disordering of secondary membrane proteins increased. All the above changes are correlated with the irradiation dosage. The results indicated that the integrality of myocardial cell membrane was injured by pulse microwave, and the membrane fluidity and stability decreased. Multi-biochemically active structures were damaged. Then all the changes could make a biochemical foundation of pathologic effects, which included membrane function decline, cell morphological change, configuration injuring and apoptosis etc. This paper is from a new view of protein conformation to explore the molecular pathologic mechanism of the damage caused by pulse microwave irradiation.

Keywords Fourier transform infrared spectrum; Pulse microwave; Myocardial cell; Cell membrane; Protein conformation

(Received Jan. 26, 2006; accepted Mar. 12, 2006)