

温度与电磁参数协同影响胰岛素分子构象与功能的光谱学方法研究

严 喆, 陈树德*, 乔登江

华东师范大学光谱学与波谱学教育部重点实验室, 华东师范大学物理系, 上海 200062

摘要 近年来, 脉冲电磁辐射和弱电磁辐射的生物效应已引起人们的关注。开展了众多的病理学调查和实验研究。但是研究结果并不一致, 学术界存在众多争议。由于脉冲电磁辐射和弱电磁辐射不能引起被辐照生物样品产生明显的温升效应(温升小于 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$), 不能用电磁辐射的热效应机理来解释这类生物效应。因此人们往往称之为“非热效应”。文章应用荧光光谱和拉曼光谱方法研究脉冲电场对胰岛素分子构象变化影响的结果表明: (1) 尽管这类电磁辐射不会引起被辐照生物样品的温度产生明显变化($0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$), 但是辐照时的环境温度变化则能改变辐照实验的结果。(2) 环境温度能对胰岛素分子结构中的链间二硫键, C—C 键的振动等在脉冲电场作用下的变化产生明显的影响, 从而对脉冲电场引发的胰岛素的构象变化产生影响。这表明对于“非热效应”, 表征热的量度的温度, 仍是脉冲和弱电磁场辐照生物效应研究中值得关注的极重要参数。

关键词 脉冲电场; 温度; 胰岛素; 荧光光谱; 激光拉曼光谱

中图分类号: Q64 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)06-1343-05

引言

近年来, 弱电磁辐射的生物效应已引起人们的关注。开展了众多的病理学调查^[1, 2]和实验研究^[3-6]。但是研究结果并不一致, 学术界存在众多争议。研究结果的分歧影响了世界统一的弱电磁辐射安全标准的制定, 影响了众多电子产品的国际贸易。且仍未建立起“科学合理”的弱电磁辐射生物效应的机理。

我们前期对胰岛素介导的脉冲电场影响细胞增殖的效应开展了研究, 结果表明脉冲电场辐照细胞明显抑制了细胞的增殖^[7], 这不是由温升而引发的生物效应。进一步研究其机理时, 我们发现作为胞间信号分子的胰岛素在这一效应中扮演了重要的角色。即脉冲电场影响胰岛素分子的构象, 进而影响其生物学功能并通过胰岛素的细胞信号通道把这种影响传入细胞内, 进而引发细胞水平的生物效应^[8, 9]。并且研究还发现脉冲电场作用时的环境温度却对实验结果产生协同作用^[10]。为了进一步考察脉冲电场作用时, 环境温度对实验结果的影响, 需要更精细的研究场强、场作用时间、场作用时的环境温度和产生的效应之间的关系。借助测量胰岛素在各种实验条件下的荧光光谱可量化地描述这种关系。进一步借

助测量胰岛素的拉曼光谱可进一步考察胰岛素分子结构中关键的分子键的变化。分析研究的结果表明辐照时环境温度对实验结果产生协同效应, 提示环境温度是研究弱电磁辐射生物效应时需关注的极重要参数。

1 材料与仪器

1.1 材料

结晶牛胰岛素(购于 Sigma 公司)溶于 pH 10.14 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶剂中。荧光光谱实验中浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 拉曼光谱实验中浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 仪器

自制脉冲电场刺激仪: 电压 $3.2\times 10^4\text{ V}$, 频率 50 Hz, 脉宽 $20\text{ }\mu\text{s}$ ^[10]。

2 实验方法

2.1 荧光光谱实验

(1) 研究电场参数变化对胰岛素荧光值的影响及初探温度变化的影响: 两极板间的电场强度 $E(\times 10^6\text{ V}\cdot\text{m}^{-1})$ 分别为 2.00, 1.78, 1.68, 1.60, 1.52, 1.39。电场作用时间均为

收稿日期: 2007-05-10, 修订日期: 2007-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(50137030)资助

作者简介: 严 喆, 女, 1982 年生, 华东师范大学物理系硕士研究生

e-mail: salty_zhe@163.com

* 通讯联系人 e-mail: sdchen@phy.ecnu.edu.cn

0, 5, 15, 25, 30, 35 min。场作用时的环境温度 20 和 35 °C 两组。0 min 样保存于室温(20 °C)下, 未受电场作用。

(2) 研究环境温度改变对脉冲电场作用结果的协同影响: 两极板间的电场强度 $E=2 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$, 场作用的环境温度为: 0.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C。场作用时间参见 2.1(1)。

(3) 探讨环境温度微小的差异是否能引起实验结果不一致: 两极板间的电场强 $E=1.39 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$, 场作用时间为 35 min, 场作用的环境温度为: 20, 25, 30, 35 °C。并在各温度下设置热比对照。

2.2 激光拉曼光谱实验

极板间的电场强度 $E=2 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$, 场作用的环境温度为: 0.5, 5, 10, 15, 20, 25 °C。场作用时间参见 2.1(1)。

荧光检测仪器为日立 F-4500 型荧光分光光度计。激发光波长为 276 nm; 发射光波长为 308 nm^[11]。各组实验结果处理时, 均以该组 0 min 样荧光值(F_0)作为标准进行归一。激光拉曼光谱测量在法国 Dilor 公司 Labram-1B 显微拉曼光谱仪上完成。激发波长为 632.8 nm, 功率为 6 mW, 光栅为 1 800 grades $\cdot \text{cm}^{-1}$, 狭缝为 100 μm , 扫描范围 200~1 800 cm^{-1} , 积分时间为每次 50 s, 四次扫描进行积累。

3 实验结果

3.1 荧光光谱实验

3.1.1 研究电场参数变化对胰岛素荧光值的影响及初探温度变化的影响

实验结果见图 1。20 °C 时, 改变电场参数使荧光值随电场强度增加及场作用时间增长而逐步下降。环境温度升高至 35 °C, 荧光值下降趋势增大。且 $E=1.39 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$, 20 °C 荧光无变化; 35 °C 时电场处理使荧光值下降, 35 min 降幅为 10%, 实验结果出现不一致。

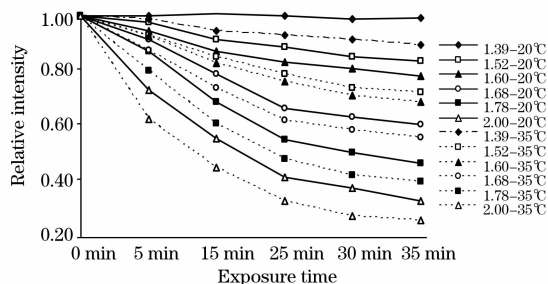


Fig. 1 Effects of PEF on relative fluorescence intensity of insulin with different intensities and exposure time

3.1.2 研究环境温度对脉冲电场作用结果的协同影响

实验结果见图 2。此结果与前期彭梦勇^[10]报道的结果相一致。

3.1.3 探讨环境温度微小的差异是否能引起实验结果不一致

实验结果见表 1。

3.2 激光拉曼实验

各温度组谱图见图 3。根据 Yu 和 Reipa 等^[12, 13]等归纳的胰岛素溶液特征谱峰, 本实验主要研究谱线如下: 510 cm^{-1} 谱线归属于链间二硫键^[13]; 934 cm^{-1} 归属于 C—C 振动, 与二级结构 α 螺旋有关^[14]; 运用 Williams 的方法^[15, 16]对酰胺 I 谱带进行拟合二级结构。为了分析需要, 谱图中各峰值以 1 066 cm^{-1} 峰值(源于溶剂 buffer 见[图 3(A)])为标准进行归一, 归一因子为 10。图 3 中各样品的拉曼谱图均已归一。

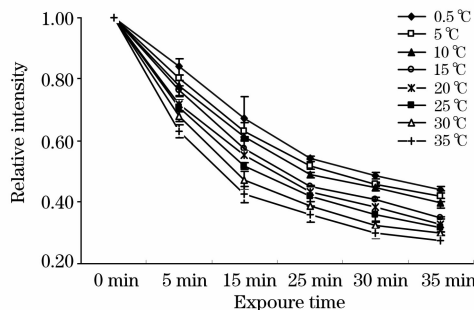


Fig. 2 Temperature and PEF co-effect on relative fluorescence intensity of insulin

Table 1 Effects of PEF on relative fluorescence intensity of insulin with 5 °C temperature difference

	Con	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
$E=1.39 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$, 35 min	1.00	0.99	0.97	0.92	0.90
Heated for 35 min	1.00	1.00	1.00	0.99	0.95

3.2.1 键能部分

温度-脉冲电场对 510 和 934 cm^{-1} 峰值影响, 结果分别见图 4 和图 5。

3.2.2 二级结构分析

实验结果表明: α 螺旋结构有明显的下降, 并且 β 折叠和其他二级结构出现不同程度的增加, 结果见表 2。

4 讨论与结论

实验中的脉冲电场能量很小, 不足以使被辐照胰岛素样品产生明显的升温($\approx 0.07 \text{ }^\circ\text{C}$)^[17], 在实验的温度控制精度范围内(0.1 °C)观察不到温度变化。但这一强度的脉冲电场作用于胰岛素分子产生了如此明显的效应, 使胰岛素发生了变性。此种电磁辐射生物效应和环境温度有着密切关系, 环境温度越高, 其效应越显著。

从图 1 分析发现: 电场 $E=1.39 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ 作用于胰岛素分子, 环境温度 35 °C 时, 荧光值随时间发生下降, 而当温度降至 20 °C 时荧光值随时间无变化。由此表明: 环境温度的不同, 可能导致弱电磁辐射生物效应出现不一致的研究结果。进一步发现更小的环境温度差异(5 °C)也可能使实验结果出现不一致。由表 1 所示, 电场 $E=1.39 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ 作用 35 min, 观察胰岛素相对荧光强度随着环境温度变化:

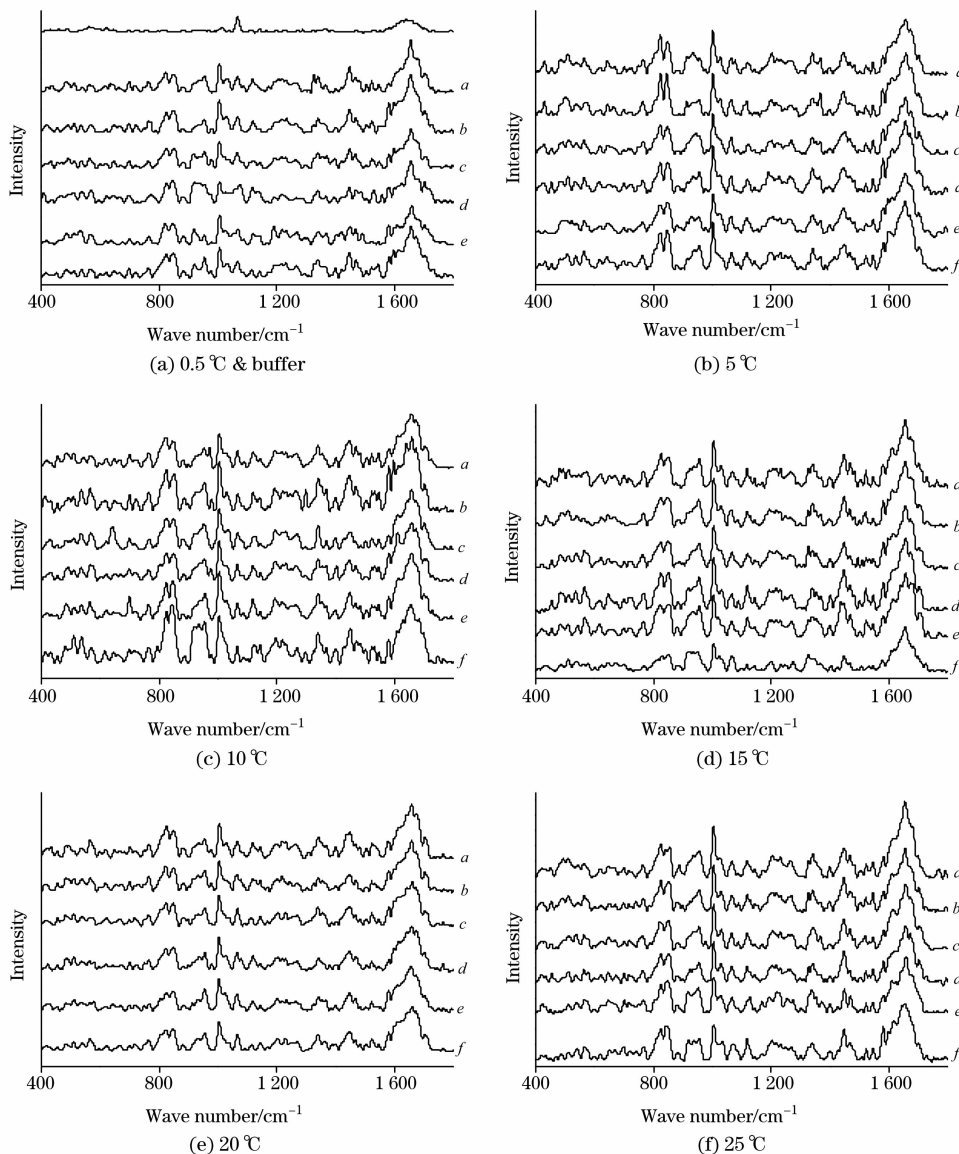


Fig. 3 Raman spectra of insulin induced by temperature and PEF co-effects: (a) buffer and 0.5 °C ; (b) buffer and 5 °C ; (c) buffer and 10 °C ; (d) buffer and 15 °C ; (e) buffer and 20 °C ; (f) buffer and 25 °C .

And in each picture: a : 0 min ; b : 5 min ; c : 15 min ; d : 25 min ; e : 30 min ; f : 35 min

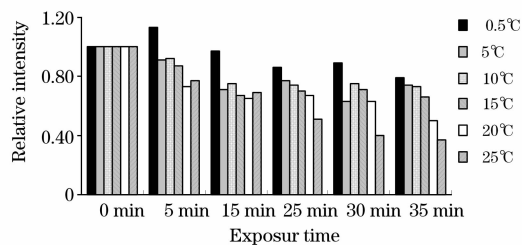


Fig. 4 Temperature and PEF co-effect of insulin on 510 cm^{-1}

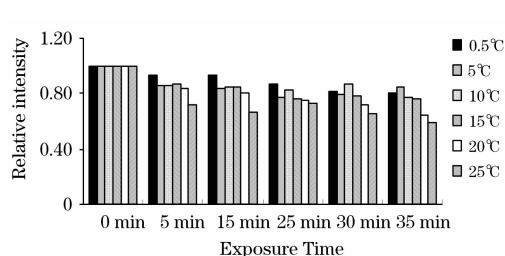


Fig. 5 Temperature and PEF co-effect of insulin on 934 cm^{-1}

在 25 °C 时，荧光值无明显变化，但在 30 °C 时就出现了较明显的变化。并且发现 25 和 30 °C 的实验结果的不一致，不是单由温度变化引起的，而是电场-温度协同作用的结果。表明在某些特殊的场作用条件下(场强和场作用时间)，当环境温

度仅 5 °C 之差时，场与温度的协同效应就会使实验结果不一致，这是值得研究者关注的。而以往的研究报告，往往关注场强、场作用时间。至于实验时的环境温度则不予关注，或笼统地称为室温条件^[17, 18]。我们的研究表明对实验时环境

Table 2 Fitting results of secondary structures (three types)

百分比%	0.5 °C			5 °C			10 °C		
	0 min	15 min	35 min	0 min	15 min	35 min	0 min	15 min	35 min
α 螺旋	70.70	67.91	65.71	70.34	64.77	63.39	69.49	64.08	62.97
β 折叠	19.51	18.09	17.70	18.76	21.58	19.52	23.81	22.41	25.27
其他	9.71	13.99	16.63	12.36	13.96	18.58	8.24	9.93	11.85
百分比%	15 °C			20 °C			25 °C		
	0 min	15 min	35 min	0 min	15 min	35 min	0 min	15 min	35 min
α 螺旋	67.91	63.78	56.10	72.01	55.29	49.43	72.50	49.06	47.14
β 折叠	27.11	27.75	30.73	14.80	25.05	26.82	16.31	24.33	22.86
其他	5.02	8.43	13.15	13.19	19.42	25.00	17.99	26.62	29.96

温度控制的不精确或不够关注,可能是造成弱电磁辐射生物效应研究结果不一致的重要原因。

由拉曼光谱进一步研究电场-温度对胰岛素构象的影响。在拉曼实验中发现,归属于链间二硫键的 510 cm^{-1} 及与 α 螺旋结构有关的 C—C 谱线 934 cm^{-1} 峰值出现了相同的场与温度协同效应的变化规律,进一步分析酰胺 I 发现 α 螺旋结构有明显的下降。胰岛素分子是由两对链间二硫键(A7-B7, A20-B19)连接成的双链分子,且 A 链本身还有一对链内二硫键(A6-A11)。三对二硫键均处于胰岛素二级结构 α 螺旋附近,对 α 螺旋起稳定作用。实验发现 510 cm^{-1} 峰值下降,表

明受温度-电场协同影响链间二硫键(A7-B7, A20-B19)个数减少。其中 A20-B19 可能稳定 B 链上的 α 螺旋,折叠是以该段 α 螺旋和 A20-B19 为基础进行的。A7-B7 的缺失可能导致 A 链上 α 螺旋结构解折叠,从而导致疏水残基的暴露;而 A6-A11 链内二硫键正位于疏水核心,其对 A 链 N 端的 α 螺旋有稳定作用, A 链 N 端是胰岛素的受体结合部位之一^[18]。因此二硫键的缺失可能造成胰岛素分子空间结构趋于松散,并可能降低胰岛素与其受体的结合能力,这与之前研究结果一致^[8]。

参 考 文 献

- [1] Wertheimer N, Leeper E. American Journal of Epidemiology, 1979, 109(3): 273.
- [2] Verkasalo P K, Pukkala E, Hongisto M Y, et al. Br. Med. J., 1993, 307: 895.
- [3] Feychting M, Forssen U, Floderus B. Epidemiology, 1997, 8(4): 384.
- [4] Simko M, Kriehuber R, Lange S. Mutat. Res., 1998, 418: 101.
- [5] Maes A, Collier M, Vandoninck S, et al. Bioelectromagnetics, 2000, 21(8): 589.
- [6] Zeni O, Bersani F, Scarfi M R. Radiation Environmental Biophysics, 2002, 41(3): 275.
- [7] LIN Fan(林凡). High Power Microwave Technology(高功率微波技术), 2003, 11: 8.
- [8] DAI Yu-wen, DING Li-ping, LI Le-jun, et al(戴零文, 丁荔萍, 李乐军, 等). Journal of East China Normal University(Natural Science)(华东师范大学学报·自然科学版), 2004, (4): 56.
- [9] LI Le-jun, DAI Yu-wen, XIA Ruo-hong, et al(李乐军, 戴零文, 夏若虹, 等). Bioelectromagnetics(生物电磁学), 2005, 8: 639.
- [10] PENG Meng-yong, CHEN Shu-de, QIAO Deng-jiang, et al(彭梦勇, 陈树德, 乔登江, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 879.
- [11] CHENG Ji-ji(程极济). Light Biophysics(光生物物理学). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1988. 120.
- [12] Nai-Teng Yu, Liu C S, Shea D C O'. J. Mol. Biol., 1972, 70(1-2): 117.
- [13] Reipa V, Gaigals A, Abramowitz S. J. Electroanal. Chem., 1993, 348: 413.
- [14] Tu A T. Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Application. John Wiley & Sons, Inc. 1982, 65.
- [15] Robert W Williams. J. Mol. Biol., 1983, 166: 581.
- [16] Robert W Williams, Duker A. J. Mol. Biol., 1981, 152: 783.
- [17] Rober Winker, Sabine Ivancsits, Alexander Pilger, et al. Mutat. Res., 2005, 585: 43.
- [18] Maria Rosaria Scarfi, Anna Sannino, Alessandro Perrotta, et al. Radiat. Res., 2005, 164: 270.

Study on Temperature & EMF Co-Effects on Insulin Conformation and Biological Functions by Fluorescence and Raman Spectroscopy

YAN Zhe, CHEN Shu-de*, QIAO Deng-jiang

Key Laboratory of Optical and Magnetic Resonance Spectroscopy, Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract Our previous studies had suggested that the intercellular signal molecule might be an important target of electromagnetic fields. Insulin, an intercellular signal molecule, plays a critical role in transferring life information. The studies on effects of pulsed electric fields (PEF) on insulin molecule are meaningful for explaining the mechanism of biological effects of electromagnetic fields. The PEF, which we used, with its highest electric field ($2 \times 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$) coupled into the insulin buffer, was about $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1} \text{cm}$, with a repeating frequency of 50 Hz. In the present study, the changes of insulin conformation induced by PEF were studied by fluorescence spectroscopy. Insulin solution was exposed to 50 Hz PEF with different electric field intensities for 5-35 min, which caused a time- and dose-dependent decrease in fluorescence intensities of insulin. Further, insulin solution was exposed to PEF at different temperatures to investigate the effects of PEF co-operated with temperature on insulin. The results indicated that the difference in temperature (about $5 \text{ }^\circ\text{C}$) could induce conflict results, which is due to the effects of PEF co-operated with temperature rather than only to the effect of temperature. The authors calculated that the increase in temperature induced by PEF was $0.07 \text{ }^\circ\text{C}$ (less than $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$). So the effects of PEF were scarcely explained by thermal effects, it belongs to “non-thermal effects” of electric fields. So it was concluded that temperature is a considerably important factor in “non-thermal effects” of electric fields, and the ignorance of variety of temperature probably result in the contrary conclusion. Further, Raman spectroscopy was used to investigate the details of structure of insulin treated by PEF co-operated with temperature. The results of Raman spectroscopy verified the effects of PEF co-operated with temperature on insulin. And the reductions of the S—S band intensity at 510 cm^{-1} , the skeletal C—C stretch band intensity at 934 cm^{-1} , and the content of the secondary structure of the alpha helix were observed. Both S—S linkages and alpha helix structure were important to the stabilization of insulin conformation. Modification of insulin may change the biological activity either by reducing the affinity of the hormone for the receptor or by decreasing the ability of the complex, when formed, to elicit a biological response.

Keywords Pulsed electric field; Temperature; Insulin; Fluorescence spectroscopy; Raman spectroscopy

(Received May 10, 2007; accepted Aug. 20, 2007)

* Corresponding author