

pH 值对红细胞膜力学特性和胞内蛋白结构与功能的影响

姚成灿^① 黄耀熊^{①*} 李校坤^② 阮萍^③

(^①暨南大学生物医学工程研究所, 广州 510630; ^②暨南大学医药生物技术研究开发中心, 广州 510630; ^③桂林医学院物理教研室, 桂林 541004. * 联系人, E-mail: tyxhuang@jnu.edu.cn)

摘要 利用快速显微动态图像分析技术和快速显微多道分光光度技术, 在无扰、在位、实时的情况下, 同时从细胞内分子、细胞膜以及细胞形态 3 个水平上, 研究单个活态人红细胞的大小形态、膜弯曲弹性模量和血红蛋白的吸收光谱等在不同 pH 值下的自主变化情况, 表明了红细胞膜的力学特性和胞内血红蛋白分子结构与浓度随 pH 值发生自主变化及其相互之间的密切联系。

关键词 红细胞膜 血红蛋白 弹性模量 吸收光谱 pH

红细胞的主要功能是给体内多个组织和器官输送 O_2 和 CO_2 , 这一功能的正常发挥主要取决于两个因素: 一是细胞内血红蛋白(hemoglobin, Hb)是否有正常的构型并具有完善的携氧能力; 二是细胞是否有合适的几何形态, 并有较好的变形能力使之可适应流场, 便于通过包括毛细血管在内的各种血管到达全身各个组织器官。也就是说, 红细胞的这一功能与其形态、细胞膜力学特性以及细胞内 Hb 的结构与功能密切相关。近年来, 多次研究报道 pH 值可影响红细胞的形态及变形性^[1,2]、膜蛋白与脂双层^[3,4]、膜的稳定性与变形性^[5,6]以及离体 Hb^[7], 从而影响红细胞输送 O_2 和 CO_2 的功能。

正常情况下, 人体血液 pH 值在 7.35 ~ 7.45 之间变化, 某些病理条件下(如酸中毒或碱中毒)血液的 pH 值会大大超过这一范围, 特殊器官内 pH 值也会降到很低(如脾内约 6.8)。另外, 由于代谢产生酸性物质, 在 pH 值改变时会影响酶的活性、胞膜骨架蛋白的聚合与交联、细胞内游离 Ca^{2+} 和 cAMP 水平等^[8]。因此, 研究 pH 值对红细胞的影响, 无论在理论研究和临床应用都有重要价值。但是, 迄今未见在活态红细胞内 Hb 分子的结构和功能受 pH 值影响的报道。而关于 pH 值影响红细胞膜变形性的研究都是在给细胞加载压力, 如使用微吸管法、探压法、滴孔法、悬浮法和激光钳等, 在细胞状态发生较大扰动情况下进行测量。通过测定细胞在外力作用下的被动形变, 再根据有关理论模型推导出细胞膜各动力学参数, 未见报道有监测红细胞受 pH 值影响而发生自主形变情况下的动力学参数。事实上, pH 值引起的红细胞自主形

变及与之对应的动力学参数的变化具有重要意义。因为细胞形态的变化会改变细胞的表面特性^[9](如表面电荷密度等)和表面积与体积比, 动力学参数的变化会影响细胞膜的流动性, 这些变化都会对血液的流动及其黏滞系数发生影响^[9], 从而对整个心血管系统都会起作用。

鉴于此, 本文利用快速显微动态图像分析技术^[10]和快速显微多道分光光度技术^[11], 在无扰、在位和实时情况下, 同时直接测定在不同 pH 值下单个活态红细胞细胞形态的自主形变, 以及对应情况下胞膜的力学特性和胞内 Hb 的吸收光谱, 通过所得出的细胞内 Hb 浓度、Hb 分子构型、膜的弯曲弹性模量和红细胞的大小形态等一系列参数, 从中揭示它们随 pH 值相关变化的关系和规律。

1 材料与方法

(i) 材料。本实验所用等渗 PBS 缓冲液按如下方法配置: 138 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 7.5 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 1 mmol/L $MgSO_4$, 5 mmol/L 葡萄糖。通过缓慢滴加 0.1mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节 PBS 缓冲液到所需的 pH 值(5.6 ~ 9.0)。所用试剂均为国产分析纯。

(ii) 红细胞制备。抽取健康成人的静脉血, 肝素钠抗凝, 立即 $2000 \times g$ 离心 10 min, 去除白细胞及血小板。将获得的压积红细胞悬浮在等渗 PBS(pH 7.4)中, $2000 \times g$ 离心 10 min 洗涤红细胞 3 次。将洗后的红细胞悬浮在不同 pH 值的等渗 PBS 缓冲液中, $37^\circ C$ 孵育 1 h, 涂片观察。所有红细胞样品的制备均在室温下进行, 所有测试均在 $37^\circ C$ 下进行。

(iii) 红细胞形态与膜弯曲弹性模量的测量. 将制好的红细胞玻片放入特制的恒温恒气样品池^[10]中, 置于 NIKON TE3000 倒置相衬显微镜下观察和摄录. 红细胞膜的起伏波动会造成散射或反射光方向和强度等的起伏涨落, 所引起的视觉闪烁称为 Flicker 现象, Flicker 现象携带细胞膜的力学信息. 利用本实验室发展的显微动态图像分析技术, 对 Flicker 现象进行光强涨落的频谱分析, 可以测量红细胞膜的弯曲弹性模量 k_c , 具体原理和方法见文献[10]. 测定红细胞膜弯曲弹性模量时, 细胞浓度控制在每幅画面一个细胞, 实验中每一个 pH 值下测量 15 个红细胞. 同时利用显微图像分析技术测量红细胞的接触面积、形状规化因子等几何参数, 每一个 pH 值下测量 80 个红细胞.

(iv) 红细胞内血红蛋白的显微分光光度分析. 采用本所研制的新型显微多道分光光度系统进行测定. 该系统可对微区样品在 350 ~ 800 nm 光谱波长范围内进行快速光谱检测(最快检测时间为 1 ms)的同时, 波长分辨率可达 0.2 nm, 具体工作原理和方法见文献[11]. 本实验采用此技术测量单个活态红细胞的血红蛋白分子的吸收光谱, 并根据其在 540 和 575 nm 波长附近吸收峰的位置和峰高确定细胞内血红蛋白分子的结构与浓度. 实验中在每一个 pH 值下测量 50 个红细胞.

2 结果与讨论

2.1 pH 值对人红细胞大小的影响

正常生理条件下, 人红细胞呈双凹圆盘形, 但在低 pH 值时变为裂口状, 而在高 pH 值时变为棘皮状, 我们所观察的结果与文献报道一致^[2]. 低 pH 值时由于红细胞膜对水的通透性增加, 细胞外 H^+ 和 H_2O 内流进入细胞内, 使细胞体积增大; 高 pH 值时细胞内 H^+ 和 H_2O 外流, 细胞体积减小(本文测定的红细胞接触面积变化, 可反映细胞体积的变化, 图 1). 另外, pH 值在高于或低于 7.4 时的形状规化因子均比 pH 7.4 时更接近 1($P < 0.05$), 说明红细胞因吸水或失水而更接近于球形. pH 值引起红细胞形态和大小的变化, 将对细胞膜的力学特性和胞内物质产生重要影响.

2.2 pH 值对红细胞膜弯曲弹性模量影响

红细胞的变形性主要决定于胞膜的力学特性, 而胞膜力学特性又决定于其弹性模量. 因此, 红细胞膜的弯曲弹性模量 k_c 是表征红细胞变形能力的重要

参数. 其值越小表明红细胞的变形能力越强, 细胞的生理特性越佳; 反之, 其值越大表明细胞膜的变形能力越差. 本实验测得的红细胞膜 k_c 随 pH 值的自主变化趋势在图 2 示出. 从图中可见, pH 7.4 时 k_c 最小, pH 值增大或减小, k_c 都会增大. 表明 pH 7.4 时红细胞有最好的变形能力, 有利于红细胞与外界的物质交换. k_c 随 pH 值的这种变化情况与被动测量得到的红细胞膜剪切弹性模量随 pH 值的变化趋势相似^[6]. 由于红细胞在形变过程中表面积保持不变, 所以 $pH < 7.4$ 时红细胞体积增大(图 1) 导致其表面积/体积比下降, 细胞变形性降低; 而当 $pH > 7.4$ 时红细胞表面产生许多棘形膜泡, 实际上减少了母体细胞的表面积, 尽管此时红细胞体积减小, 但其表面积/体积比还是有所降低. 红细胞表面积/体积比由于 pH 的变化而降低直接影响细胞膜的弹性和变形性, 增大膜的弯曲弹性模量 k_c . 另外 pH 值变化时使红细胞更接近球形, 在胞膜上产生一种切向弹性, 这些都引起红细胞膜的弯曲模量与刚性指数的增大, 变形能力降低. 红细胞膜 k_c 的增大降低了红细胞的变形性及细胞适应流场的能力, 血流速度变慢, 红细胞聚集性增加, 进而引

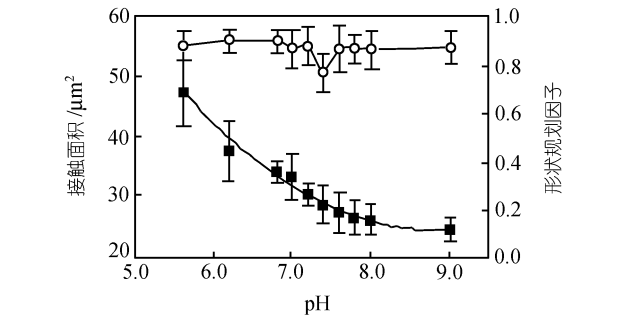


图 1 pH 值对红细胞接触面积和形状规化因子的影响
■ 示接触面积, ○ 示形状规化因子. 图中数据来自 80 个细胞, 以平均值和标准差表示

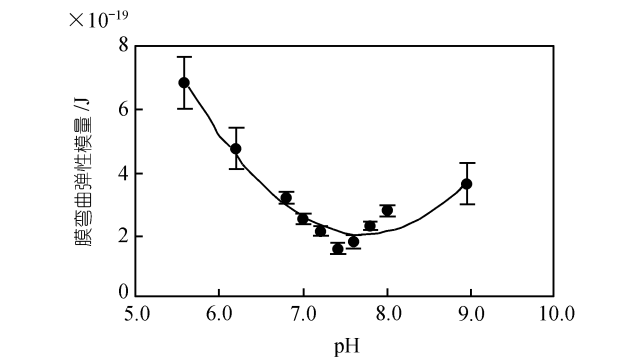


图 2 pH 值对红细胞膜弯曲弹性模量的影响
图中数据来自 15 个细胞, 以平均值和标准差表示

起血液黏度升高。

2.3 pH 值对红细胞内 Hb 吸收光谱的影响

正常生理条件下(37℃, pH 7.4), Hb 溶液在 540 (α 峰)和 575 nm (β 峰)附近处有特征吸收峰, 吸收峰的高度不仅与红细胞内 Hb 溶液浓度的高低有关, 而且还与 Hb 的理化性质(如溶解性、稳定性和氧化状态等)有关; 吸收峰的位置与不同携氧能力下 Hb 的构型有关^[12]。

较低 pH 值时 Hb 的吸收光谱与 pH 7.4 时相比, 不仅峰高显著降低, 而且两个吸收峰的位置也都向左漂移(表 1, 图 3 和 4)。表明此时红细胞内除了细胞因吸水体积膨胀而使 Hb 浓度有所降低外, 还有部分 Hb 的构型发生了变化。这样的光谱变化在离体 Hb 研究中已证实是对应于氧合Hb(Oxy-Hb)脱氧并氧化成金属Hb(Met-Hb)^[12]。所以, 可以这样认为, 首先, 介质 pH 值的降低, 引起红细胞变形性的极大降低, 使红细胞内氧释放系数减少, 氧分压下降及 Hb 与 O₂ 结合力下降。其次, 在低 pH 情况下, H⁺进入红细胞内, 与带负电的 Hb 分子结合, 改变了 Hb 的氧合构型, 降低 Hb 的 Zeta 电位和 Hb 稳定性, 引起 Hb 在红细胞内聚合和沉淀, 降低其携氧能力, 造成带氧 Hb 的浓度进一步降低。再次, 当 pH 大于或小于 7.4 时, Met-Hb 形成速度加快^[7], 也减少 Oxy-Hb 的形成。

表 1 不同 pH 值时红细胞内 Hb 两个吸收峰的位置										
pH	5.6	6.2	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	9.0
α峰/nm	537	537	537	537	538	540	540	539	539	538
β峰/nm	572	572	572	572	572	575	574	573	573	572

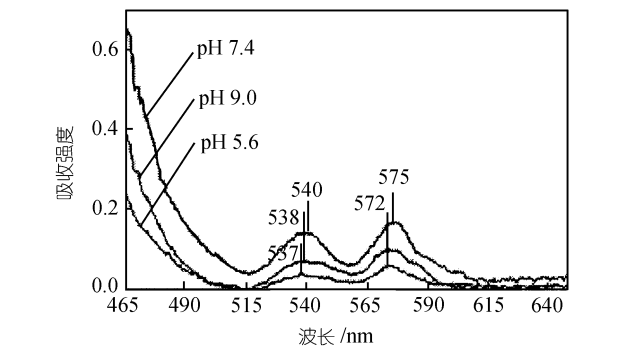


图 3 不同 pH 值时红细胞内 Hb 的吸收光谱
图示 3 个 pH 值时各 1 例典型的吸收光谱

将 pH 7.4~8.0 时 Hb 的两个吸收峰峰高两两比较, 均没有显著性差异($P > 0.05$), 但峰的位置向左漂移了 1~2 nm; pH 9.0 时, 两个吸收峰的峰高分别降

至 0.068 和 0.082, 与 pH 7.4 时比较存在显著性差异 ($P < 0.001$), 而且峰的位置也都向左漂移(表 1, 图 3 和 4)。如前所述, 吸收峰峰高的降低与胞内 Hb 浓度的降低有关。尽管 pH 9.0 时红细胞体积比 pH 7.4 时的体积要小, 但由于高 pH(如 9.0)值时, 红细胞膜骨架——脂双分子层之间的相互作用受到扰动而引起囊泡化, 脂双分子层上的部分磷脂包容一些细胞内液(主要是 Hb), 会形成一个或数个直径约 0.15~0.5 μm 的微囊泡, 从母细胞上脱落出去^[2]; 再加上此时有部分 Oxy-Hb 被氧化成 Met-Hb, Met-Hb 与膜蛋白产生交联作用而黏附到膜内侧, 从而使细胞内 Hb 浓度有所减低。另外, Hb 吸收峰位置的变化也提示, 高 pH 值时细胞内 Oxy-Hb 浓度降低而 Met-Hb 增多。

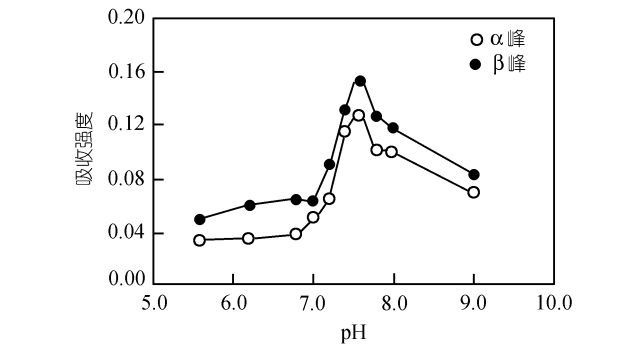


图 4 不同 pH 值时红细胞内 Hb 两个吸收峰的吸光度
图中数据来自 50 个细胞的平均值, 为清楚起见, 误差范围未示出

红细胞膜的稳定性靠脂双层、膜骨架、膜蛋白及其之间的相互作用维持。pH 值的变化影响脂双层的稳定性和磷脂在细胞膜上的分布^[4], 一方面, 膜骨架附着在脂双分子层的内侧, 其带负电荷的结构对 pH 值比较敏感, pH 值的改变影响膜骨架与脂双分子层的相互作用, 从而影响膜的力学特性; 另一方面通过 pH 值的改变影响物质的跨膜运输(如降低氧在脂双层中的扩散速度)来影响细胞内 Hb 的结构与功能。Crandall 等人^[6]认为红细胞膜的弹性特性与膜骨架蛋白有关, 主要取决于细胞膜胞浆表面的结构蛋白之间的相互作用, 改变 pH 值可以启动这些作用。组成红细胞骨架的血影蛋白在低 pH 时沉积形成膜颗粒, 这是酸性介质中细胞形状和膜力学特性发生变化的原因。Oxy-Hb 氧化成 Met-Hb 的过程中产生氧自由基, 氧自由基会引起膜的氧化损伤并引发部分溶血^[5], 直接影响到膜的力学特性和胞内蛋白的结构与功能。也有人认为红细胞膜的弹性特性与胞膜的带3(band 3)

蛋白有关,带 3 通过黏连蛋白与红细胞膜上的血影蛋白结合,血影蛋白的折叠与打开控制膜骨架的收缩与松弛.细胞内 Hb 与带 3 的亲合力随 pH 值的变化而变化^[3].pH 值的变化不但引起带 3 构型及其与膜骨架蛋白的相互作用发生变化,进而直接影响到 Hb 与带 3 的结合,使 Hb 易形成聚合体并沉积在膜上,导致细胞形态^[13]和膜的力学特性发生变化;同时 pH 值还能影响带 3 功能,使阴离子转运发生障碍,影响到细胞内 Hb 的分子结构与功能.至于 pH 值如何影响带 3 蛋白并进而影响细胞膜力学特性及细胞内物质,还有待进一步研究.

我们的实验结果表明,红细胞的大小形态、膜弯曲弹性模量及胞内 Hb 的结构与功能 3 个层次的参数之间相互紧密联系,pH 值的变化引起其中任何一者的变化,均对其余两者产生影响.不同 pH 值时的红细胞具有不同的大小形态,不同形态的红细胞具有不同的表面弹性能和临界压差,它们均与细胞膜的弯曲弹性模量 k_c 呈正相关^[14].红细胞在正常生理环境下(pH 7.4)为双凹圆盘形,有最小的表面弹性能和临界压差,此时细胞膜弯曲弹性模量 k_c 也最小^[15].当 pH 值变化时红细胞膜 k_c 增大,其表面弹性能和临界压差也随着增大,使得细胞由双凹形变为裂口形或棘形^[15].我们测得不同 pH 值下红细胞的形态大小和 k_c 之间的关系为有关理论分析提供了佐证.另外,我们的实验结果表明,pH 值偏离正常值时,不但会改变红细胞的形态大小和胞膜 k_c 值,也引起胞内 Hb 的结构以及带氧 Hb 浓度的变化.Hb 构型的变化既影响其携氧功能,也影响 Hb 与膜骨架蛋白及脂双层的相互作用,反过来又对胞膜的力学特性及细胞形态产生影响.带氧 Hb 浓度的减少,更是直接影响到红细胞的携氧能力.所以,pH 值对红细胞这三方面的影响,最终影响到红细胞运输 O_2 和 CO_2 以及物质通过细胞膜交换的功能,影响到血液的黏性和流动,对心血管系统意义重大.

本文在单个活细胞条件下,同时测定了红细胞从胞内蛋白、细胞膜到细胞形态 3 个层次多个结构与功能参数在不同 pH 值下的自主变化及其相关关系,特别是揭示了 pH 值通过改变细胞内 Hb 分子的结构与浓度而影响红细胞的携氧能力,以及细胞膜的力学特性和细胞形态大小等的机制,对红细胞的病理生理研究和有关临床诊断治疗具有重要指导作用.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号:30227001).

参 考 文 献

- 1 Kuzman D, Znidarcic T, Gros M, et al. Effect of pH on red blood cell deformability. *Pflugers Arch*, 2000, 440: R193~194
- 2 Iglič A, Hägerstrand H, Kralj-Iglič V, et al. A possible physical mechanism of red blood cell vesiculation obtained by incubation at high pH. *J Biomechanics*, 1998, 31: 151~156
- 3 Salhany J M, Cordes K A, Sloan R L. Characterization of the pH dependence of hemoglobin binding to band 3: evidence for a pH-dependent conformational change within the hemoglobin-band 3 complex. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1371: 107~113
- 4 Libera J, Pomorski T, Muller P, et al. Influence of pH on phospholipid redistribution in human erythrocyte membrane. *Blood*, 1997, 90(4): 1684~1693
- 5 Ivanov I T. Low pH-induced hemolysis of erythrocytes is related to the entry of the acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1415: 349~360
- 6 Crandall E D, Critz A M, Osher A S, et al. Influence of pH on elastic deformability of the human erythrocyte membrane. *Am J Physiol*, 1978, 235: C269~278
- 7 Park S, Kose T, Hamasaki M, et al. Effects of the pH-controlled hemoglobin vesicles by CO_2 gas. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1998, 26(5-6): 497~506
- 8 Busa W B. Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation. *Annu Rev Physiol*, 1986, 48: 389~402
- 9 Kayar E, Mat F, Meiselman H J, et al. Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology*, 2001, 38: 405~414
- 10 Li J, Huang Y X, Ji T, et al. Non-invasive measurement on the elastic properties of red blood cell membrane with dynamic image analyzing technique. *Acta Biophysica Sinica*, 2002, 18: 350~354
- 11 Ji T, Huang Y X. A novel fast multi-channel microspectrophotometer. *Acta Biophysica Sinica*, 2001, 17: 599~604
- 12 Kazuhiro T, Takuo S, Katsuko K. Microspectrophotometry of nitric oxide-dependent changes in hemoglobin in single red blood cells incubated with stimulated macrophages. *J Biochem*, 1997, 122: 264~270
- 13 Gimsa J, Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes. *Mol Membr Biol*, 1995, 12: 247~254
- 14 Helfrich W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch*, 1973, 28C: 693~703
- 15 Wada S, Kobayashi R, Karino T. A mathematical model of a red cell that is deformable into various shapes. In: Goh J C H, eds. *Proceedings of The Tenth International Conference on Biomedical Engineering*. Singapore: Humanities Press, 2000. 435~436

(2003-01-16 收稿, 2003-03-21 收修改稿)