

文章编号:1001-5078(2010)08-0874-03

· 光电技术与系统 ·

微波辐照对感光细胞蛋白结构影响的光谱分析

陈 鹏, 梁 洁, 马 萍, 宋战军, 单 清, 杨在富, 康宏向, 王长振, 钱焕文
(军事医学科学院放射与辐射医学研究所电磁与激光生物学研究室, 北京 100850)

摘 要:研究高功率微波(HPM)照射后感光细胞中膜蛋白分子结构的改变,以探讨 HPM 的损伤机制。选取大鼠视网膜感光细胞外节层作为研究对象,通过对 FT-IR 图谱酰胺 I 带中蛋白质二级结构的各吸收峰进行定量分析,观察 HPM 照后蛋白质分子结构的改变情况。结果显示 HPM 照后外节出现了膜蛋白二级结构吸收峰的位移和吸收值的改变。该研究表明 HPM 照射可使视网膜感光细胞的膜蛋白质构象发生改变,导致蛋白质结构稳定性下降和蛋白生物功能的破坏。

关键词:眼;蛋白;光谱;结构

中图分类号:0433.5 **文献标识码:**A

Spectroscopic analysis on rat photoreceptor proteins structure after microwave irradiation

CHEN Peng, LIANG Jie, MA Ping, SONG Zhan-jun, SHAN Qing, YANG Zai-fu,
KANG Hong-xiang, WANG Chang-zhen, QIAN Huan-wen
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract:To study the bioeffects of HPM on animal photoreceptor proteins structure and explore the HPM injury molecular mechanism, FT-IR microspectroscopy is applied to observe the change of biomembranes proteins structure in the outer segments. The results by FT-IR reveals that there are significant spectral differences of the absorption values for amide I band and the α -helix conformation decreases along with the increase of random coil and β -sheets structures after HPM exposure. It comes to the conclusion that the secondary structure of retinal membrane proteins has changed since the HPM irradiation, which may lead to the loss of proteins function.

Key words: eye; protein; spectroscopy; structure

1 引言

高功率微波(high power microwave, HPM)是一种新的致伤因素,眼是微波辐射最敏感的靶器官之一^[1]。显微傅里叶变换红外光谱技术(Fourier transform infrared microspectroscopy, FT-IR)结合形态学,可在分子水平上提供组织切片或细胞涂片化学组成信息^[2-3]。本实验应用显微 FT-IR 技术对感光细胞谱图中蛋白质的酰胺 I 带各吸收峰进行处理分析,研究 HPM 照射对外节中蛋白质(主要是膜蛋白)二级结构的影响,以探讨 HPM 视网膜损伤机制。

2 材料与方法

2.1 实验动物及分组

二级 Wistar 大鼠,雌性,体重(180 ± 20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供。随机分成对照组和照射组(照后 1 h 和照后 24 h)。

2.2 HPM 照射条件

将自由活动状态下的大鼠放入特制有机玻璃笼

作者简介:陈 鹏(1975 -),男,助理研究员,医学博士,主要从事微波与激光辐射生物效应及其防护的研究。E-mail:cpeng99@sohu.com

收稿日期:2010-05-04;修订日期:2010-06-04

中,S波段 HPM 效应模拟源从上部以远场平面波单次垂直照射,照射参数如下,平均功率密度: 100 mW/cm^2 ,峰值功率密度: 200 W/cm^2 ,时间: 20 min 。对照组动物经同样处理,但不接受照射。

2.3 视网膜样本制作

取各组大鼠眼球,沿水平方向经视乳头部位进行 $30 \mu\text{m}$ 厚冰冻切片,将其展平于特制的镀金载玻片上,供下一步分析使用。

2.4 显微 FT-IR 检测

反射吸收光谱在 Bio-Rad 公司 FTS-65A 傅里叶变换红外光谱仪/UMA 红外显微镜上测定,设置分辨率为 4 cm^{-1} ,使用液氮冷却的 MCT 检测器,每个视网膜选取 3 张组织切片,每张切片选取 1 个视野,每个视野扫描次数为 256 次。感光细胞外节层的选取方法:以镀金载玻片作背景扫描,在显微 FT-IR 仪的光镜下定位,光阑的一个长轴紧邻视网膜色素上皮层,另一长轴向内侧外节段开出 $30 \mu\text{m}$ 。谱图处理的操作软件为 Bio-Rad 公司提供的 3200 工作软件,本实验操作在军事医学科学院的国家生物医学与仪器测试分析中心完成。

2.5 蛋白质二级结构谱带归属与图谱的处理

蛋白质二级结构的 FT-IR 谱带主要是位于 1700 cm^{-1} 和 1500 cm^{-1} 之间的酰胺 I 带和酰胺 II 带,酰胺 I 带是由 C=O 键伸缩振动和 CN 基团伸缩振动耦合而成,酰胺 II 带是由 NH 和 CN 基团伸缩振动耦合而成,其中酰胺 I 带对于结构分析最为重要,它包含了蛋白质二级结构的 α -螺旋、 β -折叠、转角及无规卷曲等多种信息,但是其各组分所对应的振动吸收峰常常互相重叠形成一较宽的红外光谱,我们应用傅里叶解卷积技术,可将重叠的酰胺 I 带各子峰分辨开,并采用曲线拟合的方法来获得各子峰的积分面积,以定量地分析蛋白质二级结构各组分的含量。一般蛋白质和多肽的酰胺 I 带解卷积谱包含 9 到 11 个子峰,各子峰的结构归属可通过对已知结构的蛋白质的研究来确定。

外节在 $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 段的 FT-IR 图谱主要是酰胺 I 带。对正常大鼠外节 FT-IR 谱图酰胺 I 带各子峰的归属结果如下: 1691 cm^{-1} , 1681 cm^{-1} 和 1683 cm^{-1} 归属为 β 转角; 1664 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} 和 1644 cm^{-1} 归属为 α 螺旋,又可分别细分为 α II 螺旋、 α I 螺旋和 3_{10} 螺旋; 1638 cm^{-1} 归属为无规卷曲; 1628 cm^{-1} 和 1619 cm^{-1} 归属为 β 折叠。

2.6 统计方法

比较对照组与照射组的各子峰的峰位改变和吸

收值百分比,采用 SAS 软件按单因素 3 水平设计资料进行方差统计分析。

3 结果

3.1 HPM 照后各子峰的位移变化

外节 FT-IR 谱图的酰胺 I 带曲线拟合后,根据各种蛋白质(特别是视紫红质)体内外不同状态下的 FT-IR 研究成果,对各子峰进行了二级结构的指认,然后对峰位变化进行统计分析,结果表明,三种 α 螺旋的最大峰位在照后 1 h 与 24 h 均向左移,幅度从 2 到 6 个波数不等: α I 螺旋 ($1655 \rightarrow 1659$)、 α II 螺旋 ($1664 \rightarrow 1666$)、 3_{10} 螺旋 ($1644 \rightarrow 1650$)。无规卷曲的峰位在照后 24 h 向左移 3 个波数 ($1638 \rightarrow 1641$)。 β 折叠的峰位照后 1 h 与 24 h 左移约 3 个波数 ($1619 \rightarrow 1622$)。而 β 转角未见明显位移。

3.2 HPM 照后各子峰的吸收值变化

根据以上各子峰的二级结构指认,对代表不同二级结构吸收峰的吸收值占总吸收的百分比数据进行统计分析。代表 α 螺旋的吸收峰的吸收值百分比在照后 1~24 h 持续降低,无规卷曲与 β 折叠吸收峰在照后 1 h 和 24 h 增多, β 转角吸收未见明显改变。与峰位相比,吸收百分比的变化是同步的。

4 讨论

近年来微波辐射对人体健康的危害已引起高度关注,眼是微波作用的敏感靶器官,其中视网膜效应是微波眼损伤研究的重点^[1]。傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 是一种能够提供分子化学结构信息的技术,利用技术可以对样品进行定性和定量无损分析,根据红外吸收光谱谱峰位置可以鉴定多种有机化合物及官能团的存在,并且利用光谱吸收强度可以定量地计算出各种化学组分在样品中的相对含量^[2]。而显微 FT-IR 技术是在红外光谱分析技术上发展而来,它将显微镜技术与 FT-IR 相结合,利用自身的光学显微镜观测样品,通过调节光阑大小来选取某一特定微区进行红外光谱检测,可以在分子水平上提供样品的化学组成信息^[3]。本实验应用显微 FT-IR 技术研究大鼠视网膜 HPM 损伤效应的分子机制,重点观察了视网膜感光细胞外节的膜蛋白的二级结构改变。

视网膜是一个组分多而结构复杂的生物组织,实验中选取感光细胞外节作为研究对象出于以下原因:首先,外节是感光细胞的光感受器所在部位,HPM 视网膜损伤中以外节最重;其次外节成分简单,主要是盘膜结构,是分析生物膜 HPM 损伤的良好模型,而生物膜亦是 HPM 损伤的重要靶点。盘膜中镶嵌了一种特殊的膜蛋白,这种特殊的膜蛋白就

是视色素。外节中存在大量视色素分子,每一细胞内的分子数可达 10^9 数量级。视杆细胞中的视色素就是视紫红质,它是外节盘膜上的含量最多(约占85%)和最重要的蛋白质,执行着视网膜光感受器的重要功能^[4]。

蛋白质是由氨基酸以酰胺键共价连接而成的多肽链构成的,蛋白质的二级结构是指蛋白质中多肽链的规则排布,由主链极性基团的氢键形成,常见的二级结构有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角、无规卷曲等。目前测定蛋白质二级结构的方法很多。最准确和最可靠的方法是X射线衍射技术,但它只能测定可结晶的蛋白质,而且该技术不仅工作量大,成功率低(蛋白质单晶不易获得),其测定结果也不易说明蛋白质在生理状态下结构与功能的关系。圆二色光谱法虽可测定溶液状态下蛋白质的结构,但该方法是在已知三维结构的聚多肽和蛋白质光谱为参考的基础上的,此外,它在 α -螺旋的测定中较为准确,却无法测定 β 折叠及 β 转角结构。而FT-IR具有以上两种方法不可替代的优越性,是研究蛋白质各种二级结构的一种快速和有效的方法。FT-IR不仅可研究诸如水溶液^[5]、有机溶剂^[6]、去污剂以及磷脂膜等各种环境下的蛋白质二级结构,它还能与显微镜结合(显微FT-IR)用来研究组织切片或细胞涂片等生物样品中“天然状态下”的蛋白质结构,因此可反映具有功能活性的蛋白质的结构特征^[7]。

蛋白质的二级结构特征与氢键的形成方式紧密相关,无论是 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角或其他构象,都有特定的氢键结构。FT-IR光谱对蛋白质氢键敏感,可反映各种不同氢键结构的差异,主要表现为谱带峰位及吸收面积的变化。本实验中在HPM照后 α 螺旋、 β 折叠及无规卷曲的最大峰位左移,这是氢键增强的表现。分子内氢键是维持蛋白质二级结构稳定的重要因素,当蛋白质变性或聚合时,可观察到氢键增强^[8],而HPM照射后的氢键变化提示外节的膜蛋白的构象出现了一定程度的改变。

酰胺I带各子峰吸收值占总吸收值的百分比还可代表相应二级结构的百分含量,本实验中发现, α 螺旋在HPM照后持续降低,而 β 折叠和无规卷曲均增加。研究表明视紫红质膜蛋白的二级结构的维持主要依靠 α 螺旋结构的稳定,而在盘膜的视紫红质二级结构解体过程中,可出现有大量 α 螺旋转变成 β 折叠结构^[9],因此照后出现的外节膜蛋白含量的变化,说明HPM很可能导致了盘膜上视紫红质二级结构的破坏,使其蛋白质结构的稳定性降低。

视网膜感光细胞的功能正常与否决定于视紫红质蛋白结构与功能是否正常,盘膜结构的完整很大程度上依赖于膜脂质与膜蛋白结合的稳定。HPM引起的外节膜蛋白的二级结构改变必然会影响到视紫红质正常的生理功能,此外膜蛋白与膜脂质间的结合方式也会改变,最终结果会导致视紫红质生物学功能的下降。

参考文献:

- [1] Chen Peng, Liang Jie, Ma Ping, et al. Experimental research of the effects on rat eye structure and function induced by S-band high-power microwave irradiation[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2007, 16(1): 1-5. (in Chinese)
陈鹏, 梁洁, 马萍, 等. S波段高功率微波对眼组织结构和功能影响的实验研究[J]. 激光生物学报, 2007, 16(1): 1-5.
- [2] Ren Xian-pei, Liu Gang, Zhou Zai-jin, et al. Investigation of disease tobacco leaves by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Laser & Infrared, 2009, 39(9): 944-947. (in Chinese)
任先培, 刘刚, 周在进, 等. 病害烟叶的傅里叶变换红外光谱研究[J]. 激光与红外, 2009, 39(9): 944-947.
- [3] Fernandez D C, Bhargava R, Hewitt S M, et al. Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(4): 469-474.
- [4] Garriga P, Manyosa J. The eye photoreceptor protein rhodopsin. structural implications for retinal disease[J]. FEBS Lett, 2002, 528(1-3): 17-22.
- [5] Deng Bo, Pang Xiao-feng. Study of fourier infrared spectra of the interaction between acetone and water molecules[J]. Laser & Infrared, 2008, 38(5): 451-453. (in Chinese)
邓波, 庞小峰. 丙酮-水分子相互作用的傅里叶变换红外光谱研究[J]. 激光与红外, 2008, 38(5): 451-453.
- [6] Deng Bo, Pang Xiao-feng. Study on the infrared spectra of ethanol under action of static magnetic field[J]. Laser & Infrared, 2008, 38(2): 141-144. (in Chinese)
邓波, 庞小峰. 乙醇在静磁场作用下的傅里叶红外光谱研究[J]. 激光与红外, 2008, 38(2): 141-144.
- [7] Haris Pi, Chapman D. The conformational analysis of peptides using fourier transform IR spectroscopy[J]. Biopolymers, 1995, 37(4): 251-263.
- [8] Manning Mc. Use of infrared spectroscopy to monitor protein structure and stability[J]. Expert Rev Proteomics, 2005, 2(5): 731-744.
- [9] Lavoie H, Desbat B, Vaknin D, et al. Structure of rhodopsin in monolayers at the air-water interface: a pm-irras and x-ray reflectivity study[J]. Biochemistry, 2002, 41(45): 13424-13434.