

· 基础研究 ·

次声作用对 CHO 细胞膜的影响

王冰水 陈景藻 刘静 曾丽华 张飒

【摘要】 目的 应用原子力显微镜对经次声作用后的 CHO 细胞膜进行观察,以探讨次声对细胞膜超微结构的影响。**方法** 采用 8 Hz、130 dB 的次声作用于 CHO 细胞,并利用原子力显微镜对正常及经次声作用后的 CHO 细胞膜表面进行纳米级水平的扫描检测。**结果** CHO 细胞经次声作用后,其细胞膜表面突起明显变短、凹陷变浅,整个细胞膜表面结构变得较为平缓,并且随着次声作用次数的增加,其改变程度亦愈加显著。**结论** 一定强度的次声作用可引起细胞膜表面超微结构的直接改变,并且次声作用次数越多,该变化就越显著。

【关键词】 次声; CHO 细胞; 原子力显微镜; 细胞膜

Atomic force microscope observation of the CHO cell membrane after infrasound exposure WANG Bing-shui*, CHEN Jing-zao, YI Nan, LIU Jing, ZENG Li-hua, ZHANG Sa. * Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the 4th Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To observe the changes of Chinese hamster ovary (CHO) cell membrane under atomic force microscope (AFM) after infrasound exposure. **Methods** After primary culture, the CHO cells were exposed to infrasound with the intensity of 130dB and frequency of 8Hz to observe the subsequent changes in the membrane of the cells by nano-scale scanning with AFM. **Results** It was shown that the prominence of the membrane became short and excavation became shallow after exposure to the infrasound, and the surface of the membrane became smooth. As the infrasound exposure increased, the changes of the membrane became more prominent. **Conclusion** It suggested that the structure of the membrane of CHO cells could be changed by infrasound exposure with intensity of 130dB and frequency of 8Hz.

【Key words】 Infrasound; CHO cell; Atomic force microscope; Cell membrane

次声波是频率低于 20 Hz 的声波,与超声波一样,虽然超出了人耳的听阈范围,但却有着广泛的生物学效应^[1]。次声广泛存在于自然界、生产环境、军事环境以及人体内,涉及其生物学机制的研究亦日益受到人们重视。由于次声波是一种机械波,以震荡方式进行传播,其效应器官可通过共振吸收能量,而细胞膜则有可能是次声作用的一个靶部位。本实验应用原子力显微镜观察经次声作用后细胞膜的变化情况,以探讨次声对细胞膜的直接效应。

材料与方法

一、材料

1. 仪器及试剂:PRMI-1 640 型细胞培养基购自美国 Gibco 公司,培养皿购自 Costar 公司,胎牛血清由北京军区研究所生产,戊二醛由 Sigma 公司生产,由北京军事医学科学院设备仪器中心提供原子力显微镜(atomic force microscope, AFM),型号为日本岛津(SHI-

MADZU)公司生产的 SPM-9500J3 型,采用 SPM-online 2.45 版软件控制扫描,利用 SPM-offline 2.2 版软件进行图像、数据分析。

2. 次声设备:次声压力舱系统及次声检测系统由第四军医大学、航天工业总公司及中科院声学所联合研制。次声压力舱系统包括低频信号发生器、功率放大器、电动扬声器及舱体;检测系统主要包括次声传感器及次声信号数据采集分析系统。

3. 实验细胞:利用已建株的中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞系作常规培养,该型细胞性能相对稳定,于对数生长期按 10^5 个细胞/皿接种于直径 35 mm 的培养皿中,常规培养细胞至对数生长期时进行实验。

二、实验操作方法

1. 次声暴露方法及分组:设置实验次声参数为 130 dB、8 Hz,每天作用 1 次,每次持续 2 h。将上述细胞随机分为 4 组:分别是次声暴露 1 次组、次声暴露 3 次组及相应的对照 1 d 组、对照 3 d 组,每组分别有 6 皿细胞。次声舱经严格消毒后,将各暴露组细胞培养皿置于舱内接受次声作用,对照组细胞也置于同样环境中作假次声暴露,其次声声压级输出强度为 0 dB。

作者单位:710032 西安,西安第四军医大学西京医院物理医学与康复科(王冰水、刘静、陈景藻);第四军医大学预防医学系放射医学教研室(曾丽华);北京军事医学科学院设备仪器中心(张飒)

2. AFM 观测:于次声作用后即刻弃去细胞培养液,用生理盐水洗涤 2 次,再用 2% 戊二醛固定后待检。首先用光学显微镜寻找培养皿上合适的细胞群落,并将含该细胞群落的培养皿(将此培养皿裁减至大小与 AFM 载物台一致)用双面胶粘附于 AFM 的圆形不锈钢样品载物片上并压紧,该过程由 SPM-online 2.45 版软件控制,并进行接触模式连续扫描,每一样品共扫描 3 个细胞,利用 AFM 自带分析软件对数据进行三维图像重建分析。

结 果

实验结果表明,对照 1 d 组 CHO 细胞膜表面有较多的突起,大小不等,高低不平,有的突起部位之间有较深的凹陷(图 1)。经次声作用 1 次后可发现,细胞膜表面许多突起部位变得相对平缓,与相应对照组比较,突起明显减少、变缓,细胞膜起伏程度亦较小,但仍可见到少量较高的突起及一些较深的凹陷(凹陷的面积相对变小),其深度与相应对照组比较,差异无统计学意义(图 2)。对照 3 d 组(图 3)与对照 1 d 组比较,没有明显差异;而次声暴露 3 次组细胞表面变得更为平缓,与相应对照 3 d 组比较,前者未发现较高的突起,较深的凹陷也很少见到,整个细胞膜表面相对较为平缓,呈现轻微起伏状(图 4)。比较次声暴露 1 次组及次声暴露 3 次组时发现,两者细胞膜表面结构的变化性质基本相同,均为细胞膜表面突起降低,凹陷变平,膜表面趋于平缓,且次声暴露 3 次组细胞膜变化程

度明显大于次声暴露 1 次组。

讨 论

近年来,关于次声的生物学效应研究逐渐受到人们重视,尤以涉及次声对中枢神经系统、听觉系统、生殖系统及部分脏器影响的研究相对较多。相关文献表明,一定声压级水平的次声波可导致机体部分功能障碍,甚至引发器质性损伤,但损伤机制目前尚未完全明了。次声是一种机械波,以震荡方式传播,机体器官可通过共振吸收能量;但由于细胞体积较小,能否直接成为次声的靶目标从而吸收能量发生改变,一直是人们关注的问题之一。AFM 为直接观察细胞膜表面细微的结构变化提供了条件,它可通过检测样品表面与 AFM 探针针尖原子间的斥力梯度信息来获取样品表面的结构图像。当探针在生物样品上扫描时,由于样品表面原子结构起伏不平,安装探针的悬臂也就出现相应起伏,此时悬臂上的激光束反射也会出现相应的起伏,通过测光器接收并将其放大后,即可获得样品表面起伏的原子结构图像。应用 AFM 能够实时检测自然状态下细胞膜活性状态时的蛋白质构象,为在纳米级水平观察细胞形态创造了条件^[2]。

正常细胞膜以膜脂为主要构架,膜蛋白镶嵌其中,膜蛋白具有重要的生物学功能,与少量的糖蛋白及糖脂组成液态镶嵌模型。细胞膜本身具有流动性,借助机体能量支持,可维持细胞膜的完整性。本实验观察到正常细胞膜表面高低不平、有大小不一的突起及

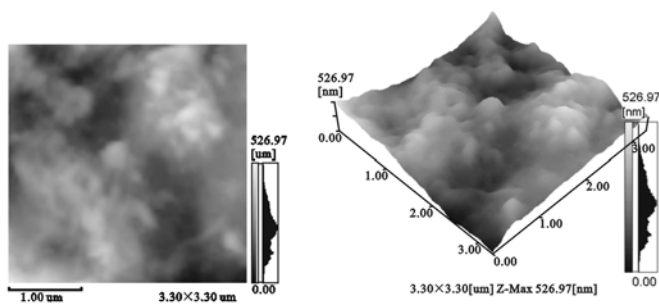


图 1 对照 1 d 组 CHO 细胞膜表面形态观察(AFM 观察)

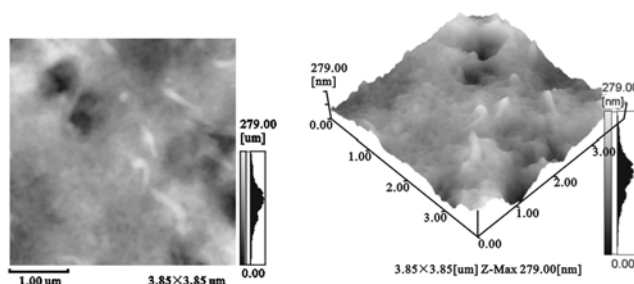


图 2 次声暴露 1 次组 CHO 细胞膜表面形态观察(AFM 观察)

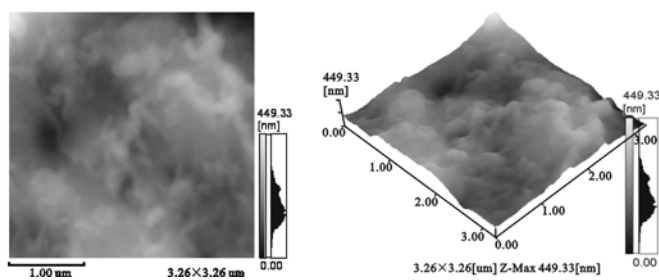


图 3 对照 3 d 组 CHO 细胞膜表面形态观察(AFM 观察)

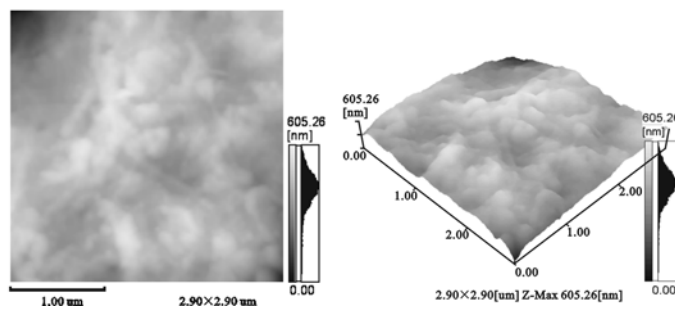


图 4 次声暴露 3 次组 CHO 细胞膜表面形态观察(AFM 观察)

深浅不等的凹陷,与以往文献报道结果类似^[3]。不同刺激因子作用可引起细胞膜表面发生相异的改变,如电磁脉冲及某些药物可引起细胞膜发生“穿孔”反应^[4,5]。次声以机械震荡的方式作用于细胞,在本实验中我们观察到,当次声作用结束后,未发现细胞膜有“孔洞”反应,但观察到细胞膜表面起伏变缓,而该改变可能是细胞膜经次声作用后的特征变化之一。其原因可能有以下几方面:①结合本实验室以往的研究,经 130 dB 的次声作用后,细胞可出现损伤性超微结构改变^[6],考虑为细胞损伤后出现轻度肿胀,致细胞膜表面“皱褶”减少,突起降低,使表面趋于平缓;而且随着次声作用次数增多,细胞损伤程度亦逐渐加重。在本实验中,次声暴露 3 次组细胞膜改变程度明显大于次声暴露 1 次组,也正好符合上述变化趋势。②次声以机械弹性震荡方式传播,细胞膜则以共振方式吸收能量,由于细胞膜蛋白的弹性模量远高于膜脂,故细胞膜蛋白表现为不同的突起形态,推测次声能量被膜蛋白吸收后,致使其结构形态发生改变,进而出现细胞膜超微结构变化。③细胞骨架及细胞质膜间存在大量的蛋白质,如膜伴随蛋白 vinculin, Goldmann 等^[7]通过 AFM 观察发现,当细胞缺乏 vinculin 蛋白时,其弹性降低,表明细胞骨架与细胞膜结构有关。本研究也观察到,细胞经次声作用后,可引起细胞骨架成分——应力丝 F-actin 明显增加,可能是由于细胞骨架的改变进而引发了整个细胞(包括细胞膜)结构发生改变。

综上所述,次声确可引起细胞膜结构发生显著改变,但由于本实验所用的 CHO 细胞为经次声短时间作用后的“新鲜”细胞,尽可能接近了生理状态,故其膜表面具有一定柔性,影响了 AFM 分辨率,而且也不能确定是膜蛋白或膜脂或其它成分发生了改变;另外 AFM 只能发现细胞膜表面结构性改变,亦不能确定其变化性质及成分,故关于次声对细胞功能及结构的影响还需结合其它手段开展进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈景藻. 次声的产生及生物学效应-医药卫生科学技术进展. 北京:军事医学科学出版社,1997. 194-197.
- 2 侯淑莲,李石玉. 原子力显微镜在生命科学研究中的应用. 中国医学物理学杂志,2000,17:235-238.
- 3 Muller DJ, Engel A. Conformations, flexibility, and interactions observed on individual membrane proteins by atomic force. Methods Cell Biol, 2002,68:257-299.
- 4 曹晓哲,王德文,赵梅兰,等. 电磁脉冲辐射致大鼠垂体细胞膜穿孔的原子力显微镜观察. 中华物理医学与康复杂志,2003,25:462-464.
- 5 刘智良,徐如祥,张英鸽,等. 红藻氨酸作用后海马神经元胞膜表面的超微结构的原子力显微镜观察. 第一军医大学学报,2003,23:659-662.
- 6 魏亚宁,刘静,舒青,等. 次声暴露对小鼠卵巢超微结构的影响. 第四军医大学学报,2003,24:293-295.
- 7 Goldmann WH, Galneder R, Ludwig M, et al. Differences in elasticity of vinculin-deficient F9 cells measured by magnetometry and atomic force microscopy. Exp Cell Res,1998,239:235-242.

(收稿日期:2004-04-25)

(本文编辑:易 浩)

· 个案报道 ·

综合康复治疗脊髓灰质炎后综合征患者 1 例

李放 胡永善 吴毅 孙莉敏 王国珍

患者为女性,39 岁,主诉渐进性四肢无力 2 年余。现病史:患者 2 年前在无明显诱因情况下突发高热,随后自感四肢乏力,但无明显麻木感,亦无四肢抽搐反应,无大、小便异常,无恶心、呕吐,能行走并坚持上、下班,但每走约 200~300 m,就会因无力而坐下休息。半年后患者四肢无力症状加重,常感觉疲劳,需他人搀扶才能行走。患者自发病以来,已于多处就诊,曾因诊断为“心因性肌无力”而给予抗抑郁药物治疗,但病情无明显缓解;也曾疑诊为“神经源性损害”而给予营养肌肉、神经等药物治疗,病情亦未见好转。

患者既往史:于婴幼儿时期曾患脊髓灰质炎,有右下肢无力史,而后好转至正常;否认有糖尿病、甲亢等代谢性疾病史

及其它病史。患者无烟、酒等不良嗜好,其婚育史、月经史、家族史均正常。体格检查:体温、脉搏、呼吸、血压正常;神志清楚,发育正常,营养良好,对答切题,检查合作;颅神经检查正常;颈软,甲状腺大小、质地均正常;心肺功能检查正常;肋下未扪及肝、脾;双上肢(从肩至指部位)肌力 II~III 级,远、近端肌力接近,双下肢(从髋至趾部位)肌力 0~I 级,远侧差于近端;T₁₀ 平面以下深、浅感觉丧失,双侧肱二头肌反射(+),膝反射(-),双侧 Babinski 征阴性。辅助检查:患者内分泌、代谢及电解质水平等均正常。肺功能测试表明患者呼吸肌肌力减退,有轻度混合性肺通气障碍。胸椎 MRI 平片扫描示患者 T₆ 椎体内有异常信号灶,考虑为血管瘤,无脊髓压迫征象,进一步以 T₆ 为中心层面行 CT 扫描,却未发现明显异常;头颅 MRI 平片扫描也未发现明显异常(除双侧有上颌窦炎外)。活检患者左侧三角肌时,发现其肌肉、神经组织均无明显病变。

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院康复医学科(李放、胡永善、吴毅、孙莉敏);浙江省台州市人民医院(王国珍)