

正常人和地中海贫血病患者血液中 血红蛋白的电子吸收光谱和 激光共振喇曼光谱

李焕玲 袁焕标 黄旭

(中山大学物理系激光光学与光谱学研究室)

陈顺存 黎庆恩

(广州医学院第一附属医院)

提要: 实验研究了正常人和一种 α 型、两种 β 型地中海贫血病患者血液中八种单一组分的血红蛋白的电子吸收光谱和激光共振喇曼光谱,结合临床,分析讨论了它们的光谱、分子结构与呼吸生理功能和致病机理的关系。

Electronic absorption spectra and laser resonance Raman spectra of hemoglobin in the blood of normal person and patients of thalassemia

Li Huanling, Yuan Huanbiao, Huang Xu

(Laser Optics & Spectroscopy Lab., Physics Department, Zhongshan University)

Chen Shuncun, Li Qingen

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College)

Abstract: The electronic absorption spectra and laser resonance Raman spectra of eight types of singular component of hemoglobin from the blood of normal persons, one α - and two β -thalassemia patients were studied. The correlation of their spectra, molecular structures, respiratory function and pathogenetic mechanism were for the first time analyzed and discussed in coordination with clinic.

一、引言

A. E. Sidwell^[1,2] 首先研究了血红蛋白

的吸收光谱,发现它在近紫外区有 Soret 带,它涉及血红素基团-铁卟啉共轭环结构的 π -

收稿日期: 1982年7月20日;修改稿收稿日期: 1983年8月12日。

π^* 电子跃迁; 在可见光区, 有 α 带和 β 带, 它与卟啉环的配位场和第六配位体的原子特性有关, 能表征血红蛋白是处于氧合或脱氧状态; 在紫外区的两个吸收带则主要是多肽链侧链上酪氨酸的苯酚基和色氨酸的吲哚环这两个紫外发色团的吸收。

七十年代中期, 激光共振喇曼光谱在生物学上的应用研究引起了人们的显著重视。H. Brunner 和 H. Sussner 等^[3~8] 用激光共振喇曼光谱方法比较了空心卟啉 IX、氯高铁血红蛋白、氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的激光共振喇曼光谱, 进一步弄清了血红蛋白共振喇曼光谱各条谱线对分子结构振动模式的归属。

近年来, 对血红蛋白分子血液病发病机理的学说指出: 当调节正常血红蛋白合成的基因发生突变, 使多肽链变异, 便会直接影响它的呼吸功能。

我们的工作就是根据这种观点, 建立了一个简单的模型: 把卟啉环和多肽链视为外场, 多肽链变异, 场强变化, 便直接影响卟啉环中心铁离子与 O_2 的结合和释放能力。用激光共振喇曼光谱方法, 以其中表征血红蛋白分子结构与 $\nu(Fe-O_2)$ 伸缩振动和 $\nu(=C-N)$ 伸缩振动有关的两条谱线为探针, 对正常人和分子血液病患者血液中各血红蛋白的单一组分进行研究, 结合临床, 分析讨论了它们的激光光谱—分子结构—呼吸功能—致病机理之间的关系。

二、实验装置和条件

实验装置如图 1 所示, 测定灵敏度达 10^{-5} M, 重复性为 ± 1 厘米⁻¹。

实验条件: Ar^+ 激光器 4880 Å 单线功率为 300 毫瓦; GDM-1000 光栅双单色仪狭缝宽为 300 微米; 光电倍增管电源电压为 900 伏; 放大器放大倍数为 500; 样品池转速为 2000 转/分。

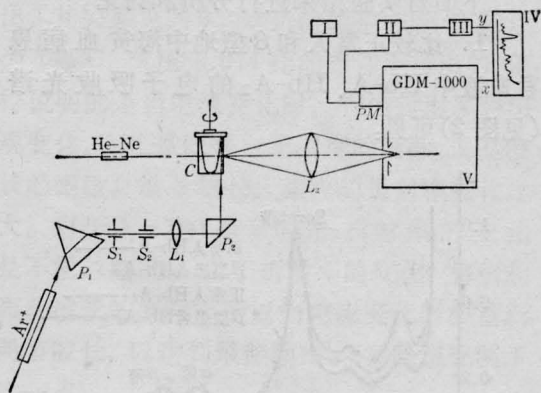


图 1 实验装置示意图

Ar^+ —氩离子激光器; P_1 —分光棱镜; P_2 —全反射棱镜; S_1, S_2 —光阑; C —样品池; L_1, L_2 —透镜; PM —光电倍增管; I —高压电源; II —前置放大器; III —相敏放大器; IV —记录仪; V —光栅双单色仪

用醋酸纤维薄膜电泳法从正常人和一种 α 型、两种 β 型地中海贫血病患者的血液中分离出八种单一的血蛋白组分(表 1)。

表 1

	Hb-A	Hb-A ₂	Hb-F	Hb-H
正常人 成人	~96%	2~3%		
正常人 胎儿			80%	
α 型患者	~70%			30%
β 型患者 A ₂ 升高症	~90%	8%		
β 型患者 F 升高症			70%	

对以上八种单一的血蛋白组分, 模拟呼吸现象, 分别通入 O_2 或 CO_2 , 测定其中的气体含量; 记录了它们的电子吸收光谱和激光共振喇曼光谱。

三、实验结果和讨论

我们对电子吸收光谱中与卟啉环、配位场和第六配位体以及多肽链有关的五个吸收峰进行了比较; 以共振喇曼光谱中与呼吸生理有关的特征喇曼谱线 572 厘米⁻¹ $\nu(Fe-O_2)$ 和 1387 厘米⁻¹、 1392 厘米⁻¹ $\nu(=C-N)$ 为探针, 观察了上述八种单一的血蛋白组分的分子结构变异在光谱上的反映。

下面对实验结果进行分析和讨论。

1. 比较正常人和 β 型地中海贫血病患者血液中Hb-A、Hb-A₂的电子吸收光谱(见图2)可见:

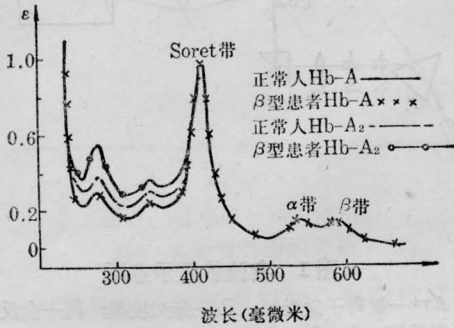


图2 正常人和 β 型地中海贫血病患者血液中Hb-A、Hb-A₂的电子吸收光谱

a. 正常人与 β 型患者的Hb-A: 表征血红素基团部位的Soret带和 β 带以及表征其多肽链的酪氨酸和色氨酸侧链中的紫外发色团部位的紫外吸收带均相同。这表明无论是正常人血中的Hb-A或 β 型患者(Hb-A₂升高症)血中的Hb-A均为正常Hb-A,其分子结构与上述吸收光谱相应的发色团的结构均相同。我们的样品均属氧合型。

b. 正常人的Hb-A与Hb-A₂两者的Soret带和 α 、 β 带均相同; 两者的紫外吸收带无相对频移, 只是强度稍有不同。这表明正常人的Hb-A和Hb-A₂均属氧合型, 两者具有相同的卟啉结构, 两者的多肽链部位虽有从 $\alpha_2\beta_2$ (Hb-A) \rightarrow $\alpha_2\delta_2$ (Hb-A₂)的变化, 但此变化不涉及酪氨酸和色氨酸侧链中的紫外发色团的变化。

c. β 型患者和正常人的Hb-A₂两者的Soret带和 α 、 β 带均相同; 两者的紫外吸收带无相对频移, 强度有些变化。这表明两者具有相同的卟啉结构。患者的病变部位在Hb-A₂的多肽链。至于两者多肽链结构上是否亦稍有不同, 尚待进一步研究。

2. 正常人和 β 型地中海贫血病患者血液中Hb-A、Hb-A₂的激光共振喇曼光谱

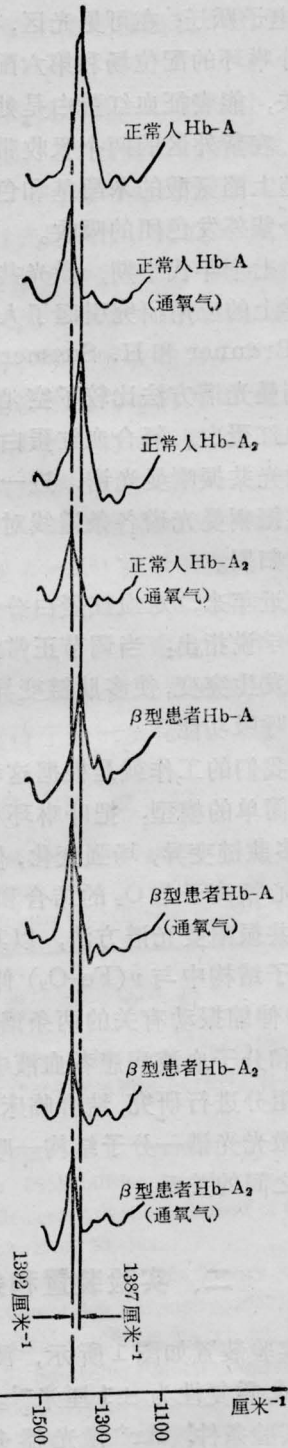


图3 正常人和 β 型患者Hb-A、Hb-A₂的激光共振喇曼光谱(纵坐标为光强,下同)

(图3、4)的特征分别是:

a. 在正常人的Hb-A中, 记录到1387

厘米⁻¹的共振喇曼谱线(图 3a), 它归属于血红蛋白中血红素基团卟啉环的 $\nu(=C-N)$ 伸缩振动, 其振动频率依赖于卟啉环中心铁离子与吡咯氮间的配位强度。

当正常人的 Hb-A 通 O₂ 时, 1387 厘米⁻¹ 这条喇曼谱线向高频移至 1392 厘米⁻¹ 处(图 3b)。这表明在正常人体内占 96% 左右的 Hb-A 容易与 O₂ 结合。结合时由于卟啉环中心铁离子 (Fe⁺⁺) 移入卟啉环平面中心, 铁与吡咯氮的配位强度增加, $\nu(=C-N)$ 振动频率向高频移动。与此同时, 还出现 572 厘米⁻¹ 这条特征喇曼谱线(图 4)。

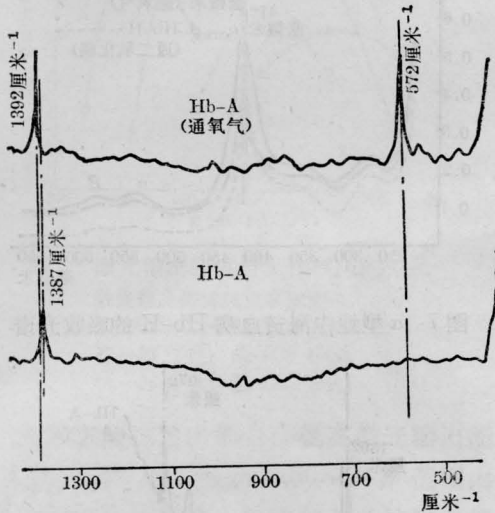


图 4 正常人 Hb-A 激光共振喇曼光谱图

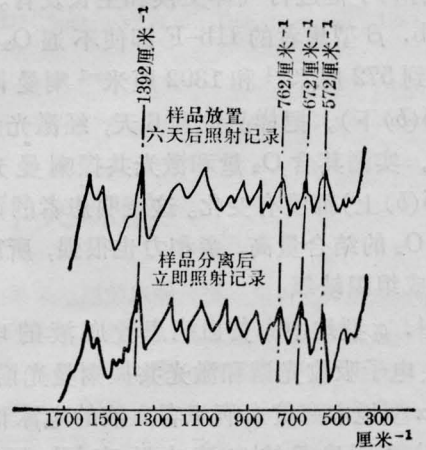
b. 正常人的 Hb-A₂ 与 Hb-A 一样记录到 1387 厘米⁻¹ 这条谱线; 通 O₂ 则频移到 1392 厘米⁻¹。

c. β 型患者的 Hb-A 与正常人的 Hb-A 完全一样, 记录到 1387 厘米⁻¹ 这条谱线, 通 O₂ 后频移至 1392 厘米⁻¹。这是正常血红蛋白 Hb-A。

d. β 型患者的 Hb-A₂ 则记录到向高频移动了的谱线 1392 厘米⁻¹, 它和正常血红蛋白 Hb-A 通 O₂ 后的情况一样。这表明患者的 Hb-A₂ 含 O₂ 量比较高, 在通常情况下已和一定量的 O₂ 结合, 而且它和 O₂ 的亲合力也比较大, 即卟啉环中心铁离子一旦与 O₂ 结



(a) 正常脐带血 Hb-F 的激光共振喇曼光谱



(b) β 型地中海贫血病 Hb-F 的激光共振喇曼光谱

图 5

合, 就比较难释放, 这也可能是造成患者缺氧的原因之一。

3. 正常脐带血和 β 型地中海贫血病患者血液中 Hb-F 的激光共振喇曼光谱 (见图 5)。

a. 正常脐带血中 Hb-F 在通 O_2 前后的激光共振喇曼光谱有明显差异:

<i> 通 O_2 前: 记录到 $\nu(=C-N) = 1387$ 厘米⁻¹ 喇曼谱线(图 5a(1))。

<ii> 通 O_2 后: 这条谱线向高频移至 1392 厘米⁻¹ 处(图 5a(2)), 这与 2. a. 有类似的结果和解释。与此同时, 还记录到 572 厘米⁻¹ 的共振喇曼谱线(图 5a(2)), 它归属于血红蛋白的血红素基团中卟啉环中心铁离子的 $\nu(Fe-O_2)$ 伸缩振动。572 厘米⁻¹ 这条谱线的出现表明, Hb-F 的卟啉环中心铁离子已与 O_2 结合。样品经半小时照射后, 572 厘米⁻¹ 这条谱线的强度减弱(图 5a(3))。

<iii> 通 CO_2 时(图 5a(4)), 572 厘米⁻¹ 喇曼谱线消失, 1387 厘米⁻¹ 增强。这表明, 此时由于 CO_2 分压增加, 使 Hb-F 对 O_2 的饱和度和亲和力降低, 甚至趋向脱氧状态。

以上结果说明, 正常脐带血中占主要成分的 Hb-F 易与 O_2 结合, 也易于释放 O_2 , 这样胎儿通过脐带血就容易在母体中吸取 O_2 , 有利于他进行气体交换和生长发育。

b. β 型患者的 Hb-F 即使不通 O_2 , 也记录到 572 厘米⁻¹ 和 1392 厘米⁻¹ 喇曼谱线(图 5(b)下)。把样品放置 6 天, 经激光多次照射, 实测其含 O_2 量和激光共振喇曼光谱(图 5(b)上)都没有变化。这表明患者的 Hb-F 与 O_2 的结合量高, 亲和力也很强, 所以容易造成组织缺氧。

4. α 型地中海贫血病患者血液的电泳谱图、电子吸收光谱和激光共振喇曼光谱。

α 型地中海贫血病患者血液的电泳谱图(图 6)表明患者的血液中除有 Hb-H(β_4) 外, 尚有 Hb-A($\alpha_2\beta_2$) 以及少量的 Hb-A₂($\alpha_2\delta_2$) 和 Hb-Bart's(ν_4), 属杂合子(杂合型 α -地中海贫血)。

a. α 型患者 Hb-H 的电子吸收光谱(图

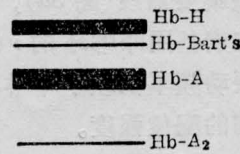


图 6 α 型患者血液的电泳谱图

7) 中 α 、 β 带较弱, 表明 Hb-H 虽属氧合型, 但它与 O_2 的结合量极低, 实测其含 O_2 量仅 10% 左右。激光共振喇曼光谱复杂, 与正常 Hb 的差异很大, 没有出现 $\nu(Fe-O_2)$ 和 $\nu(=C-N)$ 这两条喇曼谱线。

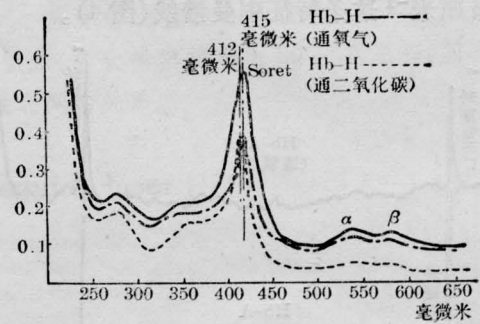


图 7 α 型地中海贫血病 Hb-H 的吸收光谱

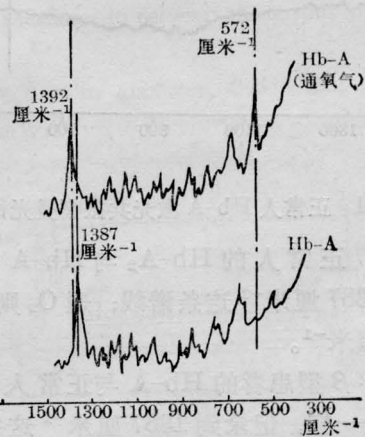


图 8 α 型地中海贫血病 Hb-A 的激光共振喇曼光谱

通 O_2 时, 其 Hb-H 表现出拒绝与 O_2 结合的性质。通 CO_2 时呈褐色絮状沉淀, 明显变性, 其吸收光谱也明显变形。

从以上实验现象与结果可见, Hb-H 的分子结构与正常血红蛋白不同。同时, Hb-H

(上接第 243 页)

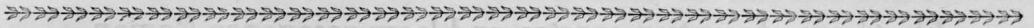
表面的能量。激光的能量在生物样品上呈高斯分布,只有照射到中心部位的能量才会产生引起生物学效应的损伤。所以,激光在生物样品上造成的有效损伤光斑可以很小。Berns等^[13]指出,激光聚焦光点的直径是激光波长、聚焦物镜放大倍数以及数值孔径的函数,但由于能量的高斯分布,激光在生物样品上所造成的有效损伤光斑可以比理论上最小值还要小(理论上最小值为激光波长的一半),其直径可以在0.25微米以下。

根据我们的实验结果,利用本氩离子激光显微仪进行照射可以在细胞及细胞器上造成0.5微米左右的微小损伤光斑,经细胞化学分析,激光照射后能够破坏核仁内的DNA和RNA。因此,利用氩激光显微照射可以在超微米的选择性损伤的条件下研究细胞内某一细胞器,甚至细胞器上某一特殊位点的功能,其优越性超过国内目前使用的红宝石激光显微照射。此外,使用不同的激光能量、波长以及用不同的活性染料处理细胞,还可以

选择性地使细胞内不同的生物大分子受到损伤,进而研究其后代的变异情况。这一特点使激光显微照射成为生物学研究中的一个非常有效的工具。

参 考 文 献

- [1] M. W. Berns, A. D. Floyd; *Exp. Cell Res.*, 1971, **67**, 305.
- [2] R. L. Amy *et al.*; *Exp. Cell Res.*, 1967, **45**, 361.
- [3] R. M. Mckinnell *et al.*; *Z. Zell.*, 1969, **93**, 30.
- [4] M. F. Mims; *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1971, **26**, 31.
- [5] J. O. Daniel, K. Takahashi; *Exp. Cel Res.*, 1965, **39**, 475.
- [6] M. W. Berns *et al.*; *Exp. Cell Res.*, 1970, **60**, 133.
- [7] M. W. Berns; *Science*, 1974, **186**, 700.
- [8] C. Cremer *et al.*; *Clin. Genet.*, 1978, **14**, 286.
- [9] C. Zorn *et al.*; *Exp. Cell Res.*, 1978, **124**, 111.
- [10] U. Haenel; *Helv. Med. Acta*, 1950, **17**, 627.
- [11] M. W. Berns, *Exp. Cell Res.*, 1971, **65**, 470.
- [12] M. W. Berns, C. Salet; *Int. Rev. Cytol.*, 1972, **33**, 131.
- [13] M. W. Berns *et al.*; *Science*, 1981, **213**, 505.



(上接第248页)

在体内外都易产生多肽链变性,影响Hb-H中 $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$,形成低氧亲和力。经实测,样品中的Met-Hb竟高达~60%。

b. α 型患者的Hb-A的激光共振喇曼光谱(图8)也较复杂,但仍能记录到1387厘米⁻¹喇曼谱线,通O₂则向高频移至1392厘米⁻¹。同时还能记录到572厘米⁻¹喇曼谱线。这表明 α 型患者的Hb-A与正常人的Hb-A有相同的分子结构,卟啉环中心铁离子为Fe⁺⁺,仍有携O₂功能。本例Hb-H占30%,所以Hb-A约占70%,患者可以无明显的缺氧症状。

参 考 文 献

- [1] A. E. Sidwell *et al.*; *J. Biol. Chem.*, 1938, **123**, 355.
- [2] T. G. Spiro, T. C. Sterkas; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 338.
- [3] T. C. Sterkas, T. G. Spiro; *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, **263**, 830.
- [4] H. Brunner, H. Sussner; *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, **310**, 20.
- [5] H. Brunner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1972, **70**, 153.
- [6] H. Brunner; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **51**, 883.
- [7] T. M. Loehr, J. S. Loehr; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **55**, 218.
- [8] L. D. Barron, A. Szabo; *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 660.