

钙通道关闭及开放状态下稀土离子对淋巴细胞的跨膜行为

王海燕 魏春英 杨 频*

(山西大学分子科学研究所 太原 030006)

摘要 用荧光探针法(以 Fura-2 为荧光指示剂)通过监测细胞内荧光强度的变化来判断稀土的跨膜行为.在近生理条件下,从单细胞、多细胞两个角度,研究了人外周血淋巴细胞钙离子通道开放、关闭等不同状态下 Dy^{3+} , La^{3+} 等稀土离子的跨膜行为.实验得出:微量稀土离子在上述状态下均不能跨膜内流.我们还发现,在钙通道开放的情况下,低剂量稀土离子不影响细胞外钙跨膜内流.

关键词 稀土离子, 荧光探针, 淋巴细胞, 钙通道, 跨膜内流

The Trans - Lymphocyte Membrane Behavior of Rare Earth When the Calcium Channel is Blocked and Opened

WANG Hai - Yan WEI Chun - Ying YANG Pin*

(*Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan, 030006*)

Abstract We have investigated the transport of rare earth ions transporting across the membrane of human peripheral blood lymphocytes(HPBL) by monitoring the fluorescence of HPBL loaded with Fura - 2. Through unicellular and multicellular aspects we study the behaviors of transporting across the membrane of HPBL about La^{3+} , Dy^{3+} . In similar physiological conditions, when we activate the calcium channel of HPBL by mitogen: PHA and ConA, the lanthanum ions ($0.01\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) cannot pass the membrane through calcium ion entry; And when calcium entry blockers (CEBS) for example Verapamil and Nifedipine block the calcium channel, the lanthanum ions cannot enter across the membrane through other entries, either. It seems to us that the trace lanthanum cannot pass the membrane in above conditions. And we find the lanthanum cannot effect the extracellular calcium influx across the plasma membrane through calcium entry.

Keywords lanthanum ions, probe of fluorescence, lymphocytes, calcium channel, influx across membrane

稀土元素对动植物生长的促进作用及在医药和临床上的应用日见显著,然而这些元素对生物体的作用机理以及其作为非生命元素的长期效应还远未清楚,有必要从细胞水平上对稀土离子的行为和作用进行深入研究,而稀土能否进入细胞是研究其长

期生物效应的一个关键问题.淋巴细胞作为重要的免疫细胞,在机体的免疫反应中起着重要作用,研究稀土对淋巴细胞的作用具有深远而广泛的实际意义.我所首次用荧光探针法(Fura-2 为荧光指示剂)来研究稀土离子在静息状态和小分子作用下能否跨

* E-mail: yangpin@mail.sxu.edu.cn

收稿日期:1999-08-16,修回日期:1999-12-16,定稿日期:2000-02-26,国家自然科学基金(29871020)和南京大学国家重点实验室资助项目

(Received August 16, 1999. Revised December 16, 1999. Accepted February 26, 2000)

过人外周血淋巴细胞,得出一些初步的定性结论^[1].在此基础上我们根据钙与稀土的相似性,将工作的重点放在与钙离子跨膜内流有关的钙通道的开放、关闭等不同状态下稀土跨膜行为,以得到更加确切的结论.

1 基本原理^[2]

Fura-2-AM 形式穿过细胞膜进入细胞(即荧光试剂的负载),被细胞中的胞浆酯酶水解为游离酸的形式 Fura-2(游离型).此游离型可与 Ca^{2+} 或稀土离子等其它金属阳离子螯合成 Fura-2-M(配位型或螯合型)(M 代表金属离子).这样,在细胞内存在两种形式,一种是未与阳离子结合的游离型 Fura-2,其激发波长为 380nm,荧光强度与游离型浓度成正比;一种是与阳离子结合的络合型 Fura-2-M,激发波长从 380nm 紫移到 340nm,荧光强度增强,荧光强度与配位型浓度成正比.静息状态时,游离型与配位型在胞内达到平衡.在细胞外加入被测稀土离子,若 La^{3+} , Y^{3+} 能过膜进入细胞,则与游离酸 Fura-2 结合形成螯合型,随之 340nm 处荧光强度增强,380nm 处荧光减弱(因为游离型的浓度相应降低),340nm 与 380nm 荧光强度比值升高;而稀土离子若不能过膜,荧光强度则没有任何变化^[1,3].据此可判断稀土离子能否过膜.

2 实验部分

2.1 仪器及试剂

美国 SPEX 公司产 AR-CM-MIC 型单细胞阳离子测试系统;美国 PE 公司产 LS-50B 荧光分光光度计;日本 Nikon 公司产 AFX-DX 型倒置荧光显微镜.

稀土氧化物(湖南稀土研究所,99.9%);Fura-2-AM (Sigma 进口分装),淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),氢化可的松注射液,异博定注射液(大同惠达制药厂);尼群地平注射液(山东齐鲁制药厂);PHA(Sigma 进口分装),ConA (Sigma 进口分装);本实验所用其它试剂均为分析纯.

人外周血淋巴细胞的制备和荧光试剂的负载见文献^[1].

2.2 仪器参数

AR-CM-MIC 型单细胞阳离子测试系统:仪器发射波长 505nm,激发波长分别为 340nm 和 380nm,

狭缝宽度均为 10nm.

LS-50B 荧光光度计:仪器发射波长 505nm,激发波长从 300~480nm,狭缝宽度均为 10nm,对溶液扫描;仪器发射波长为 505nm,激发波长分别为 340nm,380nm,狭缝宽度均为 10nm,用快速滤光片(fast filter)作胞内荧光强度随时间变化曲线.

2.3 实验方法

(1) 在近生理条件下,用单细胞阳离子测试系统测试顺次加入钙通道拮抗剂(尼群地平、氢化可的松、维拉帕米)、稀土离子 Dy^{3+} 后细胞内荧光强度.

(2) 在近生理条件下,用 LS-50B 荧光光度计测试顺次加入钙通道开放剂(PHA, ConA),稀土离子 La^{3+} 及 Ca^{2+} 后胞内荧光强度变化情况.

3 结果与讨论

3.1 钙通道关闭状态下稀土离子的跨膜情况

3.1.1 “负载”的测试 荧光指示剂 Fura-2-AM 穿过细胞膜进入细胞,被细胞中的胞浆酯酶水解为游离酸的形式 Fura-2.这是本实验的前提条件.我们在细胞悬浮液中加入 0.5mmol/L Fura-2-AM,孵育 45min 后,测定细胞内与细胞外(细胞间液)荧光强度(见图 1).

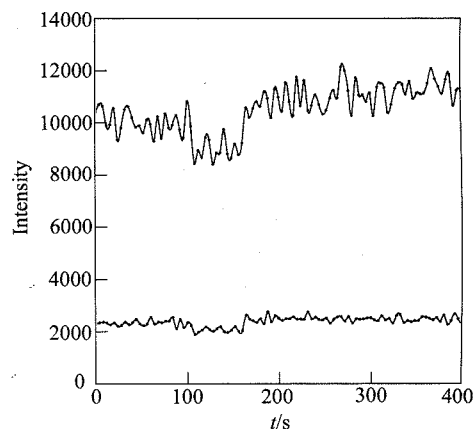


图 1 细胞内与细胞外(细胞间液)荧光强度
上方曲线代表 340nm 处的荧光强度,下方曲线代表 380nm 处的
荧光强度.其中,100s~200s 间荧光强度是细胞外(细胞间液
本身)的荧光强度,其余秒所示的荧光强度是细胞内的荧光强度

从图 1 可以看出:(1) 细胞内的荧光强度明显强于细胞外的荧光强度,这是由于所加的荧光指示剂 Fura-2-AM 已进入细胞,发射出的荧光强度值自然比细胞间液本身的荧光强度要大;(2) 340nm 的荧光强度大于 380nm 的荧光强度.这是因为 Fura

-2-AM 进入细胞被胞浆酯酶充分水解为 Fura-2 的形式(激发波长为 380nm),它与胞内钙离子结合成 Fura-2-Ca,激发波长从 380nm 移到 340nm,且荧光强度增大.图 1 说明 Fura-2-AM 已进入细胞并充分水解(也就是负载上了细胞).

3.1.2 钙通道拮抗剂尼群地平、氢化可的松、维拉帕米对 Dy^{3+} 跨膜行为的影响 尼群地平、氢化可的松、维拉帕米(即异博定)等是钙通道拮抗剂,可阻塞钙通道^[4].我们用它们作用细胞,测试 Dy^{3+} 等稀土离子的跨膜行为(见图 2,3,4).

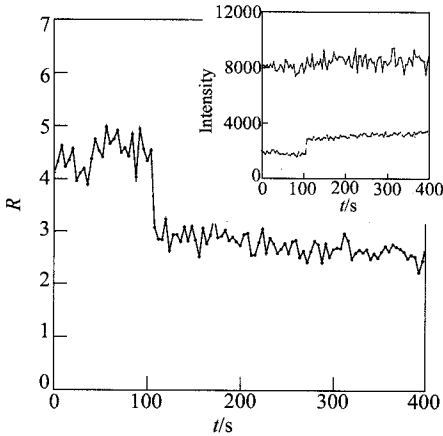


图 2 尼群地平对 Dy^{3+} 跨膜行为的影响

100s 时加入 $1\mu L$ 尼群地平,260s 加入 $5\mu L 0.1mmol/L Dy^{3+}$, 360s,加入 $1\mu L$ 凝血酶,重复三次.

图中曲线为 340nm 与 380nm 荧光强度的比值. 右上方小图为 340nm 与 380nm 荧光强度(以下同)

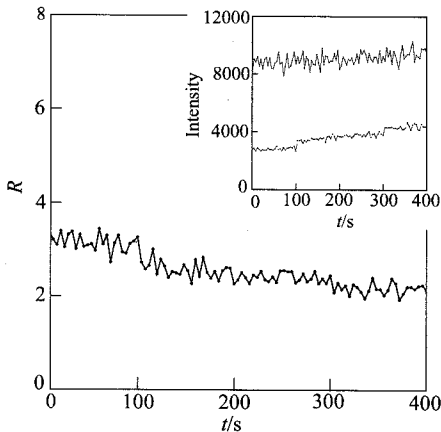


图 3 氢化可的松对 Dy^{3+} 跨膜行为的影响

100s 加入 $1\mu L$ 氢化可的松, 200s 加入 $5\mu L 0.1mmol/L Dy^{3+}$, 重复三次

强度值升高.加入稀土离子 Dy^{3+} 后,340nm 与 380nm 处荧光强度均无变化,比值也无变化,说明 Dy^{3+} 没有跨膜进入淋巴细胞,因而不能与游离型 Fura-2 结合而导致荧光强度的变化.加入刺激剂凝血酶荧光强度没有变化,说明刺激剂凝血酶也不能促进稀土离子过膜.

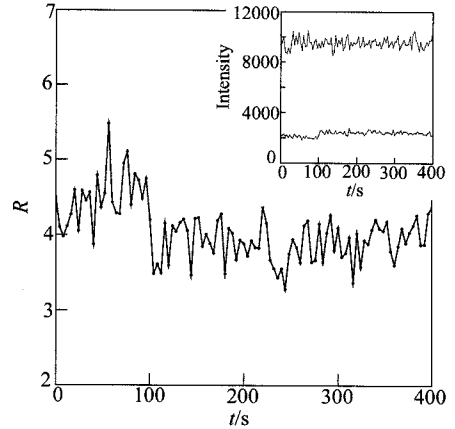


图 4 维拉帕米对 Dy^{3+} 跨膜行为的影响

100s 加 $1\mu L$ 异博定,200s 加入 $5\mu L 0.1mmol/L Dy^{3+}$, 300s 加 $1\mu L$ 黄体酮,重复三次

同尼群地平一样,氢化可的松、维拉帕米作用下, Dy^{3+} 不能跨过细胞膜进入淋巴细胞.刺激剂黄体酮也不能促进过膜.

综合上述实验,得出如下结论:稀土离子在钙通道关闭的情况下,不能跨过细胞膜进入细胞.刺激剂凝血酶、黄体酮等也不能促进稀土离子过膜.

3.2 钙通道开放状态下稀土离子的跨膜情况

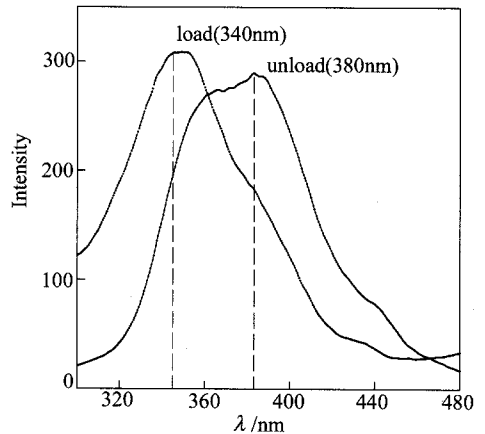


图 5 细胞悬浮液扫描曲线

右曲线是对 Fura-2-AM 扫描所得,激发峰位约在 380nm 处. 左曲线是在淋巴细胞悬浮液中加入 $0.5mmol/L$ Fura-2-AM (终浓度为 $5\mu mol/L$) 孵育 45min 后对悬浮液扫描所得, 激发峰位约在 340nm 处

从图 2 可以看出,加了尼群地平后,340nm 处与 380nm 处荧光强度比值减小.这是因为尼群地平作为钙通道拮抗剂,抑制外钙内流,使胞内钙离子浓度减小,从而释放游离型 Fura-2,导致 380nm 处荧光

3.2.1 “负载”的测试 从图 5 可以看出,峰位从 380nm 处紫移到 340nm 处.因为荧光指示剂 Fura-2-AM 已跨过细胞膜进入细胞,并水解为游离酸 Fura-2 的形式,与胞内钙离子配位,形成 Fura-2-Ca 的形式,所以激发波长峰从 380nm 移至 340nm 处,且 380nm 处的荧光强度相应减弱.

图 5 充分说明,加入荧光指示剂 Fura-2-AM 的细胞悬浮液孵育 45min 后,荧光指示剂负载上细胞.

3.2.2 PHA, ConA 对 La^{3+} 跨膜行为的影响 PHA, ConA 均为有丝分裂原的一种,能够打开淋巴细胞的钙通道^[5].我们用 PHA, ConA 作用于淋巴细胞,探讨离子通道开放的情况下稀土离子的跨膜行为(见图 6, 7).

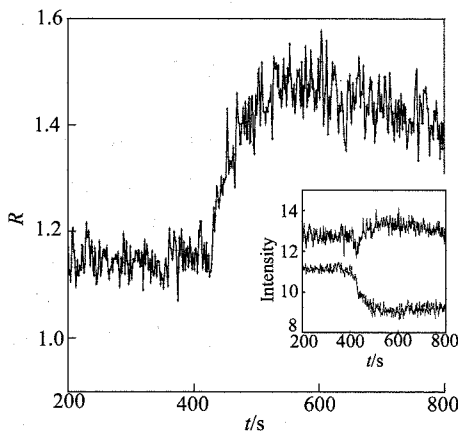


图 6 PHA 对 La^{3+} 跨膜行为的影响

0s 加入 0.5mL 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA 溶液,
200s 加入终浓度分别为 0.01mmol/L, 0.1mmol/L,
1mmol/L La^{3+} , 400s 加入终浓度为 1mmol/L Ca^{2+} , 重复三次

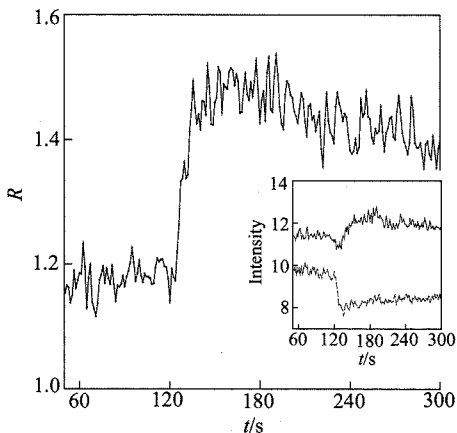


图 7 ConA 对 La^{3+} 跨膜行为的影响

0s 加 0.5mL 108.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ConA 溶液,
60s 加终浓度分别为 0.01mmol/L, 0.1mmol/L,
1mmol/L La^{3+} 离子, 120s 加终浓度为 1mmol/L Ca^{2+} , 重复三次

从图 6 看出,加入低剂量 La^{3+} (0.01mmol/L, 0.1 mmol/L, 1mmol/L) 后, 340nm 与 380nm 的荧光强度比值无变化,说明稀土离子没有过膜.而加入 Ca^{2+} 后, 340nm 荧光强度有明显升高, 380nm 荧光强度有明显降低(右下小图),因而 340nm 与 380nm 荧光强度比值升高,说明 PHA 确已打开淋巴细胞钙通道,外 Ca^{2+} 通过此通道进入细胞,而导致荧光强度相应变化.

从图 7 可知,同 PHA 一样,在 ConA 打开钙通道的前提下, La^{3+} 没有跨膜内流.

综合上述实验,在 PHA, ConA 打开淋巴细胞钙通道的情况下研究稀土离子的跨膜行为,我们得出确切结论:低剂量稀土离子不能过膜进入淋巴细胞.这与前人的观点是一致的.另外还进一步证实稀土离子不能通过钙通道进入细胞.我们推测:稀土离子可能凭其对含氧配体较大的亲和力而直接占据在淋巴细胞膜表面相应位点上.

3.3 稀土离子对外钙跨膜内流的影响

图 6, 7 等表现的是在钙通道开放剂的作用下,先加稀土离子,后加外钙的胞内荧光强度变化情况.从图中可以看出,先加稀土离子的情况下,外钙仍能跨膜内流,说明稀土离子对外钙内流并无拮抗作用.

相应地,我们再研究在钙通道开放剂的作用下,先加钙,后加稀土离子的胞内荧光强度变化情况(见图 8).

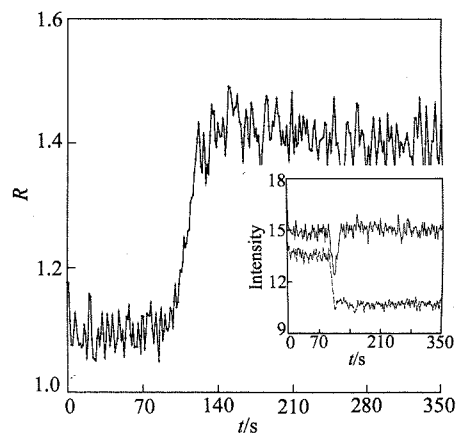


图 8 钙通道开放前提下稀土离子对外钙内流的影响

0s 加入 0.5mL 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA 溶液, 100s 加入终浓度 1mmol/L Ca^{2+} , 250s 加入终浓度分别为 0.01mmol/L, 0.1mmol/L, 1mmol/L La^{3+} , 重复三次

从图中可以看出,加入稀土离子后, 340nm 与 380nm 荧光强度的比值没有任何变化的迹象,即无增大趋势,从而排除了稀土元素刺激外钙进一步跨膜内流的可能性;也无减小的趋势,从而排除了稀土

离子拮抗外钙内流的可能性。

上述实验说明,在钙通道打开的情况下,稀土离子并不影响外钙内流.这可能是稀土离子只是占据在膜表面相应位点而并不阻塞钙通道的缘故。

4 结论

我们用单细胞阳离子测试系统及 LS-50B 荧光光度计测试系统,在模拟生理条件下,从单细胞和多细胞两方面、钙通道关闭和开放两个角度对稀土离子(La^{3+} , Dy^{3+})对淋巴细胞的跨膜行为加以全面论证,得出如下结论:

(1) 在淋巴细胞钙通道关闭的前提下,稀土离子(0.1 mmol/L)不能跨膜。

(2) 在淋巴细胞钙通道开放的前提下,低剂量稀土离子(0.01mmol/L, 0.1mmol/L, 1mmol/L)不能跨膜。

(3) 在淋巴细胞钙通道开放的前提下,低剂量稀土离子不影响外钙内流。

这些结论进一步证实了被广泛支持的观点:稀土离子不易过膜,同时也证实了我们方法的可行性。

上述结论说明:低剂量稀土离子不能通过钙通道形式跨膜进入细胞.为什么钙通道开放的情况下,“超级钙”-稀土离子却不能跨膜进入细胞?离子通道通常是由蛋白质和多肽的残基所形成的^[6],残基

的化学性质决定了离子通道传输的选择性.若金属离子被选择,则先从细胞外结合,然后经构象改变,再向胞浆侧解离、释放金属离子.否则金属离子将被拒之膜外或滞留在膜上.稀土元素不能通过钙通道跨膜内流,可能与通道的残基特性和稀土离子具有比钙更高的正电荷有关.但因为至今无人克隆纯化出淋巴细胞钙通道^[7],所以构成通道的残基具体怎样影响带有三价正电荷的稀土离子跨膜行为,还有待进一步研究。

References

- 1 YANG Pin, WEI Chun - Ying, *Chem. Bull.*, **1996**, (7), 14 (in Chinese).
- 2 YANG Pin, WEI Tian - Xin, WEI Chun - Ying, WANG Jin - Xi, FAN Da - Ping, *Acta Chimica Sinica*, **1997**, 55, 901 (in Chinese).
- 3 P. YANG, T. X. WEI, C. Y. WEI, *Chinese Chemical Letters*, **1996**, 7(9), 820.
- 4 Y. Hasin, W. H. Barry, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **1987**, 19, 853.
- 5 A. Zweifach, R. S. Lewis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, 90, 6295.
- 6 WANG Kui, HAN Wan - Shu (ed.) "Progress of Ten Years about Chinese Bioinorganic Chemistry", High Education Press, Beijing, **1997**, p. 149.
- 7 LI He - Wang, HAN Qi - De, *Shengli Kexue Jinzhan*, **1996**, 27(4), 307 (in Chinese).