

淋巴细胞膜上 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换操纵的 Eu^{3+} 内流的荧光法研究

魏春英 杨 频*

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

利用 Fura-2 荧光浓度指示剂法、通过检测 360nm 激发荧光强度的变化, 研究了 Eu^{3+} 能否利用人外周血淋巴细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换进入细胞。结果表明: 用 ouabain 预处理细胞无 Na^+ 介质中测试, 当加入 Eu^{3+} 时, 360nm 荧光强度发生猝灭, 且随着胞外加入的 Eu^{3+} 浓度的增大而猝灭增强。表明在实验条件下 Eu^{3+} 可以进入细胞。电压依赖性 Ca^{2+} 通道阻断剂 nifedipine 对 Eu^{3+} 的进入无显著影响, 建议了 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换是 Eu^{3+} 进入细胞的主要途径。当加入不同浓度的 Eu^{3+} 和 Ca^{2+} 的混和组分时, 在无 Na^+ 介质中测试, 结果表明 Eu^{3+} 与 Ca^{2+} 竞争 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换位点。在模拟胞内离子组分的 EGTA 缓冲液中 (pH 7.05), 测得 Eu^{3+} 与 Fura-2 的解离常数为 $4.95 \times 10^{-14} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 淋巴细胞 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换 稀土离子 Fura-2
分类号: O614.1

稀土在农业、医药和畜牧业等许多领域已得到广泛的应用, 尤其在中国, 稀土微肥已被应用累计面积达 6 亿亩。然而稀土离子是否能跨膜进入细胞并参与动植物的代谢, 稀土的生物效应及其对人类的长期毒理影响仍不清楚^[1]。在分子水平上, 认识细胞和稀土离子的作用机制, 它们的跨膜行为及其作用的靶分子, 是理解稀土生物效应的基础。近几年来, 国内许多研究工作者开展了大量实验研究: 倪嘉缙研究组利用高灵敏的 ICP-MS 及 NMR 技术研究了稀土离子和红细胞的作用并得出稀土离子不能进入红细胞^[2]的结论; 但王夔研究组应用破碎细胞法、激光扫描法研究指出, 稀土离子能进入红细胞, 且其跨膜与稀土离子在膜上的打洞作用有关^[3]; 我所曾利用 Fura-2 检测 La^{3+} 等稀土离子跨小鼠骨髓瘤细胞^[4]、淋巴细胞^[5, 6]及豚鼠心肌细胞膜^[7]的行为, 并系统地研究了在静息状态、细胞膜表面去极化、刺激剂作用以及钙通道开放及关闭的实验条件下的稀土离子跨膜行为, 得出稀土离子不能通过正常活细胞膜进入这些细胞。国外也有许多研究人员利用荧光指示剂法进行研究: George 认为 La^{3+} 利用 $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换很快进入鸡胚胎心室细胞, 但不能进入牛内皮细胞^[8]; Powis 也得出通过 $\text{Na}^+/\text{La}^{3+}$ 交换 La^{3+} 能进

入牛的嗜铬细胞, 但当胞外 La^{3+} 大于 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, La^{3+} 阻止 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换^[9]; Sreekumar 等人得出 La^{3+} 能进入人的 Keratinocytes 细胞, 同时抑制 Ca^{2+} 内流和外流, 但进入机制尚不清楚^[10]; Izumi 等研究者认为在高 K^+ 介质中 La^{3+} 进入兔子的 Melanotrophs^[11]; Kwan 得出 La^{3+} 没有进入泪腺泡细胞, 而且抑制 thapsigargin 激活的 Ca^{2+} 的进入^[12]; 另外, Segal 的研究认为, 低浓度的 La^{3+} ($10 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 促进 Ca^{2+} 进入兔子的 thymocytes, 但高浓度的 La^{3+} ($0.1 \sim 10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 却阻止 Ca^{2+} 的进入^[13]。总之, 稀土跨膜的研究结果, 随方法的不同和细胞种类的不同有明显差别, 而且不同细胞跨膜机制也大不相同, 且稀土离子对 Ca^{2+} 的流入和流出也有影响。另外对其它稀土离子的研究尚少见报道。为此, 我们在已有的淋巴细胞跨膜研究基础上, 通过 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换机制研究了 Eu^{3+} 跨淋巴细胞膜的行为, 并初步探讨了 Eu^{3+} 进入细胞的机制。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

Fura-2-AM (acetoxymethyl ester form of fura-2)、Fura-2 钾盐、ouabain、nifedipine 和 HEPES (Sigma 进

收稿日期: 2001-11-19。收修改稿日期: 2002-03-18。

国家自然科学基金资助项目 (No. 29871020)。

* 通讯联系人。E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

第一作者: 魏春英, 女, 32 岁, 讲师, 在职博士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

口分装); 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂); 稀土氧化物(99.9%, 湖南稀土研究所); 小牛血清为国产生化试剂; EGTA 及其它实验试剂均为国产分析纯。所有溶液均用去离子双蒸水配制。

实验所用新鲜血液由山西大学校医院提供。

美国 PE 公司产 LS-50B 荧光/磷光/发光光度计, 重庆光学仪器厂产 XDS-1 型倒置显微镜。

1.2 淋巴细胞的分离制备

新鲜人外周血液用一倍生理盐水(0.9% NaCl)稀释后, 慢慢加到淋巴细胞分离液之上, 1000~1500rpm 离心 10~20 分钟, 吸出淋巴细胞层, 用生理盐水及无 Ca^{2+} 生理液(HBS)分别洗一次, 然后悬浮在 HBS 缓冲液中待用。HBS 组成为($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 140NaCl, 5KCl, 1MgCl₂, 5.5Glucose, 10HEPES, pH 7.40。

1.3 荧光试剂的负载

取淋巴细胞悬浮液 150 μL (1×10^6 个细胞/mL), 加入终浓度为 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fura-2-AM 和 10% 的小牛血清, 并根据需要加入 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ouabain, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 30min。然后用无 Ca^{2+} HBS 溶液稀释至 4mL, 1500rpm 离心 5min, 弃上清, 以便洗去胞外的荧光指示剂。将此细胞重新悬浮在无 Na^+ 或有 Na^+ 的 HBS 溶液中(无 Na^+ 介质只是用 LiCl 代替 NaCl), 立即在荧光仪上检测。

1.4 Fura-2-Eu 的荧光性质及 fura-2 对 Eu^{3+} 的亲合性实验

Eu^{3+} 对 Fura-2 的相对亲和力是在模拟细胞内离子组分并包含 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fura-2 和 4.85 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EGTA 缓冲液中测量。将仪器发射波长固定在 510nm, 记录 300~400nm 的荧光激发光谱, 激发和发射缝宽分别为 3 和 5.3nm。其中缓冲液组成为($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 120KCl, 20NaCl, 1MgCl₂, 10HEPES, 4.85EGTA, pH 7.05。根据文献^[14]给出的 EGTA-Eu 的绝对稳定常数计算其表观稳定常数, 并利用此表观稳定常数计算 Eu^{3+} 的游离离子浓度, 进而求出 Fura-2-Eu 的离解常数(K_d)。

1.5 Eu^{3+} 跨膜内流的检测

Fura-2 对 Eu^{3+} 有很高的亲和性, 文中测得其 K_d 为 $4.95 \times 10^{-14} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Eu^{3+} 键合到 Fura-2 会猝灭 Fura-2 的荧光。因为在 360nm Fura-2 的荧光激发光谱不受胞内 Ca^{2+} 浓度的影响(360nm 为 Fura-2- Ca^{2+} 的等吸收点)^[15], 则 360nm 的荧光强度变化可用来

检测 Eu^{3+} 的跨膜内流并在 Eu^{3+} 加入之前将 360 nm 的荧光强度值规定化。

1.6 统计学处理

文中数据为 Means \pm S. E. ($n = 3 \sim 5$), 统计学分析是采用 t -test, 当 $P < 0.05$ 时, 认为数据有意义。

2 结果和讨论

2.1 Eu-Fura-2 络合物的荧光性质及离解常数(K_d)的测定

在 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fura-2 存在下的模拟细胞内离子组分的缓冲溶液中, 依次加入 Eu^{3+} (Eu^{3+} 溶液组分除含 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EuCl_3 外其余组分同细胞内液), 所得荧光激发光谱如图 1。

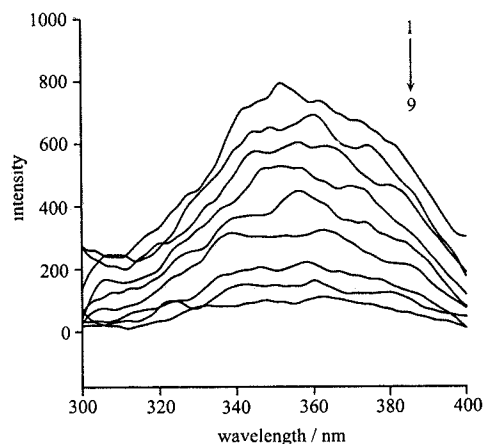


图 1 不同浓度 Eu^{3+} 存在下, Eu-Fura-2 络合物的荧光激发光谱

Fig. 1 Fluorescence excitation spectra of fura-2 in the presence of different concentrations of Eu^{3+}

从上至下, 加入 Eu^{3+} 总浓度分别为 0, 0.0400, 0.300, 1.52, 2.56, 3.37, 4.86, 6.19, 7.39 $\times 10^{-3}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据 EGTA 的四级酸式离解常数和与 Eu^{3+} 的绝对稳定常数 ($\log K = 17.77$)^[14], 求出在 pH 7.05 时 EGTA-Eu 的表观稳定常数为 $10^{13.35}$ 。当加入 Eu^{3+} 的总浓度 C_{Eu} 小于 EGTA 的总浓度 C_{EGTA} 时, EGTA 绝大部分形成 Eu^{3+} -EGTA, 由于 Fura-2 的总浓度远小于 C_{EGTA} , 故 $[\text{Eu}^{3+}\text{-Fura-2}] \ll [\text{Eu}^{3+}\text{-EGTA}]$, 因此可认为平衡时 $[\text{Eu}^{3+}\text{-EGTA}] = C_{\text{Eu}}$, $[\text{EGTA}] = C_{\text{EGTA}} - C_{\text{Eu}}$, 则 $[\text{Eu}^{3+}] = \{C_{\text{Eu}} / (4.85 \times 10^{-3} - C_{\text{Eu}})\} \times 10^{-13.35}$, 当加入 Eu^{3+} 的总浓度 C_{Eu} 大于 EGTA 的总浓度 C_{EGTA} 时, $[\text{Eu}^{3+}] = C_{\text{Eu}} - C_{\text{EGTA}}$, 从而可求出图 1 中 Eu^{3+} 平衡浓度(从上往下)分别为 0, 0.00830, 0.0625, 0.456, 1.12, 2.28 $\times 10^{-13.35} \text{mol} \cdot$

L^{-1} 和 0.0130, 1.34, $2.56 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可见 Fura-2 对 Eu^{3+} 是十分敏感的。

根据 Hill 做图法^[16] 处理图 1(部分曲线图 1 中未画出), 即将 $\log(\text{Fura-2-bound}/\text{Fura-2-free})$ 对 $\log[\text{Eu}^{3+}]$ 做图, 如图 2。其中 $\log(\text{Fura-2-bound}/\text{Fura-2-free}) = \log(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$ 。式中 F_{\max} 是加入 Eu^{3+} 前 360nm 的荧光强度; F_{\min} 为 Fura-2 被 Eu^{3+} 完全作用时 360nm 的荧光强度; 图 2 为一直线, 说明 Eu-Fura-2 配合物的计量比为 1:1。当 $\log(\text{Fura-2-bound}/\text{Fura-2-free}) = 0$ 时对应的横坐标为 $\log K_d$, 由此求得 Eu-Fura-2 的 K_d 为 $4.95 \times 10^{-14} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

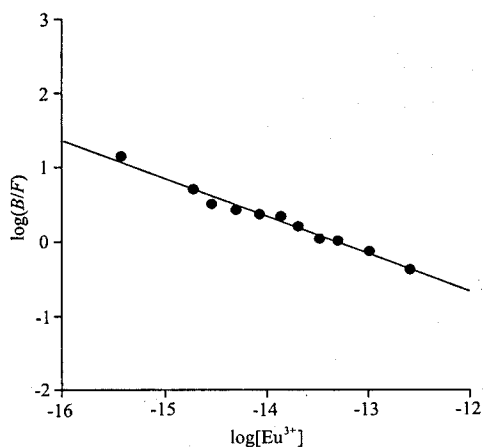


图 2 $\log(\text{Fura-2-bound}/\text{Fura-2-free})$ 对 $\log[\text{Eu}^{3+}]$ 关系图
Fig. 2 Plot of $\log(\text{fura-2-bound}/\text{fura-2-free})$ vs $\log[\text{Eu}^{3+}]$

为了比较, 我们用同样方法求得 Mn-Fura-2 的 K_d 值为 $4.13 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 文献^[17, 18] 报道其 K_d 值分别为 5.53×10^{-9} 和 $2.78 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 证明本文提出的方法可行。 Eu^{3+} 及 Mn^{2+} 与 EGTA 配合物的表观稳定常数和与 Fura-2 配合物的表观解离常数列于表 1。

2.2 淋巴细胞膜上 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换操纵的 Eu^{3+} 的进入

淋巴细胞膜上 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换系统有三种模式^[19, 20]: 正向和反向 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换及 Na^+/Na^+ 和 $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 的自身交换。正向 $\text{Na}_o^+/\text{Ca}_o^{2+}$ 交换是指 Ca^{2+} 从胞内排出而 Na^+ 进入细胞, 即通常所说的

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换。但当胞内外 Na^+ 梯度倒反时, 会进行反向的 $\text{Na}_i^+/\text{Ca}_o^{2+}$ 交换, 即 Na^+ 外排的同时伴随 Ca^{2+} 进入细胞。Ouabain 是 Na^+/K^+ 泵的专一性抑制剂, 当用它预处理细胞时, 胞内的 Na^+ 会超载, 从而使 Na^+ 梯度倒反, 此时细胞进行反向的 $\text{Na}_i^+/\text{Ca}_o^{2+}$ 交换。

为了测试 Eu^{3+} 是否可被反向的 $\text{Na}_i^+/\text{Ca}_o^{2+}$ 交换系统运输进入细胞, 我们利用 360nm 的激发荧光强度变化来研究 Eu^{3+} 的跨膜行为。用 $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ouabain 预处理细胞提高胞内 Na^+ 浓度, 然后在无 Na^+ 介质中测试, 结果如图 3。从图 3 可看出当加入 $0.4 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Eu^{3+} 时 360 及 380nm 荧光强度逐渐减小, 在 Eu^{3+} 加入之前将 360nm 的荧光强度规定化, 如图 4 所示。图中加入 Eu^{3+} 后, 360nm 荧光强度逐渐下降到起始值的 $(70 \pm 4)\%$, 表明 Eu^{3+} 经过 $\text{Na}^+/\text{Eu}^{3+}$ 交换进入细胞, 从而猝灭了 Fura-2 的荧光。

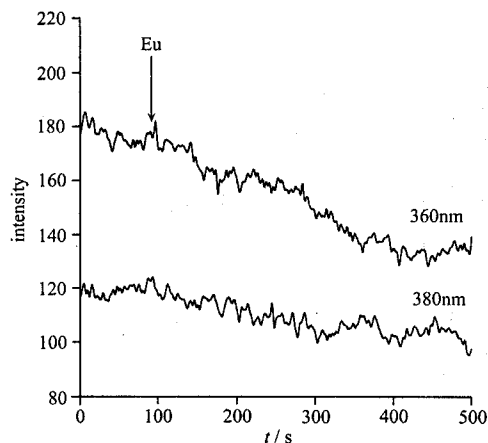


图 3 $0.4 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Eu^{3+} 对负载 Fura-2 的细胞的荧光强度影响

Fig. 3 Effect of $0.4 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Eu}^{3+}$ on fluorescence intensity of fura-2-loaded cells

Cells were pretreated with $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ouabain and measured in Na^+ -free medium

为了进一步证实此结论, 将淋巴细胞用或不用 $0.1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ouabain 预处理, 然后分别在无 Na^+ 和有 Na^+ 生理液中测试, 结果如图 5。从图 5A 中可看

表 1 Eu^{3+} 及 Mn^{2+} 与 EGTA 的表观稳定常数和 Fura-2 的表观解离常数

Table 1 Apparent Stability Constants for EGTA and Apparent Dissociation Constants for Fura-2 for Eu^{3+} and Mn^{2+} ($n=3$)

Me^{n+}	$K_s(\text{Me}^{n+}/\text{EGTA})$	$K_d(\text{Me}^{n+}/\text{Fura-2})$
Mn^{2+}	$7.24 \times 10^7 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$	$(4.13 \pm 0.65) \times 10^{-9} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
Eu^{3+}	$2.24 \times 10^{13} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$	$(4.95 \pm 0.70) \times 10^{-14} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$

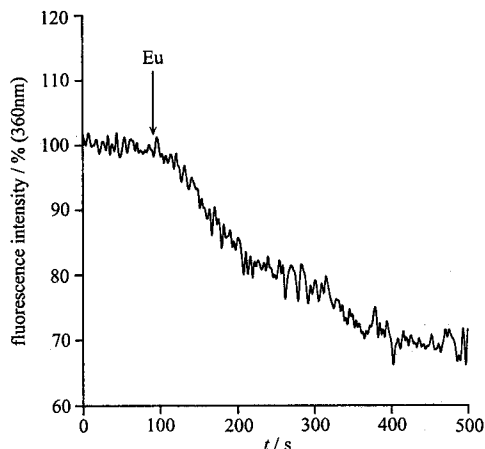


图 4 0.4mmol · L⁻¹ 的 Eu³⁺ 对 360nm 荧光强度的猝灭百分比的影响

Fig. 4 Effect of 0.4mmol · L⁻¹ Eu³⁺ on the quenching% of fluorescence intensity at 360nm
Cells were pretreated with 0.1mmol · L⁻¹ ouabain and measured in Na⁺-free medium

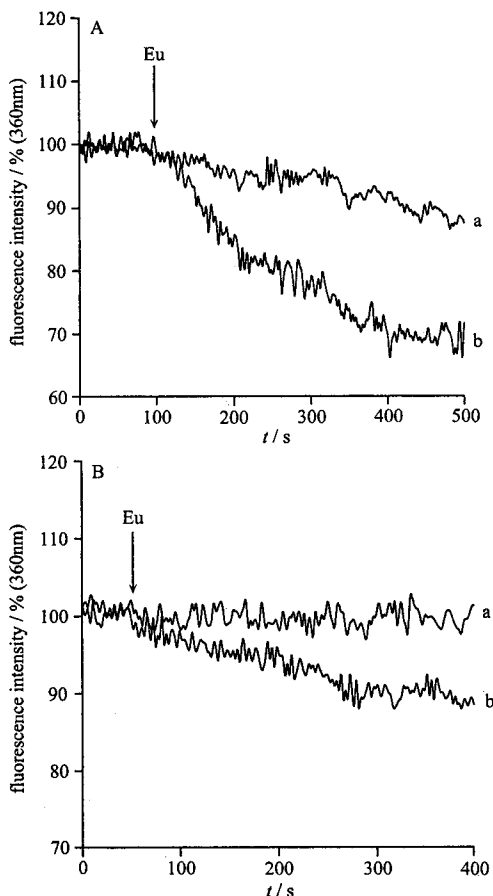


图 5 Ouabain 预处理和 Na⁺ 梯度的倒反对 0.4mmol · L⁻¹ 的 Eu³⁺ 内流的影响

Fig. 5 Effect of ouabain-pretreated and reversing the Na⁺ gradient on the influx of 0.4mmol · L⁻¹ Eu³⁺
Cells were incubated with (A) or without (B) 0.1mmol · L⁻¹ ouabain and measured in Na⁺ medium (a) or Na⁺-free medium (b)

出, 用 0.1mmol · L⁻¹ ouabain 预处理细胞 30 分钟后, 无 Na⁺ 生理液中, 360nm 的荧光下降很大, 而 Na⁺ 介质中却下降不明显。不用 0.1mmol · L⁻¹ ouabain 预处理细胞 (图 5B), 无 Na⁺ 介质中 360nm 的荧光下降略大于有 Na⁺ 介质, 但不及 ouabain 处理后的细胞荧光强度变化大, 说明 Eu³⁺ 的进入完全依赖 ouabain 的预处理和 Na⁺ 梯度的倒反。当用 ouabain 预处理细胞并在无 Na⁺ 介质中测试, Eu³⁺ 很快进入细胞, 这与预见的 Na⁺ / Eu³⁺ 交换中 Eu³⁺ 的内流依赖于细胞内 Na⁺ 浓度的结果一致。

用 0.1mmol · L⁻¹ ouabain 预处理细胞, 然后在无 Na⁺ 介质中测试。当加入不同胞外 Eu³⁺ 浓度时, 360nm 荧光强度的变化如图 6。随着 Eu³⁺ 浓度的增大, 360nm 荧光强度减小的速率提高, 说明进入胞内的 Eu³⁺ 与胞外 Eu³⁺ 的浓度成正比, 进一步证明了 Eu³⁺ 能利用 Na⁺ / Eu³⁺ 交换进入淋巴细胞。

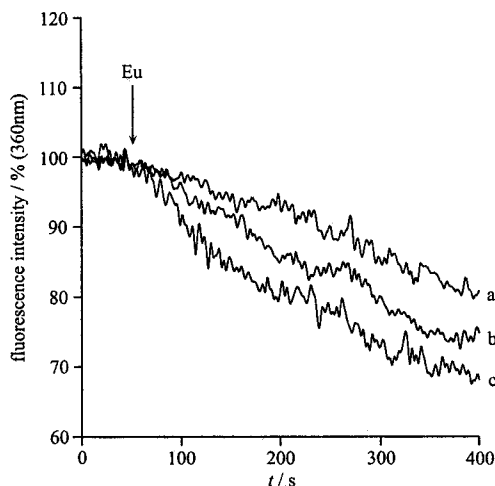


图 6 不同浓度 Eu³⁺ 对 360nm 荧光强度的影响

Fig. 6 Effect of the different concentrations of Eu³⁺ on the fluorescence intensity at 360nm
Eu³⁺ were added at 50sec (a: 0.1, b: 0.2, c: 0.4mmol · L⁻¹), and the cells were pretreated with 0.1mmol · L⁻¹ ouabain

2.3 Nicardipine 对 Eu³⁺ 内流的影响

Nicardipine 是电压依赖性 L-型 Ca²⁺ 通道阻断剂, 为了测定 Nicardipine 对 Eu³⁺ 内流的影响, 在 Eu³⁺ 加入之前先用 2.5μmol · L⁻¹ 的 Nicardipine 预处理细胞 2 分钟, 然后在无 Na⁺ 介质中测试, 360nm 荧光强度的变化与未用 Nicardipine 处理类似。图 7 说明 Nicardipine 敏感的电压依赖性 L-型 Ca²⁺ 通道对 Eu³⁺ 进入淋巴细胞无贡献。再一次表明了 Na⁺ / Eu³⁺ 交换是 Eu³⁺ 进入细胞的主要途径。

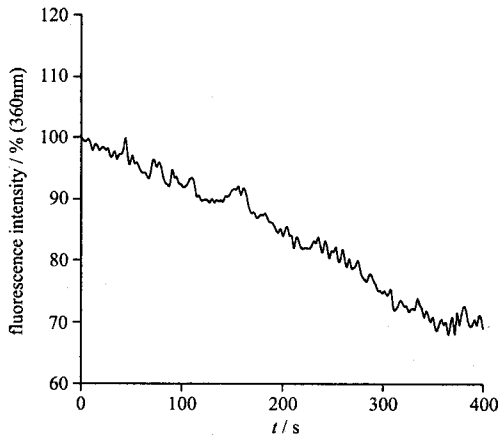
图7 Nicardipine 对 Eu^{3+} 内流的影响

Fig. 7 Effect of nicardipine on the influx of Eu^{3+} . Cells were pretreated with nicardipine for 2min and $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Eu^{3+} was added at 0sec

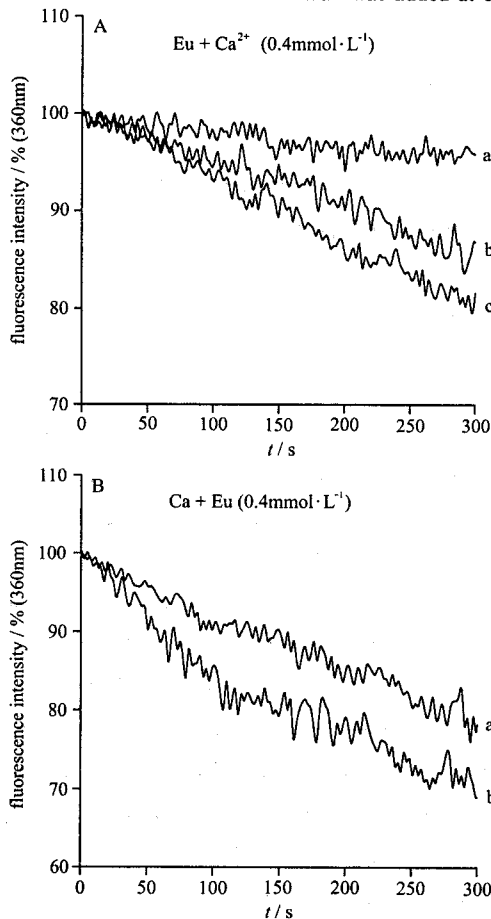
图8 不同浓度的 Ca^{2+} 和 Eu^{3+} 组合对 360nm 荧光强度的影响

Fig. 8 Influence of composite of different concentrations of Ca^{2+} and Eu^{3+} on fluorescence intensity at 360nm
A: Different concentrations of Eu^{3+} were added at 0sec (a: 0, b: 0.2, c: $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+}
B: Different concentrations of Ca^{2+} were added at 0sec (a: 0.4, b: $0\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Eu^{3+}

2.4 Eu^{3+} 进入淋巴细胞的机制

为了阐明交换操纵的 Eu^{3+} 和 Ca^{2+} 进入的关系, 我们进一步研究了在不同浓度的 Eu^{3+} 和 Ca^{2+} 存在下, Fura-2 的荧光变化特性。

在 Fura-2 负载的同时用 $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ouabain 预处理细胞 30 分钟, 然后在无 Na^+ 介质中测试。图 8A 中固定 Ca^{2+} 的浓度为 $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 随着加入的 Eu^{3+} 浓度的增大, 360nm 的荧光强度逐渐减小, 表明内流 Eu^{3+} 增加。固定 Eu^{3+} 的浓度为 $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 8B), 随着加入的 Ca^{2+} 浓度的增大, 360nm 荧光强度也增大, 表明 Eu^{3+} 内流减少。结果说明交换操纵的 Ca^{2+} 和 Eu^{3+} 的进入是一种竞争机制, 可能是由于 Ca^{2+} 和 Eu^{3+} 共同竞争 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换位点。

总之, 我们的实验表明, 当 Na^+ 梯度倒反时, Eu^{3+} 能利用 $\text{Na}^+/\text{Eu}^{3+}$ 交换进入淋巴细胞。同时细胞对 Eu^{3+} 的吸收很快达到饱和, 这一方面是由于随着时间的延长胞内的 Na^+ 逐渐减少, 另一方面 Ca^{2+} 泵及正向的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换都会外排胞内多余的 Eu^{3+} 。根据胞内 Ca^{2+} 浓度计算公式^[15], 可估算胞内游离 Eu^{3+} 浓度。当用 ouabain 预处理细胞然后在无 Na^+ 介质中测试时, 在胞外加入 $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Eu^{3+} 时进入胞内的游离 Eu^{3+} 浓度约为 $2.76 \times 10^{-14} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于 Ca^{2+} 和 Eu^{3+} 共同竞争 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换位点, 当胞外存在 Ca^{2+} 时, 会干扰 Eu^{3+} 的进入。

参 考 文 献

- [1] Evans C. H. *Biochemistry of the Lanthanides*, Plenum: New York and London, 1990, p212.
- [2] MENG Lu (孟 路), DU Xiu-Lian (杜秀莲), DING Lan (丁兰), CHEN Hang-Ting (陈杭亭), ZHAO Da-Qing (赵大庆), NI Jia-Zuan (倪嘉缙) *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, 1999, 44, 1047.
- [3] WANG Kui (王 夔), HAN Wan-Shu (韩万书) *Progress in Bioinorganic Chemistry during Ten Years in China (中国生物无机化学十年进展)*, Beijing: Advanced Education Publishers, 1997, p149.
- [4] YANG Pin (杨 频), WEI Tian-Xin (韦天新), WEI Chun-Ying (魏春英), WANG Jin-Xi (王金晞), FAN Da-Pin (樊大平) *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, 1997, 55, 901.
- [5] YANG Pin (杨 频), WEI Chun-Ying (魏春英) *Huaxue Tongbao (Chemistry)*, 1996, 7, 14.
- [6] WANG Hai-Yan (王海燕), WEI Chun-Ying (魏春英),

- YANG Pin(杨 频) *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, **2000**, **58**, 845.
- [7] CHEN Rong, YANG Pin, WEI Chun-Ying *Chinese Chemical Letters*, **2000**, **11**, 725.
- [8] Peeters G. A., Kohmoto O., Barry W. H. *Am. J. Physiol.*, **1989**, **256**, C351.
- [9] Powis D. A., Clark C. L., O'Brien K. J. *Cell Calcium*, **1994**, **16**, 377.
- [10] Pillai S., Pillai D., Bikle D. *J. Cell. Physiol.*, **1992**, **151**, 623.
- [11] Shibuya I., Douglas W. W. *Endocrinology*, **1992**, **131**, 1936.
- [12] Kwan C. Y., Putney J. W. Jr. *J. Biol. Chem.*, **1990**, **165**, 678.
- [13] Sagal J. *Biochem. Biophys. Acta*, **1986**, **886**, 267.
- [14] Martell A. E., Smith R. M. *Critical Stability Constants*, Plenum: New York and London, **1974**, p269.
- [15] Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. *J. Biol. Chem.*, **1985**, **260**, 3440.
- [16] Tomsig J. L., Suszkiw J. B. *Am. J. Physiol.*, **1990**, **259**, C762.
- [17] Kwan C. Y., Putney J. W. JR. *J. Biol. Chem.*, **1990**, **265**, 678.
- [18] Yamamoto N., Watanabe H., Kakizawa H., Hirano M., Kobayashi A., Ohno R. *Biochem. Biophys. Acta*. **1995**, **1266**, 157.
- [19] Friedman P. A. *Annual Review of Physiology*, **1998**, **60**, 179.
- [20] Balasubramanyam M., R-Kochon C., Reeves J. P., Gardner J. P. *J. Clin. Invest.*, **1994**, **94**, 2002.
- [21] Balasubramanyam M., Kimura M. *Am. J. Physiol.*, **1993**, **265**, C321.
- [22] Klishin A., Sedova M., Blatter L. A. *Am. J. Physiol.*, **1998**, **274**, C1117.

Studies on Eu^{3+} Influx Mediated by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger in Human Lymphocytes by the Fluorescent Method

WEI Chun-Ying YANG Pin*

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

We examined whether Eu^{3+} can entry human peripheral blood lymphocytes by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange using fura-2 technique by measuring the quenching of fluorescence at 360nm excitation. The results showed that the pretreatment of lymphocytes for 30min at 37°C with $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ouabain and followed by exposure to different concentrations of Eu^{3+} in Na^+ -free medium resulted in a decrease in the 360nm fluorescence intensity, and intracellular Eu^{3+} concentrations were directly proportional to the extracellular Eu^{3+} concentrations and were founded to be $2.76 \times 10^{-14}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in cells exposed to $0.4\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Eu^{3+} . Eu^{3+} influx was entirely dependent on ouabain pretreatment and reversal of the Na^+ gradients as expected for $\text{Na}^+/\text{Eu}^{3+}$ exchange activity. No further effect on the 360nm signal was seen with nifedipine pretreated, we conclude that the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger provides the major route of Eu^{3+} entry in human lymphocytes. Furthermore, when composite of different concentrations of Eu^{3+} and Ca^{2+} in the extracellular Na^+ -free medium was varied, the Eu^{3+} influx significantly decreased as the extracellular Ca^{2+} concentration increased, it is suggested that the Ca^{2+} influx and Eu^{3+} influx by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange-mediated might be mutually competition. A characterization of Eu-fura-2 interactions in solution simulating intracellular ionic composition showed that Eu^{3+} forms a 1:1 Eu-fura-2 complex. In vitro studies confirmed that fura-2 fluorescence was sensitive to Eu^{3+} and the apparent dissociation constant of Eu^{3+} for fura-2 (K_d) was $4.95 \times 10^{-14}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.05).

Keywords: lymphocytes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange rare earth ions fura-2