

Fura-2 探针对希土 Y^{3+} 跨 PC12 细胞膜行为研究

李海山 王金晔* 朱卫华^a 陈瑶 朱克涤

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

(^a 镇江医学院, 镇江 212001)

Q584.04

使用 AR-MIC-CM 阳离子测定系统, 发展 Fura-2 荧光测定技术, 将其应用于测定细胞内游离希土离子 Y^{3+} , 并以此研究了 Y^{3+} 跨 PC12 细胞(大鼠嗜铬细胞瘤细胞)膜的行为。结果表明: 在模拟细胞内各离子组分, pH=7.05 的溶液中, 测得表观解离常数为 $4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对于 PC12 细胞, 静息条件下 Y^{3+} 不能跨越细胞膜进入胞内。与钙离子通道相关的 KCl 和去甲肾上腺素均不能刺激希土 Y^{3+} 过膜。用 Ouabain(哇巴因)使胞内 Na^+ 超载后, Y^{3+} 可过膜进入细胞内, 且过膜量与胞外 Y^{3+} 浓度和胞内 Na^+ 超载程度有一定的浓度依赖关系, 提示 Y^{3+} 可以经由 $\text{Na}^+/\text{Y}^{3+}$ 交换机制过膜而进入细胞内。

关键词: Fura-2 钇离子 $\text{Na}^+/\text{Y}^{3+}$ 交换机制
分类号: O614.32

细胞膜

稀土

生物效应

我国稀土的广泛应用已使其越来越多地进入环境和食物链。因此稀土的生物效应尤其是其毒理作用, 是迫切需要解决的基础研究课题之一^[1]。从细胞水平研究稀土的跨膜行为是较为直接的方法。稀土离子与钙离子的理化性质较相似, 但稀土离子有更大的离子势, 故对一般生物配体其结合常数更大。生物实验中常用 La^{3+} 作为钙通道阻断剂, 用 Tb^{3+} 作为离子探针研究细胞膜上的结合 Ca^{2+} 。大量的实验未观察到稀土离子进入健康活细胞^[2], 而 Wendt-Gallitalli 等用更灵敏的 X 射线微探针技术却检测到了胞内的 La^{3+} ^[3]; Peeters 等应用 Indo-1 荧光技术也观察到心肌细胞 La^{3+} 内流现象^[4]。总之稀土离子跨膜行为的研究结果随方法的不同而有明显差别。我们推广了荧光探针 Fura-2 测定胞内游离 Ca^{2+} 浓度的方法^[5], 用于测定细胞内游离 Y^{3+} 浓度, 其灵敏度高, 检测方便, 测量过程对细胞无损伤, 并且可观察胞内 Y^{3+} 浓度的动态变化。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

AR-CM-MIC 型单细胞阳离子测定系统, 美国 SPEX 公司; Diapho-TMP 型倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; RF-540 荧光分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; pH-S-3C 型酸度计, 上海雷磁仪器厂。

Fura-2 钾盐、Fura-2-AM 和 HEPES 皆为美国 Sigma 公司产品, 小牛血清为国产生化试剂。

收稿日期: 1997-12-01。 收修改稿日期: 1998-03-20。
国家自然科学基金资助项目(No. 29271022)。

* 通讯联系人。

第一作者: 李海山, 男, 27 岁; 研究方向: 生物无机化学。

其余各试剂为国产分析纯,所有溶液用双蒸水配制。

PC12 细胞株由上海药物研究所提供。

1.2 Y^{3+} -Fura-2 配合物体系荧光光谱图测定方法

模拟细胞内溶液 A,各组分浓度如下(单位: $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$):KCl 120.0, NaCl 20.0, MgCl_2 1.0, HEPES 10.0, EGTA 1.00, Fura-2 0.25×10^{-3} ,并用 KOH 调节 pH 值至 7.05。希土 Y^{3+} 溶液 B 中除含 Y^{3+} $8.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外,其他各组分同溶液 A。取溶液 A 10.00 mL,依次向其中加入 0, 1.00, 0.15, 0.10, 0.05, 0.07, 0.02, 0.02, 0.20 mL 的溶液 B,每次加入溶液 B 后用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 溶液调节 pH 至 7.05,在发射波长 505 nm、激发波长 300~400 nm 测定荧光激发光谱。

1.3 PC12 细胞培养^[6]

经复苏后的 PC12 细胞接种于 25 mL 培养瓶中,置于 CO_2 培养箱中培养(37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$)。隔日更换培养液,培养液的成分如下:CMEM 90%,小牛血清 10%,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 为 7.2~7.4。待细胞铺满瓶底,用 0.25% 胰蛋白酶消化,消化完全后加入 DMEM+10% 小牛血清终止消化,用吸管吹打均匀,接种入六孔培养板(内含预先用 0.1% 多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine)处理的载玻片)中。培养 24 h 后用于细胞内离子浓度测定。

1.4 细胞内游离 Y^{3+} 浓度($[Y^{3+}]_i$)测定过程

荧光染料 Fura-2/AM 溶液(溶于二甲亚砜,浓度 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 μL 和灭活小牛血清 0.1 mL 混合均匀,经超声波振荡 5 min,加至 0.9 mL 无钙 HEPES 液中,Fura-2-AM 终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。无钙 HEPES 液各组分(单位: $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$):NaCl 140.0, KCl 4.7, MgCl_2 1.2,葡萄糖 10.0, EGTA 0.1,灭活小牛血清 0.2%, NaOH 调节 pH 至 7.4。贴壁培养的细胞载玻片浸泡在负载溶液中(可以根据需要在负载液加入 Ouabain 溶液), 37°C 培育 20 min,让荧光染料充分进入细胞,随后取出载玻片在无钙 HEPES 溶液中浸泡 10 min 左右,让 Fura-2-AM 水解,再用无钙 HEPES 溶液洗二次,在阳离子测定系统上测定单个细胞的荧光强度。激发波长为 340 nm 和 380 nm,发射波长为 505 nm。在一定时刻内用微量进样器小心加入一定体系、浓度的 Y^{3+} 溶液,观察它对所测细胞内的荧光影响。

2 结果与讨论

2.1 Fura-2 荧光光谱和 Y^{3+} -Fura-2 配合物的解离常数

Fura-2 在不同浓度的 Y^{3+} 溶液中,其荧光激发光谱如图 1 所示。图 1 中各试液中游离 Y^{3+} 浓度 $[Y^{3+}]$ 是通过加入 $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA 作为缓冲,由所加入的金属离子总浓度计算出来。根据 EGTA 的四级酸式解离常数和它们与 Y^{3+} 的结合常数^[7],在生理条件 pH=7.05 条件下,EGTA 和 Y^{3+} 的表观结合常数为 $10^{12.6}$ 。当加入 Y^{3+} 的总浓度 $[Y^{3+}]_t$ 小于 EGTA 的总浓度 $[EGTA]_t$ 时, Y^{3+} 绝大部分形成 Y^{3+} -EGTA,由于 Fura-2 的总浓度 $\ll [EGTA]_t$,故 $[Y^{3+}\text{-Fura-2}] \ll [Y^{3+}\text{-EGTA}]$,因此可认为平衡时, $[Y^{3+}\text{-EGTA}] = [Y^{3+}]_t$, $[EGTA] = [EGTA]_t - [Y^{3+}]_t$,本实验 $[EGTA]_t$ 为 $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,则: $[Y^{3+}] = 10^{12.6} [Y^{3+}]_t / (1.00 \times 10^{-3} - [Y^{3+}]_t)$ 。当 $[Y^{3+}]_t > [EGTA]_t$,且 $[Y^{3+}]_t - [EGTA]_t \gg \text{Fura-2 总浓度}$ 时,则 $[Y^{3+}] = [Y^{3+}]_t - [EGTA]_t$ 。只要知道加入的 Y^{3+} 浓度,即可知平衡时游离 Y^{3+} 的浓度 $[Y^{3+}]$ 。图 1 中在 340 nm 处从下向上各试液 $[Y^{3+}]$ 分别为 0, 0.70, 1.24, 2.09, 3.03, 7.05, 10.7, $23.7 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.09 \times 10^{-4} \text{ mol}$

• L^{-1} 。

图 1 用希尔(Hill)作图法来处理。即将 $\log(\text{Fura-2 bound}/\text{Fura-2 free})$ 对 $\log[Y^{3+}]$ 作图, 得一直线(图 2)。该直线的斜率表示 Fura-2 与金属离子配位时的计量关系, 而在 X 轴上的截距则为两者的解离常数, 其倒数为结合常数。其中:

$$\log(\text{Fura-2-bound}/\text{Fura-2 free}) = \log\left[\frac{(R-R_{\min})}{(R_{\max}-R)} \cdot \frac{S_{f_2}}{S_{b_2}}\right]$$

其值可由图 1 得到。 R 为加入定量 Y^{3+} 后 340 nm/380 nm 荧光比值; $R_{\min}$ 为完全不含 Y^{3+} 时 340 nm/380 nm 荧光比值, 即最小值; $R_{\max}$ 为 Fura-2 被 Y^{3+} 所饱和时的 340 nm/380 nm 荧光比值, 即最大值; S_{f_2}/S_{b_2} 为自由态 Fura-2 与 Y^{3+} -Fura-2 在 380 nm 处荧光强度之比。

由图 2 直线知该配合物解离常数为 $K_d(Y^{3+}) = 4.5 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 。

2.2 胞内 Y^{3+} 浓度计算

Fura-2 可以和许多二、三价金属离子螯合。通常情况下, 由于在细胞内除了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 外, 基本不含其他多价金属离子; 而 Fura-2 结合 Mg^{2+} 的能力远小于 Ca^{2+} , 所以通常在细胞内 Fura-2 仅和 Ca^{2+} 结合。但如细胞内存在 Y^{3+} 等希土离子时, Fura-2 也会和这些离子结合。由图 1, 当 Fura-2 和 Y^{3+} 结合后其荧光激发光谱最大吸收峰的位置向短波方向移动, 且峰强度也明显增大。即当溶液中 Y^{3+} 浓度增大时, Fura-2 在 340 和 380 nm 处的荧光比值 R 就升高, 同时 $R_{\max Y} > R_{\max Ca}$, 所以可以根据 Fura-2 荧光比值 R 的变化来测定溶液中的 Y^{3+} 溶液, 且灵敏度高于 Ca^{2+} 。

当以 Fura-2 来检测细胞内微量 Y^{3+} 等希土金属离子时, 必须考虑到细胞中还存在着 Ca^{2+} 。由于在实验过程中细胞培养液中无 Ca^{2+} , 可以认为在实验中细胞内 Ca^{2+} 浓度基本不变。在用 Fura-2 测定时, 如无 Y^{3+} 进入细胞则 R 不会发生明显变化; 如 Y^{3+} 进入细胞, 则 Ca^{2+} 和 Y^{3+} 同时和 Fura-2 作用, 使 R 值升高。用类似于 Jose L. Tomsig 等的方法^[8], 可推导出细胞内 Y^{3+} 的浓度与荧光比值的定量关系:

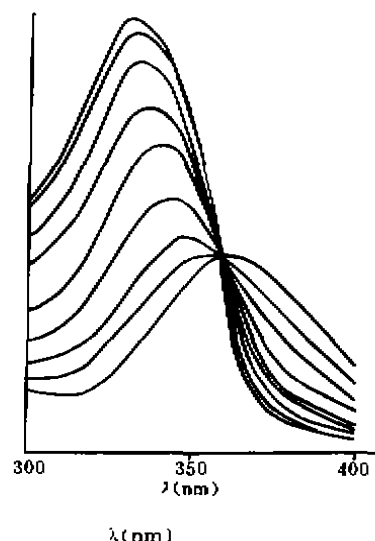


图 1 在不同 Y^{3+} 浓度时, Fura-2 的荧光激发光谱
Fig. 1 Excitation spectra of Fura-2 in the presence of different concentration of Y^{3+}

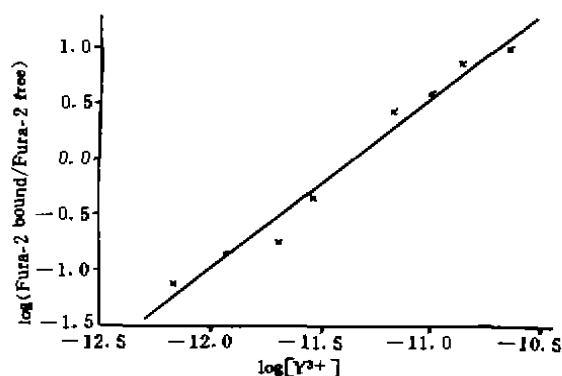


图 2 $\log(\text{Fura-2 bound}/\text{Fura-2 free})$ 对 $\log[Y^{3+}]$ 作图
Fig. 2 Plot of $\log(\text{Fura-2 bound}/\text{Fura-2 free})$ vs $\log[Y^{3+}]$

$$[Y^{3+}]_i = K_2(Y^{3+}) \cdot \frac{(R_3 - R_2)(R_{\text{maxCa}} - R_{\text{min}})}{(R_{\text{maxF}} - R_0)(R_{\text{maxCa}} - R_2)} \cdot \frac{S_{F_2}}{S_{b_2Y}} \quad (1)$$

式(1)中 R_2 、 R_0 分别为加入 Y^{3+} 前后 340 nm 和 380 nm 处的荧光比值, R_{maxCa} 、 R_{maxF} 分别为 Fura-2 被 Ca^{2+} 和 Y^{3+} 饱和时的荧光比值, 而 R_{min} 为自由态 Fura-2 荧光比值。可见: 加入 Y^{3+} 前后荧光比值的变化 ($R_3 - R_0$) 的大小即表示了细胞内游离 Y^{3+} 浓度的高低。

2.3 检测 Y^{3+} 跨 PC12 细胞膜的实验

2.3.1 静息状态下 Y^{3+} 过 PC12 细胞膜的研究

静息状态下, 35—37 °C 时在负载 Fura-2 后正常 PC12 细胞外液中分别加入 Y^{3+} 0.02、0.1、0.5、0.64、10、50 mmol · L⁻¹ 后, 在 340 nm 和 380 nm 的荧光强度均不发生变化, 这说明在此条件下 Y^{3+} 不能通过细胞膜内流。

2.3.2 钾离子去极化时对 Y^{3+} 过膜行为的影响

本实验观察了 10、25、55、75 mmol · L⁻¹ KCl 对 Y^{3+} (浓度分别为: 0.02、0.5、1、4、10 mmol · L⁻¹) 过膜行为的影响, 结果表明无论向细胞外液中先加入 Y^{3+} 再加入 KCl 还是先加入 KCl 再加入 Y^{3+} , K^+ 均不能刺激 Y^{3+} 通过 PC12 细胞膜。

2.3.3 去甲肾上腺素对 Y^{3+} 过膜行为的影响

去甲肾上腺素可以作用于细胞膜上受体依赖性钙通道, 而使得细胞外钙内流, 引起内钙升高^[1], 本实验结果表明它不能促使 Y^{3+} 内流。

2.3.4 离子载体 ionomycin 对 Y^{3+} 过膜行为的影响和 R_{max} 的测定

ionomycin 是一种 Ca^{2+} 载体^[10]。本实验证明它也能运载 Y^{3+} 。因此可能通过加入它将胞外 Y^{3+} 载入胞内, 使 Fura-2 全部和 Y^{3+} 结合以测得 R_{max} 。八个样本的平均结果为 $R_{\text{maxCa}} = 8.1 \pm 1.9$, $R_{\text{maxF}} = 10.2 \pm 2.4$, $R_{\text{min}} = 0.55 \pm 0.08$ 。

2.3.5 Y^{3+} 经过 Na^+/Y^{3+} 交换机制过膜而进入细胞内

当细胞在 Fura-2 负载时, 加入微摩尔量级的 Ouabain (哇巴因) 同时进行钠负载, 在观察单细胞荧光强度时, 加入 Y^{3+} (毫摩尔量级) 后胞内荧光比值有明显变化 (部分结构见图 3)。由于实验中外无 Ca^{2+} , 因此该变化可以解释为 Y^{3+} 通过细胞膜进入胞浆而与 Fura-2 结合所致。100 μmol · L⁻¹ Ouabain 进行钠负载的结果示于图 3 中, 从下向上四条曲线的胞外 Y^{3+} 浓度依次为 0.16、0.33、0.75、1.6 mmol · L⁻¹ (每条曲线均为六次实验的平均结果, 三次培养的细胞。

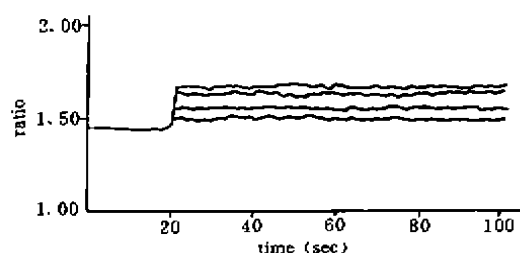


图3 Y^{3+} 对 Fura-2 和 Na^+ 负载细胞荧光的影响
Fig. 3 Effect of Y^{3+} on fluorescence of Fura-2 and Na^+ loaded cells

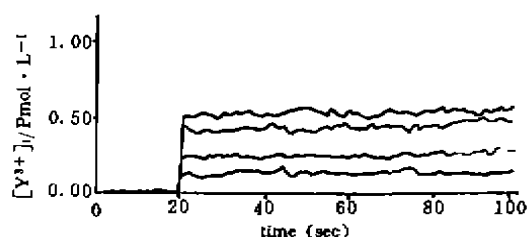


图4 胞外 Y^{3+} 浓度对 Na^+ 负载细胞内 Y^{3+} 浓度的影响
Fig. 4 Effect of Y^{3+} concentration of extracellular to Y^{3+} concentration of intracellular of Na^+ loaded cell

每批细胞各测定二次, 20 s 处加入 Y^{3+} 溶液, 而在胞外加入更多 Y^{4+} 后荧光比值不再明显升高。根据 2.2 节计算公式 (1) 得出胞内 $[Y^{3+}]_i$ 结果示于图 4, 图中曲线同图 3。

实验结果表明, 当胞外 Y^{3+} 浓度 $[Y^{3+}]_o$ 较小时, 引起 $[Y^{3+}]_i$ 随 $[Y^{3+}]_o$ 增加而升高。当加入 $[Y^{3+}]_o$ 浓度较大 (大于 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, $[Y^{3+}]_i$ 不再继续升高, 此时胞内 Y^{3+} 浓度可达 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

用于钠负载的 Ouabain 浓度变化时, 显然将影响 Na^+ 负载量, 进而影响 Y^{3+} 进入细胞内的数量, 此时即使加入等量 Y^{3+} , 引起 $[Y^{3+}]_i$ 也不会相同。因此, Y^{3+} 的过膜程度与 Ouabain 进行 Na^+ 负载的浓度存在着一定的剂量依赖关系。图 5 中从下向上用于 Na^+ 负载的 Ouabain 浓度依次分别为 25、50、75、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图中每点均为六次实验的平均值 $\pm \text{SD}$, 三次培养的细胞, 每批细胞各测定二次)。该结果提示 Y^{3+} 可以经由 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换机制过膜。这可称之为 $\text{Na}^+/\text{Y}^{3+}$ 交换机制, 结论与 Peter^[4] 及 D. A. Powis^[11] 等人的结果相一致。

希土离子 Y^{3+} 与 Ca^{2+} 半径相近, 但 Y^{3+} 的电荷高于 Ca^{2+} , 因而离子势大。对以离子键为主的化合物, 则它们的结合稳定性要高于 Ca^{2+} 。本实验结果表明: Y^{3+} 和 Ca^{2+} 跨膜运动的行为不完全相同。 Y^{3+} 和 Ca^{2+} 不同, 细胞静息状态下, 用 KCl 去极化或加入去甲肾上腺素刺激条件下, Y^{3+} 均不能通过细胞膜进入细胞内, 表明在所实验条件范围内, Y^{3+} 不能经由电压依赖性钙通道或受体依赖性钙通道进入胞内。 Y^{3+} 和 Ca^{2+} 相同, 均可通过 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换机制进入细胞内。

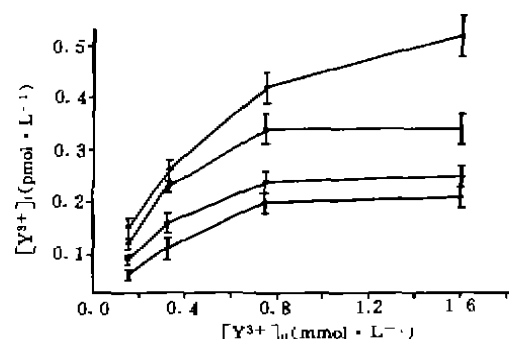


图 5 $[Y^{3+}]_i$ 对 $[Y^{3+}]_o$ 及 Ouabain 负载浓度的依赖关系

Fig. 5 Plot $[Y^{3+}]_i$ vs $[Y^{3+}]_o$ and Ouabain concentration

参 考 文 献

- [1] NI Jia-Zuan (倪嘉缙) et al *Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements* (稀土生物无机化学). Beijing: Science Press, 1995.
- [2] Mead R. H., Clusin W. T. *Biophys. J.* 1985, 48, 695.
- [3] Wendt-Gallitelli M. F., Isenberg G. *Pfluegers Arch.* 1985, 405, 310.
- [4] Peeters G. A. et al *Am. J. Physiol.* 1989, 258, C351.
- [5] Grynkiewicz G. et al *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3440.
- [6] Jackson G. R. et al *Journal of Neuroscience Research*. 1990, 25, 360.
- [7] Martell A. E., Smith R. M. *Thermal Stability Constants*. Plenum, New York, 1974.
- [8] Tomsig J. L., Suszkiw J. B. *Am. J. Physiol.*, 1990, 259, C762.
- [9] Bond M., Kitazawa T., Somlyo A. P., Somlyo A. V. *J. Physiol.*, 1984, 355, 677.
- [10] Roeplitz B. K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101 (12), 3314.
- [11] Powis D. A. et al *Cell Calcium*, 1994, 16, 377.

RESEARCH ON TRANSMEMBRANE BEHAVIORS OF Y³⁺ BY Fura-2 FLUORESCENT PROBE

LI Hai-Shan WANG Jin-Xi ZHU Wei-Hua* CHEN Yao ZHU Ke-Di

(*Institute of Coordination Chemistry, State Key Laboratory
of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093*)
(**Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001*)

By the use of the applied research cation measurement system, Fura-2 fluorescence measurement method was forwarded to detect the intracellular Y³⁺ concentration, and used for investigating the transmembrane behaviors of Y³⁺ to PC12 cells. An apparent dissociation constant of Y³⁺-Fura-2 was 4.5 μmol · L⁻¹ in solutions simulating intracellular ionic composition, with pH 7.05. Y³⁺ ions could not enter PC12 cell under the normal condition, and also could not enter the cell via the calcium channel stimulated by KCl and norepinephrine. However Y³⁺ ions entered PC12 cell after Na⁺ ions within the cell were overloaded using Ouabain. Amount of Y³⁺ entering PC12 cell were related to both outer cellular Y³⁺ concentration and intracellular overloaded Na⁺ concentration. It is suggested that Y³⁺ enter the cell in Na⁺-Y³⁺ exchanging mechanism.

Keywords: Fura-2 Yttrium(III) ion Na⁺-Y³⁺ exchanging mechanism