

专论与综述

活细胞 ^{23}Na -NMR 研究进展; 水溶性位移试剂的应用

赵 明

卢 耘

(中国科学院武汉物理研究所) (湖北医学院医用物理教研室, 武汉)

提 要

钠离子 (Na^+) 是生物体内最重要的无机阳离子之一。引入适当的水溶性位移试剂 (SR), 应用 ^{23}Na 核磁共振波谱 (^{23}Na -NMR) 技术, 是研究活细胞中 Na^+ 代谢的一条新途径。本文综述了活细胞中 ^{23}Na -SR-NMR 研究的实验方法及其研究进展。

一、引 言

在维持人体细胞正常的生理活动中, 钠离子 (Na^+) 起着非常重要的作用。有人提出, 原发性高血压^[1]、精神失常^[2]、甲状腺机能亢进^[3]和癌症^[4]等疑难病症, 都与细胞中的 Na^+ 代谢状况密切相关。因此, 对细胞中 Na^+ 代谢的研究, 已成为一个越来越引起人们关注的研究领域。

NMR 技术, 是一种无损性研究生物样品的重要物理手段。它最大的优点是能在接近生理状况下, 动态地研究生命现象。现在, ^{31}P 、 ^{13}C 、 ^1H 、 ^2H 和 ^{19}F 的 NMR 技术已经大量用于研究生物样品。从分子水平、亚细胞水平到细胞和组织水平, 都得到了许多新的重要结果。近十年来, 随着脉冲傅里叶变换核磁共振 (PFT-NMR) 技术的发展, ^{23}Na 、 ^{39}K 、 ^{25}Mg 和 ^{43}Ca 等金属阳离子 NMR 信号的检测, 也逐渐成为一般商品谱仪的常规技术, 并很快在生物样品的研究中得到了应用。但是, 细胞中的 ^{23}Na -NMR 研究, 存在着一个长期未能解决的问题^[5]: 细胞内的 Na^+ 和细胞外的 Na^+ 是化学位移等价的。这一障碍从根本上阻碍了活细胞

中 Na^+ 代谢研究的深入。幸运的是, 这一障碍, 终于在 1982 年同时被美国的两个实验室——纽约州立大学化学系 M. M. Pike 教授领导的研究小组和费城 F. Chase 癌症中心癌症研究所 P. K. Gupta 教授领导的研究小组所突破。他们分别发现: 加入一定量的某种水溶性 SR, 细胞内的 Na^+ 信号峰和细胞外的 Na^+ 信号峰就会发生分裂, 使得 Na^+ 化学位移的等价性被消除。

^{23}Na -SR-NMR 技术的出现, 为细胞中的 Na^+ 代谢研究, 提供了一个新的有力手段。相对于其它物理技术, 它具有下列优点:

- (1) 能同时准确地测定细胞内外的 Na^+ 浓度;
- (2) 能直接、连续地监测 Na^+ 跨膜传输过程;
- (3) 能定量研究 Na^+ 平衡的动力学机制。

注释:

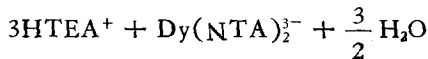
EDTA, $[(\text{O}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2]^{4-}$ DPA, dipicolinate, pridin-2, 6-dicarboxylate NTA, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_3^{3-}$ PPP, $(\text{P}_3\text{O}_{10})^{3-}$ CA, chelidamate, 4-oxypridine-2, 6-dicarboxylate TTHA, $(\text{O}_2\text{CCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2)(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2)(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2^{5-}$ HTEA, $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$

二、细胞中的 Na⁺ 检测

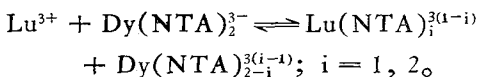
检测细胞中的Na⁺信号,是研究细胞中Na⁺代谢的前提。

Pike 等^[6]经过大量探索性实验,发现由阴离子 EDTA、DPA 和 NTA, 分别与镧系中的阳离子 Dy³⁺ 所形成的络合物 Dy(EDTA)⁻、Dy(DPA)³⁻ 和 Dy(NTA)³⁻, 是一组较理想的 Na⁺-SR。它们的位移效果按 Dy(EDTA)⁻、Dy(DPA)³⁻ 和 Dy(NTA)³⁻ 的顺序逐步增强,其中 Dy(NTA)³⁻ 在水中的溶解性最大。

络合物 Dy(NTA)³⁻ 可在使用时,按下列反应式配制。



Dy(NTA)³⁻ 能使 Na⁺ 信号峰向高场移动。尽管谱线有所增宽,但仍能保持洛仑兹线型不变。Pike 等在实验中还发现,向加入了 Dy(NTA)³⁻ 的 NaCl 溶液中滴加抗磁性离子 Lu³⁺,能消除由于 Dy(NTA)³⁻ 而引起的 Na⁺ 信号峰位移。



其中, Dy(NTA)(i = 1) 和 Dy³⁺(i = 2) 对 Na⁺ 信号没有位移作用。

Gupta 等长期应用 NMR 技术,研究生物体内无机阳离子在细胞代谢中的作用。他们曾利用 ³¹P-NMR 技术,深入地研究了 ATP 与各种金属阳离子的相互作用。在这些工作的基础上,他们推测由阳离子 Dy³⁺ 和阴离子 PPP 所形成的络合物,在生理溶液中可能是一种稳定的 Na⁺-SR。这一推测很快被他们设计的实验所证实。实验表明,在阳离子 Dy³⁺ 和阴离子 PPP 所形成的络合物中, Dy(PPP)²⁻ 的位移效果最好^[7]。

继 Pike 和 Gupta 两个小组的开创性工作之后, ²³Na-SR-NMR 技术进展较快。目前这方面的研究集中在以下三个方面:一是继续

寻找新的 Na⁺-SR,并扩展到发现其它生物体内无机阳离子的 SR;二是应用 ²³Na-SR-NMR 技术研究合适的生物样品,探讨活细胞中的 Na⁺ 代谢过程;三是定量研究 Na⁺-SR 与 Na⁺ 相互作用的机制。

到目前为止,已发现的常用 Na⁺-SR 有: Dy(DPA)³⁻、Dy(NTA)³⁻、Dy(PPP)²⁻、Dy × (CA)³⁻、Dy(TTHA)³⁻ 和 Tm(CA)⁶⁻、Tm × (PPP)²⁻、Tm(TTHA)³⁻。

三、细胞中的 [Na⁺] 测定

测定细胞中的 [Na⁺],是定量研究细胞中 Na⁺ 代谢的基础。

测定细胞中 [Na⁺] 的传统实验技术有四种:原子吸收光谱、火焰发射光谱、放射性同位素示踪和选择性离子微电极。前三种技术的灵敏度比较高,但需要对细胞的内外成份进行物理分离。由于细胞膜的外表面总是结合着部分 Na⁺,而且在细胞分离过程中,Na⁺ 的跨膜通量又会发生改变。所以,当应用这三种技术测定细胞中的 [Na⁺] 时,误差范围难以确定。选择性离子微电极技术,能测定完整细胞中的 [Na⁺]。但是,它只能适用于体积较大的细胞。

应用 ²³Na-SR-NMR 技术测定细胞中的 [Na⁺],是人们探索准确测定细胞中 [Na⁺] 技术的又一新尝试。其前提假设是 Na⁺ 信号峰的积分强度与 Na⁺ 数目成正比。但是,细胞中的 Na⁺ 不一定都对 Na⁺ 信号峰的积分强度有贡献。为此, Ogino 等^[8,9]引入了一个新概念——NMR 能见度 (NMR Visibility, NMRV)。它实质上反映的是 Na⁺ 信号峰的积分强度与 Na⁺ 数目之间的一个比例系数。要想测定细胞中的 [Na⁺],就必须先测定 NMRV。

Ogino 等提出了一种测定 NMRV 的实验方法,其基本思想是:改变细胞内外 Na⁺ 信号峰的积分强度,比较改变值的相对大小,求出 NMRV。下面以酵母细胞为研究对象,介绍 Ogino 等测定 NMRV 的具体方法^[8]。

将在 30℃ 经 24 小时培养的厌氧酵母细胞,降到 4℃ 低速离心,洗涤离心收集细胞两

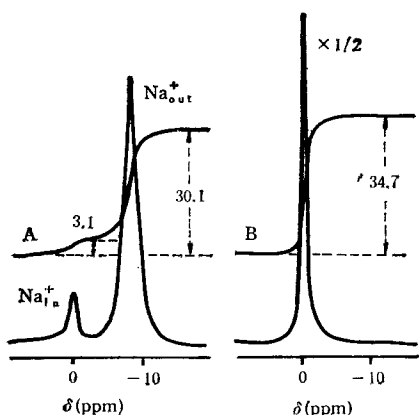


图1 厌氧酵母细胞悬液 ^{23}Na -NMR 谱 (95.26 MHz, 25°C)

A 和 B 分别代表细胞外 Na^+ 渗透前后的图谱。数字代表信号峰积分强度^[1]。

次, 与缓冲液配成悬液 (1:2)。调节 pH 值到 6.0。以 360 MHz 谱仪第一次记谱。滴加 5% 1:4 的甲苯/乙醇, 充分混合 5 分钟。再第二次记谱 (图 1)。实验过程中向悬液通以 95% N_2 /5% CO_2 的混合气体。缓冲液: 每 1ml 含 5.0×10^{-5} mol 2-(N-吗啉)乙磺酸、 1.0×10^{-6} mol $\text{Dy}(\text{PPP})_2^{3-}$ 和 2.5×10^{-5} mol Tris 的溶液中加入 H_2SO_4 0.85g, K_2HPO_4 0.15g, MgSO_4 0.5g 和 NaCl 0.1 g。

设 A_{in} 和 A_{out} 分别代表 Na_{in}^+ 和 Na_{out}^+ 信号峰的积分强度, A 代表重合后的 Na^+ 信号峰积分强度。则

$$\text{NMRV} = A_{\text{in}} / (A - A_{\text{out}}) = 3.1 / [34.7 - (30.1 - 3.1)] = 40\%$$

可见, 对于新鲜厌氧酵母细胞, 细胞中 Na^+ 的 NMRV 是 40%。

测定细胞中的 $[\text{Na}^+]$, 就是要测定细胞内的 Na^+ 含量和细胞内水的体积。按实验方法的不同, 可分为 Gupta 方法和 Pike 方法。

1. Gupta 方法^[7]

实验方法: 两支 NMR 样品管 M 和 N。M 管盛细胞和缓冲液组成的悬液, N 管只盛等量全同缓冲液。缓冲液中含 Na^+ -SR, $[\text{Na}_{\text{out}}^+]$ 已知。分别测量 M 管和 N 管, 记录 Na^+ 信号峰积分强度。

计算公式: 设 A_0 代表 N 管中 Na^+ 信号积

分强度。则

$$[\text{Na}_{\text{in}}^+] = \frac{1}{\text{NMRV}} \times \left(\frac{A_{\text{in}}}{A_{\text{out}}} \times \frac{S_{\text{out}}}{1 - S_{\text{out}}} \right) \times [\text{Na}_{\text{out}}^+]$$

其中, $S_{\text{out}} = A_{\text{out}}/A_0$, 称为空间系数 (fractional space)。

2. Pike 方法^[10]

实验方法: NMR 样品管中盛由细胞和缓冲液组成的悬液。缓冲液中含 Na^+ -SR。用毛细管离心方法读出悬液中的细胞压积。谱仪记录 Na^+ 信号积分强度。随后, 不改变谱仪测量参数, 依次对盛有各种标准浓度的 Na^+ 溶液进行测量。作出 Na^+ 信号积分强度与 $[\text{Na}^+]$ 的标准曲线。

计算公式:

$$[\text{Na}_{\text{in}}^+] = \frac{1}{\text{NMRV}} \times \frac{1}{H} \times [\text{Na}_{\text{标准}}^+]$$

$$[\text{Na}_{\text{out}}^+] = \frac{1}{H} \times [\text{Na}_{\text{标准}}^+]$$

其中, H 是细胞压积, $[\text{Na}_{\text{标准}}^+]$ 是标准曲线上对应于 Na_{in}^+ 或 Na_{out}^+ 信号积分强度的 $[\text{Na}^+]$ 。

应用 ^{23}Na -SR-NMR 技术测定细胞中的 $[\text{Na}^+]$, 其实验方法目前还不能说已十分完善, 仍是一个十分诱人的研究课题。Cowan 等^[11]发现: 在 Na^+ -SR 存在时, 细胞悬液中水的 ^1H 化学位移与细胞压积呈线性关系。因此,

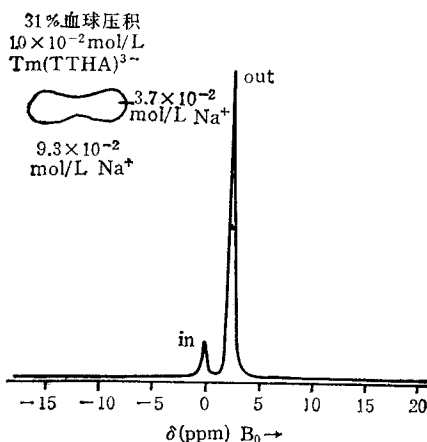


图2 血库存血 ^{23}Na -NMR 谱 (95.2 MHz, 15°C)

全血中含 1.02×10^{-2} mol/L $(\text{Choline})_3\text{Tm}(\text{TTHA}) \cdot 3\text{CholineCl}$ 和 20% (Vol./Vol.) D_2O 。FID 累加 (7.16 min), 灵敏度增强 (3Hz)^[10]。

他们在利用 ^{23}Na -SR-NMR 技术测定细胞内外 Na^+ 信号积分强度的同时,又利用 ^1H -NMR 技术测定悬液中 ^1H 的化学位移值,推算出细胞内外水的体积比值,最终算出细胞中的 $[\text{Na}^+]$ 。在最近召开的第 23 届 NMR 安培会议上, Rotman 等^[12] 又提出,利用 ^{23}Na -SR-NMR 和 ^1H -NMR 技术可直接测定细胞内 Na^+ 和 ^1H 的信号积分强度,从而算出细胞中的 $[\text{Na}^+]$ 。

四、活细胞中 Na^+ 代谢的研究进展

应用 ^{23}Na -SR-NMR 技术研究细胞中的 Na^+ 代谢,是从大单层脂质体(LUV)开始的^[13]。随后,人体血红细胞 (RBC)^[7]、蛙缝匠肌细胞^[7]、酵母细胞^[8,14]和鼠腹肌细胞^[15]也成了研究对象。目前,活细胞中的 ^{23}Na -SR-NMR 研究集中于人体 RBC 上^[9-11,16]。

1. 细胞中的 Na^+ 特征参数测定

测定细胞中的 Na^+ 特征参数,主要是在人

体 RBC 上进行的。人体 RBC 是一个理想的生物细胞模型,特别适合于研究细胞中的生理代谢过程。这是因为:第一,人体 RBC 结构简单;而且不同生长发育阶段有明显的结构特征,易于研究细胞的整个生长发育过程。第二,它能大量获取,分离提纯也很方便;而且,还易于保存和运输。最后,人体 RBC 是一个灵敏的病理生理探针,具有重要的临床实用价值。

应用 ^{23}Na -SR-NMR 技术测定人体 RBC 中的 $[\text{Na}^+]$,在进行常规静脉抽血后,只需要 30 分钟就可完成。对于高场小孔径谱仪,样品量只需 0.5 ml (图 2)。

在正常情况下,人体 RBC 中 Na^+ 的 NMRV 是 100%。新鲜血液中 RBC 的 $[\text{Na}^+_{\text{in}}]$ 低于 $1.2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$,血库存血中 RBC 的 $[\text{Na}^+_{\text{in}}]$ 范围在 $2.9 \times 10^{-2} - 4.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ (表 1, 表 2)。

表 1 正常人体 RBC 悬液在 15℃下的定量参数^[10]

样品	处理方式	RBC压积 %	SR	$[\text{SR}]$ 10^{-3}mol/L	δ 差值 ppm	$[\text{Na}^+_{\text{in}}]$ 10^{-3}mol/L	$[\text{Na}^+_{\text{out}}]$ 10^{-3}mol/L
血库存血	全血	31	$\text{X}_3\text{Tm}(\text{TTHA}) \cdot 3\text{XCl}$	10.2	2.42	38.3	91.1
新鲜血液	缓冲液洗涤	26	$\text{X}_3\text{Tm}(\text{TTHA}) \cdot 3\text{XCl}$	6.9	2.42	10.6	0.48
血库存血	缓冲液洗涤	26	$\text{X}_3\text{Tm}(\text{TTHA}) \cdot 3\text{XCl}$	6.9	2.51	30.0	1.64
新鲜血液	缓冲液洗涤	24	$\text{Na}_7\text{Dy}(\text{PPP})_2 \cdot \text{NaCl}$	0.58	3.69	36.6	50.9

注: X——胆碱。

表 2 正常人新鲜血液成分在 23℃下的定量参数^[16]

样 品	δ^+ ppm	$\nu_{\frac{1}{2}}$ H_z	T_1 10^{-3}s	T_2 10^{-3}s
0.1 mol/L NaCl	0.000	17.0	60	60
血 浆	0.049	31.7	30 ± 1	17 ± 1
5%白蛋白	0.29	20.7	50 ± 0.5	43 ± 2
RBC 中 Na^+	-0.092^*	32.9	30 ± 3	14 ± 3
Na^+Chelex	-0.69^*	325	<10	<1

注: +溶液中含 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L Dy}(\text{PPP})_2^-$;

*负号表示信号峰向高场方向移动。

2. 细胞中的 Na^+ 跨膜传输研究

无机阳离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 NH_4^+) 的跨膜传输,是一个非常重要的生理过程。NMR 技术,是目前人们研究这一过程的主要物理手段。已采用的研究方法有两种:一种是选择适当的顺磁性金属阳离子(通常是镧

系离子 Ln^{3+}),来代替某种无机阳离子。 Ln^{3+} 的跨膜传输,会引起细胞膜上磷脂分子头部基团的化学环境发生变化。这种变化能够应用 ^1H 、 ^{31}P 和 ^{13}C 的 NMR 技术来检测,它反映在头部基团信号的化学位移和线型参数上。这是一种类比的研究方法^[17]。另一种是通过观测

H^+ 的跨膜传输过程,来研究有关无机阳离子的跨膜传输机制,因为这两种过程往往是紧密地联系在一起的。应用 ^{31}P -NMR 技术,可检测细胞中 pH 值变化,也就是细胞中 H^+ 的变化。这是一种间接的研究方法^[18]。

以上两种方法存在着一定的局限性。第一种方法只能用于研究小体积的脂质体(直径小于 80 nm),而且温度要控制在类脂相变温度以上。对于体积较大的细胞器和细胞,由于运动程度降低,膜上磷脂分子的信号峰增宽,无法识别特征信号。另外,由于膜蛋白通常有很高的专一性,所以也不能用于研究选择性离子传输。第二种方法不够准确,而且只能研究细胞

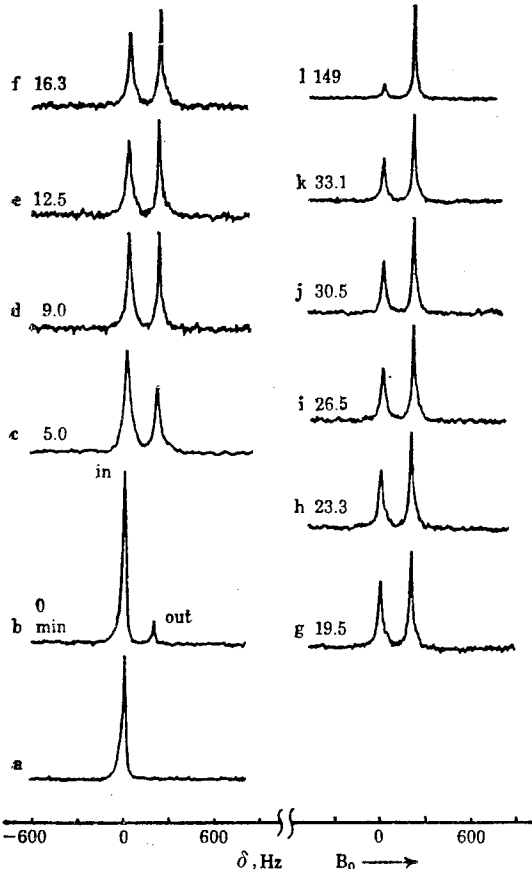


图3 LUV 的 D_2O 悬液 ^{23}Na -NMR 谱 (132.3MHz, 24°C)

(a) 悬液中含 $6.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 卵磷脂, $6.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ $NaCl_{in}$, $2.7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ $NaCl_{out}$ 和 $3.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ $LiCl_{out}$ 。(b) 悬液另含 $6.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ $Dy(NTA)_3^{out}$ 。(c—L) 悬液中另含 $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 短杆菌肽,是时间变化图谱,从 FID 累加过程的中点计时^[13]。

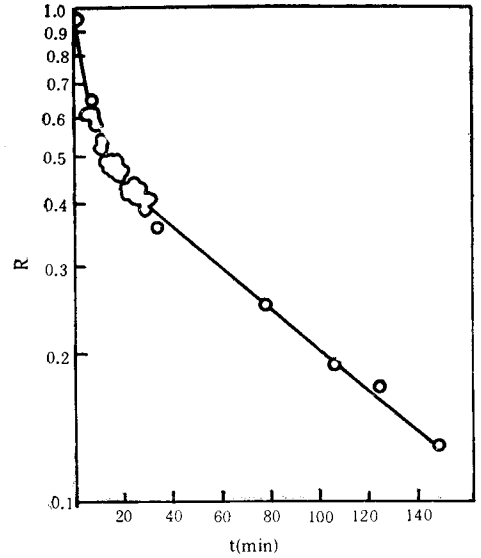


图4 R 与 t 关系图

(○)代表实验数据点, (—)代表计算机模拟曲线^[13]。

中 Na^+ 和 K^+ 的跨膜传输。但是,应用 ^{23}Na -SR-NMR 技术研究细胞中的 Na^+ 跨膜传输,就能克服这两种方法的局限性。它既能直接研究细胞模型——LUV,又能直接研究生物活细胞。通常,将这两个层次上的工作相结合,能得到令人满意的结果。

Pike 等^[13]首次应用 ^{23}Na -SR-NMR 技术,研究了在卵磷脂 LUV 膜一侧的 Na^+ 被动传输。在 $[Na^+_{in}] > [Na^+_{out}]$ 的条件下,向 LUV 悬液滴加微量的短杆菌肽, LUV 内的 Na^+ 就会顺 Na^+ 浓度梯度向 LUV 外扩散(图3)。实验结果表明: Na^+ 的扩散速度开始很快,一级速度常数达到 $K_{快} = 3.0 \pm 0.3 \times 10^{-3} s^{-1}$; 随后又很慢,一级速度常数只有 $K_{慢} = 1.6 \pm 0.2 \times 10^{-4} s^{-1}$ 。实验曲线可拟合为:

$$R = 0.41 \exp(-0.18t) + 0.53 \exp(-0.0096t) + 0.05$$

其中, $R \equiv A_{in}/(A_{in} + A_{out})$, t 的单位是分钟(图4)。

Pike 等推测, Na^+ 从初平衡态到末平衡态的传输,至少经历了三个阶段。第一阶段是 Li^+ 和 Na^+ 1:1 的进出快交换,直到 $[Li^+_{in}] = [Li^+_{out}]$, 但仍有 $[Na^+_{in}] > [Na^+_{out}]$; 第二阶段是 Li^+ 和 Na^+ 1:1 的进出慢交换,直到 $[Li^+_{in}]/$

$[Li_{out}^+] = [Na_{in}^+]/[Na_{out}^+]$, 但仍有 $[Na_{in}^+] > [Na_{out}^+]$; 第三阶段是 Cl^- 的出膜慢传输, 直到 $[Na_{in}^+] = [Na_{out}^+]$, $[Li_{in}^+] = [Li_{out}^+]$ 。

利用 LUV 模型研究细胞中 Na^+ 跨膜传输有两个方向: 一个是分别研究由各种类脂成分制备的 LUV 膜的通透性, 包括在生理条件下的和在特殊理化条件下的; 另一个是研究重建在 LUV 膜上的各种膜蛋白的特异性传输机制。

应用 ^{23}Na -SR-NMR 技术研究 Na^+ 的跨膜传输, 所采用的第一个生物活细胞样品是酵母细胞^[8,14]。酵母细胞通常是一种富含 K^+ 的细胞。但当细胞悬液中缺乏 K^+ 而富含 Na^+ 时, 它又能吸收 Na^+ , 成为一种富含 Na^+ 的细胞。如果洗涤掉悬液中的 Na^+ , 则酵母细胞又能将积累的 Na^+ 释放出来。酵母细胞的这种 Na^+ 、 K^+ 传输机制, 已有大量研究, 但其相互关系还不很清楚。

Balschi 等^[14]测定了富含 Na^+ 酵母细胞

的一级速度常数:

$$K_{ik} = 9.0 \pm 2.0 \times 10^{-4} s^{-1}$$

$$K_{re} = 1.8 \pm 1.1 \times 10^{-5} s^{-1}$$

实验曲线可拟合为:

$$R = 0.34 \exp(-0.054t) + 0.46 \exp(-0.0011t)$$

这些结果与在 LUV 上测得的结果一致。

Ogino 等^[8]利用 ^{39}K 、 ^{23}Na -SR-NMR 和 ^{31}P -NMR 技术, 研究了酵母细胞中 K^+ 、 Na^+ 和 H^+ 的相互关系。结果发现: 酵母细胞中的 K^+ 和 H^+ , 是以 1:1 的比例跨膜交换传输的; 酵母细胞膜上只存在 K^+ 载体, Na^+ 能与 K^+ 竞争 K^+ 载体。

继酵母细胞的研究之后, Ogino 等^[9]又利用 ^{39}K 、 ^{23}Na -SR-NMR、 ^{31}P -NMR 和选择性 K^+ 微电极技术, 研究了新鲜人体 RBC 中的 Na^+ 代谢。

在人体 RBC 中, Na^+ - K^+ 泵是维持细胞膜两侧 Na^+ 、 K^+ 浓度梯度的主要因素。为了确定 Na^+ -SR 加入后, 人体 RBC 中的能量代谢是否受到了阻碍, 从而影响 Na^+ - K^+ 泵的正常功能, Ogino 等先做了 ^{31}P -NMR 图谱。结果表明: 在 Na^+ -SR 加入前后, ATP 和 ADP 中有机磷的信号峰没有发生变化, RBC 中能量代谢正常(图 5)。

在通常情况下, ^{39}K -SR-NMR 技术的灵敏度要比选择性 K^+ 微电极技术的灵敏度低。因此, Ogino 等在分别利用 ^{39}K 、 ^{23}Na -SR-NMR 技术测定了 RBC 中的 $[K^+]$ 和 $[Na^+]$ 后, 又将 ^{23}Na -SR-NMR 技术与选择性 K^+ 微电极技术相结合, 研究了 RBC 中的 Na^+ 、 K^+ 跨膜传输。结果发现: 在初始平衡状态下, $[Na_{in}^+] = (8.1 \pm 0.8) \times 10^{-3} mol/L$, $[K^+] = (1.1 \pm 0.12) \times 10^{-1} mol/L$; 对苦毒无旋花子甙敏感的 Na^+ 净输出通量是 $(1.75 \pm 0.08) \times 10^{-3} mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ 。在加入短杆菌肽后, Na^+ 和 K^+ 先发生 1:1 的快交换; 随后是 Na^+ 和 K^+ 的慢交换, 其速度取决于 Cl^- 的跨膜通透性。

活细胞中的 ^{23}Na -SR-NMR 研究, 目前还处在初始阶段。但 ^{23}Na -SR-NMR 技术, 已开

(下转第 37 页)

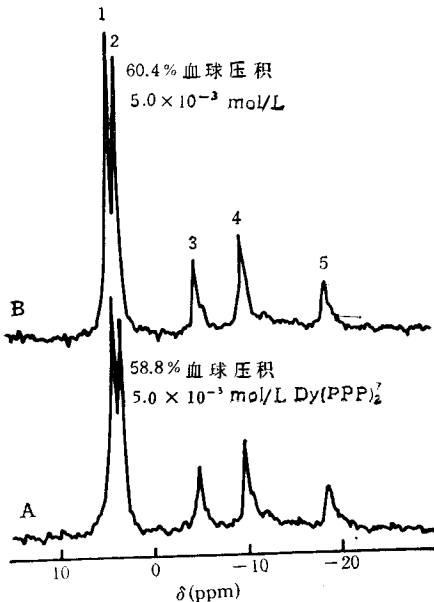


图 5 人体 RBC 悬液 ^{31}P -NMR 谱 (145.78 MHz, 37°C)

悬液中含 $6.5 \times 10^{-2} mol/L NaCl$, $2.0 \times 10^{-2} mol/L KCl$, $1.0 \times 10^{-2} mol/L NaH_2PO_4$, $2.0 \times 10^{-3} mol/L MgCl_2$, $1.0 \times 10^{-3} mol/L$ 葡萄糖和 $5.0 \times 10^{-2} mol/L$ Hepes, pH = 7.4。FID 累加 (5 min), 灵敏度增强 (20 Hz)。谱线归属: 1 和 2 峰代表 ADP 中 3-P 和 2-P; 3、4 和 5 峰代表 ATP 中 γ -P、 α -P 和 β -P^[10]。

加热只有当温度超过 45℃ 时才能产生细胞链断裂^[8]。而且 Corry 等发现照射前加热比照射后加热细胞 DNA 链断裂的百分率高 10—20%^[2]。这与我们的实验结果相近。这也许是因为高温造成 DNA 链直接或潜在的断裂,再加上电离辐射,两者的协同作用就增强了 DNA 损伤。至于照射后加热,有的研究表明主要表现为高温对 DNA 重接修复功能的抑制^[7]。这提示在放射治疗中,在照射肿瘤前进行高温处理能够提高疗效。

关于高温对细胞 DNA 链断裂重接修复的抑制,过去报道也不一致。有人认为高温促进了细胞内 DNA 单链断裂的修复^[6]但是本实验结果与 Corry 和 Jorritsman 等结果相似^[4,5],这表明 43℃ 高温极大地抑制了淋巴细胞 DNA 链断裂的重接修复。由于重接修复是一个酶促反应的生化过程,因此 DNA 修复与促使与 DNA 修复有关的酶的失活有密切关系。已有报道,高温对 DNA 聚合酶 β 的活力下降影响十分

明显^[9],这使单链 DNA 重接修复速度减慢乃至停止。

综上所述,高温合并辐射对细胞有杀伤作用,引起细胞死亡的原因是多方面的,本文的实验所观察的仅是单次加热处理对 DNA 损伤及其修复的影响。

参 考 文 献

- [1] Lunec, J. et al.: *Radiat. Res.*, **85**, 116, 1981.
- [2] Corry, P. M. et al.: *Radiology*, **123**, 475, 1977.
- [3] Rydberg, B.: *Radiat. Res.*, **61**, 274, 1975.
- [4] Boyum, A.: *Scand. J. Clin. Invest., Supple* **97**, 21, 1968.
- [5] Sakai, K. et al.: *J. Radiat. Res.*, **22**, 415, 1981.
- [6] Robinson, J. E.: *Radiology*, **113**, 195, 1974.
- [7] Jorritsman, J. B. M. et al.: *Radiat. Res.*, **98**, 198, 1984.
- [8] Dikomery, E.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **41**, 603, 1982.
- [9] Spiro, I. J.: *Radiat. Res.*, **89**, 134, 1982.

[本文于 1987 年 1 月 16 日收到]

(上接第 7 页)

始向研究生物体内其它无机阳离子扩展,如 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等^[19,20]。这些新技术的出现,可望使目前对活细胞中无机阳离子代谢研究的水平,产生一个飞跃。

参 考 文 献

- [1] Duhm, J. et al.: *Hypertension*, **4**, 477, 1982.
- [2] Dorns, E. et al.: *Science*, **205**, 932, 1979.
- [3] Rubython, E. J. et al.: *Clin. Sci.*, **64**, 441, 1983.
- [4] Cameron, I. L. et al.: *Cancer Res.*, **40**, 1493, 1980.
- [5] Kissel, T. R. et al.: *Clin. Chem.*, **28**, 449, 1982.
- [6] Pike, M. M. & Springer, Jr. C. S.: *J. Magn. Reson.*, **46**, 348, 1982.
- [7] Gupta, R. K. & Gupta, P.: *J. Magn. Reson.*, **47**, 344, 1982.
- [8] Ogino, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5185, 1983.

- [9] Ogino, T. et al.: *ibid.*, **82**, 1099, 1985.
- [10] Pike, M. M. et al.: *Am. J. Physiol.*, **246**, C528, 1984.
- [11] Cowan, B. E. et al.: *FEBS Lett.*, **184**, 131, 1985.
- [12] Rotman, A. et al.: *23th NMR Ampere Conference Symposium*, 532, 1986.
- [13] Pike, M. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 810, 1982.
- [14] Balchi, J. A. et al.: *Biophys. J.*, **38**, 323, 1982.
- [15] Matwiyoff, N. A. et al.: *Magn. Reson. Med.*, **3**, 164, 1986.
- [16] Pettegrew, J. W. et al.: *J. Magn. Reson.*, **57**, 185, 1984.
- [17] Ting, D. Z. et al.: *Biophys. J.*, **34**, 189, 1981.
- [18] Nicolay, K. et al.: *Arch. Microbiol.*, **133**, 83, 1982.
- [19] Pike, M. M. et al.: *Inorg. Chem.*, **22**, 2388, 1983.
- [20] Chu, S. C. et al.: *J. Magn. Reson.*, **56**, 33, 1984.

[本文于 1986 年 12 月 9 日收到]