

顾全保

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

大量的研究工作已经表明,细胞膜能够选择性地输送离子出入细胞,维持细胞质与外界之间的渗透压平衡。细胞膜的这种输送功能是细胞与外界进行物质交换的主要途径,担负输送任务的膜结构是蛋白质分子,称之为载体。离子由载体输送,且依赖于能量供应的叫做主动输送;而离子通过载体,却不需要供给能量的输送叫做被动输送,两者都有别于离子穿过细胞膜孔的自由扩散特性。研究物质通透细胞膜的机理,认识物质通透细胞膜的速度所遵循的规律以及外界因素对输送速度的影响,这是膜输运动力学研究的主要目的。

现在,用于细胞膜输运动力学研究的实验材料极广,本文仅以人红细胞作为介绍对象,许多从事该领域研究的科学家认为,它确是比较理想的实验材料之一。因为,成熟的人红细胞具有无核,胞内物质简单,细胞膜较为稳定,取材容易等优点;而且,它可被制备重新封闭的膜空泡,方法又很简便。所以,直至今日,红细胞膜仍作为膜输送研究的模式膜系,并应用得更为广泛,再则,红细胞膜输送功能的研究已有悠久的历史,在这期间,业已开创了許多实验方法和技术,这对研究其他细胞膜的输送功能有着重要的指导意义。

进行细胞膜输运动力学的研究,乃是解释细胞膜输送这一复杂机制的良好途径。测定离子或分子通透细胞膜的速度,是动力学研究中首先应掌握的实验手段。为此,本文的主要目的是简略地介绍流速测定的方法及其基本原理。

一、基本原理

1. 概述

在溶质通透红细胞膜的流速测定中,人们

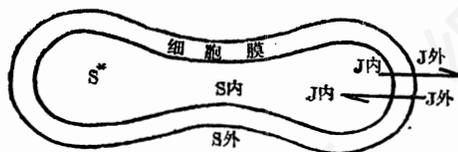


图1 离子通透人红细胞膜的示意图

多半把完整的红细胞或红细胞膜空泡悬浮在一定的溶液中,细胞内外被红细胞膜隔开(图1)。倘若某一被测物S,从细胞内透过细胞膜流向细胞外,其单向流速用 $J_{内\rightarrow外}$ 表示,同时该被测物S也以相反的方向透过细胞膜而流动,其单向流速以 $J_{外\rightarrow内}$ 表示,因此,被测物S的净流速J应该是两个相对方向的单向流速 $J_{内\rightarrow外}$ 和 $J_{外\rightarrow内}$ 之差。当被测物S在细胞内外达到平衡时,即 $S_{内}=S_{外}$,那么,它们的单向流速相互抵消,净流速等于零,此时,细胞内和细胞外被测物S的浓度保持恒量。

根据放射性和非放射性同位素的化学性质相同之原理,运用同位素示踪技术,测定某一被测物S通透细胞膜的流速是完全可能的。假定当时间等于零时,在细胞内装入少量放射性同位素示踪物 S^* ,细胞内外为了保持平衡状态,故被测物S(包括放射性和非放射性物质)开始通透细胞膜产生平衡交换,因此,在细胞外出现了放射性物质 S^* ,放射性量的变化与测定时间之间产生一定的关系,从这一量变关系,则可用适当的数学方法计算被测物的流速。下面将要详细叙述。

2. 流出速度和速度常数

被测物从细胞内通透细胞膜流向细胞外的测定,简称流出测定。速度常数k和单向流速

* 在写作过程中,得到王幽兰老师的指教,特此致谢。

J 是流出测定实验中非常重要的两个参数。表示被测物的输送速度与它的浓度关系的方程式,称为流速方程式,或叫动力学方程式。譬如,在 Donnan 平衡状态下,一些无机阴离子通透人红细胞膜的流出测定实验确定其流速方程式^[1-2]为

$${}^0J = k \times [S] \quad (1)$$

式(1)中 J 左上角的 0 表示流出测定, k 为速度常数, k 值表示细胞膜输送测定的时间间隔之倒数,即 k 的因次为时间 t^{-1} , 时间 t 一般用秒、分或小时表示。速度常数 k 的计算式经数学推导可写成以下的指数形式^[3],

$$\frac{y^t - y^\infty}{y^0 - y^\infty} = e^{-kt} \quad (2)$$

或

$$L_n\left(\frac{y^t - y^\infty}{y^0 - y^\infty}\right) = -kt \quad (3)$$

式(2)和(3)中的 y^0 、 y^t 和 y^∞ 分别表示时间为零、 t 和无穷时的放射性计数(CPM), e 为指数函数, t 表示时间。根据式(3),作半对数坐标图(参见图2),求其斜率,即得 k 值。

式(1)中 $[S]$ 表示细胞内被测物的浓度,一般以每毫升红细胞中所含被测物的毫克分子数表示。1 毫升红细胞是指在标准条件(20°C, pH 7.2, 离心力 $5000 \times g$, 离心时间 10 分钟)下,离心沉淀的红细胞所计量的体积。因此,流出速度 0J 的计算单位通常可用毫克分子数 \times 1 毫升红细胞 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 表示。当然, 0J 的计算单位也可根据实验需要按下列关系换算: 1 毫升红细胞 = 0.353 克干重红细胞 = 1.0×10^{10} 个红细胞 = 1.4×10^4 厘米 2 (红细胞膜表面积)。也可换算成毫克分子数 \times 1 升细胞水 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ (需测量细胞水所占总细胞重量的百分数,通常每毫升人的红细胞含 0.7 毫升细胞水),或换算为离子数(或分子数) \times 1 毫升红细胞 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ (根据亚佛加德罗常数, 1 克分子数 = 6.023×10^{23} 个分子)来表示。

3. 流入速度

被测物从细胞外通透细胞膜流入细胞内的

输送测定,简称流入测定。由流入测定实验,得到测定时间 t 与细胞内放射性计数 y^t 之间的关系,由此可作出单位体积红细胞内流入被测物量对测定时间 t 的坐标图,从而计算出流入速度 iJ 。 J 左上角的 i 表示流入测定。

首先,我们需要知道,在流入测定系统中,当细胞悬浮液为均匀分布状态时,每取出一定量的样品中,含有多少红细胞体积(CV)。由于实验中知道:流入测定系统的细胞密度 CD(%);每次取样的体积 SV(毫升)和测得加进流入测定液前的红细胞容量 H(%)。因此, CV 应按下式计算,

$$CV = SV \times CD \times H \quad (4)$$

然后,根据已知流入测定系统中被测物的浓度和总的放射性量(CPM),换算成每 CPM 相当于被测物的毫克分子数 CS,即

$$CS = \frac{[S] \times VT}{CPM^{VT}} \quad (5)$$

式(5)中 $[S]$ 表示流入测定液中被测物的浓度(毫克分子浓度), VT 表示计数总的 CPM 所取出的细胞悬浮液量(毫升), CPM^{VT} 表示由 VT 所测得的放射性计数。

综合以上算式,并由实验得到各次测定时间 t 时细胞内的放射性计数 y^t ,则可计算单位红细胞体积中流入被测物的量 SU, 计算式为

$$SU = \frac{y^t}{CV} \times CS \quad (6)$$

SU 的计算单位为毫克分子数 \times 1 毫升红细胞 $^{-1}$ 。由此可作出 SU 对测定时间 t 的坐标图象(参见图3)。如果该图象为一线性关系,那么,根据计算斜率即可直接得到流入速度 iJ , 那就是

$${}^iJ = \frac{dSU}{dt} \quad (7)$$

iJ 的计算单位同上述 0J 。

二、实验方法和数据处理

现以二价无机阴离子(SO_4^{2-}),在 Donnan 平衡状态下,通透人红细胞膜的流出测定和流入测定作为实例,介绍流速测定方法以及数据处

理过程。

1. SO_4^{2-} 通透正常人红细胞膜的流出测定

按实验需要量, 采取健康成人的新鲜血液(每 80 毫升血液与 20 毫升 3.8% 柠檬酸钠混合), 离心 ($5000 \times g$) 15 分钟, 沉淀的红细胞经生理盐水洗涤三次。量取洗净的红细胞, 以 50% 细胞密度悬浮在流出测定平衡液(122.5 mM 氯化钠, 5.0 mM 硫酸钠, 10.0 mM 磷酸钠缓冲液和 1—2 微居里 \times 毫升⁻¹ 放射性硫酸钠, ($Na_2^{35}SO_4$), pH 6.3) 中, 在 37°C 下温育 90 分钟, 然后离心, 取出相当于 1.0 微克分子数 SO_4^{2-} 的上清液量, 供计数 CPM, 其余的上清液弃去。沉淀的红细胞重新悬浮在不含放射性同位素的冷平衡液(4°C) 中, 洗涤三次。这时得到的红细胞已被装进 $^{35}SO_4^{2-}$, 且达到细胞内外 SO_4^{2-} 的平衡^[4]。将装有 $^{35}SO_4^{2-}$ 的红细胞以 1.0% 细胞密度悬浮在流出测定液(122.5 mM 氯化钠, 5.0 mM 硫酸钠和 10.0 mM 磷酸钠, pH 6.3)

内, 流出测定系统的总体积为 20 毫升, 将该系统温育在 8°C 的震荡式恒温水浴槽内。加入红细胞的同时, 马表计时开始, 接着按指定时间间隔, 取出一定量细胞悬液, 用离心技术使细胞从悬液中立即分开, 离心上清液与 10 毫升闪烁液混合, 在液体闪烁计数机上测定放射性量。

为了测定红细胞的精确容量, 把装有 $^{35}SO_4^{2-}$ 的红细胞样品灌进毛细玻璃管内, 管子的一端用封蜡封口, 然后装在微量血球容量离心机内, 开至最大速度, 离心 10 分钟, 离心结束后, 便能直接读数红细胞的实际容量。

SO_4^{2-} 通透人红细胞膜流出测定的不同时间 t (小时) 与放射性计数 y^t (CPM) 之间的关系见表 1。将表 1 中实验数据代入公式 (3), 作出半对数坐标图(图 2), 图象清楚地显示出一线性关系, 因此, 只要计算其斜率, 就可得到速度常数 k , 通常以 0k_s 表示, k 右下角的符号表示被测物, 这里的 S 代表 SO_4^{2-} 。由此可见,

表 1 不同测定时间 t 时 $^{35}SO_4^{2-}$ 通透人红细胞膜流出的量

t(小时)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	∞
y^t (CPM)	75.2	166.0	314.3	391.0	499.4	588.8	708.0	815.1	918.7	4985.2

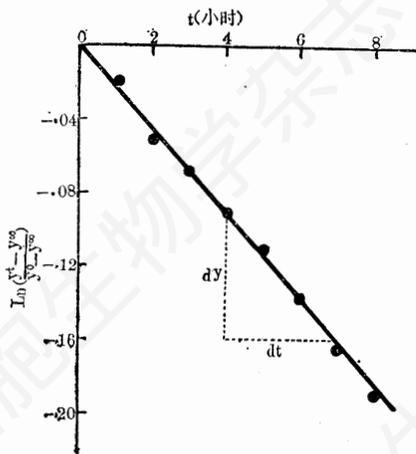


图 2 SO_4^{2-} 通透人红细胞膜流出测定的半对数坐标图

$$^0k_s = \frac{dy}{dt} = 0.40 \times 10^{-3} \times \text{分}^{-1}$$

按公式 (1), 其 S 在本实验中是指 [SO_4^{2-}],

它表示流出测定系统中所含的细胞内 SO_4^{2-} 的浓度, 下面我们推算 [SO_4^{2-}]。

因为流出测定系统总体积 (TV) 为 20 毫升, 其中流出测定液为 19.8 毫升, 红细胞为 0.2 毫升, 而且, 表 1 中所示 y^∞ 的放射性计数来自 0.5 毫升细胞悬液 (V^∞), 实际上, y^∞ 所表示的 CPM 中, 还包含细胞外未洗净的少量 $^{35}SO_4^{2-}$ 的放射性量, 即表 1 中 y^0 的 CPM。所以, 流出测定系统中总的 CPM 应该按下列计算:

$$\begin{aligned} CPM_{\text{总}} &= \frac{TV \times (y^\infty - y^0)}{V^\infty} \\ &= \frac{20 \text{ 毫升} \times (4985.2 \text{ CPM} - 75.2 \text{ CPM})}{0.5 \text{ 毫升}} \\ &= 196400 \text{ CPM} \end{aligned}$$

已知, 当 $^{35}SO_4^{2-}$ 装入红细胞达到胞内外平

衡时,测得1.0微克分子数 SO_4^- 的放射性计数为25970 CPM,因此,在流出测定液中,红细胞带入的 SO_4^- 总量为

$$\begin{aligned} \text{SO}_4^-_{\text{总}} &= \frac{1.0 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \times \text{CPM}_{\text{总}}}{\text{CPM } 1.0 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^-} \\ &= \frac{1.0 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \times 196400 \text{ CPM}}{25970 \text{ CPM}} \\ &= 7.5 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \end{aligned}$$

又知红细胞实际容量为95%,这说明加到流出测定系统中的0.2毫升红细胞实际上只有0.19(0.2毫升×95%)毫升。因为7.5微克分子数 SO_4^- 是来自0.19毫升红细胞,所以

$$\begin{aligned} [\text{SO}_4^-] &= \frac{7.5 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^-}{0.19 \text{ 毫升红细胞}} \\ &= 39.5 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \\ &\quad \times 1 \text{ 毫升红细胞}^{-1} \end{aligned}$$

综上计算结果,将 0k_s 和 $[\text{SO}_4^-]$ 值代入流出速度方程式,即得 SO_4^- 的流出速度

$$\begin{aligned} ^0J_s &= ^0k_s \times [\text{SO}_4^-] \\ &= 0.40 \times 10^{-3} \times \text{分}^{-1} \times 39.5 \text{ 微克分子数 } \\ &\quad \text{SO}_4^- \times 1 \text{ 毫升红细胞}^{-1} \\ &= 15.8 \times 10^{-3} \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \\ &\quad \times 1 \text{ 毫升红细胞}^{-1} \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

2. SO_4^- 通透正常人红细胞膜的流入测定

将洗净的红细胞悬浮于流入测定平衡液(100.0 mM 硫酸钠, 20.0 mM 柠檬酸钠, pH 6.4)中,细胞密度为50%,在37°C下温育90分钟,离心沉淀红细胞,并精确地取出一定量的沉淀红细胞,加到流入测定液(100.0 mM 硫酸钠, 20.0 mM 柠檬酸钠, 0.2 微居里×毫升⁻¹放射性硫酸钠($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$), pH 6.4)内,其细胞密度为2.0%,流入测定系统总体积为25.0毫升。实验在27°C震荡式恒温水浴槽内进行,以指定的温育时间间隔,取出1.0毫升悬浮液,与10倍体积的流入测定平衡液混合(平衡液预先置于冰浴中冷却),立即离心,将红细胞分离出来,然后重复洗涤一次。离心沉淀的红细胞和0.5毫升蒸馏水混和,使细胞解离,再加入0.5毫升21%三氯醋酸,使蛋白质

沉淀,取离心上清液,与10毫升闪烁液混和,在液体闪烁计数机上测CPM。为了测得流入测定系统中的总CPM,取0.2毫升细胞悬浮液,加等体积21%三氯醋酸,离心,取上清液测CPM。

根据实验已知数 $SV=1.0$ 毫升, $CD=2.0\%$, $H=95\%$,由公式(4)求得 CV ,即 $CV=1.0$ 毫升×0.02×0.95=0.019毫升

已知流入测定液中 SO_4^- 的浓度为100.0毫克分子浓度,又知 $VT=0.2$ 毫升和 $\text{CPM}^{VT}=54024$ CPM。将这些已知数代入公式(5)求得

$$\begin{aligned} CS &= \frac{100.0 \text{ 毫克分子浓度} \times 0.2 \text{ 毫升}}{54024 \text{ CPM}} \\ &= 0.37 \times 10^{-3} \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \times \text{CPM}^{-1} \end{aligned}$$

表2 不同测定时间 t 时 $^{35}\text{SO}_4^-$ 通透人红细胞膜流入的量

t (分)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
$y^t(\text{CPM})$	74.0	140.3	216.5	303.0	441.7

SO_4^- 通透人红细胞膜流入测定的实验结果见表2,现将 y^t , CV 和 CS 各值代入公式(6),计算结果列入表3中。根据表3,作出 SU 对时间 t 的座标图(图3),图象清楚地表示, SU 与时间的关系成一直线,因此, SO_4^- 通透红细胞膜的流入初速度由公式(7)得

$$\begin{aligned} ^1J_s &= \frac{dsu}{dt} = 2.9 \text{ 微克分子数 } \text{SO}_4^- \\ &\quad \times 1 \text{ 毫升红细胞}^{-1} \times \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

表3 不同测定时间 t 时流入红细胞的 so_4^- 量

t (分)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
SU (微克分子数×1毫升 红细胞 ⁻¹)	1.44	2.73	4.22	5.90	8.60

三、小 结

关于Donnan平衡状态下的流速测定,从实验方法中已知,首先要使被测物达到细胞内外平衡。这对于通透速度较快的物质,如一些无机阴离子,只需将完整的红细胞悬浮在适当的pH,温度和电解质成分(包括一定浓度的被

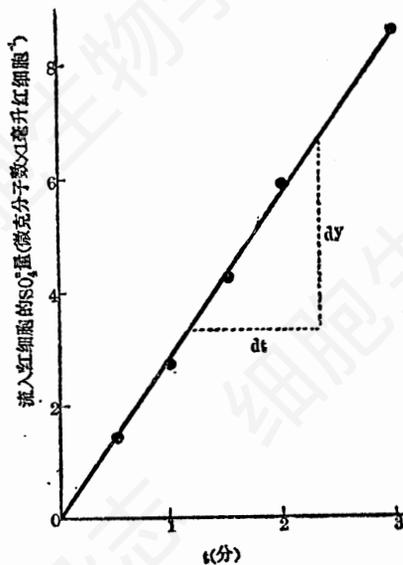


图3 SO_4^{2-} 透入人红细胞膜流入量对时间的坐标图

测非标记物质和放射性同位素标记物质)的平衡液中,温育适当时间,就能达到平衡。平衡后,如进行流出测定,必须将细胞外的示踪物尽量洗涤去净,方能开始实验。但是,对于通透速度很慢的被测物,用温育平衡的方法实际上难以达到,例如在肌酸分子通透红细胞膜的实验中,即使温育时间长达25小时之久,也未能达到平衡^[9],因此,对此类物质的流出测定,必需制备重新封闭的红细胞膜空泡^[9]。将放射性和非放射性被测物装入细胞膜空泡内,并使被测物达到细胞膜空泡内外的平衡。

在物质通透细胞膜的流速测定中,有一个很值得注意的技术性问题,这就是如何使细胞与流速测定液很快分离的问题。在表1和表2中的 y^t 表示当时间为 t 时,示踪物从细胞膜的一边流入另一边的放射性量,这必须在该时刻 t 时,立即停止被测物继续通透细胞膜而流动,否则所得的 y^t 并非时间 t 时刻的放射性计数。为此,一般根据某种被测物通透某细胞膜的速度快慢而决定选择何种方法。通常,对于流速较慢的物质,可采用离心分离技术;而对于流速较快的物质,离心技术无法进行,因为

离心时间间隔至少需要2—3分钟,因此可采用过滤技术^[7],即当细胞悬液被抽滤通过微孔滤膜时,使细胞与流速测定液分开。某些离子通透红细胞膜的速度极快,如 Cl^- 通透红细胞膜的半衰期(意指达到平衡所需要的一半时间)等于4秒钟,如此快速通透细胞膜,给实验操作带来很大的困难。由于近年来对细胞膜输送抑制剂的深入研究,发现4,4'-二异硫氰基二氢芪-2,2'-二磺酸(缩写为 $\text{H}_2\text{DIDS}^{**}$)具有对 Cl^- 和 SO_4^{2-} 等离子通透红细胞膜的不可逆性抑制效应,并且它的最大抑制效率可达百分之百^[8]。按此原理,当细胞悬液注入含有 H_2DIDS 的终止液(配制最大抑制效率的浓度)中时,细胞膜两边的 Cl^- 或 SO_4^{2-} 立即停止交换流动,这就叫做抑制剂终止技术,它足以每隔2秒钟取一样品^[9]。

测定某一离子或分子通透细胞膜的速度,按照不同的研究目的,可作多种不同的实验设计,常用的有:同种物质的平衡交换测定($S_{\text{内}} = S_{\text{外}}$);异种物质的平衡交换测定($S_{\text{内}}^1 = S_{\text{外}}^2$);同种物质的不平衡交换测定($S_{\text{内}} \neq S_{\text{外}}$)和逆浓度交换测定($S_{\text{内}} > S_{\text{外}}$ 或 $S_{\text{内}} < S_{\text{外}}$)等。它们的交换动力学特征由具体实验而定。本文所介绍的内容属于同种物质的平衡交换,并且以 SO_4^{2-} 通透红细胞膜的流出速度符合简单指数方程、流入时间曲线为一线性关系为例,这仅是提供一种细胞膜输送一种离子的特殊例子。其实,溶质通透细胞膜的流速测定极为复杂,它决定于不同被测物通透不同的细胞膜的输送动力学特点,一般可通过测定它们的 V_{max} 值(最大输送速度)和 K_m 值(最大输送速度的一半所对应的被测物浓度),然后按Michealis-Menten公式进行数学计算。

近年来,随着膜输送动力学的深入研究,越来越多的人对细胞在正常与病理情况下,甚至在细胞老化过程中,它们的膜输送功能所发

** H_2DIDS : 4,4'-diisothiocyano dihydrostilbene-2,2'-disulfonic acid.

生的变化感兴趣。开展广泛的细胞膜输送功能研究,这不仅仅是为了认识某种物质通透某一细胞膜的机理,弄清离子或分子究竟是通过什么输送系统从膜的一边通透到膜的另一边,更重要的是它必将能够提出和建立广义理论,找到膜输送功能的普遍规律,促进膜工艺的新发展。

参 考 文 献

- [1] Lepke, S. and Passow, H. 1971 *J. Membrane Biol.*, 6: 158—182.
- [2] Schnell, K. F., Gerhardt, S., Schoppe-Fredenburg, A. 1977 *J. Membrane Biol.*, 30: 319—350.
- [3] Gardos, G., Hoffman, J. F., Passow, H. 1969 In: *Laboratory Techniques in Membrane Biophysics*, (Passow, H. and Stampfli, R. Eds.) Springer Verlag, P. 8—20.
- [4] Poensgen, J. and Passow, H. 1971 *J. Membrane Biol.*, 6: 210—232.
- [5] Ku Chuan-pao and Passow, H. 1980 *Biochim. Biophys. Acta*, 600: 212—227.
- [6] Bodemann, H. and Passow, H. 1972 *J. Membrane Biol.*, 8: 1—26.
- [7] Dalmark, M. and Wieth, J. O., 1972 *J. Physiol.*, 224: 583—610.
- [8] Lepke, S., Fasold, H., Pring, M. and Passow, H. 1976 *J. Membrane Biol.*, 29: 149—177.
- [9] Ku Chuan-pao, Jennings, M. L. and Passow, H. 1979 *Biochim. Biophys. Acta*, 553: 132—141.

简 讯

中国细胞生物学学会在中国科学院 上海生理研究所举办冻冰蚀刻样品制备学习班

1983年3月22日—3月28日,中国科学院上海生理研究所电镜室,受中国细胞生物学学会的委托,开办了一期冰冻蚀刻样品制备学习班。

这次学习班的目的是推广冰冻蚀刻技术的应用。学习班的主要内容是讲解冰冻蚀刻的原理、具体操作、图象分析和应用。首先由生理所黄世楷副教授介绍冰冻蚀刻的基本原理。其次由生理所张铁峰同志以小白鼠的肝脏标本为例讲解操作步骤和作示范表演。然后由每个学员具体操作,要求基本上学会。最后由细胞所

曾弥白教授讲解图象分析及介绍此技术在细胞生物学方面的应用。

这次学习班只收16名学员,以南方为主,少数边远地区适当照顾。学员们认为这种类型的学习班很好,时间短、内容明确、达到目的。他们为这次学习班送了六个字“少而精,学到手。”最后学员们希望细胞生物学学会能多举办这样的学习班,以满足四化的需要。

中国科学院上海生理研究所

张铁峰 1983年4月