胞内、胞外钙对花生四烯酸刺激的人嗜中性白细胞呼吸爆发的调控

揣少坤 胡天惠 刘 江 沈 恂*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101. * 联系人, Email: shenxun@sun5.ibp.ac.cn)

摘要 呼吸爆发是人嗜中性白细胞行使杀菌功能的重要生理反应. 用化学发光方法测量外源花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞在体外的呼吸爆发, 用荧光探针标记法测量嗜中性白细胞内的自由钙离子浓度, 发现用细胞内质网膜上 Ca^{2+}-ATP 酶的抑制剂 thapsigargin 升高细胞内自由钙离子浓度后, 花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发增强, 而用 EGTA 或 BAPTA 螯合胞外或胞内钙离子则会抑制花生四烯酸刺激的呼吸爆发. 这些实验结果表明, 钙离子在外源的花生四烯酸刺激嗜中性白细胞呼吸爆发的信号通路中起重要的调控作用. 同时, 细胞膜上钙离子通道阻断剂三七总皂甙对这一呼吸爆发过程的抑制作用提示胞外钙离子的内流在花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞呼吸爆发中起重要作用.

关键词 花生四烯酸 嗜中性白细胞 呼吸爆发 化学发光 胞内钙 胞外钙

嗜中性白细胞是人体防御系统的一个重要细胞, 它通过吞噬和释放大量的超氧阴离子及其转化的氧自由基杀死入侵细菌. 这一过程中嗜中性白细胞通过旁路己糖支路大量耗氧, 故称为"呼吸爆发"[1]. 花生四烯酸是存在于嗜中性白细胞中的一种重要的脂肪酸, 内源的花生四烯酸是花生酸类物质和许多生物分子的前体, 而外源的花生四烯酸可以刺激嗜中性白细胞的呼吸爆发[2,3]. 近年来, 越来越多的实验证据表明, 花生四烯酸在心肌局部缺血再灌注引起的心肌细胞损伤中占有重要位置. 有文献报道, 心肌缺血会导致膜磷脂的网状降解及脂肪酸, 包括花生四烯酸的大量堆积, 而缺血组织的再灌注会造成脂肪酸继续进一步堆积[4~6]. 同时又发现, 在心肌缺血部位总有大量的嗜中性白细胞聚集, 并且这些嗜中性白细胞总是在该处被不适当地激活, 发生呼吸爆发, 释放出大量的超氧阴离子和氧自由基. 正是这些自由基干扰了心肌细胞的收缩, 破坏线粒体和质膜, 造成心肌细胞的不可逆损伤[7,8]. 由此可见, 研究花生四烯酸刺激嗜中性白细胞呼吸爆发的信号转导对于阐明心肌缺血后再灌注损伤的机理和采取防护措施具有重要的意义.

过去普遍认为外源花生四烯酸刺激呼吸爆发反应是通过直接刺激 PKC 完成而不依赖于钙离子的[9]. 近年来尽管有实验证据表明花生四烯酸可以通过促使外钙内流引起嗜中性白细胞的胞内钙浓度升高[10], 并且发现外源的核苷酸 (如 ATP)在引起嗜中性白细胞胞内钙浓度瞬时升高的同时也会增加花生四烯酸引起的嗜中性白细胞呼吸爆发的强度[11], 但是对于胞内、胞外钙对花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞呼吸爆发的调控, 以及钙离子在花生四烯酸引起的细胞呼吸爆发的信号通路中可能起到的作用未见有系统的研究报道. 我们用化学发光法检测嗜中性白细胞呼吸爆发的强度和动力学, 用荧光探针标记的方法检测嗜中性白细胞内钙离子的浓度, 用内质网膜上 Ca^{2+}-ATP 酶的抑制剂 thapsigargin (缩写为 TG)释放胞内钙库中的钙以提高胞内钙离子浓度, 用胞内、胞外钙离子螯合剂 BAPTA 和 EGTA 降低胞内外钙离子浓度, 以

及用胞膜上钙通道的抑制剂三七总皂甙封闭细胞质膜上的钙通道，对钙离子调控花生四烯酸刺激的呼吸爆发的规律做了较为详细的研究，从而对花生四烯酸诱导嗜中性白细胞呼吸爆发的信号通路有了进一步的认识.

1 材料与方法

(ⅰ) 试剂与溶液. 花生四烯酸, thapsigargin, EGTA, U73122, U73343 均购自 Sigma 公司. Fura-2/AM, BAPTA 购自 Molecular Probe 公司. 三七总皂甙购于云南昆明制药厂，其主要成分为人参二醇和人参三醇. 其他试剂为国产分析纯. Hank 平衡盐溶液(HBSS)的配方为：8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 1 g/L 葡萄糖, 60 mg/L KH_2PO_4, 47.5 mg/L Na_2HPO_4, 调 pH 至 7.2.

(ⅱ) 嗜中性白细胞的提取. 嗜中性白细胞由新鲜的人血中提取，提取方法参照文献[12].

(ⅲ) 呼吸爆发的测量. 嗜中性白细胞的呼吸爆发由化学发光法测量，细胞悬浮在 Hank 平衡盐溶液(HBSS)中，浓度为 1×10^6 细胞/mL. 测量前，细胞悬液中加入 Luminol (终浓度为 100 ng/mL). 等体积的上述细胞悬液分别作为实验样品和对照加入两个完全相同的荧光杯中，把它们放入自制的化学发光仪的旋转样品室中，在 37℃下由一个光电倍增管对实验样品和对照细胞的化学发光不断地交替计数. 当嗜中性白细胞发生呼吸爆发时，细胞悬液中产生的大量超氧阴离子及其衍生的过氧化氢与 Luminol 反应发光，发出的光子被光电倍增管接收. 由于样品与对照是在几乎完全相同的条件下同时被检测，因此极大地减少了由细胞活性、呼吸爆发强度随时间变化所带来的误差.

(ⅳ) 细胞内钙离子浓度的测量. 胞内钙浓度的检测参照文献[13]，具体步骤简述如下：1×10^6 个/mL 的细胞悬液与 1 μmol/L 荧光探针 fura-2 于 37℃下孵育 45 min 后，用 HBSS 漂洗细胞 3 次，以清除胞外的游离探针. 将孵育好的细胞悬液置于荧光杯中，在日立 F4500 双波长荧光仪上同时测量 340 和 380 nm 两个激发光下细胞在 510 nm 波长处发射的荧光强度. 胞内钙离子浓度由以下公式计算:

$$[Ca^{2+}]_i = [K_d (R-R_{min})/(R_{max}-R)](F_{380,max} / F_{380,min}),$$

其中 K_d 为钙离子与 fura-2 的解离常数(224 nm); $R = F_{340}/F_{380}$; $R_{max} = F_{340,max} / F_{380,max}$; $R_{min} = F_{340,min}/F_{380,min}$; F_{340} 和 F_{380} 分别为 340 和 380 nm 激发下的荧光发射强度, $F_{340,max}$, $F_{340,min}$, $F_{380,max}$ 和 $F_{380,min}$ 分别为 fura-2 被钙离子饱和和无钙时在 340 和 380 nm 激发下的荧光发射强度.

2 结果与讨论

2.1 胞内钙浓度的升高对花生四烯酸刺激嗜中性白细胞呼吸爆发的影响

在细胞悬液中加入不同浓度 TG 后，测定了胞内钙浓度的变化，结果如图 1(b)所示. 可以看到：加入 TG 后，胞内自由钙浓度$[Ca^{2+}]_i$逐渐升高，约 600 s 后达到稳定，且$[Ca^{2+}]_i$的升高值随着 TG 浓度的增加而增大，加入 500 nmol/L TG 后约 10 min，胞内钙浓度可由 120 nmol/L 升至 600 nmol/L. 同时，图 1(a)记录了相应浓度 TG 处理后嗜中性白细胞呼吸爆发强度的变化. 两图对照可以明显地看出：随着胞内钙浓度的升高，花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞呼吸爆发的强度增强. 加入 500 nmol/L TG 后 10 min 再加入 50 μmol/L 花生四烯酸所引起的呼吸爆发强度比对照(未加 TG，加入同样浓度花生四烯酸)增强 5 倍左右. 加入的 TG 浓度越高，胞内钙浓度升高量越大，相应的呼吸爆发强度也越大. 但花生四烯酸刺激嗜中性白细胞呼吸爆

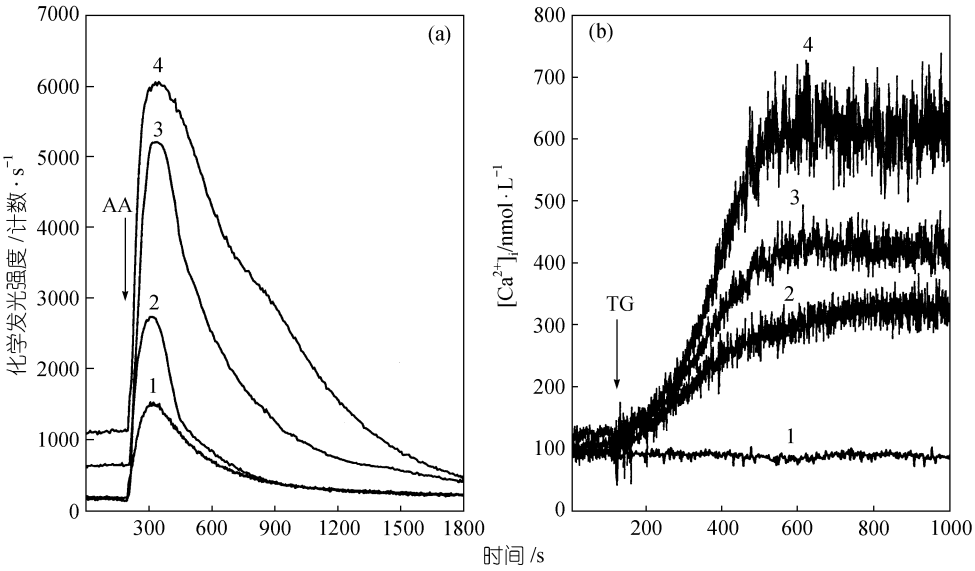

图 1 不同浓度 thapsigargin (TG) 处理后，人嗜中性白细胞的胞内钙浓度(b)和 TG 处理后由 50 μmol/L 花生四烯酸 (AA) 刺激的呼吸爆发(a)

细胞悬浮在 2 mL 含有 1.3 mmol/L $CaCl_2$ 的 HBSS 中(1×10^6 细胞/mL). 1 示未经 TG 处理的对照; 2~4 分别示 20, 100, 500 nmol/L TG 处理的细胞. 细胞用 TG 37℃处理 5 min 后，加入 50 μmol/L 花生四烯酸，测量其化学发光强度

发的动力学并不随着胞内钙浓度的变化而变化. 实验表明，花生四烯酸刺激嗜中性白细胞的呼吸爆发的信号通路是依赖于细胞内的自由钙离子的.

2.2 螯合细胞内钙和外钙对花生四烯酸刺激嗜中性白细胞呼吸爆发的影响

为了进一步研究花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发对细胞外钙和内钙的依赖性，我们分别记录了加入细胞外钙和内钙螯合剂 EGTA 和 BAPTA 5 min 后花生四烯酸刺激嗜中性白细胞的呼吸爆发动力学曲线(图 2). 由图可见，用 2 mmol/L EGTA 螯合细胞外钙后 5 min 再加入花生四烯酸,呼吸爆发被抑制 80%左右. 用 5 μmol/L BAPTA 螯合细胞内钙 5 min 后再加入花生四烯酸，呼吸爆发被抑制 80%左右. 单独螯合细胞外钙或内钙都不能完全抑制细胞的呼吸爆发. 而当同时用 2 mmol/L EGTA 和 5 μmol/L BAPTA 将内钙和外钙都螯合后，花生四烯酸刺激嗜中性白细胞的呼吸爆发被完全抑制. 说明花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发是依赖于钙离子的，当细胞内外均无自由钙离子时，呼吸爆发完全不能发生；另外也说明细胞内钙或细胞外钙的单独存在都不能使嗜中性白细胞在受到外源花生四烯酸刺激时进行充分的呼吸爆发，即这一呼吸爆发的完整的信号通路需要细胞内和细胞外钙离子的同时参与.

2.3 钙离子通道阻断剂三七总皂甙对花生四烯酸刺激嗜中性白细胞呼吸爆发的抑制

为了进一步研究细胞内钙和外钙在花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞呼吸爆发中的调控作用，我们测定了不同浓度三七总皂甙处理嗜中性白细胞后花生四烯酸刺激的呼吸爆发(图 3). 三七总皂甙中的主要成分人参二醇和人参三醇都是三萜化合物，是胞膜上的钙离子通道的抑制剂，可以抑制细胞外钙离子的内流[14]. 如图 3 所示，100 μg/mL 三七总皂甙预处理嗜中性白

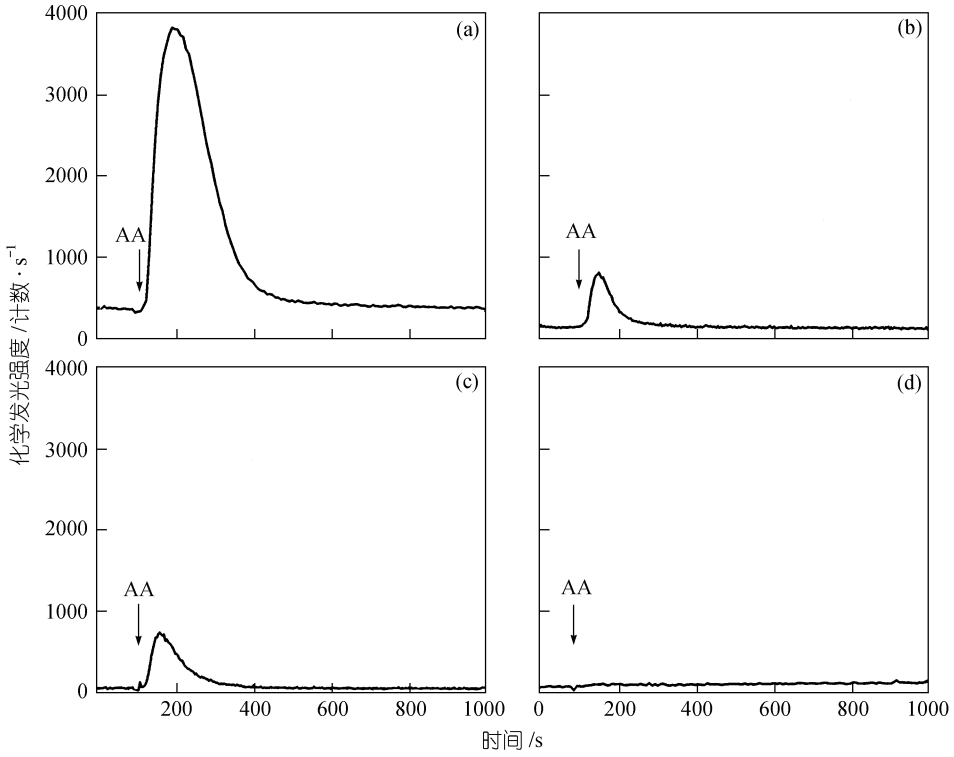

图 2 EGTA 与 BAPTA 对花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发的抑制

实验条件同图 1. (a) **示未加** EGTA **和** BAPTA **的对照;**(b) ~(d)**分别示** 2 mmol/L EGTA, 5 μmol/L BAPTA, 2 mmol/L EGTA + 5 μmol/L BAPTA **处理的细胞. 细胞由** EGTA **和** BAPTA 37℃**处理** 5 min **后, 加入** 50 μmol/L **花生四烯酸, 测量其化学发光强度**

细胞 5 min **后, 花生四烯酸刺激的呼吸爆发被抑制** 50%, **而** 200 **和** 500 μg/mL **的三七总皂甙分别可以抑制** 80%**和** 92%**的呼吸爆发. 当三七总皂甙的浓度高于** 500 μg/mL **时, 它对呼吸爆发的抑制程度不再升高(未显示), 说明细胞膜上所有钙离子通道均被三七总皂甙阻断, 即细胞外钙离子的内流被完全阻断, 这时的呼吸爆发仅由胞内钙库释放的钙离子维持. 同时, 三七总皂甙对呼吸爆发的抑制作用说明了外钙的内流在花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发过程中起重要的作用. 花生四烯酸可以引起包括嗜中性白细胞在内的许多细胞的外钙内流, 从**

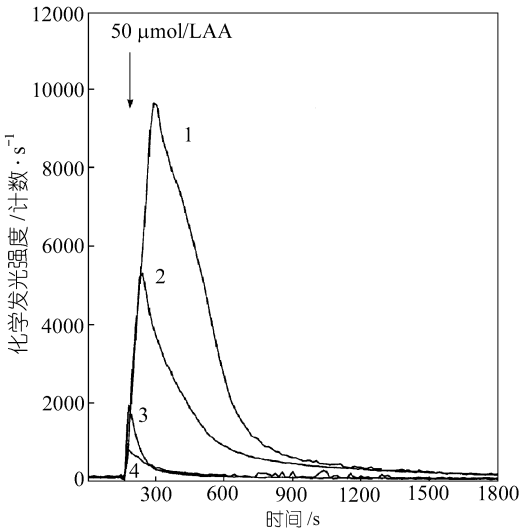

图 3 三七总皂甙对花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发的抑制

实验条件同图 1. 1 **示未经处理的对照;** 2~4 **分别示** 100, 200, 500 μg/mL **三七总皂甙处理的细胞. 细胞由三七总皂甙** 37℃**处理** 5 min **后, 加入** 50 μmol/L **花生四烯酸, 测量其化学发光强度**

而导致胞内钙浓度大幅度升高，这一现象早有报道[15,16]，但它与花生四烯酸刺激的呼吸爆发的关系却未被研究过. 我们的实验结果说明，花生四烯酸刺激嗜中性白细胞的呼吸爆发不仅需要胞内、胞外钙离子的协同作用，而且这种协同作用是通过胞外钙内流来实现的.

3 结论

在花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞的呼吸爆发中，细胞外钙和内钙都起着重要的调节作用. 一方面，细胞内钙离子浓度的升高可以明显地增强呼吸爆发；另一方面，细胞外钙的内流在维系胞内钙浓度的升高和呼吸爆发的进行上起着举足轻重的作用. 因此可以认为，花生四烯酸刺激的嗜中性白细胞呼吸爆发的信号通路与胞内、胞外的钙离子是密切相关的.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目 (批准号: 39670205).

参 考 文 献

1 Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. Physiol Rev, 1993, 73(4): 797~803

2 Khan W A, Blobe G C, Hannun Y A. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. Cell Signal, 1995, 7(3): 171~184

3 Curnutte J T, Badwey J A, Robinson J M, et al. Studies on the mechanism of superoxide release from human neutrophils stimulated with arachidonate. J Biol Chem, 1984, 259: 11851~11857

4 Chien K R, Han A, Sen A, et al. Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium. Circ Res, 1984, 54: 313~322

5 Engels W, van Bilsen M, de Groot M J, et al. Ischemia-induced arachidonic acid accumulation and prostanoid release during reperfusion in the isolated rat heart. Prog Clin Biol Res, 1989, 301: 175~179

6 van der Vusse G J, Reneman R S, van Bilsen M. Accumulation of arachidonic acid in ischemic/reperfused cardiac tissue: possible causes and consequences. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997, 57(1): 85~93

7 Servi S, Ricevuti G, Mazzone A, et al. Granulocyte function in coronary artery disease. Am J Cardiol, 1991, 68: 64B~68B

8 Siminiak T, Ozawa T. Neutrophil mediated myocardial injury. Br J Biochem, 1993, 25(2): 147~156

9 Mcphail L C, Clayton C C, Snyderman R. A potential second messenger role for arachidonic acid: activation of Ca^{2+}-dependent protein kinase. Trans Assoc Am Physicians, 1984, 97: 222~231

10 Beaumier L, Faucher N, Naccache P H. Arachidonic acid-induced release of calcium in permeabilized human neutrophils. FEBS Lett, 1987, 221(2): 289~292

11 Axtell R A, Sandborg R R, Smolen J E, et al. Exposure of human neutrophils to exogenous nucleotides causes elevation in intracellular calcium, transmembrane calcium fluxes, and an alteration of a cytosolic factor resulting in enhanced superoxide production in response to FMLP an arachidonic acid. Blood, 1990, 75(6): 1324~1332

12 贝 泠，胡天惠，沈 恂. 一种改进的分离嗜中性白细胞的方法. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4): 359~363

13 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440~3450

14 Guan Y Y, Kwan C Y, He H, et al. Effects of *Panax* notoginseng saponins on receptor-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle. Acta Pharm Sinica, 1994, 15(5): 392~398

15 Naccache P H, McColl S R, Caon A C, et al. Arachidonic acid-induced mobilization of calcium in human neutrophils: evidence for a multicomponent mechanism of actin. J Pharmacol, 1989, 97(2): 461~468

16 Alonso M T, Sanchez A, Garcia-Sancho J B. Arachidonic acid-induced calcium influx in human platelets. Comparison with the effect of thrombin. Biochem J, 1990, 272(2): 435~443

(2000-03-09 收稿, 2000-05-19 收修改稿)