

α -石英对离体巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 的影响

温和瑞 王金晞 凌静 张宇 杨震 陈荣三

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

张祖暄

(南京大学医学院, 南京 210008)

本文用荧光试剂 Fura-2/AM 和 AR-CM-M1C 阳离子测定系统研究了 α -石英对离体肺泡巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 的影响。结果表明: 在含 Ca^{2+} 介质中, α -石英对巨噬细胞的毒性作用引起胞浆游离 Ca^{2+} 浓度的升高, α -石英剂量越大或作用时间增长, 胞浆游离 Ca^{2+} 浓度升高越大, 这种效应只能部分地被 Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定所阻断。但在无 Ca^{2+} 介质中未观察到细胞胞浆游离 Ca^{2+} 浓度升高的现象。

关键词: 巨噬细胞 α -石英 游离 Ca^{2+}

前 言

α -石英对肺泡巨噬细胞的毒性作用是硅肺发生的第一步重要反应^(1,2)。近年来的研究表明, Ca^{2+} 在 α -石英诱发的巨噬细胞毒性作用中起着重要作用⁽³⁾。我们实验室发现, 实验硅肺大鼠的肺组织匀浆中 Ca^{2+} 浓度明显升高⁽⁴⁾。但对于 Ca^{2+} 在硅肺组织中的积累过程及机理尚不很清楚。为了进一步弄清硅肺发生与细胞内游离 Ca^{2+} 的相关性, 本文使用 AR-CM-M1C 型高灵敏度细胞阳离子测定系统, 研究了 α -石英诱发的肺泡巨噬细胞毒性作用过程中, 细胞胞浆游离 Ca^{2+} 浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化, 得到若干有意义的结果, 为进一步弄清硅肺的发生机制提供了重要参考。

实 验 方 法

一. 仪器与主要试剂

AR-CM-M1C 型单细胞阳离子测定系统(美国, SPEX 公司)。AFX-DX 型倒置荧光显微镜(日本, Nikon 公司)。1815 TC 型 CO_2 培养箱(美国, Shelter 公司)。

Fura-2/AM, Ionomycin, 异搏定(Verapamil), 均购自美国 Sigma 公司。N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸(HEPES, 生化试剂)。标准 α -石英粉尘($\bar{D}_n < 5\mu\text{m}$, 中国预防医学科学院制)。小牛血清(生化试剂, 国产特级)。其他试剂均为国产 A.R. 级。

二. 细胞悬液的制备

家兔(2-3kg, 性别不分)股动脉放血处死, 用 0.9% 的灭菌生理盐水经肺灌洗获得巨噬细胞。用细胞外标准溶液⁽⁵⁾ 配成 $4-5 \times 10^5 / \text{ml}$ 的细胞悬液备用。

三. 荧光试剂的负载

荧光试剂 Fura-2/AM 溶液(溶于二甲亚砜)40 μl 和灭活小牛血清 4ml 混合后, 超声振荡 5 分钟, 然后加到 40ml 的细胞悬液中(Fura-2/AM 终浓度为 $1\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 充分混匀, 于 CO_2 培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 孵育 20 分钟. 然后 1000rpm 离心, 弃上层清液, 用细胞外标准液洗涤细胞两次, 以洗去细胞外所附的荧光试剂. 细胞分别用含 Ca^{2+} 介质无 Ca^{2+} 介质配成 $4-5 \times 10^5 / \text{ml}$ 的细胞悬液. 含 Ca^{2+} 介质组成($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$): NaCl 140, KCl 4.7, CaCl_2 1.2, MgCl_2 1.13, 葡萄糖 10, HEPES 10. 含 0.2% 的灭活小牛血清, pH=7.2. 无 Ca^{2+} 介质组成($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$): NaCl 141.8, CaCl_2 0, 其他成份与含 Ca^{2+} 介质相同.

四. α -石英与细胞的作用及荧光强度的测定

在负载有 Fura-2/AM 的细胞悬液中分别加入 α -石英粉尘和异搏定, 于 CO_2 培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 孵育不同的时间, 取出 1000rpm 离心, 弃上层清液, 细胞用含 Ca^{2+} 介质或无 Ca^{2+} 介质洗涤后, 立即在阳离子测定系统上测定单个活细胞的荧光强度. 激发波长分别为 340nm 和 380nm, 发射波长为 505nm.

五. 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的计算

Fura-2/AM 进入细胞后, 在胞浆酯酶的作用下, 水解释放出 Fura-2. Fura-2 与 Ca^{2+} 结合形成 Fura-2-Ca. 根据荧光的比值按下式来计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ⁽⁶⁾.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \beta (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

K_d 是 Fura-2-Ca 的离解常数, 在实验测定温度 22 $^{\circ}\text{C}$ 时, $K_d = 1.37 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, R 为实测荧光强度减去细胞的自发荧光强度后的荧光比值 F_{340} / F_{380} . R_{\max} 是胞内 Fura-2 被 Ca^{2+}

饱和时的荧光比值; R_{\min} 是胞内 Fura-2 未结合 Ca^{2+} 时的荧光比值; $\beta = \frac{F_D}{F_S}$, F_D 和 F_S 分别

表示在无 Ca^{2+} 和饱和 Ca^{2+} 状态下 380nm 的荧光强度. 按文献 ⁽⁷⁾ 方法测得 R_{\max} 、 R_{\min} 和 β 值依次为: 7.9 ± 0.42 ($n=10$), 0.62 ± 0.04 ($n=12$) 和 5.40 ± 0.46 ($n=10$).

实 验 结 果

一. 在含 Ca^{2+} ($1.2 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 介质中, α -石英对巨噬细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

1ml 含 Ca^{2+} 介质细胞悬液 4 份, 分别加入 100 μg α -石英, 400 μg α -石英, 100 μg α -石英加 5 μg 异搏定, 400 μg α -石英加 5 μg 异搏定. α -石英和异搏定同时加入细胞悬液中. 实验结果列于表 1. 结果表明, 经 1 小时孵育后, α -石英组的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高, 大剂量 α -石英组比小剂量的升高更大, 且此时 Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定对细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响不明显. 孵育 3 小时后, 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高更为显著, 不仅高于对照组, 而且高于 1 小时的 α -石英组, 但这时异搏定能部分地抑制 α -石英引起的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高.

表 1 含 Ca^{2+} 介质中, α -石英对巨噬细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 的影响
Table 1 Effect of α -Quartz on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) of Macrophage in the Ca^{2+} -Medium

group	incubating time	
	1h	3h
control	119 ± 29(8)	130 ± 61(8)
α -quartz(100 μg / ml)	198 ± 36(8) ^a	241 ± 60(7) ^a
α -quartz(400 μg / ml)	257 ± 86(1) ^{a,c}	307 ± 71(12) ^{a,b}
α -quartz(100 μg / ml) +verapamil(5 μg / ml)	184 ± 18(9) ^a	174 ± 28(7) ^{a,d}
α -quartz(400 μg / ml) +verapamil(5 μg / ml)	207 ± 40(9) ^a	191 ± 12(9) ^a

- note: 1. Each value represents the mean ± S.D..
2. Number in parenthesis represents the number of measured cells.
3. a. significantly different from the control, $P < 0.01$
b. significantly different from α -quartz(100 μg / ml), $P < 0.01$
c. significantly different from α -quartz(100 μg / ml), $P < 0.05$
d. significantly different from α -quartz(400 μg / ml), $P < 0.01$

二. 在无 Ca^{2+} 介质中, α -石英对巨噬细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

1ml 无 Ca^{2+} 介质细胞悬液 4 份, 各组所加入 α -石英和异搏定的剂量与含 Ca^{2+} 介质的相同. 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化见表 2. 可见, α -石英与细胞作用后, 与对照组比较, 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无显著性差异 ($P > 0.05$). 这说明 α -石英引起的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是由于外 Ca^{2+} 内流所致.

表 2 无 Ca^{2+} 介质中, α -石英对巨噬细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 的影响

Table 2 Effect of α -Quartz on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) of Macrophage in the Absence of Ca^{2+}

group	incubating time	
	1h	3h
control	121 ± 26(10)	106 ± 20(10)
α -quartz(100 μg / ml)	130 ± 15(8)	119 ± 19(8)
α -quartz(400 μg / ml)	122 ± 29(11)	123 ± 24(12)
α -quartz(100 μg / ml) +verapamil(5 μg / ml)	120 ± 20(12)	118 ± 34(8)
α -quartz(400 μg / ml) +verapamil(5 μg / ml)	137 ± 28(10)	120 ± 43(8)

- note: 1. Each value represents the mean ± S.D..
2. Number in parenthesis represents the number of measured cells.

讨 论

图 1 和图 2 反映离子载体 Ionomycin 对细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响. 图 1 记录同一细胞的荧光强度变化, 细胞在 $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 介质中, 开始荧光强度无明显变化. 当加入 Ionomycin 时, 由于 Ionomycin 把细胞外 Ca^{2+} 载入细胞内, 使细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速增高, 故在 340nm 处的荧光强度增强, 而在 380nm 处的则减弱. 当加入 EGTA 后, 由于外 Ca^{2+} 被结合, 胞内 Ca^{2+} 又被

Ionomycin 载出, 使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 又迅速下降, 于是在 340nm 和 380nm 处的荧光强度发生了和前面相反的变化。图 2 是将荧光信号转换成细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化曲线。以上实验证明所用仪器是正常的, 测定方法是可行的。

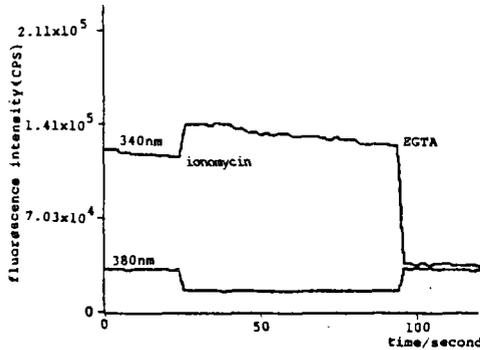


图 1 细胞荧光信号强度记录
Fig.1 Fluorescence intensity 340 and 380 nanometers

图 2 胞浆游离 Ca^{2+} 浓度变化
Fig.2 Change of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration

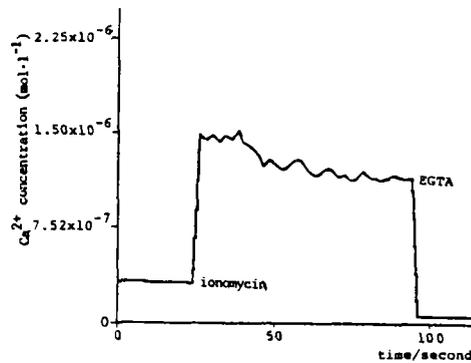


表 1 和表 2 结果表明, 在含 Ca^{2+} 介质中, α -石英对巨噬细胞的毒性作用, 使细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。且随 α -石英剂量的增加或作用时间的增长, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高越大。这种 α -石英诱发的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高只能部分地被 Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定所阻断, 说明细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高不完全是由于 α -石英作用使细胞膜钙通道兴奋所引起的外 Ca^{2+} 内流所致。而且可能与细胞膜损伤有关。过去的研究发现, 与 α -石英作用后的巨噬细胞的细胞器受到明显的结构损伤⁽⁸⁾, 细胞膜通透性增大⁽⁹⁾。Allison⁽¹⁾ 认为巨噬细胞吞噬 α -石英粉尘后, 溶酶体首先受到损伤, 溶酶体破裂释放出的水解酶对细胞内的其他细胞器产生损伤作用, 最终导致细胞崩解死亡。但 Kane⁽³⁾ 发现, α -石英诱发的巨噬细胞死亡与溶酶体破裂无直接关系, 但与细胞外介质中的 Ca^{2+} 有关。他认为 α -石英首先是破坏了细胞膜的结构和功能, 大量内流的 Ca^{2+} 对细胞内部结构进一步产生损伤作用, 导致细胞死亡。限于当时的条件, Kane 没有测定细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化, 我们的实验进一步证明了他的观点。因此, 可认为 α -石英的细胞毒性作用是由于 α -石英破坏了细胞的膜结构和离子调控机制, 引起大量的细胞外 Ca^{2+} 内流, 使细胞内 Ca^{2+} 超载, 造成细胞内部结构的进一步损伤, 最终导致细胞的崩解死亡, 这很可能是 α -石英致硅肺作用的病理生理学基础。

参 考 文 献

- (1) Allison, A. C. et al., *J. Exp. Med.*, **124**, 141(1966).
- (2) Heppleston, A. G. et al., *Nature*, **214**, 521(1967).
- (3) Kane, A. B. et al., *J. Cell Biol.*, **87**, 643(1980).
- (4) 毛 延、陈荣三等, *无机化学*, **3**(4), 12(1987).
- (5) Yule, D. I. et al., *FEBS Letters*, **239**, 358(1988).
- (6) Gryniewicz, G. et al., *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440(1985).
- (7) McDonough, P. M. et al., *Cell Calcium*, **10**, 171(1989).
- (8) Merchant, R. K. et al., *J. Appl. Physiol.*, **68**, 1354(1990).
- (9) Nadler, S. et al., *J. Histochem, Cytochem.*, **18**, 368(1970).

EFFECTS OF α -QUARTZ ON THE CONCENTRATION OF CYTOPLASMIC FREE CALCIUM ION OF THE MACROPHAGE IN VITRO

Wen Herui Wang Jinxi Ling Jing Zhang Yu Yang Zhen Chen Rongsan

(*Coordination Chemistry Institute, Coordination Chemistry State Key*

Laboratory, Nanjing University, Nanjing 210008)

Zhang Zuxuan

(*Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008*)

In this paper, with fluorescence solvent Fura-2/AM and AR-CM cation measurement system to study the effects of α -quartz on the concentration of cytoplasmic free Ca^{2+} of the macrophage in vitro. The results are mainly as follows: In the Ca^{2+} - medium, the poisonous function of α -quartz to alveolar macrophage leads to the increase of the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. The higher the concentration of the α -quartz dust suspension, or the longer the time of action, the greater the increase of the concentration of cytoplasmic free Ca^{2+} . However, Ca^{2+} channel blocker verapamil can partly inhibit the increase of the concentration of cytoplasmic free Ca^{2+} . But in the absence of Ca^{2+} , the concentration of cytoplasmic free Ca^{2+} doesn't increase.

Keywords: macrophage α -quartz free Ca^{2+}