

大黄素升高豚鼠结肠带细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的特征 和 GDP 的抑制作用

杨文修, 王 津, 李俊英, 余 奕, 许文胜

(南开大学生物物理系, 天津 300071)

摘要: 利用 Fluo-3 荧光探针检测细胞内自由 Ca^{2+} 浓度 ($[Ca^{2+}]_i$), 研究了大黄素升高豚鼠结肠带细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的量—效关系和动态变化特征, 及 GDP 和胞外 Ca^{2+} 浓度对其的影响。较低浓度大黄素随药物浓度增加使 $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高, 更高浓度大黄素有超最大抑制效应。GDP 对大黄素升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的抑制作用随其浓度增加而增强。GDP 和胞外 Ca^{2+} 浓度影响大黄素诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化的结果表明: GDP 使 $[Ca^{2+}]_i$ 峰消失, 胞外无 Ca^{2+} 导致 $[Ca^{2+}]_i$ 随时间显著下降, 大黄素升高 $[Ca^{2+}]_i$ 作用趋向消失。

关键词: 大黄素; 豚鼠结肠带细胞; $[Ca^{2+}]_i$; GDP; 动力学

中图分类号 Q27 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2001)01-0065-05

豚鼠结肠带由纵行平滑肌细胞组成, 以大幅值的分节律位相性收缩为主要运动形式^[1]。大黄素(emodin)是中药大黄(Rhubarb)有效成分蒽醌类衍生物之一。我们已报道, 大黄素可促进豚鼠结肠带平滑肌细胞膜去极化, 缩短膜电位振荡周期, 增加峰电位发放频率, 从而显著增强其分节律收缩^[2]。研究发现, 豚鼠结肠带细胞膜 K_{ATP} 通道活性的变化对其膜电位振荡和分节律收缩的发生有重要作用^[3]。大黄素的作用被 K_{ATP} 通道特异性激动剂 Cromakalim 抑制, 与 K_{ATP} 通道特异性抑制剂 Glybenclamid 的作用特征相似, 但与四乙胺、 $BaCl_2$ 的作用显著不同, 表明大黄素对平滑肌细胞电和收缩活动的兴奋作用与抑制膜 K_{ATP} 通道的活性密切相关^[4]。已知激动剂通过不同的信号传导途径调节细胞内自由钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 是其兴奋肠道等平滑肌收缩活动的关键环节^[5]。为深入了解大黄素增强豚鼠结肠带电和收缩活动的细胞信号传导机制, 我们研究了大黄素升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的量—效关系和动力学特征, 并研究了鸟苷二磷酸(guanosine diphosphate, GDP)和胞外 Ca^{2+} 浓度对其的影响。

1 实验方法

1.1 试剂和药物

大黄素, 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 胶原酶 IA, Fluo-3/AM、EGTA [ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid]、GDP 购自 Sigma 公司, 其他为国产分析纯。

1.2 豚鼠结肠带细胞悬液的制备

健康豚鼠 $310 \pm 25\text{g}$, ♀ ♂ 不限。用李俊英等^[4]的方法分离豚鼠结肠带。配制含 0.1% 胶原酶、0.1% BSA 和 0.1% 大豆胰蛋白酶抑制剂的 PSS 消化液。剪碎结肠带,用 5ml 消化液先后温浴消化 10min 和 30min。用无钙的 PSS 液悬浮细胞团,3000r/min 离心 3min,去上清,洗去消化液,用吸管吹打后经尼龙网过滤。

用含 0.2% BSA 的 PSS 液悬浮细胞后,3000r/min 离心 3min,去上清,制备含 0.2% BSA 的 PSS 液的细胞悬液,细胞密度 10^6 个/ml。

1.3 用 Fluo-3 检测细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

在豚鼠结肠带细胞悬液中加入终浓度 $4\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fluo-3/AM, 37°C 避光温育 30min,并 50r/min 振荡使 Fluo-3 负载。然后 3000r/min 离心 3min,弃上清,用 PSS 液清洗后,用含 0.2% BSA 的 PSS 液悬浮待测。用 SPEX FLUOROLOG 荧光光谱仪测量荧光强度,激发波长 490nm,发射波长 526nm。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 用以下公式计算:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$$

K_d 是 Fluo-3 与 Ca^{2+} 的解离常数, 22°C 时 $K_d = 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。F 为胞外 $[\text{Ca}^{2+}]_o = 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对应的荧光强度, F_{\max} 为加入 Triton-X100 后的荧光强度, F_{\min} 为加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA 后的荧光强度。未加入 Fluo-3 前,先加入不同浓度的大黄素,检测其荧光强度,在计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 时将其作为本底值减去。

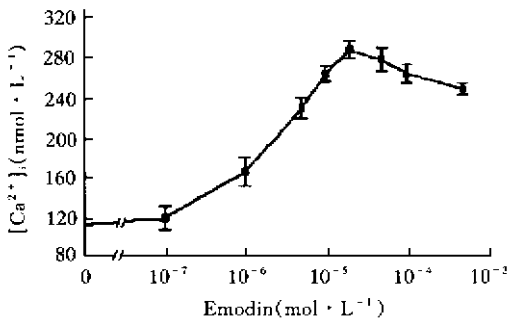


Fig.1 The relationship between emodin concentration and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in guinea pig taenia coli cells ($n=5$, $\bar{X} \pm \text{SD}$)

1.4 数据处理

以 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 和 t 检验处理数据。

2 结果

2.1 大黄素影响豚鼠结肠带细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的量一效关系

在负载有 Fluo-3 的细胞悬液各样品中,分别加入 0.1、1.0、5、10、20、50、100 和 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大黄素, 37°C 温育 10min 后,测量各样品的荧光强度,并计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。以未加大黄素的细胞悬液的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 作为对照基础值。大黄素浓度与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的量一效关系见图 1。大黄素 $1\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 开始有明显上升,随大黄素浓度增加, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著上升, $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素对应的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 达到峰值,为基础值的 2.65 倍。之后,随药物浓度增加, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 开始缓慢下降,呈现超最大剂量抑制现象。

2.2 GDP 对大黄素升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 作用的影响

在细胞悬液各样品中分别加入 0.1、0.5、1.0、5.0 和 10.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GDP,再加入 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大黄素, 37°C 温育 10min 后,检测其荧光强度,并计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,结果见表 1。与只加 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素的样品比较, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GDP 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无明显影响,而 5.0 和 $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GDP 分别使大黄素升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的作用下降了 30% 和 33%。

2.3 大黄素升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动力学特征和 GDP、胞外 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) 对其的影响

在负载 Fluo-3 的细胞悬液样品中加入 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素,分别于 37°C 温育 1、2、3、5、

Table 1 Effects of GDP on emodin stimulated the rising of $[Ca^{2+}]_i$ in guinea pig taenia coli cells($n = 5$, $\bar{X} \pm SD$, basal value as 100%, $^b p < 0.01$ vs Emodin $2 \times 10^{-5} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ induced $[Ca^{2+}]_i$ value)

Emodin ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GDP ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$[Ca^{2+}]_i$ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	%
	Base	115 ± 12	100
2×10^{-5}		291 ± 22 ^b	253
2×10^{-5}	+ 0.1	284 ± 18	247
2×10^{-5}	+ 1.0	235 ± 15 ^b	204
2×10^{-5}	+ 5.0	204 ± 14 ^b	177
2×10^{-5}	+ 10.0	194 ± 8 ^b	169

7、10、13 和 16min 后,检测各样品的荧光强度,并计算 $[Ca^{2+}]_i$ 。 $[Ca^{2+}]_i$ 随时间的变化见图 2 (a)。开始阶段, $[Ca^{2+}]_i$ 随时间迅速增加,在 3min 达到峰值,是基础值的 2.70 倍,随后缓慢下降,10min 后又逐渐上升,16min 时为基础值的 2.60 倍。同时加入 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素和 $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GDP 的样品, $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化如图 2(b)。随时间增加 $[Ca^{2+}]_i$ 缓慢上升后趋向下降,峰值消失,在 16min 时 $[Ca^{2+}]_i$ 为基础值的 1.6 倍。溶液中用 $2.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$ 取代 $2.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$, 并加入 $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EGTA, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化如图 2(c)。开始时 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速增加,约 2min 达到较低的峰值,是基础值的 2.0 倍。随后 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速下降并趋向基础值,16min 时是基础值的 1.2 倍。较正常胞外 Ca^{2+} 浓度时大黄素升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用下降了 87%。

3 讨 论

本实验结果表明,大黄素升高结肠带平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用在较低浓度时随浓度增加而增强,更高浓度大黄素对应的 $[Ca^{2+}]_i$ 趋向降低。我们已报道^[4],大黄素增强细胞分节律收缩指数的量—效关系亦呈现超最大剂量抑制效应,二者都在大黄素 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到峰值,它们的量效关系有较好的对应性,表明大黄素升高细胞内第二信使 $[Ca^{2+}]_i$ 是其增强豚鼠结肠带分节律收缩的关键环节。研究报道^[6],激动剂刺激平滑肌细胞电和收缩活动的细胞信号传导途径之一是肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)途径:激动剂与细胞膜受体结合后活化耦联的 G 蛋白,通过 $\text{PLC} \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{肌浆网 IP}_3 \text{受体} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ 释放的信号传导途径升高 $[Ca^{2+}]_i$ ^[7]。同时激动剂亦可直接或间接活化膜上的 Ca^{2+} 通道,促进胞外 Ca^{2+} 内流。细胞内

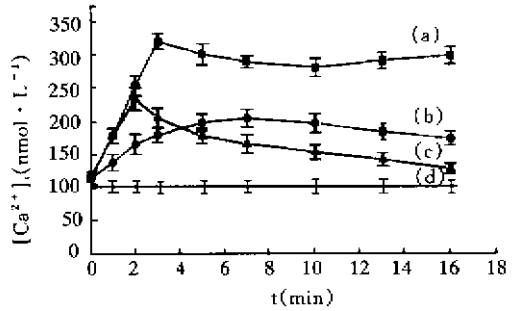


Fig.2 Time course of $[Ca^{2+}]_i$ by emodin stimulating and effects of GDP and $[Ca^{2+}]_o$ -free in Guinea pig taenia coli cells($n = 5$). (a) emodin $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b) emodin $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + GDP $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; (c) emodin $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[Ca^{2+}]_o$ -free; (d) basal

增加的 $[Ca^{2+}]_i$ 与钙调蛋白结合后,激活MLCK,进一步引发肌丝收缩。比较本实验结果的图2(a)、(b)和(c)三条 $[Ca^{2+}]_i$ 变化动力学曲线可知,胞外无 Ca^{2+} 时,大黄素仍能诱发早期出现的 $[Ca^{2+}]_i$ 峰,但幅值较低,而随后 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速下降,药物升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用趋向消失。表明大黄素诱发的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有两个来源:早期的 $[Ca^{2+}]_i$ 峰主要由于胞内肌浆网 Ca^{2+} 池释放 Ca^{2+} 产生,随后的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高则来源于胞外 Ca^{2+} 内流。Sander提出了一种肠道平滑肌慢波和峰电位发生的离子机制假说^[8,9],认为细胞膜电位自发去极化形成基础电节律,当去极化到 $-50mV$ 以上,可激活电压依赖性 Ca 通道(L型通道),胞外 Ca^{2+} 内流使膜进一步去极化,形成 Ca^{2+} 内流的正反馈过程。当膜去极化到 $-20mV$ 以上时,形成 Ca^{2+} 爆发性内流产生细胞峰电位的上升相。关于肠道平滑肌基础电节律发生机制,研究发现,其起搏活动来源于钾电导的振荡^[10]。对血管平滑肌等一些细胞的研究证明,细胞膜静息电位自发去极化是内源性因素(ATP/ADP水平)调控膜上 K_{ATP} 通道的结果^[11,12]。我们的研究已表明,大黄素能升高膜静息电位,促进膜电位去极化和周期性基础电节律的发生,进而增加峰电位发放频率,其作用机制是抑制了膜上 K_{ATP} 通道的活性^[3,4]。以上结果提示,大黄素促进胞外 Ca^{2+} 内流的机制是通过抑制膜上 K_{ATP} 通道活性,使细胞膜加速去极化,活化了膜上 Ca^{2+} 通道。另一方面,GDP对大黄素升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响主要是导致早期出现的 $[Ca^{2+}]_i$ 峰消失。已知胞内GDP的升高会降低G蛋白的活性,提示大黄素诱发的早期 $[Ca^{2+}]_i$ 峰可能与其活化受体耦联的G蛋白活性进而诱发肌浆网释放 Ca^{2+} 的信号传导通路有关。

参考文献:

- [1] Price JM, Patituai P, Fung YC. *Mechanical properties of taenia coli smooth muscle in spontaneous contraction [J]*. *Am J Physiol*, 1997,233:47-50.
- [2] 杨文修,于海鹰,许文胜,等. 大黄素对豚鼠结肠带平滑肌细胞电和收缩性能的影响[J]. 生物物理学报, 1994,10:82-86.
- [3] 李俊英,杨文修,胡文卫,等. K_{ATP} 通道活性对豚鼠结肠带平滑肌细胞电和收缩活动的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1998,14:37-39.
- [4] 李俊英,杨文修,胡文卫,等. 大黄素对豚鼠结肠带平滑肌细胞钾通道活性的影响[J]. 药理学报, 1998,35:321-325.
- [5] Clapham DE. *Calcium signaling [J]*. *Cell*. 1995,80:259-268
- [6] Walsh M P. *Calmodin and the regulation of smooth muscle contraction [J]*. *Mol cell Biochem*, 1994,135:21-41.
- [7] 李和旺. 细胞内贮存钙释放机制[J]. 生理科学进展, 1995,26:206-212.
- [8] Ward SM, Thomburg LD, Sanders KM. *Ionic current of Colonic longitudinal Smooth muscle, an action potential generating [J]*. *Biophys J*, 1991,59:234a.
- [9] Sanders KM. *Ionic mechanism of electrical rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles [J]*. *Ann Rev Physiol*, 1992,54:439-453.
- [10] Barahas-Lopez C, Hertog A D, Huizinga J D. *Ionic basis of pacemaker generation in dog colonic smooth muscle [J]*. *J Physiol*, 1989,416:385-402.
- [11] Nelson M T, Quayle JM. *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle [J]*. *Am J Physiol*, 1995,c799-822.
- [12] Yokoshiki H, Sunagawa M, Soki T, et al. *ATP-Sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells [J]*. *Am J Physiol*, 1998,274(cell physiol,43):C25-28.

CHARACTERISTICS OF EMODIN EVOKED $[Ca^{2+}]_i$ AND INHIBITION OF GDP IN GUINEA PIG TAENIA COLI CELLS

YNAG Wen-xiu, WANG Jin, LI Jun-ying, YU Yi, XU Wen-sheng
(*Department of Biophysics, Nankai University, Tianjin 300071, China*)

Abstract: Intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was detected using Fluo-3 fluorescence probe. Relationship between emodin concentration and intracellular $[Ca^{2+}]_i$ as well as kinetics of $[Ca^{2+}]_i$ in guinea pig taenia coli cells were studied. In the range of lower emodin concentration, $[Ca^{2+}]_i$ rose remarkably with increasing of drug concentration. Supermaximal stimulation of emodin inhibited rising of $[Ca^{2+}]_i$. Inhibition of GDP on rising of $[Ca^{2+}]_i$ enhanced with increasing of GDP concentration. Effects of GDP and extracellular Ca^{2+} -free on rising kinetics of emodin evoked $[Ca^{2+}]_i$ were studied. Peak of $[Ca^{2+}]_i$ disappeared by adding GDP. When extracellular Ca^{2+} -free, $[Ca^{2+}]_i$ decreased remarkably with prolonging of time, rising of emodin evoked $[Ca^{2+}]_i$ tended to disappear. These results suggest that emodin could evoke Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} pool by activating receptor coupled G protein and promote extracellular Ca^{2+} influx by depolarizing cell membrane potential.

Key Words: Emodin; Guinea pig taenia coli cells; $[Ca^{2+}]_i$; GDP; Kinetics