

细胞钙浓度的变化对周期信号的响应及胞间同步*

周永军¹, 牛中奇¹, 张辉²

(1. 西安电子科技大学电子工程学院, 陕西 西安 710071;
2. 西北工业大学电子信息学院, 陕西 西安 710072)

摘要: 钙离子是细胞中一种很重要的第二信使, 通常它以钙离子浓度振荡的方式转导多种生理学信息, 影响细胞分化、成熟和凋亡等各种生理过程, 最终导致生物效应。通过实验研究了细胞钙浓度的变化对周期信号的响应和建立在多细胞模型的基础上, 从肝细胞内钙离子振荡的动力学模型出发, 以胞间耦合因子作为影响因子, 数值分析单细胞、耦合的多细胞下的胞内钙振荡形式。实验结果表明: 细胞钙振荡对不同频率和强度的周期信号的响应是不同的: 对有的参数周期信号能产生强烈响应, 有的不能。数值分析结果表明: 细胞间的差异性导致钙振荡不同, 胞间耦合影响多细胞钙振荡的同步性。

关键词: 细胞信号系统; 电磁场; 钙振荡; 同步性

中图分类号: Q424 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2009)05-0108-06

The Frequency Response of the Cell Calcium Concentration Change and Synchronization

ZHOU Yongjun¹, NIU Zhongqi¹, ZHANG Hui²

(1. Electric Engineering Department, Xidian University, Xi'an 710071, China;
2. Northwestern Polytechnic University, Xi'an 710072, China)

Abstract: The calcium ion is a mostly important kind of second-messenger which can transmit many physiological-information and affect physiological-process such as cell's differentiation、maturation、apoptosis through calcium oscillation and result in bio-effect. The frequency response of cell calcium concentration change through experiment and based on the multiple cells model given and the nonlinear dynamic model of the calcium oscillation in rat hepatocyte cells, the calcium oscillating behaviors of the single cell, the coupling multi-cell were numerically analyzed, where the coupling coefficient between cells was the influential factor. The experimental results show that the frequency response of cell calcium oscillation was difference; the exposures of electromagnetic waves are divided to two circumstances: the one that lead to certain change, the one is not. The numerical results show that the different cell has the different calcium oscillating behavior, the coupling coefficient between cells influences the synchronization of the calcium oscillation.

Key words: cell signal system; electromagnetic field; calcium oscillation; synchronization

随着的高速发展及其产品的广泛应用, 电磁辐射已成为一种新型特殊的环境污染源。移动电讯以及电脑、电视等设备视频显示终端等电磁辐射, 特

别是低频电磁场辐射是否对人类健康有危害作用已引起人们的极大关注。细胞外的刺激信号, 如电磁辐射、激素、局部化学介导因子等, 除少部分可以

* 收稿日期: 2008-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470429)

作者简介: 周永军(1976年生), 男, 博士生; E-mail: hoozyj@tom.com

直接引起生理反应,多数只能在膜上被受体识别后,通过膜上信号转换系统,转变为胞内信号,才能调节细胞代谢反应(受体识别外界信号后,通过G蛋白的转换,活化产生第二信使(环磷酸腺苷cAMP、钙离子 Ca^{2+} 等)的效应酶或离子通道,将细胞外信号转换为胞内信号^[1])。胞内游离 Ca^{2+} 浓度是细胞内生物化学和生物物理反应的调控因子之一,1986年前后,人们观察到了细胞中存在钙离子浓度的振荡行为^[2],胞内钙库的瞬时钙离子释放是细胞对胞外信号的主要响应,这种变化可以表现出很强的时空组织性,往往以胞内钙振荡或波的形式出现^[3]。有研究发现,钙振荡的形成与三磷酸肌醇(IP_3)的浓度有关,作为细胞间通信过程中信息载体的钙离子能从一个细胞传输到另一个细胞,如Sanderson(1995)发现钙波可以在气道外皮细胞、Giaume and Venance(1998)发现钙波在神经星形胶质细胞等细胞间传播。正是胞间通讯,使得多细胞系统间的钙离子相互耦合,胞间耦合使多细胞钙振荡表现为有同步性^[4-6]。在完整的肝细胞中,Robb-Gaspers 和 Thomas(1995)以及Nathanson 等人(1995)发现由三磷酸肌醇(IP_3)相关的激动剂引发的钙振荡按跨过整个肝小叶(约500个细胞)的协调的周期波形式出现^[7]。多年来,学者提出了许多研究模型应用于钙振荡所表现出来的这些现象机理的研究中,如单钙库模型^[4]、肝细胞钙振荡动力学模型^[6]等。

在电磁场引起的生物学效应的研究中,在细胞层次上,人们多从细胞膜、信号通道、基因表达水平等方面对电磁场的生物学效应机理进行研究^[8-10],目前,细胞膜是电磁场作用的靶部位这点已被学术界普遍认可^[11],Reinbold K A 等^[12]的实验结果提示人们,电磁场不仅能直接作用于细胞而产生生物学效应,也可能通过对各种细胞信号传递通道的作用,进而对细胞产生作用。相关的研究也表明电磁场会影响信号的转导过程^[8]。基于此,文章从:①用实验方法研究细胞内 Ca^{2+} 浓度随外加电磁场的改变而产生的变化。②在建立的多细胞模型的基础上,从Hofer提出的胞内钙振荡的动力学模型出发,数值分析了电磁场对多细胞钙振荡同步性的影响,细胞间接头的耦合作用对胞间同步性的影响。

1 实验方法

取对数生长期人体肝癌细胞株,经胰蛋白酶消化制成单层悬液,当其成活率达95%以上时,接

种于培养皿中,加含有 $w = 10\%$ 小牛血清的1640培养液,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含 $\varphi(\text{CO}_2) = 5\%$ 的培养箱中孵育24 h。实验中采用试剂(Fluo-3)作为荧光探针检测胞浆中的 Ca^{2+} 浓度,先在Fluo-3中加入亲脂的AM(Acetoxymethyl Esters,乙酰羟甲基酯),使之成为AM衍生物Fluo-3/AM,将其加到细胞样品中。然后用D-Hanks液洗涤,制得样品。先将样品在激光扫描共聚焦显微镜下(其采集数据的时间间隔为1 s)进行荧光强度检测以便获得同一时刻细胞胞浆中的荧光强度和背景荧光强度数据,两者之差便是对照组胞浆中 Ca^{2+} 数据。在获得对照组数据后,再将每样品放在电磁波照射系统中接受不同频率和强度电磁波照射,照射频率和强度参照已被实验所证实且得到了学术界普遍认可的可产生生物学窗效应电磁波^[13-15],具体照射方法见参考文献^[16],然后再用激光扫描共聚焦显微镜进行荧光强度检测得到实验组数据。

2 实验结果及分析

样品受电磁波照射前后 Ca^{2+} 浓度变化结果如表1所示。

表1 ELF电磁场对肝癌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度影响
Table 1 The effect of ELF electromagnetic field on the concentration of intracellular cytosolic Ca^{2+} in liver cancer cells

f Hz	电场 峰值 ($\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$)	样品序号					p
		1	2	3	4	5	
16	53	s 3.35	2.35	2.32	2.40	3.62	0.05
		t 6.34	7.86	8.38	6.22	7.08	
32	53	s 2.43	3.16	3.28	2.94	3.07	0.1
		t 2.62	3.02	2.89	2.20	2.77	
45	53	s 0.66	3.15	2.85	2.94	2.50	0.05
		t 3.50	6.91	4.33	7.76	6.31	
60	53	s 2.67	3.11	3.71	4.42	3.70	0.1
		t 2.43	3.52	1.69	2.47	2.75	
16	26	s 3.21	4.07	2.62	2.87	4.22	0.1
		t 2.14	3.59	2.19	3.42	3.12	
16	80	s 2.46	1.42	1.16	2.41	1.35	0.01
		t 3.09	4.03	3.50	3.41	3.38	

注:s = 实验组;t = 对照组;p = 信度系数

为了能更直观反映照射前后胞浆中 Ca^{2+} 产生的变化,我们通过映射函数将照射前后差异变换到频域中进行分析,采用的时-频域的分布函数为^[17]:

$$\text{PHM}_x(t, \nu) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{h(\tau)}{2} [x(t+\tau)x^*(t) + x(t)x^*(t-\tau)] e^{-j2\pi\nu\tau} d\tau \quad (1)$$

式中的 $x(t)$ 表示细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度随时间 t 的变化函数, 按 (1) 式求得的 $\text{PHM}_x(t, \nu)$ 是 Ca^{2+} 浓

度在时间为 t , 频率为 ν 处的分布, 其结果均以分布函数 $\text{PHM}_x(t, \nu)$ 的等值线图形式给出。在此仅给出 $f=16 \text{ Hz}$, 强度 (E_p) 分别为 53 V/m 和 26 V/m 的 $\text{PHM}_x(t, \nu)$ 的等值线图, 如图 1, 2 所示。

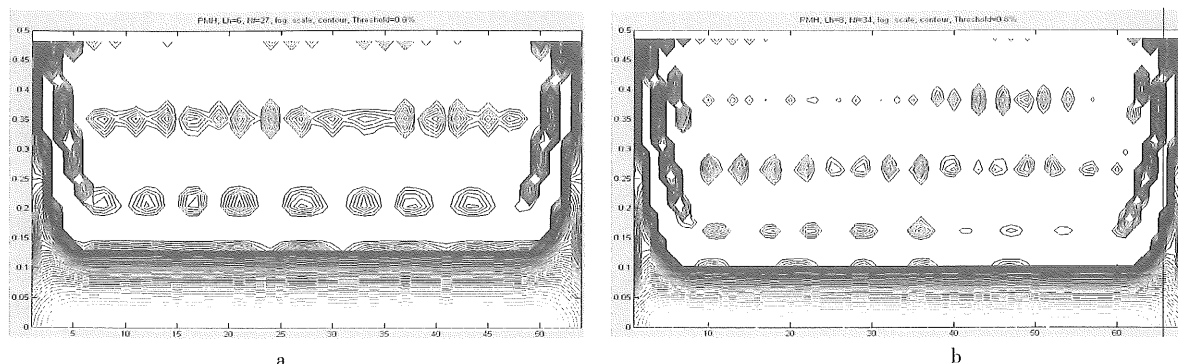


图 1 $f=16 \text{ Hz}$, $E_p=53 \text{ V/m}$ 电磁波照射前 (a) 后 (b) $\text{PHM}_x(t, \nu)$ 的等值线图

Fig. 1 the $\text{PHM}_x(t, \nu)$ isoline of before (a) and after (b) to the irradiation of electromagnetic wave in $f=16 \text{ Hz}$, $E_p=53 \text{ V/m}$

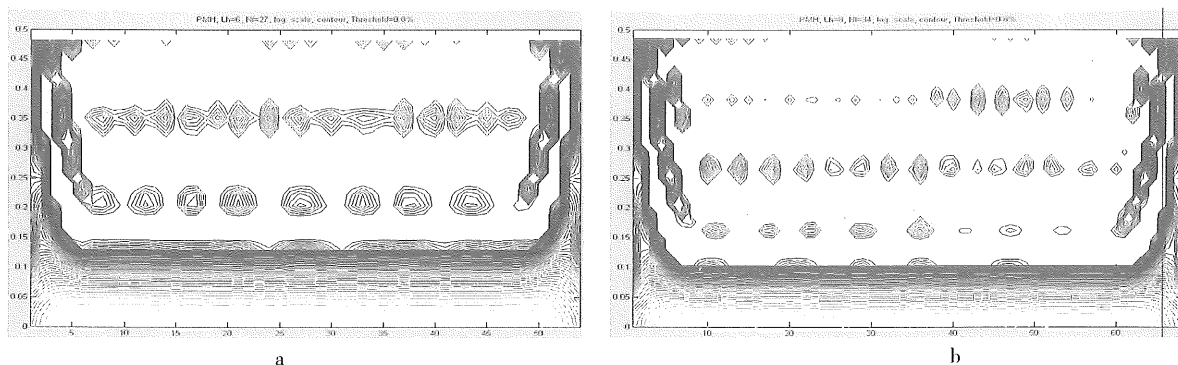


图 2 $f=16 \text{ Hz}$, $E_p=26 \text{ V/m}$ 电磁波照射前 (a) 后 (b) $\text{PHM}_x(t, \nu)$ 的等值线图

Fig. 2 the $\text{PHM}_x(t, \nu)$ isoline of before (a) and after (b) to the irradiation of electromagnetic wave in $f=16 \text{ Hz}$, $E_p=26 \text{ V/m}$

当实验组数据与对照组数据存在显著性差异时 ($P < 0.05$), 才认为该电磁波引起了胞浆 Ca^{2+} 浓度的显著性变化。从表 1 中可以看出, 电磁场峰值为 53 V/m 时, 频率分别为 16 Hz 和 45 Hz 的电磁波可使肝癌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度显著性增加 ($P < 0.05$), 而与之相邻的 32 Hz 和 60 Hz 却不使其发生显著性变化 ($P > 0.1$), 当频率为 16 Hz 时, 电场峰值为 80 V/m 的电磁波使人体肝癌细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度显著性增高 ($P < 0.01$), 而与之相邻的 26 V/m 却没有发生明显变化 ($P > 0.1$)。从分布函

数 $\text{PHM}_x(t, \nu)$ 的等值线图 2 中可以看出连续谱的频率分布范围和各离散谱对应的频率均未发生变化。而图 1 中连续谱的频率分布范围改变 (前者的连续谱分布在 $0 \sim 0.15 \text{ Hz}$ 范围内而后的分布在 $0 \sim 0.1 \text{ Hz}$ 范围内); 离散谱也发生改变 (前者的离散谱有 2 个 (图 1: a) 而后者的有 3 个 (图 1: b), 相应的离散谱的中心频率也发生改变) 由此可知 $f=16 \text{ Hz}$, $E_p=53 \text{ V/m}$ 产生了生物效应 (即强度窗效应)。

2 数值分析

2.1 肝细胞 Ca^{2+} 振荡的动力学模型^[6]

设有一个由多细胞组成的系统, 如果用 x_j 表示第 j 个细胞的细胞浆钙离子浓度, z_j 为第 j 个细胞内总的钙离子浓度, 则有:

$$\begin{aligned} \frac{dx_j}{dt} = & \rho_j \left(v_0 + v_c \frac{p_j}{K_0 + p_j} - v_4 \frac{x_j^2}{K_4^2 + x_j^2} + \right. \\ & \left. \frac{\alpha_j k_r(x_j, p_j)}{\beta_j} (z_j - (1 + \beta_j)x_j) - \right. \\ & \left. \alpha_j v_3 \frac{x_j^2}{K_3^2 + x_j^2} \right) + \gamma(x_i - x_j) \end{aligned} \quad (2)$$

$$\frac{dz_j}{dt} = \rho_j \left(v_0 + v_c \frac{p_j}{K_0 + p_j} - v_4 \frac{x_j^2}{K_4^2 + x_j^2} \right) + \gamma(x_i - x_j) \quad (3)$$

式中 x_i 是第 i 个细胞胞浆 Ca^{2+} 浓度, p_j 是第 j 个细胞的 IP_3 浓度, IP_3 的释放函数 $k_r(x_j, p_j)$ 为

$$\begin{aligned} k_r(x_j, p_j) = & k_1 \\ & \left[\frac{d_2(d_1 + p_j)p_j x_j}{(d_p + p_j)(d_a + x_j)(d_2(d_1 + p_j) + x_j(d_3 + p_j))} \right]^3 \\ & + k_2 \end{aligned} \quad (4)$$

ρ_j 、 α_j 、 β_j 是描述细胞结构的参数, $\alpha_j = A_{\text{ER}}/A_{\text{PM}}$, $\beta_j = C_{\text{ER}}/C_{\text{C}}$, A_{PM} , A_{ER} , C_{ER} , C_{C} 分别为细胞内质网膜、质膜的面积和内质网与质膜的有效体积。 v_0 描述背景钙泄露的速率, v_c 表示由 IP_3 诱导的钙泄露的速率, v_3 是内质网中钙离子上升的最大速率, v_4 是胞外钙离子内流的最大速率, γ 是相关耦合系

数且和间隙接头的渗透性成比例, 该模型中其它参数意义见文献^[6]。

在这里仅考虑二维的情况如图3所示(其中细胞1、2、3为研究对象, 其中第0个细胞和第4个细胞是为讨论方便设置的边界条件), 将其作为研究的细胞系统。依据肝细胞钙振荡动力学模型取 $v_0 = 0.2 \mu\text{M/s}$, $v_c = 4.0 \mu\text{M/s}$, $v_3 = 9.0 \mu\text{M/s}$, $v_4 = 3.6 \mu\text{M/s}$, $K_0 = 4.0 \mu\text{M}$, $K_3 = 0.12 \mu\text{M}$, $K_4 = 0.12 \mu\text{M}$, $d_1 = 0.3 \mu\text{M}$, $d_2 = 0.4 \mu\text{M}$, $d_3 = 0.2 \mu\text{M}$, $d_p = 0.2 \mu\text{M}$, $k_1 = 40.0 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 0.02 \text{ s}^{-1}$, $\rho_{i,j} = 0.02 \mu\text{M}^{-1}$, 用二阶 Runge-kutta 法数值分析了细胞间接头耦合作用对同步特性影响。

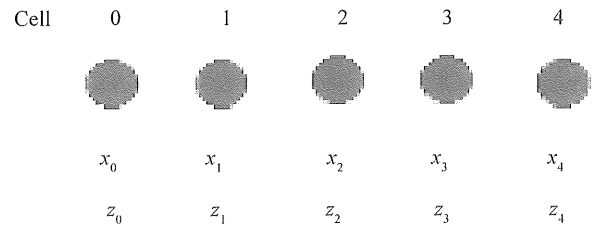


图3 线性细胞模型

Fig. 3 linear cell model

2.2 耦合对细胞钙振荡的影响

图4中a~c分别给出了在 $p = 2 \mu\text{M}$ ^[6] 耦合系数 $\gamma = 0, 0.05, 0.12$ 条件下的仿真结果。其中细胞1: $a_1 = 2.0$, $\beta_1 = 0.1$, 细胞2: $a_2 = 1.5$, $\beta_2 = 0.2$, 细胞3: $a_3 = 1.8$, $\beta_3 = 0.15$ 。

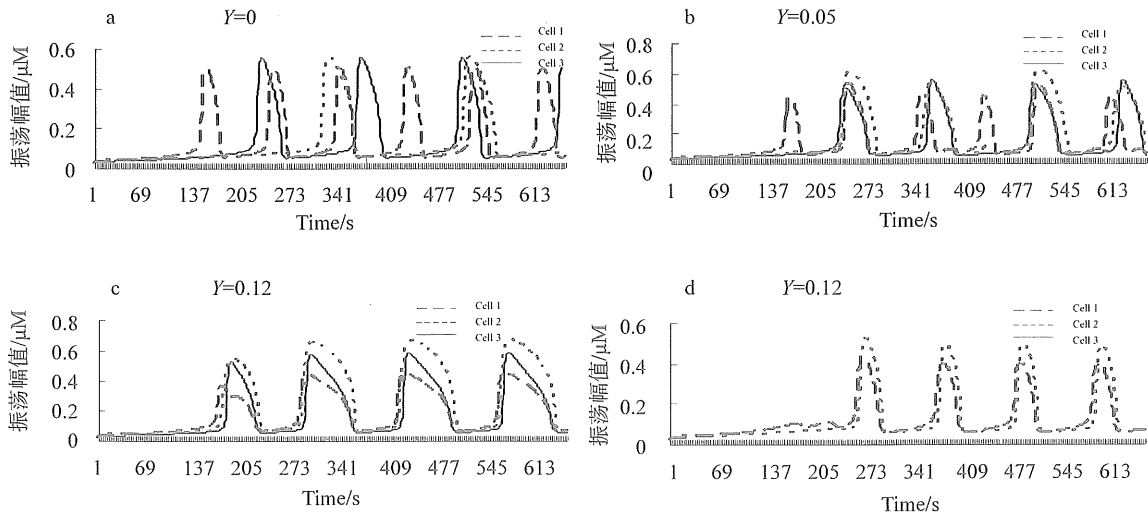


图4 不同耦合系数的细胞钙振荡行为

Fig. 4 The Time evolution of the intracellular calcium affected by other cell

为了直观的反映胞间耦合作用对多细胞体系胞浆中钙离子浓度变化的影响规律,数值分析的结果均以图的形式给出(图4:a-d)。图4:a($\gamma = 0$)中显示细胞1、细胞2、细胞3的幅度和周期分别为:0.503 2 μm , 0.561 1 μm , 0.554 μm , 92.8 s, 192.57 s, 138.6 s。即结构不同的细胞在无耦合条件下钙振荡不同(即个体细胞的钙振荡存在个体差异性);图4:b, c给出耦合系数分别为 $\gamma = 0.05$ 、 $\gamma = 0.12$ 时,细胞1, 2和细胞3的胞内钙离子浓度随时间的变化关系图,图示说明细胞间的耦合系数影响胞间钙振荡的幅值、周期,且有使胞间的钙振荡行为趋于一致的作用,即由于细胞间通讯的存在,使胞浆内钙振荡存在着同步性,且同步性的振荡频率(约为139 s)与多细胞某单个细胞振荡频率相同。为了比较2个细胞和3个细胞在耦合系数相同的条件的同步性,在图4:d中给出了细胞1、细胞2在耦合系数 $\gamma = 0.12$ 作用下的钙振荡随时间变化的曲线:在该耦合系数下,钙振荡表现为同步性,周期相同为107.36 s,但是对应的幅值不一致,分别为0.396 5 μm 、0.494 0 μm ,这说明细胞的数目决定着多细胞系统同步性钙振荡的周期和细胞钙离子浓度的幅值。

3 讨论

钙离子作为第二信使,是维持细胞正常代谢和生理机能的一种基础元素,它作为一种重要的调控因子控制着许多亚细胞过程,控制着细胞生物物理和生物化学信息过程。在细胞信号系统中,不同类型的细胞传递信号的机制可能有很大的差异,目前研究中已经知道的有旁分泌信号和跨接头扩散等几种,一个细胞收到钙信号刺激分泌三磷酸腺苷ATP,它又可以在相邻细胞中引发钙信号,从而在多细胞组成的器官组织中传播一个钙信号波。研究发现,细胞的信息过程可以被噪声放大和优化,在非线性体系环境中的扰动可以诱发出体系内的有序现象^[16,18-19]。电磁场是一个很重要的环境因素,可影响细胞受体。细胞层次上有许多实验表明,外加电磁场会使跨膜迁移的钙离子的量发生变化,从而导致产生电磁场生物学非热效应^[13],故研究时变电场对细胞受体的影响进而研究对胞内钙振荡的影响无疑具有非常重要的意义。

文中用时变的周期信号对肝癌细胞株制成的样品进行辐射,在时域和频域分别对比了照射前后细胞胞浆中钙离子浓度的变化,实验结果显示细胞胞浆中的钙离子浓度变化对不同的频率和强度的周期

信号的响应是不同的:对有的周期信号(如 $f = 16$ Hz, $E_p = 53$ V/m、 $f = 16$ Hz, $E_p = 80$ V/m等)响应强烈(细胞胞浆中 Ca^{2+} 浓度可产生显著性变化)产生生物学效应(频率窗或是强度窗);对有的周期信号($f = 16$ Hz, $E_p = 26$ V/m、 $f = 32$ Hz, $E_p = 53$ V/m等)响应不明显;文中还以单层的,平面分布的细胞作为研究的细胞系统,通过数值分析说明:①对于单个细胞而言,细胞的结构参数不同,则钙振荡的周期、幅值不同,这说明细胞的差异性可导致细胞钙振荡的不同。②胞间耦合系数影响多细胞钙振荡的同步性。耦合系数不同,导致不同细胞钙振荡的幅值存在差异,在耦合系数一定的条件下随时间的增加,钙振荡趋于同步,且同步振荡的频率与多细胞中振荡频率最快的细胞的振荡频率一致。

所以,如果以钙振荡作为检测指标的话,则电磁场对多细胞钙振荡系统的影响作为电磁场生物学频率窗、强度窗生物学效应的机理分析基础理论应该更合理些。

参考文献:

- [1] 孙大业,郭艳林. 细胞信号系统[M]. 北京:科学出版社,1993:78-82.
SUN Daye, GUO Yanlin. Cell signal system[M]. Beijing: Science Press, 1993:78-82.
- [2] WOODS N M, CUTHBERTSON K S R, COBBOLD P H. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes[J]. Nature, 1986, 319: 600-602.
- [3] THOMAS A P, BIRD G S J, HAJNOCZKY G, et al. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling[J]. FASEBJ, 1996, 10:1505-1517.
- [4] EICHWALD C, KAISER F. Model for external influences on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium oscillations[J]. Bioelectromagnetics, 1995, 16:75-85.
- [5] GOLDBETER A, DUPONT G, BERRIDGE M J. Minimal mode for signal-induced oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:1461-1465.
- [6] THOMAS H. Model of intercellular calcium oscillation in hepatocytes: Synchronization of heterogeneous cells[J]. Biophys J, 1999, 77(3):1244-1256.
- [7] TORDJIMANN T, BERTHON B, CLARET M, et al. Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes: Bial control by gap junction permeability and agonist[J]. EMBOJ, 1997, 16:5398

- ~5407.
- [8] 孙文均, 姜槐. 电磁场生物学效应的细胞膜及蛋白激酶信号转导机制研究[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2004, 27(5): 260-263.
- SUN Wenjun, JIANG Huai. The study on biological effects mechanism of cellular membrane and protein kinase signal transduction induced by electromagnetic field [J]. Foreign Medical Sciences (Biomedical Engineering Fascicle), 2004, 27(5): 260-263.
- [9] 张辉, 许家栋, 牛中奇, 等. 极低频电磁场对胞内钙振荡影响的机制分析[J]. 中国医学物理学杂志, 2007, 24(3): 189-192.
- ZHANG Hui, XU Jiadong, NIU Zhongqi, et al. The mechanism analysis on the intercellular calcium oscillations modulated by ELF magnetic fields [J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2007, 24(3): 189-192.
- [10] 严传魁, 刘深泉. 动态 IP_3 - Ca^{2+} 振荡模型的数值分析[J]. 生物物理学报, 2005, 21(5): 339-344.
- YAN Chuankui, LIU Shenquan. The numerical study of dynamical IP_3 - Ca^{2+} oscillation model [J]. ACTA Biophysica Sinica, 2005, 21(5): 339-344.
- [11] ZHOU Jiliang, LI Changlin, YAO Gengdong, et al. Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50Hz magnetic field [J]. Bioelectromagnetics, 2002, 23:339-346.
- [12] REINBOLD K, POLLACK S R. Serum plays a critical role in modulating $[Ca^{2+}]$ of primary culture bone cell exposed to weak ion-resonance magnetic fields[J]. Bioelectromagnetics, 1997, 18:203-214.
- [13] BLACKMAN C F. Influence of electromagnetic fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro [J]. Bioelectromagnetics, 1988, 9(3):215-227.
- [14] BLACKMAN C F. Multiple power-density window and their possible origin [J]. Bioelectromagnetics, 1989, 10(2):115-128.
- [15] SWCHWARTZ J L. Exposure of frog hearts to CW or amplitude-modulated VHF fields; selective efflux of calcium ions at 16Hz [J]. Bioelectromagnetics 1990, 11(4): 349-358.
- [16] 牛中奇, 侯建强, 王海滨, 等. 电磁波的生物学窗效应[J]. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(2): 126-132.
- NIU Zhongqi, HOU Jianqiang, WANG Haibin, et al. the window bioeffects of electromagnetic waves[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2003, 22(2): 126-132.
- [17] MARGENAU H, HILL R N. Correlation between measurements in quantum theory [J]. Prog Theoret Phys, 1961; 26(3): 772-738.
- [18] 张季谦, 侯中怀, 辛厚文. 肝细胞中环境噪声所诱导的双重随机共振[J]. 中国科学: B 辑, 2005, 5(1): 22-26.
- ZHANG Jiqian, HOU Zhonghui, XIN Houwen. The stochastic bi-resonance induced by ambient noise in liver cells[J]. Science in China: Series B, 2005, 5(1): 22-26.
- [19] 李红英, 侯中怀, 辛厚文. 耦合生物细胞体系中噪声诱导钙信号的传递和增强[J]. 化学物理学报, 2005, 18(2):174-178.
- LI Hongying, HOU Zhonghuai, XIN Houwen. Noise induced signal propagation and enhancement in coupled biological cell system [J]. Chinese Journal of Chemical Physics, 2005, 18(2):174-178.