

甲基对硫磷诱发大鼠肝细胞内钙浓度升高的初步机制研究^{*}

张国萍, 吴继国, 黄玉珊

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要:应用激光扫描共聚焦显微镜观察甲基对硫磷 (Methylparathion MP) 对正常大鼠肝细胞株 (BRL) 内游离钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的影响。实验结果表明, 在正常生理盐溶液 (N-PSS) 中, MP 能引起细胞内的钙升高, 并呈浓度依赖性; 在无钙生理盐溶液 ($0 Ca^{2+}$ -PSS) 中, $400 \mu\text{mol/L}$ MP 不显著改变细胞内的钙浓度。用不同的非选择性阳离子通道阻断剂 ($300 \mu\text{mol/L}$ Gd^{3+} , 2 mmol/L Si^{2+} , 2 mmol/L Ni^{2+}) 作用于由 MP 引起的钙升高时, 发现均能有效地抑制钙升高, 其中 Ni^{2+} 的抑制效果最为明显。同时 MP 引起的钙升高的时程远远大于 ATP 的作用。以上结果显示, MP 对 BRL 细胞胞内的 Ca^{2+} 具有升高作用, 此作用可能是 MP 激活非选择性阳离子通道, 并最终导致细胞膜上的其它钙离子通道开放。

关键词:甲基对硫磷; 细胞内钙; 钙通道; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号: Q424 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 01-0091-04

甲基对硫磷是使用最为广泛的有机磷农药之一, 广泛用于粮、棉、水果、蔬菜病虫害的防治^[1]。急性有机磷中毒 (acute organophosphorus pesticides poisoning AOPP) 是我国农村常见的中毒性疾病。对于 AOPP 的发病机制, 目前主要有两种学说: 神经毒性酯酶学说^[2]和钙稳态失衡学说^[3]。细胞内钙离子是重要的第二信使, 钙离子浓度的变化能引起细胞功能的明显变化。目前, 已经有文献报道, 应用天然钙通道阻断剂治疗重度急性有机磷中毒的案例^[4], 动物实验已经证实, 钙通道阻断剂可明显提高有机磷农药的 LD_{50} , 对中毒动物有治疗和保护作用^[5]。本实验应用激光共聚焦显微镜 (laser confocal scanning microscope LCSM) 观察甲基对硫磷 (MP) 浓度变化对大鼠肝细胞内钙离子含量的影响。探讨甲基对硫磷对肝细胞的作用机理。对了解有机磷农药中毒等相关疾病起到重要作用, 并对今后在临床方面提供理论上的支持。

1 材料和方法

1.1 材料

正常大鼠肝细胞株 (BRL) 由中山大学实验动物中心提供。纯度为 $w = 99.9\%$ 的甲基对硫磷 (Supelco 美国), $w = 0.25\%$ 胰蛋白酶和 DMEM 培

养基 (Gibco 美国), 新生牛血清和青、链双抗 (杭州四季青, 杭州)。N-PSS (140 mmol/L $NaCl$; 1 mmol/L KCl ; 1 mmol/L $MgCl_2$; 1 mmol/L $CaCl_2$; 10 mmol/L glucose; 5 mmol/L HEPES; $pH = 7.4$)。 $0Ca^{2+}$ -PSS (140 mmol/L $NaCl$; 5 mmol/L KCl ; 1 mmol/L $MgCl_2$; 10 mmol/L glucose; 2 mmol/L EGTA; 5 mmol/L HEPES; $pH = 7.4$)。Fluo3 AM 荧光探针和 pluronic F127 购自 Molecule Probes 公司。LEICA TCS SP2 激光扫描光共聚焦显微镜 (德国徕卡公司)、氩离子激光管激发波长为 488 nm , LEICA 公司开发的 Live Data 软件。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 将 BRL 细胞经胰酶消化后, 以 2×10^5 个 mL 传代到已经铺好盖玻片的 40 mm 的培养皿中, DMEM 培养基中加入 $\varphi = 10\%$ 的新生牛血清, 青霉素 100 U/mL , 链霉素 $100 \mu\text{g/mL}$, 在 37°C 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 培养箱中培养 24 h 细胞呈单层生长, 大约长至布满盖玻片 $80\% \sim 90\%$ 时进行实验处理。

1.2.2 激光扫描共聚焦显微镜测定细胞内钙离子浓度 传代培养 24 h 后的细胞用 N-PSS 洗 3 次后, 加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo3 AM 荧光探针和 $\varphi = 0.02\%$ pluronic F127 在 37°C 培养箱内负载 30 min 用 N-PSS 冲洗 3 遍, 把长有细胞的盖玻片

* 收稿日期: 2005-07-23

基金项目: 中山大学生命科学学院科研教学基金资助项目

作者简介: 张国萍 (1956 年生), 女, 工程师; E-mail: lssch@zsu.edu.cn

放到共聚焦显微镜专用的灌流槽中, 接好药物灌流装置, 调好共聚焦显微镜的各项参数, 开始钙荧光强度实时记录。激光扫描共聚焦显微镜的采样间隔为 1.5 s, 激发波长为 488 nm, 接收波长为 505 nm, 采用荧光强度值 (fluorescence intensity, FI) 代表细胞内钙离子的浓度。部分实验前期需要溶液为无钙的生理溶液 (0Ca^{2+} -PSS), 具体实验在文中注明。

1.2.3 图象处理和数据分析 原始图像由 LEICA 公司自带的图象分析软件 (LiveData) 处理。图表的绘制用 OriginLab 公司的 OriginPro 7.0 软件进行操作。数据以 $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ 表示, ($n=10 \sim 15$) 统计方法为 student t test 检验水准 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 MP 诱发的细胞内钙浓度升高的状况

激光扫描共聚焦显微镜观察, 在 N-PSS 的条件下待细胞内荧光强度为一平稳的曲线后加入药物, 发现细胞内的荧光强度开始上升, 在 150 s 左右达到峰值 49 ± 2 , 随后有缓慢的下降相, 最后到达一个稳定的维持相 43 ± 5.5 , 见图 1, 在记录的整个过程中未发现细胞内发生钙震荡现象。

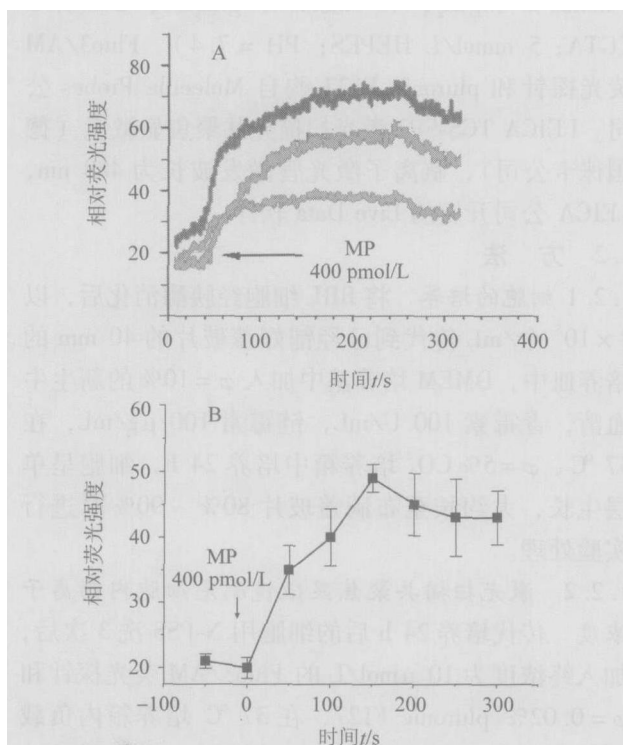


图 1 $400 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ MP 在 N-PSS 中诱导的细胞内钙的升高

Fig. 1 Effect of $400 \times 10^{-6} \text{ MP}$ on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in N-PSS

A: 实验记录的原始代表图; B: 实验记录的统计图

2.2 MP 浓度依赖性地诱发细胞内钙的升高

为了检测 MP 引起的细胞内钙的升高是一个 MP 浓度依赖性的过程, 我们依次由低浓度往高浓度加入 MP, 浓度分别是 2 20 100 300 400 500 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 。在低浓度 (2, 20 $\mu\text{mol/L}$) 时, MP 只能微弱的引起细胞内的钙改变; 当浓度增加至 400 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 细胞内钙的反应基本达到峰值; 见图 2 当 MP 浓度增加至 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 显微镜下发现细胞的形态已发生改变, 说明 MP 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 以上的浓度对细胞造成瞬间致死的反应。因为实验所用 MP 的助溶剂为丙酮, 为了检测我们得到的阳性结果确实由 MP 诱导产生的, 我们用了等量 MP 峰浓度时的丙酮作为对照, 结果发现, 丙酮并不能诱导细胞内钙浓度的升高, 证实了我们得到的细胞内钙的升高的确是由 MP 所诱导的。

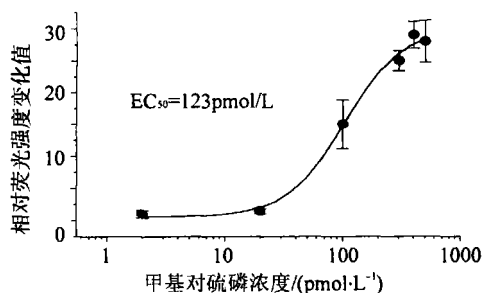


图 2 不同浓度的 MP 诱发细胞内钙的升高。

Fig. 2 Effects of varying the concentration of MP on $[\text{Ca}^{2+}]_i$

2.3 MP 诱发的细胞内钙的升高与细胞外钙离子浓度的关系

由图 3 可见当实验用 0Ca^{2+} -PSS 时, 发现 MP 无显著诱发细胞内钙的升高, 这说明 MP 诱发的细胞内的钙升高主要来自于细胞外钙离子的进入。当实验开始用 0Ca^{2+} -PSS 并在加入 MP 后, 把灌流液换为 N-PSS 时, 发现有一个非常显著的细胞内钙的升高, 这可能是由于 MP 影响了钙库内的钙的调节, 从而使得细胞膜上名为 TRP 的钙通道开放^[8], 导致了大量的钙离子进入细胞内。为了进一步证实 MP 诱导的细胞内钙的升高是由细胞膜上钙离子通道介导的, 我们运用了不同的非选择性阳离子通道的抑制剂, 发现这些抑制剂均能有效的抑制钙的升高, 由图 4 (B) 可见其中 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 Gd^{3+} 能抑制 $(25 \pm 3.7)\%$ (与对照组相比, $P < 0.05$), 的钙反应; 5 mmol/L 的 Sr^{2+} 能抑制 $(33 \pm 9.5)\%$ (与对照组相比, $P < 0.05$) 的钙反应, 由图 4 (A) 可见, 2 mmol/L 的 Ni^{2+} 能完全抑制 MP 引起

的细胞内钙的升高，并且能显著降低细胞内钙的基准浓度（ $-12.5\% \pm 1$ ）（与对照组相比， $P < 0.05$ ），3种钙通道抑制剂的抑制效果依次为： $Ni^{2+} > Sr^{2+} > Gd^{3+}$ 。在用新鲜的 N-PSS 洗脱 3 种抑制剂以后，加入 400 $\mu\text{mol/L}$ MP，均能重新诱导细胞内钙浓度的升高。

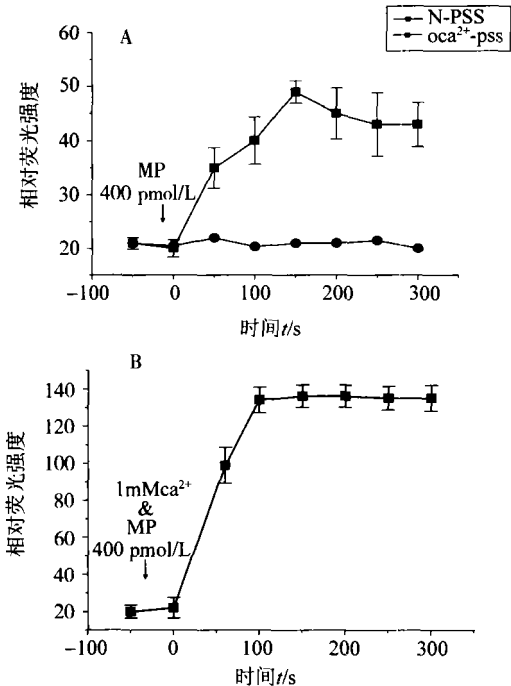
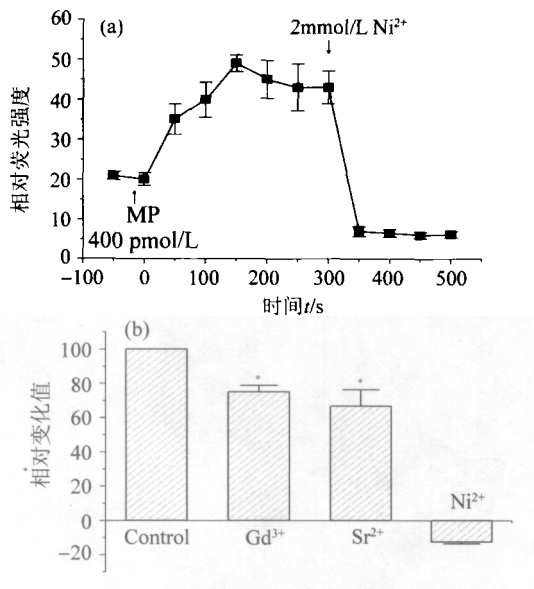


图 3 MP 诱导的细胞内钙升高具有细胞外钙依赖性
Fig. 3 The extracellular Ca^{2+} dependent effects of MP on the $[Ca^{2+}]_i$



4 不同的钙通道抑制剂对 MP 诱导的钙升高的影响
Fig. 4 The effects of Ca^{2+} channel blockers on the MP-induced $[Ca^{2+}]_i$

2.4 MP 诱发的细胞内钙的升高与 ATP 诱发的钙升高的比较

为了进一步确证 MP 诱导的细胞内钙升高是由于细胞外的钙离子的进入，我们用 ATP 诱导细胞内钙的升高与 MP 诱导的钙反应作比较。文献报道，ATP 能激活细胞内的钙库往胞浆中释放出钙离子^[6]，图 5 中我们发现，ATP 诱导的钙反应具有一个瞬时上升相，在 50 s 内迅速的达到其峰值（ 220 ± 13 ），随后荧光强度迅速的下降至基准强度，整个钙的反应在 100 s 内结束。随后，我们用 N-PSS 冲洗细胞，维持了 3 min 的 N-PSS 灌流之后，加入 400 $\mu\text{mol/L}$ MP 诱导钙反应，与 ATP 诱导的反应相比，MP 诱导的反应有一个相对缓慢的上升相，并且，反应在到达峰值以后具有一个长时程的维持相，在 10 min 的记录时间内都未能发现钙荧光强度显著性降低。这说明 ATP 所引起的细胞内的钙反应与 MP 引起的钙反应可能由细胞内不同的钙信号转导通路介导，相对 ATP 而言，MP 介导的是长时程的细胞内钙的升高。

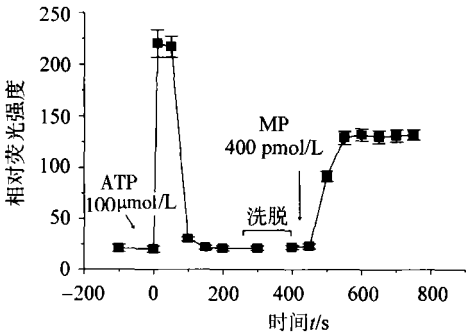


图 5 MP 诱发的细胞内钙的升高与 ATP 诱发的钙升高的比较
Fig. 5 The different effects of ATP and MP on the cells $[Ca^{2+}]_i$

3 结 论

以上结果说明了 MP 诱导的细胞内钙升高可能是通过细胞膜上的钙通道（TRP 通道 [7]）介导钙的流入。并且还发现，MP 诱导的细胞内钙升高是一个 MP 浓度依赖性的反应，基本上在 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度的 MP 才能有效的激活细胞内钙的升高，并且在 400 $\mu\text{mol/L}$ 左右到达其作用的峰值，1 000 $\mu\text{mol/L}$ 以上的农药对细胞有迅速致死性的伤害，表现于细胞形态发生明显的改变，所以，研究所用 MP 的浓度均不高于 400 $\mu\text{mol/L}$ 。同时我们推测，有机磷农药 MP 首先通过激活非选择性阳离子通道，进而可能通过影响细胞内的钙库，间接影响到细胞膜上的其它钙离子通道，从而引起细胞

外的大量钙离子的流入, 使得细胞内的钙离子浓度维持在一个很高的水平。

参考文献:

- [1] 韩丽君, 钱传范, 李文明, 等. 酶联免疫吸附分析法测定黄瓜中的甲基对硫磷 [J]. 中国农学通报, 2005 21 (6): 146-149.
- [2] JOHNSON M K. Symposium introduction: retrospect and prospects for neuropathy target esterase (NTE) and the delayed polyneuropathy (OPCDP) induced by some organophosphorus esterase [J]. Chem-Biol Interactions, 1993 87 (2): 339.
- [3] ABOU-DONIA M B. Involvement of cytoskeletal proteins in the mechanisms of organophosphorus ester induced delayed neurotoxicity [J]. Clin Exp Pharmacol, 1995 22 (2): 358.
- [4] 方家龙, 邵秋萍, 钱秀琴. 钙通道阻滞剂在抢救重度有机磷农药中毒中的应用 [J]. 中国厂矿医学, 1997 3: 201-202.
- [5] 戚文彬, 赵铁力. 危重症临床 [M]. 沈阳: 辽宁科技出版社, 1996 221.
- [6] LEUNG A Y, TAI H L, WONG P Y. ATP stimulates Ca^{2+} release from a rapidly exchanging pool in cultured rat epididymal cells [J]. Am J Physiol, 1993 264 (6): 1388-1394.
- [7] PAREKH A B, PUTNEY JW Jr. Store-operated calcium channels [J]. Physiol Rev, 2005 85 (2): 757-810.

Mechanism of Methylparathion-induced Intracellular Ca^{2+} Increase

ZHANG Guo-ping, WU Ji-guo, HUANG Yu-shan

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The present studies investigated the effects of Methylparathion (MP) on the intracellular Ca^{2+} in the BRL cells. The cells were loaded with $10 \mu\text{mol/L}$ Fura-2/AM, and measured the $[Ca^{2+}]_i$ by laser confocal scanning microscope (LCSM). The results suggested that MP concentration dependence induced an increase of $[Ca^{2+}]_i$ in normal physiology saline solution (N-PSS); When the solution changed to $0Ca^{2+}$ -PSS, 400×10^{-6} MP have no effect on the $[Ca^{2+}]_i$. But there was a significant increase of $[Ca^{2+}]_i$ while the solution was changed from $0Ca^{2+}$ -PSS to N-PSS. The MP-induced $[Ca^{2+}]_i$ was found to be blocked by several non-selective cation channel blockers such as $300 \mu\text{mol/L}$ Gd^{3+} , 2mM Si^{2+} , and 2mM Ni^{2+} . We also observed the difference between ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ and MP-induced $[Ca^{2+}]_i$, the MP-induced a longer increase of $[Ca^{2+}]_i$ than ATP did. These results suggested that MP could activate the non-selective cation channels, then lead to a significant Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channels.

Key words MP; intracellular Ca^{2+} ; Ca^{2+} channel; laser confocal scanning microscope (LCSM)