

(National Laboratory of Medical Genetics of China, Changsha 410078, China).

Abstract Auxilin is a molecular chaperon which induces binding of Hsp70c to clathrin, playing an important role in uncoating of coated vesicle isolated from brain. Through integrated analysis of public database such as dbEST, dbSTS, partial cDNA sequence of human auxilin was identified and mapped to 1p31, between marker D1S515 and D1S198. Totally 26 ESTs were found to be part of human auxilin and used to

construct five contigs, which make totally 2.3 kb sequence and contains 501 bp coding sequence. All the sequences obtained and the corresponding putative translation showed high homologous to bovine auxilin. At the same time, EST data indicate that human auxilin expressed in several tissues at fetal stage, also in brain and melanocyte at adult stage.

Keywords auxilin, localization, sequence, expression, integrated data analysis

异搏定拮抗 α -石英细胞毒性作用的研究*

朱卫华¹⁾ 王金晞²⁾ 李海山 陈 瑶

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 借助于单细胞阳离子测定系统等手段, 研究了不同细胞外钙浓度下异搏定作用后, 细胞存活率与细胞内游离钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的变化关系. 同时还研究了异搏定对实验性硅肺大鼠模型的作用. 结果表明: 由 α -石英引起的肺泡巨噬细胞内钙升高是由于大量细胞外钙内流, 造成细胞内钙超载, 引起细胞死亡, 并进一步导致硅肺形成. 异搏定可以抑制细胞内钙增加, 降低细胞的死亡. 动物模型实验结果还表明异搏定对硅肺的发生有明显的抑制作用. 提示异搏定可能成为硅肺的防治药物.

关键词 异搏定, α -石英, 细胞存活率, 细胞内钙浓度, 硅肺

学科分类号 R135.2, R994.6, R972

过去研究发现实验性硅肺大鼠在染尘 3~5 d 后, 肺匀浆游离钙离子浓度明显升高, 以后增加量与时间成正相关, 表明肺匀浆钙离子浓度升高可能是反映肺组织发生病变的重要现象^[1,2]. 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^[3]. 钙离子在 α -石英诱发巨噬细胞毒性作用中起着重要作用^[4]. 我们曾发现 α -石英能引起巨噬细胞内游离钙离子浓度升高, 这可能是由于细胞外钙内流所致^[5]. Rojanasakul 等^[6] 研究发现 α -石英作用后伴随着细胞损伤的细胞外钙内流增加, Nifedipine 可以抑制低剂量的内钙增加. 本工作研究了不同细胞外钙浓度的条件下, 异

搏定对 α -石英的细胞毒性和由 α -石英诱发的细胞内钙升高的抑制作用, 并研究了异搏定对硅肺动物模型的作用.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

单细胞阳离子测定系统 (美国 SPEX 公司产品); AFX-DX 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司产品); 1815 TC 型 CO_2 培养箱

* 国家自然科学基金资助课题 (29271022).

¹⁾ 镇江医学院, 镇江 212001.

²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-06-11, 修回日期: 1997-12-10

(美国 Shelter 公司产品); 钙离子选择电极 (苏州市标准计量局实验工厂生产). 标准 α 石英粉尘 (粒径小于 $5\ \mu\text{m}$, 含游离 SiO_2 97.7%), 中国预防医学科学院提供; Fura-2/AM、RPMI-1640 干粉培养基、异搏定 (Verapamil) 均为美国 Sigma 公司产品; 台盼蓝、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸 (HEPES) 为进口分装生化试剂. 其他试剂, 均为国产分析纯或生化试剂. 所有实验用水均为重蒸水.

1.2 肺泡巨噬细胞与硅肺动物模型

提取家兔肺巨噬细胞^[7], 用 RPMI-1640 培养液或 HEPES 缓冲液配成 $4 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 个/L 的细胞悬液. 不含 Ca^{2+} 的 HEPES 缓冲液的组成中除不含 CaCl_2 外, 还需另外加 0.1 mmol/L 的 EGTA, 其他组成与 HEPES 缓冲液相同^[8].

将体重 200 g 左右, 发育正常的 SD 雄性大鼠分成四组, 均用戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉. 由口腔插管入肺, 对照组每只注入 1 ml 生理盐水, 其余三组每只注入 α -石英悬液 1 ml (含 α -石英 50 mg). 染尘后的大鼠作为硅肺动物模型, α -石英组, 即硅肺大鼠模型, 不给药 (对照组); 低剂量给药组, 将硅肺大鼠模型按每周 6 次, 每次每只大鼠按 1.25 mg/kg 给异搏定; 高剂量给药组将硅肺大鼠模型同时按 2.5 mg/kg 给异搏定. 在喂养一个月后和二个月分别处死检验.

1.3 细胞存活率测定

在 RPMI 1640 培养液的细胞悬液中, 对照组加生理盐水; α -石英组分别加 α -石英悬液; α -石英加异搏定组还需加异搏定. 在 37°C 、 CO_2 5% 的培养箱中温育 4、12 h 后用台盼蓝拆分法计数细胞存活率.

1.4 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的测定

取 HEPES 缓冲液的细胞悬液同上分组, 在 37°C 、 CO_2 5% 的培养箱中温育 1、3 h 后按文献 [9] 测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$. 常数 $R_{\min}$ 、 $R_{\max}$ 和

β 依次为 11.2 ± 0.84 ($n = 10$), 0.62 ± 0.04 ($n = 12$), 5.26 ± 0.46 ($n = 10$).

1.5 肺组织匀浆 $[\text{Ca}^{2+}]$ 、羟脯氨酸含量的测定

实验大鼠颈动脉放血处死后, 立即取出肺在生理盐水中洗净血迹. 取 1 g 全肺组织加 5 ml 生理盐水在 Teflon 匀浆器中匀浆 3~5 min. 匀浆液立即用钙离子选择电极测定 $[\text{Ca}^{2+}]$, 此值为全肺 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的平均值.

取已称重全肺组织按文献 [10, 11] 方法测定其羟脯氨酸含量.

2 实验结果

2.1 不同外钙介质中异搏定抗 α -石英细胞毒性的研究

2.1.1 细胞存活率: 结果表明 (表 1), 正常外钙介质中, 随温育时间延长, 各组细胞存活率均不同程度下降, 组间差异也愈加明显. α -石英组细胞存活率最低, 与对照组相比有显著性差异, α -石英加异搏定组与 α -石英组相比细胞存活率明显提高. 说明 α -石英有明显细胞毒性, 提示异搏定对细胞具有保护作用. 无外钙介质中, 随温育时间延长, 各组细胞存活率均有所降低, 但组间无显著性差异. 提示细胞外钙对细胞存活率有较大影响. 高外钙介质中, 随着时间延长, 各组细胞存活率均有所下降, 且随细胞外钙浓度增加, α -石英组细胞存活率下降得更多, 异搏定能部分抑制这种趋势.

2.1.2 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化: 结果表明 (表 2), 正常细胞外钙时在培养 1 h 后, α -石英组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显提高, 异搏定对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高的影响明显. 温育 3 h 后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高更为明显, 高于对照组, 且高于 1 h 的 α -石英组, 但此时异搏定能部分地抑制由 α -石英引起的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高. 无外钙时, 组间均无显著性差异. 高外钙时, 对照组和异搏定组间 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无差异, α -石英组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加很多, 异搏定能部分抑制 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高.

表 1 不同外钙介质中 α-石英对细胞存活率的影响

组 别	存活率		组 别	存活率	
	4 h	12 h		4 h	12 h
对照组 ¹⁾	94. 55 ± 4. 47	85. 44 ± 1. 31	对照组 ³⁾	92. 14 ± 1. 56	84. 90 ± 3. 45
α-石英(100 mg/L) ¹⁾	80. 14 ± 5. 59 ⁵⁾	75. 76 ± 4. 03 ⁵⁾	α-石英(400 mg/L) ³⁾	71. 64 ± 2. 03 ⁵⁾	58. 16 ± 3. 21 ⁵⁾
α-石英(100 mg/L) ¹⁾ + 异搏定(5 mg/L) ¹⁾	88. 45 ± 3. 01 ^{6,7)}	81. 09 ± 1. 38 ^{6,7)}	α-石英(400 mg/L) ³⁾ + 异搏定(5 mg/L) ³⁾	88. 19 ± 2. 78 ^{5,7)}	78. 38 ± 2. 36 ^{5,7)}
对照组 ²⁾	93. 52 ± 0. 14	87. 46 ± 0. 64	对照组 ⁴⁾	91. 28 ± 3. 10	87. 26 ± 3. 49
α-石英(100 mg/L) ²⁾	92. 69 ± 1. 07	88. 36 ± 0. 55	α-石英(400 mg/L) ⁴⁾	65. 05 ± 2. 05 ⁵⁾	43. 28 ± 3. 74 ⁵⁾
α-石英(100 mg/L) ²⁾ + 异搏定(5 mg/L) ²⁾	92. 70 ± 1. 13	87. 38 ± 2. 86	α-石英(400 mg/L) ⁴⁾ + 异搏定(5 mg/L) ⁴⁾	86. 12 ± 2. 04 ^{5,7)}	72. 93 ± 1. 26 ^{5,7)}

¹⁾ 正常外钙介质中; ²⁾ 无外钙介质中; ³⁾ 两倍外钙浓度介质中; ⁴⁾ 四倍外钙浓度介质中; ⁵⁾ $P < 0. 01$; ⁶⁾ $P < 0. 05$, 与同时同外钙浓度对照组相比; ⁷⁾ $P < 0. 01$, 与同时同外钙浓度 α-石英组相比. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

表 2 在不同外钙介质中 α-石英对细胞 [Ca²⁺]_i 的影响

组 别	[Ca ²⁺]/nmol·L ⁻¹		组 别	[Ca ²⁺]/nmol·L ⁻¹	
	1 h	3 h		1 h	3 h
对照组 ¹⁾	112 ± 15	112 ± 19	对照组 ³⁾	126 ± 16	138 ± 18
α-石英(400 mg/L) ¹⁾	237 ± 30 ¹⁾	318 ± 33 ⁵⁾	α-石英(400 mg/L) ³⁾	298 ± 28 ⁵⁾	369 ± 41 ⁵⁾
α-石英(400 mg/L) ¹⁾ + 异搏定(5 mg/L)	169 ± 40 ⁵⁾	215 ± 41 ^{5,6)}	α-石英(400 mg/L) ³⁾ + 异搏定(5 mg/L)	186 ± 34 ^{5,6)}	229 ± 44 ^{5,6)}
对照组 ²⁾	115 ± 16	118 ± 19	对照组 ⁴⁾	130 ± 17	141 ± 19
α-石英(400 mg/L) ²⁾	119 ± 29	121 ± 14	α-石英(400 mg/L) ⁴⁾	368 ± 33 ⁵⁾	423 ± 44 ⁵⁾
α-石英(400 mg/L) ²⁾ + 异搏定(5 mg/L)	120 ± 20	124 ± 24	α-石英(400 mg/L) ⁴⁾ + 异搏定(5 mg/L)	213 ± 37 ^{5,6)}	288 ± 46 ^{5,6)}

¹⁾ 正常外钙介质中; ²⁾ 无外钙介质中; ³⁾ 两倍外钙浓度介质中; ⁴⁾ 四倍外钙浓度介质中; ⁵⁾ $P < 0. 01$, 与同外钙浓度对照组相比; ⁶⁾ $P < 0. 01$, 与同外钙浓度 α-石英组相比. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$.

2.2 异搏定对大鼠硅肺模型的作用

实验大鼠喂养一个月和二个月后, 分别测大鼠的体重后处死. 测大鼠的肺重、肺组织匀浆 [Ca²⁺]、羟脯氨酸含量, 并进行大鼠的肺组织病理切片检验. 结果显示 (表 3), 与对照组相比 α-石英组体重增加较慢, 肺重值较大, 肺组织匀浆 [Ca²⁺] 大, 羟脯氨酸含量高, 且随培

养时间的增加趋势愈加明显; 在给药组中, 这种趋势得到了抑制. 同时病理切片报告也显示, 培养二个月后, α-石英组大鼠肺组织中胶原化结节已相互融合成片. 而给药组大鼠肺组织中只见到一些细胞性结节, 均未见明显的硅结节, 有部分细胞性结节向纤维化结节演变 (图 1). 这与其他指标显示的结果是一致的.

表 3 大鼠体重、肺重平均值

组 别	喂养前后增重/g	肺重/g	肺匀浆[Ca ²⁺]/μmol·L ⁻¹	羟脯氨酸含量/mg·L ⁻¹
对照组 ¹⁾	102±11(6)	1.8±0.2(6)	12.6±1.8(6)	40.5±3.7(6)
α-石英组 ¹⁾	59±10(6) ³⁾	3.6±1.1(6) ³⁾	27.3±3.2(6) ³⁾	67.5±4.2(6) ³⁾
低剂量给药组 ¹⁾	71±15(6) ^{3,6)}	2.5±0.6(6) ^{4,5)}	22.8±2.6(6) ^{3,5)}	48.0±2.9(6) ^{3,5)}
高剂量给药组 ¹⁾	83±19(6) ^{3,6)}	2.3±0.4(6) ^{4,5)}	15.4±4.1(6) ^{4,5)}	42.4±4.3(6) ^{4,5)}
对照组 ²⁾	118±15(6)	2.1±0.3(6)	15.3±3.6(6)	56.3±4.0(6)
α-石英组 ²⁾	28±18(5) ³⁾	5.2±1.3(5) ³⁾	48.2±5.2(5) ³⁾	88.2±6.1(5) ³⁾
低剂量给药组 ²⁾	76±17(5) ^{3,6)}	3.2±1.1(5) ^{3,5)}	38.1±4.5(5) ^{3,5)}	75.5±3.6(5) ^{3,5)}
高剂量给药组 ²⁾	88±16(5) ^{4,6)}	2.9±0.9(5) ^{4,5)}	26.4±3.8(5) ^{3,5)}	69.3±2.8(5) ^{3,5)}

¹⁾表示在喂养一个月后处死；²⁾表示在喂养两个月后处死；³⁾ $P<0.01$ ；⁴⁾ $P<0.05$ 与同一时间对照组相比；⁵⁾ $P<0.01$ ；⁶⁾ $P<0.05$ 与同一时间石英组相比。括号内为样本数。 $\bar{x}\pm s$ 。

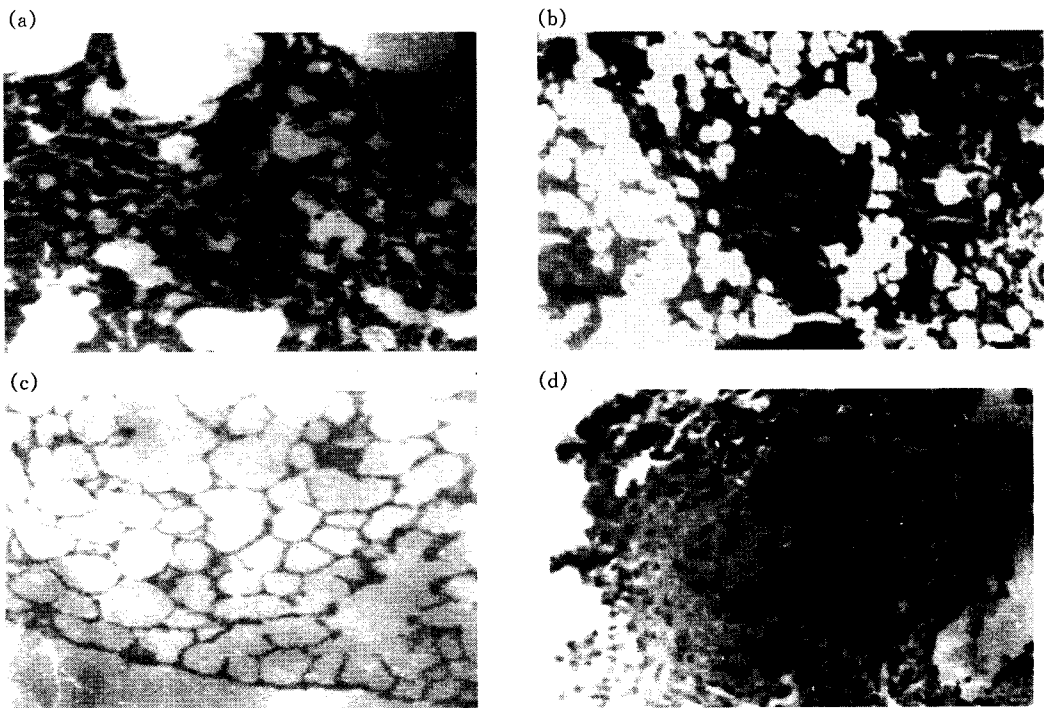


图 1 大鼠肺组织病理切片照片

(a) 低剂量给药组；(b) 高剂量给药组；(c) 正常对照组；(d) α-石英组。

3 讨 论

由离体细胞实验结果发现，增加细胞外钙浓度，细胞存活率降低，相应 $[Ca^{2+}]_i$ 升高，同时这些变化又可被异搏定部分抑制。无外钙

介质中，α-石英组与对照组的细胞存活率无差异，相应 $[Ca^{2+}]_i$ 也无差异，说明由α-石英引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是由于细胞外钙内流所致，进一步证实了我们过去的观点，也进而说明是 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高直接导致了细胞的死亡，使细

胞存活率下降。[Ca²⁺]_i的变化只是α-石英对细胞损伤的一个中介。异搏定可部分抑制由α-石英引起的[Ca²⁺]_i升高,从而达到拮抗α-石英细胞毒性的作用。异搏定是一种非特异性钙通道阻断剂,医学上一般应用于心血管疾病的治疗,而它只能部分抑制α-石英细胞毒性。也就表明在受α-石英作用后,细胞外钙不仅通过能被异搏定阻断的钙离子通道进入细胞内,而且还有其它途径进入细胞内。这也提示在受α-石英作用后,细胞膜受到损伤,使得细胞膜的通透性增加,出现了非正常的外钙内流,导致细胞内钙超载而死亡。

硅肺大鼠模型的实验结果表明,α-石英组羟脯氨酸含量高,有胶原化趋势,相应肺组织匀浆[Ca²⁺]_i也较大,给药组这种现象则有所减缓。病理切片检验报告也给出了同样的证据。这也进一步说明Ca²⁺在硅肺形成过程中起着重要的作用,提示肺泡巨噬细胞内钙升高可能是硅肺形成的致因之一。

综上所述,通过阻断外钙内流或降低外钙浓度,则可以减少细胞的死亡。而细胞死亡下降,则可以延缓硅肺的发生或不形成硅肺。这也提示我们可以通过降低细胞外钙浓度或阻断细胞外钙内流的途径来进行硅肺的防治。而α-石英对细胞膜的损伤应是我们进一步研究的重点。

参 考 文 献

- 1 毛 延, 陈荣三, 黄孟健等 (Mao Y, Chen R S, Huang M J *et al*). 肺Ca²⁺含量与硅肺的关系. 无机化学 (Wuji Huaxue Xuebao), 1987, **3** (4): 12~ 19
- 2 毛 延, 陈荣三, 黄孟健等 (Mao Y, Chen R S, Huang M J *et al*). 硅肺发病前期中钙量的变化. 无机化学 (Wuji Huaxue Xuebao), 1989, **5** (2): 16~ 21
- 3 Heppleston A G, Styles J A. Activity of macrophage factor in collagen formation by silica. *Nature*, 1967, **214** (5087): 521~ 522
- 4 Kane A B, Stanton R P, Raymond E G *et al*. Dissociation of intracellular lysosomal rupture from the cell death caused by silica. *J Cell Biol*, 1980, **87** (3): 643~ 651
- 5 Ling J, Wen H R, Chen R S *et al*. The relationship between calcium ion and the cytotoxicity of α-quartz. In: Auastassopoulou J eds. *Metal ions in biology and medicine*, 2. Paris: John Libbey Eurotext, 1992. 295~ 298
- 6 Rojanasakul Y, Wang L Y, Malanga C J *et al*. Altered cal-

cium homeostasis and cell injury in silica-exposed alveolar macrophages. *J Cell Physiol*, 1993, **154** (2): 310~ 316

- 7 梅懋华, 孙云寿主编. 生理学方法与技术 (第四集). 北京: 人民卫生出版社, 1987. 387
- 8 Yule D I, Gallacher D V. Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Letters*, 1988, **239** (2): 358~ 362
- 9 McDonough P M, Button D C. Measurement of cytoplasmic calcium concentration on cell suspensions correction for extracellular Fura-2 through use of maganase and probenecid. *Cell Calcium*, 1989, (10): 171~ 180
- 10 钱小毛 (Qian X M). 尿液羟脯氨酸测定方法的改进. 中华医学检验杂志 (Chinese Journal of Medical Laboratory Technology), 1984, **7** (1): 20~ 22
- 11 蔡武城, 袁厚积编. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982. 81

Research of Antagonism of Verapamil to the Cytotoxicity Induced by α-Quartz. ZHU Wei-hua, WANG Jir-xi, LI Hai-shan, CHEN Yao (*State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Coordination Chemistry of Institute, Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

Abstract By use of the AR-CM-MIC system and other methods, the relationship between cellular viability of alveolar macrophages and the change of intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) after the action of verapamil was investigated under different extracellular calcium concentrations. And the research about the effect of verapamil on experimental silicosis rats were conducted. The results showed: the [Ca²⁺]_i rise induced by α-quartz was caused by enormous extracellular Ca²⁺ influx and the overloading of the intracellular Ca²⁺, which directly led to the death of alveolar macrophages and further the formation of silicosis. Verapamil could inhibit the [Ca²⁺]_i rise, decline the death of cells. The results of the research about experimental silicosis indicated: verapamil has apparent inhibitory effect on the starting of silicosis. It suggested that verapamil appears to be a prevention and cure drug of silicosis.

Key words verapamil, α-quartz, cellular viability, [Ca²⁺]_i, silicosis