

of Statistics, Yunnan University, Kunming 650091, China); LIU Ci-Quan (Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China).

Abstract After analyzing the secondary structures of 68 exon-intron-exon and the corresponding exon-exon sequence segments, it is found that about 90% of 5' and 3' terminal bases G (splicing sites) of introns are situated in the loops of secondary structures or at the ends of stems near the loops, and most of "G"s in

loops are closed to the ends of loops. Approximately 92% of the connecting sites of the adjoining exons also show the similar features. About 82% of the branch point "A"s are situated in loops or at the ends of stems near the loops. Splicing sites and branch points approach each other in space because of the folding.

Key words mRNA, exon, intron, splicing site, branch point, secondary structure

多形核白细胞上嘌呤受体的初步研究*

陈 涉 聂玉生¹⁾ 胡坤生

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 ATP和ADP能激活多型核白细胞引起细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的明显升高, AMP则无此作用. 多型核白细胞对ATP和ADP具有不同的浓度依赖性. 当细胞外的钙离子被螯合后, ATP和ADP仍能引起细胞内游离钙浓度的升高. 结果表明多形核白细胞存在着对ATP和ADP敏感的P2型嘌呤受体, 并且属于P2型受体中的P2Y亚类.

关键词 白细胞, 嘌呤受体, ATP, Ca^{2+}

学科分类号 Q26

细胞表面对嘌呤核苷化合物敏感的受体称为嘌呤受体. 嘌呤受体分为两大类: P1型受体和P2型受体^[1]. P1型受体对腺嘌呤核苷(AD)和腺嘌呤核苷一磷酸(AMP)敏感, 为一类与G蛋白相偶联的受体, 其信号转导途径伴有cAMP的生成; P2型受体则对ATP和ADP敏感, 可分为两个主要的亚类: P2X型和P2Y型. P2X型嘌呤受体为离子通道型受体, 与配体结合后发生膜的去极化, 使细胞外离子内流; P2Y型受体则与G蛋白相偶联, 与配体结合后激活磷酸肌醇信号通路, 最终使胞内钙离子浓度升高^[2]. P2型嘌呤受体广泛存在于各类组织细胞中, 并对其特定的生理功能起着非常重要的调节作用, 如血小板的凝聚, 胰腺细胞的分泌, 血管平滑肌的舒张, 前列腺素的合成等^[3]. 随着研究的深入, 在越来越多的细胞类型中发现了嘌呤受体. 然而对白细胞中的嘌呤受体的研究很少有报道. 在这里我们以细胞内的钙离子浓度为指标, 采用三种腺嘌呤核苷化合物ATP, ADP和AMP作为激活剂对猪多型核白细胞进行研究, 对其存在的嘌呤受体的类别作了初步分析.

1 材料与方法

1.1 试剂

ATP (adenosine 5'-triphosphate), ADP (adenosine 5'-diphosphate) 和 AMP (adenosine 5'-monophosphate) 购自Sigma公司. Fura-2/AM 购自中国医学科学院药物研究所. 样品制备和测量过程中均使用Hanks缓冲溶液 (pH7.2~7.6, Ca^{2+} 浓度约为1.3 mmol/L).

1.2 多型核白细胞的制备

多形核白细胞由新鲜猪血制得, 参照文献[4]上的方法并加以改进. 纯化后的细胞制成浓度为 1×10^7 个/ml的悬液, 经台盼蓝排斥实验检查细胞存活率达到95%以上.

1.3 Fura-2/AM的负载和荧光的检测

纯化后的多形核白细胞用终浓度为2 μ mol/L的 Ca^{2+} 荧光指示剂Fura-2/AM在37℃负载

* 国家科委试点基金.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-04-17, 修回日期: 1998-06-11

45 min, 负载后的白细胞经洗涤后悬浮于 Hanks 液, 浓度约为 2×10^6 个/ml. 荧光的测量在日立 F4500 荧光分光光度计上用双波长法进行, 激发波长为 340 nm 和 380 nm, 发射波长为 510 nm, 激发波长和发射波长的狭缝宽度均为 10 nm.

1.4 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的计算

采用 Grynkiewicz 等^[5]的方法由两个激发波长 (340 nm 与 380 nm) 的荧光比值计算而得.

2 结 果

ATP、ADP 和 AMP 是生物体内普遍存在的核苷酸化合物, 也是研究细胞表面嘌呤受体常用的激活剂. 用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的这三种腺嘌呤核苷酸化合物刺激多型核白细胞后细胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 变化如图 1 所示. 图 1 显示静息状态下白细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 约为 80 nmol/L. 加入 ATP 后 $[Ca^{2+}]_i$ 升高到 180 nmol/L 左右, 加入 ADP 后 $[Ca^{2+}]_i$ 升高到 140 nmol/L 左右. 但是加入 AMP 后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 基本无变化. 由此可见多型核白细胞对 ATP 和 ADP 敏感, 对 AMP 则不敏感.

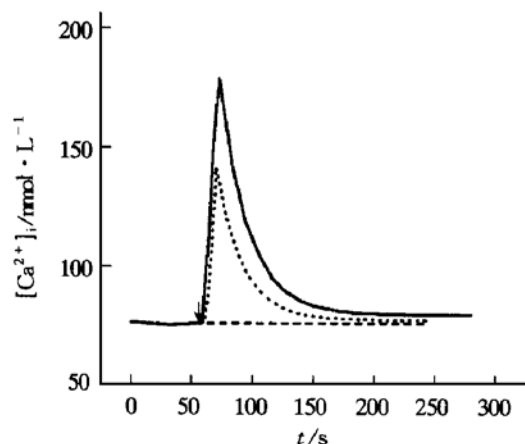


图 1 ATP、ADP 和 AMP 与多形核白细胞作用后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 随时间的变化

三种核苷酸化合物浓度均为 100 $\mu\text{mol/L}$, 在箭头所指的时间处加入. —: ATP;: ADP; - - - -: AMP.

多型核白细胞对 ATP 和 ADP 的浓度依赖性曲线如图 2 所示. 图 2 中 340 nm 与 380 nm 的荧光比值反映了 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化. 曲线显示多型核白细胞对 ATP 和 ADP 均呈浓度的正向依赖性, 两种激活剂在大约 100 $\mu\text{mol/L}$ 左右的浓度上对白细胞的激活作用达到饱和. 一个有趣的事实是白细胞对 ATP 和 ADP 的相对浓度敏感性在不同浓度下不同: 在较低浓度范围内 ADP 对白细胞的激活作用强于 ATP, 而在较高浓度范围内 ATP 对白细胞的激活

作用强于 ADP.

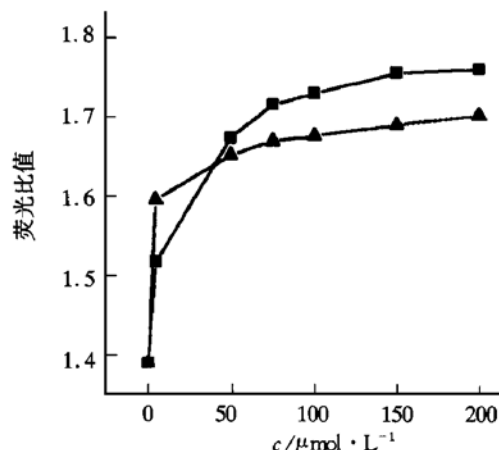


图 2 多形核白细胞与 ATP 和 ADP 作用的浓度依赖性曲线

■ — ■: ATP; ▲ — ▲: ADP.

细胞内游离钙升高的来源有两个: 细胞内钙库中钙的释放和胞外钙的内流. 由于本实验所采用的 Hanks 平衡盐溶液含有浓度大约为 1.3 mmol/L 的钙离子, 为了确定钙的来源, 我们先往细胞悬浮液中加入终浓度约为 5 mmol/L 的 EGTA 将胞外的钙离子螯合掉, 再加入 ATP 和 ADP 与白细胞作用, 结果

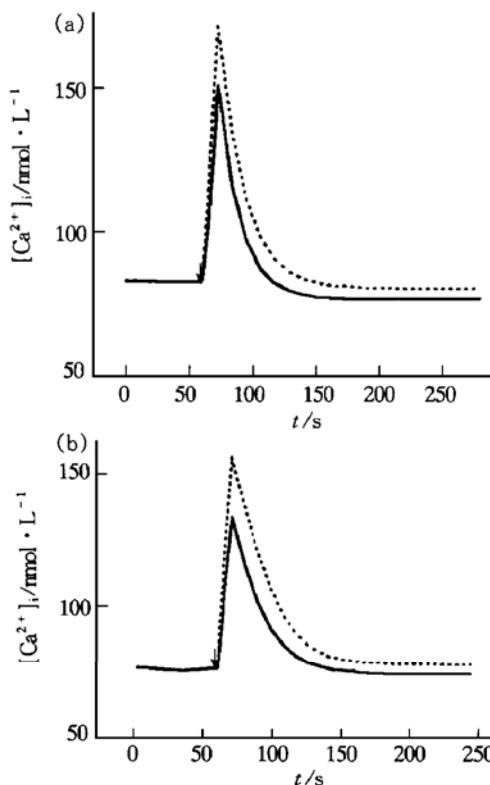


图 3 胞外有钙和无钙时 ATP 和 ADP 所引起的多形核白细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

(a) 100 $\mu\text{mol/L}$ ATP; (b) 100 $\mu\text{mol/L}$ ADP. ATP 或 ADP 在箭头所示的时刻加入.: + Ca^{2+} ; —: + EGTA.

如图3所示。图3表明, 尽管细胞外钙离子被螯合, ATP和ADP仍能激活多型核白细胞使 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。升高的幅度与胞外存在钙的情况略有减小。

3 讨 论

嘌呤受体的分类原则指出: P1型受体对腺苷(AD)和AMP敏感, P2型受体则对ADP和ATP敏感。以 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化为指标, 用三种腺嘌呤核苷酸ATP、ADP和AMP与多型核白细胞作用, 得到的结果完全符合P2型受体被激活的情况。P2型受体分为P2X型和P2Y型两个亚类。P2X型为离子通道型受体, 有两个跨膜结构域, 在结构上非常类似于内向型钾离子通道和上皮细胞钠离子通道^[6]。在一些组织细胞中ATP能激活P2X型受体打开非特异性的离子通道, 引起膜的去极化, 并导致电压门钙离子通道的开放引起钙的内流^[7]。P2Y型受体为典型的跨膜七螺旋结构, 属于与G蛋白相偶联的受体家族^[8], 与配体结合后通过G蛋白转导激活磷脂酶C(PLC), PLC水解膜上的磷脂酰肌醇二磷酸产生第二信使肌醇-1, 4, 5三磷酸(IP3), IP3则与细胞内钙库(如内质网)等上IP3的受体结合引发钙的释放^[9]。因此P2X和P2Y型受体被激活后均可引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。此外, 在某些细胞种类如动脉平滑肌细胞上存在有能与ATP直接作用的钙离子通道, 且不需膜的去极化^[10]。而图3的结果表明在细胞外无钙的情况下ATP和ADP仍能使 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 且升幅与细胞外有钙情况接近, 说明使细胞内游离钙升高的主要贡献者应为胞内钙库中钙的释放, 亦即是P2Y型受体被激活所致。受体被激活后通过肌醇磷酸信号通路引发钙的释放, 使 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。从功能上看, P2Y嘌呤受体可分为两部分: 一部分为结合位点, 与特定的配体结合, 位于膜的外侧; 另一部分为催化位点, 位于膜的内侧, 与信号转导途径相偶联。通过分子克隆的方法, 现已分离表达出至少7种功能上存在差异的P2Y型受体^[11]。已鉴定P2Y型受体的结合位点位于第六和第七螺旋, 结构比较保守, 位于膜内侧的C端则有较大的变化性^[12]。而C端应为受体催化位点的主要参与者, 可以推测由于分别与ATP和ADP作用的P2Y型嘌呤受体的催化位点的差异导致了多型核白细胞对这两种化合物敏感性的不同。肌醇磷酸信号通路亦可在胞内钙释放的同时或稍后引起钙的内流, 并且可能是通过IP4的作用^[7]。在细胞外无钙的情况下

钙内流的作用被消除, 由此可以解释加EGTA后 $[Ca^{2+}]_i$ 升高值低于细胞外有钙的情况。

参 考 文 献

- 1 Fredholm B B, Abbraccio M P, Burnstock G, *et al.* Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *TIPS*, 1997, **18**: 79~82
- 2 Dubyak G R. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1991, **4** (4): 295~300
- 3 Gordon J L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, 1986, **233**: 309~319
- 4 Fredric S F. A Ca^{2+} insensitive form of Fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*, 1987, **262** (13): 6308~6312
- 5 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, **260** (6): 3440~3450
- 6 North R A. P2x receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Foundation Symposia*, 1996, **198**: 91~105
- 7 Benham C D. ATP-activated channels gate calcium entry in single smooth muscle cells dissociated from rabbit ear artery. *J Physiol (London)*, 1989, **419**: 689~701
- 8 Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*, 1997, **36** (9): 1127~1139
- 9 Berridge M J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1993, **361** (28): 315~325
- 10 Benham C D, Tsien R W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*, 1987, **328** (6127): 275~278
- 11 Communi D, Govaerts C, Parmentier M, *et al.* Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 31969~31973
- 12 Barnard E A, Burnstock G, Webb T T. G-protein coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharm Sci*, 1994, **15** (3): 67~70

Study of Purinoceptors on Polymorphonuclear Leukocytes. CHEN She, NIE Yu-Sheng, HU Kun-Sheng (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract $[Ca^{2+}]_i$ transients were induced in porcine polymorphonuclear leukocytes in response to ATP and ADP, while no evident change in $[Ca^{2+}]_i$ was observed after AMP addition. The cells showed varied dose dependency upon ATP and ADP. In the Ca^{2+} -free bath solution, ATP and ADP could still cause $[Ca^{2+}]_i$ elevation in the cells. The results showed that the P2 receptors are present on porcine polymorphonuclear leukocytes and should belong to the P2Y subclass of purinoceptor family.

Key words leukocyte, purinoceptor, ATP, Ca^{2+}