



# 线粒体稳定高钙信号诱发超氧炫

简崇书, 侯婷婷, 殷荣康, 程和平, 王显花\*

北京大学分子医学研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 钙信号与线粒体生物医学实验室, 北京 100871

\* 联系人, E-mail: xianhua@pku.edu.cn

收稿日期: 2013-09-03; 接受日期: 2013-09-18

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB531201, 2011CB809102)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 31130067)和国家自然科学基金(批准号: 31221002, 31123004)项目资助

doi: 10.1360/052013-281

**摘要** 线粒体对于细胞钙信号和活性氧信号转导有重要的调控作用. 超氧炫是新近发现的单个线粒体超氧阴离子短时程爆发现象, 反映了活性氧生成动力学的一种新形式. 线粒体钙信号作为重要的细胞功能调控信号, 能否及如何调控超氧炫尚待深入研究. 本研究对 HeLa 细胞进行高胞外钙和离子霉素刺激, 或用皂苷穿孔细胞质膜后置于高钙细胞内液中, 两种方法均显著增加了超氧炫发生的频率. 其中, 穿孔细胞胞浆高钙诱导的超氧炫依赖于线粒体钙单向转运体, 表明超氧炫由线粒体基质内高钙信号所诱发. 重要的是, 离子霉素诱导的超氧炫发生频率与线粒体稳态钙水平线性相关, 而与瞬态线粒体钙无相关性, 提示钙离子对超氧炫的调控是一个多步骤、相对缓慢的过程. 综上, 线粒体基质的稳态高钙是超氧炫的重要调控因子.

**关键词**  
超氧炫  
钙信号  
活性氧  
线粒体

钙信号和活性氧信号是机体内非常重要的两大信号系统. 钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )是细胞内最广泛、进化上最古老的信号分子, 参与调控卵细胞受精、肌肉兴奋-收缩偶联、细胞增殖分化与凋亡等多种重大生命过程<sup>[1]</sup>. 而活性氧(reactive oxygen species, ROS)是一类化学性质非常活泼的含氧自由基或分子<sup>[2]</sup>, 包括超氧阴离子(superoxide anion radical,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、羟自由基(hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ )和过氧化氢(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 可对多种生物大分子造成损伤, 引起氧化应激反应, 也可作为第二信使, 参与细胞内多种信号通路的调节<sup>[3]</sup>.

线粒体是细胞内钙信号和活性氧信号相互作用的交汇点之一. 钙离子通过调节线粒体和细胞质内活性氧的产生和消除机制来调节活性氧的稳态. 相应的, 线粒体呼吸链电子漏产生的活性氧<sup>[4]</sup>通过氧化还原作用来修饰钙信号系统的组分和影响细胞内钙

稳态<sup>[5]</sup>. 二者紧密作用, 共同调控多种生理功能和病理过程.

本实验室<sup>[6]</sup>前期工作中, 利用特异、可逆的超氧阴离子黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)探针 cpYFP, 在活细胞单个线粒体上观测到局部、间歇性、量子化的超氧阴离子瞬时爆发现象, 并命名为“超氧炫”(superoxide flash). 这是 ROS 生成动力学的一种新形式, 而且广泛存在于分离的线粒体、培养的细胞、跳动心脏及活体动物内<sup>[6-8]</sup>. 进一步研究超氧炫的产生机制, 发现超氧炫由线粒体膜通透性转运孔道(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放所触发, 并与线粒体电子传递链活性密切相关. 超氧炫在生理、病理及应激条件下都发挥着重要作用<sup>[9-11]</sup>.

作为线粒体的两大重要信号, 超氧炫和钙信号

**引用格式:** 简崇书, 侯婷婷, 殷荣康, 等. 线粒体稳定高钙信号诱发超氧炫. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 869-876

Jian C S, Hou T T, Yin R K, et al. Regulation of superoxide flashes by steady-state and transient elevations of mitochondrial calcium. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 869-876, doi: 10.1360/052013-281

之间如何作用呢? Wang 等人<sup>[6]</sup>对钙信号与超氧炫的关系进行首次探索, 发现心肌细胞超氧炫发放频率不受钙火花活性的影响. Hou 等人<sup>[10]</sup>用组胺(histamine)和离子霉素(ionomycin)分别刺激 HeLa 细胞的钙信号, 发现生理胞外钙(1.8 mmol/L)条件下, 两者均不能刺激超氧炫; 同时增加胞内钙和本底 ROS 水平, 超氧炫发生频率显著增加, 认为钙和 ROS 协同作用诱导超氧炫. 然而, 钙离子单独能否及如何调控超氧炫信号目前尚无定论. 本研究利用不同方式刺激细胞钙信号, 发现瞬态钙变化不影响超氧炫产生, 而线粒体稳态高钙显著增加超氧炫的发生频率, 提示线粒体钙是重要的超氧炫调控因子.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

环孢霉素 A(cyclosporine A, CsA)、皂苷(saponin)、离子霉素、钌红(ruthenium red, RR)均购自 Sigma-Aldrich(美国). 钙荧光探针 Rhod-2 AM 和 Fluo-4 AM 购于 Molecular Probes(美国). 转染试剂 lipofectamine RNAiMax、青霉素、链霉素购于 Invitrogen(美国). 胎牛血清购于 Hyclone(美国). DEME(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基购于 Gibco(美国).

### 1.2 细胞培养和 RNAi 干扰

稳定表达线粒体定位 cpYFP 的 HeLa 细胞系由本实验建立并保存<sup>[9]</sup>. 细胞培养使用含胎牛血清 10%、青霉素和链霉素各  $10^2$  U/mL 的 DMEM 培养基. 细胞于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养.

干扰 MCU(CCDC109a)表达的 siRNA 及其阴性对照(negative control, NC)由上海吉玛制药技术有限公司合成. 其序列如下, MCU-1 正义链: CCAGCAA-CUAUACACCACACUdTdT, 反义链: AGUGUGGU-GUAUAGUUGCUGGdTdT; MCU-2 正义链: GCAA-GGAGUUUCUUUCUUdTdT, 反义链: AAAGA-GAAAGAAACUCCUUGCdTdT; NC 正义链: UUCU-CCGAACGUGUCACGUdTdT, 反义链: ACGUGAC-ACGUUCGGAGAAdTdT.

35 mm 培养皿中接种  $3 \times 10^5$  个细胞, 培养 16 h 后, 采用脂质体转染试剂 Lipofectamine RNAiMax, 按照制造商提供的流程, 将 100 nmol/L siRNA 转入细胞中, 60~72 h 后收取蛋白检测 siRNA 干扰效率或进行

激光共聚焦成像.

### 1.3 钙信号测量

利用钙荧光染料 Fluo-4 AM 和 Rhod-2 AM 分别指示胞浆钙和线粒体钙. 装载时, 先用含 Rhod-2 AM (5  $\mu$ mol/L)的台氏液(137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mmol/L D-葡萄糖, 20 mmol/L HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), NaOH 调 pH 至 7.35)37°C 温育细胞 20 min, 再加入 Fluo-4 AM(5  $\mu$ mol/L), 37°C 继续温育 10 min, 以使荧光探针进入细胞. 用台式液洗去外液中残余的染料后, 用倒置激光共聚焦显微镜(蔡司 LSM710 Meta, 德国)采集图像, 2 s/帧, 连续采集 450 帧. Fluo-4 AM 的激发光波长 488 nm, 荧光观测波长 505~530 nm; Rhod-2 AM 的激发光波长 543 nm, 荧光观测波长 >560 nm.

### 1.4 细胞穿孔法

使用皂苷(saponin)对细胞进行穿孔. 皂苷是一种胆固醇复合物, 能够与细胞膜中的胆固醇成分结合, 使得细胞膜穿孔通透. 打孔前, 用不含钙离子的台氏液冲洗细胞 5 遍, 洗尽细胞外钙. 然后加入含皂苷(50  $\mu$ g/mL)的细胞内液, 打孔 30 s 后立即吸弃含皂苷的细胞内液, 换入含 100 nmol/L 钙离子的细胞内液.

细胞内液的配方如下: 100 mmol/L KOH, 100 mmol/L 天冬氨酸, 20 mmol/L KCl, 0.81 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 3 mmol/L Mg-ATP, 0.5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L 磷酸肌酸-diTris, 10 mmol/L 磷酸肌酸-Na, 5 mmol/L 肌酸磷酸激酶, 10 mmol/L 谷胱甘肽, 8%葡聚糖和 20 mmol/L HEPES, KOH 调 pH 至 7.2.

### 1.5 超氧炫信号采集和分析

实验中使用蔡司 LSM710 倒置激光共聚焦显微镜测量细胞中 cpYFP 荧光强度的变化. 选用 40 倍物镜(油镜, NA=1.3), Z 轴方向分辨率调节为 2.0  $\mu$ m; cpYFP 激发光波长为 488 和 405 nm, 荧光观测波长为 515~530 nm. 时间序列图像的采样间隔为 1 s, 连续采样 100 帧. 不同处理后, 图像采集在 30 min 内完成. 所有实验均在室温下(24~26°C)完成.

对于超氧炫的数据分析主要采用本实验室<sup>[12]</sup>基于交互式数据语言(interface description language, IDL)

语言环境开发的程序(FlashSniper)进行. 主要流程包括读取 LSM(laser scanning microscopy)图像数据、图像预处理(校正平移、校正摆动、校正光漂白)、自动探测超氧炫、手动检查核实、自动分析超氧炫的特征参数、手动检查核实及保存分析结果.

### 1.6 统计分析

实验结果在 Microsoft Excel 或 GraphPad Prism 5 软件中, 选用 *t* 检验或配对 *t* 检验进行分析, 数据表示为  $\bar{x} \pm SE$ . 当  $P < 0.05$  时, 表示有显著性差异.

## 2 结果

### 2.1 超氧炫发生频率随胞内稳态钙水平的增加而增强

以稳定表达线粒体定位的 cpYFP 的 HeLa 细胞系

为实验细胞模型, 用钙离子载体 ionomycin 刺激胞浆及线粒体钙信号, 并分别利用胞浆钙指示剂 Fluo-4 和线粒体钙指示剂 Rhod-2 进行检测. 如图 1A 所示, 处于生理胞外钙水平 ( $[Ca^{2+}]_{ex} = 1.8 \text{ mmol/L}$ ) 的细胞受到 ionomycin ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 刺激时, Fluo-4 和 Rhod-2 的荧光强度瞬时增加 (Fluo-4:  $F/F_0 = 8.5 \pm 0.14$ ; Rhod-2:  $F/F_0 = 4.81 \pm 0.09$ ,  $n \geq 70$  个细胞), 达到峰值后, 胞浆钙和线粒体钙缓慢下降, 约 5 min 后恢复到稳态. 相对于刺激前, 刺激后的胞浆和线粒体钙稳态水平显著增加 (Fluo-4:  $F/F_0 = 1.31 \pm 0.03$ ; Rhod-2:  $F/F_0 = 1.30 \pm 0.02$ ,  $n \geq 70$  个细胞). 胞外高钙 (3.6, 5 和 10 mmol/L) 条件下, ionomycin ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 刺激均诱发了胞浆和线粒体的钙瞬变 (图 1B, C 和 D). 有趣的是, 钙瞬变的峰值并不受胞外钙浓度的影响 (图 1E), 一种可能的解释是钙瞬变是 ionomycin 介导的胞外钙离子内流所引起的内质网钙库释放, 其峰值反映的是细胞钙库的钙释放

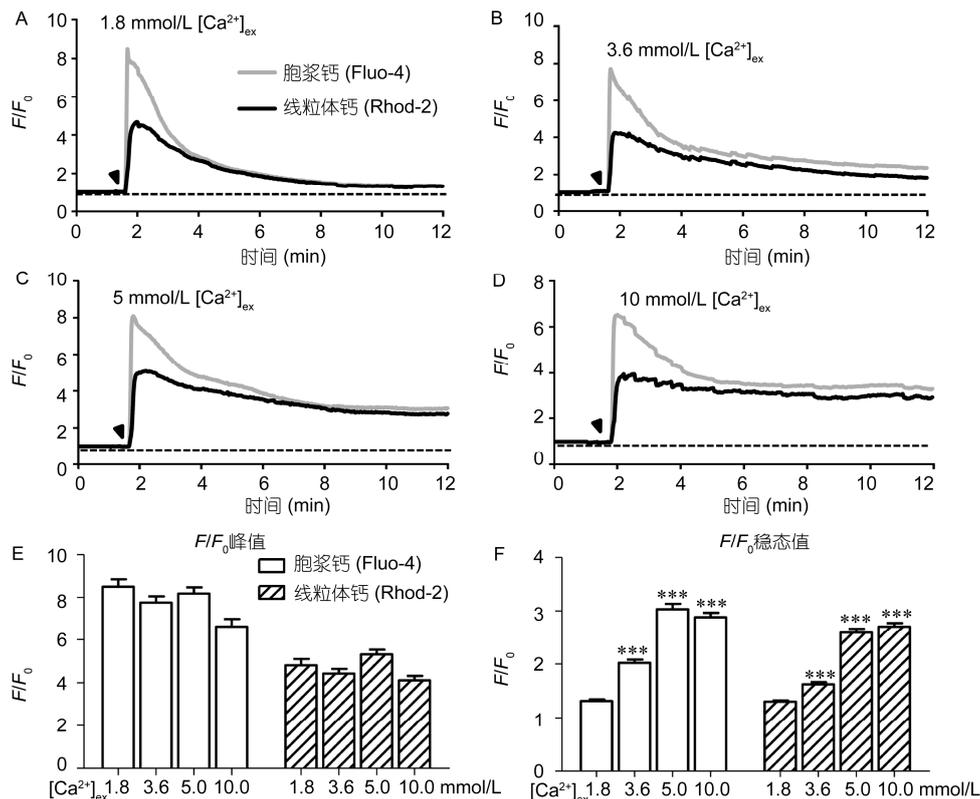


图 1 钙离子载体 ionomycin 诱导胞浆和线粒体钙信号

A-D: 不同胞外钙浓度条件下, ionomycin 诱发胞浆和线粒体钙瞬变, 并增加稳态钙水平. 箭头表示 ionomycin ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 加药点; E: 胞外钙离子浓度不影响 ionomycin 诱导钙瞬变的峰值; F: 胞外钙离子浓度依赖性地增加胞浆钙和线粒体钙的稳态值. 高钙组 (3.6~10 mmol/L) vs. 正常钙组 (1.8 mmol/L), \*\*\*:  $P < 0.001$

水平, 因此不依赖于胞外钙浓度; 而胞浆和线粒体稳态钙水平反映的是由 ionomycin 参与的细胞内外钙离子动态平衡, 因此随着胞外钙浓度梯度增加(图 1F), 具体结果是 3.6, 5.0 和 10 mmol/L, 细胞外钙组达到的稳态钙水平分别为 Fluo-4:  $F/F_0=2.02\pm 0.06$ ,  $3.03\pm 0.10$  和  $2.88\pm 0.08$ ; Rhod-2:  $F/F_0=1.62\pm 0.04$ ,  $2.59\pm 0.08$  和  $2.70\pm 0.07$  ( $n\geq 61$  个细胞)。

在并行实验中检测超氧炫信号, 发现当胞外钙浓度达到 3.6 mmol/L 时, 超氧炫发生频率显著上升 ( $P=0.02$ ), 在胞外钙浓度为 5 和 10 mmol/L 时, 超氧炫发生频率分别有 2.2 和 3.1 倍的增加 ( $P<0.0001$ ) (图 2A)。超氧炫发生频率与胞内稳态钙离子水平呈较强的正相关 ( $R^2=0.8239$ ) (图 2B)。

进一步分析钙信号动态变化与超氧炫的关系, 发现胞外钙浓度为 1.8 mmol/L 时, ionomycin 刺激 5 min 内超氧炫发生频率并不随胞内钙信号的变化而改变, 5 min 后钙浓度恢复到稳态时, 超氧炫频率仍与刺激前相当(图 2C), 说明生理胞外钙条件下, 胞内

钙瞬变不影响超氧炫频率, 这与 Hou 等人<sup>[10]</sup>报道的结果一致。然而, 细胞处于高胞外钙条件下(此处以 5 mmol/L 胞外钙为例), ionomycin 刺激 5 min 内, 随胞浆和线粒体钙的增加, 超氧炫发生频率呈上升趋势, 5 min 后, 当胞浆钙和线粒体钙恢复到较高的稳态水平时, 超氧炫频率显著增高(图 2D)。超氧炫发生频率与钙信号动态变化的非偶联性提示, 钙离子激活超氧炫是一个多步骤、相对缓慢的动力学过程。

## 2.2 高浓度胞浆钙在穿孔细胞上诱导高频超氧炫

接着, 用皂苷对细胞质膜进行穿孔, 通过直接控制细胞内液中钙离子浓度(100, 300, 500 nmol/L 和 1, 3, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), 进一步研究细胞稳态钙对超氧炫的调控。如图 3A 所示, 当钙浓度为 300 和 500 nmol/L 时, 超氧炫发生频率相对于生理浓度 100 nmol/L 时略有升高, 但没有统计学差异。而当钙浓度达到 1, 3 和 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 超氧炫的发生频率较 100 nmol/L 组分别有 2.2, 2.7 和 3 倍的增加 ( $P<0.0001$ )。实验结果说

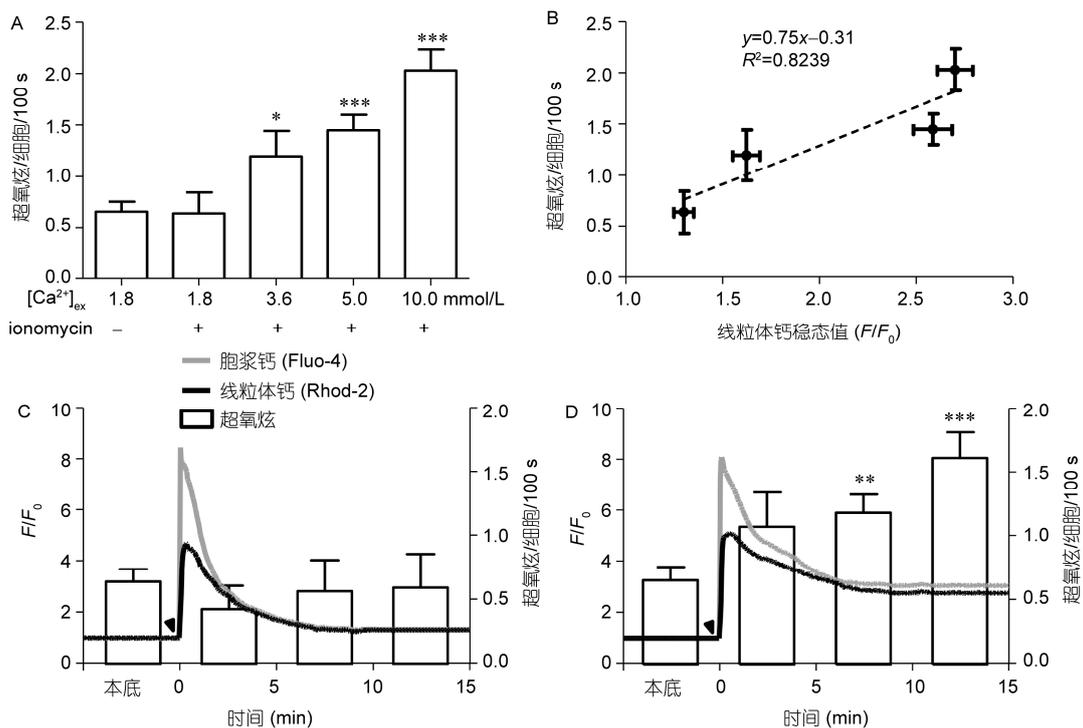


图 2 ionomycin 诱导超氧炫

A: 不同胞外钙浓度下 ionomycin(1  $\mu\text{mol/L}$ )对超氧炫发生频率的影响. ionomycin 刺激组 vs. 对照组, \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ; B: 超氧炫发生频率与 ionomycin 诱导的胞内稳态钙水平呈正相关; C:  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  为 1.8 mmol/L 时胞浆钙和线粒体钙信号变化与超氧炫发生频率的关系. 箭头表示 ionomycin 加药点; D:  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  为 5 mmol/L 时胞浆钙和线粒体钙信号变化与超氧炫发生频率的关系. 箭头表示 ionomycin 加药点. ionomycin 刺激不同时段 vs. 本底, \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$

明, 微摩尔量级以上的胞内稳态高钙能够浓度依赖性地刺激超氧炫.

在检测超氧炫的同时, 还观察到与对照组 ( $[Ca^{2+}]_c=100\text{ nmol/L}$ )相比, 高钙组 ( $[Ca^{2+}]_c>1\text{ }\mu\text{mol/L}$ )时, 此处以  $3\text{ }\mu\text{mol/L}$  为例)的线粒体出现明显片段化和肿胀, 这是线粒体通透性转换孔道 mPTP 开放的特征. 为了验证胞浆稳态高钙诱导的超氧炫是否依赖于 mPTP 的开放, 用 mPTP 特异抑制剂环孢霉素 CsA ( $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ )处理细胞, 发现  $3\text{ }\mu\text{mol/L}$  胞浆高钙不能引起 CsA 处理组的线粒体片段化和肿胀(图 3C). 对超氧炫发生频率进行统计, 结果显示, 生理浓度钙条件下, CsA 处理组超氧炫频率与对照组比略有下降, 而在  $3\text{ }\mu\text{mol/L}$  高钙刺激条件下, CsA 有效地降低了超氧炫发生频率(图 3B). 以上结果表明, 穿孔细胞上高钙所诱导的超氧炫依赖于 mPTP 的开放.

### 2.3 线粒体钙单向转运体 MCU 对钙诱导超氧炫的作用

以上两种钙信号的刺激方式均同时增加胞浆和线粒体钙水平, 而超氧炫代表线粒体的功能特性, 因

此进一步研究是否是线粒体的稳态高钙刺激了超氧炫. 得益于线粒体钙单向转运体蛋白分子的鉴定<sup>[13,14]</sup>, 利用 MCU 特异的 siRNA (siMCU-1 和 siMCU-2), 干扰 MCU 的表达, 从而改变线粒体钙的摄取. Western blot 结果显示, siMCU-1 和 siMCU-2 均有效下调了 MCU 的蛋白水平(图 4A).

结果显示, MCU 表达被干扰后, 虽然 ionomycin 所刺激的线粒体钙瞬变峰值下降, 但线粒体稳态钙水平没有变化, 表明在 ionomycin 刺激条件下, MCU 只参与了钙瞬变过程的线粒体钙摄取(图 4B 和 C). 与稳态钙水平的变化一致, ionomycin 诱导的超氧炫发生频率不受 MCU 表达量的影响(图 4D), 进一步说明稳态高钙诱导了超氧炫发生. 由于 ionomycin 刺激条件下, 胞浆和线粒体稳态高钙由 ionomycin 本身介导, 而不依赖于 MCU, 因此无法区分胞浆与线粒体高钙在诱导超氧炫过程中的作用. 而在穿孔细胞的钙刺激条件下, MCU 是外钙进入线粒体的主要途径, 因此进一步检测 MCU 对穿孔细胞中高钙诱导的超氧炫的影响. 利用 MCU 抑制剂钌红处理细胞, 发现 RR 有效地抑制了高钙诱导的超氧炫发生频率, 与对照

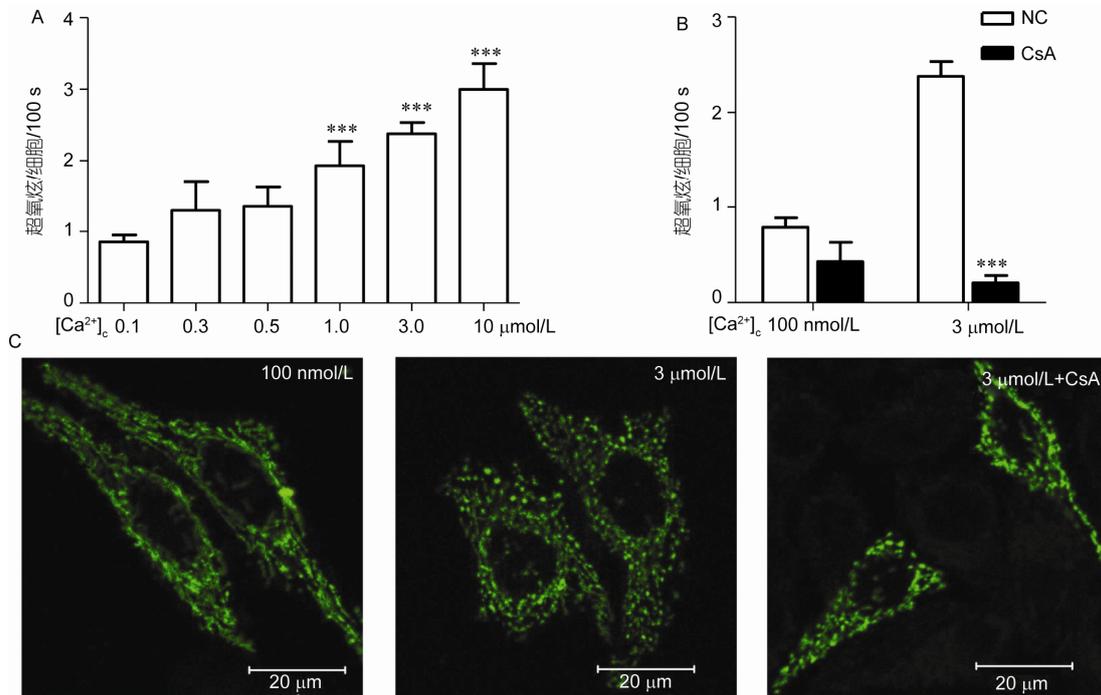


图3 穿孔细胞中胞浆高钙诱导超氧炫

A:  $1.0\text{ }\mu\text{mol/L}$  以上的胞浆高钙浓度依赖性地增加超氧炫的发生频率. 高钙组 ( $0.3\sim 10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) vs. 正常钙组 ( $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ ),  $***: P<0.001$ ; B: CsA 显著抑制高钙诱导的超氧炫. CsA 处理组 vs. 对照组,  $***: P<0.001$ ; C: 高钙诱导的线粒体肿胀

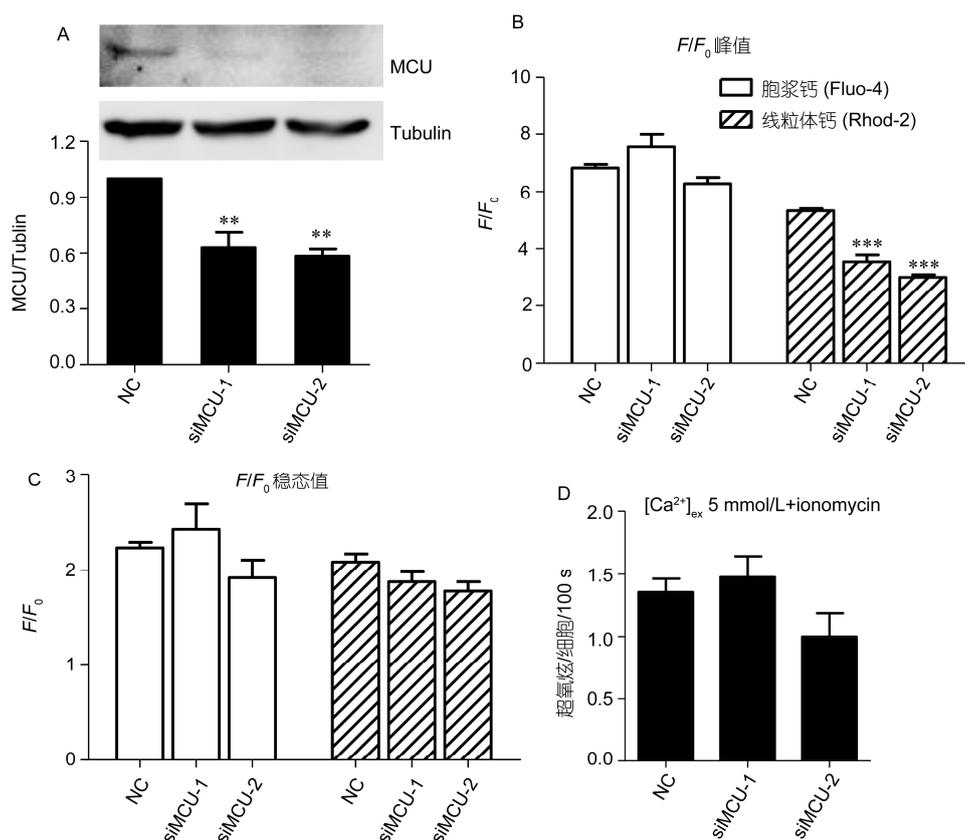


图4 ionomycin 诱导的超氧炫不依赖于线粒体钙单向转运体 MCU

A: siMCU-1 和 siMCU-2 抑制 MCU 表达; B~D: 干扰 MCU 表达对 5 mmol/L 胞外钙条件下, ionomycin 诱导的钙瞬变峰值(B)、稳态值(C)和超氧炫(D)的影响. 处理组 vs. 对照组, \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

组相比降低了 80%(图 5A). 相一致地, 干扰 MCU 的表达也显著降低了高钙所诱导的超氧炫(siMCU-1:  $73.2 \pm 0.12\%$ , siMCU-2:  $49.1 \pm 0.09\%$ )(图 5B). 这些实验结果说明, 是线粒体而非胞浆稳态高钙刺激产生了超氧炫.

### 3 讨论

作为线粒体的两大重要信号, 超氧炫和钙信号是否存在相互作用值得研究. 本工作对 HeLa 细胞进行高胞外钙和 ionomycin 刺激, 或将穿孔细胞置于高钙细胞内液中, 两种方法不仅使胞浆和线粒体钙达到很高的稳态水平, 而且增加了超氧炫发生频率, 从而表明钙离子在一定条件下能够刺激超氧炫. 并且, 钙离子对超氧炫的调控存在阈值效应, 胞浆钙的稳定浓度达到微摩尔量级以上时才能够诱导超氧炫发生. 超氧炫发生频率与线粒体稳态钙水平线性相关,

而不依赖于瞬时( $< 5 \text{ min}$ )的钙增加, 这种动力学特征提示钙离子对超氧炫的调控是一个多步骤、相对缓慢的过程.

阻断线粒体钙摄取, 穿孔细胞中由胞浆高钙所刺激的超氧炫信号被抑制, 表明线粒体的稳态高钙刺激了超氧炫. 有趣的是, 虽然 ionomycin 所刺激的线粒体钙瞬变峰值依赖于 MCU, 但其诱导的超氧炫信号却不受 MCU 表达量的影响. 这是由于 ionomycin 作为一种可跨膜的钙离子载体, 除了将细胞膜外的钙离子转运至胞内, 同时也可以将胞浆中的钙离子转入线粒体, 从而使得线粒体维持稳态高钙水平, 而此时 MCU 对于线粒体稳态钙水平的影响就微乎其微了. 这些结果表明, 钙离子无论是通过 MCU 还是离子载体, 只要进入线粒体基质, 并维持较高的稳态水平, 便可诱发超氧炫.

线粒体稳态高钙诱发的超氧炫与 mPTP 瞬时开放相偶联. 打孔细胞在高钙刺激条件下, 既能检测

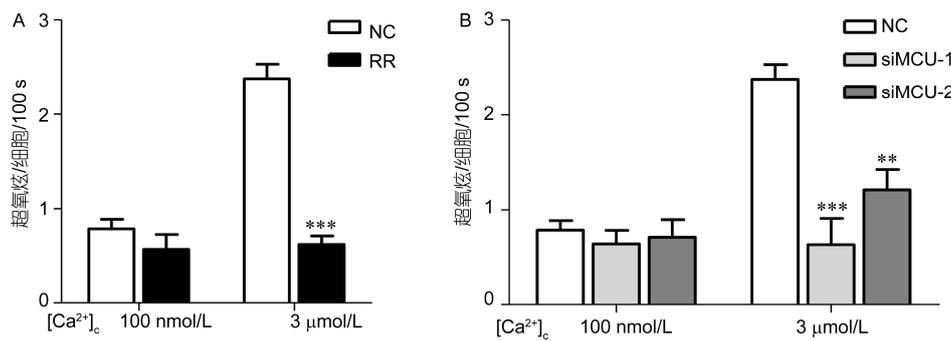


图5 穿孔细胞中, 高钙刺激的超氧炫依赖于线粒体钙单向转运体 MCU

MCU 抑制剂钉红(RR, 0.5 μmol/L)(A)和 siRNA 干扰 MCU 表达(B)显著抑制穿孔细胞中高钙所刺激的超氧炫发生. 处理组 vs. 对照组, \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

到高频的超氧炫, 也能观察到线粒体肿胀的发生. 线粒体稳态高钙诱导的超氧炫对 mPTP 抑制剂 CsA 的敏感性也进一步说明 mPTP 瞬时开放在超氧炫发生中的重要作用.

超氧炫对于线粒体钙信号刺激的应答较慢, 并且对线粒体瞬态钙信号没有反应, 提示超氧炫不是由钙离子直接接触触发的, 而是线粒体稳态高钙引起的慢激活的、多步骤的、具有阈值效应的信号转导结果. 线粒体高钙诱发超氧炫的可能机制如下: (i) 线粒体高钙加快线粒体呼吸, 增加呼吸链电子漏, 导致超氧阴离子增加, 从而刺激超氧炫. 线粒体钙的一项重要功能就是刺激三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)和氧化磷酸化过程. 特别地, 钙离子可以激活三羧酸循环的3种脱氢酶(丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶)、ATP合成酶和腺嘌呤核苷转运酶(adenine nucleotide translocase, ANT)<sup>[15-17]</sup>. 因此, 钙离子可能在加快代谢速度和 ATP 的合成、

提高耗氧量的同时也增加了线粒体 ROS 的产生, 继而诱发超氧炫; (ii) 钙离子可能通过激活某些多级的下游钙信号通路调控超氧炫活性. 线粒体稳态钙离子水平的增加会激活许多与钙相关的酶类, 如钙调激酶蛋白酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC). Joiner 等人<sup>[18]</sup>报道了 CaMK II 参与线粒体应激反应, 线粒体靶向的 CaMK II 抑制作用可以阻止或减少线粒体应激反应, 提示线粒体内具有 CaMK II 活性. 那么, 线粒体稳态高钙是否通过  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-CaMK II 这条信号通路调控超氧炫活性, 值得进一步探究.

综上, 本工作通过不同方式刺激细胞钙信号, 证明了线粒体的稳态高钙能够浓度依赖性地诱导超氧炫发生, 而瞬态钙增加不影响超氧炫活性, 表明钙离子对超氧炫的调控是一个多步骤、相对缓慢的动力学过程. 本工作解析了一种新的超氧炫调控机制, 为理解线粒体钙参与活性氧平衡的作用机制及氧化应激中钙失调的作用提供了重要线索.

## 参考文献

- Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 517-529
- Wallace D C. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp*, 2001, 235: 247-266
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47-95
- Nohl H, Gille L, Staniek K. The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Acta Biochim Pol*, 2004, 51: 223-229
- Yan Y, Wei C L, Zhang W R, et al. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27: 821-826
- Wang W, Fang H, Groom L, et al. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, 2008, 134: 279-290
- Fang H, Chen M, Ding Y, et al. Imaging superoxide flash and metabolism-coupled mitochondrial permeability transition in living animals. *Cell Res*, 2011, 21: 1295-1304
- Zhang X, Huang Z, Hou T, et al. Superoxide constitutes a major signal of mitochondrial superoxide flash. *Life Sci*, 2013, 93: 178-186
- Ma Q, Fang H, Shang W, et al. Superoxide flashes: early mitochondrial signals for oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2011, 286:

27573–27581

- 10 Hou T, Zhang X, Xu J, et al. Synergistic triggering of superoxide flashes by mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter and basal reactive oxygen species elevation. *J Biol Chem*, 2013, 288: 4602–4612
- 11 Hou Y, Ouyang X, Wan R, et al. Mitochondrial superoxide production negatively regulates neural progenitor proliferation and cerebral cortical development. *Stem Cells*, 2012, 30: 2535–2547
- 12 Li K, Zhang W, Liu J, et al. Flash sniper: automated detection and analysis of mitochondrial superoxide flash. *Biophys J*, 2009, 96: 531a–532a
- 13 Baughman J M, Perocchi F, Girgis H S, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011, 476: 341–345
- 14 De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, et al. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011, 476: 336–340
- 15 Hansford R G, Zorov D. Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem*, 1998, 184: 359–369
- 16 Harris D A, Das A M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J*, 1991, 280(Pt 3): 561–573
- 17 Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, et al. Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 324: 130–134
- 18 Joiner M L, Koval O M, Li J, et al. CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*, 2012, 491: 269–273

## Regulation of Superoxide Flashes by Steady-state and Transient Elevations of Mitochondrial Calcium

JIAN ChongShu, HOU TingTing, YIN RongKang, CHENG HePing & WANG XianHua

*Laboratory of Calcium Signaling and Mitochondrial Biomedicine, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Molecular Medicine, Peking University, Beijing 100871, China*

The mitochondria play an essential role in both intracellular calcium signaling and reactive oxygen species (ROS) signaling. As a newly discovered universal and fundamental mitochondrial phenomenon, superoxide flashes reflect transient bursts of superoxide formation in the matrix of single mitochondria. Whether and how the superoxide flash activity is regulated by mitochondrial calcium remain largely unknown. In this study, it is demonstrated that elevating mitochondrial calcium either by the calcium ionophore ionomycin or by increasing the bathing calcium in saponin-permeabilized cells effectively augmented the superoxide flash incidence. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter activity abolished the flash response in the permeabilized cells. Quantitatively, the superoxide flash incidence linearly correlated with the steady-state mitochondrial calcium level, with 1.7-fold increase in flash incidence per 1.0  $\Delta F/F_0$  of Rhod-2. In contrast, large mitochondrial calcium transients (e.g. Rhod-2 peak:  $\Delta F/F_0 \sim 3.8$ , duration  $\sim 2$  min) in the absence of steady-state elevations failed to increase the flash activity. These results indicate that mitochondrial calcium is a potent regulator of superoxide flashes, but its mechanism of action likely involves a multi-step, slow onset process.

**superoxide flash, calcium signaling, reactive oxygen species (ROS), mitochondria**

doi: 10.1360/052013-281