

细胞内钙的调节及生理意义^{*}

(综述)

平喘药物研究室 周汉良 综述 卞如濂 审校

细胞内钙为许多生物学现象的中间媒介,例如细胞电活动、细胞运动、细胞中间代谢、细胞内吞(Endocytosis)与胞吐(Exocytosis)以及细胞的生长与增殖均由钙来介导。许多类药物往往通过影响细胞膜的钙内流与外运或细胞内的钙摄取与释放等过程而产生一定的药理效应。故细胞内钙的动态是了解细胞生理功能与药物作用的基础。

一、细胞内钙的调节 细胞内钙的分布和浓度随细胞种类不同而异,象骨骼肌、血小板与含颗粒的分泌细胞,有特别高的细胞内钙浓度。如以细胞总钙含量为2mmole的真核细胞为例, Ca^{2+} 分布在核50%(1mmole)、线粒体30%(0.6mmole)、内质网14%(0.28mmole)、细胞膜外侧面5%(0.1mmole)、细胞浆中结合钙0.5%(10 μmole)、细胞浆中游离钙0.005%(0.1 μmole)。大多数细胞浆中游离钙浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与细胞外的钙浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 相差约1万倍 $[\text{Ca}^{2+}]_o/[\text{Ca}^{2+}]_i = 10^{-3}\text{M}/10^{-7}\text{M}$ 。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 直接关系到细胞的生物效应,当细胞激活时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 可由约 10^{-7}M 增加到约 10^{-5}M ;当细胞恢复正常状态时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 又降为约 10^{-7}M 。细胞具有快速调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的机制,包括①细胞膜对钙的内流和外运,②细胞器膜对 Ca^{2+} 的释放和贮存,③与细胞浆中蛋白质[如调钙蛋白(Calmodulin) CaM等]的结合或释放。细胞内外可交换的总钙量为150~500 $\mu\text{mole/kg}$ 组织,该数值要比 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 高1000倍,故提示大部分可交

换的钙从细胞器以及细胞浆中蛋白质结合的部分释放到细胞浆中,然后再与细胞外进行交换^{1,2)}。

1.细胞的钙内流:细胞钙的内流是顺着电化学梯度的。由于细胞静息时膜对钙的通透性很低,且钙泵可排出进入细胞的钙,故在细胞膜两侧形成1万倍的浓度梯度与60mv的电位梯度。当膜去极化或受激动剂作用时,即可引起钙的内流。细胞膜至少存在着两类钙通道。

(一) 电位操纵通道(Potential-Operated Channel, POC):当膜去极化时,膜电位降低促使POC的闸门开放,从而发生钙内流。高浓度钾离子引起膜去极化也可使POC开放。钙通道激动剂Bay K 8644、YC-170和CGP28 392的化学结构和钙通道阻断剂硝苯吡啶很相似,但钙通道激动剂能开放POC,有促进钙内流的作用。根据理论计算,当膜去极化形成动作电位时,钙内流量很小不足以引起生理效应。但膜的去极化或内流钙可引起细胞器贮钙的释放。

(二) 受体操纵通道(Receptor-Operated Channel, ROC):当递质、激素或激动剂激动受体后,可引起ROC开放,促进钙内流。ROC的开放和膜电位的改变无关,因为ROC开放时,细胞膜可呈现去极化,极化或超极化的不同状态。对ROC的了解较少,有学者认为ROC可能为POC的一种特殊形式。在大动脉平滑肌细胞中ROC与POC是有区别的:①对有机钙通道拮抗剂的敏感性, $\text{ROC} < \text{POC}$; ②高钾去极化引起的收

* 本文曾在1985年浙江省生理科学学会年会上报告

缩和激动剂引起者有不同的温度敏感性；
③高钾去极化引起的 ^{45}Ca 内流增加与去甲肾上腺素引起者有相加作用。

近年来应用高比活的 $[\text{}^3\text{H}]$ -二氢吡啶类($[\text{}^3\text{H}]-1,4\text{-dihydropyridines}$)进行结合实验,使钙通道的研究更加深入。已阐明不同种属的多种组织均有二氢吡啶结合点,且这种结合可以饱和,并受温度的影响;二氢吡啶结合点对蛋白酶敏感,提示该结合部位为蛋白质。现已对钙通道蛋白进行提取与纯化,分子量约为200,000与185,000;磷脂酶A与磷脂酶C可使其结合量分别降低82%与75%,说明磷脂对通道的结构和功能有一定的关系。结合实验还表明骨骼肌中钙通道存在于肌纤维外膜、横管膜、连接膜以及所支配的胆碱能神经突触前膜^(2,3)。

2. 细胞钙的外运:细胞从激活态恢复为静息态时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的下降主要依靠外运机理,即使由细胞器贮存池释放的钙也大部分外运到细胞外,而很少再回到原来释放它的细胞器。钙外运机理主要有两种,钙泵与 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换;在某些微生物尚存在 $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换。

(一) 钙泵:细胞内钙排斥到细胞外是背着电化学梯度,故这过程需要消耗三磷酸腺苷(ATP)。钙泵即钙镁ATP酶($\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++}-\text{ATPase}$),它需要钙与镁;存在于真核细胞的浆膜与肌质网膜,前者对CaM敏感,后者又有cAMP与CaM依赖性蛋白磷酸激酶介导。在心肌肌质网,通过上述两种磷酸激酶使心肌肌质网膜上分子量为22,000的蛋白质(phospholamban)磷酸化,从而调节肌质网膜上钙泵的功能。肌质网膜的钙泵为肌质网膜的主要蛋白质,占膜干重的50%。 $\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++}-\text{ATPase}$ 有一个催化单位,一个催化单位可结合2个 Ca^{2+} ,每消耗1 mole ATP即可转运2 mole Ca^{2+} 。钙泵在钙外运中以及在肌质网的钙摄取或释放中起着重要作用^(4,5)。

(二) $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换:细胞内外钠离子浓度的改变可引起钙内流量或外运量的改变,例如 $[\text{Na}^+]_i$ 增加导致 ^{45}Ca 内流量增加, $[\text{Na}^+]_i$ 减少导致 ^{45}Ca 外运量减少,说明细胞膜的确存在着 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换。因为 Na^+ 外运通过钠泵转运,消耗能量,所形成的 $[\text{Na}^+]_o$ 可为 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换及其所导致 Ca^{2+} 外运间接提供能量的基础。在犬和鸡胚心室肌以及平滑肌中,3个 Na^+ 进入细胞,则1个 Ca^{2+} 排出细胞,而在蛙心房肌细胞则为4:1。

由于细胞膜内外 Na^+ 、 K^+ 的不均匀分布是由 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 来维持,而细胞膜内外 Na^+ 的不均匀分布是 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换的前提,所以 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 功能和 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换有着密切的关系。例如 β 受体激动剂能兴奋蟾蜍胃细胞的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$,故也能易化 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换。

$\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换主要存在于细胞浆膜,而亚细胞器膜一般不进行。虽然线粒体内膜也存在着 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换,但活性很低。由于 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换对 Ca^{2+} 的亲合力比 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 对 Ca^{2+} 的亲合力要小,如在心肌细胞浆膜系统,以 $K_m(\mu\text{M})$ 表示 Ca^{2+} 亲合力,ATPase为 <1 , $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换为 $2\sim20$,所以 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换机理在钙外流中的作用不如钙泵那么重要。但在不同组织, $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换的意义也有所不同,例如平滑肌细胞与心肌细胞相比, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性较低、依赖 Na^+ 的 Ca^{2+} 转运速度较慢、依赖 $[\text{Na}^+]_o$ 的 Ca^{2+} 外运量较小,故平滑肌细胞膜 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换无重要意义,而在心肌细胞膜中则有较重要的意义。其它组织如肾、骨骼肌、小肠、肾上腺髓质、肝细胞均只有很低活性的 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换,而精子鞭毛 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换的活性是最高的,其依赖 Na^+ 的 Ca^{2+} 摄取量为 $600\text{nM}\text{Ca}^{++}/\text{mg}$ 蛋白质,这可能与精子尾部在顶体反应中出现的大振幅运动有

关。

$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换对许多物质如 Ca^{++} 通道阻断剂、 Na^+ 通道阻断剂、哇巴因、线粒体毒物均不敏感,但可被多粘菌素 B、地布卡因、丁卡因、氯丙嗪、氮氯吡咪(Amiloride)所阻断,氮氯吡咪可能为一种特异性 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换抑制剂^[6~8]。

二、细胞内钙的生理意义

1. Ca^{2+} 为第二信使或第三信使^[9]: 生物体是一个复杂的整体,细胞内与细胞间的信息联系依赖于激素、环核苷酸和钙离子。这三种调节因素之间不仅相互联系,而且在作用部位与作用时间方面相互补充,例如激素主管细胞间的信息联系,作用时间为几分钟、几小时甚至数天,环核苷酸与钙离子主管细胞内的信息联系,环核苷酸的作用时间为几秒钟至几分钟,钙离子的作用时间很短仅有几个毫秒。

钙离子和环核苷酸一样,作为某些激素或激动剂的第二信使或第三信使(前列腺素可能为第二信使),从而发挥第一信使的生理效应。钙离子作为第二信使或第三信使中又是一个很重要的调节因素。

(一) 钙与环核苷酸的相互作用: 钙可能以 $\text{Ca}^{2+} - \text{CaM}$ 复合物的形式激活环核苷酸的合成酶(腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶)与分解酶(cAMP 磷酸二酯酶、cGMP 磷酸二酯酶)。当细胞兴奋的早期,由于钙内流与细胞内钙的动用,而使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高,引起腺苷酸环化酶的激活;当细胞兴奋的后期, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显而持续增高,引起腺苷酸环化酶的抑制与 cAMP 磷酸二酯酶的激活。实验材料已证明上述这种钙对环核苷酸的调节作用,例如生理浓度的钙($< 10\mu\text{M}$) 在体外不抑制腺苷酸环化酶;高浓度的钙($> 0.1\text{mM}$) 则在体外抑制腺苷酸环化酶;应用钙离子螯合剂 EGTA 移去细胞外钙或加入钙离子载体 A23187 以增加细胞内 Ca^{2+} , 均可引起细胞内环核苷酸含量的变

化。一般来说,细胞内 Ca^{2+} 增加常伴有组织 cGMP 浓度的增高,而细胞外钙的移去则抑制 cGMP 增高反应;细胞内 Ca^{2+} 含量的增减常改变组织 cAMP 对激素的反应。

相反,环核苷酸也可以调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 这方面的研究较少,通过这种调节使细胞的阈反应发生改变或者使细胞的依赖 Ca^{2+} 的反应延长或缩短。环核苷酸调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的可能途径为: ①影响细胞膜的被动通透性或特殊钙通道; ②影响细胞内的钙贮存; ③影响钙泵功能。

(二) 钙与前列腺素的相互作用: 细胞兴奋时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高,不仅能先后激活核苷酸环化酶与磷酸二酯酶,而且也能激活磷脂酶 A_2 , 它促使细胞膜磷脂释放花生四烯酸,从而形成前列腺素,已发现很多组织释放前列腺素是依赖于 Ca^{2+} 的。相反,前列腺素又可作为生物膜的钙离子载体,使纯磷脂囊泡对钙的通透性增加,并能增加细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

2. 钙如何作为第二信使或第三信使^[10~12]: 许多钙依赖的生理过程均由 CaM 介导, CaM 是大多数细胞如平滑肌、血小板、脑、其它非肌性细胞的 Ca^{2+} 结合蛋白,而心肌与横纹肌的 Ca^{2+} 结合蛋白为肌钙蛋白 C (Troponin C)。所有真核细胞中都有 CaM, CaM 为含有 148 个氨基酸的多肽,各种生物不同组织的 CaM 一级结构十分相似,说明它在种系发生中是高度保留下来的。CaM 有四个钙结合部位,它们对 Ca^{2+} 的亲合力相似,均约为 10^{-6}M , 这正与细胞兴奋时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 相接近,有利于 Ca-CaM 复合物的形成。

当内环境中钙离子浓度不同程度增高时, Ca^{2+} 可与 CaM 不同位点相结合成 Ca-CaM 复合物,其中 CaM 发生不同的构象变化,从而识别不同的酶系、效应器蛋白或受体蛋白,使它们的构象引起改变,并形成酶、效应器蛋白或受体蛋白和 Ca-CaM 三者

的复合物,最后引起不同的生理生化反应。

3. 钙在几种生理效应中的作用:

(一) 骨骼肌、心肌中的钙结合蛋白为肌钙蛋白C,它与CaM有相似的氨基酸顺序,由8个 α 螺旋组成3(心肌)~4(骨骼肌)个钙结合部位,其中I、II部位为低亲和力,不能与 Mg^{2+} 结合,III、IV部位为高亲和力,也能与 Mg^{2+} 结合。当 Ca^{2+} 与不同部位相结合,由于肌钙蛋白C中疏水基团的相互作用使其构象发生改变,从而使肌钙蛋白I的位置改变、不再与肌动蛋白(Ac-tin)相结合、原肌球蛋白(Tropomyosin)移入肌动蛋白之间的槽中,促使肌动蛋白激活肌球蛋白(Myosin)ATP酶,并释放出能量引起细丝沿粗丝滑动即引起收缩效应。当细胞钙外流、肌质网摄取钙, $[Ca^{2+}]_i$ 下降, Ca^{2+} 与肌钙蛋白C复合物分解,引起上述一系列反应的逆行即发生骨骼肌松弛与心肌舒张效应。由于骨骼肌与心肌中含有丰富的肌质网,故亚细胞器贮存的钙在骨骼肌与心肌收缩、舒张中占有很重要的地位⁽¹³⁾。心肌的实验已证明,经肌纤膜的钙内流不直接激活肌原纤维细丝,而是通过钙引起的肌质网钙释放(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release CICR),CICR的刺激物不是肌质网外的游离钙浓度变化($\Delta[free\ Ca^{2+}]$),而是肌质网外的游离钙浓度变化速率($\Delta[free\ Ca^{2+}]/\Delta t$)。经肌纤膜 Ca^{2+} 流的开始相对快相可触发钙释放,而随后的慢相则起到贮存肌质网钙的作用。当CICR致肌质网外 $[free\ Ca^{2+}]$ 高度增加时,则抑制进一步释放,这种负反馈使CICR不是全与无反应⁽¹⁴⁾。

平滑肌中的钙结合蛋白为CaM,当 $[Ca^{2+}]_i$ 增高时, Ca^{2+} 和CaM形成复合物,产生构象改变而具有活性。 Ca^{2+} -CaM与肌球蛋白轻链激酶(MLCK)相结合,使其具有活性。MLCK催化肌球蛋白的磷酸化。然后肌动蛋白才能激活肌球蛋白ATP酶,

以供应平滑肌收缩所需的能量。当 $[Ca^{2+}]_i$ 下降,肌球蛋白结合的磷酸基移去,肌动蛋白也不再对其有激活作用,从而引起平滑肌松弛效应。所以钙依赖的肌球蛋白磷酸化是平滑肌收缩的主要机理。 β 受体激动剂与平滑肌细胞膜上的 β 受体结合,继而先后激活磷脂甲基转移酶I与II,使磷脂酰乙醇胺转变为磷脂酰胆碱,这种磷脂成分的改变引起细胞膜流动性的增加,促使腺苷酸环化酶与三磷酸鸟苷酸(GTP)结合蛋白相互作用而激活腺苷酸环化酶,通过cAMP水平的提高引起MLCK活性下降,并使钙贮存与外运,最后导致平滑肌松弛效应。由于平滑肌的细胞内钙贮存池较小,故平滑肌的收缩效应是高度依赖于细胞外钙的内流,当然随着激动剂与其浓度的不同,平滑肌的收缩反应亦可部分借助于细胞内钙的释放。例如,在无钙营养液中,高浓度氯化钾不再引起血管平滑肌收缩,而肾上腺素却仍可引起收缩反应,说明高钾引起的血管平滑肌收缩主要靠细胞外钙,而肾上腺素所致的收缩可能和细胞内、外两个钙池均有关系。又如,在无钙营养液中, $10^{-6}M$ 乙酰胆碱不再引起气管平滑肌收缩,而 $10^{-3}M$ 乙酰胆碱却仍可引起收缩反应,说明高浓度乙酰胆碱可能通过细胞内钙释放而导致收缩^(15~17)。

(二) 肥大细胞为过敏介质的制造部位,在肥大细胞的颗粒中贮存有预先合成的介质(组胺、嗜酸细胞趋化因子、中性细胞趋化因子),还有些介质是当过敏反应时由肥大细胞新合成的,如白三烯、前列腺素与血小板激活因子。这两类介质的释放都有两个时相,即①钙内流;②钙依赖的胞吐作用。当肥大细胞膜上两个邻近的IgE受体,通过抗原或抗IgE抗体的搭桥,使肥大细胞激活,随之激活磷脂甲基转移酶,使磷脂酰乙醇胺转变为磷脂酰胆碱,引起肥大细胞膜流动性增加、粘度降低、钙通道开放、钙内

流。内流的钙激活磷脂酶A使产生溶血卵磷脂,激活磷脂酶C使产生二酰基甘油,后者再经过磷酸激酶形成磷脂酸或经过二酰基甘油酯酶形成一酰基甘油。溶血卵磷脂、二酰基甘油,一酰基甘油为膜融合原(Fusogen),它能促使肥大细胞中颗粒膜互相融合以及颗粒膜与浆膜融合,从而导致介质释放;磷脂酸为钙离子载体,促使钙进一步内流。有一些实验材料支持上述的肥大细胞过敏介质释放机理,因为肥大细胞对 ^{45}Ca 的摄取在时间或程度方面和细胞膜磷脂甲基化、组胺释放相平行;甲基转移酶抑制剂可阻断肥大细胞的钙内流与组胺释放。由于近年来发现肥大细胞中亦存在CaM,故钙内流引起脱颗粒也是由CaM介导的,因为CaM抑制剂吩噻嗪类能抑制肥大细胞释放介质。其具体方式可能是Ca-CaM复合物激活蛋白激酶,使膜蛋白磷酸化,从而发生肥大细胞中颗粒膜互相融合以及颗粒膜与浆膜融合,导致介质释放;在肥大细胞脱颗粒的后期,Ca-CaM复合物激活蛋白激酶后随之活化细胞膜钙泵与内质网钙泵,使钙外流与内质网钙摄取增加, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 下降,从而限制肥大细胞过敏介质的释放过程^[17~18]。

参 考 文 献

1. Campbell AK, The investigation of Intracellular Ca as a Regulator, Campbell Ak Ed, Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator, John Wiley & Sons Ltd, 1983: 23~84.
2. Droogmans G, et al, Experientia 1985; 41: 895.
3. 王振纲、杨武, 药理学报 1985; 20(3): 235.
4. Inesi G, Ann Rev physiol 1985; 47: 573.
5. Wuytack F, et al, Experientia 1985; 41: 900.
6. Pilipson K D, Ann Rev Physiol 1985; 47: 561.
7. Casteels R, et al, J Cardiovascular Pharmacol 1985; 7 (Suppl 3): S 103.
8. Carafoli E, J Mol Cell Cardiol 1985; 17(3): 203.
9. Campbell A K, Intracellular Ca^{2+} and intermediary metabolism, Campbell AK Ed, Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator, John Wiley & Sons Ltd, 1983: 257~304.
10. West W L, Fed Proc 1982; 41(7): 2251.
11. Tomlinson S, et al, Clin Sci 1984; 66: 497.
12. Cheung W Y, Science 1980; 207: 19.
13. Campbell AK, Calcium and Cell Movement, Campbell AK Ed, Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator, John Wiley & Sons Ltd, 1983: 206~256.
14. Alexandre F, Am J Physiol 1983: 245.
15. Farley J M, et al, J pharmacol Exp Therap 1978; 207(2): 340.
16. Fanta C H, J Asthma 1984; 21(6): 387.
17. Middleton E, J Allergy Clin Immunol 1984; 73(5): 643.
18. Kajita T, et al, Int Archs Allergy Appl Immun 1984; 75(3): 276.
19. Alm P E, Ibidi 1984; 75(4): 375.