

· 综 述 ·

气道纤毛摆动调节和钙离子通道

张郁 陈良安 刘又宁

气道粘液-纤毛转运系统对维护气道的防御功能有重要意义,它主要通过纤毛的摆动,将粘附于粘液层的异物颗粒和病原微生物由肺部排向咽部,继而经吞咽或被咯出得以排出体外。气道纤毛的作用非常关键,粘液清除的速度取决于纤毛活动协调配合及纤毛摆动频率(ciliary beat frequency, CBF)。当机体受到各种外来刺激,如药物、机械刺激等,气道纤毛的功能活动会随之而变化,更加有效地发挥纤毛的作用,以维持呼吸道的健康状态。因此,纤毛摆动的调节非常重要。但是,有关纤毛摆动调节的细胞内机制却知之甚少。目前有关纤毛的许多研究认为,纤毛细胞受到外界环境影响时,细胞内产生第二信使,如钙离子(Ca^{2+})、三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-triphosphate, IP_3)、环磷酸腺苷(cAMP)或一氧化氮(nitric oxide, NO),使纤毛轴活动发生改变,引起纤毛摆动的变化。其中最重要的改变涉及到细胞内钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的变化, Ca^{2+} 在气道纤毛摆动调节中发挥着重要作用。

1 钙离子通道的一般特点和分类

Ca^{2+} 充当着机体代谢广泛的信使,细胞外 Ca^{2+} 浓度明显大于细胞内,细胞内游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)变化调节细胞代谢、基因表达等细胞共有的活动。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高主要依赖于胞外质膜上的钙通道内流和胞内储存钙的释放。胞外钙内流:通过膜上 Ca^{2+} 通道, Ca^{2+} 通道包括:①电压门控 Ca^{2+} 通道,该通道启闭受控于膜电压;②受体活化 Ca^{2+} 通道,受体与 Ca^{2+} 通道通过 G 蛋白偶联,激活某些酶产生第二信使调节钙通道开放。细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放:钙库可能是内质网、肌质网、线粒体等,这些细胞器膜上也有钙通道。有的 Ca^{2+} 释放通道对 IP_3 敏感, IP_3 与内质网膜上 IP_3 受体结合, IP_3 受体是一种化学门控的钙离子释放通道, Ca^{2+} 通道开放,动员细胞内钙库中的 Ca^{2+} 转移到胞浆中, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升

高。信号 Ca^{2+} 在细胞内的调节机制,可通过活化钙结合蛋白进行,其中了解最多的是钙调蛋白(calmodulin, CaM),CaM 本身无活性,与 Ca^{2+} 结合构象改变,形成 Ca^{2+} -CaM 复合物而被活化,激活蛋白激酶或磷酸酶,调节细胞内代谢活动。

2 纤毛摆动调节和钙离子通道

目前认为,哺乳类动物的纤毛摆动调节至少有 3 种机制:①直接 Ca^{2+} 作用^[1];②依赖 cAMP 的磷酸化^[2];③依赖 Ca^{2+} 的 NO/cGMP 磷酸化^[2,3]。这 3 种机制并非完全独立,而其中许多环节牵涉到 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化。

2.1 钙离子对纤毛摆动的影响及机制 早期国外对哺乳动物气道上皮纤毛细胞的研究证明, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加可引起 CBF 加快,但由于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 CBF 的测量难以同步,因此 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 CBF 的确切关系难以证实。最近,由于技术方法的不断改进, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 CBF 的测量达到时间和空间的统一。国外学者对钙离子与纤毛摆动的关系进行了大量研究,他们认为,气道纤毛细胞受到各种刺激后,最初引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速增加,但持续时间短暂,随后 CBF 明显加快,而且在钙离子的调节下达到最大值,可持续 20~30 min,而纤毛摆动方向不受影响。抑制钙库 Ca^{2+} 释放,阻碍 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加,CBF 亦下降至原有水平。也有实验证实, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在一定范围内调节 CBF。最近,Lansley 等^[4]采用高速阶段对比成像技术,同时记录新西兰白兔气道上皮同一个细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 CBF。结果显示,纤毛基底局部 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加可导致 CBF 增加, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的传播形成 Ca^{2+} 波,通过细胞间的缝隙连接扩散。低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 状态(20~150 nmol/L),CBF 相对稳定, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度为 350~400 nmol/L 时,CBF 增加到最大值, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 值继续增加,CBF 无变化。Evans 等^[5]得出同样结论, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度在 200~300 nmol/L 范围内,CBF 受 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 调节,可加快 2~3 倍,在此阶段,CBF 反应达到饱和, $[\text{Ca}^{2+}]_i > 300$ nmol/L 对

作者单位:100853 北京,解放军总医院呼吸科

作者简介:张郁,女,医学硕士,主治医师

通讯作者:陈良安,电话:010-66939361

CBF 无影响。总之, $[Ca^{2+}]_i$ 增加导致 CBF 加快已被许多实验得以肯定证实,但它们之间的剂量-效应关系结果不同,这可能因为种属差异和测量 $[Ca^{2+}]_i$ 和 CBF 技术方法不同所致。

$[Ca^{2+}]_i$ 升高的原因为胞内钙库释放,外来刺激如 ATP、乙酰胆碱、机械刺激等,激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC),将膜脂质中的二磷酸磷脂酰肌醇水解为 IP_3 和二酰甘油,激活 IP_3 受体,内质网中钙库 Ca^{2+} 的释放,胞浆 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。而 $[Ca^{2+}]_i$ 升高如何调节 CBF,是钙离子直接作用于纤毛轴动力蛋白还是通过复杂的磷酸化级联反应,目前还存在分歧。Salathe 等^[1]在羊气道上皮纤毛摆动作用模式的研究中,认为 Ca^{2+} 直接和纤毛结合位点结合,该结合位点可能是动力蛋白轻链, Ca^{2+} 和纤毛蛋白结合后,能调节微管动力蛋白相互作用的速度,从而引起 CBF 的改变。也有报道表明,细胞内 Ca^{2+} 浓度增高与 CaM 一起激活 Ca^{2+} -CaM 依赖性蛋白激酶,控制基础的纤毛活动。

2.2 cAMP 对纤毛摆动调节 不可否认,cAMP 是调节纤毛活动的重要介质, β -肾上腺素能激动剂与 G 蛋白结合,活化腺苷酸环化酶,产生 cAMP,激活 cAMP 依赖性蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA),引起哺乳类动物气道纤毛靶位磷酸化^[2,6],CBF 增加。Braiman 等^[7]采用蛙食管纤毛细胞,结果表明 PKA 通过两种方式提高 CBF。首先,PKA 引起细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放, Ca^{2+} 的释放与 PLC 激活及 IP_3 受体活化的钙离子通道有关, Ca^{2+} 的快速大量释放导致 CBF 明显增加,这说明 Ca^{2+} 通道和 cAMP 通道相互交叉。PKA 还可以通过对 $[Ca^{2+}]_i$ 变化不敏感的途径直接增加 CBF。Lieb 等^[8]发现人类气道上皮受到短时间嘌呤物质(如 ATP)刺激,最初胞浆钙库 Ca^{2+} 释放, $[Ca^{2+}]_i$ 增加,活化 Ca^{2+} 敏感的腺苷酸环化酶,激活 PKA, CBF 提高。此过程中, $[Ca^{2+}]_i$ 变化是必不可少的,再一次证明了 Ca^{2+} 在调节纤毛摆动中的作用。

2.3 依赖 Ca^{2+} 的 NO/cGMP 信息传递系统对纤毛摆动的调节 NO 信息传递系统存在于纤毛上皮细胞。Uzlaner 等^[3]认为细胞外 ATP 刺激纤毛上皮后, IP_3 生成,细胞内钙库 Ca^{2+} 释放, $[Ca^{2+}]_i$ 增加可直接激活 NO 合酶(nitric oxide synthase, NOS),此 NOS 称为 Ca^{2+} -CaM 依赖的结构型 NOS,激活 NO,可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase, sGC)被激活,与 ATP 亲和力提高,环磷酸鸟苷(cGMP)大量生成,依赖 cGMP 蛋白激酶 G (protein

kinase G, PKG)被激活,PKG 在较高 $[Ca^{2+}]_i$ 存在下,使 CBF 显著增加。另外,激活的 PKG 可促进胞外 Ca^{2+} 内流,使得 $[Ca^{2+}]_i$ 长时间维持高浓度,反过来引起 CBF 持久增高。故 Ca^{2+} -NO-sGC-cGMP-PKG 途径是调节纤毛摆动的又一机制。

3 钙振荡对纤毛摆动的调节

3.1 钙振荡的一般特征 胞浆游离钙作为重要的第二信使参与多种细胞功能的调节,介导细胞对刺激的反应。在研究胞浆游离钙调控规律的过程中,人们逐渐验证了胞浆游离钙普遍存在的一种运动形式——钙振荡(calcium oscillation),钙振荡即认为胞浆游离钙浓度是周期性起伏波动的。钙振荡广泛存在于多种细胞,如心肌细胞、平滑肌细胞等;钙振荡的意义在于:① 细胞的自身保护作用;② 与细胞的周期性生理效应有关。胞浆的钙振荡可以在两种条件下观察到:① 静息状态下, $[Ca^{2+}]_i$ 出现的自发钙振荡;② 激动剂诱发的钙振荡。

3.2 钙振荡与纤毛摆动调节 钙振荡的调节机制在多种细胞广泛存在,许多 Ca^{2+} 敏感性细胞功能主要由钙振荡调节,而不是因为持续增加的 $[Ca^{2+}]_i$ 。国外学者对钙振荡在不同种属动物如兔、羊气道上皮的影响进行了研究。结果表明, $[Ca^{2+}]_i$ 的振荡参与纤毛摆动的调节, Ca^{2+} 来源依赖 IP_3 敏感的钙储池。Evans 等^[5]报道,胞外给予 ATP 后,最初 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬时增加, CBF 增加 2~3 倍。随后 $[Ca^{2+}]_i$ 出现振荡, CBF 并不伴随钙离子振荡而波动,而是持续维持较高水平,且 CBF 最大值出现于钙振荡过程中。CBF 值决定于 $[Ca^{2+}]_i$ 变化值和钙振荡频率。高频率的钙振荡有利于产生更持久和增加更显著的纤毛摆动,钙振荡的频率依赖于 ATP 的浓度。

4 药物对纤毛摆动的影响

4.1 ATP 和 UTP 两者是促进纤毛摆动的强有力的激动剂。它们作用于纤毛可通过以下途径:① ATP 和 UTP 刺激纤毛表面与 G-蛋白偶联的 P2Y 受体^[5,9],激活 PLC,引起细胞内钙库释放 Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ 增加;② 三磷酸核苷还可以刺激气道细胞表面的腺苷酸受体发挥效应,腺苷酸受体分为 3 类: A_1 , A_2 (A_{2a} 和 A_{2b}) 及 A_3 , A_1 受体激动剂抑制纤毛摆动。最近, Taira 等^[10]证明选择性 A_3 受体激动剂可通过 Ca^{2+} 介导机制,显著增加 CBF;③ ATP 和 UTP 作用于纤毛,引起初始短暂 $[Ca^{2+}]_i$ 增加及随

之的 $[Ca^{2+}]_i$ 振荡,促进纤毛活动^[5]。

4.2 β 受体激动剂 研究证明, β 受体激动剂可增强纤毛摆动频率,浓度为 10^{-6} mol/L 的异丙肾上腺素使体外培养的兔气道纤毛摆动频率增加 100%。体外实验也证明,浓度为 10^{-6} mol/L 的特布他林可增加人类上呼吸道纤毛摆动频率 16%^[6]。 β 受体激动剂的作用可通过 cAMP-PKA 途径。

4.3 胆碱能类 M 受体激动剂 乙酰胆碱、乙酰甲胆碱,激活 M 型受体后, IP_3 受体活化, $[Ca^{2+}]_i$ 增加^[11]。有实验证实,胆碱能类引起 $[Ca^{2+}]_i$ 和 CBF 短暂升高,继之两者长时间处于较低水平。也有报道表明,胆碱能类调节 CBF 涉及 NO-sGC-cGMP 机制^[12]。另外,M 受体阻断剂阿托品明显减低健康成年人的上呼吸道纤毛摆动频率^[13]。

4.4 精氨酸-加压素(arginine vasopressin, AVP) Tamaoki 等^[14]应用兔气道上皮细胞体外培养,认为具有抗利尿作用的激素 AVP 可以刺激纤毛活动。 10^{-6} mol/L 的 AVP 使 CBF 迅速而持久的增加。AVP 刺激气道上皮 V1b 受体,激活 PLC,通过 IP_3 介导的 Ca^{2+} 增加影响纤毛活动。

5 临床意义

现已证明,许多肺部疾病有气道纤毛功能障碍。呼吸道和肺部感染的患者纤毛活动下降。病毒和细菌本身可破坏纤毛的清除功能。实验证明,动物暴露于香烟烟雾中,其纤毛摆动频率降低。另有报道表明,衰老亦可造成纤毛清除功能下降。最近 Ho 等^[15]对 90 名健康志愿者的调查证实,老年人的纤毛摆动频率比青年人显著降低,这可能是造成老年人呼吸道感染易感性增加的因素之一。从生理学的角度来说,由于从气管隆突至咽喉部的粘液运输时间为 10~15 min,因而 CBF 持久增加 15~30 min 即具有生物学意义,可缩短粘液清除时间,利于有害物质的清除。虽然调节纤毛活动的机制错综复杂,但 Ca^{2+} 在其中无疑发挥着重要作用。通过药物影响调节 $[Ca^{2+}]_i$ 及钙振荡,进一步调节纤毛活动,将为呼吸系统疾病的治疗提供新的方法。

参考文献

- 1 Salathe M, Bookman RJ. Mode of Ca^{2+} action on ciliary beat frequency in single ovine airway epithelial cells. *J Physiol*, 1999,520:851-865.
- 2 Wyatt TA, Spurzem JR, May K, et al. Regulation of ciliary beat frequency by both PKA and PKG in bovine airway epithelial cells. *Am J Physiol*, 1998,275:L827-L835.
- 3 Uzlaner N, Priel Z. Interplay between the NO pathway and elevated $[Ca^{2+}]_i$ enhance ciliary activity in rabbit trachea. *J Physiol*, 1999,516:179-190.
- 4 Lansley AB, Sanderson MJ. Regulation of airway ciliary activity by Ca^{2+} . Simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca^{2+} . *Biophys J*, 1999,77: 629-638.
- 5 Evans JH, Sanderson MJ. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium*, 1999,26:103-110.
- 6 Yang B, Schlosser RJ, McCaffrey TV. Dual signal transduction mechanisms modulate ciliary beat frequency in upper airway epithelium. *Am J Physiol*, 1996,270(5Pt): L745-L751.
- 7 Braiman AZ, Zagoory O, Priel Z. PKA induces Ca^{2+} release and enhances ciliary beat frequency in a Ca^{2+} -dependent and -independent manner. *Am J Physiol*, 1998,275: C790-C797.
- 8 Lieb T, Frei CW, Frohock JI, et al. Prolonged increase in ciliary beat frequency after short-term purinergic stimulation in human airway epithelial cells. *J Physiol*, 2002,538: 636-646.
- 9 Korngree A, Ma W, Priel Z, et al. Extracellular ATP directly gates a cation-selective channel in rabbit airway ciliated epithelial cells. *J Physiol*, 1998,508:703-720.
- 10 Taira M, Tamaoki J, Nishimura K, et al. Adenosine A_3 receptor mediated potentiation of mucociliary transport and epithelial ciliary motility. *Am J Physiol*, 2002,282:L556-L562.
- 11 Zagoory O, Braiman A, Gheber L, et al. Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am J Physiol*, 2001,280: C100-C109.
- 12 Yang B, Schlosser RJ, McCaffrey TV. Signal transduction pathways in modulation of ciliary beat frequency by methacholine. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1997, 106: 230-236.
- 13 Centanni S, Camporesi G, Tarsia P, et al. Effect of atropine on ciliary beat in human upper respiratory tract epithelial cells. *Int J Tissue React*, 1998,20: 131-136.
- 14 Tamaoki J, Kondo M, Takeuchi S, et al. Vasopressin stimulates ciliary motility of rabbit tracheal epithelium: role of V1b receptor-mediated Ca^{2+} mobilization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998,19(2): 293-299.
- 15 Ho JC, Chan KN, Hu WH, et al. The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001,163:983-988.

(收稿日期:2002-09-09)

(本文编辑 李楠生)