

• 论著 •

Na⁺/Ca²⁺ 交换抑制剂对慢性阻塞性肺疾病患者肺泡巨噬细胞功能的影响

李旭 王立祥 张健鹏 谷鸥翔 宋满景

【摘要】 目的 观察 Na⁺/Ca²⁺ 交换抑制剂 Benzamil 对慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者肺泡巨噬细胞(AM)胞浆中游离钙离子([Ca²⁺]_i)浓度及其对生成肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、丙二醛(MDA)的影响。方法 采用支气管肺泡灌洗、细胞培养和荧光指示剂的方法,测定 36 例 COPD 稳定期患者及 36 例健康体检者 AM 内 [Ca²⁺]_i 浓度及其生成的 TNF-α 和 MDA 含量。结果 ① COPD 组患者 AM 内 [Ca²⁺]_i [(68.26 ± 7.24) nmol/L]、TNF-α [(5.74 ± 0.42) ng/L] 和 MDA [(3.77 ± 0.61) μg/L] 水平均较健康对照组 [分别为 (60.61 ± 6.26) nmol/L、(2.06 ± 0.20) ng/L、(1.91 ± 0.19) μg/L] 明显增高 (*P* 均 < 0.01); ② 给予缺氧后, COPD 组 AM 内 [Ca²⁺]_i 浓度 [(168.34 ± 17.58) nmol/L]、TNF-α [(9.67 ± 1.01) ng/L] 和 MDA [(11.21 ± 1.01) μg/L] 水平均较刺激前增高 (*P* 均 < 0.01); ③ 先加 Benzamil 孵育 AM 再缺氧, 可使胞浆内 [Ca²⁺]_i 浓度 [(129.21 ± 14.33) nmol/L]、TNF-α [(6.78 ± 0.52) ng/L] 和 MDA [(8.47 ± 0.79) μg/L] 水平均较单纯缺氧时明显减少 (*P* 均 < 0.01)。结论 Benzamil 可抑制由缺氧引起 AM 内 [Ca²⁺]_i 浓度增高及其产生的 TNF-α、MDA 含量; 提示通过调节 AM 激活可抑制 TNF-α、MDA 的分泌。

【关键词】 肺泡巨噬细胞; 荧光指示剂; 细胞内游离钙离子; 肿瘤坏死因子-α; 丙二醛

Effect of Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker, Benzamil, on alveolar macrophage function in patients with chronic obstructive pulmonary disease LI Xu*, WANG Li-xiang, ZHANG Jian-peng, GU Ou-xiang, SONG Man-jing. * General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 10039, China
Corresponding author: WANG Li-xiang

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of Benzamil on cytosolic free calcium ions ([Ca²⁺]_i) concentration, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and malondialdehyde (MDA) in alveolar macrophage (AM) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Alveolar macrophages were collected from bronchoalveolar lavage fluid, and they were cultured and [Ca²⁺]_i were determined by calcium fluorescent with indicator Fura-2/AM. The effects of Benzamil on the increase in cytosolic [Ca²⁺]_i and on secretion of TNF-α, MDA were investigated in 36 patients with COPD and 36 healthy volunteers. **Results** ① [Ca²⁺]_i concentration (68.26 ± 7.24) nmol/L, TNF-α (5.74 ± 0.42) ng/L and MDA (3.77 ± 0.61) μg/L were found in COPD patients, and they were significantly increased, as compared with the control group, in whom the contents were [Ca²⁺]_i concentration (60.61 ± 6.26) nmol/L, TNF-α (2.06 ± 0.20) μg/L, MDA (1.91 ± 0.19) ng/L (all *P* < 0.01). ② The following data namely [Ca²⁺]_i concentration (168.34 ± 17.58) nmol/L, TNF-α (9.67 ± 1.01) ng/L and MDA (11.21 ± 1.01) μg/L were obtained after anoxia in COPD patients (all *P* < 0.01). ③ After incubation with Benzamil, and then subjected the cells to anoxia, the following data were obtained: [Ca²⁺]_i concentration (129.21 ± 14.33) nmol/L, TNF-α content (6.78 ± 0.52) ng/L and MDA (8.47 ± 0.79) μg/L and they were all lower than only anoxia was applied (all *P* < 0.01). **Conclusion** Benzamil not only downregulates alveolar macrophages activity but also suppresses the generation of the TNF-α and MDA.

【Key words】 alveolar macrophage; fluorescence indicator; cytosolic free calcium ions; tumor necrosis factor-α; malondialdehyde

在慢性阻塞性肺疾病(COPD)中,多种细胞因子和酶类等活性物质释放、参与气道炎症反应是其特点之一。COPD 患者肺泡巨噬细胞(AM)增多、活

作者单位:100039 北京,武警总医院医学急救中心(李旭,王立祥,张健鹏);武警部队药品仪器检验所(谷鸥翔);山西医科大学第二医院(宋满景)

通讯作者:王立祥,硕士生导师,主任医师

作者简介:李旭(1970-),女(汉族),山东省人,博士,主治医师,研究方向是肺脏疾病与免疫功能相关机制的研究(Email:lixuangle@yahoo.com.cn)。

化,产生多种细胞因子和酶类等活性物质,参与气道炎症反应与重建,从而导致气道和肺组织炎症,促进 COPD 的发生^[1]。研究表明,COPD 造成缺血、缺氧等病理条件,AM 内的 Ca²⁺ 稳态被破坏,胞外 Ca²⁺ 大量内流导致细胞内 Ca²⁺ 增多,但其确切机制尚不清楚^[2]。Na⁺/Ca²⁺ 交换体是介导 Na⁺ 和 Ca²⁺ 跨膜转运的一种重要载体蛋白。在正常生理状态下,它将胞外的 Na⁺ 和 Ca²⁺ 以 3 : 1 比例交换,构成胞内 Ca²⁺ 外流的途径之一。但在缺血、缺氧等病理条件下它是

否参与 Ca^{2+} 的跨膜转运,具有何种意义,目前国内报道较少。本研究通过观察 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换抑制剂 Benzamil 对缺氧后的 AM 内游离钙离子 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 和分泌的细胞因子的影响,探讨该药在治疗 COPD 中的作用机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象:回顾性分析 1998 年 5—11 月在山西医科大学第二医院呼吸科就诊的 COPD 稳定期患者的临床资料。36 例患者中男 19 例,女 17 例;年龄 53~79 岁,平均 (65 ± 9) 岁;病程 8~40 年。健康对照组 36 例为同期该院健康体检自愿者,其中男 20 例,女 16 例;年龄 51~76 岁,平均 (66 ± 8) 岁。纳入标准:符合中华医学会呼吸病学分会制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》,近 1 周来未使用过任何药物,均知情同意。排除标准:患有癌症、胶原血管疾病、心力衰竭、严重免疫功能性及器官功能性障碍者。两组研究对象间年龄、性别经统计学处理差异无显著性 (P 均 > 0.05),具有可比性。

1.2 方法:对每位研究对象行支气管肺泡灌洗术,处理回收液,依照 Iwamoto 等^[3]介绍的方法纯化 AM,用质量分数为 0.4% 的苜蓿蓝进行排斥试验检查,细胞成活率达 95% 以上即可进行以下试验。AM 胞浆中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定参照 Gryniewicz 等^[4]介绍的方法,将已纯化的 AM 悬浮于含 2 mmol/L 谷氨酸、10 mmol/L 牛血清白蛋白的 RPMI1640 培养基中,并不断通入人工氧混合气(体积分数 95% O_2 + 5% CO_2),调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{L}$,37 °C 预温 5 min 后加入钙荧光探针(Fura-2/AM,终浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$),37 °C 恒温振荡 45 min,用含体积分数为 0.1% 牛血清白蛋白的 D-Hank 液洗涤 AM 3 次,以无钙缓冲液(pH=7.4)悬浮细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{L}$ 。测定前先复温 2~3 min。缺氧时用体积分数 95% N_2 + 5% CO_2 代替氧混合气。再依次加入 CaCl_2 (1 mmol/L)、LPS (10 mg/L),最后加入 TritonX-100 和乙二醇四乙酸酯(EGTA),按下式计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Kd}(\text{Sf2}/\text{Sb2}) \times$$

$$(\text{R} - \text{Rmin}) / (\text{Rmax} - \text{R})$$

式中, $\text{Kd} = 224 \text{ nmol}/\text{L}$, Sf2 和 Sb2 分别为零钙和饱和钙时 380 nm 处的荧光强度, R 为 340 nm 和 380 nm 处的荧光强度比值, Rmin 和 Rmax 分别为零钙和饱和钙时 340 nm/380 nm 最小和最大荧光强度比值。

用紫外荧光分光光度计(激发波长 340 nm 和

380 nm 处,发射波长为 500 nm)测定胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度。且测定 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度均在 Fura-2 负载后 40 min 内完成,以减少因 Fura-2 漏出所造成的误差。

1.3 AM 培养:用 RPMI1640 悬浮纯化的 AM,注入 24 孔培养板,每孔 1 ml,并分组给药。第一组为空白对照。第二组为缺氧组。第三组加入 20 mmol/L Benzamil 于 AM 中孵育 10 min,待其充分发挥作用后再进行缺氧,培养 24 h,经离心将上清与 AM 完全分离,吸取每孔上清液分别储存于 -70 °C 下备用,然后将双蒸水 100 ml 加入每孔残余细胞后,分别加入上述离心沉淀的各离心管中,在冰水中超声破碎细胞 15 min,再于每管中加入 900 μl RPMI1640,混匀后再次离心,吸取上清液并分别储存于 -70 °C 下备用。

1.4 检测指标及方法:肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所),丙二醛 (MDA, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所),操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理:采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度的变化(表 1):COPD 组 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度基础值明显高于对照组 ($P < 0.01$)。缺氧后,两组 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度均较基础值明显增高,且 COPD 组 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度较对照组增高,差异有显著性 (P 均 < 0.01)。Benzamil 干预可使两组 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度较缺氧时明显下降 (P 均 < 0.01),但两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 Benzamil 对 AM 中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Suppression effects of Benzamil on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of AM ($\bar{x} \pm s$) nmol/L

组别	基础值	CaCl_2	缺氧	Benzamil 干预
COPD 组	68.26 \pm 7.24 [△]	89.66 \pm 9.04 ^{△*}	168.34 \pm 17.58 ^{△**}	129.21 \pm 14.33 [#]
对照组	60.61 \pm 6.26	91.00 \pm 10.39 ^{△*}	141.66 \pm 15.74 ^{△**}	129.88 \pm 16.08 [#]

注:与对照组比较:△ $P < 0.01$;与本组基础值比较:△* $P < 0.01$;与本组加入 CaCl_2 时比较:* $P < 0.01$;与本组缺氧时比较:# $P < 0.01$

2.2 AM 生成 TNF- α 和 MDA 的变化(表 2):COPD 组 TNF- α 和 MDA 基础值均较对照组明显增高 (P 均 < 0.01)。缺氧后,两组 TNF- α 和 MDA 均较刺激前增高,与本组基础值比较差异有显著性 (P 均 < 0.01)。Benzamil 干预可使两组 TNF- α 和

MDA 较仅缺氧时明显降低(P 均 <0.01)。

表 2 AM 培养后 TNF- α 和 MDA 含量变化($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of levels of TNF- α and MDA in AM culture supernatant($\bar{x}\pm s$)

指标	组别	基础值	缺氧	Benzamil 干预
TNF- α (ng/L)	COPD 组	5.74 \pm 0.42 Δ	9.67 \pm 1.01 \star	6.78 \pm 0.52 $\#$
	对照组	2.06 \pm 0.20	6.62 \pm 0.55 \star	3.67 \pm 0.43 $\#$
MDA(μ g/L)	COPD 组	3.77 \pm 0.61 Δ	11.21 \pm 1.01 $\Delta\star$	8.47 \pm 0.79 $\Delta\#$
	对照组	1.91 \pm 0.19	7.72 \pm 1.32 \star	4.68 \pm 0.54 $\#$

注:与对照组比较, $\Delta P<0.01$;与本组基础值比较, $\star P<0.01$;与本组缺氧时比较, $\# P<0.01$

3 讨论

COPD 时各种致病因子长期得不到清除,自身修复和防御功能平衡遭到破坏,下呼吸道无菌状态被扰乱,以致细菌在黏膜上定植。由于存在慢性炎症,激活状态的 AM 数量增多,因此,COPD 患者 AM 胞浆[Ca²⁺]_i 基础值较对照组高。

在生理状态下,钙作为细胞内信使,几乎参与一切调控细胞功能的信号转导过程。机体通过一系列转运机制以维持细胞内低钙状态,但一些有害因素可引起钙平衡功能失调,钙分布紊乱,导致细胞内钙浓度异常升高,即钙超载^[5]。AM 是一种多功能的间质细胞,它是气道局部炎症反应的始动细胞。本结果显示,COPD 患者和健康者在缺氧条件下 AM 胞浆内[Ca²⁺]_i 浓度均升高,说明缺氧时 Ca²⁺ 稳定机制改变,AM 内[Ca²⁺]_i 异常升高;而且 COPD 患者较对照组患者的升高也明显,说明 COPD 患者 AM 胞浆内钙超载更严重。

细胞上的 Na⁺/Ca²⁺ 交换体作为 Na⁺、Ca²⁺ 跨膜转运载体,介导 Na⁺ 进、Ca²⁺ 出。研究表明,Na⁺/Ca²⁺ 交换体在缺氧时对心肌细胞、神经细胞膜内外 Na⁺、Ca²⁺ 交换有重要作用^[5]。本实验结果表明,预先加入 Benzamil 于 AM 中孵育 10 min,待其充分发挥作用再进行缺氧,AM 胞内[Ca²⁺]_i 浓度较单纯缺氧时降低,提示 Benzamil 能显著抑制缺氧后 AM 胞内[Ca²⁺]_i 浓度的升高,这可能是其对抗 AM 缺氧损伤的机制之一。

TNF- α 是始动炎症的前炎症介质之一,主要由 AM 产生,在炎症反应中起重要作用。COPD 患者炎症病变的特点是 AM 激活的数目与 TNF- α 分泌呈正相关。COPD 组 TNF- α 的基础值较对照组高,说明 COPD 时 AM 激活的量较正常人多。而且在缺氧时,在胞内[Ca²⁺]_i 升高的同时 TNF- α 分泌量也增加,这是由于 AM 内升高的钙与钙调蛋白结合,激活了依赖钙调蛋白的蛋白激酶后,使细胞核

转录因子- κ B(NF- κ B)活性增强,进而迅速诱导 TNF- α mRNA 表达,促进 TNF- α 分泌^[6]。两组在先加入 Benzamil 后进行缺氧的情况下,TNF- α 较仅缺氧时减少,这可能与 Benzamil 阻断钙作为第二信使的信息转导途径有关。

AM 激活后在分泌大量 TNF- α 的同时也产生大量的活性氧,致使细胞膜发生脂质过氧化反应,造成肺损伤,最终形成 MDA。目前认为活性氧的生成与 AM 激活过程中胞内钙升高有关。研究表明,胞内钙增加致使蛋白质磷酸化,启动脂质过氧化反应,造成肺损伤,生成大量 MDA^[7]。而预先给予 Benzamil 时,MDA 较仅缺氧时减少,证实 Benzamil 有抑制氧自由基生成的作用。

正常肺脏对 AM 激活的数量和状态有精确的调控功能,使其既对机体有保护作用,又不至于造成肺损伤。COPD 时,一方面 AM 在肺内大量聚集,另一方面肺防御机制被破坏,肺的抗损伤功能减弱^[8];AM 激活呈失控状态,释放过量炎症介质,导致肺损伤^[9]。Benzamil 能调节 AM 的激活,进而使 TNF- α 、氧自由基分泌减少,减轻肺部的炎症反应和肺损伤,因此在 COPD 治疗中使用可能有益。

参考文献:

- Lundborg M, Dahlen S E, Johard U, et al. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages[J]. Environ Res, 2006, 100(2): 197-204.
- Condrescu M, Opuni K, Hantash B M, et al. Cellular regulation of sodium-calcium exchange[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 976: 214-223.
- Iwamoto G K, Monick M M, Burmeister L F, et al. Interleukin-1 release by human alveolar macrophages and blood monocytes[J]. Am J Physiol, 1989, 256(5 Pt 1): C1012-1015.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440-3450.
- Bickler P E, Donohoe P H, Buck L T. Molecular adaptations for survival during anoxia: lessons from lower vertebrates[J]. Neuroscientist, 2002, 8(3): 234-242.
- Brown D M, Donaldson K, Borm P J, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(2): L344-353.
- Broeke R T, Leusink-Muis T, Hilberdink R, et al. Specific modulation of calmodulin activity induces a dramatic production of superoxide by alveolar macrophages[J]. Lab Invest, 2004, 84(1): 29-40.
- Marten K, Hansell D M. Imaging of macrophage-related lung diseases[J]. Eur Radiol, 2005, 15(4): 727-741.
- Tetley T D. Macrophages and the pathogenesis of COPD[J]. Chest, 2002, 121(5 Suppl): 156S-159S.

(收稿日期:2006-11-02 修回日期:2007-06-27)

(本文编辑:李银平)