文章编号:1000-5641(2010)02-0092-10

氧化胁迫对骨骼肌型钙释放通道与相关蛋白作用的影响

张玉焜, 蔡知音, 朱倩蓉, 曹美萍, 夏若虹
(华东师范大学 物理系,上海 200062)

摘要: 利用[^{3}H]-ryanodine 结合实验,SDS-PAGE 和 Western Blotting,光子相干光谱法(PCS)和 DPH 荧光偏振法,考察氧化胁迫条件下氧化型通道调控剂 1,4NQ 和 Na_2SeO_3 对 RyR1 通道活性,SR 膜蛋白分布,RyR1 的平均粒径和 SR 膜流动性的影响. 结果显示,高浓度的 1,4NQ 和 Na_2SeO_3 处理使 RyR1 通道活性和 SR 膜的流动性降低,并且导致 SR 上的膜蛋白交联形成大分子交联复合物,而 RyR1 参与了它的形成,DTT 可以逆转交联复合物的的形成. 结果提示,高浓度氧化剂对 RyR1 通道的抑制作用,可能是由于氧化了负责关闭通道的职能巯基导致蛋白间错误交联,从而影响了钙释放通道和钙释放单元的结构和功能.

关键词: 氧化调控剂; 钙释放通道; 巯基; 大分子交联复合物; 氧化胁迫
中图分类号: Q67 **文献标识码**: A

Effects of extensive oxidative stress on the interaction between the skeletal type ryanodine receptors and related proteins

ZHANG Yu-kun, CAI Zhi-yin, ZHU Qian-rong,
CAO Mei-ping, XIA Ruo-hong
(*Department of Physics, East China Normal University, Shanghai* 200062, *China*)

Abstract: By using [^{3}H]-ryanodine binding assay, SDS-PAGE, Western Blotting, photon correlation spectroscopy (PCS) and DPH fluorescence polarization, the influences of oxidation modulators 1,4NQ and Na_2SeO_3 on the channel activity, the average particle size of RyR1, the distribution of SR proteins in cross-linking complex, and fluidity of SR membrane under the oxidative stress were investigated. The results indicate that, upon to the oxidants treatment of 1,4NQ and Na_2SeO, both the activity of RyR1 channel and the fluidity of SR membrane decreased, and macromolecular cross-linked complexes consisting of RyR1 emerged on the gel of the SR membrane proteins. Further investigations showed that DTT decomposed the cross-linked complexes. Above results suggest that the inhibition of RyR1 channel caused by the high concentration of oxidant modulators is probably due to oxidation of the functional sulfhydryls which are respon-

收稿日期:2009-03
基金项目:国家教委留学回国人员基金(49000191);国家自然科学基金(30770539)
第一作者:张玉焜,男,硕士研究生. E-mail: zhangyukun2001@163.com.
通讯作者:夏若虹,女,教授,研究方向为膜生物物理学和生物电磁学. E-mail: xirren@163.com.

sible for the closure of the channels, and the occurrence of mistaken cross-linking between SR proteins which would alter the function of the calcium release unit.

Key words: oxidation modulator; calcium release channel; sulfhydryl; macromolecular cross-linking complex; oxidative stress

0　引　　言

胞内氧化还原环境的平衡依赖于各种胞内氧化还原(redox)缓冲系统[1]. 其中，还原型/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)和还原型/氧化型辅酶 I(NADH/NAD^+)是建立胞内 redox 电势平衡和稳定最重要的两个缓冲系统. 如果因生理或病理原因导致这种平衡发生位移或失稳，胞内局部 redox 环境就会向更加氧化的方向改变，并导致功能性蛋白被严重氧化从而发生氧化损伤. 细胞膜系中以钙释放通道为代表的离子通道是氧化胁迫威胁的主要目标之一，一些骨骼肌和心肌疾病均与离子通道的氧化损伤有关[2]. 研究发现，蛋白质的过度氧化和交联，使这些蛋白不能进入正常的代谢程序而在细胞中堆积，这是细胞凋亡和与衰老相关疾病的分子和病理基础[3].

胞内钙释放通道(RyR)对 redox 环境敏感，它位于肌质网 SR 膜上，由 4 个 565 kDa 的亚基组成，是调控胞浆钙离子浓度的重要蛋白，在骨骼肌兴奋—收缩偶联中，介导了 Ca^{2+} 的快速释放[4]. 前期工作已经发现氧化型调控剂如醌类，亚硒酸类，Zn^{2+} 等对 RyR1 具有低浓度激活和高浓度抑制的双相调控性[5,6]. 骨骼肌型钙释放通道(RyR1)的每个亚基有约 100 个含有巯基的半胱氨酸残基，分别由激活通道和关闭通道等不同职能巯基群组成，它们是通道门控的 redox 调控机制的重要基团[7,8]. RyR1 蛋白上存在众多调控剂的结合位点，可以与不同的蛋白和通道调节因子相互作用，调控通道的活性或门控. 另外，在 SR 膜上，RyR1 与 Junctin，Calsequestrin，Triadin 等钙释放单元蛋白共同组成一个复杂的而稳定的蛋白质复合体，是 Ca^{2+} 释放的结构基础[9]，一般被称为钙释放单元(Ca^{2+} release unit).

此项研究初步探讨在模拟的氧化胁迫条件下，RyR1 与周边 SR 相关蛋白的是否通过氧化交联形成错误的大分子复合体，产生异常蛋白堆积物，从而抑制通道的活性进而妨碍钙释放单元的功能.

本研究采用 Ryanodine binding 方法检测 RyR1 的功能状态，利用 SDS-PAGE 回收电泳法和光子相干光谱法(PCS)检测在高浓度氧化调控剂作用下 SR 膜上大分子交联复合体的组成和蛋白质平均粒径，利用 DPH 荧光偏振法检测 SR 膜的流动性. 回收电泳法可以用来检测收集到的 SDS-PAGE 的交联复合物的蛋白组成. 光子相干光谱法(PCS)实验参照胡晓芳[10]的方法，研究了溶液中的粒子粒度和测定粒子聚集状态的临界值的变化.

本工作将重点研究氧化型通道调控剂萘醌(1,4NQ)和硒化合物(Na_2SeO_3)在 IC_{50} 浓度下模拟氧化胁迫条件，利用[^{3}H]-ryanodine 结合 SDS-PAGE 和 PCS 实验，研究氧化胁迫对兔骨骼肌 SR 钙释放通道(RyR1)功能、SR 膜蛋白的组成情况和蛋白平均粒径，和对 SR 膜的流动性的影响，并用回收电泳实验和 Western Blotting 检测大分子交联复合体的组成. 由此可以初步探究高氧化胁迫对诱导异常胞内蛋白堆积的可能机制，从而可以更好地理解氧化胁迫对细胞内钙调控机制/钙信号通路的影响及导致离子通道疾病的病理诱因.

1 实验材料与方法

1.1 试剂和材料

[^{3}H]-ryanodine 购自 Du Pont,放射活性为 75～80 Ci/mmol. 3-[3-(胆酰氨丙基)二甲铵基]丙磺酸内盐(CHAPS),哌嗪-N,N′-二(2-乙磺酸)(PIPES),Na_2SeO_3,1,4NQ,乙二醇双(氨基乙基醚)四乙酸 (EGTA), 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)等试剂购于 Sigma Chemical Co. Phosphatidylcholine(卵磷脂,PC),1,6-二苯-1,3,5-己三烯(DPH)购自 Molecular Probes Co. 1mol/L 氯化钙($CaCl_2$)溶液购于 Fluka Co. Sephacryl S300 HR 购自 Amersham Pharmacia. 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、SDS、甘氨酸、过硫酸胺、TEMED、考马斯亮蓝、丽春红、Tween-20、ECL 和显影定影液等试剂购自碧云天生物科技公司. RyR1 特异性抗体购自 Santa Cruz Co 辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗购自北京鼎国生物科技公司. 其它试剂均为国产分析纯.

1.2 SR 囊泡的制备和 RyR1 蛋白提取

SR 囊泡样品主要参照 MacLennan[11] 的方法由新西兰白兔后腿和双侧背肌制备,并在第一次离心悬浮液中加入了 100 mmol/L EGTA 和 100 μmol/L DTT 以清除悬浮金属离子和减少制样时对钙通道的氧化损伤. 样品悬浮于含有 100 mmol/L KCl, 20 mmol/L HEPES, pH 7.1 的悬浮液内, 液氮预处理后贮于 -80 ℃.

提取通道蛋白 RyR1 采用了经修改后的 West[12] 和尹长城[13] 的方法. SR 囊泡在柱层析之前经过 Triton X-100 抽提 SR 膜上的 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase,并用 CHAPS 溶解 SR 膜[13]. 将处理的样品加到装有 Sephacryl S300 HR 凝胶的层析柱上并以 0.75 mL/min 的速度用分离 buffer(1 mol/L NaCl, 25 mmol/L PIPES, 0.15 mmol/L $CaCl_2$, 0.1 mmol/L EGTA, 20 mmol/L sucrose, 0.4% CHAPS, 和 2 mg/mL PC, pH 7.4)洗脱蛋白. 每 2 min 收集一个洗脱样品,含有 RyR1 的样品再进行羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)层析. 先用平衡液(0.48% CHAPS, 0.2% PC,10 mmol/L K_2HPO_4,2 mmol/L DTT, pH 7.0)平衡柱,然后用 4 个柱体积 100 mmol/L K_2HPO_4 和 3 个柱体积 200 mmol/L K_2HPO_4(含平衡液)洗脱,最后用 500 mmol/L K_2HPO_4 清洗柱床. 整个过程洗脱流速为 2 mL/min. 将 200 mmol/L K_2HPO_4 洗脱液浓缩至 2～3 mL,所得蛋白经液氮预处理后贮于 -80 ℃.

1.3 [^{3}H]ryanodine 结合实验

[^{3}H]-ryanodine 结合实验参照 Xia[1] 的方法进行:0.5 mg/mL 的 SR 样品悬浮于实验液中(1 nmol/L [^{3}H]-ryanodine, 14 nmol/L ryanodine, 250 μmol/L KCL, 15 μmol/L NaCl, 25 mmol/L HEPES, 50 μmol/L EGTA, 100 μmol/L $CaCl_2$, pH 7.1). 一定浓度的 1,4NQ 和 Na_2SeO_3 将根据要求以设定的浓度分别加入实验液中得到终溶液,37 ℃温育 3 h,由气动过滤器过滤掉游离的 ryanodine. 所得样品由同位素液闪计数器(Beckman LS 6500)测量放射性活性. 非特异性标记样品由上述终溶液中加入 200 倍的 ryanodine 所获得. 在 50 μL终溶液中加入 3 mL 闪烁液获得放射活性总剂量. 所得数据经 Sigma 软件计算并绘出结合曲线.

1.4 蛋白质 Cross-linking 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳检测

提纯的 SR 分为 4 组,第①、③组各用 1 mmol/L Na_2SeO_3 和 250 μmol/L 1,4NQ 处理,冰上反应 1 h 后,加入 5× SDS-PAGE 上样缓冲液(60 mmol/L Tris-HCl, 25% 甘油, 2%

SDS，0.1% 溴酚蓝）；第②、④组也用同样浓度的 Na_2SeO_3 和 1，4NQ 处理，加入含有 1.60 mmol/L DTT 的上样缓冲液. 每组样品的蛋白浓度均为 3.2 mg/mL. 用 3%～15%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品中的蛋白质. 凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色，冰醋酸-乙醇脱色后拍照成像.

1.5　蛋白质回收 SDS-聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳和 Western 印迹检测

蛋白质 cross-linking 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳结束以后，用考马斯亮蓝 R-250 染色液短暂染色后直接用 250 mmol/L KCl 溶液脱色，然后根据染色结果切下发生交联的大分子蛋白条带凝胶，放入装有电洗脱缓冲液（50 mmol/L Tris，50 mmol/L 甘氨酸，0.1% SDS，pH 8.9）的透析袋中，将透析袋置于水平电泳槽中，低温电泳 2～3 h. 回收蛋白所用的缓冲液与电泳所用的缓冲液相同. 透析袋中的蛋白质经过超滤管浓缩后，加入 DTT，用同上的方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳检测. Western 印迹检测将凝胶通过湿法转移槽转移到醋酸纤维素薄膜上. 第一抗体为抗 RyR1 特异性抗体，第二抗体为辣根过氧化酶连接的马抗山羊 IgG. 使用 ECL Western 试剂盒检测结果.

1.6　光子相干光谱法测蛋白粒度分布

将提取的 RyR1 蛋白用 Buffer（20 mmol/L PIPES，1 mmol/L CHAPS，0.3 mg/mL PC，500 μmol/L EGTA，pH 7.1）稀释至 10 μg/mL 浓度，再将溶液经滤器过滤，分装成 1.5 mL的样品，然后加入不同的氧化剂，在摇床上摇 30 min 后进行 PCS 检测.

PCS 测定中所使用的仪器为 Zetasizer Nano ZS（Malvern Instrunents Ltd，UK）. 使用 633 nm 的 He-Ne 激光作为光源，检测角度为 137°，检测温度为 25 ℃. 溶质和颗粒的散射系数分别设为 1.330 和 1.520，溶液的粘度为 1.00.

1.7　DPH 荧光偏振测定肌质网膜的流动性

参照文献的方法[14]，取适量的 2 μmol/L DPH 四氢呋喃溶液与 0.5 mg/mL 肌质网混合（磷脂总浓度为 0.4 g/L，探针与磷脂分子比为 1∶500）. 25 ℃避光孵育 1.5 h. 用荧光分光光度计（日立 F4 500 型）进行测定，激发波长为 362 nm，发射波长为 432 nm，狭缝为 5 nm. 本实验重复 3 次.

1.8　统计学处理

应用 Sigma Plot 8.0 软件对数据绘图和对数据进行线性或非线性回归处理，所有数据均用 Mean ± SD 表示，数据分析用 t 检验，$P < 0.05$ 认为有显著性差异. n 表示试验重复次数.

2　结　　果

2.1　氧化剂对钙释放通道 ryanodine 结合的影响

本实验考察了氧化胁迫对 RyR1 ryanodine 结合能力的影响. 在 50 μmol/L Ca^{2+} 作用下，RyR1 处于开放状态，与 ryanodine 的结合能力表示 RyR1 的活性. 从图 1 可以看出，氧化胁迫浓度的氧化剂（30 μmol/L 1，4NQ 和 30 μmol/L Na_2SeO_3）显著抑制了钙释放通道的活性. 加入氧化剂后其对 ryanodine 结合分别抑制了 79%和 73%. 这说明经此浓度氧化剂处理后，RyR1 的通道活性被严重抑制. 下一步需要考察的是这种抑制效应是否是因在氧化胁迫下，RyR1 与其它蛋白形成了大分子交联复合物的结果，这种交联可能导致 RyR1 与 ryanodine 的一些作用位点或者功能巯基被掩蔽，或者蛋白上的巯基被直接氧化，导致结合能力活性降低.

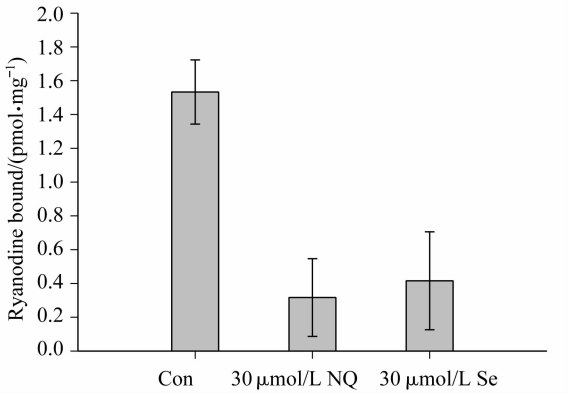

图 1 氧化剂对 SR[^{3}H]-ryanodine 结合能力的影响

Fig. 1 The effects of oxidizing agents on the [^{3}H]-ryanodine bindings

注:Con 不加入任何调控剂,NQ 1,4NQ,Se Na_2SeO_3;结果表示为 Mean ± SD,Con $n=9$,其它实验组 $n=4$,$P<0.01$ *vs* Con

2.2 氧化剂导致 SR 蛋白间交联

图 2 结果显示了高浓度氧化剂对 SR 蛋白电泳分布的影响. 从图中结果可以看出,经 Na_2SeO_3 和 1,4NQ 处理过的 SR 囊泡样品中一些蛋白由于被氧化而产生了交联,形成了大分子量的交联复合体,并在凝胶上部胶体孔径较大处聚集(黑色箭头). 胶中一些蛋白成份与对照组相比有所减少甚至消失(白色箭头),如 RyR1 和钙泵(Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase)等蛋白所在位置的条带. 而这种蛋白之间的交联复合体被加入的 DTT 所逆转. DTT 使由 Na_2SeO_3 和 1,4NQ 氧化形成的蛋白间交联被解除,说明由 Na_2SeO_3 和 1,4NQ 引起的蛋白交联是因自由巯基被氧化后形成的二硫键的结果. 由于电泳样品中所含蛋白浓度较大(3.2 mg/mL),故电泳实验中采用的 Na_2SeO_3 和 1,4NQ 的浓度也较大(分别达到1 mmol/L和 250 μmol/L). 下一步需要了解复合体的蛋白组分和 RyR1 是否参与了复合体的形成.

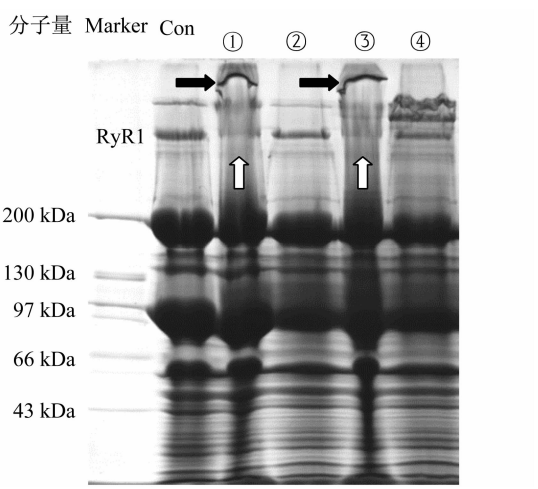

图 2 氧化剂处理后 SR 蛋白交联电泳图

Fig. 2 Oxidants induced the cross-linking of SR proteins

注:Con 不加任何氧化剂的对照组;①和③ 各用 1 mmol/L Na_2SeO_3 和 250 μmol/L 1,4NQ 处理;②和④ 先分别用 Na_2SeO_3 和 1,4NQ 处理,再加入 160 mmol/L 的 DTT;黑色箭头 大分子量的蛋白复合体; 白色箭头 明显消失或减少的蛋白;$n=5$

2.3　氧化剂引起的大分子交联复合物的组分考察

回收电泳实验和 Western Blotting 实验用以研究参与形成大分子交联复合物的蛋白组成. 图 3 和 4 的结果显示回收的大分子交联复合物的主要组分的蛋白分布. 图 3 的结果显示，当加入含有 DTT 的上样缓冲液后，蛋白质间的二硫键被打开，经电泳分离后出现多条蛋白质条带，根据分子量判断可能是 RyR1，myosin 和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase（钙泵）等参与 Ca^{2+} 调控的蛋白. 进一步，利用 RyR1 特异性单抗以及辣根过氧化物酶标记的二抗对 RyR1 标记，进行 Western Blotting 实验，结果由图 4 所示. 在此结果中 RyR1 显阳性，表明此蛋白确实参与了氧化剂诱导的交联复合物的形成. 以上实验说明氧化剂可以导致 RyR1 之间和 RyR1 与 SR 其它重要功能性蛋白的巯基被氧化成二硫键，使这些蛋白聚集，形成大分子交联复合体. 这有可能是诱发胞内异常蛋白堆积的机制之一.

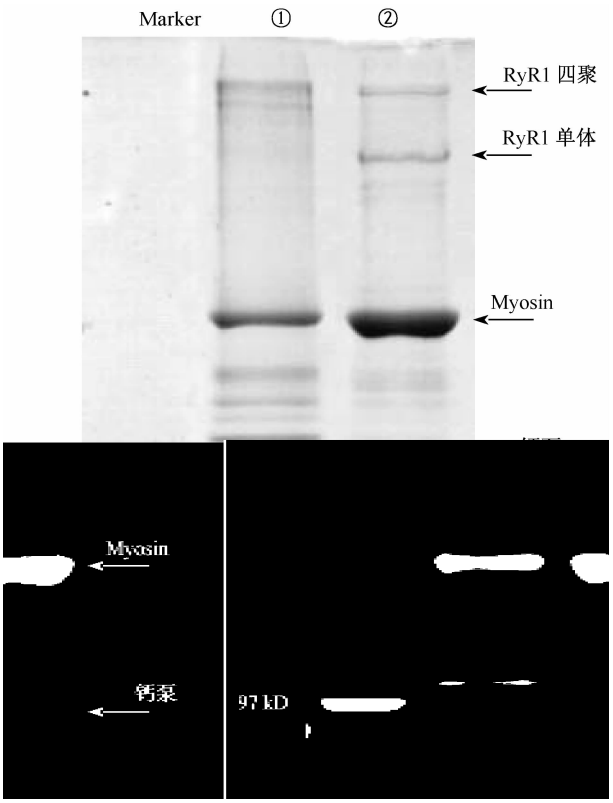

图 3　SDS-PAGE 分析大分子交联复合物的组成

Fig. 3　The analysis of the compositions of the macromolecular cross-linking complexes by SDS-PAGE

注：①和② 回收的 1 mmol/L Na_2SeO_3 和 250 μmol/L 1,4NQ 处理后形成的大分子交联复合体，加入含 DTT 的上样缓冲液，电泳后经过考马斯亮蓝染色

2.4　氧化剂对 RyR1 的平均粒径的影响

为了研究氧化胁迫是否也导致 RyR1 之间的交联，此项研究也对提纯 RyR1 的粒度作了检测和分析. 蛋白质的平均粒度（Z-ave）可以反映蛋白质的聚集情况，蛋白的聚集物增加可以间接表明蛋白间的相互作用加强. 此实验利用 PCS 研究了高浓度氧化调控剂诱导的氧化胁迫对 RyR1 之间的交联的影响. 图 5 反映了不同处理组的 RyR1 样品的平均粒径. 对照

2.5　氧化剂对肌质网膜流动性的影响

SR 膜上的膜蛋白如受体、离子通道，它们的活性与膜的流动性有一定的相关性. 当膜蛋白因氧化形成错误交联的大分子复合体的时候，膜和蛋白之间，蛋白之间都不同程度加剧了锚定效应，因此膜流动性会发生改变，这种使膜蛋白和脂质体灵活性受限的改变进而会再对膜蛋白活性产生限制性的影响. 因此此项研究考察了高浓度氧化调控剂对 SR 膜流动性的影响. DPH 是一种脂溶性的荧光探针，它与膜脂结合后荧光偏振度反映了整体膜流动性. 偏振度数值随膜流动性降低而升高. 表 1 的实验结果显示，对照组的偏振度值为 0.186 2 ± 0.005 4，30 μmol/L 1,4NQ 处理组的偏振度值为 0.249 7 ± 0.010 9，50 μmol/L Na_2SeO_3 处理组的偏振度值为 0.221 1 ± 0.009 2，阳性对照 2 mmol/L Ca^{2+} 处理组的偏振度值为 0.204 0 ± 0.007 8. 两者相比对照组偏振度值分别上升了 34% 和 19%，明显高于阳性对照上升的程度(10%). 这说明经过氧化剂处理后，因膜蛋白形成了大分子交联复合物，使膜流动性大大降低，影响膜蛋白的构象变化和移动，这可能是氧化胁迫影响膜蛋白的功能的重要原因之一，也可能是氧化损伤引起的离子通道疾病的病理基础之一.

表 1　氧化剂对肌质网膜流动性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$, $P<0.01$ *vs* Con)

Tab. 1　The effects of oxidizing agents on the membrane fluidity of SR($\bar{x} \pm s$, $n=4$, $P<0.01$ *vs* Con)

组别	Con	30 μmol/L 1,4NQ	50 μmol/L Na_2SeO_3	2 mmol/L Ca^{2+}
荧光偏振度	0.186 2 ± 0.005 4	0.249 7 ± 0.010 9	0.221 1 ± 0.009 2	0.204 0 ± 0.007 8

3　分析讨论

细胞的氧化还原缓冲系统保护细胞器和功能蛋白免受氧化损伤，提供了膜蛋白在膜上的基本自由度. 当处于航天环境或高海拔缺氧等极端条件下，在激烈运动和激烈情绪等氧化应激状态下，或者在动脉粥样硬化等病理条件下，这一平衡被打破，胞内发生氧化胁迫，导致蛋白巯基库存变小，自由基产率升高，使胞内抗氧化机制运转满负荷. 这时胞内的生物大分子就会受到氧化损伤. 众多的研究发现，一些严重疾病的诱发机制是包括胞内的蛋白过氧化和异常蛋白堆积[3]. 由于蛋白被氧化的一个直接后果就是蛋白巯基的被氧化，进而诱发蛋白间的错误交联. 因此研究氧化胁迫在分子水平上的作用机理，应该了解氧化胁迫对蛋白间的相互作用的影响，包括对蛋白交联和蛋白异常堆积等方面的影响.

1,4NQ 具有异常活跃的氧化还原性质，能干扰体系的氧化还原环境和电子传递链[7]，硒(Se)是生物体必须的一种微量元素，在特异底物存在时，它具有氧化剂的性质[15]. 它们可以用来模拟氧化胁迫的环境.

研究氧化调控剂对 RyR1 的影响可以揭示氧化胁迫对钙释放机制的损害性影响. 本文中的[^{3}H]-ryanodine 结合实验结果表明，半抑制浓度的 1,4NQ 和 Na_2SeO_3 严重抑制了钙释放通道 RyR1 的活性. 前期工作[16]也发现在此浓度下，RyR1 的自由巯基数目减少了 70% 左右. RyR1 上的自由巯基按照对 RyR1 的调控和对氧化环境的敏感度可分为负责打开通道、关闭通道和蛋白结构稳定的巯基群，它们按先后顺序对氧化环境的敏感度逐渐降低. 当存在高浓度氧化型通道调控剂时，会通过氧化负责通道关闭的职能巯基群抑制通道活性，关闭通道. 因此自由巯基数目的急剧减少意味着通道蛋白功能的受限.

受氧化威胁的蛋白不仅功能受限，而且会发生错误氧化修饰，导致功能进一步受限或者被抑制. 此研究已经观察到，在氧化胁迫条件下，SR 中的蛋白之间形成了可以被巯基特异性

还原剂 DTT 解除的大分子交联复合物,使 RyR1(包括聚合物)的平均粒径增加.结合以前的研究结果,本项研究结果提示,氧化剂不仅降低了调节门控的 RyR1 巯基群规模,而且作用于影响蛋白结构的其它巯基,形成 RyR1 之间、RyR1 与其它 SR 膜蛋白间的交联,形成大分子复合物.有研究显示,在骨骼肌细胞中 RyR1 与 Triadin,Junctin 和钙结合蛋白等功能蛋白形成一个钙释放单元复合体,胞浆内 Ca^{2+} 浓度通过改变 RyR1 与 Triandin 的相互作用控制 RyR1 的开放和关闭[9].在氧化胁迫下,RyR1 之间,或 RyR1 与其它蛋白质间形成大分子复合物,会影响此单元的结构和组成,破坏 Ca^{2+} 释放机制的结构基础,进而影响调控剂对 RyR1 功能的调控.文中大分子交联复合物的回收电泳实验和 Western Blotting 检测的结果证实了 RyR1 参与形成由氧化胁迫诱导的大分子交联复合物.另外,RyR1 在氧化胁迫下聚集相互作用增强,可能影响 RyR1 间的协同性和灵活性,从而影响的 Ca^{2+} 正常释放.不仅如此,这些发生错误交联的蛋白复合物因具有蛋白水解酶的抗性,难以进入正常的代谢途径,会在细胞质,膜组织和细胞器中积累,它们将是诱发细胞病变的危险因素.例如在帕金森症的发生过程中 α-synuclein 蛋白的聚合和积累导致蛋白酶体失活和多巴胺神经元的死亡[17],可见重要组织器官的细胞中异常蛋白堆积,必然会诱导相关疾病的发生,这也许也是氧化损伤机制的长期效应之一.

Squier[18] 曾报道膜流动性的改变会影响肌质网 Ca^{2+}-ATPase 的构象和活性.Vareesangthip 等[19] 报道成人多囊肾病人红细胞膜胰岛素受体敏感性降低 ,可能与膜流动性变化等直接相关.氧化胁迫引起膜流动性的改变可能会影响到 SR 的膜蛋白的活性.实验结果提示,高浓度的氧化调控剂诱导的氧化胁迫导致蛋白之间甚至蛋白和脂质体分子之间的交联,进而引起蛋白的运动自由度严重下降,蛋白对膜的锚定作用加强,这可能是 SR 膜的流动性下降的分子基础,也可能是氧化胁迫对 RyR1 钙释放通道活性和 SR 上 Ca^{2+} 调控系统抑制的一个途径.

为了深入研究氧化调控剂引起的氧化环境的改变对 SR 上钙释放通道的作用机制,还需要进一步确定是哪些巯基对氧化胁迫做出响应,并考察其它氧化调控剂,如高浓度的 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 等,检测它们是否影响 RyR1 上自由巯基数目以及对 RyR1 复合体的影响.

4 总 结

本研究揭示了高浓度氧化调控剂(1,4NQ 和 Na_2SeO_3)诱导的氧化胁迫对骨骼肌型钙释放通道 RyR1 与相关蛋白的相互作用的影响.发现在氧化胁迫条件下,RyR1 和相关蛋白上的自由巯基被氧化,形成大分子交联复合物.提示氧化胁迫可能通过氧化负责关闭通道的巯基群和影响 RyR1-钙释放单元复合体的结构,形成膜上的异常蛋白堆积物,来抑制通道的活性和损伤钙释放机制.

致谢:美国 Portland State 大学的 Jonathan J Abramson 教授、上海交通大学的胡晓芳博士和复旦大学的黄沛博士对本研究给与了许多帮助,特此感谢.对华东师范大学生命科学学院中心实验室的赵实老师给予的帮助表示衷心的感谢.

[参 考 文 献]

[1] XIA R H, STANGLER T, ABRAMSON J J. Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators[J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36556-36561.

[2] LAMB G. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanism in skeletal muscle: Studies with mechanically skinned fibres [J]. J of Muscle Res and Cell Mot, 2002, 23: 81-91.

[3] THOMAS N. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence[J]. EMBO J, 2005, 24: 1311-1317.

[4] FILL M, COPELLO J A. Ryanodine receptor calcium release channels[J]. Physiol Rev, 2002, 82: 893-922.

[5] XIA R H, GANTHER H E, ABRAMSON J J, et al. Selenium compounds modulate the calcium release channel/ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle by oxidizing functional thiols[J]. Biochemical Pharmacology, 2004, 67: 2071-79.

[6] 夏若虹. 1,4-naphtoquinone 与兔骨肌肌质网钙通道相互作用表现出的双相性特性[J]. 生物物理学报, 1998(3): 429-437.
XIA R H. The interaction of 1,4NQ with the release channel of rabbit skeketal muscle sarcoplasmic reticulum reveals biphasic behavior[J]. Acta Biophysica Sinica, 1998(3): 429-437.

[7] FENG W, LIU G H, XIA R H, et al. Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinines [J]. Molecular Pharmacology, 1999, 55: 821-31.

[8] MARIOV B S, OLOJO R O, XIA R H, et al. Non-thiol reagents mediate ryanodine receptor function by redox interactions that modify reactive thiols[J]. Antioxidants & Research Signaling, 2006(9): 609-621.

[9] ZHANG L, KELLEY J, SCHMEISSER G, et al. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor[J]. J Biol Chem, 1997, 272(37): 22389-22397

[10] HU X F, CHEN K Y, XIA R H, et al. Modulation of the interactions of isolated ryanodine receptors of rabbit skeletal muscle by Na^+ and K^+[J]. Biochemistry, 2003, 42: 5515-5521.

[11] MACLENNAN D H. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum [J]. J Biol Chem, 1970, 245: 4508-4518.

[12] WEST D J, SMITH E C, WILLIAMS A J. A novel and rapid approach to isolating functional ryanodine receptors [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002, 294: 402-407.

[13] 韩红梅，韦日生，尹长城. 一种快速大量纯化骨骼肌 Ryanodine 受体的方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(9): 755-760.
HAN H M, WEI R S, YIN C C. A fast method for purification of skeletal muscle ryanodine receptor in large scale [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 22(9): 755-760.

[14] 王玉苓，崔肇春，杨福愉. GM1 对肌质网 Ca^{2+}-ATPase 活性及膜流动性的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15: 820-823.
WANG Y L. CUI Z C, YANG F Y. Effect Of GM1 on Ca^{2+}-ATPase activity and membrane fluidity of sarcoplasmic reticulum[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 15: 820-823.

[15] LIPINSKI B. Rationale for the treatment of cancer with sodium selenite[J]. Medical Hypotheses 2005, 64(4): 806-810.

[16] 蔡知音，张玉焜，叶燕萍，等. 超氧中介巯基氧化剂对骨骼肌型钙释放通道的调控作用[J]. 航天医学和医学工程, 2008, 21(6): 455-461.
CAI Z Y, ZHANG Y K, YE Y P, et al. Modulation activity of superoxide medium thiol oxidant to skeletal muscle type Ca^{2+} release channel[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2008, 21(6): 465-471.

[17] DAWSON T M , DAWSON V L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. Science, 2003, 302(5646): 819-822.

[18] SQUIER T C, THOMAS D D. Lipid of luidity directly modulats the overall protein rotational mobility of the Ca^{2+}-ATPase in sarcoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 1988, 263: 9178-9186.

[19] VAREESANGTHIP K, TONG P , WILKINSON R, et al. Insulin resistance in adult polycystic kidney diesease [J]. Kidney Int, 1997, 52(2): 503-508.