

# 钙信号和活性氧相互作用的研究进展

侯晓媛<sup>1</sup> 李雪<sup>2</sup> 鲁严<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院皮肤科, 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学附属妇产医院皮肤科, 南京 210004)

**摘要** 钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )是重要的第二信使,在调节基因表达、细胞周期调控、细胞运动、自噬和凋亡等方面发挥着重要的作用。活性氧(ROS)由细胞内系统以中等水平生成,作为信号分子参与各种生理活动,而高水平的ROS可致功能障碍、疾病甚至细胞死亡。越来越多的证据表明, $\text{Ca}^{2+}$ 和ROS信号系统之间存在相互联系,这对调节细胞信号网络具有重要意义。 $\text{Ca}^{2+}$ 和ROS信号系统之间的相互作用可以是刺激性或抑制性,这取决于靶蛋白的类型、ROS种类、剂量和暴露时间。这种复杂的联系可能会增强信号转导,其中一个系统的功能障碍可能会影响另一个,并破坏两个系统的稳定性。该综述简要总结了 $\text{Ca}^{2+}$ 和ROS系统之间的相互调节作用,此调节有利于维持 $\text{Ca}^{2+}$ 和ROS稳态。

**关键词** 活性氧; 钙离子; 钙离子通道

## Interplay Between Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species

HOU Xiaoyuan<sup>1</sup>, LI Xue<sup>2</sup>, LU Yan<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;<sup>2</sup>Department of Dermatology, Obstetrics and Gynecology Hospital Affiliated of Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China)

**Abstract** Calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is an important secondary messenger and plays an essential role in regulating gene expression, cell cycle control, cell motility, autophagy and apoptosis. Reactive oxygen species (ROS) are generated in moderate levels by different intracellular systems, acting as signaling molecules involved in various physiological processes, while high levels of ROS can cause dysfunction, diseases, and even cell death. Increasing evidence suggests a mutual cross-talk between  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS signaling systems which seems to have important implications for fine tuning cellular signaling networks. The interactions between  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS signaling systems can be either stimulatory or inhibitory, depending on the type of target proteins, the ROS species, the dose, and exposure time. Such complex connection might enhance signal transduction, whereas dysfunction in either system might affect the other system and undermine the stability of both systems. This review briefly summarizes the interactions between the two signaling systems that finely tune the homeostasis of  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS.

**Keywords** reactive oxygen species; calcium ion;  $\text{Ca}^{2+}$  channels

细胞内钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )作为重要的第二信使调节多种生理功能,包括基因表达、细胞周期调控、细胞运动、自噬和凋亡,这种调节常响应于各种生理

刺激触发的细胞溶质 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )增加。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 一般维持在非常低的水平( $\sim 10^{-7}$  mol/L),主要通过诱导细胞外液 $\text{Ca}^{2+}$ ( $\sim 10^{-3}$  mol/L)经质膜钙流入通道

收稿日期: 2019-01-09 接受日期: 2019-03-20

国家自然科学基金(批准号: 81872541、81602774)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 025-86862684, E-mail: luyan6289@163.com

Received: January 9, 2019 Accepted: March 20, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81872541, 81602774)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-86862684, E-mail: luyan6289@163.com

网络出版时间: 2019-09-30 10:25:02

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1024.010.html>

或者胞内钙储存库( $\sim 10^{-4}$  mol/L)释放进入胞质, 激活下游信号级联反应。钙稳态在细胞生理学和病理生理学中起关键作用, 而胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 持续升高可能会引发细胞死亡<sup>[1]</sup>。活性氧(reactive oxygen species, ROS)通过电子转移反应从分子氧衍生, 形成超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), 随后自发或通过超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)作用形成过氧化氢(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 超氧化物和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 进一步形成高活性羟基自由基( $\text{HO}\cdot$ )<sup>[2-3]</sup>。线粒体产生的ROS可通过特定的线粒体离子通道/转运蛋白, 如线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)释放至胞质<sup>[4]</sup>。ROS除了作为线粒体呼吸链活动的副产物, 还可以由线粒体外酶如NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)、脂氧合酶、黄嘌呤氧化酶、髓过氧化物酶、细胞色素P450环氧合酶等生成。中等水平的ROS通过氧化蛋白质、脂质和核苷酸参与生理活动。然而, 高水平的ROS超过细胞抗氧化能力时, ROS会累积并损伤细胞<sup>[5-6]</sup>。

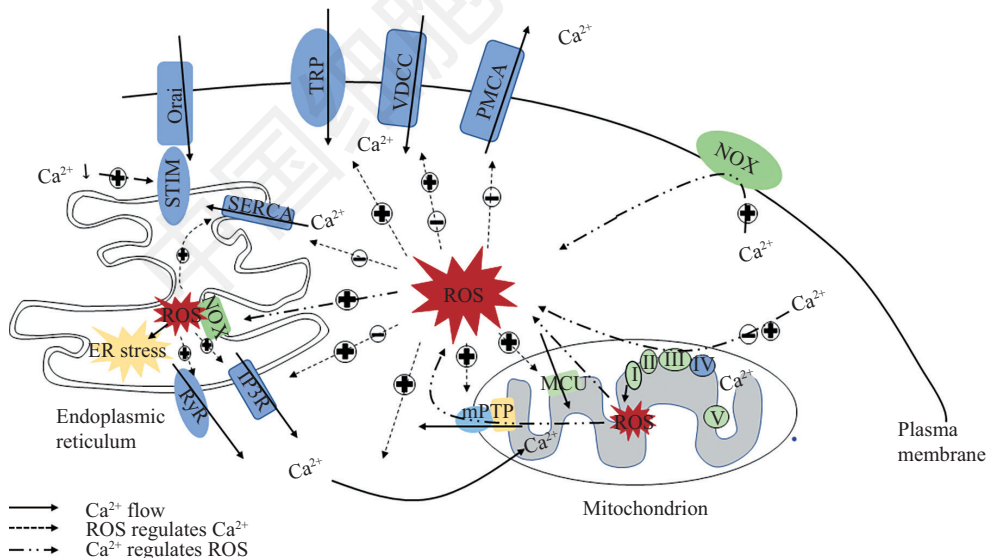
越来越多的证据表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 和ROS信号系统之间存在密切的相互作用和沟通联系, 参与调节细胞信号网络(图1)。一个系统的功能障碍会严重影响另

一个系统, 触发一系列病理信号事件, 最终导致功能障碍、疾病或细胞死亡。

## 1 钙离子调节活性氧生成

### 1.1 钙通道调节ROS的生成与代谢

ROS一直被认为是生成ATP过程中氧化代谢的副产物。电子传递链中高达1%的电子转移至分子氧衍生为超氧化物。一般认为,  $\text{Ca}^{2+}$ 通过刺激三羧酸循环中的酶(丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和酮戊二酸脱氢酶)和ATP合成酶、腺嘌呤核苷酸转位酶, 以及线粒体内的氧化磷酸化促进ATP合成, 通过增加代谢速率并消耗更多的氧, 增加呼吸链电子泄漏和ROS生成<sup>[4,7]</sup>。还有研究者认为,  $\text{Ca}^{2+}$ 通过诱导呼吸链复合物三维构象变化, 诱导ROS产生<sup>[8]</sup>。实际上, 线粒体的代谢状态决定了 $\text{Ca}^{2+}$ 对线粒体ROS水平的影响, 线粒体膜电位高(无ATP合成)时,  $\text{Ca}^{2+}$ 摄取减少ROS生成, 膜电位为去极化范围(ATP合成)时, 根据 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度, 其对ROS生成的影响不同, 而线粒体内 $\text{Ca}^{2+}$ 过量时, ROS的生成增加可能与线粒体代谢状态无关<sup>[9]</sup>。多种钙通道参与调节ROS生成。Nishida等<sup>[10]</sup>发现, ATP激活血管内皮细胞中N型电压依赖性



ROS: 活性氧; TRP: 瞬时受体电位通道; VDCC: 电压依赖性钙通道; PMCA: 质膜 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶; SERCA: 肌浆网/内质网 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶; STIM: 基质相互作用分子; Orai: 钙释放激活钙通道蛋白; NOX: NADPH氧化酶; ER: 内质网; IP<sub>3</sub>R: 肌醇1,4,5-三磷酸受体; RyR: 兰尼碱受体; mPTP: 线粒体通透性转换孔; MCU: 线粒体钙单向传递体。+: 正调节; -: 负调节。

ROS: reactive oxygen species; TRP: transient receptor potential channel; VDCC: voltage-dependent calcium channels; PMCA: plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; SERCA: sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; STIM: stromal interaction molecule; Orai: calcium release-activated calcium channel protein; NOX: NADPH oxidase; ER: endoplasmic reticulum; IP<sub>3</sub>R: inositol 1,4,5-trisphosphate receptors; RyR: ryanodine receptor type; mPTP: mitochondrial permeability transition pore; MCU: mitochondrial calcium uniporter. +: positive regulation; -: negative regulation.

图1 钙离子通道与ROS之间的互相调节

Fig.1 Interactions between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and ROS

钙通道(voltage-dependent calcium channels, VDCC)诱导Ca<sup>2+</sup>内流促进ROS生成,这种效应可以被VDCC阻断剂 $\omega$ -芋螺毒素( $\omega$ CTx)GVIA结构选择性阻断。ATP处理的嗜铬细胞瘤PC12细胞内游离钙浓度也增加,诱导线粒体去极化和ROS生成,该作用可以被胞内Ca<sup>2+</sup>螯合剂(BAPTA-AM)或线粒体钙单向传递体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)抑制剂RU360阻断<sup>[11]</sup>,提示线粒体基质内Ca<sup>2+</sup>超载也增加了ROS的生成,降低MCU表达可以显著降低胞质Ca<sup>2+</sup>升高产生的超氧炫<sup>[4]</sup>。与此相反,最近的数据显示, Ca<sup>2+</sup>抑制ROS的生成起保护作用。Ca<sup>2+</sup>通过TRPM2通道持续进入细胞,维持细胞生物能量学并防止缺氧-复氧损伤,还通过增加叉头框转录因子3a(FOXO3a)和下游效应物——SOD2的水平减少ROS生成,从而保护细胞免受氧化应激的损伤<sup>[12-13]</sup>。

此外,目前已发现一系列抗氧化蛋白参与中和细胞内过度形成的ROS,主要包括SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽S-转移酶和硫氧还蛋白等。Ca<sup>2+</sup>通过调节抗氧化系统调节ROS的清除过程。一方面, Ca<sup>2+</sup>可以直接激活抗氧化酶(如过氧化氢酶和谷胱甘肽还原酶),提高SOD水平,并在Ca<sup>2+</sup>诱导的mPTP开放时,促进线粒体释放谷胱甘肽。另一方面, Ca<sup>2+</sup>激活的钙调蛋白(calmodulin, CaM)可进一步激活过氧化氢酶,从而间接下调H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平<sup>[7,14]</sup>。

## 1.2 钙调节NADPH氧化酶

NOX家族主要的生物学功能是产生超氧化物和过氧化氢,是由胞膜亚基NOX2(gp91<sup>phox</sup>)、p22<sup>phox</sup>和胞质亚基p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、Rac(GTP酶)组成的酶复合体,NOX2及其同源物NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、双氧化酶1和2(DUOX1和DUOX2)为NOXes的核心亚基。NOX2与p22<sup>phox</sup>一起构成细胞色素b558,NOX2被激活时诱导大量ROS释放,这种活化受到胞质亚基的调节,胞质亚基需要被蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)磷酸化,易位到质膜偶联细胞色素b558起效,而PKC的活化依赖于Ca<sup>2+</sup><sup>[15-16]</sup>。此外, Ca<sup>2+</sup>激活的钙/钙调蛋白依赖性激酶II(calmodulin-dependent kinase II, CAMKII)也可以增加NOX2活性,促进ROS的产生<sup>[17]</sup>。角质形成细胞中的NOX1活化与含有NOX2的酶类似,依赖钙募集类似于NOX2的胞质亚基。Ca<sup>2+</sup>还通过激活PKC $\beta$ 1,磷酸化Thr429残基调节NOX1活性增强ROS生成<sup>[18]</sup>。

与上述间接活化NOX不同,NOX5和含有DUOX1

和DUOX2的酶为钙结合蛋白,依赖Ca<sup>2+</sup>产生ROS。NOX5与NOX1~4的区别在于N末端有4个与Ca<sup>2+</sup>结合的EF手结构域(EF hand domains)。胞内Ca<sup>2+</sup>升高促进Ca<sup>2+</sup>与NOX5 EF手结构域结合,改变NOX5的构象,暴露其疏水残基,促进N末端与C末端催化结构域相互作用,激活酶并产生ROS<sup>[19]</sup>。除了EF手结构域, Ca<sup>2+</sup>激活的CaM可以作用于NOX5的C末端结构域,诱导构象变化和增加N末端酶活性。此外, Ca<sup>2+</sup>激活的CAMKII磷酸化NOX5的C末端Ser475,正调节NOX5的活性,促进超氧化物生成<sup>[20]</sup>。DUOX酶含有类似于NOX5中的EF手结构域和与哺乳动物过氧化物酶具有序列同源性的N末端结构域。最近有研究显示, DUOX酶被Ca<sup>2+</sup>激活后产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,正如表皮创伤后诱导局部Ca<sup>2+</sup>增加,通过结合EF手结构域激活DUOX1,产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>并募集免疫细胞、激活炎症反应<sup>[21]</sup>。

## 2 活性氧调节钙离子稳态

### 2.1 质膜钙通道

2.1.1 电压依赖性钙通道 VDCC(也称为Cav通道)介导响应膜去极化的快速Ca<sup>2+</sup>内流,由5个主要亚基组成,分别为L型(Cav1.1~1.4)、N型(Cav2.2)、P/Q型(Cav2.1)、R型(Cav2.3)和T型(Cav3.1~3.3)钙通道。Cav通道中孔形成 $\alpha$ 1亚基中含半胱氨酸(cysteine, Cys)残基,故其对氧化还原敏感,调节其氧化还原状态会影响通道的活动、表达、运输、开放概率及开放时间<sup>[1,6]</sup>。

ROS对L型VDCC活性的影响存在争议。对豚鼠心室肌细胞的研究表明,外源性ROS氧化L型VDCC的游离巯基,抑制Ca<sup>2+</sup>内流;外源性氧化剂抑制HEK293细胞中的L型VDCC,而还原剂二巯苏醇可以逆转抑制作用<sup>[22]</sup>。与这些发现相反,血管紧张素II增强大鼠心室肌细胞中NOX2和P47<sup>phox</sup>的表达,通过NADPH氧化酶增加ROS产生,激活L型VDCC并增强 $\alpha$ 1C亚基表达,从而促进Ca<sup>2+</sup>内流,该效应可以被SOD类似物Mn(III)TBAP[Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride]显著降低,而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>清除剂无明显影响,提示调节钙通道可能是由超氧化物调节的,而非H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[23-25]</sup>。然而也有研究表明,外源性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以快速激活L型VDCC<sup>[23]</sup>。L型VDCC氧化还原调节的不统一可能是ROS激活的不同激酶广泛磷酸化钙通道,而通道磷酸化可以部分抵消活性氧直接氧

化对通道产生的抑制作用导致的。然而, ROS的来源、种类、数量和作用时间的差异也可导致ROS对L型钙通道的可变效应<sup>[26]</sup>。此外, Huang等<sup>[27]</sup>发现, 刺激产生的内源性ROS抑制感觉神经元中的T型Ca<sup>2+</sup>电流。

**2.1.2 瞬时受体电位通道** 瞬时受体电位通道(transient receptor potential channel, TRP)家族根据序列同源性和蛋白质结构域分为7个亚组, 即TRPA、TRPC、TRPM、TRPM1、TRPP、TRPN和TRPV。哺乳动物TRP蛋白形成同源或异源四聚体作为非选择性Ca<sup>2+</sup>可渗透性阳离子通道, 可以被多种因素激活和调节, 如Ca<sup>2+</sup>、温度、pH、ROS、化学和机械应力。氧化还原敏感的TRP通道是TRPC5、TRPM7、TRPA1、TRPV1和TRPM2<sup>[28]</sup>。

哺乳动物中ROS诱导的最佳靶标是TRPM2, ROS激活TRPM2的模式一直存在争议。很多证据表明, ROS可以直接或间接激活TRPM2通道<sup>[29-30]</sup>。众所周知, 氧化应激诱导ADP-核糖(ADP-ribose, ADPR)形成, ROS通过增加线粒体和多聚(ADP-核糖)聚合酶-1[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP-1]合成ADPR间接激活TRPM2。ADPR与TRPM2 C末端的NUDT9-H结构域结合, 激活通道。在PARP-1缺陷细胞中未检测到氧化剂诱导的TRPM2活化<sup>[12,29,31]</sup>。此外, 研究发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>还可能通过直接氧化TRPM2蛋白激活通道, 诱导的电流类似ADPR诱导的TRPM2电流, 电流可以被TRPM2拮抗剂克霉唑(10 μmol/L)或移除胞外Ca<sup>2+</sup>抑制<sup>[6,32]</sup>。除TRPM2通道外, TRPA1可以被亲电体和氧化应激产生的内源性亲电子产物激活, 并且已证明TRPA1通道的活化发生在ROS氧化Cys修饰后<sup>[28]</sup>。超氧化物清除剂(tempol)和SOD/过氧化氢酶模拟物(MnTMPyP)可降低TRPA1活化, 提示超氧化物和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>均参与调节TRPA1的活性; 而还原剂二硫苏醇通过防止和逆转Cys巯基氧化/二硫键形成, 完全阻断TRPA1活化, 表明TRPA1激活是由ROS直接作用于通道所致的<sup>[33-34]</sup>。ROS氧化修饰Cys残基还参与直接激活TRPV1和TRPC5通道。ROS增加神经元中TRPV1通道激动剂(辣椒素)诱发的TRPV1电流, 抗氧化剂如谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)通过清除ROS抑制神经元中辣椒素诱导的电流<sup>[31,35]</sup>。

**2.1.3 钙库操纵性钙内流** 非兴奋细胞中Ca<sup>2+</sup>进入胞质还可以通过钙库操纵性钙内流(store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, SOCE)或称作钙释放激活的钙通道(Ca<sup>2+</sup> release-

activated Ca<sup>2+</sup>, CRAC)。SOCE的核心蛋白由内质网基质相互作用分子(stromal interaction molecule, STIM)和质膜钙释放激活钙通道蛋白(calcium release-activated calcium channel protein, Orai)构成。STIM感知内质网内Ca<sup>2+</sup>水平并在其耗尽时与质膜Orai蛋白偶联, 激活Orai通道, 促进Ca<sup>2+</sup>内流。Ca<sup>2+</sup>得到补充后, STIM与Orai蛋白缓慢解离失活, 通道关闭。目前, 已在哺乳动物中鉴定出2种STIM同种型(STIM1~2)和3种Orai同种型(Orai1~3)<sup>[36]</sup>。

ROS通过不同途径作用于SOCE分子组分调节通道活性, 如直接氧化S-谷胱甘肽化Cys残基或通过激活PKC间接磷酸化苏氨酸、丝氨酸残基<sup>[22]</sup>。STIM和Orai蛋白均含Cys残基, PKC的调节和催化结构域也含Cys富集区域, 因此它们可能受氧化还原状态的调节。研究报道, ROS通过S-谷胱甘肽化STIM1中位于内质网腔的Cys56、Cys49, 引起STIM寡聚化并易位至质膜, 激活SOCE, 诱导Ca<sup>2+</sup>内流。STIM2的C末端结构域的Cys725也可能作为ROS的作用位点。与之相反, 氧化剂对Orai1中Cys195的修饰降低了通道功能, 但当Orai1与STIM1偶联时, 蛋白发生构象变化, Cys195对氧化剂的反应性也发生改变, 赋予Orai1介导Ca<sup>2+</sup>流入的氧化还原抗性<sup>[37]</sup>。Chen等<sup>[38]</sup>发现, 缺氧诱导大鼠平滑肌细胞产生ROS, 提高STIM1和Orai1的蛋白质水平, 该作用可以被PEG(polyethylene glycol)-SOD增强, PEG-过氧化氢酶减弱, PEG-SOD加速超氧化物转化为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 而PEG-过氧化氢酶将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>降解为水和氧, 提示细胞内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>而非超氧化物参与缺氧诱导SOCE增强。然而, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>激活SOCE所需的活化时间和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度有差异, 这可以解释为: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>激活SOCE似乎通过与胞内钙库组分相互作用发挥作用, 故H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>需要穿过质膜, 而不同细胞的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>运输通道蛋白的膜组成和表达方面不同; 另外, 细胞H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消除机制的效率差异也可能影响不同细胞中激活SOCE所需的有效H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度<sup>[39]</sup>。

## 2.2 肌浆网/内质网钙通道

肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)和内质网(endoplasmic reticulum, ER)分别是可兴奋和非兴奋细胞内主要的胞内钙储存库。SR/ER的主要钙释放通道分别是兰尼碱受体(ryanodine receptor type, RyR)和肌醇1,4,5-三磷酸受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, IP<sub>3</sub>R)。激活RyR和IP<sub>3</sub>R诱导Ca<sup>2+</sup>流入胞质, 导致[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高<sup>[36]</sup>。RyR包括3种同种型(RyR1~3), 其

中, RyR1和RyR2含有反应性Cys残基作为氧化还原修饰的靶点。ROS可以通过氧化Cys巯基基团直接增强通道活性, 促进SR释放Ca<sup>2+</sup>。缺氧影响细胞内ROS的产生, 经此途径诱导RyR活化。Wang等<sup>[40]</sup>发现, 外源性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与缺氧相似, 诱导肺动脉平滑肌细胞中[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>增加和肺动脉收缩, 而[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的增加不受胞外Ca<sup>2+</sup>去除或CaV通道阻滞剂硝苯地平的影响, 但可以被RyR拮抗剂丹曲林和兰尼碱抑制或消除, 提示ROS主要通过激活RyR诱导钙库释放Ca<sup>2+</sup>提高[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>水平。此外, NOX也参与调节RyR活性, NOX的活性与RyR2介导的Ca<sup>2+</sup>诱导Ca<sup>2+</sup>释放的调节相关<sup>[41]</sup>。

IP<sub>3</sub>R是非兴奋细胞中主要Ca<sup>2+</sup>释放通道, 包含3种亚型, IP<sub>3</sub>R结构域包括N末端区域的IP<sub>3</sub>结合位点、C末端的6个跨膜结构域、大量细胞质调节位点和蛋白质结合结构域<sup>[42]</sup>。研究表明, 氧化内源性氧化还原剂(如超氧化物和氧化型谷胱甘肽)的硫醇基团可激活不同细胞类型的IP<sub>3</sub>R, 诱导钙库释放Ca<sup>2+</sup><sup>[43]</sup>。此外, 内源性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>还可以增加主动脉内皮细胞中IP<sub>3</sub>R对IP<sub>3</sub>的敏感性, 证明了ROS对IP<sub>3</sub>R活性影响的生理相关性<sup>[44]</sup>。有研究使用鸡DT40细胞(表达3种IP<sub>3</sub>R同种型)鉴定了介导超氧化物依赖性Ca<sup>2+</sup>释放的IP<sub>3</sub>R类型, 三重IP<sub>3</sub>R缺陷型和仅表达IP<sub>3</sub>R3的细胞失去响应超氧化物介导的Ca<sup>2+</sup>释放, 表明IP<sub>3</sub>R1和IP<sub>3</sub>R2而非IP<sub>3</sub>R3对ROS有反应<sup>[44]</sup>。

### 2.3 线粒体钙通道

线粒体Ca<sup>2+</sup>稳态在细胞生理中起重要作用。线粒体外膜对Ca<sup>2+</sup>高度通透, 主要通过非特异性电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC)排出Ca<sup>2+</sup>。而线粒体内膜对Ca<sup>2+</sup>的渗透性低几个数量级, 从而限速Ca<sup>2+</sup>进入线粒体基质。线粒体Ca<sup>2+</sup>摄取由呼吸链质子泵产生的线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )驱动。有研究发现, MCU参与快速摄取Ca<sup>2+</sup>, 其受调节蛋白(MICU1-3和MCUR1)的调控; 推测MCU的N末端存在2个CaMKII磷酸化作用位点Ser57和Ser92, 而ROS可以通过氧化CaMKII调节结构域中Met281和Met282残基间接激活MCU通道, 机制仍需进一步验证<sup>[1,7,45]</sup>。

mPTP参与线粒体钙排出, 其主要由外膜的VDAC和内膜的腺苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase, ANT)、基质的亲环蛋白D(cyclophilin D, Cyp-D)组成。线粒体钙超载时, 高水平ROS和线粒体膜电位去极化

刺激mPTP持续开放, 释放大量Ca<sup>2+</sup>和促凋亡蛋白进入胞质, 导致细胞死亡。VDAC是氧化还原敏感通道, 调节膜通透性。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>调节VDAC功能, 触发VDAC依赖性线粒体外膜透化, 释放凋亡因子, 激活凋亡级联反应<sup>[46]</sup>。ROS还可以通过氧化ANT的Cys160、Cys56以及Cyp-D内Cys203, 直接调节mPTP的开放。此外, ROS通过增加线粒体Ca<sup>2+</sup>浓度间接调节mPTP的开放: ROS促进Ca<sup>2+</sup>从ER/SR进入胞质, 随后流至线粒体。Ca<sup>2+</sup>浓度增加促进氧化磷酸化过程中ATP和ROS的生成, 促进mPTP的开放<sup>[47]</sup>。

### 2.4 Ca<sup>2+</sup>-ATP酶

通过Ca<sup>2+</sup>转运系统维持细胞溶质低水平Ca<sup>2+</sup>浓度, 即Ca<sup>2+</sup>-ATP酶。其将胞质Ca<sup>2+</sup>快速泵回胞内细胞器, 如ER, 或排出至细胞外液。这些Ca<sup>2+</sup>-ATP酶属于P型ATP酶(E1E2型)超家族, 根据其亚细胞定位可分为: 质膜Ca<sup>2+</sup>-ATP酶(plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase, PMCA)、SR/ER Ca<sup>2+</sup>-ATP酶(sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, SERCA)和高尔基体分泌途径衍生Ca<sup>2+</sup>-ATP酶(secretory-pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase, SPCA)。

2.4.1 SERCA 据报道, ROS通过修饰Cys残基调节SERCA活性, 不同的SERCA同种型含有22~28个Cys残基, 这些残基的氧化还原状态对于SERCA功能至关重要<sup>[22]</sup>。低水平的ROS可逆地增加SERCA活性, 而高水平的ROS通过不可逆的氧化修饰导致通道失活<sup>[48]</sup>。SERCA依赖于ATP水解发挥其正常功能, 有研究指出, ROS可以阻止ATP与SERCA结合, 从而使ATP水解与Ca<sup>2+</sup>泵送解偶联<sup>[49]</sup>。Cys669和Cys674似乎在SERCA活性的氧化还原调控中起重要作用: 血管内皮生长因子诱导NOX2和NOX4可逆性S-谷胱甘肽化Cys674增加SERCA活性。相反, 该残基的不可逆氧化磺化与SERCA活性降低相关<sup>[50]</sup>。

2.4.2 PMCA PMCA的运转速度虽较SERCA慢得多, 其也受到氧化还原状态的调节。ROS可通过直接氧化或氧化其配体CaM的甲硫氨酸抑制PMCA活性。PMCA失活使得较少的Ca<sup>2+</sup>从胞质泵出, 导致胞质Ca<sup>2+</sup>浓度增加。计算机分析表明, 残基Tyr589、Met622和Met831负责ROS介导的PMCA失活<sup>[51]</sup>。此外, ROS可以间接调节PMCA活性, 胞质中CaM与PMCA结合后诱导自身抑制结构域从酶活性位点解离, 激活PMCA导致Ca<sup>2+</sup>转运率增加数倍, 而ROS通过氧化CaM的Met144、Met145从而间接抑制PMCA活性, 导致胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加<sup>[52]</sup>。

### 3 内质网应激、钙和ROS

ER的蛋白氧化折叠机制也参与ROS生成。ER为蛋白质提供了独特的氧化-折叠环境以促进二硫键形成,该过程生成约25%的ROS。蛋白质二硫键异构酶(protein disulfate isomerase, PDI)和内质网氧化还原蛋白-1(endoplasmic reticulum oxidoreductin-1, ERO1 $\alpha$ )之间的电子转移过程生成ROS。还原型PDI直接接受电子,氧化Cys残基并形成二硫键,随后ERO1 $\alpha$ 依赖于黄素腺嘌呤二核苷酸将电子从PDI转移到分子氧,氧化PDI并生成ROS作为副产物<sup>[53]</sup>。

当ER受到未折叠/错误折叠/突变蛋白积累、细胞氧化还原调节紊乱和内源性ROS产生、钙调节异常、病毒感染等应激信号时,ER功能失调,触发了“内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)”,随后激活未折叠蛋白反应(unfolded-protein response, UPR)的保护性反应。ERS早期阶段, Ca<sup>2+</sup>经线粒体相关内质网膜(mitochondria-associated ER membranes, MAM)蛋白质组从ER向线粒体转移,维持线粒体代谢活性并产生ATP、ROS,后者循环回ER,导致Ca<sup>2+</sup>被进一步释放。此外,通过反馈机制, Ca<sup>2+</sup>本身进一步增强钙通道(RyR、IP<sub>3</sub>R)的敏感性,增加Ca<sup>2+</sup>释放。PDI还可以与NOX结合,增加ER中ROS水平,NOX衍生的ROS调节SERCA活性,增加、维持ER内Ca<sup>2+</sup>水平。然而,在长期严重的ERS下,随着氧消耗量的增加,UPR从保护作用变成细胞毒性作用,一氧化氮合酶被Ca<sup>2+</sup>激活,抑制呼吸链复合物IV的活性,同时,NO和线粒体内高Ca<sup>2+</sup>抑制复合物I打开mPTP释放细胞色素c,阻断复合物III,两者均增加ROS的产生。ROS持续诱导Ca<sup>2+</sup>进入线粒体,高水平Ca<sup>2+</sup>刺激呼吸链活动,生成大量ROS。线粒体ROS反过来影响ER钙通道和NOX,高浓度ROS抑制RyR活性,增加ER内Ca<sup>2+</sup>和ROS负荷,导致恶性循环。线粒体内Ca<sup>2+</sup>超载、ATP消耗和ROS累积,改变线粒体膜电位并打开mPTP,释放促凋亡蛋白,导致细胞凋亡<sup>[9,53-54]</sup>。

### 4 结论

ROS和Ca<sup>2+</sup>信号传导之间的相互作用被认为是双向的,ROS可以调节细胞Ca<sup>2+</sup>信号传导,而Ca<sup>2+</sup>信号传导对于ROS的产生是必需的。ROS和Ca<sup>2+</sup>之间的相互作用不仅影响生理学特性,还影响病理过程,在应激条件下充当细胞存活和细胞死亡之间的关键

因子。充分理解调节ROS和Ca<sup>2+</sup>稳态的不同机制,可以提供Ca<sup>2+</sup>/ROS平衡功能障碍导致的各种疾病的新治疗策略。

### 参考文献 (References)

- Cui C, Merritt R, Fu L, Pan Z. Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2017; 7(1): 3-17.
- Bogeski I, Kilch T, Niemeyer BA. ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J Physiol* 2012; 590(17): 4193-200.
- Ambudkar IS, Muallem S. ROS and Ca<sup>2+</sup>: Partners in sickness and in health. *Cell Calcium* 2016; 60(2): 51-4.
- O-Uchi J, Ryu SY, Jhun BS, Hurst S, Sheu SS. Mitochondrial ion channels/transporters as sensors and regulators of cellular redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(6): 987-1006.
- Jung HJ, Im SS, Song DK, Bae JH. Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. *BMB Rep* 2017; 50(6): 323-8.
- Bogeski I, Kappl R, Kummerow C, Gulaboski R, Hoth M, Niemeyer BA. Redox regulation of calcium ion channels: Chemical and physiological aspects. *Cell Calcium* 2011; 50(5): 407-23.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 4350965.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(4): C817-33.
- Adam-Vizi V, Starkov AA. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis* 2010; 20 Suppl 2: S413-26.
- Nishida M, Ishikawa T, Saiki S, Sunggip C, Aritomi S, Harada E, *et al.* Voltage-dependent N-type Ca<sup>2+</sup> channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434(2): 210-6.
- Perveen S, Yang JS, Ha TJ, Yoon SH. Cyanidin-3-glucoside inhibits ATP-induced intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration, ROS formation and mitochondrial depolarization in PC12 cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18(4): 297-305.
- Miller BA, Cheung JY. TRPM2 protects against tissue damage following oxidative stress and ischaemia-reperfusion. *J Physiol* 2016; 594(15): 4181-91.
- Bao L, Chen SJ, Conrad K, Keefer K, Abraham T, Lee JP, *et al.* Depletion of the human ion channel TRPM2 in neuroblastoma demonstrates its key role in cell survival through modulation of mitochondrial reactive oxygen species and bioenergetics. *J Biol Chem* 2016; 291(47): 24449-64.
- Kiselyov K, Muallem S. ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium* 2016; 60(2): 108-14.
- Ward JPT. From physiological redox signalling to oxidant stress. *Adv Exp Med Biol* 2017; 967: 335-42.
- Dikalov SI, Li W, Doughan AK, Blanco RR, Zafari AM. Mitochondrial reactive oxygen species and calcium uptake regulate activation of phagocytic NADPH oxidase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302(10): R1134-42.

- 17 Hansen SS, Aasum E, Hafstad AD. The role of NADPH oxidases in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(5 Pt B): 1908-13.
- 18 Streeter J, Schickling BM, Jiang S, Stanic B, Thiel WH, Gakhar L, *et al.* Phosphorylation of Nox1 regulates association with NoxA1 activation domain. *Circ Res* 2014; 115 (11): 911-8.
- 19 Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, *et al.* Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 2004; 279(18): 18583-91.
- 20 Pandey D, Gratton JP, Rafikov R, Black SM, Fulton DJ. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Mol Pharmacol* 2011; 80(3): 407-15.
- 21 Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Curr Biol* 2013; 23(5): 424-9.
- 22 Song MY, Makino A, Yuan JX. Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(6): 1549-65.
- 23 Ma Y, Kong L, Qi S, Wang D. Atorvastatin blocks increased L-type Ca<sup>2+</sup> current and cell injury elicited by angiotensin II via inhibiting oxide stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016; 48(4): 378-84.
- 24 Groschner K, Rosker C, Lukas M. Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Found Symp* 2004; 258: 222-30.
- 25 Zeng Q, Zhou Q, Yao F, O'Rourke ST, Sun C. Endothelin-1 regulates cardiac L-type calcium channels via NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326(3): 732-8.
- 26 Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol* 2015; 6: 260-71.
- 27 Huang D, Huang S, Gao H, Liu Y, Qi J, Chen P, *et al.* Redox-dependent modulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in sensory neurons contributes to acute anti-nociceptive effect of substance P. *Antioxid Redox Signal* 2016; 25(5): 233-51.
- 28 Kim YS, Hong CS, Lee SW, Nam JH, Kim BJ. Effects of ginger and its pungent constituents on transient receptor potential channels. *Int J Mol Med* 2016; 38(6): 1905-14.
- 29 Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, *et al.* Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. *J Physiol* 2009; 587(Pt 5): 965-79.
- 30 Ru X, Yao X. TRPM2: a multifunctional ion channel for oxidative stress sensing. *Sheng Li Xue Bao* 2014; 66(1): 7-15.
- 31 Demirdaş A, Nazıroğlu M, Övey İS. Duloxetine reduces oxidative stress, apoptosis, and Ca<sup>2+</sup> entry through modulation of TRPM2 and TRPV1 channels in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(6): 4683-95.
- 32 Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* 2011; 50(3): 279-87.
- 33 Nesuashvili L, Hadley SH, Bahia PK, Taylor-Clark TE. Sensory nerve terminal mitochondrial dysfunction activates airway sensory nerves via transient receptor potential (TRP) channels. *Mol Pharmacol* 2013; 83(5): 1007-19.
- 34 Stanford KR, Taylor-Clark TE. Mitochondrial modulation-induced activation of vagal sensory neuronal subsets by antimycin A, but not CCCP or rotenone, correlates with mitochondrial superoxide production. *PLoS One* 2018; 13(5): e0197106.
- 35 Kahya MC, Nazıroğlu M, Övey İS. Modulation of diabetes-induced oxidative stress, apoptosis, and Ca<sup>2+</sup> entry through TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion and hippocampus of diabetic rats by melatonin and selenium. *Mol Neurobiol* 2017; 54(3): 2345-60.
- 36 Fracchia KM, Pai CY, Walsh CM. Modulation of T cell metabolism and function through calcium signaling. *Front Immunol* 2013; 4: 324.
- 37 Bhardwaj R, Hediger MA, Demaurex N. Redox modulation of STIM-ORAI signaling. *Cell Calcium* 2016; 60(2): 142-52.
- 38 Chen TX, Xu XY, Zhao Z, Zhao FY, Gao YM, Yan XH, *et al.* Hydrogen peroxide is a critical regulator of the hypoxia-induced alterations of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry into rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 312(4): L477-87.
- 39 Grupe M, Myers G, Penner R, Fleig A. Activation of store-operated I(CRAC) by hydrogen peroxide. *Cell Calcium* 2010; 48(1): 1-9.
- 40 Wang YX, Zheng YM. Role of ROS signaling in differential hypoxic Ca<sup>2+</sup> and contractile responses in pulmonary and systemic vascular smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 174(3): 192-200.
- 41 Eisner V, Csordás G, Hajnóczky G. Interactions between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle: pivotal roles in Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species signaling. *J Cell Sci* 2013 Jul 15; 126(Pt 14): 2965-78.
- 42 Vervoessem T, Yule DI, Bultynck G, Parys JB. The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca<sup>2+</sup>-release channel. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853 (9): 1992-2005.
- 43 Missiaen L, Taylor CW, Berridge MJ. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* 1991; 352 (6332): 241-4.
- 44 Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275 (21): 15749-57.
- 45 Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, Gao Z, *et al.* CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature* 2012; 491(7423): 269-73.
- 46 Madesh M, Hajnoczky G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* 2001; 155 (6): 1003-15.
- 47 Voronina S, Okeke E, Parker T, Tepikin A. How to win ATP and influence Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium* 2014; 55 (3): 131-8.
- 48 Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, Brewer AC, Shah AM. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(7): 777-93.
- 49 Cook NL, Viola HM, Sharov VS, Hool LC, Schöneich C, Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and perturb Ca<sup>2+</sup> homeostasis in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(5): 951-61.
- 50 Evangelista AM, Thompson MD, Bolotina VM, Tong X, Cohen RA. Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and

- endothelial cell migration. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(12): 2327-34.
- 51 Lushington GH, Zaidi A, Michaelis ML. Theoretically predicted structures of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and their susceptibilities to oxidation. *J Mol Graph Model* 2005; 24(3): 175-85.
- 52 Anbanandam A, Bieber Urbauer RJ, Bartlett RK, Smallwood HS, Squier TC, Urbauer JL. Mediating molecular recognition by methionine oxidation: conformational switching by oxidation of methionine in the carboxyl-terminal domain of calmodulin. *Biochemistry* 2005; 44(27): 9486-96.
- 53 Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Helencourt C, Ravanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 213.
- 54 Zeeshan HM, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3): 327.

中国细胞生物学学报