



Title	活性酸素による肝細胞傷害における細胞内Ca <sup>2+</sup> の動態とその役割
Author(s)	村田, 賢
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3075294">https://doi.org/10.11501/3075294</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

①

主論文

活性酸素による肝細胞傷害における細胞内Ca<sup>2+</sup>の動態とその役割

Role of Intracellular Calcium in Superoxide-Induced Hepatocyte Injury

外科系外科学第二講座

Dept. of Surgery II, Osaka Univ. Med. School

村田 賢

Masaru Murata

(主任：森 武貞教授)

## 英文抄録

The mechanisms of hepatocyte injury caused by exogenous superoxide were investigated using cultured rat hepatocytes. Cell viability, cytosolic free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), and cell surface structure were observed. Superoxide was produced by adding hypoxanthine and xanthine oxidase to the buffer.  $[Ca^{2+}]_i$  was calculated by ratio imaging of fura-2 fluorescence using multiparameter digitized microscopy. In the buffer containing 1.27 mM of calcium, lactate dehydrogenase release into the buffer began to increase at 1 hour and reached a plateau at 5 hours. Eighteen minutes after the addition of hypoxanthine and xanthine oxidase, small blebs were recognized on the cell surface with a scanning electron microscope, after which a gradual rise in  $[Ca^{2+}]_i$  was observed. Thirty minutes after exposure to superoxide, large blebs were recognized with a phase contrast microscope, when  $[Ca^{2+}]_i$  had risen to about 700 nM. Depriving the buffer of calcium ( $< 10 \mu\text{M}$ ) significantly suppressed bleb formation and cell death, and  $[Ca^{2+}]_i$  was found to remain around the basal level (200 nM). When ethylene glycol-bis (B-aminoethyl ether) - N,N,N',N'-tetraacetic acid was added to the buffer, bleb formation and cell death were more effectively suppressed, and  $[Ca^{2+}]_i$  decreased. Superoxide dismutase combined with catalase or nifedipine allowed the hepatocytes to maintain their viability and suppressed  $[Ca^{2+}]_i$  elevation. Calpeptin, a  $Ca^{2+}$ -dependent neutral protease inhibitor, did not affect the rise in  $Ca^{2+}$ , but did prevent cell injury. We concluded that cell injury caused by superoxide is initiated by influx of calcium and that the resultant activation of  $Ca^{2+}$ -dependent protease may play an important role in bleb formation and cell death.

Key Words: Hepatocyte, Superoxide, Cytosolic free calcium, Bleb formation, Cell viability.

## 抄録

ラット培養肝細胞を用いて、活性酸素 (SO) による肝細胞傷害のメカニズムについて検討した。特に、細胞のviability、及び細胞膜の形態変化を細胞質内自由Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) との関連において観察した。SOはbufferにhypoxanthine (HX) とxanthine oxidase (XO) をそれぞれ最終濃度が250μM、75mU/mlとなる様に添加することによって発生させた。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はmultiparameter digitized microscopyを使用し、fura-2の蛍光画像の比より計算した。1.27mMのCa<sup>2+</sup>を含むbuffer中でHXとXOを添加するとlactate dehydrogenase (LDH) は添加1時間後よりbuffer中に放出されはじめ、5時間後にはプラトーに達した。HXとXOの添加18分後には電顕にてsmall blebが観察されるようになったが、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>はほぼ同時間より上昇し始めた。そしてSO発生30分後には[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は約700nMまで上昇し、光顕でも観察できる large blebが出現した。Buffer中にCa<sup>2+</sup>を添加しなければ、Ca<sup>2+</sup>はSO発生前の約200nMにとどまり、blebの形成と細胞死は有意に抑制された。Buffer中にEGTAを添加すると[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は低下し、blebの形成と細胞死はさらに抑制された。Superoxide dismutaseとcatalase、あるいはnifedipineをbufferに添加すると[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇と細胞傷害とは抑制された。また、calpeptin (Ca<sup>2+</sup>依存性中性 protease inhibitor) をbufferに添加すると[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は抑制されなかったが、細胞傷害は抑制された。以上より、SOによる細胞傷害は細胞外より細胞内にCa<sup>2+</sup>が流入することによって始まり、その結果としてCa<sup>2+</sup>依存性のproteaseが活性化されblebの形成と細胞死が進行することが示唆された。

## 緒言

$\text{Ca}^{2+}$ は虚血・再灌流傷害において重要な役割を果たしていると考えられている<sup>1)</sup>。細胞毒による肝細胞傷害についても、 $\text{Ca}^{2+}$ の役割が種々のモデルで研究されてきた<sup>2) - 7)</sup>。細胞外に $\text{Ca}^{2+}$ を添加した場合に細胞傷害が増強するという観察から "Ca<sup>2+</sup> dependence of toxic cell death" という概念が提唱された<sup>2)</sup>。即ち、細胞膜が傷害を受けると、電気化学的な急な $\text{Ca}^{2+}$ 勾配にそって $\text{Ca}^{2+}$ が細胞内に流入し、これによって傷害が進行すると考えられた。しかし、逆に細胞外の $\text{Ca}^{2+}$ の存在が保護的に働くという報告<sup>3)</sup>もあり、肝細胞傷害における $\text{Ca}^{2+}$ の役割については議論されているところである。細胞傷害時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変動については、glycogen phospholylase 活性、phospholipase A<sub>2</sub>活性、non-lysosomal proteinase 活性、などをモニターすることによる間接的な測定<sup>8) - 10)</sup>が試みられてきた。近年、蛍光プローブであるfura-2を利用することにより直接的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定が可能となり、種々の肝細胞傷害モデルにおいても報告がみられるようになった。Lemastersらはcyanideとiodoacetateを用いたchemical hypoxiaのモデルにおいて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定し、細胞表面にblebが形成される時あるいは細胞傷害が進行する時に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は変化しないことを示した<sup>5)</sup>。しかし、相反する結果が他の施設から報告されている<sup>11) - 14)</sup>。今回の研究は、superoxideによる肝細胞傷害における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の役割を明らかにすることを目的として行なった。

## 材料と方法

### 材料

Hypoxanthine (HX)、xanthine oxidase (XO)、horse heart cytochrome C、superoxide dismutase、catalase はSigma chemical company (St. Luis, MO, USA) より購入した。Williams' E medium はICN Biomedicals (Costa Mesa, CA, USA) より購入した。Collagenase は和光純薬より、購入した。Fura-2とfura-2-AMは同仁化学より購入した。Nifedipine はバイエル薬品より供与された。Calpeptinは大阪大学第二外科の上林純一博士より供与を受けた。

### ラット肝細胞の分離と培養

肝細胞は体重180g-220gのWistar系雄性ラットよりSeglenの方法に準じたcollagenase 灌流法にて分離した<sup>15)、16)</sup>。分離した肝細胞は5% fetal calf serum、10nM dexamethasone、100nM insulinを含むWilliams' E medium 中に $5 \times 10^5$  cells/mlとなるように調整し、collagen coat したcover glass 上で95% air 5% CO<sub>2</sub>の条件で24時間培養した。

## 細胞内Ca<sup>2+</sup>の測定

培養肝細胞を 5 μM の fura-2-AM を含む Eagle's minimum essential medium 中で 1 時間、37 ° C で培養し、fura-2 を負荷した。培養肝細胞を Krebs-Henseleit-HEPES buffer (Ca<sup>2+</sup>: 1.27mM) で 3 回洗浄し、顕微鏡の stage にのせた。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は multiparameter digitized microscopy (Argus 100、浜松フォトニクス) で測定した。このシステムでは、励起光による肝細胞の photobleaching と photodamage を最少にするため、computer 制御によるシャッターを使用した。また neutral density filter も使用した。Fura-2 を負荷した肝細胞に 340nM (Ca<sup>2+</sup>感受性) と 380nM (Ca<sup>2+</sup>非感受性) の励起光を照射し、その蛍光像よりそれぞれ background を差し引いたものを pixel ごとに演算して蛍光強度の比を求めた。標準曲線は、EGTA と fura-2 を含む HEPES buffer を用いて求めた<sup>17)</sup>。

## 実験系

肝細胞に fura-2 を負荷した後、HX と XO を添加し、その後 3 分毎に、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を測定し、同時に光顕にて形態の変化を観察した。さらに 2 % glutaraldehyde と 2 % osmium で固定し、走査電顕 (日立製作所) で細胞表面の変化を観察した。HX と XO を添加した後の肝細胞の viability は、buffer 中に放出される LDH 活性で評価した。LDH 活性は Unikrit (中外製薬) を用いて酵素的に測定した。LDH の最大放出量は、肝細胞を 3 回凍結融解した後に遊離された量と定義した。各実験での LDH 活性は、最大放出量に対するパーセントで示した。HX と XO を混合した時に発生する superoxide の定量は、cytochrome C 法で測定した<sup>18)</sup>。すなわち、cytochrome C の存在下で HX と XO を混合した時の 550nM の吸光度の変化を 1 分間測定し、その勾配より求めた。

細胞外 Ca<sup>2+</sup> の影響を調べるために、Ca<sup>2+</sup> を添加しない Krebs-Henseleit-HEPES buffer、あるいは、Ca<sup>2+</sup> を添加せず 0.5mM の EGTA を添加した buffer を使用して同様の実験を行った。さらに、superoxide dismutase と catalase (各 10-1000U/ml)、nifedipine (1 μM)、calpeptin (細胞膜透過性 Ca<sup>2+</sup> 依存性 protease inhibitor, 10-100 μM) の効果を調べた。いずれも、superoxide の発生直前に buffer に加えた。

## 統計学的処理

各群間の有意差検定には分散分析法 (ANOVA, analysis of variance) を用いた。いずれも有意水準を危険率 5 % とした。本文中の数値および図中の表示は、平均 ± 標準偏差であらわした。

## 結果

## Superoxide発生量

250  $\mu\text{M}$ のHXと、25、50、75 mU/mlのXOを混合すると、それぞれ3.97、7.96、12.5  $\mu\text{M}/\text{minute}$ のsuperoxideが発生した (Fig.1.)。以下の実験では75 mU/mlのXOを使用した。

## 肝細胞のviability、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、形態変化

HXとXOを添加した時、buffer中に放出されるLDH活性は、添加後0.5、1.0、3.0、5.0時間でそれぞれ0、39、75、95%であった (Fig.2.)。  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の初期値は約200nMで、HXとXOの添加18分後より上昇しはじめ30分後には約700nMに達した (Fig.3.)。走査電顕にて18分後にはsmall blebが観察され、21分後にはlarge blebが光顕上観察された (Fig. 4.)。30分後には、その大きさも数も増大した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と細胞膜に形成されたblebの間には相関が認められた。Superoxide発生21分後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が観察された肝細胞のほとんどに光顕上blebが認められた。

## $\text{Ca}^{2+}$ 非添加の効果

$\text{Ca}^{2+}$ を添加しないbufferを用いると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はHXとXOの添加30分後まで上昇しなかった。さらにbufferにEGTAを添加すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は徐々に低下した (Fig.3.)。Buffer中の $\text{Ca}^{2+}$ を1.27mMとするとHXとXOの添加30分後に57%の肝細胞表面にlarge blebが観察されたのに対し、 $\text{Ca}^{2+}$ を添加しないbuffer中では、26%の細胞の表面にのみlarge blebが観察された。さらにbufferにEGTAを添加すると、large blebの観察される肝細胞は10%にまで減少した (Fig. 5.)。細胞外の $\text{Ca}^{2+}$ の有無に関わらず、LDHはHXとXOの添加30分後まで放出されなかった。superoxideの発生は $\text{Ca}^{2+}$ を添加しない場合でも (11.6  $\mu\text{M}/\text{min}$ )、 $\text{Ca}^{2+}$ を添加せずEGTAを添加した場合でも (11.6  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) 影響されなかった。

## SODとcatalaseの効果

SODとcatalaseは用量依存性にLDHの放出を有意に抑制し (対照: 61%、10 U/ml: 62%、100 U/ml: 31%、1000 U/ml: 0%)、1000 U/mlでは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇も抑制された (Fig. 6.)。Superoxideの発生は1000 U/mlの存在下で完全に抑制された (1.7  $\mu\text{M}/\text{min}$ )。

## Nifedipineの効果

HXとXOの添加3時間後にbuffer中に放出されるLDHは、1  $\mu\text{M}$ のnifedipineの存在下で部分的に抑制され (対照: 67%、nifedipine: 39%)、また $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇も抑制さ

れた (Fig. 7.)。Superoxideの発生はnifedipineの存在により影響を受けなかった (11.9  $\mu\text{M}/\text{min}$ )。

#### Ca<sup>2+</sup>依存性protease inhibitor の効果

30  $\mu\text{M}$ のcalpeptinの存在下でHXとXOをbufferに添加すると、LDHの放出は有意に抑制された。しかし100  $\mu\text{M}$ のcalpeptinの存在下ではLDHはさらに上昇した (対照: 53%、10  $\mu\text{M}$ : 51%、30  $\mu\text{M}$ : 32%、100  $\mu\text{M}$ : 75%)。Blebの形成も30  $\mu\text{M}$ のcalpeptinの存在下では抑制された。しかし[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は抑制されなかった (Fig. 8.)。Calpeptinの存在によってもsuperoxideの発生は抑制されなかった (11.1  $\mu\text{M}/\text{min}$ )。

#### 考案

以前より種々の臓器の虚血・再灌流傷害においてCa<sup>2+</sup>が非常に重要な因子であることが報告されている<sup>1)</sup>が、最近、培養細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が測定可能となり、その病態をさらに詳細に検討することができるようになった。培養肝細胞に対して肝毒性を有する薬剤を添加すると、傷害を受けた細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は上昇し、これがphospholipaseやCa<sup>2+</sup>依存性のproteaseを活性化し、傷害が進行することが示されている<sup>1, 9) - 2, 1)</sup>。虚血・再灌流傷害においても同様なメカニズムが考えられているが、Lemastersら<sup>5)</sup>はKCNとiodoacetateを用いたchemical hypoxiaの実験系で、肝細胞傷害の進行が[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇なしに起きることを示し、虚血・再灌流傷害におけるCa<sup>2+</sup>の役割に疑問がもたれている。一方、McCord<sup>2, 2)</sup>は虚血・再灌流傷害の原因としてsuperoxideの関与を提唱した。すなわち、一定時間の虚血後組織を再灌流すると、虚血中にadenine nucleotidesの分解産物として産生されたhypoxanthine(HX)からxanthine oxidase(XO)によってsuperoxideが生じ、これが血管内皮細胞などの細胞を傷害するという機序である。そこで、本研究では培養肝細胞にHXとXOとを添加し、superoxideを発生せしめ、虚血・再灌流傷害のモデルとし、その時の肝細胞傷害の進展と[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の関係を検討した。

培養肝細胞にsuperoxideを添加すると、1時間後よりbuffer中にLDHが漏出しはじめ、細胞死が見られるようになり、5時間でほとんどの細胞がviabilityを失った。この系で、細胞死が始まる以前、すなわちsuperoxide発生後30分までの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化と細胞膜の変化を観察すると、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は18分頃より上昇を開始し、以後比較的急峻に上昇し、30分では700-800nMとなった。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇し始めると同時に細胞表面にsmall blebが走査電顕で検出されるようになり、その後光顕でも観察可能なlarge blebが出現した。しかし、superoxide発生後30分以内では細胞膜が破綻する細胞はなかった。このように、本実験モデルでは細胞膜表面の変化と[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が相関していることが明らかとなった。ここでは、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇してくるまでに18分間の時間差がある。現在までに肝細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化を測定した報告では、phenylephrine、vasopressin、hepatocyte growth factorなどを添加した場合、数分以内の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇が示されている<sup>2, 3), 2, 4)</sup>。

これらはレセプターを介したホルモンの生理的な作用で、反応が急速に起こることも理解できる。また *tert*-butyl hydroperoxide による肝細胞傷害モデルでも  $[Ca^{2+}]_i$  は数分以内に一過性に上昇し、その後徐々に上昇し細胞死に至っている。同様な radical による細胞傷害で、これらの差が生じた原因は明らかでないが、radical の反応性の違いと用いた肝細胞の培養時間の差が考えられる。初代培養肝細胞は24時間以上培養すると phenylephrine や vasopressin による  $[Ca^{2+}]_i$  の反応が低下することが知られている<sup>23)</sup>。我々のモデルでは肝細胞は24時間培養したものをを用いたが、*tert*-butyl hydroperoxide による細胞傷害のモデルでは16時間培養したものが用いられた。

上昇した  $[Ca^{2+}]_i$  の起源を調べるために細胞外  $Ca^{2+}$  環境を変更した。Buffer に  $Ca^{2+}$  を添加しない ( $Ca^{2+} < 10 \mu M$ ) と、 $[Ca^{2+}]_i$  は上昇せず、EGTA を添加すると  $[Ca^{2+}]_i$  は徐々に低下した。本実験モデルにおける  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は細胞内 organella からの  $Ca^{2+}$  の放出も否定することはできないが、以上の実験結果よりは、他の報告同様<sup>2), 14), 19), 25)</sup>、細胞外より細胞内への  $Ca^{2+}$  の流入によって上昇する可能性が高い。したがって、superoxide が生じると細胞膜に何らかの傷害を起こし、そこで細胞外より  $Ca^{2+}$  が徐々に流入する結果となる。そして、膜表面には small bleb ができる。このときの  $Ca^{2+}$  流入のメカニズムとしては、 $Ca^{2+}$  channel あるいはその他のメカニズムが考えられるが詳細は不明である。明らかなことは細胞膜が破壊されたものではないといえるであろう。

次に、L型  $Ca^{2+}$  channel blocker として知られている nifedipine を用いたところ、 $1 \mu M$  の nifedipine は  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇と LDH の放出を部分的に抑制した。この現象は  $Ca^{2+}$  channel の存在を示唆する結果かもしれないが、現在まで、肝細胞では voltage sensitive な  $Ca^{2+}$  channel の存在が証明されておらず<sup>26)</sup>、この効果は  $Ca^{2+}$  channel を介さない他のメカニズム、例えば antioxidant としての作用、また phospholipase  $A_2$  の阻害作用などが関与している可能性も考えらる<sup>27)</sup>。

では、 $[Ca^{2+}]_i$  が上昇した場合、その細胞内で何が起きるか。Nicotera らは non-lysosomal proteases が細胞傷害の進行に重要な役割を果たしていることを報告した<sup>20)</sup>。 $Ca^{2+}$  dependent protease の calpain は最適 pH が中性で、 $Ca^{2+}$  によって制御される non-lysosomal な cysteine protease として知られおり、種々の細胞で proteolytic な過程において重要な役割を果たすと報告されている<sup>28), 29)</sup>。血小板では calmodulin binding protein や phospholipase  $A_2$  が calpain によって崩壊すると報告されている<sup>30), 31)</sup>。さらに actin binding protein などの細胞骨格も  $Ca^{2+}$  dependent protease の標的になるとされている<sup>32), 33)</sup>。今回の研究で細胞膜透過性の calpain inhibitor である calpeptin の効果について調べた。 $30 \mu M$  の calpeptin は bleb の形成と LDH の放出を有意に抑制したが、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は抑制しなかった。これらの結果と過去の報告<sup>20), 21)</sup>より、上昇した  $[Ca^{2+}]_i$  が calpain を活性化し、細胞骨格を破壊し、細胞死に至るものと考えられた。高濃度の calpeptin は血小板におけるアラキドン酸代謝など種々の細胞機能に影響を及ぼすと報告されている<sup>28)</sup>。今回の実験においても  $100 \mu M$  の calpeptin は superoxide による細胞傷害を増強した。

## 結論

Superoxideによる肝細胞傷害時には細胞外より細胞内にCa<sup>2+</sup>が流入することによって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇し、その結果Ca<sup>2+</sup> dependent non-lysosomal proteaseが活性化され、細胞骨格の構造と機能が傷害されることが示唆された。

## 謝辞

稿を終わるにあたり本研究の課題を与えていただき、御懇切なる御指導、御校閲を賜りました森武貞教授、並びに、研究遂行に際し直接の御指導、御教示を頂きました門田守人助教授、梅下浩司博士に心から深謝致しますとともに、教室員各位に感謝します。

## 文献

1. Trump BE, Berezesky IK, Cowley RA. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Cowley RA, Trump BF eds. Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia. Baltimore: Williams & Wilkins, 1982:6-46.
2. Schanne AXF, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of cell death: A final common pathway. Science 206:700-702,1979.
3. Smith MT, Thor H, Orrenius S. Toxic injury to isolated hepatocytes is not dependent on extracellular calcium. Science 213:1257-1259,1981.
4. Farris MW, Pascoe GA, Reed DJ. Vitamin E reversal of effect of extracellular calcium on chemically induced toxicity in hepatocytes. Science 227:751-754,1985.
5. Lemasters JJ, DiGuiseppi J, Nieminen A-L, Herman B. Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. Nature 325:78-81,1987.
6. Nieminen A-L, Gores GJ, Wray BE, Tanaka Y, Lemasters JJ. Calcium dependence of bleb formation and cell death in hepatocytes. Cell Calcium 9:237-246,1988.
7. Dolak JA, Waller RL, Glende EA, Recknagel RO. Liver cell calcium homeostasis in carbon tetrachloride liver cell injury: New data with fura 2. J Biochem Toxicol 3:329-342,1988.
8. Andrabi K, Kaul N, Ganguly NK. Altered calcium homeostasis in carbon tetrachloride exposed rat hepatocytes. Biocem Int 18:1287-1295,1989.

9. Starke PE, Hoek JB, Farber JL. Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured hepatocytes. *J Bio Chem* 261:3006-3012,1986.
10. Glende EA, Recknagel RO. An indirect method demonstrating that  $\text{CCl}_4$ -dependent hepatocyte injury is linked to a rise in intracellular calcium ion concentration. *Res. Commun. Chem. Pathol.Parm.* 73:41-52,1991.
11. Nicotera P, McConkey D, Svensson S-A, Bellomo G, Orrenius S. Correlation between cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology* 52:55-63,1988.
12. Kawanishi T, Nieminen A-L, Herman B, Lemasters JJ. Suppression of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in cultured rat hepatocytes by chemical hypoxia. *J Biol Chem* 266:20062-20069,1991.
13. Nieminen A-L, Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 265:2399-2408,1990.
14. Sakaida I, Thomas A.P, Farber JL. Increases in cytosolic calcium ion concentration can be dissociated from the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *J Biol Chem* 266:717-722,1991.
15. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. In: *Methods in Cell Biology*. New York, Academic Press, 1976;13:29-83.
16. Umeshita K, Monden M, Fujimori T, Sakai H, Gotoh M, Okamura J, Mori T. Extracellular calcium protects cultured rat hepatocytes from injury caused by hypothermic preservation. *Cryobiology* 25:102-109,1988.
17. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
18. O'Brien PJ. Superoxide production. In: *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1984;370-378.
19. Sakaida I., Ythomas A.P., Farber J.L. Phospholipid metabolism and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cultured rat hepatocytes intoxicated with cyanide. *Am. J. Physiol.* 263:C684-C690,1992.
20. Nicotera P, Hartzell P, Baldi C, Svensson SA, Bellomo G, Orrenius S. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and the stimulation of non-lysosomal proteolytic system. *J Biol Chem* 261:14628-14635,1986.
21. Bronk S.F., Bores G.J., PH-dependent non-lysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes. *Am.J.Physiol.* 264:G744-G751,1993.
22. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 312:159-163,1985.
23. Rooney TA, Sass EJ, Thomas AP. Characterization of cytosolic calcium

oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J Biol Chem* 264:17131-17141,1989.

24. Kaneko A, Hayashi N, Tsubouchi H, Tanaka Y, Ito T, Sasaki Y, Fusamoto H, et al. Intracellular calcium as a second messenger for human hepatocytes growth factor in hepatocytes. *Hepatology* 15:1173-1178,1992.

25. Gasbarrini A., Borle A.B., Farghali H., Bender C., Francavilla A., Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 267:6654-6663,1992.

26. Mauger J-P, Claret M. Calcium channel in hepatocytes. *J. Hep.* 7: 278-282,1988;

27. Gasbarrini A., Borle A.B., Van Thiel D.H.  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist do not protect isolated perfused rat hepatocytes from anoxic injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1177: 1-727,1993.

28. Ariyoshi H, Shiba E, Kambayashi J. Characteristics of various synthetic peptide calpain inhibitors and their application for the analysis of platelet reaction. *Biochem Int* 23:1019-1033,1991.

29. Tsujinaka T, Kajiwara Y, Kambayashi J, Sakon M, Higuchi N, Tanaka T, Mori T. Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor ( calpeptin ). *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1201-1208,1988.

30. Kosaki G, Tsujinaka T, Kambayashi J, Morimoto K, Yamagami K, Sobue K, Kakiuchi S. Specific cleavage of calmodulin-binding proteins by low  $\text{Ca}^{2+}$ -requiring form of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated neutral protease in human platelets. *Biochem Int* 6:767-775,1983.

31. Low MG, Carroll RC, Weglicki WB. Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C of different relative molecular masses in animal tissue. *Biochem J* 221:813-822,1984.

32. Mellgren RL. Calcium-dependent neutral protease: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEBJ* 1:110-115,1987.

33. Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Bellomo G, Thor S, Orrenius S. Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are modulated by oxidative and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 270:478-488,1989.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Production of superoxide as a function of XO concentration. The rate of superoxide generation was assessed by the cytochrome C method described in Materials and Methods. Superoxide produced after addition of HX (fixed at 250  $\mu$ M) and XO at 25, 50, and 75 mU/ml were 3.98, 7.96, and 12.5  $\mu$ M/min, respectively.

Fig. 2. Time course of hepatocyte death after addition of HX and XO. The initial rise in LDH was observed at 1 hour, with the release reaching 95% of the total amount at 5 hours.

Fig. 3 Extracellular calcium environment and changes in  $[Ca^{2+}]_i$  following superoxide generation. In the buffer with calcium, a significant rise in  $[Ca^{2+}]_i$  from the basal level (about 200 nM) was first observed at 18 min, and  $[Ca^{2+}]_i$  reached about 700 nM in 30 min. In the buffer without added calcium,  $[Ca^{2+}]_i$  was sustained around the basal level. Furthermore, in the buffer without additional calcium and with EGTA,  $[Ca^{2+}]_i$  decreased.

Fig. 4. Phase contrast microscopic observation of the hepatocytes. (A) Hepatocytes just prior to superoxide generation. No large blebs are seen. (B) Many blebs can be recognized 30 hours after addition of HX and XO. (original magnification x 400)

Fig. 5. Percentage of cells with large blebs at 30 min. In the buffer containing 1.27 mM of calcium, 57% of the cells had blebs on cell the surface. In the buffer without added calcium, blebs were observed on 26 % of the hepatocytes. In the buffer without additional calcium and with EGTA, only 10% of the cells had blebs.

\* $P < 0.01$  compared with  $Ca^{2+}(+)$

\*\* $P < 0.01$  compared with  $Ca^{2+}(-)$

Fig. 6. Effect of SOD and catalase on LDH release and  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) LDH release 3 hours after addition of HX and XO. In the presence of SOD and catalase (100 U/ml each), LDH leakage was significantly suppressed. More complete suppression was observed at 1000 U/ml of each. (B) Change in  $[Ca^{2+}]_i$ . The rise in  $[Ca^{2+}]_i$  was completely suppressed with 1000 U/ml of SOD and catalase.

\* $P < 0.01$  compared with control

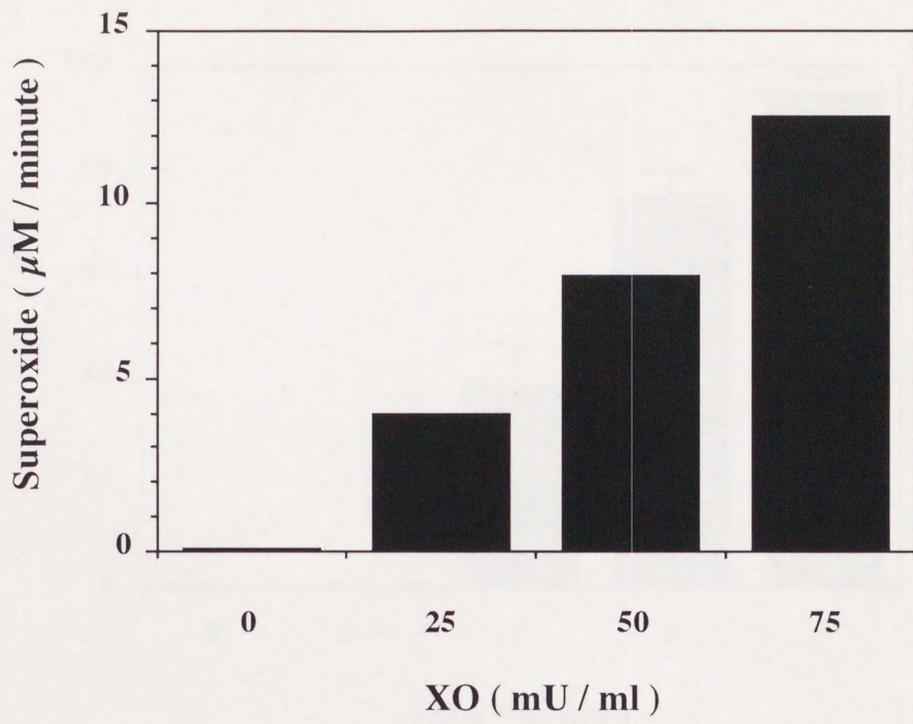
Fig. 7. Effect of nifedipine on LDH release and  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) LDH release 3 hours after addition of HX and XO. LDH release was partially suppressed by nifedipine at  $1 \mu M$ . (B) Change in  $[Ca^{2+}]_i$ . The rise in  $[Ca^{2+}]_i$  was suppressed by nifedipine at  $1 \mu M$ .

\* $P = 0.077$

Fig. 8. Effect of a calcium dependent protease inhibitor (calpeptin) on LDH release and  $[Ca^{2+}]_i$ . (A) LDH release 3 hours after addition of HX and XO. Calpeptin at  $30 \mu M$  significantly suppressed the LDH release, whereas a smaller or larger amount was ineffective. (B) Change in  $[Ca^{2+}]_i$ . The rise in  $[Ca^{2+}]_i$  was not suppressed at all by calpeptin at  $30 \mu M$ .

\* $P < 0.01$  compared with control

\*\* $P < 0.01$  compared with control



**Figure 1**

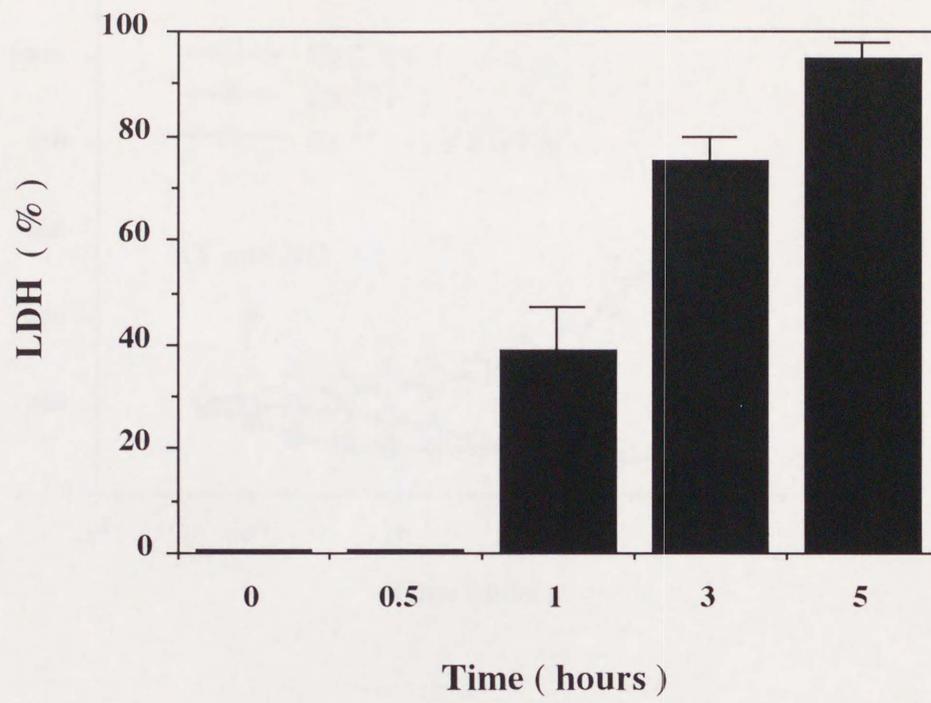


Figure 2

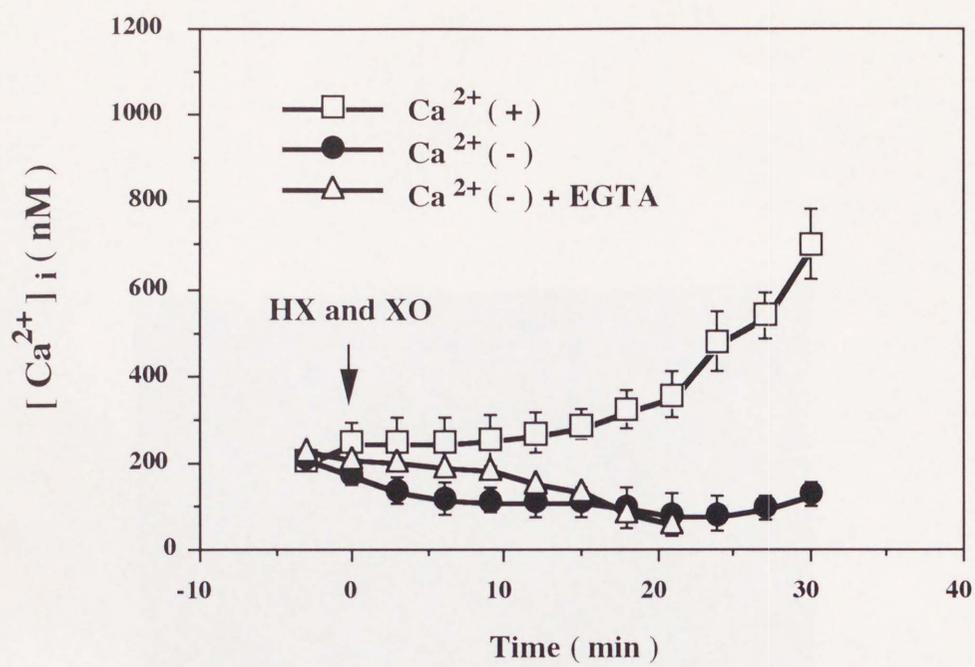


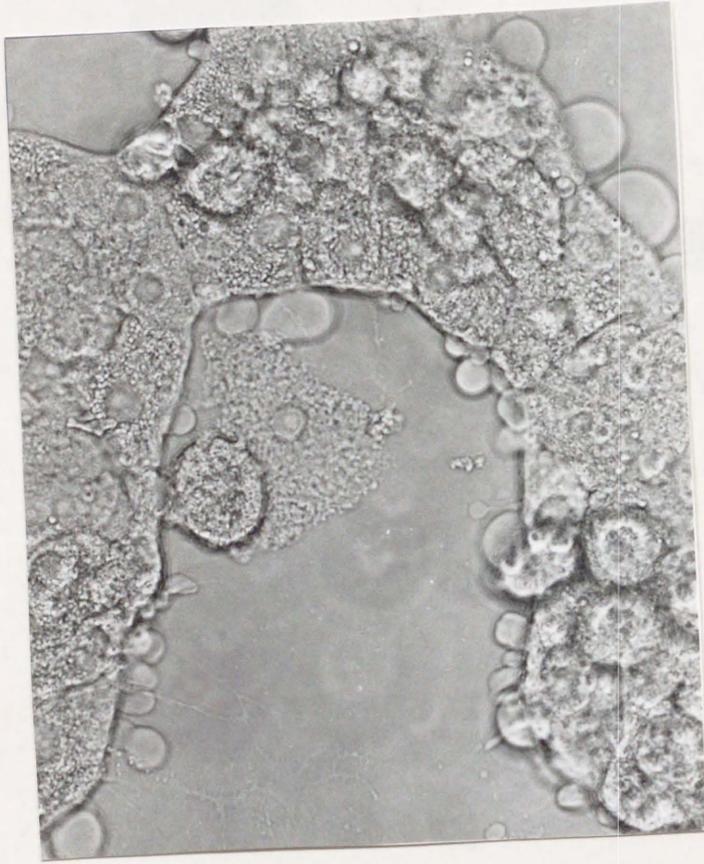
Figure 3

top



**Figure 4 (A)**

top



**Figure 4 (B)**

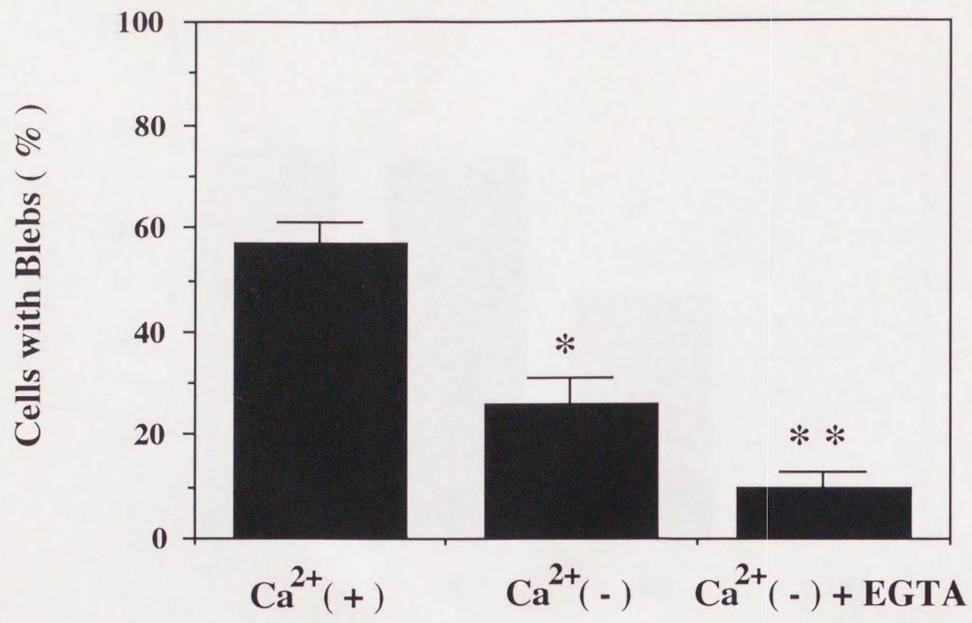
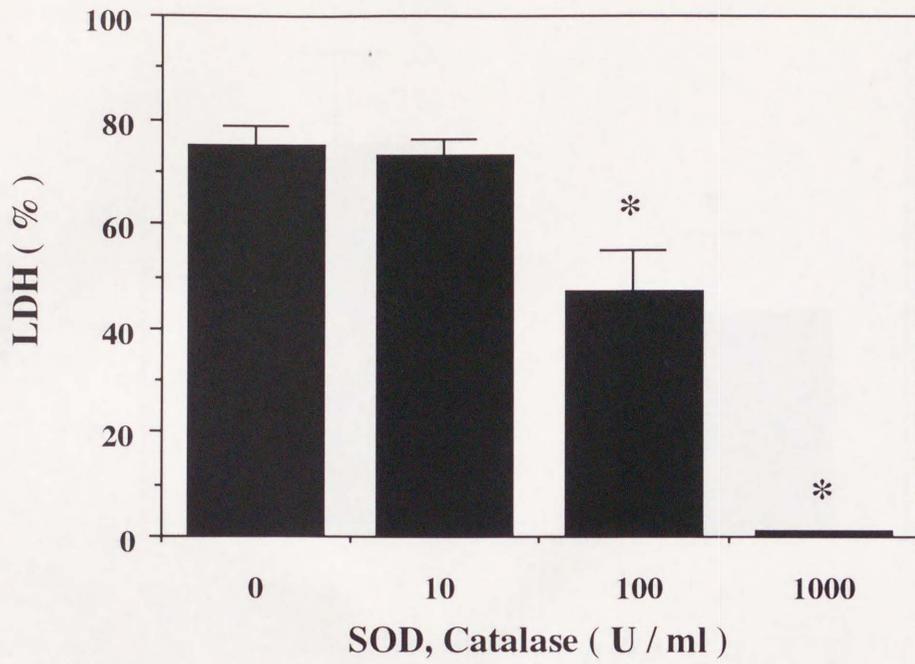
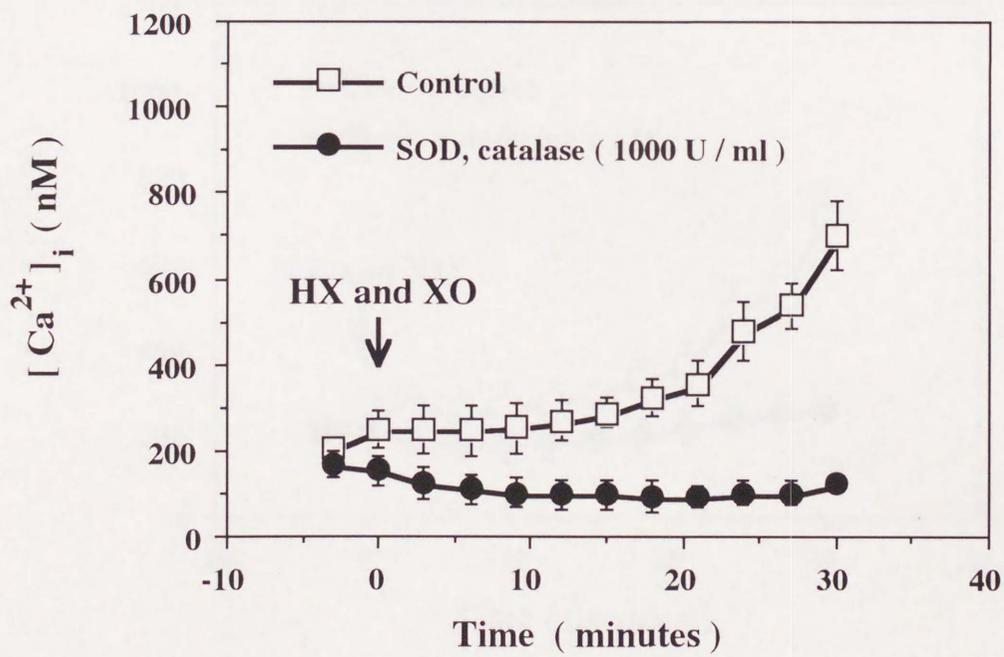


Figure 5

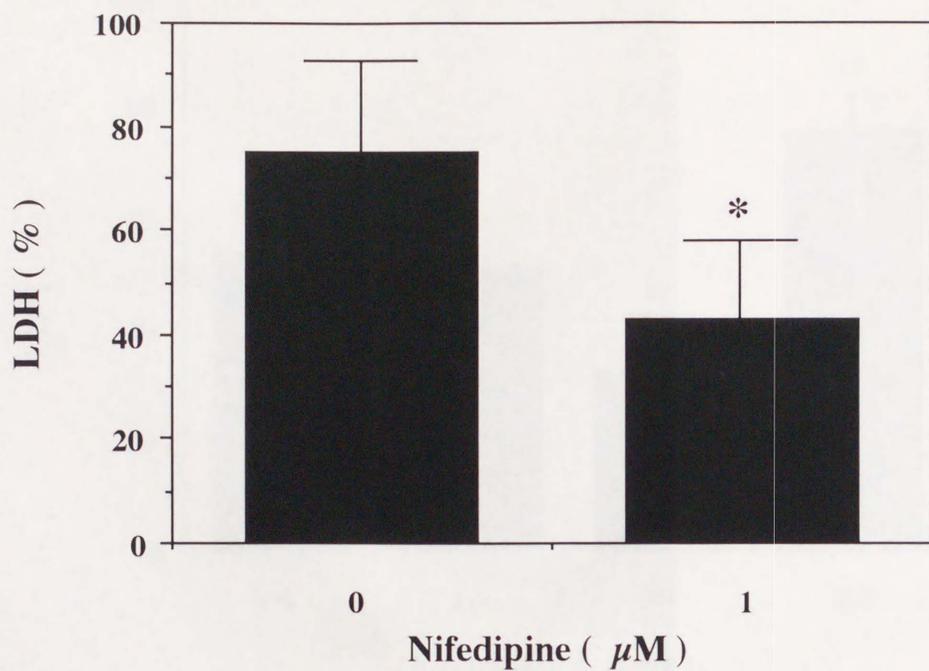


(A)

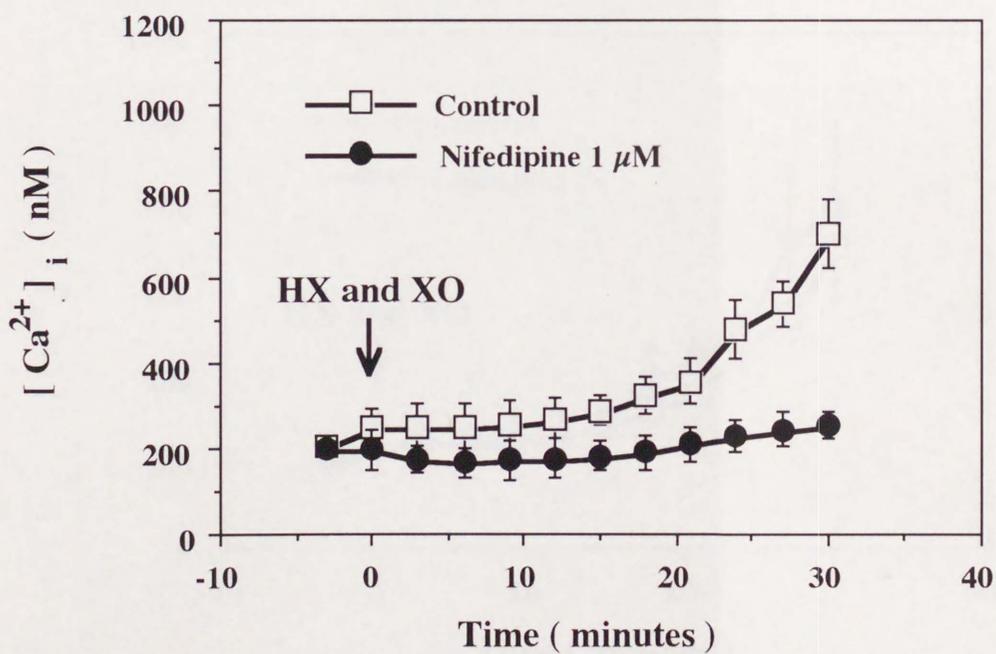


(B)

Figure 6

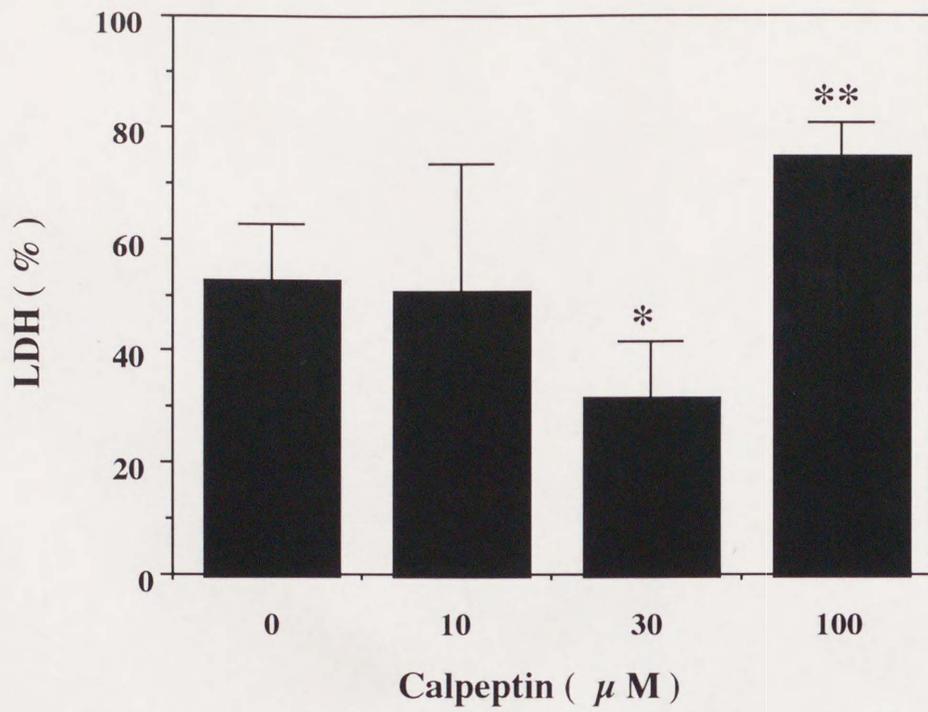


(A)

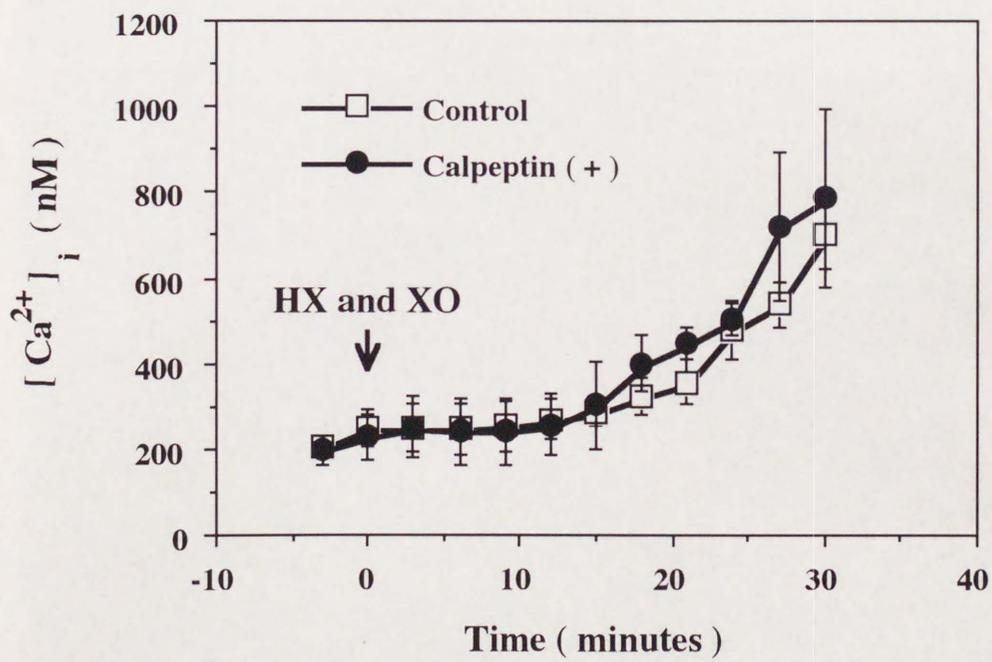


(B)

Figure 7



(A)



(B)

Figure 8



(A)



(B)

Figure 1