维普资讯 http://www.cqvip.com

305-307

荧光探针Fura－2/AM测定大鼠肝细胞胞内游离钙离子浓度

R446.61

基础医学 临床生化教研室 徐 勇* 杨 清 涂植光

提 要 采用胶原酶原位灌注法分离纯化了大鼠肝细胞，并用荧光探针Fura－2/AM测定了细胞内游离钙离子浓度。结果显示，胶原酶原位灌注法可分离获得高纯度，高活率的单个大鼠肝细胞，适合用荧光探针Fura－2/AM测定胞内游离钙离子浓度；测得新分离大鼠肝细胞静息状态下细胞内游离钙离子浓度为174.5±57.3nmol/L($\bar{x}\pm s$)。我们就上述两种技术进行了一定的改进和探讨。

关键词 肝细胞；钙离子；荧光光度法；胶原酶类；灌注法
中图分类号 R446.61

钙离子(Ca^{2+})是细胞内重要的第二信使物质，不仅在正常的细胞功能中起着极其重要的作用，而且还参与了许多疾病的发生、发展[1]。肝脏是许多疾病中最早累及或损害最严重的器官，近年来对肝细胞Ca^{2+}通道的认识及对跨膜信号系统的研究不断深入，对Ca^{2+}失衡所致肝细胞损害有了进一步认识[2]，因而，其胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的测定已成为了研究肝细胞生物学及病理学的有力工具。1985年，新一代四羧酸类Ca^{2+}荧光指示剂Fura－2/AM问世后，使得$[Ca^{2+}]_i$的测定有了新的飞跃[3]。本文报告对胶原酶原位灌注法分离纯化的大鼠肝细胞，用荧光探针Fura－2/AM测定其$[Ca^{2+}]_i$的方法。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性Wistar大白鼠，体重180～250g，购自本校实验动物中心。实验前12h禁食，自由饮水。

1.2 药品、试剂

Fura－2/AM购自中科院上海细胞生物所，批号029401；牛血清白蛋白(BSA)、HEPES购自上海生化所；IV型胶原酶、胰蛋白酶抑制剂购自Sigma公司；其余试剂均为国产分析纯品。

无Ca^{2+}灌流液：NaCl 40g，KCl 2g，$NaH_2PO_4\cdot 12H_2O$ 0.39g，$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ 0.76g，HEPES 11.9g，EGTA 0.95g，$NaHCO_3$ 1.75g，Glucose 4.5g，溶于1000ml三蒸水中作为贮存液，临用前稀释5倍，用1mol/L NaOH调pH为7.4。

清洗缓冲液：NaCl 4g，KCl 0.2g，$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ 0.3g，Glucose 0.9g，HEPES 3.0g，$CaII_2$ 0.02g，溶于500ml三蒸水，用1mol/L NaOH调pH为7.4。

胶原酶灌流缓冲液：NaCl 4.0g，KCl 0.2g，$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$ 0.039g，$Na_2HPOa\cdot 12H_2O$ 0.0755g，HEPES1.19G，$NaHCO_3$ 0.175g，溶解于三蒸水中，加$CaCL_2$ 0.28g和BSA 0.1%(W/V)，加三蒸水至500ml，以1 mol/L NaOH调pH为7.2～7.4，经0.22μm滤器过滤灭菌，4℃贮存。临用前配成含0.005%胰蛋白酶抑制剂和0.05%IV型胶原酶的缓冲液50ml。

测定$[Ca^{2+}]_i$用缓冲Hanks液：NaCl 8.0g，KCl 0.4g，$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 0.197g，$Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ 0.1185g，HEPES 2,38g，$NaHCO_3$ 0.42g，$CaCl_2$ 0.166g，溶于三蒸水中，据不同需要加入不同含量(0,2%，2%)的BSA，加三蒸水至1000ml，用1 mol/L NaOH调pH至7.63。

1.3 主要仪器

大鼠肝脏灌流装置(自制)，包括蠕动泵，恒温水浴箱及硅胶导管等；岛津RF－540荧光分光光度计(带恒温水浴)。

1.4 胶原酶原位灌注法分离纯化大鼠肝细胞

参照Seglen法[4]并加以改进

1.4.1 大鼠肝脏原位灌流

肝门静脉插管，用37℃无Ca^{2+}灌流液以20～30ml/min流速灌注肝脏，迅速剪断下腔静脉；原位灌流2～4min后，分离肝脏移至托盘中，勿扭转门静脉，保持灌流通畅，继续灌流约10min，至肝脏变为灰白色；立即用37℃酶灌流缓冲液，以30～40ml/min流速灌注10～15min，见肝

* 男，1969－09出生，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

脏肿大变软，表面出现裂纹时，终止灌流。将肝脏放于盛有清洗缓冲液的平皿中，撕去包膜，小心梳理，使肝细胞散落。

1.4.2 肝细胞纯化

获得的肝细胞悬液用250μm滤网或单层纱布过滤，37℃孵育30min并轻轻摇动；取出放冰浴5min使悬液冷至0℃，用100μm滤网或三层纱布过滤后，冷至0℃，200g离心5min，重复上述操作三次。末次离心前用台盼蓝排斥试验检测细胞活率(100个细胞中不被染色的细胞数)、细胞纯度(100个细胞中肝实质细胞数)、并计数细胞数(用血细胞计数板计数)。

1.5 细胞内游离Ca^{2+}浓度测定

参照文献[6]报道并加以改进。

1.5.1 Fura－2/AM负载

将活率＞90％的肝细胞重悬于2％BSA缓冲Hanks液，并调整细胞密度为3×10^6个/ml，加入终浓度为5μmol/L的Fura－2/AM，37℃，避光振荡孵育30min。

1.5.2 洗涤及去酯化

将负载后的细胞悬液用0.2％BAS缓冲Hanks液洗涤三次，25℃放置20min，保证Fura－2/AM完全去酯化。测定前用含0.2％BSA缓冲Hanks液调整细胞密度为1.5×10^6个/ml，每次取2ml细胞悬液进行测定。

1.5.3 荧光测定

将仪器比色池恒温在37℃，首先扫描测定Fura－2/AM标准液、负载液及测定液的激发光谱和发射光谱，比较确定测定$[Ca^{2+}]i$用激发波长(λex)及发射波长(λem)。先测得样本荧光值F，再加入终浓度为0.1％的Triton x－100获得Fmax；加入终浓度为5mmol/L的EGTA获得Fmin，按公式：

$$[Ca^{2+}]i(nmol/L)=Kd\frac{F-Fmin}{Fmax-F}$$

求出$[Ca^{2+}]i$，Kd在37℃为224nmol/L。每个标本测定后均需减去自发荧光后再进行计算，整个测定过程应在3h内完成。

2 结果

2.1 分离肝细胞的细胞数、纯度及活率

三次实验结果如表1所示。肝细胞的产量、纯度、活率分别为：$3.41\pm0.75\times10^8$，94.6±2.51％，92.3±2.51％，可满足实验要求。

表1 胶原酶原位灌流法分离肝细胞的特征

动物	细胞得率	细胞活率(％)	细胞纯度
1	3.76×10^8个	92	95
2	2.55×10^8个	95	93
3	3.93×10^8个	90	97

2.2 Fura－2/AM标准液、负载液及测定液的荧光光谱扫描。

标准液与负载液的荧光光谱基本相同，最大λex为380nm左右，最大λem为490nm左右。测定液最大λex为340nm左右，最大λem为500nm左右。因此，确定肝细胞$[Ca^{2+}]i$测定用λex为340nm λem为500nm。

2.3 肝细胞$[Ca^{2+}]i$测定结果

如表2所示，三次实验测得平均肝细胞$[Ca^{2+}]_i$为174.5±57.3nmol/L。

表2 新分离纯化大鼠肝细胞$[Ca^{2+}]i$测定

动物	测定数	$\bar{x}$(nmol/L)	S	$\bar{x}\pm s$
1	$n=10$	163.1	55.1	163.1±55.1
2	$n=10$	170.6	69.6	170.6±69.6
3	$n=10$	189.8	48	189.8±48
		174.5	57.3	174.5±57.3

3 讨论

荧光探针Fura－2/AM测定$[Ca^{2+}]i$的关键在于细胞活性及其功能状态。我们采用胶原酶原位灌注法分离纯化大鼠肝细胞，其肝细胞纯度高(＞90％)，细胞活率经台盼蓝染色排斥率可达90％以上，完全可满足测定需要，一般一只大鼠可制备10^8个肝细胞。为提高细胞活率，灌流前各种灌流液可预通氧气饱和1～2h，灌流中也可持续通氧；门静脉插管要迅速，更换灌流液时不能混入气泡以免栓塞微血管造成灌流不良，可采用三通管并预先排除气泡以预防；肝脏从大鼠体内分离时剪切要小心，不能剪破肝包膜，移出时不能扭曲

维普资讯 http://www.cqvip.com

门脉血管。为节约胶原酶，当所需测定数少，细胞用量少时，也可用部分灌流法[6]。

用Fura－2/AM测定[Ca^{2+}]i时，最好用塑料试管负载细胞，缓冲液配制也尽量用超纯水或三蒸水，以减少外源性Ca^{2+}及其它重金属离子的污染，因为Fura－2极易被痕量Ca^{2+}饱和。测定之前要扫描Fura－2/AM标准品、负载液及测定液的荧光光谱，以了解细胞完整性和负载是否成功，并确定适当的测定参数，保证测定的可靠性。标准液与完整细胞负载液的荧光光谱应基本相同，λex为380nm左右，λem为490nm左右(机器误差可为±5nm)。细胞负载后，Fura－2/AM进入细胞经细胞内非特异性酯酶水解成Fura－2，并与Ca^{2+}结合，荧光光谱改变，λex移至340nm左右，λem移至500nm左右，所以测定液的荧光光谱应为λex 340nm，λem 500nm左右。如果细胞完整性差，有破损，负载液中会因含酯酶而使Fura－2/AM水解并与Ca^{2+}结合，从而使负载液的荧光光谱变为接近测定液。

在测定[Ca^{2+}]i时，准确获取Fmax、Fmin也是很重要的。本方法的Fax采用加入终浓度为0.09%的Triton x－100以彻底破坏细胞膜后测得；而Fmin则通过加入过量EGTA结合Ca^{2+}测得，EGTA最好用饱和Tris配制，保证反应时pH＞8.0，以便结合完全，获得最低的、稳定的Fmin值。

参考文献

1 Graic E., et al Hepatology 1989;10:375
2 徐 勇，等.重庆医科大学学报 1996;21(1):84
3 Grynkiewicz G., et al J Biol Chem 1985;260:3440
4 Seglen P.O., et al. In Prescott P.M. eds《Methods in Cell Biology》New York, San Francisco London, Academic Press Inc, 1976;13:29
5 Moon, T.W. et al Am J Physiol 1993;264:E735
6 王宇明，等.中华消化杂志 1994;14:175

(收稿日期 1997－04－08)

Measurement of cytosolic Ca^{2+} level of the isolated rat hepatocytes with fluorescent probe—fura－2/AM

Xu Yong, et al
Department. of Clinical Biochemistry

The rat hepatocytes were isolated *in situ* with collagenase perfusion method and the cytosolic Ca^{2+} levels were measured using fluorescent probe fura－2/AM. Some improvement on the two reported methods was made. The results suggested that isolated hepatocytes were of high purity and viability, and suitable for the measurement of cytosolic Ca^{2+} with fura－2/AM. The cytosolic Ca^{2+} level of isolated rat hepatocytes in metabolic quiescent stage was:174.5±57.3 nmol/L ($\bar{x}\pm s$)

KEY WORDS Hepatocyte; Calcium; Fluorescent probe; Fluorescent; Spectrometry; Isolation & Purification