DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.026

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0806-04

新生大鼠心肌细胞内 Ca^{2+} 的空间分布及调控的离体研究

刘 健[1],何作云[1],王培勇[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]高原军事医学系病理生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察心肌细胞胞浆和核 Ca^{2+} 的空间分布和钙变化的形式。方法 以 Fluo-4/AM 荧光指示剂负载培养的心肌细胞,应用激光共聚焦扫描显微镜观察心肌细胞的钙信号形式及胞浆和核内[Ca^{2+}]i 的变化。结果 心肌细胞核的荧光强度明显高于细胞浆,并存在小幅度的钙震荡,Ang II 使钙震荡幅度增大,其作用可被 NO 所完全抑制。Ca^{2+}-ATPase 抑制剂 Thapsigargin(10^{-6} mol/L)、钙释放通道 Ryanodine 受体 2 激动剂咖啡因(5 mmol/L)和大剂量 L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂 Verapamil(500 μmol/L)使心肌细胞胞浆内和核膜上出现钙闪烁现象。EGTA 首先螯合心肌细胞内的游离 Ca^{2+},继之螯合钙库 Ca^{2+},最后仅显示心肌细胞核膜腔 Ca^{2+} 库影。L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂 Verapamil 引起心肌细胞自发的钙波传递消失,核和胞浆内荧光强度一过性升高后下降。结论 心肌细胞内存在钙闪烁、钙波以及钙震荡等多种钙信号形式,胞浆和核 Ca^{2+} 库对 Ca^{2+} 的摄取和释放在细胞功能的调节中起重要作用。

关键词:钙信号;心肌细胞;细胞核

中图法分类号:R322.11;R329.25 文献标识码:A

Study on dynamic changes and spatial distribution of Ca^{2+} in cultured neonatal rat myocardiocytes

LIU Jian, HE Zuo-yun, WANG Pei-yong (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** Investigated the localization and distribution of elementary Ca^{2+} signaling units in cultured rat neonatal cardiomycytes. **Methods** Confocal laser scanning microscopy and fluo-4/AM calcium probe were used. **Results** Calcium fluorescent intensity oscillated slightly in myocardiocytes and the average intensity was much higher in the nucleus than in the cytoplasm, all of which could be increased significantly by Ang II(10^{-7} mol/L). Ca^{2+} oscillation induced by Ang II was completely blocked by NO. Ca^{2+}-ATPase antagonist, thapsigargin(10^{-6} mol/L), ryanodine receptor type 2 agonist, caffeine(5×10^{-3} mol/L) and L-type Ca^{2+} channel blocker, verapamil (500 μmol/L) evoked Ca^{2+} spark was seen in the cytosole or nuclear surface membrane. L-type Ca^{2+} channel blocker verapamil completely blocked the propagation of Ca^{2+} waves and simutaneously induced a temporary Ca^{2+} increase followed by a significant drop. **Conclusion** Spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} signaling comes in various patterns, such as spontaneous Ca^{2+} spikes, Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation, changes of calcium signaling in cytosole and nucleus are not synchronous. The regulation of the Ca^{2+} release and uptake of cytosolic and nuclear calcium stores in the cardiomycytes may play an important role in cellular cardiac function.

Key words: calcium; cardiomycytes; nucleus

Ca^{2+} 是重要的细胞内信使,除参与调节细胞收缩、分化、增殖等功能外,还与刺激 DNA 合成和基因激活有关,因此细胞内钙信号的精密调节,对细胞功能的维持具有至关重要的意义。本实验观察培养新生大鼠心肌细胞胞浆和核游离 Ca^{2+} 变化,旨在初步揭示心肌细胞内各种钙信号的形式及其意义。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

Fluo-4/AM、F127、Thapsigargin 和 4-bromo-A-23187 购自 Molecular Probes, Ang II, EGTA、咖啡因和 DMEM 均为 Sigmas 产品。

1.2 大鼠心肌细胞培养

取出 1~3 d 龄 Wistar 大鼠的心脏,剪成约 1~3 mm 大小的碎块,用 0.125% 胰蛋白酶和 1%的胶原酶溶液反复消化 5~6 次,分离大鼠心室肌细胞,在含 5% 小牛血清的培养介质(DMEM)中于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱(Heraeus West Germany)内孵育 2 h,用差速贴壁法去除非心肌细胞,之后收集细胞悬液,配成 2.5×10^5/ml 悬液,接种于培养皿上,在培养的最初 1 d 加入阿糖胞苷(1 μmol/L),以抑制非心肌细胞生长。

1.3 Fluo-4/AM 荧光指示剂负载心肌细胞[1]

向培养 4 d 的心肌细胞中,加入含 Fluo-4/AM(终浓度为 2 μmol/L)的负载液,同时加入 20% 的 F127(2 μl/ml)使 Fluo-4/AM 能均匀的分布于细胞,并在二氧化碳培养箱内孵育 30 min,然后用不含 Fluo-4/AM 的负载液反复轻洗 3 次,于 10 mmol/L HEPES 的 DMEM 培养液(pH 7.4)中进行[Ca^{2+}]i 荧光测定。

1.4 心肌细胞 Ca^{2+} 变化检测

向负载有 Fluo-4/AM 的心肌细胞中,分别加入 Ang II(10^{-7} mol/L)、Thapsigargin(10^{-6} mol/L)、咖啡因(5 mmol/L)、Verapamil(500 μmol/L),硝普钠(10^{-5} mol/L, NO 供体),对照不加处理因素。在 CLSM 下,以 Fluo-4 为游离钙荧光探针,用氪氩离子激光激发(激发波长 494 nm,发射波长 516 nm),观察胞内[Ca^{2+}] 的分布及荧光强度变化。每间隔 5~10 s 记录 1 次图像,动态记录[Ca^{2+}]变化,每个样本记录 10 min 左右。测试温度为 37 ℃。[Ca^{2+}]浓度按下列公式计算:

$$[Ca^{2+}] = Kd[(F-F_{min})/(F_{max}-F)] \text{ (nmol/L)}$$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870347, 39870392)

作者简介:刘 健(1968-),女,山东省日照市人,博士研究生,主治医师,主要从事心肌重塑的发病机制方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)68755000-74601

收稿日期:2000-11-19;修回日期:2001-04-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Kd 为解离常数(345 nmol/L), F 为测定的荧光强度, F_{max} 为加入 Ca^{2+} ionophore 4-bromo-A23187 (10^{-5} mol/L) 和 $CaCl_2$ 2.0 mmol/L 后测得的最大荧光强度, F_{min} 为加入 EGTA (5 mmol/L) 后测得的最小荧光强度。

1.5　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异用配对 t 检验。

2　结果

2.1　正常心肌细胞[Ca^{2+}]的动态观察

Fluo-4 与游离 Ca^{2+} 结合后, 在激光共聚焦显微镜下, 可见正常心肌细胞内荧光分布不均匀, 培养 4 d 生长良好的原代心肌细胞核的荧光强度(123.38±5.77)高于核周(79.13±4.02)与细胞浆(35.47±1.76)。心肌细胞内可见小的钙微粒, 并存在动态变化, 钙在某个区域瞬间增高后, 反复以很快的速度在细胞内及相连的另一细胞间彼此传播, 并周期性出现整个视野所有心肌细胞的强烈荧光照亮现象, 即所有心肌细胞以细胞核为荧光最强的中心, 同步出现全细胞内均一性的钙瞬时增高现象。

2.2　心肌细胞的钙震荡

在激光共聚焦显微镜下, 可见正常心肌细胞内存在小幅度的钙震荡, 核 Ca^{2+} 荧光强度的震荡幅度为 103.78~133.66, 核周为 66.03~85.68, 胞浆为 27.89~37.90。如图 1A 所示。

10^{-7} mol/L AngⅡ引起心肌细胞核和胞浆钙震荡幅度明显增加, 此时核 Ca^{2+} 荧光强度的震荡幅度为 58.42~253.63, 胞浆为 26.01~174.73, 加入 10^{-5} mol/L 硝普钠后, 钙的周期性震荡消失, Ca^{2+} ionophore 4-bromo-A-23187 (10^{-5} mol/L) 又使荧光强度迅速升高。如图 1B 所示。

2.3　EGTA 对心肌细胞[Ca^{2+}]的影响

EGTA 能螯合细胞内外的 Ca^{2+}, 加入 Ca^{2+} ionophore 4-bromo-A-23187 (10^{-5} mol/L) 通透心肌细胞膜后, 再加入 5 mmol/L EGTA, 心肌细胞核和胞浆内的游离 Ca^{2+} 首先被螯合, 使荧光强度下降, 而胞浆细胞器钙库中的 Ca^{2+} 则清晰可见, 如图 2A 所示。之后心肌细胞核和胞浆内荧光强度迅速下降至最低水平, 最后仅可见核膜腔钙库影, 如图 2B 所示。

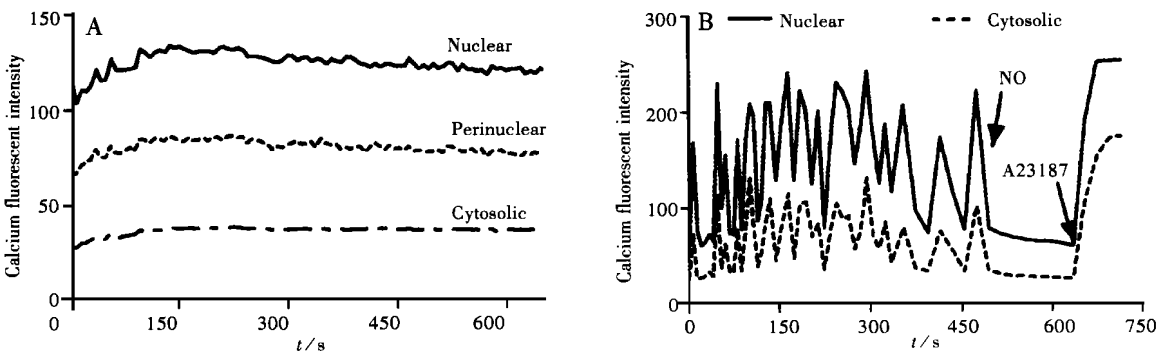


图 1　心肌细胞的钙震荡

A: 正常心肌细胞的核、核周和胞浆的钙震荡; B: AngⅡ和 NO 对心肌细胞核、胞浆钙震荡的影响

Fig 1　The Ca^{2+} oscillation of cultured cardiac myocytes

A: Oscillation of nucleus, perinuclear and cytosolic[Ca^{2+}] in cultured cardiac myocytes; B: Effect of AngⅡ and NO on the oscillation of nucleus and cytosolic[Ca^{2+}] in cultured cardiac myocytes

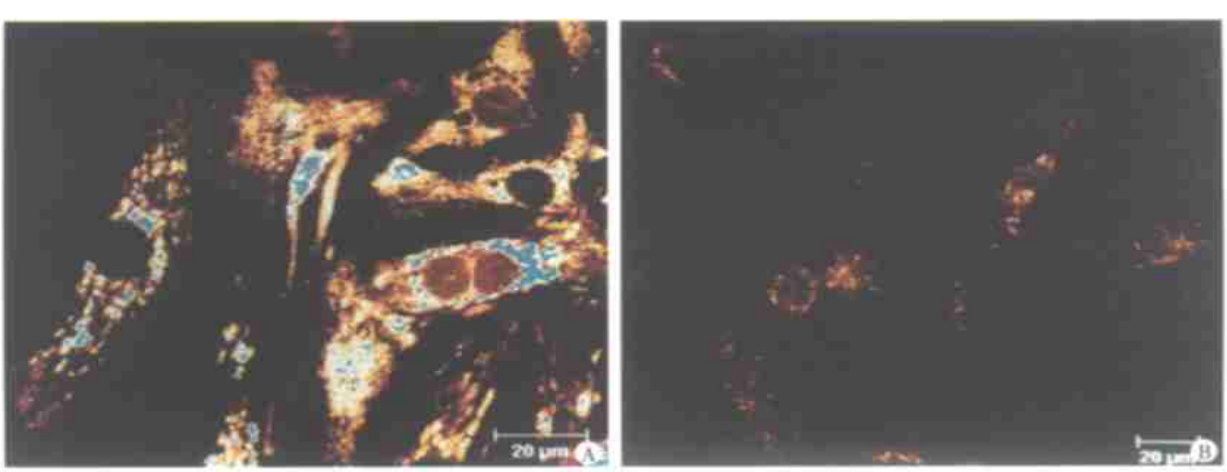


图 2　心肌细胞胞内 Ca^{2+} 库

A: 心肌细胞内游离 Ca^{2+} 被 EGTA 螯合; B: 胞浆钙库 Ca^{2+} 被 EGTA 螯合, 剩余的核膜钙库

Fig 2　Ca^{2+} pool in myocardiocytes

A: Ca^{2+} in myocardiocytes chelated by EGTA; B: Remained calcium pool of nuclear envelop. Ca^{2+} of plasma calcium pool chelated by EGTA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 Thapsigargin 对心肌细胞[Ca^{2+}]的影响

加入 Thapsigargin 10^{-6} mol/L，可见胞浆内和核膜上出现局限性的、类似点火花状的非传播性 Ca^{2+} 增高，即钙闪烁现象，如图3所示。核和胞内荧光强度先升高后降低。

2.5 咖啡因的作用

加入 5 mmol/L 咖啡因后，心肌细胞[Ca^{2+}]n 显著升高 2.25 倍（1 902.6±159.2）nmol/L *vs*（585.5±115.1）nmol/L，$P<0.001$]，[Ca^{2+}]c 增加 34%[（156.3±5.2）nmol/L *vs*（116.6±5.4）nmol/L，$P<0.05$]，核周 Ca^{2+} 增加 99.8%[（545.95±25.7）nmol/L *vs*（273.3±32.6）nmol/L，$P<0.01$]。胞内增加的 Ca^{2+} 则经细胞膜和核膜附近出现较大的钙闪烁团排至胞外，如图4所示。

2.6 L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂(Verapamil)的作用

加入 Verapamil 500 μmol/L，心肌细胞内出现散在荧光微粒，如图5所示，核和胞浆的荧光强度迅速一过性显著升高，其中[Ca^{2+}]n 显著升高[（2 336.38±530.03）nmol/L *vs*（318.33±68.17）nmol/L，$P<0.001$]，[Ca^{2+}]c 增加[（430.32±49.06）nmol/L *vs*（144.09±16.88）nmol/L，$P<0.01$]，心肌细胞自发的钙波传递消失。加入 verapamil 引起有的心肌细胞膜周边出现不规则的钙闪烁团，胞内荧光强度增加，心肌细胞产生收缩，之后兴奋收缩失耦联。继之所有心肌细胞内的荧光强度下降。



图3 Ca^{2+}-ATPase 抑制剂 Thapsigargin 使心肌细胞产生 Ca^{2+} 闪烁

Fig 3 Ca^{2+} sparks in cultured neonatal ventricular myocytes caused by thapsigargin

图4 Caffeine 引起心肌细胞产生核膜和胞浆 Ca^{2+} 闪烁团

Fig 4 Ca^{2+} sparks in plasma and nuclear membrane of cultured neonatal ventricular myocytes caused by caffeine

图5 Verapamil 作用下，心肌细胞的钙微粒和钙闪烁现象

Fig 5 Quarks and sparks in cultured neonatal ventricular myocytes evoked by verapamil

3 讨论

细胞内钙信号有复杂的时间和空间排列形式，机制尚不很清楚。本实验观察到，在正常心肌细胞内，核和核周的荧光强度明显高于细胞浆，并存在小幅度的钙震荡，且钙以很快的速度在细胞内及相连的另一细胞间彼此传播，这种变化可能是钙波(Calcium wave)以钙震荡的形式传播。本实验还观察到整个视野所有心肌细胞周期性出现强烈的荧光照亮现象，即所有心肌细胞以细胞核为荧光最强的中心，同步出现全细胞内均一性的钙瞬时增高现象。

目前研究表明，在静息状态下，细胞内游离钙浓度一般维持在 100 nmol/L 左右，而胞内钙库集聚了与胞外 Ca^{2+} 浓度相当的 Ca^{2+}（10^{-3} mol/L），在刺激兴奋的条件下，胞外 Ca^{2+} 和细胞器中的 Ca^{2+} 都可能被动员进入细胞浆，不论是由胞外游离 Ca^{2+} 的流入，还是由胞内钙库的 Ca^{2+} 释放，均产生局部性钙信号。Ca^{2+}-ATPase抑制剂 Thapsigargin 具有抑制心肌细胞钙库对 Ca^{2+} 的摄取的作用，但它不能阻断钙库释放 Ca^{2+}，本实验观察到，Thapsigargin 可引起心肌细胞胞浆内和核膜上出现局限性的、类似点火花状的非传播性 Ca^{2+} 增高，即钙闪烁现象。有研究发现钙闪烁(Calcium spark)是指从心肌细胞肌质网内释放钙产生局部的钙增高现象[2,3]。而本实验则提示 Thapsigargin 也引起心肌细胞核产生 Ca^{2+} 释放现象。

有关核 Ca^{2+} 的研究是近年来信号转导课题的热点，而核 Ca^{2+} 是否存在独立调节尚不十分清楚，我们的实验发现，Thapsigargin 和 Caffeine 均可引起核膜上产生钙闪烁，提示细胞核膜上可能存在相对独立于胞浆的 Ca^{2+} 转运系统，推测它们可能为受 Thapsigargin 和 caffeine 调节的核膜 Ca^{2+}-ATPase 和 Ryanodine 受体(RyR)，参与核 Ca^{2+} 摄取和释放，从而精确地调控核内[Ca^{2+}]变化。实验还发现 Ca^{2+} 离子螯合剂 EGTA 首先螯合心肌细胞内的游离 Ca^{2+}，继之螯合胞浆钙库中的 Ca^{2+}，最后仅可见核膜腔钙库影，提示核与胞浆 Ca^{2+} 变化不同步，核膜腔钙库可能具有更大的 Ca^{2+} 缓冲能力。

本实验观察到大剂量 L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂 Verapamil 引起心肌细胞内出现大量的钙闪烁、核和胞浆内荧光强度瞬时升高，心肌细胞自发的钙波传递消失，继之所有心肌细胞内的荧光强度下降。说明 L-型 Ca^{2+} 通道阻滞剂除具有抑制胞外 Ca^{2+} 内流的作用外，可能还通过增加胞内钙库的 Ca^{2+} 释放，阻断胞内钙库对 Ca^{2+} 的摄取，从而引起胞内钙库耗竭，钙波传递消失。其机制不明，可能与阻断 L-型钙通道诱导反式 Na^{+}/Ca^{2+} 交

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

换转运 Ca^{2+}, 进一步引起肌质网释放 Ca^{2+} 有关[4], 也可能与 L 型钙通道与肌质网释放通道(或 Ryanodine 受体)之间存在着"微耦联"[5]有关。另外我们对胞内 Ca^{2+} 外排也进行了观察, 发现 Thapsigargin 和 Ryanodine 2 受体激活剂 caffeine 使心肌细胞 Ca^{2+} 释放显著增加, 而胞内增加的 Ca^{2+} 排至胞外时, 细胞膜和核膜附近也出现钙闪烁团。有研究证实 Caffeine 引起钙库释放的 Ca^{2+} 能经 Na^+/Ca^{2+} 交换排出胞外[6], Goldhaber 等[7]也发现心肌细胞 Na^+-Ca^{2+} 交换可产生钙闪烁现象, 本实验观察到的这种钙闪烁团是否为 Na^+/Ca^{2+} 交换体主动排出 Ca^{2+} 所致, 尚有待于进一步探讨。

正常心肌细胞内存在小幅度的钙震荡, Ang Ⅱ增加细胞核和浆钙震荡的幅度, 说明不仅胞浆存在 Ca^{2+} 震荡, 核内 Ca^{2+} 也存在震荡。有研究发现钙震荡的产生与胞内钙库反复的 Ca^{2+} 摄取和释放有关[8], 由此推测心肌细胞核上也存在调节钙震荡的核 Ca^{2+} 转运系统: 核钙泵和钙释放系统。

参考文献:

[1] Burnier M, Centeno G, Burki E, *et al*. Confocal microscopy to analyze cytosolic and nuclear calcium in cultured vascular cells[J]. Am J Physiol, 1994, 266(35): C 1 118—1 127.

[2] Shorofsky S R, Izu L, Wier W G, *et al*. Ca^{2+} sparks triggered by patch depolarization in rat heart cells[J]. Circ Res, 1998, 82(4): 424—429.

[3] Collier M L, Thomas A P, Berlin J R. Relationship between L-type Ca^{2+} current and unitary sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release events in rat ventricular myocytes[J]. J Physiol Lond, 1999, 516(Pt 1): 117—128.

[4] Leblanc N, Hume J R. Sodium current induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum[J]. Science, 1990, 248(4 953): 372—376.

[5] Takagishi Y, Rothery S, Issberner J, *et al*. Spatial distribution of dihydropyridine receptors in the plasma membrane of guinea pig cardiac myocytes investigated by correlative confocal microscopy and label-fracture electron microscopy[J]. J Electron Microsc Tokyo, 1997, 46(2): 165—170.

[6] Varro A, Negretti N, Hester S B, *et al*. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes[J]. Pflugers Arch, 1993, 423(1—2): 158—160.

[7] Goldhaber J I, Lamp S T, Walter D O, *et al*. Local regulation of the threshold for calcium sparks in rat ventricular myocytes: role of sodium-calcium exchange[J]. J Physiol Lond, 1999, 520(Pt 2): 431—438.

[8] Prakash Y S, Kannan M S, Sedck G C. Regulation of intracellular calcium oscillations in porcine tracheal smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 1997, 272(3pt 1): C966—975.

(编辑　王　红)

(上接 805 页)

取正常人新鲜血和切除人脾脏分离单核细胞和脾巨噬细胞, 然后把细胞置于含 15%小牛血清的 1640 培养液的 6 孔培养板中, 培养过夜后, 洗去非粘附细胞, 计数单核细胞约为 5×10^5 个/孔, 每孔加 Tuftsin 工作液 0.4 ml(10 μg), 对照组加同样量的培养液。培养 24 h 后, 用冷的 PBS 液洗板 1 次, 小心用细胞刮刀把细胞刮下, 然后再加生物素标记的抗 HLA-ABC、HLA-DR 单抗(邦定生物医学公司)(1∶100)和 B7-2 的单抗(Sigma 公司)(1∶100), 4 ℃下孵育 30 min, 再加卵白素-PE(Sigma 公司)显色, 显色后用冷 PBS 洗涤离心 1 次。用流式细胞仪检测。

2　结果

Tuftsin 对单核细胞和脾巨噬细胞表达 HLA-DR 的影响, 见表 1。

表 1　**Tuftsin** 对单核细胞和脾巨噬细胞表达 **HLA** 和 **B7-2** 的影响(相对百分数, $\bar{x}\pm s$)

组别	单核细胞组			脾巨噬细胞组		
	HLA-DR	HLA-ABC	B7-2	HLA-DR	HLA-ABC	B7-2
Tuftsin 刺激组	4.18±1.06 *	4.58±1.58 *	5.42±1.57 *	4.02±0.95 *	4.49±1.2 *	4.66±1.34 *
对照组	2.64±0.468	2.31±0.53	2.61±0.34	1.98±0.416	2.16±0.47	2.37±0.25

*: $P<0.05$ 与对照组比较

3　讨论

人类白细胞抗原—HLA 是位于人 6 号染色体短臂上一群高度多态性、紧密连锁的基因群, 它所编码的主要组织相容性抗原, 在特异性免疫中处于重要地位。HLA 抗原可分为三类, 即: HLA-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类。HLA-Ⅰ类抗原受控于 ABCDEFG 位点, 而其中的 ABC 位点所编码的分子归为经典 HLA-Ⅰ类分子, HLA-ABC 抗原是 HLA-Ⅰ类抗原的一种, 它广泛分布于有核细胞表面。HLA-Ⅱ类抗原受控于 DPDRDQ 位点, HLA-DR 抗原是 HLA-Ⅱ类抗原的一种, 它广泛分布于 B 淋巴细胞、巨噬细胞和活化的 T 细胞表面, 其功能是将外源性抗原肽递呈给 Th 细胞。

大量的文献报道, 肿瘤免疫主要是以 T 细胞为主的细胞免疫, 效应细胞主要是 CTL 和 Th。近年来的文献表明, $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 的 T 细胞的活化需要两个不同的信号。信号 1 是结合于 APC 上的 MHC Ⅰ类分子或Ⅱ类分子的抗原多肽和抗原特异性的 T 细胞受体之间的反应。信号 2 是依靠 APC 上的共刺激分子[包括 B7-1(CD28)和 B7-2(CD86)]通过他们在 T 细胞上的计数器(Counter)受体来完成的。

以前有关 Tuftsin 对单核吞噬细胞功能影响的研究主要集中在 MHC 非限制性的分泌和吞噬作用方面, Tuftsin 对单核细胞和巨噬细胞表达 HLA 抗原和 B7 分子的研究还未见报道。尽管 APC 如何把抗原提呈给 Th 细胞从而活化 CTL 细胞, 是一个非常复杂的问题, 其中涉及很多因子, 还有许多具体的问题还不清楚。但我们的研究粗略的显示, Tuftsin 可以促进单核细胞和脾巨噬细胞表达 HLA-ABC、HLA-DR 及 B7-2 分子。表明 Tuftsin 不但可以促进单核吞噬细胞系统的 MHC 非限制性功能, 还可以促进它们的 MHC 限制性的抗原提呈功能。

关键词: Tuftsin; HLA; B7-2; 脾巨噬细胞; 单核细胞
中图法分类号: R394.3　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 雷　新, 韩本立. Tuftsini 的合成及对裸鼠胆管癌模型的作用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 75—77.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net