

· 基础研究 ·

自发钙火花与诱发钙火花的形态特征比较

沈建新^{1,2}, 王世强³, 程和平³

(1. 汕头大学医学院生理学教研室, 广东 汕头 515041; 2. 西安交通大学医学院生理学教研室, 陕西 西安 710061; 3. 北京大学生命科学学院膜与膜生物工程国家实验室, 北京 100871)

摘要:【目的】钙火花是胞内基本的钙释放事件,既可以在静息的状态下随机产生,也可以被通过 *L*-型钙通道内流的少量钙离子诱发产生。对钙火花特征和产生机理的研究极大地深化了我们对兴奋-收缩耦联过程的理解。本研究的目的旨在比较同一条件下自发钙火花和由 loose-patch 方法诱发的可以准确测量的钙火花之间在形态特征上的异同,以加深我们对钙火花的认识。【方法】激光共聚焦显微镜线扫描成像技术可记录到加载有荧光染料 fluo-4 的成年大鼠心肌细胞中随机产生的自发钙火花;而非紧密封接膜片钳技术与激光共聚焦显微镜线扫描成像相结合的方法(loose-patch 方法)可准确记录诱发钙火花。【结果】总体上,在相同条件下共聚焦显微镜线扫描方式记录到的自发钙火花与诱发钙火花的基本特征相似;但诱发钙火花的幅度高于自发钙火花的幅度(1.00 ± 0.05) vs (0.80 ± 0.06), $P < 0.05$),而空间扩散范围则小于自发钙火花的空间范围(1.35 ± 0.05) μm vs (1.94 ± 0.08) μm , $P < 0.05$)。【结论】自发钙火花和诱发钙火花因其记录方法不同而在形态特征上有不同表现,这对于正确分析钙火花数据和准确理解胞内钙信号的实质有重要意义。

关键词 钙火花;膜片钳;激光共聚焦显微镜;细胞 心肌

中图分类号 R363

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2004)05-0390-05

Morphometric Difference Between Spontaneous Ca^{2+} Sparks and Evoked Ca^{2+} SparksSHEN Jian-xin^{1,2}, WANG Shi-qiang³, CHENG He-ping³

(1. Department of Physiology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China, 2. Department of Physiology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, 3. National Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: 【Objective】 Ca^{2+} sparks are considered to be the elementary events of intracellular Ca^{2+} release. Ca^{2+} Sparks not only can occur spontaneously and stochastically in quiescent cardiac myocytes, but also can be evoked by Ca^{2+} influx through *L*-type Ca^{2+} channels locally. The investigation of Ca^{2+} sparks enhanced our understanding about excitation-contraction coupling greatly. In this study, to deepen our knowledge about Ca^{2+} sparks, we would like to compare the morphometrics between spontaneous Ca^{2+} sparks and evoked Ca^{2+} sparks. The latter were activated by loose-patch method and could be detected exactly. 【Methods】In single quiescent cardiac myocytes loaded with fluo-4, spontaneous Ca^{2+} sparks could be detected by confocal laser scanning microscopic line-scanning imaging. And evoked Ca^{2+} sparks could be activated by loose-seal patch-clamp and detected exactly by confocal laser scanning microscopic line-scanning imaging, which is so called the loose-patch method. 【Results】In general, under the same conditions, spontaneous Ca^{2+} sparks and evoked Ca^{2+} sparks were analogous in morphometrics, except that the evoked ones were higher in

收稿日期: 2004-05-28

项目基金: 国家重大基础研究发展基金资助项目(G2000057002);西安交通大学重点基金资助项目(X160, 082003);广东省卫生厅“五个一”工程重点基金资助项目(413626);汕头市“四一一五”工程重点项目(961224);汕头大学研究与发展基金资助项目(L00015)

作者简介: 沈建新(1969-),男,广东潮州人,原中山医科大学1995届校友(硕士),现在汕头大学医学院生理学教研室工作,在职攻读西安交通大学博士学位。E-mail: jxshen@stu.edu.cn

amplitude [(1.00 ± 0.05) vs (0.80 ± 0.06), $P < 0.05$] and narrower in width [(1.35 ± 0.05) μm vs (1.94 ± 0.08) μm , $P < 0.05$] than the spontaneous ones. **【Conclusion】** There are some difference in morphometrics between spontaneous Ca^{2+} sparks and evoked Ca^{2+} sparks because of the different imaging methods. This would be important for data analysis of Ca^{2+} sparks and understanding the essential of intracellular signaling.

Key words: Ca^{2+} sparks; patch-clamp; confocal laser scanning microscope; myocytes, cardiac
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 390 - 394]

离子钙参与包括肌肉收缩、突触传递、激素分泌、基因转录以及细胞分裂、受精、代谢和凝血等多种生理过程,是生物机体中最普遍、最重要的第二信使之^[1,2]。对心肌细胞来说,离子钙可将细胞的电活动与细胞的收缩联系起来,此即为兴奋-收缩耦联(excitation-contraction coupling, ECC)^[3]。胞内钙释放是ECC过程中的关键环节。正是由于胞内离子钙浓度的瞬时升高即钙瞬变(Ca^{2+} transients),才进而导致肌细胞的收缩^[3,4]。胞内钙释放研究中的一个划时代的进展是钙火花(Ca^{2+} sparks)的发现^[1,5]。钙火花(Ca^{2+} sparks)是激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope)下观察到的孤立的、持续时间很短的细胞内基本的钙释放事件^[1,6]。钙火花不仅可以在静息的状态下随机产生,而且可以被通过L-型钙通道内流的少量钙离子诱发产生^[1,7]。对钙火花特征和产生机理的研究极大地深化了我们对ECC过程的理解^[8]。本研究的目的旨在比较同一条件下自发钙火花和由loose-patch方法^[6,9]诱发的可以准确测量的钙火花之间在形态特征上的异同,以加深我们对钙火花的认识。

1 材料和方法

1.1 心室肌单细胞分离

心室肌单细胞取自成年SD大鼠(Sprague-Dawley rats, 2~3月龄,体质量200~300g)。采用通用的标准酶解分离技术分离细胞^[10]。分离过程中使用的Hepes缓冲液成分如下(单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 MgCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 1 CaCl_2 , 10 glucose 和 20HEPES; pH用NaOH调至7.4。

1.2 加载荧光染料

将分离好的心肌单细胞先与钙荧光指示剂fluo-4-AM(终浓度为 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (Molecular

Probes, Inc.)共同孵育5 min,之后以正常胞外液灌流10 min,以便除去胞外多余的荧光染料并使进入胞内的fluo-4-AM所携带的AM基团(即acetoxymethyl ester,为一酯类基团,fluo-4带上此基团后即可自由过膜)被胞内相应的酶除去。加载好荧光染料的细胞置于共聚焦倒置显微镜系统的载物台上。

1.3 选择合适的细胞

适合进行实验的细胞必需符合以下标准:①横纹清晰;②呈杆状;③表面干净平整;④观察1 min未发现有自发收缩活动。

1.4 共聚焦显微镜钙成像

本研究采用LSM-510共聚焦显微镜系统,对此系统的基本配置要求为:波长488 nm的氩激光,40倍、1.3 NA(numerical aperture)的油浸镜头;其纵向和水平的分辨率分别为 $1.0 \mu\text{m}$ 和 $0.5 \mu\text{m}$ 。共聚焦成像一般采用快速线扫描方式(line scanning)以更好地显示钙信号的时空特征(图1)。时间-空间采样参数分别为 $0.77 \text{ ms}/\text{线}$ 、 $0.045 \mu\text{m}/\text{像素}$ 。所有实验均在室温($23 \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$)条件下进行。

1.5 自发钙火花的记录

在放置扫描线之前先采用二维平面扫描方式,以获得细胞的整体轮廓;接着通过调节焦平面位置选取合适的细胞层面(荧光分布均匀,且尽量避开细胞核所在的层面)。然后将扫描线约置于细胞长轴纵向正中切面的中央(图1A左),再转换为线扫描方式。每个细胞一般采集8幅线扫描图像,每幅大小约为 512×512 (图1A右),每两幅图像间间隔时间约10 s。

1.6 诱发钙火花的记录

本研究采用Loose-patch方法^[9]诱发心肌细胞局部产生钙火花。具体方法为,①形成非紧密封接的膜片钳细胞贴附实验模式。非紧密封接的膜片钳技术(loose-seal patch-clamp)与膜片钳技术中的细

胞贴附式膜片钳制方式 (cell-attached patch clamping) 相似。但最终形成的封接电阻较低, 约为 $20 \sim 40 \text{ M}\Omega$ (一般的膜片钳实验要求形成的封接电阻为 $1 \text{ G}\Omega$ 以上)。关键之处在于, 电极尖端在靠近细胞膜时要非常小心, 既要避免形成高阻抗封接 (以免变形影响局部的兴奋-收缩耦联关系), 又要保证能稳定钳制局部斑片膜的电压。其目的在于定点激发局部钙释放, 且可通过改变钳制电压自由控制激发条件。此技术与共聚焦显微镜钙成像技术相结合即为 loose-patch 方法 (图 1), 可对兴奋-收缩耦联过程中钙释放的基本事件即钙火花进行精确观察。②共聚焦线扫描先进行一小段时间 (如 $\sim 50 \text{ ms}$), 获得的图像作为激发前对照。③共聚焦成像系统触发膜片钳系统工作, 使膜去极化至设定的膜电压水平 (如 $\sim -30 \text{ mV}$) 并持续一段时间 (如 100 ms), 记录此过程的钙信号变化。

1.7 图像处理和数据分析

实验结果均为共聚焦显微镜线扫描图像。钙火花的探测和数据处理均采用自编的程序。编程语言为 IDL (Interactive data language, research systems, Inc.)。钙火花的幅度以标准荧光强度的净变化 $\Delta R = \Delta F / F_0$ 表示, 其中 F_0 指静息状态下 fluo-4 的背景荧光强度^[5,9]。钙火花的平均叠加方法为: 将钙火花以其峰值所在位置为中心截取相同大小的钙火花图像, 将图像叠加平均即得平均的钙火花图像 (图 2A&B 上)。统计方法为 Student t test, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 自发钙火花的形态特征

图 1A 右中箭头所指的局部区域为典型的自发钙火花记录, 其基本特征是具有一定的空间范围, 持续一定的时间, 亮度随空间和时间的不同而发生变化。自发钙火花的产生在时空范围上均具有较大的随机性, 因此钙火花可出现于激光共聚焦线扫描过程中的任何时刻和任何钙释放位点处。为更好地了解自发钙火花的总体特征, 我们将随机获得的 69 个自发钙火花进行叠加平均处理 (图 2B 上), 并显示通过钙火花中心的局部范围内的平均的空间范围曲线 (图 2B 上 - W_s) 和时间变化曲线 (图 2B 中)。而图 2B 下则以表面曲线 (surface plot) 的方法更直观地显示自发钙火花的时空特性。

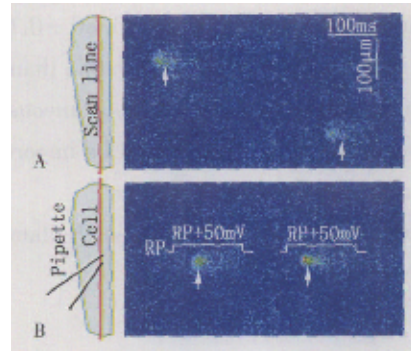


图 1 诱发钙火花和自发钙火花的记录

Fig. 1 Recording of spontaneous Ca^{2+} sparks and evoked Ca^{2+} sparks

A. Spontaneous Ca^{2+} sparks, note two typical sparks in the line-scan image. B. Evoked Ca^{2+} sparks at membrane potential of $\sim -30 \text{ mV}$, two activations by two depolarization pulses, note the locations of the pipette tip and the igniting sites of the evoked Ca^{2+} sparks are in the same horizontal line. Left: experiment setup, showing the cell model and the locations of scan line and the pipette tip. Right: line-scan images. Arrow shows the location of spark $\text{RP} = -80 \text{ mV}$

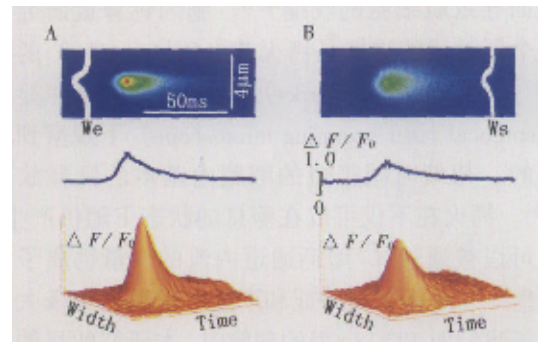


图 2 平均诱发钙火花与自发钙火花特征比较

Fig. 2 Averaged spontaneous Ca^{2+} spark and evoked Ca^{2+} spark

A. Averaged evoked Ca^{2+} sparks at membrane potential of $\sim -30 \text{ mV}$ from 120 activations. B. Averaged spontaneous Ca^{2+} sparks from 69 activations. From top to bottom, averaged line-scan images of Ca^{2+} sparks, time courses of the averaged Ca^{2+} sparks, and surface plots of the averaged Ca^{2+} sparks. W_e : spatial profile of the averaged evoked Ca^{2+}

2.2 诱发钙火花的形态特征

图 1B 右中箭头所指的局部区域为两个从静息膜电位 ($\sim -80 \text{ mV}$) 去极化至 $\sim -30 \text{ mV}$ 、持续时间 $\sim 100 \text{ ms}$ 的脉冲刺激所诱发的典型钙火花, 其基本特征也是具有一定的空间范围, 持续一定的时间, 亮度随空间和时间的不同而发生变化。但由图可看到, 诱发的钙火花的时空范围特别是空间范围要比自发的钙火花的小一些。还有, 虽然诱发钙火花的产生在时间上是随机的 (指钙火花可以在去极化脉冲持续时程内的任何时刻产生), 但在空间上是固定的 (即只产生于微电极尖

端下受去极化脉冲影响到的一个小范围内)。同样地,为更好地了解诱发钙火花的总体特征,我们将随机获得的 120 个诱发钙火花进行叠加平均处理(图 2A 上),并显示通过钙火花中心的局部范围内的平均的空间范围曲线(图 2A 上 -We)和时间变化曲线(图 2A 中)。而图 2A 下则以表面曲线(surface plot)的方法更直观地显示诱发钙火花的时空特性。

2.3 自发钙火花与诱发钙火花的形态特征比较

我们测量了钙火花的 5 个主要特征,即钙火花

的幅度(amplitude, A , 单位以 $\Delta F/F_0$ 表示)上升时间(rising time, RT , 指钙火花起始处到峰值处所经历的时间)平均上升速率(mean rising rate, MRR , $MRR = A/RT$ 即 $r_{MR} = A/t_r$)持续时间(以图 2A&B 中的时间变化曲线中高于峰值 1/2 的曲线部分所持续的时间计算^[11],以 t_{50} 表示)和空间范围(以图 2A&B 上的空间变化曲线 We 和 Ws 中高于峰值 1/2 的曲线部分所对应的距离计算^[11],以 $Width$ 表示)。结果如下表。

表 1 自发钙火花与诱发钙火花的比较

Table 1 Comparison between spontaneous Ca^{2+} sparks and evoked Ca^{2+} sparks

		Amplitude ($\Delta F/F_0$)	t (rise time)/ms	Mean rising rate	t_{50} /ms	$l_{width}/\mu m$
Spontaneous ($n = 69$)	Mean	0.80	17.66	0.045	22.27	1.94
	SE	0.06	1.03	0.008	1.85	0.08
Evoked ($n = 120$)	Mean	1.00 ¹⁾	16.13	0.062 ¹⁾	20.35	1.35 ¹⁾
	SE	0.05	0.49	0.006	0.66	0.05

1) Compared with spontaneous Ca^{2+} sparks, $P < 0.05$

由表中数据可以看到,总体上,在相同条件下共聚焦显微镜线扫描方式记录到的自发钙火花与诱发钙火花的基本特征相似;但诱发钙火花的幅度高于自发钙火花的幅度(1.00 ± 0.05) vs (0.80 ± 0.06), $P < 0.05$),而空间扩散范围则小于自发钙火花的空间范围(1.35 ± 0.05) μm vs (1.94 ± 0.08) μm , $P < 0.05$)。

3 讨 论

实验证明产生心肌细胞钙火花的钙均来源于肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)内储存的钙,SR膜上的 $RyRs$ 是胞内的钙释放通道^[5,8]。自发钙火花因 $RyRs$ 的随机开放而产生,正常情况下其产生概率较低^[8]。后来的研究发现,通过细胞膜上 L -型钙通道内流的少量钙可以钙诱导钙释放(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR)的方式诱发钙火花的产生^[7]。为观察到单个孤立的诱发钙火花,研究者需要在降低胞外钙浓度或利用药物(如 L -型通道阻断剂)大幅减少 L -型钙通道开放概率的情况下以较弱的刺激来激发胞内的钙释放。但这种方法诱发的钙火花与自发钙火花一样都是在全细胞的范围内随机产生的,因而存在一个难以克服的弱点:无法将共聚焦线扫描的扫描线准确地置于钙火花发生的局部,因此难以测量钙火花的确切特征^[1,6]。从理论上分析,正常情况下自发钙火花与诱发钙火花的形态特征

在客观上应该是没有明显差别的。但以往记录的钙火花的幅度由于方法学的限制而被低估,空间范围则被高估^[6]。本研究中采用的 loose-patch 方法诱发的钙火花可以被激光共聚焦显微镜准确记录。结果发现,诱发钙火花的幅度高于自发钙火花的幅度,而空间范围的情况则相反。这样的结果与预期是一致的。但我们也注意到,以往有关的研究结果认为自发钙火花的幅度约为 1.00^[12],高于本研究得到的数值(0.80),这可能与本研究所采用的激光共聚焦系统和荧光染料较灵敏,能探测到较弱的钙释放事件有关。准确记录诱发钙火花的方法有利于纠正和深化人们对钙火花本质特征的认识。实际上,我们刚完成的研究^[6]已经证实,钙火花在幅度和上升速率上具有多态性,这结束了长期以来关于钙火花是否可变的争论。综上所述,钙火花的研究对于理解胞内钙信号的实质意义重大,同时也提醒我们,做有关的数据分析时要特别注意方法学对于钙火花真实特征的影响。

参考文献:

- [1] Cheng H, Shen J X. Calcium sparks in heart muscle cells [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2004, 25(5): 387-9, 394.
- [2] Ganong W F. Hormonal control of calcium metabolism & the physiology of Bone[A]. In: Ganong W F, ed. Review of Medical Physiology[M]. 29th ed. USA: McGraw-Hill,

- 2001, 369-82.
- [3] Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling[J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 198-205.
- [4] 沈建新, 王世强, 程和平, 等. Thapsigargin 对心肌细胞钙释放和肌浆网钙容量的时间效应[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(1): 19-23.
- [5] Cheng H, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle[J]. *Science*, 1993, 262(5134): 740-4.
- [6] Shen J X, Wang S Q, Song L S, *et al.* Polymorphism of Ca^{2+} sparks evoked from in-focus Ca^{2+} release units in cardiac myocytes[J]. *Biophys J*, 2004, 86(1): 182-90.
- [7] Wier W G, Balke C W. Ca^{2+} release mechanisms, Ca^{2+} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle[J]. *Circ Res*, 1999, 85(9): 770-6.
- [8] Cheng H, Wang S Q. Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells[J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d1867-78.
- [9] Wang S Q, Song L S, Lakatta E G, *et al.* Ca^{2+} signalling between single L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in heart cells[J]. *Nature*, 2001, 410(6828): 592-6.
- [10] Zhou Y Y, Wang S Q, Zhu W Z, *et al.* Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(1): H429-36.
- [11] Song L S, Stern M D, Lakatta E G, *et al.* Partial depletion of sarcoplasmic reticulum calcium does not prevent calcium sparks in rat ventricular myocytes[J]. *J Physiol*, 1997, 505(Pt 3): 665-75.
- [12] Cannell M B, Soeller C. Mechanisms underlying calcium sparks in cardiac muscle[J]. *J Gen Physiol*, 1999, 113(3): 373-6.
- (编辑 张敏瑞)
-
- (上接第 389 页 from page 389)
- universality of calcium signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(1): 11-21.
- [5] Cheng H, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle[J]. *Science*, 1993, 262(5134): 740-4.
- [6] Cheng H, Lederer M R, Lederer W J, *et al.* Calcium sparks and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(1 Pt 1): C148-59.
- [7] Cheng H, Wang S Q. Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells[J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d1867-78.
- [8] Cannell M B, Cheng H, Lederer W J. The control of calcium release in heart muscle[J]. *Science*, 1995, 268(5213): 1045-9.
- [9] Stern M D. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle[J]. *Biophys J*, 1992, 63(2): 497-517.
- [10] Shen J X, Wang S Q, Cheng H P, *et al.* Time-dependent effects of thapsigargin on cardiac intracellular Ca^{2+} release and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content[J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2004, 25(1): 19-23.
- [11] Cannell M B, Cheng H, Lederer W J. Spatial non-uniformities in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes[J]. *Biophys J*, 1994, 67(5): 1942-56.
- [12] Shen J X, Wang S, Song L S, *et al.* Polymorphism of Ca^{2+} sparks evoked from in-focus Ca^{2+} release units in cardiac myocytes[J]. *Biophys J*, 2004, 86(1): 182-90.
- [13] Wang S Q, Song L S, Lakatta E G, *et al.* Ca^{2+} signalling between single L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in heart cells[J]. *Nature*, 2001, 410(6828): 592-6.
- [14] Santana L F, Cheng H, Gomez A M, *et al.* Relation between the sarcolemmal Ca^{2+} current and Ca^{2+} sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling[J]. *Circ Res*, 1996, 78(1): 166-71.
- [15] Bridge J H, Ershler P R, Cannell M B. Properties of Ca^{2+} sparks evoked by action potentials in mouse ventricular myocytes[J]. *J Physiol*, 1999, 518(Pt 2): 469-78.
- [16] Cheng H, Cannell M B, Lederer W J. Partial inhibition of Ca^{2+} current by methoxyverapamil (D600) reveals spatial nonuniformities in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes[J]. *Circ Res*, 1995, 76(2): 236-41.
- [17] Pratusевич V R, Balke C W. Factors shaping the confocal image of the calcium spark in cardiac muscle cells[J]. *Biophys J*, 1996, 71(6): 2942-57.
- [18] Smith G D, Keizer J E, Stern M D, *et al.* A simple numerical model of calcium spark formation and detection in cardiac myocytes[J]. *Biophys J*, 1998, 75(1): 15-32.
- [19] Cleemann L, DiMassa G, Morad M. Ca^{2+} sparks within 200 nm of the sarcolemma of rat ventricular cells: evidence from total internal reflection fluorescence microscopy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 430: 57-65.
- [20] Nagai T, Sawano A, Park E S, *et al.* Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} [J]. *PNAS*, 2001, 98(6): 3197-202.
- (编辑 张敏瑞)