

· 实验研究 ·

用荧光染料 fura-2 法测定 心室肌细胞内游离钙离子浓度

潘敬运 黄晓笛 詹澄扬

(生理学教研室)

提 要 用 fura-2 荧光染料测定了静息时的酶解分离心室肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, 40 mM KCl 和 5mM 咖啡因都能使心室肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加, 但 KCl 增加游离 Ca^{2+} 浓度需要细胞外液中存在 Ca^{2+} , 而咖啡因则否, 提示 KCl 增加细胞内游离 Ca^{2+} 浓度可能是通过细胞外 Ca^{2+} 内流, 咖啡因则使细胞内贮存 Ca^{2+} 释放。

关键词 心室肌细胞 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 KCl 咖啡因

细胞内钙离子 (Ca^{2+}) 是重要的细胞信使, 参与许多重要的生理过程。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度取决于细胞外的 Ca^{2+} 内流和细胞内 Ca^{2+} 释放。细胞外的 Ca^{2+} 内流通过电压依从性钙通道和受体操纵钙通道^[1-3]。

本研究用荧光染料 fura-2 法测定游离心室肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, 观察 KCl 引起的去极化和咖啡因对细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响。

材 料 与 方 法

游离心室肌细胞的制备

实验用 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 120~150g。在戊巴比妥钠麻醉后, 剪开胸腔取出心脏, 用改良 Langendorff 灌流装置, 通过主动脉插管灌流心脏。灌流液由 Joklik 培养液、10mM HEPES 和 1.25mM CaCl_2 组成。用 5% CO_2 + 95% O_2 混合气饱和灌流液。灌流温度为 37℃, pH 约 7.4。用上述灌流液灌流 5min 后, 改用无钙灌流液灌流。5min 后加入 1 型胶原酶 (125 单位/ml) 和牛血清蛋白 (BSA) 1mg/ml 到灌流液中, 维持循环灌流 20min。此后, 以递增方式, 每隔 5min 加入 1.0mM 或 0.5mM CaCl_2 溶液, 使灌流液的 CaCl_2 浓度在 20min 内增加至 1.25mM。总消化时间约 40~45min。消化完毕后, 分离心室肌细胞, 再将获得的心室

肌细胞重新悬浮于新鲜配制含 2% BSA 的有钙灌流液中。在显微镜下可见 75% 以上细胞呈典型杆状, 横纹清晰。将细胞置细胞培养瓶内, 在室温下培养备用。

细胞内 Ca^{2+} 浓度测定

1. fura-2 荷载 (loadidg) 用离心方法 (100g, 1min) 浓集细胞, 用 1% BSA 的灌流液稀释, 使含 5×10^4 个/ml 细胞。然后加入 fura-2/AM (Sigma) 4 μg , 在 37℃ 恒温水浴震荡器中震荡 40min, 使 fura-2/AM 进入细胞并充分反应。然后用离心沉淀细胞, 弃去含 fura-2/AM 上清液, 用含钙灌流液冲洗 2~3 次, 再将细胞置于不含 fura-2/AM 的有钙灌流液中 10 min (室温)。

2. 测定细胞内游离钙浓度 将细胞移至 Krebs-Henseleit 溶液中, 溶液成分 (以 mM 单位) 98 NaCl, 10 NaHCO_3 , 10 NaH_2PO_4 , 4.7 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 1.25 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 葡萄糖, 用 5% CO_2 + 95% O_2 混合气饱和和后加 1% BSA (pH 约 7.4)。将细胞浓度稀释至 $1 \sim 2 \times 10^4$ /ml。

用荧光分光光度计 (Hitachi) 测定荧光, 激发波长 340nm, 裂隙宽度 3nm, 发射波长 500nm, 裂隙宽度 10nm。将细胞移入石英杯内, 用磁珠搅拌以维持细胞悬浮, 测试温度为 37℃, 10min 平衡后加入 40mM KCl, 或 5mM

咖啡因。最后加入33μg/ml Digitonin 测得最大荧光强度 (Fmax), 再加入10mM EGTA 测得最小荧光强度 (Fmin)。细胞内游离 Ca²⁺ 浓度 [Ca²⁺]_i 按下式计算:

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

Kd 为解离常数(224nM)。F为测定荧光强度(图1)。

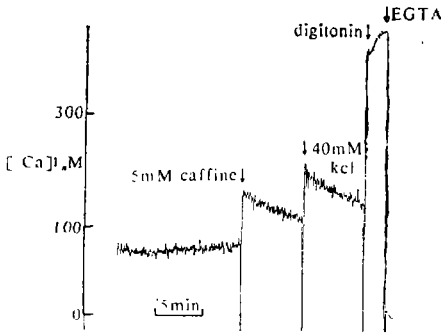


图1 先加咖啡因和后加 KCl 对心室肌细胞内游离钙浓度的作用

结 果

静息时心室肌细胞内游离 Ca²⁺ 浓度

静息时 2 组心室肌细胞内游离 Ca²⁺ 浓度分别为 99.5 ± 2.4nM 和 94.5 ± 2.4nM。

KCl 或咖啡因对心肌细胞内游离钙浓度的作用

加入40mMKCl 或 5mM 咖啡因到无细胞混悬液中对荧光没有影响(图2), 在细胞混悬液中加入40mM KCl 使细胞内游离 Ca²⁺ 浓度增加至 245 ± 43nM, 再加入咖啡因后细胞内游离钙浓度进一步增加(425.8 ± 61nM)(图3), 先加入5mM 咖啡因后加入 40mM KCl 亦有类似作用(图1)。

预先加入 EGTA 于悬浮液中以络合细胞外 Ca²⁺ 后, 加入40mM KCl 不能使心肌细胞荧光强度升高, 再加入咖啡因可使荧光强度升高(图4)。

讨 论

fura-2 是新一代的荧光染料, 可用于测定细胞内游离Ca²⁺浓度^[4]。本文用 fura-2法测定心肌细胞内游离钙浓度, 在1小时内其荧光强

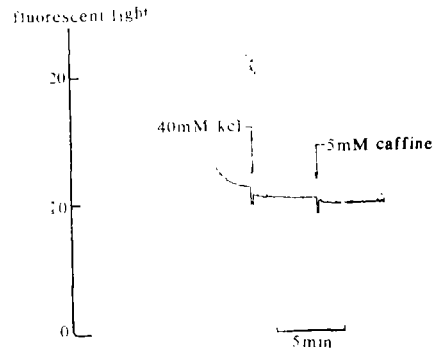


图2 40mM KCl 和 5mM 咖啡因对悬浮液荧光的作用

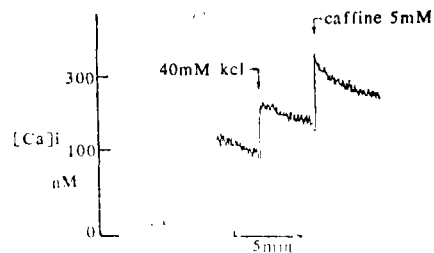


图3 先加 KCl 和后加咖啡因对心室肌细胞内游离钙浓度的作用

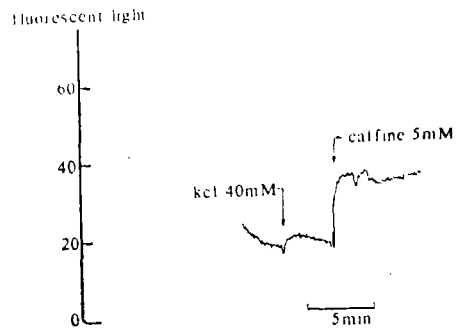


图4 在悬浮液中加入EGTA络合 Ca²⁺ 后, KCl 和咖啡因对心室肌细胞内游离钙浓度的作用

度不变(图5), 表明心室肌细胞功能良好。KCl 和咖啡因本身无荧光。我们测定的静息时心室肌细胞内游离钙浓度分别为 94.5 ± 2.4nM 和 99.5 ± 2.4nM, 比 Young^[5] 等报道的静息时心室肌细胞 67 ± 26nM 稍高, 比 Wier^[6] 等报道 134 ± 43nM 稍低。

细胞内游离 Ca²⁺ 浓度受电压依从性钙通道的影响。我们观察到40mM KCl 使心室肌细胞内游离 Ca²⁺ 明显升高。用 EGTA 络合了

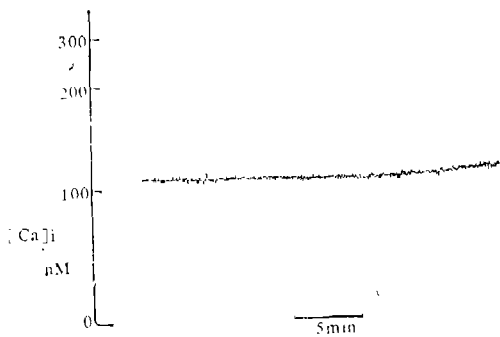


图5 大鼠心室肌细胞内游离钙浓度

的细胞外的 Ca^{2+} 后, 40mM KCl 不再引起细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高, 表明 KCl 引起细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高需要细胞外 Ca^{2+} 存在, 是 Ca^{2+} 内流造成的。因为钙拮抗剂硝吡啶 (nifedipine) 可抑制 KCl 引起的细胞内游离钙浓度升高^[7]。40mM KCl 使心室肌细胞去极化, 细胞外 Ca^{2+} 通过电压依从性钙通道进入细胞内, 引起细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高。咖啡因可使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高。这种升高不受细胞外 Ca^{2+} 浓度影响, 因为除去细胞外 Ca^{2+} 后, 咖啡因仍可使细胞内游离 Ca^{2+} 升高。据报道, 咖啡因可使肌浆网 Ca^{2+} 池释放 Ca^{2+} 和抑制肌浆网摄取 Ca^{2+} ^[8]。可见咖啡因是释放细胞内 Ca^{2+} 池的 Ca^{2+} 引起细胞内游离钙浓度升高。

MEASUREMENT OF THE INTRACELLULAR FREE CALCIUM CONCENTRATION OF VENTRICULAR MYOCYTES WITH FLUORESCENT DYE FURA-2

Pan Jingyun Huang Xiaodi Zhan Chengyang

(Department of Physiology)

The intracellular free calcium concentration in the resting ventricle myocytes of rat was measured with fluorescent dye fura-2. Both 40mM KCl and 5mM caffeine increased the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ of the ventricular myocytes. The rise in the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ by KCl was dependent on the presence of the extracellular calcium, however, the rise in the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ by caffeine was not, suggesting that the increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ by KCl may be due to Ca^{2+} influx through voltage dependent calcium channels and caffeine may cause the release of calcium from intracellular calcium stores.

Key words Cardiac ventricular myocyte Intracellular free calcium concentration
KCl Caffeine

参 考 文 献

- [1] Hofmann F, et al. Regulation of the L-type calcium channel. TIPS 1987;8:393.
- [2] Taylor C W. Receptor regulation of calcium entry. TIPS 1987;8:79.
- [3] Rink J J. A real receptor-operated calcium channel? Nature 1988;334:649.
- [4] Grynkiewicz G, et al. A new generation of Ca^{2+} indicator with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 1986; 260:3440.
- [5] Young M B D, Scarpa A. Extracellular ATP induces Ca^{2+} transients in cardiac myocytes which are potentialized by norepinephrine. FEB 1987;223:53.
- [6] Beuckmann D J Wier W S. Voltage dependence of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ transients in guinea pig ventricular myocytes. Cir Res 1987;61:148.
- [7] Young M B D, Scarpa A. ATP receptor-induced Ca^{2+} transients in cardiac myocytes: Sources of mobilized Ca^{2+} . Am J Physiol 1989; 257: C750.
- [8] Konishi M, et al. The effects of caffeine on tension development and intracellular calcium transients in rat ventricular muscle. J Physiol 1984;355:605.