

单细胞内 Ca^{2+} 时空变化的激光共聚焦显微测定*

杨小毅 颜 坤¹⁾ 黄有国²⁾

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 应用激光扫描共聚焦显微系统 (LSCM) 和 Fluo-3/AM 荧光探针标记技术, 测定了单个活细胞胞内游离 Ca^{2+} 的动态变化与立体分布影像。结果显示, 在 37°C , Fluo-3/AM 终浓度为 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的条件下, C57BL/6J 小鼠巨噬细胞负载 1 h 左右即可获得良好的标记效果。相反, 若探针浓度太高或负载时间太长, 胞内荧光强度太强, 影响在共聚焦显微镜镜下分辨细胞内结构。因此用 LSCM 研究细胞内游离 Ca^{2+} 变化时, 荧光探针的负载应以获得最适荧光信号而不是以最大荧光强度为标准。上述方法在其他如平滑肌细胞、卵母细胞中的测定亦获得满意的结果, 这对进一步研究各种生理和病理条件下细胞内 Ca^{2+} 信号的动态变化、与跨膜 Ca^{2+} 梯差的关系及对活细胞功能活动的调节提供了一种可行的、直观的研究手段。

关键词 胞内 Ca^{2+} , 激光扫描共聚焦显微系统 (LSCM), Fluo-3/AM

细胞内游离 Ca^{2+} 不仅作为一种重要的第二信使广泛参与细胞的运动、分泌、代谢和分化等多种细胞功能活动的调节^[1]; 而且胞内游离 Ca^{2+} 浓度的变化与调控对于参与维持存在于细胞质膜或细胞器膜两侧的跨膜 Ca^{2+} 梯差, 介导细胞对外界刺激的应答反应, 实现信息跨膜转导也具有重要的调节作用^[2~4]。因此, 在完整细胞上准确测定胞内游离 Ca^{2+} 浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动态变化及运动方式, 其重要性是显而易见的。目前用于测定细胞内 Ca^{2+} 的技术主要包括原子吸收光谱、电子微区 X 射线及能谱、离子选择性微电极、发光光谱和荧光 Ca^{2+} 指示探针等方法。以往由于实验手段的限制, 研究细胞内 Ca^{2+} 变化的报道多用荧光探针检测群体细胞胞浆 Ca^{2+} 平均浓度的变化。上述这些相对静态的观察方法实际上并不能准确地反映细胞内 Ca^{2+} 信号的时、空传递过程。近年来激光扫描共聚焦显微镜系统 (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 的问世为观察单个细胞内 Ca^{2+} 水平的时空变化提供了先进的研究工具, 使研究细胞内 Ca^{2+}

的动态变化与运动方式成为可能^[5]。

因此, 本工作应用 LSCM 和 Fluo-3/AM 荧光探针标记技术, 测定了单个活巨噬细胞内 Ca^{2+} 的立体分布影像, 和外源性刺激剂如 K^{+} 诱导胞浆游离 Ca^{2+} 的动态变化, 国内尚未见报道。这为进一步探讨巨噬细胞激活过程中 Ca^{2+} 的细胞内传递及 Ca^{2+} 梯差变化的作用建立了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

Fluo-3/AM 购自 Molecular Probes 公司; Pluronic F-127、A23187 购自 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基, 新生胎牛血清购自 Gibco 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 巨噬细胞培养

C57BL/6J 小鼠 [δ , (20 ± 2) g] 购自中

*国家自然科学基金资助。

¹⁾中国科学院生物物理研究所神经生物学研究室, 北京 100101。

²⁾通讯联系人。

收稿日期: 1995-10-12, 修回日期: 1996-05-09

国医学科学院动物实验中心. 将小鼠腹腔注射无血清 RPMI 1640 培养液, 4 d 后断颈处死小鼠, 无菌条件下采集腹腔浸出液, 1000 r/min 离心 10 min. 收集细胞后, 用含 10% 血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 3 h 后, 换液去除不贴壁的细胞 (淋巴细胞和肥大细胞), 贴壁细胞即为巨噬细胞, 按实验室常规方法培养 2 d 后进行实验.

1.3 Fluo-3/AM 负载

细胞以 RPMI 1640 培养基配成大约 1×10^7 /ml, 培养基中含终浓度为 6 μ mol/L 的 Fluo-3/AM, 加入 1 μ l 25% pluronic F-127, 在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h, 其间轻轻振荡几次, 然后以无血清 RPMI 1640 洗 3 次, 以除去细胞外的 Fluo-3/AM.

1.4 Ca²⁺ 立体分布影像的 LSCM 测定

LSCM 激光扫描共聚焦显微镜系统 (德国 Zeiss 公司) 由共聚焦显微镜主体、激光器 (Argon 激光和 He-Ne 激光) 和微型计算机构成. 激光束的扫描与控制以及图象数据的采集和加工均由计算机完成. 将负载好荧光探针的细胞放入激光共聚焦扫描显微镜测定小室, 激发波长 488~514 nm, 在镜下确定检测细胞的视野, 并在监视器上显示. 激光扫描光切按每片厚度为 0.7 μ m 进行, 然后用伪彩色重叠方法来显示重建的 Ca²⁺ 立体分布影像.

1.5 Ca²⁺ 动态变化的 LSCM 测定

仪器工作条件、荧光染料负载同上所述, 确定扫描时间间隔和总时间. 开始扫描待基线平稳后, 将刺激剂滴于玻片上, 继续动态观察, 每一细胞或一组细胞的荧光强度时间曲线由图象分析软件获得.

2 结果与讨论

2.1 Ca²⁺ 荧光指示剂 Fluo-3 的负载

Fluo-3 及 Fluo-3/AM 是近年来合成的新一代 Ca²⁺ 荧光指示剂^[6,7] (图 1), 分子质量为 781, 激发波长 503~506 nm, 发射波长 526 nm; 与 Quin2、Indo-1 和 Fura-2 等荧光探针相比, 它具有明显的优点: a. 可以用可见

光激发; b. 激发光谱和发射光谱不漂移; c. 当与 Ca²⁺ 结合时其荧光增强 40 倍, 与 Ca²⁺ 的亲和力 K_d 为 400 nmol/L, 所以可以测定 5~10 μ mol/L 范围 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态变化.

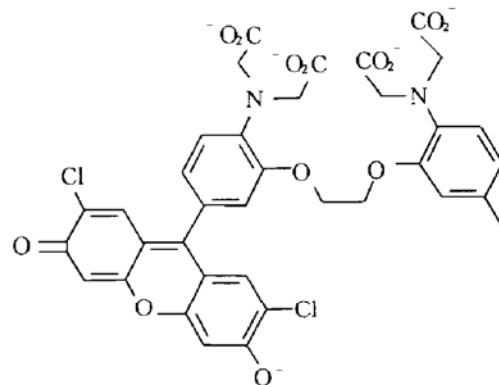


图 1 Ca²⁺ 荧光指示剂 Fluo-3 的结构

在 37℃, Fluo-3/AM 终浓度为 6 μ mol/L 的条件下, 细胞负载 1 h 左右即可获得良好的标记效果. 相反, 若探针浓度太高或负载时间太长, 胞内荧光强度太强, 影响在共聚焦显微镜镜下分辨细胞内结构. 因此用 LSCM 研究细胞内游离 Ca²⁺ 变化时, 荧光探针的负载应以获得最适荧光信号而不是以最大荧光强度为标准.

负载后细胞内荧光探针的外泄是制约用 Ca²⁺ 荧光指示剂测定细胞内游离 Ca²⁺ 浓度方法的主要因素. 应用 LSCM 可以极为方便的直接观察探针外泄情况, 我们的实验发现, 用 Fluo-3/AM 负载的细胞 30 min 内外泄率小于 3%, 保证了动态观察细胞内游离 Ca²⁺ 浓度变化的准确性.

2.2 LSCM 能直观地观察细胞内 Ca²⁺ 立体分布

激光扫描共聚焦显微镜系统系利用激光扫描技术, 使一束激光经过光源针孔, X、Y 扫描器和物镜之后, 聚焦到样品的某一深度即焦平面上, 其反射光再聚焦经观察针孔至成像面. 由于与两个聚焦光点相应的光源针孔和观察针孔孔径都非常小, 二者只有同步动作对准后才能获得清晰的共聚焦显微图像, 因此具有较好的空间分辨率. 这就为研究 Ca²⁺ 在细胞

内的立体分布提供了良好的条件^[8]。

以 Fluo-3 标记巨噬细胞后, 应用 LSCM 测定胞浆内 Ca^{2+} 的立体分布影像变化, 随着激光扫描切面的深入, 细胞各个切面 Ca^{2+} 荧光信号的分布与强度是不同的。图 2 所显示的

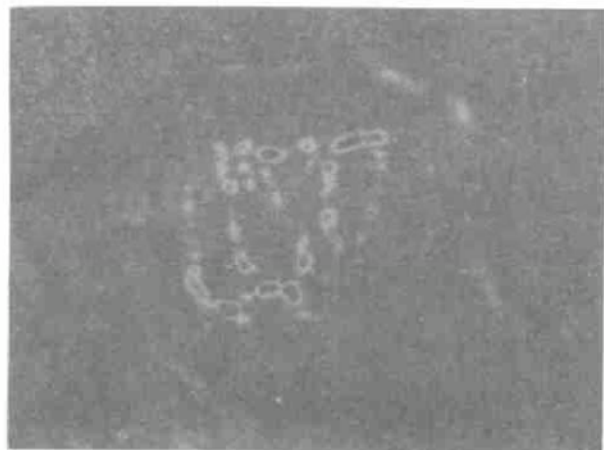


图 2 单个巨噬细胞内 Ca^{2+} 分布的激光扫描共聚焦显微影像
单一激光扫描切面 $8\ \mu\text{m}$ 。

即为一帧经细胞中部 (深度为 $8\ \mu\text{m}$) 扫描得到的共聚焦显微图象, 由图 2 清晰可见, 在静息状态下以白色透明的荧光信号所显示的 Ca^{2+} 在细胞内的分布并不是均匀的, 只是在局部区域显示荧光信号 (如为彩色照片则会因荧光强度的不同显示为彩色信号); 将不同激光扫描切面的巨噬细胞内 Ca^{2+} 分布影像, 用伪彩色重叠的方法进行三维图象重建, 即得到巨噬细胞内 Ca^{2+} 立体分布影像 (图 3)。用立

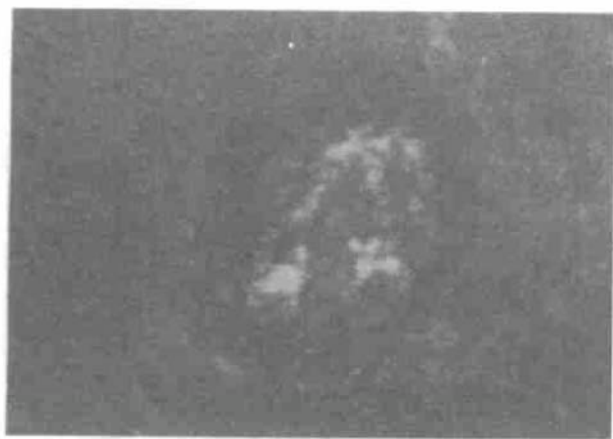


图 3 经伪彩色重叠的单个巨噬细胞内 Ca^{2+} 细胞内立体分布影像
此照片用彩色底片冲印。

体眼镜可观察到细胞内不同横断面 Ca^{2+} 荧光信号差别也很大, 提示不仅细胞质膜两侧存在 Ca^{2+} 梯差, 而且细胞内不同深度或层次间也存在不同程度的局部区域间 Ca^{2+} 梯差。A23187 是一种 Ca^{2+} 载体, 能将细胞外 Ca^{2+} 导入细胞内。当加入 A23187 后, 细胞内、外 Ca^{2+} 浓度达到了平衡, Ca^{2+} 梯差被消除。因荧光染料仅存在于细胞内而细胞外没有, 所以, 细胞内显示出很强的荧光, 几乎遍布整个细胞, 我们可以 A23187 诱发的 Ca^{2+} 在细胞内、外达平衡状态时的荧光变化作为校正测量的标准 (图略)。

2.3 单个活细胞内 Ca^{2+} 动态变化的测定

Ca^{2+} 信号的细胞内传递过程是一个复杂的时、空传递过程。用激光扫描共聚焦显微镜系统还可以在单个活细胞水平观察外源性刺激物诱发的细胞内 Ca^{2+} 的动态变化过程。当用 $1\ \text{mmol/L}\ \text{K}^+$ 刺激细胞后, 在显微镜下选择细胞内胞浆区的一个局部区域, 测定 Ca^{2+} 的动态变化, 由图 4 可见, 细胞内游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈

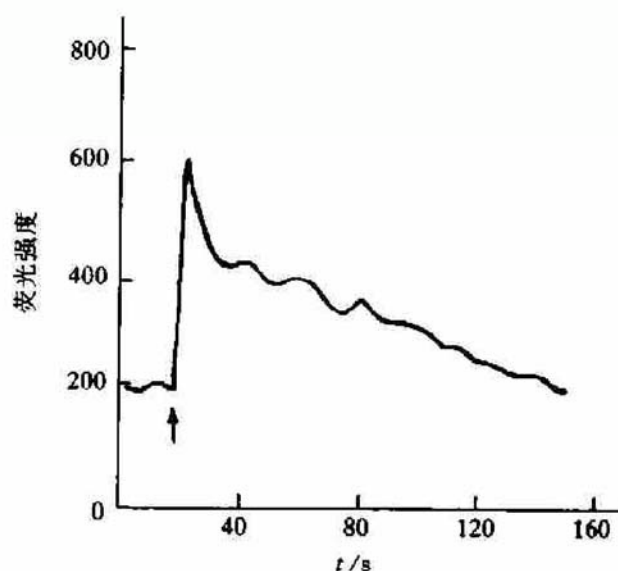


图 4 K^+ 诱导的单个巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 动态变化

尖峰状迅速升高, 达到高峰后开始缓慢呈波动下降。这也提示跨细胞质膜两侧的 Ca^{2+} 梯差随外源性刺激发生了明显变化。用这种方法还可以进一步研究各种生理、生化因素 (如激素、多肽、低密度脂蛋白以及核苷酸等) 刺激单个活细胞所诱发的细胞内 Ca^{2+} 振荡、 Ca^{2+}

波等 Ca^{2+} 信号的时间、空间传递的动态过程 (另文报道)。

上述实验结果表明, 用荧光探针 Fluo-3/AM 标记细胞内 Ca^{2+} 的方法, 用激光扫描共聚焦显微镜非常直观地观察到单个巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 的时、空分布和变化。这里所述的方法在其他如平滑肌细胞、卵母细胞中的测定亦获得满意的结果, 这为进一步研究各种生理和病理条件对细胞内 Ca^{2+} 动态平衡的调节和影响提供了一种非常直观的研究手段。

参 考 文 献

- 1 Clapham D E. Cell, 1995; 80: 259
- 2 Yang F Y, Tu Y P. Biochem Biophys Res Commun, 1991; 175: 366
- 3 Fan G F, Huang Y G, Bai Y H *et al.* FEBS Lett, 1995; 357: 13
- 4 Yang X Y, Fan G F, Huang Y G *et al.* Chin Sci Bull, 1996; 41: 338
- 5 Hernandez-Cruz A, Sala F, Adams P R. Science, 1990; 247: 858
- 6 Kao J P Y, Harootunian A T, Tsien R Y. J Biol Chem, 1989; 264: 8179
- 7 Lakowicz J R, Szmajda H, Johnson M L. J Fluorescence, 1992; 2: 47
- 8 Diliberto P A, Herman B. Biophys J, 1993; 64: A130

A Powerful Method for the Determination of the Spatial and Temporal Changes of Intracellular Ca^{2+} in Single Living Cells by Laser Scanning Confocal microscopy. Yang Xiaoyi, Yan Kun, Huang Youguo (National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics,

Academia Sinica, Beijing 100101, China).

Abstract Procedures for the determination of the spatial distribution and the dynamic changes of intracellular Ca^{2+} signaling in single intact living cells are described using laser scanning confocal microscopy (LSCM) and the highly fluorescent Ca^{2+} -sensitive dye, fluo-3/AM. The duration, dye concentration, and requirement for Pluronic are determined empirically for the loading conditions. It is especially important for the proper intracellular dye concentration to provide adequate signal strength for detection while not to disturb normal intracellular physiology. For example, in C57BL/6J macrophages, it was found that cells cultured on glass cover slips were incubated for 1 h at 37°C with 6 $\mu\text{mol/L}$ fluo-3/AM, resulting in excellent LSCM imaging of intracellular Ca^{2+} . The similar results have been successfully obtained by this method for other types of cells such as vascular smooth muscle cells, Chinese hamster oocytes. It may provide an available, visual experimental approach for investigation into the dynamic changes of Ca^{2+} signal and their relationship to transmembrane Ca^{2+} gradient in living cells under the physiological and pathological conditions.

Key words intracellular Ca^{2+} , laser scanning confocal microscopy (LSCM), fluo-3/AM

T-2 毒素对心肌细胞三型钙通道的阻滞作用

彭双清 张文杰 杨进生

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 用膜片钳连细胞电压钳法, 在培养的 Wistar 大鼠单个心肌细胞上记录了 T-2 毒素对 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道单通道电活动的影响。结果表明, T-2 毒素浓度为 10 mg/L 时, 心肌细胞 B、L 和 T 三