

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

型 Ca^{2+} 通道均受到明显的阻滞, 其阻滞作用表现为使 Ca^{2+} 通道的开放概率减小, 开放时间缩短, 关闭时间延长, 而对流过 Ca^{2+} 通道的 Ba^{2+} 流幅值无影响.

关键词 镰刀菌毒素, T-2 毒素, 心肌细胞, 钙通道, 膜片钳技术

单端孢霉烯族毒素对机体各组织器官具有广泛的生物学效应, T-2 毒素是其中毒性最强的毒素之一. 它的毒性效应器官主要包括免疫系统^[1]、造血系统^[2]、消化系统^[3]和心血管系统^[4], 破坏分裂旺盛的组织器官, 如淋巴结、胸腺、胃肠道、骨髓、脾脏、睾丸和卵巢等, 它是细胞毒; 目前一般认为其生化作用机理是抑制蛋白质的合成, 引起多核蛋白体的分解及破坏转译, 或延长和终止转录过程^[5]. 但是, 对蛋白质的抑制尚无法解释各种毒性损伤作用和死亡等一系列的问题, 不能完全说明它们的最终生物学效应. 有人提出单端孢霉烯族毒素对蛋白质的抑制不是毒素作用的唯一细胞机制, 可能与其对膜的毒性效应有关^[6]. 以前的工作已经观察到 T-2 毒素能抑制心肌细胞跨膜电活动, 表明其对 Ca^{2+} 通道具有明显的阻滞作用^[7]. 为进一步阐明 T-2 毒素对心肌细胞 Ca^{2+} 通道的阻滞作用及其机制, 本实验应用膜片钳技术, 在培养的 Wistar 大鼠乳鼠心肌细胞的膜片上, 记录了 B 型、L 型和 T 型 Ca^{2+} 通道的单通道活动.

1 材料与方法

1.1 心肌细胞分离与培养

取 Wistar 大鼠乳鼠心肌, 用含有 0.1% 胰蛋白酶、0.1% 牛血清白蛋白的无钙、镁 Hanks 液分离心肌细胞, 置于含有 80% Dulbecco 极限必需培养基 (DMEM) 与 20% 小牛血清的培养基内, 在 5% CO_2 、95% 空气的孵箱中进行培养, 2 h 后做贴壁分离, 于培养 24~48 h 期间进行实验记录.

1.2 钙单通道活动的记录

用膜片钳连细胞电压钳法, 在培养的大鼠心肌细胞上记录 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道的单通道活动. 浸浴液: 140 mmol/L 天门冬酸钾、10 mmol/L EGTA、10 mmol/L Hepes,

pH 7.4. 电极充灌液: 110 mmol/L BaCl_2 , 10 mmol/L Hepes, pH 7.4. 膜片钳放大器 (Dagan 8800, USA) 与示波器 (VC 10 Kohden, Japan) 的低通滤波器截止频率分别设置在 1 kHz 和 10 kHz. 微电极与细胞膜之间的封接电阻大于 10 G Ω . 由 -50 mV 保持电压阶跃至 +10 mV, 诱发 L 型 Ca^{2+} 通道活动; 由 -70 mV 阶跃至 -10 mV, 诱发 T 型 Ca^{2+} 通道活动; 在 -60 mV 保持电压下, 记录 B 型 Ca^{2+} 通道的自发性单通道活动.

1.3 数据采集处理与统计

三型 Ca^{2+} 通道的每一种, 均记录 5 个细胞, 每个 Ca^{2+} 通道连续采样 50 条原始曲线, 删除原始曲线中阶跃命令的电容伪迹, 并修平基线, 用 Gauss 曲线拟合采样点电流序列密度直方图的方法, 得出流过 Ca^{2+} 通道的 Ba^{2+} 流幅值. 用指数曲线拟合开放或关闭时间分布直方图的方法, 得出平均开放与关闭时间. 每条采样曲线, 通道开放总时间除以总采样时间得出开放概率. 所有数据均用均数 $\pm$ 标准差表示. 两组均数的比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时, 表示差异显著, 有统计学意义.

2 结 果

向浴液中加入 T-2 毒素 10 mg/L, 记录加入毒素前后 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道的单通道活动, 同时与 Ca^{2+} 通道阻滞剂 verapamil 37.5 mg/L 和 Ca^{2+} 通道激动剂 BAY K 8644 5 $\mu\text{mol/L}$ 进行比较. 结果如表 1 所示, T-2 毒素 (10 mg/L) 使 B 型 Ca^{2+} 通道的开放概率下降 67.2%, 开放时间缩短 60.5%, 关闭时间延长 28.7%; 使 L 型 Ca^{2+} 通道的开放概率下降 78.4%, 开放时间缩短 76.5%, 关闭时间延长 24.9%; 使 T 型 Ca^{2+} 通道的开放概率下降 76.3%, 开放时间缩短 62.8%, 关闭时间延长 40.4%. T-2 毒素对流过三型 Ca^{2+} 通

表 1 T-2 毒素对心肌细胞 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道参数的影响

		开放时间/ms	关闭时间/ms	电流幅值/pA	开放概率
B	对照	6.33 ± 2.54	96.20 ± 6.07	1.79 ± 0.61	0.061 ± 0.024
	T-2 毒素	$2.50 \pm 0.41^{1)}$	$123.80 \pm 4.23^{2)}$	1.23 ± 0.18	$0.020 \pm 0.003^{1)}$
L	对照	11.68 ± 7.10	98.62 ± 5.44	2.41 ± 1.10	0.102 ± 0.053
	T-2 毒素	$2.14 \pm 0.34^{1)}$	$123.18 \pm 8.09^{2)}$	1.44 ± 0.28	$0.022 \pm 0.004^{1)}$
T	对照	3.50 ± 0.70	93.06 ± 7.73	1.09 ± 0.57	0.038 ± 0.011
	T-2 毒素	$1.30 \pm 0.07^{2)}$	$130.64 \pm 4.41^{2)}$	1.06 ± 0.45	$0.009 \pm 0.002^{2)}$

注: T-2 毒素剂量为 10 mg/L; $^{1)}P < 0.05$, $^{2)}P < 0.01$, 表示与对照比较具有显著性统计学意义。

表 2 Ca^{2+} 通道阻滞剂 verapamil 与 Ca^{2+} 通道激动剂 BAY K 8644 对心肌细胞 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道的影响

		开放时间/ms	关闭时间/ms	电流幅值/pA	开放概率
B	对照	5.71 ± 0.50	33.26 ± 13.96	1.20 ± 0.09	0.160 ± 0.059
	VER	$2.40 \pm 0.20^{1)}$	$147.19 \pm 45.60^{1)}$	1.36 ± 0.02	$0.017 \pm 0.047^{1)}$
	对照	2.59 ± 0.33	88.40 ± 14.73	1.41 ± 0.22	0.033 ± 0.009
	BAY	$4.74 \pm 0.42^{1)}$	$35.30 \pm 12.41^{1)}$	1.40 ± 0.18	$0.149 \pm 0.098^{1)}$
L	对照	4.15 ± 0.30	124.88 ± 35.19	1.53 ± 0.49	0.035 ± 0.013
	VER	$2.42 \pm 0.25^{1)}$	$190.45 \pm 19.31^{1)}$	1.02 ± 0.19	$0.013 \pm 0.002^{1)}$
	对照	3.24 ± 0.21	152.90 ± 29.99	1.62 ± 0.59	0.021 ± 0.004
	BAY	$4.52 \pm 0.39^{1)}$	$110.71 \pm 9.03^{1)}$	1.55 ± 0.71	$0.040 \pm 0.005^{1)}$
T	对照	2.07 ± 0.10	65.02 ± 9.88	0.76 ± 0.04	0.032 ± 0.006
	VER	$1.51 \pm 0.27^{1)}$	$188.89 \pm 21.03^{1)}$	0.66 ± 0.13	$0.008 \pm 0.002^{1)}$
	对照	1.89 ± 0.15	116.19 ± 14.34	0.65 ± 0.05	0.016 ± 0.003
	BAY	$2.32 \pm 0.03^{1)}$	$49.96 \pm 11.65^{1)}$	0.66 ± 0.05	$0.046 \pm 0.009^{1)}$

注: VER (verapamil) 剂量为 37.5 mg/L, BAY (BAY K 8644) 剂量为 5 $\mu\text{mol/L}$; $^{1)}P < 0.01$, 表示与对照比较具有显著性统计学意义。

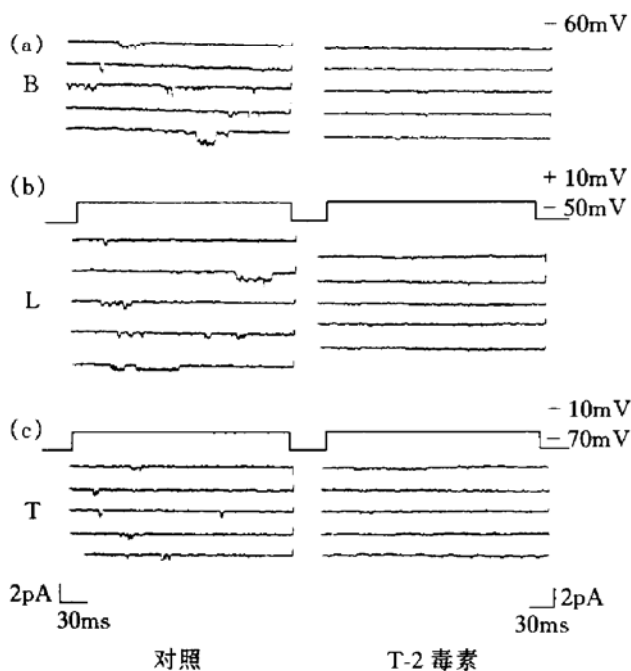


图 1 T-2 毒素对心肌细胞 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道的影响

(a) B 型; (b) L 型; (c) T 型。

道的 Ba^{2+} 离子流幅值均无明显影响。这种效应与 verapamil 相似, 与 BAY K 8644 相反 (表 2)。图 1 为修整过的 T-2 毒素对三型 Ca^{2+} 通道活动的原始记录曲线, 从曲线中可以看出, T-2 毒素对三型 Ca^{2+} 通道具有显著的阻滞作用。

3 讨 论

离子通道 (ionic channels) 是神经、肌肉和其他组织细胞膜兴奋性的基础, 是生物电活动的基础。在体大鼠心室肌细胞为快反应非自律性细胞, 其零期除极化主要是靠 Na^{+} 的内流, 培养的心室肌细胞可转化为慢反应自律细胞, 其动作电位零期除极化与 2 期平台的形成均取决于 Ca^{2+} 内流。在以前的实验中, 发现 T-2 毒素对心肌细胞动作电位的影响, 使去极化电位参数减小, 表明 T-2 毒素使心肌细胞零

期除极化 Ca^{2+} 内流减少, 提示 Ca^{2+} 通道受到阻滞^[7]. 本实验应用膜片钳的连细胞电压钳法, 在培养的 Wistar 大鼠心肌细胞上观察了 T-2 毒素对 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道单通道电活动的影响, 以进一步确证 T-2 毒素对心肌细胞 Ca^{2+} 通道的阻滞作用及其作用机制.

既往实验证实, 心肌细胞上存在 3 种不同类型的 Ca^{2+} 通道, 即 L 型 Ca^{2+} 通道^[8]、T 型 Ca^{2+} 通道^[9] 和 B 型 Ca^{2+} 通道^[10]. L 型 Ca^{2+} 通道, 开放时间长且单通道电导大^[9]; T 型 Ca^{2+} 通道开放时间短, 激活电压较负, 单通道电导较小, 即微观钙流的幅度较小, 在离细胞膜片上 T 型 Ca^{2+} 通道存活的时间较长^[8,11]; B 型 Ca^{2+} 通道是一种自发发放的 Ca^{2+} 通道, 因而被称为背景 Ca^{2+} 通道, 当心肌细胞膜被钳制在 0~180 mV 的过程中, 其自发发放的概率与电导均呈电压依赖性加大^[11,12]. 本实验结果表明, T-2 毒素对心肌细胞 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道均具有明显的抑制作用, 其阻滞作用在于使三型 Ca^{2+} 通道的开放概率减小, 开放时间缩短, 而对流过 Ca^{2+} 通道的 Ba^{2+} 流幅值无影响.

Ca^{2+} 通道阻滞剂分无机和有机两大类. 无机 Ca^{2+} 通道阻滞剂有 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 La^{2+} 和 Mn^{2+} 等, 它们与 Ca^{2+} 竞争位于 Ca^{2+} 通道外口的结合位点, Ca^{2+} 与此位点结合后, 旋即分离, 从而经 Ca^{2+} 通道内流. 这些阳离子与此位点的亲和力高, 一旦与之结合就不易分离, 因而使 Ca^{2+} 内流减少^[13,14]. 有机 Ca^{2+} 通道阻滞剂主要有硫氮卓酮 (diltiazem)、异搏定 (verapamil) 与二氢吡啶类 (dihydropyridine) 等^[15,16], 其对 Ca^{2+} 通道阻滞的活性均与其立体结构有关, 多数 Ca^{2+} 通道阻滞剂在细胞膜内侧面对 Ca^{2+} 通道发挥作用, 它们进入细胞的程度决定于其脂溶性^[17]. T-2 毒素对 B、L 和 T 三型 Ca^{2+} 通道的阻滞作用与 verapamil 相似, 但其作用机制是否相似尚不清楚. 分析 T-2 毒素对 Ca^{2+} 通道阻滞作用的机制, 有两种可能性. a. T-2 毒素是一种亲脂性物质, 它能自由地进入大多数细胞, 可直接作

用于 Ca^{2+} 通道; b. T-2 毒素通过影响膜的通透性, 膜通透性的改变使细胞内外离子紊乱, 引起细胞外和肌浆网中 Ca^{2+} 流入胞浆内, 使心肌细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度梯度减小, 导致膜去极化^[18], 从而使 Ca^{2+} 通道受到阻滞, 但其具体作用机制尚需作进一步的研究.

参 考 文 献

- Holt P S, Corrier D E, Deloach J R. *Immunopharmacol and Immunotoxicol*, 1988; **19** (3): 365
- Bergers W W A, van Dura E A, van der Stap J G M M. *Toxicol Lett*, 1987; **36** (2): 173
- Williams P P. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1989; **18**: 374
- Bubien J K, Woods JR W T. *Toxicol*, 1987; **25** (3): 325
- Lafarge-Frayssinet C, Declotire F, Mousset S *et al.* *Mutation Res*, 1981; **88**: 115
- Bunner D L, Morris E R. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1988; **92**: 113
- 彭双清, 张文杰, 杨进生. *中国应用生理学杂志*, 1995; **11** (3): 229
- Reuter H, Stevens C F, Tsien R W *et al.* *Nature*, 1982; **297**: 501
- Nilius B, Hess P, Lansman B *et al.* *Nature*, 1985; **316**: 443
- Rosenberg R L, Caronado R, Meissner G. *J Gen Physiol*, 1988; **92**: 27
- Brown A M, Camerer H, Kunze D L *et al.* *Nature*, 1981; **299**: 156
- Coulombe A, Lefevre I A, Baro I *et al.* *J Mem Biol*, 1989; **111**: 57
- Hagiwara S, Byerly L. *Annual Review of Neuroscience*, 1981; **4**: 69
- Reuter H. *Nature*, 1983; **301**: 569
- Tang C M, Presser F, Morad M. *Science*, 1988; **240**: 213
- Frishman W H. *Curr Probl Cardiol*, 1987; **7**: 293
- Lee K S, Tsien R W. *Nature*, 1983; **302**: 790a
- Halliwell B, Gutteridge J M C. *Biochem J*, 1984; **219**: 1

Single Channel Analysis on the Calcium Blockade Action of T-2 Toxin in the Cultured Cardiac Cells. Peng Shuangqing, Zhang Wenjie, Yang Jinsheng (*Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China*).

Abstract The effects of T-2 toxin on the activi-

ties of B-type, L-type and T-type Ca^{2+} channels were recorded on cultured ventricular myocytes of neonatal Wistar rats by cell-attached patch clamp technique. T-2 toxin at dose of 10 mg/L significantly inhibited the activities of the three types of Ca^{2+} channels. The open time of Ca^{2+} channels was shortened and the open-state probability was decreased, whereas there were no significant variations in the amplitude of

ionic current flowing through the Ca^{2+} channels. Compared with verapamil and Bay K 8644, the effects of T-2 toxin on the Ca^{2+} channels were similar to the blockade effect of verapamil. It was suggested that the cytotoxic action of T-2 toxin may be due to the damages of cell membrane.

Key words fusarium toxin, T-2 toxin, cardiac cell, calcium channel, patch clamp technique

RNA 二级结构预测系统构建

李伍举 吴加金

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 运用下列 RNA 二级结构预测算法: 碱基最大配对方法、Zuker 极小化自由能方法、螺旋区最优堆积、螺旋区随机堆积和所有可能组合方法与基于一级螺旋区的 RNA 二级结构绘图技术, 构建了 RNA 二级结构预测系统 Rnafold. 另外, 通过随机选取 20 个 tRNA 序列, 从自由能和三叶草结构两个方面比较了前 4 种二级结构预测算法, 并运用 t 检验方法分析了自由能的统计学差别. 从三叶草结构来看, 以随机堆积方法最好, 其次是螺旋区最优堆积方法和 Zuker 算法, 以碱基最大配对方法最差. 最后, 分析了两种极小化自由能方法之间的差别.

关键词 RNA 二级结构, 预测, 比较

RNA (指 tRNA, rRNA, mRNA 和 SnRNA) 功能与其结构密切相关, 特别是, 目前已有大量证据表明: RNA 二级结构, 尤其是 SD 序列附近的二级结构与外源基因在原核系统中的表达水平有密切关系^[1], 因此研究 RNA 结构, 对理解 RNA 功能, 原核基因工程和与 RNA 有关的生命现象有着重要意义. 但是, RNA 分子具有降解快, 晶体难于获得等特点, 故需要发展 RNA 结构首先是二级结构的计算机预测.

目前, 也有一些 RNA 二级结构预测程序, 如 Pcgene 中的二级结构预测模块, Pcfold 预测系统等, 但这些程序预测方法单一, 都是基于 Zuker 算法^[2], 而且与绘图系统分开, 因此, 我们研制了 RNA 二级结构预测系统

Rnafold, 与 Pcgene, Pcfold 相比, 集多种预测算法与绘图技术于一体, 可接受多种序列输入方式. 另外, 还用统计学方法分析了这些算法之间的关系, 这不仅有助于分子生物学家选择恰当的方法来研究 RNA 的结构功能关系, 也对新算法的优劣提供了评价方法.

1 材料与方法

1.1 材料

所有数据均取自 EMBL 核酸序列库, 序列名称为 EMBL 代码, Salzer 与 Turner 自由能数据取自文献 [3]. 用 SAS 软件包^[4]作统计分析.