

大鼠和黄鼠心肌细胞钙瞬变记录 和钙移除机制分析^{*}

王世强^{**} 周曾铨

钱 洪

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要 用共聚焦显微术在不同温度下记录非冬眠动物大鼠和冬眠动物黄鼠心肌细胞钙瞬变, 并分析钙移除速率. 结果表明: 大鼠细胞钙瞬变舒期水平随降温显著升高, 黄鼠基本不变; 相同温度下, 黄鼠钙瞬变时程较短, 钙移除速率较快. CPA (cyclopiazonic acid) 的药理作用显示肌质网是细胞钙移除的主要机制, 黄鼠肌质网摄钙速率较大鼠快. 肯定了肌质网在冬眠动物心肌细胞耐受低温适应中的关键地位, 否定了钠钙交换发挥重要作用的观点, 提出了改善非冬眠动物心肌低温耐受性的可能性.

关键词 心肌细胞 钙瞬变 钙移除 肌质网 冬眠 低体温 共聚焦激光扫描显微术

低温下, 非冬眠动物心肌收缩机能发生障碍, 而冬眠动物仍可保持有力的收缩^{1,2}. 我们³最近的研究表明, 大鼠心肌细胞胞内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 在低温下显著升高, 冬眠动物黄鼠基本不变. 但这些测定是在静息心肌细胞进行的, 不足以说明收缩机能的变化与胞内钙调节的关系.

另一方面, 冬眠动物心肌细胞避免发生钙超载³ 必然在钙移除机制上有特殊适应, 但具体机制尚有争论. 研究显示, 冬眠动物离体心肌肌质网相对非冬眠动物有较高钙摄取能力⁴, 而且冬眠动物进入冬眠状态, 心肌肌质网体积成倍增加, 离体肌质网摄钙功能增强^{5,6}. 这些证据提示肌质网在心肌耐低温适应中有重要地位. 但另一些人认为, 钠钙交换不直接消耗 ATP, 可缓冲低温下细胞能量供应, 因而可能在冬眠动物心肌耐低温适应中有特殊地位. 冬眠金花鼠心肌动作电位的低位平台⁷, 豚鼠和冬眠动物黄鼠心肌冷处理后胞内离子恢复的差异⁸, 冬眠黄鼠和刺猬动作电位复极化对胞外 Ca^{2+} 和 Na^+ 的敏感性(未正式发表的结果)等, 都支持这一观点. 我们认为, 肌质网和钠钙交换在耐低温适应中的地位之所以未能阐明, 是因为以往有关肌质网钙摄取的测定都是离体进行的, 不能说明其在细胞钙移除中的实际贡献, 更不能对比它与钠钙交换的相对地位.

1998-11-03 收稿, 1999-09-29 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 39670276)和国家杰出青年科学基金(批准号: 39825506)资助项目

^{**} E-mail: wangsq@gc.nia.nh.gov

本文将运用共聚焦显微系统记录非冬眠动物大鼠和冬眠动物黄鼠心肌细胞在兴奋收缩周期中胞内 Ca^{2+} 浓度的动态变化(钙瞬变), 并用钙瞬变下降相拟合法直接测定两种动物肌浆钙移除速率常数, 借助肌质网钙泵选择性抑制剂 CPA (cyclopiazonic acid) 分析其中肌质网钙摄取所占的比例, 从而揭示冬眠动物心肌耐低温、避免钙超载的适应性机制。

1 方法

1.1 细胞标本

本研究采用非冬眠动物大鼠和冬眠动物黄鼠 (*Citellus dauricus*), 雌雄不拘。心室肌细胞的分离和 Ca^{2+} 荧光探针 indo-1 的导入方法与我们已有的报道^[3] 相同。简言之, 实验动物以乙醚麻醉后取心, 以无钙生理溶液 37°C 恒温灌流 5 min 后改灌含 0.5 mg/mL 胶原酶 (Sigma 1A 型), 1 mg/mL 牛血清白蛋白 (Sigma, 组分 V, 无脂肪酸型) 和 75 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 的生理溶液。约 15 min 后取心室组织剪碎, 在酶液中保温, 然后逐步收获细胞。细胞储存和测定的生理溶液成分为 (mmol/L): 140 NaCl, 4 KCl, 2.0 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 10 glucose, 5 HEPES, pH 调至 7.4。使用前, 细胞在含 2.5 $\mu\text{mol/L}$ indo-1 AM 的生理溶液中 37°C 避光保温 10 min, 将 indo-1 导入细胞。

1.2 标本槽及温度控制

实验所用标本槽是一玻片底的培养皿, 内置环形玻璃管, 围成直径 1 cm 的小室, 最多可盛放 0.5 mL 溶液 (图 1)。环形玻璃管与 Cole-Parmer 低温循环水浴相连, 用以控制温度。电子温度计的探头紧贴皿底放置, 用以监视温度。当皿内盛有 0.3 mL 溶液时, 小室底部中心与周边温差小于 0.5°C 。标本槽盖上镶了 1 对银丝电极, 一端平行伸入标本槽溶液中, 另一端与电子刺激器相连, 以波宽 2 ms, 频率 0.2 Hz 的方波对细胞进行场刺激。为防止细胞收缩时位置移动, 标本槽在使用前用 0.5% 的明胶进行处理。

1.3 荧光信号的记录和计算

荧光图像的记录在 ASCS Meridian 575UV 共聚焦激光扫描荧光显微成像系统上进行。硬件设置与以往的报道^[3] 相同。由于此共聚焦系统的线扫描速度很慢, 本文用点方式记录钙瞬变, 采样频率 100 Hz。为提高信噪比, 本文将相同条件 8 个连续记录进行叠加平均。荧光强度所对应的 Ca^{2+} 浓度由下式^[9] 计算:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{\text{FR} - \text{FR}_{\min}}{\text{FR}_{\max} - \text{FR}} \cdot \beta, \quad (1)$$

其中, FR 为 405 nm 探测器 PMT2 与 480 nm 波长探测器 PMT1 所测荧光强度的比值, $\text{FR}_{\min}$ 和 $\text{FR}_{\max}$ 分别是无钙和饱和钙溶液的 FR, β 为波长 480 nm 的信号在无钙和饱和钙溶液中的比值, K_d 采用我们 α 定态下细胞原位标定的数据^[3, 10]。钙移除速率常数 v 通过钙瞬变下降相进行一阶指数拟合得到, 拟合范围是钙瞬变下降相中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低于 1 $\mu\text{mol/L}$ 的部分 (详见讨论), 公式为

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = A \cdot \exp(-vt + B), \quad (2)$$

式中 A 和 B 为拟合参数。

1.4 统计

数据经统计表示为平均值 $\pm$ 标准误差的形式。温度影响及种间差异的显著性由单因素或

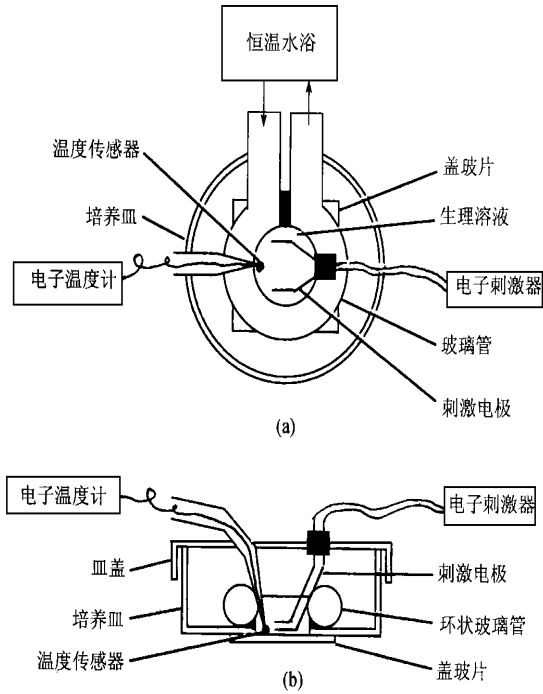


图 1 实验标本槽及温控和刺激装置
(a) 俯视图; (b) 垂直断面

双因素有重复试验的方差分析检验, $P < 0.05$ 认为显著. 假定统计数据 $X \pm \hat{\alpha}$ 和 $Y \pm \hat{\beta}$ 依函数 $f(X, Y)$ 运算, 得到结果 Q , 则 Q 的标准差为:

$$\hat{\sigma}_Q = \sqrt{\left[\frac{\partial f(X, Y)}{\partial X} \right]^2 \hat{\sigma}_X^2 + \left[\frac{\partial f(X, Y)}{\partial Y} \right]^2 \hat{\sigma}_Y^2}. \tag{3}$$

2 结果

2.1 钙瞬变的记录和比较

本文用点方式记录钙瞬变. 图 2 是记录的示例, 其中 PMT1 与 PMT2 的荧光信号呈镜像变化, 二者之比(PMT2/PMT1)是以 FR 表示的钙瞬变, 第 4 条线是连续 8 个记录的平均, 可见信噪比明显提高. 同一细胞不同部位记录到的钙瞬变在幅度、舒期水平、时程等指标上是很接近的. 我们以往也观察到, 细胞 Ca^{2+} 浓度的分布是相对均匀的^[3], 因而点方式记录的钙瞬变虽然是细胞内某一局部的情况, 但能够反映细胞整体的性质.

实验研究了大鼠和黄鼠心肌细胞钙瞬变随温度的变化. 图 3 显示二者的钙瞬变峰值均随降温逐渐上升, 不同之处是大鼠心肌细胞钙瞬变的舒期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 随温度下降显著上升, 从而其动态幅度明显减小, 黄鼠心肌细胞在低温下舒期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化不大, 保持较大动态幅度. 虽然大鼠与黄鼠钙瞬变的半峰时程都随温度降低而延长, 但在各温度下黄鼠的半峰时程显著较短.

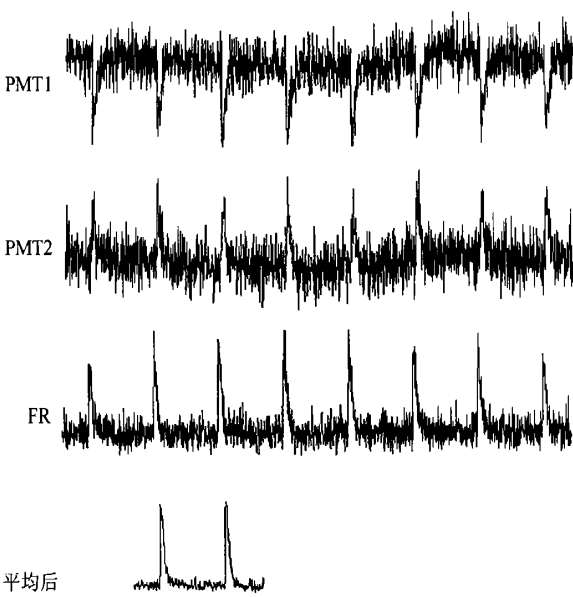


图 2 用共聚焦系统点方式记录大鼠心肌细胞钙瞬变
PMT1 和 PMT2 分别为 480 nm 和 405 nm 波长 indo-1 荧光强度变化，第 3 条记录为 PMT2/PMT1 的
荧光强度比，第 4 条记录为 8 个连续记录叠加平均的结果

2.2 钙移除速率常数的测定和分析

细胞钙移除速率常数由(2)式对以 $[Ca^{2+}]_i$ 表示的钙瞬变下降相进行拟合得到. 根据已有研究, 大鼠心肌舒期张力^[1,2]和细胞 $[Ca^{2+}]_i$ ^[1,3]在 25℃以上变化不大; 图 3 显示钙瞬变的变化也是如此. 但 15℃以下, 尤其是 CPA 作用下的大鼠心肌细胞, 钙瞬变逐渐变得不稳定. 因此, 本文选择 25℃和 15℃进行钙移除速率常数的测定分析. 在这两个温度间钙移除速率常数随降温而下降, Q_{10} 在大鼠和黄鼠分别为 2.9 和 2.4. 相同温度下, 黄鼠的钙移除速率常数高于大鼠(图 4(a)).

为分析肌质网在细胞钙移除中的贡献, 我们用 50 μmol/L CPA 选择性抑制肌质网钙泵. 为了保证降低温度时 CPA 仍为饱和药理作用, 此剂量是 Balke 等人^[11]在 23℃进行同类实验的 5 倍. 在 CPA 作用下, 钙瞬变下降相缓慢, 但仍可很好地为单指数方程所拟合(图 5). 拟合结果显示, CPA 使大鼠心肌细胞钙移除速率常数在 25℃和 15℃分别下降 72.7%和 81.3%, 黄鼠细胞相应地分别下降 78.0%和 84.9%. 其中大鼠的下降比例与文献报道^[11,12]一致, 肯定了我们测定方法的可靠性. CPA 的效用之大, 证明大鼠和黄鼠心肌细胞的钙移除均以肌质网的摄取为主. CPA 作用之后, 大鼠和黄鼠心肌细胞钙移除速率常数的种间差异已不显著(图 4(b)). 用对照数据(图 4(a))与 CPA 作用下的数据相减, 得到 CPA 敏感的肌质网钙摄取速率常数. 此常数在黄鼠约为大鼠的 2 倍(图 4(c)). 在 25℃和 15℃间, CPA 不敏感成分的 Q_{10} 在大鼠和黄鼠分别为 4.1 和 3.6, CPA 不敏感成分的 Q_{10} 分别为 2.0 和 1.6, 显示肌质网钙摄取是一种温度系数较低的钙移除机制.

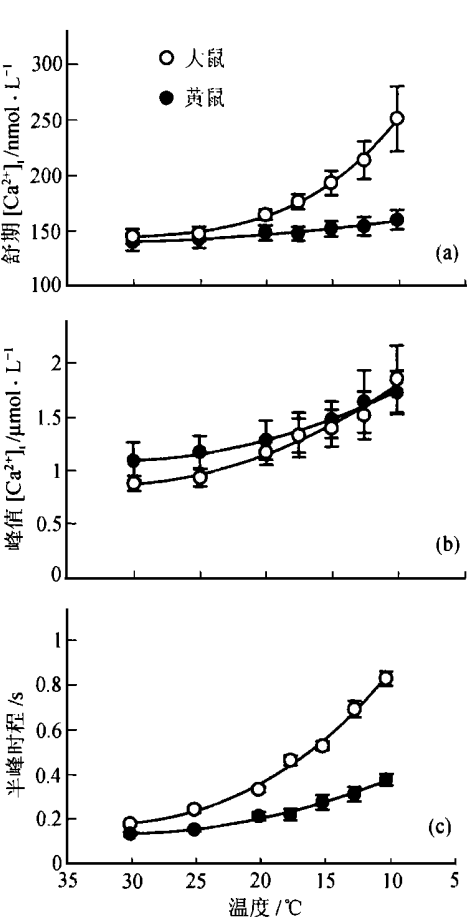


图 3 大鼠($n=9$)和黄鼠($n=5$)心肌细胞钙瞬变舒期 $[Ca^{2+}]_i$ (a)、峰值 $[Ca^{2+}]_i$ (b)和半峰时程(c)随温度的变化

有重复试验的双因素方差分析显示温度与物种之间在舒期 $[Ca^{2+}]_i$ ($P<0.05$)和半峰时程($P<0.01$)上交互作用显著,但在峰值上不显著($P>0.05$)

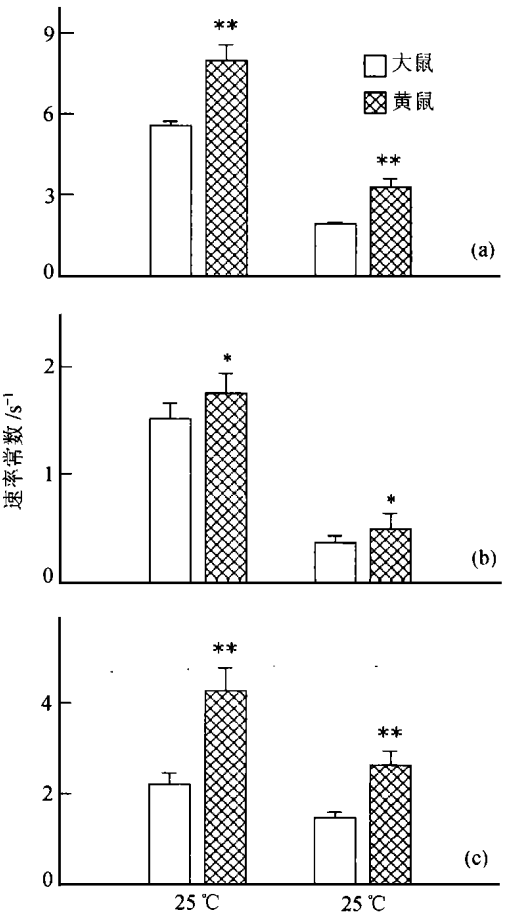


图 4 大鼠($n=12$)和黄鼠($n=6$)心肌细胞钙移除速率常数(a)以及其中 CPA 不敏感成分(b)和 CPA 敏感成分(c)

(a)和(b)中的数据由实验结果统计得到, (c)为(a)和(b)相减得到. t 检验. *示 $P<0.05$, **示 $P<0.01$

3 讨论

3.1 关于钙移除速率的研究方法

钙移除速率的测定可以用分离的细胞膜组分,也可以在细胞原位进行. 肌质网钙摄取的研究常用分离肌质网囊泡的方法^[5,6]. 这种方法在解释活细胞钙移除功能方面有局限性,因为肌质网在细胞中的密度和分布可能不同^[6],其他钙移除机制的贡献也会不同^[12]. 为比较两类动物细胞的钙移除功能差异,本文通过钙瞬变下降相拟合法原位测定细胞钙移除速率常数. 由于我们实验条件控制(例如温度)比较特殊,为保证结果可靠,我们对此方法的适用条件进行了分析.

设细胞内有 n 种钙移除过程, 其中第 j 种过程的速率为 V_j , Ca^{2+} 进入细胞胞浆的速率为 L , 则 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 随时间 t 的下降过程可描述为

$$-\frac{d}{dt}[\text{Ca}^{2+}]_i = \sum_{j=1}^n V_j - L, \quad (4)$$

设 $C_0 \equiv [\text{Ca}^{2+}]_i(t=0)$, $C_\infty \equiv [\text{Ca}^{2+}]_i(t \rightarrow \infty)$, 假定 $L \ll \sum V$ 且 V 与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 满足线性关系 $V = v \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_i - C_\infty)$, 则对 (4) 式求解得到

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = (C_0 - C_\infty) \cdot \exp\left[-\left(\sum_{j=1}^n v_j\right)t\right] + C_\infty. \quad (5)$$

(5) 式是拟合公式 (2) 的解析形式, 其导出过程说明, 钙瞬变的下降相拟合法有赖于两个假设: 第 1 假设是 $L \ll \sum V$. 钙瞬变下降相后期, L 由于有关通道失活而减小, 因此下降相后期的拟合较可靠. 第 2 假设是 V 与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 满足线性关系, 这要求各钙移除过程近似一级动力学. 已知 37°C 至 5°C 间肌质网钙摄取在 $[\text{Ca}^{2+}]_i > 1 \mu\text{mol/L}$ 时才趋向饱和动力学^[4], 钠钙交换在 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$ 时达到最大速度的一半^[13]. 本文对钙瞬变下降相中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低于 $1 \mu\text{mol/L}$ 的部分进行拟合, 照顾了第 2 假设.

(5) 式还证明了速率常数具有可加性, 这是本文用 CPA 作用前后钙移除速率常数相减, 得到肌质网钙摄取速率常数的理论基础.

3.2 低体温下的细胞钙稳态机制

我们最近报道, 静息的大鼠心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 随降温显著上升, 黄鼠则几乎不变^[3]. 本文将 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 研究扩展到搏动的细胞, 用以解释低温对心肌收缩功能的影响. 我们观察到, 大鼠心肌细胞不能在低温下维持舒期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 稳定, 这是其与黄鼠的主要区别. 这一结果从细胞生理学角度解释了非冬眠动物心肌低温下舒期张力的增加和收缩性的下降^[1,2], 证明了胞内钙超载是非冬眠动物心肌低温下功能障碍的重要环节; 冬眠动物心肌低温下保持收缩功能的关键是其保持了 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 基本水平的稳定.

兴奋收缩过程后, 细胞通过钙移除过程恢复其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的基本水平. 其中肌质网钙摄取和细胞膜的钠钙交换是主要的钙移除机制, 线粒体钙摄取和细胞膜钙泵的贡献很小^[11,12]. 本文证实了冬眠动物黄鼠心肌细胞比非冬眠动物大鼠有较强的钙移除能力. CPA 的药理作用指出, 黄鼠钙移除较快的原因在于肌质网的钙摄取, 而不是其他机制.

曾有观点认为钠钙交换不直接消耗 ATP, 可能对低温下心肌细胞的钙移除有利. 我们的结果中, 肌质网以外的机制对钙移除的总贡献不足 1/4, 而且本文和文献 [14] 的数据都证明钠钙交换的温度系数甚至比肌质网的还要高. 它在低温下钙移除过程中的地位不是增强了, 而是减弱了. 由此可以肯定, 钠钙交换对低温下心肌细胞钙移除的适应性意义不大.

以往对冬眠过程的研究表明, 动物入眠后, 在心肌低温耐受性增强^[15] 的同时, 肌质网从形态到钙摄取功能都上调了^[15,6]. 本文结果说明, 冬眠动物与非冬眠动物之间也存在肌质网

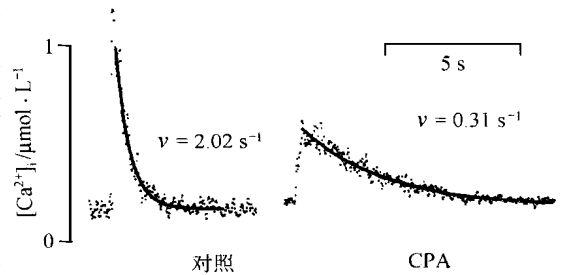


图5 50 $\mu\text{mol/L}$ CPA 抑制肌质网前后大鼠心肌细胞 15°C 下钙瞬变的典型记录

图中实线为钙瞬变下降相中 $[\text{Ca}^{2+}]_i \leq 1 \mu\text{mol/L}$ 部分的一阶指数拟合曲线, v 为速率常数

功能与耐低温的相关性。反过来,我们也发现用咖啡因抑制黄鼠心肌肌质网功能,其低温耐受性近乎丧失,表现为比大鼠更严重的舒期张力上升、后收缩,以及收缩性的丧失^[1]。以上证据共同证明,肌质网对心肌耐低温适应具有关键意义。既然这一原理被冬眠哺乳动物用以保护自身,人类也有可能将其用于医学目的。通过某种调节改善肌质网功能或其他细胞钙稳态机制,有可能为防治有关低体温和钙超载的心脏疾患提供有效借鉴。

参 考 文 献

- 1 Wang S Q, Huang Y H, Zhou Z Q. Dependence of myocardial hypothermia resistance on sources of activator calcium. *Cryobiology*, 1997, 35: 193~200
- 2 Liu B, Wohlfart B, Johansson B W. Effects of low temperature on contraction in papillary muscles from rabbit, rat and hedgehog. *Cryobiology*, 1990, 27: 539~546
- 3 王世强, 周曾铨, 钱 洪. 共聚焦显微术测定大鼠和黄鼠心肌细胞游离 Ca^{2+} 浓度与温度的关系. *中国科学, C 辑*, 1999, 29(3): 240~245
- 4 Liu B, Belke D D, Wang L C H. Ca^{2+} uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum at low temperature in rat and ground squirrel. *Am J Physiol*, 1997, 272: R1121~R1127
- 5 Belke D D, Milner R E, Wang L C H. Seasonal variations in the rate and capacity of cardiac SR calcium accumulation in a hibernating species. *Cryobiology*, 1991, 28: 354~363
- 6 唐亚俊, 王世强, 周曾铨. 黄鼠心肌肌质网超微结构和摄钙速率的季节性变化. *生理学报*, 1995, 47: 478~484
- 7 Kondo N. Electrophysiological effects of Ca antagonists, tetrodotoxin, $[\text{Ca}]_o$ and $[\text{Na}]_o$ on myocardium of hibernating chipmunks: possible involvement of Na-Ca exchange mechanism. *Br J Pharmacol*, 1987, 91: 315~319
- 8 Smith T W, Yamaoka K, Twist V W, et al. Membrane transport in isolated cardiac myocytes of ground squirrels: cold sensitivity of pumps and channels. In: Malan A, Canguilhem B, eds. *Living in the Cold II*. London: John Libbey Eurotext, 1989. 177
- 9 Grynkiewicz G, Poenie M, Tien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem*, 1985, 260: 3 440~3 450
- 10 Wang S Q, Zhou Z Q. Alpha-stat calibration of indo-1 fluorescence and measurement of intracellular free calcium in rat heart cells at different temperatures. *Life Sciences*, 1999, 65: 871~877
- 11 Balke C W, Egan T M, Wier W G. Processes that remove calcium from the cytoplasm during excitation-contraction coupling in intact rat heart cells. *J Physiol (London)*, 1994, 474: 447~462
- 12 Puglisi J L, Bassani R A, Bassani J W, et al. Temperature and relative contributions of Ca transport systems in cardiac myocyte. *Am J Physiol*, 1996, 270: H1772~H1778
- 13 张 云, 薛绍白. 钙和细胞功能. 见: 郑国 , 翟中和, 主编. *细胞生物学进展*(第 2 卷). 北京: 高等教育出版社, 1991. 160~210
- 14 Marengo F D, Wang S Y, Langer G A. The effects of temperature upon calcium exchange in intact cultured cardiac myocytes. *Cell Calcium*, 1997, 21: 263~273
- 15 王世强, 周曾铨, 高天礼. 冬眠哺乳动物心血管机能特点. *动物学报*, 1997, 42: 203~208