

# 整合科学班综合实验：细胞钙信号的自组织行为

张广欣

北京大学 元培学院，北京 100087

**【摘要】** 本次实验课程分为 5 部分：显微成像技术理论课、钙火花理论课、分离大鼠的心室肌细胞、使用共聚焦显微镜对心肌细胞进行钙成像、汇报讨论。其中，分离大鼠心肌细胞的工作由王艳茹老师和侯婷婷老师完成，观察心肌细胞的实验分组进行，每人选取其中一个现象进行汇报，本人选取汇报的是酒精对于心肌细胞钙活动的影响：在低浓度酒精下 (0.1mg/mL)，心肌细胞的自发钙活动频率几乎不受影响，甚至略有降低，稍高浓度酒精 (0.16ml/mL) 会使细胞自发活动变得活跃；更高浓度酒精 (0.20mg/mL) 会使得细胞发生强烈反应后，细胞状态明显异常，可能与 SERCA 蛋白活性受到影响以及自由基对细胞器的损伤有关。

**【关键词】** 共聚焦显微镜、钙信号、心肌细胞

## 1 实验目的

1. 学习激光共聚焦显微镜的基本原理以及其特点。
2. 了解 Fiji 的基础使用方法。
3. 了解与心肌细胞钙活动相关的生物学知识以及钙火花、钙瞬态等现象的生物学意义。
4. 学习共聚焦显微镜的基本使用方法，使用其完成对心肌细胞的成像过程。
5. 自行设计实验，在细胞层面你上观察外界刺激对心肌的影响（本人探究的是酒精对心肌细胞的影响）。

## 2 实验原理

### 2.1 共聚焦显微镜

共聚焦显微镜通过使用空间针孔来阻挡图像形成中的失焦光，以增加显微照片的光学分辨率和对比度。从一个点光源发射的探测光通过透镜聚焦到被观测物体上，如果物体恰在焦点上，那么

反射光通过原透镜应当汇聚回到光源，这就是所谓的共聚焦。

共焦显微镜在反射光的光路上加上了一块二向色镜 (dichroic mirror)，将已经通过透镜的反射光折向其它方向，在其焦点上有一个带有“针孔” (pinhole)，小孔就位于焦点处，挡板后面是一个光电倍增管 (PMT)。探测光焦点前后的反射光通过这一套共焦系统，会被挡板挡住，必不能聚焦到小孔上。

光度计测量的就是焦点处的反射光强度。通过移动透镜系统，可以对一个半透明的物体进行三维扫描，通过捕捉样本中不同深度的多个二维图像来重建物体内的三维结构 (这个过程称为光学切片)。

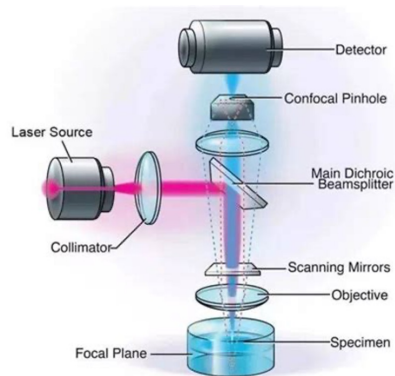


图 1 激光共聚焦显微镜原理图<sup>[1]</sup>

实验时间: 2023.5-2023.6

报告时间: 2023.6

\*学号: 2000012272

\*E-mail: 2000012272@stu.pku.edu.cn

## 2.2 Fluo-4

Fluo-4 用于测量活细胞内的钙 ( $Ca^{2+}$ ) 浓度, 通常用于受体配体和钙渗透离子通道的高通量筛选。

绿色荧光钙指示剂 Fluo-4 是钙指示剂 Fluo-3 的改进版本。它通常用作非荧光乙酰氧基甲酯 (Fluo-4 AM), 在细胞内裂解产生游离的荧光 Fluo-4。它加载速度更快, 在同等浓度下更亮, 可以被实验室常用的氩离子激光器的 488 nm 波长的光很好地激发。<sup>[2]</sup>

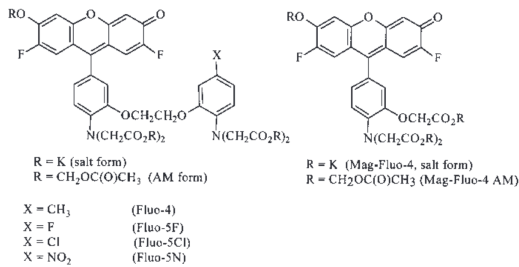


图 2 Fluo-4 的化学结构以及相关的化合物<sup>[2]</sup>

## 2.3 钙离子作为第二信使

钙离子是第二信使的一种, 负责许多重要的生理功能, 包括肌肉收缩、受精和神经递质释放。这些离子通常结合或储存在细胞内成分 (例如内质网 (ER)) 中, 并且可以在信号转导过程中释放。磷脂酶 C 产生甘油二酯和肌醇三磷酸, 这会增加钙离子进入细胞膜的渗透性。活性 G 蛋白打开钙通道, 让钙离子进入质膜。磷脂酶 C 的另一种产物二酰甘油可激活蛋白激酶 C, 从而有助于激活 cAMP (另一个第二信使)。<sup>[3]</sup>

## 2.4 心肌细胞

心肌细胞又称心肌纤维, 有横纹, 受植物性神经支配, 属于有横纹的不随意肌, 具有兴奋收缩的能力。呈短圆柱形, 有分支, 其细胞核位于细胞中央, 一般只有一个。

心肌细胞之间可以形成闰盘结构, 该处细胞膜凹凸相嵌, 并特殊分化形成桥粒, 彼此紧密连接, 但心肌细胞之间并无原生质的连续。该处结构对电流的阻抗较低, 兴奋波易于通过; 又因该处呈间隙连接, 内有 15~20 埃的嗜水小管, 可允许钙离子等离子通透转运, 有利于细胞间的兴奋传递。<sup>[4]</sup>

## 2.5 心肌细胞的兴奋-收缩偶联

电信号 (动作电位) 导致的去极化使得心肌细胞膜上钙离子相关的电压门控通道开启, 少量钙离子进入细胞, 触发肌浆网上的 RyR 受体开放, 通过钙致钙释放, 胞浆钙迅速升高, 肌钙蛋白与钙离子结合, 肌丝收缩, 心肌细胞发生收缩。

之后, 通过肌浆网上的钙泵 SERCA2a 将胞浆大量钙重新回收至肌浆网。同时细胞膜上的钙泵以及钠钙交换体将少量的钙运到细胞外, 肌钙蛋白与钙离子解离, 肌丝收缩, 细胞开始舒张。在稳态过程中, 钙的总量前过程前后是稳定的。

钙离子也可以进入细胞核, 在长周期上调控基因表达; 且可以进入线粒体。

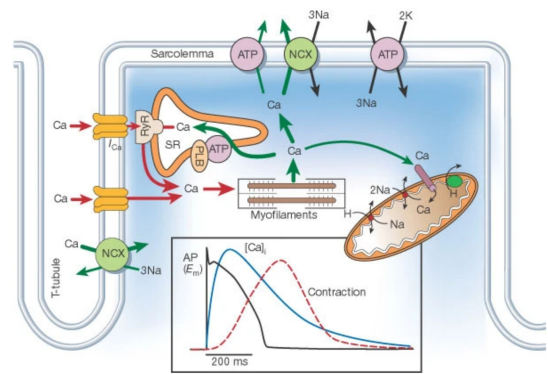


图 3 在 37 °C 下在兔心室肌细胞中测量的动作电位、 $Ca^{2+}$  瞬变和收缩的时间过程。NCX:  $Na^+/Ca^{2+}$  交换; ATP: ATP 酶; PLB: 受磷蛋白; SR: 肌浆网<sup>[5]</sup>

## 3 实验过程

### 3.1 大鼠心室肌细胞分离 (Langendoff 逆灌法, 由老师完成)

#### (1) 配置灌流用溶液 (A 液)

A 液	mM
NaCl	120
KCl	5.4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
Glucose	5.6
HEPES	10
MgCl <sub>2</sub>	1.2
Taurine	5

图 4 A 液成分以及浓度

用 NaOH 调节至 pH=7.35。

B 液: 取 50 mL A 液, 加入 1 mg/mL BSA、125  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ;

C 液: 取 20 mL A 液, 加入 1 mg/mL BSA、1 mM  $\text{CaCl}_2$ ;

E 液 (即酶液): 取 30 mL A 液, 加入 1 mg/mL BSA、50  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ;

(2) 将 A 溶液通二元气 ( $95\%\text{O}_2 - 5\%\text{CO}_2$ ), 充盈灌流管道, 打开  $37^\circ\text{C}$  水浴保持恒温;

(3) 杀鼠取心脏, 将主动脉挂于平针头上扎紧, 溶液 A 灌流 2-3min, 冲净血液, 心脏呈透亮粉红色;

(4) 更换为酶液, 随后开始循环消化, 加入 1.5 mg / 30 $\mu\text{L}$  蛋白酶;

(5) 消化至心脏软化 (约需 30-40 min)、失去弹性, 剪下心室部分, 去掉大血管、上部心房部分, 置于不含蛋白酶的酶液中剪碎。

(6) 用 1 mL 枪轻吹几次, 使细胞分离。加入 2-3mL 预先氧饱和的 B 液, 移入离心管内, 低速离心;

(7) 弃去上清, 用 B 液轻轻重悬, 透射光下观察细胞状态及活率;

(8) 复钙: B : C=1 : 1 混匀加入细胞沉淀, 自然沉降后置换为 C 液, 此时心肌细胞外溶液  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 1 mM, 可用于后续实验。

### 3.2 大鼠心室肌细胞钙成像

(1) 使用台式液和纯乙醇, 经过梯度稀释, 配成 0.2mg/mL, 0.4mg/mL, 0.8mg/mL 的酒精溶液各 1mL, 装入 1.5mL 离心管;

(2) 分离后的心肌细胞使用 laminin 粘附于适用于倒置显微镜观察的玻片;

(3) 装载钙染料 fluo-4 AM: 5  $\mu\text{M}$  fluo-4 AM 稀释于 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  台式液,  $37^\circ\text{C}$  孵育 10 min;

(4) 吸出染液, 加入 500 $\mu\text{M}$  台式液, 放在显微镜载物台上并固定好。在明场中用目镜观察, 调整粗、细准焦螺旋, 至从目镜中看到清晰的心肌细胞。

(5) 电脑在暗场找到希望记录的视野, 并对心肌细胞的形态以及活动情况进行初步观察和记录。

(6) 调整显微镜 (Zeiss LSM 980) 参数: 视野为  $353.55\mu\text{m} \times 353.55\mu\text{m}$  (像素数尺寸取  $512 \times 512$ , 即一个像素对应  $1.45\mu\text{m}$ ), 每一帧时间 629.15ms, 激

光强度为 2%, 检测器增益为 600v, 重复 200 次, 开始记录。记录一段时间后, 分两次, 用移液枪向皿中缓慢 (防止把细胞冲走) 加入 500 $\mu\text{L}$  0.2mg/mL 的酒精溶液, 本轮记录结束。两次加入酒精溶液后, 体系中的酒精浓度约为 0.10mg/mL、0.16mg/mL。

(7) 将容器内液体轻轻吸走, 加入 500 $\mu\text{L}$  台式液。开始记录: 记录一段时间后, 分两次, 用移液枪向皿中缓慢 (防止把细胞冲走) 加入 500 $\mu\text{L}$  0.4mg/mL 的酒精溶液, 本轮记录结束 (观察到本次加完酒精后细胞状态严重紊乱, 因此没有进行更高浓度的实验)。两次加入酒精溶液后, 体系中的酒精浓度约为 0.20mg/mL、0.27mg/mL。

## 4 实验结果与分析

### 4.1 心肌细胞形态以及钙信号模式

在透射光下观察心肌细胞形态, 其呈长杆状、长短边长度比在 5:1 以上, 有清晰横纹结构, 并存在沿长轴的自发收缩现象。

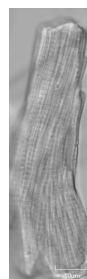


图 5 明场下观察到的心肌细胞形态

在暗场下可以观察到丰富的钙波行为, 每张图片间隔约 0.63s。对于单个心肌细胞:

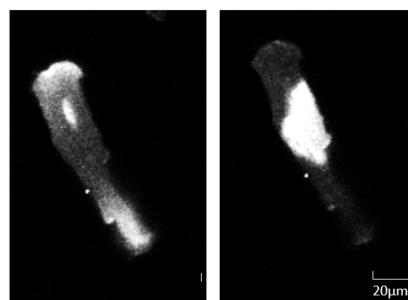


图 6 从形态上判断, 前一帧应为从中间发出的钙波传导到了细胞边缘, 后一帧为有冲动从细胞中间产生

观察到有 2 个心肌细胞连接在一起, 信号在细胞间传导:

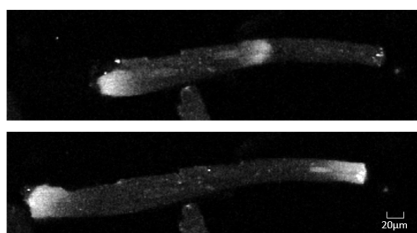


图 7 从中间产生，传向两端

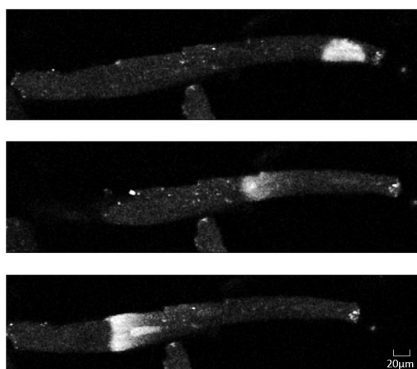


图 8 从最右端传到最左端

#### 4.2 所选细胞以及亮度随时间的变化

利用 Fiji，从 2 套数据中分别圈出细胞<sup>1</sup>，分析它们的平均亮度信息（是否兴奋）随时间的变化情况。由于进行心肌细胞分离时，细胞会受到一定损伤，且到进行实验时，细胞已经被分离出接近 6 小时，因此并不是所有细胞都有较为健康的状态。根据形态可以大致分成：健康（棒状）、爆米花状、菜花状。

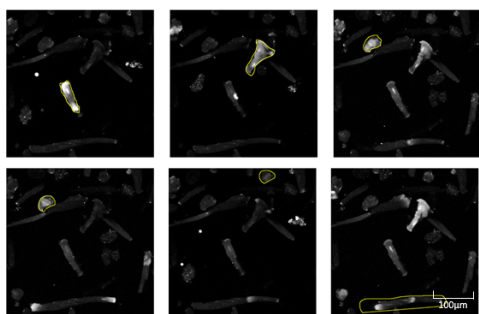


图 9 0.2mg/mL 组圈出的 6 个细胞（从左到右，从上到下编号为 1-6，下同），其中 1、6 为健康状态，2 为菜花状，3、4、5 为爆米花状

<sup>1</sup>将加入 0.2mg/mL 浓度酒精的实验组简称为“0.2mg/mL 组”，以此类推

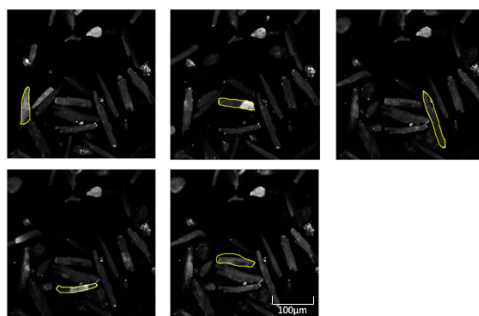


图 10 0.4mg/mL 组圈出的 5 个细胞，都是健康状态

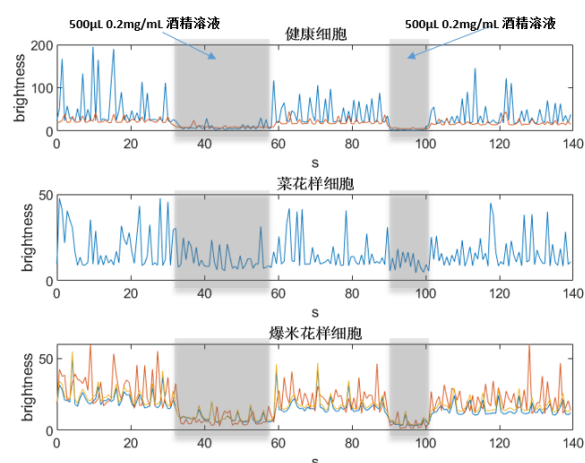


图 11 0.2mg/mL 组细胞亮度随时间的变化

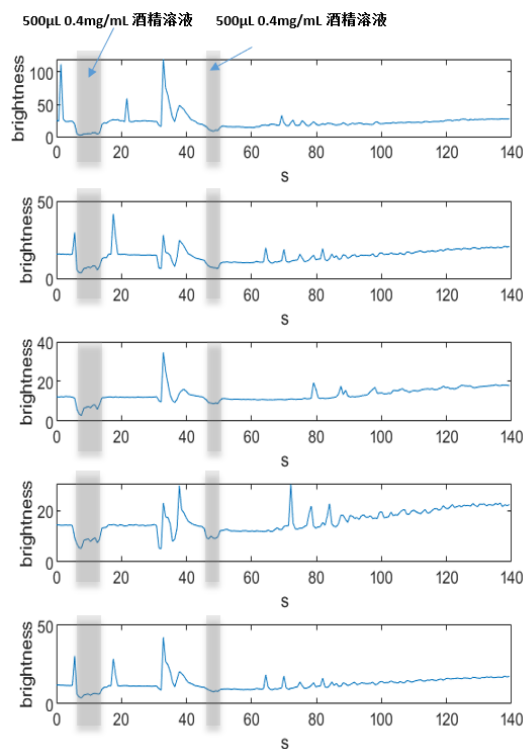


图 12 0.4mg/mL 组细胞亮度随时间的变化

视野会在某个时间段内突然整体变暗，这应是在滴加酒精时，水流对体系造成的扰动使得光在液体中的折射情况发生改变，或由于加入的溶液与原有液体的温度不同导致介质不够均一等因素，使成像的焦平面发生短暂偏移，收集到数据的细胞总体亮度发生改变。

加入酒精的前后，0.2mg/mL 组的细胞反应模式没有发生明显的变化，而 0.4mg/mL 组在经历了一次集体的强烈信号释放后，细胞状态被极大改变，总体亮度明显持续上升，应是细胞濒死或已经死亡时染料大量进入细胞；钙信号波动幅度小且密集，应是细胞功能严重紊乱造成，因此后一组细胞反应在意义上不能反应细胞功能的有效信息，在探究统计性质时只考虑前一组。

这些细胞反应彼此间的相似度很高，计算这些数据之间的相关矩阵，可以发现它们之间彼此高度相关，因此有这些数据得出的统计性质具有一定的代表性。

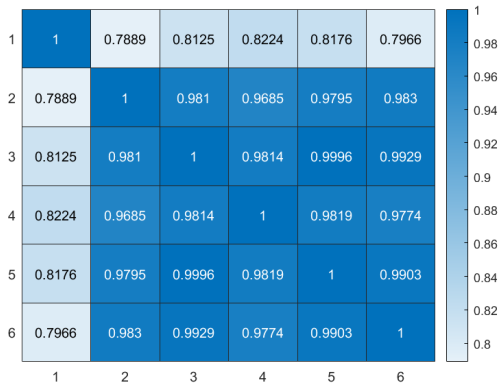


图 13 0.2mg/mL 组细胞反应相关矩阵

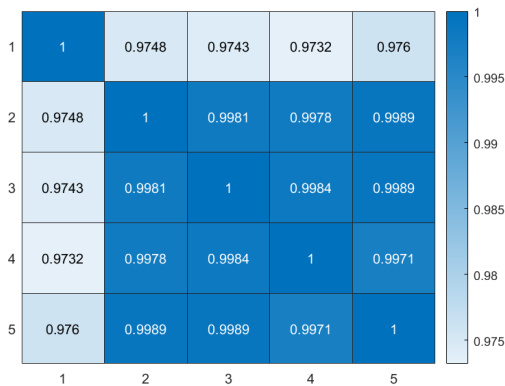


图 14 0.4mg/mL 组细胞反应相关矩阵

### 4.3 心肌细胞相同时间自主兴奋次数与是否加酒精之间的联系

认为视野整体变暗时间即为滴入酒精的过程，则可以将数据分为加入酒精前，以及分别加入 2 次酒精后共 3 个阶段，且时间上近似相等。将不同时间段的数据分别减去基础亮度（规定为所在时段亮度的最低值），得到每一时刻信号强度  $L(t)$ ，寻找钙信号的上升沿，认为  $L(t+1)/L(t) > 10$  即为发生了一次自主兴奋。

对于 0.2mg/mL 组的每个心肌细胞在相同时间内自主兴奋次数进行统计，可以发现加入极少量酒精后，心肌细胞的活动较为平缓甚至可能略微有所下降，然而继续增加酒精浓度，则会明显促进细胞的钙信号释放频率；如果使得血液中酒精浓度进一步增加，则心肌细胞会发生应激性反应，细胞状态发生明显变化并逐渐死亡。不同形态的细胞，其反应规律并没有呈现出明显不同。

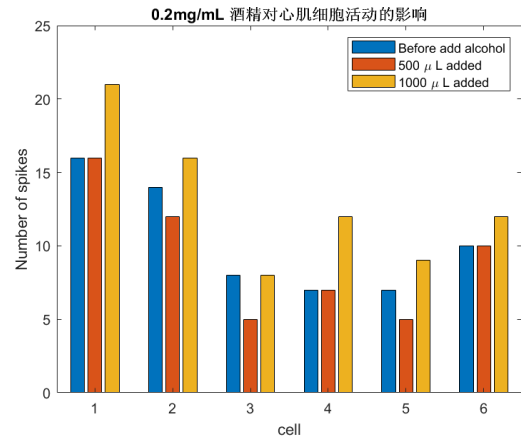


图 15 0.2mg/mL 组细胞自主兴奋次数的变化

关于酒精浓度对细胞自主兴奋在一定时间发生频次的改变，不能排除随着时间推移，细胞由于被激光加热等效应，钙释放频率自发升高（可做对照试验验证）；可能是由于加入的酒精对 SERCA2 活性产生影响，从而干扰了钙的回收，胞浆中钙离子回收效率下降，从钙库释放的钙更容易诱发下一次兴奋，机理详见讨论部分；根据课堂讨论中申家祺同学提供的线索，加入大量酒精后，钙信号的形态可能发生改变，在这套大尺度帧扫的数据集中无法很好分辨，应在时空分辨率更高的数据上验证。

这一过程可能与实际情况相对应，温和的酒精



摄入可以使人感到松弛和欣快，长期看同时降低冠状动脉心脏病的发病率，酗酒则会对全身各个脏器产生不良影响，细胞发生酒精中毒甚至死亡。

#### 4.4 兴奋间隔时间

猜测心肌细胞发生自主钙释放应服从泊松过程<sup>2</sup>，实际上观察到部分兴奋间隔时间具有指数分布的现象，分布模式在加入酒精后并无明显改变。但由于现有数据量较少，并不能很好地对这一猜想进行检验。

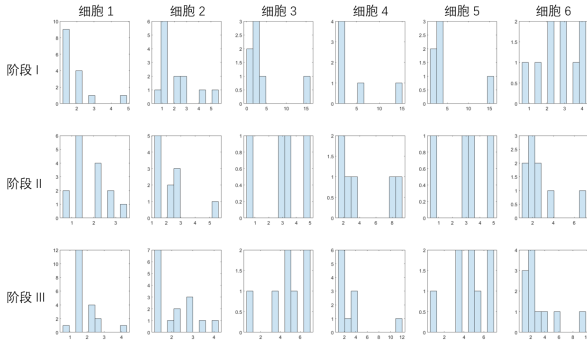


图 16 兴奋间隔时间分布

## 5 讨论

### 5.1 酒精与心脏病的关系

#### 5.1.1 临床医学层面

(1) 大量饮酒会增加人的总死亡率和心血管死亡率，并增加冠状动脉和外周动脉疾病、心律失常的风险。

(2) 酒精性扩张型心肌病以剂量依赖性方式逐渐发展，从舒张功能障碍开始，导致收缩功能障碍和充血性心力衰竭。

(3) 遗传、种族和行为易感因素影响酒精引起的心脏损伤程度，包括性别，因为女性比男性对有害的心脏影响更敏感。

(4) 温和的酒精摄入，有助于降低冠状动脉心脏病的发病率<sup>[6]</sup>。

(5) 酒精性心肌病指长期过量饮酒导致的以

<sup>2</sup>泊松过程是随机过程的一种，是以事件的发生时间来定义的。我们说一个随机过程  $N(t)$  是一个时间齐次的一维泊松过程，如果它满足以下条件：

(1) 在两个互斥（不重叠）的区间内所发生的事件的数目是互相独立的随机变量。

(2) 在区间  $[t, t+\tau]$  内发生的事件的数目的概率分布为： $P(N(t+\tau) - N(t) = k) = \frac{e^{-\lambda\tau}(\lambda\tau)^k}{k!}, k = 0, 1, 2, \dots$ 。

泊松过程种，第  $k$  次随机事件与第  $k+1$  次随机事件出现的时间间隔服从指数分布。

心脏扩大、心律失常和心功能不全为主要表现的继发性心肌病。机理上，酒精会破坏心肌细胞膜的完整性、其代谢产物乙醛对心肌细胞有强烈的毒害作用、损伤心肌细胞对钙离子的处理能力、细胞内钙离子通透性降低、调节部分重要心肌蛋白从而会影响其收缩和舒张功能。<sup>[7]</sup>

#### 5.1.2 细胞分子层面

(1) 酒精会诱导 p66shc 的剂量依赖性磷酸化，活性氧 (ROS) 的产生与 p66shc 的磷酸化水平平行增加，以及线粒体膜电位丧失和细胞色素 c 释放<sup>[8]</sup>。

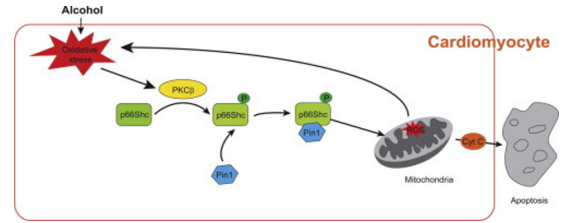


图 17 酒精诱导的氧化应激以及心肌细胞凋亡的信号转导的分子基础

#### (2) 急性酒精中毒对心肌细胞内钙的影响

酒精会降低肌浆网钙-ATP 酶 (SERCA)-2a 的蛋白质表达和受磷蛋白磷酸化，抑制非磷酸化状态下的 SERCA 活性，从而降低电刺激后细胞内钙的升高程度，使得细胞内钙的衰减速度变慢，让心肌细胞的钙回收量减少，胞内钙浓度增加<sup>[9]</sup>，这部分没有被及时回收的钙提高了细胞自主兴奋的频率。对心肌细胞的收缩产生负面影响<sup>[10]</sup>，使其功能紊乱，加之产生的自由基对细胞器进行损伤，细胞逐渐死亡。

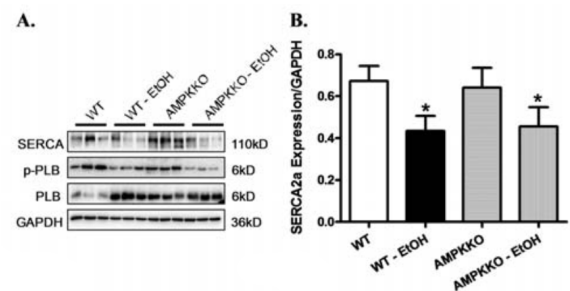


图 18 细胞内  $Ca^{2+}$  调节蛋白的蛋白质印迹分析来自接受治疗的 WT 和 AMPK 2 敲除 (AMPK KO) 小鼠的心肌使用或不使用乙醇 (EtOH, 3 g/kg, 腹腔注射) 或媒介物，持续 3 天。A: 代表描述 SERCA2a、pan 和 phos- 表达的感应免疫印迹磷酸化受磷蛋白 (PLB) 和 GAPDH (用作上样对照)；B: SERCA 2a<sup>[10]</sup>

## 5.2 可以进一步探究的问题

(1) 理解细胞兴奋情况, 需要更多数据。酒精浓度梯度应进一步划分; 设置对照组更为细致地观察各时间段细胞自发反应发生频率; 更为详实统计数据有助于得出更为坚实的统计规律。

(2) 更高的时空分辨率。可以单细胞进行线扫, 观察钙信号的发放模式是否受到酒精影响, 以及酒精对钙火花是否有影响。

(3) 对相关分子通路的理解, 可以用一些生化手段辅助实现。

### 致谢

感谢程和平老师认真的教学以及和我们的充分讨论, 使我们不仅学习了心肌细胞以及共聚焦显微镜相关的理论知识, 更让我们了解了应该如何思考科学问题, 让我们领略了大师风采; 感谢王艳茹和侯婷婷老师为我们准备实验体系, 给我们讲解相关知识。

感谢陈心语师姐为我们尽心尽力地答疑解惑, 不辞辛苦带领我们完成实验, 也感谢朱宇飞、景智文师兄给予我们的指导。

感谢的程老师课题组的其他师兄师姐, 给我们提供了学习讨论的时间与空间。

感谢各位一同上课的元培学院整合科学班的同学, 我们相互鼓励、共同进步。

### 参考文献

- [1] MURPHY D B, DAVIDSON M W. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging[M]. John Wiley & Sons, 2012.
- [2] GEE K R, BROWN K, CHEN W U, et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4  $Ca^{2+}$ -indicator dyes[J]. Cell calcium, 2000, 27(2): 97-106.
- [3] NEWTON A C, BOOTMAN M D, SCOTT J D. Second messengers[J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2016, 8(8): a005926.
- [4] WOODCOCK E A, MATKOVICH S J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2005, 37(9): 1746-1751.
- [5] BERS D M. Cardiac excitation-contraction coupling[J]. Nature, 2002, 415(6868): 198-205.
- [6] FERNANDEZ-SOLA J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption[J]. Nature Reviews Cardiology, 2015, 12(10): 576-587.
- [7] MATHEWS M J, LIEBENBERG L, MATHEWS E H. The mechanism by which moderate alcohol consumption influences coronary heart disease[J]. Nutrition journal, 2015, 14: 1-12.
- [8] WANG Y, ZHAO J, YANG W, et al. High-dose alcohol induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via  $pkc-\beta/p66shc$  in mouse primary cardiomyocytes[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 456(2): 656-661.
- [9] GU L, FINK A M, CHOWDHURY S A, et al. Cardiovascular responses and differential changes in mitogen-activated protein kinases following repeated episodes of binge drinking[J]. Alcohol and alcoholism, 2013, 48(2): 131-137.
- [10] KANDADI M R, HU N, REN J. Ulk1 plays a critical role in  $ampk$ -mediated myocardial autophagy and contractile dysfunction following acute alcohol challenge[J]. Current pharmaceutical design, 2013, 19(27): 4874-4887.