

应用激光共聚焦扫描显微镜技术检测缺氧人肺微血管内皮细胞内钙离子浓度动态变化*

莫 镜 崔其亮[△] 张费通 林黎黎 李 颖 廖嘉仪

(广州医学院第三附属医院儿科 广东 广州 510150)

摘要 目的:探讨应用激光共聚焦扫描显微镜(LSCM)技术检测缺氧状态的人肺微血管内皮细胞(HPMVEC)内钙离子(Ca^{2+})浓度动态变化的价值。**方法:**HPMVEC 常规培养,按观察时间点不同分为 5 个缺氧培养组(1h hyp 组、2h hyp 组、4h hyp 组、6h hyp 组和 8h hyp 组)以及 1 个对照组(0h con 组)共 6 个组,每组设 8 个复孔,应用 LSCM 技术测定缺氧后 HPMVEC 内 Ca^{2+} 浓度水平及随时间推移的变化。**结果:**LSCM 技术显示 HPMVEC 内 Ca^{2+} 的荧光强度 1h hyp 组与 0h con 组比较、2h hyp 组与 1h hyp 组比较、4h hyp 组与 2h hyp 组比较、6h hyp 组与 4h hyp 组比较、8h hyp 组与 6h hyp 组比较有显著差异($P<0.05$)。线性回归分析结果显示 Ca^{2+} 荧光强度与缺氧时间成正相关($r=0.969, P<0.01$)。**结论:**HPMVEC 内 Ca^{2+} 浓度随缺氧时间增长而增高, LSCM 在动态检测缺氧状态下 HPMVEC 内的 Ca^{2+} 浓度变化中具有明显优势。

关键词 激光扫描共聚焦显微镜 缺氧 人肺微血管内皮细胞 钙离子浓度

中图分类号 R318.13 R364.4 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)05-834-03

Detection of Dynamic Changes of Intracellular Calcium in Hypoxia Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells by Laser Scanning Confocal Microscope*

MO Jing, CUI Qi-liang[△], ZHANG Fei-tong, LIN Li-li, LI Ying, LIAO Jia-yi

(The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the dynamic changes of intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by laser scanning confocal microscope (LSCM) in hypoxia human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMVEC). **Methods:** HPMVEC conventional culture, divided into six groups: one control group (Group 0h con) and five hypoxia groups, respectively hypoxia for 1h, 2h, 4h, 6h and 8h(1h hyp group, 2h hyp group, 4h hyp group, 6h hyp group and 8h hyp group), each group has 8 wells. The changes of the intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were determined after hypoxia by LSCM. **Results:** The concentration of the intracellular calcium was significantly increased in the 1h hyp group compared to the 0h hyp group($P<0.05$), and in the 2h hyp group compared to the 1h hyp group($P<0.05$), and in the 4h hyp group compared to the 2h hyp group($P<0.05$), and in the 6h hyp group compared to the 4h hyp group($P<0.05$), and in the 8h hyp group compared to the 6h hyp group($P<0.05$). Linear regression showed: Fluorescence intensity of the intracellular calcium concentration positively correlated with hypoxia ($r=0.969, p<0.01$). **Conclusions:** The intracellular calcium concentration of hypoxia HPMVEC were increasing with the time. It is an obvious advantages that LSCM dynamically detects the change of intracellular calcium concentration of the HPMVEC.

Key words: Laser scanning confocal microscope; Hypoxia; Human pulmonary microvascular endothelial cells; Intracellular free calcium concentration.

Chinese Library Classification: R318.13 R364.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-834-03

前言

因供氧减少或利用氧障碍引起细胞发生代谢、功能和形态结构异常变化的病理过程称为缺氧。缺氧是造成细胞损伤的最常见原因。细胞缺氧是临床多种疾病发生发展所共有的病理生理基础。缺氧可引起血管内皮细胞和平滑肌细胞钙离子(Ca^{2+})

内流加强,细胞内钙超载,造成细胞损害。本文应用激光共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscope, LSCM)技术观察缺氧前后人肺微血管内皮细胞(Human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMVEC)内 Ca^{2+} 水平变化,以探讨缺氧时血管内皮细胞损伤的内在机制。

1 材料与方法

* 基金项目 广东省科技计划项目(粤科规划字[2010]170号)

作者简介 莫镜(1982),女,硕士,方向 新生儿疾病诊断与治疗, E-mail: mnggie4835@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 崔其亮,硕士生导师,主任医师,教授, E-mail: cuiqiliang@21cn.com ; Tel: 020-81292255

(收稿日期 2010-12-10 接受日期 2010-12-31)

1.1 材料

HPMVEC 株(美国 SCIENCELL 公司)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、高糖 DMEM(美国 Gibco 公司)、0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)、共聚焦培养皿(中国 NEST 公司)、共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司)、5%CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)、缺氧培养箱(美国 Thermo 公司)、FLuo-3Am(中国碧云天公司)、细胞培养板和培养瓶(美国 Corning 公司)。

1.2 细胞培养

将 HPMVEC 细胞株培养于含 10%胎牛血清、90%高糖 DMEM 培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度孵箱中培养,每 2~3d 换液 1 次,待细胞长至融合后以 0.25%胰酶消化传代。

1.3 缺氧模型建立

将生长状态良好的第 3 代细胞接种于共聚焦培养皿,加入 10%胎牛血清、90%高糖 DMEM 培养基 1ml,置于 5%CO₂ 培养箱,培养 24h,观察细胞已长满皿内玻片的 70%~80%,细胞状态良好,再将各皿置于缺氧培养箱(气体成分与浓度分别为:95%N₂ 和 5%CO₂)。培养皿放置时间分别为 1h、2h、4h、6h、8h 并分别为 1h hyp 组、2h hyp 组、4h hyp 组、6h hyp 组、8h hyp 组;对照组放置时间 0h 为 0h con 组。按不同培养时间取出各皿换掉培养基,以荧光染料负载。

1.4 荧光负载

荧光染料 Fluo-3 的母液浓度为 1~5 mmol/L,以二甲基亚砜(DMSO)溶解,-20℃保存。实验当天以生理盐溶液稀释至终浓度为 1~5 μmol/L,负载条件为 20~37℃、15~60min。本实验以 4 μmol/L 的 Fluo-3 在 37℃、5%CO₂ 孵箱避光孵育 30 min,用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 液洗涤 3 次送共聚焦显微镜室扫描。

1.5 共聚焦显微镜扫描观察

共聚焦显微镜是以激光作为光源,通过计算机分析相关指标。Fluo-3Am 通过细胞膜脱去 -Am 基团变成 Fluo-3 后,能特异地与胞浆内游离钙结合而发出荧光,Fluo-3Am 不发光。缺氧状态下的内皮细胞染色后,每隔 2 秒由激光扫描一次细胞并记录相应荧光值,观察时间 2~5 min。生理状态下内皮细胞亦在相等参数下观察,以示对照。其激发波长和发射波长分别为 488 nm 和 526 nm。

1.6 统计学方法

实验数据均以(mean ± SD)表示。全部资料利用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,组间的比较采用单因素方差分析 线性回归分析时间与荧光强度。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

不同缺氧时间 HPMVEC 内 Ca²⁺ 荧光水平的变化及比较见图 1。无缺氧状态(对照组)下 HPMVEC 内 Ca²⁺ 荧光强度值很低,平均值为 239.64 ± 40.27 。缺氧状态下 HPMVEC 内 Ca²⁺ 荧光强度增强,分别表现为 1h hyp 组 500.01 ± 74.15 、2h hyp 组 675.75 ± 73.88 、4h hyp 组 889.14 ± 39.06 、6h hyp 组 1369.60 ± 52.60 、8h hyp 组 1820.74 ± 164.92 ,且组间比较有显著性差异($P < 0.05$)。经 spearman 线性相关分析,HPMVEC 内 Ca²⁺ 荧光

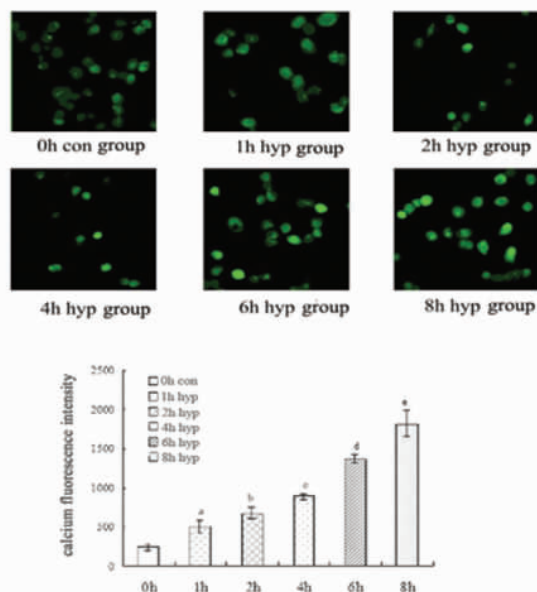


图 1 缺氧时间对肺微血管内皮细胞内钙离子荧光强度的影响

Fig 1 Hypoxia time affects the intracellular calcium fluorescence intensity of HPMVEC

注 * $P < 0.05$ 与 0h con 组比较; $P < 0.05$ 与 1h hyp 组比较; $P < 0.05$ 与 2h hyp 组比较; $P < 0.05$ 与 4h hyp 组比较; $P < 0.05$ 与 6h hyp 组比较。

强度的增加与缺氧时间呈显著性正相关($r = 0.969, P < 0.01$)。

3 讨论

Ca²⁺ 是人体内重要的阳离子, Ca²⁺ 广泛存在于细胞内、外液中。细胞内的 Ca²⁺ 主要贮存于线粒体和内质网内, 机体细胞许多生理活动均依赖于钙的参与^[1]。细胞外液 Ca²⁺ 浓度远高于细胞内液, 这种浓度差依靠细胞膜 Ca²⁺ 通道选择性、Ca²⁺ 泵作用以及细胞内 Ca²⁺ 库(线粒体、内质网)对 Ca²⁺ 摄取与储存来维持^[2]。细胞内 Ca²⁺ 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, 而且细胞内 Ca²⁺ 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梯差, 以及介导细胞对外界刺激的应答反应具有重要的调节作用^[3]。

细胞内 Ca²⁺ 的测定在各类相关临床与基础研究中具有重要意义。大量研究已证实, 在缺氧条件下会出现细胞内 Ca²⁺ 升高, 其主要原因是在此条件下, 维持细胞内外梯差的电压依赖性钙通道(VDCC)和受体门控钙通道(ROCC)受缺氧因素影响, 产生功能变化导致细胞内 Ca²⁺ 聚集量超过排除量, 发生细胞内 Ca²⁺ 超载, 导致细胞内 Ca²⁺ 浓度明显升高^[4]。本实验也证实, HPMVEC 在缺氧条件下细胞内 Ca²⁺ 浓度较对照组明显升高, 在一定时间范围内, 随缺氧时间的延长细胞内 Ca²⁺ 浓度上升越明显。有资料表明, 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度升高可以激活核内切酶, 使基因组 DNA 产生特征性降解, 对细胞凋亡起重要作用^[5], 从而产生一系列的病理生理变化。

目前用于测定细胞内 Ca²⁺ 的方法主要有焦锑酸钾沉淀法、电子分光成像技术、原子吸收分光光度法、电子探针 X 线微区分析法、荧光法等。荧光法是应用较为广泛的方法, 该方法是应

用能特异性地与细胞内游离 Ca^{2+} 结合的荧光染料,依据不同生理、病理状态下 Ca^{2+} 浓度差异所造成的荧光强度改变来测算细胞内 Ca^{2+} 含量。常用的 Ca^{2+} 荧光指示剂有 indo-1、quin-2、Fura-2、Fluo-3、Fluo-4 等。本实验采用 HPMVEC 为研究对象,采用荧光法以 Fluo-3 为特异性荧光染料,由于该染料荧光选择性强,自身不产生荧光而是进入细胞内与游离钙结合后才发出荧光,不需紫外光激发等,所以能有效地避免非特异性染色,避免紫外光对 HPMVEC 活细胞样品的损伤,具有细胞损伤小、敏感性高、不易淬灭、测量不易受干扰等优点,因而能更精准反应在缺氧条件下 HPMVEC 内 Ca^{2+} 浓度的变化。

LSCM 是目前进行钙研究的重要手段之一^[6-8]。本实验将 HPMVEC 分别进行不同时间的缺氧培养,并设置 1 个空白对照组,应用荧光染料 Fluo-3 染色后经 LSCM 技术连续动态观察各组 HPMVEC 内 Ca^{2+} 浓度水平及随时间推移的变化。与传统的荧光显微镜相比,LSCM 具有以下独特优势:①有较高的分辨率,观察细胞内 Ca^{2+} 浓度更准确;②可尽量避免人为因素导致的偏差,使测量结果更客观;③利用 Fluo-3 荧光探针可以测量 Ca^{2+} 在活细胞内的浓度及变化;④一般来说,电生理记录装置加摄像技术检测细胞内离子量变化的速度相对较快,但其图像本身的价值较低,而 LSCM 可以提供亚细胞结构中 Ca^{2+} 浓度动态变化更好的图像,对于研究 Ca^{2+} 细胞内动力学有突出意义。⑤可以利用激光点扫描成像,形成所谓的“光学切片”,沿纵轴上移动标本进行多个光学切片的叠加后,形成组织或细胞中荧光标记结构的总体图像。因此,LSCM 可以观察到更立体、更全面的样本状态,如较重要的切片和一些表面不平的标本。⑥可以进行三维图像重建和标记强度的半定量分析,使图像和结构数据化,利于实验分析和研究。

参考文献 (References)

- [1] Hen'era JA,Arevalo-Herrera M, Shahabuddin AK,et al. Calcium and conjugated linoleic acid reduces pregnancy-induced hypertension and decreases intracellular calcium in lymphocytes [J]. Am J Hypertens, 2006,19(4):381
- [2] 古雅丽,石四箴.细胞内钙离子分析[J].同济大学学报(医学版), 2001,22(6) 54-56
Gu Ya-li,Shi Si-zhen. Analysis of intracellular calcium [J].Journal Of Tongji University (Medical Science),2001,22(6):54-56
- [3] Katz E, Verbitaky M, Rothlin C, et al. High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor [J]. Hear Res,2000,141:117-128
- [4] Albert AP, Liu M, Large WA. Dual effect of calmodulin on store-operated Ca^{2+} permeable cation channels in rabbit portal vein myocytes[J]. Br J Pharmacol,2006,148(7):1001-1011
- [5] Leiba A, Vald A, Peleg E,et al. Does dietary recall adequately assess sodium,potassium, and calcium intake in hypertensive patients [J]. Nutrition, 2005,21(4):462
- [6] 韦国锋,程金生,徐群清,等.用激光扫描共聚焦显微镜观察仙人掌提取物镇痛作用对小鼠脑细胞内钙离子的影响[J].应用激光,2006,26(6) 460-461
Wei Guo-feng, Cheng Jin-sheng, Xu Qun-qing, et al. LSCM technology to investigate the influence of the Abirritation of Opuntia Ailleii Haw extractive on the concentration of $[\text{Ca}^{2+}]$ in mouse brain cell[J].APPLIED LASER,2006,26(6):460-461
- [7] Chen JT, Chen RM, Lin YL, et al. Confocal laser scanning microscopy:an overview of principle and practice in biomedical research[J].Acta Anaesthesiol Taiwan,2004,42(1):33-40
- [8] Amos WB, White JG. How the confocal laser scanning microscope entered biological research[J]. Biol Cell,2003,95(6):335-342
- [6] Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, et al. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse[J]. Mol Ther,2001,3(2):241-248
- [7] Cui Q, Lu Q, So KF, et al. CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters[J]. Inves Cphthalmol Vis Sci, 1999,40:760-766
- [8] Loh NK, Woerly S, Bunt SM, et al. The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts [J]. Exp Neurol, 2001,170(1):72-84
- [9] Manthorpe M, Skaper SD, Williams LR, et al. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor [J]. Brain Res, 1986,367: 282-286
- [10] Aebischer P, Pochon NA, Heyd B, et al. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogeneic cell line engineered to secrete Hcntf [J]. Hum Gene Ther,1996,7: 851-860
- [11] Chun MH, Ju WK, Kim KY, et al. Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Muller cells in the rat retina following optic nerve transection[J]. Brain Res,2000,23,868:358-362
- [12] Jo SA, Wang E, Benowitz LI. Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells[J]. Neuroscience,1999,89: 579-591
- [13] Cui Q, Harvey AR. CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts [J]. Neuroreport,2000,11: 3999-4002
- [14] McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy [J]. Human Gene Therapy, 2004,15(11): 1022-1033
- [15] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors [J]. Human Gene Therapy,2004,15(11):1034-1044
- [16] Kim M, Zinn KR, Barnett BG, Sumerel LA,et.al. The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells [J]. European Journal of Cancer Prevention,2002,38(14):1917-1926
- [17] Harvey AR, Hellström M, Rodger J. Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway[J]. Prog Brain Res,2009,175:151-161
- [18] McGill TJ, Prusky GT, Douglas RM, et al., Intracocular CNTF reduces vision in normal rats in a dose-dependent manner [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2007,48(12):5756-5766
- [19] MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, et al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion[J]. Exp Eye Res,2006,83(5):1118-1127

(上接第 811 页)