

# 单个心肌细胞内钙波的微观动力学研究\*

白永强<sup>1)†</sup> 唐爱辉<sup>2)</sup> 王世强<sup>2)</sup> 朱 星<sup>1)‡</sup>

1) 北京大学物理学院, 人工微结构与介观物理国家重点实验室, 北京 100871)

2) 北京大学生命科学学院, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871)

3) 大庆石油学院电子科学学院, 大庆 163318)

4) 国家纳米科学中心, 北京 100080)

(2006 年 11 月 8 日收到, 2006 年 11 月 20 日收到修改稿)

利用基于近场光学原理构建的全内反射荧光显微镜研究了大鼠单个心肌细胞中的钙信号. 利用这种显微镜的快速成像和高信噪比的特点, 观察到单个细胞中复杂的二维钙波斑图. 分析了单个钙信号释放事件在钙波形成、运动过程中的作用. 建立在 fire-diffuse-fire 模型基础上的模拟显示, 由基本钙释放事件组成的钙波可以在心肌细胞中稳定存在. 此研究对进一步认识活体可激发系统的微观动力学行为有指导意义.

关键词: 近场光学, 全内反射荧光显微镜, 心肌细胞, 钙波

PACC: 8725, 0760P, 8715H, 5235M

## 1. 引 言

钙离子是普遍存在的细胞信使之一, 调控着诸如肌肉收缩、神经传导、荷尔蒙分泌、基因表达和细胞的生长、凋亡等重要的生理过程<sup>[1-4]</sup>. 在心肌细胞中, 钙离子的作用主要是调节肌细胞的收缩, 为心脏的正常跳动提供基本生理支持. 钙离子从心肌细胞的肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR) 释放到细胞基质的过程受钙致钙释放( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, CICR) 机理调控<sup>[5]</sup>, 此过程通过 SR 上的钙通道——兰尼定受体(ryanodine receptors, RyRs) 完成. 心肌细胞中的钙释放具有时空离散性, 每次释放的时间间断性和释放通道的空间间断性, 使钙释放以钙火花的形式呈现. 并且由于 CICR 的作用, 当几个近邻的钙火花在相近的时间出现时, 其释放的钙离子可能有足够的浓度扩散到下一个释放位点并引起此位点的释放, 当这一过程连续发生时就形成钙波. 因此, 钙火花和钙波是心肌细胞中钙离子表现的两种基本形式. 自从 Cheng 等在 1993 年首次发现钙火花以来<sup>[6]</sup>, 单个钙通道分子的生理学研究取得了很大的进展<sup>[7]</sup>, 与此相比, 心肌细胞中钙波的动力学行

为研究的进展就相对缓慢, 尤其是由钙火花形成钙波以及钙波在钙火花干扰作用下的演变过程很少有研究涉及, 但是这正是生理系统中微观机理到宏观机理的转变过程. 因此, 对此现象的研究对理解从微观的生理现象到宏观的生理过程具有非常重要的意义.

在以往的研究中, 更多地是使用扫描共焦显微镜研究心肌细胞的钙信号, 由于其扫描的特点, 成像速度较慢. 对于较为快速的钙信号活动, 多采用线扫描方式, 而观察二维空间分布的钙波斑图较为困难. 因此文献中所用的图形多为一维空间-时间图.

我们用基于近场光学原理构建的全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM)<sup>[8-10]</sup>进行钙信号的观察. 全内反射现象是生活中一种常见现象, 如钻石的色彩斑斓和光纤中的光线传播等等. 当光线由较高折射率介质照向较低折射率介质并在两介质界面发生全反射时, 通过电磁场理论计算可知在较低折射率介质中存在沿界面平行传播的隐失场. 对于可见光而言, 隐失场约透过界面小于 100 nm, 这正是激发界面处荧光分子的良好光源. TIRFM 的优点归因为其隐失波的照明特性. TIRFM 具有信噪比高(隐失波照明)、成像速度

\* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2003CB716901), 高等学校博士学科点专项科研基金和北京大学 985 计划单分子检测项目资助的课题.

† 通讯联系人. E-mail: zhuxing@pku.edu.cn

快(非扫描, CCD 成像), 对样品伤害小(隐失波能量较小)等特点, 是研究生物活体动态行为较为理想的仪器. 通过 TIRFM, 我们观测到了心肌细胞钙信号展现的复杂二维时空斑图. 结果显示, 钙火花在行波、靶波及螺旋波的形成及演化过程中起着关键的作用. 基于 fire-diffuse-fire (FDF) 模型的模拟证实, 钙火花组成的钙波可以在心肌细胞中稳定存在.

## 2. 实验方法和实验仪器

### 2.1. 实验方法

如文献[11]所述, 将成年 SD 大鼠(Sprague-Dawley rats 2—3 个月大, 重 200—300 g)心室肌细胞用标准酶液分离技术取得, 存放在如下溶液中(单位  $10^{-9}$  mol/dm<sup>3</sup>): 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 葡萄糖, 20 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)(pH 值为 7.4). 实验观察钙信号之前, 在保存的心肌细胞中加入 Fluo-4 钙敏荧光染料, 将含有细胞的溶液滴到盖玻片上, 静置数分钟, 放置 TIRFM 上观察. 所有实验都是在室温下进行的.

### 2.2. 实验仪器

实验采用的是本实验室自行构建的物镜式 TIRFM 系统. 如图 1 所示, 风冷氩离子激光器(543-AP-A01, Melles Griot)发出的 488 nm 激光经过透镜组聚焦在安装在倒置显微镜(IX-71, Olympus)上的 TIRFM 物镜(Apo × 60, NA = 1.45, oil, TIRFM, Olympus)的后焦面(back focus plane, BFP)上. 这样, 在理想情况下从物镜出射的激光就为平行光. 调节透

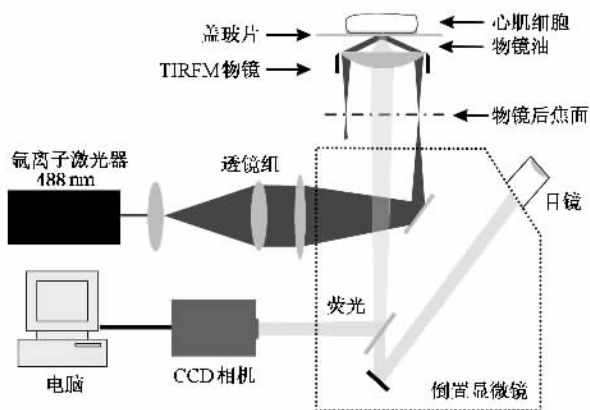


图 1 物镜式 TIRFM 成像系统结构示意图

镜组的位置, 使聚焦在物镜 BFP 上的光点偏离物镜轴心, 物镜出射的平行光变成斜照射, 当斜照射的角度超过临界角时, 激光在盖玻片的上表面会产生全反射, 同时隐失场在盖玻片上表面形成, 从而激发盖玻片表面附近 100—200 nm 内细胞中的荧光分子. 钙离子与钙敏荧光染料 Fluo-4 结合并被激发后形成的荧光由 CCD 相机(Cascade 650, Roper Scientific)接收成像(全幅 653 × 492 像素, 25 帧/秒; 16 × 16 像素, 510 帧/秒). 成像过程由软件(Image-pro Express, version 4.5, Media Cybernetics)通过计算机完成.

## 3. 实验结果与讨论

### 3.1. 行波的回转

图 2 显示行波在钙火花的作用下形成回转的过程. 心肌细胞中钙信号的释放与传播有如下三个特点, 一是每一个 SR 上的钙释放通道对钙的敏感性有很大的不同, 二是当一次钙火花发生后, 此处释放位点将进入不应期, 即在将来一段时间内将不再继续释放. 另外, 在钙离子传播的同时, SR 上的钙泵会将钙离子从细胞基质中泵回 SR 中, 以维持 SR 内外的钙离子有一定的浓度差, 并给下一次钙释放提供一定的钙离子支持. 这样整个心肌细胞就具有一定的可激发性. 正是由于第一个特点, 我们观察到行波的波前(图 2 中白实线)并不是平面波形状, 而是参差不齐的. 并且, 这种形状会随时间的推移, 时时不同(如图 2(a)和(b)的白线形状的不同). 钙火花的出现有一定的随机性<sup>[6, 12]</sup>, 我们观察到在行波的传播同时, 其他位置释放位点在没有波前的触发的情况下, 也有一些钙火花随机出现(图 2(a)中白虚线). 此处随后又发生了三个钙火花(图 2(b)中白虚线), 但是并没有传播出去. 这一看似随机的微观事件, 却产生了整个行波传播的重大变化. 正是由于上述的第二个特点, 当钙火花释放过后, 位点将进入不应期, 那么, 当行波波前到来时, 虽然此处的钙浓度很高, 也不能触发此处位点继续释放. 这一行为导致了 CICR 机理在此处发生中断, 后果是行波波前变小, 并绕着不应区域传播, 形成回转现象(图 2(e)—(h)). 为了更清楚地显示这一过程, 我们将所有行波波前及钙火花绘在一张图上(图 2(i)), 可以看出行波波前确实在提前钙火花释放点发生形变. 虽然细胞核等天然释放位点少的区域也能引起这些现象<sup>[13, 14]</sup>, 但我们观察发现, 随机的提前释放和

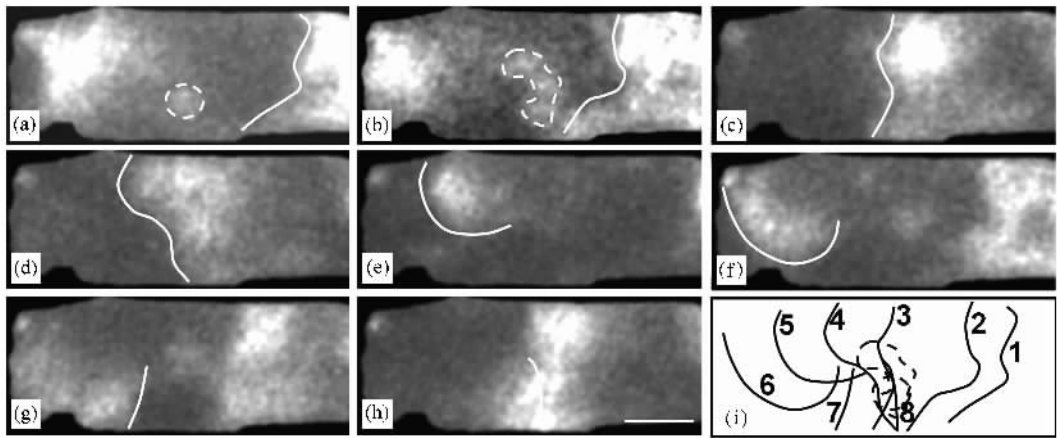


图2 行波在钙火花作用下变成回转状态的过程 虚线表示的是钙火花,实线表示的是行波波前(i)中每条线旁边数字表示波前出现顺序,每幅图时间间隔为106 ms,图中标尺为10  $\mu\text{m}$

CICR 机理的中断是引起行波变成回转波的重要原因。

### 3.2. 靶波的形成

在静息状态下的心肌细胞中,单个的钙火花并不能触发钙波<sup>[15]</sup>。这是因为钙火花所释放的钙离子一方面进行空间扩散,一方面由于钙泵的回收作用,使得到达下一邻近释放位点的钙离子浓度不足以达到释放位点的触发阈值。但是,当几个钙火花在释放时间和空间上近邻时就有可能产生钙波。尤其是当释放区域位于细胞的中间区域时,就会形成靶波(由中心圆形对称向远处传播的波)。图3显示了这一过程。图3(a)I, II, III位置的自发的钙火花没有产生钙波,分析其原因一是周围位点正处在不应期内,比如I和II释放位点(此处刚有钙波传过,波后在图的左上角可以看到),二是钙火花较小,不能触发临近的位点释放(因为CICR机理需要一定的阈值)比如III释放位点。然而当以上情况都排出时,钙波就有可能产生,如IV处释放位点,由于其邻近细胞膜,因此所形成的靶波为半圆形。可以看出,波形在二维空间上非常接近圆形,这说明钙离子的扩散速度在空间上是对称的。最新研究结果表明<sup>[16]</sup>,空间上释放位点在细胞的长轴和短轴方向排列距离并不相等(长轴方向约是短轴方向的2倍),这样要想形成圆形对称的靶波,势必要求钙离子在长轴和短轴方向的有效扩散系数不同<sup>[17]</sup>,其形成的具体原因还有待实验和理论进一步研究。如3.1节分析所示,靶波的传播过程中也受着自发钙火花的干扰作用。图3(c)中箭头所指区域发生的一次提前钙释

放,导致当靶波传到这里时,产生对称的破坏(图3(d)箭头处)。这种对称的缺失,有时可能产生螺旋现象,引起可激发系统的持续震荡,3.3节将阐述这一过程。

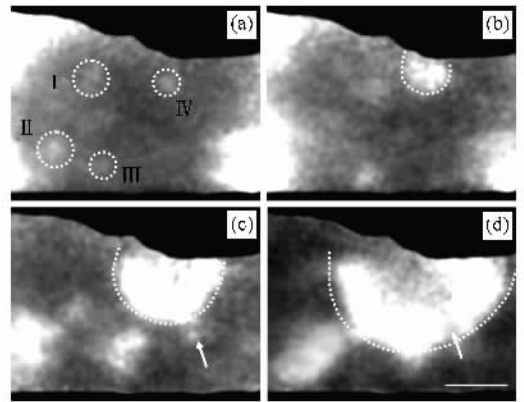


图3 靶波的形成过程 每幅图时间间隔为106 ms,图中标尺为10  $\mu\text{m}$

### 3.3. 螺旋波的形成

图4显示了两个靶波相互碰撞产生一对螺旋波的过程。事实上,对可激发系统而言,两个单纯的靶波相碰撞并不能产生螺旋波,而是形成一个较大的不规则的纺锤状的波形<sup>[18]</sup>(这与非可激发系统的机械波比如水波的相遇不同,它们相遇时相互越过,继续向前传播)。螺旋现象的产生必然要求有对称的破坏,即缺陷的产生。虽然也有报道说在活体体系的可激发系统(比如心脏)螺旋波的产生是由于波的相互碰撞产生的<sup>[19]</sup>,但是,这只是表现现象。在我们的观察中,两个靶波首先随机产生(图4(a)白实线区

域和虚线区域)随着时间的推移,其中的一个靶波产生非对称状态(图 4(c)箭头所指处)这是由于提前的钙释放导致的. 这种非对称形状为另一靶波(图 4(c)白虚线所指)产生螺旋提供了时空可行性. 当另一靶波波前扩散到此区域时,如果它恢复了不应期,那么, CICR 就会在此处发生,从而形成波的定向传播. 如果没有其他突发事件的干扰,后续 CICR 过程将沿着不应期(另一靶波留下的)恢复先后顺序进行,从而形成螺旋波(图 4(d)-(f)). 因此我们得到这样的结论,钙螺旋波所形成的必要条件——对称的破缺,来源于钙火花.

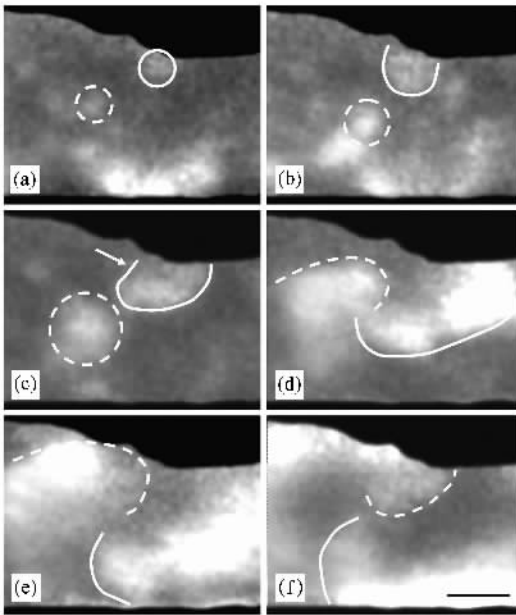


图 4 螺旋波的形成过程 虚线和实线分别表示两个独立的波前,每幅图时间间隔为 106 ms,图中标尺为 10  $\mu\text{m}$

#### 4. 模型与模拟结果

随着钙火花的发现,人们更加清楚地认识了心肌细胞内钙信号活动的规律. 在实验基础上,建立了心肌细胞中的钙信号动力学模型. 心肌细胞中钙离子释放特性与其他细胞有很大不同,因此在模型上也是不一样的,最重要的区别之一是钙释放的空间和时间上的分立特点,而对应发展起来的 FDF 模型<sup>[20,21]</sup>是比较准确的. 我们综合改进了文献中提出的模型建立了如下描述心肌细胞中钙信号活动规律的方程:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -\frac{vu^4}{k^4 + u^4} + D\nabla^2 u$$

$$+ \sum_m \sum_n \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_n) \gamma(t - T_n^m), \quad (1)$$

$$\gamma(t) = \frac{\sigma}{\tau} \Theta(t) \Theta(\tau - t), \quad (2)$$

$$T_n^m(\mathbf{r}) = \inf \left\{ t \mid u(\mathbf{r}, t) > u_c, \frac{\partial u(\mathbf{r}, t)}{\partial t} > 0, T_n^m(\mathbf{r}) > T_n^{m-1}(\mathbf{r}) + \tau_R \right\}, \quad (3)$$

其中(1)式是反应扩散方程, $u$ 表示为细胞质中的钙离子浓度,等号右边第一项表示 SR 上钙泵将细胞质中的钙离子转运回 SR 中, $\nu$ 和 $\kappa$ 为常数( $\nu$ 取 10  $\mu\text{M}/\text{s}$ ,  $\kappa$ 取 0.2  $\mu\text{M}$ ),第二项为扩散项, $D$ 为扩散系数,最后一项为 SR 上钙释放通道释放钙离子项, $n$ 和 $m$ 表示第 $n$ 个释放位点的第 $m$ 次释放, $\delta$ 函数表示只有固定间隔的位置才有钙通道,即钙通道是分离的. $\gamma$ 函数表示每次释放特点,由(2)式描述,即形状是方波,总强度为 $\sigma$ ,持续时间 $\tau$ . 何时释放由(3)式决定,式中三个条件分别表示为钙浓度要大于阈值 $u_c$ ,钙离子浓度在上升过程<sup>[21]</sup>,以及释放时间间隔大于钙通道的不应期 $\tau_R$ .

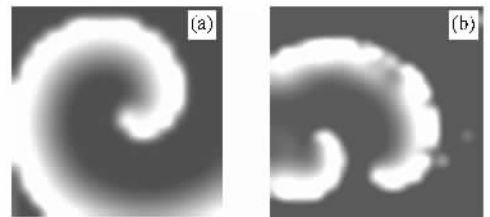


图 5 建立在 FDF 模型基础上的心肌细胞钙信号模拟结果 (a) 随机靶波的产生 (b) 随机螺旋波的产生 ( $D = 15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $\tau_R = 200 \text{ ms}$ ,  $\sigma = 1 \mu\text{M} \cdot \mu\text{m}^2$ ,  $\tau = 10 \text{ ms}$ , 释放位点间距 1  $\mu\text{m}$ , 随机释放概率 (a) 每秒中每个位点释放 0.1 次 (b) 每秒中每个位点释放 0.5 次

将方程(1)差分化后并加入释放条件,即可迭代模拟出心肌细胞内钙信号随时间和空间的变化. 结合钙火花释放的随机特点,我们在模型中加入了随机释放的钙火花. 我们的模拟显示钙波在适合的初始条件和释放条件下可以产生并稳定地传播(图 5(a)). 当调节钙火花释放的随机频率,在程序执行开始 300 ms 时间步时,如第三节描述,系统中出现螺旋波(图 5(b)). 模拟结果证实前文分析的合理性,可以运用此模型对心肌细胞微观动力学性质进行更加细致的研究.

作为普遍存在的细胞信使之一,钙离子在心肌细胞中展现了复杂的斑图,虽然这种情况在正常的心肌细胞中并不常见,但其表现出来的性质为我们

研究活体可激发介质提供了有力的手段。尤为特别的是,由于心肌细胞释放单元的非连续性和易观察性,为研究可激发系统的微观或局域特性对系统的影响提供了理想的模型。从实际角度来讲,目前所发现的活体可激发系统<sup>[22-25]</sup>都是非常不连续的,比如爪蟾卵中钙通道的不连续性、心脏的单细胞构成、神经系统的单个神经元等,上述系统中所发现的螺旋波还没有从微观角度进行研究,我们的研究方法为观察它们当中的非线性现象的微观机理提供了可能的手段。

## 5. 结 论

本文利用基于近场光学原理自行构建的全内反射荧光显微镜研究了单个心肌细胞内钙信号的复杂斑图。分析了钙回转波、靶波、螺旋波产生的机理,发现钙活动的微观基本单位——钙火花,其释放特性决定宏观钙波斑图的演变。在靶波的形成、行波的回转,以及螺旋波的产生等各个过程,钙火花都起着至关重要的作用。建立在 FDF 模型基础上的模拟显示由钙火花组成的钙波可以在单个心肌细胞中存在。

- [ 1 ] Clapham D E 1995 *Cell* **80** 259
- [ 2 ] Berridge M J, Lipp P, Bootman M D 2000 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1** 11
- [ 3 ] Zhu W, Wang S Q, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown J H, Devic E, Kobilka B K, Cheng H, Xiao R P 2003 *J. Clin. Invest.* **111** 617
- [ 4 ] Bers D 2001 *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*, 2nd ed, (Dordrecht/Boston/London: Kluwer)
- [ 5 ] Endo M, Tanaka M, Ogawa Y 1970 *Nature* **228** 34
- [ 6 ] Cheng H P, Lederer W J, Cannell M B 1993 *Science* **262** 740
- [ 7 ] Wang S Q, Wei C, Zhao G, Brochet D X, Shen J, Song L S, Wang W, Yang D, Cheng H 2004 *Circ. Res.* **94** 1011
- [ 8 ] Toomre D, Manstein D J 2001 *Trends Cell Biol.* **11** 298
- [ 9 ] Axelrod D 2001 *Traffic* **2** 764
- [ 10 ] Wang C, Wang G Y, Xu Z Z 2004 *Acta Phys. Sin.* **53** 1325 (in Chinese)[王琛、王桂英、徐至展 2004 *物理学报* **53** 1325]
- [ 11 ] Zhou Y Y, Wang S Q, Zhu W Z, Chruscinski A, Kobilka B K, Ziman B, Wang S, Lakatta E G, Cheng H, Xiao R P 2000 *Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol.* **279** H429
- [ 12 ] Wang S Q, Song L S, Lakatta E G, Cheng H 2001 *Nature* **410** 592
- [ 13 ] Lipp P, Niggli E 1993 *Biophys. J.* **65** 2272
- [ 14 ] Ishida H, Genka C, Hirota Y, Hirota Y, Nakazawa H, Barry W H 1999 *Biophys. J.* **77** 2114
- [ 15 ] Marchant J, Callamaras N, Parker I 1999 *Embo J.* **18** 5285
- [ 16 ] Chen-Izu Y, McCulle S L, Ward C W, Soeller C, Allen B M, Rabang C, Cannell M B, Balke C W, Izu L T 2006 *Biophys. J.* **91** 1
- [ 17 ] Parker I, Zang W J, Wier W G 1996 *J. Physiol.* **497** 31
- [ 18 ] Wussling M H P, Scheufler K, Schmerling S, Drygalla V 1997 *Biophys. J.* **73** 1232
- [ 19 ] Lee J J, Kamjoo K, Hough D, Hwang C, Fan W, Fishbein M C, Bonometti C, Ikeda T, Karagueuzian H S, Chen P S 1996 *Circ. Res.* **78** 660
- [ 20 ] Keizer J, Smith G D, Ponce-Dawson S *et al* 1998 *Biophys. J.* **75** 595
- [ 21 ] Coombes S, Timofeeva Y 2003 *Phys. Rev. E* **68** 021915
- [ 22 ] Lechleiter J, Girard S, Peralta E, Clapham D 1991 *Science* **252** 123
- [ 23 ] Davidenko J M, Pertsov A M, Salomonsz R, Baxter W, Jalife J 1991 *Nature* **355** 349
- [ 24 ] Sawai S, Thomason P A, Cox E C 2005 *Nature* **433** 323
- [ 25 ] Huang X Y, Troy W C, Yang Q, Ma H T, Laing C R, Schiff S J, Wu J Y 2004 *J. Neurosci.* **24** 9897

# Micro-dynamics of $\text{Ca}^{2+}$ signals in single heart cells<sup>\*</sup>

Bai Yong-Qiang<sup>1)B)</sup> Tang Ai-Hui<sup>2)</sup> Wang Shi-Qiang<sup>2)</sup> Zhu Xing<sup>1)A)†</sup>

<sup>1</sup> *State Key Laboratory for Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China*

<sup>2</sup> *State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China*

<sup>3</sup> *Institute of Electronic Science, Daqing Petroleum Institute, Daqing 163318, China*

<sup>4</sup> *National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100084, China*

( Received 8 November 2006 ; revised manuscript received 20 November 2006 )

## Abstract

We used a total internal reflection fluorescence microscope based on the near field optics principle to study the  $\text{Ca}^{2+}$  signals in single heart cells of Sprague-Dawley rat. Due to the high signal to noise ratio and high speed of data acquisition of this microscope, the  $\text{Ca}^{2+}$  images show complex 2-dimensional wave patterns. The local elementary  $\text{Ca}^{2+}$  release units play important role in the formation and transformation of  $\text{Ca}^{2+}$  wave. Simulations based on Fire-Diffuse-Fire model show that the  $\text{Ca}^{2+}$  wave, composed of  $\text{Ca}^{2+}$  release units, may steadily exist in single heart cell. Our results will be helpful for understanding the micro-dynamics of living excitable medium.

**Keywords** : near-field optics, total internal reflection fluorescence microscope, heart cell,  $\text{Ca}^{2+}$  wave

**PACC** : 8725, 0760P, 8715H, 5235M

<sup>\*</sup> Project supported by the State Key Development Program for Basic Research of China ( Grant No. 2003CB716901 ), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China and the " Single molecule defection " Project of Peking University 985 Program, China.

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail : zhuxing@pku.edu.cn