

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00083

新型钙离子指示剂 GCaMP 的发展与应用

董斐斐, 安娜娜, 王国坤, 秦永文*

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

[摘要] 新型钙离子指示剂 GCaMPs 是以单个荧光蛋白为基础构建而成, 可以定位到特定的细胞亚型或细胞器, 对细胞或细胞器内钙离子敏感, 荧光强度与钙离子浓度成正比, 可用以观察钙离子介导的信号传递过程, 研究机体发育、疾病、药物作用等过程中细胞内钙信号的产生、传递和时空特点, 近年来被广泛应用于生理学、细胞生物学和临床研究等领域, 具有独特的优势和广阔的前景。本文通过对 GCaMPs 的原理、发展和应用进行综述, 旨在为生命科学工作者介绍一种新的钙离子检测工具, 以利于更好地探索生理和病理状态下细胞的行为和功能, 揭示其内在的病理生理机制。

[关键词] GCaMPs; 钙离子指示剂; 原理; 应用

[中图分类号] R 33-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)01-0083-05

GCaMPs: promising tools for *in vivo* calcium imaging

DONG Fei-fei, AN Li-na, WANG Guo-kun, QIN Yong-wen*

Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] GCaMPs are new genetically encoded calcium indicators based on a single fluorescent protein molecule with high calcium affinity. The fluorescence intensity of GCaMPs is proportional to intracellular calcium concentration. GCaMPs can be easily targeted and expressed in specific cells and cellular compartments, so as to make it possible for observing calcium-mediated signal transduction. GCaMPs can provide long-term *in vivo* imaging of calcium signals during development, disease, and drug therapy, making them promising tools for physiological, cytobiological and clinical studies. This paper summarized the principle, progression and application of GCaMPs, hoping to introduce a new calcium detection tool for further exploring the behavior and functions of cells under physiological and pathological states.

[Key words] GCaMPs; calcium indicator; mechanism; application

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 83-87]

细胞内游离钙是重要的第二信使, 参与对生物体生长和发育的调控, 对细胞的兴奋、收缩、分泌、代谢、细胞周期等有重要作用, 病理条件下可介导多种细胞的损伤^[1]。胞内钙离子含量及信号转导的研究已成为生理学、生物学和临床医学的前沿课题。从 20 世纪 50 年代起, 人们就开始研究测定细胞内钙离子含量的技术和方法。近年来, 基因编码的钙离子指示剂 (genetically encoded Ca^{2+} indicator, GECIs) 成为应用最为广泛的钙离子检测工具之一, 在研究生物体不同组织、系统的生理功能和发育机制方面做出了重要贡献^[2]。

根据发光原理可将 GECIs 分成两大类: 以单个

荧光蛋白为基础的 GECIs 和由荧光共振能量转移 (fluorescent resonance energy transfer, FRET) 的荧光蛋白对构成的 GECIs^[3]。前者包括 Pericams、Camgaros 和 GCaMPs 等, 后者包括 Cameleons、D3cpV 和 TN-XXL 等。运用分子生物学和转基因手段, 可将这些 GECIs 定位到靶细胞或亚细胞结构, 高效、直观、无创地在体检测胞内钙离子信号。本文将着重对 GCaMPs 的发展和应用进行综述。

1 GCaMPs 概述

GCaMPs 是单个绿色荧光蛋白 (GFP)、钙调蛋白 (CaM) 和平滑肌细胞肌球蛋白轻链激酶片段 M13

[收稿日期] 2012-08-24 **[接受日期]** 2012-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金 (8113005, 31000354, 30971231). Supported by National Natural Science Foundation of China (8113005, 31000354, 30971231).

[作者简介] 董斐斐, 博士生. E-mail: fay11fay143fay@yahoo.com.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31151261, E-mail: ywqin1@yahoo.com.cn

融合的产物。其中 GFP 是环状序列改变的增强型绿色荧光蛋白 (cpEGFP), 用六肽 GGTGGS 将 EGFP 的 N 末端与 C 末端连接起来, 同时将 EGFP 氨基酸序列上特定位置的肽键断开, 产生新的 N 末端与 C 末端^[4]。C 末端结合 CaM, N 末端结合 M13 片段, 作为 CaM 结合的靶序列。

CaM 结合钙离子后发生变构, 环绕在 M13 肽周围, 以其铰链区和 M13 结合, Ca^{2+} -CaM-M13 相互作用, 引起 EGFP 生色基团环境改变, 从而使 GCaMPs 的荧光强度明显增加^[4]。荧光饱和曲线说明 M13 存在时钙离子和 CaM 结合有协同作用, CaM 和 M13 的结合与钙离子结合相偶联, 钙离子浓度高时钙离子结合动力学更快, 而解离动力学与钙离子浓度无关^[5]。

2 GCaMPs 的发展历史

2001 年, Nakai 等^[5] 构建出第一代 GCaMP, 称为 GCaMP1, 用以观察 HEK293 细胞和小鼠肌管的信号改变。但是由于固有信号强度低, 反应非线性, 对低频信号敏感性不足, 对温度不稳定, 仅用于测量低等生物细胞内钙信号。2005 年, Ohkura 等^[6] 对 GCaMP1 做了改进, 在 cpEGFP 内引入 2 处突变 (V163A 和 S175G), 得到了 GCaMP1.6, 同时在其 CaM 的钙结合位点引入 E140K 突变, 得到了 CaMP1.6-CaM(E140K), 两者的荧光强度、最大荧光改变、钙离子敏感性、离子选择性都显著提高, 后者还减少了 CaM 与钙离子的结合, 降低了指示剂对钙离子的缓冲效应, 能更准确地检测胞内钙离子浓度, 并减小对细胞生理的影响。但是, 所有第一代 GCaMPs 在 30℃ 以上都不能维持稳定荧光, 不能用于在体检测哺乳动物细胞内钙离子浓度的改变。

为了解决这一问题, 2006 年, Tallini 等^[7] 在 GCaMP1.6 的 N 末端第 35 位氨基酸残基处引入了由多聚组氨酸组成的前导序列, 以加强 GCaMPs 在生理温度下的稳定性, 同时在 cpEGFP 内引入 3 个突变 (D180Y、A206K 和 V93I), 得到了第二代 GCaMP, 称为 GCaMP2。此后, Mao 等^[8] 通过多次突变, 得到了多个 GCaMP2 的亚型, 进一步改善了 GCaMPs 的动力学范围和基线荧光。与第一代 GCaMPs 相比, 第二代 GCaMPs 折叠效率更高, 荧光更强, 生理温度下动力学快速稳定, 对高频刺激反应更明显, 不受内源性 CaM 的影响, 不改变细胞的生理状态和功能, 可用于在体研究高等生物体内快

速信号改变。但是, 总体而言, 第二代 GCaMPs 对单个动作电位敏感性有限。

为此, Tian 等^[9] 在 2009 年构建了第三代 GCaMPs。由于早前 Varshavsky^[10] 报道过 GCaMP2 的 N 末端 2 位精氨酸会降低指示剂的稳定性, Tian 等首先造成该位精氨酸缺失, 并在此基础上在 cpEGFP 内引入 M153K 和 T203V 双突变, 在 CaM 内引入 N60D 突变, 以增加少量钙离子瞬时流动引起的荧光改变, 将这种新型的指示剂称为 GCaMP3。与第二代 GCaMPs 相比, GCaMP3 信噪比更高, 耐光性更好, 基线荧光信号更强, 动力学范围更大, 对钙离子的亲和力更高, 一次可以稳定表达数月, 没有明显的细胞毒性和行为干扰, 且由于 GCaMP3 对钙离子浓度变化更为敏感, 可用于检测此前的 GCaMPs 无法检出的低频自发性钙内流和单个动作电位^[11]。

2011 年, Muto 等^[11-12] 在 GCaMP2 中诱导 cpEGFP 不同部位突变 (S30R、Y39N、N105T、A206V), 形成超折叠的绿色荧光蛋白, 得到新一代 GCaMP, 称为 GCaMP-HS。与前几代相比较, GCaMP-HS 折叠效率更高, 热变性后荧光恢复更快, 荧光强度和信号振幅更大, 在静息状态更明亮, 在细胞内表达水平更高, 对钙离子的亲和力和敏感性更强, 在钙离子浓度较低时仍可用于检测瞬时钙离子的变化。

3 GCaMPs 在生命科学研究领域的应用

3.1 检测特定类型细胞或亚细胞结构内的信号变化

GCaMPs 的一个突出的优点是可以通过特异的启动子和定位序列实现在特定类型细胞或亚细胞结构表达, 从而检测目标细胞或亚细胞结构内的钙离子信号的变化, 记录生理条件下或给予外源性刺激下不同细胞的反应方式、信号的起源和传递^[13]。Wang 等^[14] 和 Jayaraman 等^[15] 分别在果蝇蕈形体嗅觉神经元和触角神经叶投射神经元内特异表达 GCaMPs, 根据不同种类和浓度的气味分子引起嗅觉环路不同部位神经元的荧光改变, 研究果蝇嗅觉环路的构成和信号机制。Dreosti 等^[16] 将 GCaMP2 与突触囊泡蛋白接合, 形成可以定位到神经元突触小泡的 SyGCaMP2, 记录斑马鱼视网膜双极细胞和视顶盖细胞突触内的钙离子变化, 研究视觉通路的形成和机制。Tallini 等^[7] 构建了心肌细胞条件表达的 $\alpha\text{MHC-CaMP2-tTA}$ 双转基因小鼠, 用于观察传导

系统的发育和心肌的兴奋收缩偶联。Tian 等^[9]用 GCaMP3 检测小鼠躯体感觉和运动皮质神经元内钙离子浓度改变,以研究皮质区神经元活动和信号传递。Shigetomi 等^[17-18]在星形胶质细胞和神经元细胞膜上表达 Lck-GCaMP2/Lck-GCaMP3,检测两者活化后胞内和突起内的信号变化,观察微区钙信号的时空分布,分析神经元和星形胶质细胞信号传递的异同点,研究微区钙信号产生的机制。

3.2 研究神经网络控制的动物行为 GCaMPs 可用于在体观察脊椎动物特定神经环路的活性,而神经环路的活化调控动物行为。Muto 等^[11-12]构建了尾部初级(caudal primary, CaP)运动神经元特异表达 GCaMP-HS 的转基因斑马鱼,通过分析胚胎早期自主收缩时躯干两侧 CaP 运动神经元激活的时空特点和中间神经元的活动,揭示了参与自发性卷曲行为的脊柱运动神经元回路的构成。Marella 等^[19]在果蝇味觉细胞特异表达 GCaMPs,在体检测不同种类和浓度的味觉信号引起的味觉细胞在脑中投射神经元的电活动,观察这些细胞的激活与接受或逃避行为的关系,建立行为反应和神经元信号改变的联系,研究这些生物学行为的形成机制。Chalasanani 等^[20]在线虫感觉神经元和感觉通路上的两种中间神经元中表达 GCaMPs,根据荧光信号的改变分析神经元的活动,研究这些神经元在食物和气味引起的行为反应中所起的作用。

3.3 研究疾病发生发展机制 生物体内钙离子介导多种细胞损伤,与心血管疾病、肝肾损伤、神经系统疾病等有关。哺乳动物心脏的正常功能依赖于钙池内钙离子释放和再摄取的协同作用,这一过程异常可导致各种心律失常,Chi 等^[21]构建了心脏传导系统特异表达 GCaMPs 的转基因斑马鱼,可通过检测传导束的位置和传导特性,分析某些传导缺陷引起的心律失常的成因和机制。癫痫灶脑细胞内钙离子浓度升高达阈限以上是异常放电和脑损害的直接原因;阿尔茨海默病患者脑内神经元和各种胶质细胞钙通道异常,细胞内钙离子稳态破坏和钙信号改变,导致突触退化、神经元损伤和凋亡^[22];缺血性卒中神经元细胞体内钙离子升高,树突棘结构改变^[23],结合 GCaMP-HS 和 Lck-GCaMP3 模型可以检测参与这些神经系统疾病病理过程的多种细胞内部的信号变化和细胞间环路的激活情况,研究疾病引起的脑功能的改变,分析疾病发生发展的基础和病理生理机制,为疾病的治疗提供可能的靶点。

3.4 研究机体发育过程和内在机制 发育过程的组织分化与生长调控涉及多条信号通路,钙离子作为某些通路中重要的信号分子,参与调控细胞的生长、增殖、迁移和凋亡,调节组织的分化方向,保证器官的正常大小,维持系统功能的稳定。Tian 等^[9]用 GCaMP3 记录小鼠行为形成过程中所有皮质区神经元的同步活动和信号传递,观察学习诱导的神经环路活动的改变,研究神经系统发育中各级神经元的突触联系和环路的形成和优化。Chi 等^[21]用 GCaMPs 研究斑马鱼心脏传导系统的发育,根据荧光反应的变化辨别出斑马鱼心脏传导系统的 4 个生理发育期,分析传导束的起止、传导速度、传导方向、房室传导的延迟和心室发育过程中室内传导方式的改变。Tallini 等^[7]构建了心肌条件表达指示剂的转基因小鼠,发现心内膜、冠脉平滑肌或非肌肉组织不表达 GCaMP2,而肺的大动脉平滑肌可见表达,提示这些组织可能从心肌分化而来,为研究组织来源和发育提供了基础。

3.5 分析细胞间相互作用 细胞之间存在复杂的相互作用,以维持机体内环境的稳定,在细胞间信号传递的过程中,钙离子起着重要作用。Shigetomi 等^[17]将星形胶质细胞和神经元共培养,用 GCaMPs 检测两者之间的信号传递,揭示神经元和星形胶质细胞相互作用的细节和生理机制。Ji 等^[25]用 GCaMPs 研究神经支配的平滑肌细胞内的突触后信号,检测神经元释放的不同递质引起突触后不同阈值和传导速度的信号改变,以研究神经肌肉接头处的兴奋-收缩偶联。同样地,用类似的方法可以研究感觉和运动环路中各级神经元的活动和相互作用关系,分析周围神经和感受器与中枢的功能联系和作用机制,也可用于研究其他系统细胞间的相互作用。

4 发展和应用前景

在体观察胞内游离钙离子浓度变化成为生理学和细胞生物学研究的重要环节,传统化学合成的指示剂如 Fluo3、fura2 等荧光变化范围大,对 pH 不敏感,对钙离子的特异性强,亲和力弱,过去常用于测定细胞悬液及单个细胞内钙离子的原位动态变化,但是这类指示剂需酯化后才能载入细胞,常由于负载不完全导致利用效率低下,会随时间推移泄漏到胞外,不能用于长时间测定,且有一定细胞毒性^[26],已渐渐被其他指示剂所取代。FRET 指示剂利用双波长激发和比率技术,可用于定量测定胞内钙离子

变化,避免了合成指示剂染料泄漏、房室化及非特异性负载的问题,但不适于转基因的无脊椎动物和哺乳动物细胞,且在体表达时动力学范围小,荧光变化没有合成指示剂明显^[27]。GCaMPs的出现和发展大大弥补了以往指示剂的不足,扩展了细胞功能研究的范围。尽管早期的GCaMPs因为荧光强度不足、热稳定性差、信号滞后、阈值高、动力学慢、对低频刺激不敏感等,应用受到了一定限制。但是近年来,经过蛋白质工程的不断改进,GCaMPs在胞内钙离子信号检测方面体现出越来越多的优势:(1)在同等实验条件及基线钙离子水平下,GCaMPs与FRET指示剂相比,信噪比和敏感性更高、耐光性更好、动力学更快、荧光延迟时间更短;(2)可以测量细微结构如神经元树突棘中的钙离子改变,对突触信号传递的检测能力优于化学合成的钙离子指示剂;(3)可以检测特定细胞亚型的活性,测量特殊细胞器的钙离子动力学;(4)可以长期在体观察细胞内钙离子改变;(5)细胞毒性低,不影响组织本身的完整性和所表达细胞的正常生理功能。

目前,GCaMPs多用于观察可兴奋细胞内的钙离子变化,但钙离子在非兴奋性细胞如血管内皮细胞中也起着调节细胞功能、信号传递、介导损伤和凋亡的重要作用,随着GCaMPs的改进和光学成像技术的发展,可以进一步研究非兴奋细胞在生理、损伤、疾病等条件下与细胞功能相关的钙信号产生、传递及时空效应,研究非兴奋性细胞内钙离子介导的病理和生理过程。

此外,GCaMPs在疾病和药理学方面的应用有待扩展。基于对神经系统疾病的研究,可用GCaMPs研究其他钙离子参与的疾病,如冠心病、肿瘤等发生发展过程中细胞内信号改变,为研发新的靶向药物提供基础;在体内和体外研究药物引起的胞内钙离子浓度变化,观察药物的药理学特性,探讨药物的生理和药理学机制,评价新药的药理作用和毒性。

综上所述,新型钙离子指示剂GCaMPs将成为生命科学研究的重要辅助工具。

5 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Russell J T. Imaging calcium signals *in vivo*: a powerful

tool in physiology and pharmacology[J]. *Br J Pharmacol*,2011,163:1605-1625.

- [2] Kotlikoff M I. Genetically encoded Ca^{2+} indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology[J]. *J Physiol*,2007,578(Pt 1):55-67.
- [3] Hires S A, Tian L, Looger L L. Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators[J]. *Brain Cell Biol*,2008,36(1-4):69-86.
- [4] Akerboom J, Rivera J D, Guilbe M M, Malave E C, Hernandez H H, Tian L, et al. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design[J]. *J Biol Chem*,2009,284:6455-6464.
- [5] Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein[J]. *Nat Biotechnol*,2001,19:137-141.
- [6] Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, Imoto K, Nakai J. Genetically encoded bright Ca^{2+} probe applicable for dynamic Ca^{2+} imaging of dendritic spines [J]. *Anal Chem*,2005,77:5861-5869.
- [7] Tallini Y N, Ohkura M, Choi B R, Ji G, Imoto K, Doran R, et al. Imaging cellular signals in the heart *in vivo*: cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2006,103:4753-4758.
- [8] Mao T, O'Connor D H, Scheuss V, Nakai J, Svoboda K. Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators[J]. *PLoS One*,2008,3:e1796.
- [9] Tian L, Hires S A, Mao T, Huber D, Chiappe M E, Chalasani S H, et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators [J]. *Nat Methods*,2009,6:875-881.
- [10] Varshavsky A. The N-end rule at atomic resolution[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2008,15:1238-1240.
- [11] Muto A, Kawakami K. Imaging functional neural circuits in zebrafish with a new GCaMP and the Gal4FF-UAS system[J]. *Commun Integr Biol*,2011,4:566-568.
- [12] Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S, Nakai J, Kawakami K. Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2011,108:5425-5430.
- [13] Wang J W, Wong A M, Flores J, Vosshall L B, Axel R. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain[J]. *Cell*,2003,112:271-282.

- [14] Wang Y, Guo H F, Pologruto T A, Hannan F, Hakker I, Svoboda K, et al. Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca^{2+} imaging[J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 6507-6514.
- [15] Jayaraman V, Laurent G. Evaluating a genetically encoded optical sensor of neural activity using electrophysiology in intact adult fruit flies[J]. *Front Neural Circuits*, 2007, 1: 3.
- [16] Dreosti E, Odermatt B, Dorostkar M M, Lagnado L. A genetically encoded reporter of synaptic activity *in vivo* [J]. *Nat Methods*, 2009, 6: 883-889.
- [17] Shigetomi E, Kracun S, Khakh B S. Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters[J]. *Neuron Glia Biol*, 2010: 1-9.
- [18] Shigetomi E, Kracun S, Sofroniew M V, Khakh B S. A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 759-766.
- [19] Marella S, Fischler W, Kong P, Asgarian S, Rueckert E, Scott K. Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behavior [J]. *Neuron*, 2006, 49: 285-295.
- [20] Chalasani S H, Chronis N, Tsunozaki M, Gray J M, Ramot D, Goodman M B, et al. Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2007, 450: 63-70.
- [21] Chi N C, Shaw R M, Jungblut B, Huisken J, Ferrer T, Arnaout R, et al. Genetic and physiologic dissection of the vertebrate cardiac conduction system[J]. *PLoS Biol*, 2008, 6: e109.
- [22] Mattson M P, Chan S L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease[J]. *Cell Calcium*, 2003, 34 (4-5): 385-397.
- [23] Zhang S, Murphy T H. Imaging the impact of cortical microcirculation on synaptic structure and sensory-evoked hemodynamic responses *in vivo* [J]. *PLoS Biol*, 2007, 5: e119.
- [24] Hata K, Polo-Parada L, Landmesser L T. Selective targeting of different neural cell adhesion molecule isoforms during motoneuron myotube synapse formation in culture and the switch from an immature to mature form of synaptic vesicle cycling[J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 14481-14493.
- [25] Ji G, Feldman M E, Deng K Y, Greene K S, Wilson J, Lee J C, et al. Ca^{2+} -sensing transgenic mice: postsynaptic signaling in smooth muscle[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 21461-21468.
- [26] Paredes R M, Etzler J C, Watts L T, Zheng W, Lechleiter J D. Chemical calcium indicators[J]. *Methods*, 2008, 46: 143-151.
- [27] Kotlikoff M I. Genetically encoded Ca^{2+} indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology[J]. *J Physiol*, 2007, 578(Pt 1): 55-67.

[本文编辑] 周燕娟, 邓晓群

· 消 息 ·

2012 结构性心脏病介入治疗新进展高峰论坛成功举办

日前,由第二军医大学长海医院心血管内科牵头举办的“2012 结构性心脏病介入治疗新进展高峰论坛暨疑难病例讨论会”在上海成功召开,来自全国 20 多个省市的 200 余名医师和研究人员参会,该会议是目前国内结构性心脏病介入领域学术水平最高、影响最广的会议之一。

长海医院钟海忠副院长、中国医师协会心血管内科分会先心病委员会主任委员朱鲜阳教授、中华医学会内科学分会副主任委员曾智教授、北京阜外医院介入中心副主任徐仲英教授以及长海医院心内科秦永文教授、赵仙先教授等专家共同出席了会议开幕式。

本届大会以“规范 创新发展”为主题,围绕常见结构性心脏病的发病机制、介入治疗要点、难点及最新治疗方法,以及超声心动图在结构性心脏病介入治疗领域的应用进展等重点问题进行了交流和探讨。本届大会坚持开放性的办会思路、浓厚的学术氛围、基础和临床并重的方向,汇集了来自国内的 30 余位顶尖学者,进行了 30 场次的专题报告,为国内心血管介入医生提供了技术交流和合作的平台。