

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00123

· 论 著 ·

膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统的建立及其在心肌细胞膜钙离子通道研究中的应用

刘红¹, 王晔¹, 汤莹², 沈亚峰², 杨勇骥^{2*}, 雷长海^{1*}

1. 第二军医大学网络信息中心, 上海 200433

2. 第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统,并将其应用于体外心肌细胞膜钙离子通道的研究,验证其应用效果。**方法** 通过在激光扫描共聚焦显微镜上加装膜片钳装置,采用计算机自动控制技术建立膜片钳与激光扫描共聚焦显微镜的同步实时控制系统;将建立好的装置应用于观察体外雄性大鼠心肌细胞膜钙离子通道,并分析观察结果。**结果** 成功建立膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统;当刺激心肌细胞时,激光扫描共聚焦显微镜-膜片钳同步实时控制系统在通过激光扫描共聚焦显微镜观察钙火花的同时可通过膜片钳记录心肌细胞膜钙离子通道电流信号。定量分析结果表明相邻两个钙火花之间的时间间距分别为(10.055±0.021)、(10.079±0.021)、(10.087±0.021) s,符合膜片钳设定的刺激间隔(10 s);单个钙火花在空间上均局限于2 μm直径范围,在时间上平均经历了约30 ms,从出现至达到最高浓度平均需10 ms,从达到最高浓度到消失平均需20 ms,与钙火花理论吻合。**结论** 成功建立膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统,在心肌细胞实现了在利用膜片钳进行全细胞记录观测和测定钙离子通道电流及其开闭时程的同时,利用激光扫描共聚焦显微镜获得了钙火花的显微结构形态图像,测定钙离子的位点变化,有助于进一步了解膜钙离子通道的内部机制。

[关键词] 膜片钳术;共焦显微镜检查;同步控制;钙通道

[中图分类号] Q 337; TN 722.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)02-0123-07

Establishment of patch clamp and laser scanning confocal microscope synchronous real-time control system and its application in study of membranaceous calcium channel

LIU Hong¹, WANG Ye¹, TANG Ying², SHEN Ya-feng², YANG Yong-ji^{2*}, LEI Chang-hai^{1*}

1. The Network Information Center, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a patch clamp and laser scanning confocal microscope synchronous real-time control system, and apply it in study of membranaceous calcium channel, so as to verify its effects. **Methods** By adding the patch clamp on the laser scanning confocal microscope, we established a patch clamp and laser scanning confocal microscope synchronous real-time control system using computer autocontrol technique. The system was used to observe the male rat membranaceous calcium channel *in vitro*, and the observation results were analyzed. **Results** We successfully established the patch clamp and laser scanning confocal microscope synchronous real-time control system. When the myocardial cells were stimulated, the system could observe the myocardial calcium spark by laser scanning confocal microscope and at the same time record calcium channel current signal by patch-clamp. Quantitative analysis showed that the time intervals between 2 adjacent calcium sparks were (10.055±0.021), (10.079±0.021) and (10.087±0.021) s, which met the stimulus interval for patch-clamp set (10 s). A single calcium spark had a diameter within 2 μm, and it experienced an average period of about 30 ms. It needed an average of 10 ms from the appearance of the spark to its peak concentrations, and it needed an average of 20 ms from its peak concentration to disappearance, which was consistent with the calcium spark theory. **Conclusion** A patch clamp and laser scanning confocal microscope synchronous real-time control system has been successfully established. The system is capable of performing whole-cell observation recording and determining the membranaceous calcium channel currents and its closing process by patch clamp; at the same time it can synchronously obtain the micro images of the calcium spark with laser

[收稿日期] 2011-09-10

[接受日期] 2011-12-20

[基金项目] 国家自然科学基金(39970359,30170253). Supported by National Natural Science Foundation of China(39970359,30170253).

[作者简介] 刘红, 博士生, 副教授. E-mail: liuhong@smmu.edu.cn

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81870297, E-mail: yjyang22@163.com; Tel: 021-81870332, E-mail: lei@smmu.edu.cn

scanning confocal microscope, locating changes of calcium ions and helping to understand the internal mechanism of the membrane calcium channels.

[Key words] patch-clamp techniques; confocal microscopy; synchronous control; calcium channels

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2): 123-129]

在目前的生物医学基础研究中,最常用的技术方法主要有两类:一是功能分析技术^[1-3],二是形态分析技术^[4-5]。这两类技术各有优缺点,功能分析技术可以获得生物信号发生、转导的信息,但无法知道生物信号发生源的蛋白表达和结构变化;形态分析技术能够方便、准确地观察、定位细胞内外结构变化及蛋白在细胞内的表达,但是无法对生理变化时的组织及细胞进行同步信号变化(如电信号)分析。

膜片钳技术和激光扫描共聚焦显微镜技术是当前质膜钙离子通道的功能-形态研究中两种最常用的技术。膜片钳技术是以微弱电流信号测量为基础,利用玻璃微电极与细胞膜高阻封接技术,可测量多种膜通道电流^[1,6-7],其值可小到 pA(10^{-12} A)量级^[1],被广泛应用于生物组织、细胞的生理功能研究中。激光扫描共聚焦显微镜是 20 世纪 80 年代末期发展起来的一项具有划时代意义的高科技新产品,是当今世界上最先进的生物医学形态分析仪器之一。利用激光扫描共聚焦显微镜可以得到用传统光源看不到的样品深部形态图像,从而得以看到样品真实的三维结构图像。同时,激光扫描共聚焦显微镜能对活体细胞和组织进行实时的结构变化观测;利用荧光标志物,可以对细胞内蛋白变化及离子变化进行测量^[8-10]。

膜片钳技术与共聚焦显微镜技术都存在着各自的优点,但是亦存在各自的不足和局限性。膜片钳技术能获得质膜钙离子通道的离子电流,但不能对离子的移动进行实时定位,不能定量分析离子浓度。激光扫描共聚焦显微镜技术可以对钙离子的移动进行实时定位,但不能对单个离子通道的离子移动信号(如单通道电流)进行分析。

因此,膜片钳技术与激光扫描共聚焦显微镜技术的结合就成为理想的生物组织生理功能-形态分析研究方式。本研究通过在激光扫描共聚焦显微镜上加装膜片钳装置,采用计算机自动控制技术建立膜片钳与激光扫描共聚焦显微镜的同步实时控制系统,并应用于质膜钙离子通道的研究,实现了在利用膜片钳进行全细胞记录观测和测定质膜钙离子通道

电流及其开闭时程的同时,利用激光扫描共聚焦显微镜的实时线扫、面扫描技术同步获得了钙火花的显微结构形态图像,测定钙离子的位点变化,取得初步成效。

1 材料和方法

1.1 膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统的建立

1.1.1 系统架构 膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统由 1 个控制台及 3 个被控制端[分别是膜片钳(EPC10,德国 HEKA 公司)和激光扫描共聚焦显微镜(LEICA TCS SP2,德国 LEICA 公司)所连接的计算机,加药器所连接的计算机也可作为被控端]组成,控制台和被控制端通过网络进行连接。系统架构如图 1 所示。

1.1.2 实现方法 本研究所用的膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统,是在 Visual Basic 集成开发环境中通过基于 Windows API(Windows Application Program Interface)调用的远程控制技术来实现的。其中的关键步骤如下,第一步:通过调用 Windows API 函数实现膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜控制计算机键盘和鼠标的模拟控制。在膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统中核心功能是根据实验操作的要求远程设置和控制膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜所连接计算机的键盘或鼠标。通过调用 Windows API 函数实现了远程模拟控制膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜控制计算机的键盘和鼠标。第二步:采用多线程技术实现膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜的同步实时控制。为了保证膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜控制的实时性和同步性,系统软件采用多线程的设计模式。所创建的线程将会分别控制膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜所连接计算机的键盘和鼠标,按指定的工作模式和工作时序,执行预先定义好的工作流程,实现膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜的同步实时联用。第三步:基于 Socket 技术完成控制台与膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜控制机之间的指令和数据传输。通过 Socket 技术,控制台可设置远程膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜主机的属性并监听它们的端

口, 完成指令控制和数据传输。

1.1.3 系统界面 按照图 1 所示的系统架构, 在控制台计算机(图 1A)上安装服务程序, 在每个客户端计算机(图 1B、1C、1D, 它们分别连接和控制膜片钳、

激光扫描共聚焦显微镜和加药器)上安装客户程序。这些计算机通网络进行连接, 控制台的服务程序通过 Socket 技术控制各个客户端程序, 从而实现膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜的同步控制。

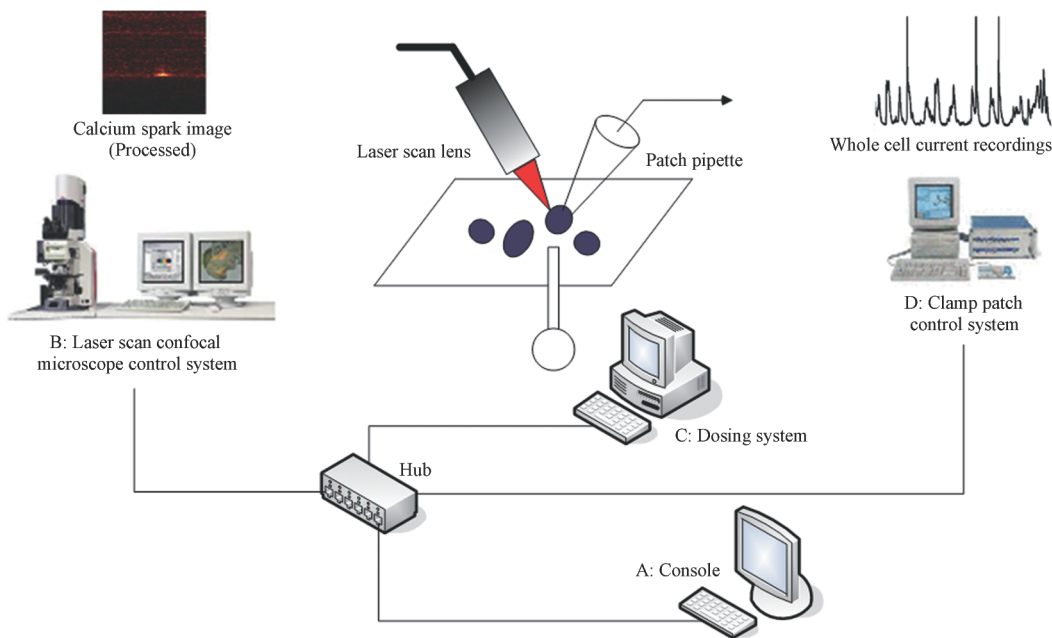


图 1 膜片钳-激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统模式图

Fig 1 Mode of patch clamp and laser scanning confocal microscope synchronous real-time control system

膜片钳和激光扫描共聚焦显微镜同步实时控制系统的软件界面如图 2 所示。图 2C 是控制台服务程序的软件界面。在服务程序界面中, 我们可以设置客户端计算机的 IP 地址和端口, 还可以预定义客

户端计算机之间的工作流程, 完成控制台和客户端之间命令和数据传输。图 2A 是客户端(激光扫描共聚焦显微镜控制计算机)的软件界面。图 2B 是客户端(膜片钳控制计算机)的软件界面。

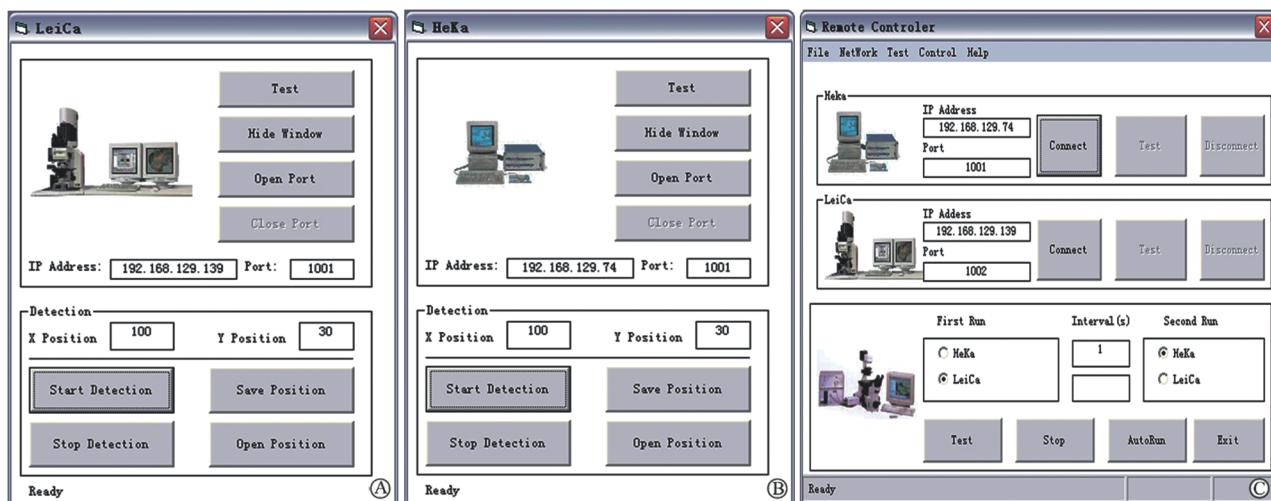


图 2 膜片钳与激光扫描共聚焦显微镜的同步实时控制系统界面

Fig 2 User interface of patch clamp and confocal synchronous real-time control system

A: Laser scanning confocal microscope; B: Patch clamp; C: Console

1.2 心肌细胞膜钙离子通道的观察

1.2.1 心肌细胞样品制备 实验动物:雄性SD大鼠,体质量250~350 g,购自第二军医大学实验动物中心。心肌细胞的急性分离^[11-12]:利用酶解方法分离得到单个心室肌细胞。雄性SD大鼠经乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉后,开胸迅速取出心脏,置于4℃无钙台氏液中,游离主动脉根部,剪除周围结缔组织,将心脏悬挂于Langendorff系统行逆行灌流,灌流液温度38℃,流速约10 ml,并以100% O₂饱和。先以无钙台氏液灌流5 min,再以含60 μmol/L Ca²⁺、1%BSA和0.6 mg/ml I型胶原酶(Sigma公司)的台氏液灌流8~12 min,直至心脏变软、流出液出现“拉丝”现象。将心脏从Langendorff灌流装置上取下,剪去心房和基底部组织,然后将心室肌剪碎,并用广口吸管缓慢吹打1 min,用200目的尼龙网过滤,心肌细胞在室温下沉淀10 min后将细胞外液钙浓度逐步复钙到1.2 mmol/L,在室温下静置2~3 h备用。Fluo-3 AM负载:心肌单细胞与钙荧光指示剂Fluo-3 AM(5 μmol/L)共同孵育30 min,室温、避光,之后用细胞外液漂洗3次,每次5 min。

1.2.2 心肌细胞的观察 将负载好的心肌细胞悬液加入细胞池内,并置于倒置显微镜工作台上,室温下待细胞贴壁。适合进行实验的心肌细胞具有如下特点:横纹清晰,杆状,表面干净平整,无自发收缩。膜片钳全细胞记录采用P-97型玻璃电极自动拉制仪制备玻璃电极,用电极内液冲灌,电极电阻通常为2~5 MΩ。利用三维操纵器移动电极,并轻压在细胞表面,稍加负压后即可形成1 GΩ以上的高阻封接,补偿快电容后再用较大负压吸破细胞膜,补偿电容电流和电极串联电阻,形成全细胞记录模式^[3,13]。信号经Ag/AgCl电极引导,由膜片钳放大器(EPC10,德国)放大,计算机通过软件(Pulse/Pulse-fit)经模/数转换系统采集数据,并进行数据分析。

刺激方案:将细胞膜电位钳制在-40 mV,先给予持续300 ms的-40 mV刺激已失活钠电流,再给予持续400 ms的+10 mV刺激激活L-型钙电流,刺激频率每10 s一次。心肌细胞钙火花图像则通过LEICA TCS SP2激光扫描共聚焦显微镜采用线扫描的方式获得。激光扫描共聚焦显微镜的成像方式为线扫描,采样速率为2 ms/线,物镜放大倍数为40倍,油镜,N. A.:1.25。扫描频率为400 Hz,1 024像素/线,512线/页。采用Ar/ArKr激光管,激发波长:488 nm,发射波长:498~560 nm。

观察时,启动激光扫描共聚焦显微镜-膜片钳同步实时控制系统,分别连通LEICA TCS SP2激光扫描共聚焦显微镜和EPC10膜片钳控制系统。设定先启动激光扫描共聚焦显微镜,10 s后启动膜片钳系统,实时记录心肌细胞膜钙离子通道电流以及捕获心肌细胞中的钙火花现象和测定钙离子浓度变化的情况。

2 结果

2.1 定性观察结果 当刺激心肌细胞时,激光扫描共聚焦显微镜-膜片钳同步实时控制系统在通过激光扫描共聚焦显微镜观察钙火花(图3)的同时通过膜片钳记录心肌细胞膜钙离子通道电流信号(图4)。

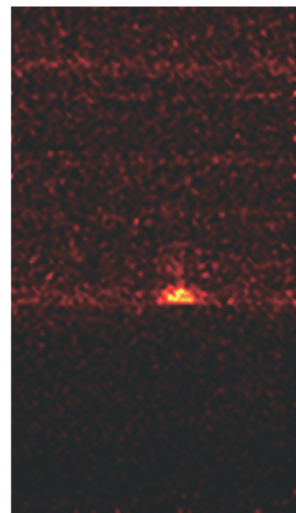


图3 电刺激后心肌细胞中钙火花图像
Fig 3 Calcium spark image in cardiac muscle cells after stimulation

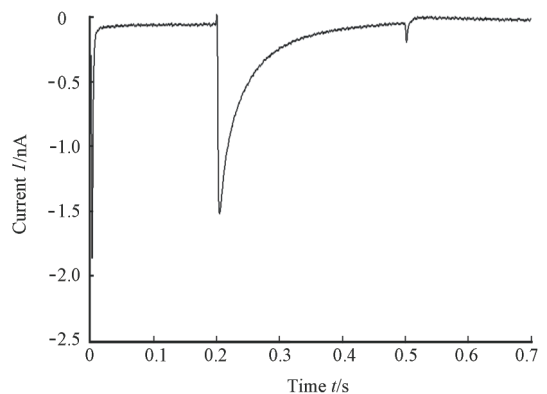


图4 刺激心肌细胞时膜片钳记录的心肌细胞钙离子通道电流信号
Fig 4 Electrical signal of calcium release channel in stimulated cardiac muscle cells

2.2 定量验证结果

2.2.1 心肌细胞钙火花发生与刺激信号发生的相关性 结果(图5)显示了2次连续刺激信号对应的钙火花图像(钙火花图像采集时间由激光扫描共聚焦显微镜自动记录)。左图原始图像文件为06-11-02'_Series060_Nt037_ch00.tif,采集时间为21:42:16.180;右图原始图像文件为06-11-02'_Series060_Nt045_ch00.tif,采集时间为21:42:26.638。左图钙火花(白色箭头所指)爆发时间为21:42:17.171,右图钙火花(红色箭头所指)爆发时间为21:42:27.225,两个钙火花之间的时间间隔为 (10.055 ± 0.021) s,符合膜片钳设定的刺激间隔(10 s)。表1是3组线扫描序列中所有相邻钙火花的时间间隔数据。3组线扫描序列中相邻两个钙火花之间的时间间隔分别为 (10.055 ± 0.021) 、 (10.079 ± 0.021) 、 (10.087 ± 0.021) s,符合膜片钳设定的刺激间隔(10 s)。

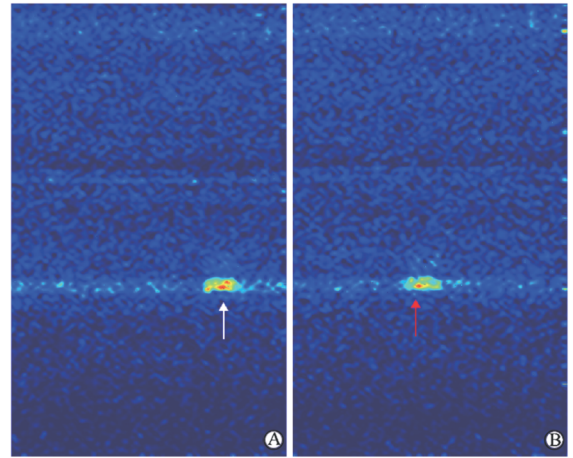


图5 两次连续刺激对应的钙火花图像

Fig 5 Images of calcium sparks corresponding two consecutive stimulations

A: Record time 21:42:16.180, white arrow is calcium sparks; B: Record time 21:42:26.638, red arrow is calcium sparks

表1 相邻钙火花时间间隔数据

Tab 1 Time interval data of calcium sparks in three groups

Group	Image ID	Start time	Duration time	Interval t/s
1	06-11-02'_Series060_Nt037_ch00.tif	21:42:16.180	21:42:17.171	10.055 ± 0.021
1	06-11-02'_Series060_Nt045_ch00.tif	21:42:26.638	21:42:27.225	
2	06-11-02'_Series063_Nt006_ch00.tif	21:43:15.936	21:43:16.890	10.079 ± 0.021
2	06-11-02'_Series063_Nt014_ch00.tif	21:43:26.394	21:43:26.969	
3	06-11-02'_Series063_Nt037_ch00.tif	21:43:56.461	21:43:57.203	10.087 ± 0.021
3	06-11-02'_Series063_Nt045_ch00.tif	21:44:06.919	21:45:07.290	

2.2.2 实验数据的验证 根据文献^[14-16],钙火花现象被描述为在表面上均一的细胞静息钙信号的背景下,突然爆发式地出现一个或几个明亮的球形信号,在10 ms内到达它的最高亮度,又经20 ms后消失。典型钙火花的局部 Ca^{2+} 浓度在10 ms可达到200~300 nmol/L。钙火花的空间传播(空间半高宽)约

2 μ m,时间常数(时程半高宽)约25 ms。图6是本实验中观测到的部分典型钙火花(钙火花为图像中的红色区域,垂直红色线条的高度代表2 μ m,水平红色线条的长度代表50 ms,图像大小为80像素 \times 50像素)。钙火花的时空分布如图7所示。

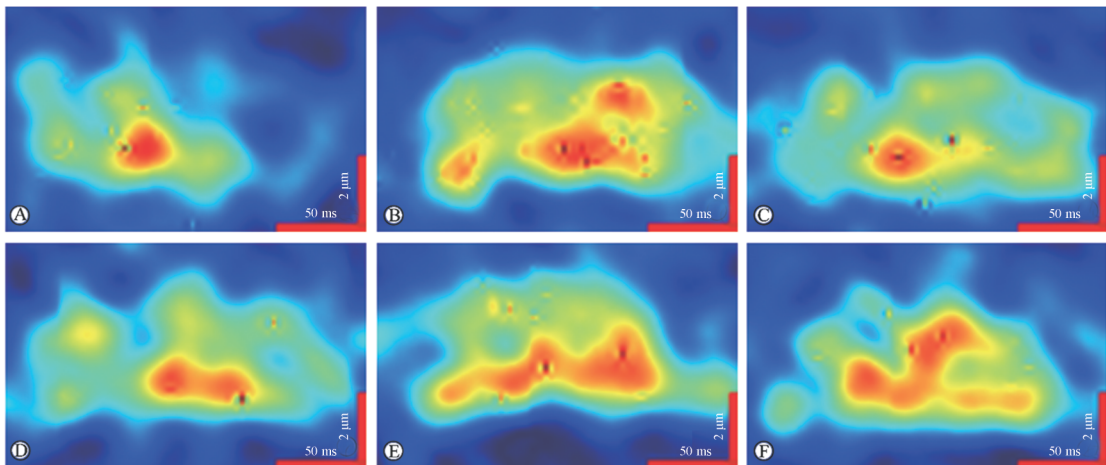


图6 钙火花图像

Fig 6 Calcium sparks

A: 10-09-11'-Series060-Nt030-ch00; B: 10-09-11'-Series060-Nt037-ch00; C: 10-09-11'-Series060-Nt045-ch00; D: 10-09-11'-Series063-Nt006-ch00; E: 10-09-11'-Series063-Nt014-ch00; F: 10-09-11'-Series063-Nt037-ch00

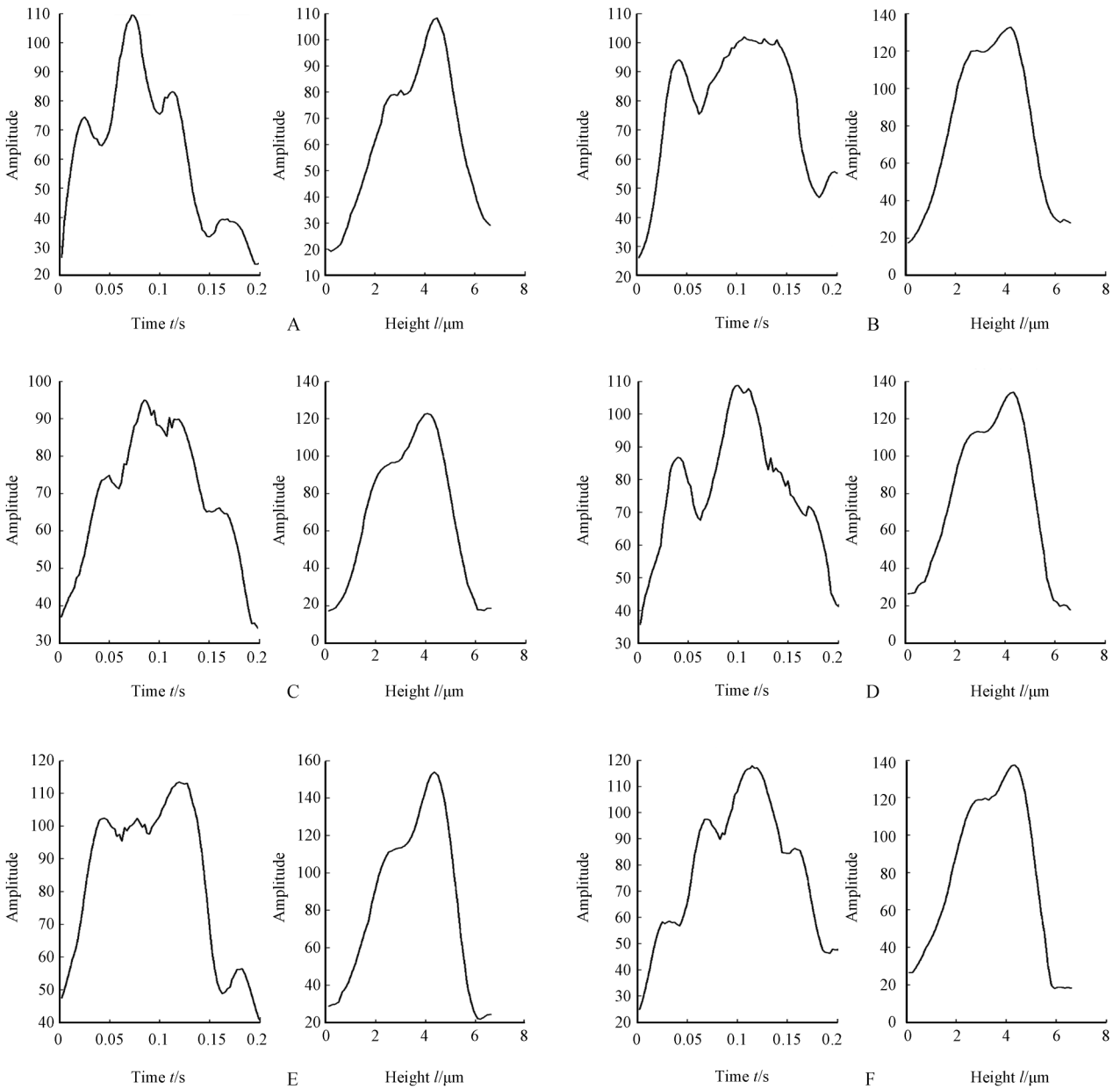


图 7 钙火花的时空域分析

Fig 7 Analysis of calcium sparks in time domain and space domain

A: 06-11-02'_Series060_Nt030_ch00; B: 06-11-02'_Series060_Nt037_ch00; C: 06-11-02'_Series060_Nt045_ch00; D: 06-11-02'_Series063_Nt006_ch00; E: 06-11-02'_Series063_Nt014_ch00; F: 06-11-02'_Series063_Nt037_ch00

通过对这些典型钙火花的形状参数(图 6)和时空分析(图 7),可以看到单个钙火花在空间上均局限于 2 μm 直径范围,在时间上平均经历了约 30 ms,从出现至达到最高浓度平均只需 10 ms,从达到最高浓度到消失平均需要 20 ms。实验结果与钙火花理论吻合。

3 讨论

随着计算机技术的迅猛发展,生物医学研究领

域中的测量技术、数据分析技术也随之向更快速、更精确的方向发展,特别是对功能-形态同步实时分析处理、极弱信号的分析处理等,已经成为生物医学研究领域一个重要的发展方向。本研究结合使用膜片钳技术与激光扫描共聚焦显微镜技术进行钙离子通道功能-形态的同步研究,可以在同一时刻将所研究的钙离子通道的形态和功能两方面信息同时记录下来,解决了以往实验中只能记录某种单一信号的局限性。通过应用于心肌细胞膜钙离子通道的研

究,表明该膜片钳与激光扫描共聚焦显微镜的同步实时控制系统作为生物组织功能-形态同步研究的一种新手段,不仅在质膜钙离子通道研究中大有可为,也可以推广应用到生物组织功能-形态同步分析研究的各个领域,且该系统无需对实验设备进行软、硬件改动,便捷易用、经济实惠,功能扩展性较强。

4 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] Sakmann B, Neher E. Single-channel recording[M]. 2nd ed. New York: Springer Science Business Media, 2009: 4-7.
- [2] Kitamura K, Judkewitz B, Kano M, Denk W, Häusser M. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons *in vivo* [J]. Nat Methods, 2008, 5: 61-67.
- [3] Kirichok Y, Navarro B, Clapham D E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel [J]. Nature, 2006, 439: 737-740.
- [4] Picht E, Zima A V, Blatter L A, Bers D M. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293: C1073-C1081.
- [5] Er F, Michels G, Brandt M C, Khan I, Haase H, Eicks M, et al. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects [J]. Cell Calcium, 2007, 41: 467-477.
- [6] 张伟伟, 周辰, 齐翠, 鲍朝飞, 景军展, 张丽瑶, 等. 白介素1 β 时间依赖性地抑制大鼠皮层神经元钾电流 [J]. 生物物理学报, 2009, 6: 415-422.
- [7] Pancrazio J J. Ion channel events simulated with the program SIMSTATE [J]. Comput Methods Programs Biomed, 1995, 46: 165-174.
- [8] Sebille S, Cantereau A, Vandebrouck C, Balghi H, Constantin B, Raymond G, et al. Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series [J]. Comput Methods Programs Biomed, 2005, 77: 57-70.
- [9] 毕玉花, 陈文利, 邢达. 延迟荧光分析和激光共聚焦技术在检测非洲菊发育过程中表皮细胞叶绿素变化中的应用 [J]. 生物物理学报, 2007, 5: 402-408.
- [10] Launikonis B S, Zhou J, Santiago D, Brum G, Rios E. The changes in Ca²⁺ sparks associated with measured modifications of intra-store Ca²⁺ concentration in skeletal muscle [J]. J Gen Physiol, 2006, 128: 45-54.
- [11] Ohmoto-Sekine Y, Uemura H, Tamagawa M, Nakaya H. Inhibitory effects of aprindine on the delayed rectifier K⁺ current and the muscarinic acetylcholine receptor-operated K⁺ current in guinea-pig atrial cells [J]. Br J Pharmacol, 1999, 126: 751-761.
- [12] Nakaya H, Tohse N, Takeda Y, Kanno M. Effects of MS-551, a new class III antiarrhythmic drug, on action potential and membrane currents in rabbit ventricular myocytes [J]. Br J Pharmacol, 1993, 109: 157-163.
- [13] Hu S T, Shen Y F, Liu G S, Lei C H, Tang Y, Wang J F, et al. Altered intracellular Ca²⁺ regulation in chronic rat heart failure [J]. J Physiol Sci, 2010, 60: 85-94.
- [14] Cheng H, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle [J]. Science, 1993, 262: 740-744.
- [15] Cheng H, Lederer M R, Lederer W J, Cannell M B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 1996, 270: 148-159.
- [16] Wellman G C, Nelson M T. Signaling between SR and plasma-lemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels [J]. Cell Calcium, 2003, 34: 211-229.

[本文编辑] 贾泽军