

细胞内钙离子指示剂的光致荧光增强

李淑娜, 霍波

(北京理工大学 宇航学院力学系, 北京 100081)

摘要:目的 钙离子(Ca^{2+})指示剂的光学稳定性对于显示细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度的时间特性非常重要,定量研究 Ca^{2+} 指示剂的光致荧光增强现象。方法 分别用5种不同功率的光照射5种不同细胞系(MC3T3-E1、RAW264.7、MLO-Y4、MEF3T3、HEK293),研究两种 Ca^{2+} 指示剂Fluo-4 AM和Oregon green的光致荧光响应。观察光致荧光增强以及随后发生的荧光淬灭,并进一步利用毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)刺激引起钙响应峰,分析响应峰的特征参数。结果 高功率光对于Fluo-4 AM或Oregon green都可引起荧光增强现象,但Oregon green染色细胞的响应比例以及光致响应峰的大小和时间跨度都显著小于Fluo-4 AM染色细胞。结论 使用低功率光照射Oregon green染色细胞显示细胞内 Ca^{2+} 浓度变化具有更好的光学稳定性。

关键词:光功率;光;钙离子;钙指示剂;光学稳定性

中图分类号:R 318.01 文献标志码:A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.04.291

Light-induced fluorescence enhancement in cells stained with Ca^{2+} indicators

LI Shu-na, HUO Bo (Department of Mechanics, School of Aerospace Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective As the photostability of calcium ions (Ca^{2+}) indicators is an important property for indicating the temporal features of cytosolic Ca^{2+} in cells, this study aims to quantitatively measure the light-induced fluorescence enhancement in cells stained with Ca^{2+} indicators. **Methods** Five cell lines, MC3T3-E1, RAW264.7, MLO-Y4, MEF3T3 and HEK293, were exposed to the light with five levels of optical power, respectively, so as to investigate the light-induced responses of two commonly-used Ca^{2+} indicators, Fluo-4 AM and Oregon green. The light-induced fluorescence enhancement, the succeeding photobleaching and the thapsigargin (TG)-induced responsive peak followed by were observed. The characteristic parameters of responsive peaks were further analyzed. **Results** Light with higher power level would induce the fluorescence enhancement for both Fluo-4 AM or Oregon green, while the responsive percentage as well as the magnitude and time span of light-induced peak of Oregon green-stained cells were significantly lower than those of Fluo-4 AM-stained cells. **Conclusions** The use of Oregon green with low power level light shows better photostability to indicate the intracellular Ca^{2+} .

Key words: Optical power; Light; Calcium ions; Ca^{2+} indicator; Photostability

作为重要的第2信使分子,钙离子(Ca^{2+})调控着细胞内的大部分信号通路,研究通常采用 Ca^{2+} 指示剂来监测胞内 Ca^{2+} 浓度,以阐明胞内的相关生物

学行为。诸如力学^[1-3]、温度^[4]、电学^[5]等方面的物理刺激或者pH值^[6]、激素^[7]、缺氧^[8]、盐度^[9]等化学因素都能引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高。但是有研究

表明,在只有光照情况下胞内 Ca^{2+} 浓度也会升高。例如,光敏感的视网膜神经细胞在光刺激(波长 470 nm)下会引发胞内 Ca^{2+} 浓度升高,并且 Ca^{2+} 浓度变化依赖于光刺激的强度和持续时间^[10]。此外,光照能够调节不同种类细胞的生物功能。例如,低能量激光(3 J/cm^2 , 波长 830 nm)可促进成骨细胞的增殖^[11],激光(5 J/cm^2 , 波长 635 nm)还能诱导骨髓间充质干细胞向肌肉方向分化^[12]。但是,这种光致荧光增强或者光致钙响应现象仍然缺乏定量化的研究。

胞内 Ca^{2+} 浓度的变化通常采用 Fura-2、Fluo-3、Fluo-4、Oregon green[®] 488 BAPTA-1 等 Ca^{2+} 指示剂来显示。其中,Fura-2 是一种比率荧光指示剂,激发光波长为 340 和 380 nm。Fluo-3^[13-14] 及其衍生物 Fluo-4^[15] 能够以可溶于细胞膜的乙酰羟甲基酯形式进入细胞,并且与 Ca^{2+} 亲和力较高。与 Fluo-3 和 Fluo-4 类似,Oregon green 也广泛用于显示受精、肌肉收缩、神经活动过程中 Ca^{2+} 的动态变化^[8]。一种优良的 Ca^{2+} 荧光染料应该具有较高的光学稳定性,即较短的光激发和光漂白时间。人们熟知的一种光致荧光强度变化现象是光淬灭,即在长时间光照下荧光强度显著降低。事实上,在对荧光染色细胞施加较高功率光照的初始阶段,还可以看到荧光强度随着时间显著增加。对于这种光致荧光增强现象有两种可能的解释,一种是强光照下胞内 Ca^{2+} 浓度的确因为胞内钙释放或胞外钙内流而升高,另外还可能源于在高能量光照下荧光染料是逐步激发的,从而出现一个可见的激发峰。目前关于这种光致荧光强度响应的定量研究还鲜有报道。

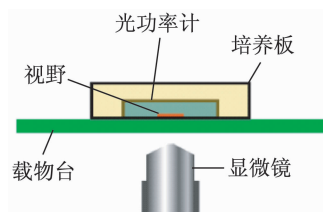
本文研究了两种 Ca^{2+} 指示剂 Fluo-4 AM 和 Oregon green 的光学稳定性。采用 5 种不同强度的光照射 3 种骨系细胞(成骨前体细胞 MC3T3-E1、骨细胞 MLO-Y4、破骨前体单核细胞 RAW264.7),以及 2 种非骨系细胞(小鼠胚胎成纤维细胞 MEF3T3、人胚肾细胞 HEK293),然后记录并分析胞内钙信号的实时变化图像。本研究结果表明,使用适当强度的光或者 Ca^{2+} 指示剂可以避免光致荧光增强现象的发生。

1 材料与方 法

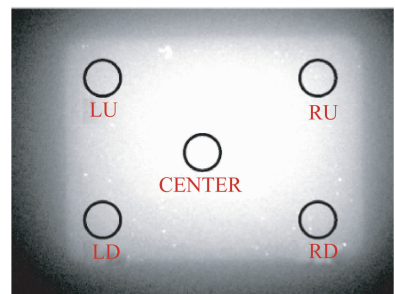
1.1 标定光功率

利用倒置荧光显微镜 (DMI6000B, Leica 公司)

测量光照细胞的荧光强度。实验中荧光激发波长为 470 nm。光强度设置可以通过调节显微镜视场光阑或者外接光源上的光强调节按钮,5 种不同等级的光功率分别用 E_0 、 E_1 、 E_2 、 E_3 、 E_4 表示。将数码光功率计 (PM100D, Thorlabs 公司) 探头放在六孔板中测量光功率[见图 1(a)]。30 min 内将所测功率的平均值除以光斑面积,定义为功率密度。此外,为检测视野内光强分布的不均匀性,分别测量 5 个位置的灰度值,即中心 (CENTER)、左上角 (LU)、右上角 (RU)、左下角 (LD)、右下角 (RD)[见图 1(b)],测量重复 3 次。



(a) 原理图



(b) 视野中央光强分布的标定位置

图 1 光功率测量示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the optical power measurement

(a) Principle diagram, (b) Locations for calibrating optical density distributions in the field of view

1.2 细胞培养

小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 购买自美国标准细胞库 (ATCC),培养基为含 10% FBS (Gibco 公司) 和 1% PS (Sigma 公司) 的 α -MEM (Hyclone 公司),培养环境为 37°C 和 5% CO_2 。小鼠骨样细胞 MLO-Y4 获赠于美国密苏里-堪萨斯大学的 Lynda Bonewald 教授,培养于包被有 0.15 mg/mL 鼠尾胶原 (Sigma 公司) 的表面上。培养基为含有 5% FBS、5% CS 和 1% PS 的 α -MEM。RAW264.7 细胞系购买自欧洲细胞培养库 (ECACC),培养基为含有 10% FBS 和 1% PS 的 DMEM (Hyclone 公

司)。小鼠胚胎成纤维细胞 MEF3T3 来自北京大学医学院,人胚肾细胞 HEK293 来自北京大学第一医院,其培养基均与 RAW264.7 相同。

1.3 胞内钙的测量

当培养瓶中细胞融合度达 80% ~ 90% 时,将其消化并接种至 24 孔板,密度约为 1.5×10^4 个/ cm^2 。分别用两种荧光指示剂 Fluo-4 AM (Invitrogen 公司) 和 Oregon green (Invitrogen 公司) 显示胞浆内的 Ca^{2+} 。细胞与 5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4 AM (溶于 DMSO 的 0.02% Pluronic F-127) 常温孵育 2 h, 或者与 4.4 $\mu\text{mol/L}$ Oregon green (溶于 DMSO 的 0.02% Pluronic F-127) 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。然后将 24 孔板的细胞用不含染料的培养基清洗 3 次。整个操作过程尽量轻柔,以避免晃动引起细胞内提前发生钙响应。将 24 孔板放置于显微镜载物台上,先用光功率水平 E_0 设置的光照射细胞 1 min, 并将其作为基准值, 然后分别施加 E_1 、 E_2 、 E_3 和 E_4 设置的光照。为了检验细胞钙池(如内质网)内是否仍有 Ca^{2+} 存在, 在施加高强度光照射一段时间后, 在细胞培养基中加入毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG), 使钙池内 Ca^{2+} 迅速释放进入胞质中。用显微镜 CCD 记录细胞的荧光强度, 时间为 20 min。最后将每个细胞的荧光强度减去细胞周围的背景光强, 再除以 E_0 设置下的

基准值, 得到归一化的相对荧光强度。

1.4 统计分析

每种细胞在每种光功率下进行 3 组以上独立实验, 且每组实验统计分析 20 ~ 50 个细胞。所有数据采用均值 \pm 标准差表示。采用双因素方差分析法统计荧光染料和照射功率对光致荧光增强的影响, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 检验不同实验组间平均值的差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 5 种等级的光功率有显著性差异

测量不同显微镜设置下细胞培养板内的光功率, 30 min 内的变化曲线表明光功率基本稳定 [见图 2(a)]。5 种不同等级光功率 E_0 、 E_1 、 E_2 、 E_3 和 E_4 的光密度平均值分别为 0.02、0.10、0.42、0.84 和 1.57 W/cm^2 [见图 2(b)], 且有显著性差异 ($P < 0.05$)。为了观察视野内的光强分布是否均匀, 分别测量视野内 5 个不同位置的光强。视野中心处的灰度值稍微高于矩形视野边缘的灰度值 [见图 2(c)]。随着光功率的增加, 差异性变得更大。需要注意的是, 5 种光功率的平均灰度值具有显著性差异 [见图 2(d)], 说明 CCD 接收到的光功率和光功率计测量值是类似的。

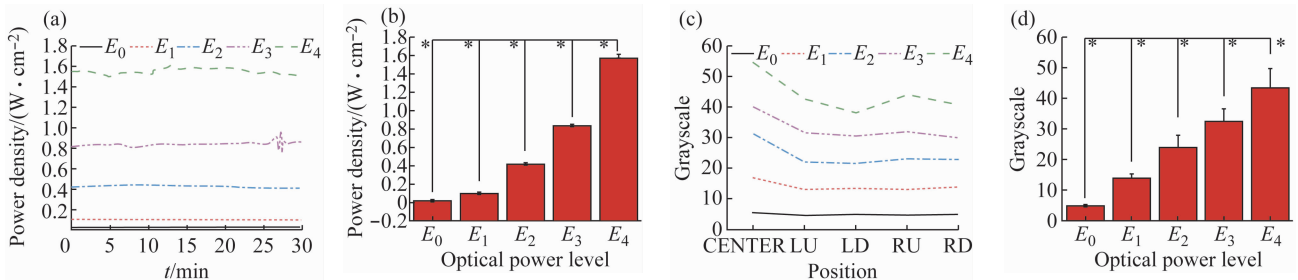


图2 光功率密度的标定 (a) 光功率密度随时间变化图, (b) 不同等级功率下光功率密度平均值, (c) 5 个位置处荧光光强的灰度值, (d) 不同等级功率下荧光光强的灰度平均值 (* $P < 0.05$)

Fig. 2 Calibration of optical power density (a) Variation of optical power density with time, (b) Average optical power density at different power levels, (c) Grayscale in five locations, (d) Average grayscale at different optical power levels

2.2 成骨细胞内发生光致荧光增强

采用 E_0 功率光初始照射 1 min, 然后 E_4 功率光照射 9 min, Fluo-4 AM 染色和 Oregon green 染色的成骨细胞中荧光强度伪彩图如图 3 所示。由图可知, 当 $E_4 = 0.84 \text{ W}/\text{cm}^2$ 时, 成骨细胞系 MC3T3-E1 的荧光强度值首先显著增强, 随后渐渐降低至很低水平。

图 4 所示为成骨细胞荧光强度的典型曲线。首先 E_0 功率光照射 1 min, 然后分别用 E_1 和 E_2 功率光照射 19 min 或者 E_4 功率光照射 9 min。Fluo-4 AM 染色细胞用低能量光 (E_0) 照射 1 min 无荧光增强现象, 随后提高光功率, 3 s 之内即可观察到荧光增强 [见图 4(a)]。对于 E_1 光功率, 在光照射的 19 min

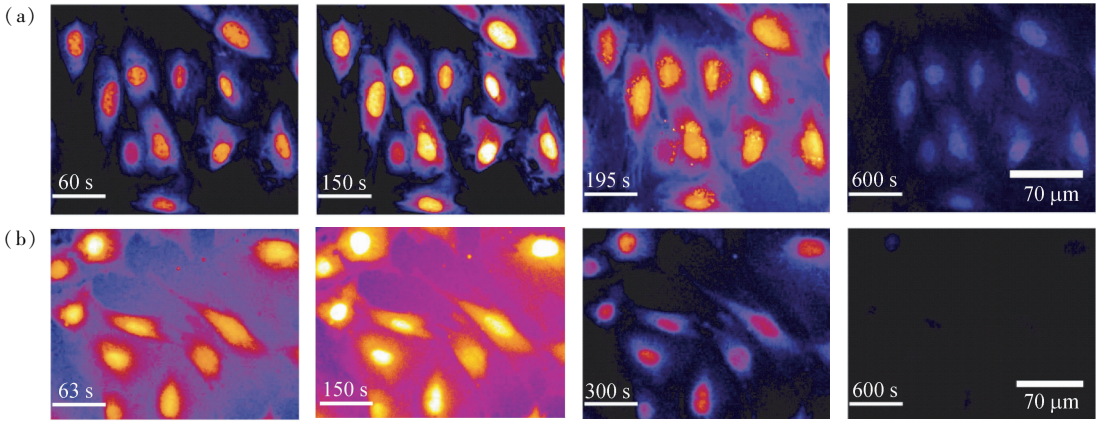


图3 成骨细胞中荧光强度伪彩图 (a) Fluo-4 AM 染色, (b) Oregon green 染色

Fig. 3 Pseudo-color images of fluorescent intensity for MC3T3-E1 cells (a) Stained with Fluo-4 AM, (b) Stained with Oregon green

内荧光强度趋于稳定,但是增加到 E_2 、 E_3 和 E_4 时, 荧光强度出现 1 个峰值,随后会发生荧光淬灭。需要指出的是,认定存在 1 个荧光峰的标准是其荧光强度变化幅值大于 E_0 功率基准值平均变化幅值的 4 倍。Oregon green 染色细胞有类似的光致荧光强度响应峰[见图 4(b)],但是只有 E_4 功率光照射下有响应峰。此外,即使发生光淬灭,在培养基中添加 TG 之后仍会有 1 个峰值。为了定量研究光和 TG 引起的峰值,定义以下几个参数: t_1 为从第 1 个光致

响应峰值前面的峰谷到第 1 个响应峰的时间,代表细胞荧光染色后光照引起响应的时间; t_2 为从峰值到峰值衰减到 50% 的时间; t_3 和 t_4 分别为 TG 引起响应峰的响应时间和衰减 50% 时间; m_1 为光致响应峰的峰值; m_2 为 TG 引起的响应峰的峰值[见图 4(c)]。在计算某一功率下荧光峰值时,采用此峰的相对光强值减去同一功率下出现此峰前的谷的相对光强值,以表示该功率光照引起的荧光强度变化。

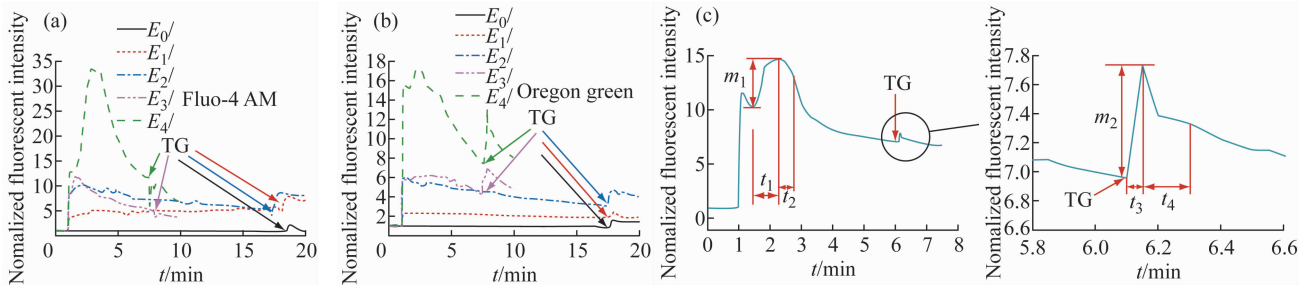


图4 成骨细胞 MC3T3-E1 荧光强度变化典型曲线 (a) Fluo-4 AM 染色, (b) Oregon green 染色, (c) 钙响应曲线特征参数

Fig. 4 Typical curves of fluorescence intensity (grayscale) in MC3T3-E1 cells (a) Stained with Fluo-4 AM, (b) Stained with Oregon green, (c) Characteristic parameters of calcium response.

对于 Fluo-4 AM 染色,90% 以上的细胞在光功率 E_2 、 E_3 和 E_4 时有光致响应峰[见图 5(a)]。但是对于 Oregon green 染色,光功率 E_2 、 E_3 和 E_4 时的响应比例分别降低至 33%、21% 或 43%。双因素方差分析结果表明,荧光染料对响应比例有显著性影响,不同等级光功率对响应比例也有显著性影响,但是染料和光功率之间没有交互作用。单因素方差分析表明,在光功率 E_2 、 E_3 和 E_4 时,两种染料之间均有

显著性差异[见图 5(a)]。Fluo-4 AM 染色时,光功率 E_2 时细胞大约需要 200 s 到达光致响应峰 t_1 ,光功率 E_3 和 E_4 时则需要 100 s[见图 5(b)]。而 Oregon green 染色组明显更快,只需要 60 s。在光功率 E_2 、 E_3 和 E_4 时,两种染料之间均有显著性差异[见图 5(b)]。荧光染料对 m_1 有显著性影响。在光功率 E_2 和 E_3 时,两种染料之间均有显著性差异[见图 5(c)]。Fluo-4 AM 染色细胞光致响应峰衰减时间

t_2 随着光功率的增强而降低,光功率 E_2 时为 200 s, E_3 时为90 s, E_4 时为 60 s [见图 5(d)]. 荧光染料对 t_2 有显著性影响。

为了研究光致荧光响应之后是否仍有 Ca^{2+} 从胞内钙池释放,向培养基中滴加 TG,光功率 E_1 和 E_2 时 17 min 左右加入, E_3 和 E_4 时 7 min 左右加入。对于 Fluo-4 AM 染色组, TG 滴加之后,光功率 E_1 和 E_2 时约 92% 的细胞有响应,而光功率 E_3 和 E_4 时约 75% 的细胞有响应 [见图 5(e)]。对于 Oregon green 染色组, 50% ~ 80% 的细胞在加入 TG 后有响应。在光功率 E_2 时,染料对响应比例均有显著性差异。TG 引起的峰值响应时间 t_3 为 10 ~ 50 s [见图 5(f)]。不同等级光功率对 t_3 无显著差异。在光功率 E_2 时,染料对 m_2 均有显著性差异 [见图 5(g)]。衰减时间 t_4 为 30 ~ 75 s,不受荧光染料和光功率影响 [见图 5(h)]。

2.3 光致荧光响应依赖于细胞种类

除了 MC3T3-E1, 采用其他 4 种细胞系 RAW264.7、MLO-Y4、MEF3T3 和 HEK293 研究光致荧光响应是否依赖于细胞系的种类(见图 6)。需要指出的是, E_0 功率光照射 1 min 之后,只用 E_1 和 E_4 功率光照射细胞。与 MC3T3-E1 类似,这 4 种细胞系在 E_0 和 E_1 功率光照射时没有观察到光致荧光响应。用最大功率 E_4 时, Fluo-4 AM 染色的 5 种细胞的响应比例分别为 97%、62%、32%、77% 和 96% [见图 6(a)]。对于 Oregon green 染色组, HEK293 没有荧光响应, MLO-Y4 和 MEF3T3 的响应比例分别为 3% 和 16%, 明显低于 Fluo-4 AM 染色组。对于 MC3T3-E1、MEF3T3 和 HEK293, 两种染色组的光致响应时间有显著差异 [见图 6(b)]。Fluo-4 AM 和 Oregon green 染色细胞的光致响应峰值 m_1 为 3 ~ 18, 只有 MEF3T3 和 HEK293 之间有显著性差异 [见图 6(c)]。衰减时间 t_2 为 10 ~ 60 s, MC3T3-E1、RAW264.7 和 HEK293 在两种染色之间无显著性差异 [见图 6(d)]。两种方法染色这 5 种细胞,在 E_1 [见图 6(e)、(g)] 和 E_4 [见图 6(f)、(h)] 功率光照射时,加入 TG 都能引起荧光响应。

2.4 荧光染料的孵育时间和曝光时间对荧光强度的影响

采用 Fluo-4 AM 的两种孵育方法对细胞染色,即 37 °C 孵育 0.5 h 或室温孵育 2 h。37 °C 孵育 0.5 h

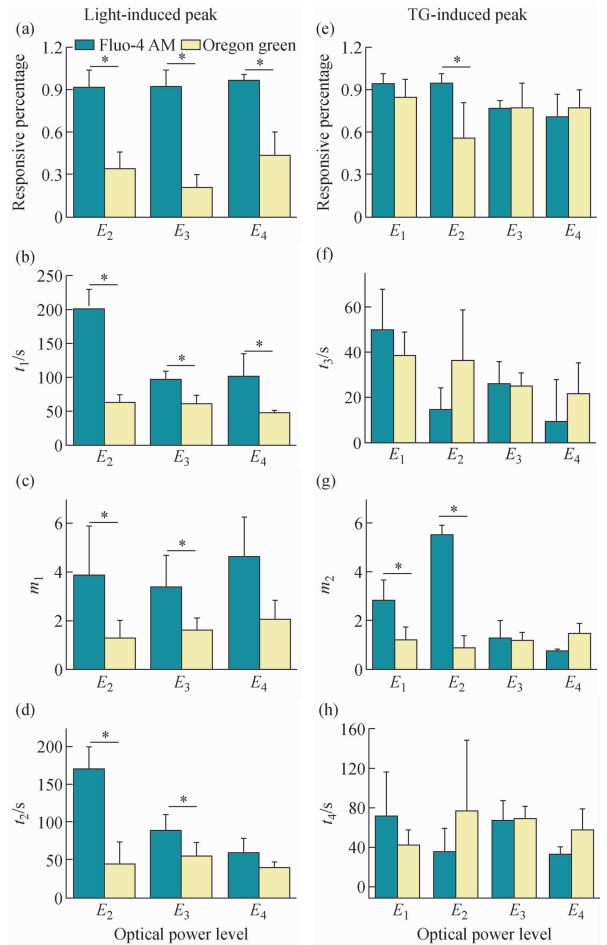


图 5 Fluo-4 AM 或 Oregon green 染色的成骨细胞中光照和 TG 引起荧光强度变化的特征参数 (a)(e) 响应比例, (b)(f) 第 1 峰响应时间, (c)(g) 第 1 峰峰值, (d)(h) 第 1 峰衰减时间 (* $P < 0.05$)

Fig. 5 Characteristic parameters of light-induced and TG-induced peaks of fluorescent intensity for MC3T3-E1 cells stained with Fluo-4 AM or Oregon green (a)(e) Percentage of responsive cells, (b)(f) Time to the first peak, (c)(g) Magnitude of the first peak, (d)(h) Relaxation time of the first peak

的细胞染色后有明显的线粒体/内质网区域滞留,细胞核部分荧光强度低于周围胞浆 [见图 7(a)]。室温孵育 2 h 的细胞荧光强度则分布均匀 [见图 7(b)]。但是两种孵育方法的光致荧光响应特征参数之间并没有显著性差异。为研究长时间曝光对荧光强度的影响,分别用 Fluo-4 AM 和 Oregon green 染色 MC3T3-E1,用 E_1 功率光照射 100 min。Fluo-4 AM 染色细胞有比较明显的光致荧光响应,而 Oregon green 染色细胞并无响应 [见图 7(c) ~ (f)]。

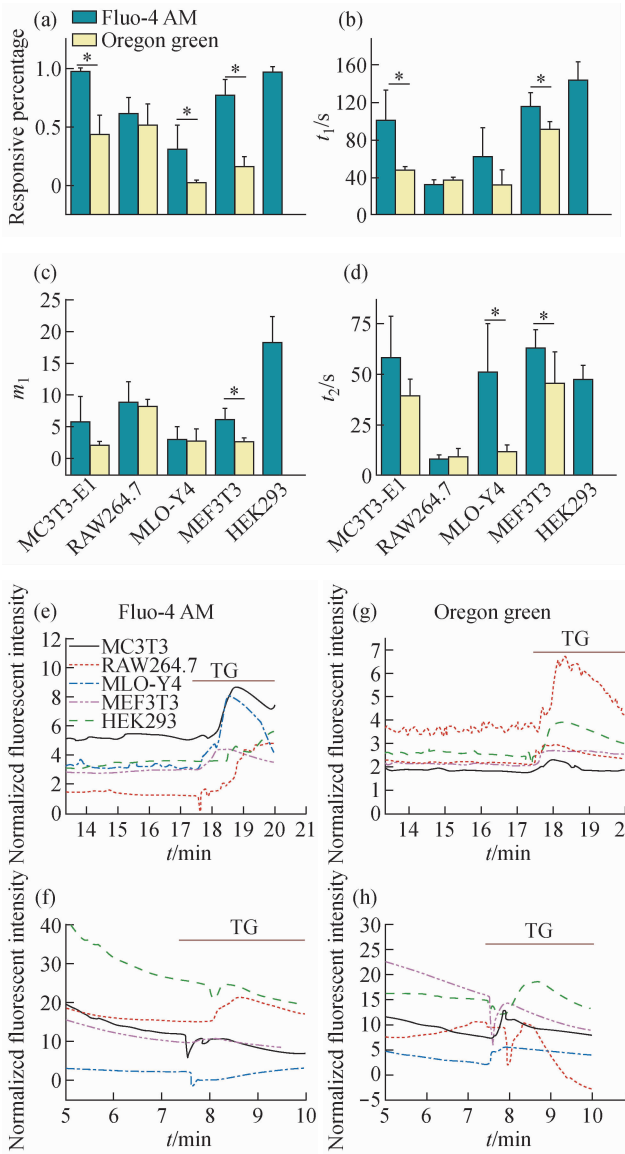


图6 不同细胞系的荧光响应 (a)~(d)5种细胞系光致响应的响应比例、第1峰响应时间 t_1 、第1峰峰值 m_1 和第1峰衰减时间 t_2 、(e)(g) E_1 功率光照射Fluo-4 AM或Oregon green染色的5种细胞系加入TG后荧光响应典型曲线、(f)(h) E_4 功率光照射Fluo-4 AM或Oregon green染色的5种细胞系加入TG后荧光响应典型曲线

Fig. 6 The fluorescent response for different cell lines

(a)-(d) The responsive percentage, time to the first peak t_1 , magnitude of the first peak m_1 , relaxation time of the first peak t_2 of light-induced peak for five cell lines, (e)(g) The typical curves of fluorescent intensity of five cell lines under TG stimulation after exposing to power level E_1 for Fluo-4 AM or Oregon green staining, (f)(h) The typical curves of fluorescent intensity of five cell lines under TG stimulation after exposing to power level E_4 for Fluo-4 AM or Oregon green staining

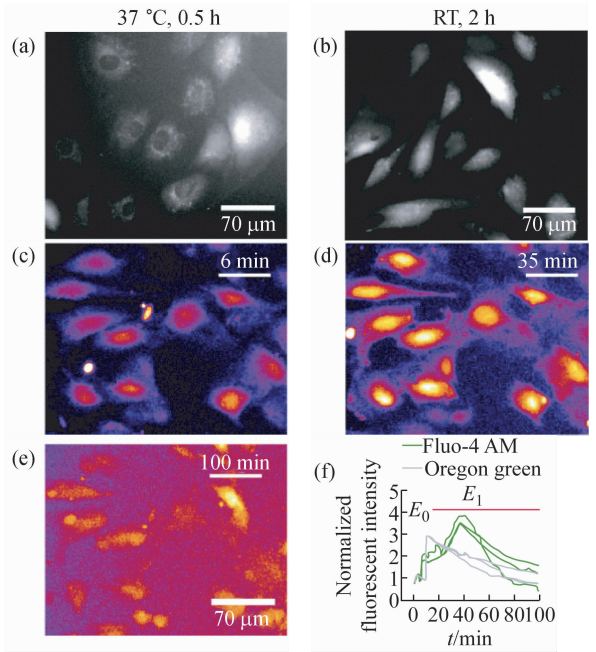


图7 孵育时间和温度以及曝光时间对荧光染色的影响

(a)(b)光功率 E_4 照射时成骨细胞应用Fluo-4 AM在37 °C孵育0.5 h或室温孵育2 h荧光染色图片、(c)~(e)Fluo-4 AM染色MC3T3-E1在 E_1 功率光照射6、35、100 min伪彩图、(f)Fluo-4 AM或Oregon green染色以及 E_1 功率光照射100 min细胞荧光强度变化典型曲线

Fig. 7 Effect of incubation time and temperature of dyes as well as the exposure time on fluorescence (a)(b) Fluorescent images of MC3T3-E1 cells stained with Fluo-4 AM at 37 °C for 0.5 h or at room temperature (RT) for 2 h when exposing to power level E_4 , (c)-(e) Pseudo-color images of fluorescent intensity for MC3T3-E1 stained with Fluo-4 AM when exposing to light with power level E_1 for 6, 35, 100 min, respectively, (f) The typical curves of fluorescent intensity vs. time for MC3T3-E1 stained with Fluo-4 AM or Oregon green when exposing to light with power level E_1 for 100 min

3 讨论

本研究采用2种常用 Ca^{2+} 指示剂Fluo-4 AM和Oregon green染色MC3T3-E1、RAW264.7、MLO-Y4、MEF3T3和HEK293这5种细胞系。用5种不同功率的光分别照射细胞,然后滴加TG释放胞内钙池的 Ca^{2+} 。观察光致荧光增强和随后的光淬灭现象,以及滴加TG引起的响应峰,并进一步分析响应峰的特征参数。

因为光致荧光增强现象可能会与一些特定因素(例如化学物或力学刺激)引起的荧光增强现象发

生混淆,通常采用降低激发光功率的方法来避免,而目前鲜有文献定量研究 Ca²⁺ 染料染色细胞的光致荧光增强现象。本研究发现,成骨细胞 MC3T3-E1 在 E₂ 功率光照射时,光致响应峰的峰值约为 4,响应时间约为 201 s,衰减时间约为 170 s;当光功率提高至 E₄ 时,以上 3 个参数分别为 5、102 s 和 59 s。有研究显示,在成骨细胞系 ROS17/2.8 添加胞外核苷酸 ATP 时,响应峰值为 3,响应时间为 10 s,衰减时间为 60 s^[16]。本课题组曾用流体刺激 MC3T3-E1,得到的响应峰值为 1.6,响应时间为 40 s,衰减时间为 50 s^[1];而对多核破骨细胞施加流体刺激,以上 3 个参数分别为 2.5、50 s、60 s^[17]。这些对比表明光致荧光增强现象不能被忽视,在使用 Ca²⁺ 指示剂时一定要控制光功率的大小。

事实上,光致荧光增强的机制尚不清楚。本研究发现,在光致荧光增强之后滴加 TG 仍然能够引起荧光强度峰值,推测与胞内钙池的 Ca²⁺ 释放有关。因此,之前的荧光增强可能不是因为钙池内 Ca²⁺ 释放,否则滴加 TG 不会在短时间内引起另一个钙响应峰。光致荧光响应的一种可能原因是高能量光的照射首先升高培养基和细胞体的温度,导致细胞膜上的离子通道开放,进而引起胞外 Ca²⁺ 进入胞质。研究发现,当温度高于 35 °C 时,加热 Hela 细胞会引起内质网质膜上的 STIM1 蛋白聚集,进而导致 Orail 调控的 Ca²⁺ 内流^[18]。究竟高能量光是否可以激活热敏感 Ca²⁺ 通道并进而引起胞外 Ca²⁺ 内流,已经超出了本文的研究范围,将在后续工作中加以深入探索。

本研究结果表明,Oregon green 染色 MC3T3-E1 细胞的光致荧光响应峰特征参数,例如响应比例、响应时间、衰减时间和响应峰值,都明显比 Fluo-4 AM 染色细胞低,说明 Oregon green 的光学稳定性比 Fluo-4 AM 好,而其他 4 种细胞系的实验结果也证明了上述结论。当光功率为 E₀ 和 E₁ 时,没有观察到荧光增强,且不依赖于细胞种类和荧光染料,表明低于 0.10 W/cm² 的光密度适合激活染色细胞,并可以避免光致荧光增强现象。为检测这种光致荧光增强是否不依赖细胞系种类,对比 5 种不同细胞系,结果显示光致荧光响应峰对于不同细胞系有所不同。例如,5 种细胞系除了 RAW 274.7, Oregon green 染色细胞的响应比例都比 Fluo-4 AM 染色细胞低。此外,

Oregon green 和 Fluo-4 AM 染色 MEF3T3 和 HEK293 的光致荧光响应的响应时间、衰减时间和响应峰值均显著不同。

本文还研究了 Fluo-4 AM 染色 MC3T3-E1 的孵育条件对荧光强度的影响。Fluo-4 AM 的推荐染色方法为 37 °C 孵育细胞 30 min,然后再孵育 30 min 以脱脂。但是本研究结果显示,对于 MC3T3-E1,这种染色方法可能会导致亚细胞结构区域滞留,与 37 °C 孵育 Hela 细胞之后放置 30 min 后的结果类似^[19]。而 MC3T3-E1 在室温孵育 2 h 后,细胞内的荧光分布却很均匀,推测较高的孵育温度可能会引起质膜中的阴离子转运体清空 Ca²⁺ 指示剂^[19]。尽管两种孵育条件下细胞染色分布不同,但是光致荧光响应峰的参数并无显著性差异。

综上所述,在不同细胞系内,较高功率的光照都会引起 Fluo-4 AM 或 Oregon green 染色细胞的荧光增强。但是 Oregon green 染色细胞的响应比例、响应峰值以及响应时间都低于 Fluo-4 AM 染色细胞,表明 Oregon green 比 Fluo-4 AM 具有更好的光学稳定性。因此,基于本文研究结果,建议在低功率光照下采用 Oregon green 显示胞内 Ca²⁺ 浓度变化。

参考文献:

- [1] Huo B, Lu XL, Hung CT, et al. Fluid flow induced calcium response in bone cell network [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2008, 1(1): 58-66.
- [2] 霍波, 康英永, 胡漫, 等. 成骨细胞力致钙响应和钙传递的研究进展[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(4): 382-388.
Huo B, Kang YY, Hu M, et al. Advances of mechanical stimulation induced calcium response and transfer in osteoblasts [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(4): 382-388.
- [3] 胡漫, 李平, 高宇欣, 等. 流体剪切力作用下无间隙连接成骨细胞阵列内的钙响应[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(5): 402-407.
Hu M, Li P, Gao YX, et al. Calcium response in osteoblastic pattern without gap junction under flow shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(5): 402-407.
- [4] Tsutsumi M, Kumamoto J, Denda M. Intracellular calcium response to high temperature is similar in undifferentiated and differentiated cultured human keratinocytes [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(10): 839-840.
- [5] Yan X, Liu J, Huang J, et al. Electrical stimulation induces calcium-dependent neurite outgrowth and immediate early

- genes expressions of dorsal root ganglion neurons [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1): 129-141.
- [6] Krizaj D, Mercer AJ, Thoreson WB, *et al.* Intracellular pH modulates inner segment calcium homeostasis in vertebrate photoreceptors [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(1): C187-197.
- [7] Zhang F, Sjöholm A, Zhang Q. Growth hormone signaling in pancreatic beta-cells—Calcium handling regulated by growth hormone [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 297(1-2): 50-57.
- [8] Hawrysh PJ, Buck LT. Anoxia-mediated calcium release through the mitochondrial permeability transition pore silences NMDA receptor currents in turtle neurons [J]. *J Exp Biol*, 2013, 216(Pt 23): 4375-4387.
- [9] Laohavisit A, Richards SL, Shabala L, *et al.* Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in arabidopsis require the calcium regulatory protein annexin1 [J]. *Plant Physiol*, 2013, 163(1): 253-262.
- [10] Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, *et al.* Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(15): 1290-1298.
- [11] Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, *et al.* Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells [J]. *Photomed Laser Surg*, 2008, 26(4): 401-404.
- [12] Hou JF, Zhang H, Yuan X, *et al.* In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: Proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation [J]. *Lasers Surg Med*, 2008, 40(10): 726-733.
- [13] Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(14): 8171-8178.
- [14] Kao JP, Harootyan AT, Tsien RY. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3 [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(14): 8179-8184.
- [15] Gee KR, Brown KA, Chen WN, *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes [J]. *Cell Calcium*, 2000, 27(2): 97-106.
- [16] Katz S, Boland R, Santillan G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: Involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(12): 2082-2091.
- [17] Li P, Hu M, Sun S, *et al.* Fluid flow-induced calcium response in early or late differentiated osteoclasts [J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(9): 1874-1883.
- [18] Xiao B, Coste B, Mathur J, *et al.* Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca²⁺ influx and modulates gene expression [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(6): 351-358.
- [19] Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, *et al.* A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals [J]. *Cell Calcium*, 2000, 28(4): 213-223.