

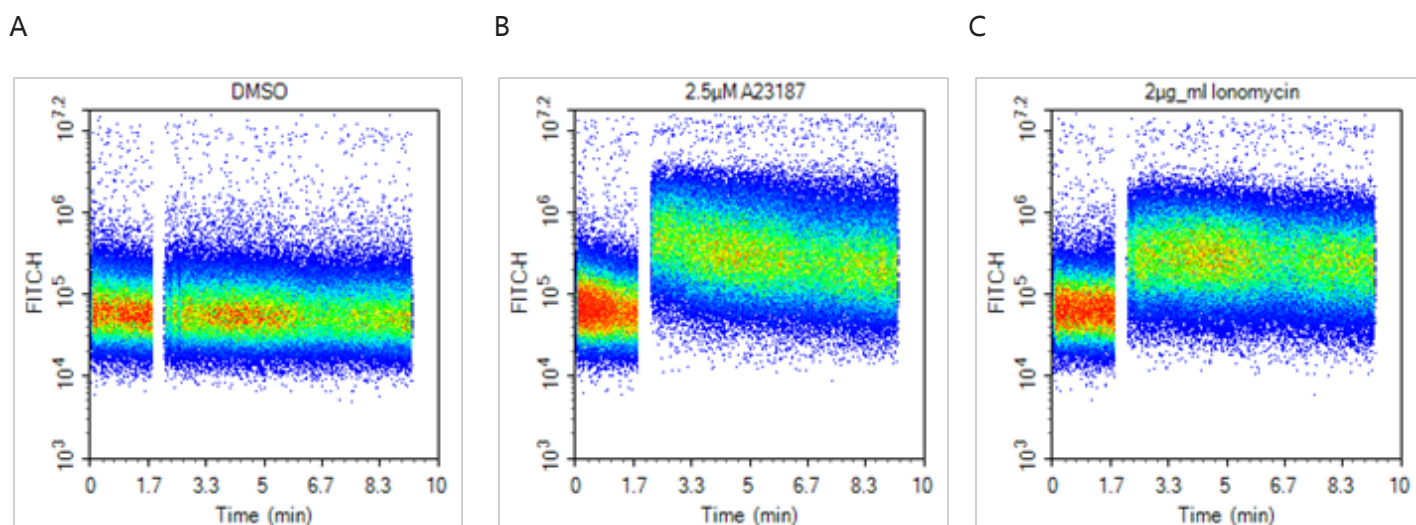
■ 概述

钙是机体内最重要的元素之一，是机体各项生理活动不可缺少的离子，参与一切生命的活动过程，比如骨骼形成，肌肉收缩，神经活动，同时作为细胞内第二信使通过与钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 结合激活多种蛋白激酶 (如腺苷酸环化酶、磷酸二酯酶等)、蛋白水解酶和核酸酶，引起特异的生理生化反应，从而参与细胞代谢、增殖、运动、分化及分泌等功能的调节^(1,2,3)。因此，钙离子 (Ca²⁺) 测定在生物学及医学研究中有着十分重要的意义。

钙的信使功能是通过调控细胞内游离 Ca²⁺ 浓度来实现的，因此测定细胞质中的 Ca²⁺ 浓度十分重要。在多种 Ca²⁺ 浓度检测方法中，流式细胞术是一种简单、方便及准确的方法。流式方法使用的钙荧光指示剂种类繁多，常见的有 Quin-2、Fura-2、Indo-1、Fluo-3、Fluo-4 等染料⁽⁴⁾，Fluo-3、Fluo-4 以其价格低廉、反应灵敏、可见光激发等优点被广泛应用。Fluo-3 AM 和 Fluo-4 AM 进入细胞后脱去 AM 酯，与细胞内游离钙结合，488nm 激光激发后产生的荧光信号强度与游离钙离子浓度成正比。本文使用 ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪，以负载 Fluo-4/AM 后的 Jurkat 细胞为研究对象，测定了多种外源性刺激物诱导胞浆游离 Ca²⁺ 浓度的动态变化过程以及激酶抑制剂 Ibrutinib 的钙流抑制作用。

■ ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪检测钙流：

A23187 和 Ionomycin 具有高度的钙离子结合活性，是常用的钙离子载体，在细胞生物学研究中，广泛用于转运钙离子至细胞质或穿过各种细胞膜^(5,6,7)。使用 ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪，可准确地检测细胞内基础钙流水平及 A23187、Ionomycin 引起的钙离子浓度变化。如图 1 所示，处于静息状态的 Jurkat 细胞显示平稳的钙离子基线，当加入 A23187、Ionomycin 后，在约 20 秒间隔的起始检测点 (图 1A-C) 检测到钙离子浓度的瞬时升高，短时持续后逐渐下降，A23187 引起的钙流变化强于 Ionomycin。基于流式检测，以静息状态的钙离子水平为基线，外源刺激诱导的 Ca²⁺ 浓度变化的动态过程得以呈现 (图 1D)。



D

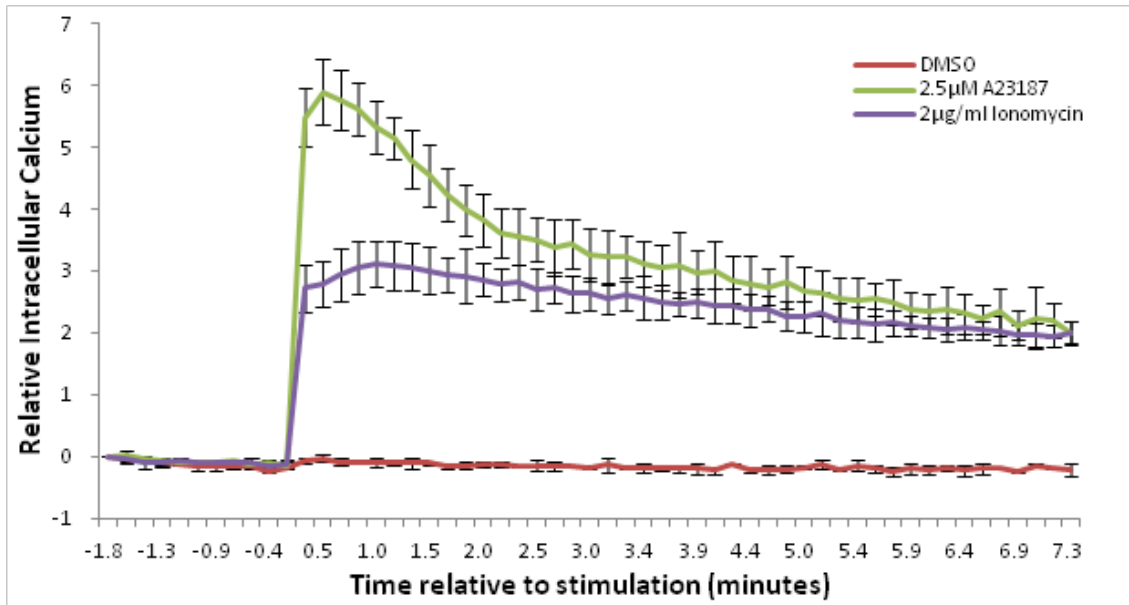
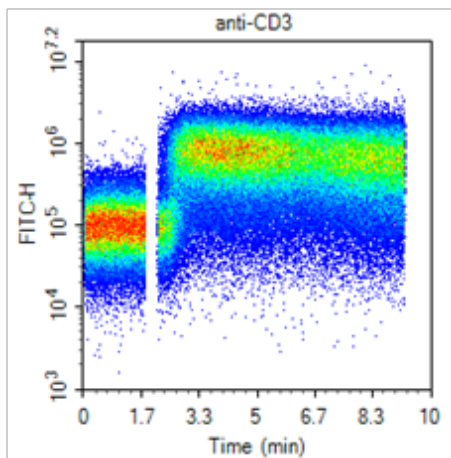


图 1. ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪检测 A23187、Ionomycin 引起的钙离子浓度变化。Jurkat 细胞负载 Fluo-4/AM (Invitrogen, F-14201) 后, 调整细胞浓度至 1×10^6 /ml, ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪上采集静息荧光强度 (基线) ~ 2 min (采样体积 25ul, 采样速度 14ul/min), 然后加入 A23187 或 Ionomycin 继续采集 100ul 样本, 共采集 125ul 终止。DMSO 为对照, 荧光强度代表细胞内 Ca^{2+} 浓度高低。A. 加入溶剂 DMSO (Sigma-Aldrich); B. 加入 $2.5 \mu M$ A23187 (Sigma-Aldrich, C7522); C. 加入 $2 \mu g/ml$ Ionomycin (联科生物, CS0002); D. 根据基线归零处理后的钙离子浓度随时间变化曲线 ($n=3$, means \pm SEM)。归零处理公式: Relative Intracellular Calcium(RIC)=fold of baseline(initial stage) - 1。加入刺激物时间为零点, 检测初始点为 $\sim 20s$ 。

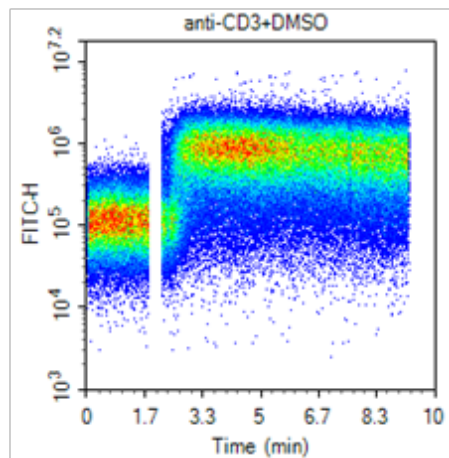
■ ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪检测药物对钙流的抑制作用

多种信号转导途径可影响细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。anti-CD3 抗体与 T 细胞受体结合后, 诱导细胞器中储存的内钙释放至细胞质, 细胞质内游离钙离子浓度的瞬时升高进一步诱发细胞膜离子通道开放, 使胞外钙离子内流, 从而激活一系列关键分子如钙调蛋白, 此级联反应最终导致基因转录和细胞状态的变化⁽³⁾。Ibrutinib (依鲁替尼) 是一种靶向抗肿瘤药物, 使 T 细胞响应于 T 细胞受体活化信号的钙流减弱⁽⁸⁾。使用 ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪可以灵敏地检测 anti-CD3 诱导的钙流变化, 以及测定药物 Ibrutinib 对钙流的抑制作用。如图 2 所示, 静息状态下的 Jurkat 细胞保持平稳的钙离子水平, 加入 anti-CD3 单克隆抗体后, Jurkat 细胞被活化, 钙离子的浓度迅速升高, 短时持续片刻后逐渐下降, 最后趋向平缓; 经 Ibrutinib 处理过的 Jurkat 细胞, 其响应于 anti-CD3 活化引起的钙流显著减弱。如图 2D, 在检测的 7.3min 时间进程内, anti-CD3 有效地激活 T 细胞, 引起钙离子浓度持续升高, Ibrutinib 完全抑制 T 细胞对 anti-CD3 的响应。

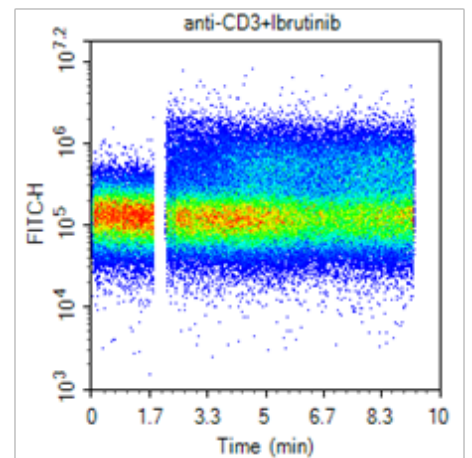
A



B



C



D

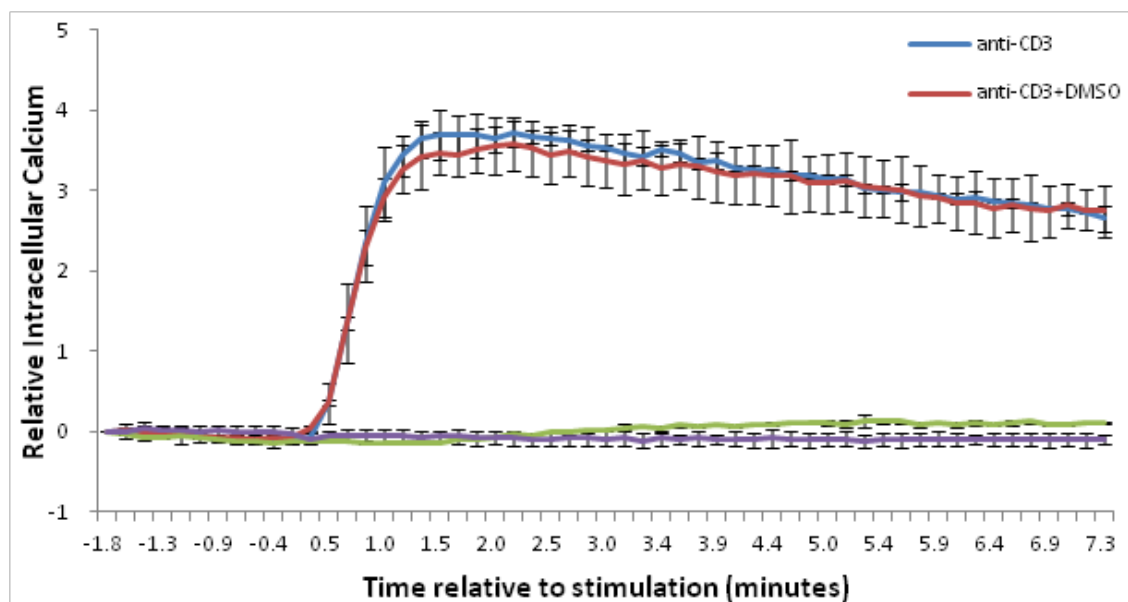


图 2. ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪检测 Ibrutinib 对钙流的抑制作用。Jurkat 细胞负载 Fluo-4/AM (Invitrogen, F-14201) 后, 经 DMSO 或 1µM Ibrutinib (NCE Biomedical, IB-2013-2) 处理, 调整细胞浓度至 1×10^6 /ml, 以不处理 Jurkat 细胞为对照, ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪上采集静息荧光强度 (基线) ~ 2min (采样体积 25ul, 采样速度 14ul/min), 然后加入 5µg/ml anti-CD3 (T&L Biotechnology, TL-101) 或等体积抗体稀释液 (PBS+0.2%BSA+0.09%NaN₃) 诱导细胞活化, 继续采集 100ul 样本, 共采集 125ul 终止。荧光强度代表细胞内 Ca²⁺ 浓度高低。A. 未处理; B. DMSO 处理; C. 1µM Ibrutinib 处理; D. 根据基线归零处理后的钙离子浓度随时间变化图 (n=3, means ± SEM)。

钙是人体不可或缺的微量元素, 它既是身体的构造者, 又是身体的调节者, 是人体的生命之源。对细胞内 Ca²⁺ 浓度的准确检测, 能让我们更全面的了解其在细胞功能上的调控过程, 能让我们更深入的认识许多生理病理过程和药物作用机制。ACEA NovoCyte™ 流式细胞仪检测钙流具有准确、高灵敏度和高稳定性的特点, 助力于钙离子及相关的实验研究。

参考文献

- (1) 浅谈钙离子的生理作用。韦磊, 科学信息, 2011: 27
- (2) 钙离子结合蛋白及其在神经系统疾病中的作用。朱运峰, 中国生物化学与分子生物学报, 2008; 24(5): 413-418
- (3) An imaging flow cytometry-based approach to measuring the spatiotemporal calcium mobilisation in activated T cells. Cerveira J, Begum J, et al, J Immunol Methods, 2015; 423:120-30
- (4) 细胞内钙成像和钙测定的基本原理及应用。史娟、李继硕, 神经解剖学杂志, 2006; 22(4): 455-462
- (5) Intracellular calcium dependent activation of p72syk in platelets. Wang XY, et al, J Bio chem, 1994; 116:858-861
- (6) The effect of intracellular Ca²⁺ on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. Martina M, et al, J Membr Biol, 1994;142(2):209-16
- (7) The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. Beeler TJ, et al, J Biol Chem, 1979;254(14):6229-31
- (8) Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. Jason A. Dubovsky, Kyle A. Beckwith, et al, Blood, 2013;122(15):2539-2549

