

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.12.001

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240531.1639.004\(2024-06-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240531.1639.004(2024-06-03))

一氧化氮对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控机制研究*

刘欣语, 谢伟明, 刘幸华, 李占飞, 周锡渊[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院创伤外科, 武汉 430030)

[摘要] **目的** 利用高速荧光摄影技术, 探究一氧化氮(NO)对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控作用。**方法** 利用成年斑马鱼分离提取其游离骨骼肌细胞, 将细胞以 Fluo-4, AM 荧光探针孵育后, 使用高速荧光摄像机记录单个电刺激后斑马鱼游离骨骼肌细胞内钙瞬态的荧光变化, 并定量计算细胞内钙瞬态相关的生物物理学参数。实验分组为对照组、S-亚硝基-N-乙酰基-DL-青霉胺(SNAP)组和 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)组, 使用 NO 供体 SNAP 和非特异性一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 L-NAME 探究 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控作用。实验再分组为对照组、N-乙基马来酰亚胺(NEM)组、1H-[1,2,4]恶草灵并[4,3-A]喹啉-1-酮(ODQ)组、SNAP 组和 SNAP+ODQ 组, 使用 sGC-cGMP-PKG 通路抑制剂 ODQ 和 S-亚硝基化抑制剂 NEM 探究 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控机制。**结果** 高速荧光摄影技术可以完整记录成年斑马鱼骨骼肌细胞内的钙瞬态荧光变化, 并计算出细胞内钙瞬态相关的生物物理学参数。与对照组比较, SNAP 组骨骼肌细胞钙瞬态明显降低, 而 L-NAME 组骨骼肌细胞钙瞬态较对照组明显增强。ODQ 组骨骼肌细胞钙瞬态明显强于对照组, 而 NEM 组与对照组比较各钙瞬态相关参数差异无统计学意义($P > 0.05$)。SNAP+ODQ 组骨骼肌细胞钙瞬态也明显强于 SNAP 组。**结论** NO 能够通过 sGC-cGMP-PKG 途径负向调控成年斑马鱼骨骼肌细胞内的钙瞬态过程。

[关键词] 一氧化氮; 斑马鱼; 骨骼肌细胞; 钙瞬态; 钙成像

[中图分类号] R318.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)12-1761-07

Study on regulatory mechanism of nitric oxide on calcium transient state in skeletal muscle cells of adult zebrafish*

LIU Xinyu, XIE Weiming, LIU Xinghua, LI Zhanfei, ZHOU Xiyuan[△]

(Department of Trauma Surgery, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

[Abstract] **Objective** To use the high-speed fluorescence photography to investigate the regulatory effect of nitric oxide (NO) on calcium transient state in skeletal muscle cells of adult zebrafish. **Methods** The skeletal muscle cells were separated and extracted from adult zebrafish and then incubated with Fluo-4 and AM fluorescent probe. The fluorescence change of calcium transient state in zebrafish free skeletal muscle cells after single electrical stimulation was recorded by a high-speed fluorescence camera, and the biophysical parameters related to the intracellular calcium transient state were quantitatively calculated. The experimental groups were divided into the control group, S-nitroso-n-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) group and n-nitroso-L-arginine methyl ester (L-NAME) group. NO donor SNAP and non-specific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME were used to investigate the regulatory effect of NO on calcium transient state in adult skeletal muscle cells of zebrafish. The experimental groups were redivided into the control group, N-ethylmaleimide (NEM) group, 1H-[1,2,4] dioxalin and [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) group, SNAP group and SNAP+ODQ group. The regulatory mechanism of NO on calcium transients state in adult zebrafish skeletal muscle cells was investigated by using sGC-cGMP-PKG pathway inhibitor ODQ and S-nitrosation inhibitor NEM. **Results** The fluorescence changes of calcium transient state in adult zebrafish skeletal muscle cells could be recorded by high speed fluorescence photography and the biophysical parameters related to intracellular calcium

transients state were calculated. Compared to the control group, the calcium transient state of skeletal muscle cells in the SNAP group was significantly decreased, while the calcium transient state of skeletal muscle cells in the L-NAME group was significantly enhanced compared to the control group. The calcium transient state of skeletal muscle cells in the ODQ group was significantly stronger than that in the control group, while there was no statistical difference in the related parameters of calcium transient state between the NEM group and control group. The calcium transient state of skeletal muscle cells in the SNAP+ODQ group was also significantly stronger than that in the SNAP group. **Conclusion** NO could negatively regulate the process of calcium transient state in adult zebrafish skeletal myocytes by the sGC-cGMP-PKG pathway.

[Key words] nitric oxide; zebrafish; skeletal muscle cell; calcium transient state; calcium imaging

细胞内钙离子流动在骨骼肌兴奋-收缩耦联过程中起到了关键作用^[1]。细胞受到兴奋性刺激后,钙离子从肌浆网迅速释放至细胞质内,使得细胞质内钙离子浓度迅速升高,触发骨骼肌细胞收缩^[2];随后,钙离子又被快速重吸收回肌浆网,骨骼肌细胞终止收缩,这一过程被称为钙瞬态^[3]。钙瞬态的持续时间和幅度参数决定了骨骼肌的收缩特性^[4-5]。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种小分子活性物质,广泛参与机体内多种生物学过程^[6-7]。既往研究表明,NO通过影响钙瞬态负向调节斑马鱼幼鱼骨骼肌的收缩和肌力^[8]。当斑马鱼幼鱼发育为成鱼,其躯体由透明变成不透明,伴随着骨骼肌细胞形态体积发生改变,其细胞内一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的亚型表达和分布也会发生变化^[9-10]。故本研究拟开展进一步实验探究 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控作用及机制。

在之前的研究中,作者团队通过光电倍增器将显微镜下采集到的荧光信号转换成电信号,以电信号的强弱反映荧光强度的变化,进而计算出细胞质内钙离子浓度的变化^[8],但该方法存在背景噪音干扰较大的缺点。随后的研究中亦广泛应用激光共聚焦显微镜进行荧光强度的测量^[11-12],但激光共聚焦显微镜曝光速度慢,录制帧率偏低。本研究采用高感光度的荧光高速摄像机,录制骨骼肌细胞钙瞬态变化的视频,直接测量视频中荧光亮度,并简便快速地计算出细胞内钙浓度的变化,为本研究中钙瞬态的监测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

3~5 月龄成年野生型斑马鱼,雌雄不限,购自中国科学院水生生物研究所。一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰基-DL-青霉素(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, SNAP)、非特异性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME)、可溶性鸟苷酰环化酶(soluble guanylyl cyclase, sGC)抑制剂 1H-[1,2,4]恶草灵并[4,3-A]喹啉-1-酮(1H-

[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one, ODQ)、S-亚硝基化阻滞剂 N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)及哇巴因(Ouabain)购自美国 MCE 公司。牛磺酸、离子霉素和乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)购自上海阿拉丁生化科技有限公司。环匹阿尼酸购自上海源叶生物科技有限公司。4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、DMEM 高糖培养基、青霉素链霉素溶液购自武汉赛维尔生物科技有限公司。胶原酶 II、蛋白酶 K、牛血清白蛋白和 Fluo-4, AM 钙离子荧光探针购自上海翌圣生物科技有限公司。2,3-丁二酮一肟(2,3-Butanedione monoxime, BDM)、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)凝胶购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 成年斑马鱼骨骼肌细胞的分离

取 1~2 条成年斑马鱼置于 4 °C 冷水中,待其麻醉后,分离头、腹部、内脏及鳍,剥除皮肤,将余下的背部及尾部肌肉组织置于 10 mL 消化液(100 mmol/L NaCl、10 mmol/L KCl、1.2 mmol/L KH₂PO₄、4 mmol/L MgSO₄、50 mmol/L 牛磺酸、20 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、1 mg/mL 胶原酶 II、10 μg/mL 蛋白酶 K、4 mg/mL 牛血清白蛋白、调节 pH 至 6.9),用镊子钝性分离肌肉组织为 1 mm³ 小块,置于恒温振荡器中 27 °C 消化 1 h。同时配制转移液 A(117.2 mmol/L NaCl、25.2 mmol/L NaHCO₃、4.7 mmol/L KCl、1.2 mmol/L MgCl₂、1.2 mmol/L KH₂PO₄、11.1 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L BDM、5 mg/mL 牛血清白蛋白、调节 pH 至 7.4)及转移液 B(117.2 mmol/L NaCl、25.2 mmol/L NaHCO₃、4.7 mmol/L KCl、1.2 mmol/L MgCl₂、1.2 mmol/L KH₂PO₄、2.5 mmol/L CaCl₂、11.1 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、调节 pH 至 7.4)。收集消化完毕的细胞悬液,以 100×g 离心 10 min。离心完成后弃上清液,将细胞沉淀重悬于转移液 1(4.9 mL TBA+0.1 mL TBB)中,移液枪轻柔吹匀后室温静置 5 min,再次 100×g 离心 10 min。在转移液 2(4.5 mL TBA+0.5 mL TBB)及转

移液 3(2.5 mL TBA+2.5 mL TBB)中进行前一步操作。离心后保留约 0.5 mL 上清液重悬细胞沉淀。将细胞悬液均匀滴于以 50 μ L ECM 凝胶包盖的圆形盖玻片上,置于细胞培养皿内。静置 5 min 后,沿培养皿壁小心缓慢加入 3 mL DMEM 高糖培养基(含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、4 mmol/L L-谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、10 mmol/L BDM),在 27 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 的 O_2 培养箱中孵育 30 min 备用。

1.2.2 斑马鱼游离骨骼肌细胞钙瞬态的测量

轻柔取出载有细胞的载玻片,TBB 清洗一次后另置入空的 35 mm 培养皿,以 100 μ L 含 10 μ mol/L Fluo-4,AM 钙离子荧光探针的 TBB 滴于载玻片上,转入 27 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 的 O_2 中避光孵育 30 min。TBB 清洗细胞一次后,将其浸泡入装有工作液的 6 孔板中,静置 5 min。本研究对照组工作液为 TBB 溶液,实验组工作液分别为添加有 100 μ mol/L SNAP、5 mmol/L L-NAME、10 μ mol/L ODQ 或 100 μ mol/L NEM 的 TBB 溶液,各试剂工作浓度参考既往研究文献^[8,13-15]确定。

使用 NO 供体 SNAP 和非特异性 NOS 抑制剂 L-NAME 探究 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控作用,实验分为对照组、SNAP 组和 L-NAME 组。再使用 sGC-cGMP-PKG 通路抑制剂 ODQ 和 S-亚硝基化抑制剂 NEM 探究 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控机制,实验分为对照组、NEM 组、ODQ 组和 SNAP+ODQ 组。

将 6 孔板安置于荧光显微镜(明美 MI52-N)的载物台上。一对纯铜电极紧贴 6 孔板孔壁对向安置于载有细胞的盖玻片两侧,连接电刺激器,给予单次 15 V 100 ms 的电刺激,细胞的荧光变化过程由 E-3CMOS00400KMA 相机(深圳市泰立仪器仪表有限公司)实时录制(720 \times 540 分辨率,400 帧/s,2.43 ms 曝光时间,2 500 ISO 增益)。

1.2.3 图像处理分析

视频通过 Adobe Premiere Pro2022 软件剪辑成适当时间长度,选取 5 \times 5 像素细胞荧光变化典型区域,以自编 Python 程序测量视频每一帧中该区域的平均亮度值,与连续时间线对应记录。同时选取视频中背景区域测量背景亮度值。两者相减得出细胞本身的荧光亮度值。细胞以高钙液(140 mmol/L LiCl、5 mmol/L KCl、1.2 mmol/L KH_2PO_4 、1.2 mmol/L MgCl_2 、4 mmol/L CaCl_2 、20 mmol/L HEPES、0.005 mmol/L 离子霉素、0.01 mmol/L 环匹阿尼酸、5 mmol/L 咖啡因、1 mmol/L Ouabain)处理后,以前述 10 μ mol/L Fluo-4,AM 探针避光孵育 30 min,测量其荧光值为 F_{\max} 。以无钙液(140 mmol/L LiCl、5

mmol/L KCl、1.2 mmol/L KH_2PO_4 、1.2 mmol/L MgCl_2 、4 mmol/L EGTA、20 mmol/L HEPES、0.005 mmol/L 离子霉素、0.01 mmol/L 环匹阿尼酸、5 mmol/L 咖啡因、1 mmol/L Ouabain)处理细胞后,10 μ mol/L Fluo-4,AM 探针避光孵育 30 min,测量其荧光值为 F_{\min} 。

将各工作液中测定的细胞荧光亮度值作为 F 代入以下公式,换算出细胞质内钙离子浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (1)$$

生产商提供的 Fluo-4,AM 解离常数 K_d 为 345 nmol/L。数据输入 WPS Office2023 软件整理后,导入专业波形拟合软件 PeakFit4.12 以脉搏波方程进行拟合。用以下 8 个参数分析波形:峰值、全波形宽度、半峰宽度、曲线下面积、达峰时间、波形上升速率、重吸收时间、90%~10% 指数衰减时间。其中全波形宽度、峰值、曲线下面积、半峰宽度描述了钙瞬态的一般性质,达峰时间、波形上升速率反映了钙释放的速度,而重吸收时间、90%~10% 指数衰减时间则反映钙离子重吸收的速度。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism9.5.0 软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 成年斑马鱼游离骨骼肌细胞的一般特性

在显微镜白光下,斑马鱼骨骼肌细胞表现出清晰可见的横纹,细胞内存在纵行的肌丝结构,与哺乳动物的骨骼肌细胞类似,为典型横纹肌,见图 1A、B。整个实验过程细胞能保持自身形态及功能。通过 Fluo-4,AM 钙离子荧光探针负载,静息状态下的骨骼肌细胞可被激发出较弱的绿色荧光,显示其细胞轮廓,见图 1C、D。

2.2 成年斑马鱼游离骨骼肌细胞钙瞬态的荧光变化

所有静息态视频均未见细胞自发钙瞬态变化。成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态过程中荧光变化的代表性图片见图 2。细胞典型区域荧光亮度值随时间变化的散点图及拟合曲线见图 3。

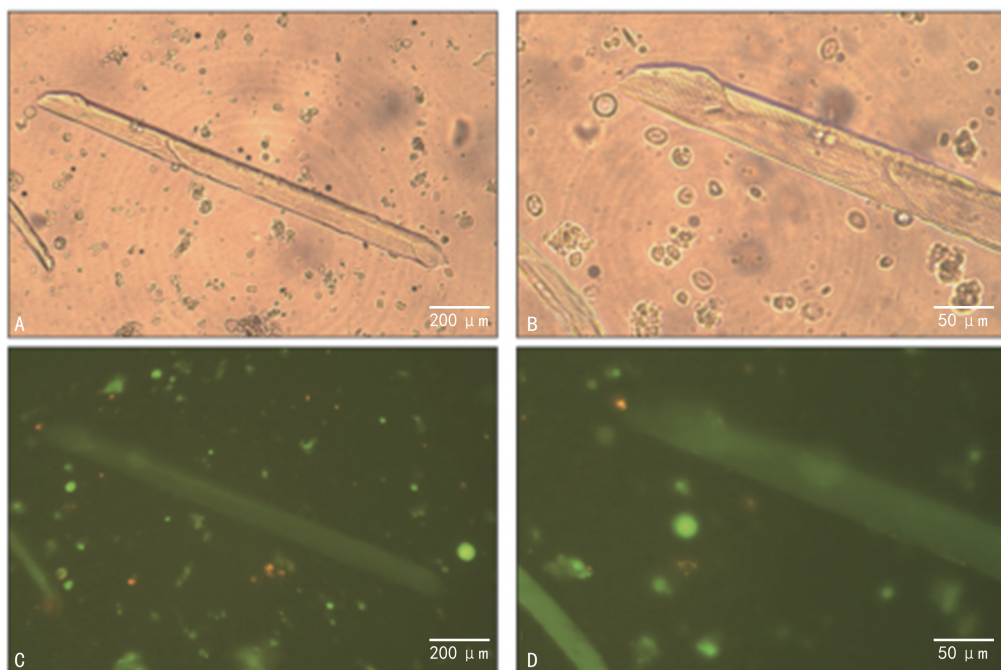
2.3 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控作用

SNAP 组的峰值、曲线下面积较对照组明显降低($P < 0.05$)。SNAP 组的波形上升速率较对照组明显降低($P < 0.05$),而 SNAP 组和对照组间的重吸收时间和 90%~10% 指数衰减时间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。L-NAME 组的全波形宽度、峰值、曲线下面积、波形上升速率、重吸收时间较对照组明显升高($P < 0.05$),半峰宽度、达峰时间、90%~10% 指数衰减时间较对照组明显降低($P < 0.05$),见表 1。

2.4 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控机制

本研究中使用 sGC 抑制剂 ($10 \mu\text{mol/L}$ ODQ) 和 S-亚硝基化抑制剂 ($100 \mu\text{mol/L}$ NEM), 分别阻断 sGC-cGMP-PKG 通路^[16-17] 或 S-亚硝基化通路^[18], 以探究 NO 在成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控机制。结果显示, NEM 组和对照组间各参数比较差异

均无统计学意义 ($P > 0.05$)。ODQ 组的全波形宽度、峰值、曲线下面积、波形上升速率、重吸收时间 90%~10% 指数衰减时间较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 达峰时间较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。与 SNAP 组比较, SNAP+ODQ 组的全波形宽度、峰值、曲线下面积、波形上升速率、重吸收时间明显升高 ($P < 0.05$), 达峰时间明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2。



A, B: 白光图; C, D: 荧光图。

图 1 斑马鱼游离骨骼肌细胞的形态及静息荧光图

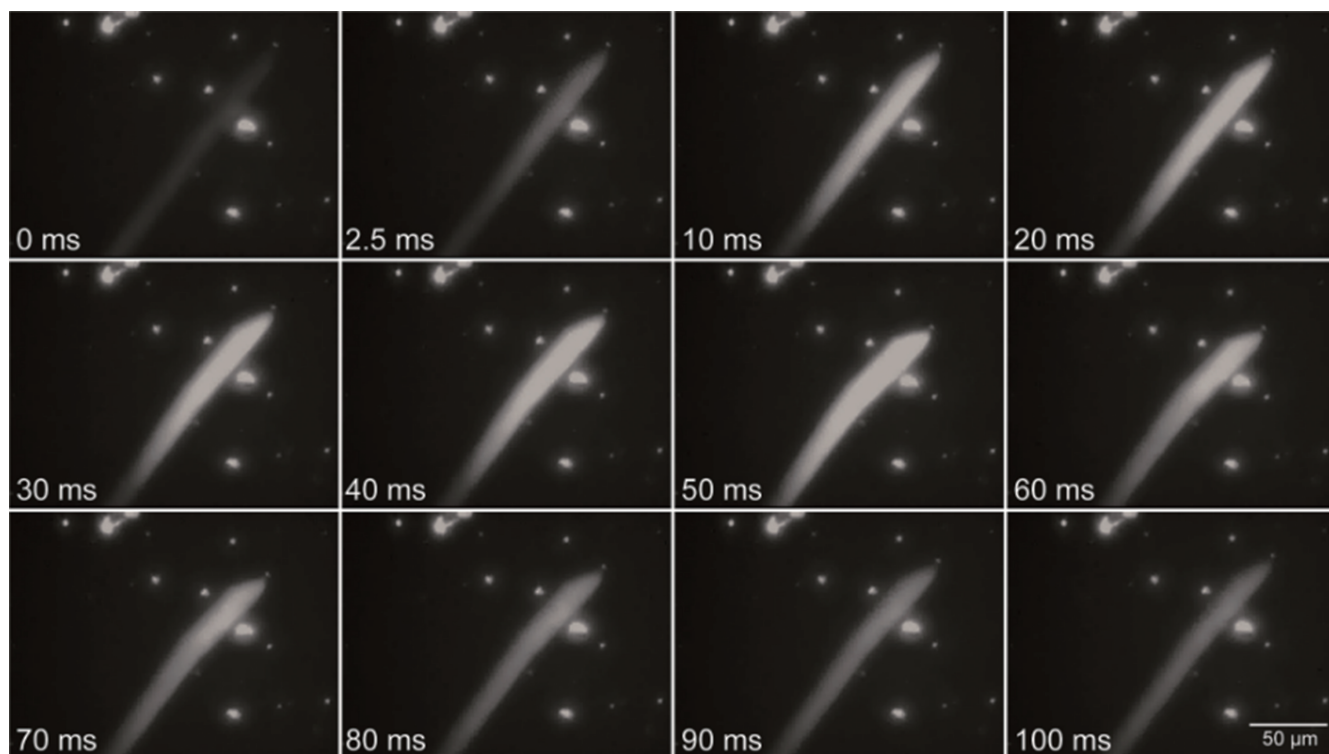


图 2 电刺激诱发斑马鱼游离骨骼肌细胞的钙瞬态变化过程

表 1 NO 调控斑马鱼游离骨骼肌细胞钙瞬态各参数结果($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组(n=34)	SNAP组(n=36)	L-NAME组(n=30)
全波形宽度(ms)	621.25±35.39	623.61±60.59	813.58±90.73 ^c
峰值(nmol/L)	137.94±71.50	73.07±53.11 ^c	298.42±142.30 ^c
曲线下面积(nmol·s·L ⁻¹)	20.65±10.71	10.54±6.94 ^c	40.52±19.78 ^c
半峰宽度(ms)	131.75±7.61	132.74±12.58	119.43±13.77 ^b
达峰时间(ms)	53.16±2.91	54.51±5.66	44.42±10.46 ^c
波形上升速率($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	2.60±1.39	1.41±1.12 ^a	7.04±3.69 ^c
重吸收时间(ms)	568.09±32.73	569.10±56.67	769.17±89.22 ^c
90%~10%指数衰减时间(ms)	193.38±11.26	194.03±19.28	183.00±19.37 ^a

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.001$, ^c: $P < 0.0001$, 与对照组比较。

表 2 NO 通过 sGC-cGMP-PKG 途径调控骨骼肌细胞钙瞬态各生物物理学参数结果

项目	对照组(n=34)	NEM组(n=28)	QDQ组(n=23)	SNAP组(n=36)	SNAP+ODQ组(n=20)
全波形宽度(ms)	621.25±35.39	637.50±85.10	788.48±203.13 ^d	623.61±60.59	776.75±79.75 ^f
峰值(nmol/L)	137.94±71.50	119.15±85.67	194.63±83.31 ^a	73.07±53.11 ^b	158.30±101.97 ^e
曲线下面积(nmol·s·L ⁻¹)	20.65±10.71	17.97±12.82	29.03±11.04 ^a	10.54±6.94 ^b	23.08±13.67 ^e
半峰宽度(ms)	131.75±7.61	133.72±13.88	131.38±7.42	132.74±12.58	133.36±19.93
达峰时间(ms)	53.16±2.91	53.04±4.78	45.11±9.52 ^d	54.51±5.66	48.38±5.08 ^e
波形上升速率($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	2.60±1.39	2.29±1.73	4.58±2.37 ^c	1.41±1.12 ^a	3.29±2.22 ^e
重吸收时间(ms)	568.09±32.73	584.46±80.83	743.37±210.90 ^d	569.10±56.67	753.38±102.35 ^f
90%~10%指数衰减时间(ms)	193.38±11.26	197.77±25.23	208.15±25.03 ^a	194.03±19.28	206.38±51.95

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, ^c: $P < 0.001$, ^d: $P < 0.0001$, 与对照组比较; ^e: $P < 0.01$, ^f: $P < 0.0001$, 与 SNAP 组比较。

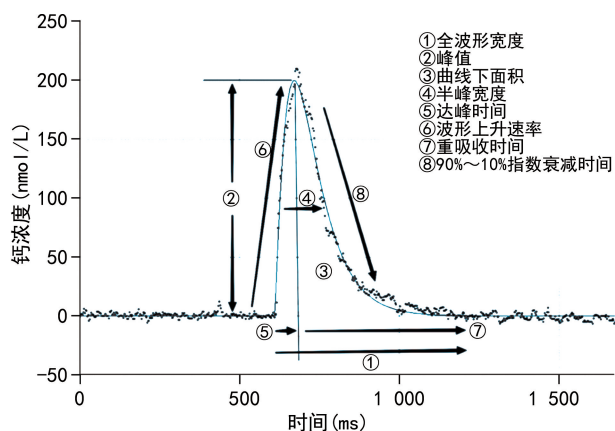


图 3 细胞内钙浓度-时间散点图及拟合曲线图

3 讨论

之前的研究表明,NO 对斑马鱼幼鱼骨骼肌肌力及钙瞬态存在负向调控作用^[8]。当斑马鱼发育成熟后,体内 NOS 亚型的表达和分布有所变化,不同亚型的 NOS 产生的 NO 可通过不同途径对骨骼肌的收缩功能及兴奋性进行调控^[9,19]。因而本研究着重探讨了 NO 对单次电刺激诱导的成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控作用。不同时间长度的单次电刺激诱导的钙瞬态及肌力强度不同,本研究采用了单次 15 V 时间 100 ms(为预实验测得细胞最大钙瞬态平均诱导刺

激时间的 1.5 倍)的电刺激,以确保所有细胞均产生最大钙瞬态变化。研究结果显示,NO 供体 SNAP 可以明显降低钙离子的释放速度,减少释放的总量和持续时间,表明 SNAP 提供的外源性 NO 主要通过抑制钙离子的释放来负向调控骨骼肌细胞的钙瞬态。而 NOS 抑制剂 L-NAME 阻断了内源性 NO 产生之后,明显增加了钙离子释放量和持续时间,延长了重吸收时间,对细胞钙瞬态有着明显的正向调控作用。这些结果与既往幼鱼骨骼肌细胞的研究结果相吻合,提示 NO 对成年和幼鱼骨骼肌细胞钙瞬态有着类似作用,能对斑马鱼骨骼肌收缩产生负向调控。不同的是,在成年斑马鱼骨骼肌细胞中,L-NAME 组达峰时间较对照组明显降低,波形上升速度较对照组明显升高,加快了钙离子的释放速度。其机制尚不明确,可能与 NOS 产生的 NO 能提升骨骼肌细胞兴奋性相关,需后续研究予以阐明。

既往研究表明,NO 在机体内主要通过 sGC-cGMP-PKG 通路或 S-亚硝基化通路两条途径发挥其生理调控功能^[20]。为了进一步明确 NO 对斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控途径,本研究观察了 sGC 阻滞剂 ODQ 和 S-亚硝基化阻滞剂 NEM 对骨骼肌细胞钙瞬态的作用。结果显示,在具有正常生理功能(即

NOS 产生内源性 NO 进行调控)的斑马鱼骨骼肌细胞中,NEM 阻断了 S-亚硝基化作用后,对细胞钙瞬态的生物物理学参数几乎无影响;而 ODQ 可以明显增强斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态,表明抑制 sGC 可以阻断内源性 NO 对斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的影响。同时 ODQ 抑制 sGC 可以明显提升钙离子的释放速度,并抑制钙离子的重吸收,延迟骨骼肌舒张,提示 ODQ 对斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态具有明显的正向调控作用,与 L-NAME 的效应相似,这两组数据与作者所在课题组之前的研究结果^[8]相吻合。为了进一步探究了 ODQ 对 SNAP 释放的外源性 NO 的调控作用,本研究进一步使用 SNAP 和 ODQ 两种药物处理细胞,结果显示 ODQ 抑制 sGC 可以明显阻断 SNAP 产生的外源性 NO 对钙瞬态的负向调控作用。上述结果提示,NO 对斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的调控途径并未随着组织发育而发生改变,其依旧通过 sGC-cGMP-PKG 途径发挥作用。

近年来,随着专业工具软件的发展及人工智能的介入,细胞钙成像荧光摄像技术因其可连续记录细胞运动轨迹、功能、形态变化,以及一次实验可记录多个细胞数据的特点,被愈来愈广泛地应用于以神经功能学为代表的各个研究领域^[21-22]。相较于神经细胞及心肌细胞,骨骼肌细胞收缩过程中细胞内钙离子浓度的升高主要源于肌浆网内钙离子释放进入细胞质,其钙瞬态快速变化及较高的峰值保证了肌肉快速而有力的收缩运动^[23],而这种钙瞬态的快速变化,导致钙成像实验中荧光闪烁非常短暂,通常只持续数毫秒至数百毫秒^[24]。为了精确记录骨骼肌细胞的钙瞬态变化过程,需要在短时间内记录尽可能多的帧,以较高的时间分辨率获取相对平滑的荧光强度变化曲线。然而高帧率拍摄视频,势必会使每一帧的曝光时间受到压缩,例如采取 500 帧/s 进行拍摄记录,则每一帧的曝光时间低于 2 ms,如此短暂的曝光时间使得相机的进光量受到极大限制。同时,为了减少光毒性对细胞的损伤,实验时激发光的功率也受到限制,绝大部分钙离子荧光指示剂发射的荧光强度都相当微弱。短暂的曝光时间和微弱的荧光强度,使清晰地记录高帧率视频相当困难,对实验器材的性能提出了极大的挑战。目前常用的激光共聚焦显微镜虽然也能清晰地记录微弱的细胞荧光,但其机制是通过激光束对焦平面的每个像素点依次扫描后再绘制出图像,全分辨率下扫描帧率大都限制于每秒数 10 帧,线扫描帧率虽然很快,但难以呈现整体图像,且设备价格昂贵^[25]。本研究采用高速荧光摄影相机,具有高速全局快门(即所有像素点同时曝光及读取数据)和优异的弱光性能,设置适当的增益后,能在 720×540 分辨率下以最高 520 帧/s 的帧率清晰记录微弱的荧光视频。在

综合考虑成像质量及荧光亮度等因素后,本研究在 2 500 ISO 增益下,应用 2.43 ms 的曝光时间以 400 帧/s 记录了所有实验视频,通过自编的 Python 程序测量视频每一帧图像中选定的典型区域内细胞荧光强度值,按时间排列组成荧光变化曲线。细胞荧光视频录制及测量的方式简便易行,使用普通的荧光显微镜即可完成实验,而且一次实验可以录制视野内多个细胞,通过软件逐一测量,极大地增加了样本量,降低了实验时间和成本。此外,通过测量同一帧视频中背景区域的亮度值,可以有效减少背景噪音的干扰,与传统的光电倍增器或者共聚焦显微镜比较,具有独特的优势。但是对于某些快速移动的细胞标本或更加短暂的钙瞬态过程,最高 500 帧/s 导致的 2 ms 的时间分辨率尚不能满足测量需求。

综上所述,本研究通过高速荧光摄影结合软件测量视频荧光亮度变化的方法,阐明了 NO 对成年斑马鱼骨骼肌细胞钙瞬态的负向调控作用,揭示了其调控作用主要是通过 sGC-cGMP-PKG 途径进行,而调控位点及详细机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] KOULEN P, JANOWITZ T, JOHENNING F W, et al. Characterization of the calcium-release channel/ryanodine receptor from zebrafish skeletal muscle[J]. *J Membr Biol*, 2001, 183(3):155-163.
- [2] ROBIN G, ALLARD B. Voltage-gated Ca^{2+} influx through L-type channels contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} loading in skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2015, 593(21):4781-4797.
- [3] STEPHENSON D G, LAMB G D, STEPHENSON G M. Events of the excitation-contraction-relaxation (E-C-R) cycle in fast- and slow-twitch mammalian muscle fibres relevant to muscle fatigue[J]. *Acta Physiol Scand*, 1998, 162(3):229-245.
- [4] BAYLOR S M, HOLLINGWORTH S. Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers[J]. *J Gen Physiol*, 2012, 139(4):261-272.
- [5] HOLLINGWORTH S, KIM M M, BAYLOR S M. Measurement and simulation of myoplasmic calcium transients in mouse slow-twitch muscle fibres[J]. *J Physiol*, 2012, 590(3):575-594.
- [6] YANG Z L, ZHAO Q, HE Q. Nitric oxide[J].

- Med Gas Res, 2019, 9(4): 170.
- [7] LIY P M, PUZI N N A, JOSE S, et al. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2021, 246(22): 2399-2406.
- [8] ZHOU X Y, FINK R H A, MOSQUEIRA M. NO-sGC pathway modulates Ca^{2+} release and muscle contraction in zebrafish skeletal muscle[J]. Front Physiol, 2017, 8: 607.
- [9] POON K L, RICHARDSON M, LAM C S, et al. Expression pattern of neuronal nitric oxide synthase in embryonic zebrafish[J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3(4): 463-466.
- [10] KUMAR R, COGGAN A R, FERREIRA L F. Nitric oxide and skeletal muscle contractile function[J]. Nitric Oxide, 2022, 122/123: 54-61.
- [11] DENG J, CAI X, HAO M, et al. Calcium dobesilate (CaD) attenuates high glucose and high lipid-induced impairment of sarcoplasmic reticulum calcium handling in cardiomyocytes[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 637021.
- [12] JANICEK R, AGARWAL H, GOMEZ A M, et al. Local recovery of cardiac calcium-induced calcium release interrogated by ultra-effective, two-photon uncaging of calcium[J]. J Physiol, 2021, 599(16): 3841-3852.
- [13] PFEIFFER S, LEOPOLD E, SCHMIDT K, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine[J]. Br J Pharmacol, 1996, 118(6): 1433-1440.
- [14] PRAVDIC D, VLADIC N, CAVAR I, et al. Effect of nitric oxide donors S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, spermine NONOate and propylamine propylamine NONOate on intracellular pH in cardiomyocytes[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(9): 772-778.
- [15] ZACHAROWSKI K, BERKELS R, OLBRICH A, et al. The selective guanylate cyclase inhibitor ODQ reduces multiple organ injury in rodent models of Gram-positive and Gram-negative shock[J]. Crit Care Med, 2001, 29(8): 1599-1608.
- [16] FRANCIS S H, BUSCH J L, CORBIN J D, et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action[J]. Pharmacol Rev, 2010, 62(3): 525-563.
- [17] ZHANG X, HIAM D, HONG Y H, et al. Nitric oxide is required for the insulin sensitizing effects of contraction in mouse skeletal muscle[J]. J Physiol, 2017, 595(24): 7427-7439.
- [18] YOON S, EOM G H, KANG G. Nitrosative stress and human disease: therapeutic potential of denitrosylation[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9794.
- [19] MOSQUEIRA M, SCHEID L M, KIEMEL D, et al. nNOS-derived NO modulates force production and iNO-derived NO the excitability in C2C12-derived 3D tissue engineering skeletal muscle via different NO signaling pathways[J]. Front Physiol, 2022, 13: 946682.
- [20] ANDRABI S M, SHARMA N S, KARAN A, et al. Nitric oxide: physiological functions, delivery, and biomedical applications [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(30): e2303259.
- [21] DANA H, SUN Y, MOHAR B, et al. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments[J]. Nat Methods, 2019, 16(7): 649-657.
- [22] KETTUNEN P. Calcium imaging in the zebrafish[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1131: 901-942.
- [23] IRVING M. Regulation of contraction by the thick filaments in skeletal muscle[J]. Biophys J, 2017, 113(12): 2579-2594.
- [24] COUTTS C A, PATTEN S A, BALT L N, et al. Development of ionic currents of zebrafish slow and fast skeletal muscle fibers[J]. J Neurobiol, 2006, 66(3): 220-235.
- [25] ELLIOTT A D. Confocal microscopy: principles and modern practices[J]. Curr Protoc Cytom, 2020, 92(1): e68.

(收稿日期: 2023-11-18 修回日期: 2024-03-12)

(编辑: 姚雪)