

# 使用 BMG reader 即時監測 iPSC 心臟組織之鈣離子變化

新藥開發需進行全面性測試，必須具備對於人體有正面效益及沒有健康危害的特性，但動物模型對於藥物可能產生不同的反應。為此，研究人員尋找更合適的體外系統，盡可能模擬人體組織或器官的生理狀況。傳統方式的2D細胞培養，有利於初步篩選。然而，3D細胞培養方式可提供數據更加接近體內組織結果，並最大限度減少來自2D細胞培養結果之誤導。工程心臟組織 (Engineered heart tissues, EHTs) 是由人類誘導型多功能幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 分化的心肌細胞製造而成。我們發現人類心肌和 EHTs 都會以相似的速率自發性跳動。於本篇中將介紹如何使用這個3D模型來分析藥物處理下，對於組織中鈣離子的變化，藉此篩選出可能引起不良副作用的藥物。當作動電位轉移至細胞膜上，膜將會進行去極化 (-80mV)，去極化結果會導致電位的改變使離子通道被打開，鈣離子湧入細胞內，進一步引發鈣離子由內部肌漿網狀結構 (Sarcoplasmic Reticulum, SR) 迅速釋放。鈣離子增加會進一步活化鈣離子依賴性收縮蛋白作用。

BMG CLARIOstar<sup>plus</sup> 全功能盤式判讀儀可偵測短時間內快速的變化，每秒讀取100個數據 (相當於每0.01秒可讀取一個數據點)。鈣離子染劑 Fluo-4 可用於標記細胞質中鈣離子，可偵測鈣離子短時間內的變化。

## 材料方法

CLARIOstar<sup>plus</sup> 全功能盤式判讀儀

Fluo-4 (Life Technologies)

3D tissue culture micro chamber or plates, MC-8TM or MC-96TM respectively (InvivoSciences)

**使用 CLARIOstar<sup>plus</sup> 進行鈣指示劑測量**

使用市售染劑分析鈣離子變化 (Fluo-4-AM, Life Technologies)。將組織浸泡在含有 Fluo-4-AM (15  $\mu$ M) 及 Pluronic F127 Tyrodes 溶液於37 °C 環境中45到60分鐘。經顯微鏡觀察確定樣本染色，即以 Tyrodes 溶液替換並於37 °C 培養20分鐘，樣本完成準備後以 CLARIOstar<sup>plus</sup> 進行研究(儀器設定見下方)，同樣的方式於可使用2D培養實驗中追蹤鈣離子的變化。

## CLARIOstar<sup>plus</sup> 儀器設定：

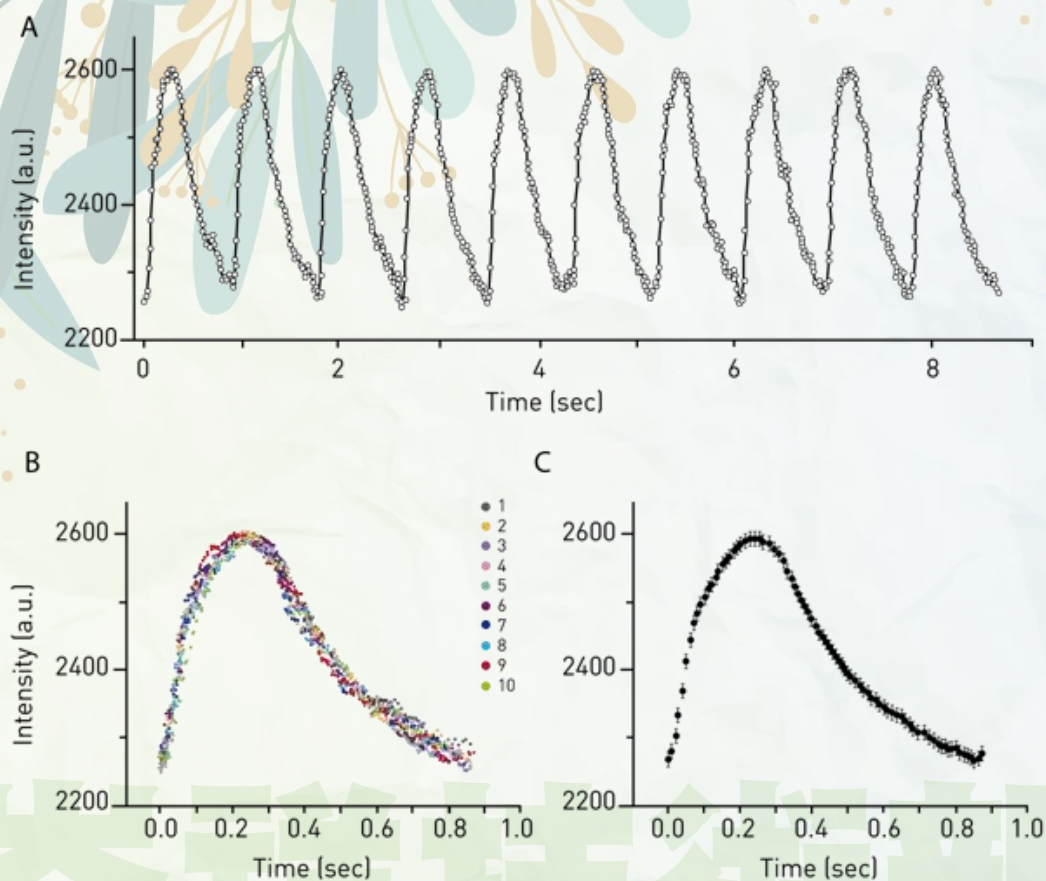
測定方法	Fluorescence Intensity, Well Mode
Monochromator :	激發光 (Ex) : 483-14 及 散射光 (Em) : 530-30
讀取模式 :	Bottom Reading
Gain :	1750
對焦高度 :	2.0 mm
目標溫度 :	37°C

## 動力學設定：

間格數 :	1000
每個間隔的閃光次數 :	1
間隔時間 :	0.01 秒
每孔時間總測量值 :	10 秒

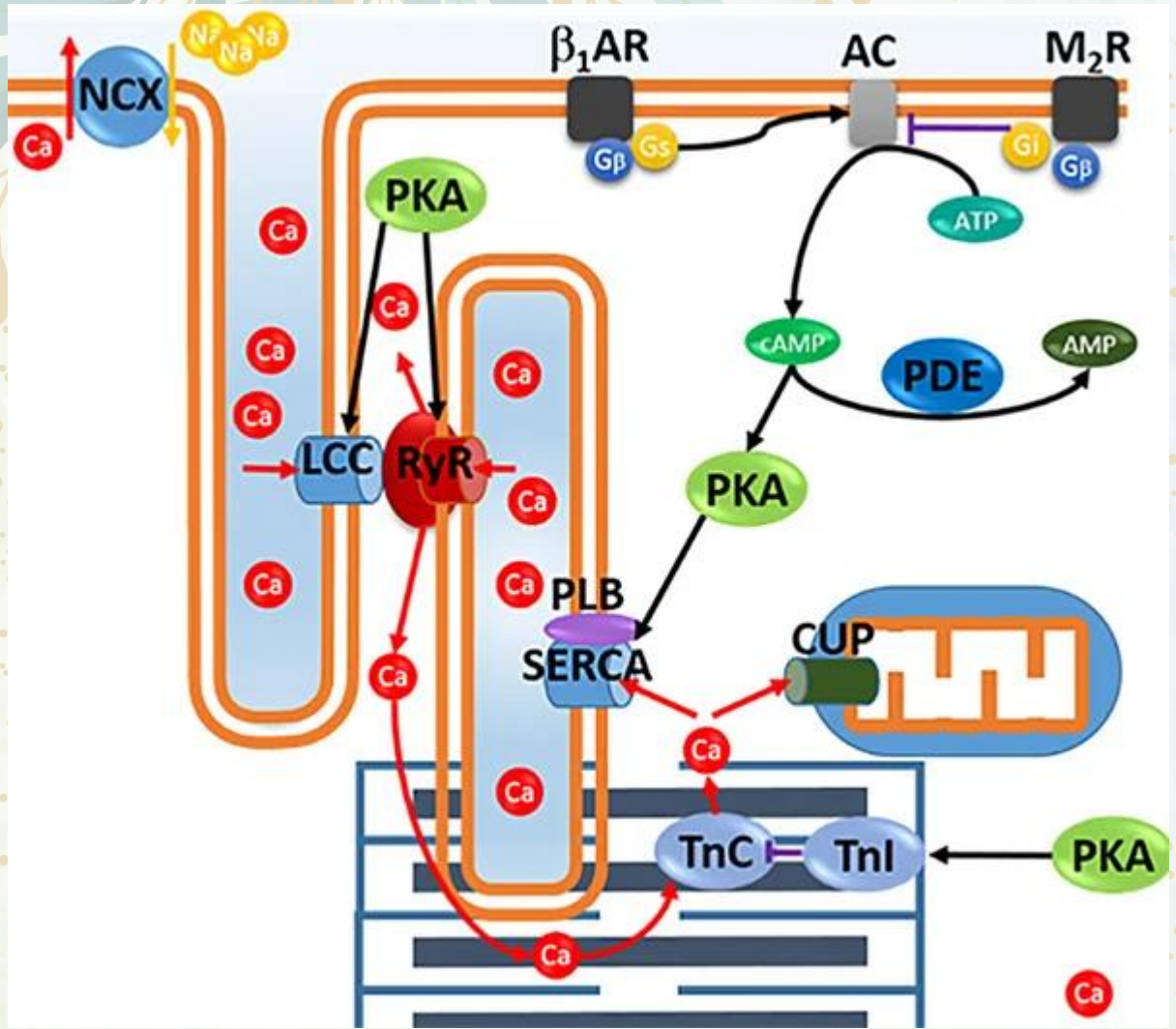
## 結果與討論：

由鈣離子染劑的實驗結果可以看出螢光強度的週期性變化很明顯(圖一A)。數據經由平均數或者快速傅立葉變換 (Fast Fourier Transfer, FFT) 分析，鈣離子變化數值(於十次或者更多次)重疊圖鈣離子變化曲線(圖一B)，與人類心肌有相似的結果(圖一C)。



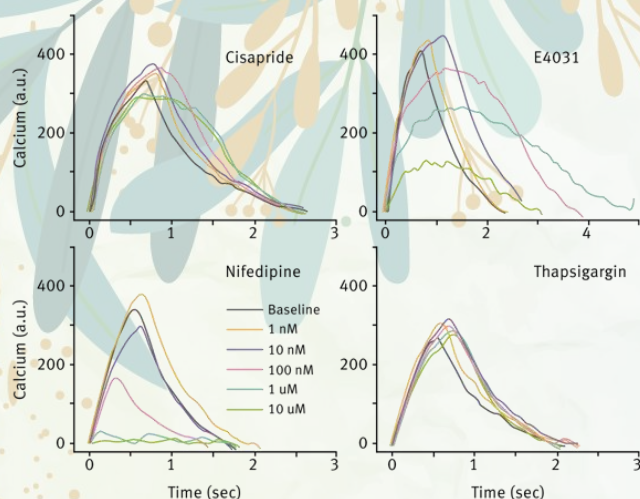
圖一 使用iPSC所衍生出的3D心臟組織及Fluo-4鈣離子螢光染劑測量鈣離子的瞬間變化。(A) CLARIOstar<sup>plus</sup> 盤式判讀儀偵測鈣離子瞬間變化週期，藉由鈣離子變化影響心臟收縮。(B)10次鈣離子瞬間變化疊圖，每一個為單次心臟跳動。(C)鈣離子短時間內的變化平均分布 (bar=標準誤差)。

當EHTs分別以多種類型的藥物處理後，鈣離子會產生明顯的變化，進一步產生興奮收縮聯合作用 (excitation contraction coupling, ECC)，鈣離子作為第二訊息傳遞者 (second messenger)，藉由鈣離子濃度調節心臟收縮 (圖二)。



圖二 EC-coupling & regulation. LCC: L-type Ca channel, RyR: Ryanodine receptor NCX: Na-Ca exchanger, PDE: Phosphodiesterase III, PKA: Protein kinase A, TnC/I: Troponin C/I, SERCA: SR Ca pump, PLP: Phospholamban,  $\beta_1$ AR: beta adrenergic receptor, AC: Adenylyl cyclase, M2R: M2 Receptor, CUP Ca uniporter.

於不同濃度的 Cisapride 及 Thapsigargin，兩藥物被認為不會影響鈣離子變化，有相似的鈣離子變化特性；以兩個已知會影響鈣離子濃度藥物 (E4031 and Nifedipine)，則呈現出明顯的離子濃度依賴性於鈣變化圖型中(圖三)。



**圖三 鈣離子短時間變化曲線(Calcium Transient Profiles)。**人類 EHTs分別以不同濃度 Cisapride, E4031, Nifedipine, Thapsigargin 處理。

部分數據指出，有些從市場上撤回的藥物改變人類的 EHTs 內鈣離子傳遞，長期進行治療下，可能會導致心律不整或者心肌明顯纖維化。結果顯示於早期藥物篩選中，使用人類 EHTs 進行興奮收縮聯合作用 (ECC) 分析可用來預測藥物潛在性安全問題。

## 結論：

利用 EHTs 來自各種不同個體對於毒物或藥物的敏感性的特性，未來將可能成為重要的工具，用於開發更安全、更加有效個人化治療。CLARIOstar<sup>plus</sup> 全功能盤式判讀儀能夠在一秒內讀取100筆數據。能夠在極短時間的動力學反應中，實時偵測在藥物刺激下引發興奮收縮聯合作用 (ECC)。

原廠文章：[Real-time calcium flux measurements in iPSC derived 3D heart tissue \(2014\)](#)