

用 Fura-2 测定突触体内游离 Ca^{2+} 浓度 及 Ca^{2+} 通道激动剂和阻断剂的影响

高 红 冯亦璞

(中国医学科学院药物研究所,北京 100050)

提要 用 Fura-2 测定大鼠突触体内游离 Ca^{2+} 浓度,探讨 Ca^{2+} 通道激动剂和阻断剂对突触体内钙浓度的影响。测得突触体内 Ca^{2+} 浓度为 200~400 nmol/L。观察了不同浓度 KCl, CaCl_2 , NMDA 和谷氨酸对突触体内 Ca^{2+} 增加的影响以及维拉帕米及 MgCl_2 对 KCl 和 NMDA 引起钙内流的阻断作用。本实验提供一个研究突触体内 Ca^{2+} 变化的准确而稳定的方法,并对测定中几个影响因素加以讨论。

关键词 新型钙离子荧光指示剂(Fura-2); 突触体; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA); 钙通道激动剂; 钙通道阻断剂

突触是神经细胞活动的重要部位,参与各种神经细胞的生理、病理活动。突触体膜上仍具有电位依赖性钙离子通道和受体门控性离子通道。近年来,很多学者通过研究突触体内游离钙离子浓度变化来研究神经系统的各种生理及病理机制^(1,2)。用 Fura-2 测定突触体内钙离子浓度,可较好地反应突触体内、外钙离子的动态变化。本文通过 Fura-2 检测大鼠突触体内游离钙离子浓度和研究钙通道激动剂和阻断剂对突触体内游离钙浓度的影响。以便进一步研究神经原的损伤机制和药物对钙离子的调节作用。

材 料 和 方 法

Wistar 大鼠♂,体重 200~300 g,购自中国医学科学院动物中心。Fura-2/AM 由药物研究所合成室提供,用 DMSO(Sigma 公司)配成 0.5 mmol/L 后,分装(10 μl /管)并存于 -20℃ 备用。维拉帕米(verapamil)及 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA)购于 Sigma 公司。其余试剂均市售分析纯。人工脑脊液(CSF)的组成(mmol/L): NaCl 132, KCl 3.0, MgSO_4 1.0, NaH_2PO_4 1.2, 葡萄糖 10.0, HEPES 10.0, CaCl_2 0.02~1.0。

突触体制备 按 MacDonald⁽³⁾法略加修改。大鼠断头后取前脑,每 g 脑组织加 0.3 mol/L 蔗糖溶液 10 ml,于玻璃匀浆器中用手匀浆 15 次,匀浆液离心(1000 r/min, 10 min),取上清液在 12000 \times g 离心 20 min。沉淀用 0.3 mol/L 蔗糖溶液 12 ml 悬浮。取 2 ml 铺在 0.8 mol/L 和 1.2 mol/L 蔗糖溶液(各 5 ml)做成的密度梯度上,共 6 管,在 150000 \times g 离心 1 h。取 0.8 和 1.2 mol/L 蔗糖液界面的悬浮带,置 0.3 mol/L 40 ml 蔗糖液中使悬浮,在 20000 \times g 离心 30 min。取沉淀加 CSF 18 ml,在 9500 \times g 离心 30 min。取沉淀加 CSF 悬浮,调蛋白浓度至 2~3 mg/ml,用 Lowry 法测蛋白⁽⁴⁾。全部操作过程均在 4℃ 条件下进行。

本文于 1992 年 9 月 25 日收到。

本课题为高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

Fura-2 负载 依 Komulainen⁽¹⁾法进行实验。样品管用 Fura-2 负载,终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$,经温孵,离心沉淀后加 CSF 液待测荧光。将样本置于双激发波长荧光光度计(Hitachi-4010)中,选 Fura-2 与 Ca^{2+} 结合和游离的激发波长 340 nm 和 380 nm(光栅 5),发射波长 500 nm,(光栅 20)。在 37°C 和搅拌条件下测荧光值。根据 Grynkiewicz⁽⁵⁾公式计算突触体内游离钙浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。所测得各数据均减去自发荧光值(即对照管的荧光值),用 40 mol/L MnCl_2 淬灭突触体外荧光。静息钙浓度的测定取自加 MnCl_2 后 30 s 时的荧光值。全部数据采用 *t* 检验。

结 果

静息状态下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 含量

在 CSF 含 CaCl_2 1 mmol/L 的条件下,突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 392 ± 94 nmol/L ($n=19$); 含 CaCl_2 0.02 mmol/L 时则 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 302 ± 57 nmol/L ($n=7$); 在零钙含 1 mmol/L EGTA 的 CSF 中, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 165 ± 24 nmol/L ($n=6$),突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 随外钙浓度增加而升高。

不同浓度 KCl 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

图 2 显示在含 CaCl_2 1 mmol/L 的 CSF 液中,累积加入 KCl 10, 20, 30, 40, 50 和 60 mmol/L 后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由原水平的 438 ± 99 nmol/L 分别升至 601 ± 135 , 651 ± 141 , 655 ± 138 , 706 ± 160 , 701 ± 98 和 691 ± 181 nmol/L。在 KCl 10 mmol/L 时,即可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显上升。KCl 40 mmol/L 时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 达到最大值。加入 KCl 后 10~20 s,去极化反应达高峰,1 min 时,荧光值稳定, KCl 反应完全。图 1 为其中一次的测定情况及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化。

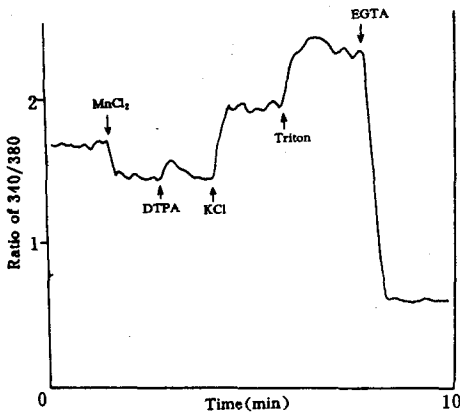


Fig 1 The temporal response of intra-synaptosome Ca^{2+} to the addition of KCl, Triton and EGTA.

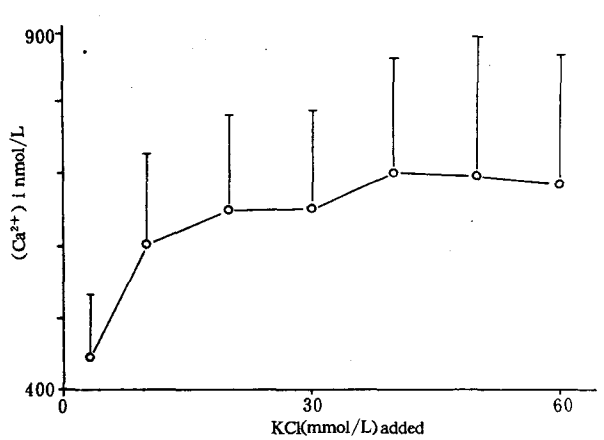


Fig 2 Effect of membrane depolarization on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in synaptosomes. Depolarizations were done by direct addition of KCl to external medium containing CaCl_2 1 mmol/L. Data are the $\bar{x} \pm s$; $n=7$.

高钾去极化状态下,不同浓度 CaCl_2 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

由图 3 可见,突触体用 60 mmol/L KCl 去极化后,逐渐升高 CSF 中 CaCl_2 浓度时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$

明显升高。 CaCl_2 浓度在 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 mmol/L 时, 可见 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由原水平的 302 ± 57 nmol/L 逐渐上升至 519 ± 76 , 605 ± 89 , 594 ± 128 , 751 ± 242 和 842 ± 239 nmol/L, 在 2.5 mmol/L 时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 仍呈上升趋势。

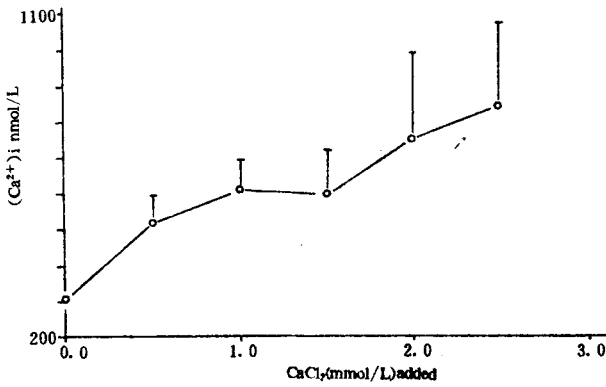


Fig 3 Effect of various concentrations of CaCl_2 in medium on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in synaptosomes depolarized by KCl 60 mmol/L. Data are the $\bar{x} \pm s$; $n=7$.

维拉帕米对去极化突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

由图 4 可见, 突触体去极化后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由 384 ± 108 nmol/L 升高至 658 ± 189 nmol/L ($n=6$, $P<0.01$), 反应 1 min 后, 加入维拉帕米 50, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 相应减少至 606 ± 203 nmol/L, 559 ± 155 nmol/L 和 512 ± 68 nmol/L. 经统计处理, 维拉帕米 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 有明显阻断 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高作用 ($P<0.05$). 但不能降至静息水平。

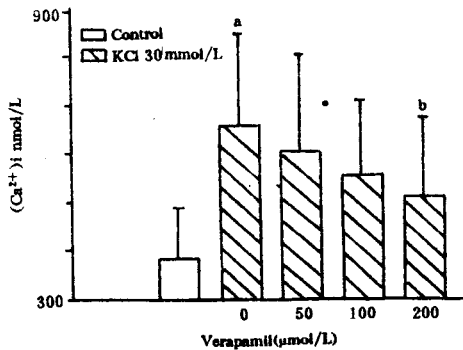


Fig 4 Effect of verapamil on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in depolarized synaptosomes. Data are the $\bar{x} \pm s$; $n=6$. a. $P<0.01$ as compared with control; b. $P<0.05$ as compared with KCl added.

NMDA 受体激动剂和阻断剂对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

NMDA 100 $\mu\text{mol/L}$ 可使突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由 356 ± 31 nmol/L 升至 542 ± 96 nmol/L ($n=6$, $P<0.01$). 当加入 NMDA 受体通道阻断剂 MgCl_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 时, 则可明显影响 NMDA 的效

应, $[Ca^{2+}]_i$ 降至 423 ± 70 nmol/L ($P < 0.01$)。而 $MgCl_2$ (200 μ mol/L) 对由 KCl 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高则无影响(图 5)。

由图 6 可见, 在突触体悬液中含零钙时, 谷氨酸 10 μ mol/L 和 $CaCl_2$ 0.5 mmol/L 同时加入时, 可使突触体静息 $[Ca^{2+}]_i$ 水平从 165 ± 24 nmol/L 升高至 529 ± 154 nmol/L。而只含 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 的悬液中, $[Ca^{2+}]_i$ 升高至 309 ± 66 nmol/L。谷氨酸对突触体内钙的净升高为 220 ± 105 nmol/L, 二者相比, 差异显著 ($P < 0.02$, $n=6$)。

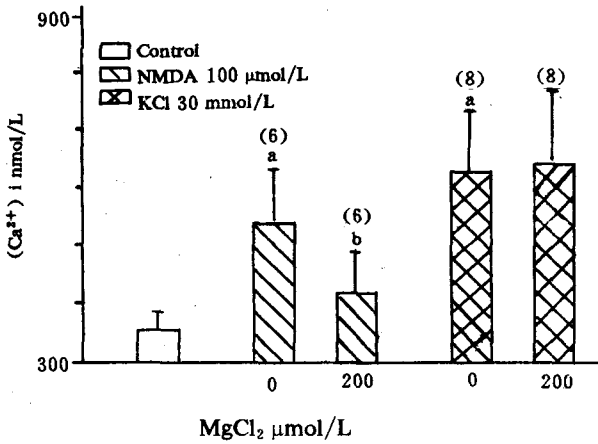


Fig 5 Effect of NMDA and KCl on $[Ca^{2+}]_i$ in the absence or presence of $MgCl_2$ in CSF medium containing $CaCl_2$ 1 mmol/L. $MgCl_2$ was added after NMDA and KCl. Data are the $\bar{x} \pm s$; a. $P < 0.01$ compared with control. b. $P < 0.01$ compared with NMDA added.

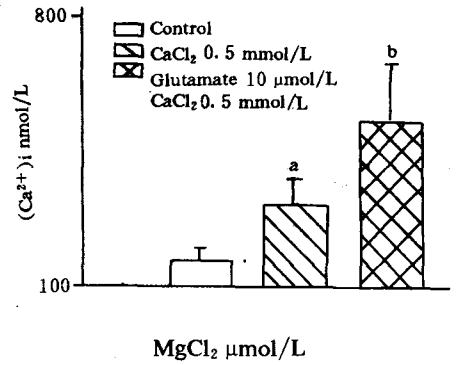


Fig 6 Effect of glutamate on $[Ca^{2+}]_i$ in synaptosomes. Data are the $\bar{x} \pm s$, $n=6$. a. $P < 0.001$ compared with control (free calcium); b. $P < 0.02$ as compared with $[Ca^{2+}]_i$ in $CaCl_2$ 0.5 mmol/L medium.

讨 论

突触体作为一种孤立的神经末梢, 象一般细胞一样, 有完整的膜, 内含各种细胞器和胞浆。膜上有 Ca^{2+} 离子通道, 对突触体内外 Ca^{2+} 的平衡起调节作用。故经常通过研究突触体内 Ca^{2+} 变化探讨神经系统的生理、病理机制。

本实验采用 Fura-2 为荧光指示剂, 测得突触体内游离钙浓度的范围为 200~400 nmol/L, 这与文献报道一致, 该浓度与突触体悬液中的 $CaCl_2$ 浓度有关。当悬液为零钙时, 测得内钙浓度较低, 外液中 $CaCl_2$ 浓度高时, 突触体内钙也较高。这可能由于突触体膜不象细胞膜那样有很好的调节功能。因为突触体内没有核糖体, 合成能力低, 调节和适应周围环境的能力受到限制。所以, 当悬液中 $CaCl_2$ 浓度改变时, 突触体内钙浓度也有相应的变化⁽²⁾。

当悬液中 $CaCl_2$ 浓度增加至 2~2.5 mmol/L 时, KCl 60 mmol/L 引起去极化的突触体 $[Ca^{2+}]_i$ 仍有升高趋势, 这可能一方面由于 Ca^{2+} 通道开放引起, 另一方面由于内、外的 Ca^{2+} 浓度差突然增高产生的刺激, 引起 Ca^{2+} 进入突触体⁽⁶⁾。

突触体膜上具有电位依赖性和受体门控性钙离子通道。突触体膜对 KCl 的去极化有高度敏感性。这是通过电位依赖性 Ca^{2+} 通道开启而使内钙增加。钙拮抗剂维拉帕米能抑制这一作用。而 NMDA 可通过突触体膜上受体门控的钙离子通道开放,引起钙内流,谷氨酸有同样效果。NMDA 受体通道阻断剂 MgCl_2 则可抑制 NMDA 的这一作用,但不能抑制 KCl 对突触体 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的作用,说明本法可用于研究不同激动剂或拮抗剂对 Ca^{2+} 通道的影响。

突触体功能好坏是实验成功的关键。而用本法提取的突触体,可得到很好的结果。实验应在突触体提取完毕后 3 h 内完成。一般负载时,蛋白浓度以 2~3 mg/ml 为好。测定时,其自发荧光占负载突触体最大荧光值 10% 以下时,可获得良好的反应和准确的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

由于 Fura-2 容易漏出突触体,本实验采用 40 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 淬灭突触体悬液中荧光,加入 MnCl_2 后 30~40 s 的荧光值为静息状态下的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。此后 5 min 内,荧光值可保持平稳。如不用 MnCl_2 淬灭突触体外荧光,所得突触体内钙浓度较高。在 Triton 破膜同时,加入重金属络合剂 DTPA 1 mmol/L,这样可使 DTPA 与 Mn^{2+} 络合,以致不影响最大荧光值。EGTA 用饱和 Tris 配制,目的是在反应时,pH 能达到 8.0 以上,使 EGTA 与 Ca^{2+} 的络合反应充分完成。因此,可获得快速的、最低的荧光值。另外,由于用二个波长荧光值之比,减少了由于突触体在测量中聚集引起的荧光值的减少。

参 考 文 献

- 1 Komulainen H and Bondy SC. The estimation of free calcium within synaptosomes and mitochondria with Fura-2; comparison to Quin-2. *Neurochem Int* 1987;10:55.
- 2 Martinez A, et al. Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes. *Neurosci Lett* 1988;88:336.
- 3 MacDonald WF and White TD. Nature of extrasynaptosomal accumulation of endogenous adenosine evoked by K^+ and veratridine. *J Neurochem* 1985;45:791.
- 4 Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265.
- 5 Grynkiewicz G, et al. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440.
- 6 Tsien RY, et al. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982;94:325.

ESTIMATION OF FREE CALCIUM LEVEL WITHIN SYNAPTOSOMES BY USING FURA—2 AND THE EFFECT OF CALCIUM CHANNEL AGONIST AND ANTAGONIST

H Gao and YP Feng

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Beijing 100050*)

ABSTRACT The cytosolic free calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ in synaptosomes was determined with the fluorescent indicator fura—2, the effects of calcium channel agonist and antagonist on intracellular Ca^{2+} level were studied. The cytosolic ionized calcium concentrations in resting status were between 200 nmol/L and 400 nmol/L. Cytosolic Ca^{2+} was elevated following increases in Ca^{2+} concentration in the medium, plasma membrane depolarizations induced by KCl, and the addition of glutamate and NMDA. On the other hand, the increase of cytosolic Ca^{2+} induced by KCl was decreased by verapamil and that induced by NMDA was decreased by $MgCl_2$.

A few critical problems in $[Ca^{2+}]_i$ detection were also discussed.

Key words Fura-2; Synaptosome; *N*-methyl-*D*-aspartate(NMDA); Calcium channel agonist; Calcium channel antagonist