

# 应用 Fura-2/AM 检测分离的神经细胞内游离钙及其变化

李明 王峻峰\* 韩济生\* 张均田

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050; \*北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083)

**提要** 本文以酶法制备新生大鼠脑细胞悬液, 运用近年来发展起来的 Fura-2 技术, 检测此神经细胞内游离钙(以下简称为  $[Ca^{2+}]_i$ ) 及其变化。结果表明: 在静息状态下, 其  $[Ca^{2+}]_i$  为  $240 \pm 5$  nmol/L。高钾去极化可使  $[Ca^{2+}]_i$  成倍增加。钙拮抗剂 verapamil 和 nifedipine 能阻断高钾升高  $[Ca^{2+}]_i$  的作用。实验结果证明了所制备的神经细胞悬液的可用性及建立的 Fura-2 测定  $[Ca^{2+}]_i$  方法的可靠性。

**关键词** 新型钙离子荧光指示剂 (Fura-2); 脑细胞; 钙离子; 钙拮抗剂

Fura-2 是近年来发展起来的新一代钙离子荧光指示剂, 与 Quin-2 相比, 它具有荧光强度高, 对钙离子选择性好, 测量灵敏准确等优点, 因此已成为研究钙离子在生命科学中生理、生化功能的最常用技术之一<sup>(1,2)</sup>。目前, Fura-2 已可用于细胞悬液、培养细胞、完整组织及单个细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的测定。但在神经系统研究方面, 文献中多应用的突触体和培养神经细胞。由于突触体毕竟不同于完整的活细胞, 经传代培养的神经细胞特性也不可能等同于正常脑细胞, 故难臻理想程度。本文以酶法制备新生大鼠的脑细胞悬液, 成功地运用 Fura-2 技术测定其  $[Ca^{2+}]_i$ , 并进一步观察高钾去极化引起的神经细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的变化及几种钙拮抗剂的阻断作用, 同时探讨了 Fura-2 应用于神经细胞悬液时的一些技术问题。

## 材 料 和 方 法

### 一. 药品及试剂

Fura-2/AM: 中国医学科学院药物研究所产品, 熔点:  $52 \sim 54$  °C, 分子量: 1001。用 DMSO 溶解成 1 mmol/L 贮备液, 分装后置  $-20$  °C 避光保存。胰蛋白酶, DMSO, verapamil 均购自 Sigma 公司。Nifedipine 系德国拜耳药厂惠赠。其它试剂均为市售分析纯。

### 二. 细胞悬液的制备

参考 Dildy 及 Leslie<sup>(3)</sup> 的方法, 取新生 1 ~ 2 d Wistar 大鼠乳鼠, 剥离全脑, 立即置于冰 Hank 氏液 (mmol/L: NaCl 137; KCl 5.0;  $CaCl_2$  1.3;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.8;  $Na_2HPO_4$  0.6;  $KH_2PO_4$  0.4;  $NaHCO_3$  3.0; Glucose 5.6; pH 7.4) 中, 仔细剥离、剔除软脑膜及血管, 用 Hank 氏液冲洗 3 ~ 4 次, 剪碎后, 置于一定量的 0.125% 胰蛋白酶中, 于  $37$  °C, 轻轻搅拌 20 min。以冰 DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清) 中止消化。过 200 目筛网, 滤液以 1000 r/min 离心 5 min, 再以 Hank 氏液洗一次。最后用 DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清) 制

备成  $2 \times 10^6$  个/ml 细胞悬液。台盼兰排斥试验检查, 细胞成活率达 95% 以上。

### 三. Fura-2 负载及荧光测定

上述细胞悬液  $37^\circ\text{C}$  预温 5 min 后, 加入 Fura-2/AM (终浓度为  $5 \mu\text{mol/L}$ ),  $37^\circ\text{C}$  恒温振荡 45 min。负载后的细胞以含 0.2% 牛血清白蛋白的 Hank 氏液洗二次。最后调整细胞悬液为  $2 \times 10^6$  个细胞/ml。测定前细胞预先于  $37^\circ\text{C}$  复温约 2~3 min。

荧光测定采用日立 RF-510 型荧光分光光度计。测定条件: 激发光光栅 5 nm, 发射光光栅 10 nm, 以 300~420 nm 扫描激发光谱 (若峰值在 340 nm, 表明 Fura-2 已负载入胞内), 然后固定激发波长在高峰波长, 观察不同实验条件下荧光强度的变化。由下式计算出  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

其中,  $K_d$  为 Fura-2 与  $\text{Ca}^{2+}$  反应的解离常数, 为  $224 \text{ nmol/L}^{(1)}$ ;  $F$  为不同实验条件下的荧光强度;  $F_{\max}$  为最大荧光值, 由加入 Triton X-100 (终浓度为 0.1%) 测得;  $F_{\min}$  为最小荧光值, 由加入 EGTA (终浓度至少高于  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 2~3 倍,  $\text{pH} > 8.5$ ) 测得。在计算前, 对细胞自发荧光的影响进行校正, 即式中  $F, F_{\max}, F_{\min}$  取分别减去未负载 Fura-2 细胞的  $F, F_{\max}, F_{\min}$  后的值进行计算。

## 结 果

### 一. Fura-2 负载

在  $37^\circ\text{C}$ , Fura-2/AM 终浓度为  $5 \mu\text{mol/L}$  的条件下, 负载不同时间后测定负载细胞在 340 nm 激发波长处荧光强度, 发现 40~50 min 后达到最好负载效果, 继续延长负载时间, 荧光强度不再增加 (见图 1), 提示神经细胞负载时间以 40~50 min 为宜。

负载后细胞内 Fura-2 漏出率, 通过观察在细胞悬液中加入  $40 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{MnCl}_2$  前后 340 nm 处荧光强度的变化而检测<sup>(4)</sup>。发现: 在室温下, 神经细胞 Fura-2 漏出较少, 30 min 内漏出不超过 5%; 随时间延长, 漏出逐渐增加, 到 2 h, 漏出达 15% (见图 2)。因此, 实验中

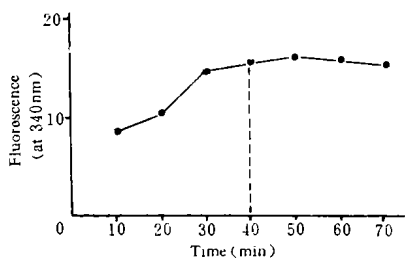


Fig 1. Time response effect of loading of Fura-2/AM ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) in dissociated brain cells. Points represent the mean of two separate experiments. Ordinate: reading of fluorescence measured at 340 nm.

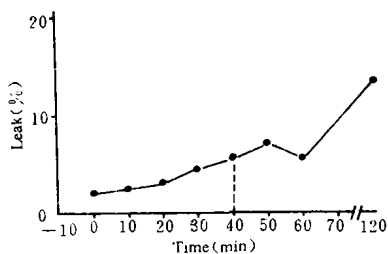


Fig 2. Leak of Fura-2 from loaded brain cells. Points represent the mean of two separate experiments.

荧光测定一般控制在 30 min 内完成。

图 3 显示在  $1.3 \text{ mmol/L}$  外  $\text{Ca}^{2+}$  情况下, 负载细胞的激发光谱。可见激发光谱峰值在 340 nm, 说明酯酶对 Fura-2/AM 水解良好。加入 Triton X-100 (终浓度 0.1%), 镜下观察可见细胞全部破碎, 这时 Fura-2 释放到高钙的间液之中, 使 340 nm 处荧光值大大增

加。加入 EGTA (终浓度为  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的 3 倍,  $\text{pH} > 8.5$ ) 后, 激发光谱发生明显变化, 340 nm 处荧光值降低。

## 二. 静息状态下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

在细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  为 1.3 mmol/L 情况下, 应用本法分离的神经细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  为  $240 \pm 5$  nmol/L ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ,  $n = 67$ ), 与文献报道接近<sup>(3,5)</sup>。

## 三. 高钾去极化状况下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化及钙拮抗剂的阻断作用

图 4 显示在细胞外钙为 1.3 mmol/L 时, 高钾去极化引起的负载细胞荧光强度变化。加入 50 mmol/L KCl 可使  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  平均增加  $305 \pm 27$  nmol/L ( $n = 17$ ), 而 25 mmol/L KCl 致  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的增加仅为 50 mmol/L KCl 的 25%。在无细胞外钙的条件下 (负载细胞以无钙 Hank 氏液悬浮, 并加入 1 mmol/L EGTA), 50 mmol/L KCl 致  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加作用消失, 说明高钾系通过打开电压依赖性钙通道, 使  $\text{Ca}^{2+}$  内流增加。

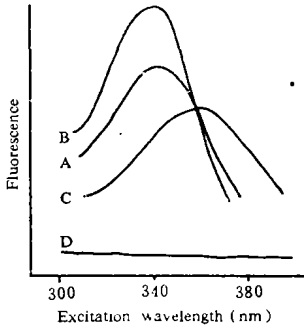


Fig 3. Excitation spectra of Fura-2 loaded brain cells. A: measured in 1.3 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ -containing Hank's solution; B and C: after the addition of Triton X-100 and EGTA respectively. D: Autofluorescence of the brain cells.

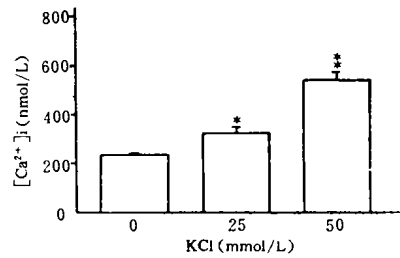


Fig 4. The effect of KCl on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in dissociated brain cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  as compared with the resting  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

在加入 KCl 前 5 min, 预先加入一定浓度的钙拮抗剂 nifedipine 和 verapamil, 能阻断 50 mmol/L KCl 引起的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加, 并呈一定的剂量反应关系 (见图 5)。nifedipine 和 verapamil 本身对静息状态下  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  没有显著影响。

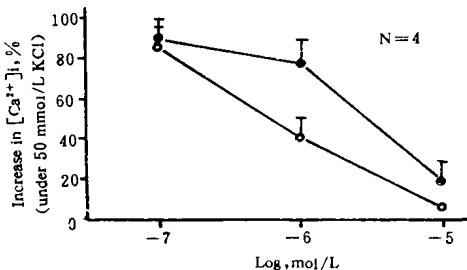


Fig 5. The inhibitory effect of verapamil and nifedipine on the increment of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by 50 mmol/L KCl.

## 讨 论

本文采用胰蛋白酶消化法制备新生大鼠脑细胞, 方法简便易行, 且所用胰蛋白酶浓度低 (0.125%), 一般对细胞无明显损伤作用。分离出的细胞经台盼兰排斥试验检查, 成活率达 95% 以上, 并且在实验过程中一直保持存活。用此神经细胞悬液, 我们运用近年来发展

起来的 Fura-2 技术测定了其  $[Ca^{2+}]_i$ , 结果与文献报道在培养细胞株上所得的结果一致。

一般认为, 高钾能打开神经细胞膜上电压依赖性钙通道, 引起细胞外钙内流, 导致  $[Ca^{2+}]_i$  升高。在分离的神经细胞, 我们用 Fura-2 检测出这种动态变化。加入电压依赖性钙通道阻断剂 nifedipine 和 verapamil, 则能够阻断高钾引起的  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 从而证实了高钾致  $[Ca^{2+}]_i$  升高是细胞外钙通过电压依赖性钙通道内流的结果这一学说<sup>(6)</sup>。另外, 我们还观察了八肽胆囊收缩素、血管紧张素 II、烟碱等致分离的神经细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的变化(待发表资料)。以上结果都证明了我们制备的神经细胞悬液的可用性及建立的 Fura-2 测定  $[Ca^{2+}]_i$  方法的可靠性。

需要强调指出的是: 对于细胞悬液, 测定中记录的荧光信号是激发光光道内所有细胞信号的总和, 最后求得的  $[Ca^{2+}]_i$  只是一个平均值。死亡的细胞(其  $[Ca^{2+}]_i$  大大增加)或细胞分散不好, 会对测定结果造成很大误差。细胞功能不佳, 则会导致对刺激剂如高钾等的反应减弱甚至消失。因此, 制备高质量的细胞悬液是实验成功的关键。

实验过程中遇到的另一问题是负载后细胞内 Fura-2 的漏出。尤其是在细胞悬液情况下, 漏出到间液中的 Fura-2 会使细胞外背景荧光大幅度增加, 从而造成测量误差。文献报道<sup>(7)</sup>, Fura-2 的漏出也可发生在未受损伤的完整细胞, 其机制可能是通过细胞膜上亲水阴离子通道外排, 用阴离子转运抑制剂 probenecid 等可减少 Fura-2 外排。研究还表明: 尽管绝大多数细胞都有漏出, 但不同种类细胞漏出率有很大差别<sup>(1)</sup>。我们用酶法分离的神经细胞, Fura-2 漏出较少, 在 30 min 之内, 漏出不超过 5% (见前)。另外, Fura-2 漏出与温度有很大关系, 在 20~25℃ 室温下, 漏出一般不超过 10%/h, 在 30℃ 以上, 漏出速度明显增加。但在实验中, 要保持细胞对高钾等刺激剂发生反应, 必须在 37℃ 条件下。因此, 以我们的经验, 建议将细胞分管置于室温下, 临测前再逐一于 37℃ 复温 3~5 min, 并尽量将测量时间控制在 30 min 之内。

## 参 考 文 献

1. Gryniewicz G. et al. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; **260**:3440.
2. Cobbold PH. et al. Fluorescence and bioluminescence measurement of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Biochem J* 1987; **248**:313.
3. Dildy JE and Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increase in free intracellular  $Ca^{2+}$  in dissociated brain cells. *Brain Research* 1989; **499**:383.
4. 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.
5. Nachshen DA. Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J Physiol (Lond)* 1985; **363**:87.
6. Llinas R. et al. Presynaptic calcium currents in squid giant synapse. *Biophys J* 1981; **33**:289.
7. Divirgilio F. et al. Inhibitors of membrane transport system for organic anions block Fura-2 excretion from PC<sub>12</sub> and N<sub>2</sub>A cells. *Biochem J* 1988 **265**:959.
8. Malgaroli A. et al. Fura-2 measurement of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J cell Biol* 1987; **105**: 2145.

## MEASUREMENT OF INTRACELLULAR FREE $\text{Ca}^{2+}$ CONCENTRATION IN DISSOCIATED RAT BRAIN CELL – S USING FURA – 2/AM

M Li\*, JF Wang\*\*, JS Han\*\*, JT Zhang \*

(\*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050; \*\*Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083)

**ABSTRACT** The intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was measured in freshly dissociated brain cells prepared from neonatal rats using the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fura – 2/AM. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of resting cells was calculated to be  $240 \pm 5$  nmol/L. Depolarization with high  $\text{K}^+$  resulted in an over 100% increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, and this increase could be prevented or reversed by verapamil or nifedipine known to block voltage – sensitive Ca channels. These results suggest that the adoption of Fura – 2/AM method in freshly dissociated rat brain cells is a useful and relatively easily applicable technique for monitoring intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  changes.

**Key words** Fura – 2/AM; Brain cells;  $\text{Ca}^{2+}$ ; Calcium antagonist