维普资讯 http://www.cqvip.com

97,22(3)
191-193

第22卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.22 No.3
1997 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1997

191-286

大鼠脑突触体的制备及形态和活性研究

基础医学院药理教研室 徐蜀远* 周岐新
研究生处 黄 萌

提 要 用低浓度(0.3及0.8mol/L)蔗糖溶液为分离介质，在低离心力下制备大鼠脑突触体。以电镜观察和测定乳酸脱氢酶活性检测其结构的完整性，以高钾刺激下突触体内游离Ca^{2+}浓度和氨基酸(Asp,Glu,Gly,Tall和GABA)释放量的变化判断其生物活性。结果表明，本方法制备的突触体具有结构完整性和较强的生物活性。本实验建立了一个快速制备突触体的方法。

关键词 突触体；钙；氨基酸
中图分类号 R338.13 R329-33

突触体是脑匀浆经分离而得的神经末梢组份。由于它具有完整神经元的许多功能特征，而广泛用于生理、生化、药理与毒理学等生物医学领域的研究[1]。在这些研究中，突触体制备是实验成功的先决条件。要求设备简单，操作容易，制备过程短；所得突触体制备纯度高、活性强。人们在科研实践中，从不同工作目的以及各自的不同条件出发，本着这个愿望，在Whittaker等[2]的经典方法基础上，发展建立了许多制备突触体的方法。这些方法虽各具优点，但尚未尽如人意。或仪器条件要求高，或分离时间过长，或分离试剂昂贵，或突触体纯度和活性不够理想。我们根据自己的实验条件，以Hajos法[3]为基础并进行改良，建立了一个快速、简便、有效的突触体制备方法，并对该法所获突触体的完整性和活性进行了检验。

1 实验材料

1.1 动物 Wistar大鼠，雄性，200-250g，本校实验动物中心提供。

1.2 仪器 冷冻离心机(日本)，KUBOTA KR-20000T；可见紫外分光光度计(日本)，岛津UV-260；玻璃匀浆器。Waters484紫外可见检测器，810色谱工作站，PICLO--TAG衍生工作台。荧光分光光度计(日本)，岛津RF-540。

1.3 试剂 Quin-2AM,Aldrich chem Co.产品；Digitonin, Sigma产品。其余试剂为市售分析纯。培养液(人工脑脊液)组成(mmol/L)：NaCl 132，KCl 5，NaH_2PO_4 1.2，$MgCl_2$ 1.2，$CaCl_2$ 1.2，葡萄糖10.0，Tris 20μmol，pH7.40。

2 方法

2.1 突触体制备

取Wistar大鼠，断头，迅速取出整个大脑，尽可能除去白质，必要时用预冷的0.3mol/L蔗糖溶液冲洗。按每克脑组织加0.3mol/L蔗糖溶液10ml于玻璃匀浆器中上下磨十二次，用力均匀，制成匀浆。匀浆在1500g离心10分钟，上清液在9000g离心20分钟，沉淀即为粗突触体组份(P_2组份)。

P_2组份沉淀用2.5ml 0.3mol/L蔗糖溶液悬浮，滴加在10ml 0.8mol/L蔗糖溶液液面上，在9000g离心25分钟。弃去0.3mol/L蔗糖溶液相及0.3与0.8mol/L蔗糖溶液界面带，吸取0.8mol/L蔗糖溶液相。在不少于5分钟时间内，缓缓滴加等体积的预冷培养液，在20000g离心10分钟，沉淀即为突触体。用考马斯亮蓝法[4]测定突触体蛋白浓度，并调至10mg蛋白/ml。冰浴10～15分钟待用。

整个制备过程应在0～4℃进行。

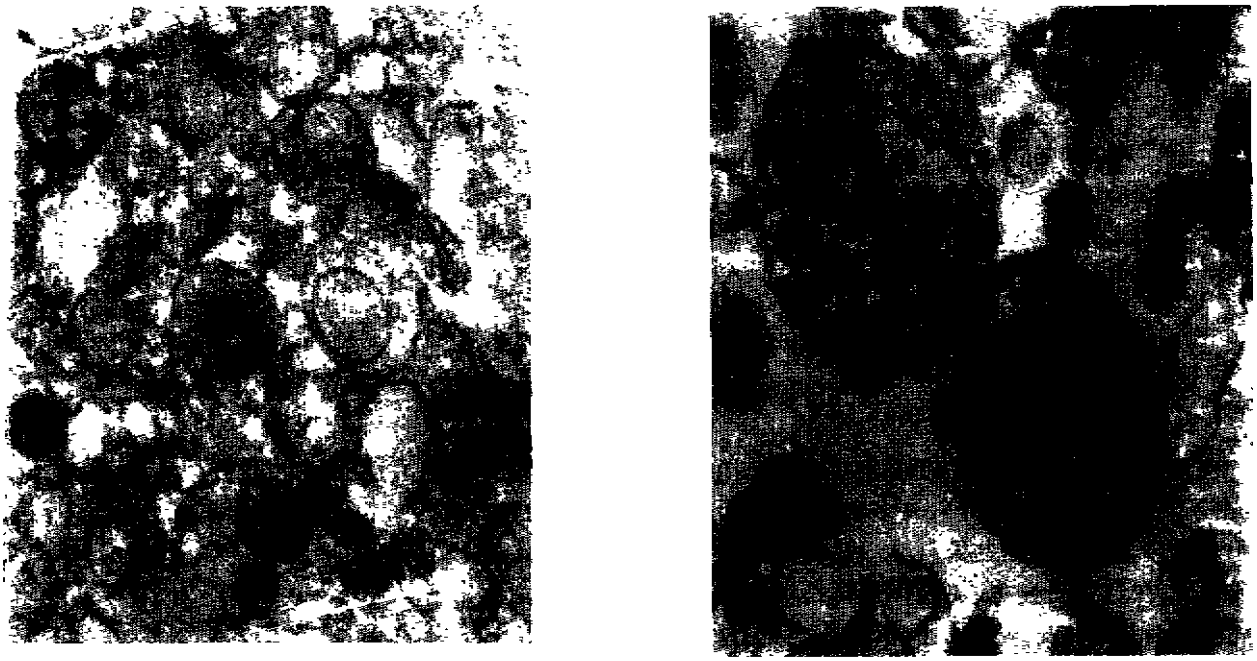
2.2 突触体完整性研究

2.2.1 电镜观察

冰浴待用的突触体用培养液稀释为1mg蛋白/ml，取300μl在9000g离心10分钟，倾弃上清液。沉淀用4%戊二醛前固定，用1%四氧化锇后固定，常规电镜样品包埋和超薄切片，醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色，H-600透射电镜观察。

* 男，1958-12出生，主管药师(现在自贡市三医院工作)

维普资讯 http://www.cqvip.com



a (×300) b (×5000)

图 突触体电镜观察

2.2.2 乳酸脱氢酶活性测定

突触体悬液(1mg蛋白/ml)在37°C温育60分钟。温育前、后取悬液各两份，一份作为静息突触体制备;一份加入50mmol/L KCl.作为去极突触体制备。分别取悬液10μl，加Triton×-100(5%v/v)10μl;另取悬液在9000g离心10分钟后的上清液10μl;加双蒸水10μl。用比色法[6]测定乳酸脱氢酶活性(以单位/mg蛋白表示)。

2.3 突触体活性测定

突触体活性以不同条件下突触体内钙浓度变化及氨基酸释放量变化为指标。突触体内钙浓度以Quin-2AM为指示剂，按Ashely法[8]进行测定。氨基酸测定步骤为:取在37°C温育60分钟的突触体悬液(1mg蛋白/ml)两份，一份作静息，一份加入50mmol/L KCl.悬液分别在9000g通过硅油层离心10分钟[8]，取上清液按文献[7]方法测定Asp,Glu,Gly,Tau和GABA。

3 结果

电镜观察结果见图。结果表明，本实验所获突触体具有膜包围的连续椭圆形结构。其中可见线粒体和小泡，有时可见带有突触后膜，具有突触体的典型结构特征[2]。图a还表明，突触体含量也较高。但由于标本固定及切片制作过程中的损伤，部分突触体出现空泡。

乳酸脱氢酶活性测定结果见表1。在各种条件下，悬液中总的乳酸脱氢酶活性与上清液中活性维持在约4:1不变。

表1 不同条件下突触体内外乳酸脱氢酶活性比较(单位/mg蛋白，$\bar{x}\pm s$)

	温育前	温育后	
		静 息	KCl(50mmol/L)
悬 液	20.35(n=2)	20.16±1.1(n=7)	19.3±1.4(n=7)
上清液	5.7±1.0(n=4)	5.74±1.5(n=7)	5.6±1.6(n=7)

n:样本数(下同) 上清液与悬液比较$P<0.005$

突触体内Ca^{2+}测定结果($\bar{x}\pm s$)，静息与50mmol/L KCl刺激下分别为155.2±90.3(n=12)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 静息和KCl(50mmol/L)刺激条件下突触体内氨基酸释放量的比较

	氨基酸释放量(nmol/mg蛋白)($\bar{x}\pm s, n=5$)				
	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
静息	1.02±0.26	5.89±0.66	3.12±0.45	9.66±1.47	1.36±0.14
高钾	6.4±1.38**	9.92±2.11*	4.45±1.07	10.2±1.18	2.7±0.51

与静息比较 *:$P<0.05$, **:$P<0.01$

和443.0±123.0($n=10$)nmol/L。高钾刺激引起内Ca^{2+}显著增高($P<0.01$)。

突触体氨基酸释放量测定结果见表2。

4 讨论

乳酸脱氢酶存在于胞液中，处于封闭状态。当突触体受到损伤，膜的完整性有破坏时，乳酸脱氢酶向外泄漏。在本实验各条件下，突触体悬液中乳酸脱氢酶活性远远高于上清液中活性，且维持在一定的比例不变，提示本实验制备的突触体形态上是完整的，具有膜结构的连续性。在高钾刺激下，突触内游离钙浓度和Asp、Glu两种氨基酸释放量均比静息状态显著增加，其余三种氨基酸Gly,Tau和GABA释放量也呈增加趁势(无显著性)。这些结果表明，突触体对外K^+浓度的变化可产生如同生活神经元一样的反应，提示本实验所获突触体具有较强的代谢活性。综上所述，本实验突触体制备方法是成功的。

本实验制备突触体与Hajos法相似，只用了0.3和0.8mol/L两种较低浓度的蔗糖溶液，但以培养液(人工脑脊液)代替Hajos法中用双蒸水调高浓度(0.8mol/L)的突触体悬液至等渗。因而，减少了高浓度蔗糖溶液对突触体的损伤作用，使最后得到的突触体活性较强，纯度也较高。同时使突触体制备时间大大缩短，在1.5～2小时内即可完成。而Whittaker法[2]需4～5小时。虽然其它一些改良方法如Ficoll/Sucrose梯度离心法也有缩短时间、避免高浓度介质损伤等优点，但这些方法操作复杂，设备条件要求高(如离心力大)，且试剂昂贵。所用试剂如Ficoll还可能粘附于生物膜，对研究不利。本法所用离心力较低，降低了对设备的要求，减少了对设备的损耗。本法可获得较高的蛋白产量，每克新鲜脑组织可得到突触体蛋白8～11mg。

本实验提供了一个简单、快速而实用的突触体制备方法。

参考文献

1.Whittaker V P. J Neurocytol,1993;22:735
2.Gray F and Whittaker Vp. J Anat,1962;96:79
3.Hajos F. Brain Res,1975;93:485
4.Bradford MM. Analytical Biochemistry,1975;72:248
5.朱忠勇.乳酸脱氢酶测定，比色测定法;实用医学检验学，人民军医出版社 1992
6.Ashely RH,et al. Biochem J,1984;219:149
7.张晓萍,等.重庆医科大学学报 1995;20(3):160
8.Dagani F,et al. J Neurochem,1987;49(4):1229

(收稿日期 1996-12-09)

Preparation of synaptosomes from rat brain and studies of their morphology and activity

Xu Shuyuan, et al

Department of Pharmacology, The college of basic medical sciences

Synaptosomes were prepared with sucrose solutions of low concentration(0.3 and 0.8mol/L) at relatively low centrifugal forces. The morphology of synatosomes was investigated by electron microscope and by the determination of the activity of lactate dehydrogenase in and out of synaptosomes. The intrasynaptosomal free calcium concentrations and the release of amino acids (Asp,Glu,Gly,Tau,GABA) from them in resting and depolarised conditions were also determined in order to observe the biogical activity of the synaptosomes prepared. The results show that synaptosomes prepared by this method are intact and have a good metabolic state. The present study has established a rapid and useful method for preparing synaptosomes.

KEY WORDS Synaptosomes; Calcium;Amino acids.