维普资讯 http://www.cqvip.com

第21卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.3
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

突触体钙进入的实验条件分析及其意义

药理教研室 周岐新
中心实验室 张晓萍

提 要 本文系统地研究了影响小鼠大脑皮层细胞突触体 ^{45}Ca摄取的实验条件。发现:在前4min内，^{45}Ca摄取量与温育时间呈直线关系;突触体膜蛋白投入量以0.063～0.250mg为宜，超过0.250mg则 ^{45}Ca摄取呈下降趋势;与无钙和正常钙(1.20mmol/L)培养液相比，低钙培养液(0.6mmol/L)更有利于突触体的钙摄取，且钙拮抗剂硝吡乙甲酯在低钙(0.6mmol/L)培养液中对 ^{45}Ca进入突触体有促进作用;高钾刺激促进 ^{45}Ca摄取，但浓度以30～50mmol/L为宜;溶剂二甲亚砜(DMSO)低浓度(0.05%)有促进 ^{45}Ca摄取的作用;但乙醇和丙酮浓度在0.05～6.25%范围内则无明显影。上述实验结果为准确进行突触体钙摄取实验和测定药物对钙进入的影响提供了基础资料。

关键词 突触体; ^{45}Ca摄取
中图分类号 R338.13

突触体(synaptosome)是神经细胞末梢部分，有完整的胞浆膜、胞浆、一些酶的活性、离子通道和各种受体等[1]。近年人们以突触体制备研究神经递质释放及调节，突触顺应性变化，Na^+、K^+、Ca^{2+}等离子通道，神经细胞能量代谢及膜电位变化等[2-4]。其中在各种模拟病理情况下，突触体内游离钙浓度和钙进入量的变化常常敏感地反映了神经细胞受损情况及药物依赖性和成瘾性的形成和发展[4,5]。目前多用Fura 2-AM和Quin 2-AM荧光法测定突触体内游离钙浓度，而钙进入常用 ^{45}Ca摄取试验。后者结果受到多种条件，如培养基中Na^+、K^+浓度、pH值、温育时间及温度、能量代谢抑制剂的使用等影响[6,7]。下面就我们实验过程中发现的常被人们忽略的影响因素作一报道。

1 材料和方法

1.1 药品 ^{45}Ca为氯化钙水溶液，比活度0.94Gbq/mg(25.39mCi/mg)，放射浓度740Mbq/ml(20mCi/ml)，购自DU PONT公司;其它药品来自Sigma公司。

1.2 突触体制备 ♂性TO株小鼠，体重25～35g，断头取出整个大脑，按Hajos[8]法，略加改良，制备突触体。步骤如下:1)去白质大脑2个(约1.8g)+9ml 0.32 mol/L蔗糖溶液(以20mmol/L Tris B配制，pH=7.5)，以玻璃匀浆器上下10次获脑匀浆;2)在1000g 4℃离心匀浆液10min ;3)，上清液在9000g 离心20min获沉淀块;4)以0.32mol/L蔗糖液5ml悬浮沉淀块并把所作悬浮液小心滴加到20ml 0.8mol/L蔗糖液面上;5)9000g离心20min后，把悬浮于0.8mol/L蔗糖液中的突触体悬液取出，用20mmol/L Tris B液稀释成含蔗糖0.32mol/L的悬液;6)将悬液在17000g离心20min，获突触体沉淀块，以人造脑脊液[9]配制突触体悬液，并置冰浴中待用，以Bradford法测定突触体膜蛋白量。

1.3 突触体 ^{45}Ca摄取测试 反应管体积1ml，膜蛋白投入量一般0.25mg，^{45}Ca终浓度4.625kBq(0.125μCi)/ml，在30℃振荡水浴中温育，当反应管中K^+浓度增加时，相应减少Na^+浓度以使单价阳离子总数一致。温育毕，用Whatman GF/B滤纸在Brandel M 30-R细胞收集器上快速真空

维普资讯 http://www.cqvip.com

抽滤，并用2×5ml 0.32mol/L蔗糖液冲洗以中止反应。取下滤纸并置入含特制液闪液Hydrofluor-(National Dignostics Somerville,NJ)4ml的闪烁瓶内，测定放射强度。突触体 ^{45}Ca摄取量以nmol/·mg蛋白或nmol/mg蛋白/min表示。

2 结果

2.1 温孵时间对突触体Ca^{2+}摄取的影响 反应管膜蛋白投入量为0.25mg，温育不同时间后，抽滤，测定突触体^{45}Ca摄取量。结果如图1。显示无论在静息(5mmol/L k^{+})或高钾(70mmol/L)刺激下，突触体的^{45}Ca摄取量随温育时间延长而增加。温育第4～5min内，接近达最大摄取值。这段时间，高钾刺激状态下突触体钙摄取量为静息状态的3倍，但最大摄取量仅为静息状态的2倍。

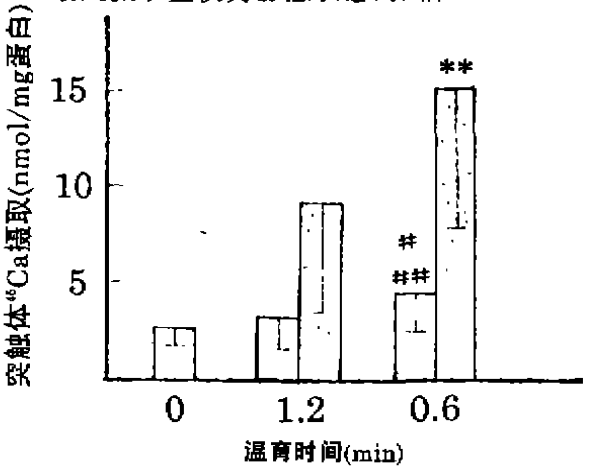


图1 温育时间对突触体 ^{45}Ca摄取的影响
静息状态(5mmol/L K^{+})，70mmol/L K^{+}刺激状态。
$n=4, \bar{x}\pm s$

2.2 突触体膜蛋白投入量对 ^{45}Ca摄取的影响 反应管温育5min，观察不同膜蛋白投入量对钙摄取的影响，结果如图2。显示无论在静息或高钾刺激下，膜蛋白投入量在0.063～0.25mg范围内 ^{45}Ca摄取最好。超过0.25mg则^{45}Ca摄取呈下降趋势。

2.3 不同高钾浓度刺激对突触体 ^{45}Ca摄取的影响 膜蛋白投入量为0.25mg，温孵时间5min，反应管中不同浓度钾刺激对突触体

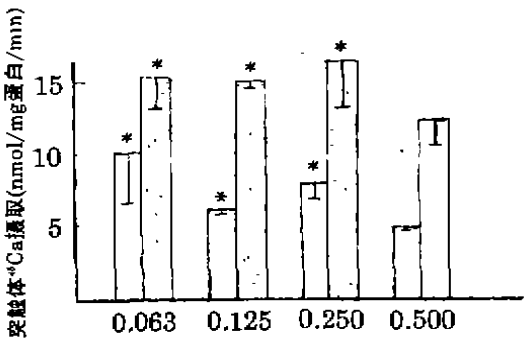


图2 突触体膜蛋白投入量对 ^{45}Ca摄取的影响
□ 静息状态，□70mmol/L K^{+}刺激状态。
* 与相应投入0.5mg膜蛋白组相比，
$P<0.05, n=4, \bar{x}\pm s$

^{45}Ca摄取影响见表1。当钾浓度达50mmol/L时，^{45}Ca摄取量已接近最大值。而摄取反应最敏感段在30～50mmol/L之间。超过50mmol/L时，每mg蛋白突触体每min ^{45}Ca摄取量下降。

表1 不同钾浓度对突触体 ^{45}Ca摄取的影响

钾浓度(mmol/L)	^{45}Ca摄取(nmol/mg)蛋白/min)($\bar{x}\pm s$)
5	3.14±1.70
10	3.41±1.64
30	7.05±4.35 *
50	9.16±5.90 *
70	10.31±6.48 *

* 与钾5 mmol/L组相比，$P<0.01$

2.4 反应管中不同钙浓度对突触体 ^{45}Ca摄取的影响 当培养基中钙离子浓度为0.6mmol/L 时，突触体对^{45}Ca摄取最好。在无钙或正常钙(1.2mmol/L)下，钙摄取均较前者为低(图3)。令人感兴趣的是，当在不同

维普资讯 http://www.cqvip.com

钙浓度下测定钙阻断剂硝吡乙甲酯对突触体 ^{45}Ca摄取的影响时，发现在无钙或正常钙(1.2mmol/L)培养基下，0.1mol/L硝吡乙甲酯抑制^{45}Ca摄取，而在0.6mol/L钙存在下则有促进^{45}Ca进入的作用(表2)。

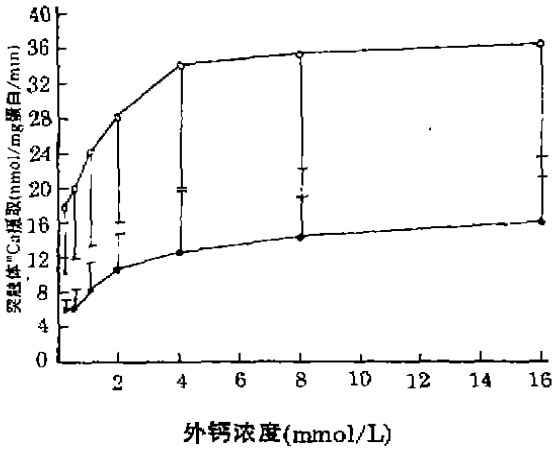


图3 培养基中外钙浓度对突触体^{45}Ca摄取的影响 □ 5mmol/L K^+，□ 50mmol/L K^+，## 与无钙组相比，$P<0.01$，# 与1.2mmol/L 钙组相比，$P<0.05$，** 与1.2mmol/L钙组相比，$P<0.01$。$n=4-8$，$\bar{x}\pm s$

2.5 **溶剂对突触体^{45}Ca摄取的影响** 在突触体钙进入的抑制和促进实验中，常用某些有机溶剂配制药品。但常用有机溶剂对突触体^{45}Ca摄取影响如何尚无系统报告。本实验发现，DMSO低浓度(0.05%)有显著促进突触体钙进入的作用，而乙醇和丙酮在0.05～6.25%范围内对 ^{45}Ca摄取无明显影响(表3)。

表3 溶剂不同浓度对 ^{45}Ca摄取的影响

组	突触体 ^{45}Ca摄取(nmol/mg蛋白/min($\bar{x}\pm s$)			
	溶剂浓度(%)			
	0.05	0.25	1.25	6.25
二甲亚砜	3.91±2.47*	2.97±1.37	2.84±1.40	2.74±1.27
乙醇	2.98±1.45	2.86±1.33	3.03±1.51	3.11±1.51
丙酮	3.14±1.56	2.90±1.32	3.14±1.40	3.01±1.62
对照组	2.60±1.51			

* 与对照组相比，$P<0.05$

3 讨论

突触体钙摄取实验已广泛作为多种疾病病理和病因研究的体外模型[4,10,11]。然而由于实验条件的设置不同，各文献报道的实验结果常有较大差异。本实验证明，温育4～5min，突触体 ^{45}Ca摄取已基本达最大值。因此温育时间最长限制在5min能较好地把摄取反应控制在敏感曲线段内(图1)。突触体膜蛋白投入量各文献报告不同，相差10倍以上[5,6,18]。究竟应加多少膜蛋白最合适尚无

表2 硝吡乙甲酯在外钙浓度不同的培养液中对突触体 ^{45}Ca摄取的影响

培养液钙浓度	突触体 ^{45}Ca摄取(nmol/mg蛋白/min)($\bar{x}\pm s$)			
	硝吡乙甲酯浓度(μmol/L)			
(mmol/L)	0	0.01	1	100
0	2.65±0.80	2.68±0.79	2.47±0.87	2.23±0.77*
1.2	2.48±0.67	2.63±±0.73	2.35±0.84	2.07±0.69
0.6	3.46±0.60#	3.54±0.74	3.89±0.60*	5.13±1.76**

* 和 ** 与各自未用药组相比，$P<0.05$和$P<0.01$

与无钙和正常钙对应组相比，$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

报道。我们的结果表明，膜蛋白的最佳投入量应在0.063～0.25mg之间。Xiang证明[6]，^{45}Ca在突触体内蓄积随外钙浓度增加而增加。但我们的实验结果与此不同，发现与无钙或正常钙(1.2mmol/L)相比，外钙浓度为0.6mmol/L时突触体的钙摄取最好；且钙阻滞剂硝吡乙甲酯在此钙浓度下对^{45}Ca摄取有促进作用(表2)。这个现象是很难解释的，也无他人报告所佐证。在研究药物对钙通道的作用时，常选用高钾刺激条件。但人们常难决断采用多大浓度的钾为宜。本实验证明，大于10并在50mmol/L以内的高钾是最佳浓度，因为此时的钙摄取反应似对钾离子最敏感(表1)。有报告，配制药物的有机溶剂可影响钙通道[4]。为此我们检查了几种有机溶剂的作用，发现DMSO 0.05%浓度有促进钙进入的作用，超过此浓度则无此效；同样条件，乙醇和丙酮对钙摄取影响不明显。因此我们建议在进行突视体钙摄取实验时，不宜用DMSO而应用乙醇或丙酮配制药物。

参 考 文 献

1. Bradford HF. In Chemical Neurobiology,Freeman Press,New York,1996; p311
2. Dagani F, et al. J Neurochem 1987; 49:1229
3. Delangen CDJ,et al. Eur J Pharmacol 1979; 60:79
4. Boakye P. et al. J Neurochem 1991; 57:88
5. Elrod SV & Leslie SW. J Pharmacol Exp Ther 1980; 212:131
6. Xiang JZ,et al. J Neurochem 1990; 55:303
7. Blaustein MP & Ector AC. Mol Pharmacol 1975; 11:369
8. Hajos F. Brain Res 1975; 93:485
9. Bradford MM. Anal Biochem 1976; 72:248
10. Leslie SW,et al. Ibid 1980; 185:409
11. Harris A & Stodes JA. Ibid 1982; 242:157
12. Woodward JJ & Leslie SW. Ibid 1986; 370:397
13. Hood WF & Harris RA. Biochem Pharmacol 1980; 345:478
14. Wu L. et al. Naunyn－Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1992; 345:478

(收稿日期 1996－04－16)

ALANYSIS ABOUT EXPERIMENTAL CONDITIONS OF ^{45}Ca UPTAKE INTO SYNAPTOSOME AND ITS IMPORTANCE

Zhou Qixin,et al

Dept. of Pharmacology

The experimental conditions of ^{45}Ca uptake into synaptosome from the mice cerebral cortices were studied. It was found that during the first 4 minutes there was a straight relationship between amount of ^{45}Ca uptake and incubation time. The range of suitable membrane protein of synaptosome used was between 0.063～0.250 mg and ^{45}Ca uptake would decline when membrane protein was more than 0.250mg Low calcium medium(0.6mmol/L)was more beneficial to the ^{45}Ca uptake than zero or normal calcium(1.2 mmol/L) medium, and nitrendipine had a promoting effect on ^{45}Ca uptake in the former medium. The rang of kalium concentrations for the best stimulation of ^{45}Ca uptake was grom 30 to 50 mmol/L. DMSO had a potential effect on ^{45}Ca uptake at the concentration of 0.05%, but ethanol and acetone failed to show an influence on it at the concentrations of 0.05～6.25%. All results above provide essential data for correctly carrying out experiments of ^{45}Ca uptake into synaptosome and determining the effects of drugs on ^{45}Ca uptake.

KEY WORDS Synaptosome; ^{45}Ca uptake