

大鼠星型胶质细胞的 IP_3 -和非 IP_3 -敏感钙库的特征和相关性

胡波 孙圣刚 何立铭 梅元武 童萋塘

【摘 要】 目的 研究纯化培养的大鼠星型胶质细胞的 IP_3 -和非 IP_3 -敏感钙库的特征和相关性。**方法** 用显微荧光测量技术监测单个星型胶质细胞内钙信号的动态变化,用 IP_3 -敏感钙库和非 IP_3 -敏感钙库的激活剂 MCh 和 CAF 及线粒体解偶剂 FCCP 刺激胶质细胞,观察它们胞内钙信号的影响。**结果** 在大部分细胞上,两种钙库中的任何一种被削弱或完全排空后,另一种钙库被激活所诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高幅度不受影响或仅被轻度抑制;而在少数细胞上,一种钙库被削弱或完全排空后,另一种钙库被激活所诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高幅度明显降低。**结论** 研究显示星型胶质细胞内的钙库包括: IP_3 敏感和非 IP_3 敏感两种内质网钙库,它们相对独立或密切相关。

【关键词】 星型胶质细胞; IP_3 -敏感钙库; 非 IP_3 -敏感钙库; $[Ca^{2+}]_i$

Property of IP_3 -sensitive and non- IP_3 -sensitive calcium stores in rat astrocytes and their relationship HU Bo*, SUN Shenggang, HE Liming, MEI Yuanwu, TONG Etong. *Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To study the property of the IP_3 -sensitive and non- IP_3 -sensitive calcium stores in rat astrocytes and their relationship. **Methods** By using the microfluorescent technique, the intracellular calcium signals of the astrocytes were detected and observed dynamically. By different combination of calcium store activators (MCh, CAF) and a decoupling agent (FCCP), the astrocytes were stimulated and its effects on the intracellular calcium signals were analysed. **Results** In most cells, when one kind of calcium store was attenuated or exhausted, the magnitude of elevation of $[Ca^{2+}]_i$, induced by the calcium store activator, was not significantly affected or only slightly inhibited; but in some cells, this magnitude of elevation of $[Ca^{2+}]_i$ was markedly reduced. **Conclusion** There are two types of calcium stores existing in the astrocytic endoplasmic reticulum, one is IP_3 -sensitive and the other is non- IP_3 -sensitive. They have intimate or relatively independent relationship.

【Key words】 Astrocyte; IP_3 -sensitive calcium stores; Non- IP_3 -sensitive calcium stores; $[Ca^{2+}]_i$

中枢神经系统中,胶质细胞的数量几乎占 90%,当中枢神经系统受损后会呈现出胶质化即胶质细胞增多的特征。近年来的研究显示胶质细胞在生理活动中亦起了重要作用,并与神经元之间存在密切关系,已有足够证据显示神经元和胶质细胞间进行着频繁的信息传递^[1]。神经元突触末端释放的神经递质可作用于星型胶质细胞,诱发其胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)升高,而升高的 $[Ca^{2+}]_i$ 又可激发星型胶质细胞合成、释放多种化合物,如谷氨酸等,将信号反馈到神经元。

作为一种重要的第二信使, Ca^{2+} 在神经元和星型胶质细胞的相互关系中起了桥梁作用。细胞内的游离钙主要储存在内质网(endoplasmic reticulum, ER)内,一般认为内质网有两种钙库成分:一种是 inositol (1, 4, 5)-trisphosphate (IP_3)-敏感的钙库,可被 Acetyl- β -

Methylcholine Chloride (MCh) 激活,另一种是 IP_3 不敏感的钙库,可被 Caffeine (CAF) 激活。

本文着重讨论培养的大鼠星型胶质细胞内质网的两种钙库特征及相互关系,发现在该细胞中两种钙库均存在,在多数细胞中相对独立,而在少数细胞中有密切联系。

材料和方法

一、试剂和药品

胎牛血清, DMEM/F12 由 Gibco 公司提供, HEPES, arbamylcholine chloride (carbachol), caffeine, poly-l-lysine, trypsin, EGTA, thapsigargin, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), 均由 Sigma 公司提供。Fura-2/AM 由 Molecular Probe 公司提供。

二、细胞培养

按照 McCarthy 和 Devellis 的方法^[5]进行星型胶质细胞的原代培养。出生后 1~3 d 的新生 Sprague-Dawley 大鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO. 30040037)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(胡波、孙圣刚、梅元武、童萋塘);生物物理与生物化学研究所(何立铭)

供。用乙醚麻醉后,用 70% 的乙醇消毒,取脑,将皮质横切为 500 ~ 800 μm 厚的脑片,用 0.25% 的胰蛋白酶,置于 37℃、5% CO_2 的培养箱内消化 30 min,获得细胞悬液后种植到培养瓶内。培养基成分为:78% DMEM/F12, 10% 小牛血清, 1% 盘尼西林和链霉素 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)。在 10% CO_2 , pH = 7.2 ~ 7.3 和 37℃ 的培养箱内培养 7 ~ 9 d 后放入 180 转/min 的恒温摇床摇 15 h,再将其传代,种在盖玻片上,种植密度为 5×10^5 个/ml,3 ~ 7 d 后的细胞可用于实验。用免疫组织化学的方法鉴定本法培养的细胞,胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 呈阳性的细胞为星型胶质细胞,本法培养的细胞中 GFAP 阳性细胞占 98%。

三、系统设备

Fura-2 荧光测钙系统包括:倒置显微镜 Axiovert 100 (Zeiss, Germany)、单色灯光源 75X-O (Ushio, Japan)、控制单元 (T. I. L. L Photonics, Germany)、光导纤维和滤光片等。计算机通过与 Pulse + Pulsefit8.0 (HEKA, Germany) 捆绑的 Fura 软件 (HEKA, Germany) 对控制单元进行控制。F340/F380 的荧光比值被用来反映 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化^[6]。

四、Fura-2 荧光测钙的基本原理

Fura-2 是一种钙结合荧光试剂。通常使用的 Fura-2 有两种形式,一种是酯形式的 Fura-2/AM;另一种是游离酸盐形式。前者能透过细胞膜,但不能与钙离子结合,当进入细胞后可被胞浆酯酶水解成游离酸盐形式;后者不能透过细胞膜,却可与钙离子结合。Fura-2 与钙离子结合后,激发波长发生改变,由未结合钙离子时的 380 nm 移至 340 nm,因此,分别测量 340 nm 和 380 nm 波长时 Fura-2- Ca^{2+} 和 Fura-2 的荧光强度,代入公式: $[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{KdX} (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) (Sf_2 / Sb_2)$,便可以计算出细胞内游离钙离子浓度。

五、Fura-2 的加载

本实验中均采用 Fura-2/AM 孵育法加载 Fura-2。Fura-2/AM 50 μg 溶于 50 μl 的 Pluronic 母液,混合均匀,制成 1 mmol/L 的 fura-2/AM 溶液。然后用 10 ml 的细胞外液稀释并以 250 μl 体积分装于 eppendorf 管中,放置到 -20℃ 冰箱中保存。将培养有胶质细胞的盖玻片用缓冲液冲洗一遍,放置在实验皿中,加入细胞外液并定量为 0.5 ml,然后在避光条件下将 Fura-2/AM 母液解冻,把 250 μl 全部加入实验皿之中。把实验皿放入细胞培养箱中 10 ~ 30 min 后取出,用缓冲液冲洗两遍除去胞外多余 Fura-2/AM 后,即可开始实验。

六、给药方法

将 CAF, MCh, TG 等按实验设计配置成高浓度的储存液,是使用时稀释 100 倍或更高倍数。其中水溶

性药物用 Krebs-HEPES 液配制,脂溶性药品用二甲基亚砜配制。

七、溶液

细胞外液成分为 (mmol/L): 150 NaCl, 10 HEPES, 10 D-Glucose, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 ; pH = 7.3; 渗透压 = (320 ± 5) mOsm/L。在外液中加入 Tetrodotoxin (TTX: 1 mM) 阻断钠电流。无钙外液成分除以 BaCl_2 代替 CaCl_2 或加入 1 mM 的 EGTA 外,其余不变。

结 果

一、星型胶质细胞内 IP_3 敏感和非 IP_3 敏感钙库的特征

在 0Ca^{2+} 外液中, MCh 可引起 89% 的细胞产生反应 ($n = 110$), 其中 18 个细胞仅有轻度的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 而其余细胞有明显的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。用不同浓度的 MCh 或 CAF 分别刺激同一个细胞, 刺激间隔不少于 5 min (以避免受体失敏), 可见随浓度升高, 反应逐渐增强。1 mM 的 MCh 和 5 mM 的 CAF 诱发的反应最强; 用 MCh 或 CAF 快速、反复地刺激同一细胞, 每次间隔 100 s, 荧光比值的升高程度逐渐减弱, 最后完全消失, 当间隔刺激延长为 20 min 时, 刺激所诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高又可变得十分明显 ($n = 23$)。这表明星型胶质细胞内存在 IP_3 和非 IP_3 敏感的钙库, 快速的重复刺激可排空钙库。如果给予充足的时间, 耗竭的钙库可得到完全恢复。

二、星型胶质细胞内 IP_3 敏感和非 IP_3 敏感钙库的相互关系

在 67% 的研究细胞中, IP_3 敏感和非 IP_3 敏感两种钙库表现为相对独立。用 1 mM 的 MCh 反复刺激同一个细胞, 刺激间隔在 100 到 140 s 之间, IP_3 敏感的钙库被完全排空后, 5 mM 的 CAF 仍可在该细胞上引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的明显升高, 当用 CAF 快速、反复刺激该细胞, 可见 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高幅度逐渐下降 (图 1A) ($n = 21$)。当 MCh 敏感钙库被削弱而不是耗竭时, 5 mM 的 CAF 仍能引发 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的显著升高, 用 CAF 和 MCh 交替刺激细胞, 二者诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高都逐步降低 (图 1B) ($n = 27$)。这提示 IP_3 敏感和非 IP_3 敏感两种钙库功能相对独立, 二者在空间上的分布相对分离。

在一部分细胞中, 两种钙库显得密切相关。用 1 mM MCh 重复刺激同一个细胞, 刺激间隔少于 100 s, 使 IP_3 敏感钙库耗竭后, 用 CAF 刺激该细胞仅引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的轻度升高, 且 CAF 敏感钙库排空明显加快 (图 2A) ($n = 13$)。当用 1 mM MCh 和 5 mM CAF 交替刺激细胞, 两种钙库的反应都迅速减弱 (图 2B) ($n = 15$)。这些现象在 23% 的细胞上表现突出, 表明在这些细胞上二者之间相互依赖, 可能有空间分布上的

重叠。

三、星型胶质细胞内线粒体钙库的作用

作为细胞内 Ca^{2+} 的缓冲系统,线粒体在星型胶质细胞中存在且在胞内 Ca^{2+} 的缓冲中起了重要作用。在 0Ca^{2+} 外液中,线粒体的解偶剂 FCCP 可诱发短暂的、轻度的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,并可加强 MCh 的作用,延长升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 下降的时间 ($n=8$)。

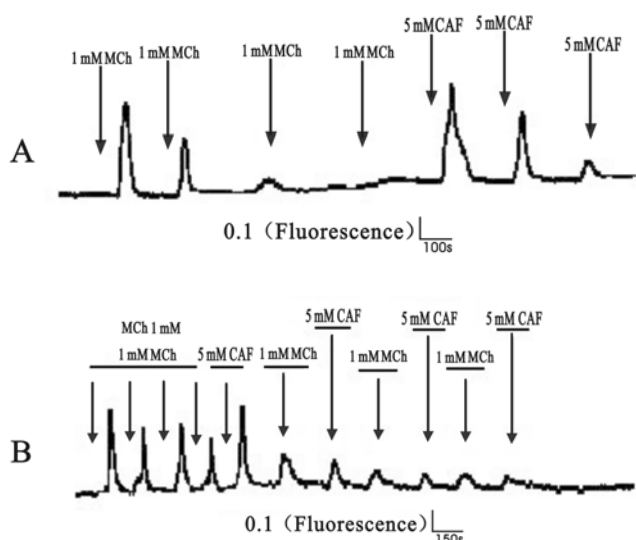


图1 星型胶质细胞内 IP_3 敏感和非 IP_3 敏感钙库的相对独立性

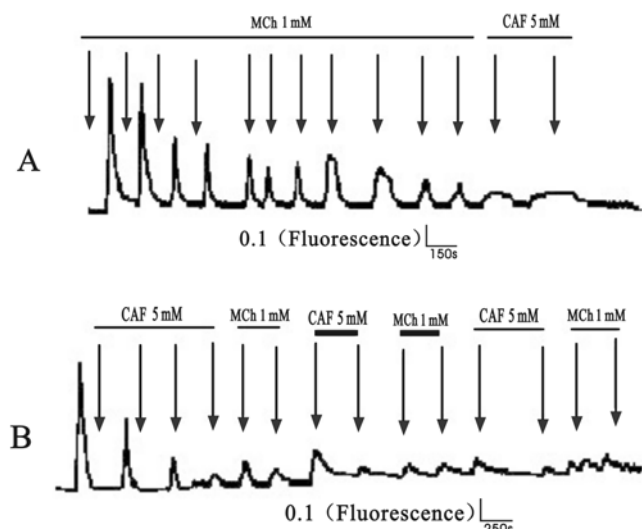


图2 星型胶质细胞内 IP_3 敏感和非 IP_3 敏感钙库的相关性

讨 论

以往的研究表明细胞内游离 Ca^{2+} 主要储存在内质网内,近来的研究已证实星型胶质细胞的内质网含 IP_3 敏感和非 IP_3 敏感两种钙库成分,它们各自受 IP_3 受体系统和 Ryaodine 受体系统的调控^[1,2], Muscarinic acetylcholine 受体激动剂 MCh 和 CAF 是各自的激动剂。

从结果可见, MCh 和 CAF 在无钙外液中均可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较基钙明显升高,且其引起的反应呈现出浓度依赖性特征。快速重复的刺激可导致钙库的耗竭,而足够长的间隔时间可使钙库的 Ca^{2+} 储存得到不同程度的恢复,而这种现象可被内质网膜上 Ca^{2+} 泵的不可逆抑制剂所阻断^[1]。这一过程可能是通过内质网膜上 Ca^{2+} 泵和受体的协同作用来完成的,两种钙库均可被再填充,恢复对钙离子的储存。Golovina 和 Blaustein 研究发现,星型胶质细胞中内质网的某些区域可随 MCh 的加入和去除出现排空和填充的现象,而另一些区域的排空和填充与 CAF 密切相关^[3],这与我们的结果一致。

在研究的多数细胞中, MCh-和 CAF-敏感的钙库是相对独立的,一种钙库的削弱或耗竭并不会影响另一种钙库的排空,后者仍旧保持其固有特征。成像技术和免疫组织化学研究发现 IP_3 和 ryanodine 受体的分布不同^[6],这可能是造成它们相对独立的原因。然而,在少数细胞中,二者却显示出相互依赖的密切关系,一种钙库的削弱和耗竭会促进另一种钙库的明显削弱和快速耗竭。Golovina 和 Blaustein^[3]发现在内质网的某些区域,两种钙库有明显的重叠,空间分布界定模糊。Seymour-Laurent 等^[6]发现 IP_3 门控的钙释放与钙诱发的钙释放是空间独立的,但又互相影响,这在钙震荡的形成和钙波在胞体和轴突间的传播中十分重要。虽然,详细机制仍不清楚,但可推测钙库和系列循环的受体激活参与了 Ca^{2+} 的交流过程。

胞内钙信号的调控机制十分复杂。当胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高时,质膜上的 Ca^{2+} -ATPase 是重要的缓冲机制之一^[9],若阻断内质网上的钙泵,则可抑制内质网对胞浆内游离 Ca^{2+} 的摄取,明显加强 MCh 和 CAF 对钙库的排空作用^[4,9]。Na/Ca 交换机制仅在胞浆内 Ca^{2+} 大大升高时,才参与胞内钙库的调节,免疫组织化学研究显示,这种交换分子是以网状形态分布在星型胶质细胞表面^[4]。经典理论认为线粒体仅在胞内钙极度升高或病理状态下才参与钙信号的调控,但近来研究发现:线粒体在生理条件下,也可摄取胞浆内的钙离子,反馈调节钙信号^[5,7,8],线粒体解偶剂 carbonyl cyanide p - trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)可影响线粒体的呼吸链,减少 ATP 的合成,减少线粒体对胞浆内 Ca^{2+} 的摄取,抑制线粒体的钙缓冲能力。

我们的研究显示星型胶质细胞内的钙库有多种成分,包括: IP_3 敏感和非 IP_3 敏感两种内质网钙库,它们的关系存在两种可能,即相对独立或密切相关;而线粒体钙库则参与胞浆内 Ca^{2+} 缓冲系统。三种钙库在胶质细胞的钙信号调控中都十分重要,对胶质细胞钙

库的研究可为我们进一步研究其重要生理功能提供思路。

参 考 文 献

- 1 Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*, 1993, 361:315-325.
- 2 Galione. Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium. *Science*, 1993, 259: 325-326.
- 3 Golovina VA, Blaustein MP. Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores in astrocytes. *Glia*, 2000, 31:15-28.
- 4 Mooren FC, Kinne RK. Cellular calcium in health and disease. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1406:127-151.
- 5 Rizzuto R, Pinton P, Brini M, et al. Mitochondria as biosensors of microdomains. *Cell Calcium*, 1999, 26:193-199.
- 6 Seymour-Laurent KJ, Barish ME. Inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distributions and patterns of acetylcholine- and caffeine-induced calcium release in cultured mouse hippocampal neurons. *J Neurosci*, 1995, 15:2592-2608.
- 7 Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, et al. Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signaling. *FEBS Lett*, 1994, 348:211-215.
- 8 Pozzan NT, Rizzuto R. High tide of calcium in mitochondria (news comment). *Nat Cell Bio*, 2000, 2: E25-E27.
- 9 Simpson PB, Russell JT. Role of sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPases in mediating Ca^{2+} waves and local Ca^{2+} -release microdomains in cultured glia. *Biochem J*, 1997, 325:239-247.

(收稿日期:2001-11-22)

(本文编辑:熊芝兰)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

科技论文中量和单位的使用规则

针对许多作者在来稿中量和单位使用混乱的状况,我们按《中华人民共和国法定计量单位》和《中华人民共和国法定计量使用方法》,以及 GB3100~3102-93 有关量、单位和符号的规定及其书写规则,参考中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第 3 版(人民军医出版社 2001 年出版),对科技论文中量和单位的使用作如下提示。

各种量和单位除在无数值的叙述性文字中可使用中文符号外,均应使用量和单位的国际符号。非物理量的单位(例如个、次、件、人等)用中文表示。量的符号通常是单个拉丁字母或希腊字母,都必须用斜体印制(pH 例外),符号后不加缩写点(圆点)。表示物理量的符号作下标时也用斜体字母。

1. 单位符号用正体字母,无复数形式,符号后不加缩写点(圆点)。来源于人名的单位(例如 Pa、Gy 等)的首字母大写,“升”一般用大写“L”,其余均为小写。

2. 词头的符号用正体字母,它与单位符号之间不留空隙。词头符号与紧接的单个单位符号构成一个新的单位符号。 10^6 以上的词头符号(例如 M、G、T 等)大写,其余为小写。词头不能单独使用(例如:“ μm ”不能写作“ μ ”),也不能重叠使用(例如:“nm”不应写作“m μm ”)。

3. 表示量值时,单位符号应置于数值之后,数值与单位符号之间留 1/4 汉字空。惟一例外为平面角的单位度(°)、分(')和秒("),数值和单位符号之间不留空隙。

4. 一般不能对单位符号进行修饰,如加缩写点、下标、复数形式,或在组合单位符号中插入化学元素符号等。但 mm Hg(毫米汞柱)、cm H_2O (厘米水柱)等例外,书写时单位符号与化学元素符号之间应留 1 个字母的空隙。根据国家质量技术监督局、卫生部联合发布的《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,人体和动物体内压力检测值的计量单位恢复使用 mm Hg、cm H_2O 等,但在文中第 1 次出现时应注明与 kPa(千帕斯卡)的换算系数。

5. 单位符号是一个整体,不得拆开或移行。若上行末排 mmol/,下行排 L,应将上行末的 mmol/移至下行,与 L 连排成一行。

6. 在图、表中表示数值的量和单位时,对量的符号明确的物理量,可采用量的符号与单位符号相比的形式,例如: m/kg 、 t/min 。鉴于医学专业领域中很多检测指标难以规范量的符号,仍然可以沿用国际通用的表达方式,即列出检测指标名称,在括号内写出单位符号,例如:甘油三酯(mmol/L)。

7. 一般情况下,统一用 L(升)作为表示人体检验组分浓度单位的分母,而不使用 ml(毫升)、dl(分升)、 mm^3 (立方毫米)等作分母。但当涉及高精度微量测试的问题,强调测试样品为微升、毫升等时,可以用 ml(毫升)、 μl (微升)等作分母。

8. 单位符号可以与非物理量的单位(如:件、台、人、圆等)的汉字构成组合形式的单位,例如:件/d(件每天)。

9. 在 1 个组合单位符号中,斜线不应多于 1 条。例如: $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ 应写成 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,或 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

10. 时间的表示方法:天(d)应用“d”,小时应用“h”,分钟应用“min”,上述 3 项的单位符号均用英文小写。在描述第 $\times$ 天、第 $\times$ 小时、第 $\times$ 分钟时,不可用“第 $\times$ d”、“第 $\times$ h”、“第 $\times$ min”;每天、每小时、每分钟,也不可用“每 d”、“每 h”、“每 min”。

11. 中医针灸描述穴位位置时使用的“寸”,表示的是“同身寸”概念,是用患者人体某段长度标志作为测量的单位,因人而异,不同于旧市制长度单位的“寸”,不能换算成米制单位。中药剂量 1 钱按 3 g 计,1 两按 30 g 计。

12. 表示离心加速作用时,应以重力加速度(g)的倍数的形式表达,例如: $6\,000 \times g$ 离心 10 min;或者在给出离心机转速的同时给出离心半径,例如:离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 10 min。

13. 不能把 ppm、pphm、ppb 等缩写字作为单位使用。