

19:312-318.  
[4] Condorelli, DF. et al., 1994, *J Neurochem.*, 63:509-516.

[5] Nakajima, K. and Kohsaka, S., 1993, *Neurosci Res.*, 17:187-203.  
[6] Chao, MV., 1992, *Neuron.*, 9:583-593.

## EXPRESSION OF NEUROTROPHIC RECEPTORS IN RAT BRAIN MICROGLIA

LIU Yong Mao YANG Gui Zhen

(Department of Immunology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

### ABSTRACT

It has been extensively investigated that neurotrophins play an important role in neuronal development and survival, but the mechanism keep unclear. In present study, we detected the expression of neurotrophin receptors (TrkA, TrkB, TrkC and LNGFRp75) by RT-PCR, southern blot and immunocytochemical staining. The results revealed that cultured rat microglia express high-affinity receptors TrkA, TrkB and TrkC, and low-affinity receptor LNGFRp75 both in mRNA and protein level. Thus, these results appear to indicate that the neurotrophin family has a regulative role in the function of microglia through trk-mediated signal transduction.

Key words: Neurotrophin receptor Microglia Expression

### 实验技术

## 自制显微荧光光度系统及其应用\*

范世福 张思祥 肖松山 孙振东 赵玉春

王天佑 张 莉

(天津大学生物医学工程与科学仪器系 天津 300072)

(北京市神经外科研究所 北京 100050)

显微荧光光度计已有国外产品可供选用<sup>[1]</sup>,还有更齐全的各种细胞检测仪(例如流式细胞仪)<sup>[2]</sup>;但是进口仪器的昂贵、使用不便是一般研究和临床工作单位难以问津的,因此国内大多数部门和单位没有条件和能力开展细胞内钙离子的检测研究工作。

本项研究工作的目的就是基于细胞内游离钙离子荧光光度测定的原理<sup>[3]</sup>,结合我国国情,研究开发符合实用要求的计算机化细胞显微荧光光度检测系统及细胞内游离钙离子的检测方法。通过大量的设计、研究、实验、改进,已经开

发出符合神经细胞生理学研究实用要求的系统及相应的检测方法。

### 一、细胞显微荧光光度 检测系统的开发

在常用的日本 Olympus BH<sub>2</sub>-RFL 型落射式荧光显微镜上,配装研制开发成的荧光探测系统和计算机处理、控制系统,构成了完整的细胞显微荧光分光光度检测系统,其原理框图如图 1 所示。

\* 国家卫生部资助项目。

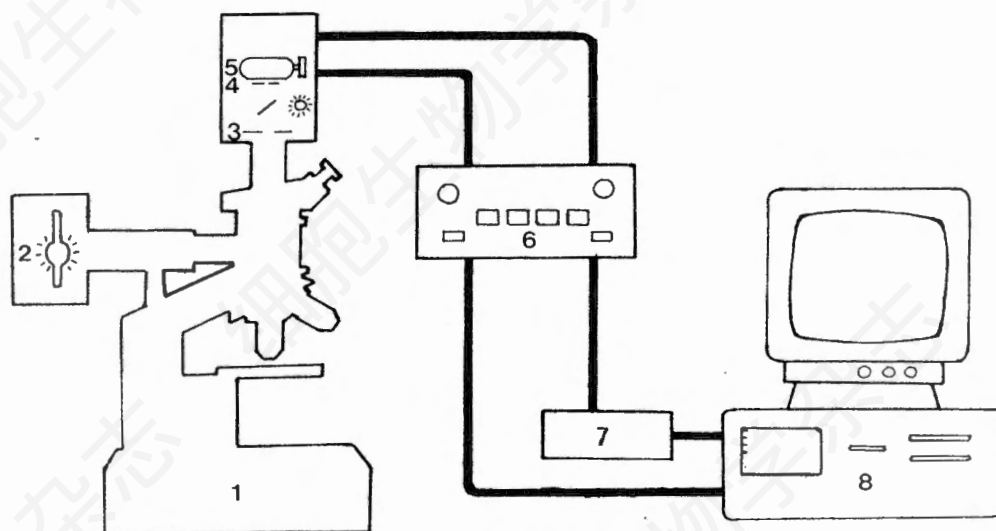


图 1 细胞显微荧光光度检测系统原理框图

该系统光源为 100W 高压汞灯,配紫外、紫、蓝、绿四种激发滤光片,采用 R446 光电倍增管作荧光探测器。为了减少杂散光和激发光对细胞荧光的干扰,也为检测单个细胞荧光时减少其他细胞荧光的干扰,我们在荧光显微镜成象面设置了一个测量光阑,调节载物台可使待测细胞被圈在测量光阑中,调整光阑孔径可得到所要求的观测区大小,从而将不需检测的其他细胞或染料杂质的干扰除去。为防止误操作将强光投射到光电倍增管上而使其受损,系统中设有计算机控制的电子快门,当需要采集微弱的细胞荧光信号时电子快门才由计算机指令打开。

计算机采集、处理、控制系统有两部分组成,计算机硬件和计算机软件两部分,其中计算机硬件主要有用于数据采集的模-数转换(A/D)接口和用于电子快门控制的数字输入输出接口(I/O)。计算机软件中有一些用于控制硬件实现硬件各个操作功能,一些用于对采集的数字电压信号进行滤波处理、相对荧光强度信号以图形的形式实时显示、钙离子浓度转换、打印输出、文件管理。

计算机硬件接口:

A/D 转换器,采用 A/D 公司 100KHz 的 A/D1674 器件作为 A/D 转换的核心,A/D 内置 1 微秒采样保持器,整个电路 A/D 的通过率为 50KHz(输入放大倍率  $G=1, 2, 386DX/33$ ),输入通道建立时间小于  $20\mu s$ 。输入可以是双极性输入( $0-\pm 5V$ )或单极性输入( $0-10V$ ),输入的放大倍率可以通过 3 档跳线选择,放大倍率分别为:1, 2, 10。输入阻抗大于  $100M\Omega$ ,最大输入电压  $<+12V/-5V$ ,精度为 0.2%,分辨率为  $\pm 1$  LSB,DB25 孔式输入连接器。

I/O 接口,采用 INTEL 公司 8255 器件,具有 24 路可编程数字输入输出,高电压  $>3.5V$ ,底电压  $<0.4V$ ,TTL 电平兼容,输出下拉电流  $>2mA$ ,输出上拉电流  $>2mA$ ,输入电流  $<0.4mA$ 。26 脚扁平电缆插座输出,占用 4 条 PC I/O 地址,可以从 200H—2F0H 之间选择。为了消除相对缓慢变化的荧光信号以外的噪声和干扰,在硬件上采用了双二阶有源低通滤波器,在软件中通过数字滤波使信号输出更加平滑。

为了检查所开发的细胞显微荧光光度系统的性能,我们用 Hoechst 33342 染料对小鼠精

子细胞和肝细胞单细胞的 DNA 荧光作了多次细胞相对荧光检测。用紫外光(峰值  $\lambda = 346\text{nm}$ )激发,检测蓝白荧光(峰值  $\lambda = 460\text{nm}$ ),获得如图 2 所示的检测结果。表明精子荧光为 1 时,小肝细胞的相对荧光度为 2,部分肝细胞为 4,少数肝细胞则接近于 8,完全符合单倍体、二倍体、四倍体、八倍体生物学特点。图 2 也表明了该检测系统荧光强度与检测输出之间有良好的线性关系,作显微荧光相对光度测量有足够的检测精度。我们还用碘化丙锭染料对小鼠精子细胞和肝细胞单细胞的 DNA 结合荧光作了类似的检测,也得到了符合单倍体、二倍体、四倍体、八倍体规律的线性检测结果(激发波长峰值  $536\text{nm}$ 、荧光发射检测波长峰值为  $617\text{nm}$ ),验证了系统对红光也呈线性。

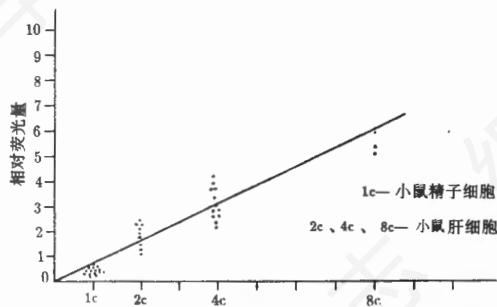


图 2 Hoechst 33342 精子细胞、肝细胞与相对荧光度关系

多次实验结果还证明此荧光显微光度检测系统在长达 4-5 小时工作过程中性能稳定、漂移不明显,一次实验中数据重现性好,因此可以进行荧光变化的动态检测,系统计算机(486 兼容机)的硬件和软件系统在采样、记录、绘图、存盘、打印等功能方面也都能符合细胞荧光显微光度检测要求。

## 二、细胞内游离钙离子浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 的检测

通过测定细胞膜内外钙离子流动所产生的电压变化来推测钙离子分布的间接测量方法,因为不准确已很少应用。在种种直接测定法中,原子吸收光谱法、离子微电极法、电镜法、发射

示踪法、标记示踪法等都因各自的特殊困难问题(如无法区别钙离子与非离子钙,需要特定同位素或标记物,反应速度慢,样品准备过程繁琐,灵敏度低等等),在实际应用时遇到许多麻烦<sup>[4,5]</sup>。荧光指示剂法则有较多优点,加上目前各种新的荧光指示剂不断得到开发(例如,北京、上海及国外都已能制备性能优良的 Fura-2 荧光指示剂及其配套试剂),因此采用显微荧光光度法检测细胞内游离钙离子是方便、可靠、灵敏、值得推广应用的技术<sup>[6,7]</sup>。

### 神经细胞内静息 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 的检测

神经细胞内静息  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  一般浓度在  $100-200\text{nmol/L}$ , 细胞损伤后其浓度会增高或降低,因此准确检测静息  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的浓度可以反映神经细胞的生理状态。

我们采样荧光指示剂 Fluo-3 来显示活细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。Fluo-3 的 AM 酯容易穿透细胞膜,受细胞内非特异酯酶催化水解形成游离的 Fluo-3,并迅速与游离的钙离子结合,在  $488-490\text{nm}$  波长激发下可以产生峰值在  $530\text{nm}$  附近的荧光,荧光强度与游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度相关<sup>[8]</sup>。

### 检测方法如下:

神经细胞培养:取 15-16 天小鼠胚胎,在无菌的条件下取出大脑半球,去除脑膜和血管后剪碎,用 0.25% 胰蛋白酶消化 5-10 分钟,经滴管吹打、不锈钢筛去除细胞团块后,将细胞悬液种于平皿中(已放有用聚赖氨酸处理过的盖玻片),加培养基(MEM 含 10% 小牛血清),置  $\text{CO}_2$  培养箱中。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度测定:取培养 6-7 天的小鼠大脑皮层细胞的盖玻片,用缓冲生理盐水(PBS)洗一次,滴加 Fluo-3/AM 的 PBS 溶液  $200\mu\text{L}$ , Fluo-3/AM 浓度为  $10\mu\text{mol/L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温 45 分钟后用 PBS 洗去多余的染液,翻转盖玻片于特制灌流槽上用石蜡密封。在  $25-28^\circ\text{C}$  室温下进行检测,同时由蠕动泵不断吸进 PBS。仪器条件为 40 倍物镜,  $100\text{W}$  汞灯,蓝激发滤光片,黄绿发射滤光片。图 3 是检测结果的一个实例。

### [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的标定

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

式中  $K_d$  是 Fluo-3 与  $\text{Ca}^{2+}$  的解离常数, 一般取值 400nmol/L,  $F$  为检测得的相对荧光值,  $F_{\max}$  为加用离子载体后细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  大量进入细胞内测得的相对荧光值(一般用 A23187 或 Ionomycin 离子载体),  $F_{\min}$  为加入二价离子 ( $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Cu}^{2+}$ ) 后所测得的最小相对荧光值<sup>[9]</sup>。

因  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  可与 Fluo-3 结合而取代已结合的  $\text{Ca}^{2+}$ , 通过标定就可求得细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度的绝对值(nmol/L)。

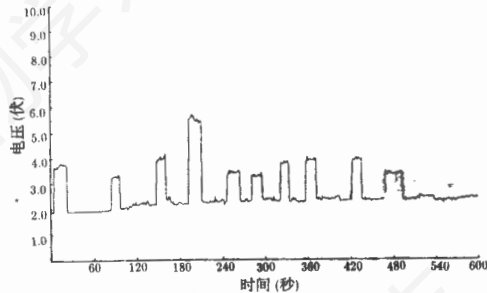
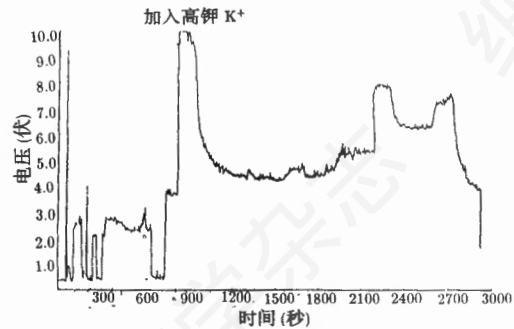


图3 细胞内静息钙离子的检测结果

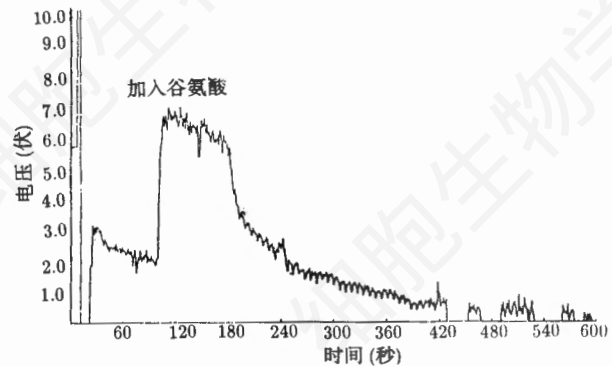
### 神经细胞内 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的生理变化动态检测

活细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度比细胞外浓度低四个数量级(约为 1/10000), 当细胞膜去极化时, 电压依赖性钙离子通道被打开,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  向细胞内流入引起  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  瞬时跃升, 随后由于细胞内多种缓冲机制的作用又使  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度逐渐降低直到恢复到正常水平。通常可采用将细胞外液的  $\text{K}^+$  浓度升高到 50mmol/L 的方法造成细胞膜去极化。某些化学物质与神经细胞膜上的特异受体结合后, 也可导致离子通道开放和  $\text{Ca}^{2+}$  内流使  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高; 这些化学物质可以是生理性的(神经递质, 可传递神经兴奋性信息), 也可是药物性的。谷氨酸单钠盐(Sodium Glutamate)就是一种中枢神经系统最重要的兴奋性递质。

本实验是在弱蓝光照射下长时间连续记录 Fluo-3 结合的钙信号, 观测单个或一小团神经细胞在高  $\text{K}^+$  液或含谷氨酸液灌流前后  $[\text{Ca}^{2+}]_i$



a) 加入高钾前后测量曲线



b) 加入谷氨酸盐前后测量曲线

图4 神经细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  生理变化动态检测

的随时间变化情况。在实验测定时, 操作上应注意防止在灌流时形成小气泡而形成伪迹。最长曾连续观测 1.5 小时, 基线基本稳定, 测定结果重复性令人满意。

由图 4 可见, 加入高钾(a)和谷氨酸(b)会引起钙信号迅速上升, 停止加入后钙信号又很快恢复, 完全符合文献中公认的动态变化特性<sup>[2,7,9]</sup>。

立足国情, 采用最新光电技术、计算机技术以很低的费用实现了普通荧光显微镜的改造、升级换代成方便实用的神经细胞钙离子显微荧光分光光度检测系统, 实现了神经细胞内静息

钙和钙生理动态变化的直接检测。研究结果表明系统稳定可靠、线性好、反应灵敏、计算机实时处理和能力强,实验方法正确有效、实验数据重现性好,成功开发了符合细胞生理学研究和实用要求的细胞显微荧光光度检测新手段,特别便于在国内推广应用、可促进我国细胞显微检测技术的现代化发展。

在推广和进一步完善方面,我们将在系统仪器化规范设计、计算机软件功能扩大、改装双波长检测系统、推广应用到细胞内 NAD/NADH 含量测定、pH 测定、Na<sup>+</sup>测定等方面继续努力。本装置也可以用于钙振荡测定,但是,测量精度不太高,如果采用波长为 340nm 和 380nm 交替激发的比值测定法可以提高测量精度<sup>[10]</sup>。

### 摘 要

用自行开发的细胞显微荧光分光光度系统对神经细胞内游离的静息[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>及其动态生理变化成功地进行了测定,实验结果证明系统工作稳定、重复性好,测定结果也符合公认的动力

态变化特点。本文报道了该项研究工作开发成功的细胞显微荧光光度系统及神经细胞内钙离子的分析测定过程及其结果。

**关键词:** 细胞钙离子 神经细胞 显微荧光光度

### 参 考 文 献

- [1] Xue Shaobai et al., 1993, *Science in China*, Vol. 36, No. 3, March.
- [2] Richard A. Mathies and Konan Peck, 1990, SPIE Vol. 1205, *Bioimaging and Two-Dimensional Spectroscopy*,
- [3] Richard J. Cherry et al., 1991, CRC Press Inc. Boca Raton FL.
- [4] 范世福、陈捷光著, 1989, 6,《光学式分析仪器》,机械工业出版社.
- [5] 林中、范世福著, 1989, 8,《光谱仪器学》,机械工业出版社.
- [6] M. Valdeolmillos and D. A. Eisner, 1991, Plenum Press New York.
- [7] P. H. Cobbold and Timothy J. RINK, 1987, *Biochem. J.* 248:329-336.
- [8] 陈国珍等, 1990,《荧光分析法》,科学出版社.
- [9] Kao J PY et al., 1989, *J. Biol Chem.* 264: 8179-8184.
- [10] K. D. Mielenz, 1982, *Optical Radiation Measurements Vol. 3*. P. 2-82.

## REBUILT CONVENTIONAL FLUORESCENCE MICROSCOPE SYSTEM AND ITS APPLICATION

FAN Shi Fu ZHANG Si Xiang XIAO Song Shan SUN Zhen Dong ZHAO Yu Chun

(Dept. of Biomedical Engineering and Scientific Instrument, Tianjin University, Tianjin 300072)

WANG Tian You Chang Li

(Beijing Neural Surgical Institute, Beijing 100050)

### ABSTRACT

The free static [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in neural cell and its dynamic physiological changes were successfully measured with independently developed cell fluorescence microspectrophotometric system. The measurements show that the system is stable, good reproducible, and the measuring data are also conformable to the dynamic characteristics acknowledged. The paper present the details of our new developed cell microfluorescence system, the measuring procedure and results measured for calcium ions in nervous cell.

**Key words:** Calcium ions in cell Neural cell Fluorescence microspectrophotometry