

中产生的热量从中心向表面发散, 散热快。间歇微波照射使照射时在样品中心产生的热量有足够长的间歇期向样品表面传递, 最后被固定液所吸收, 减少了热量在样品中的积累, 从而防止了由于微波照射而使样品升温过高、过快而产生的损伤。固定液温度受低温水浴控制保持恒定, 因此我们使用的固定液仅为 3 ml, 比国外通常使用的 10 ml 少得多, 节省了昂贵的固定剂。

微波照射后不立即取出标本, 适当延长样品在固定液中浸泡的时间(30 分钟), 使组织中不溶蛋白质由初始的 44.3% 升高到 79.6%^[4], 大幅度改善了样品固定质量, 使细胞超微结构得以更好的保存。

摘 要

在电镜酶细胞化学技术中, 我们在样品的

固定、温育、包埋剂浸渍和聚合等主要过程中均使用微波照射, 不仅缩短了制样时间, 而且由于使用了小标本、间歇微波照射、低温水浴及适当延长样品在固定液中的时间等改进技术, 使细胞超微结构和酶的活性都得以更好保存。酶染色清晰, 无扩散, 定位准确。

参 考 文 献

- [1] Mayers, C P., 1970, *J. Clin Pathol.*, 23: 273—275.
- [2] Kayser, K. et al., 1988, *Histochem. J.*, 20: 347—352.
- [3] Login, G R. et al., 1986, *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 381—387.
- [4] Mizuhira, V. et al., 1990, *Acta Histochem. Cytochem.*, 23: 501—523.
- [5] Notoya, M. et al., 1990, *Acta histochem. Cytochem.*, 23: 525—536.

用 Fura-2 测定缺氧时海马细胞内游离钙离子浓度的变化

刘振伟 王福庄 姜 航 丁爱石 黄燕华

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

缺氧时神经元胞内游离 Ca^{2+} 离子浓度升高, 这是缺氧所致神经元及突触传递发生不可逆损伤的重要机制之一^[1,2]。我们以往的工作发现, 缺氧能迅速阻断大鼠海马脑片的突触传递, 而无 Ca^{2+} 及高 Mg^{2+} 液能减轻突触传递的缺氧损伤, 提高复氧后脑片突触功能的恢复率^[3], 间接说明 Ca^{2+} 参与了神经元与突触功能的缺氧损伤。为进一步观察缺氧时神经元胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高的动态变化, 本工作用 Fura-2 荧光测定技术, 连续监测了缺氧时海马细胞胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_i$)的变化特征, 并对其变化的可能机制进行了初步分析。

材 料 与 方 法

实验参考 Dildy 及 Leslie 的方法^[4], 用新生 1—

2 天的 Wistar 大鼠, 在解剖显微镜下剥离出双侧海马, 剪碎后置于 37℃、0.125% 的胰蛋白酶溶液中消化 20 min。用含 10% 马血清的 MEM 培养基中止消化, 200 目过筛。滤液 1000 r/min 离心 5 min。沉淀细胞以 10% 马血清的 0.2% BSA-MEM 液配制成 3 ml 细胞悬液。加入 Fura-2/AM(终浓度为 5 μ mol/L), 在 37℃ 水浴中恒温振荡 45 min—50 min, 并不断地通入 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体以维持细胞功能^[5]。负载后, 细胞悬液以 1000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 用 8 ml 0.2% BSA-Hank 氏液洗 1—2 次。Hank 氏液成分为 (mmol/L): NaCl 137.0, KCl 5.0, $CaCl_2$ 1.3, $MgSO_4$ 0.8, Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.4, $NaHCO_3$ 3.0, 葡萄糖 5.0, pH 7.2。沉淀物最后用 0.2% BSA-Hank 氏液配成细胞悬液, 用台盼蓝染色检查细胞存活率达

* 中科院上海生理所低氧生理开放实验室资助项目。

85%—90%左右,并调整细胞密度至 2×10^6 个/ml。

荧光测定采用日本岛津RF-540型荧光分光光度计,激发、发射光栅分别为5、10 nm,发射波长500 nm,以300 nm—420 nm激发波长扫描,固定激发波长在高峰波长,测定不同实验条件下悬液荧光强度值的变化。测试温度为室温(18℃—20℃),整个测试过程在20分钟内结束。胞内游离钙浓度由下式计算:

$$[Ca^{2+}]_i = kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F) \quad (\text{nmol/L})^{[5]}$$

式中kd为Fura-2/ Ca^{2+} 的解离常数,为224 nmol/L;F为在不同条件下测定的高峰荧光强度值;F_{max}为加入Triton X-100(终浓度0.1%)后的最大高峰荧光值;F_{min}值为在F_{max}值基础上,再加入EGTA(终浓度5 mmol/L)测得。

Fura-2/AM为中科院生理研究所产品,用二甲亚砜(DMSO)配成1 mmol/L浓度,分装后置于-20℃备用。EGTA购自中国医药公司北京分公司,进口分装。其余试剂均为市售分析纯。实验结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,全部数据采用t检验。

结 果

一、静息状态下海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$

选择在20分钟连续监测中 $[Ca^{2+}]_i$ 值变化不大的细胞悬液进行观察,这些悬液较稳定,细胞功能状态较好。在细胞外钙浓度为1.3 mmol/L情况下,新生大鼠海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 为

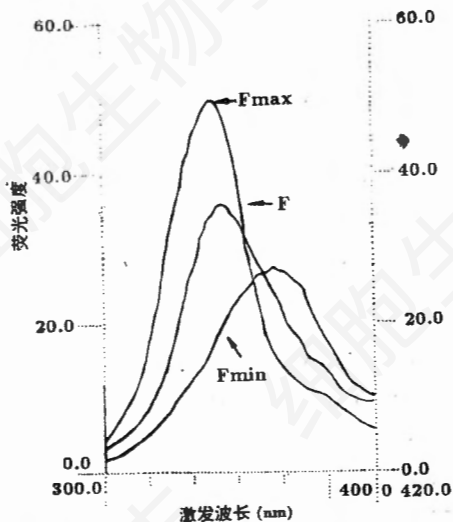


图1 Fura-2负载海马细胞的激发光谱

260.2 ± 55.7 nmol/L ($n = 11$);在去除细胞外 Ca^{2+} (Hank氏液中去除 $CaCl_2^{2+}$,并加入0.1 mmol/L EGTA)时, $[Ca^{2+}]_i$ 为 192.4 ± 43.8 nmol/L ($n = 8$),低于胞外有 Ca^{2+} 情况($p < 0.01$)。图1为实测的Fura-2负载海马细胞的激发光谱。

二、缺氧对海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

在细胞悬液中通入无氧混合气(9.5% N_2 +5% CO_2),连续观察 $[Ca^{2+}]_i$ 的瞬时变化,发现缺氧后海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 急剧升高,缺氧10 min时为 662.0 ± 63.5 nmol/L ($n = 7$),较缺氧前升高了 400.4 ± 64.6 nmol/L ($n = 7, p < 0.01$)。进一步观察发现,在缺氧1 min和6—8 min时, $[Ca^{2+}]_i$ 各有一个较大的越迁,显示出缺氧时 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的时相性变化(图2)。当去除细胞外 Ca^{2+} 时,缺氧10 min, $[Ca^{2+}]_i$ 为 398.4 ± 59.0 nmol/L ($n = 5$),较缺氧前升高了 206.3 ± 36.7 nmol/L ($n = 5, p < 0.01$),但与胞外有钙情况相比, $[Ca^{2+}]_i$ 的升高有较大幅度降低($p < 0.01$);另外,此时 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的时相性变化特征不再出现。

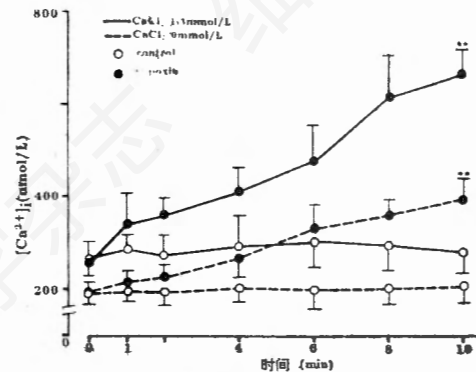


图2 不同浓度细胞外钙情况下缺氧对海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

图中可见,胞外 Ca^{2+} 为1.3 mmol/L的情况下,缺氧1、6—8分钟时 $[Ca^{2+}]_i$ 各有一较大的越迁。

** $p < 0.01$,与正常对照组比较。

讨 论

本文用Fura-2荧光测定技术观察到缺氧可引起海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 急剧升高,去除细胞

外 Ca^{2+} 时, 缺氧仍可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 但其升高幅度明显降低。上述结果表明, 缺氧所致海马细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高过程中有胞外 Ca^{2+} 内流与内源 Ca^{2+} 的释放同时存在, 但主要是胞外 Ca^{2+} 的内流。

另外, 观察缺氧 10 min 的整个过程, 发现 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高呈明显时相性变化。缺氧可引起海马脑片及海马培养细胞谷氨酸的大量释放, 使细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高^[6,7]。Zinkand 等人报道^[8], 谷氨酸介导的 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 内流表现出初次钙内流和再次钙内流的时相性特征, Randall^[9] 等人用 Ca^{2+} 指示剂 indo-1 也观察到了谷氨酸引起海马培养细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的时相性变化, 本实验缺氧过程中亦看到 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 存在两个大的越迁, 与文献报道相类似, 由于去除胞外 Ca^{2+} 后上述特征性变化消失(图 2), 表明这一变化为胞外 Ca^{2+} 的内流引起, 此与 Zinkand 等人的观点符合, 有关这一特征性变化的机制目前还不十分清楚。

摘 要

本文用 Fura-2 荧光测定技术直接监测了缺氧时大鼠海马细胞内游离钙离子浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

的变化。实验发现, 缺氧可使海马细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著增高, 并且在缺氧过程中其增高呈现明显的时相性变化。在去除细胞外钙的情况下, 缺氧仍能使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高, 仅增高幅度有所降低; 另外 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 不再出现时相性变化特征。结果提示, 胞外 Ca^{2+} 的内流以及内源 Ca^{2+} 的释放均参与了缺氧所致海马细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增高过程, 缺氧时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的时相性变化为胞外 Ca^{2+} 内流引起。

参 考 文 献

- [1] Roberts, E. L. and Sick, T. J., 1988, *Brain Res.*, 456: 113—119.
- [2] Lipton, P. and Lobner, D., 1990, *Stroke*, 21: III 60—64.
- [3] 刘振伟等, 1994, 中国应用生理学杂志, 10 (1): 34—37.
- [4] Dildy, J. E. and Leslie, S. W., 1989, *Brain Res.*, 499: 383—387.
- [5] 张均田等, 1991, 中国药理学杂志, 26 (11): 655—658.
- [6] Mitani, A. et al., 1991, *Neurosci. Lett.*, 122: 167—170.
- [7] Ogata, T. et al., 1992, *J. Neurochem.*, 58: 1957—1959.
- [8] Zinkand, W. C. et al., 1992, *ANN. N. Y. Acad. Sci.*, 648: 355—357.
- [9] Randall, R. D. et al., 1992, *J. Neurosci.*, 12: 1882—1895.

敬 告 读 者

根据中国细胞生物学学会五届二次理事会会议有关精神, 本刊对《细胞生物学杂志》征稿简则作了适当修订(刊登在本期第 144 页上)。请读者留意。

今后来稿均以修订后的征稿简则为准。

谢谢合作并请互相转告。

细胞生物学杂志

编辑部

1994.8.