

技术与方法

人红细胞内乙酰胆碱/胆碱活度的微电极测量及临床意义*

余 涌 曾宪英 洪文兵

奚国华 丁德云 周君富

(浙江大学科仪系细胞生理研究室、杭州 310027) (浙江医科大学心脑血管研究所, 杭州 310009)

徐 嗣 荪

(浙江省精神病防治研究所, 杭州 310023)

提 要

本文采用新发展的乙酰胆碱/胆碱 (ACh/Ch) 离子选择微电极对人体单个红细胞内的 ACh/Ch 活度进行了测量。实验对象是 25 位正常人及 8 位躁狂症病人的红细胞。正常人红细胞内 ACh/Ch 的活度值为 $24.0 \pm 8.3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 而躁狂症病人的红细胞内 ACh/Ch 的活度值为 $98.3 \pm 41.4 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 是正常人的 4 倍。本文对 ACh/Ch 离子选择微电极的结构和特性参数亦作了描述。

关键词 乙酰胆碱 (ACh), 胆碱 (Ch), 离子选择微电极, 红细胞

一、引 言

近年来, 由于人们对躁狂症^[1]、老年性痴呆症^[2]、迟发性运动障碍^[3]等一些临床疾病中的红细胞胆碱值很感兴趣, 因而作了大量的研究工作。一些报道还指出, 红细胞内胆碱值可以作为临床诊断及治疗的检测指标, 甚至于还可能使我们认识一些神经和精神疾病的机理^[4]。

现在已有多种能检测 ACh 浓度的方法, 例如: 生物测定法^[5]、荧光测定法^[6]、测光法^[7]、气相色谱法^[8]、核磁共振法^[9]等。但这些方法的缺点是不能直接在细胞及亚细胞水平上对游离态乙酰胆碱/胆碱的活度值进行动态测量。由于红细胞膜表面乙酰胆碱脂酶的活性很高, 不可能采用这些方法监测活细胞内的 ACh 动态平衡过程。最近, 我们已发展了数种对有机离子敏感的离子选择微电极 (双通道, 尖端约 $0.1 \mu\text{m}$)。例如: 能监测乙酰胆碱/胆碱、5-羟色胺和组织胺的离子选择微电极, 因而能在活细胞

内对这些参数作快速、连续、动态的检测^[10-13]。本研究的目的是应用 ACh/Ch 离子选择微电极直接检测人体单个红细胞内 ACh/Ch 活度值, 以便了解人红细胞内 ACh/Ch 的活度与躁狂症之间的关系。

二、材料及方法

1. 材料

0.1% 聚赖氨酸溴化氢水溶液由 Poly Sciences Inc. 公司 (Warrington, PA18976, USA) 提供, N,N-二甲基三甲基硅烷胺从 Fluka 化学公司 (Buchs, Switzerland) 购买。ACh/Ch 离子交换剂为自制并已申请专利^[14]。ACD-B 细胞保养液从朝辉制药厂 (上海)、肝素 (Liquemin) 从 Hoffmann-La. Roche AG 化学公司 (Grenzach-Wyhlen, W. Germany)、氯化钠从宁波化学工厂、氯化乙酰胆碱从 Sigma 化学

* 国家自然科学基金资助课题。

公司 (ST. Louis USA)、双通道玻璃毛细管从 Firm H. kugelstatter (Garching, W. Germany) 购买。

2. 仪器及电化学测量

微电极拉制器 (Sacks-Flaming micropipette puller model PC-84) 用于制备玻璃微电极。

微电极放大器 (Max-Planck-Institut für Systemphysiologie, Dortmund) 输入阻抗为 $10^{15}\Omega$ 。三通道记录仪 (BBC Goery Servogor

SE 330) 用于测量和记录离子敏感微电极的电位值。甘汞电极作为参比电极。该测量系统为: 银-氯化银/0.9% 氯化钠/液态敏感膜/样品/0.9% 氯化钠/甘汞电极。所有的测量都在室温(22℃)及屏蔽网内进行。

实验仪器设备如图 1 所示。

3. ACh/Ch 敏感双通道微电极的制备

用微电极拉制器 (Firm Sutter Instrument, San Rafael, CA, U. S. A.) 将双通道玻璃管拉制成尖端约 $0.1\mu\text{m}$ 的微电极。将微电极尖

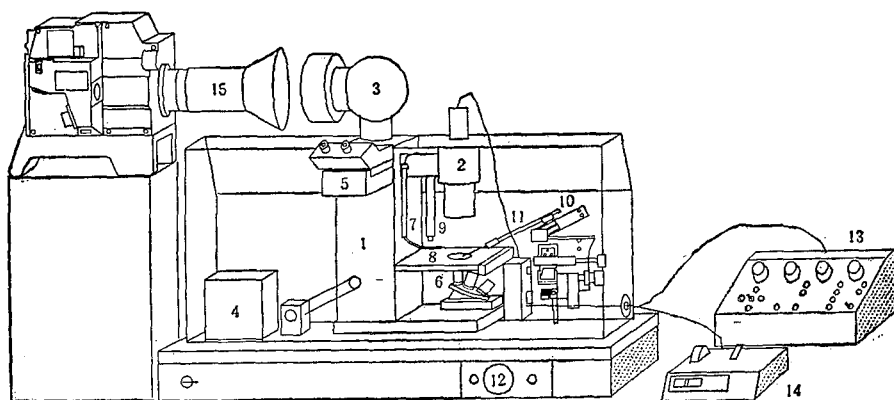


图 1 测量人红细胞内乙酰胆碱/胆碱活度的仪器装置示意图

1. 倒置显微镜及环境控制系统 (Leitz Diavert, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, W. Germany) 2. 光源及聚光镜 3. 显微照相、显微投影及录像系统所需的透镜系统 4. 加热及通风箱 5. 双目观察镜 6. 物镜转换器 7. 热传感器 8. 电操纵水平载物台 9. 甘汞参比电极 10. 遥控显微操纵器 (AM 3 DC-K Bacher GmbH, Reutlingen, W. Germany) 11. ACh/Ch 微电极固定装置 12. 温度控制旋钮 13. 三维显微操纵器遥控箱 14. 水平载物台遥控箱 15. 摄像机 (JVC kY-210BE, Victor Company of Japan, Limited) 所有仪器都安装在防震平台上。

端置入 N,N-二甲基三甲基硅烷胺的蒸气中约 1s, 然后将 0.9% NaCl 溶液从微电极一个通道的后端注入而构成直流通路。将该微电极浸入上述硅烷胺溶液中硅化 5s, 渗入 ACh/Ch 通道中的硅化液数分钟后蒸发完毕, 硅化了的微电极放置在室温中 30min 后, 将电极尖端浸入对 ACh/Ch 敏感的离子交换剂中约 20min, 使离子交换剂通过毛细作用渗入 ACh/Ch 离子通道, 再从 ACh/Ch 通道的尾端注入 0.9% NaCl 电解液使之与离子交换剂相接。最后, 将两根银/氯化银丝 (0.1 mm) 分别插入微电极的尾端与管内的电解液相接触。

ACh/Ch 离子选择微电极在不同校正溶液

中的校正曲线如图 2 所示。

对 ACh/Ch 敏感的微电极的特性参数如下:

a. 双通道: 一道用于直流电位测量, 另一道用于测定 ACh/Ch 活度, 尖端直径为 $0.1\mu\text{m}$ 。

b. 膜电位与乙酰胆碱浓度之间的线性关系, 在 10^{-1} — 10^{-3}mol/L ACh 浓度范围内其斜率值为 59mV, 在 10^{-3} — 10^{-4}mol/L ACh 浓度范围内其斜率值为 40—50mV, (所有数值都在 Tyrode 溶液中测得)。

c. 检测下限为: 10^{-6}mol/L ACh。

d. 一些无机离子如 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- 对

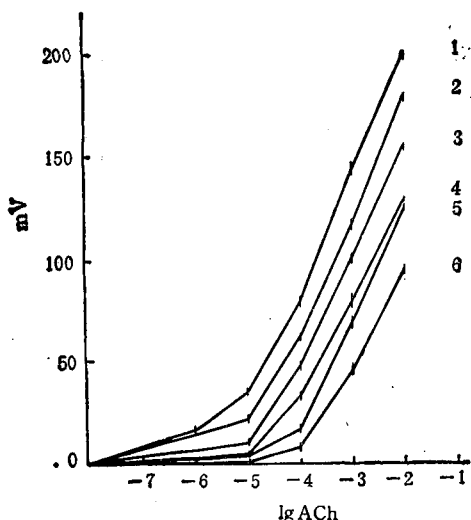


图2 在不同校正溶液中 ACh^+/Ch^+ 通道的选择性系数及校正曲线(室温 22°C)

1. 用蒸馏水配制的 10^{-2} — 10^{-7} mol/L ACh 校正溶液
2. 用 10^{-3} mol/L KCl 配制的 10^{-2} — 10^{-7} mol/L ACh 校正溶液, 选择性系数为 7×10^{-3}
3. 用 10^{-3} mol/L CaCl_2 配制的 10^{-2} — 10^{-7} mol/L ACh 校正溶液, 选择性系数为 3×10^{-4}
4. 用 0.154 mol/L NaCl 配制的 10^{-2} — 10^{-7} mol/L ACh 校正溶液, 选择性系数为 6.5×10^{-1}
5. 用 Tyrode 溶液配制的 10^{-2} — 10^{-7} mol/L ACh 校正溶液
6. 用 10^{-3} mol/L Ch 配制的 10^{-2} — 10^{-7} mol/L ACh 校正溶液, 选择性系数为 8×10^{-2}

ACh/Ch 测定无明显干扰。

e. 在 Tyrode 溶液中 ACh/Ch 通道的漂移为: 5mV/h 。

4. 人红细胞内的乙酰胆碱/胆碱活度的测量

所采用的电子线路可同时测量 ACh/Ch 离子活度及直流电位。ACh/Ch 通道和直流通道之间的电位差被用来反应活细胞内 ACh/Ch 离子活度变化, 以便排除生物电信号, 例如细胞膜电位对测定的干扰。实验开始前, 乙酰胆碱微电极须在 10^{-3} — 10^{-6} mol/L 氯化乙酰胆碱的 0.9% NaCl 校正溶液中校正。在人耳垂采血 0.01ml, 用 1ml ACD-B 细胞培养液及 0.01ml 肝素稀释后备用。在测量前取 0.01ml 已稀释的血样再用 3ml 0.9% NaCl 溶液进行稀释。

实验分成如下两组进行:

1. 红细胞内乙酰胆碱/胆碱活性正常值由

25 位健康人提供, 以便得到正常人红细胞内乙酰胆碱/胆碱的平均值及标准差。

2. 红细胞内乙酰胆碱/胆碱活性的异常值及变动范围由 8 位躁狂症病人提供。

将一小滴 0.05% 聚赖氨酸水溶液涂在盖玻片的中间部位 ($10 \times 10 \text{ mm}^2$), 在室温下自然干燥。然后将 3ml 0.9% NaCl 和 0.3ml 稀释备用的血样注入实验槽内。红细胞慢慢沉到实验槽底部, 并被玻璃表面的聚赖氨酸分子紧密吸附住。将微电极固定在三维显微操纵器上, 以插入放在倒置显微镜的平台上的红细胞内, 整个过程在显微电视系统监视下进行(见图 1)。

ACh/Ch 及 DC 通道的电位变化由高输入阻抗放大器放大, 然后用 6 道记录仪记录。

三、结果与讨论

图 3 是健康人红细胞内 ACh/Ch 活度值的直方图。红细胞内 ACh/Ch 活度值为 10×10^{-6} mol/L 的健康人仅占总数的 1%, 没有人出现低于 5×10^{-6} mol/L 的数值, 出现频率最高的数值分布在 15 — 20×10^{-6} mol/L 处, 并且 50% 的人 ACh/Ch 值大于 20×10^{-6} mol/L。

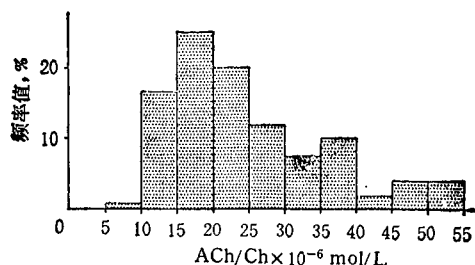


图3 健康人红细胞内 ACh/Ch 活度值直方图

图 4 显示了正常人和躁狂症病人之间 ACh/Ch 的关系。其横坐标中 ACh/Ch 活度值的间距是图 3 的 4 倍, 为 20×10^{-6} mol/L。

如图 4 所示, 躁狂症病人红细胞内 ACh/Ch 活度值均高于 20×10^{-6} mol/L, 出现频率最多的数值在 100 — 120×10^{-6} mol/L 之间。该组 50% 的数值分布在 100 — 200×10^{-6} mol/L, 而正常组中近 90% 的数值分布在 0 — 40×10^{-6} mol/L。

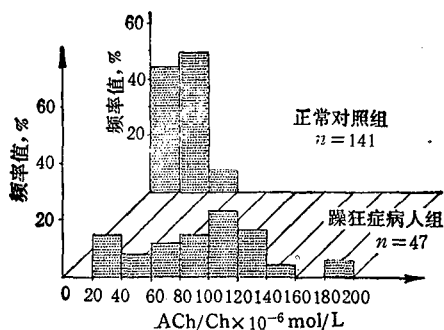


图4 正常人及躁狂症病人红细胞内 ACh/Ch 活度值直方图

mol/L. 比较正常人及躁狂症病人之间的 ACh/Ch 值直方图, 可见病人组的直方图明显右移。躁狂症病人组中在 $160-180 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 处的频率值为 0 是由于测定的例数较少所致。

正常组及躁狂症病人组的 ACh/Ch 活度值如表 1 所示。

表 1 正常组及躁狂症病人组的 ACh/Ch 活度值

分组	数量	ACh/Ch 活度值
正常人对照组	25	$24.9 \pm 8.3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$
病人组	8	$98.3 \pm 41.4 \times 10^{-6} \text{mol/L}$

$P < 0.01$ (t-test)

躁狂症病人红细胞内 ACh/Ch 值为 $98.3 \pm 41.4 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 是正常组的 4 倍, 两者之间经统计学处理有明显差异 ($P < 0.01$)。

Joje 等人^[14]发现躁狂症病人在没有接受锂盐治疗时红细胞内的胆碱浓度是正常人的 3 倍。锂盐治疗使其值升高达正常值的 11 倍, 而血浆中的胆碱浓度在锂盐治疗前后没有变化。

Ehrlich^[15] 也发现躁狂症病人血浆中的胆碱浓度在锂盐治疗前后无差异, 而胞内却上升了 10 倍。在延长锂盐治疗后红细胞内胆碱的转运被不可逆地减少了 90%^[16]。Joje^[17] 发现锂盐治疗刺激了大脑一定区域的胆碱能活性, 这或许在精神病人的锂盐治疗中起着重要的作用。红细胞中胆碱的运转及其与躁狂症的联系已由 Ehrlich 和 Diamond^[18] 作了综述报导。

Bogdan 等^[19]报道, 在锂盐治疗过程中红细胞内胆碱的增加是由于磷脂释放的胆碱积累的结果。许多学者都报道过入红细胞内胆碱正常值, 但结果却大不相同^[4,8-10]。

人红细胞内存在胆碱及胆碱乙酰化酶^[20], 提示人红细胞在适当条件下有可能在胞内合成乙酰胆碱。人红细胞内的乙酰胆碱可能是作为一种局部激素而不是作为一种神经介质的作用而存在, 这种局部激素的调节作用可能与红细胞膜正常生理功能的维持有关。由于胆碱是构成红细胞膜的重要成分, 因此胞内胆碱活性的改变将会引起膜结构内及胞浆内胆碱动态平衡过程的改变, 这一改变亦将造成红细胞膜功能及通透性的改变。

我们设想: 造成躁狂症病人红细胞内 ACh/Ch 活性增高的原因, 可能是由于异常的红细胞代谢造成胞内 ACh 合成的增加及膜通透性的改变使 Ch 在红细胞内聚集所致。而造成红细胞代谢异常的原因还有待进一步研究。

ACh/Ch 离子选择微电极这一技术的优点, 在于它能连续动态地检测活红细胞内的 ACh/Ch 活性。这一方法有可能为躁狂症及其他有关疾病的临床药理学、病因学研究、诊断及治疗的监测提供活细胞水平的研究模型。

对于给予我们经费支持的国家自然科学基金会、国家教委科学基金会、西德马克思·普朗克系统生理研究所、西德大众汽车基金会表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Johnson G, Kuchel P W. *N Engl J Med*, 1980; 303: 705
- 2 Richter J A, Perry E K, Tomlinson B E. *Life Sci*, 1980; 26: 1683
- 3 Davis K L, Hollister L E, Barchas J D et al. *Life Sci*, 1976; 19: 1507
- 4 Joje R S, Jenden D J, Ehrlich B E et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1980; 77(10): 6144
- 5 Morel N, Israel M, Manaranche R. *J Neurochem*, 1978; 30: 1553
- 6 Speeg K V J. In: Hanin I et al. eds, *Choline and acetylcholine: Handbook of Chemical assay methods*, New York, 1974: 129
- 7 Eksborg S, Persson B A. *Acta Pharm Suecica*, 1971; 8: 205

(下转第 151 页)

3. 血凝试验: 结果表明麻疯树粗毒及分离所得各组分对人血红细胞均无凝集作用。

4. 光谱测定 表明蛋白组分 I、II、III 均在紫外区的 280nm 附近出现典型的蛋白吸收峰, 峰值分别为 278、272 和 275nm。

5. 等电点 三个蛋白组分在等电聚焦电泳中均只出现一条蛋白区带, pH 值依次为 8.1、8.8 和 8.8。

6. 动物急性中毒试验 结果见表 1。小鼠中毒死前症状包括行为共济失调, 拉稀便, 耳血管暂时扩张, 活动和食量明显减少, 尸体解剖见心脏停止于收缩期, 肺, 肝和静脉淤血。大多数中毒鼠的死亡见于给药后 8—24h, 少数死于 24—48h 间。从表 1 可见, 组分 I 的毒性试验结果与文献[3]报道相近。而从厦门麻疯树种子提取的粗毒的毒性比文献[3]的报道值大。这

表 1 麻疯树粗毒及毒素组分 I 对小鼠腹腔注射的急性 LD₅₀

毒 素	组 数	只/组 ¹⁾	LD ₅₀		
			mg/只	(mg/10g)	95% 可信限
粗 毒	5	10	6.76	(2.71)	6.05—7.56
毒 素 I	5	10	6.39	(2.55)	5.87—6.94

1) 按只计算时, 每只小鼠以 25g 计。

与厦门麻疯树种子毒素组分 I 的含量较高的结果相符。小鼠腹腔注射组分 II 超过 6mg/只仍未出现中毒现象, 这一结果与文献[3]的报道相似。因组分 III 含量少, 难以收集到足以供进行中毒实验的量。

中科院福建物质结构研究所陈明晃, 郭卫东和叶晓明对本文工作给予诸多协助和支持, 谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 郑硕. 生物化学与生物物理进展, 1987; (4): 19
- 2 郑硕. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(1): 16
- 3 Stirpe F et al. *Biochem J*, 1976; 156: 1
- 4 Weber K, Osborn M. *J Biol Chem*, 1969; 244: 4406
- 5 蔡武城等编. 生物化学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1983; 19—21
- 6 苗积生, 吴吉勇, 沈毅等生物化学与生物物理进展, 1987; (4): 59

[本文于 1990 年 2 月 8 日收到, 1990 年 7 月 3 日修回]

(上接第 136 页)

- 8 Hasegawa Y, Kunihara M, Maruyama Y. *J Chromatogr*, 1982; 239: 335
- 9 Beilharz G R, Middlehurst C R et al. *Anal Biochem*, 1984; 137: 324
- 10 Yu Bi, Zeng Xianying, Weigelt H. *Int J Microcirc: Clin Exp*, 1986; 5(1): 107
- 11 Yu Bi, Chinese patent 87014761, 1987
- 12 Yu Bi. *Chinese J Physiological Science*, 1989; 5(1): 10
- 13 Yu Bi, Zhang Yiqun, Hong Wenbin. *Biosensors & Bioelectronics*, 1990; 5: 215
- 14 Jope R S, Jenden D J, Ehrlich B E et al. *N Engl J Med*, 1978; 299: 833

- 15 Ehrlich B E, Diamond J M. *J Membrane Biol*, 1980; 52: 187
- 16 Lingsch C, Martin K. *Br J Pharmacol*, 1976; 57: 323
- 17 Jope R S. *J Neurochem*, 1979; 33: 487
- 18 Ehrlich B E, Diamond J M. *Am J Physiol*, 1979; 237 (1): C102
- 19 Bogdan E C, Beilharz G R, York M J et al. *Biochemical and biophysical research communications*, 1972; 105 (4): 1280
- 20 Michelson M J, Zeimal E V. In: Alexander P, Bacq Z M eds, *International series of monographs in pure and applied biology*, V 38, New York, 1973: 28

[本文于 1990 年 2 月 13 日收到, 6 月 4 日修回]