

studied. The results show that alternative pulse electric field obviously decreases the depolarization ratio of the diffracted light from intact fibers but it does not change that from skinned fibres. Static magnetic field does not affect the depolarization ratio from either intact or skinned fibers. It is suggested that changes of spatial disposition but not conformation of the contractile proteins take place during muscle contraction caused by electric field and that during the transition from weakly-binding state to strongly-binding state

the crossbridges (particularly subsegment-2) move towards actins, thus the average tilt of crossbridges relative to the backbone of thick filaments is increased. It is also shown that static magnetic field with field strength could not exert apparent influence on both the electric properties of cell membrane and the contractile protein movement within skeletal muscle fiber.

Key words electromagnetic field effect, single skinned skeletal muscle fiber, ellipsometry, depolarization ratio, crossbridges

老年学习记忆减退大鼠脑突触体膜流动性改变

洪 岸 姚志彬 顾耀铭 陈以慈

(中山医科大学人体解剖教研室, 广州 510089)

摘要 选用 Morris 水迷宫将老年大鼠分为学习记忆正常和学习记忆减退两部分, 采用荧光偏振技术, 对青年、老年记忆正常和老年记忆减退鼠脑分离突触体膜流动性进行测定, 并检测神经节苷脂 GM1 对膜流动性的影响. 结果表明老年记忆减退鼠新皮质、海马结构突触体膜荧光各向异性明显增加, 即膜流动性显著降低, GM1 对膜流动性有明显改善作用. 相关分析表明新皮质、海马结构突触膜流动性与老年学习记忆减退密切相关, GM1 的积极作用为临床治疗提供实验依据.

关键词 老年学习记忆减退, 脑分离突触体, 膜流动性, 大鼠

细胞膜流动性的研究不仅是生物物理学的一个重要课题, 在医学的许多领域中也日益受到重视. 如肿瘤细胞、血细胞膜流动性的研究已有较多文献报道, 神经系统老化机制还提出了膜假说^[1,2], 其中包括膜脂质微粘度增加(膜流动性降低)和脂质过氧化等. 近年来在医学领域虽然对细胞膜流动性的研究已取得了一些成果, 但对于各种疾病, 细胞膜流动性到底发生了怎样的变化还在探索之中. 作为脑重要的高级活动——学习记忆与细胞膜流动性的关系如何, 国内外均未见报道. 本实验采用现代生物物理技术——荧光偏振, 对老年学习记忆减退大鼠脑突触体膜流动性进行测定, 旨在阐明

老年学习记忆减退与脑突触体膜流动性的关系, 并检测神经节苷脂 (GM1) 对脑突触体膜流动性的影响, 因 GM1 为哺乳类脑神经节苷脂的主要类型, 且主要集中在神经终末, 有研究表明它与突触传递和行为有关^[3], 故本实验试图通过检测外源性 GM1 对脑突触体膜流动性的影响, 了解其是否有积极作用, 从而为老年学习记忆减退的临床治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 Morris 水迷宫的组成及行为检测

1.1.1 迷宫: 分为水池和自动录像记录系统

两部分. 水池直径 130 cm, 高 50 cm, 水深 30 cm, 水温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 水面覆一层泡沫塑料屑, 池壁上四个等距离点分水池为四个象限, 任选一象限在中央放置平台, 平台直径 12 cm, 高 29 cm, 没于水面下 1 cm, 水池周围参照物保持不变^[4,5].

1.1.2 行为测试过程: 健康雌性 SD 青年大鼠 (3 月龄) 10 只, 老年大鼠 (28 月龄) 34 只, 从水池任一象限开始将大鼠面向池壁放入水中, 自动录像记录系统记录大鼠找到平台所需的时间, 即逃避潜伏期. 找到平台后休息 1 min, 再按序由下一象限入水进行下一次试验. 每只鼠每天 8 次 (上下午各 4 次), 连续 5 d. 以青年鼠平均逃避潜伏期 95% 和 99% 正常值范围上限值为界, 将老年大鼠分为学习记忆减退组和学习记忆正常组.

1.2 脑突触体的分离制备

随机选取青年鼠、老年记忆正常、减退鼠各 5 只, 参照 Dodd 等的快速分离突触体方法^[6], 对三组大鼠的海马结构、新皮质 (额、颞皮质) 进行脑突触体快速分离制备, 将得到的纯突触体悬浮于标准生理盐溶液 (Na-PSS) 中.

1.3 突触体蛋白浓度测定

采用 Bradford 测定法^[7], 先以牛血清白蛋白制作标准蛋白曲线, 然后测定每管突触体的蛋白浓度.

1.4 突触体膜各向异性测定

采用荧光偏振技术^[8]将待测各管突触体悬液的蛋白浓度调整到 120~140 mg/L, 加入等体积荧光探针 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯 (DPH, Sigma 公司) 工作液 (2 mmol/L DPH-四氢呋喃母液 500 μl 加入 50 ml 0.01 mol/L PBS 中, 振荡混合 10 min, 即成 20 $\mu\text{mol/L}$ DPH 工作液) 使成终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$, 于 37°C 水浴箱中孵育 15 min, 冷冻超速离心机离心, $13\ 000\text{ g} \times 2\text{ min}$, 将沉淀的突触体悬浮于 Na-PSS 液中, 37°C 均衡 10 min, 借助 350 型荧光分光光度计 (Hitachi 公司, 连水浴加热器), 测定其荧光强度, 激发波长 360 nm, 发射波长 430 nm. 由公式计算荧光各向异性 r .

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH})$$

(式中 G 为仪器检测偏振时的校正因子)

1.5 神经节苷脂 GM1 对膜流动性的影响

在负载了荧光探针 DPH 的突触体悬液中加入 GM1 储备液 (5 mmol/L), 使终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ ^[3], 37°C 孵育 20 min, 同上测定荧光强度, 计算膜荧光各向异性.

2 结 果

2.1 行为筛选结果

以青年组平均逃避潜伏期 95% 和 99% 正常值范围上限值为界^[9], 将逃避潜伏期大于 99% 正常值范围上限值的老年大鼠视为老年学习记忆减退鼠, 逃避潜伏期小于 95% 正常值范围上限值的老年大鼠视为老年学习记忆正常鼠 (图 1).

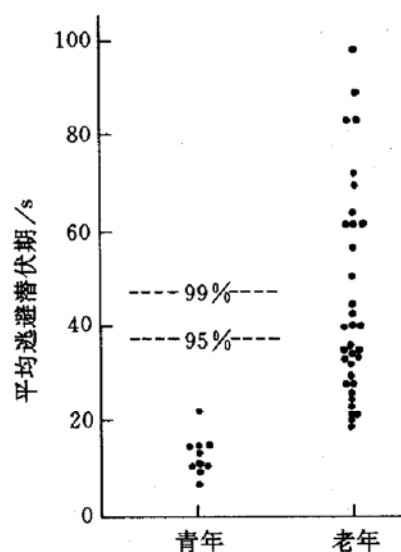


图 1 大鼠行为测试分组

每一圆点代表一只鼠的平均逃避潜伏期, 虚线代表青年组逃避潜伏期 99% 和 95% 正常值范围上限值. 上虚线以上的为老年学习记忆减退鼠, 下虚线以下的为老年学习记忆正常鼠.

2.2 膜荧光各向异性测定结果

三组大鼠新皮质 (额、颞皮质)、海马结构分离突触体膜荧光各向异性 (r) 测定结果显示老年学习记忆减退组较青年组、老年学习记忆

正常组均显著增加 ($P < 0.01$), 即膜流动性明显降低, 而老年正常组与青年组无显著差异 (表 1). 加入 GM1 后, 老年减退组新皮质、海马结构突触体膜荧光各向异性较未加 GM1 时明显减少 ($P < 0.05$) (表 2), 即膜流动性增加, 而对青年组和老年正常组均无影响. 相关分析结果表明大鼠新皮质、海马结构突触体膜荧光各向异性与其逃避潜伏期呈显著正相关关系 (相关系数分别为: $r = 0.68$, $P < 0.01$; $r = 0.65$, $P < 0.01$).

表 1 大鼠脑突触体膜荧光各向异性 (r)

	青年组	老年正常组	老年减退组
海马结构	0.140 ± 0.009	0.133 ± 0.021	0.180 ± 0.027 ¹⁾²⁾
新皮质	0.139 ± 0.014	0.136 ± 0.018	0.182 ± 0.026 ¹⁾²⁾

注: $n = 5$; ¹⁾与青年组比较, $P < 0.01$; ²⁾与老年正常组比较, $P < 0.01$.

表 2 GM1 处理前后老年减退鼠脑突触体膜荧光各向异性

	处理前	处理后
海马结构	0.180 ± 0.027	0.153 ± 0.011 ¹⁾
新皮质	0.182 ± 0.026	0.148 ± 0.012 ¹⁾

注: $n = 5$; ¹⁾与 GM1 处理前相比, $P < 0.05$.

3 讨 论

膜流动性主要取决于膜脂质成分——胆固醇和脂肪酸的含量, 胆固醇增多或不饱和脂肪酸减少使得膜流动性降低, 反之亦然^[2,10]. 本研究发现对于相同年龄的老年大鼠只在学习记忆减退的那部分老年大鼠出现了显著的膜流动性降低, 而学习记忆正常的老年大鼠则无明显改变. 提示学习记忆减退老年大鼠新皮质、海马结构突触体膜胆固醇含量可能增加, 不饱和脂肪酸含量可能减少; 也可能是由于脂质过氧化所致膜流动性降低. 但无论是膜脂成分改变还是脂质过氧化作用, 本研究结果表明膜流动性的改变不仅仅是一个单纯的老化现象, 它与老年学习记忆减退密切相关.

神经元膜的完整性是细胞间通讯, 如递质释放和信号转导一系列生化过程的基础. 突触体膜流动性的降低可使得膜上酶活性降低, 膜受体活动范围减少, 活性降低, 甚至可由于膜硬度的增加压迫膜蛋白使之纵向移位而暴露于膜外或脱落, 丧失其生理功能^[2], 这样势必严重地影响了与神经传递有关的细胞膜内过程, 足以致脑功能异常, 这可能是导致学习记忆减退的原因之一.

外源性 GM1 对老年学习记忆减退大鼠脑突触体膜流动性的改善作用可能是由于补充了膜脂成分, 它可通过受损的突触体膜结构插入膜的内部, 改变膜上脂质和蛋白的构象^[11], 使膜结构与膜功能趋于正常化; 正常大鼠脑突触体膜结构完整, 外源性 GM1 加入后只能存在于膜的外表面, 不能进入膜内改变其正常结构和功能, 故对膜无影响. GM1 对老年学习记忆减退大鼠脑突触体膜流动性的改善作用对临床选择治疗手段有一定的理论指导意义.

参 考 文 献

- 1 Gelbmann C M, Muller W E. *Neurobiology Aging*, 1991; 13: 45
- 2 甘思德. *生理科学进展*, 1991; 22 (3): 240
- 3 von Euler G, Fuxe K, Bondy S C. *Brain Res*, 1990; 508: 210
- 4 Gage F H, Bjöklund A, Stenevi V *et al.* *Science*, 1984; 225: 533
- 5 Morris R. *J Neurosci Meth*, 1984; 11: 47
- 6 林 玲, 吴霞梅. *生理科学*, 1986; 6 (2): 89
- 7 Bradford M M. *Analytical Biochem*, 1976; 72: 248
- 8 von Euler G, Ogren S O, Bondy S C *et al.* *Toxicology*, 1991; 67: 333
- 9 Gage F H, Bjöklund A. *J Neurosci*, 1986; 6: 2837
- 10 林克椿, 聂松青. *生理科学进展*, 1985; 16 (1): 83
- 11 Hansson H A, Holmgren J, Svennerholm L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 3782

Change of Brain Synaptosomal Membrane Fluidity in Aged Learning- and Memory-impaired Rats. Hong An, Yao Zhibin, Gu Yaoming, Chen Yici (Department of Anatomy, Sun Yat-sen University of Medical

Sciences, Guangzhou 510089, China).

Abstract Aged rats were divided into aged memory-impaired rats and normal aged rats based on their behaviour in the Morris water maze. Brain synaptosomal membrane fluidity and the effect of GM1 on it was evaluated by fluorescence polarization technique. The results showed that statistically significant decreases of the synaptosomal membrane fluidity in the neocortex and hippocampal formation were found in the aged memory-impaired rats compared with the young and normal aged

rats, and that GM1 could ameliorate the abnormal membrane fluidity. Correlation analysis indicated that the brain synaptosomal membrane fluidity was closely related to aged learning and memory impairment. It was suggested that GM1 has a potential therapeutic value for aged memory impairment through altering neuronal membrane structure.

Key words aged learning and memory impairment, synaptosomal membrane fluidity, rat

CCL₂₂₉细胞经诱导后蛋白激酶 C 及抑制剂活性的变化

王红梅 于秉治¹⁾ 王芸庆 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 检测以维甲酸 (RA)、1, 25-二羟基维生素 D₃ (1, 25 (OH)₂VD₃) 诱导 2 d、佛波酯 (PMA) 诱导 6 h 的人大肠癌细胞 CCL₂₂₉ 的蛋白激酶 C (PKC) 及其抑制剂活性。结果显示: 诱导后 PKC 总活性升高 ($P < 0.05$); RA、1, 25 (OH)₂VD₃ 诱导引起细胞质 PKC 活性增加, PMA 诱导后细胞膜 PKC 比率 (细胞膜活性/总活性) 显著升高 ($P < 0.01$); 诱导后 PKC 抑制剂活性均降低, 其中 1, 25 (OH)₂VD₃ 组与对照组有显著差异 ($P < 0.05$); 提示 PMA 引起 PKC 从细胞质向细胞膜转移, 不同药物诱导后 PKC 及其抑制剂活性出现不同的相对均衡关系。

关键词 PKC, 抑制剂, 人大肠癌细胞, 诱导分化

细胞的增殖与分化及其调控是细胞生物学中的基本问题之一, 而肿瘤细胞的主要特征在于细胞的增殖分化异常。因此, 研究肿瘤细胞的体外诱导分化, 有助于认识细胞分化及其调控机制。蛋白激酶 C (PKC) 作为信号传递系统的关键酶, 广泛参与细胞的增殖与分化^[1], 它的作用日益受到生物学界与医学界的重视。自 1983 年以来本实验室就系列研究了维甲酸 (RA) 作为有效的分化诱导剂对人早幼粒白血病细胞 HL-60 的诱导分化作用^[2,3]。最近, 我们

发现 RA、1, 25-二羟基维生素 D₃ (1, 25 (OH)₂VD₃), 佛波酯 (PMA) 可从形态学、生物学特性等多方面诱导 CCL₂₂₉ 细胞分化 (另文发表), 为研究 PKC 在其诱导分化中的作用, 本文以 RA、1, 25 (OH)₂VD₃ 及 PMA 诱导人大肠癌细胞 CCL₂₂₉, 检测 PKC 及其抑制剂活性, 观察与研究 PKC 及其抑制剂活性在人大肠癌细胞诱导分化中的变化。

¹⁾中国医科大学生物化学教研室, 沈阳 110001.

收稿日期: 1995-01-20, 修回日期: 1995-07-05