

鸡胚脑细胞谷氨酸释放的模拟微重力效应*

王彦 孙彤 张锦珠**

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用回转器旋转鸡胚蛋研究对脑细胞的模拟微重力生物效应. 采用连续荧光法测量孵化 10 d (E10) 和孵化 13 d (E13) 鸡胚的脑细胞谷氨酸的初始释放速率、在 KCl 去极化及单个电脉冲刺激后的释放速率和释放量以及谷氨酸的含量, 并对旋转处理组和静止对照组进行了比较. 结果如下: 旋转组和对照组脑细胞的谷氨酸初始释放速率没有显著差异, E10 鸡胚经 24 h 旋转后, 在 KCl 刺激下脑细胞的谷氨酸释放速率和释放量皆高于对照组, 经 4 h 旋转后谷氨酸含量显著增高 ($P < 0.01$); 但旋转 24 h 的 E13 鸡胚上述指标皆无显著改变, 表明微重力对鸡胚脑细胞神经递质释放的影响与胚龄有关. 鸡胚脑细胞在电脉冲刺激下谷氨酸释放的动态过程表明: 脉冲电场引起的谷氨酸释放与细胞内钙离子迅速增加有关.

关键词 微重力, 生物效应, 鸡胚, 脑细胞, 谷氨酸释放

学科分类号 Q693

到目前为止已有资料表明微重力引起宇航员的许多生理和病理变化, 如空间运动病、骨丢失、心血管功能和免疫功能下降等现象, 这些变化虽发生于某一局部, 但很可能与神经系统, 尤其与脑有关, 因此研究微重力对脑细胞的影响对发展载人航天事业有重要意义. 利用航天飞行来创造真正的失重环境较为昂贵, 所以人们早已在地面模拟微重力生物效应. 模拟微重力生物效应的方法很多, 其中利用回转器旋转是目前常用的方法之一^[1]. 鸡胚蛋具有便于在回转器上操作的优点, 是模拟微重力生物效应的理想材料. 已有报道说明了回转器旋转能引起鸡胚脑细胞内自由 Ca^{2+} 浓度下降, 脂代谢和能量代谢改变, 同时这些变化与鸡胚龄有关^[2~4].

谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统中的一个主要的兴奋性神经递质, 在脑创伤、脑缺血、脑缺氧和癫痫等中枢神经系统疾病及损伤过程中都伴随谷氨酸释放的增加^[5], 谷氨酸也是禽类中的一种重要的兴奋性神经递质^[6], 局部缺血、尼古丁刺激、烙印刺激引起谷氨酸释放增加^[7~9]. KCl 引起哺乳动物神经细胞谷氨酸释放已有大量报道^[5], 有研究表明鸡胚视网膜神经元和视网膜球形细胞用 KCl 去极化引起谷氨酸释放增加^[10]. 利用连续电脉冲刺激可引起鼠小脑粒细胞谷氨酸释放升高^[11]. 到目前为止, 还未见有关微重力对神经细胞谷氨酸释放影响的报道. 本文报道在模拟微重力生物效应条件下对鸡胚脑细胞神经递质释放影响的实验结果.

1 材料和方法

1.1 试剂、材料和仪器

L-谷氨脱氢酶购自 Boehringer 公司 (Type 127710) 和 Sigma 公司 (Type G-2626), NADP⁺ 购自 Sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

实验选用受精的莱亨鸡胚全脑为材料. 鸡胚蛋旋转采用本所江丕栋教授实验室制作的电动回转器. 将胚蛋重心落在转轴上, 鸡胚的纵轴与转轴垂直, 胚蛋呈逆时针旋转, 转速为 60 r/min, 整个回转器置 37℃ 孵育箱中. 电脉冲由美国 PDS 生物工程仪器公司的基因转导系统 (ZA2025) 发生. 电极由两片平行的不锈钢片构成, 电极间距 5 mm. 荧光分光光度计为 HITACHI F-4500.

1.2 样品制备

取孵化第 10 天 (E10) 和孵化第 13 天 (E13) 的胚蛋置回转器中旋转 4 h 和 24 h 作为旋转组, 同时取在回转器中静置相同时间的胚蛋作为对照组. 将鸡胚全脑于温孵液 (NaCl 125 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl_2 1 mmol/L, Na_2HPO_4 1.2 mmol/L, NaHCO_3 5 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, Hepes 20 mmol/L, pH 7.4) 中洗两次, 剪碎后轻轻吹打,

* 国家高技术航天领域 863-2-7-2-14 基金资助项目和国家自然科学基金资助项目 (39770208).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888578, E-mail: changjj@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-05-21, 接受日期: 2001-06-28

200 目尼龙网过滤, 滤液用温孵液 (含 0.2% BSA, V 型) 悬浮, 调整细胞浓度至 $10^6/\text{ml}$. 这样制备样品经台盼蓝染色鉴定活细胞高于 95%.

1.3 鸡胚胎细胞谷氨酸释放及含量的测定

神经细胞释放的谷氨酸在谷氨酸脱氢酶作用下, 和 NADP^+ 反应生成 NADPH 和酮戊二酸, 生成的 NADPH 的量与谷氨酸释放量相对应, NADPH 的量可由激发波长 340 nm, 发射波长 460 nm 的荧光强度灵敏地反映出来, 基于此原理, 利用连续荧光法可连续测定谷氨酸释放的动态过程^[5].

在 3 ml 的石英比色杯中加入 2 ml 细胞悬浮液 ($10^6/\text{ml}$), 加入 NADP^+ 至终浓度 1 mmol/L, CaCl_2 至终浓度 1.3 mmol/L, 于 37 °C 恒温水浴中平衡 5 min 后, 加入 L-谷氨酸脱氢酶 50 U 并连续记录荧光值的变化, 测谷氨酸的初始释放, 待曲线稳定后加入 KCl (终浓度 50 mmol/L) 测 KCl 去极化引起的谷氨酸释放, 最后加入 TritonX-100 至终浓度 0.5%, 测细胞的谷氨酸含量.

检测电脉冲刺激引起的谷氨酸释放时, 方法基本相同. 先将电极片放入比色杯中, 使电极片与光路平行. 首先测谷氨酸的初始释放, 待曲线稳定后, 施加一个方波电脉冲 (幅度为 1 kV/cm, 宽度为 50 μs), 测电脉冲刺激引起的谷氨酸释放.

谷氨酸的释放量和细胞的谷氨酸含量根据标准曲线计算出. 谷氨酸释放速率由释放曲线斜率求出, 以单位时间内谷氨酸的浓度变化值表示 (nmol/min), 释放量以每段释放曲线所达到的最高点与起始点对应的谷氨酸浓度差表示 ($\text{nmol}/10^6$), 细胞的谷氨酸含量用含 10^6 个细胞的悬液中谷氨酸的总浓度表示 ($\text{nmol}/10^6$). 另外以温孵液和不加 NADP^+ 的细胞悬浮液做为空白对照.

1.4 数据分析

各项实验进行 8~9 次重复, 用 Statistic 软件进行数据分析和作图, 并用 t 检验法比较组间差异的显著性.

2 结 果

2.1 KCl 刺激引起的鸡胚胎细胞谷氨酸释放

图 1 示利用连续荧光法^[6]测得的鸡胚胎细胞谷

氨酸释放的动态过程. 全过程分为三个阶段: 初始释放阶段 (1)、KCl 刺激后释放阶段 (2) 和细胞总谷氨酸完全释放阶段 (3). 图 2 为前两个阶段的典型例子, 给出 E10 和 E13 旋转组与对照组的鸡胚胎细胞在 50 mmol/L KCl 作用下谷氨酸释放的动态过程. 图 2 中可见: E10 鸡胚 24 h 旋转组与对照组的初始释放速率没有明显差异, 但在 KCl 作用下, 旋转组受刺激后谷氨酸释放速率和释放量明显高于对照组. 而经 4 h 旋转的 E10 鸡胚胎细胞 KCl 刺激后的释放速率和释放量则与对照组没有显著差异 (表 1). E13 鸡胚 24 h 旋转组和对照组在 KCl 的作用下均由较低的初始释放速率迅速上升, 但刺激后释放速率和释放量没有显著差异 (图 2 和表 1).

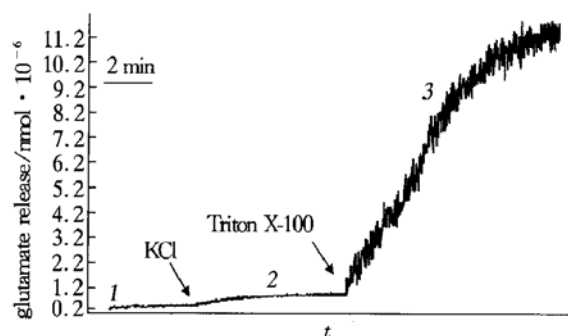


Fig. 1 Dynamic process of glutamate release from brain cells of E10 chicken embryos rotated in a clinostat for 4 h
1, 2, 3 shows respectively the initial release, KCl induced release, intracellular total glutamate release by adding Triton X-100.

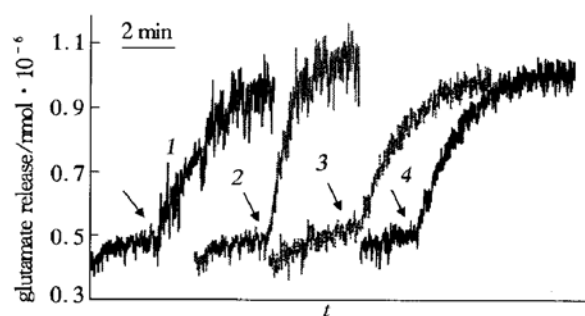


Fig. 2 Dynamic process of glutamate release from brain cells depolarized by KCl

The arrows show the start point of adding 50 mmol/L KCl. The curve 1, 2, 3, 4 represents E10 control, E10 rotated for 24 h, E13 control, E13 rotated for 24 h respectively.

Table 1 KCl-induced release of glutamate from brain cells of embryonic chicks

Group	Initial release rate	KCl-induced release rate	Release content by KCl
	/ nmol·min ⁻¹	/ nmol·min ⁻¹	/ nmol·10 ⁻⁶
E10 Rotated 4 h	0.047 ± 0.009	0.165 ± 0.015	0.530 ± 0.030 ²⁾
E10 Control 4 h	0.042 ± 0.007	0.158 ± 0.013	0.485 ± 0.030
E10 Rotated 24 h	0.046 ± 0.009	0.304 ± 0.006 ¹⁾	0.567 ± 0.025 ²⁾
E10 Control 24 h	0.040 ± 0.001	0.160 ± 0.003	0.479 ± 0.021
E13 Rotated 24 h	0.047 ± 0.008	0.158 ± 0.017	0.503 ± 0.036
E13 Control 24 h	0.043 ± 0.007	0.155 ± 0.013	0.495 ± 0.031

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$. $\bar{x} \pm s$, $n = 9$, ($n = 3$ for E10 24 h).

2.2 电脉冲引起的脑细胞谷氨酸释放的动态过程

与 KCl 刺激引起的谷氨酸释放过程不同, 鸡胚脑细胞在单个电脉冲刺激下由较低的初始释放速率瞬间上升 (快释放过程), 几秒钟后释放速率又变得缓慢 (慢释放过程). 在电脉冲作用下, E10 鸡胚 4 h 旋转组及 E13 鸡胚 24 h 旋转组与对照组相比, 慢释放速率和释放量虽没有显著差异, 但均低于在 KCl 作用下的谷氨酸释放速率和释放量 (图 3 和表 2).

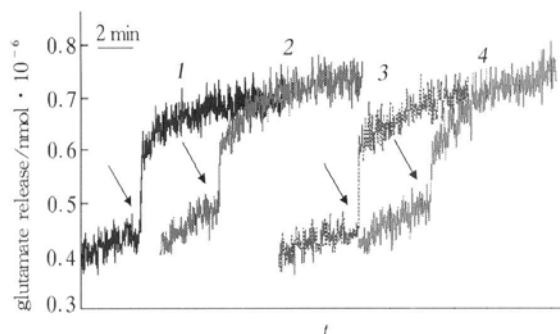


Fig. 3 Dynamic process of glutamate release from brain cells induce by a single electric pulse (1 kV/cm, 50 μ s)

The arrows show the start point of applying the pulse. The curve 1, 2, 3, 4 represents E10 control, E10 rotated for 4 h, E13 control, E13 rotated for 24 h respectively.

Table 2 Electric pulse induced glutamate release from brain cells of embryonic chicks

Group	Pulse induced release	Release content by pulse
	rate/ nmol·min ⁻¹	/ nmol·10 ⁻⁶
E10 Rotated 4 h	0.058 ± 0.013	0.250 ± 0.017
E10 Control 4 h	0.052 ± 0.009	0.251 ± 0.018
E13 Rotated 24 h	0.056 ± 0.005	0.253 ± 0.019
E13 Control 24 h	0.048 ± 0.010	0.264 ± 0.020

Compared with control group, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$.

2.3 回转器旋转对鸡胚脑细胞的谷氨酸含量的影响

图 4 为鸡胚脑细胞在加入 TritonX-100 后 (图 1) 得到的细胞谷氨酸含量的比较. 从图 4 中可以看出: E10 鸡胚旋转 4 h 后, 细胞的谷氨酸含量显著升高 ($P < 0.01$), 而 E13 鸡胚旋转 24 h 后与对照组相比没有显著性差异.

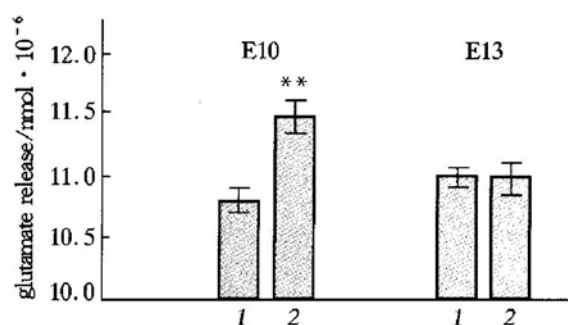


Fig. 4 Comparison of intracellular glutamate contents of brain cells between rotated embryos and the controls

E10 rotated for 4 h and E13 for 24 h. ** $P < 0.01$, $\bar{x} \pm s$, $n = 9$.

1: control; 2: rotated embryos.

3 讨 论

由于在地面上无法摆脱地球引力, 因此是无法模拟微重力的, 但利用某些方法可以模拟微重力的生物效应. 根据生物体识别重力方向改变的本领是有限的, 可以利用回转器旋转模拟对它们的微重力生物效应. 利用回转器对不同发育阶段的鸡胚进行不同时间的旋转等一系列实验, 我们曾观察到: E10 鸡胚旋转 4 h 后其脑细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 而 E13 鸡胚需旋转 24 h 后其脑细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 才出现升高; 鸡胚脑细胞内脂代谢和能量代谢及 ATP 的含量等因旋转而发生改变, 同时这些变化与胚龄有关^[2~4]. 国外航天搭载实验表明^[13, 14], 早期的胚蛋在空中不能孵化出小鸡, 但 E9 和 E10

鸡胚可正常发育. 因此该实验重点研究了 E10 和 E13 鸡胚旋转 4 h 和 24 h 后对脑细胞谷氨酸释放的影响. 得到的实验结果表明: E10 鸡胚旋转 4 h 和 24 h 与对照组相比, 脑细胞初始释放速率 (未加任何刺激的) 没有显著性差异; 旋转 24 h 后, 在 KCl 作用下旋转组谷氨酸释放速率和释放量皆高于对照组; E10 鸡胚旋转 4 h 后, 与对照组相比细胞谷氨酸含量显著升高; 但旋转 24 h 的 E13 鸡胚旋转组和对照组上述指标没有显著改变, 表明 E10 鸡胚比 E13 鸡胚对微重力更敏感; E10 旋转后对 KCl 刺激的敏感性增高. 上述谷氨酸递质释放实验结果与已往的实验结果相一致^[2~4].

神经细胞内的谷氨酸包括起神经递质作用和单纯起代谢作用的谷氨酸^[5]. E10 鸡胚旋转 4 h 后细胞内谷氨酸含量升高, 然而初始释放和刺激后释放都没有显著升高, 说明谷氨酸含量升高可能是由于细胞内起代谢作用的谷氨酸浓度增加引起的, 它较其他指标对微重力更敏感.

采用连续荧光法能实时地研究谷氨酸释放动态过程. 电脉冲刺激表现出与 KCl 不同的谷氨酸释放的动态过程. 谷氨酸释放有依赖 Ca^{2+} 和不依赖 Ca^{2+} 的两种方式, 依赖 Ca^{2+} 的谷氨酸释放伴随着 Ca^{2+} 的快速内流先是很快, 然后减慢^[5]. Beani 等^[11]发现 20 Hz 脉冲电场引起谷氨酸释放的同时, 细胞内 Ca^{2+} 浓度同步升高, 认为电脉冲引起的谷氨酸释放具有 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依赖性. 电脉冲引起鸡胚脑细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速增加已被报道^[12]. 本实验中所观察到的在电脉冲作用下谷氨酸释放动态过程, 先是快释放过程, 几秒钟后变为慢释放过程, 说明外电场引起的脑细胞谷氨酸释放与细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速增加有关.

致谢 衷心感谢江丕栋教授等提供的各种回转培养装置.

参 考 文 献

- 1 江丕栋, 傅世密, 郑克, 等. 在地面进行微重力生物学模拟用的回转器. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17 (2): 141
- 2 陈雅, 沈宏略, 于文斗, 等. 回转器旋转对鸡胚脑细胞周期的影响. 生物物理学报, 1997, 13 (1): 107~112
- 3 陈雅, 沈宏略, 孙彤, 等. 回转器旋转对鸡胚脑细胞内游离 Ca^{2+} 水平的影响及其恢复. 航天医学与医学工程, 1998, 11 (6): 447~450
- 4 孙彤, 沈宏略, 王彦, 等. 鸡胚脑细胞内磷脂代谢的微重力生物效应的 ^{31}P -NMR 谱研究. 中国科学 (C 辑), 2000, 30 (2): 171~176
- 5 Sun T, Shen H L, Wang Y, et al. Scin Chin (Series C), 2000, 43 (4): 354~360
- 6 Nicholls D G. Release of glutamate, aspartate and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. J Neurochem, 1989, 52 (2): 331~341
- 7 Kataoka Y, Ohmori H. Of known neurotransmitters, glutamate is the most likely to be released from chick cochlear hair cells. J Neurophysiol, 1996, 76 (3): 1870~1879
- 8 Horner C H, Davies H A, Stewart M G. Hippocampal synaptic density and glutamate immunoreactivity following transient cerebral ischaemia in the chick. Eur J Neurosci, 1998, 10 (12): 3913~3917
- 9 Daniel S M, Mark J S H, Shari G, et al. Nicotine Enhancement of fast Excitatory Synaptic Transmission in CHS by presynaptic receptors. Science, 1995, 269 (5231): 1692~1696
- 10 Tsukada Y, Kanamatsu T, Takahara I I. Neurotransmitter release from the medial hyperstriatum ventrale of the chick forebrain accompanying filial imprinting behavior by *in vivo* microdialysis. Neurochem Res, 1999, 24 (2): 315~320
- 11 Duarte C B, Santos P F, Prieto J S, et al. On-line detection of glutamate release from cultured chick retinospheroids. Vision Res, 1996, 36 (13): 1867~1872
- 12 Beani L, Antonelli T, Tomasini C, et al. The muscarinic modulation of $[\text{H}^3]$ D-aspartate efflux and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels in rat cerebellar granule cells. Brain Res, 1997, 765 (1): 91~100
- 13 陈雅, 王彦, 孙彤, 等. 脉冲电场对粒细胞内 Ca^{2+} 浓度影响的动态变化. 中国科学 (C 辑), 1999, 29 (6): 663~668
- 14 Chen Y, Wang Y, Sun T, et al. Scin Chin (Series C), 2000, 43 (1): 75~81
- 15 Suda T. Lessons from the space experiment SL-J/FMPT/L7: the effect of microgravity on chicken embryogenesis and bone formation. Bone, 1998, 22 (5 Suppl): 73S~78S
- 16 Kenyon R V, Kerschmann R, Sgarioni R, et al. Normal vestibular function in chicks after partial exposure to microgravity during development. J Vestib Res, 1995, 5 (4): 289~298
- 17 Jojich L, Pourcho R G. Glutamate immunoreactivity in the cat retina: A quantitative study. Visual Neuroscience, 1996, 13: 117~133

Simulated Biological Effects of Microgravity on Glutamate Release from Brain Cells of Embryonic Chicks^{*}

WANG Yan, SUN Tong, ZHANG Jir-Zhu (CHANG Jiir-Ju)^{**}

(Department of Molecular Cell Biophysics, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Biological effects of microgravity on brain cells were simulated by rotating chicken embryos in a clinostat during their hatch. Continuous fluorometry was used to study dynamic release of glutamate from brain cells of the embryonic chicks. The initial release rate, the induced release rate, the release content by KCl or by a single electric pulse and the total intracellular glutamate concentration have been compared between rotated and control groups. The results showed that there was no obvious difference in initial release rate between both rotated and controls. The total intracellular glutamate concentration increased significantly ($P < 0.01$) when E10 embryos were rotated for 4 h, and KCl induced release rate and release content from brain cells of E10 embryos rotated for 24 h were higher than those from controls. However, there was no significant difference in the total intracellular glutamate concentration and the KCl induced release rate, release content from brain cells of E13 embryos between rotated and their control groups. These results suggest that the releasing behaviors of neurotransmitters from brain cells can be affected by microgravity and the influence is related to the age of the embryos. The dynamic process of glutamate release from brain cells induced by a single electric pulse shows that the release is related with a rapid increase of the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ following the pulse.

Key words microgravity, biological effect, glutamate release, brain cells, embryonic chicks

^{*} This work was supported by grants from space project (863-2-7-2-14) and the National Nature Science Foundation of China (39770208).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-64888578, E-mail: Changjj@sun5.ibp.ac.cn

Received: May 21, 2001 Accepted: June 28, 2001