

# 细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 对可释放囊泡库的影响

阳小飞 荣伊 周仲燕

(中南民族大学 生物医学工程学院, 脑认知国家民委重点实验室,

医学信息分析及肿瘤诊疗湖北省重点实验室, 膜离子通道与药物研发实验室, 武汉 430074)

**摘要** 目的: 探讨细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  对可释放囊泡库的影响. 方法: 取体外培养成熟的新生鼠大脑皮层神经元细胞, 分别对正常细胞、去除细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  的细胞、同时去除细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  的细胞, 记录微小型兴奋性突触后电流(mEPSCs) 和微小型抑制性突触后电流(mIPSCs), 观察兴奋性和抑制性突触可释放囊泡库(RRP) 大小, 研究细胞外和细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  对细胞胞吐的不同影响. 结果: 去除神经元细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  和细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  均对 mEPSCs 和 mIPSCs 的电流频率有抑制作用, 细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  对 RRP 大小并无显著影响, 而去掉细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  可引起细胞内 RRP 的显著降低. 结论: 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  可影响 RRP 的维持.

**关键词** 1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-*N,N,N,N*-四乙酸四(乙酰氧基甲酯); 大脑皮层神经元; 囊泡释放; 可释放囊泡库

中图分类号 Q426 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2019)03-0362-04

DOI 10.12130/znmzdk.20190308

引用格式 阳小飞, 荣伊, 周仲燕. 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  对可释放囊泡库的影响[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2019, 38(3): 362-365.

YANG Xiaofei, RONG Yi, ZHOU Zhongyan. Effect of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on readily releasable pool [J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition), 2019, 38(3): 362-365.

## Effect of intracellular $\text{Ca}^{2+}$ on readily releasable pool

YANG Xiaofei, RONG Yi, ZHOU Zhongyan

(Laboratory of Membrane Ion Channels and Medicine, Key Laboratory of Medical Information Analysis and

Tumor Diagnosis and Treatment of Hubei Province, Key Laboratory of Cognitive Science of the State Ethnic Affairs

Commission, College of Biomedical Engineering, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Objective: To study the effect of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on readily releasable pool (RRP). Methods: Cerebral cortical neuron cells in mature neonatal rat were cultured *in vitro*. Spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs), miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs), excitatory and inhibitory RRP size in cultured cortical neurons with or without extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  were recorded, respectively. Results: The current frequencies of mEPSCs and mIPSCs were reduced in neurons lacking both the extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . The size of RRP was not affected by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  but was reduced significantly upon removing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Conclusion: Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  may affect the maintenance of the RRP size of cortical neurons.

**Keywords** BAPTA-AM; cerebral cortical neurons; vesicle release; RRP

在神经网络中, 神经元细胞间的信号传递需要囊泡释放包裹的神经递质, 单个囊泡释放出的神经递质与突触后膜上的受体结合, 引起电流的变化, 即微小型兴奋性突触后电流(mEPSC) 或微小型抑制性突触

后电流(mIPSC)<sup>[1,2]</sup>. 神经元细胞中可释放囊泡库(RRP)<sup>[3]</sup>的大小影响囊泡的自发性释放.  $\text{Ca}^{2+}$ 在囊泡释放中发挥重要作用. 当囊泡靠近突触前膜时, 随着  $\text{Ca}^{2+}$  的通透性增加, 细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 推动囊泡与

收稿日期 2018-09-05

作者简介 阳小飞(1979-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 神经信号转导, E-mail: sunlittleyfly@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31670850); 中南民族大学科学基金引进人才科研启动基金自科项目(ZZ130020)

突触前膜的融合、释放,引起突触后的电位变化<sup>[4-6]</sup>.在正常情况下,当细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度过高时,激活某些蛋白酶、磷脂酶及内源性核酸酶等,导致细胞凋亡<sup>[7]</sup>;但当神经元细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度过低甚至无  $\text{Ca}^{2+}$  存在时,对细胞会造成什么样的影响,目前尚无定论.

BAPTA-AM 是一种乙酰甲酯衍生物,细胞膜对其通透性较强,当它进入细胞内,在酯酶的作用下分解出 BAPTA,后者是一种高效  $\text{Ca}^{2+}$  络合剂,它亲和力强,能快速与细胞内游离的  $\text{Ca}^{2+}$  结合,在细胞内营造出无  $\text{Ca}^{2+}$  的状态<sup>[8,9]</sup>.运用此方法,可有效地去除细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ .本文通过全细胞膜片钳记录的方法,探讨去除细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  及同时去除细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  对大脑皮层神经元自发性囊泡释放的影响及原理,为研究中枢神经系统的囊泡分泌提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

胎牛血清、MEM 培养基、0.25%胰蛋白酶、转铁蛋白、B-27 supplement (Gibco); BAPTA-AM、胰岛素、葡萄糖、HEPES、阿糖胞苷、EGTA、多聚赖氨酸 (Sigma); 二甲苯、丙酮、无水乙醇等(国药集团化学试剂); 印防己毒素, Tocris 1128, 1 g; 河豚毒素, Affix Scientific 4368-28-9, 1 mg; CNQX, Tocris 1045, 10 mg.

倒置显微镜 (Olympus); 全套自动膜片钳放大器 (HEKA); P-97 微电极拉制仪 (普升科技);  $\text{CO}_2$  恒温细胞培养箱 (Thermo); 超净工作台 (苏州 Air Tech); 高压灭菌锅 (上海博讯).

### 1.2 实验溶液配制

按照文献<sup>[10,11]</sup>配制神经元解剖液、神经元培养基、电生理正常细胞外液、0 Ca 细胞外液、电生理细胞内液、10 mmol/L BAPTA-AM 母液(溶于 DMSO).

### 1.3 原代鼠脑皮层神经细胞的获取

取出生 <24 h 的新生 KM 小鼠,无菌环境下断头取脑,分离出大脑皮层,用 0.25% 的胰蛋白酶在 37 °C 恒温环境中消化 12 min,用神经元培养基分散细胞后,滴种在用多聚赖氨酸处理过的玻片上,放入细胞培养箱,分别在第 1, 4, 9 d 换液.

### 1.4 电生理记录

将获取的大脑皮层神经细胞体外培养 13, 14 d 后,对细胞进行电生理记录.采用全细胞膜片钳技术,在 -70 mV 的钳制电压下记录电流.记录 mEPSC 时,在细胞外液中加入 100  $\mu\text{mol/L}$  的 GABA 受体阻断剂 PTX 和 1  $\mu\text{mol/L}$  的 Na 通道阻断剂 TTX; 记录 mIPSC 时,在细胞外液中加入 10  $\mu\text{mol/L}$  的 AMPA 受体阻断

剂 CNQX 和 1  $\mu\text{mol/L}$  的 Na 通道阻断剂 TTX<sup>[12,13]</sup>.

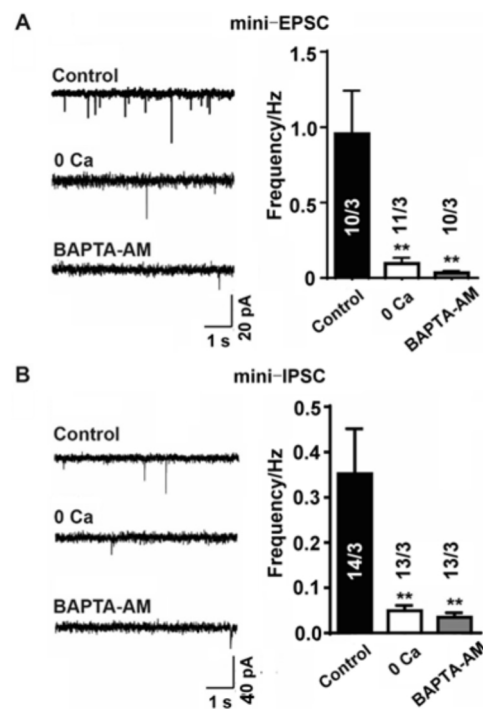
### 1.5 数据处理

用 Pclamp 10 记录并导出数据后,再用 Igor Pro Folder, GraphPad Prism 进行处理分析.3 次独立实验之后进行数据分析,用 *t* 检验进行差异分析,\* 表示显著性差异.

## 2 结果

### 2.1 细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 和细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 对大脑皮层神经细胞囊泡释放的影响

为研究神经元细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  和细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  对神经递质释放的影响,对体外培养成熟的神经元细胞进行电生理记录.实验分为 3 组,取大脑皮层细胞在正常外液、0 Ca 外液、加入 10  $\mu\text{mol/L}$  BAPTA-AM 的 0 Ca 外液中孵育 30 min 后,分别在上述 3 种外液中记录 mEPSC, 结果见图 1.



A) 在正常外液、0 Ca 外液、加入 10  $\mu\text{mol/L}$  BAPTA-AM 的 0 Ca 外液中孵育 30 min 后分别在正常外液、0 Ca 外液、0 Ca 外液中记录 mEPSC; B) 在正常外液、0 Ca 外液、加入 10  $\mu\text{mol/L}$  BAPTA-AM 的 0 Ca 外液中孵育 30 min 后分别在正常外液、0 Ca 外液、0 Ca 外液中记录 mIPSC. \*\*  $P < 0.01$  vs. control  $\bar{x} \pm s$   $n = 3$

图 1 细胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  对大脑皮层神经元自发性囊泡释放的影响

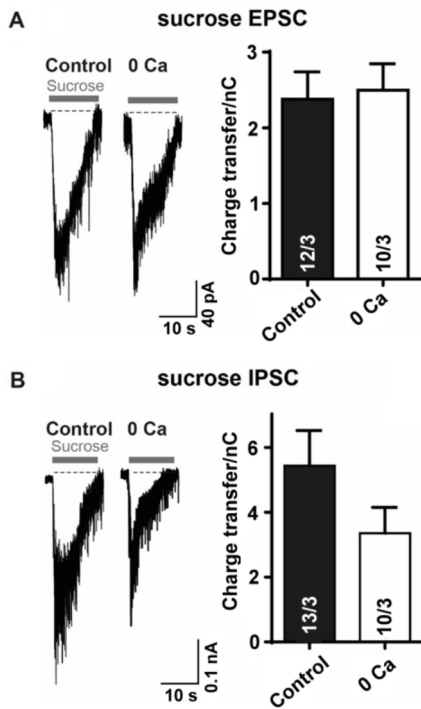
Fig.1 Effects of extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on spontaneous vesicle release in cortical neurons

当外液中无  $\text{Ca}^{2+}$  时, mEPSC 频率降低; 当外液中的  $\text{Ca}^{2+}$  和细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  同时不存在时, mEPSC 频率进一步降低(见图 1A); 同样的方法记录 mIPSC 时,

发现在 0 Ca 外液中 mIPSC 的频率降低,进一步络合细胞内 Ca<sup>2+</sup>后, mEPSC 的频率稍微降低(见图 1B)。结果表明:去除细胞外 Ca<sup>2+</sup>对神经细胞的囊泡释放有抑制作用( $P < 0.01$ ),同时去除细胞外 Ca<sup>2+</sup>和细胞内 Ca<sup>2+</sup>对囊泡释放也有抑制作用。

### 2.2 细胞外 Ca<sup>2+</sup>对大脑皮层神经细胞内可释放囊泡库的影响

取体外培养 13 d 的大脑皮层神经元细胞分别在加入 TTX 和 PTX 的正常外液和 0 Ca 外液中记录兴奋性突触可释放囊泡库大小,即在记录过程中给予所记录细胞 30 s 的 0.5 mol/L 蔗糖溶液的刺激,在高渗溶液下,通过物理刺激将细胞中的囊泡都释放出来,引起电流变化,记录细胞的可释放囊泡库<sup>[14]</sup>,结果见图 2。



A) 正常外液、0 Ca 外液中兴奋性突触可释放囊泡库大小; B) 正常外液、0 Ca 外液中抑制性突触可释放囊泡库大小。 $\bar{x} \pm s, n = 3$

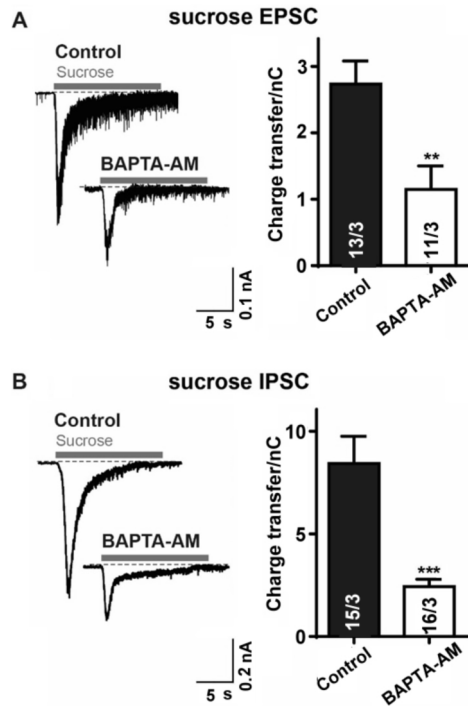
图 2 细胞外 Ca<sup>2+</sup>对大脑皮层神经细胞内可释放囊泡库的影响  
Fig.2 Effects of extracellular Ca<sup>2+</sup> on RRP in cortical neurons

在正常外液中和 0 Ca 外液中的可释放囊泡库无显著性差异(见图 2A);同等条件下,在加入 TTX 和 CNQX 的正常外液中和 0 Ca 外液中记录抑制性突触可释放囊泡库大小,同样无显著性差异(见图 2B)。因此,认为细胞外 Ca<sup>2+</sup>对大脑皮层神经细胞内可释放囊泡库无影响。

### 2.3 细胞内 Ca<sup>2+</sup>对大脑皮层神经细胞内可释放囊泡库的影响

正常外液中加入 DMSO,在 0 Ca 外液中加入 10

$\mu\text{mol/L}$  的 BAPTA-AM,将体外培养成熟的大脑皮层神经元分别置于两组外液中孵育 30 min,再分别在加入 TTX 和 PTX 的正常外液和 0 Ca 外液中记录细胞的兴奋性突触可释放囊泡库大小,结果见图 3。加入 BAPTA-AM 络合细胞内 Ca<sup>2+</sup>后,细胞内可释放囊泡库显著降低( $P < 0.01$ ,见图 3A);相同条件下,改变两组外液中的阻断剂,加入 TTX 和 CNQX,记录抑制性突触可释放囊泡库大小,发现在去除细胞内 Ca<sup>2+</sup>之后的神经元内,可释放囊泡库较正常神经元的可释放囊泡库显著减小( $P < 0.001$ ,见图 3B)。



A) 分别在正常外液、加入 10  $\mu\text{mol/L}$  BAPTA-AM 的 0 Ca 外液中孵育 30 min 后,在正常外液、0 Ca 外液中记录兴奋性突触可释放囊泡库大小; B) 分别在正常外液、加入 10  $\mu\text{mol/L}$  BAPTA-AM 的 0 Ca 外液中孵育 30 min 后,在正常外液、0 Ca 外液中记录抑制性突触可释放囊泡库大小。\* $P < 0.01$  vs. control, \*\* $P < 0.001$  vs. Control  $\bar{x} \pm s, n = 3$

图 3 细胞内 Ca<sup>2+</sup>对大脑皮层神经细胞内可释放囊泡库的影响  
Fig.3 Effects of intracellular Ca<sup>2+</sup> on RRP in cortical neurons

因此,无论兴奋性还是抑制性突触,去除细胞内 Ca<sup>2+</sup>均能引起细胞内可释放囊泡库的减小,引起自发性囊泡释放的减少,即 mEPSC 和 mIPSC 频率的降低。故认为当同时去除细胞外 Ca<sup>2+</sup>和细胞内 Ca<sup>2+</sup>后,抑制自发性囊泡释放的原因是缺乏 Ca<sup>2+</sup>引起囊泡膜与细胞膜融合和可释放囊泡库减小的综合结果。

## 3 讨论

在神经元囊泡释放的过程中,突触前膜对 Ca<sup>2+</sup>的

通透性增强,  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度越高, 对囊泡与突触前膜的融合作用越强, 因此囊泡释放的频率越高。本实验中, 当细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 0 时, 其囊泡释放的频率较正常细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下显著降低, 而两种状况下的细胞内可释放囊泡库无显著变化, 说明细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  仅仅参与囊泡释放的过程, 对于囊泡释放前的反应并无太大的影响。频率降低的原因是当细胞外液无  $\text{Ca}^{2+}$  时, 细胞本身的游离内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达不到促进囊泡释放的浓度, 导致囊泡释放频率降低。

去除细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  并同时用 BAPTA-AM 络合细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  时, 囊泡释放的频率较仅去除细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  时的频率进一步降低, 本实验结果显示: 去除细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  后, 细胞内可释放囊泡库显著减小, 因此囊泡释放频率的降低, 除了无细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  促进囊泡释放这一过程外, 也受到可释放囊泡库减小这一因素的影响。

囊泡在成熟之前要经过不同的阶段, 在神经元细胞里存在着发育到不同阶段的囊泡, 而可释放囊泡库是由感应到细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变高时, 就能迅速与突触前膜融合并释放出神经递质的囊泡组成。

当去除细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ , 引起细胞内可释放囊泡库的减小, 原因是细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  在囊泡产生及发育的过程中起重要作用, 当细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  为 0 时, 囊泡形成的某一阶段受影响, 导致生成的囊泡数量减少。此外, 还可能是细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  不会影响囊泡的形成, 但在维持可释放囊泡库的过程中起至关重要的作用<sup>[15-17]</sup>, 因此, 当细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  为 0 时, 可释放囊泡库里的囊泡不能正常储存, 造成囊泡的流失, 使可释放囊泡库减小; 但细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  对神经元细胞的可释放囊泡库的减小的具体影响有待深入研究。

#### 参 考 文 献

- [1] SARA Y, BAL M, ADACHI M, et al. Use-dependent AMPA receptor block reveals segregation of spontaneous and evoked glutamatergic neurotransmission [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(14): 5378-5382.
- [2] RAMIREZ D M, KAVALALI E T. Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses [J]. *Curr Opin Neurobiol* 2011 21(2): 275-282.
- [3] BUI L, GLAVINOVIĆ M I. Is replenishment of the readily releasable pool associated with vesicular movement? [J]. *Cogn Neurodyn* 2014 8(2): 99-110.
- [4] CHEN Z, DAS B, NAKAMURA Y, et al.  $\text{Ca}^{2+}$  channel to synaptic vesicle distance accounts for the readily releasable pool kinetics at a functionally mature auditory synapse [J]. *J Neurosci* 2015 35(5): 2083-2100.
- [5] BACAJ T, WU D, BURRÉ J, et al. Synaptotagmin-1 and -7 are redundantly essential for maintaining the capacity of the readily-releasable pool of synaptic vesicles [J]. *PLoS Biol*, 2015, 13(10): e1002267.
- [6] SMITH S M, CHEN W, VYLETA N P, et al. Calcium regulation of spontaneous and asynchronous neurotransmitter release [J]. *Cell Calcium* 2012 52(3-4): 226-233.
- [7] BERNTSEN H F, BJØRKLUND C G, STRANDABØ R, et al. PFOS-induced excitotoxicity is dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx via NMDA receptors in rat cerebellar granule neurons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018 357: 19-32.
- [8] IDO K, OHWADA T, YASUTOMI E, et al. Screening quality for  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channel in IonWorks Quattro is greatly improved by using BAPTA-AM and ionomycin [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2013 67(1): 16-24.
- [9] 宋必卫, 褚昭兴. BAPTA-AM 的研究现状 [J]. *中国药理学通报* 2009 25(7): 851-853.
- [10] GONG J, LAI Y, LI X, et al. C-terminal domain of mammalian complexin-1 localizes to highly curved membranes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113(47): E7590-E7599.
- [11] WANG S, CHOI U B, GONG J, et al. Conformational change of syntaxin linker region induced by Munc13s initiates SNARE complex formation in synaptic exocytosis [J]. *EMBO J* 2017 36(6): 816-829.
- [12] YU Y, CHEN S, MO X, et al. Accessory and central  $\alpha$ -helices of complexin selectively activate  $\text{Ca}^{2+}$  triggering of synaptic exocytosis [J]. *Front Mol Neurosci* 2018 11: 61.
- [13] 阳小飞, 梅颖, 余意, 等. 印防己毒素在不同类型突触分泌中的作用 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)* 2016 35(3): 80-84.
- [14] XU S J, WANG P, XIA D. Quantitative analysis of synaptic vesicle release and readily releasable pool size in hippocampal neurons [J]. *Acta Physiologica Sinica* 2009 61(6): 505-510.
- [15] CHUNG C, BARYLKO B, LEITZ J, et al. Acute dynamin inhibition dissects synaptic vesicle recycling pathways that drive spontaneous and evoked neurotransmission [J]. *J Neurosci* 2010 30(4): 1363-1376.
- [16] KAESER P S, REGEHR W G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release [J]. *Annu Rev Physiol* 2014 76: 333-363.
- [17] SARA Y, VIRMANI T, DEÁK F, et al. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission [J]. *Neuron* 2005 45(4): 563-573.

(责任编辑 刘钊)