

神经研究文献专辑 非损伤微测技术

获取更多分类文献专辑

神经研究、毒理（斑马鱼）研究、重金属胁迫、盐胁迫、IAA 研究、极性生长、温度胁迫、水旱胁迫、植物免疫、植物-微生物互动、植物营养 [>>点击获取](#)

中关村 NMT 产业联盟

nmtia.org.cn

扫码获取 2021 最新文献



目 录

NAT CELL BIOL: NMT 发现抗凋亡 Bcl2 家族蛋白可促氧外排与线粒体 ATP 合酶互作调节神经元代谢	1 -
山西医大祁金顺: NMT 证实抗 T2DM 药物维持钙稳态缓解 A β 毒性	5 -
山西医大祁金顺: NMT 在海马脑片神经元跨膜 Ca ²⁺ 流研究中的应用及 A β 效应观察	9 -
EXP NEUROL: Cu 和 β -淀粉样蛋白相互作用可诱导神经元的神经退行性变化在阿尔茨海默氏病的发展中起重要作用	14 -
J Neurochem: 谷氨酸提升胞内钙升高促进耗 O ₂ 消耗 ATP 的毒性机制	16 -
J Biol Eng: 哺乳动物脊髓继发性损伤的电流和 Ca ²⁺ 内流	18 -
PLOS ONE: 长期 β 淀粉样蛋白肽暴露会通过 K ⁺ 外排介导机制导致神经元退行性改变和凋亡	21 -
PLOS ONE: MT-2A 蛋白或成为阿尔茨海默病治疗的新思路	24 -

NAT CELL BIOL: NMT 发现抗凋亡 Bcl2 家族蛋白可促氧外排与线粒体 ATP 合酶互作调节神经元代谢

1. 基本信息

期刊: Nature Cell Biology

主题: NMT 发现抗凋亡 Bcl2 家族蛋白可促氧外排与线粒体 ATP 合酶互作调节神经元代谢

标题: Bcl-x_L regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F₁F₀ ATP synthase

影响因子: 20.042

作者: 耶鲁大学 Elizabeth A. Jonas、Kambiz N. Alavian

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

抗凋亡 Bcl2 家族蛋白 (例如 Bcl-x_L) 通过隔离凋亡分子来保护细胞免于死亡, 但也有助于正常的神经元功能。本研究在海马神经元中发现 Bcl-x_L 增强了能量代谢的效率。本研究的证据表明, Bcl-x_L 与 F₁F₀ ATP 合酶的 β 亚基直接相互作用, 减少了 F₁F₀ ATPase 复合物中的离子泄漏, 从而在 F₁F₀ ATPase 活性期间增加了 F₁F₀ 对 H⁺ 的净转运。通过膜片钳富含 F₁F₀ ATP 合酶复合物的线粒体囊泡, 研究发现, 在存在 ATP 的情况下, Bcl-x_L 活性的药理或遗传抑制作用会增加膜泄漏电导。此外, 重组 Bcl-x_L 蛋白直接增加了纯化的合酶复合物的 ATPase 活性水平, 而抑制内源性 Bcl-x_L 则降低了 F₁F₀ 酶活性水平。本研究的发现表明, 线粒体代谢效率的提高有助于表达 Bcl-x_L 的神经元中突触效能的提高。

3. 检测离子/分子指标

O₂

4. 样品信息

大鼠海马神经元

5. 离子/分子流实验处理方法

- ① GFP-Bcl-x_L 表达神经元与 mito-GFP 表达神经元 CSCW2-荧光素酶慢病毒转染 7 d
- ② 单个不表达神经元或表达 Bcl-x_L shRNA 或混乱 shRNA 的神经元 CSCW2-荧光素酶慢病毒转染 7 d

- ③ 单个神经元 10 μM ABT-737 处理 18 h
- ④ 90 mM KCl 和 5 mg ml^{-1} 寡霉素处理表达 Bcl-x_L-GFP 或 mito-GFP 的单个神经元
- ⑤ 萤火虫荧光素酶在有 1 μM ABT-737 处理海马神经元中的发光 5 min, 随后用 90 mM KCl 处理 90 s。

6. 离子/分子流实验结果

先前的工作描述了过表达 Bcl-x_L 的神经元中线粒体生物量的增加。如果线粒体生物量的增加是造成 ATP 水平升高的唯一原因, 那么表达 Bcl-x_L 的细胞有望增加摄氧量。为了验证这一点, 使用 O₂ 流速微传感器检测单个神经元的氧摄取量 (图 2)。与预期相反, 过表达 Bcl-x_L 的神经元的 O₂ 流速低于转染 mito-GFP 的神经元 (图 1b), 这表明过表达 Bcl-x_L 的神经元更有效地将 ATP 的产生与 O₂ 的吸收结合。内源性 Bcl-x_L 具有类似的作用, 因为 shRNA 介导的消耗 (图 1c, d) 或 Bcl-x_L 活性的药理抑制作用 (图 1e) 增加了神经元的 O₂ 流速。这些数据表明, Bcl-x_L 的消耗或抑制使 ATP 的产生与 O₂ 的摄取解耦联。

从理论上讲, 较高的 ATP 水平和过表达 Bcl-x_L 的神经元的 O₂ 摄取水平较低, 可能是由于电活动和突触活动水平降低而导致 ATP 积累的静止状态。这不太可能, 是因为 Bcl-x_L 过表达的神经元具有比对照更大的突触和更多的自发活动。

因此, 作者研究了过表达 Bcl-x_L 的神经元是否具有更大但未被充分利用的能量。当细胞在高钾条件下去极化时, Bcl-x_L 过表达的神经元 O₂ 流速比基础水平增加了约 90%, 这是一种已知的刺激神经元电活动和突触活动的处理方法 (图 1f), 而 mito-GFP 表达对照则仅增加了 50%。

在氧化磷酸化过程中, 从线粒体基质中泵出的质子通过 ATP 合成酶处的线粒体内膜的 H⁺ 流速 (生产流速) 和 H⁺ 外排 (非生产性) 重新进入基质。减少非生产性外排可提高 ATP 生产效率。为了确定 Bcl-x_L 过表达的神经元在最大活性期间是否有不同程度的非生产性穿过内膜的外排, 高钾被迅速冲洗出去, 并在寡霉素中测量 O₂ 摄取量, 寡霉素抑制与 ATP 生成相关的 H⁺ 流速, 但不抑制与非生产性外排相关的 H⁺ 流速。与 mito-GFP 表达对照相比, GFP-Bcl-x_L 细胞具有更高的产 O₂ 流速与总 O₂ 流速的比值, 表明它们利用更高的整体峰值 O₂ 流速百分比来制造 ATP (图 1g)。

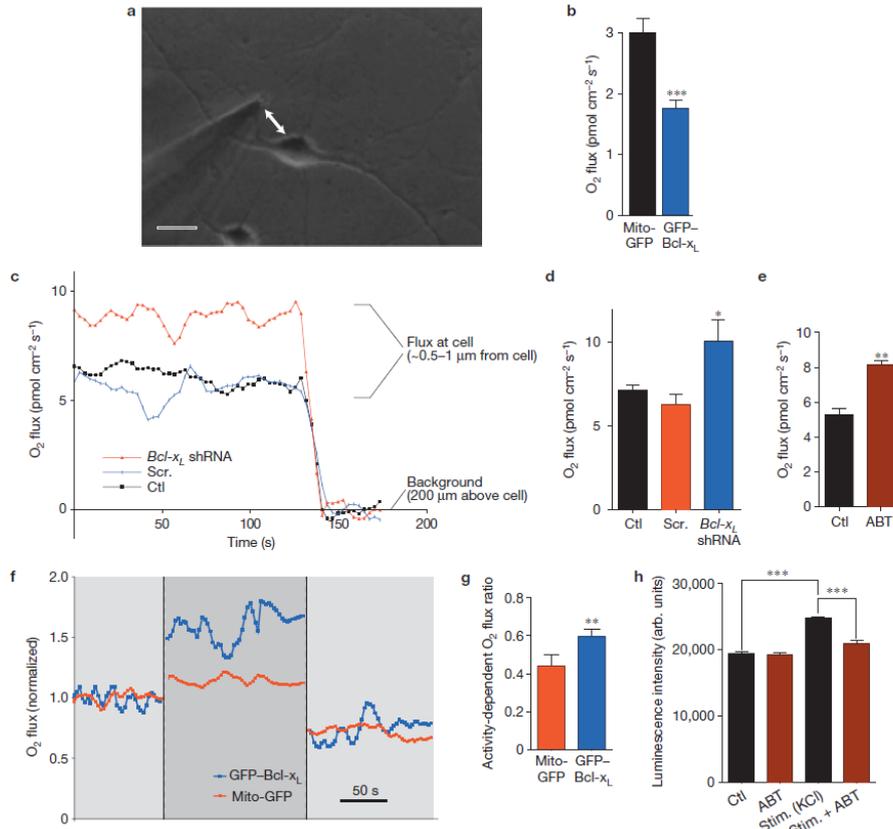


图 1. Bcl-x_L 改变神经元对 O₂ 的吸收

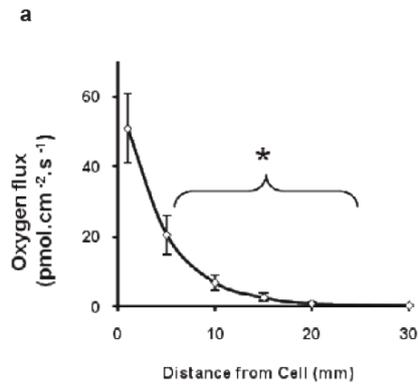


图 2. O₂ 流速水平与 O₂ 流速传感器距细胞的距离成正比

7.其他实验结果

- Bcl-x_L 过表达的神经元 ATP 水平升高, Bcl-x_L 缺失的神经元 ATP 水平降低。
- Bcl-x_L 是刺激引起的代谢变化所必需的。
- Bcl-x_L 定位于线粒体内膜。
- 重组 Bcl-x_L 蛋白增强了 F₁F₀ ATPase 的酶促速率。
- 在 F₁F₀ ATPase 活动期间, Bcl-x_L 抑制减弱 H⁺ 进入亚线粒体囊泡。
- 内源性 Bcl-x_L 是 ATP 结合后抑制膜泄漏所必需的。
- Bcl-x_L 增加线粒体 ATP 的产生, 可使细胞在缺乏 Bax 或 Bak 的情况下免受代谢损害。

8.结论

本研究发现过表达 Bcl-x_L 的神经元具有较高的 ATP 水平, 而内源性 Bcl-x_L 被消耗或抑制的细胞具有较低的 ATP 水平。尽管 ATP 水平升高, 但过表达 Bcl-x_L 的神经元耗氧量较少, Bcl-x_L 消耗增加了氧摄取水平。除其外膜定位外, 研究通过免疫电镜在线粒体基质中发现 Bcl-x_L。Bcl-x_L 与 F₁F₀ ATP 合酶的 β 亚基免疫共沉淀, 与纯化的 F₁ ATP 合酶重组 β 亚基结合。外源施加 Bcl-x_L 使 F₁F₀ ATPase 活性水平升高, Bcl-x_L 抑制使酶促速率降低。Bcl-x_L 缺失使含 F₁F₀-ATPase 的递质线粒体囊泡对 H⁺ 离子的续断能力下降, 表明 Bcl-x_L 消耗引起质子在激活该酶后外排。通过膜片钳检测暴露于 ATP 的含 F₁F₀-ATPase 的囊泡, 记录到 Bcl-x_L 被抑制或耗尽时外渗电导增加。因此, 本研究提出了一个模型, 其中 Bcl-x_L 通过减少 F₁F₀ ATPase 中的质子外排来提高 ATP 合成的效率, 从而改善神经元的新陈代谢。

8.测试液

90 mM KCl, 64 mM NaCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, pH 7.4

山西医大祁金顺: NMT 证实抗 T2DM 药物维持钙稳态缓解 A β 毒性

1. 基本信息

期刊: Neuro Pharmacology

主题: NMT 证实抗 T2DM 药物维持钙稳态缓解脑内 β -淀粉样蛋白毒性

标题: A GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist improves memory behavior, as well as synaptic transmission, neuronal excitability and Ca²⁺ homeostasis in 3xTg-AD mice

影响因子: 4.431

作者: 山西医科大学祁金顺、李甜

2. 中文摘要

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种严重威胁人类健康的进行性神经退行性疾病, 目前为止仍然缺乏有效的治疗方法。2 型糖尿病 (T2DM) 是促使 AD 发生的一个主要因素。该研究报告了一种新型单分子抗糖尿病药物 GLP-1/GIP/Glucagon 三受体激动剂 (Triagonist) 对 3xTg-AD 小鼠的认知和病理学改善有神经保护作用。研究结果显示, 在放射状迷宫测试 (radial maze test) 中, 慢性 Triagonist 治疗能有效地降低 3xTg-AD 小鼠工作记忆和参考记忆的错误。此外, Triagonist 增强了 3xTg-AD 小鼠海马脑片的自发兴奋性突触活性, 差异性地调节电压门控和化学门控 (voltage- and chemically-gated) Ca²⁺ 流速, 并减少了锥体神经元 (pyramidal neurons) 的过度兴奋。慢性 Triagonist 治疗还能增加 3xTg-AD 小鼠海马突触素 (synaptophysin) 和 PSD-95 的表达水平。这些结果表明, Triagonist 可以改善 3xTg-AD 小鼠的记忆形成、突触传递、Ca²⁺ 平衡和神经元兴奋性。Triagonist 的这些神经保护作用可能与突触素和 PSD-95 的上调有关。因此, 该研究表明多受体激动剂可能是治疗 AD 的一种新的策略。研究利用 NMT 技术进一步探讨了神经保护作用的潜在微环境生理和分子机制, 通过 Ca²⁺ 流数据了解了 Triagonist 改善了 3xTg-AD 小鼠的 Ca²⁺ 跨膜流动情况, 进而揭示 Triagonist 具有神经保护作用的机制。

3. 检测离子/分子指标

Ca²⁺

4. 样品信息

小鼠脑片

5. 离子/分子流实验处理方法

7 个月大的小鼠分为野生型+盐水, 野生型+Triagonist, 3xTg+盐水和 3xTg+Triagonist。

分别用10 μM 谷氨酸或低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aCSF (含0.35 mM Ca^{2+}) 瞬时处理7个月大的小鼠分为野生型+盐水, 野生型+Triagonist, 3xTg+ 盐水和 3xTg+Triagonist。分别用10 μM 谷氨酸或低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aCSF (含0.35 mM Ca^{2+}) 瞬时处理。

6. 离子/分子流实验结果

Ca^{2+} 稳态不仅取决于细胞外 Ca^{2+} 的内流量, 还取决于细胞内 Ca^{2+} 的清除率。因此, 通过 NMT 进一步研究了 Triagonist 对跨膜 Ca^{2+} 外排的作用。图 1A 显示了谷氨酸诱导的海马脑片 CA1 区跨膜 Ca^{2+} 内流的时间进程。所有组在施用谷氨酸盐前 (-2~0 min) 的平均 Ca^{2+} 流速几乎为零。在稳定的基线记录后, 急性的谷氨酸盐处理 (10 μM) 诱发海马脑片 CA1 神经元持续的跨膜 Ca^{2+} 内流。值得注意的是, 与生理盐水处理的 WT 小鼠相比, 生理盐水处理的 3xTg-AD 小鼠在 5 min 内的平均 Ca^{2+} 流入量明显降低。用 Triagonist 处理后, 3xTg-AD 小鼠的平均 Ca^{2+} 内流速率接近对照水平, 与生理盐水处理 3xTg-AD 小鼠比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

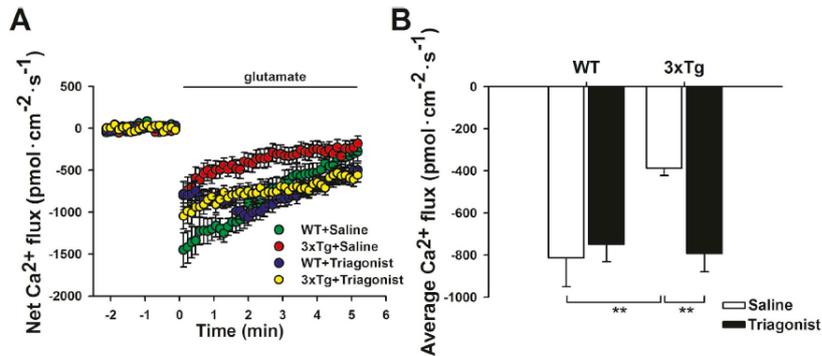


图 1. Glu 诱导海马脑片 CA1 区跨膜 Ca^{2+} 内流

此外, 研究测试了低钙人工脑脊液海马神经元的 Ca^{2+} 流速 (图 2C, D)。如预期发现, 用低钙人工脑脊液取代正常的人工脑脊液后, 出现明显的跨膜 Ca^{2+} 外排 (图 2C)。与盐水处理的 WT 小鼠相比, 生理盐水处理 3xTg 小鼠 5 分钟记录的平均 Ca^{2+} 流外排明显减少。与此同时, 与生理盐水处理的 WT 小鼠相比, 尽管在用低钙人工脑脊液替换正常人工脑脊液后, 开始时出现短暂的 Ca^{2+} 外排升高, 但 Triagonist 处理组的平均 Ca^{2+} 外排没有受到影响。重要的是, Triagonist 处理显著提高了 3xTg-AD 小鼠的平均 Ca^{2+} 外流。这些数据表明, Triagonist 改善了 3xTg-AD 小鼠的 Ca^{2+} 跨膜流动情况, 这可能通过避免细胞内 Ca^{2+} 超载而与 Triagonist 的神经保护作用相关。

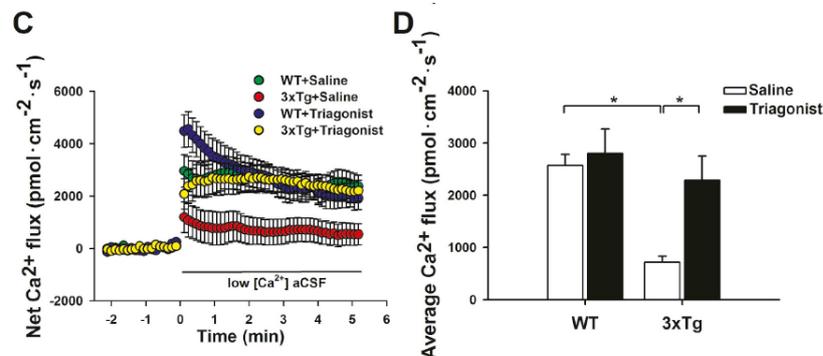


图 2. 海马脑片 CA1 区低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aCSF 诱导神经元 Ca^{2+} 外排

7.其他实验结果

- Triagonist 有效地改善了 3xTg-AD 小鼠的工作记忆和参考记忆。
- Triagonist 治疗可有效缓解 3xTg-AD 小鼠自发兴奋性突触活动的不足。
- Triagonist 慢性治疗可以减轻 3xTg-AD 小鼠海马 CA1 锥体神经元的过度兴奋性。
- Triagonist 对 3xTgAD 小鼠海马 CA1 神经元中增强的 L-VGCC 电流具有抑制作用,表明 Triagonist 有利于维持 Ca^{2+} 稳态。
- 突触素和 PSD-95 的表达升高可能有助于改善经 Triagonist 治疗的 3xTg-AD 小鼠的认知行为和海马突触传递。

8.结论

本研究通过研究 Triagonist 在 3xTg-AD 小鼠中的多种作用,证实并扩展了以前的相关工作。结果表明, Triagonist 可以减轻 3xTg-AD 小鼠的记忆障碍,并改善兴奋性突触传递、神经元兴奋性和 Ca^{2+} 平衡。该研究表明,多受体激动剂可能是治疗 AD 的一种新的治疗策略。

9.测试液

120 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7.4

10.文章简介（一作供稿）

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种严重威胁人类健康的进行性神经退行性疾病,目前为止仍然缺乏有效的治疗方法。最新研究表明,2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是 AD 发生的一个重要危险因素, T2DM 的治疗药物对 AD 也显示出一定的神经保护效应。脑内 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β protein, $\text{A}\beta$) 的沉积是 AD 的一个重要病理特征。现有证据表明,细胞内 Ca^{2+} 超载是 $\text{A}\beta$ 产生细胞毒性作用的重要机制。同时, Ca^{2+} 作为细胞内第二信使在多种生命活动中扮演着重要的信号转导作用。因此,快速、准确检测神经元跨膜 Ca^{2+} 流的动态变化,不仅可以帮助了解细胞维持 Ca^{2+} 稳态和正常功能活动的机理,也有助于揭示 AD 以及其他与 Ca^{2+} 信号扰乱相关疾病的发生机制。

非损伤微测技术 (non-invasive micro-test technology, NMT) 是近年发展起来的一种以非接触方式直接获取离子跨膜净流速的最新技术手段。NMT 的最大特点在于检测时不接触组织,对细胞不构成任何损伤,故可长时间用于 Ca^{2+} 跨膜净流速的实时动态测量。同时,通过改变传感器尖端的口径和适当调整传感器与标本的距离, NMT 技术可在一定程度上提高空间分辨率。本研究中我们利用 NMT, 研究了一种新型的抗 T2DM 药物 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂 (Triagonist) 对 3xTg-AD 小鼠海马离体脑片神经元 Ca^{2+} 跨膜流动的影响。

研究发现急性给予谷氨酸 (10 μM) 可诱发各组小鼠海马 CA1 区神经元的持续跨膜 Ca^{2+} 内流。值得注意的是,与 WT 小鼠相比, 3xTg-AD 小鼠在 5 min 内的内向跨膜 Ca^{2+} 流显著降低, 而经 Triagonist 治疗后, 3xTg-AD 小鼠的内向跨膜 Ca^{2+} 流接近对照水平。

此外,我们利用低钙人工脑脊液 (Artificial cerebrospinal fluid, aCSF) 诱发跨膜 Ca^{2+} 的外排,观察到用低钙 aCSF 替代正常 aCSF 后,各组小鼠海马 CA1 区神经元均出现明显的外向跨膜 Ca^{2+} 流。但与 WT 小鼠相比, 3xTg-AD 小鼠在 5 min 内的外向跨膜 Ca^{2+} 流明显减少, 而 Triagonist 显著提高了 3xTg-AD 小鼠的外向跨膜 Ca^{2+} 流。这些结果表明, Triagonist 通过

调节 3xTg-AD 小鼠海马 CA1 区神经元的跨膜 Ca^{2+} 流，维持了神经元的 Ca^{2+} 稳态，避免了细胞内 Ca^{2+} 超载。

山西医大祁金顺: NMT 在海马脑片神经元跨膜 Ca^{2+} 流研究中的应用及 $\text{A}\beta$ 效应观察

1. 基本信息

论文类型: 山西医科大学硕士学位论文

主题: NMT 在海马脑片神经元跨膜 Ca^{2+} 流研究中的应用及 $\text{A}\beta$ 效应观察

作者: 山西医科大学祁金顺、李甜

2. 摘要

AD 的一个重要病理特征是脑内聚集有大量、高密度的淀粉样 β 蛋白 (amyloid- β protein, $\text{A}\beta$)。内源性 $\text{A}\beta$ 的主要分子形式是 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 $\text{A}\beta_{1-42}$, 两者均为 β -分泌酶和 γ -分泌酶作用于单链跨膜的淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 后的产物。研究表明, $\text{A}\beta$ 发挥神经毒性作用的活性中心位于 25~35 序列 ($\text{A}\beta_{25-35}$) 甚或 31~35 序列 ($\text{A}\beta_{31-35}$)。本实验室早期的研究曾发现, $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理可使小鼠培养的大脑皮层细胞凋亡、可抑制大鼠电导钙激活钾通道的功能活性、还能损伤大鼠在体海马的突触可塑性和空间学习记忆能力。已经明确, 作为细胞内第二信使, Ca^{2+} 在多种生命活动中扮演着重要的信号转导作用。同时, 神经元细胞内发生的 Ca^{2+} 超载又成为 $\text{A}\beta$ 产生细胞毒性作用的一个离子机制。因此, 快速、准确检测神经元跨膜 Ca^{2+} 流的动态变化, 不仅可以帮助了解细胞维持 Ca^{2+} 稳态和正常功能活动的原理, 也有助于揭示 AD 以及其他与 Ca^{2+} 信号扰乱相关疾病的发生机制。目前, 测定神经元跨膜 Ca^{2+} 流的技术手段主要有: 细胞内离子成像和电生理记录膜电流。然而, 受技术所限, 这些方法均有不尽人意之处。细胞内 Ca^{2+} 成像往往局限于培养细胞水平, 而且需要将 Ca^{2+} 敏感的染料 (如 Fura-2 和 Fluo-4 等) 导入到细胞内, 但染料本身可以影响细胞活性, 还随时间延长和激发光持续作用出现淬灭。电生理技术可以直接测定跨膜 Ca^{2+} 电流, 但流速传感器经封接、破膜进入细胞的过程已对细胞构成伤害, 也很难进行长时间记录, 且空间分辨率低、实验操作复杂。非损伤微测技术 (non-invasive micro-test technique, NMT) 是近年发展起来的一种以非接触方式直接获取离子跨膜内流或外流流速的最新技术手段, 其根据 Fick 第一扩散定律和 Nernst 方程, 通过检测细胞外两点间电位差的改变, 从而测得紧邻细胞膜的胞外离子变化情况。本研究采用 NMT 实时记录了小鼠海马脑片神经元 Glu 引起的跨膜 Ca^{2+} 内流流速变化; 探讨了 $\text{A}\beta_{31-35}$ 对 Glu 所致细胞的兴奋作用及其机制; 利用低钙人工脑脊液观察了跨膜 Ca^{2+} 的外排过程, 并深入探讨了 $\text{A}\beta_{31-35}$ 对 Ca^{2+} 外排的影响及其可能机制。

3. 检测离子/分子指标

Ca^{2+}

4. 样品信息

8月龄雄性C57BL/6小鼠脑片

5. 离子/分子流实验处理方法

将海马脑片置于经混合气体饱和后的 aCSF 中，流速传感器三维推进至脑片海马 CA1 区神经元正上方 50 μm 处，开启流速传感器移动和电压采集程序，记录神经元在基础状态下 2 min 内和给予药物处理后 5 min 期间的 Ca^{2+} 跨膜流动情况。药物处理包括：

- (1) 急性给予不同浓度的 Glu
- (2) 急性给予不同浓度的 $\text{A}\beta_{31-35}$
- (3) 不同浓度 $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理后急性给予 Glu
- (4) $\text{A}\beta_{31-35}$ 联合 D-APV 或 CNQX 预处理后急性给予 Glu
- (5) 急性给予低钙 (0.35 mM Ca^{2+}) aCSF 液
- (6) $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理后给予低钙 aCSF
- (7) KB-R7943 或 TFH 预处理后给予低钙 aCSF

对照组仅给予溶解药物的溶剂 (vehicle)。

6. 离子/分子流实验结果

6.1 Glu 和 $\text{A}\beta_{31-35}$ 浓度依赖性诱发海马脑片神经元跨膜 Ca^{2+} 内流

在基础状态下，海马脑片 CA1 区神经元未记录到明显的 Ca^{2+} 内流或外流，这种稳定状态至少可保持到 60 min 以上 (结果未显示)。如图 1A 所示，作为给药前自身对照，基础状态下 2 min 内的 Ca^{2+} 流速平均值接近零水平 ($0.17 \pm 0.1 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$)。当分别急性给予不同浓度的 Glu 后，与对照组 (仅给予 vehicle) 相比，各 Glu 给药组均即刻检测到快速的内向 Ca^{2+} 流，流速由起始最大随给药时间延长而逐渐减慢并趋于稳定。经统计学处理，2.5 mM、5 mM、10 mM 三个不同浓度的 Glu 组给药后 5 min 内的 Ca^{2+} 流速平均值分别为 $-177.135 \pm 6.528 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 、 $-331.864 \pm 22.742 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 和 $-498.03 \pm 55.783 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 。三组不同浓度的 Glu 给药组之间也存在显著性差异 ($P < 0.05$)。这表明，急性给予 Glu 可浓度依赖性引起海马脑片 CA1 区神经元跨膜 Ca^{2+} 内流。有趣的是，急性给予不同浓度的 $\text{A}\beta_{31-35}$ 也诱发了海马脑片神经元出现先快后慢的内向跨膜 Ca^{2+} 流。如图 1C 和 1D 所示，与对照组 5 min 内 Ca^{2+} 流速 ($2.912 \pm 2.466 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$) 相比，10 μM 、30 μM 和 50 μM $\text{A}\beta_{31-35}$ 组给药后 5 min 内出现的内向 Ca^{2+} 流平均流速分别为 $-32.262 \pm 17.347 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 、 $-129.838 \pm 26.610 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 和 $-310.297 \pm 35.231 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 。这些内向 Ca^{2+} 流也具有先快后慢并持续稳定的特征。同时， $\text{A}\beta_{31-35}$ 诱发的海马脑片 CA1 区神经元跨膜 Ca^{2+} 内流具有浓度依赖性 ($P < 0.05$)。

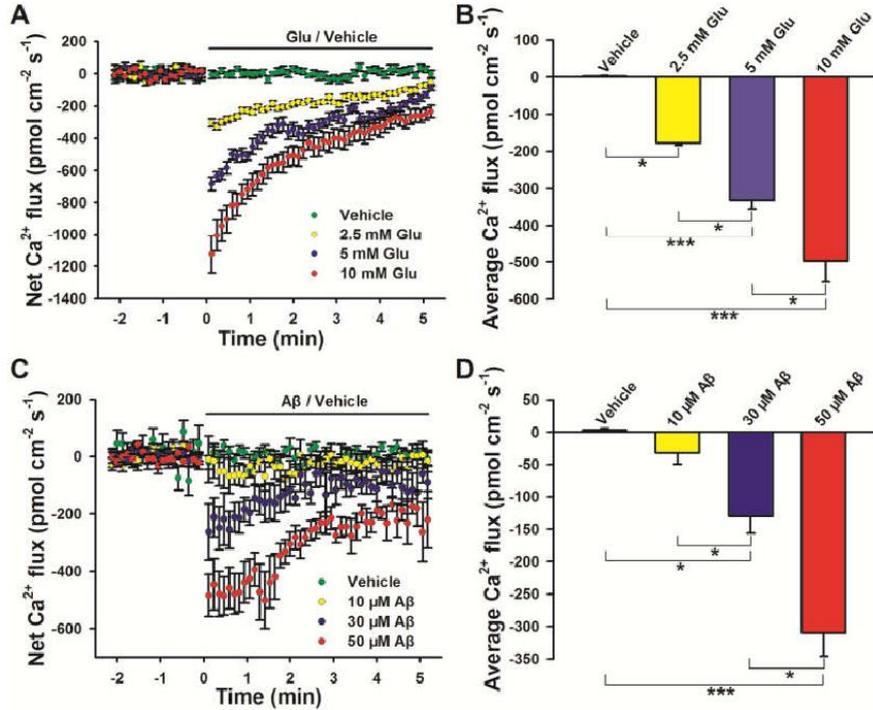


图 1. 急性给予 Glu 及 $A\beta_{31-35}$ 引起海马脑片 CA1 区神经元 Ca^{2+} 内流

6.2 $A\beta_{31-35}$ 浓度依赖性增强 Glu 诱发的海马脑片神经元 Ca^{2+} 内流

如图 2A 所示, 各组脑片在稳定记录 2 min 基础状态 Ca^{2+} 流速基础上, 除对照组给予 vehicle 外, 其余给药组先用不同浓度的 $A\beta_{31-35}$ 处理 2 min, 然后比较各组脑片急性给予 Glu (10 mM) 后 5 min 内的平均 Ca^{2+} 流速。结果可见, 没有 $A\beta_{31-35}$ 预处理时, Glu 引起的平均 Ca^{2+} 流速为 -430.747 ± 37.537 pmol/(cm² s) (Vehicle+Glu); 不同浓度的 $A\beta_{31-35}$ 预处理 2 min 后, Glu 诱导的内向 Ca^{2+} 流速较 $A\beta_{31-35}$ 未预处理组 (即单独 Glu 组) 明显增大。10 μ M $A\beta$ +Glu 组、30 μ M $A\beta$ +Glu 组和 50 μ M $A\beta$ +Glu 组 5 min 内 Glu 诱发的 Ca^{2+} 流速平均值分别为 -1418.91 ± 69.85 pmol/(cm² s)、 -2495.05 ± 127.735 pmol/(cm² s)、 -3887.07 ± 257.969 pmol/(cm² s)。三组之间, 内向 Ca^{2+} 流速也呈现浓度依赖性增强 ($P < 0.001$)。这表明, $A\beta_{31-35}$ 预处理对 Glu 诱发海马脑片神经元 Ca^{2+} 内流具有明显的易化作用。

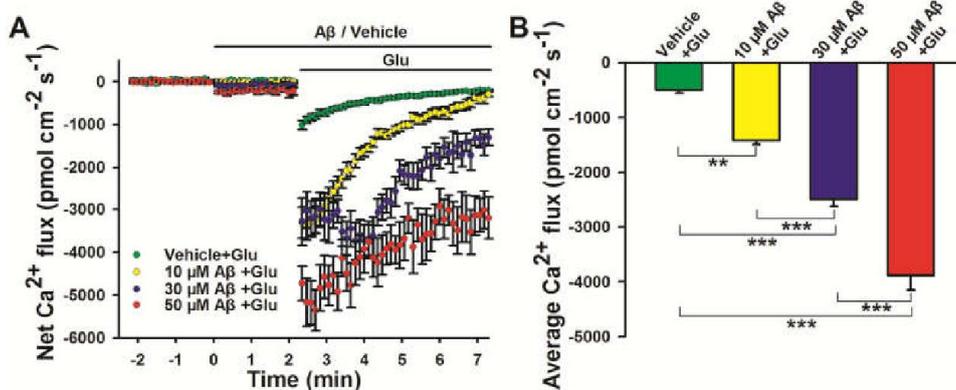


图 2. $A\beta_{31-35}$ 预处理剂量依赖性增强 Glu 诱发的海马脑片神经元 Ca^{2+} 内流

6.3 NMDA 受体介导 $A\beta_{31-35}$ 对 Glu 所致海马脑片神经元 Ca^{2+} 内流的易化作用

为了检查 $A\beta_{31-35}$ 对 Glu 诱发 Ca^{2+} 内流的易化作用机制, 研究比较了单独给予 $A\beta_{31-35}$ 以

及联合给予 NMDA 受体阻断剂 D-APV (100 μM) 或 AMPA 受体阻断剂 CNQX (20 μM) 预处理的效应。如图 3 所示, 正常对照组 (Vehicle+Glu) Glu 引起的 Ca^{2+} 内流平均流速为 $-571.253 \pm 57.129 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$; $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理 ($\text{A}\beta_{31-35}+\text{Glu}$) 可使其易化至 $-3944.539 \pm 340.557 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$, 增加了 5 倍之多; $\text{A}\beta_{31-35}$ 联合 D-APV (D-APV+A β +Glu) 后, Glu 诱发的 Ca^{2+} 内流显著减小至 $-116.345 \pm 47.786 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ ($P < 0.001$); 而联合给予 CNQX (CNQX+A β +Glu) 后, Glu 诱发的 Ca^{2+} 内流流速仍保持在 $-3049.358 \pm 210.551 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$, 虽有一定程度减小, 但效应明显小于 D-APV 联合给药组 (图 3A, B)。

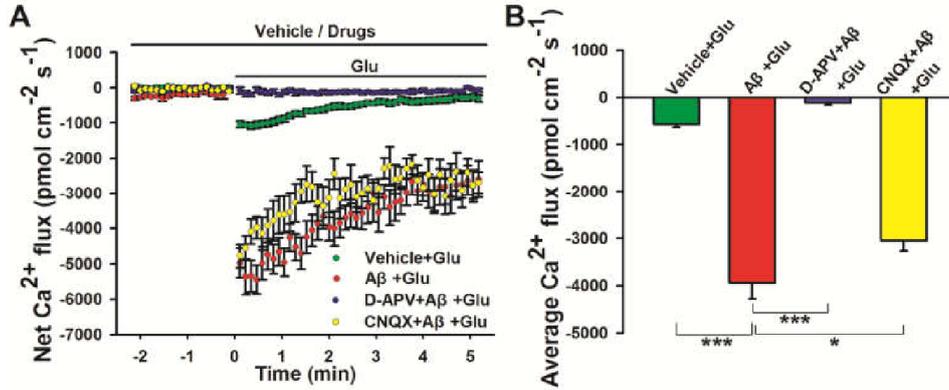


图 3. NMDA 受体阻断剂 D-APV 逆转了 $\text{A}\beta_{31-35}$ 对海马脑片神经元跨膜 Ca^{2+} 内流的易化作用

6.4 $\text{A}\beta_{31-35}$ 抑制海马脑片神经元低钙 aCSF 诱发的 Ca^{2+} 外排

钙稳态的维持不仅涉及到 Ca^{2+} 内流及其调节, 依靠细胞能量系统实现的主动 Ca^{2+} 外排可能是更重要的另一方面。为此, 研究利用 NMT 检测了海马脑片在低钙 aCSF 条件下出现的外向 Ca^{2+} 流, 并探讨了 $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理对 Ca^{2+} 外排的作用和可能机制。如图 4A 所示, 将流速传感器移至海马记录部位时, 正常对照组基础状态下 2 min 内的 Ca^{2+} 流速接近零水平, 给予 vehicle 后 5 min 内 Ca^{2+} 流速平均值也基本没有变化 ($0.837 \pm 0.499 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$)。但将正常 aCSF 换为低钙 (0.35 mM Ca^{2+}) aCSF (Vehicle+Low[Ca^{2+}]_o) 后, 可记录到一个明显的外向 Ca^{2+} 流, 峰值快速达到 $5186.969 \pm 300.595 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$, 随后逐渐回落, 5 min 时基本稳定在 $3337.39 \pm 231.405 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 上下。统计学处理 (图 4B) 表明, 单纯低钙液 (Vehicle+Low[Ca^{2+}]_o) 诱发的 Ca^{2+} 外排 5 min 内平均流速为 $3867.868 \pm 244.502 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 。有趣的是, $\text{A}\beta_{31-35}$ (50 μM) 预处理 ($\text{A}\beta_{31-35}+\text{Low}[\text{Ca}^{2+}]_o$) 可部分阻断这种低钙 aCSF 诱发的 Ca^{2+} 外排, 5 min 内平均 Ca^{2+} 流速只有 $2541.532 \pm 440.146 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ 。接着, 研究用质膜钙泵阻断剂 TFH 或质膜钠钙交换体阻断剂 KB-R7943 分别预处理, 以检查这种低钙液诱发的 Ca^{2+} 外流机制。研究发现, 两种阻断剂在正常 aCSF 中并不影响基础性的 Ca^{2+} 流, 但用 TFH (100 μM) 预处理 (TFH+Low[Ca^{2+}]_o) 后, 低 Ca^{2+} 液引起的 Ca^{2+} 流速较 TFH 未处理组明显减少, 平均流速降低到 $1954.733 \pm 327.616 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$; 用 KB-R7943 (100 nM) 预处理 (KB-R7943+Low[Ca^{2+}]_o) 后, 低 Ca^{2+} 液引起的 Ca^{2+} 流则大幅度减少, 平均流速只有 $352.828 \pm 75.665 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$, 抑制程度远大于 TFH。这说明, 低 Ca^{2+} 液引起海马脑片 CA1 区神经元的 Ca^{2+} 外排主要是质膜上 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体介导的, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体可能也是 $\text{A}\beta_{31-35}$ 抑制 Ca^{2+} 外排的主要靶点。

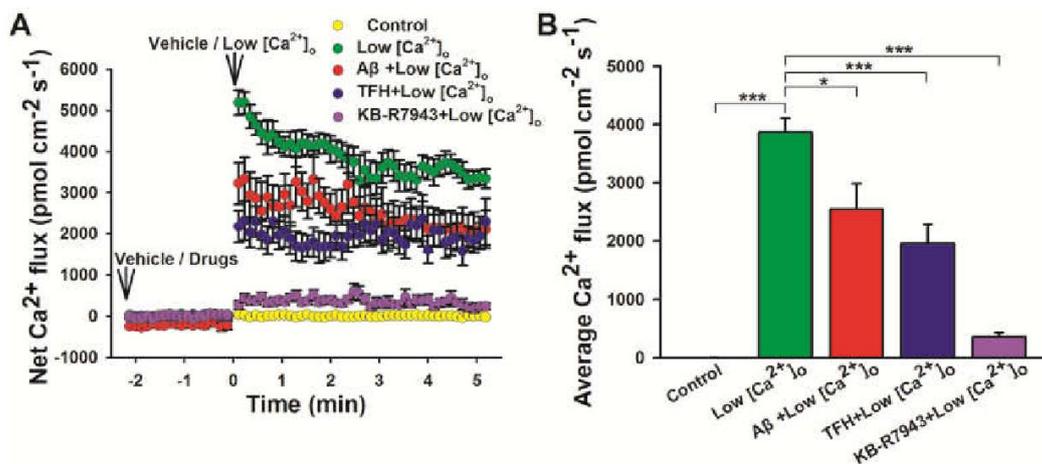


图 4. $A\beta_{31-35}$ 预处理抑制了海马脑片 CA1 区神经元低钙 aCSF 诱发的 Ca^{2+} 外流

7. 其他实验结果

- 腹腔注射 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂可改善 3xTg-AD 小鼠短期和长期的学习记忆认知行为。
- 腹腔注射 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂可减轻 3xTg-AD 小鼠在体海马 CA1 区突触可塑性的损害。
- 腹腔注射 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂可阻止 3xTg-AD 小鼠海马组织中的 S^{133} p-CREB、 T^{286} p-CAMKII 和 S^9 p-GSK3 β 的水平下调。

8. 结论

本研究初步表明：长期慢性腹腔注射 GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂可显著改善 3xTg-AD 小鼠的学习记忆行为；三受体激动剂 Triagonist 同时还改善了 3xTg-AD 小鼠海马 CA1 区的突触可塑性；Triagonist 处理还提高了上述 3xTg-AD 小鼠海马组织中与学习记忆功能密切相关的 S^{133} p-CREB、 T^{286} p-CAMKII 和 S^9 p-GSK3 β 的表达水平。这些结果提示，GLP-1/GIP/Gcg 三受体激动剂有可能成为预防和治疗 AD 尤其是伴有 T2DM 或血糖异常 AD 的一种新策略。

9. 测试液

120 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM D-glucose, 2.5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.3~7.4

EXP NEUROL: Cu 和 β -淀粉样蛋白相互作用可诱导神经元的神经退行性变化在阿尔茨海默氏病的发展中起重要作用

1. 基本信息

期刊: Experimental Neurology

主题: Cu 和 β -淀粉样蛋白相互作用可诱导神经元的神经退行性变化在阿尔茨海默氏病的进展中起重要作用

标题: Redox-active Cu(II)-A β causes substantial changes in axonal integrity in cultured cortical neurons in an oxidative-stress dependent manner

影响因子: 4.691

作者: 塔斯马尼亚大学 Roger S. Chung、Claire Howells

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

β -淀粉样蛋白 (A β) 肽包含表征阿尔茨海默氏病 (AD) 的淀粉样蛋白斑, 并被认为是疾病的发病机理有重大贡献。AD 大脑中的氧化应激升高, 并且有大量证据表明 A β 和氧化还原活性铜之间的相互作用是导致 AD 氧化应激的主要因素。这项研究的主要发现是, 具有氧化还原活性的 Cu(II)-A β 在长期的神经元培养物中引起明显的轴突病理, 包括轴突断裂和高磷酸化 tau 免疫反应性轴突肿胀的形成。值得注意的是, 表达 MAP-2 的树突过程在很大程度上不受 Cu(II)-A β 处理的影响。这些营养不良的轴突表现类似于 AD 脑的某些神经炎症病理学特征。研究表明, Cu(II)-A β 通过自由基的产生和随后 K⁺ 从神经元的外排直接导致轴突内肿胀的形成。总之, 本研究报道氧化还原活性的 Cu(II)-A β 可以诱导成熟神经元发生实质性的神经退行性变化, 并且可能在 AD 的缓慢进展中起重要作用。

3. 检测离子/分子指标

K⁺

4. 样品信息

大鼠皮层神经元

5. 离子/分子流实验处理方法

40 μ M Cu(II)-A β 实时处理

6. 离子/分子流实验结果

研究使用高度敏感的非损伤微测技术 (NMT) 来评估 $\text{Cu(II)-A}\beta_{1-40}$ 对培养的皮层神经元 K^+ 离子流速的影响 (图 1)。研究发现, $\text{Cu(II)-A}\beta_{1-40}$ 引起 K^+ 大量外排 (图 1)。但是 $\text{A}\beta_{1-40}$ 单独对 K^+ 流速没有影响 (结果未显示)。为了确定 $\text{Cu(II)-A}\beta$ 诱导的 K^+ 外流对皮层神经元的重要性, 研究评估了 K^+ 通道抑制剂 4-氨基吡啶 (4-AP) 是否可以阻断 $\text{Cu(II)-A}\beta$ 诱导的细胞骨架破坏。结果发现, 4-AP (2 mM) 几乎完全阻断了 $\text{Cu(II)-A}\beta$ 诱导的轴内肿胀的形成。

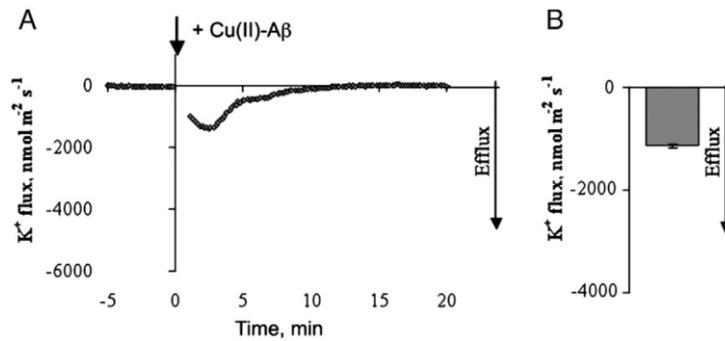


图 1. 40 μM $\text{Cu(II)-A}\beta_{1-40}$ 皮层神经元使大量的 K^+ 外排

7. 其他实验结果

- $\text{Cu(II)-A}\beta$ 对培养的皮质神经元的急性毒性比其他生化形式的 $\text{A}\beta$ 毒性更强。
- 长期暴露于细胞外 $\text{Cu(II)-A}\beta_{1-40}$ 可导致皮质神经元进行性神经退行性变 (progressive neurodegeneration)。
- 长期暴露于氧化还原活性 $\text{Cu(II)-A}\beta_{1-40}$ 会导致皮质神经元轴突完整性的进行性改变。
- $\text{Cu(II)-A}\beta_{1-40}$ 导致培养的皮质神经元轴突病理改变。

8. 结论

本研究报道 $\text{Cu(II)-A}\beta$ 可通过氧化应激和 K^+ 稳态失调途径诱导神经元发生明显的神经退行性改变, 可能在延缓 AD 的发病机制中发挥重要作用。

9. 测试液

150 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.5 mM CaCl_2 , 1.5 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 5 mM NaHCO_3 , 25 mM glucose, pH 7.4

J Neurochem: 谷氨酸提升胞内钙升高促进耗 O₂ 消耗 ATP 的毒性机制

1. 基本信息

期刊: Journal of Neurochemistry

主题: 谷氨酸提升胞内钙升高促进耗 O₂ 消耗 ATP 的毒性机制

标题: Simultaneous single neuron recording of O₂ consumption, [Ca²⁺]_i and mitochondrial membrane potential in glutamate toxicity

影响因子: 4.066

作者: 巴尔的摩生物医学研究中心 Mark P.Mattson、Marc Gleichmann

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

为了确定谷氨酸毒性的细胞过程顺序, 研究同时记录了单个皮质神经元的 O₂ 消耗量、细胞 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 和线粒体膜电位 (mΔψ)。使用安培自交铂电极邻近神经元测量耗氧量, 其中 [Ca²⁺]_i 和 mΔψ 分别用 Fluo-4 和 TMRE⁺ 监测, 使用转盘激光共聚焦显微镜。谷氨酸的兴奋毒性剂量引起 [Ca²⁺]_i 的升高, 随后几秒钟内 O₂ 消耗量增加, 在 1~5 min 内达到最大值。在这段时间内, mΔψ 发生了适度的增加, 然后, 在达到最大 O₂ 消耗前不久, mΔψ, 如 TMRE⁺ 荧光所示, 消散了。最大 O₂ 消耗持续 5min, 然后与 mΔψ 和 ATP 水平一起下降, 而 [Ca²⁺]_i 进一步增加。当神经元在 [Ca²⁺]_i 增加后不久用 NMDA 受体拮抗剂处理时, mΔψ 和 [Ca²⁺]_i 恢复到基线水平。本研究前所未有的空间和时间分辨率揭示了这一事件序列在所有神经元中是相同的, 尽管 O₂ 消耗、[Ca²⁺]_i 和 mΔψ 的变化幅度和动力学具有相当大的差异性。使用这种新方法获得的数据与谷氨酸受体激活后几分钟, 尽管线粒体呼吸达到最大, 但 Ca²⁺ 内流导致 ATP 耗竭的模型一致。

3. 检测离子/分子指标

O₂

4. 样品信息

皮质神经元

5. 测试液

120 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 20 mM Tris, 5 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 15 mM glucose, pH 7.4

6. 文章简介

神经元是可兴奋性细胞，在突触活动及产生动作电位后，神经元要产生大量的 ATP 驱动离子泵以提高胞内的 Na^+ 和 Ca^{2+} 水平。谷氨酸 (Glu) 是重要的神经递质，负责快速突触传递及突触传递强度的长期变化，并参与认知和记忆等过程；但如果过度激活谷氨酸受体，谷氨酸会导致离子平衡破坏、细胞死亡等毒性反应。本文为明确谷氨酸神经毒性的机制，将非损伤微测技术与激光共聚焦技术结合，以大鼠幼崽大脑皮层的神经元为被测样品，用非损伤微测技术检测单个神经元 O_2 消耗量 (即 O_2 内流)，而用激光共聚焦技术检测其胞内 Ca^{2+} 浓度和线粒体膜电位。研究发现，在谷氨酸作用下，细胞内 Ca^{2+} 浓度上升，随后 O_2 消耗量增加，这期间线粒体膜电位也发生相应改变。该结论直接证实了下述谷氨酸毒性机理模型：谷氨酸受体被激活后能引起 Ca^{2+} 内流，导致细胞内 ATP 损耗。

将非损伤微测技术与激光共聚焦等技术相结合，检测生物样品内部和外部离子分子或其他信息的变化情况，已经成为揭示生命过程机理机制的重要手段。

J Biol Eng: 哺乳动物脊髓继发性损伤的电流和 Ca^{2+} 内流

1. 基本信息

期刊: Journal of Biological Engineering

主题: 哺乳动物脊髓继发性损伤的电流和 Ca^{2+} 内流

标题: Large Naturally-Produced Electric Currents and Voltage Traverse Damaged Mammalian Spinal Cord

影响因子: 3.429

作者: 普渡大学 Mahvash Zuberi、Richard B Borgens

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

神经系统受损后,一系列物理,生理和解剖事件立即导致神经元功能崩溃,并常常死亡。伤害过程的这种进展称为“继发性伤害”。在脊髓和大脑中,除了早期阶段,这种功能和解剖结构的丧失在很大程度上是不可逆的。研究调查了继发性伤害中最被忽略和最早的成分。大的生物电流立即进入受损的豚鼠脊髓细胞和组织。这些电流背后的驱动力是相邻完整细胞膜的电位差。也许是几天以来,由创伤引起的生物物理事件在神经创伤的早期生物学中占主导地位。巨大的($\leq \text{mA}/\text{cm}^2$)生物电流横穿了哺乳动物脊髓的损伤部位。该内生电流随时间和与受伤部位的距离而减小,但最终保持较低但稳定的值($< 50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$)。进入损坏部位至少一个小时的净电流中的钙成分(约 $2.0 \text{ pmoles}/\text{cm}^2/\text{sec}$)非常重要。奇怪的是,进入脊髓腹侧的损伤电流可能比进入背侧表面的损伤电流高 10 倍,并且与脊髓横断相比,与挤压损伤相关的电流大小差异不大。生理测量使用非损伤微测技术(NMT)进行:一维和二维细胞外振动流速传感器实时进行。用自参考钙选择流速传感器进行钙测量。巨大的生物电流部分由游离钙携带,是继发性损伤过程的主要引发剂,在破坏邻近损伤部位的易损细胞膜后会造造成重大损害。人们认为,特别是沿轴突长度极化的较大的细胞内电压与在严重受伤的神经纤维中观察到的细胞器死亡,变形和不对称区域有关。这些数据扩大了作者对次级机制的理解,并提供了考虑干扰这种分解代谢和进行性组织损失新方法。

3. 检测离子/分子指标

Ca^{2+}

4. 样品信息

豚鼠脊髓

5. 离子/分子流实验处理方法

用钳子造成脊髓的挤压/压缩伤（该钳子具有一定的张力，有助于压缩程度的标准化）

6. 离子/分子流实验结果

当用 Ca^{2+} 传感器检测峰值流速时（图 1），脊髓损伤后 0~20 min 的平均 Ca^{2+} 流速为 $1.86 \pm 0.12 \text{ pmoles/cm}^2/\text{sec}$ ；20~40 min 为 $1.95 \pm 0.10 \text{ pmoles/cm}^2/\text{sec}$ ；40~60 min 为 $1.93 \pm 0.10 \text{ pmoles/cm}^2/\text{sec}$ 。

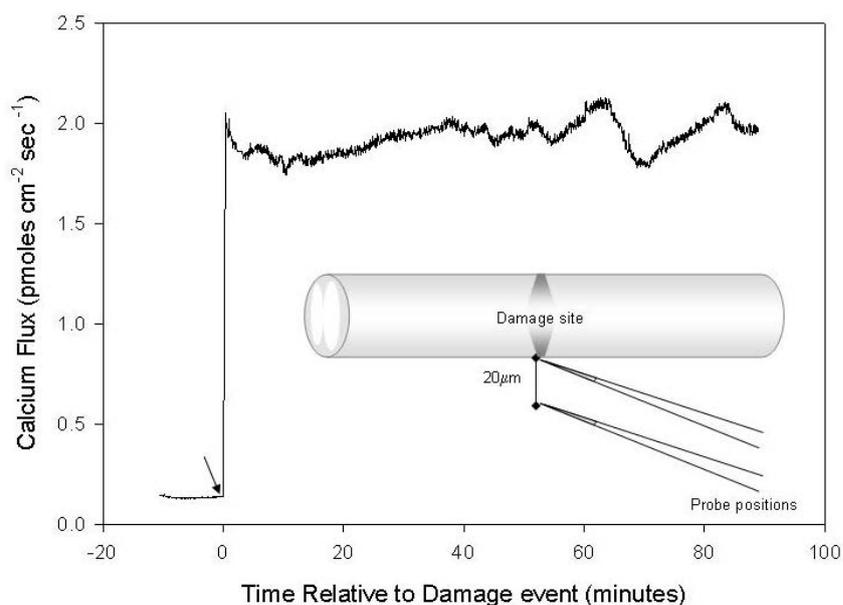
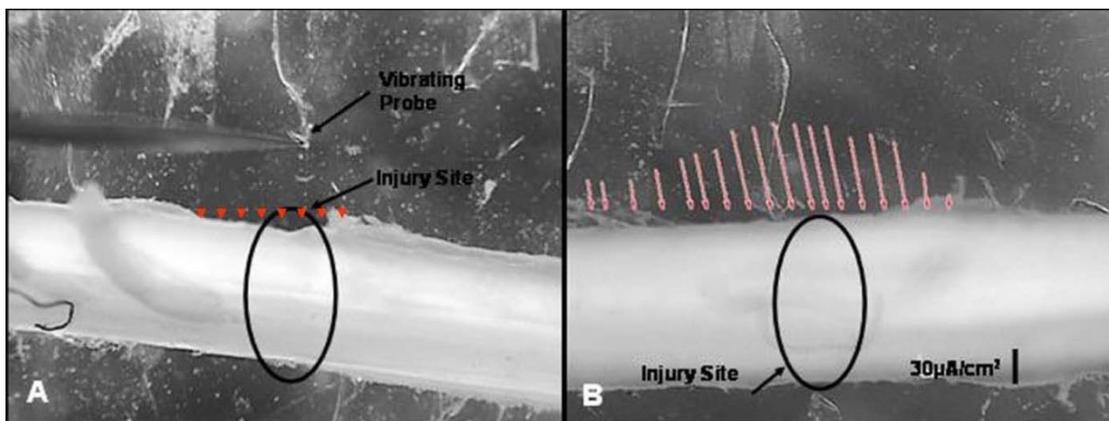


图1.在脊髓损伤出 Ca^{2+} 内流

7. 其他实验结果

- 电流密度随损伤点距离受损中心的距离下降，与损伤后电流密度随时间的指数下降近似成线性关系。
- 与从背侧表面测量的电流相比，进入脊髓腹侧表面的损伤电流明显占优势。

8. 结论

哺乳动物脊髓的损伤区域有一个非常大（ $\leq 1.0 \text{ mA}$ ）的生物电流进入。它由未受损相邻

区域细胞膜完整的“电池”驱动。这种电流大小在切断和粉碎的脊髓中都是相似的。在损伤后几分钟内，其幅度迅速下降一个数量级以上。这种离子电流与粉碎和切割纤维的解剖结构的严重破坏有关，并延伸到远离损伤的局部部位。特别重要的是电流中的钙成分，其进入的 Ca^{2+} 浓度约为 $2 \text{ pmoles cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。 Ca^{2+} 浓度高于其生理范围的增加与细胞结构的破坏和胞浆中分解代谢酶作为必需的辅助因子有关。奇怪的是，进入脊髓腹侧区域的电流水平大于进入粉碎脊髓背侧区域的损伤电流。在损伤的早期急性期干扰 Ca^{2+} 介导的依赖于损伤离子电流的破坏可能被认为是改善继发性损伤影响的一种手段。

9. 文章简介

脊髓损伤是一种严重威胁人类健康的疾患。对脊髓损伤的预防治疗和康复已成为当今医学界一大研究课题。脊髓损伤后发生继发性损伤，涉及循环、水肿、神经递质、离子改变、一氧化氮、血管内皮素、细胞凋亡等许多方面。利用非损伤微测技术发现离子的电流和电压对于继发性损伤起到主要的调节作用，尤其对 Ca^{2+} 流的平衡（内外流）。

普渡大学的科学家 Porterfield 等人使用非损伤微测技术研究了豚鼠脊髓创伤后进入细胞和组织的强生物电流以及 Ca^{2+} 的变化。发现一个强的生物电流横贯脊髓创伤处，这一内生电流随时间和远离创伤而递减，最终保持在一个较低而稳定的强度，同时检测到显著的钙离子内流。研究结果认为电流和 Ca^{2+} 与受损神经纤维中的细胞器死亡、扭曲、不对称的区域有关。这些数据增加了作者对继发性损伤机理的理解，并提供了新方向去考虑如何阻止组织的异化和不断损伤。

PLOS ONE: 长期 β 淀粉样蛋白肽暴露会通过 K^+ 外排介导机制导致神经元退行性改变和凋亡

1. 基本信息

期刊: PLoS ONE

主题: 长期 β 淀粉样蛋白肽暴露会通过 K^+ 外排介导机制导致神经元退行性改变和凋亡

标题: Tg2576 Cortical Neurons That Express Human Ab Are Susceptible to Extracellular Ab-Induced, K^+ Efflux Dependent Neurodegeneration

影响因子: 2.74

作者: 塔斯马尼亚大学 Roger S. Chung、Shannon Ray

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

AD 的关键病理特征之一是不溶性淀粉样斑块的形成。这些细胞外斑块的主要成分是 β 淀粉样蛋白肽 (Ab), 尽管 Ab 也被发现在 AD 中在神经内积累。由于疾病的缓慢进展性质, 很可能神经元长时间暴露于亚致死浓度的细胞内和细胞外抗体。在这项研究中, 作者报告每天暴露于亚致死浓度的 Ab_{1-40} (1 mM) 六天会诱导 Tg2576 小鼠培养的皮质神经元发生实质性凋亡 (表达细胞内 Ab 的实质性但致死水平)。值得注意的是, 未处理的相似年龄的 Tg2576 神经元未显示任何凋亡迹象, 表明这些神经元中存在的细胞内 Ab 水平不是引起毒性的原因。此外, 在相同的慢性 Ab_{1-40} 治疗下, 野生型神经元未凋亡。研究发现这种凋亡与 Tg2576 神经元有关, 而 Tg2576 神经元在 Ab 治疗后无法维持 K^+ 稳态。此外, 阻断 K^+ 外流保护 Tg2576 神经元免受 Ab 诱导的神经毒性。有趣的是, 长期暴露于 1 mM Ab_{1-40} 导致 Tg2576 神经元中轴突肿胀, 其中 Tg2576 神经元中含有高浓度的高磷酸化 tau 蛋白。在相同的治疗条件下, 在野生型神经元中未观察到这些。研究数据表明, 当神经元长期暴露于亚致死水平的细胞内和细胞外抗体时, 这会导致 K^+ 依赖性神经变性, 其病理特征类似于 AD。

3. 检测离子/分子指标

H^+ , K^+

4. 样品信息

小鼠皮层神经元

5. 离子/分子流实验处理方法

1 μ M Ab_{1-40} 实时处理 Tg2576 转基因小鼠和野生型小鼠

6. 离子/分子流实验结果

有许多报道表明, 细胞外抗体会引起神经元离子稳态的变化, 这些变化会直接导致神经毒性。研究使用 NMT 技术研究 Ab 处理后是否会改变神经元维持离子稳态的能力。采用 NMT 技术直接观察到 Ab 处理可引起野生型神经元 K^+ 的快速外排 (图 1A), 在 Ab_{1-40} 处理后 10 min 内恢复稳态。然而, 经 Ab_{1-40} 处理的 Tg2576 神经元 K^+ 流速并未恢复稳态 (图 1B)。相反, 在 Ab_{1-40} 处理后, 转基因神经元表现出 K^+ 的持续外排超过 120 min (图 2A)。 Ab_{1-40} 处理后 25 min 的总 K^+ 流速的测定结果显示, Tg2576 神经元的 K^+ 外排速率明显高于野生型神经元的外排速率 (图 1C)。另外, 用 1 mM Ab_{1-40} 连续处理 3 d 的野生型神经元并没有改变它们在 Ab 治疗后维持 K^+ 稳态的能力 (结果未显示)。

同时, 研究还测定了 Ab_{1-40} 处理后神经元的 H^+ 流速。 Ab_{1-40} 处理的野生型神经元显示出 H^+ 迅速内流, 在 5 min 内趋于稳定, 整个记录期间保持稳定 (图 1D)。 Tg2576 神经元显示出对 Ab_{1-40} 的类似反应 (图 1E)。然而, 从处理后约 10 min 开始, Tg2576 神经元的 H^+ 逐渐内流 (图 1E)。后者在接下来的 120 min 处理过程中进一步增加 (图 2B)。在 Ab 处理后 25 min 内测量的总 H^+ 流速, 结果显示与野生型神经元相比, Ab_{1-40} 诱导 Tg2576 神经元的 H^+ 大量内流 (图 1F)。

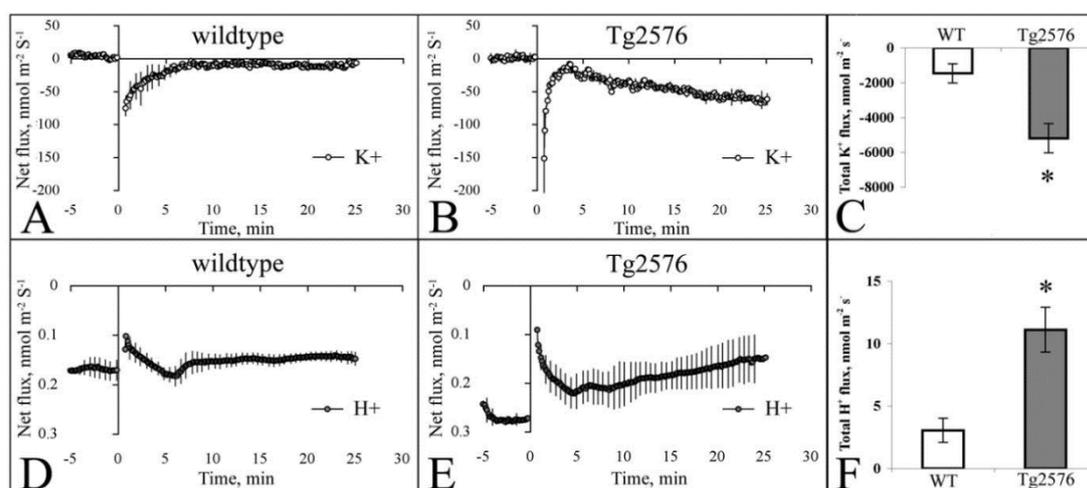


图 1. 可溶性 Ab 诱导 Tg2576 皮层神经元中 K^+ 快速外排

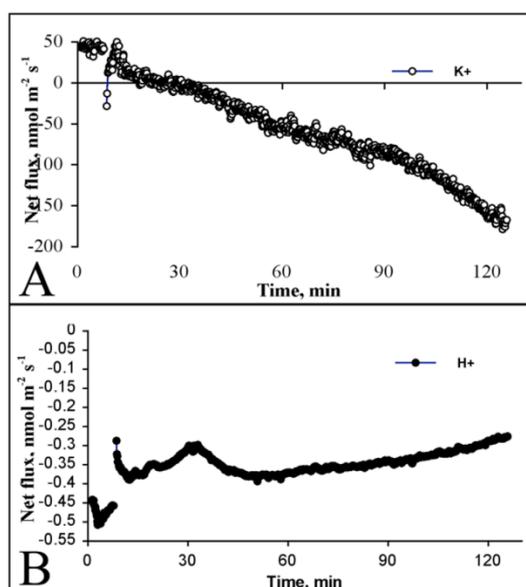


图 2.可溶性 Ab 诱导 Tg2576 皮层神经元 K^+ 长时间外排

7.测试液

150 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃,
25 mM glucose, pH 7.4

PLOS ONE: MT-2A 蛋白或成为阿尔茨海默病治疗的新思路

1. 基本信息

期刊: PLoS ONE

主题: MT-2A 蛋白或成为阿尔茨海默病治疗的新思路

标题: The Native Copper- and Zinc- Binding Protein Metallothionein Blocks Copper-Mediated A β Aggregation and Toxicity in Rat Cortical Neurons

影响因子: 2.74

作者: 塔斯马尼亚大学 Roger S. Chung

2. 中文摘要 (谷歌机翻)

AD 的主要病理特征是不溶性细胞外 β 淀粉样蛋白(A β)斑块的沉积。有可靠数据表明, A β 聚集是通过与金属锌和铜反应而催化的。本研究报道, 主要的人类表达金属硫蛋白(MT) 亚型 MT-2A 能够预防铜在体外介导的 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 的聚集。MT-2A 的这种作用似乎涉及 Zn₇MT-2A 与 Cu(II)-A β 之间的金属交换, 因为 Cu₁₀MT-2A 或羧甲基化 MT-2A 都不会阻止 Cu(II)-A β 聚集。此外, Zn₇MT-2A 阻断了 Cu(II)-A β 诱导的离子稳态变化和随后培养的皮质神经元的神经毒性。这些结果表明, 以 MT-2A 代表的类型的 MT 能够防止 A β 聚集和毒性。鉴于最近对 AD 的金属螯合疗法产生了兴趣, 该疗法可从 A β 中去除金属, 从而留下可轻松再次与金属结合的无金属 A β , MT-2A 可能代表了另一种治疗方法, 因为 MT 与 A β 之间的金属交换锌结合的相对惰性的 A β 。

3. 检测离子/分子指标

K⁺, Ca²⁺

4. 样品信息

神经元

5. 离子/分子流实验处理方法

40 μ M Cu(II) Ab₁₋₄₀ 处理

6. 离子/分子流实验结果

40 μ M Cu (II) A β_{1-40} 处理后, K⁺从神经元大量外排 (图 1A), Ca²⁺从神经元中大量内流 (图 1B); Zn₇MT-2A 与 Cu (II) Ab 共同处理可完全阻断 Cu (II) A β 对 K⁺ (图 1A, C) 和 Ca²⁺

(图 1B, D) 的影响。为了进一步证实 Zn₇MT-2A 能够阻断 Cu(II)-A β 诱导的氧化应激的有害作用, 研究利用非损伤微测技术(NMT)监测神经元对 Cu(II)-A β 响应时离子稳态的变化。用 Cu(II)A β ₁₋₄₀ 处理(在抗坏血酸存在的情况下)会诱导 K⁺快速从神经元外排, 施加 Cu(II)-A β 后 4.26 \pm 0.65 min 达到峰值, K⁺外排持续 20 min (图 1A)。该处理还导致 Ca²⁺内流, 施用 Cu(II) A β 后 6.456 \pm 1.35 min 达到峰值, 并且在实验期间 Ca²⁺持续内流 (图 1C)。Zn₇MT-2A 浓度为 >5 μ M 时, 完全抑制了 Cu(II)-A β 引起的 K⁺和 Ca²⁺流速的变化, (图 1B, D)。

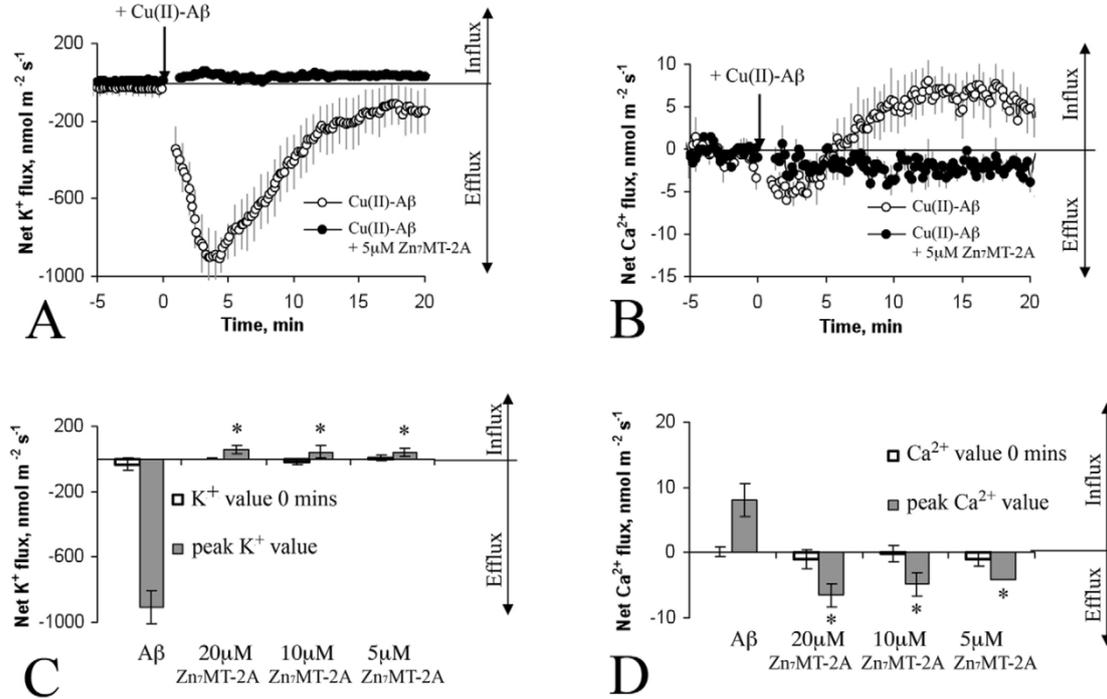


图 1. K⁺和 Ca²⁺流速对 Cu(II)-A β 和 Zn₇MT-2A 的响应动力学

7.测试液

150 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 25 mM glucose, pH 7.2