

神经研究

1、*Mol Neurodegener*: NMT 证明离子失衡指示 AD 早期症状

通讯作者: 塔斯马尼亚大学 学者

所用 NMT 设备: 非损伤微测技术平台

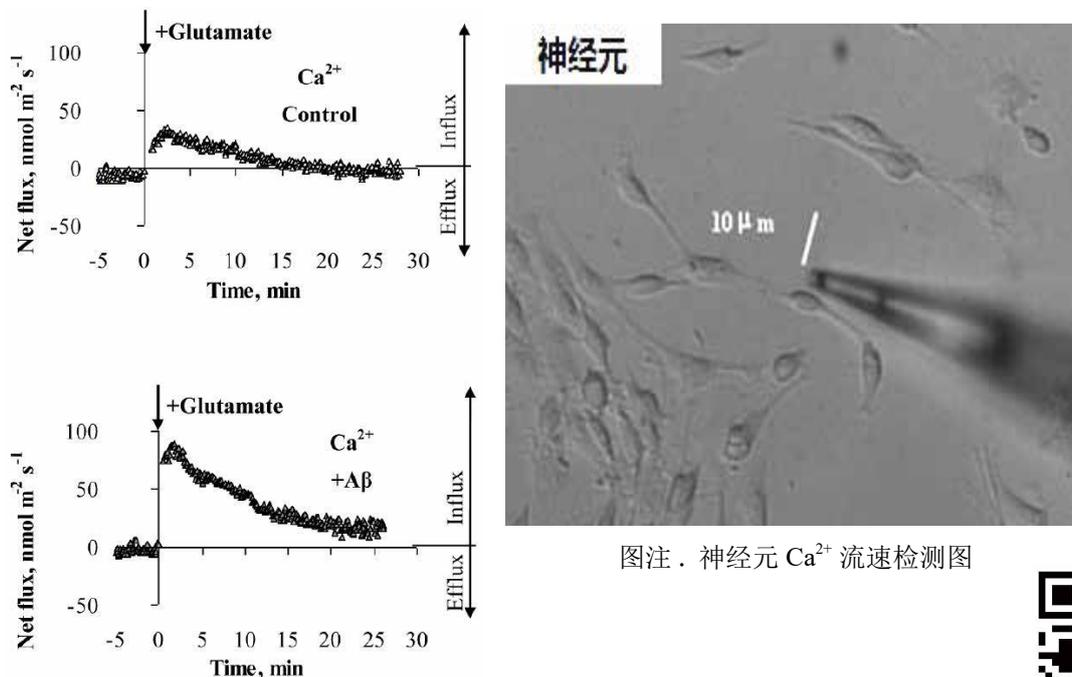
关键词: Alzheimer's disease; Ion homeostasis; Beta amyloid; K^+ flux; Ca^{2+} flux

NISC 文献库文献编号: F2010-017 (扫码回复编号下载全文)

AD (阿尔茨海默症, 俗称“老年痴呆症”) 是一个进行性发展的退行性疾病, 主要特征是形成不溶的淀粉样斑块和神经纤维缠结。 β -淀粉体 ($A\beta$) 是 $A\beta$ 斑块的主要组分。神经元暴露在慢性、亚致死剂量的 $A\beta$ 中超过一定的时间可能会致病, 然而许多研究没在活体细胞中进行, 因此存在一些问题。

为了研究 AD 发病的机理和解决活体细胞测定的问题, 澳大利亚的科学家使用基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的非损伤微测技术平台研究了活体神经元的 K^+ 和 Ca^{2+} 流速。发现初级皮层神经元在 $1 \mu M$ 的 $A\beta$ 1-40 中超过 7 天, 神经元存活率下降了 20%, 这种细胞的存活率和 K^+ 外排的增加有关。另外, $10 \mu M$ 的 Glu 诱导了神经元的兴奋性中毒, $1 \mu M$ 的 $A\beta$ 处理 1 天后用 Glu 再处理导致了更大的 K^+ 外排, K^+ 外排在 $A\beta$ 处理 20min 后更高, 用 Glu 处理导致 K^+ 外排增加了 2.8 倍。 Ca^{2+} 的吸收用 $A\beta$ 处理 20min 就增加了 2.5 倍。研究结果认为神经元长期暴露在 $A\beta$ 中会致病, 因为 $A\beta$ 降低了皮层神经元维持 K^+ 和 Ca^{2+} 平衡对 Glu 的反应, 这种反应可能是 AD 早期症状发生的原因。

这项研究发现神经元失去维持 K^+ 和 Ca^{2+} 平衡的能力可能是细胞对 $A\beta$ 早期反应的指示。在将来的工作中我们可以通过 K^+ 流检验微量的 $A\beta$ ($1 \mu M$), K^+ 外排指示 AD 的早期症状以及 Glu 与 $A\beta$ 的协同作用。



图注. 神经元 Ca^{2+} 流速检测图

图注. 在 $-/+ A\beta$ 条件下, 加入 Glu 时神经元 Ca^{2+} 流速变化图。正值表示吸收, 负值表示外排



2、**生理学报**：NMT 成功检测活体脑片跨膜 Ca^{2+} 流

通讯作者：山西医科大学 祁金顺

所用 NMT 设备：NMT 活体生理检测仪[®] (Physiolyzer[®])

关键词：非损伤微测技术；海马脑片； Ca^{2+} 流；淀粉样 β 蛋白；谷氨酸

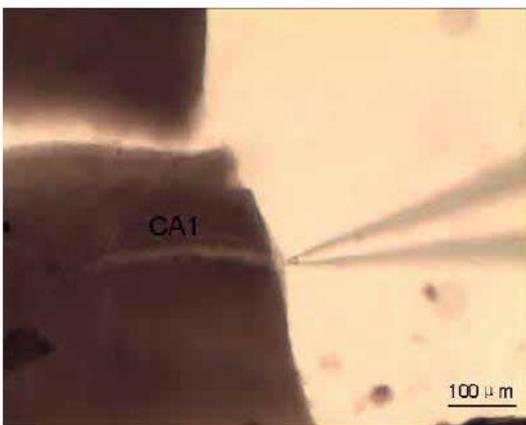
NISC 文献库文献编号：H2017-001（扫码回复编号下载全文）

脑内 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β protein, $\text{A}\beta$) 的聚集是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的重要病理特征。 $\text{A}\beta$ 的神经毒性作用机制与其扰乱神经元 Ca^{2+} 稳态有密切关系。

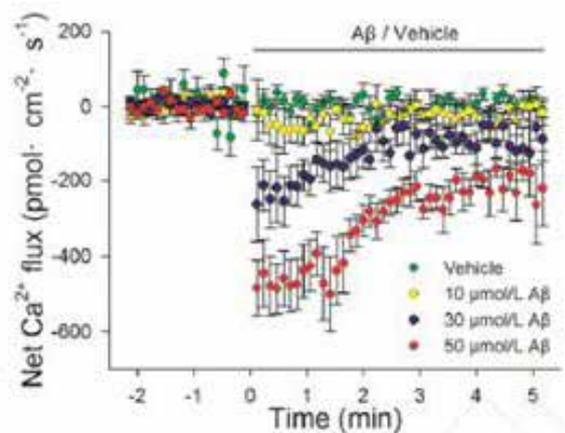
2017 年，山西医科大学祁金顺教授在《生理学报》上发表了《非损伤微测技术实时检测海马脑片跨膜钙离子流》的研究成果。课题组以 C57BL/6 小鼠活体海马脑片为研究对象，利用基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的 NMT 活体生理检测仪[®] (Physiolyzer[®])，首次检测了 $\text{A}\beta$ 对谷氨酸 (Glu) 诱发的 Ca^{2+} 吸收以及细胞外低钙引起的 Ca^{2+} 外排的影响，并初步探讨了 $\text{A}\beta$ 扰乱神经元 Ca^{2+} 稳态的相关机制。

结果表明： $\text{A}\beta$ 引起的细胞内 Ca^{2+} 超载不仅涉及到 Ca^{2+} 吸收增加，也与其对 Ca^{2+} 外排的抑制有关； $\text{A}\beta$ 易化 Glu 的兴奋毒作用主要是通过 NMDA 受体介导的，其抑制 Ca^{2+} 外排的靶点主要是 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体。

非损伤微测技术 (NMT) 具有操作相对简单、实时获取结果、非损伤等优点，适用于脑片 Ca^{2+} 吸收和外排的长时间测定。本研究不仅为解释 $\text{A}\beta$ 所致 Ca^{2+} 超载的神经毒性机制提供了新的实验证据，也为开展跨膜 Ca^{2+} 信号转导机制的脑研究提供了新的技术方法。



图注：活体脑片 Ca^{2+} 流检测图



图注：给予 Glu 引起海马脑片 CA1 区神经元 Ca^{2+} 流测定。负值表示吸收，正值表示外排



3、Neuropharmacology: NMT 证实抗 T2DM 药物维持钙稳态缓解 Aβ 毒性

通讯作者：山西医科大学 李甜

所用 NMT 设备：NMT 活体生理检测仪[®] (Physiolyzer[®])

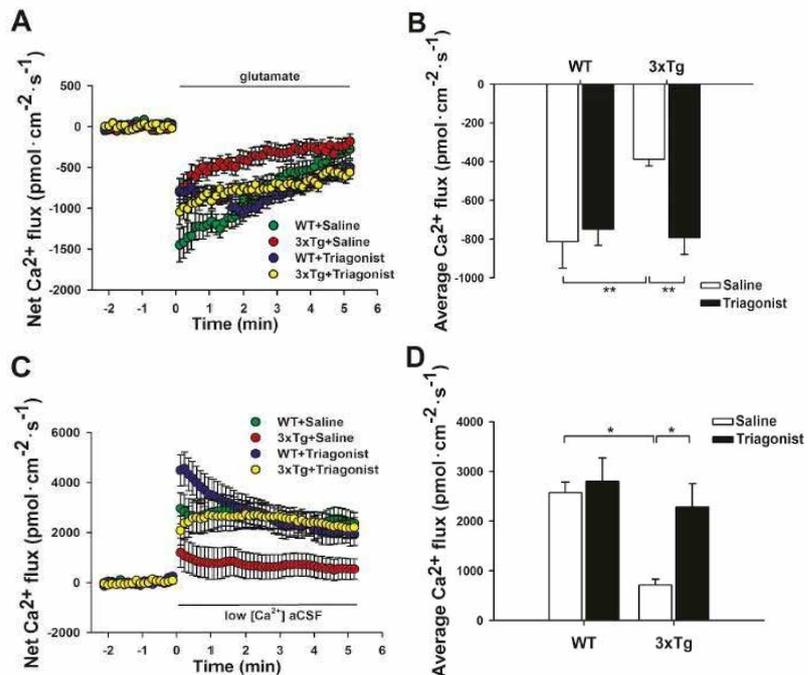
关键词：非损伤微测技术；海马脑片；Ca²⁺ 流；淀粉样 β 蛋白；谷氨酸

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, Aβ) 的沉积是 AD 的一个重要病理特征。现有证据表明，细胞内 Ca²⁺ 超载是 Aβ 产生细胞毒性作用的重要机制。同时，Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 流的动态变化，不仅可以帮助了解细胞维持 Ca²⁺ 稳态和正常功能活动的机理，也有助于揭示 AD 以及其他与 Ca²⁺ 信号扰乱相关疾病的发生机制。

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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 流显著降低，而经 Triagonist 治疗后，3xTg-AD 小鼠的内向跨膜 Ca²⁺ 流接近对照水平。

此外，利用低钙人工脑脊液 (Artificial cerebrospinal fluid, aCSF) 诱发跨膜 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 流。但与 WT 小鼠相比，3xTg-AD 小鼠在 5 min 内的外向跨膜 Ca²⁺ 流明显减少，而 Triagonist 显著提高了 3xTg-AD 小鼠的外向跨膜 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 流，维持了神经元的 Ca²⁺ 稳态，避免了细胞内 Ca²⁺ 超载。



图注. Triagonist 对 3xTg-AD 小鼠海马脑片神经元 Ca²⁺ 跨膜流动的影响

4、*Nat Cell Biol*: Bcl-x_L 改变 H⁺、O₂ 流速调节神经元代谢

通讯作者：耶鲁大学 学者

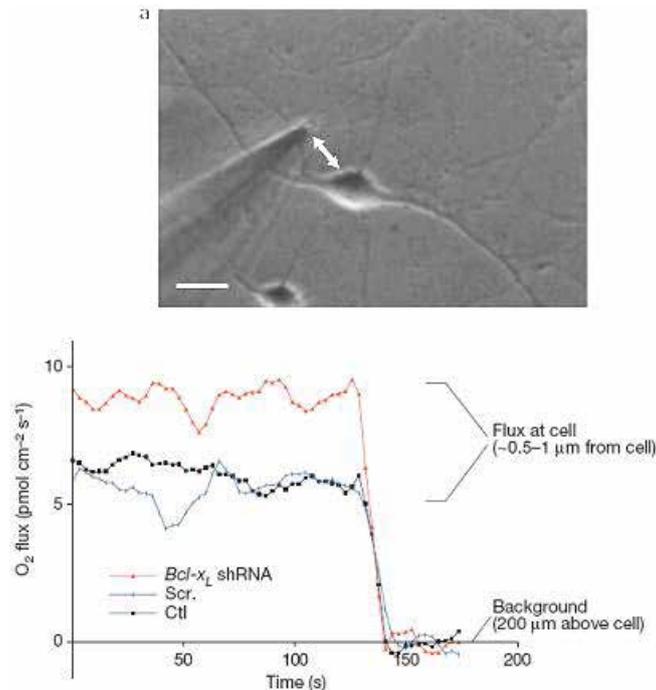
所用 NMT 设备：NMT 能量代谢仪

NISC 文献库文献编号：F2011-005（扫码回复编号下载全文）

B 细胞淋巴 2 (Bcl2) 家族蛋白调节程序性细胞死亡，但是抗细胞程序性死亡蛋白如 Bcl2 和 Bcl-x_L 如何阻止细胞死亡的过程还不了解。Bcl-x_L 促进线粒体和胞质之间代谢物的交换，也是成年大脑中主要的抗细胞程序性死亡的蛋白，Bcl-x_L 过表达增加了突触的数量和大小。

为了研究 Bcl-x_L 的调节作用，耶鲁大学的科学家使用基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的 NMT 能量代谢仪在 *Nature Cell Biology* 发表文章，发现过表达 Bcl-x_L 的神经元有更高的 ATP 水平，外源 Bcl-x_L 减少或者抑制 ATP。尽管 ATP 水平增加，但是过表达神经元 Bcl-x_L 的耗氧降低，且 Bcl-x_L 消失后增加了氧气吸收的水平。证据表明 Bcl-x_L 与 F1F0 ATP 合成酶的 β -subunit 直接作用，减少了 F1F0 ATP 合成酶复合体中的离子渗漏，因而增加了 F1F0 ATP 活动期间通过 F1F0 的 H⁺ 转运。此外，重组 Bcl-x_L 蛋白直接增加了纯化的合成酶复合体 ATPase 活性的水平，并且外源的 Bcl-x_L 减少了 F1F0 酶活性的水平。发现表明在 Bcl-x_L 表达的神经元中增加线粒体的效率归功于增加了突触的效能。

本研究认为 Bcl-x_L 通过减少质子从 F1F0 ATP 合成酶的渗漏增加 ATP 合成酶的效率，因此促进了神经元的代谢。这里通过基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的 NMT 能量代谢仪直接测定神经元的氧气流速，从而准确地认识了 Bcl-x_L 所引起的线粒体代谢效率的增加，为更多的代谢方面的研究提供了新手段。



图注. 神经元 O₂ 流速检测图 (上图) 及其数据图 (下图)。正值表示吸收

5、*Neuropharmacology*: 谷氨酸过多促进神经元消耗 O₂

通讯作者: 美国老龄化内部研究计划所 学者

所用 NMT 设备: NMT 能量代谢仪

关键词: excitotoxicity; glutamate; oxygen consumption

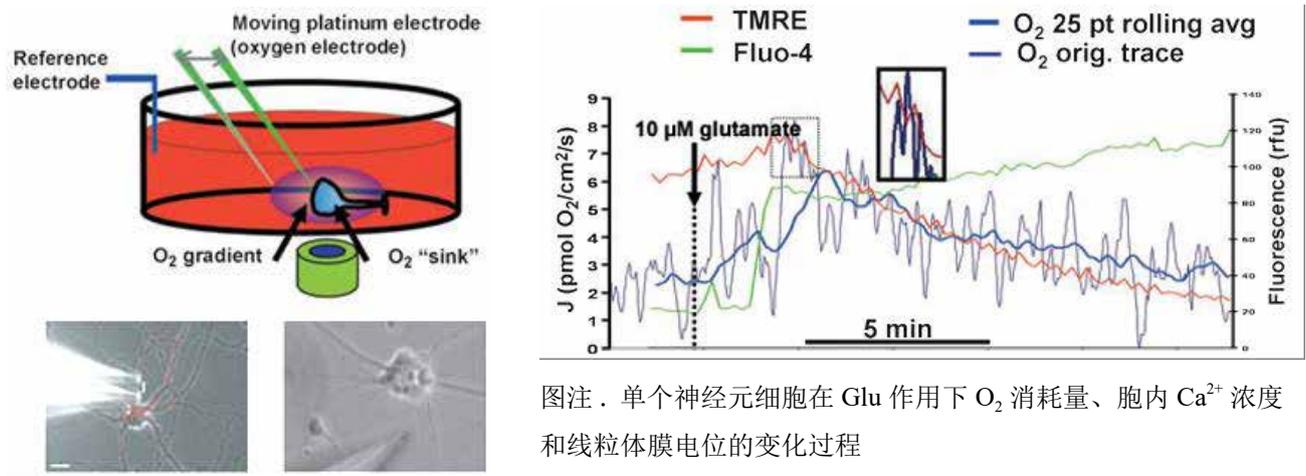
NISC 文献库文献编号: F2009-018 (扫码回复编号下载全文)

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 Ca²⁺ 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 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 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, 利用基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的 NMT 能量代谢仪检测单个神经元 O₂ 消耗量 (即 O₂ 吸收), 而用激光共聚焦技术检测其胞内 Ca²⁺ 浓度和线粒体膜电位。

研究发现, 在谷氨酸作用下, 细胞内 Ca²⁺ 浓度上升, 随后 O₂ 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 Ca²⁺ 吸收, 导致细胞内 ATP 损耗。

将非损伤微测技术 (NMT) 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。



图注. 单个神经元细胞在 Glu 作用下 O₂ 消耗量、胞内 Ca²⁺ 浓度和线粒体膜电位的变化过程



6、*PLoS ONE*: 胞外 A β 诱导皮层神经元 K $^+$ 外排、H $^+$ 吸收

通讯作者: 塔斯马尼亚大学 学者

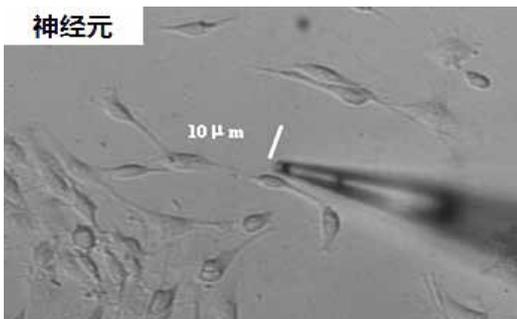
所用 NMT 设备: 非损伤微测技术平台

NISC 文献库文献编号: F2011-019 (扫码回复编号下载全文)

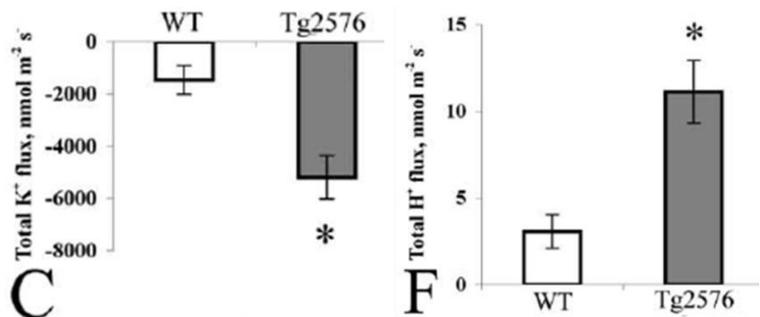
阿尔茨海默症(AD)的一个重要的病理学特征是形成不溶性淀粉斑。这个淀粉斑的主要成分是 β 淀粉体肽(A β), A β 是老年斑的主要成分,也是AD发病机理的主要因素。然而,A β 在AD中作用的精确机制还不清楚。

2011年,澳大利亚的科学家使用基于非损伤微测技术(Non-invasive Micro-test Technology, NMT)的非损伤微测技术平台等技术,研究了每日暴露在亚致死浓度1mM的A β 1-40中4天,诱导了大量Tg2576小鼠皮质神经元的细胞凋亡,在这个过程中,离子平衡被破坏。实验结果表明未处理的Tg2576神经元没有出现任何细胞凋亡的迹象,说明胞内的A β 没有引起毒性,WT神经元在同样的慢性A β 处理下也没有出现细胞凋亡。但是,Tg2576神经元在A β 处理下出现细胞凋亡,K $^+$ 显著外排。此外,阻止K $^+$ 外排保护了A β 诱导的Tg2576神经元毒性的发生。长期暴露在1mM的A β 1-40中引起了Tg2576神经元轴突肿胀的发生,包括高度磷酸化的tau蛋白的浓缩。但是,在同样条件下WT神经元中没有观察到这种现象。因此,细胞凋亡是因为Tg2576神经元不能在A β 处理下保持K $^+$ 平衡所致。

这项研究第一次发现了A β 能够引起超级磷酸化tau蛋白免疫反应的轴突肿胀,且具有进行性发展,这种亚致死水平的胞内外A β 引起的K $^+$ 依赖的神经退行性疾病和AD具有相似的病理学特征。



图注. 神经元 H $^+$ 流检测图



图注. 神经元 K $^+$ 、H $^+$ 流速测定。正值表示吸收, 负值表示外排

7、*PLoS ONE*: AD 治疗新思路: 金属硫蛋白螯合疗法

通讯作者: 塔斯马尼亚大学 学者

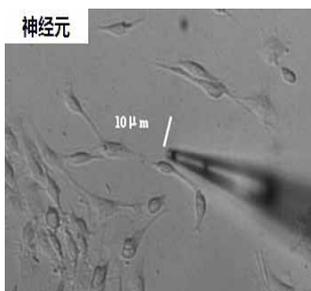
所用 NMT 设备: 非损伤微测技术平台

NISC 文献库文献编号: F2010-021 (扫码回复编号下载全文)

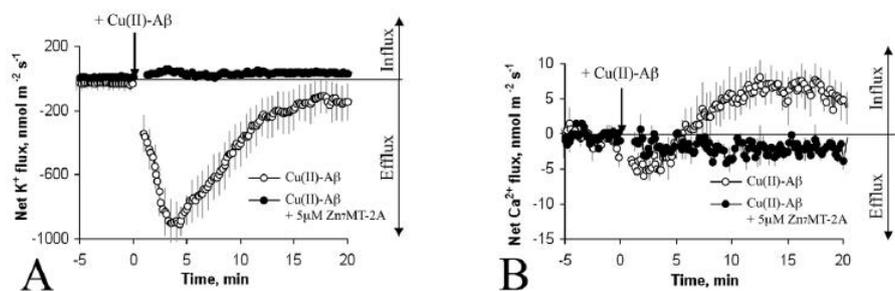
阿尔茨海默症 (AD) 是引起老年痴呆的重要疾病, AD 的主要病理学特征是胞外不溶性 β 淀粉粒 ($A\beta$) 空斑的沉积。研究表明 $A\beta$ 的聚集受金属锌及铜的催化。金属硫蛋白 (MT) 是脑内主要的锌和铜的内源结合蛋白, MT 与 AD 的病理生理学相关。鉴于 MT 较强的金属结合能力, 研究人员推测 MT 可能参与调控金属结合调控及 $A\beta$ 聚集。

2010 年, 澳大利亚及爱沙尼亚的科学家以大鼠皮质神经元细胞为材料, 通过电喷雾离子阱质谱 (ESI-MS)、等离子体质谱 (ICP-MS)、神经元毒性试验、非损伤微测技术等手段研究了金属硫蛋白亚型 MT-2A 与锌 / 铜的结合状态以及不同处理条件下神经元细胞的活力、 Ca^{2+} 、 K^+ 流信息等。研究发现, MT-2A 可以保护皮质神经元细胞免受 $A\beta$ 聚集引起的毒性, 主要是由于 Zn7MT-2A 与 Cu(II)- $A\beta$ 之间的锌铜交换并形成 Zn 结合的 $A\beta$, 而 Zn 结合的 $A\beta$ 只能形成可溶性的蛋白聚集。神经元毒性试验表明 Cu(II)- $A\beta$ 具有神经元毒性, 可诱导产生类似氧化胁迫的不利影响。通过基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的非损伤微测技术平台检测 Cu(II)- $A\beta$ 处理下神经元离子动态平衡的改变, 发现 Cu(II)- $A\beta$ 引起 K^+ 的外排, Ca^{2+} 的吸收, 而加入 $5\mu M$ 的 Zn7MT-2A 会阻止 Cu(II)- $A\beta$ 引起的 K^+ 和 Ca^{2+} 流的改变, 证实了 Zn7MT-2A 可阻止 Cu(II)- $A\beta$ 诱导氧化胁迫引起的不利影响。

目前比较普遍的 AD 疗法是金属螯合疗法, 但是被螯合掉金属离子的 $A\beta$ 容易重新与金属离子结合, 而 MT 与 $A\beta$ 进行金属交换后留下的是活性低的结合了 Zn 的 $A\beta$ 。该研究结果提供了一种更为可行的 AD 金属螯合疗法。



图注. 神经元 K^+ 流检测图



图注. 添加 / 不添加 $5\mu M$ Zn7MT-2A 时, Cu(II)- $A\beta$ 处理前后, 神经元 K^+ 、 Ca^{2+} 流速测定。正值表示吸收, 负值表示外排



8、*Bone*: AD 治疗新思路: Ca^{2+} 外排修复骨骼损伤法

通讯作者: 凯斯西储大学 学者

所用 NMT 设备: NMT 钙信号检测仪

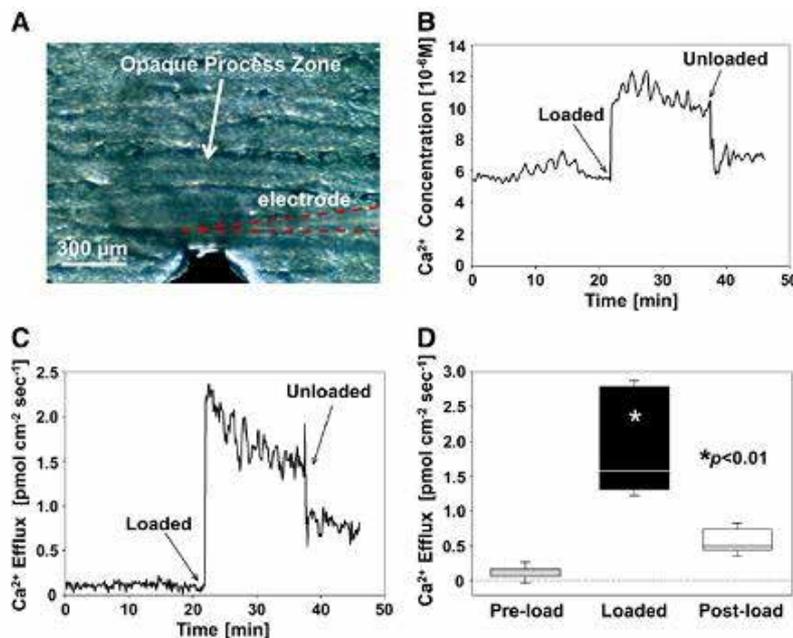
关键词: Calcium efflux; Bone matrix; Damage targeting; Mechanochemical transducer; Intracellular calcium; Osteoblast

NISC 文献库文献编号: F2012-003 (扫码回复编号下载全文)

在生理学上, 劳累和超负荷的压力导致骨骼遭受轻微的损伤, 这种损伤能够被骨骼细胞定向修复。通常使用事后免疫组化分析骨骼细胞对损伤的反应, 但是不能实时监测这种反应, 且忽略了细胞周围环境对损伤反应和骨细胞的潜在影响。迄今为止, 没有体外损伤模型研究骨骼细胞对损伤的反应。

2012 年初, 美国凯斯西储大学的科学家发展了实时监测损伤的实验模型, 报道了通过应力集中点诱导的 Ca^{2+} 外排的研究方法。通过基于非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的 NMT 钙信号检测仪和荧光技术发现 MC3T3-E1 成骨细胞通过胞内 Ca^{2+} 信号转导激活应力集中点的 Ca^{2+} 外排, 成骨细胞的活性与胞外的 Ca^{2+} 有关。骨骼受到损伤导致骨骼把 Ca^{2+} 释放到骨骼基质中, 促进骨骼基质中的成骨细胞吸收 Ca^{2+} 和细胞的生长, 从而定向修复骨骼损伤的部位。

这个结果说明了一个新的前景, 骨骼基质通过转换机械应力使化学信号 (细胞外的 Ca^{2+}) 进入细胞, 担当细胞反应和修复的中间体, 为研究骨骼的修复提供了一种新的方法。



图注. 在机械拉力下实时测定骨骼表面的 Ca^{2+} 流速和细胞内的 Ca^{2+} 浓度