

30min 后, HX 又降至难以检测, OFR 降至接近缺血组。这种 HX 浓度与 OFR 含量的相关性变化证明了脑血管内皮细胞内黄嘌呤氧化酶催化次黄嘌呤生成氧自由基的途径可能是脑内氧自由基产生的一条重要途径。

本研究证明, DTC 在体内具有清除自由基作用, 使缺血脑组织内能量物质得到进一步恢复, 延缓缺血脑组织由可逆转化为不可逆损伤的病理过程, 减轻线粒体的损伤程度, 降低脑缺血再灌注损伤引起的动物死亡率, 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

(本文中的脑组织形态观察研究, 得到基础部病生教研室戴益民教授的协助和指导, 特致谢意)。

参考文献

[1] Hossmann KA, Kleihues P. Reversibility of ischemic brain damage. Arch Neurol, 1973; 29: 375
 [2] Chen DM, Li WH, Xu BX, Tao XB, C. sm J, Effects of sodium diethyldi-thiocarbamate on ischemia-reperfusion-induced injury in Mongolian gerbil, Acta Pharmacol Sin, 1994; 15(5): 469
 [3] 胡天喜, 陈杞, 陈克明, 徐馥本著. 发光分析与医学. 上海: 华东师范大学出版社, 1990: 144

[4] 韩庆宏, 张乃忠, 王风茹等. 反相高效液相色谱法测定肿瘤细胞腺苷酸. 色谱, 1989; 7(6): 377
 [5] Cunha RA, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Separation of adenosine triphosphate and its degradation products in innervated muscle of the frog by reverse phase high-performance liquid chromatography. Chromatographia, 1989; 28(11/12): 610
 [6] Swartz HM. Cells and tissues. In: Swarta HM, Bolton JR, Borg DC, editors. Biological application of electron spin resonance. New York: Wiley-interscience, 1972: 155-95.
 [7] McCord JM. "Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury." New Engl J Med, 1985; 312: 159
 [8] Helmut S. Biochemistry of oxidative stree. 自由基生物学与医学学术会议资料. 中国生物物理学会 1988; P26-40
 [9] Denopules HB. In: Popp AJ, editor. Neurol Trauma. New York: Raven, 1979: 63
 [10] Abd-Elfattah AS, Jessen ME, Lekven J, Doherty NE, Brunsting LA, Wechsler AS. Myocardial reperfusion injury: Role of myocardial hypoxanthine and xanthine in free radical-mediated reperfusion injury. Circulation, 1988; 78(suppl 1): 1-224-1-235

应用 Fura-2/AM 测定大鼠肝细胞内钙离子浓度

吴笑春 崔海影

(广州军区武汉总医院 武汉 430070)

钙是人体含量最丰富的元素之一, 广泛分布于细胞和体液中, 它在生命活动的各种生理、生化反应和疾病的发生、发展中起着极其重要的作用。欲确切地分析 Ca^{2+} 在生命活动中的作用, 就必须准确地测量细胞内 Ca^{2+} 的浓度 ($[Ca^{2+}]^*$)。

本文介绍应用国广 Fura-2/AM 测定大鼠肝细胞 $[Ca^{2+}]^*$ 的方法。

Fura-2 测定 $[Ca^{2+}]^*$ 的原理是 Fura-2 的结构(图 1)类似于四羧酸的 Ca^{2+} 螯合剂

EGTA, 能以 1:1 的比例特异性地与 Ca^{2+} 结

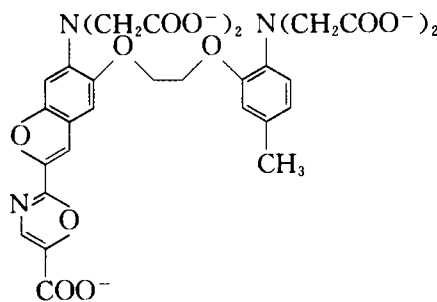


图 1 Fura-2 的结构

合, 与 EGTA 不同的是 Fura-2 可发出荧光,

并且结合 Ca^{2+} 后其荧光特性有改变, 这变化即可指示 Ca^{2+} 的存在, 但是 Fura-2 为一极性很大的酸性化合物, 不能进入细胞内。在其负性基团部位结合上乙酰氧甲酯基, 成为 Fura-2/AM。Fura-2/AM 脂溶性很强, 又消除了负电荷, 容易通过细胞膜, 随后被细胞内的非特异性酯酶水解掉分子中的酯基又变为 Fura-2, 与胞浆的游离 Ca^{2+} 结合后即可被特定波长的紫外光激发产生荧光, 其发射光的强度与 $[\text{Ca}^{2+}]$ 呈比例关系, 据此可以测定 $[\text{Ca}^{2+}]$ 及其变化。

应用微量注射技术在显微镜下将 Fura-2 直接注入单细胞内, 即可测量 $[\text{Ca}^{2+}]^*$ 及其分布, 该法准确可靠, 但需要昂贵的仪器设备。笔者利用 Fura-2/AM 透膜标记, 在显微荧光光度计下, 逐个测量单个肝细胞内的荧光, 从而求出 $[\text{Ca}^{2+}]^*$ 。

下面简单介绍一下方法:

一、细胞制备 这是重要的第一步, 因为细胞功能的好坏直接影响测定结果, 若细胞破裂, 一方面其酯酶可将 Fura-2/AM 水解成 Fura-2, 使其负载减少, 另一方面可将胞内的 Fura-2 排出胞外; 若细胞功能受损, 对荧光剂的负载和对激动剂反应不明显; 若细胞死亡影响则更大, 因为死亡细胞内 Ca^{2+} 浓度比正常细胞高出十几倍。因此, 保护细胞功能是一个很重要的实验技巧问题。一般用台盼兰排斥反应检测细胞的成活程度, 要求活细胞必须占 90% 以上 (细胞数 $10^5 \sim 10^{10}$ 个/ml)。

二、Fura-2/AM 负载 常用负载浓度 $1 \sim 10 \mu\text{M}$, 温育温度 37°C 左右, 时间 $30 \sim 120 \text{ min}$ 。我们用 Fura-2/AM 负载大鼠肝细胞, 只需室温负载 20min 即可。一般认为细胞内 Fura-2/AM 浓度可达温育液的 $10 \sim 30$ 倍。有的细胞负载困难, 可加入 $0.1 \sim 0.5\%$ 的牛血清白蛋白帮助 Fura-2 负载。

三、测定细胞悬液荧光 负载后如需测定细胞悬液荧光还必须进行充分的清洗, 以

除去细胞外的 Fura-2/AM。笔者是用显微荧光光度计逐个测量单细胞的荧光, 则此步可免去。

四、荧光测量 先扫描测定 Fura-2/AM 标准液、负载液及测定细胞内 Fura-2 的激发光谱 (图 2) 和发射光谱。Fura-2/AM 无

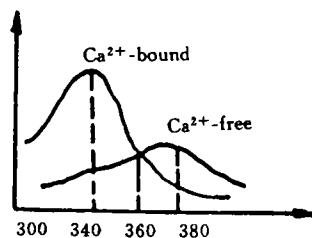


图 2 Fura-2 的激发光谱

Ca^{2+} 结合能力, 其激发波长 (λ_{ex}) 和发射波长 (λ_{em}) 在加入 Ca^{2+} 前后的变化不大, 分别为 380 nm 和 490 nm 左右, 负载液的荧光光谱基本上同于此, 如其 λ_{ex} 不在 380 而在 340 nm , 说明 Fura-2/AM 被水解成 Fura-2 并已结合上 Ca^{2+} , 这就影响细胞负载的效果。进入胞内的 Fura-2/AM 被完全水解成 Fura-2, 后者随即与 Ca^{2+} 结合, 所以其 λ_{ex} 应在 340 nm 左右, λ_{em} 为 500 nm 。在进行正式测定以前, 必须得出这几个参数, 方可保证测定方法的正确。然后分别测量静息期和加入激动剂、拮抗剂或药物后的荧光强度, 最大荧光值 (F_{max})、最小荧光值 (F_{min}) 和细胞自身荧光等。理想的测定 F_{max} 的方法是应用离子载体——ionomycin (100 nm), 使大量 Ca^{2+} 进入细胞内饱和 Fura-2, 这种方法不改变光照范围内 Fura-2 的浓度。笔者曾用 A_{23187} 代替 ionomycin, 取得了良好效果。测量 F_{min} 最常用的方法是加入至少比 Ca^{2+} 浓度高二倍的 EGTA 络合全部的 Ca^{2+} , 使 Fura-2 呈游离状态。另一种方法是加入 Mn^{2+} 熄灭 Fura-2 荧光, 这时测得的荧光值 ($F_{\text{Mn}^{2+}}$) 经公式 $F_{\text{min}} = F_{\text{Mn}^{2+}} + 1/6(F_{\text{max}} - F_{\text{Mn}^{2+}})$ 即可计算出

Fmin。细胞自身荧光的测定与此类似,唯不加入 Fura-2/AM。

五、计算 应用双波长荧光分光光度计可同时测定 340 和 380 这两个波长激发的荧光强度, Ca^{2+} 浓度用这二者的比值 ($R = F_{340}/F_{380}$) 来计算。其计算公式如下:

$$[Ca^{2+}] = Kd \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{F_{f2}}{F_{b2}}$$

Kd 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数,文献报道在生理条件下其为 224nm, R 、 R_{min} 、 R_{max} 分别为测得的荧光比值,最小荧光比值和最大荧光比值, F_{f2} 、 F_{b2} 分别为零 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 饱和时 380nm 激发光产生的荧光强度,

Ca^{2+} 浓度单位为 $nm(10^{-9}M)$ 。由于目前国内大多数荧光分光光度计均为单波长装置,无法用 R 值来计算 $[Ca^{2+}]$,因而沿用 quin-2 的计算公式,即 $[Ca^{2+}] = kd \cdot \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$,式中 F 、 F_{min} 和 F_{max} 均为用 340nm 激发光测得的样品荧光值、最小荧光值和最大荧光值, Kd 值仍为 224nm。

参考文献

- [1] Grynkeiwex G, et al. J Biol chem, 1985, 260: 3440
- [2] Tsiem R Y, et al. J Cell Biology, 1982, 94: 325
- [3] Tsiem R Y, et al. Cell Calcium, 1985, 6: 145
- [4] Li Q, et al. Biochem Biophys Res Comm, 1987, 147: 120
- [5] Al-Mohanna F A. Cell Calcium, 1988, 9(1): 17

血管紧张素 II (angiotensin II) 受体的研究进展

戴生明 朱铨英 苏定冯

(第二军医大学药理学教研室 上海 200433)

摘要 血管紧张素 II (A II) 受体按照其与选择性拮抗剂的亲和力不同,至少可分为 AT_1 和 AT_2 受体两种。 AT_1 、 AT_2 受体的分布、氨基酸序列已经清楚。 AT_1 受体是 G 蛋白偶联受体,可能通过抑制腺苷酸环化酶、激活磷脂酶 C 而促进磷脂酰肌醇水解起作用。A II 的已知作用均是由 AT_1 受体介导的。 AT_2 受体的生理功能及其信息跨膜转导机制迄今尚不清楚。

关键词 血管紧张素 II; 受体

血管紧张素 II (A II) 最初因参与调节血压和水钠平衡而引起人们的兴趣。近年来发现 A II 作为内分泌、旁分泌、自分泌和胞内分泌 (intracrine) 的激素可能对各种细胞、组织、器官都有作用。生物化学和药理学研究早已提示在机体不同组织或同一组织存在不同类型的 A II 受体。但由于实验技术和方法的限制未能深入研究 A II 受体。1988 年以来两类高选择性的非肽类 A II 受体拮抗剂的问世^[1,2], 为 A II 受体的研究提供了良好的工具。分子生物学技术的发展使得从分子水平认识 A II 受体成为可能。因此,近年来 A II 受

体的研究取得了巨大进展。

一、A II 受体的分型

1989 年 Whitebread 等^[3]首先用放射性配基结合试验和非肽类 A II 受体拮抗剂研究证实,人和大鼠的肾上腺球状带存在两种 A II 受体。因 A II 受体类型的命名一时较混乱,1990 年美国心脏学会高血压研究理事会统一了 A II 受体类型的命名,规定用 AT 表示 A II 受体的缩写,用 1, 2 等区分不同类型;用 A, B 等表示不同亚型。把对罗沙藤 (losartan, DuP753) 敏感的受体定为 AT_1 受体(曾用名 A II 受体 1 型, B 型, α 型); 对