

increases in the sensitivity of DNA fragments detection by at least 200-fold relative to the widely used agarose gel electrophoresis, and the linearity of the assay is about 5~ 5 000 ng DNA. The application of the method in the apoptosis study showed that (1) a time- and dose-dependent increase in the number of DNA strand breaks in apoptotic Raji lymphoma lymphocytes induced by dexamethasone, and (2) age-dependent increase in the number of DNA strand breaks occurred in the cardiac tissues of spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with that of

normal control rats (WKY). Results of the assay were confirmed by the DNA ladder pattern exhibited after electrophoresis, fluorescein dUTP and exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL), flow cytometric analysis (FCA) ($r > 0.98$). It is a quantitative, simple, sensitive, specific and useful assay for assessing DNA degradation in molecular and cell biology especially in apoptosis research.

Key words DNA break, saturation label, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)

八肽胆囊收缩素对大鼠大脑皮质细胞钙调素活性的影响

项 鹏 陈曼玲 吴兆锋

(华西医科大学生物化学教研室, 成都 610041)

摘要 为了探讨胆囊收缩素 (CCK) 受体在中枢神经系统中的信号传递机制, 观察了 CCK₈ 和 CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 对大鼠大脑皮质钙调素 (CaM) 活性的影响. 结果表明: a. CCK₈ 对 CaM 活性的影响具有时间依赖性, 15 min 达到最高点后逐渐下降; b. CCK₈ 在 10^{-12} ~ 10^{-7} mol/L 范围内可刺激 CaM 活性的增加, 超过 10^{-7} mol/L 后, 逐渐趋于饱和. c. CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 均可抑制 10^{-7} mol/L CCK₈ 引起的 CaM 活性的增加, 但两者 IC_{50} 相差 40 倍, L-365, 260 在较低浓度时即能明显拮抗 CCK₈ 引起的 CaM 活性变化. 研究结果提示 CCK₈ 可能通过 CCK_B 受体引起 CaM 活性变化, 而 CaM 可能是 CCK_B 受体的重要信号传递机制之一.

关键词 八肽胆囊收缩素 (CCK₈), CCK_B 受体, 钙调素

学科分类号 Q579.2⁺3

胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 是一种广泛分布在中枢神经及外周组织中的肽类物质, 通过其受体发挥多种生理功能. 它具有多种分子形式^[1], 其中 CCK₈ (八肽胆囊收缩素) 是中枢神经系统中含量最丰富的一种形式. CCK 受体分为两种亚型, 即 CCK_A 受体和 CCK_B/胃泌素受体, 两者在体内的分布和介导的功能各有不同, 可能是通过不同信号传递机制. 对于 CCK_A 受体信号传递机制的研究目前比较清楚, 但对于 CCK_B 受体信号传递目前尚无定论, 其主要原因是制备纯度较高能表达 CCK_B 受体的细胞比较困难. 有研究显示 CCK₈ 可引起中枢神经系统中 Ca^{2+} 浓度的变化, 但其是否引起大脑皮质神经细胞钙调素 (CaM) 活性的变化目前尚未见报道. 因此本研究以分离大鼠大脑皮

质神经细胞为材料, 观察 CCK₈、CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 与受体结合后引起钙调素 (CaM) 活性的变化.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物: Wistar 大鼠, 由华西医科大学实验动物中心提供, 体重 200~ 250 g, 雌雄不限.

1.1.2 试剂与仪器: CCK₈ (Sigma 公司), L-364, 718、L-365, 260 (英国 Leslie Iversen 博士馈赠), Dowex 1×8 (Sigma 公司), 蛇毒 (Crotalus atrox, Sigma 公司), 标准 CaM、环核苷酸磷酸二酯酶

Tel: (028) 5501254

收稿日期: 1999-09-28, 修回日期: 2000-04-13

(PDE, 电泳纯, 吴兆锋教授提供), ^3H -液体闪烁计数器 (西安二六二厂), 低速离心机 (Dupont 公司).

1.2 方法

1.2.1 神经细胞制备: 参考 Dildy 等^[2] 方法, 稍作改进, Wistar 大鼠断头处死, 剥离全脑, 用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hank's 液冲洗 2~3 次, 冰浴下分离大脑皮质, 充分剪碎后 0.125% 胰蛋白酶消化, 37℃ 保温 20 min, 冰 RPMI1640 培养基 (含 10% 小牛血清) 终止消化, 220 目筛网过滤, 滤液离心, 用 RPMI1640 培养基调成一定密度的细胞悬液, 台盼蓝排斥实验检查, 细胞存活率在 95% 以上.

1.2.2 CaM 活性测定方法

a. 待测样品 CaM 提取

分离的神经细胞 (5×10^6 个/ml) 500 μL , 加入各种刺激物处理后, 加 Hank's 液 2 ml 终止反应, 离心, 弃上清, 加入 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 后匀浆, 匀浆液煮沸, 离心, 取上清液, 测蛋白质含量.

b. CaM 活性测定

根据 Thompson 等^[3] 方法, 略加改进. 第一步, PDE 反应液含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mmol/L MgCl_2 , 3.75 mmol/L 巯基乙醇, 1 g/L 牛血清白蛋白 (BSA), 0.2 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L cAMP, ^3H -cAMP (cpm 值为 2.0×10^5), 适量稀释的 PDE, 标准 CaM (0~200 ng) 或标本, 30℃ 保温 20 min, 各管置沸水浴中处理. 第二步加入蛇毒 (1 g/L) 50 μL , 混匀后于 30℃ 保温 20 min, 加入 30% Dowex 1 \times 8 水混悬液 400 μL , 置冰浴 10 min, 离心, 吸取上清液 200 μL , 闪烁计数, 根据 CaM 的标准曲线换算样品中的 CaM 含量.

2 结果

2.1 CCK₈ 作用不同时间对 CaM 活性的影响

每管细胞中加入 CCK₈ 至终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, 保温时间分别为 0.5、1、2、5、10、15、30 min, 结果如图 1 所示, CCK₈ 的浓度在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时刺激 CaM 活性增加在 0.5~15 min 内逐渐上升, 15 min 达到高峰以后缓慢下降. 因此, 其保温时间以 15 min 为宜.

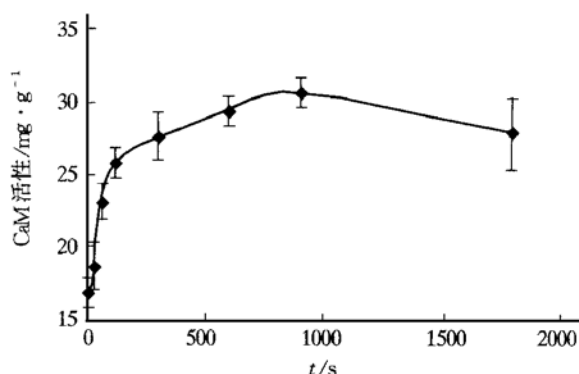


图 1 保温时间对 CaM 活性的影响

2.2 不同浓度的 CCK₈ 对 CaM 活性的影响

如图 2 所示, 于各管中加入不同浓度 CCK₈ 后, 随 CCK₈ 浓度的上升, CaM 活性逐渐增加, 在 10^{-12} ~ 10^{-7} mol/L 浓度范围内上升迅速, 10^{-7} mol/L 后逐渐趋于饱和, 10^{-11} mol/L 以上各点与空白对照相比, 均有显著性差异 ($P < 0.05$).

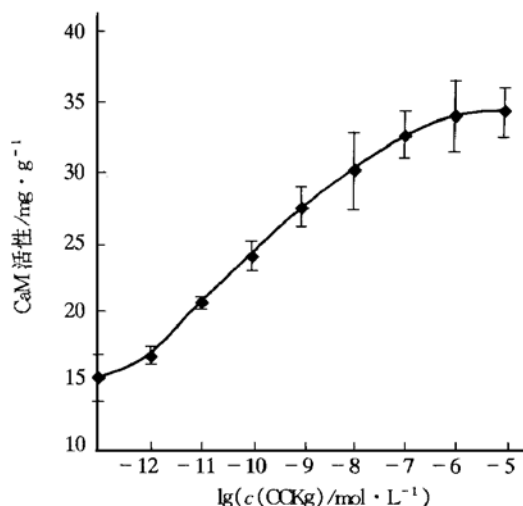


图 2 不同浓度 CCK₈ 对 CaM 活性的影响

2.3 CCK 受体拮抗剂 L-364, 718、L-365, 260 对 CaM 活性的影响

测定管依次加入不同浓度 (10^{-11} ~ 10^{-6} mol/L) 的 CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718 和 CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260, 再加入 10^{-7} mol/L CCK₈, 各管均 30℃ 保温, 结果如图 3. 两种拮抗剂浓度上升, 均可引起 CaM 活性的下降. 但两者的 IC_{50} 不同, 分别为: IC_{50} (L-364, 718) = 8.03×10^{-8} mol/L; IC_{50} (L-365, 260) = 2.05×10^{-9} mol/L.

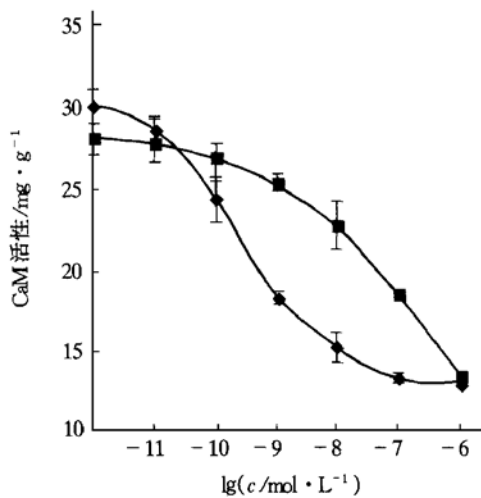


图3 CCK受体拮抗剂L-364, 718、L-365, 260对CaM活性的影响

■—■: L-364, 718; ●—●: L-365, 260.

3 讨 论

钙调素 (calmodulin, CaM) 是一种极其重要的钙调节蛋白, 与钙离子具有高亲和力和结合力, 作为 Ca^{2+} 的受体影响细胞的多种功能, CaM 广泛存在于脊椎动物、无脊椎动物、植物、原生动物的各种组织中, 且无组织特异性和种属特异性, CaM 的结构在进化过程中也保持了高度的恒定. CaM 的广泛分布及进化上的保守性说明它对生命的重要意义. Ca^{2+} -CaM 系统调节的靶酶, 包括环核苷酸磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE)、腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC)、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、磷酸化酶激酶 (phosphorylate kinase) 和磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2) 等, 这些酶在神经系统信息传递中起着重要作用. 哺乳动物的脑组织中含有丰富的 CaM, 约占总蛋白质含量的 0.2% ~ 0.4%. 神经组织中的 CaM 主要集中在突触胞浆、突触囊泡、突触前神经末梢和突触后致密处, 这一现象提示了 CaM 对突触功能可能有重要的调节作用.

CCK_A 受体是 $\text{G}_{q/11}$ 蛋白偶联受体, 循肌醇磷脂信号途径进行信号传递^[4]. CCK 可激活胰腺和胆囊的 CCK_A 受体, 引起肌醇磷脂的水解, 进而导致胞内 Ca^{2+} 的变化^[5]. Galas 等^[6] 利用豚鼠大脑皮质突触体的研究发现多种 CCK 类似物均可引起胞内 Ca^{2+} 含量的变化, 并与 CCK 浓度呈剂量依赖关系. Muller 等^[7] 也发现 CCK₈ 可引起小鼠海马星形胶质细胞内 Ca^{2+} 的增加, 利用受体亚型拮抗剂研究发现该变化是通过 CCK_B 受体介导的. CaM 作为

细胞内重要 Ca^{2+} 的受体, 提示 CaM 可能参与了 CCK 的胞内信号传递机制. 陈素珍等^[8] 利用大鼠脊髓突触小体的研究发现, CCK₈ 为 10 ~ 100 nmol/L 可显著增加脊髓突触小体 CaM 的活性, 浓度增至 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 CaM 活性无影响, 可能是 CCK_A 受体及 CCK_B 受体共同介导了 CCK₈ 对 CaM 活性的刺激作用. 但关于 CCK₈ 对大鼠大脑皮质中 CaM 活性的影响目前尚未见报道.

本研究以大鼠大脑皮质神经细胞为材料, 观察了 CCK₈ 及 CCK 受体拮抗剂 L-364, 718、L-365, 260 对胞内 CaM 活性的影响, 结果发现 CCK₈ 浓度为 10^{-6} mol/L 时对 CaM 活性的影响具有时间依赖性, 刺激后 0.5 ~ 15 min, CaM 活性逐渐上升, 在 15 min 达到最高点, 以后逐渐下降, 呈一钟形时间曲线. 有文献报道, CCK₈ 可引起新生大鼠脑细胞 IP₃ 的增加^[9]. 因此我们推测可能是 CCK₈ 与神经细胞表面 CCK 受体结合, 引起胞内肌醇磷脂的水解, IP₃ 增加, 胞内钙库打开, Ca^{2+} 释放, Ca^{2+} 浓度上升激活 CaM, CaM 激活后又可使钙泵激活^[10], 将 Ca^{2+} 排出, 胞内 Ca^{2+} 降低后, CaM 与 Ca^{2+} 解聚, CaM 活性消失, 逐渐恢复到静息状态, 这是一种反馈调节机制.

CCK₈ 在 10^{-12} ~ 10^{-7} mol/L 范围内可刺激 CaM 活性的增加, 超过 10^{-7} mol/L 后, 逐渐趋于饱和. 10^{-11} mol/L 以上各种浓度 CCK₈ 引起的 CaM 活性变化与空白对照组相比均有显著性差异 ($P < 0.05$), CCK₈ 刺激 CaM 活性变化呈 S 形剂量曲线. 即在较低的 CCK₈ 浓度刺激时, CaM 活性变化明显, 在高浓度时变化不显著.

CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 均可抑制 10^{-7} mol/L CCK₈ 引起的 CaM 活性的增加, 并呈剂量依赖关系, 但两者 IC_{50} 相差 40 倍. L-365, 260 更为有效, 较低浓度时即能明显拮抗 CCK₈ 引起的 CaM 活性变化. 因此我们认为在大鼠大脑皮质神经细胞中主要是 CCK_B 受体介导了 CaM 活性的变化, 提示 CaM 活性的变化可能是 CCK₈ 调节中枢神经系统功能的重要机制之一.

有研究表明, Ca^{2+} -CaM 可能影响神经递质的释放, 突触小泡蛋白的磷酸化, 并与神经递质的释放有关, 该作用需 CaM 存在. 若去除 CaM, 则由 Ca^{2+} 引起的递质释放效应消失, 因此我们认为在中枢神经系统中, CCK 通过其受体, 特别是 CCK_B

受体引起的多巴胺 (DA), γ -氨基丁酸 (GABA) 的释放可能与 CaM 的活性变化有关。这为进一步研究一些疾病, 如帕金森氏症、精神分裂症的发病机制提出了新的思路。

参 考 文 献

- 1 Liddle R A. Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**: 221~ 242
- 2 Dildy J E, Leslie S W. Ethanol inhibits NMDA-induced increase in free intracellular Ca^{2+} in dissociated brain cells. *Brain Res*, 1989, **499** (2): 383~ 389
- 3 Thompson W J, Brooker G, Appleman M M. Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterases with radioactive substrates. *Methods Enzymol*, 1974, **38**: 205~ 212
- 4 Wank S A. Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol*, 1995, **269** (5 pt 1): G628~ G646
- 5 Yule D I, Williams J A. CCK antagonists reveal that CCK_8 and JM V-180 interact with different sites on the rat pancreatic acinar cell CCK_A receptor. *Peptides*, 1994, **15** (6): 1045~ 1051
- 6 Galas M C, Bernad N, Martinez J. Pharmacological studies on CCK_B receptor in guinea pig synaptoneurosome. *Eur J Pharm*, 1992, **226**: 35~ 41
- 7 Muller W, Heinemann U, Berlin K. Cholecystokinin activates CCK_B receptor-mediated Ca^{2+} signaling in hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol*, 1997, **78** (4): 1997~ 2001
- 8 陈素珍, 韩济生. 八肽胆囊收缩素拮抗 NDAP 对大鼠脊髓钙调蛋白的作用. *生理学报*, 1994, **46** (2): 120~ 125
Chen S Z, Han J S. *Acta Physiologica Sinica*, 1994, **46** (2): 120 ~ 125
- 9 Zhang L J, Lu X Y, Han J S. Influence of cholecystokinin octapeptide phosphatidylinositol turnover in neonatal rat brain cells. *Biochem J*, 1992, **285** (2): 390~ 393
- 10 刘景生主编. 细胞信息与调控. 北京: 北京医科大学中国协和医科联合出版社, 1998. 191~ 192

Liu J S. *Cell Information and Regulation*. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Press, 1998. 191~ 192

The Effect of Cholecystokinin Octapeptide on CaM Activity in Rat Cerebral Cortex Neurocytes. XIANG Peng, CHEN Mar-Ling, WU Zhao-Feng (*Department of Biochemistry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

Abstract In order to investigate the effects of cholecystokinin octapeptide (CCK_8) on calmodulin activity in rat cerebral cortex, the cerebral cortex neurocytes was used as a model. CCK_8 stimulated the activation of CaM in a time-dependent manner. After 15 minutes of treatment of $1 \mu\text{mol/L}$ CCK_8 , the CaM activity reached the maximum increase. CaM activity was increased in a dose-dependent manner by CCK_8 ($10^{-12} \sim 10^{-7} \text{ mol/L}$). The CCK_B -specific receptor antagonist L-365, 260 and with a weaker efficiency, the CCK_A -specific receptor antagonist L-364, 718, were able to block a maximal effect of CCK_8 -induced CaM activation, suggesting that CCK_B receptor may regulate CaM activity in cerebral cortex.

Key words CCK_8 , CCK_B receptor, calmodulin

大剂量地塞米松快速高效诱导巨噬细胞凋亡

黄行许 陈练波¹⁾ 鲍永耀¹⁾ 朴英杰¹⁾ 黄有国²⁾

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 运用透射电镜、DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术、原位末端标记法 (TUNEL) 染色等技术, 检测了大剂量地塞米松处理小鼠腹腔巨噬细胞的各种变化。结果显示, 大剂量地塞米松处理的巨噬细胞发生胞体皱缩、染色质凝聚、胞质浓缩; TUNEL 染色呈阳性; 0.5 h 后 DNA 凝胶电泳即呈梯状条带; 流式细胞术作周期分析出现凋亡峰等明显的凋亡特征。并且随处理时间延长凋亡率升高。结果表明, 大剂量地塞米松快速、高效诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡。

关键词 小鼠, 腹腔巨噬细胞, 凋亡, 地塞米松

学科分类号 Q28

¹⁾ 第一军医大学中心实验室, 广州 510515. ²⁾ 通讯联系人。

Tel: (010) 64888518, E-mail: huang@sun5.ibp.ac.cn 收稿日期: 1999-10-12, 修回日期: 2000-03-07