

钙离子对在体坐骨神经中微管和轴浆转运的作用

甘思德、范明明、和国平 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

提要 大鼠坐骨神经内注入 50-200 mM CaCl_2 , 10 mM EGTA 或 100-200 mM 秋水仙碱, 使轴突中微管明显减少或消失, 标记蛋白的轴浆转运阻断在神经注射点附近。将 50 mM 秋水仙碱分别与 5 mM EGTA 或 25 mM CaCl_2 伍用对微管和转运的效应相加。因此 Ca^{2+} 可能是微管聚合和轴浆转运的一个调节因素, 其居间环节可能与微管有关。

关键词 在体轴浆流; 微管; 钙; 乙二醇双乙胺醚-N,N'-四乙酸; 秋水仙碱

神经元胞体合成的生物活性物质经胞浆转运到外周突起的特定部位是维持神经系统生长发育, 结构和功能的物质基础。然而对神经元

胞浆转运的机制和调节因素目前并不清楚。有人曾提出微管与转运有关⁽¹⁾, 但缺乏在体实验的根据, 而且最近报道, 提高营养液中的 Ca^{2+} 浓度虽可使离体神经的微管解聚, 却不影响物质在轴浆中转运⁽²⁾。微管究竟是否与转运有关, Ca^{2+} 对微管和转运又有什么作用? 我们用在体实验作进一步的探讨。

方 法

乌拉坦麻醉成年大鼠 在脊髓定位器上籍微操纵器及恒速泵向 $\text{L}_{4,5}$ 左、右腹角各注入 $[^3\text{H}]$ 亮氨酸 2 μl (上海原子核研究所制备, 1.96 TBq/mol, 37 MBq/ml), 10 min 注完。注射针

直径 $50\ \mu\text{m}$ 。3 h 后再在半量麻药麻醉下,向股方肌下缘的右侧坐骨神经内分别注入 CaCl_2 (北京红星化工厂,AR)或 EGTA(北京化工厂,CP)或秋水仙碱(Fluke) $20\ \mu\text{l}$,速度为 $10\ \mu\text{l}/\text{h}$,左侧神经对应点同时注入 $20\ \mu\text{l}$ 生理盐水作对照。注射点距 L_4 腹根出脊髓点约 $60\ \text{mm}$ 。1 h 后活杀,将两侧 $\text{L}_{4,5}$ 腹根,坐骨,腓总及胫神经按每 $5\ \text{mm}$ 一段取样,每段用 $0.5\ \text{N}\ \text{NaOH}$ $0.3\ \text{ml}$ 在 75°C 消化 1 h,冷却后各加入乙二醇乙醚 $3\ \text{ml}$,闪烁液 $5\ \text{ml}$ (其组成为 PPO $4\ \text{g}$, POPOP $0.1\ \text{g}$, 甲苯 $1000\ \text{ml}$),暗适应 12 h 后用 LKB II 型液闪仪测定。

电镜观察实验 坐骨神经注药 1 h 后,取注射点两侧 $2\ \text{mm}$ 以外的神经 $10\ \text{mm}$, 3% 戊二醛固定 1 h,在固定液中再各切取近注射点端 $1\ \text{mm}$,继续固定 1 h 后移于含 6.85% 蔗糖的 $0.2\ \text{M}\ \text{PBS}$ 中($\text{pH}\ 7.2$),漂洗过夜,其间换液 3 次, 1% 锇酸后固定,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅复染, JEM 6 C 透射电镜观察。

结果用 MDR Z 80 微机处理并作分组 t 检验。

结 果

Ca^{2+} 对标记蛋白在体轴浆转运的作用

腹角中神经元胞体将摄取的 $[\text{H}^3]$ 亮氨酸同化为标记蛋白,后者再顺向转运至轴突。腹根的放射活性随与脊髓的距离而逐段下降,但在坐骨、腓总及胫神经相对稳定,至转运的终点迅速降低到本底水平。同体臂神经本底为 $49 \pm \text{SD}\ 19\ \text{cpm}$ ($n = 100$)。标记蛋白 6 h 的平均转运距离为 $87 \pm 5\ \text{mm}$ ($n = 143$),此距离越过神经注射点约 $30\ \text{mm}$ 。神经内注入 CaCl_2 可提高轴浆中 Ca^{2+} 浓度⁽⁴⁾,注入 $5\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$ 对标记蛋白的转运没有影响; $25\ \text{mM}$ 似可减弱转运,使转运距离缩短, $50, 100$ 及 $200\ \text{mM}$ 均使转运阻断在神经注射点附近。紧邻注射点两端神经节段中放射活性的改变与结扎神经转运阻断的对照图形相似(图 1,2。结扎神经对照图未示出)。

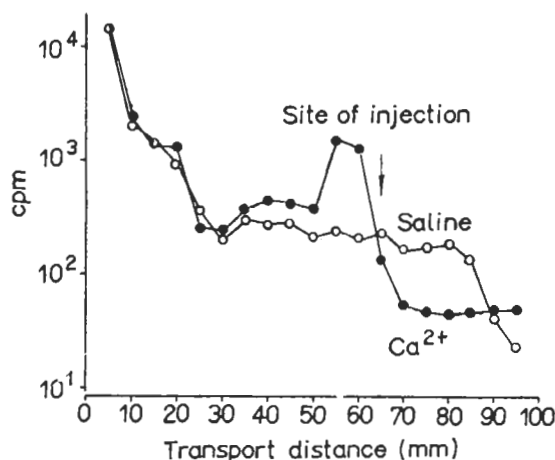


Fig 1. Effect of Ca^{2+} on axoplasmic transport of the labeled protein. At 3 h after injection of $[\text{H}^3]$ leucine into ventral horns, $100\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$ $20\ \mu\text{l}$ injected into right sciatic nerve, saline into left as control. The transport was blocked around the Ca^{2+} -injected site and the figure of transport curve was similar to that by nerve ligation. 5 rats/group.

神经内注射 Ca^{2+} 络合剂 EGTA 以降低轴浆中原有的内源性 Ca^{2+} 浓度, $10\ \text{mM}$ 全部阻断标记蛋白的顺向转运, $5\ \text{mM}$ 转运似有减弱, $2.5\ \text{mM}$ 无作用。将注射针刺入神经但不注射任何药物,标记蛋白的转运距离与生理盐水对照近似。这说明要维持正常的在体轴浆转运,轴浆中必须有一定浓度范围的 Ca^{2+} (图 2)。

Ca^{2+} 对在体微管的作用 大鼠坐骨神经的有髓或无髓纤维均有丰富的微管(图 3 A, B 见图版 2, 以下各图同)。神经中注射生理盐水 $20\ \mu\text{l}$ 对微管的形态,密度和分布无明显影响,注入 $5, 25\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$ 或 $2.5, 5\ \text{mM}\ \text{EGTA}$ 亦无明显变化(图未示出)注入可阻断转运的 $50-200\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$ 或 $10\ \text{mM}\ \text{EGTA}$ 则微管明显减少或基本消失(图 3 C, D)。微管由其亚基管蛋白聚合而成,它的减少或消失说明微管解聚。实验证明要维持在体微管的正常密度,轴浆中也必须有一定浓度的 Ca^{2+} , 这与要维持在体轴浆转运轴浆中必须有一定浓度的 Ca^{2+} 是相似的。

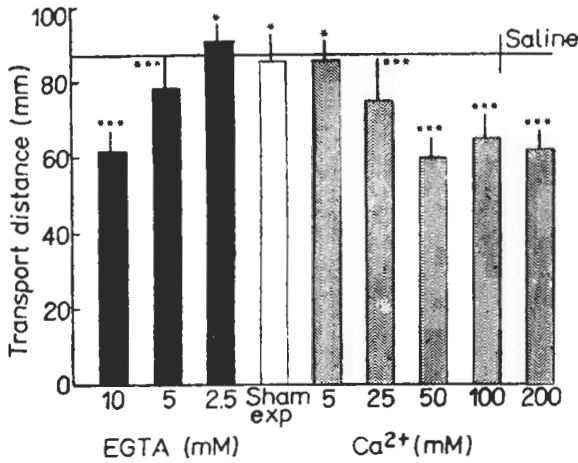


Fig 2. Relationship between axoplasmic Ca^{2+} concentrations and transport distances of the labeled protein. [^3H]leucine injected into ventral horns and CaCl_2 or EGTA injected into the right sciatic nerve as Fig 1. 5 rats/group, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

* $p > 0.05$, *** $p < 0.01$.

Ca²⁺ 或 EGTA 与秋水仙碱伍用对微管和轴浆转运的作用 神经内注射 25 或 50 mM 秋水仙碱对微管和标记蛋白的顺向转运无明显影响, 100 或 200 mM 使微管减少或消失, 转运阻断在注射点附近, 其转运距离分别为 64 ± 5 及 $62 \pm 6 \text{ mm}$ ($n = 5$).

分别将轻度减弱转运的 25 mM CaCl_2 或 5 mM EGTA 与对微管和转运无明显作用的 50 mM 秋水仙碱伍用, 伍用的效应相加, 使微管基本消失(图 3 E, F), 转运进一步减弱或阻断(表 1)。因此改变轴浆中 Ca^{2+} 浓度对微管

Tab 1. Effect of colchicine in combined injection with CaCl_2 or EGTA on centrifugal transport of labeled protein. Total volume $20 \mu\text{l}/2 \text{ h}$ injected into right sciatic nerves, saline into left as control. $\bar{x} \pm \text{SD}$

Colchicine	EGTA	CaCl_2	Rats	Transport distance (mm)	p
-	-	-	40	88 ± 5	
50 mM	-	-	5	86 ± 7	> 0.05
-	5 mM	-	5	79 ± 8	< 0.01
50 mM	5 mM	-	5	71 ± 10	< 0.01
-	-	25 mM	5	75 ± 11	< 0.01
50 mM	-	25 mM	5	65 ± 6	< 0.01

和转运的效应与秋水仙碱一致。

讨 论

实验所用药物均可使在体微管减少或消失, 标记蛋白的转运减弱或阻断, 并且凡使微管减少或消失的药物浓度总能阻断转运, 说明微管的解聚与转运阻断的关系密切。虽然电镜下目测微管计数不甚精确, 而正常轴浆中聚合的微管又可能过量⁽⁴⁾, 但微管消失和转运阻断这两个最大效应易于判断, 两者的关系也更为明确。为了解 Ca^{2+} 对微管和转运的作用是否为特异性, 又测试了其它 10 种离子。在所用剂量范围内, 除 Mg^{2+} , Sr^{2+} 等二价阳离子没有作用外, 还发现 Cd^{2+} 既能络合管蛋白的巯基使离体或在体微管解聚, 又能阻断标记蛋白的转运(待发表)。这就为微管可能参与在体轴浆转运的机制提供了进一步的证据。

一些离体实验发现秋水仙碱等药物兼有解聚微管和阻断转运的作用⁽⁵⁾, 但另一些离体实验应用同样或相似的药物, 微管解聚和转运阻断有时又不相伴存在^(2, 6-8), 因此对微管是否参与转运的机制迄今尚无定论。造成争论的原因之一可能由于各家离体实验条件不同, 比如有的实验选用的药物种类较少, 每种药物的剂量范围^(2, 6-8)又窄, 因为如本文报道, 药物对微管与转运是否有作用及其作用程度均严格取决于剂量。遗憾的是除枪乌鲷等巨大轴突外,

目前尚缺乏测定一般轴突轴浆中 Ca^{2+} 浓度的有效手段⁽⁹⁾。已知营养液中的 Ca^{2+} 不易穿过离体神经的外鞘⁽¹⁾，而在体神经内注射的药物还必须穿过神经周膜和神经内膜并仅在郎氏结及施兰氏切迹才可越过支持细胞及轴膜而进入有髓纤维的轴浆^(9,10)，因此进入轴突的实际有效剂量将远小于注射的浓度和容量。本文借神经内注射药物以改变轴浆中 Ca^{2+} 浓度的方法，为 Ca^{2+} 是微管聚合和轴浆转运的一个调节因素及微管参与转运机制，作了在体实验的证明。

致谢 蔡 翘教授指导，王国华同志制作电镜切片。

参 考 文 献

1 Chan SY, Ochs S, Worth RM. *J Physiol*

(Lond) 1980; 301 : 477

2 Brady ST, Crothers SD, Nosal C, McClure WO. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5909

3 Chan SY, Ochs S, Jersild RA Jr. *J Neurobiol* 1983; 15 : 89

4 Brimijoin S. *Fed Proc* 1982; 41 : 2312

5 Dustin P. *Microtubules*. 1st ed. Berlin: Springer, 1978 : 23-70, 167-214, 308-33

6 Fernandez HL, Hrncicus FC, Davison PF. *J Neurobiol* 1970; 1 : 395

7 Donoso JA, Illanes JP, Samson F. *Brain Res* 1977; 120 : 287

8 Byers MR. *Ibid* 1974; 75 : 97

9 Baker PF. *Ann NY Acad Sci* 1978; 307 : 250

10 Ellisman MH, Friedman PL, Hamilton WJ. *J Neurocytol* 1980; 9 : 185

Acta Pharmacologica Sinica 1986 May, 7 (3) : 204-207

Effect of Ca^{2+} on microtubules and axoplasmic transport of sciatic nerve *in vivo*

GAN Si-de, FAN Ming-ming, HE Guo-ping

(Inst Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

ABSTRACT CaCl_2 , EGTA or colchicine were injected into rat sciatic nerve to observe their effects on centrifugal transport of [^3H]leucine which was injected into L_{4,5} ventral horns 3 h earlier. The radioactivities of every 5-mm segment of ventral roots and the nerves were determined by scintillation and the nerves were examined under an electron microscope as well. CaCl_2 25 mM or EGTA 5 mM decreased the transport distance of labeled protein mildly. CaCl_2 50-200 mM or EGTA 10 mM or colchicine 100-200 mM induced a great decrease or even disappearance of microtubules and blocked the transport around the injected site. Sham microinjection into the nerve did not affect the microtubules and

transport. By injection of CaCl_2 25 mM or EGTA 5 mM combined with colchicine 50 mM, their effects on microtubules or transport were additive.

The results indicated that maintenance of a certain level of axoplasmic Ca^{2+} concentration was necessary for the polymerization of microtubules and axoplasmic transport *in vivo*. Ca^{2+} played a regulatory role in axoplasmic transport through the depolymerization of microtubules, thus microtubules were involved in the mechanism of axoplasmic transport.

KEY WORDS axoplasmic flow *in vivo*; microtubules; calcium; EGTA; colchicine

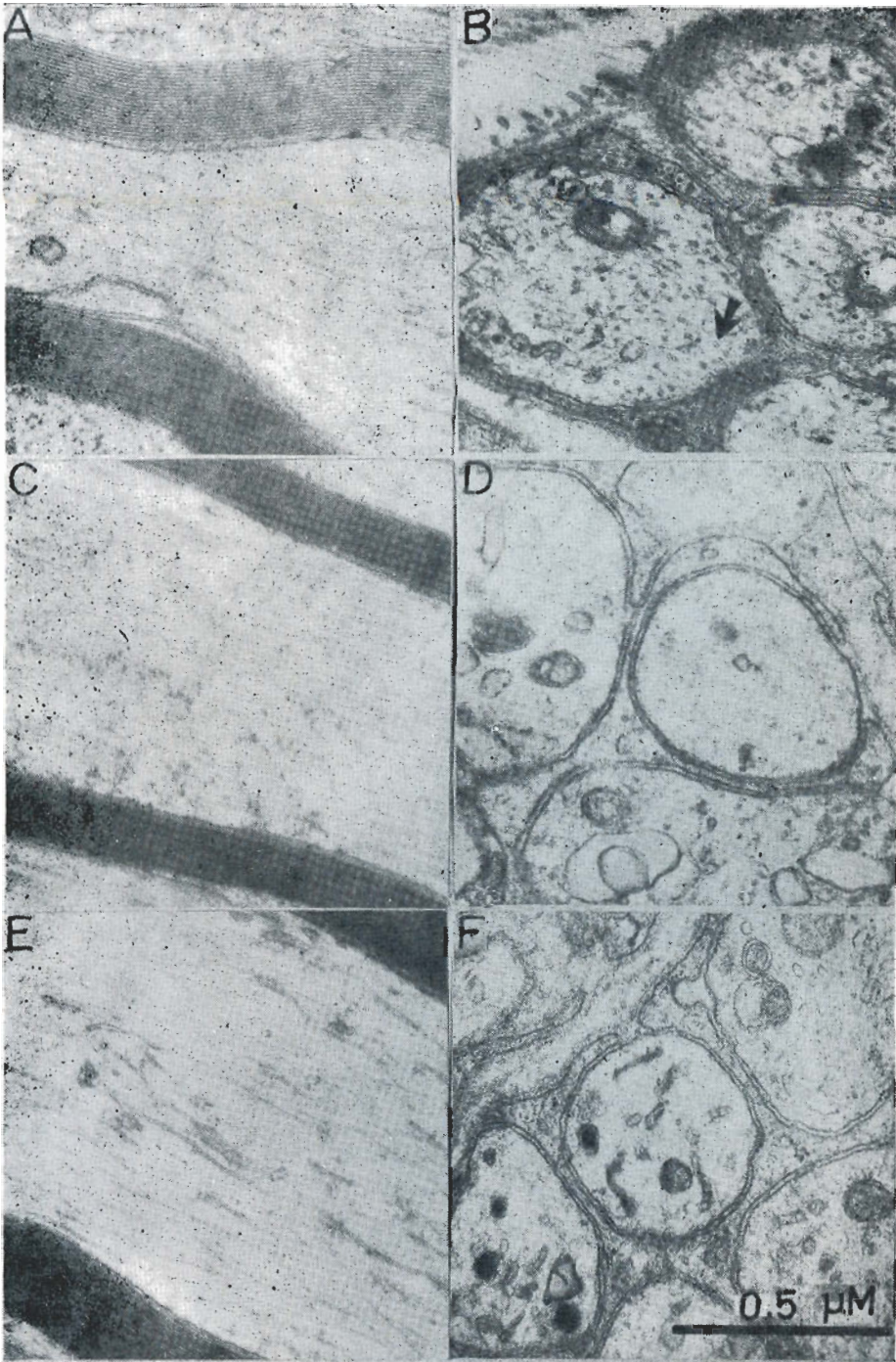


Fig 3. Microtubules in axons of rat sciatic nerves. A) Longitudinal section of a myelinated fiber. Abundant microtubules along the axis of axon. B) Transverse section of unmyelinated fibers, showing microtubules (arrow). Decrease or disappearance of microtubules under 100 mM CaCl_2 (longitudinal section, C) or 10 mM EGTA (transverse section, D) injected into sciatic nerve (20 $\mu\text{l}/2$ h. Samples were taken 1 h after the end of injection). Further lessened microtubules induced by combining injection of 50 mM colchicine with 5 mM EGTA (E), or with 25 mM CaCl_2 (F), at the rate of 20 $\mu\text{l}/2$ h. Samples were taken 1 h after combined injection. Bar 0.5 μm .