

实验方法

Received 2017-02-25 Accepted 2017-05-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31471080).

*Corresponding author. Tel: +86-351-4135091; Fax: +86-351-4135091; E-mail: jinshunqi2009@163.com

DOI: 10.13294/j.aps.2017.0033

眉题：李 甜等：非损伤微测技术实时检测海马脑片跨膜钙离子流

非损伤微测技术实时检测海马脑片跨膜钙离子流

李甜¹，原丽²，张军¹，焦娟娟¹，祁金顺^{1*}

¹山西医科大学生理学系，细胞生理学省部共建教育部重点实验室，太原 030001；

²山西长治医学院生理教研室，长治 046011

通讯作者：祁金顺

地址：山西省太原市迎泽区新建南路 56 号

电话：0351-4135091

E-mail: jinshunqi2009@163.com

中图分类号：Q4-33

总页数：20

图数：5

文章字数：9976

页眉：

本课题受国家自然科学基金项目资助

非损伤微测技术实时检测海马脑片跨膜钙离子流

李甜¹, 原丽², 张军¹, 焦娟娟¹, 祁金顺^{1,*}

¹山西医科大学生理学系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001;

²山西长治医学院生理教研室, 长治 046011

摘要: 脑内 β -淀粉样蛋白(amyloid- β protein, A β)的聚集是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的重要病理特征。A β 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。非损伤微测技术(non-invasive micro-test technique, NMT)是近年发展起来的一种利用 Fick 第一扩散定律和 Nernst 方程, 通过非接触方式检测膜外扩散电位获取离子跨膜流速的最新技术手段。本研究在 C57BL/6 小鼠海马脑片, 利用 NMT 首次检测了 A β 对谷氨酸(Glu)诱发的 Ca^{2+} 内流以及细胞外低钙引起的 Ca^{2+} 外排的影响, 并初步探讨了 A β 扰乱神经元 Ca^{2+} 稳态的相关机制。结果显示: (1)急性给予 Glu 可诱发海马脑片 CA1 区神经元产生起始快、继而缓慢衰减的持续性内向 Ca^{2+} 流; (2)A β 预处理浓度依赖性地增强海马神经元对 Glu 的反应性, 显著提高给药后 5 min 内 Ca^{2+} 内流的平均流速, 而 NMDA 受体拮抗剂 D-APV 可有效阻断 A β 对神经元 Glu 反应的这种易化作用; (3)用低钙人工脑脊液急性灌流脑片可引起海马 CA1 区神经元产生持续的外向跨膜 Ca^{2+} 流, 其大部分可被特异性 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体抑制剂 KB-R7943 所阻断; (4)A β 预处理可部分抑制低钙人工脑脊液引起的 Ca^{2+} 外排。这些结果表明: A β 引起的细胞内 Ca^{2+} 超载不仅涉及到 Ca^{2+} 内流增加, 也与其对 Ca^{2+} 外排的抑制有关; A β 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。NMT 具有操作相对简单、实时获取结果、非损伤的优点, 适用于脑片 Ca^{2+} 内流和 Ca^{2+} 外排的长时间测定。因此, 本研究不仅为解释 A β 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。

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

中图分类号: Q4-33

Real-time measurement of Ca^{2+} flux in hippocampal slice with

non-invasive micro-test technique

LI Tian¹, YUAN Li², JIAO Juan-Juan¹, ZHANG Jun¹, QI Jin-Shun^{1,*}

¹*Department of Physiology, Key Laboratory for Cellular Physiology of Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;* ²*Department of Physiology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China*

Abstract: The deposition of amyloid- β protein ($A\beta$) in the brain is the most important pathological feature of Alzheimer's disease (AD). The mechanism of $A\beta$ neurotoxicity may be closely related to the disturbance of intracellular Ca^{2+} homeostasis. Non-invasive micro-test technique (NMT) is a novel technique developed in recent years, which can be used to directly record transmembrane ion influx and efflux in a non-contact way by detecting the diffusion potentials outside of the membrane. The present study examined the effects of $A\beta_{31-35}$ pretreatment on glutamate (Glu)-induced Ca^{2+} influx and low Ca^{2+} solution-induced Ca^{2+} efflux in the hippocampal slices of C57BL/6 mice using NMT. The results showed that: (1) acute administration of Glu (2.5, 5, 10 mmol/L) evoked a persistent transmembrane Ca^{2+} influx in hippocampal CA1 neurons, with a rapid onset and subsequent decay; (2) pretreatment with $A\beta$ dose-dependently increased the average rate of Ca^{2+} influx induced by Glu during the initial 5 min, which was blocked by NMDA receptor antagonist D-APV; (3) perfusion with low Ca^{2+} artificial cerebrospinal fluid (aCSF) induced a continuous Ca^{2+} efflux, which was mostly blocked by KB-R7943, a specific antagonist of Na^+/Ca^{2+} exchanger; (4) $A\beta_{31-35}$ pretreatment partially inhibited the low Ca^{2+} aCSF-induced Ca^{2+} efflux. These results indicate that $A\beta$ not only facilitates Ca^{2+} influx but also inhibits Ca^{2+} efflux, which jointly contribute to the $A\beta$ -induced intracellular Ca^{2+} overload; the potentiation of $A\beta$ on Glu excitotoxicity is mainly mediated by NMDA receptors, while the target for $A\beta$ to affect Ca^{2+} efflux was mainly Na^+/Ca^{2+} exchangers. NMT showed multiple advantages in detecting transmembrane Ca^{2+} flux in brain slices, such as non-invasiveness to target cells, fast, convenient and real-time acquisition of Ca^{2+} flux. Therefore, this study provided new experimental evidence for $A\beta$ -induced Ca^{2+} overload, as well as a novel application for NMT in measuring transmembrane Ca^{2+} flux of neurons in the brain.

Key words: non-invasive micro-test technique; hippocampal slice; Ca^{2+} flux;

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的、不可逆的中枢神经系统退行性疾病,临床主要表现为进行性认知功能障碍、记忆力减退和精神行为改变^[1, 2]。AD 的一个重要病理特征是脑内沉积有高密度的 β -淀粉样蛋白(amyloid- β protein, A β)^[3-5]。内源性 A β 的主要分子形式是 A β_{1-40} 和 A β_{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蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)后的产物^[6]。研究表明, A β 发挥神经毒性作用的活性中心位于其 25~35 序列(A β_{25-35})甚或 31~35 序列(A β_{31-35})^[7-9]。本研究组前期的研究显示, A β_{31-35} 预处理可使小鼠培养的大脑皮层细胞凋亡^[10, 11]、抑制大鼠大电导钙激活钾通道的功能活性^[12]、损伤大鼠在体海马的突触可塑性和空间学习记忆能力^[13, 14]。现有证据表明, 细胞内 Ca^{2+} 超载是 A β 产生细胞毒性作用的重要机制^[15-17]。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, 用于测定神经元跨膜 Ca^{2+} 流的技术手段主要有: 细胞内 Ca^{2+} 成像和电生理膜片钳记录膜电流。然而, 这些方法均有不尽如人意之处。细胞内 Ca^{2+} 成像能较直观地显示胞内的 Ca^{2+} 浓度, 但该方法往往局限于培养细胞水平, 而且需要将染料(如 Fura-2 和 Fluo-4 等)导入到细胞内, 染料本身即可影响细胞活性, 还会随时间延长和激发光持续作用出现淬灭。膜片钳技术可以直接测定快速短暂的跨膜 Ca^{2+} 电流, 但电极经封接、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, 且空间分辨率很低、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净流速的最新技术手段, 它根据 Fick 第一扩散定律和 Nernst 方程, 通过检测细胞胞外的离子扩散电位, 从而测得离子跨膜流动情况。NMT 的最大好处是记录电极不直接接触组织, 因而对细胞没有任何损伤。同时, 既可以检测单细胞, 也可用于多细胞或组织样本的测定。近年来, NMT 在植物生理活动研究中已经开始应用^[18-20]。还有少量报道表明, NMT 可以在培养神经元上记

录到经不同条件处理后的 K^+ 流、 H^+ 流、 Cl^- 流或 Ca^{2+} 流的变化^[21-23]。然而，在动物脑组织进行实时、动态 Ca^{2+} 流研究，特别是记录 Ca^{2+} 外排的研究尚未见报道。本研究采用 NMT 在小鼠海马脑片神经元实时记录了谷氨酸(glutamate, Glu)引起的跨膜 Ca^{2+} 内流流速变化，还首次观察了低钙人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, aCSF)引起的跨膜 Ca^{2+} 外排过程。在此基础上，探讨了 $A\beta_{31-35}$ 对 Ca^{2+} 内流和 Ca^{2+} 外排的影响，旨在利用新的技术手段进一步揭示 $A\beta$ 扰乱神经元 Ca^{2+} 稳态的相关机制。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 本研究使用的主要仪器设备有：非损伤微测定系统(BIO-001A, Younger USA Sci. & Tech. Corp., USA)、 Ca^{2+} 测定用玻璃微电极(XY-SJ-Ca, Younger USA)、垂直振动切片机(VF300, 香港伯齐科技有限公司)、露点渗透压仪(VAPRO 5520, 美国 WESCORE 公司)、pH 计(PH400, 上海 ALALIS 公司)等。主要试剂包括： $A\beta_{31-35}$ (Abcam 公司)、*L*-Glu (Sigma 公司)，NMDA 受体拮抗剂 D-APV (Tocris 公司)、AMPA 受体拮抗剂 CNQX (Tocris 公司)、质膜 Na^+/Ca^{2+} 交换体(Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX)抑制剂 KB-R7943 (Tocris 公司)、质膜钙泵(plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA)抑制剂 Trifluoperazine dihydrochloride (TFH, Sigma 公司)、非损伤微测系统定标相关试剂(北京旭月科技有限公司)。

1.2 实验动物 8 月龄雄性 C57BL/6 小鼠 20 只，由山西医科大学实验动物中心提供。小鼠在 12 h/12 h 明/暗交替环境中饲养，自由进食和饮水，室温保持在 24~26 °C，湿度控制在 50%~60%。

1.3 离体海马脑片制备 动物在 5%乌拉坦(7 mL/kg, i.p.)麻醉下仰卧位固定于手术平台上，暴露胸腔，用 30 mL 低温并经 95% O_2 /5% CO_2 混合气体饱和的切片液进行心脏灌注。切片液成分及其浓度 (mmol/L)：NMDG (*N*-methyl-*D*-glucamine) 93、KCl 2.5、 NaH_2PO_4 1.2、 $NaHCO_3$ 30、HEPES 20、*D*-葡萄糖 25、硫脲(thiourea) 2、抗坏血酸钠(sodium ascorbate) 5、丙酮酸钠(sodium pyruvate) 3、 $MgSO_4$ 10、 $CaCl_2$ 0.5、*N*-乙酰半胱氨酸(NAC) 12。调整 pH 至 7.3~7.4。灌注之后，迅速断头，剥离大脑并浸入混合气体饱和后的低温切片液中 30 s 左右，切除小脑和大脑前 1/3 后固定于垂直振动切片机上，并沿水平面切片，厚度 200 μm 。从心脏灌注至完成切片的时间控制在 15 min 内。然后，将修正后的海

马脑片置于(32 ± 0.5) °C 的 aCSF 中孵育 1 h, 并持续通入 95% O₂/5% CO₂ 混合气体。aCSF 成分及各自浓度(mmol/L): NaCl 120、KCl 3、NaH₂PO₄ 1.25、NaHCO₃ 25、D-葡萄糖 10、MgCl₂ 1、CaCl₂ 2.5, pH 7.3~7.4。

1.4 Ca²⁺电极充灌、定标及定位 如图 1A 所示, 在低倍显微镜观察下, 将玻璃微电极后部充灌 1 cm 长度左右的电解质溶液(100 mmol/L CaCl₂), 然后利用气压将电解质溶液压到电极尖端(电极尖端开口约 4~5 μm), 尖端再吸入 Ca²⁺液态离子交换剂(LIX) (Hydrogen Ionophore I-cocktail B, No.95293, Fluka, Buchs SG, Switzerland), 长度约为 15~50 μm。将 Ag/AgCl 丝从电极后端插入, 使其与电解质接触, 并且在电极固定架(EHB-1; World Precision Instruments)上与电压检测器相连。参比电极(DRIREF-2; World Precision Instruments)为 Ag/AgCl 固体电极, 置于灌流液中并接地。分别采用含有 3 mmol/L 和 0.3 mmol/L Ca²⁺的 aCSF 作为测试电极的校正液, 获取电压/浓度校正曲线, 曲线斜率达到(29 ± 3) mV/decade 范围后, 开始进行脑片实验。将测试电极在 aCSF 中定位于被测脑片的近端位置(near position), 然后以固定距离 dx 进行近端位置和远端位置(far position)两点的电位测定, 获得的两点间电位差(dv)可通过电压/浓度校正曲线得出两点间 Ca²⁺的浓度差(dc)。将 dc 和 dx 代入 Fick 第一扩散定律公式 $J = -D \times dc/dx$, 即可获得 Ca²⁺的扩散通量(J), 代表单位时间流过单位面积的 Ca²⁺量, 包括流动方向和流动速率(pmol·cm⁻²·s⁻¹), 其中 J 正值代表 Ca²⁺外排, 负值代表 Ca²⁺内流。式中 D 为离子/分子特异的扩散常数, 其单位是 cm²·s⁻¹。

实际检测海马脑片神经元跨膜 Ca²⁺流速时, 将脑片放入盛有 5 mL aCSF 的培养皿中, 脑片上方用盖网压紧以固定脑片位置。在三维推进装置下, 将充有 LIX 和高钙电解质液体的测试电极(图 1B)快速定位到脑片边缘(图 1C), 然后利用步进马达将电极精确移动到海马 CA1 区细胞层(图 1D)上方约 50 μm 处, 并以 30 μm 的两点固定距离在 Z 轴方向进行自动、往复的位置转换, 用以测定海马脑片 CA1 区多个神经元膜外发生的 Ca²⁺浓度变化, 电极移动频率即采样频率设定为 0.3 Hz。

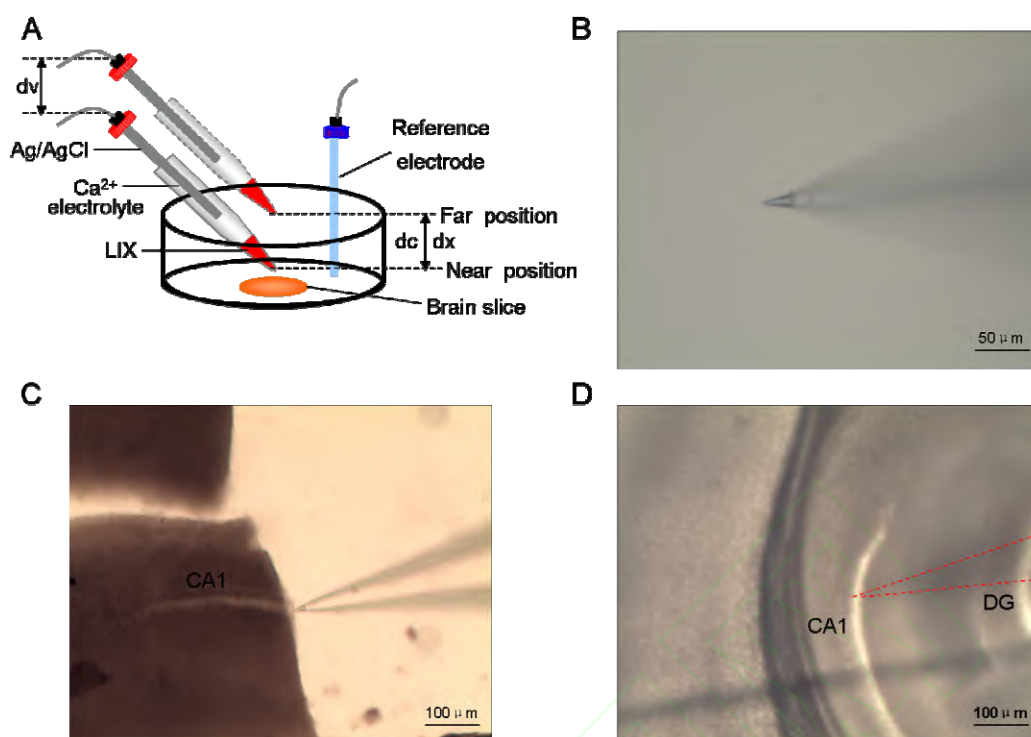


图 1. 非损伤微测技术测定海马脑片 Ca^{2+} 流的测定原理及测试电极推进过程

Fig. 1. Measurement of Ca^{2+} flux of hippocampal slices by using NMT. *A*: A diagram showing the principle of NMT ion flux measurements. Ca^{2+} sensitive microelectrode (silver gray) filled with Ca^{2+} LIX and 100 mmol/L Ca^{2+} electrolyte oscillated between far and near positions, with a fixed distance (30 μm). The reference electrode (blue) was in the same dish. *B*: Micrograph showing the tip of a microelectrode in aCSF. *C* and *D*: Screen-printed pictures showing that the microelectrode located at the margin of the brain slice (*C*) and directly over the CA1 region (*D*).

1.5 海马脑片 Ca^{2+} 流速测定及给药 将海马脑片置于经混合气体饱和后的 aCSF 中，将记录电极三维推进至脑片海马 CA1 区神经元正上方 50 μm 处，开启电极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 (2.5、5、10 mmol/L)；(2) 急性给予不同浓度的 $\text{A}\beta_{31-35}$ (10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)；(3) 不同浓度 $\text{A}\beta_{31-35}$ (10、30、50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后急性给予 Glu (10 mmol/L)；(4) $\text{A}\beta_{31-35}$ (50 $\mu\text{mol/L}$) 联合 D-APV (100 $\mu\text{mol/L}$) 或 CNQX (20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后急性给予 Glu (10 mmol/L)；(5) 用低钙 (0.35 mmol/L Ca^{2+}) aCSF 急性灌流；(6) $\text{A}\beta_{31-35}$ (50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后给予低钙 aCSF；(7) KB-R7943 (100 nmol/L) 或 TFH (100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理后给予低钙 aCSF。对照组仅给予溶解药物的溶剂(vehicle)。

1.6 统计学分析 测得的 Ca^{2+} 流速(容积流速)单位为($\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 负值代表 Ca^{2+} 内流, 正值表示 Ca^{2+} 外排。所有实验数据用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。取给药后 5 min 内的平均流速进行组间比较, 采用 t 检验和 one-way ANOVA 进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 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 2A 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 ± 0.1) $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n = 44$)。当分别急性给予不同浓度的 Glu 后, 与对照组($n = 10$, 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, 表现为起始最大, 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、5、10 mmol/L 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 ± 6.528) $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n = 10$, $P < 0.05$)、(-331.864 ± 22.742) $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n = 10$, $P < 0.001$)和(-498.03 ± 55.783) $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n = 14$, $P < 0.001$)。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 2C 和 2D 所示, 与对照组 5 min 内的平均 Ca^{2+} 流速[(2.912 ± 2.466) $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]相比, 给予 10 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 12$)、30 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 14$)和 50 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 15$) $\text{A}\beta_{31-35}$ 5 min 后, 各组的平均 Ca^{2+} 流速均明显升高($P < 0.05$ 或 0.001), 并随浓度增加而成倍增加, 在不同浓度之间呈现出明显的浓度依赖性($P < 0.05$)。

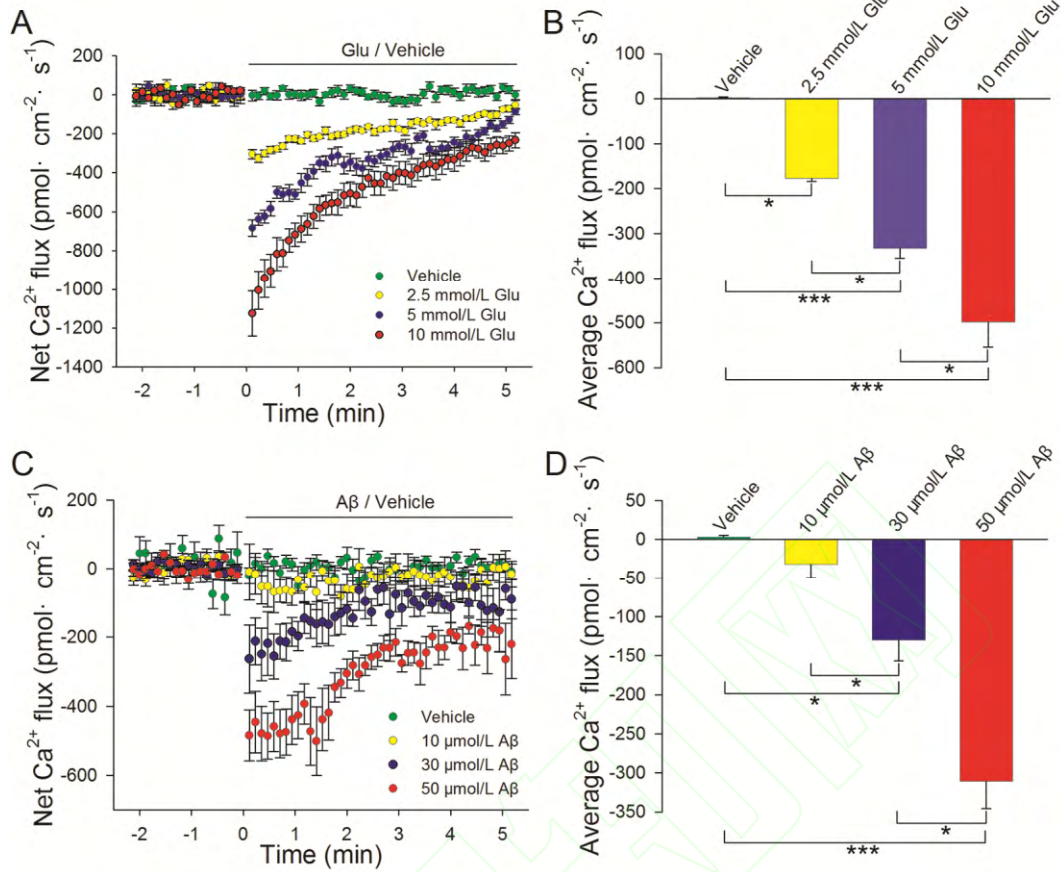


图 2. 急性给予 Glu 及 Aβ₃₁₋₃₅ 引起海马脑片 CA1 区神经元 Ca²⁺内流

Fig. 2. Acute application of glutamate (Glu) or Aβ₃₁₋₃₅ increased transmembrane Ca²⁺ influx in the CA1 region of hippocampal slice. *A* and *C*: Plots showing the time courses of neuronal net Ca²⁺ flux in the hippocampal CA1 region. A basic Ca²⁺ flux was first recorded for 2 min (–2 to 0 min) before drug application. Negative deflection of curves indicates Ca²⁺ influx. Except for the control group (only vehicle without drugs), both Glu (*A*) and Aβ₃₁₋₃₅ (*C*) all dose-dependently induced rapid Ca²⁺ influx. *B* and *D*: Histograms showing the statistical analyses of average Ca²⁺ influx during 5 min following drugs or vehicle application. Columns and error bars represent means ± SEM (*n* = 10–15). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

2.2 Aβ₃₁₋₃₅ 浓度依赖性增强 Glu 诱发的海马脑片神经元 Ca²⁺内流

如图 3A 所示, 各组脑片在稳定记录 2 min 基础状态 Ca²⁺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 Aβ₃₁₋₃₅ 处理 2 min, 然后比较各组脑片急性给予 Glu (10 mmol/L)后 5 min 内的平均 Ca²⁺流速。结果可见(图 3B), 没有 Aβ₃₁₋₃₅ 预处理时, Glu 引起的平均 Ca²⁺流速为 (–430.747 ± 37.537) pmol · cm⁻² · s⁻¹ (Vehicle+Glu, *n* = 12); 不同浓度的 Aβ₃₁₋₃₅ (10, 30, 50 μmol/L)预处理

2 min 后, 同样浓度的 Glu 诱导的内向 Ca^{2+} 流速较 $\text{A}\beta_{31-35}$ 未预处理组(即 Vehicle+Glu 组)明显增大($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。各组之间 Ca^{2+} 流速也呈现浓度依赖性增强((10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta$ +Glu, $n = 13$; 30 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta$ +Glu, $n = 14$; 50 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta$ +Glu, $n = 15$, $P < 0.001$)。这表明, $\text{A}\beta_{31-35}$ 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。

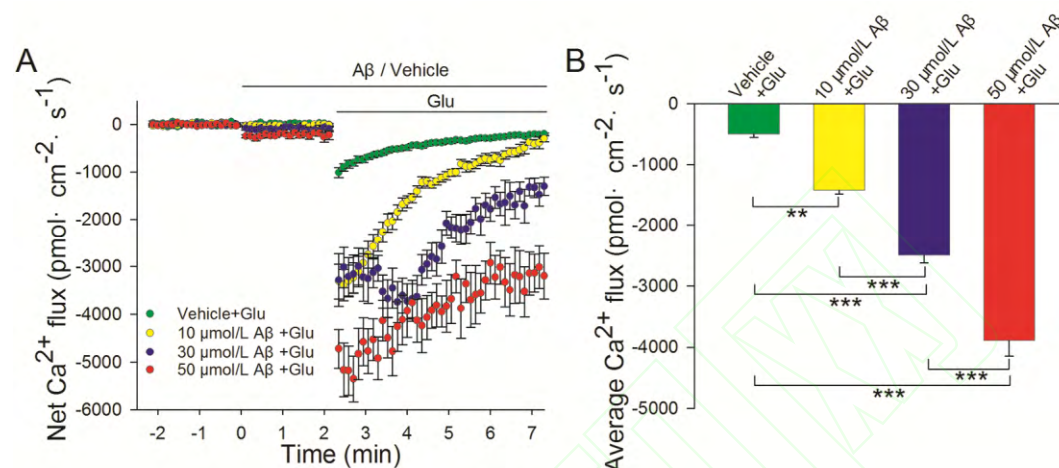


图 3. $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理剂量依赖性增强 Glu 诱发的海马脑片神经元 Ca^{2+} 内流

Fig. 3. $\text{A}\beta_{31-35}$ pretreatment dose-dependently increased Glu-induced Ca^{2+} influx in the hippocampal CA1 neurons. *A*: Plots showing time courses of Glu-induced Ca^{2+} influx in presence or absence of $\text{A}\beta_{31-35}$. After 2 min (–2 to 0 min) of stable basic recording, different concentrations of $\text{A}\beta_{31-35}$ or vehicle were added into the dish. Another 2 min later, Glu was applied to induce Ca^{2+} influx. *B*: Histograms showing Glu-induced average Ca^{2+} flux during 5 min with or without $\text{A}\beta_{31-35}$ pretreatment, indicating that $\text{A}\beta_{31-35}$ dose-dependently increased the excitability of hippocampus to Glu stimulation. Columns and error bars represent means \pm SEM ($n = 13$ –15). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

2.3 NMDA 受体阻断剂 D-APV 明显阻断 $\text{A}\beta_{31-35}$ 和 Glu 所致海马脑片神经元 Ca^{2+} 内流

为了探讨 $\text{A}\beta_{31-35}$ 对 Glu 诱发 Ca^{2+} 内流的易化作用机制, 我们比较了单独给予 $\text{A}\beta_{31-35}$ (50 $\mu\text{mol/L}$) 以及联合给予 NMDA 受体拮抗剂 D-APV (100 $\mu\text{mol/L}$) 或 AMPA 受体拮抗剂 CNQX (20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理的效应。如图 4 所示, 正常对照组 (Vehicle+Glu, $n = 10$) Glu 引起的 Ca^{2+} 内流平均流速为 (-571.253 ± 57.129) pmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$; $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理 ($\text{A}\beta_{31-35}$ +Glu, $n = 8$) 可易化 Glu 的效应, 使平均流速增加 5 倍之多($P < 0.001$); $\text{A}\beta_{31-35}$ 联合 D-APV (D-APV+ $\text{A}\beta$ +Glu, $n = 8$) 预处理后,

Glu 诱发的 Ca^{2+} 内流显著减小 ($P < 0.001$ vs $\text{A}\beta_{31-35} + \text{Glu}$)；而联合给予 CNQX ($\text{CNQX} + \text{A}\beta + \text{Glu}$, $n = 8$) 预处理后, Glu 诱发的 Ca^{2+} 内流流速虽有一定程度减小 ($P < 0.05$ vs $\text{A}\beta_{31-35} + \text{Glu}$)，但效应明显不如 D-APV 联合给药组 (图 4A, B)。

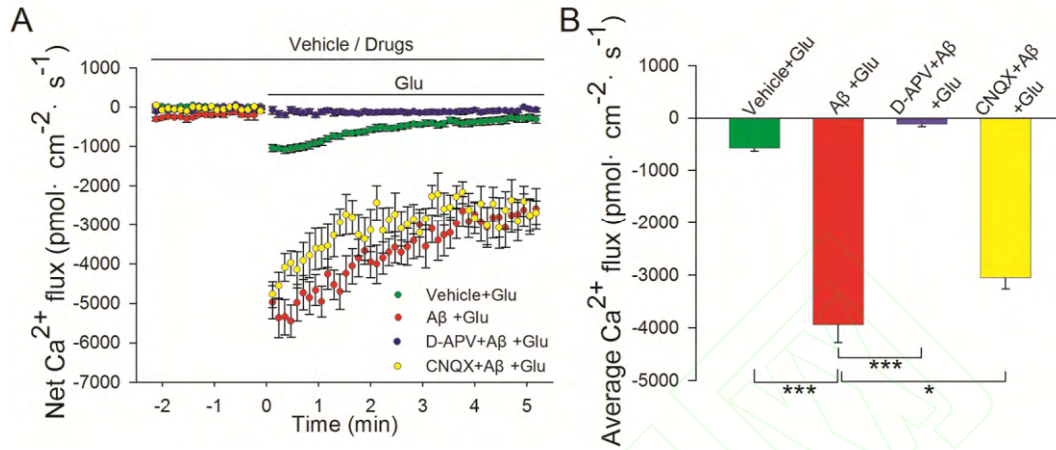


图 4. NMDA 受体阻断剂 D-APV 逆转了 $\text{A}\beta_{31-35}$ 对海马脑片神经元跨膜 Ca^{2+} 内流的易化作用
Fig. 4. NMDA receptor antagonist D-APV reversed the potentiation of $\text{A}\beta_{31-35}$ on Glu-induced Ca^{2+} influx in the hippocampal neurons. A: Plots showing time courses of neuronal net Ca^{2+} flux induced by Glu in the hippocampal CA1 region. The strong potentiation of Ca^{2+} influx induced by $\text{A}\beta_{31-35}$ ($\text{A}\beta_{31-35} + \text{Glu}$) was completely reversed by NMDA receptor antagonist D-APV (D-APV+A β +Glu). B: Histograms comparing the statistical analyses of average Ca^{2+} influx during 5 min under different conditions. Columns and error bars represent means \pm SEM ($n = 8-10$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

2.4 $\text{A}\beta_{31-35}$ 抑制低钙 aCSF 诱发的海马脑片神经元 Ca^{2+} 外排

如图 5A 所示, 将电极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 ± 0.499) pmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$, $n = 10$]. 但将正常 aCSF 换为低钙 (0.35 mmol/L Ca^{2+}) aCSF (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 ± 300.595) pmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$, 随后逐渐回落, 5 min 时基本稳定在 (3337.39 ± 231.405) pmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ 上下。统计学处理 (图 5B) 表明, 单纯低钙液 (Low [Ca^{2+}] $_o$, $n = 10$) 诱发的 Ca^{2+} 外排 5 min 内平均流速为 (3867.868 ± 244.502) pmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ ($P < 0.001$)。有趣的是, $\text{A}\beta_{31-35}$ (50 $\mu\text{mol/L}$) 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 ± 440.146) pmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ ($P < 0.05$, $n = 11$)。接着, 我们用质膜 NCX 抑制剂 TFH 或 PMCA

抑制剂 KB-R7943 分别预处理, 以检查这种低钙液诱发的 Ca^{2+} 外流机制。结果显示: 两种抑制剂在正常 aCSF 中并不影响基础性的 Ca^{2+} 流, 但用 TFH (100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理(TFH+Low $[\text{Ca}^{2+}]_o$)后, 低 Ca^{2+} 液引起的 Ca^{2+} 流速较未经任何药物预处理的低钙液(Low $[\text{Ca}^{2+}]_o$)组明显减少, 平均流速降低到(1954.733 ± 327.616) $\text{pmol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ ($P < 0.001$, $n = 11$); 用 KB-R7943 (100 nmol/L) 预处理(KB-R7943+Low $[\text{Ca}^{2+}]_o$)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 ± 75.665) $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($P < 0.001$, $n = 10$), 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 NCX 介导的, NCX 可能也是 $\text{A}\beta_{31-35}$ 抑制 Ca^{2+} 外排的主要靶点。

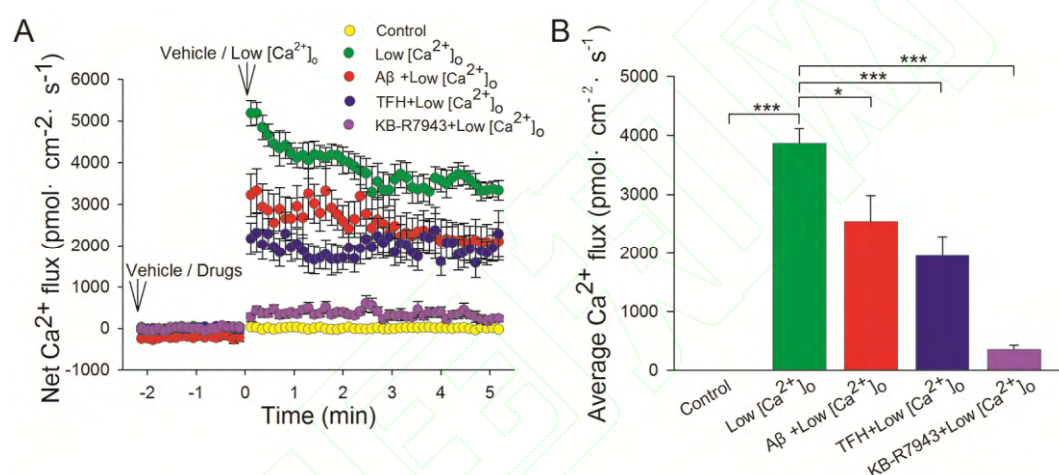


图 5. $\text{A}\beta_{31-35}$ 预处理抑制海马脑片 CA1 区神经元低钙 aCSF 诱发的 Ca^{2+} 外流

Fig. 5. $\text{A}\beta_{31-35}$ pretreatment inhibited low Ca^{2+} aCSF-induced Ca^{2+} efflux in the hippocampal CA1 neurons. A: Plots showing continuous recording of neuronal Ca^{2+} flux induced by low Ca^{2+} aCSF in presence of $\text{A}\beta_{31-35}$, TFH (a specific antagonist of plasma membrane Ca^{2+} ATPase), or KB-R7943 (a specific antagonist of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger). Positive deflection of traces indicates Ca^{2+} efflux. In positive control group (green), only low Ca^{2+} aCSF was applied after 2 min (-2 to 0 min) basic recording. Clearly, low Ca^{2+} aCSF induced a significant Ca^{2+} efflux, while $\text{A}\beta_{31-35}$ pretreatment (red) partially suppressed the Ca^{2+} efflux. In addition, KB-R7943 almost blocked all the low Ca^{2+} aCSF-induced Ca^{2+} efflux. B: Bar graphs showing the average net Ca^{2+} fluxes in different groups. Columns and error bars represent means \pm SEM ($n = 10-11$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使, 钙信号转导对于维持神经元的正常功能起着

重要的调节作用。安静情况下,神经元胞浆内游离 Ca^{2+} 的浓度很低,这使得细胞在受到刺激时能够通过外钙内流和(或)内钙释放显著改变细胞自身的功能活动。Glu 是哺乳类动物中枢神经系统中广泛存在的兴奋性神经递质。在大脑皮层和海马锥体神经元中,它通过与 Glu 受体的结合在学习记忆中发挥重要作用^[24]。Glu 受体中的 NMDA 受体属于促离子型受体,是存在于质膜上的阳离子通道,对 Ca^{2+} 有较大的通透性。当细胞去极化到一定程度时,结合了配体 Glu 的 NMDA 受体通道可打开,从而介导 Ca^{2+} 内流,成为神经细胞主要的 Ca^{2+} 内流途径之一。脑内 Glu 的水平以及 Glu 受体的功能是否正常,对神经元的兴奋性以及各种脑功能的完成都具有重要作用。然而,胞内 Ca^{2+} 水平是一把双刃剑,当细胞外 Glu 浓度过高或 Glu 受体功能发生异常上调时,经由 Glu 受体通道大量流入的 Ca^{2+} 可使细胞内出现 Ca^{2+} 超载,继而激活某些磷脂酶、蛋白酶、内切酶、一氧化氮合酶等,由此损害了细胞功能,最终使神经元出现凋亡或死亡^[25, 26]。

AD 时脑内发生的神经元退行性改变和学习记忆功能下降,可能就与 $\text{A}\beta$ 所致的钙稳态失调特别是 Ca^{2+} 超载有关。有研究表明,正常生理浓度 (pmol/L~nmol/L) 的 $\text{A}\beta$ 在脑内有益于神经生长,可促成长时程增强(long-term potentiation, LTP)的形成并参与神经递质的调节^[27-29]。但较高浓度($\mu\text{mol/L}$)时会出现神经毒性作用,对已分化、成熟的神经元产生显著的伤害作用,并抑制神经递质的释放,引起神经元变性和坏死^[28]。Mattson 等^[30]发现, $\text{A}\beta$ 能促进胞外 Ca^{2+} 内流,升高神经元胞浆内的 Ca^{2+} 水平,使神经元对 Glu 的神经毒性更加敏感。还有研究表明,可溶性寡聚体 $\text{A}\beta$ 可易化 Glu 的兴奋毒作用,影响突触传递,损伤海马 LTP^[31, 32]。本研究组前期采用细胞内钙成像的研究也表明,急性给予 $\text{A}\beta_{1-40}$ 、 $\text{A}\beta_{25-35}$ 或 $\text{A}\beta_{31-35}$ 均可剂量依赖性增加大鼠原代培养神经元的细胞内 Ca^{2+} 浓度^[33, 34]。本研究采用 NMT 手段探测了急性给予 Glu 或 $\text{A}\beta$ 对小鼠海马脑片跨膜 Ca^{2+} 流的影响,结果显示: Glu 可在海马脑片神经元浓度依赖性地诱发内向 Ca^{2+} 流(图 2),这与 Shabala 等在原代培养的皮层神经元上的结果^[21]以及我们先前在细胞 Ca^{2+} 成像实验中观察到的胞内 Ca^{2+} 水平升高^[34]是基本一致的。我们注意到,这种 Glu 诱发的 Ca^{2+} 净内流流速不是恒定的,给药后 5 min 内 Ca^{2+} 流速从起始的最大值有一个逐渐减小并趋于平稳的过程,这可能反映了细胞为抵御持续 Ca^{2+} 内流、恢复 Ca^{2+} 稳态所启动的 Ca^{2+} 主动外排机制。重要的是,本研究观察到,急性给予 $\text{A}\beta$ 可诱导出明显的内向 Ca^{2+} 流(图 2),且 $\text{A}\beta$ 引起的 Ca^{2+} 内流程度与给予的 $\text{A}\beta$

浓度具有很好的相关性。这一结果,为以往实验包括我们^[34]在内曾观察到的 A β 引起细胞内 Ca²⁺超载的现象,提供了直接的 Ca²⁺跨膜流动(包括方向和速率变化)变化新证据。以往研究证实, A β 能通过易化 Glu 受体增加 Ca²⁺内流^[30]。本研究也显示,在 A β 预处理后的海马脑片上, Glu 诱导的内向 Ca²⁺流速要比未经 A β 处理的脑片大得多(图 3)。这说明, A β 预处理对 Glu 受体具有明显的易化作用。进一步的问题是, A β 对哪一种促离子型 Glu 受体的易化作用更强? 本研究比较了联合给予 A β 和 NMDA 受体阻断剂 D-APV 或 AMPA 受体阻断剂 CNQX 的差异,结果显示: D-APV 对 Ca²⁺内流抑制效应较 CNQX 更明显。这提示, NMDA 受体可能在 A β 对 Glu 受体的易化作用中贡献更大。

胞内钙稳态的调节机制涉及质膜 Ca²⁺转运调节和胞内 Ca²⁺库调节。本研究采用的 NMT 技术将 Ca²⁺敏感电极直接置于非常靠近细胞(约 50 μ m)的膜外一侧,主要记录并反映的是跨质膜的 Ca²⁺净移动情况。细胞维持胞内 Ca²⁺稳态和正常的兴奋性离不开质膜对 Ca²⁺的主动转运,即 Ca²⁺外排。在可兴奋细胞如神经细胞中, Ca²⁺的外排主要通过 NCX 和 PMCA 两种主动转运机制得以实现^[35]。NCX 存在于细胞的膜性结构上,以心、脑和肾分布最多^[36]。NCX 在脑内的表达有多种亚型,通过调节神经元 Ca²⁺浓度参与神经递质的释放、突触可塑性及胶质细胞的发育等过程。有研究表明,敲除海马区的 NCX3 可损害小鼠的 LTP^[37]。PMCA 在脑组织中的表达量也相当高,其对 Ca²⁺亲和力高,但容量小,主要负责 Ca²⁺转运的精细调控^[38]。本研究利用 NMT 技术和急性给予低钙液灌流,在海马脑片上记录到了外向跨膜 Ca²⁺流,这种 Ca²⁺外流并非起因于离子电极尖端所处溶液中的 Ca²⁺浓度变化,因为远离脑片或在无脑片的 aCFS 中,给予低钙液灌流并未检测到任何明显的 Ca²⁺流速变化(结果未显示)。本研究显示,这种低钙液诱发的 Ca²⁺外流可以被 PMCA 抑制剂 TFH 和 NCX 抑制剂 KB-R7943 所阻断。其中 KB-R7943 的抑制作用更加明显,几乎将低钙诱发的 Ca²⁺外流流速抑制到原先的 10% (图 5)。这提示,低钙液诱发的海马 CA1 区神经元 Ca²⁺外流可能主要是 NCX 活动增加所致。那么, A β 是否在增强 Glu 兴奋毒、提高 Ca²⁺内流的同时也能影响 Ca²⁺外排机制? 本研究结果显示, A β 预处理可使低钙液诱发的海马神经元外向 Ca²⁺流速明显降低。鉴于 NCX 在海马神经元 Ca²⁺外排中所做的突出贡献,我们推测, A β 极有可能影响到 NCX 的功能,进而抑制了正常的 Ca²⁺外排。然而,本研究尚不能排除 A β 对 PMCA 的伤害,因为 TFH 也能部分抑制低钙液诱发的

Ca²⁺外流。A β 抑制 Ca²⁺外排的确切机制还有待结合其他方法如分子生物学手段进一步明确, 但 A β 抑制 Ca²⁺外排、加速细胞 Ca²⁺超载的病理意义已是显而易见的。

与现有的离子测定技术比较, NMT 的最大特点在于记录电极不接触组织, 对细胞不构成任何损伤, 故可长时间用于 Ca²⁺跨膜净流速的实时动态测量。同时, 通过改变记录电极尖端的口径和适当调整电极与标本的距离, NMT 技术可在一定程度上提高空间分辨率, 达到既可检测单细胞, 也可同时检测多细胞的跨膜 Ca²⁺流。本研究采用的是单电极 Ca²⁺测定技术, 电极尖端口径约 5 μm , 距离海马 CA1 区细胞层上方约 50 μm , 故测得的 Ca²⁺浓度变化反映的是多神经元在该处的同步化活动。值得一提的是, NMT 技术还可以使用多电极记录, 并且不限于 Ca²⁺流, 这就为脑片上不同脑区的各种离子同步化检测提供了极大的便利。当然, 由于检测原理和技术所限, NMT 的时间分辨率较低(远不如电压钳技术), 也不能直接测定胞内各种细胞器的 Ca²⁺信号变化。因此, 根据实验需求, 选择最恰当的一种或多种方法, 取各实验手段之长进行综合研究可能是更有意义的。

总之, 本研究采用 NMT 技术, 通过 Glu 诱发 Ca²⁺内流和低钙液引起 Ca²⁺外排, 探讨了 A β 对海马脑片 CA1 区神经元跨膜 Ca²⁺流的影响, 证实了 A β 不仅可以引发基础状态下的 Ca²⁺内流、易化 Glu 对神经元的兴奋性, 也能抑制 Ca²⁺外排, 从而加速神经元钙稳态的失衡, 导致细胞 Ca²⁺超载。因此, 本研究为探讨 A β 神经毒性作用机制的 Ca²⁺超载学说提供了又一新的实验证据; 同时, 本实验在检测脑片组织跨膜 Ca²⁺流中显示出的快速、方便和非损伤特征, 特别是低 Ca²⁺液可靠诱发 Ca²⁺外排的结果也为开展脑功能 Ca²⁺信号转导机制的研究提供了新的技术思路。

参考文献

- 1 Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004; 430(7000): 631–639.
- 2 Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2005; 115(6): 1449–1457.
- 3 Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A 2003; 100(18): 10417–10422.
- 4 Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580): 353–356.
 - 5 Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440(7082): 352–357.
 - 6 Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 2015; 52: 1–18.
 - 7 Pan Y, Chen X, Wu M, Ma C, Qi J. Arginine vasopressin prevents against A β_{25-35} -induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Horm Behav* 2010; 57(4–5): 448–454.
 - 8 Qi JS, Qiao JT. Amyloid β -protein fragment 31-35 forms ion channels in membrane patches excised from rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 2001; 105(4): 845–852.
 - 9 Qi JS, Ye L, Qiao JT. Amyloid β -protein fragment 31-35 suppresses delayed rectifying potassium channels in membrane patches excised from hippocampal neurons in rats. *Synapse* 2004; 51(3): 165–172.
 - 10 Yan X, Qiao J, Dou Y, Qiao Z. β -amyloid peptide fragment 31-35 induces apoptosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience* 1999; 92(1): 177–184.
 - 11 Clementi ME, Marini S, Coletta M, Orsini F, Giardina B, Misiti F. A β (31-35) and A β (25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. *FEBS Lett* 2005; 579(13): 2913–2918.
 - 12 Qi JS (祁金顺), Qiao JT. Suppression of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by amyloid beta-protein fragment 31-35 in membrane patches excised from hippocampal neurons. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2001; 53(3): 198–204 (in Chinese with English abstract).
 - 13 Li S (李少凤), Qi J. Effect of A β_{31-35} on the learning and memory of rats. *Natl Med Front Chin (中国医疗前沿)* 2011; 6(2): 34–37 (in Chinese with English abstract).
 - 14 Zhang J, Wu M, Qi J, Qiao J. Amyloid β -protein fragment 31-35 suppresses long-term potentiation in hippocampal CA1 region of rats *in vivo*. *Synapse* 2006; 60(4): 307–313.

- 15 Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Cavaliere F, Perez-Samartin A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C. Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 2010; 47(3): 264–272.
- 16 Li LM (李灵敏), Qiao JT, Zhang C. Effects of humanin on elevation of intracellular calcium concentration induced by β -amyloid peptide₃₁₋₃₅ in cultured cortical neurons. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2009; 61(2): 127–131 (in Chinese with English abstract).
- 17 Zhao L (赵丽), Cui AL, Zhang C. Group III mGluRs reduces intracellular calcium increased induced by $\text{A}\beta_{31-35}$. *Chinese Journal of Gerontology (中国老年学杂志)* 2011; 31(9): 1561–1564 (in Chinese with English abstract).
- 18 Babourina O, Newman I, Shabala S. Blue light-induced kinetics of H^+ and Ca^{2+} fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant arabidopsis seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4): 2433.
- 19 Sun J, Chen S, Dai S, Wang R, Li N, Shen X, Zhou X, Lu C, Zheng X, Hu Z. NaCl-Induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiol* 2009; 149(2): 1141.
- 20 Li Q, Li BH, Kronzucker HJ, Shi WM. Root growth inhibition by NH_4^+ in Arabidopsis is mediated by the root tip and is linked to NH_4^+ efflux and GMPase activity. *Plant Cell Environ* 2010; 33(9): 1529–1542.
- 21 Shabala L, Howells C, West AK, Chung RS. Prolonged $\text{A}\beta$ treatment leads to impairment in the ability of primary cortical neurons to maintain K^+ and Ca^{2+} homeostasis. *Mol Neurodegener* 2010; 5(1): 30.
- 22 Yang L, Zhu L, Xu Y, Zhang H, Ye W, Mao J, Chen L, Wang L. Uncoupling of K^+ and Cl^- transport across the cell membrane in the process of regulatory volume decrease. *Biochem Pharmacol* 2012; 84(3): 292–302.
- 23 Ray S, Howells C, Eaton ED, Butler CW, Shabala L, Adlard PA, West AK, Bennett WR, Guillemin GJ, Chung RS. Tg2576 cortical neurons that express human Ab are susceptible to extracellular $\text{A}\beta$ -induced, K^+ efflux dependent neurodegeneration. *Plos One* 2011; 6(4): e19026.
- 24 Francis PT. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18(Supplement 1): S15–S21.
- 25 Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J*

- Physiol 2000; 529 Pt 1(1): 57–68.
- 26 Gleichmann M, Mattson MP. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(7): 1261–1273.
 - 27 Mura E, Lanni C, Preda S, Pistoia F, Sara M, Racchi M, Schettini G, Marchi M, Govoni S. β -amyloid: a disease target or a synaptic regulator affecting age-related neurotransmitter changes? *Curr Pharm Des* 2010; 16(6): 672–683.
 - 28 Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M. Dual effect of beta-amyloid on $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. *PLoS One* 2012; 7(1): e29661.
 - 29 Varga E, Juhasz G, Bozso Z, Penke B, Fulop L, Szegedi V. A β (1-42) enhances neuronal excitability in the CA1 via NR2B subunit-containing NMDA receptors. *Neural Plast* 2014; 2014: 584314.
 - 30 Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992; 12(2): 376–389.
 - 31 Hamilton A, Zamponi GW, Ferguson SS. Glutamate receptors function as scaffolds for the regulation of β -amyloid and cellular prion protein signaling complexes. *Mol Brain* 2015; 8(1): 18.
 - 32 Lei M, Xu H, Li Z, Wang Z, O'Malley TT, Zhang D, Walsh DM, Xu P, Selkoe DJ, Li S. Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. *Neurobiol Dis* 2016; 85: 111–121.
 - 33 Wang XH, Yang W, Wang ZJ, Cai HY, Li QS, Qi JS. Val8-GLP-1 remodels synaptic activity and intracellular calcium homeostasis impaired by amyloid β peptide in rats. *J Neurosc Res* 2013; 91(4): 568–577.
 - 34 Wu MN (武美娜), Li X, Guo F, Qi J. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in amyloid β -fragment-induced intracellular Ca^{2+} elevation in cultured rat cortical neurons. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2009; 61(6): 517–525 (in Chinese with English abstract).
 - 35 Reeves JP, Condrescu M, Chernaya G, Gardner JP. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport in the mammalian heart. *J Exp Biol* 1994; 196(6): 375–388.
 - 36 Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79(3): 763–854.

- 37 Molinaro P, Viggiano D, Nistico R, Sirabella R, Secondo A, Boscia F, Pannaccione A, Scorziello A, Mehdaawy B, Sokolow S, Herchuelz A, Di Renzo GF, Annunziato L. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX3) knock-out mice display an impairment in hippocampal long-term potentiation and spatial learning and memory. *J Neurosci* 2011; 31(20): 7312–7321.
- 38 Stahl WL, Eakin TJ, Jr JWMO, Breininger JF, Filuk PE, Anderson WR. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization. *Mol Brain Res* 1993; 16(3–4): 223–231.