意大利蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度测定方法的研究*

杨 俊[1,2] 周 玮[1] 周 婷[1,2] 王 强[1,2**] 代平礼[1,2] 吴艳艳[1,2]

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 农业部授粉昆虫重点开放实验室 北京 100093)

摘 要 本实验试图建立一套蜜蜂脑神经细胞游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的体外测定方法。采用 Fura-2 acetoxy-methyl ester(Fura-2 AM)作为荧光指示剂,对体外培养的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 脑神经细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 测定方法进行了探索,研究了不同浓度的 Fura-2 AM 及不同的孵育时间对细胞钙离子测量 ratio 值的影响。结果测得细胞 ratio 值随 Fura-2AM 浓度的增大而降低,孵育时间也会影响 ratio 值,综合比较得到最佳孵育时间以及最佳染料浓度,并在此基础上制订了一套意大利蜜蜂蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度的测定方法,这对进一步建立以蜜蜂神经细胞钙离子浓度变化作为衡量环境有毒物质对蜜蜂的风险研究具有重要意义。

关键词 蜜蜂,脑神经细胞,Fura-2 AM,钙离子浓度,测量

The detection method of intracellular Ca^{2+} ion concentration of brain neurons of honeybee *Apis mellifera ligustica*

YANG Jun[1,2] ZHOU Wei[1] ZHOU Ting[1,2] WANG Qiang[1,2**] DAI Ping-Li[1,2] WU Yan-Yan[1,2]

(1. Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;
2. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

Abstract A prototype in vitro method to measure intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in honeybee brain cells was developed and tested. Fura-2 AM was used as a florescence indicator to measure intracellular calcium ion concentration ratio values and incubation time ratio was also recorded and analyzed using META FLOUR software. The results revealed that cell ratio values decreased among groups with increased concentration of Fura-2 AM during cell incubation, and there were highly significant differences between groups ($P < 0.01$). Similarly, it was clear that incubation time can potentially affect ratio values; for example only 10 mins incubation resulted in ratio values significantly lower than the other treatments.

Key words honeybee, brain cells, Fura-2 AM, free calcium concentration, determination

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 由于其产蜜及产王浆的能力强,是我国饲养的主要经济蜂种,同时又是我国进行农业授粉的主要蜂种,为农业增产增质发挥了重要的作用。但是现在随着人类在农作物生产中大量使用农药等化药产品,环境中各种有害物质的增多,使得蜜蜂在为人们做出巨大贡献的同时,也受到了很多毒害。因此,在细胞水平研究农药等有毒物质对蜜蜂的影响,对于保护这种农业重要的授粉昆虫具有重要的价值。此外,作为一种公认的环境污染的"生物指示器",以蜜蜂作为工具进行环境毒理学的研究同样具有重要的理论及现实意义。

神经细胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的稳定为正常的生命活动提供保障(Limbrick *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996),细胞内钙调控的轻微变化便可显著影响神经元功能(Mayer, 1989),而 $[Ca^{2+}]_i$ 平衡的破坏往往也是细胞功能异常甚至死亡的关键因素和外在表现(耿东进等, 1994; 陈良怡等, 2000),因此测定神经细胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 变化可作为评定一种物质对神经细

* 资助项目:国家自然科学基金项目(31072094)、"十二五"现代蜂产业技术体系建设专项、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费专项资助。

** 通讯作者,E-mail: beeprotect@ yeah. net

收稿日期:2011-12-05,接受日期:2012-03-01

意大利蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度测定方法的研究*

杨 俊[1,2] 周 玮[1] 周 婷[1,2] 王 强[1,2**] 代平礼[1,2] 吴艳艳[1,2]

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 农业部授粉昆虫重点开放实验室 北京 100093)

摘 要 本实验试图建立一套蜜蜂脑神经细胞游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的体外测定方法。采用 Fura-2 acetoxy-methyl ester(Fura-2 AM)作为荧光指示剂,对体外培养的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 脑神经细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 测定方法进行了探索,研究了不同浓度的 Fura-2 AM 及不同的孵育时间对细胞钙离子测量 ratio 值的影响。结果测得细胞 ratio 值随 Fura-2AM 浓度的增大而降低,孵育时间也会影响 ratio 值,综合比较得到最佳孵育时间以及最佳染料浓度,并在此基础上制订了一套意大利蜜蜂蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度的测定方法,这对进一步建立以蜜蜂神经细胞钙离子浓度变化作为衡量环境有毒物质对蜜蜂的风险研究具有重要意义。

关键词 蜜蜂,脑神经细胞,Fura-2 AM,钙离子浓度,测量

The detection method of intracellular Ca^{2+} ion concentration of brain neurons of honeybee *Apis mellifera ligustica*

YANG Jun[1,2] ZHOU Wei[1] ZHOU Ting[1,2] WANG Qiang[1,2**] DAI Ping-Li[1,2] WU Yan-Yan[1,2]

(1. Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;
2. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

Abstract A prototype in vitro method to measure intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in honeybee brain cells was developed and tested. Fura-2 AM was used as a florescence indicator to measure intracellular calcium ion concentration ratio values and incubation time ratio was also recorded and analyzed using META FLOUR software. The results revealed that cell ratio values decreased among groups with increased concentration of Fura-2 AM during cell incubation, and there were highly significant differences between groups ($P < 0.01$). Similarly, it was clear that incubation time can potentially affect ratio values; for example only 10 mins incubation resulted in ratio values significantly lower than the other treatments.

Key words honeybee, brain cells, Fura-2 AM, free calcium concentration, determination

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 由于其产蜜及产王浆的能力强,是我国饲养的主要经济蜂种,同时又是我国进行农业授粉的主要蜂种,为农业增产增质发挥了重要的作用。但是现在随着人类在农作物生产中大量使用农药等化药产品,环境中各种有害物质的增多,使得蜜蜂在为人们做出巨大贡献的同时,也受到了很多毒害。因此,在细胞水平研究农药等有毒物质对蜜蜂的影响,对于保护这种农业重要的授粉昆虫具有重要的价值。此外,作为一种公认的环境污染的"生物指示器",以蜜蜂作为工具进行环境毒理学的研究同样具有重要的理论及现实意义。

神经细胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的稳定为正常的生命活动提供保障(Limbrick *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996),细胞内钙调控的轻微变化便可显著影响神经元功能(Mayer, 1989),而 $[Ca^{2+}]_i$ 平衡的破坏往往也是细胞功能异常甚至死亡的关键因素和外在表现(耿东进等, 1994; 陈良怡等, 2000),因此测定神经细胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 变化可作为评定一种物质对神经细

* 资助项目:国家自然科学基金项目(31072094)、"十二五"现代蜂产业技术体系建设专项、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费专项资助。

** 通讯作者,E-mail: beeprotect@ yeah. net

收稿日期:2011-12-05,接受日期:2012-03-01

胞毒性的重要指标之一。研究测定蜜蜂神经细胞钙离子浓度的方法可以为今后进一步进行蜜蜂神经细胞的毒理研究提供基础。

细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的测量方法有很多(陈立华,1996),其中以荧光标记法应用最广。Fura-2 是目前测定胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 应用最广的荧光指示剂(Tsien *et al.*,1985;Malgaroli *et al.*, 1987;Goldman *et al.*,1990;Sharif,1993),它可以测定细胞内高浓度的 Ca^{2+} 浓度,对微量 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化也很敏感,且方法简单易用(陈立华,1996)。

本项研究拟通过实验分析比较 Fura-2 AM 不同孵育时间以及不同孵育浓度对胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,得到 Fura-2 AM 最佳的孵育时间以及孵育浓度,并最终确定测定意大利蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度的优化方法。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 来自中国农业科学院蜜蜂研究所蜜蜂保护与生物安全研究室,实验时取即将出房的封盖子脾置入 32℃的培养箱,随时抓取从封盖子新出房的工蜂用于脑神经细胞的解剖培养。

1.2 主要试剂及仪器

Leibovitz's L-15 Medium, powder(GIBCO 公司,Cat. No. 41300-039);99.7% 溴氰菊酯标准品 GBW (E) 060138; DIMETHYL SULPHOXIDE (DMSO) (SIGMA);Fura-2 AM (SIGMA);胎牛血清(GIBCO 公司);双抗 [青霉素(10 000 U/mL)/链霉素(10000μg/mL)(GIBCO);HEPES(北京 KEHAOZE);酵母粉(OXOID)。

荧光倒置相差显微镜 Eclipse Ti-U (日本 Nikon); Lambda DG-4 (美国 Sutter Instrument Company);Meta Imaging Series 7.5 (美国 Universal Imaging Corporation);细胞恒温培养箱(日本 SANYO)。

实验中主要用了 1 倍的 PBS 缓冲液(1x phosphate-buffered saline),L-15 培养液,1 × HEPES 缓冲液以及 HBSS 缓冲液。下面依次介绍了试验中所需营养液及缓冲液的配制及保存方法。

配制 1 L PBS 缓冲液:8.00 g NaCl,0.20 g KCl,1.44 g Na_2HPO_4,0.24 g KH_2PO_4,溶于 950 mL 蒸馏水,用 HCL 或 NaOH 调 pH 至 7.0,加蒸馏水定溶至 1 L。高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 30 min,放至室温后保存于 4℃冰箱。

表 1 L-15 培养液配制成分

Table 1 Components of the L-15 medium

培养液成分 Medium composition	各组成成分含量 Component content
L-15 Medium powder	13.7% (w/v)
葡萄糖 Glucose	3.4 g/L
蔗糖 Sucrose	32.0 g/L
果糖 Fructose	2.1 g/L
L-脯氨酸 L-proline	0.4 g/L
双抗 Double-resistance	0.9% (v/v)
酵母粉 Yeast powder	0.4% (w/v)
胎牛血清 Fetal bovine serum	13% (v/v)

按表格 1 所示准确称量葡萄糖、蔗糖、果糖、L-脯氨酸、酵母粉及袋装 L-15 粉末放于烧杯,加入 950 mL 蒸馏水(少于所需体积 5%),慢慢搅拌使所有固体充分溶解,加入 9 mL 双抗,用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 将培养液 pH 调为 7.0,用蒸馏水定溶至 1 L,并立即用 0.22 μm 的滤膜过滤分装,按 13% 的体积比加入胎牛血清,置于 4℃保存。

表 2 2 × HEPES 缓冲盐溶液配方

Table 2 Components of the 2 × HEPES buffer saline

缓冲液成分 Composition of the buffers	各物质含量(g) Component content
NaCl	1.6
KCl	0.074
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0.027
葡萄糖 Sucrose	0.2
HEPES	1

将表 2 中所有物质溶解在 90 mL 的蒸馏水中,用 0.5 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,再用蒸馏水定容至 100 mL,用 0.22 μm 滤膜过滤并分装保存于 -20℃,使用时稀释为 1 × HEPES。

准确称取表 3 中各物质,溶于 1 L 蒸馏水,用 5.6% 的 $NaHCO_3$ 调节 pH 至 7.0,用 0.22 μm 滤膜过滤,保存于 4℃冰箱。

表 3　HBSS 配方

Table 3　Components of the HBSS

缓冲液成分 Composition of the buffers	各成分浓度 (mmol/L) Concentration	各物质含量 (g/L) Component content
$CaCl_2$(无水)	1.3	0.14
KCl	5.4	0.4
KH_2PO_4	0.4	0.06
$Mg\ Cl_2 \cdot 6H_2O$	0.5	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4	0.1
NaCl	136.9	8
$NaHPO_3$	4.2	0.35
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.3	0.11
D-Glucose	5.5	1
HEPES	8.0	2.08

1.3　实验设计与方法

1.3.1　蜜蜂脑细胞的原代培养　关于蜜蜂脑神经细胞的贴壁培养已有研究报道(周婷等,2008)。本实验中对蜜蜂脑神经细胞的贴壁培养在文献(Kreissl and Bicker,1992;赵佼等,1999;周亚竞等,2000;尹毅青等,2002)的基础上进行了改进,使细胞生长状态更好。

贴壁细胞的培养:高温灭菌的 PBS 缓冲液在 4℃冰箱中预冷。在培养皿中滴入一滴浓度为 0.1 mg/mL 的多聚赖氨酸(P-L-L),并标记位置,置于 30℃培养箱,10 min 后将多余的多聚赖氨酸吸走,继续将培养皿放入 30℃温箱中自然风干。取新出房的工蜂,用 75% 酒精消毒全身,用 PBS 缓冲液清洗 2 遍,没入盛有预冷 PBS 的蜡盘,快速解剖取出蜜蜂的完整大脑,放入盛有冰 PBS 的 1.5 mL 离心管中,4 ~5 个脑/管,用 PBS 清洗 2 ~3 遍。加入木瓜蛋白酶,30℃消化 15 min,1 000 r/min 离心 4 ~6 min,吸走消化液,加入 L-15 培养液静止 5 min,使其停止消化。大脑用 L-15 培养液洗 2 遍,小心吸去培养液,重新加入 1 mL L-15 培养液,用枪头轻轻吹打使成细胞悬液,将细胞浓度调至 1×10^6 个/mL,吸取 150 μL 细胞悬液滴在涂有多聚赖氨酸(P-L-L)的培养皿中,将培养皿置于恒温培养箱中(28℃),贴壁 2 ~3 h 后在加入 2 ~4 mL 的 L-15 培养液, 30℃进行培养,培养时间大于 2 d 时,每 2 d 换一次培养液。

1.3.2　Fura-2 AM 孵育条件对蜜蜂脑细胞钙离子浓度影响的研究　Fura-2 AM 首先用 DMSO 溶解配制成 1 mmol/L 的储备液,部分分装于 5 mL 的离心管中,每管装 8 μL,避光保存于 -20℃冰箱,每次使用时用 1 × HEPES 缓冲液稀释为所需工作液浓度。

1.3.2.1　不同 Fura-2 AM 浓度对蜜蜂脑细胞钙离子浓度的影响　分别将 Fura-2 AM 的工作液浓度设定为 1、2、8、32、128 μmol/L。细胞培养 36 h 待细胞贴壁牢固以后,吸走培养液,用 HBSS 冲洗 1 遍并加入 1 mL 稀释好的 Fura-2 AM 工作液,避光放入 30℃温箱中进行孵育。孵育时间统一选用 45 min,孵育完成后吸走荧光染料,用 HBSS 冲洗 2 遍,并加入 1 mL 的 HBSS 作为细胞外缓冲液,立即上机测量细胞钙离子浓度 ratio 值。

1.3.2.2　不同孵育时间对蜜蜂脑细胞钙离子浓度的影响　试验中 Fura-2 AM 浓度统一选用 2 μmol/L,避光放入 30℃温箱中进行孵育,孵育时间依次分别选择:10、30、50、70、360 min。孵育完成后吸走 Fura-2 AM 工作液,用 HBSS 冲洗 2 遍,并加入 1 mL 的 HBSS 作为细胞外缓冲液,立即上机测量细胞钙离子浓度 ratio 值。

1.3.3　蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度的测量　利用 META FLOUR 软件,设置激发光 2 个分别为 340 nm 和 380 nm,发射光为 510 nm。记录时间间隔设为 3 s,测量并记录细胞 340/380 的 ratio 值。

1.4　数据统计与分析

因 ratio 值即可直观反应胞内钙离子浓度的高低,故直接采用 ratio 值进行结果的统计分析。实验数据利用 SAS V8 软件进行单方面分类的方差分析进行差异显著性分析,$P < 0.05$ 时有显著性差异,$P < 0.01$ 时有极显著性差异。

2　结果与分析

2.1　不同浓度荧光染料 Fura-2 AM 对意大利工蜂脑神经细胞钙离子浓度的影响

由图 1 可以看到不同浓度的 Fura-2 AM 孵育的细胞所测得 ratio 值不同。ratio 值随 Fura-2 AM 浓度的增大而降低,由单方面分类的方差分析结果 $n \geqslant 30$,$P < 0.0001$,组间多重比较得到不同浓度的 Fura-2 AM 孵育所得到 ratio 值每两组间均具有极显著性差异($n \geqslant 30$,$P < 0.01$)。

2.2　不同孵育时间对 ratio 值的影响

图 2 中显示了用 Fura-2 AM 孵育不同时间所

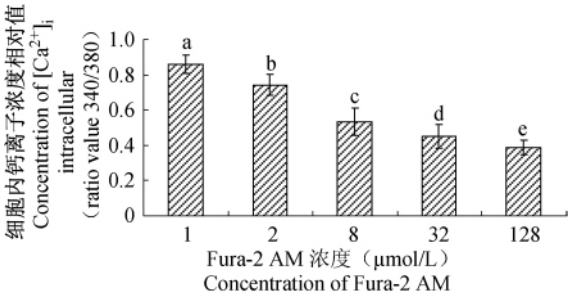

图 1　不同浓度 Fura-2 AM 对 ratio 值影响

Fig. 1　Different concentrations of Fura-2 AM affect the ratio value

柱上不同小写字母表示差异显著（$P < 0.01$）。下图同。

Histograms with different small letters indicate significantly different at 0.01 level. The same below.

测得的 ratio 值，将 5 组数据通过 SAS 进行单方面分类的方差分析：$n \geqslant 30$，$P = 0.0001$，组间多重比较得到孵育 10 min 所测 ratio 值与其它处理有极显著差异（$n \geqslant 30$，$P < 0.01$），而孵育 30、50、70、360 min，所得 ratio 值之间无显著差异（$n \geqslant 30$，$P > 0.05$）。

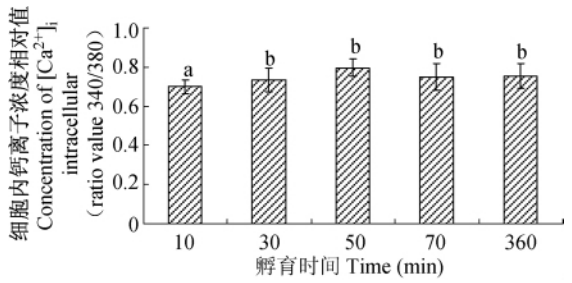

图 2　不同孵育时间对 ratio 值影响

Fig. 2　Incubation time affect the ratio value

3　讨论

3.1　蜜蜂脑神经细胞的原代培养

关于蜜蜂脑神经细胞的原代培养的方法，前人已做过相关研究（周婷等，2008），本实验在原有研究基础上进行了改进，昆虫细胞一般喜欢高糖（赵佼等，1999），本实验将 L-15 培养液中蔗糖浓度提高，并将培养液的 pH 调为 7.0，结果证明改进后的的培养液更适于蜜蜂脑神经细胞的生长，细胞较亮，轴突正常生长并能够连接到一起，克服了之前轴突生长较少不能正常生长的问题。图 3 是用改进后的 L-15 培养液培养蜜蜂脑神经细胞 72 h 后的生长状态。

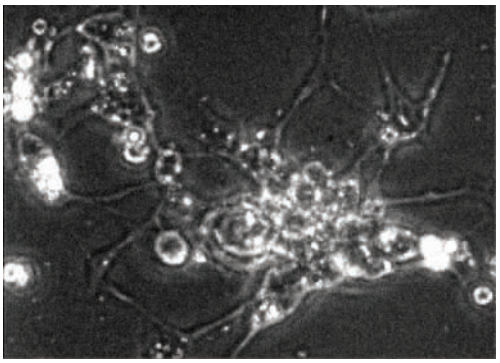

图 3　蜜蜂脑神经细胞

Fig. 3　Honeybee brain nerve cells

注：利用改进后的 L-15 培养液，培养 72 h 后，相差显微镜放大 600 倍。

The improved L-15 culture medium is used, cultured for 72 h, magnified 600 times under a phase contrast microscope.

3.2　不同浓度的 Fura-2 AM 对蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度测量 ratio 值的影响

从实验结果得知荧光染料 Fura-2 AM 对蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度可以产生显著影响，浓度越高，所测得 ratio 值越低。而据文献报道在哺乳动物细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 基本不受荧光剂 Fura-2 AM 浓度的影响（Malgaroli *et al.*，1987），正常状态下测得 ratio 值一般为 0.5 ~ 1.0（Ong *et al.*，2007；Monika *et al.*，2008）。可能原因是蜜蜂脑神经细胞对该荧光染料的耐受力与哺乳动物的不同，高浓度的 Fura-2 AM 虽然在测量时间内并没有造成可观察到的细胞外部形态的变化，但仍对蜜蜂神经细胞钙离子浓度造成了显著影响，而这种影响必然会造成细胞状态和功能的异常，从而影响实验结果的准确性。综合考虑上述情况，在蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度测量的实验中，为保证足够的荧光亮度以确保测量的准确性，而又尽量减少 Fura-2 AM 对细胞的影响，认为将 Fura-2 AM 浓度定为 2 μmol/L 最为合适。

3.3　不同孵育时间对蜜蜂脑神经细胞钙离子浓度测量 ratio 值的影响

试验中相同浓度的 Fura-2 AM 孵育 10 min 所得到的 ratio 值显著低于其它处理，而其它处理间

没有显著差异。根据 Fura-2 AM 工作原理,Fura-2 AM 进入细胞内,被酯酶水解成 Fura-2 后可与胞浆内游离的 Ca^{2+} 结合从而表现荧光波段的迁移,该结合具有可逆性,而 Fura-2 AM 本身不能与 Ca^{2+} 结合。分析上述实验结果的原因可能是 Fura-2 AM 孵育 10 min 时间太短,Fura-2 AM 进入细胞并被细胞内酯酶分解的量不足,从而不能与细胞内全部的游离钙离子结合,这就导致了所测得 ratio 值的偏低,即所测得的数值仅为胞内部分钙离子的量。孵育时间为 30 ~ 70 min 时,所测得结果无显著差异,说明超过 30 min 以后 Fura-2 AM 已有足够的量进入细胞并充分脱脂化与胞内全部游离钙离子结合。因此孵育时间应至少大于 30 min,可以选择 30 ~ 70 min 之间,此结果与哺乳动物细胞孵育所需时间相似(Yermolaieva *et al.*,2004)。建议选择 45 min 最为合理。

4　小结

经过上述实验,建立了优化的从细胞贴壁培养到钙离子比例测量技术的一套较完整的方法,该方法将有望改变过去确定有毒物质(包括农药等)对蜜蜂毒性研究多采用蜂群生物学实验的粗放的方法,为建立一套依托细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化为衡量指标的评价体系奠定基础。

参考文献(References)

Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E, 1996. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J. Neurotrauma*, 13(10):557—568.

Goldman WF, Bova S, Blaustein MP, 1990. Measurement of intracellular Ca^{2+} in cultured arterial smooth muscle cells using Fura-2 and digital imaging microscopy. *Cell Calcium*, 11(2/3):221—231.

Kreissl S, Bicker G, 1992. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. *J. Neurocytol.*, 21(8):545—556.

Limbrick DD Jr, Churn SB, Sombati S, DeLorenzo RJ, 1995. Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death. *Brian Res.*, 690(2):145—156.

Malgaroli A, Milani D, Meldolesi J, Pozzanr T, 1987. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J. Cell Biol.*, 105(5):2145—2155.

Mayer FB, l989. Calcium neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res. Rev.*, 14(3):227—243.

Monika V, Dehaven WI, Bird GS, Billingsley JM, Wang HY, Rao PE, Hutchings AB, Jouvin M, Putney JW, Kinet J, 2008. A major defect in mast cell effector functions in CRACM1 - / - mice. *Nat. Immunol.*, 9(1):89—96.

Ong HL, Cheng KT, Liu XB, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, SrikanthS, Singh BB, Gill D, Ambudkar IS, 2007. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. *J. Biol. Chem.*, 282(12):9105—9116.

Sharif NA, 1993. Molecular Imaging in Neurosciences: A Practical Approach. New York: Oxford University Press. 172—175.

Tsien RY, Rink TJ, Poenie M, 1985. Measurement of cytosolic free calcium in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, 6(1/2):145—157.

Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ, 2004, Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *PNAS*, 101(17):6752—6757.

陈立华, 1996. 神经元细胞内钙离子的生理与测定方法. 国外医学:神经病学. 神经外科学分册,23(2):60—63.

陈良怡, 徐涛, 邹寿彬, 康华光, 2000. 胞内游离钙离子浓度的定量检测技术. 中国医疗器械杂志, 24(6):349—356.

耿东进, 蔡琰, 苏敏, 王珺, 1994. 神经细胞老化与细胞内 Ca^{+} 相关性的实验研究. 中国老年学杂志, 14(5):294—295.

尹毅青, 薛玉良, 刘进, 2002. 果蝇三龄幼虫中枢神经元细胞培养. 天津医科大学学报, 8(1):48—51.

赵佼, 周燕, 谭文松, 俞俊棠, 1999. 贴壁培养方式中昆虫细胞的生长限制性因素研究. 生物工程学报, 15(3):383—387.

周婷, 王强, 代平礼, 张毅力, 孙继虎, 2008. 成年蜜蜂脑神经细胞的培养和电生理特征. 昆虫学报, 51(7):700—706.

周亚竞, 张志芳, 张元兴, 何家禄, 2000. 昆虫细胞培养研究进展. 蚕业科学, 26(增刊):74—78.