

用 ^{41}Ca -AMS 法测定谷氨酸毒性对 PC12 细胞 外钙内流的影响

袁媛^{1,2} 李世红¹ 张东正³ 何明¹ 董克君¹ 张根发⁴ 姜山¹

1 (中国原子能科学研究院 北京 102413)

2 (中国人民解放军军事医学科学院微生物与流行病学研究所 北京 100071)

3 (上海交通大学物理系 上海 200030)

4 (北京师范大学生命科学院 北京 100875)

摘要 本工作用 ^{41}Ca 示踪 PC12 细胞, 以 CaF_2 作为最终测量样品, 用加速器质谱计(全称 AMS) 测量 ^{41}Ca 。从谷氨酸毒性对 PC12 细胞的时间效应, MK-801 对 PC12 细胞受体门控钙通道(全称 ROC)阻断效应两方面进行分析, 以激光扫描共聚焦显微镜的检测结果作为参照, 结果表明 ^{41}Ca 的加速器质谱(AMS) 测量方法能有效地检测到在不同情况下谷氨酸引起 PC12 细胞中外钙内流的情况。综合两种方法推测在谷氨酸引起的钙超载中, NMDAR 介导的外钙内流起了重要作用。

关键词 ^{41}Ca , 加速器质谱计, 激光扫描共聚焦显微镜, PC12 细胞, 谷氨酸, MK-801

中图分类号 O57

钙离子作为细胞内的第二信使控制着细胞的代谢、分化和增殖, 准确测定胞内钙离子浓度具有重要的意义。迄今为止, 胞内钙离子的分析技术已发展了多种方法: 如, 原子吸收分光光度法、焦锑酸钾沉淀法和电子分光成像技术、电子探针 X 线微区分析法、荧光法。其中荧光法是最常用的方法^[1]。但在 Ca^{2+} 信号的定量变化过程以及定量区分外源钙和内源钙引起胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高方面远未建立灵敏的测量方法。在区分外钙内流和内钙释放方面常使用 ^{45}Ca 示踪方法^[2,3], 或者用荧光法对外钙内流和内钙释放分开检测^[4]。但外钙内流和内钙释放并非是两个独立无关联的过程。

^{41}Ca 是一种理想的生物医学示踪剂。用 ^{41}Ca 作为示踪, 无需像荧光法那样用 EDTA 整合外钙将外钙内流和内钙释放两个过程分开来研究。与 ^{45}Ca 相比, ^{41}Ca 的衰变方式为电子俘获, 只发射 3.3keV 的 X 射线, 半衰期长($T_{1/2}=1.0\times 10^5\text{a}$)^[5]。由于加速器质谱仪(Accelerator mass spectrometer, AMS) 检测 ^{41}Ca 的灵敏度极高, 其所需示踪剂量可以更少, 对生物体的辐射损伤极其微弱, 比正常饮食造成的内照射损伤要小得多^[6]。基于此, 本实验采用谷氨酸致 PC12 细胞(大鼠嗜铬细胞瘤细胞系) 钙超载

为研究对象, 用荧光标记-激光扫描共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscope, LSCM) 技术和 AMS 两种方法检测谷氨酸和 NMDAR 受体拮抗剂 MK-801 对 PC12 细胞游离钙的影响, 旨在进一步发展新的细胞钙离子检测技术, 探索适合 AMS 检测的生物样品的制备, 定量地检测兴奋性氨基酸谷氨酸致神经细胞损伤在钙离子方面的影响。在靶样制备方面, 本实验室已采用不同于以往的 CaH_2 制备方法制备 CaF_2 样品, 已有结果显示该方法将能够继本实验室已实现的 CaH_2 -AMS 方法之后, 为 ^{41}Ca 示踪剂在生物医学中的进一步应用提供新的、更简捷的技术支持^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂: L-glutamate、MK-801、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO) 为 Sigma 公司产品; DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS) 购自 Hyclone 公司; Fluo-3/AM、PluronicF-127 为 Molecular Probe 公司产品; HF 为优级纯, 其余试剂均为国产分析纯。

国家自然科学基金项目(10405036) 资助

第一作者: 袁媛, 女, 1978 年出生, 2005 年于北京师范大学获硕士学位, 目前为军事医学科学院微生物与流行病学研究所博士生

通讯联系人: 姜山

收稿日期: 2006-02-23, 修回日期: 2006-07-20

细胞系:将 PC12 细胞(大鼠嗜铬细胞瘤细胞系,中国科学院生物物理所捐赠)置于 DMEM 培养基中,其中含 10%马血清,5%胎牛血清,100ku/L 的青霉素,100mg/L 的链霉素。在 37℃,5% CO₂ 的孵箱中培养。每 2—3d 换液 1 次,待细胞增长至 70%融合时,消化以 1:3 分瓶传代。

药物处理与分组:待细胞至 70%融合时,加入药物处理:(1)对照组;(2)glu 1h 组(1mmol/L Glu 处理 1h);(3)MK-801 阻断组(在加入 1mmol/L Glu 前 15min 加入 5μmol/L MK-801);(4)glu 1h 组(1mmol/L Glu 处理 4h)。

1.2 方法

1.2.1 激光扫描共聚焦显微镜检测 PC12[Ca²⁺]_i

Ca²⁺荧光探针的负载:将 PC12 细胞以 2×10⁵ 接种于 Petri 小皿,药物处理如上所述,于不同时相点用 PBS 液漂洗 2—3 次后,往小皿中央的凹槽中加入 100μL 含有 Fluo-3/AM(终浓度为 5μmol/L)和 PluronicF-127(终浓度为 0.0625%重量比)的负载液,37℃温育 45min。吸去负载液,再用 PBS 漂洗 2—3 次,加入 1mL DMEM 溶液,待上机检测细胞内钙离子浓度[Ca²⁺]_i。

PC12 细胞钙离子荧光强度的检测:将负载好的细胞放在 LSCM 载物台上,调节焦平面使荧光图像清晰。测定条件:激发波长 488nm,发射波长 530nm,xy 扫描,PMT591。每组结果来自 3 次独立实验。统计学处理:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 *t* 检验,应用 spss11.0 统计软件处理。

1.2.2 ⁴¹Ca-AMS 法对 Ca 的检测

细胞的示踪:将含有 ⁴¹Ca 的 CaCO₃ 示踪剂 { $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})=4.2 \times 10^{-5}$ } 以 CaCl₂ 的形式加入到 DMEM 完全培养液中(终浓度为 100mg/L),将原培养液弃掉,换上含示踪剂的 DMEM 完全培养液,按上述分组药物处理细胞(附加流程空白组:不加示踪剂,不加药物处理),每组总细胞样品来自三瓶相同独立处理的细胞,由于 DMEM 中 Ca(NO₃)₂ 的存在,此时培养液中 $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})=2.9 \times 10^{-5}$ 。

细胞胞浆的提取:差速离心法提取胞浆,参见文献[8]。

AMS 测量生物样品的制备:CaF₂ 样品的制备主要包括以下几个步骤:

①载体的加入及消解:在上述提取的胞浆中加入 5—10mg 的 CaCO₃ 载体,在电热板上蒸干水分,加入 5mL 的混合酸(HNO₃:HClO₄ 为 4:1),溶解残渣后再蒸干,用 0.08 HNO₃ 溶解剩余物。

②形成 CaC₂O₄ 沉淀去除部分 K⁺:取上述溶解

液 5mL,加入等体积 5mol/L 的(NH₄)₂C₂O₄ 形成沉淀。2000 r·min⁻¹ 离心 10min,去上清,用 2mL 2.5% (NH₄)₂C₂O₄ 洗两次,再以 2mL 去离子水洗两次。

③通过阳离子交换柱进一步去除 K⁺:将上述沉淀用 4mol/L HNO₃ 溶解并稀释,经阳离子交换柱,用 0.8mol/L HNO₃ 洗掉其他干扰离子,再以 4mol/L HNO₃ 洗脱钙离子并收集。

④CaF₂ 的形成:向上述收集液中加入 HF 形成 CaF₂ 沉淀,用去离子水悬浮,再 3000r·min⁻¹ 离心 10min,重复此过程两次,于 100℃烘干沉淀。

生物样品的 AMS 测量:

取 4—5mg CaF₂ 样品与 200 目筛银粉混合(质量比约为 1:1),用压靶器压入靶锥,靶盘在 180℃ 下烘烤数个小时后,装入离子源。AMS 测量时的工作端电压选定为 8.5 MV,离子源引出 CaF₃,碳膜剥离后的电荷态选择 7+,用 AMS 法拉第筒测量 ⁴⁰Ca 束流强度,基本步骤参见本实验室对 CaH₂ 的测量^[8]。

进入胞浆的 ⁴¹Ca 和 ⁴⁰Ca 由公式(1)和(2)推算:

$$\eta_s = \frac{N_m^{41}\text{Ca}}{N_m^{40}\text{Ca}} = \frac{N_i^{41}\text{Ca}}{N_c^{40}\text{Ca}} \Rightarrow N_i^{41}\text{Ca} \quad (1)$$

$$\eta_0 = \frac{N_i^{41}\text{Ca}}{N_i^{40}\text{Ca}} \Rightarrow N_i^{40}\text{Ca} \quad (2)$$

η_s : 生物样品中的 ⁴¹Ca/⁴⁰Ca 比值(AMS 所测值); η_0 : 加入示踪剂后培养液中的 ⁴¹Ca/⁴⁰Ca 比值(2.9×10^{-5}); N_m : AMS 所测得的 Ca 原子个数; N_i : 进入细胞的 Ca 原子个数; N_c : 所加载体含有的 Ca 原子个数。

2 结果与讨论

2.1 LSCM 对谷氨酸引起 PC12 细胞游离钙影响的观察

钙离子作为第二信使调控着细胞内许多重要的生理和病理过程。胞外钙离子内流是钙离子浓度 [Ca²⁺]_i 升高的主要原因之一。钙内流主要通过细胞膜上三类钙离子通道实现:电压门控的钙通道(VOC)、受体门控的钙通道(ROC)和钙库控制的钙通道(SOC)^[9]。PC12 细胞是一种在含有神经生长因子(NGF)的培养条件下,其形态、结构功能都与交感神经元类似的细胞,常被用做细胞模型来研究神经细胞递质的合成、储存和释放、离子通道规律及受体^[10]。谷氨酸是一种兴奋性氨基酸,在缺血性脑损伤、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)等疾

病中, 谷氨酸都有着高水平的释放^[11,12]。在谷氨酸受体中 N-甲基 D-天门冬氨酸受体(NMDA 受体)对[Ca²⁺]_i通道最为重要。它的过度兴奋可引起钙通道开放, Ca²⁺内流而导致神经细胞损伤^[13]。我们用

1 mmol/L 的谷氨酸来刺激细胞, 在不同时段观察细胞内的钙成像, 见图 1。随着谷氨酸刺激时间的延长, PC12 细胞钙离子荧光强度和细胞形态也发生变化; 到 4h, 多数细胞变圆, 呈死亡状态。

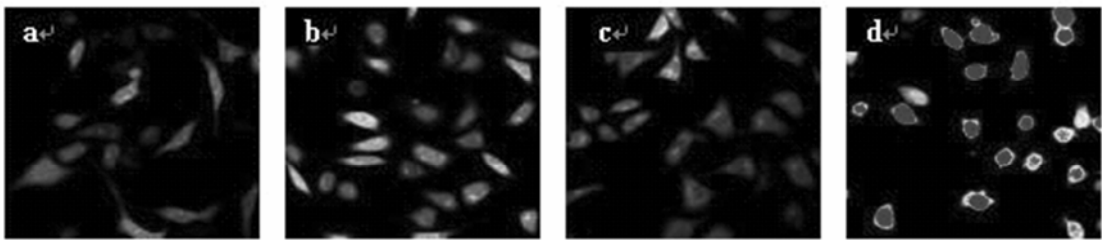


图 1 谷氨酸刺激下 PC12 细胞钙离子荧光成像图
a.对照; b.谷氨酸刺激 1h; c.MK-801 阻断谷氨酸刺激 1h; d.谷氨酸刺激 4h
Fig.1 Calcium fluorescence images of PC12 exposed to glutamate
a. Control; b. PC12 cells grown in the presence of glutamate for 1h; c. PC12 cells grown in the presence of glutamate for 1h and with pretreatment of MK-801; d. PC12 cells grown in the presence of glutamate for 4h

由表 1 可见, 谷氨酸的刺激对 PC12 细胞的游离钙影响具有时间效应, 即随着时间的延长, 钙离子荧光强度显著升高。MK-801 对 NMDA 受体进行阻断, 与单独用谷氨酸刺激 1h 相比, 外钙内流显著减小, 说明 MK-801 能占领离子通道结合位点, 阻止细胞外 Ca²⁺通过 NMDA 受体门控通道(ROC)进入细胞内。结合过去的实验中, 电压门控通道阻断剂 Verapamil 对谷氨酸引起的 PC12 细胞的外钙内

流没有阻断作用, 动态扫描中, 谷氨酸在刺激细胞 30min 后, 钙离子荧光强度又有升高的现象, 初步推测在谷氨酸引起 PC12 细胞钙超载的过程中, NMDAR 介导的外钙内流可能起了重要作用, 由此可见该实验培养的 PC12 细胞对谷氨酸毒性极为敏感, 毒性水平的谷氨酸引起的细胞游离钙变化较明显。用谷氨酸 PC12 损伤模型作为 ⁴¹Ca-AMS 方法学研究的生物模型比较合适。

表 1 钙离子荧光强度统计表
Table 1 The calcium fluorescence intensities detected by LSCM ($\bar{x} \pm SD$)

	Fluorescence intensity		
	Control	1h group	4h group
Glutamate	64.85±9.58	112.54±9.17*	187.17±16.668*#
MK-801		90.99±4.04#	

*P<0.05, 与对照组比较; # P<0.05, 与谷氨酸刺激 1h 比较; n=3, 每组数据来自 3 个平行样, 每个样至少包括 10 个细胞
*P<0.05 as compared to control cells; # P<0.05 as compared to glu 1h alone; n=3 experiments with at least ten cells per experiment

2.2 AMS 对 ⁴¹Ca 的测量结果

中国原子能科学研究院与北京大学医学部合作, 在 ⁴¹Ca 示踪细胞、AMS 检测胞浆钙方法研究方面已取得初步进展^[14], 但所选择的生物模型还不够灵敏, 不能很好地验证 AMS 结果, 也限制着 ⁴¹Ca-AMS 方法在细胞钙离子检测方面的深入研究; 而在生物样品的制备方面还存在制样繁琐的问题。基于此, 本实验采用上述谷氨酸致 PC12 细胞损伤为模型, 制备 CaF₂ 样品, 以期能进一步发展 AMS 在细胞钙离子检测方面的作用。图 2 是 AMS-⁴¹Ca 测定的两维能谱图, 该能量谱显示出用 CaF₂ 样品同样可以排除 K⁺的干扰, 用 ΔE 能量谱可以很好地鉴别 ⁴¹Ca。图 2 中(a)为对照组, 在 DMEM 培养液中加入含有 ⁴¹Ca 的 CaCO₃ 示踪剂, 但不用谷氨酸刺激, 用 AMS 检测无谷氨酸刺激时胞浆中的 ⁴¹Ca,

$\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})=2.76 \times 10^{-9}$ 。图 2 中(b)和(c)分别为 Glu 刺激 1h 组和 4h 组, 在与对照组等剂量示踪剂的情况下, 用 AMS 检测谷氨酸刺激 1h、4h 后胞浆中的 $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})$, 分别为 8.77×10^{-9} (1h)和 1.20×10^{-8} (4h)。图 2 中(d)为 MK-801 阻断组, 在与谷氨酸刺激 1h 组等剂量示踪剂的情况下, 预先用 MK-801 与 PC12 细胞作用 15min, 用 AMS 检测谷氨酸刺激 1h 后胞浆中的 ⁴¹Ca, $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})=6.42 \times 10^{-9}$ 。

由以上 AMS 所测 $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})$ 值可推算出各组进入细胞的 ⁴⁰Ca(见表 2)。示踪 1h 对照组, 进入细胞 ⁴⁰Ca 为 1.61×10^9 /个 cell, 该组实验也说明了在静息状态下, 细胞的钙稳态是一种动态的稳定状态, 细胞内外仍存在钙离子交换。谷氨酸刺激 1h 和谷氨酸刺激 4h 组进入细胞的 ⁴⁰Ca 分别为 7.66×10^9 /个 cell、 1.26×10^{10} /个 cell, 说明毒性水平的 Glu(1mmol/L)对 PC12 细胞的游离钙影响的过程中, 外钙内流具

有时间效应，可能是随着时间的延长，膜上钙泵衰竭，细胞将内钙泵出细胞外的能力下降或丧失导致大量的外钙涌入。MK-801 阻断 1h 组内流入的 ^{40}Ca 相应减少到 $5.54\times10^9/\text{个 cell}$ ，但与对照组相比，外

钙内流的 ^{40}Ca 还是有所增加，这也说明了 PC12 细胞除了 NMDA 受体操纵的 ROC 外，还存在其他钙离子通道如 VOC、SOC 等。

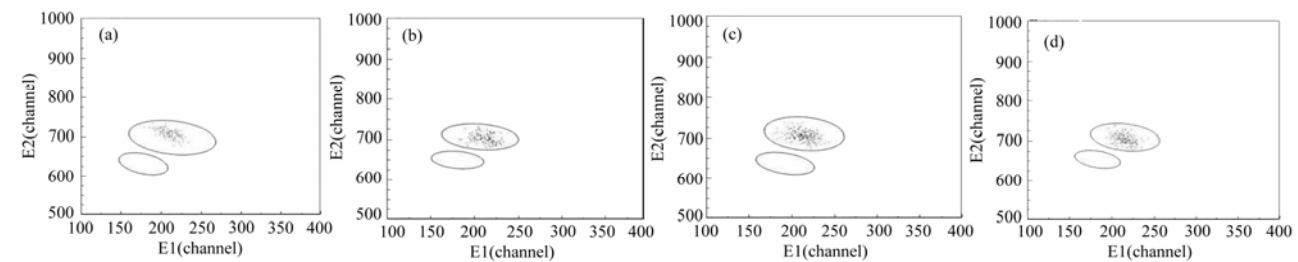


图 2 ^{41}Ca 、 ^{41}K 的 E1 和 E2 能量合成二维谱
(a) 对照; (b) 谷氨酸刺激 1h; (c) 谷氨酸刺激 4h; (d) MK-801 阻断谷氨酸刺激 1h
Fig.2 Two-dimensional energy spectra for the measurement of ^{41}Ca and ^{41}K
(a) Control; (b) PC12 cells grown in the presence of glutamate for 1h; (c) PC12 cells grown in the presence of glutamate for 4h; (d) PC12 cells grown in the presence of glutamate for 1h and with pretreatment of MK-801

表 2 AMS 检测到的外钙内流(^{40}Ca 个/cell)		
Table 2 The $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})$ detected by AMS and corresponding influx of ^{40}Ca		
Group	$\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})$	Influxing $^{40}\text{Ca}(\times10^8)/\text{cell}(\bar{x}\pm\text{SD})$
Control	2.76×10^{-9}	$N_{\text{out}}=16.1\pm1.1$
Glu 1h	8.77×10^{-9}	$N_{\text{out}}=76.6\pm13.6$
Glu 4h	1.20×10^{-8}	$N_{\text{out}}=126\pm49$
MK-801	6.42×10^{-9}	$N_{\text{out}}=55.4\pm13.8$

注：最后进入单个细胞的钙原子个数由样品测量 3 次所得的 $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})$ 推算而来
Note: Results of influxing $^{40}\text{Ca}(\times10^8)/\text{cell}$ were deduced by $\eta(^{41}\text{Ca}/^{40}\text{Ca})$ detected by AMS 3 times

2.3 AMS、LSCM 结果的综合讨论

AMS 检测到的是细胞的外钙内流，而以荧光标记法 LSCM 检测到的是细胞中的游离钙，钙离子荧

光强度的升高既由外钙内流也由内钙释放引起。以对照组为基本值，各组与对照组比值的柱状分析图如图 3。

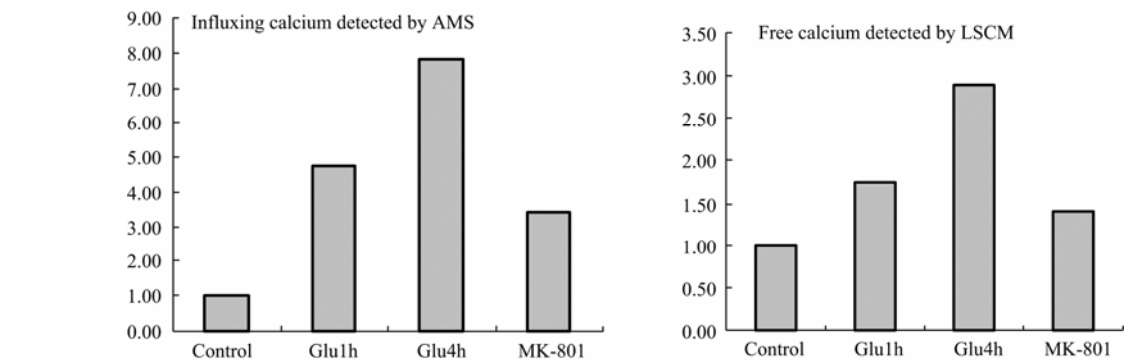


图 3 LSCM 和 AMS 结果定性分析比较图
Fig.3 The qualitative analysis and comparison of the results from LSCM and AMS

如图 3 左所示，Glu 1h 组、Glu 4h 组、MK-801 组由 AMS 检测到的外钙内流分别是对照组的 4.76、7.83 和 3.44 倍；而图 3 右表明，Glu 1h 组、Glu 4h 组、MK-801 组由 LSCM 检测到的游离钙分别是对照组的 1.74、2.89 和 1.40 倍。可见外钙内流随着谷氨酸刺激时间的延长，其升高的幅度高于细胞胞浆游离钙升高的幅度。这验证了前面 LSCM 的推测，即在谷氨酸引起 PC12 细胞的钙超载中，外钙内流起了主要作用，MK-801 阻断谷氨酸刺激 1h 后，AMS

检测到 MK-801 的阻断效应与 LSCM 检测到的阻断效应相似，说明 AMS 结果的可靠性。 ^{41}Ca 示踪-AMS 技术对细胞外钙内流的定量检测，可以弥补荧光标记-LSCM 方法的一些缺点，不必以 EDTA 螯合外钙或者以 Thapsigargin 排空钙库来研究细胞受刺激后钙升高的来源（外钙内流和内钙释放），不必像荧光法那样受到胞内 pH 值、荧光指示剂的不完全水解、泄漏等因素对测量结果的影响。

3 结论与展望

本实验表明在选择较为灵敏的生物模型和合适的 AMS 样品的条件下, ^{41}Ca 加速器质谱(AMS) 测量可以发展成一种新的钙离子检测方法, 这将为细胞生物学中钙离子的检测提供一种新的手段。 ^{41}Ca 示踪-AMS 技术能够定量检测神经模拟细胞 PC12 细胞在谷氨酸、MK-801 等作用下外钙内流的变化。 ^{41}Ca -AMS 将为 AD、PD、心血管疾病的治疗、为钙离子通道阻断剂新药的筛选和细胞钙离子通道的研究提供一种新的检测手段。在许多神经疾病中, 亚细胞器线粒体参与了钙超载引起的损伤, 以谷氨酸致 PC12 细胞损伤为模型, 以 ^{41}Ca 示踪-AMS 技术进一步研究钙超载中 ^{41}Ca 在线粒体中的定量储存可能对探讨线粒体在神经疾病中的作用有积极的意义。 ^{41}Ca 示踪-AMS 技术结合荧光标记法 LSCM 技术可能是研究细胞内钙离子动力学的一种有利手段, 值得进一步的探讨和研究。

参考文献

- 1 吉雅丽. 同济大学学报(医学版), 2001, 22(6): 54—56
JI Yali. J Tongji Univ (Med Sci), 2001, 22(6): 54—56
- 2 彭宝岗, 吕明德, 肖定璋, 等. 中国药理学通报, 1997, 13(1): 70—73
PENG Baogang, LV Mingde, XIAO Dingzhang, *et al.* Chin Pharmacol Bull, 1997, 13(1): 70—73
- 3 Lawrence T. J Biol Chem, 1982, 257(22): 13189—13192
- 4 丘俭, 王晨光, 黄秀英, 等. Chin J Neurosci, 1998, 14(4): 221—226
- 5 QIU Jian, WANG Chenguang, HUANG Xiuying, *et al.* Chin J Neurosci, 1998, 14(4): 221—226
- 6 姜山, 何明, 武绍勇, 等. 原子核物理评论, 2002, 19(1): 66—69
JIANG Shan, HE Ming, WU Shaoyong, *et al.* Nucl Phys Rev, 2002, 19(1): 66—69
- 7 Johnson R R, Berkovits D, Boaretto E, *et al.* Nucl Instr Meth, 1994, B92: 483—488
- 8 李世红, 姜山, 何明, 等. 高能物理与核物理, 2005, 29(12): 1210—1213
LI Shihong, JIANG Shan, HE Ming, *et al.* High Energy Phys and Nucl Phys, 2005, 29(12): 1210—1213
- 9 岳东方. ^{41}Ca 示踪-AMS 法测定在石棉刺激下细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度变化的方法研究[硕士论文]. 北京师范大学, 2003
YUE Dongfang. The ^{41}Ca tracer-AMS method applied to the research of calcium change in cytoplasm under the stimulation of asbestos[MS Thesis]. Beijing: Beijing Normal University, 2003
- 10 Michael J B. J Phys, 1997, 499(2): 291—306
- 11 Shafter T J, Atchison W D. Neurotoxicology, 1991, 11(13): 473—489
- 12 Choi D W. Neuron, 1988, 27(8): 623—634
- 13 李炜如. 中国实用儿科杂志, 1997, 12(4): 245—246
LI Weiru. Chin J Pract Pediatr, 1997, 12(4): 245—246
- 14 JIANG Shan, HE Ming, DONG Kejun, *et al.* Nucl Instr Meth, 2004, B223-224: 750—753

Detecting the effects of glutamate toxicity on influxing calcium in PC12 cells by AMS

YUAN Yuan² LI Shihong¹ ZHANG Dongzheng³ HE Ming¹ DONG Kejun¹
ZHANG Genfa⁴ JIANG Shan¹

¹ (Department of Nuclear Physics, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

² (Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

³ (Department of Physics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

⁴ (College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract The PC12 cells were traced by ^{41}Ca and the final biological sample, CaF_2 , was measured by Accelerator Mass Spectrometry (AMS). The results were analyzed from two aspects: the time effect of glutamate on free calcium in PC12 cells; and the blocking effect of antagonist, MK-801, on receptor operated channel (ROC). Comparing with the results detected by laser scanning confocal microscope (LSCM), the results show that ^{41}Ca AMS measurement can be used for detecting the change of calcium influx in PC12 cells effectively in different situations.

Key words ^{41}Ca , Accelerator mass spectrometry (AMS), Laser scanning confocal microscope (LSCM), PC12 cell, Glutamate, MK-801

CLC O57