

小鼠海马 CA1 和 CA3 神经元基本电生理特性的比较分析

张玉松¹ 祝 延^{1,2} 郭呈斌¹ 解 敏¹ 王烈成¹ 张 晨³

摘要 目的 制备急性小鼠海马脑片,观察并分析海马脑片 CA1 和 CA3 神经元的电生理特性。方法 将急性制备的小鼠海马脑片,应用红外微分干涉相差技术结合电荷耦合成像系统和脑片膜片钳技术,对小鼠海马 CA1 和 CA3 神经元结构特点和电生理特性进行观察和检测。结果 海马 CA1 和 CA3 神经元立体结构清晰,胞体突起明显,细胞死亡少且容易封接。海马 CA1 和 CA3 神经元自发放电电流和动作电位的幅度、频率、静息膜电位和峰峰间距,二者之间差异均无统计学意义;去极化脉冲电压与钠和钾离子通道电流密度,步阶脉冲电流与动作电位发放数二者之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 海马 CA1 和 CA3 神经元的一些基本电生理特性存在异同,这结果为记忆和神经疾病等研究提供一定的理论基础。

关键词 膜片钳技术;小鼠;脑片;海马神经元;电生理

中图分类号 R 338.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1072-05

海马是大脑中被广泛研究的热点脑区之一,海马 CA1 和 CA3 神经元是实验研究中常用的两类神经元且均匀的位于清晰易见的细胞带上,与一些生理行为学和神经系统疾病研究相关联^[1-2]。CA1 神经元具有明显的海马信号输出环路,在长时程记忆和相对空间任务及行为学上有重要作用。CA3 神经元位于大脑颞叶海马里,被各种抑制性神经元所调节,CA3 神经元从齿状回神经元接收信息与 CA1 神经元有雪佛侧枝相连接,也被应用于记忆方面的研究。另外,CA1 和 CA3 神经元异常放电亦与癫痫等神经系统疾病有关。该实验制作急性海马脑片,比较分析 CA1 和 CA3 神经元基本电生理特性,为记忆和神经疾病等研究提供一定的理论基础。

2014-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071075);安徽医科大学校科研基金(编号:2013xkj002)

作者单位:¹ 安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

² 蚌埠医学院生理学教研室,蚌埠 233000

³ 北京大学生命科学学院神经疾病与神经网络实验室,北京 100871

作者简介:张玉松,男,硕士研究生;

祝 延,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhuyan@ah.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物 C57/BL6 型小鼠 10 只,出生约 14 d,体重约 30 g,清洁级,由北京维通利华公司提供,雌雄不限。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Leica VT 1200 型振动切片机 (Leica Biosystems Nussloch GmbH,德国);电极拉制仪(P-98,美国);膜片钳系统(HEKA,德国);相差红外微分干涉显微镜(Olympus,日本)。

1.2.2 主要试剂 实验试剂均购自美国 Sigma 公司。解剖液(mmol/L): Sucrose 213、Glucose 10、KCl 3、NaH₂PO₄ 1、CaCl₂ 0.5、MgCl₂ 5、NaHCO₃ 26,用 NaOH 或 HCl 调 pH 至 7.30~7.40,渗透压约为 310 mOsm。人工脑脊液(mmol/L): Glucose 10、NaCl 125、KCl 5、NaH₂PO₄ 1.2、CaCl₂ 2.6、MgCl₂ 1.3、NaHCO₃ 26,调 pH 至 7.30~7.40。电极内液(mmol/L): KCl 145、NaCl 5、HEPES 10、EGTA 5、MgATP 4、Na₂GTP 0.3,调 pH 值至 7.30~7.40,渗透压约为 310 mOsm。

1.3 制备小鼠海马脑片 取约 14 d 的小鼠,用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉^[3]。麻醉昏迷后迅速移除大脑,固定头部用手术剪刀分别沿着颅骨中线和颅底两侧方向剪开头颅骨,同时不断地用约 0℃ 解剖液冲洗大脑(解剖液预先充含 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体 30 min),然后把整个大脑置于有约 0℃ 解剖液的圆盘中,用手术刀和弯镊子剔除嗅球、小脑,沿颅中线分开两大脑半球并除去海马周围白纸和皮质,修整脑块后在底座上点少量 α-氰基丙烯酸乙酯胶水以便海马组织牢固站立,迅速将底座放在盛有约 0℃ 解剖液的切片槽里并不断充以混合气体,沿矢状位切成 400 μm 厚的脑片,把脑片放在盛有人工脑脊液(预先充混合气体 30 min)的玻璃杯中室温下孵育 1~2 h 后备用^[4]。

1.4 固定及灌流脑片 应用盖网固定法,即铂金丝制作 U 型框架围绕以尼龙线绳并胶粘固定。把 U 型网框架轻放于脑片上,用蠕动泵向脑片恒速灌流混合气体饱和的人工脑脊液,流速 1~2 ml/min,使脑片浸泡在液面下 2 mm^[5]。

1.5 神经元形态学观察及电生理记录 应用红外显微镜结合电荷耦合摄像系统观察脑片 CA1 与 CA3 神经元结构特点。电压钳下,钳制电位在 -60 mV,记录神经元自发放电电流,给予步阶脉冲刺激记录不同离子通道电流并作电流-电压曲线;电流钳下,记录海马神经元的静息膜电位值和动作电位变化情况。这些获得的信号通过放大器放大后输出,应用 IGOR 软件分析作图。

1.6 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用方差分析 (Two-Way ANOVA)。

2 结果

2.1 脑片神经元的选择和形态学观察 10 倍镜下沿着脑片锥体细胞线找到海马 CA1 与 CA3 区域,然后换成 40 倍镜观察细胞,通过红外微干涉显微镜结合电荷耦合摄像系统可以看到 CA1 与 CA3 神经元立体结构清晰,胞体与突起明显,胞体呈锥形或椭圆形,死亡细胞少,CA1 神经元胞体相对 CA3 神经元胞体较小,选择这两个区域的神经元进行膜片钳电生理记录,高阻封接顺利,见图 1。

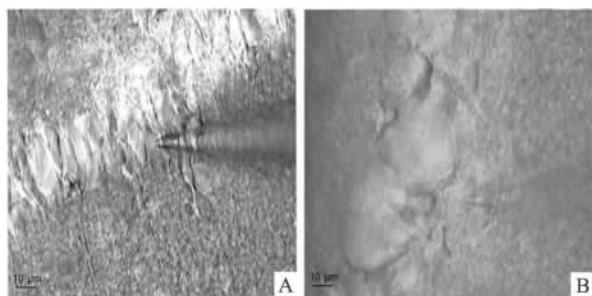


图1 红外干涉显微镜下观察海马脑片
神经元形态结构特点 $\times 40$
A:CA1 神经元; B:CA3 神经元

2.2 全细胞膜片钳记录

2.2.1 电压钳模式 钳制电位在 -60 mV,记录海马 CA1 神经元的自发性突触后电流和 CA3 神经元的自发性突触后电流,见图 2。分析其电流的幅度和频率,CA1 和 CA3 神经元突触后电流幅度和频率分别为 $[(531.10 \pm 88.03) \text{ pA}, n=9]$, $[(305.00 \pm 90.03) \text{ pA}, n=6]$ 和 $[(0.74 \pm 0.15) \text{ Hz}, n=9]$, $[(1.08 \pm 0.12) \text{ Hz}, n=6]$ 二者之间差异无统计学意义 ($t=1.72, P=0.10$; $t=1.60, P=0.13$)。钳制电位于 -60 mV,从 -60 mV 开始给予 20 mV 步阶脉冲去极化刺激至 80 mV,每个刺激时间为 200

ms,可以记录到全细胞跨膜总电流变化图形,外向电流为钾离子通道电流,内向电流为钠离子通道电流,见图 3。以去极化电压为横轴,以神经元在该刺激电压时产生的离子电流幅值为纵轴绘制出离子通道的电流-电压 (I-V) 曲线,用电流密度代替电流幅值 (电流密度 = 离子电流幅值 / 膜电容,单位为 pA/pF) 计算^[6]。从图 4 可知,CA1 与 CA3 神经元钾离子通道激活电压约在 -50 mV,随着去极化脉冲电压的增加,电流密度也随着增加,CA1 与 CA3 神经元钾离子通道电流密度二者之间差异无统计学意义 ($F=4.41, P=0.05$) 给予不同去极化脉冲电压与钾离子通道电流密度二者之间差异有统计学意义 ($P<0.05$);CA1 与 CA3 神经元钠离子通道电流密度约在 -50 mV 激活去极化, -40 mV 后逐渐变小,二者之间差异无统计学意义 ($F=3.04, P=0.09$),给予不同去极化脉冲电压与钠离子通道电流密度二者之间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

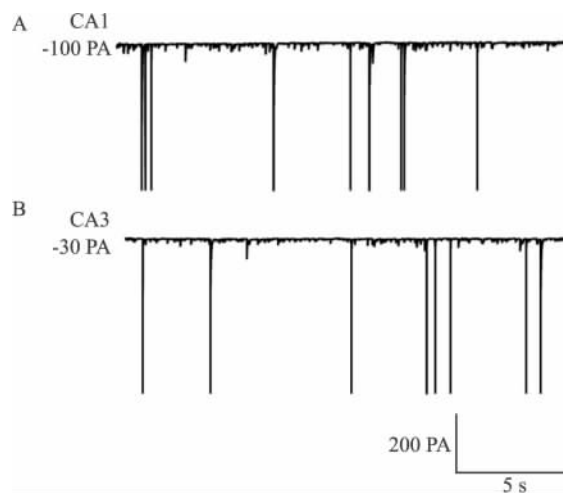


图2 海马脑片 CA1 与 CA3 神经元自发性突触后电流和
电流的幅度及频率

A:CA1 神经元自发性突触后电流; B:CA3 神经元自发性突触后电流

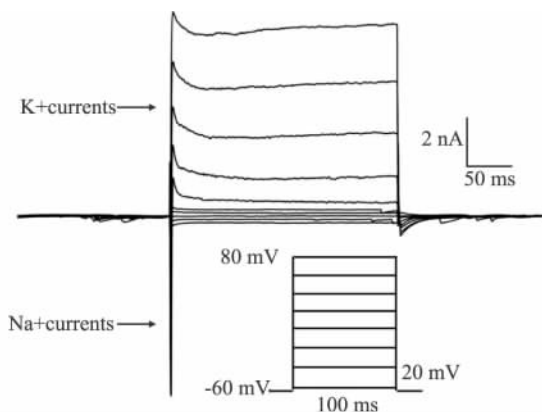


图3 在同一神经元上给予不同步阶脉冲刺激所记录的电流变化
左上图:全细胞电压钳记录结果;右下图:脉冲刺激方波

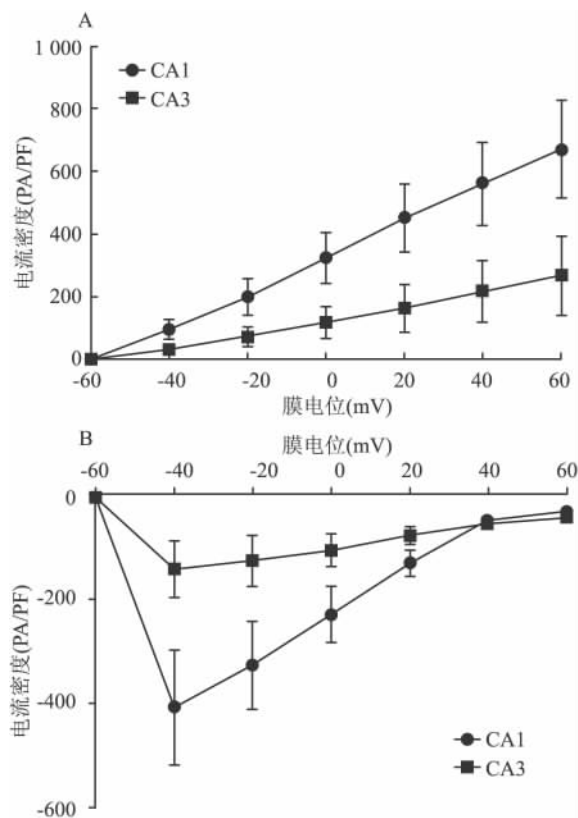


图4 海马脑片 CA1 和 CA3 神经元钾离子和钠离子通道电流的 I-V 曲线

A: 钾离子通道电流的 I-V 曲线; B: 钠离子通道电流的 I-V 曲线

2.2.2 电流钳模式 全细胞电流钳模式下记录海马脑片 CA1 与 CA3 神经元的动作电位放电情况见图 5。分析 CA1 与 CA3 神经元的动作电位幅度和频率, 结果显示 CA1 与 CA3 神经元动作电位的幅度和频率分别为 $[(93.19 \pm 4.08) \text{ mV}, n = 12]$, $[(101.10 \pm 4.42) \text{ mV}, n = 10]$ 和 $[(0.96 \pm 0.33) \text{ Hz}, n = 12]$, $[(0.95 \pm 0.34) \text{ Hz}, n = 10]$, 二者之间差异无统计学意义 ($t = 1.30, P = 0.20$; $t = 0.02, P = 0.97$)。海马 CA1 与 CA3 神经元静息膜电位分别为 $[(-60.07 \pm 0.43) \text{ mV}, n = 12]$, $[(-60.44 \pm 1.39) \text{ mV}, n = 10]$; 海马 CA1 与 CA3 神经元动作电位峰峰间距分别为 $[(4601.00 \pm 1785.00) \text{ ms}, n = 12]$, $[(3884.00 \pm 1654.00) \text{ ms}, n = 10]$, 二者之间差异均无统计学意义 ($t = 0.27, P = 0.78$; $t = 0.29, P = 0.77$)。钳制电位置于 -60 mV , 以 50 pA 步阶脉冲电流从 -650 pA 至 50 pA , 可记录到海马 CA1 与 CA3 神经元动作电位发放, 见图 6A、B。取步阶脉冲电流从 -300 pA 到 -50 pA 的动作电位发放数作统计, 结果显示步阶脉冲电流与动作电位发放数二者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 海马 CA1 与 CA3 神经元动作电位发放数二者之间差异

无统计学意义 ($F = 3.57, P = 0.06$), 见图 6C。

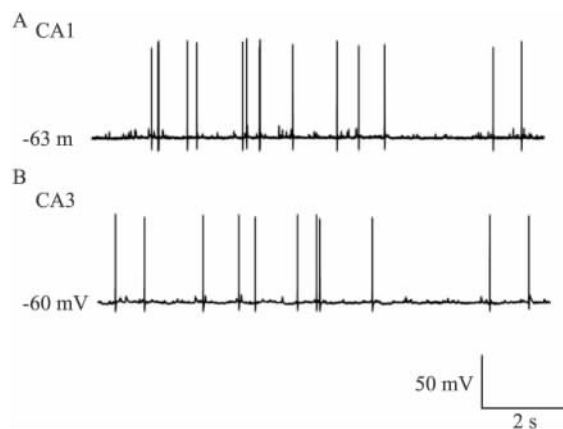


图5 海马脑片 CA1 与 CA3 神经元的动作电位记录及其幅度和频率

A: CA1 神经元动作电位发放; B: CA3 神经元动作电位发放

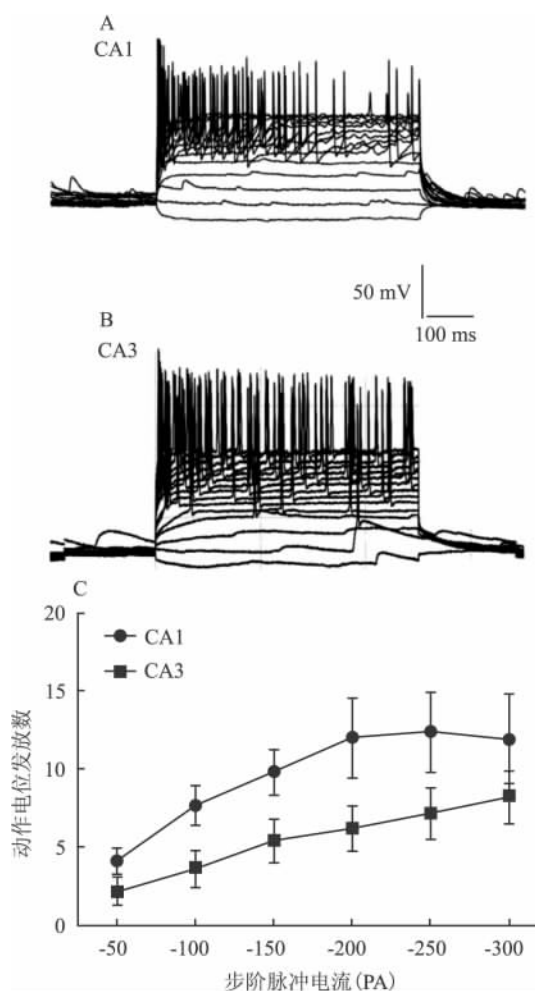


图6 诱发海马脑片 CA1 与 CA3 神经元动作电位及其发放数

A: CA1 神经元动作电位及其发放; B: CA3 神经元动作电位及其发放; C: 动作电位发放数统计结果 (CA1: $n = 19$; CA3: $n = 13$)

3 讨论

细胞培养或急性分离的细胞可以用于多项实验技术的研究, 却难以运用于膜片钳记录研究所需电

流,且对神经细胞离子通道有不同程度的损伤,过程复杂^[7]。离体海马脑片具有有序排列的神经元和神经纤维、完整的神经解剖通路、定位明显的胞体突起、稳定的离子通道性质等特点,易于进行电生理记录操作,已成为研究神经系统突触可塑性和神经系统疾病的良好标本^[8]。研究^[9]显示,离子通道广泛存在于神经系统中,与神经系统疾病(如脑缺血、脊髓缺血、癫痫及抑郁等)密切相关,且有些离子通道在脑缺血和癫痫的治疗中发挥重要的保护作用;同时离子通道受体也是一些药物作用的靶点。急性离体脑片培养是近年发展起来的一种器官培养方法,相比于传统的体外培养的神经元,离体脑片既保留了细胞的组织结构,还保留了细胞与细胞的内在联系^[10]。更重要的是,脑片培养可以模拟在体生理环境,排除了实验中 pH 值、温度、离子浓度等不利因素的影响,为研究离子通道的生理特性和药理特性等提供了理想的模型需求^[11]。

本实验结果显示,海马脑片能够清晰的观察 CA1 与 CA3 神经元的结构特征和电生理特性。结构上,CA1 与 CA3 神经元立体结构清晰,树突胞体明显;与 CA3 神经元相比,CA1 神经元顶树突较长,树突分支较多形成一个树突树,胞体直径较小;这些结构特征在急性培养的神经元很难观察到。另外,CA1 神经元与 CA3 神经元结构上的异同源于单个神经元内部特性还是区域环路因素,目前还未完全清楚^[12]。从本实验结果显示,CA1 与 CA3 神经元自发突触后电流的幅度达几百甚至上千 pA,发放频率约在 1.0 Hz。CA1 与 CA3 神经元静息膜电位值均约在 -60 mV,未注射去极化电流时,动作电位的幅度大约 100 mV,发放频率在 1~10 Hz;在给予注射去极化电流时,动作电位的阈电位约在 -50 mV,这些电生理特性与以往文献^[13]报道相一致。钾离子电流对调节神经元的兴奋性至关重要,CA1 与 CA3 神经元钾离子通道表达特性的不同也许能够解释其放电形式的不同,这也帮助理解为什么 CA1 神经元参与癫痫样放电事件的发生比 CA3 神经元多。

综上所述,制备急性离体海马脑片能够模拟在体环境使离子通道性质保持稳定,CA1 与 CA3 神经元结构及电生理特性的异同,决定了具有类似而又不同的功能,为进一步研究与 CA1 和 CA3 神经元相关的神经系统疾病等提供了理论基础。

参考文献

- [1] 林毅勇,邵福源,孙刚,等. 急性缺氧对大鼠海马神经元 N-甲基-D-天门冬氨酸诱发电流的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(4): 634-6.
- [2] Newrzella D, Pahlavan P S, Kruger C, et al. The function genome of CA1 and CA3 neurons under native conditions and in response to ischemia [J]. BMC Genomic, 2007, 8:370.
- [3] 杨李果,曾庆文,张旭亮,等. NR1 基因敲除对小鼠前额叶脑区 LTP 的影响[J]. 华东师范大学学报(自然科学版) 2012, 47(1): 47-53.
- [4] Mohajerani M H, Sivakumaran S, Zacchi P, et al. Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA1-CA3 connections in the hippocampus [J]. PNAS, 2007, 104(32): 13176-81.
- [5] 雷革胜,万业宏,王玉英,等. 应用红外可视脑片膜片钳技术研究大鼠海马 CA1 神经元电生理特性[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(13): 1153-6.
- [6] 张晓芸,王越,张健,等. 蝎毒耐热蛋白对大鼠海马神经元钠通道的抑制作用[J]. 生理学报, 2007, 59(2): 278-84.
- [7] Kay A R, Krupa D J. Acute isolation of neurons from the mature mammalian central nervous system [J]. Curr Protoc Neurosci, 2001: Chapter 6.
- [8] 刘振伟,李立君,刘传绩. 海马脑片盲法膜片钳全细胞记录技术[J]. 生理学报, 2001, 53(5): 405-8.
- [9] 孙晖,李国超,谢敏,等. P2 受体介导对大鼠三叉神经节神经元电压门控性钙离子通道的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(3): 207-10.
- [10] 杨丽君,崔红,杨爱军,等. 大鼠全脑脑片培养及缺氧缺糖模型的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(5): 283-5.
- [11] 黄文先,彭碧文,何小华. 脑片模型在癫痫实验中的应用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2012, 33(3): 449-52.
- [12] Mizuseki K, Royer S, Diba K, et al. Activity dynamics and behavioral correlates of CA3 and CA1 hippocampal pyramidal neurons [J]. Hippocampus, 2012, 22(8): 1659-80.
- [13] Andersen P, Morris R, Amaral D, et al. The Hippocampus Book [M]. New York: Oxford University Press, 2007: 139-60.

Comparative analysis of basic electrophysiological characteristics of hippocampal CA1 and CA3 neurons in mice

Zhang Yusong¹, Zhu Yan^{1,2}, Guo Chengbin¹, et al

(¹Dept of Physiology, College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Physiology Bengbu Medical College, Bengbu 233000)

Abstract Objective Acute mouse hippocampal slices were prepared for patch clamp recording in order to observe

兔 MSCs 对韧带移植骨道内愈合影响的光镜观察

刘靖 徐斌 徐洪港 王瑞 涂俊

摘要 目的 探讨兔自体外周血间充质干细胞(MSCs)对韧带移植在骨道内愈合的影响。方法 8只新西兰白兔随机均分为实验组和对照组。粒细胞刺激因子动员各组兔后,抽取外周血分离、纯化培养干细胞。实验组移植入 MSCs 和生物蛋白胶混合物;对照组移植入生物蛋白胶。分别于 2、4、8、12 周 4 个时间点每组各处死 1 只兔行形态学观察。术后 4 个时间点对两组标本进行高倍镜下成纤维细胞计数,采用单向方差分析及 SNK 法检验,比较韧带重建术后移植肌腱与骨道愈合情况。结果 术后 8 周实验组移植肌腱与骨道界面连接紧密,出现 Sharpey 纤维及软骨移行带,术后 12 周对照组出现 Sharpey 纤维,但连接组织中胶原排列紊乱。实验组与对照组在 4 个时间点高倍镜下成纤维细胞计数比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MSCs 能促进韧带重建术后移植肌腱在骨道内愈合。

关键词 间充质干细胞;膝关节;韧带;移植;愈合

中图分类号 R 686

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1076-04

随着国民健身意识不断加强,交叉韧带损伤越来越多见。交叉韧带是膝关节重要的静力稳定结构,损伤后难以自愈且治疗难度较大,如不及时治疗或治疗不当,随之出现膝关节不稳,关节其他韧带松

弛,半月板损伤,关节软骨退变等并发症,导致膝关节退变及骨性关节炎的早期发生^[1-3]。目前主要手术方式为膝关节镜下自体软组织移植术(腓绳肌、半腱肌、股薄肌等)前交叉韧带重建术。随着微创技术的不断发展,该手术方式日益成熟,但文献^[4]报道,其失败率仍为 0.7%~10.0%,骨道内愈合不良是导致失败的重要原因之一。目前,关于移植肌腱在骨道内愈合的研究愈来愈多,包括物理干扰、生理机械刺激、骨替代材料填充、骨膜移植、生长因子和基因治疗、组织工程技术及干细胞移植等^[5]。随着组织工程技术的日益成熟,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)促进骨道内愈合的研究尤为突出。

1 材料与方法

1.1 MSCs 的分离、培养及鉴定 粒细胞刺激因子动员后,抽取兔外周血 5 ml,采用密度梯度离心法分离细胞接种到 5 ml 完全培养基中,37℃、5% CO₂ 恒温箱中培养,48~72 h 后,首次换液,以后每 72 h 换液 1 次,观察细胞形态及生长情况,待细胞呈涡旋状生长并达 90% 时进行传代培养。取第 3 代生长旺盛细胞行 MSCs 表面抗原 CD11b、CD34、CD29、CD90 检测。

1.2 动物模型的建立及分组 8 只兔随机均分为实验组和对照组。麻醉消毒铺巾后取出趾长屈肌腱,将肌腱对折,对折后其直径为 (2.5 ± 0.3) mm,

2014-04-18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH157)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科四病区,合肥 230022

作者简介:刘靖,男,硕士研究生;

徐斌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: youchen100@126.com

the basic electrophysiological properties of hippocampal CA1 and CA3 neurons. **Methods** The structure properties and basic electrophysiological properties of mouse hippocampal slices were observed and recorded by infrared differential interference contrast technique and patch clamp, respectively. **Results** The hippocampal slice structure was observed clearly with healthy gloss and few dead neurons, and the hippocampal neurons were sealed easily with patch clamp technique. The spontaneous discharge current and action potential between CA1 and CA3 neurons did not show significant differences in amplitude, frequency, inter spike-intervals and resting membrane potentials. The current density of sodium and potassium ion when injecting pulse stimulations and the action potential numbers when injecting step currents showed significant differences in CA1 and CA3 neurons ($P < 0.05$). **Conclusion** Some basic electrophysiological properties of hippocampal CA1 and CA3 neurons provide certain theoretical basis for memory and nerve diseases research.

Key words patch clamp; mouse; brain slices; hippocampal neurons; electrophysiology