

大鼠海马 CA3 区神经元和星形胶质细胞三维结构重塑

杨志军¹, 饶志仁², 徐如祥¹, 魏玲³, 王晓斌², 姜晓丹¹ (¹第一军医大学珠江医院神经外科, 广东 广州 510282; ²第四军医大学²神经科学研究所, ³唐都医院呼吸科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 观察大鼠海马 CA3 区神经元锥体细胞及其周围星形胶质细胞(AST)的分布, 重塑两者之间的三维构象。方法 采用脑片膜片钳全细胞记录、细胞内荧光黄(LY)染色、免疫荧光和激光共聚焦显微镜检查(LSCM)相结合的技术。结果 根据放电形式的不同把海马锥体细胞分为位相型和非位相型放电神经元。LSCM 下单层光学图像和三维立体重建显示许多 AST 紧密围绕在 LY 染色锥体细胞周围并形成紧密接触。2 类神经元与 AST 形成接触的部位存在区别。非位相型放电神经元的树突和胞体周围都有许多 AST 形成接触的部位在, 而位相型放电神经元则仅位于树突。结论 不同特性海马神经元周围 AST 的空间分布可能存在差异。

关键词: 海马; 星形胶质细胞; 荧光黄; 细胞内染色; 膜片钳; 激光共聚焦显微镜技术

中图分类号: R322.81 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)04-0426-04

Three-dimensional structural reconstruction of the neurons and astrocytes in rat hippocampal CA3 area

YANG Zhi-jun¹, RAO Zhi-ren², XU Ru-xiang¹, WEI Ling³, WANG Xiao-bin², JIANG Xiao-dan¹

¹Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; Institute of Neuroscience², Department of Respiration, Tangdu Hospital³, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To observe the distribution of the pyramidal neurons and the surrounding astrocytes in rat hippocampal CA3 area and reconstruct their three-dimension structure. **Methods** Whole-cell patch-clamp recording of the brain slices, intracellular staining with Lucifer yellow, glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunofluorescence, and confocal laser scanning microscopy were utilized in this study. **Results** According to the firing patterns, the hippocampal pyramidal neurons were classified into phasic or non-phasic firing neurons. Monolayer scanning and three-dimensional reconstruction showed that many astrocytes aggregated in tight clusters around the pyramidal neurons positive for Lucifer yellow staining, forming close contact. The two types of neurons contacted the astrocytes in different manners. Surrounding the cell body and dendrites of the non-phasic firing neurons, many astrocytes were seen to form contact with the neurons, whereas the phasic firing neurons formed contact with the astrocytes through the dendrites. **Conclusion** The spatial distribution of the astrocytes surrounding different types of the hippocampal neurons may differ.

Key words: hippocampus; astrocytes; Lucifer yellow; intracellular staining; patch clamp; laser scanning confocal microscopy

在脊椎动物的中枢神经系统中, 海马是脑内的一个重要结构机能区, 与学习和记忆等活动密切相关, 对大鼠海马神经元的形态学已经有比较详细的认识^[1-3]。近年研究发现星形胶质细胞(astrocyte, AST)并非是惰性细胞, 而是能积极参与脑内的神经活动、与神经元之间存在相互信息交流的细胞^[4]。本研究旨在初步利用电生理膜片钳结合免疫荧光黄(lucifer yellow, LY)染色, 通过激光共聚焦显微镜(LSCM)技术重塑海马内神经元和 AST 的三维图象, 为今后进一步研

究海马内 AST 的空间分布与其功能的关系提供一些启示。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生 30 d 的 SD 雄性大鼠, 体质量约 50 g, 由第四军医大学实验动物中心提供。饲养于调温、调湿动物室, 自由进食饮水。

1.2 实验溶液的配制

人工脑脊液(ACSF)的成分为 (mmol/L): NaCl 125, KCl 3, CaCl₂ 2, MgSO₄ 2, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25, 葡萄糖 10; 蔗糖 ACSF (mmol/L): 蔗糖 250, KCl 2.5, CaCl₂ 2, MgSO₄ 2, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 25; 电极内液 (mmol/L): 葡糖酸钾 140, MgCl₂ 2, Hepes 10, ATP 2。用 KOH 将 pH 调至 7.2。

收稿日期: 2003-12-10

基金项目: 第 34 批中国博士后科学基金(2003034063)

Supported by the 34th China Postdoctoral Science Foundation (2003034063)

作者简介: 杨志军(1970-), 男, 2002 年毕业于第四军医大学, 博士, 电话: 020-61643270

通讯作者: 饶志仁, E-mail: zrrao@fmmu.com

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠离体海马脑片的制备 大鼠经氯胺酮 100 mg/kg·b.w.麻醉后,迅速打开胸腔,剪开右心房,左心室灌以 0~4 °C 的充以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的蔗糖 ACSF 50 ml,以冷却脑组织和冲去脑组织中的血液。心脏灌流完成后,迅速取脑置于充以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的冰冷蔗糖 ACSF 中几分钟。待脑完全冷却和变硬后,取出修块(含有海马)。用胶将修好的脑组织块粘好后,再用振动切片机(美国 Campden 公司)水平切 350 μm 左右的脑薄片。取含有海马的脑薄片置于充以 95% O₂ 和 5% CO₂ 的 ACSF 中,室温下放置 2 h 以上备用。

1.3.2 海马神经元脑片膜片钳全细胞记录方式的建立

取含有海马的脑薄片,置于记录槽,以 1~2 ml/min 的流速灌以恒温的(26 °C)的 ACSF。用微电极拉制仪把外径为 1.6 mm 的玻璃毛坯(上海脑所)经 2 次拉制成尖端开口约 1~2 μm 的微电极。用注射器经细针头向微电极充以经过滤含 LY (10 mmol/L)的电极内液后,把电极夹在电极柄上。体视镜下辨别海马 CA3 区锥体细胞层所在区域,先用微电极操纵器的粗调把微电极尖端对准海马,并把微电极置于海马上方约 1 mm,然后用操纵器细调调节电极位置。打开放大器,并由计算机通过 D/A 采样板给予一个幅度为 -1 mV、持续 200 ms 的探测方波。调节微操纵器使电极逐渐下降,并进入灌流的液体,此时测得电极的阻抗为 4~6 MΩ。继续下降电极使其插入海马,此时电极的阻抗会逐渐增加,当其上升至初值的约 2 倍时,通过细管给予正压,使其恢复原来的阻值。继续下降电极,当发现有胞外的放电,且电极阻值增加时,先给予一个正压,若阻值能回复初值,且放电仍然存在,则给予一个轻轻的负压吸引。此后电极阻值会不断增加,当其超过 2 GΩ 后,先加上钳制电压(-70 mV),再给予 1 个短促的负压吸引,吸破电极尖端的膜片,形成膜片钳全细胞记录模式,在计算机上可以观察到刺激方波起始和结束处有充放电电容电流。在全细胞电流钳模式下引出膜静息电位和自发动作电位。全细胞记录信号由 Axopatch 200A 放大器(AXON 公司)放大,pClamp5.5 软件采集,采样由 A/D 转换器转化为数字信号存储于计算机。记录 1 h 后拔除电极。

1.3.3 免疫荧光组织化学染色 记录结束后立即将海马脑片浸入 4%多聚甲醛固定 4 h(室温),然后放入 20%蔗糖中(4 °C)直至组织沉底,用冰冻切片机连续冠状切片(片厚 10 μm)并贴片。在 Olympus BX60 显微镜下找出 LY 阳性染色细胞的所有切片,继续进行免疫荧光染色。切片经 PBS 中漂洗后,入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 中浸泡 30 min(室温)。然后入免

抗胶质原纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein,GFAP)多克隆抗体(1:1 000,Dako)孵育 48 h(4 °C)和 Texas Red 标记羊抗兔 IgG(1:200,Molecular Probes)孵育 2 h(37 °C),PBS 充分洗涤后用 VECTASHIELD Mounting Medium(Vector)封片。

1.3.4 结果观察和图象采集 采用 Fluoview FV 300(Olympus 公司)LSCM 观察,通过 Fluoview 软件操作双通道系统,用氩氦/氩激光分别连续扫描细胞内 LY 和 GFAP 染色的海马细胞。选用的参数为:LY 和 Texas Red 的激发波长分别为 488 nm 和 568 nm;用于图象采集的显微镜物镜为 UPLAPO 20×和 40×;数值孔径(NA)分别为 0.50 和 0.85;Zoom 设为 1.0;每个光扫描切片的厚度(Step)为 1.0;图象存为 1 024×1 024 像素类型。经过 Fluoview 应用软件进行单层光学图像合并、系列光学图像三维立体重建。

2 结果

2.1 脑片膜片钳全细胞记录模式的建立及正常大鼠海马神经元的电生理特点

采用“盲插”的方法,成功建立脑片膜片钳全细胞记录模式,此种方法的成功率较高,在 60%以上,同时膜封接阻抗也多在 3 MΩ 以上。在全细胞电流钳记录方式下共记录 16 个海马锥体神经元,测得其平均静息膜电位为 $-(70 \pm 2.5)$ mV,在给予 20 pA 直流电流刺激使膜电位至 -60 mV 后可观察到去极化引发的动作电位发放。根据放电形式的不同把神经元主要分为 2 类:位相型和非位相型放电神经元。其中记录位相型神经元 9 个,非位相型神经元 7 个。位相型放电动作电位发放规律,动作电位之间间距较大(图 1);非位相型放电动作电位发放不规则,动作电位之间间距小(图 2)。

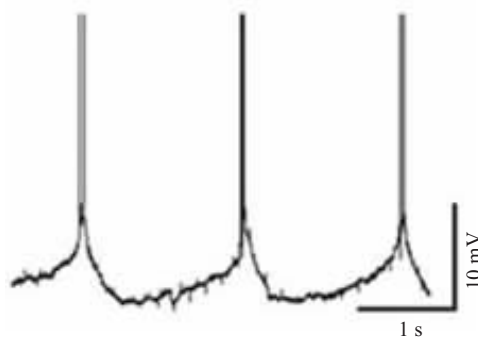


图 1 20 pA 直流电流刺激荧光黄(LY)染色神经元(膜电位-70 mV),使膜电位去极化至-60 mV 后引发的位相型动作电位发放

Fig.1 Short phasic bursts of action potentials of Lucifer yellow (LY)-labeled neuron (membrane potential -70 mV) elicited by depolarizing plateau potentials

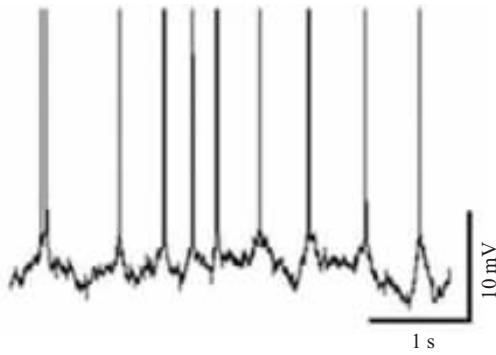


图 2 20 pA 直流电流刺激 LY 染色神经元 (膜电位 -71 mV), 使膜电位去极化至 -60 mV 后引发的非位相型动作电位发放

Fig.2 Short non-phasic bursts of action potentials of LY-labeled neuron (membrane potential -71 mV) elicited by depolarizing plateau potentials

2.2 海马内神经元和 AST 的形态及其相互关系

荧光显微镜下可见 LY 染色阳性的细胞出现在海马锥体层内,为锥体细胞,胞体为纺锤形,胞体两端发出树突,伸向相反的方向,有些树突上可见到树突棘(图 3)。GFAP 染色阳性的 AST 胞体较大、突起细长,主要集中分布在海马的始层、辐射层和网状层内,锥体细胞层内较少(图 4、5)。LSCM 下单层光学图象和三维立体重建都显示许多 AST 可以紧密围绕在锥体细胞周围并形成紧密接触。发生接触的部位有细胞特异性,位相型放电的锥体细胞与 AST 发生接触的部位主要位于基树突和顶树突部位,而胞体部位则未发现(图 4);非位相型放电神经元不仅在基树突、顶树突可以见到与 AST 发生接触,而且在胞体部位也可见到与 AST 发生接触(图 5)。

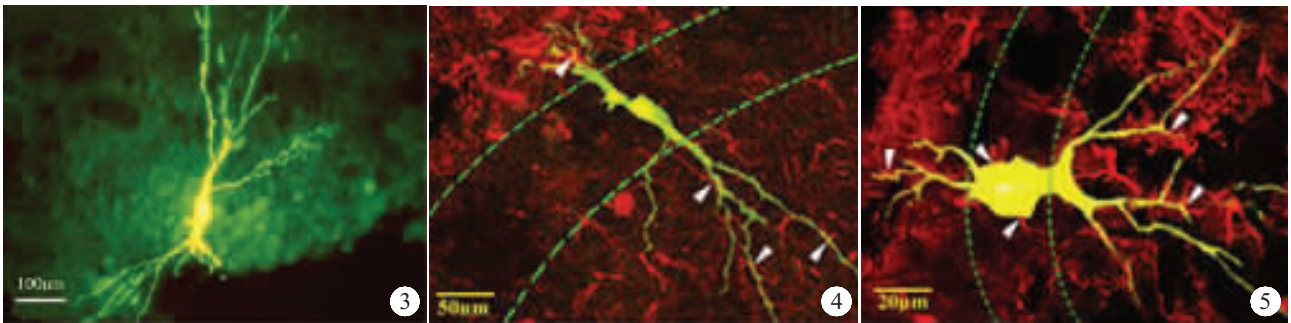


图 3 荧光显微镜下海马锥体层内 LY 阳性染色的神经元 (标尺 =100 μm)

Fig.3 Fluorescence microphotography showing LY-positive neurons in the pyramidal layer of rat hippocampus (Bar=100 μm)

图 4 图 1 中位相型 LY 阳性染色神经元 (黄色) 和 GFAP 染色阳性星形胶质细胞 (红色) 激光共聚焦显微镜图 [星形胶质细胞与神经元紧密接触点 (Δ), 锥体细胞层 (∶ ∶ ∶), 标尺 =50 μm]

Fig.4 Confocal laser scanning microphotograph showing LY-positive phasic neuron (yellow) in Fig.1 and glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes (red)

The contact sites between the neurons and astrocytes are indicated by Δ, the pyramidal layer by ∶ ∶ ∶, Bar=50 μm.

图 5 图 2 中非位相型 LY 阳性染色神经元 (黄色) 和 GFAP 染色阳性星形胶质细胞 (红色) 激光共聚焦显微镜图 [星形胶质细胞与神经元紧密接触点 (Δ), 锥体细胞层 (∶ ∶ ∶), 标尺 =20 μm]

Fig.5 Confocal laser scanning microphotography of LY-positive non-phasic neurons (yellow) in Fig.2 and GFAP-positive astrocytes (red)

The contact sites between the neurons and astrocytes are indicated by Δ, the pyramidal layer by ∶ ∶ ∶, Bar=20 μm.

3 讨论

膜片钳技术结合脑片细胞内 LY 染色技术被证明是研究单个神经元电生理特性和形态的一种有效的方法。在此基础上,本研究进一步结合免疫荧光组化方法,通过 LSCM 同时扫描 2 种不同激发光和发射光波长的荧光素,同时显示 LY 染色的神经元胞体和树突构筑以及 GFAP 染色阳性的 AST 形态和分布,并通过单层光学图象和三维立体重塑 2 个步骤判断它们之间的空间解剖学联系。这些技术的结合运用具有许多优点。首先,与普通荧光显微镜相比,LSCM 通过光学断层扫描及伪彩色图像处理,明显减少了背景荧光的干扰,并使图像反差更强、更为清晰,易于观察。其次,与普通免疫组织化学双标记方法相比,通过断层扫描可观察到更多、更明确的信息,而且结合立

体观察,2 种标记成分之间的空间关系个容易辨别。第三,较电镜观察简便、快捷,且更容易全面了解神经元与 AST 的空间联系。

长期以来一直认为神经元是神经系统的基本结构和功能单位,胶质细胞则是神经元的支持细胞或间质细胞,其功能主要是支持、营养、保护和修复神经元等。传统神经解剖学将 AST 根据形态特征分为纤维性和原浆性 2 类,并笼统地认为前者主要见于白质,后者主要分布于灰质。现在发现胶质细胞在脑的基本信息处理中起着关键的作用,胶质细胞可对神经元行使重要的调控功能,胶质细胞不是一类同质 (homogeneous) 的细胞群,不同部位内的胶质细胞空间构筑不同,功能也可能有所不同^[5,6],所以仅根据形态把 AST 分为 2 类是不足说明 AST 功能的。根据对

铯离子(Cs^+)的敏感性以及全细胞电位记录曲线的不同,海马 AST 可分为 3 种:复合型(Cs^+ 高度敏感型)、内流型(Cs^+ 中度敏感型)和直线型(Cs^+ 低度敏感型)。其中,复合型和内流型主要见于 CA3 区,而直线型主要见于 CA1 区。同时认为胶质细胞的分隔与功能密切相关,如 CA3 区钾内向整流电流较多,细胞外钾离子可迅速进入,CA1 区钾外流更容易,通过合胞体传来的钾离子,可迅速排出细胞外,从而维持了脑内微环境的平衡^[7]。有证据显示成年大鼠海马 CA1 分子层中 40% 以上的 AST 为 GFAP 阴性^[8,9]。GFAP 表达的异质性(heterogeneity)可能与海马 CA1 区内 AST 的 2 个不同电生理类型相关:“被动型”AST,表达 GFAP 但缺乏电压依赖性膜电流;“复合型”AST,缺乏 GFAP 表达但有电压依赖性膜电流^[6,8,10],这种差异反映了不同类型的 AST 有不同的功能^[11]或生理状态^[12]。

AST 可以包绕大量神经元突起和突触,并且不同类型 AST 对神经元发挥影响的作用也有所差异。例如,在成年大鼠海马 CA1 区,突触的密度为 $213/100 \mu\text{m}^3$ ^[13],一个 AST 大约占据了 $66\ 000 \mu\text{m}^3$ 神经毡并且“监督”140 000 个突触,大量的突触将在单一 AST 影响之下。AST 紧密包绕在突触前和突触后神经终末周围,海马内大约有 57% 轴-棘突触可以与 AST 发生接触^[14]。而小脑内一个 Purkinje 细胞周围有 8 个 Bergmann 胶质细胞,每一个 Bergmann 细胞可以包绕 2 142~6 358 个突触^[15]。CA1 区 AST 多是沿着神经元顶树突的方向纵向排列,这样的排列方式可能是因为此区域内的 AST 功能与其他部位不同。AST 的生理学特性可能是可以发生动态变化的,AST 的状态是与其局部的微环境密切相关的^[6,16]。

本研究利用膜片钳和 LSCM 技术,初步发现大鼠海马 CA3 区内不同电生理特性的神经元周围 AST 的分布存在区域上的差异,这可能与 AST 的不同功能状态有关,但由于记录到的细胞数目有限,本研究观察到的结果是否是海马内神经元和胶质细胞相互联系的共性,很值得进一步从电生理学和形态学角度对神经元和胶质细胞进行深入的研究。LSCM 在光镜水平,能够较快地对神经细胞进行定性观察和初步的定量分析,尤其初步观察 AST 在神经元胞体和树突周围的特异性分布。但这一方法的缺点也是显而易见的,它毕竟是光镜水平的观察,神经元和 AST 之间的这种突触样接触或紧密接触,只能提示二者之间有可能形成突触,并不是电镜下的突触概念,其中可能包括真正的突触和部分非突触性的接触,直接的证据仍需电镜证明。已经有报道把细胞内染色的 LY 经过简单的光转化,使之转化成为电子密度较高的 DAB 产物,再结合包埋前或包埋后免疫组化,在电镜下进一步证实两者之间的联系。

了解不同状态下胶质细胞和神经元在脑内不同

部位的细胞构筑,有利于对胶质功能的认识,这方面的工作才刚刚开始。

参考文献:

- [1] 陈光忠,罗炳德,王红芹,等.高温对体外培养大鼠海马锥体细胞凋亡的影响[J].第一军医大学学报,2003,23(3):233-5.
Chen GZ, Luo BD, Wang HQ, *et al.* Effects of hyperthermia on rat hippocampal pyramidal cell apoptosis *in vitro* [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 233-5.
- [2] 刘智良,徐如祥,张英鸽,等.红藻氨酸作用后海马神经元膜表面的超微结构的原子力显微镜观察[J].第一军医大学学报,2003,23(7):659-62.
Liu ZL, Xu RX, Zhang YG, *et al.* Ultrastructural observation of the membrane surface of kainic acid-treated hippocampal neurons by atomic force microscopy[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 659-62.
- [3] 程毓华,王卫东,孙莉莎,等.NOS 抑制剂对成年大鼠弥漫性脑损伤后海马齿状回神经发生的影响[J].第一军医大学学报,2003,23(10):1074-7.
Cheng YH, Wang WD, Sun LS, *et al.* Effects of nitric oxide synthase inhibitor on dentate gyrus neurogenesis after diffuse brain injury in adult rats [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(10):1074-7.
- [4] Carmignoto G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurons[J]. Prog Neurobiol, 2000, 62 (6): 561-81.
- [5] Walz W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment[J]. Prog Neurobiol, 1989, 33(3): 309-33.
- [6] Walz W. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter[J]. Glia, 2000, 31(1): 95-103.
- [7] D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, *et al.* Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes [J]. J Neurosci, 1998, 18(44): 4425-38.
- [8] Walz W, Lang MK. Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus [J]. Neurosci Lett, 1998, 257(2):127-30.
- [9] Walz W, Wuttke WA. Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue[J]. J Neurosci Res, 1999, 56(6): 595-603.
- [10] Jabs R, Paterson IA, Walz W. Qualitative analysis of membrane currents in glial cells from normal and gliotic tissue *in situ*: down-regulation of Na^+ current and lack of P2 purinergic responses [J]. Neuroscience, 1997, 81(9): 847-60.
- [11] Holthoff K, Witte OW. Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex[J]. Glia, 2000, 29(3): 288-92.
- [12] Kafitz KW, Güttinger HR, Müller CM. Seasonal changes in astrocytes parallel neuronal plasticity in the song control area HVc of the canary[J]. Glia, 1999, 27(1): 88-100.
- [13] Kirov SA, Sorra KE, Harris KM. Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats[J]. J Neurosci, 1999, 19(34): 2876-86.
- [14] Ventura R, Harris KM. Three dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes [J]. J Neurosci, 1999, 19(45): 6897-906.
- [15] Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, *et al.* Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function [J]. J Hirnforsch, 1995, 36(5): 509-17.
- [16] Bordey A, Sontheimer H. Passive glial cells, fact or artifact[J]? J Membr Biol, 1998, 166(2): 213-22.

(责任编辑:杨金星)