DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.033
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0263-03

技术方法

海马脑片LTP中钙变化的激光共聚焦扫描技术测定方法

Method of Ca^{2+} measurement with confocal laser scanning microscopy in LTP hippocampal slice

罗 峻[1],胡志安[1],黎海蒂[1],姚忠祥[2],徐海伟[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]组织学与胚胎学教研室;重庆 400038)

提 要:目的 探讨采用激光共聚焦扫描技术来测定海马脑片LTP诱出过程中锥体细胞胞内游离钙的变化。方法 海马脑片的常规孵育及LTP的诱出,通过间隙灌流法负载荧光剂Fluo-3AM的海马脑片内游离钙的激光共聚焦测定。结果 直接用Fluo-3AM孵育脑片,可得到轮廓清晰的神经元共聚焦图像,条件刺激诱出LTP之后,海马锥体细胞胞内游离钙显著增高。结论 所述方法对实时测定LTP诱出过程中海马锥体细胞胞内游离钙的动态变化具有较好的效果。钙离子参与了LTP过程中的信号传递。

突触传递长时程增强(Long-term potentiation, LTP)是学习记忆的重要细胞模式[1],其中离体脑片LTP是广泛采用的模型之一,钙离子在LTP和学习记忆的作用历来受到特别的关注。大量文献报道钙离子在LTP中发挥了重要的作用。为了更好测定各种处理因素后的脑片钙离子变化,人们一直在不断寻找理想的测定钙离子技术。早期采用的是敏感钙离子电极等方法。近年随着钙离子特异性荧光指示剂如Fluo-3等的出现,钙离子的测定开始进入定量和定位阶段[2]。由于脑片具有定位的特征,直接在脑片上观察钙离子的成像的意义是不言而喻的。本实验拟介绍结合使用电生理和激光共聚焦扫描技术(Confocal laser scanning microscope, CLSM),观察海马脑片LTP中钙离子测定方法。共聚焦显微镜在理论上使焦平面上的图像分辨率大大提高(达到普通显微镜的1.4倍)[3]。由于脑片具有一定厚度(一般为300~500 μm),表面层次结构的观察普通显微镜即可实现,但较深层次结构的观察则必须借助激光共聚焦扫描显微镜以达到观察目的。脑片的钙离子荧光标记方法国内已有报道[4]。但在需要进行LTP电生理记录的条件下,选择何种标记方法尚未报道。在对直接孵育方式进行改变之后,采用间歇灌流标记法,我们观察了成年大鼠海马脑片CA1区锥体神经元在LTP诱出后胞内钙离子的共聚焦成像。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600048)
作者简介:罗 峻(1973-),男,重庆市人,助理实验师,主要从事脑片诱发电位方面的研究。电话:(023)68752254
通信作者:胡志安,电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-03

1 材料和方法

1.1 动物标本

Wistar大鼠22只,鼠龄2个月左右,体重150 g左右。

1.2 仪器装置

仪器装置:常规细胞外电生理记录装置一套(其中记忆示波器和微电极放大器购自日本光电)。半浸式脑片浴槽(脑片置于尼龙网之上)为自制。激光共聚焦扫描显微镜系统购自德国Leica公司,所用激光波长是488 nm,光电倍增管收集波长大于498 nm的发射荧光。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠断头处死后,取出一侧海马,顺海马槽纤维的走向连续切片,片厚400~500 μm,迅速将其移至浴槽尼龙网上,随之保证持续的恒温人工脑脊液(Artificial cerebrospinal fluid, ACSF)灌流,脑片的供氧以界面式进行,即让95%O_2与5%CO_2的混合气体通过外室热水加热、湿化再弥散于脑片的表面,供氧量为1 dl/min。脑片在孵育0.5 h后,开始灌注含Fluo-3(AM)的ACSF。Fluo-3的浓度为40 μmol/L。灌流1 h,灌流量约1~1.5 ml,采用间歇灌流方式。标记完毕后用ACSF冲洗0.5 h,随后开始电生理记录。

1.3.2 本实验刺激电极置于来自CA3区锥体细胞的Schaffer侧枝上,记录电极置于CA1区的放射层,所记录的电活动是Schaffer侧枝CA1区锥体细胞的场兴奋性突触后电位(fEPSP)。记录时,先行测试刺激(Test stimulation, TS),测试刺激每5~10 min一次,以观察fEPSP是稳定,待其稳定15 min后,再行条件刺激(Conditioning stimulation, CS)。条件刺激10 min后,检测LTP是否产生。

1.3.3 检测LTP后,取出脑片立即进行CLSM观察。观察时注意调整聚焦平面,以获取最佳效果。由于脑片是在ACSF灌流不足和无氧供应条件下进行,观测最好在较短时间内完成。

1.4 激光共聚焦

在急性分离细胞悬液中加入荧光探针Fluo-3/AM(终浓度5

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

μmol/L)和3 μl/ml 25%助染剂 Pluronic F-127, 在37 ℃避光孵育40 min。以记录液清洗2遍, 再孵育20 min。待 Fluo-3/AM 在胞浆中水解为 Fluo-3 后, 即可置激光共聚焦显微镜下观察。

以488 nm 波长的激光作激发光在515 nm 处探测荧光发射, 选择形态佳、贴壁好、在3~5 min 保持荧光值稳定的细胞进行监测, 以测得荧光绝对强度代表 Ca^{2+} 相对强度。每隔20 s 扫描1次, 直接监测单个神经元胞内游离钙浓度([Ca^{2+}] i)在给药前后的动态变化过程。在钙超载形成并稳定1 min 后, 加入用人工脑脊液配置的MT, 使其在培养液中的终浓度分别达到0.2 mg/kg(1× MT)至2 mg/kg (10× MT), 荷包牡丹碱在MT 前30 s 加入孵育液, 以不含 MT 的人工脑脊液作为对照组。

2 结果

采用自制的间歇灌流装置, 得到了令人满意的实验结果: LTP 诱出率比荧光剂在体微量注射标记法得到了极大的提高; 而和荧光剂直接孵育标记法相比, 在节省荧光剂的同时, 两者的诱出率基本一致, 见图1。

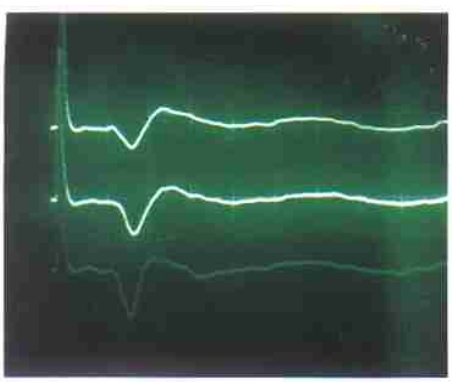


图1 间歇灌流法诱导海马 **CA1** 区的 **LTP**

未进行条件刺激的海马各区在 CLSM 下, 可观察到较明显的细胞带, 但荧光强度低, 神经元形态难于辨认。在诱出了 LTP 的脑片上, 低倍镜下可见清晰、排列整齐锥体细胞层, 突起明显; 高倍镜下可见直径、长度大小不一的突起从胞体顶部和基底部发出, 见图2。诱出 LTP 后, 海马脑片CA1区钙离子荧光强度较诱出前明显升高, 而海马其它各区荧光强度变化不明显。

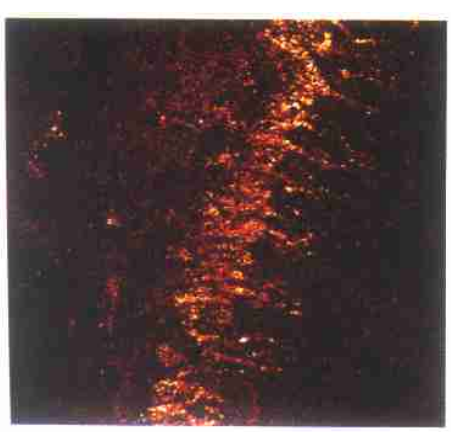


图2 诱出了 **LTP** 的海马各区在 **CLSM** 下的图像

3 讨论

众所周知, 在LTP 和学习记忆机制中, 钙离子是重要的第二信使, 阐明其中钙离子的定量和定位变化意义深远。以往测定LTP 中钙离子变化的方法存在不够直接和直观形象的缺点。由于亲脂性 Fluo-3(AM)易于透过细胞膜, 激发光的波长恰好在可见光区范围内, 适于激光共聚焦扫描显微镜, 使得此种标记方法可能成为观察 LTP 中钙离子变化的理想手段之一[5]。但对需要进行电生理观察的脑片负载 Fluo-3 时, 尚必须面对以下几个问题: ①如采用在体微量注射标记方法(Fluo-3 直接注入大鼠海马, 进行在体荧光标记), 则有可能造成注射区域结构的破坏, 不利于电生理实验。同时, 我们初步实验还发现, 经过较长时间后(电生理实验2 h 左右), Fluo-3 的负载效果不够理想; ②如采用荧兴剂直接孵育标记(制备海马脑片, 在含 Fluo-3 的 ACSF 中孵育30~45 min), 由于不能进行 ACSF 的更换, 对于脑片良好状态的保持极为不利。若进行常规灌流, 所需 Fluo-3 大大增加, 实验成本上升。为此, 我们采用了间歇灌流法直接孵育, 在既不影响电生理实验, 又不增加实验成本的情况下, 得到了较为理想脑片钙离子成像。图像上可观察到完整的海马锥体细胞带, 较清晰的单个神经元微细结构。说明此标记方法可使 Fluo-3 在整个脑片的三维空间上完成均匀一致的胞内负载, 方便对任一区域的观察。

近来研究表明, 钙离子参与了海马脑片尼古丁诱导的 LTP 的形成[6]。对大鼠听觉皮层脑片 LTP 的研究也发现, 钙离子内流通过影响镍离子敏感通道, 参与了听觉皮层的LTP 的形成[7]。本实验将海马脑片 LTP 和钙离子的激光共聚焦结合起来, 将功能和形态有机结合, 可以直观地观察到海马各区锥体细胞在 LTP 的引出过程中的动态变化, 引出 LTP 后海马 CA1 区锥体性细胞胞内游离钙明显升高, 这和以前报道的结果基本吻合[6,7]。

关键词: 钙离子; 海马; 长时程增强; 大鼠
中图法分类号: R338.8; R446.8 文献标识码: B

参考文献:

[1] Joshua R S, Jeff E L. Can molecules explain long-term potentiation[J]. Nature Neurosci, 1999, 2(7): 597—604.
[2] Watson T F. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry[J]. Br Dent J, 1991, 171(9): 287—291.
[3] Fine A, Amos W B, Durbin R M, *et al*. Confocal microscopy applications in neurobiology[J]. Trends Neurosoi, 1988, 11(8): 346—351.
[4] Wang L H, Zhao P, Huang Y, *et al*. Changes of intracellular calcium level in hippocampal slices neurons: a confocal laser scanning microscopic study

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[J]. Physiol Sin, 1998, 50(3): 355—358.
[5] Alford S, Ferrnguelli B G, Schofield J G. Characterization of Ca^{2+} signals induced in hippocampal CA1 neurones by the synapticactivation of NMDA receptors[J]. J Physiol, 1993, 469(1): 693—716.
[6] He J, Deng C Y, Chen R Z, *et al*. Long-term potentiation induced by nicotine in CA1 region of hippocampal slice is Ca^{2+}-dependent[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(5): 429—432.
[7] Seki K, Kudoh M, Shibuki K. Long-term potentiation of Ca^{2+} signal in the rat auditory cortex[J]. Neurosci Res, 1999, 34(3): 187—197.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2003)03-0265-02

技术方法

小型动物清醒无肌松头颅固定方法的建立和应用

Establishment and application of the head fixation on awake animals without muscle relaxation

高 洁, 隋建峰, 熊 鹰, 黎海蒂 (第三军医大学基础医学部生理学教研室, 重庆 400038)

提 要: 目的 建立一种小型动物清醒状态下不使用肌松剂的头颅固定方法。方法 设计和制作了前后桥型有孔头颅支架, 并安装于动物前囟及后囟周围, 再以螺丝、牙科水泥坚固。结果 运用该固定方法成功进行了听觉诱发电位、细胞外单位放电、长时程增强等实验, 效果满意。结论 该固定方法简便易行, 稳定性好, 可用于脑研究的急、慢性实验, 尤其有利于进行动物清醒状态下的听觉认知功能研究。

在进行脑功能研究的在体动物实验中, 常需要对动物进行清醒状态下的头部固定, 过去常用的方法是使用肌松剂加气管插管和人工呼吸对动物进行清醒制动, 这虽可以实现动物清醒状态的在体研究, 但对动物损伤大, 且利用率低, 只能用于急性实验。另外在应用脑立体定位仪固定动物头部时, 需用耳杆顶住外耳道, 这种固定方法显然不利于进行听觉相关研究。

为保证动物清醒、无肌松且不使用耳杆条件下的头颅固定, 我们设计和制作了用于小型动物的头颅固定支架, 实现了在体实验动物的清醒固定。并用该法进行了清醒豚鼠的听觉诱发电位, 听觉分辨认知中豚鼠海马神经元放电和清醒大鼠海马长时程增强(Long-term potentiation, LTP)的记录, 均取得良好效果。

1 材料与方法

1.1 桥形固定支架的制作

取日用金属片(硬度要大)于电热炉加热变软, 弯成"Ц"形, 再用电动钻头在桥身和桥臂处对称打孔。桥身孔和桥臂孔的大小分别依照配套螺丝杆粗细和耳杆尖端粗细而定, 两桥身孔间距约 6 mm。桥身长短和宽窄可根据动物头颅大小加工, 将桥形支架表面打磨光滑, 桥身应仿颅骨弧度弯成弧形, 使其可与颅骨表面可靠接触, 见图 1。

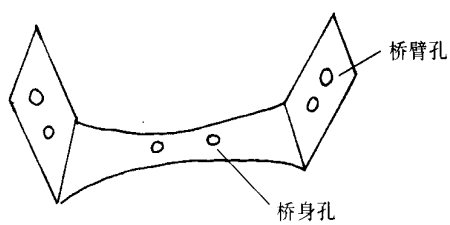


图 1 小型头颅固定支架

1.2 支架的安装

取动物(大鼠、豚鼠或家兔均可), 例如豚鼠, 体重 500 ~ 600 g(由第三军大学实验动物中心提供), 以 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 用脑立体定位仪固定。将豚鼠眼后到耳间区域对应头皮剪掉(头皮损伤区域尽可能小), 在前囟前 4 mm 和实验区域周围(如海马)5 mm, 中缝左右旁开 3 mm 处各钻两椭圆小孔, 将小型螺杆的帽端反旋入颅骨内, 注意勿损伤皮层。将支架从桥身孔处穿过螺杆并贴近颅骨面, 将螺母旋紧螺丝即可固定支架。根据实验区域和平衡原理以同法安装后支架, 再用牙科水泥强化固定。最后, 对拟记录区的去颅骨部分注意覆盖, 抗菌保护, 以备后用。动物休息 3 d 后进行实验。

1.3 动物清醒无肌松固定方法

动物安装支架 3 d 后进行实验。在动物清醒状态下将脑立体定位仪(Narishige SN-1)前后两对耳杆分别插入前、后桥臂的左右孔, 通过四点对顶使头颅稳妥固定。动物身体置于悬吊的网兜或小盒内, 以减小挣脱力。为方便固定, 后耳杆需进行加工改进, 使其头端与桥臂孔的相对位置可以调适, 见图 2。

作者简介: 高 洁(1977—), 女, 山西省晋中市人, 硕士研究生, 主要从事学习记忆的神经生物学方面的研究。电话: (023)68752254

收稿日期: 2002-10-08; 修回日期: 2002-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net