

活体小鼠后顶叶皮质神经元双光子成像与空间定向机制*

何小飞¹ 徐光青^{1,5} 兰 月² 梁凤银³ 罗传铭⁴ 裴 中³ 黄东锋¹

摘要

目的:结合双光子显微镜和Morris水迷宫探讨右侧顶叶皮质在空间认知功能中的作用机制。

方法:选用C57BL/6J小鼠18只,随机分为正常对照组和右侧顶叶损毁组,用直流电损害小鼠的后顶叶皮质,正常对照组未做任何处理。在双光子显微镜下观测小鼠活体内右侧顶叶皮质神经元活动,Morris水迷宫评价小鼠的空间认知功能。

结果:在双光子显微镜下,损毁组小鼠较正常组右侧顶叶皮质功能神经细胞明显减少,神经元跨膜电位明显减弱。在水迷宫空间任务中,损毁组小鼠空间学习能力及空间探索功能也均明显减弱。

结论:双光子显微镜可在活体动物直接观察神经元活动;正常右侧后顶叶功能神经元活动是空间定向认知的关键。

关键词 双光子成像;损毁;后顶叶皮质;空间定向;Morris水迷宫

中图分类号:R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2013)-10-0889-05

Neural mechanism of the spatial orienting in posterior parietal cortex of mice in vivo: two-photon brain imaging study/HE Xiaofei, XU Guangqing, LAN Yue, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(10): 889—893

Abstract

Objective: To demonstrate the crucial role of right posterior parietal cortex in spatial orienting using two-photon microscope detecting cortical neuronal activity and Morris water maze testing visuospatial function of mice.

Method: Eighteen C57BL/6J mice were randomly divided into two groups as damaged group which received electrolytic lesion in right posterior parietal cortex and normal control group which received no operation. Morris water maze was used to test visuospatial orienting function. And then, depose the mice under two-photon to observe and record.

Result: Under the two-photon calcium imaging, in right posterior parietal cortex of damaged mice the recorded neurons significantly decreased compared with normal control group. Moreover, in right posterior parietal cortex the number of both neuron cell and neurogliocyte decreased significantly. The transmembrane potentials of neuron reduced significantly. During Morris water maze test, the damaged mice showed significant deficits in spatial learning ability and spatial explore orienting function compared with normal control group.

Conclusion: Two-photon microscope can detect online neuronal activity, with high temporal and spatial resolution. Normal right posterior parietal cortex plays a crucial role in spatial orienting cognition.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510080

Key word two-photon microscope; lesion; posterior parietal cortex; spatial orienting; Morris water maze

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.10.002

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071608)

1 中山大学附属第一医院康复医学科,广州,510080; 2 中山大学附属第三医院康复医学科; 3 中山大学附属第一医院神经内科; 4 澳门大学; 5 通讯作者

作者简介:何小飞,女,硕士研究生; 收稿日期:2013-06-07

空间定向障碍是脑损害后常见的功能残损,大量研究证实这往往与后顶叶皮质 (posterior parietal cortex, PPC) 受损有关,还会导致患者意向性运动功能下降,从而影响患者日常生活活动能力的恢复^[1-2]。另外,临床资料显示,右侧后顶叶损害较左侧损害所导致空间定向障碍更多见、更严重,并且自发恢复的几率更小^[3]。目前对 PPC 在空间定向活动中的机制研究主要是建立在脑损害模型所获取的神经影像学资料和行为学之上,通过血氧浓度和行为学变化来研究相关脑区参与空间定向,而缺乏直接的神经元活动证据。有关脑神经机制的动物实验研究,多数局限在形态学层面上,这些方法虽然有效但无法对活体脑组织进行观察。

综上所述,现代神经生物学研究的一大挑战就是如何对活体动物大脑皮质进行有效的成像,并直接观察记录皮质神经元的活动。随着神经成像技术的发展,通过局部注射膜渗透性标记物,双光子激光共聚焦显微镜 (two-photon laser scanning microscope, TPLSM) 可以清晰地对活体动物大脑皮质局部神经元进行成像,并且能够记录和分析神经元活动^[4-5]。因此,我们计划采用直流电解局部损毁右侧后顶叶皮质,利用双光子显微镜观察局部神经元的活动,并结合 Morris 水迷宫试验来探讨右侧后顶叶皮质参与空间定向活动的神经机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物及分组

雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只,年龄 8 周,体重 23—25g (由中山大学实验动物中心提供)。随机分为损毁组和正常对照组,各 9 只,普食喂养。

1.2 试验试剂与仪器

1.2.1 实验试剂: 20% 乌拉坦,麻醉剂; Sulforhodamine 101 (SR 101, Sigma 公司), 用于标记神经胶质细胞; Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1AM, Invitrogen 公司), 可同时标记神经元和神经胶质细胞; SPS 缓冲液 (150mmol NaCl, 2.5mmol KCl, 10mmol HEPES); 标准的细胞外盐水 (2mmol CaCl₂, 1mmol MgCl₂, 20mmol glucose, 125mmol NaCl, 4.5mmol KCl, 26mmol NaHCO₃, 1.25mmol NaH₂PO₄, pH=7.4); 普朗尼克 F-127 (Sig-

ma 公司); 二甲亚砜溶液 (Sigma 公司)。

1.2.2 实验仪器: 双光子显微镜 (Leica 公司, Germany); 立体定位仪 (瑞沃德公司, 深圳); 颅骨固定架; 颅骨钻; 玻璃毛细管; 微电极拉针仪; 微量注射泵 (UMP3, USA); 10μl 微量注射器 (可换针头); 电子针刺刺激仪。

1.3 直流电损毁右侧后顶叶皮质

采用乌拉坦 (150mg/100g) 麻醉小鼠, 然后将小鼠固定于立体定位上, 利用颅骨钻磨去后顶叶皮质上的颅骨 (前囟后 2mm, 中线外侧 1.7mm)^[6]。夹掉直径为 0.7mm 的针灸针针尖, 固定于立体定位仪上, 连接电子针刺刺激仪, 阳极作为刺激电极, 阴极作为参考电极夹在头皮上。刺激电极针插入皮质 1.5mm, 打开电源通电, 通电时间 20s, 电流强度 1mA^[7]。直流电损毁后, 局部撒上青霉素粉, 逐层缝合头皮。

1.4 双光子显微镜成像

1.4.1 试剂配制: 普朗尼克溶于二甲亚砜溶液中 (F-127 2g, 二甲亚砜 10ml); 然后将 OGB-1AM 溶解于上述 F-127 溶液中, 浓度为 10mmol/L。再利用 SPS 缓冲液把 OGB 混合液稀释 10 倍, 最后浓度为 1mmol/L。最后, 9mg SR 101 溶解于 1.5ml 生理盐水中, 并用微量滴液管分别滴入 0.4μl OGB-1AM, 4μl SPS 缓冲液, 0.5μl SR 101, 混合离心以保证染色液的浓度均匀。

1.4.2 膜渗透标记神经元^[8]: 乌拉坦麻醉小鼠, 并固定于立体定位仪上, 定位目标区域 (右侧顶叶皮质), 用颅骨钻轻柔地将颅骨磨薄, 直径约 1mm, 在操作过程中, 在颅窗内滴入少量人工脑脊液, 在湿润情况下操作可使颅骨更平, 每 30s 观察颅骨的厚度, 以防止振动引起脑组织损伤。当用镊子尾端轻刮颅骨时, 颅骨平软, 且脑组织表面血管清晰可见时, 停止操作。用颅骨钻在目标观察区域旁开一个直径约 0.5mm 的颅窗, 去掉颅骨, 以便于染料注射。

用微电极拉针仪将玻璃毛细管拉成尖端很细的针, 连接于微量注射器之上, 将微量注射泵固定于立体定位仪上, 连接微量注射泵。用胶水把固定铁板粘在颅骨上以固定小鼠头部, 防止由呼吸和心跳导致的头部振动。用微量注射器吸取 5μl 的配置好的 OGB-1AM 和 SR 101 染料, 以倾斜角度 30° 缓慢地

从旁边的小颅窗插进皮质,插入深度约400 μ m,尽量避开血管进行操作,调节微量注射泵注射速度为86nl/min,注射总时间约1min。注射2h后在双光子显微镜下观察目标区域神经钙成像,OGB-1AM在注射后1h将达稳定状态,可维持4—6h。

1.4.3 双光子成像:利用双光子显微镜(Leica, 20*, 标准细胞外盐水浸润物镜),选择OGB-1AM激发波长800nm。在物镜下检查激发光的功率,少于50—70mW,减小功率至最少以聚焦于双光子显微镜下的脑组织表面,逐渐增加激发光功率(避免漂白),并记录神经元荧光强度变化判断神经活动情况。

1.5 水迷宫试验

将目标平台置于第二象限,连续训练C57/BL7小鼠7d,每天上午、下午各训练1次。第1天为训练适应,数据结果不列入统计,第2天至第6天为获得性训练,第7天撤走平台,为空间探查实验。实验时间设置为60s,在目标区域时间为2s,如果小鼠到达目标平台的时间超过60s,则引导动物到平台,且让动物在平台上停留10s后再移开小鼠,擦干,每一次随机对四个象限进行训练,且每一只小鼠每一次训练时间间隔约为20min。探查试验时,将小鼠面壁置于目标区域对侧象限,记录60s内小鼠穿越目标区域次数,此为空间记忆的探测指标。以排除手术炎症的影响,右侧顶叶损害组在术后1周,按照同样的方法进行水迷宫测试。

1.6 统计学分析

利用SPSS 19.0软件进行统计分析,采用两组独立样本 t 检验, $\alpha=0.05$ 。采用Igor pro和Graph-Pad Prism 5.0软件进行图片处理。

2 结果

2.1 右侧后顶叶皮质双光子显微镜成像

在25倍水浸润物镜下,正常小鼠右侧后顶叶皮质可见大量神经元和神经胶质细胞,并有广泛的微血管分布(图1A)。连续观察和记录单个神经元可见神经元荧光强度变化明显(图1B),提示所记录的神经元 Ca^{2+} 跨膜电位活动显著。

在25倍水浸润物镜下,直流电损毁小鼠右侧后顶叶皮质标记到的功能神经元和神经胶质细胞数量明显较正常对照组小鼠稀少,只可隐约见到极少量

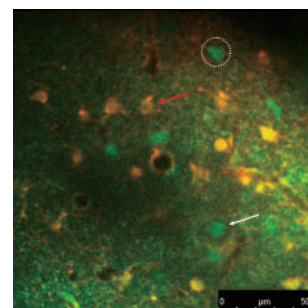
的神经元和神经胶质细胞,并且没有清晰可见的微血管分布(图2A)。连续观察和记录单个神经元(图2A白色圆圈标识)可见神经元荧光强度明显降低,荧光强度变化明显减弱(图2B),提示所记录的神经元 Ca^{2+} 跨膜电位活动减弱。

2.2 水迷宫行为学测定

在获得性训练过程中(第2—6天),随着训练次数的增加,正常对照组小鼠到达目标区域的平均持续时间均逐渐缩短,第5天与第1天到达目标区域时间比较差异有显著性意义($t=5.305, P<0.01$)。而损毁组小鼠到达目标区域的平均持续时间,第5天和第1天比较差异无显著性意义($t=0.6959, P>0.05$)。见图3。

两组小鼠均进行1次适应性训练和5次获得性训练后,在第7天进行空间探查实验,结果显示右侧后顶叶损毁小鼠空间定向功能受损,与正常对照小鼠比较,60s内平均穿越目标区域的次数明显减少,差异具有显著性意义($t=6.155, P<0.01$)。见表1。

图1A 正常小鼠右侧后顶叶皮质双光子显微镜成像(25A*3.02)



注:神经元(白色箭头及白色圆圈所示);神经胶质细胞(红色箭头所示)。

图1B 正常小鼠右侧后顶叶皮质神经元荧光强度变化

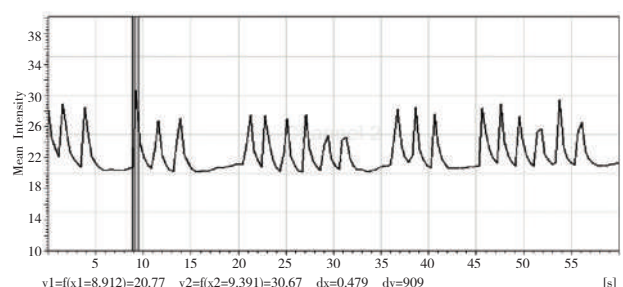
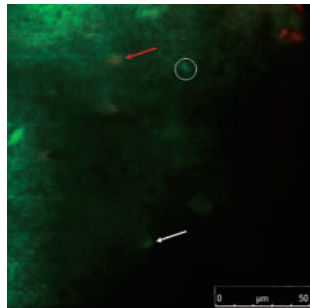


图2A 直流电损毁小鼠右侧后顶叶皮质双光子显微镜成像(25A*3.02)



注:神经元(白色箭头及白色圆圈所示);神经胶质细胞(红色箭头所示)。

图2B 直流电损毁小鼠右侧后顶叶皮质神经元荧光强度变化

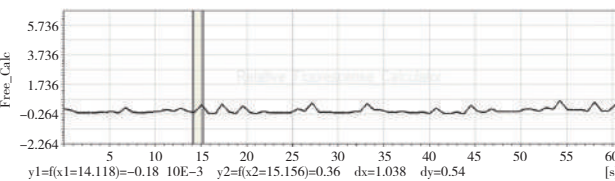


图3 水迷宫获得性训练到达目标区域平均持续时间—训练天数趋势图

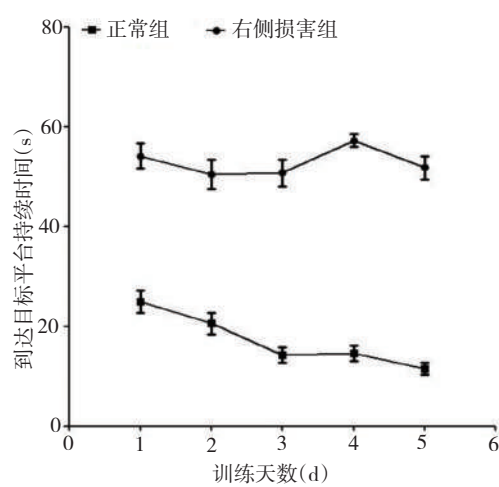


表1 空间探查试验60s内平均穿越目标区域次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	穿越次数
正常对照组	9	9.33±3.808
右侧后顶叶损毁组	9	1.00±1.414 ^①

与对照组比较:① $P < 0.01$

3 讨论

我们采用双光子显微镜和Morris水迷宫试验对

小鼠右侧后顶叶进行局部皮质神经细胞成像和空间定向功能评价,发现损毁小鼠的局部皮质功能神经元和神经胶质细胞数量明显减少,神经活动明显减弱,而空间学习能力和空间记忆能力明显减退,提示右侧后顶叶正常的神经活动是空间定向认知的关键脑区和物质基础。

双光子显微镜是结合了激光扫描共聚焦显微镜和双光子激发技术的一种新技术,利用钙标记成像可以活体记录大脑皮质神经元和神经胶质细胞,并具有单个细胞分辨率的成像技术^[9]。在我们的双光子成像研究中,所使用的膜渗透钙指示剂,是一种结合乙酰羟甲基酯的 Ca^{2+} 结合敏感染料,易于通过质膜进入细胞,在进入细胞后即被非特异性酯酶水解,留在细胞内的荧光探针与细胞内的靶结构或靶分子结合发挥作用^[10-11],同时利用SR 101特异性标记神经胶质细胞,结果显示直流电损毁右侧后顶叶皮质后局部神经元和神经胶质细胞较正常对照组小鼠均明显减少。此外,神经元内的 Ca^{2+} 水平变化和电位变化密切相关,我们记录到单个神经元(图1A,2A白色圆圈标识)的荧光强度变化曲线,可以特性地标识神经元快速发放的电活动。我们研究发现损毁组小鼠较正常对照组所记录到的神经元 Ca^{2+} 跨膜电位活动显著减弱(图2A,2B)。综上所述,直流电损毁右侧后顶叶皮质后,不仅局部活动的神经细胞数明显减少,而且残存的功能神经元跨膜电位也明显减弱,说明双光子显微镜可以在活体动物上进行单个功能神经元成像,并实时记录特性神经元快速发放的电活动,为我们探讨复杂大脑皮质系统的结构-功能连接提供了一种新的途径。

临床资料证实,空间认知障碍与后顶叶的损害关系密切^[12-13],尤其右侧后顶叶受损所导致的定向不能更为常见和严重^[3,14]。动物行为学研究发现,后顶叶在空间信息的编码中具有重要作用,后顶叶损害将导致明显的空间记忆障碍^[15-16]。与这些研究结果一致,我们采用直流电损毁小鼠右侧后顶叶后进行Morris水迷宫检测,60s内平均穿越目标区域的次数较正常对照组小鼠明显减少,提示右侧后顶叶受损可以导致空间学习和记忆能力减退。结合双光子成像结果,本研究直接证实右侧后顶叶在空间定向认知活动中的关键作用。

本实验对活体小鼠右侧后顶叶皮质神经元进行双光子钙成像分析,虽然对功能神经元的跨膜电位没能进行定量检测,但是损毁组小鼠后顶叶区域功能神经细胞减少,特性神经元放电减弱,Morris水迷宫测量显示空间定向功能受损。这使得在活体动物进行功能神经元成像和跨膜电位测量成为可能,结合神经功能和行为学评价,为进一步空间认知障碍的神经机制及其可塑性研究提供了更直接和客观的工具。

参考文献

- [1] Ringman JM, Saver JL, Woolson RF, et al. Frequency, risk factors, anatomy, and course of unilateral neglect in an acute stroke cohort[J]. *Neurology*, 2004, 63(3):468—474.
- [2] Hamilton RH, Coslett HB, Buxbaum LJ, et al. Inconsistency of performance on neglect subtype tests following acute right hemisphere stroke[J]. *J Int Neuropsychol Soc*, 2008, 14(1):23—32.
- [3] Siman-Tov T, Mendelsohn A, Schonberg T, et al. Bihemispheric leftward bias in a visuospatial attention-related network[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(42):11271—11278.
- [4] 彭诗宇,任振华,徐金勇,等.活体小鼠脑组织Ca²⁺敏感荧光染料双光子成像的观察[J].*中山大学学报*,2011,50(5):111—113.
- [5] Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, et al. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Science*, 2008, 321(5896):1686—1689.
- [6] Harvey CD, Coen P, Tank DW. Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task[J]. *Nature*, 2012, 484(7392):62—68.
- [7] Haghparsat A, Ahmad-Molaei L. Effects of electrolytic lesion of dorsolateral periaqueductal gray on analgesic response of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis in rat[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 451(2):165—169.
- [8] Garaschuk O, Milos RI, Konnerth A. Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1):380—386.
- [9] Golshani P, Portera-Cailliau C. In vivo 2-photon calcium imaging in layer 2/3 of mice[J]. *J Vis Exp*, 2008, (13):681.
- [10] 陈同生,曾绍群,骆清铭,等.活体细胞内双光子激发的光漂白特性[J].*生物化学与生物物理进展*,2002,29(2):261—266.
- [11] Alitto HJ, Dan Y. Cell-type-specific modulation of neocortical activity by basal forebrain input[J]. *Front Syst Neurosci*, 2012, 6(79):1—12.
- [12] Xu GQ, Lan Y, Huang DF, et al. Visuospatial attention deficit in patients with local brain lesions[J]. *Brain Res*, 2010, (1322):153—159.
- [13] 徐光青,兰月,陈少贞,等.脑额顶网络损害患者视空间注意功能障碍的研究[J].*中华物理医学与康复杂志*,2011,33(2):122—125.
- [14] Xu G, Lan Y, Huang D, et al. The study on the frontoparietal networks by continuous theta burst stimulation in healthy human subjects[J]. *Behav Brain Res*, 2013, (240):60—68.
- [15] Nitz DA. Tracking route progression in the posterior parietal cortex[J]. *Neuron*, 2006, 49(5):747—756.
- [16] Svoboda J, Telensky P, Blahna K, et al. Lesion of posterior parietal cortex in rats does not disrupt place avoidance based on either distal or proximal orienting cues[J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 445(1):73—77.

中国医师协会康复医师分会第二届骨科康复论坛通知

中国医师协会康复医师分会第二届骨科康复论坛定于2013年12月13—15日在北京华北宾馆召开。会议主题:迎接骨科康复的新发展。会议将就以下4个主题进行研讨:骨科康复临床路径;骨科康复评定及ICF的应用;转化医学在骨科康复的应用;常见骨科疾患康复治疗专家共识。会议将授予国家继教项目I类学分8分。会议主办单位:北京康复中心。征文要求:论文摘要1份,字数为800—1000字。来稿请注明单位名称、作者姓名及通讯地址、邮编、Email地址。

投稿方式:请通过电子邮件发送论文,不接受纸质稿件,邮件主题为:(征文)论文题目。投稿邮箱:shuyanpb@163.com。截稿时间:2013年11月15日。联系人:郅淑燕 shuyanpb@163.com。电话:13810510280。

中国医师协会康复医师分会

www.rehabi.com.cn 893