

网络出版时间: 2017-9-8 12:36 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1236.001.html>

◇基础医学研究◇

双光子显微镜用于在体监测小鼠 视交叉上核 Ca^{2+} 动态变化的方法学研究

王 聪¹, 马腾飞², 张 晨³, 王元银², 王烈成¹

摘要 目的 通过颅底暴露手术联合双光子荧光成像技术实现在体记录视交叉上核(SCN)神经元钙离子活动信号并研究其活动规律的新型方法。方法 对麻醉小鼠实行颅底暴露手术,通过双光子荧光显微镜对已注射钙指示剂的活体小鼠SCN核团钙信号进行实时动态测定。结果 成功建立一套小鼠颅底暴露SCN核团手术方法,术后应用双光子显微镜清晰地检测到SCN核团钙离子荧光信号,也能够实现稳定的在体细胞钙离子成像,并发现不同自发反应细胞中钙离子活动规律差异。结论 通过颅底暴露手术,利用双光子显微镜成功实现了实时监测SCN区域神经元钙离子信号。

关键词 双光子; 荧光成像技术; 在体; 钙成像; 视交叉上核
中图分类号 R 319.9; R 322.811

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1583-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.001

双光子荧光显微镜因其可以对活体动物大面积细胞功能活动进行三维实时监测^[1],且穿透性强,信噪比小,对活体组织损伤小^[2]而在越来越多的生命科学研究领域扮演着重要角色,得到广泛的应用。但由于显微镜镜头焦距短,仅能够检测活体小鼠大脑浅层的细胞^[3],因此,目前利用荧光成像技术主要局限在在体观测实验动物的大脑颅顶皮层神经元。视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)是哺乳动物最重要的昼夜节律起搏器,其调整着哺乳动物一系列生理行为和活动,目前探索SCN核团与周边核团的相互作用以及在昼夜节律、睡眠的调节机制是热点研究领域^[4]。但由于SCN核团位于颅底,对于其功能活动主要采用离体脑片神经元膜片钳和

用微电极阵列等记录技术研究神经元的功能活动^[5]。除此之外,也有报道通过核磁共振成像的灰度值来研究大脑深部的神经元能够活动^[6]。然而,与双光子钙成像相比,这些研究手段有很大局限性,不像双光子显微镜一样具有高灵敏度,并且不能采集直接可视化的高分辨率图像和视频^[7]。因此,该研究通过首创的颅底暴露手术暴露小鼠颅底核团,再联合运用双光子成像技术和荧光标记技术实现了对活体动物SCN神经元钙活动的实时记录。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性健康C57BL/6小鼠,5周龄,清洁级,购自北京维通利华公司。所有实验小鼠手术前置于(22±2)℃、相对湿度(55±10)%的有空调装置的饲养室里,给予12 h光照/黑暗周期(光照时间07:00~19:00),小鼠养到7~8周进行试验。将小鼠腹腔注射剂量为10 mg/kg的麻醉药戊巴比妥钠。麻醉深度的评估通过监测眼睑反射和呼吸率。

1.1.2 主要试剂 Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1,美国Life Technologies公司);人工脑脊液成分(mmol/L):126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 11 Glucose·H₂O, 26 NaHCO₃, 1 Ascorbic acid, 1.2 MgCl₂·6H₂O, 2.5 CaCl₂·2H₂O (pH=7.4±0.5); DMSO、Agarose、戊巴比妥钠(美国Sigma公司)。

1.1.3 仪器 双光子显微镜(美国Thorlabs公司);双光子显微镜镜头(日本Nikon公司);小鼠无创血氧仪 Mouse Ox pulse oximeter(美国STARR Life Sciences公司);MaiTai飞秒激光器(美国Spectra-Physics公司);小鼠高速颅骨钻(深圳瑞沃德公司);高频手术电刀(安徽英特公司)。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 小鼠经戊巴比妥钠(10 mg/kg)腹腔麻醉后,注射丁丙诺啡(1 mg/kg)用于止痛。通过测试小鼠反射来监测评估麻醉深度,必要情况

2017-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81571293);中国科学院脑功能与脑疾病重点实验室开放课题(编号:2013-4)

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安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

³北京大学生命科学学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室,北京 100871

作者简介:王 聪,女,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wangliecheng@ahmu.edu.cn

下可少量补麻醉药。将小鼠置于加热垫上,加热垫温度维持在 36°C ,用小鼠无创血氧仪监测小鼠手术过程中各项生理指标,包括体温、血氧饱和度和心率。将小鼠眼部涂上眼药膏保护眼睛,防止手术灯的强光刺激和干燥。接着给小鼠颅骨黏贴上起固定作用的钛合金金属片。手术过程如下:首先用75%乙醇溶液消毒颅顶区域皮肤,用无菌手术刀片除去小鼠颅顶毛发;然后用镊子提起头皮用手术剪去除头皮暴露颅骨;再用棉球沾取少量双氧水轻轻擦拭颅骨以去除表层筋膜,用手术刀小心的刮去颅骨上粘连的剩余肌肉黏膜组织;将定制的钛合金金属片用502胶水先粘到头骨上,用力按压2 min左右,待502胶水干透后,用牙科水泥将周边空隙填满。10 min后待牙科水泥干透可继续下一步试验(图1)。

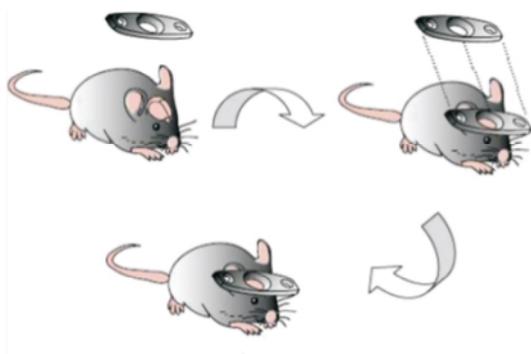


图1 颅顶粘贴钛合金金属片示意图

1.2.2 气管插管 用手术剪刀去除小鼠颈前部的毛发,75%的酒精消毒皮肤。在小鼠颈部正中线剪一个1.0 cm的切口,用止血钳钝性分离肌肉组织,暴露气管。在气管上剪一个倒T型切口,将特制的3 cm的无菌橡胶管插入小鼠气管(图2A)并固定气管插管(图2B)。

1.2.3 颅底暴露手术 将手术电刀的中性电极板置于加热垫上,然后将麻醉小鼠仰卧位固定于中性电极板上。用弯头止血钳尖端紧贴于颌肌肉,把高频电刀尖端垂直贴于血管钳尖端,血管钳尖端沿虚线从上至下缓慢匀速凝烧灼表面血管(图2C)。外科手术剪刀从两颗门牙中间剪一小口,再用高频电刀切开门牙(图2D)。以上过程中,首选电切模式(输出功率15 W),但后续实验过程中若遇到小鼠血管流血,则改用电凝模式(输出功率20 W)。然后用高频电刀沿图2E所示虚线电切开下颌肌肉和切割舌头(图2F)。在用高频电刀电切割舌头时,要注意切割速度不宜过快,否则舌根血管尚未完全凝

结,容易造成出血,因为此部位难以止血,最终会导致小鼠失血过多休克而死,但也不宜过慢,因为长时间高温电击小鼠,也容易造成小鼠死亡。在后续的手术过程中,由于很靠近颅底部位,因此要尽量减少对周围组织的损伤,需要选择一个相对低功率(输出功率是10 W)的持续电流进行手术。用电刀去除颅骨表面的软膜(图2G),再用颅骨钻把颅底中线的腔隙磨至大小为 $2.5\text{ mm} \times 5.0\text{ mm}$,将周边的颅骨磨薄至半透明状态,最后用镊子小心地从边缘掀开硬脑膜,清除腔隙中碎骨,直至视神经交叉及其下部的脑组织(主要是下丘脑)完全暴露。最后一步是极其关键的,需要细心和耐心才能降低脑组织出血的风险,否则会影响成像清晰度甚至危及小鼠生命(图2H)。

1.2.4 注射钙指示剂 Oregon Green 488 BAPTA-1

将钙指示剂 Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1) 用玻璃微电极($3 \sim 5\text{ M}\Omega$)缓慢注入SCN区域,注射深度为 $150 \sim 350\text{ }\mu\text{m}$,容积为 $3\text{ }\mu\text{l}$,注射用时为 $5 \sim 10\text{ min}$,然后将定制玻片($2.5\text{ mm} \times 5.0\text{ mm}$)覆盖在组织上,再用1.2%的琼脂糖压在玻片上,以尽量避免肌肉震颤和小鼠呼吸抖动造成的影响(图2I)。

1.2.5 双光子在体成像 将完成颅底暴露手术并注射OGB-1染料的小鼠仰卧位固定于双光子显微镜下(图2J)。用于拍摄的双光子显微镜包括扫描镜头($16\times$ 水镜,工作距离:3 mm)和飞秒激光器。本实验中双光子激发光波长 920 nm ,扫描频率为 20.4 Hz ,图像大小为 768×768 个像素,连续扫描5000张,拍摄深度为 $-150 \sim -350\text{ }\mu\text{m}$ 。实验结束后对小鼠实行安乐死。

1.3 图象处理 本实验中图像处理采用 Matlab、Igor Pro6 (WaveMetrics)、Image J,制图使用 Adobe Illustrator CS3、Adobe Photoshop CS3 等软件。

2 结果

2.1 双光子荧光显微镜在体钙成像检测 将术后荧光标记的小鼠通过双光子荧光显微镜进行在体成像检测,成像深度为 $150 \sim 400\text{ }\mu\text{m}$,镜下能够清晰观察到颅底浅层血管、胶质细胞和SCN区域神经元(图3)。由图可见,神经细胞聚集在一起并与血管形成一个密集的网络结构。

2.2 SCN区域神经元的自发钙信号 用双光子显微镜对SCN区域神经元进行荧光扫描和记录。将记录的扫描图片利用 matlab 软件随机选取出现自发反应的神经元,再通过 Image J 软件和 Igor Pro 6

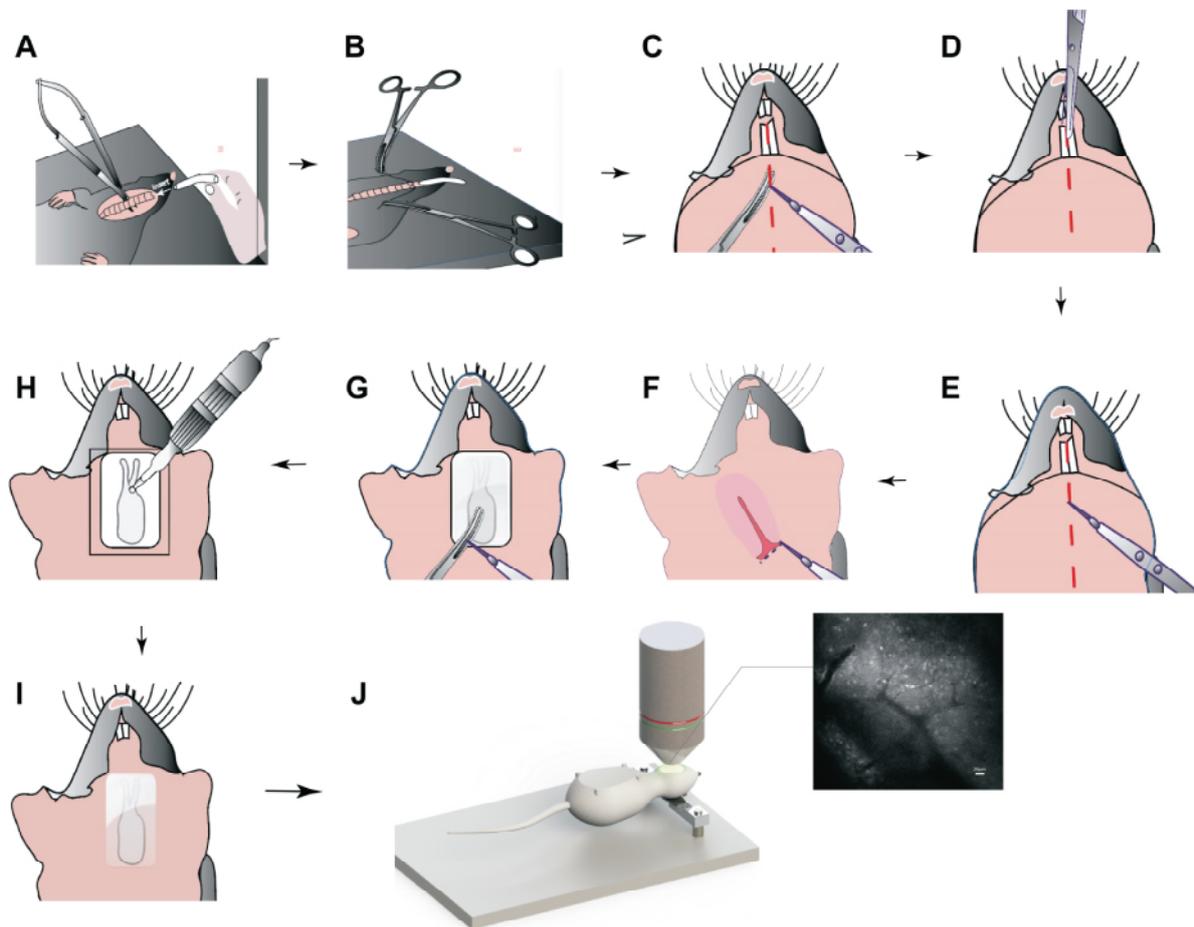


图2 颅底暴露手术全过程

A: 气管插管; B: 结扎; C: 电凝血管; D: 分离两门齿; E: 电切下颌肌肉; F: 舌头环切术; G: 去除软腭; H: 磨骨; I: 贴盖玻片; J: 双光子拍摄

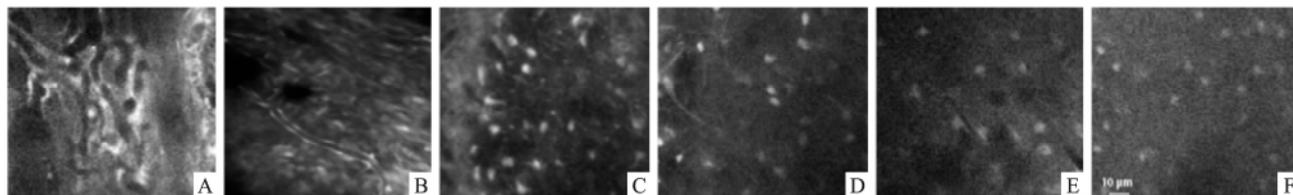


图3 双光子显微镜下的颅底浅层血管和神经细胞图 ×160

A: 150 μm; B: 200 μm; C: 250 μm; D: 300 μm; E: 350 μm; F: 400 μm

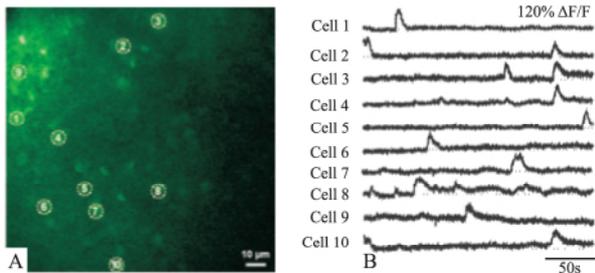


图4 SCN 神经元在体双光子荧光成像检测典型结果图

A: 双光子显微镜下拍摄图, 钙指示剂为 OGB-1 (×160); B: A 图中标记的 10 例神经元对应的实时自发钙活动的曲线图

软件分析并导出自发钙活动信号。图4是一组检测结果 A 图是 10 例标记有自发钙活动的神经元, B 图是这 10 例神经元实时活动的曲线图。结果表明 SCN 区域神经元在没有任何刺激的情况下, 该区域神经元自发钙活动并不一致, 在被检测的时间内有的呈高频活动, 有的呈低频活动, 即使同一个神经元, 其活动间隔时间也不相等, 自发钙活动频率范围在 0.004 ~ 0.016 Hz。

3 讨论

20 世纪 90 年代初, 双光子激光扫描显微镜首

次运用于生物科学研究以来^[8],因其可以对大面积活细胞进行三维实时监测,具有穿透性强、信噪比小和光对活体组织损伤小等技术优势而迅速发展,已从离体研究拓展到在体研究,从通过磨薄的颅窗来观察皮质神经元的功能活动^[9]到开颅观察皮质神经元的功能活动^[10],从而推进了神经科学的研究。但目前人们对双光子显微镜在体中枢神经系统检测中的应用尚停留在颅顶皮质神经元,主要原因是颅顶皮质神经元暴露的手术比较简单,易于操作,实验动物存活率高且实验观察时间长。而颅底虽然有很多重要的核团,比如 SCN,有着“昼夜节律生物钟”之称,在昼夜节律的产生中起到极其重要的作用。SCN 内有多种功能的神经元,因在神经元化学表型、输入和输出方面存在着差异从而在昼夜节律功能中起到不同作用,而昼夜节律紊乱与机体疾病的发生、发展和预后密切相关。如果能应用双光子显微镜对 SCN 神经元进行三维实时监测,再结合电生理检测和药理学分析,对实时观测不同类型的 SCN 神经元功能规律及神经网络通讯机制都具有极高的应用价值。对进一步揭示 SCN 不同类型的核团在昼夜节律调控中的功能发生机制提供有利的帮助。

不过颅底暴露手术相较于颅顶暴露手术要复杂得多,难度也较大。比如手术过程易出血的地方比较多,手术中必须采用电刀电凝止血;开颅的难度也比较大,需将颅骨磨薄后再小心揭开颅骨等等。正因为有如此大的难度,故之前未见这方面的报道。

本实验开创性地探索出通过颅底暴露手术,运用双光子荧光成像技术,首次实现对活体小鼠 SCN 核团内钙信号的探测,实现了对颅底大面积活细胞进行三维实时监测。神经网络自发钙活动携带着丰富信息,本研究显示 SCN 区域神经细胞的自发钙活动并不一致,且相较于视皮层神经元自发钙活动的频率,颅底神经元自发钙活动发生频率远低于视皮层神经元,即使是爆发期也不及皮质神经元,不过一次钙活动的持续时间远高于视皮层神经元,这可

能与其调控生物节律和内环境稳态功能活动相一致,而大脑皮层神经元主要调控躯体运动和感觉的反射性活动。

参考文献

- [1] Li J, Dong H, Zhang S, et al. Colloidal quantum-dot-based silica gel glass: two-photon absorption, emission, and quenching mechanism [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(36): 16440–8.
- [2] Li C Y, Cao D, Qi C B, et al. One-step separation-free detection of carcinoembryonic antigen in whole serum: Combination of two-photon excitation fluorescence and optical trapping [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 90: 146–52.
- [3] Chen X, Leischner U, Varga Z, et al. LOTOS-based two-photon calcium imaging of dendritic spines *in vivo* [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(10): 1818–29.
- [4] Edwards M D, Brancaccio M, Chesham J E, et al. Rhythmic expression of cryptochrome induces the circadian clock of arrhythmic suprachiasmatic nuclei through arginine vasopressin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016, 113(10): 2732–7.
- [5] Hanna L, Walmsley L, Pienaar A, et al. GABAergic projections gate suprachiasmatic nucleus responses to retinal input [J]. *J Physiol*, 2017, 595(11): 3621–49.
- [6] Hankin M K, Parkinson J R, Bloom S R, et al. The effects of glutamate receptor agonists and antagonists on mouse hypothalamic and hippocampal neuronal activity shown through manganese enhanced MRI [J]. *Neuroimage*, 2012, 59(2): 968–78.
- [7] Zhang H, Wang K, Xuan X, et al. Cancer cell-targeted two-photon fluorescence probe for the real-time ratiometric imaging of DNA damage [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2016, 52(37): 6308–11.
- [8] Gibbs K L, Kalmar B, Sleight J N, et al. *In vivo* imaging of axonal transport in murine motor and sensory neurons [J]. *J Neurosci Methods*, 2016, 257: 26–33.
- [9] Silasi G, Boyd J D, Ledue J, et al. Improved methods for chronic light-based motor mapping in mice: automated movement tracking with accelerometers and chronic EEG recording in a bilateral thin-skull preparation [J]. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 123.
- [10] Isshiki M, Okabe S. Evaluation of cranial window types for *in vivo* two-photon imaging of brain microstructures [J]. *Microscopy (Oxf)*, 2014, 63(1): 53–63.

Methodological study in the dynamic changes of calcium signals of suprachiasmatic nucleus *in vivo* with two-photon microscopy

Wang Cong¹, Ma Tengfei², Zhang Chen³, et al

(¹Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²College of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³State Key Laboratory of Biological Membrane and Biological Engineering, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Objective To explore a novel surgical method of skull base exposure and record calcium activity of

肝细胞损伤模型中银杏内酯 A 保护机制 及对 Nrf2-抗氧化酶的影响

姜璐¹, 向楠², 姜侠³, 王伟芹⁴

摘要 目的 探讨银杏内酯 A 对四氯化碳 (CCl₄) 诱发的 HepG2 细胞损伤是否具有保护作用,并观察其对核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 调控的抗氧化酶的作用。方法 采用 CCl₄ 诱发 HepG2 细胞损伤,并予以不同剂量的银杏内酯 A 对其进行干预治疗,MTT 法检测细胞活性,ELISA 法检测细胞培养液中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 浓度,并观察细胞 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)、丙二醛 (MDA)、Nrf2、血红素氧合酶 1 (HO-1)、谷胱甘肽 (GSH) 水平。进而采用 PI3K/Akt、MAPK 通路拮抗剂干预,探索介导银杏内酯 A 发挥作用的上下游通路。结果 与对照组比较,CCl₄ 组 HepG2 细胞活性降低,细胞培养液 AST、ALT 浓度增加,细胞 8-OHdG、MDA 水平升高 ($P < 0.05$)。而与 CCl₄ 组比较,银杏内酯 A 可剂量依赖性的升高 HepG2 细胞活性,降低 AST、ALT 浓度,降低 8-OHdG、MDA 水平,同时显著升高 Nrf2、HO-1、GSH 水平 ($P < 0.05$)。此外,PI3K/Akt 拮抗剂 LY294002 与 p38 拮抗剂 SB203580 显著减弱了银杏内酯 A 对 HepG2 细胞的保护作用,并抑制了银杏内酯 A 对 Nrf2、HO-1、GSH 表达的上调作用 ($P < 0.05$)。结论 银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤具有保护作用,其机制之一可能与通

过 PI3K/Akt、p38 通路上调 Nrf2、HO-1、GSH 表达、抑制氧化应激反应有关。

关键词 银杏内酯 A; HepG2 细胞; 四氯化碳; 氧化应激; Nrf2; HO-1; GSH

中图分类号 R 962

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1587-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.002

肝脏在物质代谢、维持机体平衡方面具有重要作用。许多化学、生物等因素可导致肝脏损伤,进而引起肝硬化等,影响机体健康。过强的氧化应激反应是多种致病因素引发肝脏损伤的共同机制之一,抑制过强的氧化应激反应被认为是治疗肝损伤的一项重要策略^[1]。多种中药及其提取物被证实具有抗氧化作用并被用于治疗肝脏疾病^[2]。银杏内酯 A 是中药银杏干燥叶的提取物之一,研究^[3]显示银杏内酯 A 具有抗氧化活性,并被用于多种疾病的治疗。但银杏内酯 A 是否对肝脏损伤具有保护作用未见报道,该研究拟观察银杏内酯 A 对 CCl₄ 诱发的 HepG2 细胞损伤的保护作用,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药品、试剂与仪器 MTT、CCl₄、PI3K/Akt 拮抗剂 LY294002、JNK 抑制剂 SP600125、p38 抑制剂

2017-05-31 接收

基金项目: 山东中医药管理基金 (编号: 2009-33)

作者单位: ¹ 山东中医药大学附属医院消化内镜诊疗科, 济南 250014

² 山东中医药大学, 济南 250355

³ 山东中医药高等专科学校中医经典教研室, 烟台 264199

⁴ 山东中医药大学附属医院, 济南 250014

作者简介: 姜璐, 女, 硕士, 主治医师, 责任作者, E-mail: 18615218099@163.com

SCN *in vivo* combining two-photon fluorescence imaging. **Methods** The surgery of skull base exposure was performed on the anesthetized mice and the calcium signals of SCN were real-time monitored by two-photon fluorescence microscopy after calcium indicator injected. **Results** A set of operative methods to expose the SCN at skull base of mice were successfully established. After surgery, the calcium signals of SCN were clearly monitored with two-photon microscopy. The fluorescence signals of calcium did not quench for a long time along with the detecting time and laser intensity, and the intracellular calcium imagings *in vivo* were stably displayed. The activity routine of spontaneous calcium responses was different in recording neurons. **Conclusion** After the surgery of exposing skull base in mouse, the real-time detection of calcium signals of neurons in SCN are successfully realized with two-photon microscopy.

Key words two-photon; fluorescence imaging; *in vivo*; calcium imaging; suprachiasmatic nucleus