

液压打击损伤后海马 CA1 区神经元兴奋性变化的研究

张爱华¹, 顾建文^{1,2}, 郑崇勋¹

(1. 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049)

(2. 成都军区总医院神经外科, 成都 610083)

摘要: 为考察脑损伤对海马 CA1 区锥体神经元电活动的影响并研究大黄素对神经元的超兴奋性和突触传递的作用, 应用液压打击大鼠脑损伤模型和细胞外记录方法提取诱发的海马 CA1 区兴奋性突触后电位 (fEPSP) 和群峰电位 (PS), 进行相关的数据处理和分析。发现损伤侧比非损伤侧的 fEPSP 斜率明显升高, PS 波峰个数显著增加, 而 PS 潜伏期明显减小; 在灌流液中施加大黄素, CA1 区诱发场电位明显减弱。研究表明: 颅脑损伤可造成海马 CA1 区锥体神经元的迟发性过度兴奋; 大黄素对神经元的兴奋性有抑制作用, 可能对颅脑损伤后的中枢神经系统具有保护功能。

关键词: 诱发场电位; 海马 CA1 区; 兴奋性; 液压打击损伤

中图分类号: R318

1 引言

颅脑外伤已成为发达国家青少年伤病致死的首位病因^[1]。随着现代社会日益工业化和交通的发展, 我国颅脑创伤的发生率也明显增多。脑外伤会导致海马功能失调, 直接影响脑功能并引起继发性脑损伤, 其主要后果是长期的癫痫发作和记忆紊乱^[2]。由于苔藓状神经元是哺乳类动物大脑中易受颅脑外伤损害的一类神经元, 因此有研究者提出齿状回神经回路的异常改变可能是颅脑损伤后癫痫发作的主要机理^[3]。应用颅脑损伤动物实验模型, 已有研究表明由液压打击引起的苔状门细胞的损害可导致齿状回颗粒细胞的兴奋性增强^[3,4]。然而, 关于颅脑损伤对海马 CA1 区锥体神经元活动的影响, 文献报道甚少。本文采用大鼠左顶液压打击伤模型, 应用细胞外记录技术研究颅脑损伤后海马 CA1 区神经元诱发场兴奋性突触后电位的变化, 以进一步揭示颅脑损伤后疾病产生机理。在此研究基础上, 我们选择了大黄有效成分大黄素 (emodin) 观察其对海马神经元兴奋性传递的作用。研究表明, 大黄素对神经元的兴奋性有抑制作用, 可能对颅脑损伤后的脑组织具有保护功能。

2 材料和方法

2.1 动物模型与脑片制备

选用健康的 Wistar 大鼠 (250~300 g), 在室

温 24~28℃ 下用戊巴比妥钠 (Nembutal) 全麻后置入脑立体定位仪上, 沿头皮矢状缝正中切开, 暴露颅骨, 在正中矢状线左侧 4.0 mm、人字缝后 2.0 mm 处钻一直径为 4 mm 的小孔。硬脑膜外将液压冲击接头用牙托树脂固定在小孔内, 孔周围密闭, 待树脂凝固后将其连至液压打击装置, 1/4 重力打击, 打击标准为大鼠轻度抽搐、体温升高约 1℃、不发生死亡, 损伤等级为轻型颅脑外伤。大鼠存活一周后, 在全麻状态下断头取脑, 制备 400 μm 厚水平海马脑薄片。将脑片置于通氧的 22~24℃ 人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中孵育约 1 h。然后置于浴槽栅网上, 以 233 ml/min 的流速持续灌流以 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气供氧的 ACSF。ACSF 的成分为 (mmol/L): NaCl 117, KCl 4.7, NaH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25 和葡萄糖 11。

2.2 诱发场电位记录

刺激电极置于 Schaffer 侧支进行顺向刺激, 将内充 ACSF 的玻璃微电极置于海马 CA1 锥体细胞层细胞外检测诱发场电位, 信号经 Axoclamp-2A (Axon Instruments, Inc.) 放大器放大后输入 Scope mode of PowerLab (AD Instruments, Inc.) 连续监视, 同时经模数转换后将数据存储在计算机。采

收稿日期: 2003-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30000056)

通讯作者: 郑崇勋, 电话: (029)2669055,

E-mail: cxzheng@xjtu.edu.cn

样频率为 10 kHz。实验开始时,先在非损伤侧检测刺激强度与反应的关系,将刺激强度调整到使诱发输出的场电位包含一个最大幅值的 PS (40 V, 400 μ s),然后以相同强度输出刺激信号,刺激频率为 0.1 Hz。

2.3 数据处理

诱发场电位主要由场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) 和群峰电位 (population spike, PS) 组成。应用自编程序计算 fEPSP 斜率、PS 潜伏期和 PS 波峰个数。对连续 10 次刺激记录的 fEPSP 和 PS 信号进行叠加平均以消除场电位噪音获取诱发场电位信号。fEPSP 斜率

为诱发场电位波形中第一个上升相的斜率; PS 潜伏期是指刺激开始至第一个 PS 下降相波峰点的时间。

实验数据以 $\bar{x}+s$ 表示。用 t 检验进行差异的显著性分析。

3 结 果

3.1 颅脑损伤后 CA1 区神经元的兴奋性改变

以 ACSF 灌流脑片,刺激信号作用于海马 Schaffer 侧支通路,在非损伤侧 CA1 区锥体细胞层诱发的场电位仅包含 1 个 PS 波峰,如图 1A 所

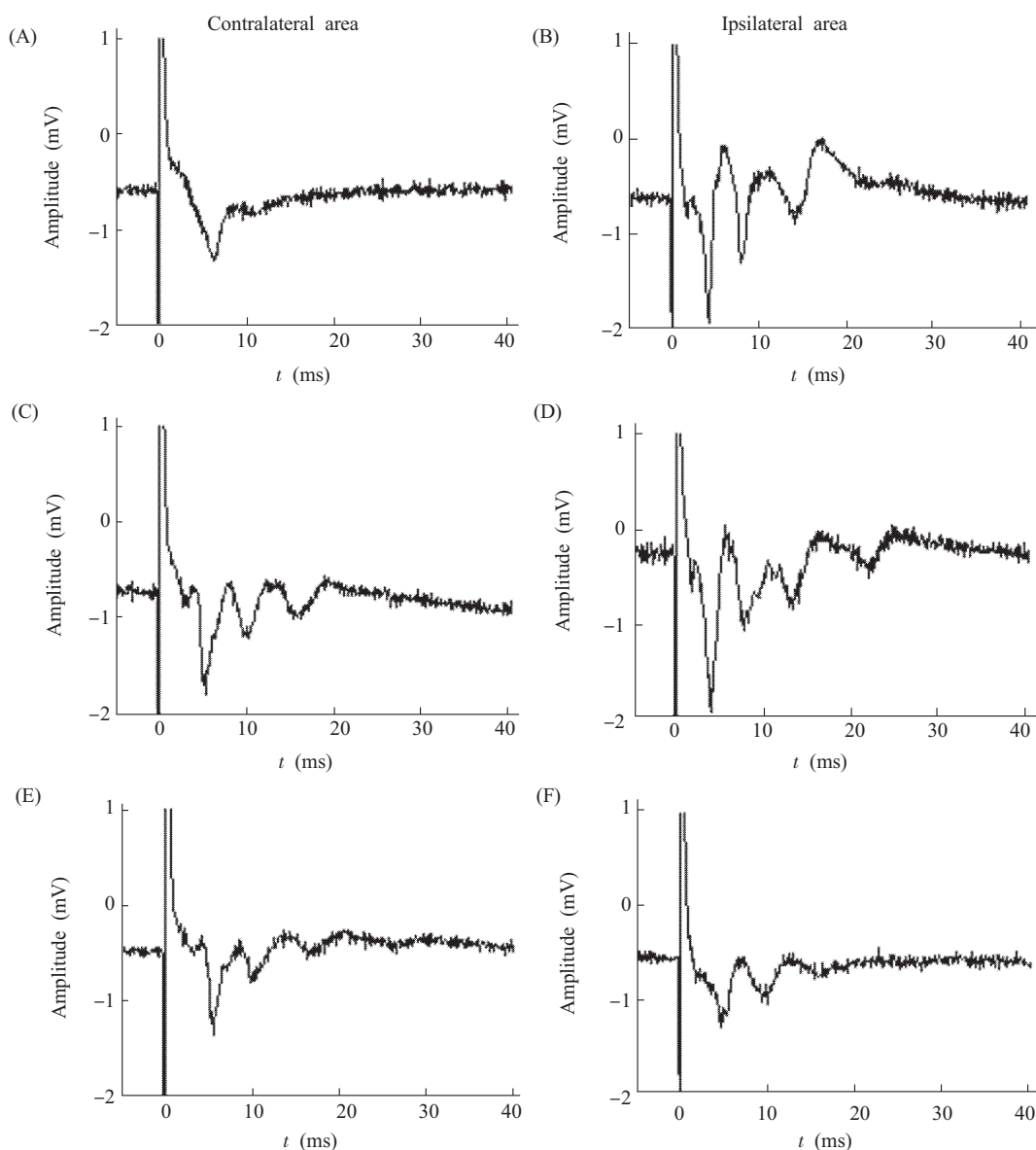


Fig.1 Sample records of the field potential obtained from the contralateral and ipsilateral hippocampal CA1 pyramidal cell layers in FPI rats. (A) and (B) Effects of FPI on the field potential; (C) and (D) Effects of bicuculline (20 μ mol/L) on the field potential; (E) and (F) Effects of emodin (74 μ mol/L) on the field potential

示; 而应用相同强度刺激信号作用于海马 Schaffer 侧支, 在损伤侧 CA1 区锥体细胞层诱发的场电位包含 2~4 个 PS 波峰, 如图 1B 所示。对 6 只大鼠海马脑片细胞外记录的诱发场电位信号进行分析计算, 结果见表 1。以非损伤侧为对照, 损伤侧的

fEPSP 斜率和 PS 波峰个数均显著增加 ($P < 0.01$), 而 PS 潜伏期明显减小 ($P < 0.05$)。表明应用液压打击顶部大脑皮层致使颅脑损伤后, 迟发性增强了损伤侧海马 CA1 区神经元的动作电位传导和兴奋性突触传递。

Table 1 Effects of FPI on the field potential recorded from contralateral and ipsilateral CA1 areas

Group	Slope of fEPSP (mV/ms)	Number of PS	Latency of PS (ms)
Contralateral	0.0933±0.0454	1.3333±0.5164	5.2857±1.9887
Ipsilateral	0.2800±0.1103	2.8333±0.7528	3.2667±1.0482

3.2 荷包牡丹碱对 CA1 区神经元 fEPSP 和 PS 的影响

海马是哺乳类动物中枢神经系统边缘组织的一部分。在中枢突触传递中, 氨基酸起着神经递质的作用, 可分为兴奋作用和抑制作用两类。抑制性 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 在中枢神经系统中含量很高。GABA 直接从神经元胞浆释放于突触间隙, 与 GABA_A 受体结合可引起神经元突触后膜超极化。荷包牡丹碱 (bicuculline) 能拮抗 GABA 对神经元的抑制作用。为研究颅脑损伤后损伤侧 CA1 区锥体神经元兴奋性增强的作用机理, 我们在 ACSF 中施加 20 $\mu\text{mol/L}$ 的荷包牡丹碱, 用以去除抑制性递质对兴奋性突触后电位

的影响, 在非损伤侧和损伤侧的诱发场电位分别如图 1C 和 D 所示。对 6 只大鼠脑片细胞外记录的场诱发电位信号进行分析计算, 结果见表 2。以脑片灌流液中未施加荷包牡丹碱为对照, 非损伤侧诱发场电位的 fEPSP 斜率和 PS 波峰个数均有显著增加 ($n=6$, $P < 0.01$), 而 PS 潜伏期明显减小 ($n=6$, $P < 0.05$)。同样以相应脑片灌流液中未施加荷包牡丹碱为对照, 损伤侧诱发场电位的 fEPSP 斜率和 PS 波峰个数也有明显增加 ($n=6$, $P < 0.05$), 而 PS 潜伏期明显减小 ($n=6$, $P < 0.05$)。结果表明, 在灌流液中加入荷包牡丹碱后, 无论损伤侧还是非损伤侧, CA1 区锥体神经元的诱发场电位均明显增强。

Table 2 Effects of bicuculline on the field potential

Group	Slope of fEPSP (mV/ms)	Number of PS	Latency of PS (ms)
Contralateral	0.2067±0.0750	2.6667±0.8165	3.7667±0.8937
Ipsilateral	0.4733±0.1704	3.6667±0.5164	2.2333±0.4082

3.3 大黄素对 CA1 区神经元兴奋性的抑制作用

大黄是我国常用的中药, 具有泻下、抗菌、抗肿瘤及止血等效用。在以往的研究中, 我们在临床发现应用中药大黄可以抑制中枢过度兴奋导致的继发性脑及多脏器损害^[5]。在上述研究基础上, 我们选择了大黄有效成分大黄素 (emodin) 观察其对海马神经元兴奋性传递的作用。应用含 74 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素和 20 $\mu\text{mol/L}$ 荷包牡丹碱的 ACSF 灌流海马脑薄片, 在非损伤侧和损伤侧的诱发场电位分别如图 1E 和 F 所示。对 6 只大鼠脑片细胞外记录的场诱发电位信号进行分析计算, 结果见表 3。以脑

片灌流液中施加荷包牡丹碱为对照 (见表 2), 施加大黄素后非损伤侧诱发场电位的 fEPSP 斜率和 PS 波峰个数均有明显减小 ($n=6$, $P < 0.05$), 而 PS 潜伏期明显增加 ($n=6$, $P < 0.05$)。同样以相应脑片灌流液中施加荷包牡丹碱为对照, 施加大黄素后损伤侧诱发场电位的 fEPSP 斜率和 PS 波峰个数显著减小 ($n=6$, $P < 0.01$), 而 PS 潜伏期明显增加 ($n=6$, $P < 0.05$)。由此可见, 在灌流液中加入大黄素后, CA1 区锥体神经元的诱发场电位明显减弱。表明在海马脑片灌流液中施用大黄素能有效抑制颅脑损伤后 CA1 区锥体神经元的过度兴奋。

Table 3 Effects of emodin on the field potential

Group	Slope of fEPSP (mV/ms)	Number of PS	Latency of PS (ms)
Contralateral	0.1183±0.0426	1.6667±0.5164	4.7833±0.5601
Ipsilateral	0.2367±0.0539	2.6667±0.5164	3.2667±1.0482

4 结论与讨论

研究表明, 颅脑损伤可造成损伤侧海马 CA1 区锥体神经元的迟发性过度兴奋。神经元异常兴奋的可能原因有中枢神经兴奋性突触传递增强和抑制性突触传递受损。Sloviter^[6]提出 GABA_A 受体神经元的活动性降低使齿状回颗粒细胞去抑制, 从而导致神经元活动性增强。Golarai 等^[7]指出, 颅脑损伤后神经元的兴奋性和抑制性同时被易化。在本文研究中, 应用 GABA_A 受体拮抗剂荷包牡丹碱灌流海马脑片, CA1 区锥体神经元的诱发场电位明显增强, 表明脑损伤后抑制性突触传递无明显减弱。兴奋性突触传递增强可能是神经元过度兴奋的主要原因。

实验结果提示, 在海马脑片灌流液中施用大黄素对颅脑损伤后 CA1 区锥体神经元的过度兴奋有明显的抑制作用, 可能对颅脑损伤后的中枢神经系统具有保护功能。谷氨酸 (glutamate, Glu) 是中枢神经系统中广泛分布的一种兴奋性氨基酸。在海马脑组织中 NMDA (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 与非 NMDA 受体重叠分布, Glu 与非 NMDA 受体结合, 使细胞膜对单价阳离子 (如 Na⁺ 和 K⁺) 的通透性迅速增加, 待细胞膜去极化到一定程度后可激活 NMDA 受体, 使电压依赖性 Ca²⁺ 通道开放, 膜电位进一步减小^[8]。基于我们前期的研究, 发现受体激活的钙离子通道在颅脑创伤的继发性反应中起了至关重要的作用^[9]。颅脑损伤后释放大量兴奋性氨基酸 Glu, 兴奋性递质的过多释放会激活过多的 NMDA 受体, 引起细胞膜去极化导致细胞膜对 Ca²⁺ 的通透性增加并诱导细胞内 Ca²⁺ 库中 Ca²⁺ 的释放, 最终引起 Ca²⁺ 大量内流和胞浆内 Ca²⁺ 超载, 导致神经元变性和损伤。有研究表明液压打击脑损伤后脑组织中 Ca²⁺ 浓度明显增加^[10]。临床研究还发现中药大黄可有效抑制严重颅脑损伤导致的脑功能紊乱^[5,9]。大黄素为蒽醌结构, 是大黄的主要成分。早期对蒽醌及其衍生物的研究表明, 它能阻断大脑皮层匀浆的脂质过氧化损伤反

应, 单独应用大黄素可降低大鼠模型的脑温^[9]。一些临床报道亦证实, 大黄素在钙离子介导的胃肠动力学方面亦有显著的调节作用, 对减轻脑创伤性消化道病变的发生和防止应激性消化道出血均有很好的作用。此外, 我们在实验中记录了海马 CA1 区神经元的自发微小兴奋性突触后电位 (miniature excitatory postsynaptic potential, mEPSP), 实验结果表明, 大黄素能有效抑制 mEPSP 的发生频率, 但 mEPSP 的幅度在灌流大黄素前后没有明显变化。有研究表明, 兴奋性递质能增高 mEPSP 的发生频率而不改变 mEPSP 的幅度, 这一现象属兴奋性突触传递的突触前易化^[11,12]。综上所述, 大黄的有效成分之一大黄素对海马 CA1 区神经元过度兴奋的抑制作用可能是由于大黄素减弱了来自突触前终末处 Glu 的释放以及对细胞膜上 Ca²⁺ 通道的阻断, 从而减少了细胞外 Ca²⁺ 内流。

所记录的诱发场电位是多个神经元诱发电位综合作用的结果, 因此 CA1 区诱发场电位的变化可准确反映海马脑组织的功能变化。应用脑片进行药效和药物作用机制的研究, 不存在血脑屏障, 药物可直接作用在脑组织, 但脑薄片毕竟是离体组织, 其指标与在体条件下的电生理特性肯定有一定差距, 这有待于在此基础上通过在体实验继续研究, 以进一步阐明颅脑创伤后继发性脑损害发病机理并为大黄类天然药物在中枢神经系统的医学应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Jingle A, Andrew B. Presynaptic hyperexcitability at cerebellar synapses in traumatic injury rat. *Neuroscience letters*, 2002, 332(3):155~158
- [2] Sanders MJ, Sick TJ, Perez-Pinzon MA, Dietrich WD, Green EJ. Chronic failure in the maintenance of long-term potentiation following fluid percussion injury in the rat. *Brain Research*, 2000,861(1):69~76
- [3] Toth Z, Hollrigel GS, Gorcs T, Soltesz I. Instantaneous perturbation of dentate interneuronal networks by a pressure wave-transient delivered to the neocortex. *Neuroscience*, 1997,

- 17(21):8106-8117
- [4] Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *Neuroscience*, 1992,12(12):4846~4853
- [5] Gu JW, Zhang X, Fei Z, Wen A, Qin S, Chen Y, Li X. Rhubarb extracts in treating complications of severe cerebral injury. *Chinese Medical Journal*, 2000,113(6):529~531
- [6] Sloviter RS. On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals. *Hippocampus*, 1994,4(3):250~253
- [7] Golarai G, Greenwood AC, Feeney DM, Connor JA. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *Neuroscience*, 2001,21(21):8523~8537
- [8] Raghavendra Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Dempsey RJ. Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Research*, 2001,911(1):96~100.
- [9] Chang CH, Lin CC, Yang JJ, Namba T, Hattori M. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leiocarpa*. *American Journal of Chinese Medicine*, 1996,24(2):139~142
- [10] Fineman I, Hovda DA, Smith M, Yoshino A, Becker DP. Concussive brain injury is associated with a prolonged accumulation of calcium. *Brain Research*, 1993,624(1~2):94~102
- [11] Thomson AM. Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci*, 2000,23(7):305~312
- [12] Thompson SM, Copogna M, Scanziani M. Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 1993,16(6):222~227

STUDY ON EXCITABILITY CHANGE OF HIPPOCAMPAL CA1 NEURONS AFTER FLUID PERCUSSION INJURY

ZHANG Ai-hua¹, GU Jian-wen^{1,2}, ZHENG Chong-xun¹

(1. Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Education Ministry, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

2. Neurosurgery Center General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: The effects of traumatic head injury on the neuronal activity in the hippocampal CA1 area and the effects of emodin on the neuronal hyperexcitability and synaptic transmission were studied. The fluid percussion brain injury rat model and extracellular recording method were used. The field excitatory postsynaptic potential and population spike evoked by stimulating Schaffer collaterals were collected from the ipsilateral (impact side) and the contralateral rat hippocampus CA1 areas *in vitro*. And the field potentials, including the field excitatory postsynaptic potential and the population spike were analyzed. Results showed that the slope of the field excitatory postsynaptic potential in the ipsilateral area was obviously greater than that in the contralateral area. And the number of the population spike was increased significantly while the latency of the population spike was decreased obviously. Furthermore, the evoked field potentials in hippocampus CA1 areas were decreased significantly by emodin even after the brain injury. Studies indicated that traumatic head injury may lead to hyperexcitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons. Emodin can depress the neuronal hyperexcitability, which suggests that emodin plays an important role in protecting the central nervous system from neuronal damage after traumatic head injury.

Key Words: Evoked field potential; Hippocampus CA1 area; Excitability; Fluid percussion injury