

多电极记录阵列:在脑片上研究癫痫的新工具☆

蔡国恩* 张溥明△ 陆钦池* 梁培基△ 叶钦勇**

【摘要】 目的 探讨多电极记录应用于癫痫研究的可行性,以及观察多电极应用于癫痫研究的优势。方法 通过多电极记录系统对由低镁高钾诱导的海马切片的癫痫模型进行记录,运用 MATLAB 进行数据分析。**结果** 成功建立了低镁高钾诱导的海马切片的癫痫模型,并运用多电极记录到了有效信号。观察到了此癫痫模型的区域特异性及时空表达特异性;初步研究了不同浓度的卡马西平(10 μM , 30 μM , 100 μM)对此模型的药理学作用,发现 10 μM 基本不起作用,30 μM 能够一定程度上抑制癫痫样放电,100 μM 基本上完全抑制了海马切片的癫痫样放电。**结论** 成功建立了多电极研究癫痫的脑片模型,观察到了多电极记录运用于癫痫研究及药物研究的优势。

【关键词】 多电极记录 脑片 癫痫 海马

【中图分类号】 R742.1

【文献标识码】 A

玻璃电极应用于脑片上研究癫痫一直被认为是金标准。然而,一种新的方法——多电极记录(multi electrode arrays recording, MEA recording)——非侵入性的神经细胞记录被 Thomas 和 Gross 等^[1-2]介绍进神经科学领域的研究。多电极记录技术应用于脑片记录已经超过 10 年时间,然而尽管其相对简单,但是这种技术没有被广泛的应用于理论和药理学研究^[3-4]。

在实验性癫痫研究中,低镁诱导离体脑片的癫痫样发作模型是一种被常用于离体研究癫痫的模型^[5-7]。在本研究中采用传统的由无镁高钾诱导的癫痫样海马切片作为研究对象,结合多电极记录这项新技术,观察多电极记录运用于癫痫研究及药物治疗的优势。

1 材料与方法

1.1 实验过程

1.1.1 基本介绍 运用 MEA (multi Channel Systems MCS GmbH, German)(图 1(a)(b))对 C57BL/

6 小鼠(鼠龄 7~8 周)的癫痫样海马切片的神经细胞进行胞外记录。

1.1.2 切片准备 实验选用 7 周的 C57BL/6 小鼠(由中科院上海生命科学院动物中心提供),雄性。实验方法在先前已经有描述^[8-10]。将小鼠快速断头,快速浸入人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF),剥离颅骨和硬脑膜,取出脑组织,快速放入冰水混合 ACSF 中,迅速剥离出一侧海马,切成厚度为 400 μm 的海马切片,然后快速移入 ACSF 中进行孵育,在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)前后孵育 1 h 以上才能进行实验。

1.1.3 实验记录 用广口吸管将一个海马切片移到 MEA 上(图 1c),调整好位置,然后用尼龙网固定切片。由蠕动泵将持续通于 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体 ACSF 以 2.5~3 mL/min 的灌流切片(室温 25 $^{\circ}\text{C}$)。当用 ACSF 灌流 10 min 以上后,换用持续通于 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体的无镁高钾 ACSF 灌流切片,以形成癫痫样的海马脑片(癫痫样放电达到 6 次/min 以上入选实验组),然后给予卡马西平灌流 30 min,给药结束以后,再次给与无镁高钾的 ACSF 灌流 40 min。神经元发出癫痫样波通过 60 道电极进行同时记录,后由商业软件(MCRack)对神经元反应进行采样,存储于计算机硬盘中,以备离线分析。采样频率为 10 kHz。

1.2 信号提取及数据分析 此过程由商业软件

doi: 10.3969/j.issn.1002-0152.2012.10.008

☆ 福建省科技厅青年人才基金(编号:3031713)

* 福建医科大学附属协和医院神经内科(福州 350001)

● 通讯作者(E-mail: unionqyye@163.com)

△ 上海交通大学生命科学院

* 上海交通大学医学院附属仁济医院

(MCRack) 进行处理。动作电位提取出来以后,运用 MATLAB 进行进一步数据处理作图。具体可以参见本实验室以前发表的相关文章^[11-13]。

2 结果

2.1 无镁高钾诱导脑片的癫痫样放电特征 由 MEA 在此癫痫模型记录观察到, 从开始给予无镁高钾灌流到开始出现癫痫样放电的时间为: 600 ± 45 s ($n = 8$)。在出现相对大的癫痫样放电事件之前一般都有出现相对较小的癫痫活动事件。场电位的幅值一般大于 $100 \mu\text{V}$ 。经过滤波后得到的癫痫样放电的幅值在 $25 \sim 60 \mu\text{V}$ 之间。

2.2 动作电位的检测与提取 从癫痫样海马切片上得到的原始信号(图 2A), 经过 MCRack 处理后的结果(图 2B)。在实验过程中, 在只有当发生如图 2A 的癫痫样放电的频率大于 6 次/min 的标本才入选, 在我们进行的 20 多次成功的实验中, 观察到了相似的结果, 虽然每次实验的海马切片和电极阵列的相对位置随机不固定的, 但是在实验和数据处理过程中观察到了相似的放电模式图 2。

2.3 神经元放电的时空变化 给予脑脊液灌流脑片很少观察到有自发放电, 给予无镁高钾脑脊液灌流以后, 会先观察到神经元明显的兴奋性表现, 出现少量的自发放电, 经过一段时间的持续灌流, 出现大量放电。CA1 和 CA3 的放电比较明显, 表明海马切片的癫痫模型具有区域特异性(图 3)。

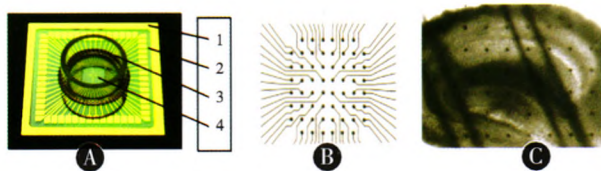


图 1 A. MEA: 1. 石英玻璃; 2. 连接板; 3. 玻璃环; 4. 电极区。 B. MEA 芯片电极阵列详细排列。 C. 海马在 MEA 上的位置

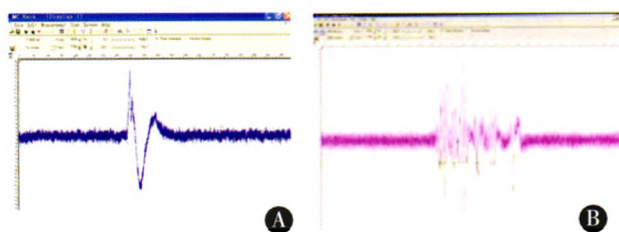


图 2 MEA 上记录到的原始信号以及经过 MCRack 处理以后的信号

2.4 卡马西平在对海马切片的癫痫活动的影响 文献报道卡马西平可以对无镁高钾诱导的癫痫活动起抑制作用。在给予卡马西平按照浓度递增顺序($10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$)的实验中观察发现, 随着浓度的增加, 癫痫样放电被抑制得更加明显, $10 \mu\text{M}$ 时海马切片的放电基本保持不变, $100 \mu\text{M}$ 时

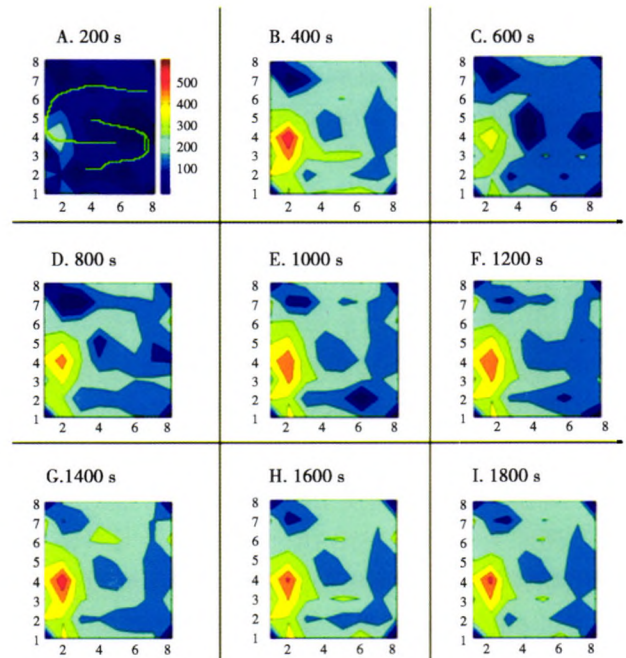


图 3 海马切片的癫痫样放电的区域特异性

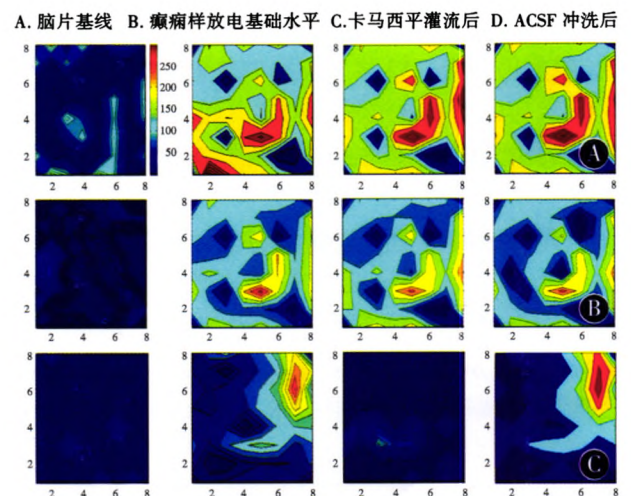


图 4 不同浓度的卡马西平对海马切片的癫痫样放电的抑制作用。A: 示卡马西平浓度为 $10 \mu\text{M}$ 时 c 能量图谱信号变化不大, 说明脑片放电受抑制较弱; B: 示卡马西平浓度为 $30 \mu\text{M}$ 时 c 能量图谱信号轻度受抑制, 说明脑片放电一定程度上受抑制; C: 示卡马西平浓度为 $100 \mu\text{M}$ 时 c 能量图谱信号基本消失, 说明脑片放电受较强抑制

海马切片的放电基本被完全被阻断(图4)。同时我们观察了苯妥英钠对此癫痫模型的作用,发现1 mM的苯妥英钠不能阻断癫痫活动。

3 讨论

长期以来,以玻璃电极为基础的电生理技术已经成为神经科学研究的标准,对于神经科学的发展有相当重要的贡献。在癫痫的电生理研究中,一直以来都是通过玻璃电极来了解癫痫活动的,包括癫痫的发生机制以及药理学研究,从而推动癫痫的研究的向前发展。然而MEA技术为癫痫的电生理研究提供一新的手段,它可以同时给与记录和刺激,为癫痫的基础和药理学研究提供新的思路和新的方向。从神经网络学说角度来看,耐药性难治性癫痫的形成多数是神经网络的重组导致的^[7]。龙莉莉的研究观察到匹罗卡品致痫大鼠海马中间神经元变化表明神经网络的重要性^[14]。而MEA对研究神经网络具有极大的相对优势。

无镁高钾的癫痫模型是一个传统的模型,其通过不阻断突触间的NMDAR,而导致神经元兴奋,引起癫痫样放电。在多电极阵列建立起癫痫模型,然后通过60个位点同步记录,可以同时观察到整个脑片的神经元的放电反应情况。图3可以看出在海马各个分区其癫痫样放电是不一样的。随着海马癫痫样放电时间延长,海马各个区域的放电发生变化,但是仍然以CA3区为主要的放电区域。

卡马西平是通过阻断钠通道起抗癫痫作用,在以往的研究中^[8],卡马西平在此癫痫模型当中抑制了癫痫样放电的发生。有许多学者通过玻璃电极在无镁高钾的海马切片癫痫模型上得到的实验结果也是10 μM 的卡马西平基本上没有起作用,30 μM 、100 μM 卡马西平能使突触后电位的幅度与频率均减少。从本研究图4可以观察到卡马西平随着浓度增加,癫痫波逐渐被抑制,100 μM 基本被完全抑制。

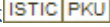
上述研究说明了我们在MEA上建立起无镁高钾诱导的海马切片癫痫模型是成功的,并初步运用经典的抗癫痫药物验证了此模型,展示了MEA研究癫痫的优势。我们相信多电极记录是可以更加推广应用于研究癫痫的新技术,但是需要进一步探索最佳的研究方法。

参 考 文 献

- [1] Thomas CA Jr, Springer PA, Loeb GE, et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells[J]. *Exp Cell Res*, 1972,74(1):61-66.
- [2] Gross GW. Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 1979,26(5):273-279.
- [3] Steidl EM, Neveu E, Bertrand D, et al. The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays[J]. *Brain research*, 2006,1096(1):70-84.
- [4] Meyer T, Boven KH, Gunther E, et al. Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology: a novel tool to study QT interval prolongation[J]. *Drug Saf*, 2004,27(11):763-772.
- [5] Tancredi V, Hwa GG, Zona C, et al. Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features [J]. *Brain research*, 1990,511(2):280-290.
- [6] Kojima H, Kowada M, Bragdon AC. Mechanism of electrographic seizure generation in the rat brain slice in low magnesium medium: modulatory effect of interictal bursting on seizure generation[J]. *Jpn J Psychiatry Neurol*, 1991,45(2):279-283.
- [7] 苏婕, 吴原, 吴月娟, 等. 体外培养癫痫细胞模型中整合素 $\alpha 2$ 表达的变化[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2011, 37(8):482-485.
- [8] Dost R, Rundfeldt C. The anticonvulsant retigabine potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca^{++} and low Mg^{++} model in the hippocampal slice preparation [J]. *Epilepsy research*, 2000,38(1):53-66.
- [9] Wan YH, Jian Z, Wang WT, et al. Short-term plasticity at primary afferent synapse in rat spinal dorsal horn and its biological function[J]. *Neuro-Signals*, 2006,15(2):74-90.
- [10] Li ST, Matsushita M, Moriwaki A, et al. HIV-1 Tat inhibits long-term potentiation and attenuates spatial learning [corrected] [J]. *Annals of neurology*, 2004,55(3):362-371.
- [11] 陈爱华, 周艺, 龚海庆, 等. 小鸡视网膜神经节细胞的反应特性: 多电极记录研究[J]. *中国科学(C辑)*, 2003,33(1):82-88.
- [12] Zhou Y, Liu X, Liang PJ. The dual-peak light response of ganglion cells in chicken retina [J]. *Brain research*, 2007,1138:104-110.
- [13] Zhang PM, Wu JY, Zhou Y, et al. Spike sorting based on automatic template reconstruction with a partial solution to the overlapping problem [J]. *Journal of neuroscience methods*, 2004,135(1-2):55-65.
- [14] 龙莉莉, 肖波, 宋延民, 等. 匹罗卡品致痫大鼠的海马PV中间神经元数目变化及其轴突出芽[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2011,37(1):15-19.

(收稿日期:2011-09-21)

(责任编辑:李立)

作者: 蔡国恩, 张溥明, 陆钦池, 梁培基, 叶钦勇
作者单位: 蔡国恩, 叶钦勇(福建医科大学附属协和医院神经内科 福州 350001), 张溥明, 梁培基(上海交通大学生命科学院), 陆钦池(上海交通大学医学院附属仁济医院)
刊名: 中国神经精神疾病杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases
年, 卷(期): 2012, 38(10)

参考文献(14条)

1. Thomas CA Jr;Springer PA;Loeb GE A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells 1972(01)
2. Gross GW Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface 1979(05)
3. Steidl EM;Neveu E;Bertrand D The adult rat hippocampal slice revisited with multi-electrode arrays 2006(01)
4. Meyer T;Boven KH;Gunther E Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology:a novel tool to study QT interval prolongation 2004(11)
5. Tancredi V;Hwa GG;Zona C Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice:electrophysiological and pharmacological features 1990(02)
6. Kojima H;Kowada M;Bragdon AC Mechanism of electrographic seizure generation in the rat brain slice in low magnesium medium:modulatory effect of interictal bursting on seizure generation 1991(02)
7. 苏婕;吴原;吴月娟 体外培养癫痫细胞模型中整合素 $\alpha 2$ 表达的变化 2011(08)
8. Dost R;Rundfeldt C The anticonvulsant retigabine potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca^{++} and low Mg^{++} model in the hippocampal slice preparation 2000(01)
9. Wan YH;Jian Z;Wang WT Short-term plasticity at primary afferent synapse in rat spinal dorsal horn and its biological function 2006(02)
10. Li ST;Matsushita M;Moriwaki A HIV-1 Tat inhibits long-term potentiation and attenuates spatial learning[corrected] 2004(03)
11. 陈爱华;周艺;龚海庆 小鸡视网膜神经节细胞的反应特性:多电极记录研究 2003(01)
12. Zhou Y;Liu X;Liang PJ The dual-peak light response of ganglion cells in chicken retina 2007
13. Zhang PM;Wu JY;Zhou Y Spike sorting based on automatic template reconstruction with a partial solution to the overlapping problem 2004(1-2)
14. 龙莉莉;肖波;宋延民 匹罗卡品致痫大鼠的海马PV中间神经元数目变化及其轴突出芽 2011(01)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgsjjsjbzz201210009.aspx