

酸中毒对小鼠大脑皮层 GABA 能神经元 电生理特性的影响^{*}

黄丽¹, 王春², 李言¹, 赵士弟^{1△}

1. 蚌埠医学院 病理生理学教研室 (蚌埠 233030); 2. 蚌埠医学院第二附属医院 内分泌科 (蚌埠 233040)

【摘要】 目的 探讨胞外酸中毒对小鼠大脑皮层 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元动作电位发放和突触传递功能的影响。**方法** 选择出生后 27~30 d 的小鼠 20 只,做大脑冠状切片,随后分为正常对照组和细胞外酸中毒组;大脑冠状切片灌流 pH 值为 7.4 的人工脑脊液,采用膜片钳全细胞电流钳模式记录动作电位阈电位、绝对不应期和动作电位峰间距,电压钳模式记录自发性兴奋性突触后电流,为正常对照组;随后将灌流人工脑脊液的 pH 值调为 6.5,模拟胞外酸中毒,为细胞外酸中毒组。再次记录神经元动作电位和自发性兴奋性突触后电流,比较两组间以上各项指标的差异。**结果** 与正常对照组对比,胞外酸中毒使 GABA 能神经元动作电位峰间距和绝对不应期延长($P<0.01$),阈电位升高($P<0.01$),自发性兴奋性突触后电流幅度和频率增加($P<0.01$)。**结论** 胞外酸中毒损伤大脑皮层 GABA 能神经元动作电位的发放和突触传递,这可能是酸中毒诱导脑功能损伤的机制之一。

【关键词】 酸中毒 GABA 能神经元 动作电位 突触传递 膜片钳全细胞记录

Influence of Acidosis on Electrophysiological Characteristics of Cortical GABAergic Neurons in Mice HUANG Li¹, WANG Chun², LI Yan¹, ZHAO Shi-di^{1△}. 1. Department of Pathophysiology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 2. Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233040, China

△ Corresponding author, E-mail: zhdsdi@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the influences of extracellular acidosis on spike encoding and synaptic transmission of cortical GABAergic neurons in mice. **Methods** Twenty mice aged 27-30 d mice were selected to prepare coronal cortical slices and then divided into control group and extracellular acidosis group. In control group, the coronal slices were perfused with artificial cerebrospinal fluid at pH7.4, the action potential threshold potential, absolute refractory period and action potential peak spacing were recorded with the patch-clamp all-cell current clamp mode; the spontaneous excitatory postsynaptic current was recorded with the voltage clamp mode. In extracellular acidosis group, the artificial cerebrospinal fluid was adjusted at pH6.5, mimicking extracellular acidosis. Recorded neurons action potential and spontaneous excitatory postsynaptic currents again, comparing the difference of the above indexes between the two groups. **Results** Compared with the control group, the extracellular acidosis significantly prolonged the inter-spike intervals and absolute refractory periods ($P<0.01$), increased the voltage of threshold potentials and the amplitude and frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents ($P<0.01$). **Conclusion** Extracellular acidosis leads to the dysfunction of cortical GABAergic neurons by breaking the inter-characteristics and synaptic transmission, contributing one of the possible mechanisms to acidosis-induced brain damage.

【Key words】 Acidosis GABAergic neurons Action potential Synaptic transmission Patch clamp whole cell recording

脑是机体最重要的器官之一,大脑神经元通过突触信号的整合和编码来维持机体良好的认知和行为^[1],这些编码过程受多种神经系统疾病影响,如癫

痫^[2]、脑缺血^[3-4]等。同时,脑部疾病也会引发细胞代谢损伤,如脑缺血时酸性代谢产物增多引起的细胞酸中毒会使脑细胞功能紊乱,导致焦虑、癫痫等症状^[5]。大脑各种生化反应和细胞代谢依赖于稳定的酸碱平衡环境,同时,各种膜受体和离子通道的激活也受 pH 影响,研究表明^[6-7],大脑严重缺血可致缺血区周围 pH 值明显降低,出现酸中毒。酸中毒是一种常见的临床现象,患者常会有严重代谢紊乱、肾

^{*} 国家自然科学基金(No. 81673791),安徽省科技厅自然科学基金(No. 1308085QH147、No. 1408085MH185)和安徽省蚌埠医学院自然科学基金重点项目(No. BYKY1622ZD、No. BYKY1635ZD)资助

△ 通信作者, E-mail: zhdsdi@126.com

脏和肺损伤,并可表现出一定程度的认知障碍,例如焦虑、惊厥和昏迷等^[8],这可能是酸中毒诱导神经元功能损伤的结果。因此,阐明酸中毒时神经功能损伤的机制对保护其功能至关重要,然而既往对酸中毒时神经元功能损伤的文献报道主要侧重于代谢障碍方面,包括细胞内酶活性的改变、质子的聚集、酸敏感性离子通道的研究等^[9-11],但对特定类型的神经元及其动作电位发放和突触传递活动的损伤机制知之甚少,需要进行系统的研究。本实验选择大脑皮层 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元,通过改变人工脑脊液 pH 值,模拟胞外酸中毒,进行大脑皮层 GABA 能神经元全细胞记录,观察其动作电位发放和突触传递功能的变化,探讨胞外酸中毒时中枢抑制性神经元功能的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 27~30 d FVB-Tg(GAD-GFP)4570 Swn/J 转基因小鼠(Jackson Lab, Bar Harbor, ME 04609, USA)20 只,雄性。该小鼠 GAD 基因下游插入了绿色荧光蛋白基因(GFP),实验中使用荧光显微镜 488 nm 蓝光激发,可使其大脑皮层 GABA 能神经元发出绿色荧光,为 GABA 能神经元的准确选择提供了保障。

1.2 溶液配置

参考文献^[9-15],人工脑脊液(ACSF) I 组成:124 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Hepes, 10 mmol/L dextrose, 26 mmol/L NaHCO₃, 4 mmol/L MgSO₄, 3 mmol/L KCl, 1.3 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mmol/L CaCl₂, pH (7.4±0.05)。ACSF II 组成:124 mmol/L NaCl, 26 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L dextrose, 5 mmol/L Hepes, 3 mmol/L KCl, 2.4 mmol/L CaCl₂, 1.3 mmol/L NaH₂PO₄, 1.3 mmol/L MgSO₄, pH 7.4, ACSF I 和 ACSF II 使用 1 mol/L NaOH 调节 pH。标准电极液组成:150 mmol/L K-gluconate, 5 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Hepes, 5 mmol/L 磷酸肌酸, 4 mmol/L Mg-ATP, 0.5 mmol/L Tris-GTP, 0.4 mmol/L EGTA, pH 7.4, 使用 2 mol/L KOH 调节 pH。

1.3 试剂与设备

所有试剂均购自 Sigma 公司。Nikon E600FN IR-DIC 光学显微镜(日本 Nikon 公司),Axoclamp-200B 膜片钳放大器(美国 Axon 公司),P-97 微电极管控制仪(美国 SUUTTER 公司),振荡切片机(美

国 VIBRATOME 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 大脑脑片制备^[9-15] 选取 20 只出生后 27~30 d 小鼠的大脑,放入充分氧合冰水混合的 ACSF I 中,将大脑沿冠状面切成 400 μ m 脑片,放入充分氧合的 ACSF II 中 25 $^{\circ}$ C 孵育 1~2 h。

1.4.2 大脑皮层 GABA 能神经元的选择 将孵育好的脑片转移至记录槽内,以充分氧合 31 $^{\circ}$ C ACSF II 灌流,速度为 2 mL/min,用于全细胞记录^[9-15]。显微镜下选择大脑皮层 GABA 能神经元,其在荧光显微镜蓝光激发下可发出绿色荧光。

1.4.3 实验分组和体外酸中毒模型制备 将脑片分为两组:正常对照组和细胞外酸中毒组。①正常对照组:脑片 ACSF II 灌流速度为 2 mL/min, pH 为 7.4,测量 GABA 能神经元动作电位内在特性和接收外来神经元突触兴奋性突触信号产生的自发性兴奋性突触后电流(sEPSC)^[9,16-21]。②细胞外酸中毒组:细胞外酸中毒模型通过改变脑片灌流的 ACSF II 的 pH 值来实现(将 ACSF II 的 pH 值由 7.4 调到 6.5)。GABA 能神经元首先使用正常 ACSF II 灌流,记录动作电位内在特性和 sEPSC,15 min 后,灌流酸性 ACSF II 再次记录动作电位内在特性和 sEPSC^[9,19]。

1.4.4 全细胞记录和指标测定^[9-25,19-22] 利用 Axoclamp-200B 放大器电流钳模式记录皮层 GABA 能神经元动作电位,电压钳模式记录兴奋性突触反应,采集的电信号输入 pClamp 10.0(Axon Instrument Inc., Foster CA, USA)分析处理软件。电流钳模式按照实验要求设置去极化电流脉冲的强度和持续时间,诱发动作电位,膜片钳放大器的高频滤波(bandwidth)为 3 kHz。电压钳模式中将神经元膜电位钳制在一定水平记录 sEPSC。

神经元动作电位内在特性包括动作电位峰间距(ISI)、绝对不应期(ARP)和激发动作电位的能障——阈电位与静息膜电位的差值(ΔV);突触反应指标包括 sEPSC 的间距和幅度。ISI 表示动作电位的发放能力,是在阈刺激下序列动作电位中相邻两个动作电位峰顶点之间的距离;ARP 是向记录神经元输入两个连续去极化电流脉冲诱发动作电位,调整脉冲的间距,使后一个动作电位的发放概率为 50%时两个动作电位之间的时程; ΔV 表示神经元受到去极化电流刺激跨越能级障碍发放动作电位的难易程度,是阈电位与静息膜电位间的差值,阈电位指动作电位上升的起点;sEPSC 幅度和频率反映神

经元接收外来兴奋性突触信号并产生兴奋性突触后电流的能力。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酸中毒对大脑皮层 GABA 能神经元 ISI 的影响

见图 1。测量 GABA 能神经元相同编号动作电位 ISI 值, 细胞外酸中毒组较正常对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。可见酸中毒使 GABA 能神经元动作电位发放能力降低, 兴奋性降低。

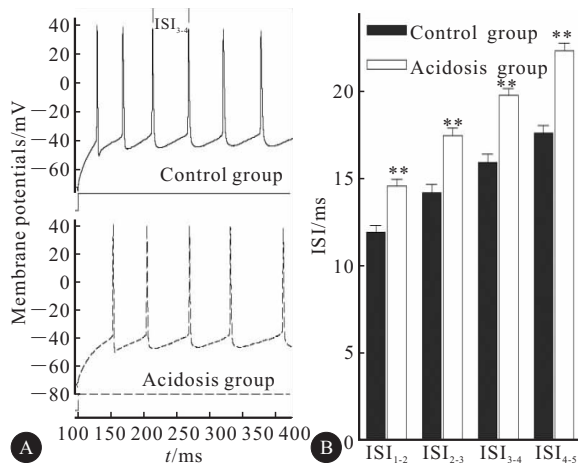


图 1 酸中毒对 GABA 能神经元动作电位 ISI 的影响

Fig 1 The influences of inter-spike interval (ISI) of sequential spikes at GABAergic neurons under the conditions of control and acidosis

A: Waveforms illustrate sequential spikes induced by identical protocol in a GABAergic neuron under the conditions of control (solid line) and acidosis (short dash line); B: The ISI of sequential spikes under the conditions of control and acidosis at cortical GABAergic neurons. ** $P < 0.01$, vs. control group

2.2 酸中毒对大脑皮层 GABA 能神经元 ARP 的影响

见图 2。测量 GABA 能神经元相同编号动作电位 ARP 值, 细胞外酸中毒组较正常对照组延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 酸中毒对大脑皮层 GABA 能神经元阈电位 (ΔV) 的影响

见图 3。测量 GABA 能神经元相同编号动作电位 ΔV 值, 细胞外酸中毒组较正常对照组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 酸中毒对自发性兴奋性突触反应 (sEPSC) 的影响

见图 4。测量 GABA 能神经元 sEPSC 的幅度和频率, 细胞外酸中毒组较正常对照组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

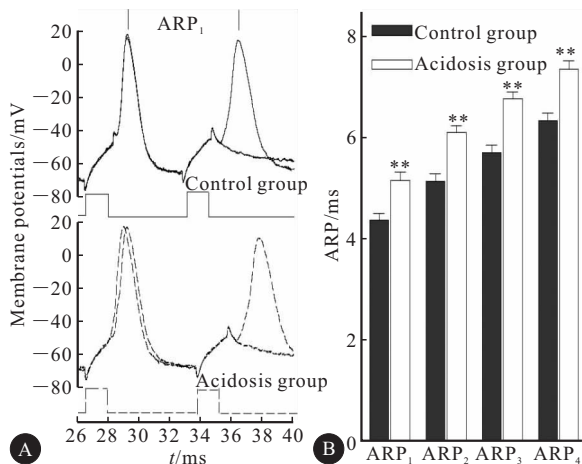


图 2 酸中毒时 GABA 能神经元动作电位 ARP 变化

Fig 2 The influences of absolute refractory period (ARP) of sequential spikes at GABAergic neurons under the conditions of control and acidosis

A: Superimposed waveforms show ARP measurements by changing inter-pulse intervals of depolarization currents (3 ms) under the control (solid line) and acidosis (short dash line) at cortical GABAergic neurons; B: The comparisons of spike ARP under the control and acidosis at cortical GABAergic neurons. ** $P < 0.01$

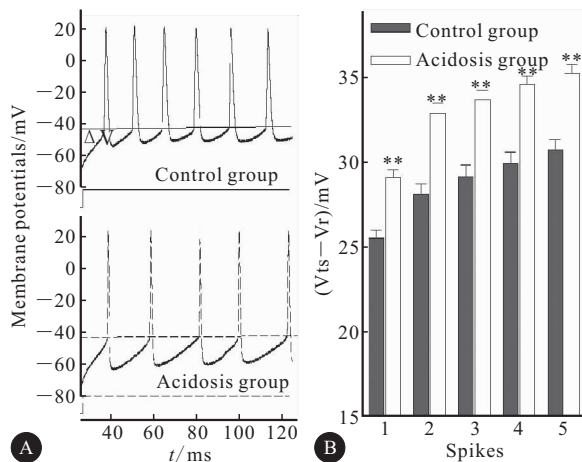


图 3 酸中毒时 GABA 能神经元动作电位 ΔV 变化

Fig 3 The influences of ΔV of sequential spikes at GABAergic neurons under the conditions of control and acidosis

A: Waveforms show ΔV under the control (solid line) and acidosis (short dash line) at cortical GABAergic neurons; B: The comparisons of ΔV under the control and acidosis at cortical GABAergic neurons; V_{ts}: Threshold potentials; V_r: Resting potentials. ** $P < 0.01$, vs. control group

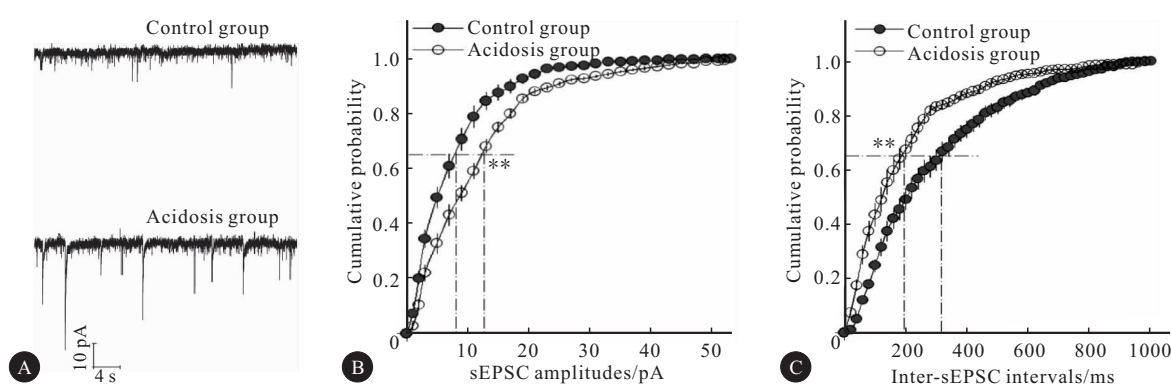


图 4 酸中毒时 GABA 能神经元 sEPSC 变化

Fig 4 The influences of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) at GABAergic neurons under the conditions of control and acidosis
A: sEPSC under the control (top trace) and acidosis (bottom trace) at cortical GABAergic neurons; B: Accumulative probability is plotted with sEPSC amplitudes under the control and acidosis at cortical GABAergic neurons; C: Accumulative probability is plotted with sEPSC intervals under the control and acidosis at cortical GABAergic neurons. * * $P < 0.01$, vs. control group

3 讨论

正常脑组织通过葡萄糖有氧化供能,由于脑组织对缺血缺氧极其敏感,故急性缺血性脑卒中等疾病后由于脑血液循环障碍引起脑组织急性缺氧,无氧酵解加强,其无氧酵解产物乳酸和 ATP 水解产物质子蓄积,导致缺血周围 pH 值明显降低,严重脑缺血组织周围的 pH 值可降至 6.5 以下^[6-7],引起中枢酸中毒状态。酸中毒是由酸性代谢产物增多而导致的机体内环境和功能紊乱,是临床常见的酸碱平衡紊乱之一,容易导致人体生理功能和内环境紊乱,甚至引发一系列疾病,患者常表现为严重的代谢紊乱、多系统功能损伤,以及一定程度的认知障碍等^[8],这可能是酸中毒诱导中枢神经元功能损伤的结果。GABA 能神经元是中枢神经系统主要的抑制性神经元之一,广泛存在于大脑皮层、小脑皮质、下丘脑、纹状体和黑质等广泛区域,这些脑区的功能与运动平衡、情感和认知等功能密切相关^[23],同时,GABA 能神经元更容易受到各种损伤因素的影响^[9,24]。本实验通过改变人工脑脊液 pH 值模拟细胞外酸中毒环境,探讨细胞外酸中毒对大脑皮层 GABA 能神经元动作电位发放和突触传递功能的影响。

实验中我们发现酸中毒使大脑皮层 GABA 能神经元动作电位发放能力降低。动作电位发放能力用 ISI 表示。ISI 表示长时程去极化电流刺激细胞产生序列动作电位,其中相邻两动作电位峰顶点的间隔时间。相同刺激强度和时间下测量 GABA 能神经元相同编号动作电位 ISI 值,细胞外酸中毒组

高于正常对照组 ($P < 0.01$),表明在同样的刺激条件下,酸中毒使 GABA 能神经元动作电位发放个数减少,即神经元兴奋性降低。

动作电位发放的变化与细胞内在特性即动作电位的 ARP 和 ΔV 有关^[6]。ARP 和 ΔV 由电压门控性钠通道动力学控制^[9-15,19-22]。实验中我们检验酸中毒是否通过升高 GABA 能神经元动作电位 ΔV 和延长其 ARP 水平来导致其功能损伤。结果显示,皮层 GABA 能神经元相同编号动作电位的 ARP 值,细胞外酸中毒组较正常对照组延长 ($P < 0.01$);相同编号动作电位 ΔV 值,细胞外酸中毒组较正常对照组升高 ($P < 0.01$)。ARP 延长意味着单位时间内神经元动作电位发放个数减少,即发放频率降低,发放能力减弱。 ΔV 升高即静息电位与阈电位间的电位差增加,表明神经元接收电信号刺激后由静息状态到产生动作电位的能障变大,即神经元对兴奋性输入不敏感,兴奋性降低。除了动作电位,实验中我们还检测了大脑皮层 GABA 能神经元对于接受来自皮层兴奋性突触信号输入的反应能力^[14]。通过测量 sEPSC 的幅度和频率来检测 GABA 能神经元接收外来有效反应的强弱。sEPSC 反映兴奋性突触在不受外界刺激影响下的自发活动,其频率变化反映突触前兴奋性神经递质谷氨酸的释放量,幅度变化与突触后膜受体特性有关^[25]。在对 GABA 能神经元接收外来突触信号引起的 sEPSC 结果分析中,我们发现大脑皮层 GABA 能神经元接收外来兴奋性突触信号引起的 sEPSC 的幅度明显增加和反应间隔时间明显缩短,表明大脑皮层中兴奋性神经递质释放增多,且 GABA 能神

经元上谷氨酸受体功能活动增强,从而导致了兴奋性神经毒的产生。

在动作电位发放和突触传递的性能方面,酸中毒可能引起 GABA 能神经元电压门控性钠通道和谷氨酸受体通道的损伤,这表明细胞膜内外的钠离子、钾离子和钙离子的变化都受 pH 值的影响^[26]。通过分析酸中毒对皮层 GABA 能神经元引起的损伤反应,我们发现酸中毒引起大脑皮层 GABA 能神经元功能障碍,最根本的原因为脑功能自稳态失衡,从而表明这些离子通道和/或胞内信号分子可能对中枢神经元的功能有一定的影响。本实验结果为临床上治疗酸中毒诱导大脑皮层 GABA 能神经元功能的功能障碍提供了一定的理论依据。酸中毒对中枢神经网络中其他类型神经元和神经胶质细胞的影响还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] KLYACHKO VA, STEVENS CF. Excitatory and feed-forward inhibitory hippocampal synapses work synergistically as adaptive filter of neural spike trains. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): e207 [2017-03-25]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040207>.
- [2] AVOLI M, LOUVEL J, PUMAIN R, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol*, 2005, 77(3): 166-200.
- [3] SORIA FN, PÉREZ-SAMARTÍN A, MARTIN A, *et al.* Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *Clin Invest*, 2014, 124(8): 3645-3655.
- [4] WANG JH. Short-term cerebral ischemia causes the dysfunction of interneurons and more excitation of pyramidal neurons. *Brain Research Bulletin*, 2003, 60(1/2): 53-58.
- [5] WALKER MD. Fluid and electrolyte imbalances; interpretation and assessment. *J Infus Nurs*, 2016, 39(6): 382-386.
- [6] YINGJUN G, XUN Q. Acid-sensing ion channels under hypoxia. *Channels (Austin)*, 2013, 7(4): 231-237.
- [7] WANG YC, LI WZ, WU Y, *et al.* Acid-sensing ion channel 1a contributes to the effect of extracellular acidosis on NLRP1 inflammasome activation in cortical neurons. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 246.
- [8] AYERS P, WARRINGTON L. Diagnosis and treatment of simple acid-base disorders. *Nutr Clin Pract*, 2008, 23(2): 122-127.
- [9] HUANG L, CHEN N, GE M, *et al.* Ca²⁺ and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(3): 709-714.
- [10] STOROZHUK M, KONDRATSKAYA E, NIKOLAENKO L, *et al.* A modulatory role of ASICs on GABAergic synapses in rat hippocampal cell cultures. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 90-106.
- [11] YINGJUN G, XUN Q. Acid-sensing ion channels under hypoxia. *Channels (Austin)*, 2013, 7(4): 231-237.
- [12] LU W, WEN B, ZHANG F, *et al.* Voltage-independent sodium channels emerge for an expression of activity-induced spontaneous spikes in GABAergic neurons. *Mol Brain*, 2014, 5(7): 38-56.
- [13] HUANG L, ZHAO S, LU W, *et al.* Acidosis-induced dysfunction of cortical GABAergic neurons through astrocyte related excitotoxicity. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140324 [2017-04-10]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0140324>.
- [14] ZHAO S, CHEN N, YANG Z, *et al.* Ischemia deteriorates the spike encoding of rat cerebellar Purkinje cells by raising intracellular Ca²⁺. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 401-407.
- [15] GE R, QIAN H, CHEN N, *et al.* Input-dependent subcellular localization of spike initiation between soma and axon at cortical pyramidal neurons. *Mol Brain*, 2014, 7(4): 26-38.
- [16] ZHANG G, GAO Z, GUAN S, *et al.* Upregulation of excitatory neurons and downregulation of inhibitory neurons in barrel cortex are associated with loss of whisker inputs. *Mol Brain*, 2013, 6(1): 2-14.
- [17] MCKAY BE, TURNER RW. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol*, 2005, 567(3): 829-850.
- [18] NI H, HUANG L, CHEN N, *et al.* Upregulation of barrel GABAergic neurons is associated with cross-modal plasticity in olfactory deficit. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13736 [2017-04-10]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013736>.
- [19] WANG JH, WEI J, CHEN X, *et al.* The gain and fidelity of transmission patterns at cortical excitatory unitary synapses improve spike encoding. *J Cell Sci*, 2008, 121(17): 2951-2960.
- [20] YU J, QIAN H, CHEN N, *et al.* Quantal glutamate release is essential for reliable neuronal encodings in cerebral networks. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25219 [2017-04-10]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025219>.
- [21] YU J, QIAN H, WANG JH. Upregulation of transmitter release probability improves a conversion of synaptic analogue signals into neuronal digital spikes. *Mol Brain*, 2012, 5(1): 26-38.
- [22] ZHANG F, LIU B, LEI Z, *et al.* mGluR1, 5 activation improves network asynchrony and GABAergic synapse attenuation in the amygdala; implication for anxiety-like behavior in DBA/2 mice. *Mol Brain*, 2012, 5(1): 20-33.
- [23] 韩济生. 神经科学原理. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 539-551.
- [24] SHETTY AK, HATTIANGADY B, RAO MS. Vulnerability of hippocampal GABA-ergic interneurons to kainate-induced excitotoxic injury during old age. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8): 2408-2423.
- [25] LIU ZW, YANG S, ZHANG YX, *et al.* Presynaptic alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons. *生理学报*, 2003, 55(6): 731-735.
- [26] HAN JE, CHO JH, CHOI IS, *et al.* Effects of acidic pH on voltage-gated ion channels in rat trigeminal mesencephalic nucleus neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2017, 21(2): 215-223.

(2017-12-15 收稿, 2018-03-20 修回)

编辑 余琳