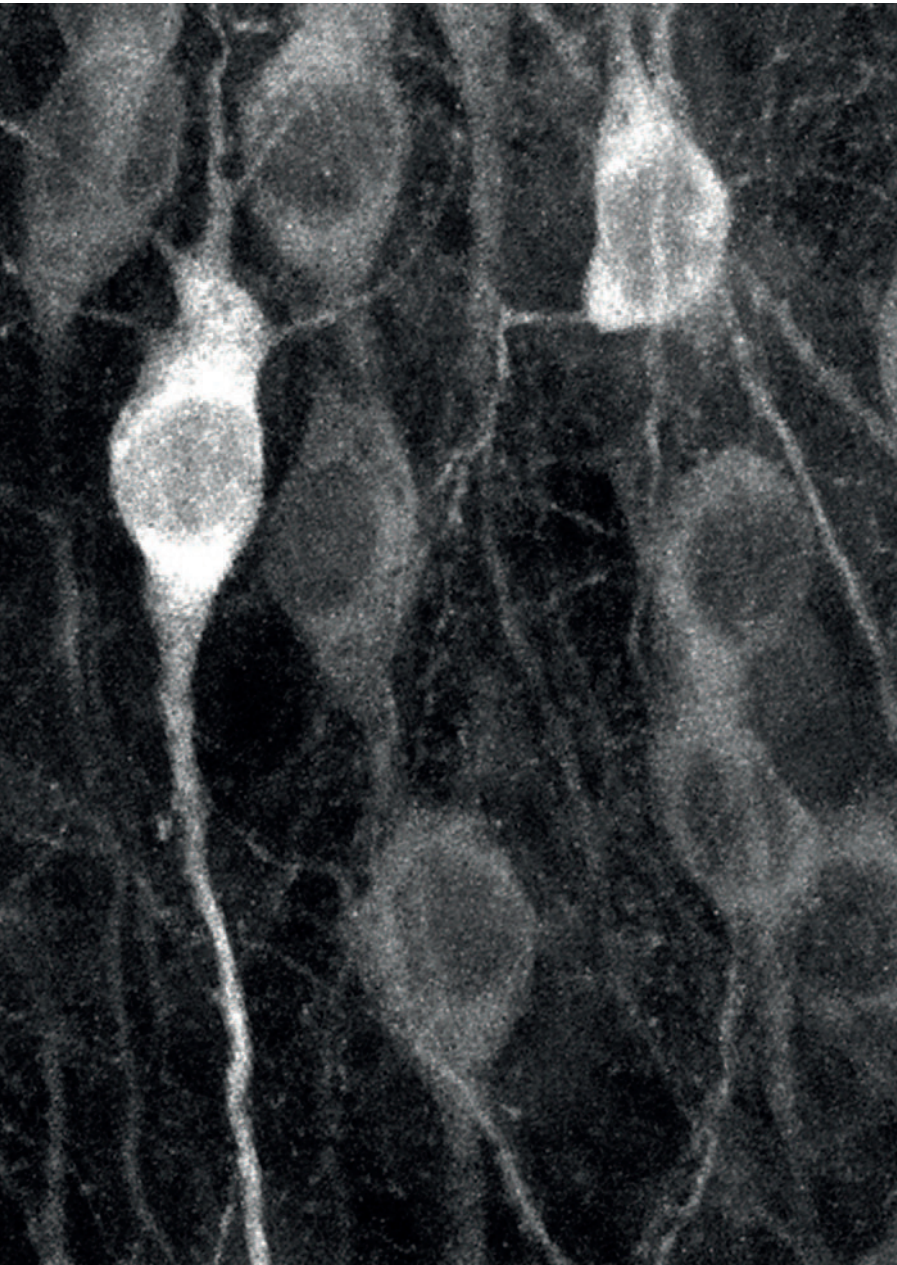


神经元和星形细胞中的钠瞬态成像

大脑中的细胞钠稳态和信号传导

通过 Na^+/K^+ -ATPase (NKA) 维持较低的细胞内钠浓度对于神经元和星形细胞的功能而言都是必不可少的。过去有研究认为，细胞内钠浓度 ($[\text{Na}^+]_i$) 升高是卒中后缺乏ATP的首要后果。大脑中钠离子水平的失调可能影响其他重要离子和神经递质，因此认识细胞钠稳态和调节是认识大脑功能的关键。

本应用说明提供了Gerkau博士（德国杜塞尔多夫海因里希·海涅大学）关于卒中梗死周围扩散性去极化 (PID) 期间星形细胞和神经元中细胞内钠增加怎样促进钠/钙交换剂 (NCX) 反转的数据。尼康稳定而可靠的FN1显微镜与NIS-Elements软件的结合，成为提供优质成像和分析活体脑组织星形细胞和神经元中细胞内钠离子的关键。



表达ATP受体ATeam1.03YEMK的
海马CA1锥体神经元

重要特点

质量高 - FN1显微镜可配备各种高质量光学系统，能以极高的清晰度和对比度可视化样品深处的微小细节

通用性好 - FN1显微镜结合NIS-Elements软件能够协同各种外设一起工作

直观 - NIS-Elements软件是一款专业易用并可全面自定义用户界面的工具

局部和全局钠瞬态成像

化学离子敏感荧光指示剂广泛用于细胞内离子浓度的评估。尽管如今存在数量庞大的Ca²⁺指示剂染料，包括基因编码探针，但得到认可的钠指示剂却屈指可数。可以通过标准荧光、共聚焦或多光子显微术实现用化学指示剂染料动态测量星形细胞和神经元中钠离子浓度的变化。这些方法都有其特有的优缺点，选择偏好主要取决于研究方法和样本制备（如使用的是培养细胞还是完整的组织）。

多光子成像仅从焦平面诱导荧光发射，这减少了焦外构造的漂白，使得研究者可以在亚细胞结构（如树突和树突棘）中，甚至光散射组织中的进行钠成像。不过，星形细胞具有广阔的三维结构，从一个焦平面成像使得分析局限于细胞的一小部分。在此使用宽场显微技术可能是有利的，因为它不局限于焦平面，因此可以对细胞中的大物质甚至完整细胞进行快速成像。宽场成像的另一个优势是其很适合大量细胞同时成像，所以也适合检测细胞网络中的活动。在这种情况下，图像是按单帧获得的，不需要扫描，使得该方法特别有利于同时可视化被观察对象的动态过程。重要的是，成像频率也较高，因此可以测量速度极快的细胞信号。

用于钠瞬态成像的宽场显微技术

间苯二甲酸苯并咪唑钠结合剂（SBFI）是一种比率式、可紫外激发的钠指示剂。比率成像可以检测到钠浓度的变化，基本上不受染料浓度变化的影响，如细胞移动、漂白或染料的细胞损失所引起的变化。此外，原位校准使得SBFI荧光比的变化可以换算成细胞内钠浓度（[Na⁺]_i）的变化。研究星形细胞时，可以额外使用产生特定标记和标识的活体染料磺酰罗丹明101（SR101）。

尼康的FN1荧光显微镜就是针对此类成像和研究而专门设计的，能够以理想的清晰度和对比度展现体外标本中的细胞细节。配合适当的相机和光源，该系统能够实现高成像频率下的快速比率成像。尽管细胞的三维结构被简化成二维，但该荧光系统仍然可以对完整细胞进行成像。

尼康NIS-Elements的软件界面简单易用，配合针对离子瞬态细胞成像而配置的FN1显微镜，二者集图像采集、可视化和数据分析功能于一身，是图像数据整合的强大工具（图1）。

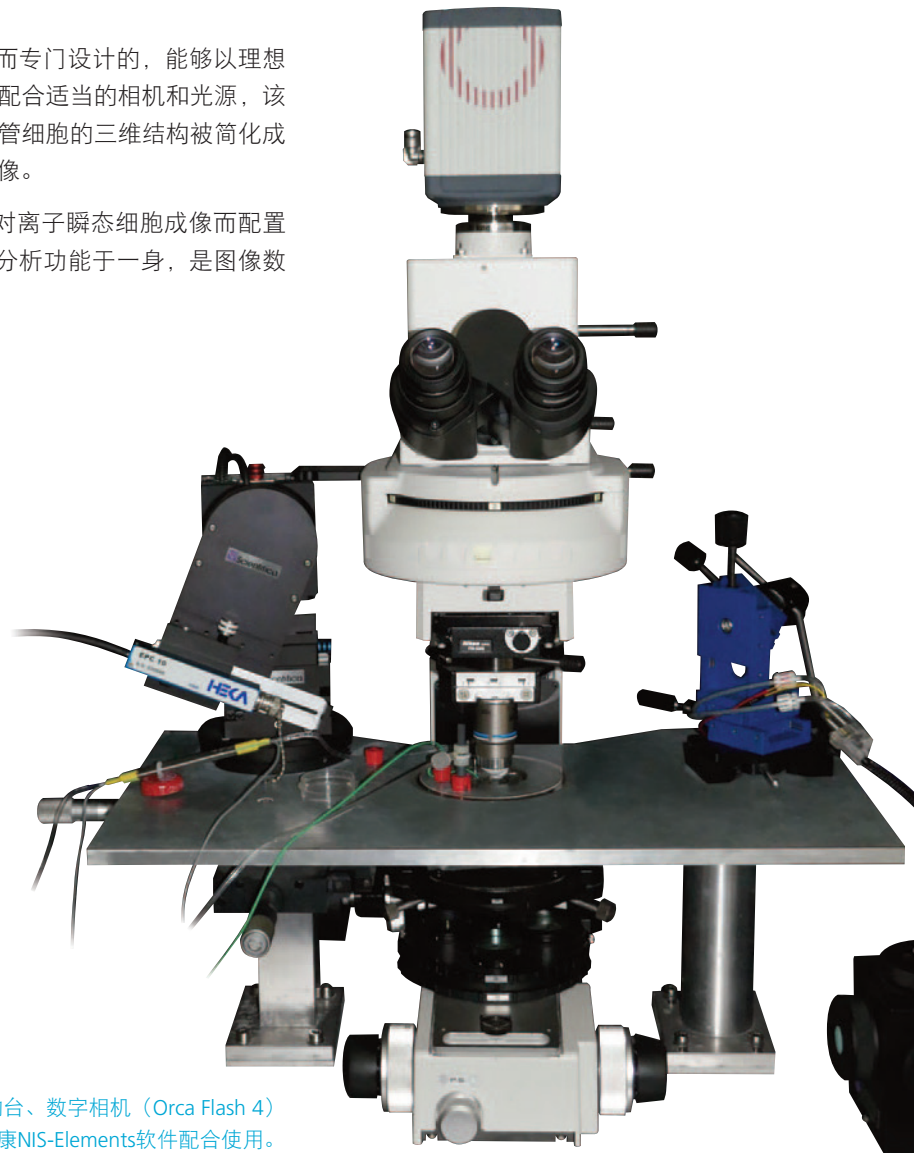


图1. 尼康FN1显微镜，配备了固定载物台、数字相机（Orca Flash 4）和灌注/显微注射器，与尼康NIS-Elements软件配合使用。

案例研究

卒中后星形细胞和神经元中 Na^+ 增加的后果

在缺血性卒中的核心区域中，血流中断导致离子梯度受到破坏，可能很快引起细胞死亡。外周组织可以从局部缺血的影响中恢复，但涉及其他代谢应激的梗死周围扩散性去极化（PID）可能会妨碍这种恢复。尽管曾有人指出这些变化中的一部分是由 $[\text{Na}^+]_i$ 同时增大引起的，但缺乏与PID有关的 $[\text{Na}^+]_i$ 增大方面的信息。

用尼康FN1显微镜和NIS-Elements软件实现 Na^+ 瞬态的宽场荧光成像

德国杜塞尔多夫海因里希·海涅大学神经生物学研究所的Gerkau博士在啮齿动物卒中模型（体内和原位）中曾使用多光子和荧光成像研究小鼠大脑皮层神经元和星形细胞中 Na^+ 和 Ca^{2+} 水平的变化（Gerkau, NJ等人，2018年）。

在急性隔离组织切片中，注射荧光钠指示剂SBFI在尼康Eclipse FN1正置显微镜上实现了 Na^+ 瞬态的荧光成像。为方便识别，用荧光染料SR101标记了星形细胞。

用FN1显微镜分析得到的荧光图像（图1）。用尼康NIS-Elements成像软件控制采集并分析结果。该软件的若干重要功能为这项研究带来了明显优势，包括：

- 方便加入和控制外部光源（如单色仪或快速LED灯）和外部设备（如压力应用设备或通过NIDAQ模拟/TTL信号控制的电刺激器）
- 能够在实验过程中获取波长以及比值
- 在实验过程中，能在一个窗口中在线测量荧光强度随时间的变化，并能实时按亮度-时间关系曲线和比率一起显示该变化
- 能在一次实验中分析50个单独区域

为了模拟体内缺血性卒中后引起的状况，用含有叠氮化钠（ NaN_3 ，5 mM）和2-脱氧葡萄糖（2-DG，2 mM）（可抑制细胞糖酵解和线粒体呼吸）的盐水（即化学性局部缺血盐水）灌注组织切片。然后根据校准测量将这种操作引起的SBFI荧光变化换算为 $[\text{Na}^+]_i$ 变化。

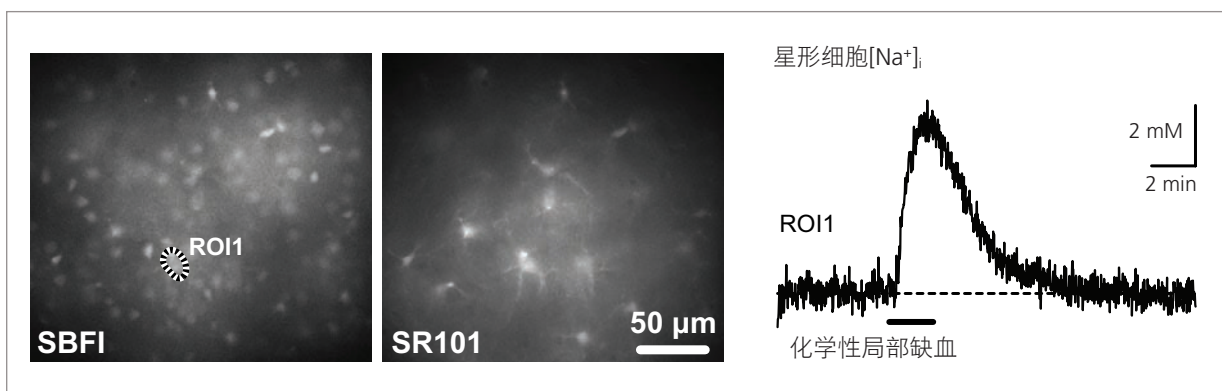


图2. 急性皮层脑切片的SBFI荧光图像（左）和SR101荧光图像（中）。右：2分钟化学局部缺血期引起的 $[\text{Na}^+]_i$ 变化，诱发方式为用5 mM NaN_3 和2 mM 2-DG在单个星形细胞中灌注。

神经元和星形细胞中的钠/钙交换剂反转可以促进缺血性卒中的恢复

短时间（2分钟）化学局部缺血后，在星形细胞（图2）和神经元中都观察到 $[Na^+]_i$ 短暂增加。更长时间的处理带来了持续时间更久的细胞 Na^+ 负荷，会导致大部分细胞无法从该负荷中恢复。因此，该组织模型中的钠成像表现出可观的神经元和星形细胞 Na^+ 负荷并伴随局部缺血条件下的PID。其他采用药理学方法的实验表明星形细胞的谷氨酸转运活性对其钠负荷有着显著影响。

出乎意料的是，测量结果还表明，阻断细胞质膜钠/钙交换剂（NCX）的活性增强了神经元和星形细胞中的 Na^+ 瞬变。另一方面，化学局部缺血引起的 Ca^{2+} 波动受到强烈抑制。这说明NCX发挥反向调控作用，除了介导这两种细胞的 Na^+ 流出，还促进 Ca^{2+} 流入。因此 Na^+ 经反向NCX导出可以促进从局部缺血性去极化中恢复。所以将NCX交换剂或降低细胞 $[Na^+]_i$ 负荷作为研究目标或许能有效减轻因卒中造成的初期细胞损伤。

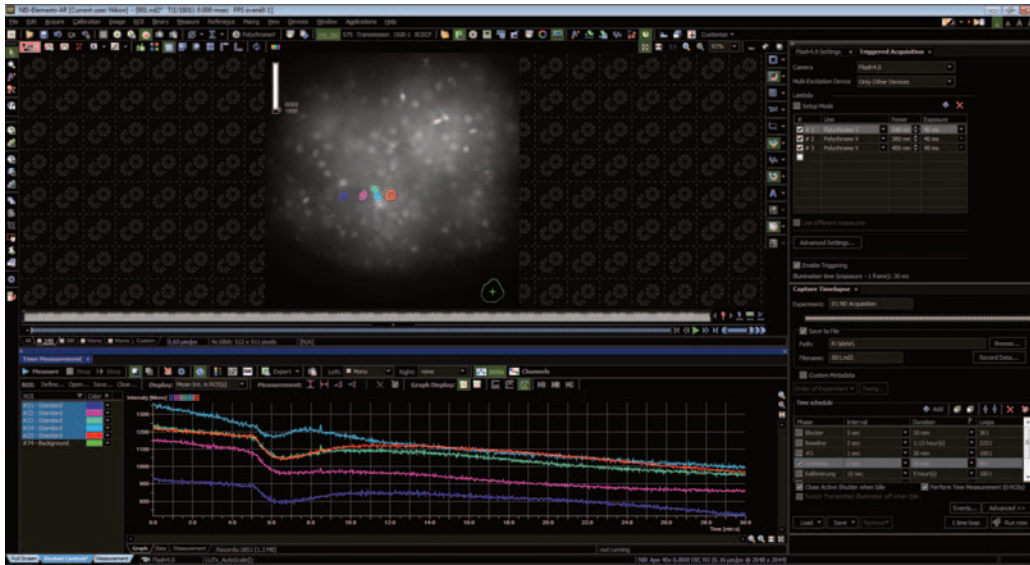


图3. NIS-Elements软件通过星形细胞和神经元上的定量比率成像实现离子瞬态的高内涵分析。

神经元和星形细胞中离子瞬态的优化成像

这项研究表明使用尼康先进的FN1显微镜可以实现活体脑组织星形细胞和神经元中细胞内离子浓度变化的优化、自定义成像和分析。该显微镜功能稳定、可靠，可以进行长时间成像。NIS-Elements软件通过星形细胞和神经元上的定量比率成像实现离子瞬态的高内涵分析（图3）。只要在该显微镜系统中增添少量周边设备，研究人员甚至能够用该软件进行宽场荧光寿命成像（FLIM）实验。

各种尼康仪器的组合使用可以提供优质、多功能的宽场荧光成像，这使得此类研究受益匪浅。



Niklas J. Gerkau博士

Niklas J. Gerkau博士在德国杜塞尔多夫海因里希·海涅大学担任博士后者。他目前正在进行的研究的重点是小鼠大脑局部缺血期间神经元和星形细胞内钠稳态的早期变化。

参考文献 Gerkau NJ, Rakers C, Durry S, Petzold GC and Rose CR. (2018) Reverse NCX attenuates cellular sodium loading in metabolically compromised cortex. *Cerebral Cortex* 28: 4264-4280

鸣谢 感谢德国杜塞尔多夫海因里希·海涅大学Karl Kafitz博士为本应用说明作出的科学和编辑贡献。
封面图片来源：杜塞尔多夫海因里希·海涅大学神经生物学研究所Rodrigo Lerchundi博士