脑死亡过程中谷氨酸与场电位的同步检测微电极阵列研究

蔚文婧¹² 宋轶琳¹ 范心怡¹² 张 松¹² 王 力¹² 徐声伟¹ 蔡新霞^{*12}

1(中国科学院电子学研究所 传感技术联合国家重点实验室 北京 100190)

²(中国科学院大学,北京 100190)

摘 要 高浓度胞外 K⁺ 会引起神经元的去极化、谷氨酸释放、甚至细胞死亡。为研究高浓度 K⁺ 对在体神经 元的影响 采用微机电系统(MEMS)方法制作了一种植入式微电极阵列(MEA),其上包含形状、位置固定的 电化学(50 × 150 μm)和电生理(直径为 15 μm)检测位点,可同时进行脑内神经递质谷氨酸、局部场电位信 号(LFP)双模检测。将这种 MEA 植入到大鼠纹状体后,给大鼠皮层施加高浓度 K⁺ 刺激,结果表明,高钾刺 激增加了纹状体内谷氨酸浓度,同时抑制了神经电生理活动。这是首次采用双模 MEA 研究神经元在体死亡 过程,结果验证了双模微电极阵列在体检测的可行性,可用于研究脑内神经电化学、电生理的时空关系。

关键词 微机电系统; 植入式微电极阵列; 脑死亡; 高钾; 谷氨酸; 局部场电位

1 引 言

K⁺是细胞内的主要阳离子,是形成静息膜电位的基础,也是动作电位复极过程的主要离子。K⁺的 轻微改变即会明显影响细胞膜电位,从而影响细胞的极化功能^[1]。脑内的高浓度 K⁺可发生神经电生 理和神经递质的紊乱^[2],发生去极化现象,提升细胞外谷氨酸浓度。谷氨酸(Glutamate,Glu)是中枢神 经系统内重要的兴奋性神经递质,但是过高的谷氨酸浓度有明显的毒性作用,可导致细胞损伤、死 亡^[3~6]。很多脑损伤疾病,如脑缺血、中风、头部外伤、癫痫,都伴随着细胞膜去极化和谷氨酸释 放^[3.7~9]。

神经元之间通过电学和化学两种模式的信号实现信息的传递^[10,11]。因此,研究高浓度 K⁺引起的 神经元死亡需要同时检测双模神经信息,从而全面了解神经元的状态。另外,高 K⁺可能会引起癫痫, 为排除这种情况,在记录神经递质过程中也有必要监测电生理信号^[57,12]。

之前的高钾导致脑死亡的在体研究都是通过并用两种手段实现双模同测:利用高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC)记录谷氨酸浓度,同时用电极记录脑电信号 (EEG)^[57,12]。但是,高效液相色谱法的时间分辨率与细胞死亡过程同是 min 级的,因此,不适合用于记录快速的神经变化过程^[13]。

微机电系统(Micro-electro-mechanical Systems,MEMS)制作的微电极阵列(Microelectrode array, MEA)为神经信息检测和记录的研究提供了一种高通量、高时空分辨率和高灵敏度的检测器件^[14,15]。 本研究制备了一种植入式 MEA,其上有电化学、电生理通道,可同时记录谷氨酸浓度变化和局部场电位 (Local field potential ,LFP)。将此 MEA 植入到麻醉大鼠纹状体内,给脑内施加高浓度 K⁺刺激后,MEA 成功记录到脑死亡过程中电化学、电生理双模信号的变化,验证了此双模电极在体检测的可行性。

2 实验部分

2.1 仪器与材料

USB-ME16-FAI-System 型 16 通道滤波放大器(MultiChannel Systems, Germany), Gamry 电化学工作 站(Gamry Reference 600, Gamry Instruments, USA), MW-D20 型实验室超纯水器(美诚公司), BSA124S 型电子天平(赛多利斯公司)。

本文系国家重大科学研究计划(Nos. 2011 CB933202 2014 CB744605)、北京市科技计划(Nos. Z141100000214002, Z141102003414014)、

²⁰¹⁵⁻⁰¹⁻¹⁵ 收稿; 2015-04-25 接受

国家自然科学基金项目(Nos. 61125105, 61101048, 61471342)、中科院重点项目(No. XDA06020101)资助课题

^{*} E-mail: xxcai@ mail. ie. ac. cn

谷氨酸氧化酶(GluOx,Yamasa Corp.,Japan) 0.9% 生理盐水(石家庄四药公司),乌拉坦(Urethane,≥98%,上海国药集团),间苯二胺(mPD,≥99%,Aldrich 公司),牛血清白蛋白(BSA,≥99%, Amresco 公司),戊二醛(GA,25%,上海化学试剂公司),谷氨酸盐(>98%,上海化学试剂公司),磷酸 盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,Na₂HPO₄-NaH₂PO₄-KCl,pH 7.4 Sigma 公司)。实验用水为高纯水。在体 用 KCl (100 mmol/L) 和谷氨酸(500 mmol/L) 溶液用生理盐水配制。

2.2 植入式微电极阵列芯片制备、修饰

实验使用硅基底、铂导电材料、氮化硅绝缘层的自制 16 通道植入式微电极阵列芯片。芯片包含微电极阵列、电极导线、外接电路触点,使用 MEMS 技术的光刻和刻蚀等工艺实现芯片的制备,具体方法 参考文献 [13]。MEA 厚 30 μm,前端可植入部分为单针形,长 7 mm,最宽处 343 μm, 16 个记录位点呈 直线排列,两个长方形电化学检测位点(60 × 125 μm)和两个圆形电生理检测位点(直径 15 μm) 交错排 布。相邻电生理位点圆心到圆心的距离为 170 μm 相邻电化学位点中心到中心的距离为 80 μm。相邻的 电生理位点和电化学位点中心距离是 150 μm。将 MEA 芯片压焊到 PCB 电路接口上,即可与记录仪器 相连。

为提高电极电生理检测性能,在电生理位点上修饰了铂纳米颗粒来降低阻抗。采用电化学沉积的 方法在铂金微电极上制备纳米铂黑。将需要电镀的微电极与电化学工作站的工作电极连接,铂丝电极 作为对电极,系统的参比电极与对电极短接。实验在恒电位条件下进行,电解液由48 mmol/L 氯铂酸和 4.2 mmol/L 醋酸铅溶液按体积比 1: 1 组成。电镀电压为–1.0 V、沉积时间为 60 s。电镀结束后,用大 量去离子水冲洗电极表面,去除残留在电极表面的各种离子。修饰铂黑后的微电极的阻抗和噪声都会 显著下降^[16],有利于神经电生理信号的检测。

对于谷氨酸检测,采用交联法 将 GluOx (1%),BSA (1%)和 GA (0.125%)混合溶液涂在电化学 检测位点上,为不影响电生理检测,本实验只修饰了 MEA 前端的第一个电化学位点。将 mPD 定向电镀 在此位点上,可有效排除电活性物质抗坏血酸、多巴胺、5-羟色胺的干扰^[17~19]。修饰好的电极需在室温 下放置至少 24 h 才可使用。

2.3 植入式微电极阵列芯片电化学性能测试

电化学实验采用计时电流法、两电极系统 MEA 中的 GluOx-mPD 电化学位点为工作电极, Agl AgCl 电极作为参考电极 施加+0.7 V 电压^[20] 在 PBS 缓冲液中依次加入不同浓度谷氨酸 观察记录工作电极对不同浓度谷氨酸溶液的响应数据。测试过程均在屏蔽箱中进行 ,且整个测试系统良好接地 将外界噪声干扰降到最低。

2.4 在体实验

实验选取雄性 SD 大鼠 1 只,体重 270 g,用乌拉坦(1.4 g/kg) 经腹腔注射麻醉。将大鼠置于脑立体定位仪上,根据大鼠脑立体定位图谱,去掉头皮,以前囟为零点,在纹状体正上方的颅骨钻孔,其立体定位坐标为 AP: +1.0 mm, ML: -2.5 mm, DV: -5.0 mm(AP:前方取正值,ML:右侧取正值,DV:硬脑膜下深度,取负值)。将硅针微电极阵列插在微推进器上,调整推进器及电极垂直方向,使硅针尖端到达零点位置。然后按照预设坐标微调推进器,使电极尖端到达目标区域上方并缓慢向下推进,直至植入目标深度。一根自制的 Ag | AgCl 丝植入到大鼠脑皮层(AP: -7.0 mm, ML: 3.0 mm, DV: -1.0 mm)作为电化学参比电极 根据大鼠脑立体图谱确定,每次植入位置保持一致。在颅骨上固定一个颅骨钉并接地。

MEA 同时连接 Gamry 电化学工作站和 MultiChannel 电生理记录仪。在记录过程中 8 个通道的电 生理信号采样率为 25 kHz 采用 200 Hz 低通滤波分离出 LFP。谷氨酸的检测采用计时电流法 ,施加电 压为 +0.7 V ,记录间隔为 0.1 s。整个实验体系在法拉第屏蔽笼中进行 将外界噪声干扰降到最低。所 有动物实验方法均符合有关规定。

脑内药物刺激方法为:在颅骨上滴加药品,溶液会通过颅骨上的孔渗入到脑内(图1)。

3 结果与讨论

3.1 MEA 的电化学性能

在 PBS 缓冲液中,+0.7 V 电位作用下, MEA 中的 GluOx-mPD 微电极对 5~25 μ mol/L 不同浓度谷氨酸的实时响应见图 2A,随着谷 氨酸浓度的增加,响应电流也随之增大。图 2B 是谷氨酸在电极表面氧化电流与浓度的线 性相关曲线,灵敏度为 54.6 pA/(μ mol/L), 线性相关系数 R 为 0.978。

为验证植入式双模 MEA 在体检测性能, 将电极植入到大鼠纹状体后,给脑内分别施加 谷氨酸(200 μ L,500 mmol/L)和生理盐水 (200 μ L)刺激。结果显示,谷氨酸刺激后, GluOx-mPD 微电极上的电流增加;生理盐水 刺激后,电流减小。通过灵敏度换算,药物谷 氨酸刺激使纹状体内谷氨酸浓度提高了 (3.06 ± 0.15) μ mol/L;生理盐水导致纹状 体内谷氨酸浓度降低了(2.68 ± 0.16) μ mol/L (*n* = 3)(图 3)。

除了通过扩散效应造成被测谷氨酸浓度 升高外,药物谷氨酸刺激也可通过使转运蛋白 介导释放来促进脑内谷氨酸的释放;另外,谷 氨酸刺激可使神经细胞产生兴奋活动进而释放





图1 在体实验示意图

Fig. 1 Schematic diagram of in vivo recording system. The microelectrode arrays (MEA) was implanted into the rat striatum 植入式微电极阵列芯片(MEA) 植入到大鼠纹状体 在颅骨上滴加的药品,可通过颅骨上所开的孔渗入到脑内。

Drugs were applied on the exposed skull and release to the brain through the holes in the skull.



图 2 (A) *i*+ 曲线 ,+0.7 V 电压下 ,MEA 中的 GluOx-mPD 微电极对 5~25 µmol/L 不同浓度谷氨酸氧化电流的实时响应; (B) 电极表面氧化电流与谷氨酸浓度的线性相关曲线 ,灵敏度为 54.6 pA/(µmol/L) Fig. 2 (A) *i*+ curves ,voltage 0.7 V ,response of *D*-glutamic oxidase-*m*-dihydroxybenzene (GluOx-mPD) microelectrode in MEA probe to glutamate with concentrations 5~25 µmol/L. (B) Linear fit of glutamate oxidation currents , sensitivity is 54.6 pA/(µmol/L) , *R* = 0.978

谷氨酸^[17,18]。生理盐水降低脑内谷氨酸是由于外加溶液稀释了脑内谷氨酸。

在体检测结果显示,电极可有效反映脑内谷氨酸水平,信号稳定、重复性好,说明电极可用于在体 检测谷氨酸变化。

3.2 高浓度 K⁺引起的纹状体内谷氨酸释放和局部场电位衰减

纹状体是基底核中最大的核团,接受来自大量皮层、丘脑、海马区的信息,当大脑受到刺激时,纹状体的响应是很明显的^[21]。因此在本研究中选择纹状体作为被测脑区。

给大鼠脑内施加高浓度 KCl 刺激后(100 mmol/L,1 mL) 纹状体内的谷氨酸快速大量地释放,在刺激 541 s 后,谷氨酸浓度升高了 13.66 μmol/L,随后逐渐下降(图4A)。在这个过程中,LFP 信号的幅度 和频率都明显减弱,且不可逆转(图4B)。LFP 是基本的神经回路活动,反映来自周边神经网络区域的



图 3 对大鼠脑内进行谷氨酸(500 mmol/L,200 μL)和生理盐水(200 μL)刺激 植入式 MEA 芯片 上的 mPD-GluOx 位点实时记录到纹状体内谷氨酸的变化。所加电压为 +0.7 V。

Fig. 3 Gutamate recording signal observed from mPD-GluOx modified electrode in rat striatum. Three times of glutamate (500 mmol/L, $200 \text{ }\mu\text{L}$) and saline ($200 \text{ }\mu\text{L}$) were applied (indicated by the arrows)

on the skull and the glutamate levels in the rat striatum were changed. Applied potential was +0.7 V.

高浓度 K⁺引起的这些在体神经递质及电生理活动变化有以下几个原因:(1)高浓度 K⁺可引起扩散性抑制去极化(Spreading depression-like depolarizations SDDs)^[7,17,23],在许多脑区内产生不可逆的被损伤的嗜酸细胞,造成神经元不可逆坏死^[8]。(2) SDDs 减弱了细胞外谷氨酸的重吸收过程,并且促进胶质细胞和突触前末梢谷氨酸的合成,因而胞外谷氨酸浓度升高^[7]。(3) 谷氨酸的过量释放又会刺激谷氨酸 NMDA 受体(N-methyl-d-aspartate,NMDA)的活动,NMDA 受体对 Ca²⁺的通透性较高,大量 Ca²⁺ 会内流到细胞内。细胞内长时间的高浓度 Ca²⁺是一种非生理刺激,会触发各种胞内过程,包括脂肪酶和一氧化氮合酶的激活、氧自由基的形成、神经递质谷氨酸、多巴胺、5-羟色胺释放等。这一系列反应会导致细胞死亡,并且死亡细胞会继续释放神经毒性的谷氨酸^[3]。

本实验利用新型双模植入式 MEA ,首次记录到了脑死亡过程中神经递质谷氨酸与局部场电位双模 信号的同步变化,实验结果与理论相符,验证了此双模电极用于神经研究的可行性。



图 4 对脑内施加高浓度 $K^+(100 \text{ mmol/L}, 1 \text{ mL})$ 刺激后 ,纹状体内谷氨酸浓度和局部场电位的变化: (A) 刺激后胞外谷氨酸增加; (B) KCl 刺激前(T_0) 和刺激后(T_1) 8 个通道的场电位信号。

Fig. 4 High-potassium (100 mmol/L, 1 mL) to brain evoked changes in striatal extracellular glutamate concentration and local field potentials (LFPs). (A) Increases of extracellular glutamate after high potassium stimulation. (B) LFPs sampled before (T_0) and after (T_1) the potassium stimulation.

4 结 论

本研究制作了一种新型植入式双模多通道微电极阵列芯片,可同步检测在体脑内谷氨酸递质和神 经电生理信号。在谷氨酸浓度为 5~25 µmol/L 范围内,灵敏度为 54.6 pA/(µmol/L),线性相关系数 为 0.978。此芯片植入到大鼠纹状体后,成功记录到高浓度 K⁺引起的脑死亡过程中谷氨酸释放和局部 场电位衰减。实验结果表明,此双模微电极阵列芯片可进行神经递质与电生理双模同步实时检测,在 神经科学研究领域具有广阔的应用前景。

References

- ZHANG Jian-You, WANG Xiao-Hai, ZHENG Man, TU Zhao-Zhen. Journal of Medical Research, 2010, 39(7): 94-96
 张建友, 汪小海, 郑曼, 涂兆珍. 医学研究杂志, 2010, 39(7): 94-96
- 2 Vaagenes P, Ginsberg M, Ebmeyer U, Ernster L, Fischer M, Gisvold S E, Gurvitch A, Hossmann K A, Nemoto E M, Radovsky A, Severinghaus J W, Safar P, Schlichtig R, Sterz F, Tonnessen T, White R J, Xiao F Zhou Y. Critical Care Medicine, 1996, 24(2): S57 S68
- 3 Mauler F, Fahrig T, Horvath E, Jork R. Brain. Res. , 2001, 888(1): 150-157
- 4 Limbrick D D , Churn S B , Sombati S , Delorenzo R J. Brain. Res. , 1995 , 690(2): 145 156
- 5 Fujikawa D G. Neuroscilett. , 1997 , 226(1): 25 28
- 6 Billman G E. Pharmacol. Therapeut. , 2008 , 120(1): 54 70
- 7 Wu A G , Fujikawa D G. Brain. Res. , 2002 , 946(1): 119-129
- 8 Fujikawa D G , Kim J S , Daniels A H , Alcaraz A F Sohn T B. Neuroscience , 1996 , 74(3): 695 706
- 9 Zhao Y M , Sun L N , Zhou H Y , Wang X L. Neuroscilett. , 2006 , 398(1-2): 22 27
- 10 Song Y, Lin N, Liu C, Jiang H, Xing G, Cai X. Biosens. Bioelectron. , 2012, 38(1): 416-420
- 11 JIANG Ting-Jun, LIU Chun-Xiu, SONG Yi-Lin, XU Sheng-Wei, WEI Wen-Jing, CAI Xin-Xia. Chinese J. Anal. Chem., 2014, 42(8): 1071 – 1076

蒋庭君,刘春秀,宋轶琳,徐声伟,蔚文婧,蔡新霞.分析化学,2014,42(8):1071-1076

- 12 Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Yokoyama H, Nakajima A, Mitsuyama Y, Ohya-Nishiguchi H, Kamada H, Willmore L J. Journal of Neurochemistry, 2001, 76(3): 892 – 900
- 13 Wei W J , Song Y L , Shi W T , Lin N S , Jiang T J , Cai X X. Biosens. Bioelectron. , 2014 , 55(1): 66-71
- 14 Johnson M D, Franklin R K, Gibson M D, Brown R B, Kipke D R. J. Neurosci. Meth. , 2008, 174(1): 62-70
- 15 Chang L , Liu C , He Y , Xiao H , Cai X. Science China Chemistry , 2011 , 54(1): 223-230
- 16 SONG Yi-Lin, LIN Nan-Guo, JIANG Hong, LIU Chun-Xiu, XING Guo-Gang, CAI Xin-Xia. Journal of Southeast University (Medical), 2011, 01(01): 29-32 宋轶琳,林楠森,姜红,刘春秀,邢国刚,蔡新霞.东南大学学报(医学版), 2011, 01(01): 29-32
- 17 Oldenziel W H, Dijkstra G, Cremers T I F H, Westerink B H C. Brain. Res. , 2006, 1118(1): 34-42
- 18 Frey O, Holtzman T, McNamara R M, Theobald D E H, van der Wal P D, de Rooij N F, Dalley J W, Koudelka-Hep M. Biosens. Bioelectron. , 2010, 26(2): 477 – 484
- 19 Rutherford E C , Pomerleau F , Huettl P , Stromberg I , Gerhardt G A. Journal of Neurochemistry , 2007 , 102(3): 712 722
- 20 Lowry J P , McAteer K , Elatrash S S , Duff A , Oneill R D. Anal. Chem. , 1994 , 66(10): 1754 1761
- 21 Mahmud M, Travalin D, Bertoldo A, Girardi S, Maschietto M, Vassanelli S. Journal of Medical and Biological Engineering, 2012, 32(6): 397-404
- 22 Tsirogiannis G L, Tagaris G A, Sakas D, Nikita K S. Biological Cybernetics, 2010, 102(2): 155-176
- 23 Burmeister J J , Pomerleau F , Palmer M , Day B K , Huettl P , Gerhardt G A. J. Neurosci. Meth. , 2002 , 119(2): 163 171

Study of Microelectrode Array Probe for Simultaneous Detection of Glutamate and Local Field Potential during Brain Death

WEI Wen-Jing¹², SONG YI-Lin¹, FAN Xin-Yi¹², ZHANG Song¹², WANG Li¹², XU Sheng-Wei¹, CAI Xin-Xia^{*12}

¹ (State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China) ² (University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract High extracellular potassium can induce spreading depression-like depolarizations, elevations of extracellular glutamate and even neuronal death in normal brain. To investigate the contribution of high potassium in vivo, a microelectrode arrays (MEAs) probe integrated with recording sites for glutamate concentration ($50 \times 150 \mu$ m) and local field potential (LFP) (diameter = 15μ m) was fabricated by Micro-electro-mechanical-systems (MEMS) technologies. We implanted the MEA probe acutely in the rat brain and exposed the brain to a high potassium solution. During these multi-modal recordings, it was observed that high potassium elevated extracellular glutamate while suppressing the LFP irreversibly. This is one of the first studies in which a dual mode MEA probes is applied in vivo for neuronal death , and it is concluded that our MEA probes are capable of examining specific spatiotemporal relationships between electrical and chemical signaling in the brain.

Keywords Implantable microelectrode array; Micro-electro-mechanical-systems; Brain death; High potassium; Glutamate; Local field potential

(Received 15 January 2015; accepted 25 April 2015)

This work was supported by the Major National Scientific Research Plan (Nos. 2011CB933202, 2014CB744605), the Beijing Science and Technology Plan (Nos. Z141100000214002, Z141102003414014), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 61125105, 61101048, 61471342) and the Key Programs of the Chinese Academy of Sciences (No. KJZD-EW-L11-2).

《有机物络合萃取化学》(第二版)

戴猷元、秦炜、张瑾、单欣昌 编著

本书分原理和应用两部分,重点介绍了络合萃取的化学原理、过程特征、萃取体系、分离工艺及模型预测、应用实例 及前景。在有机物络合萃取机理分析和研究日趋深入的基础上,本次对全书进行了系统地修订,并重点对应用实例部分 进行了必要的补充。

本书可作为高等院校化工、生物化工、环境、制药等专业师生的教学参考书,也可供上述专业从事分离过程研究开发、设计和运行的工程技术人员参考。

书 号: 9787122233899 定价: 98.0元 出版时间: 2015 年 6月 开本: 16 化学工业出版社出版