

本科毕业论文



论文题目: 超声诱导的机械敏感通道-电压门控离子通道的偶联 机制研究

- 姓 名:汤雯絮 学 号: 20307110336
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物技术
- 指导教师: 薛磊 职 称: 教授
- 单 位:复旦大学生命科学学学院
- 完成日期: 2024 年 5 月 17 日

超声诱导的机械敏感通道-电压门控 离子通道的偶联机制研究

完成人 汤雯絮

指导小组成员

薛磊 教授

摘要	Ĩ		I
Abst	tract		п
_,	前	言	
	1.1	研究す	皆景1
		1.1.1	超声神经调控技术1
		1.1.2	机械敏感通道 2
		1.1.3	突触传递与电压门控钙离子通道
	1.2	研究	为容概述 5
<u> </u>	材料	科与方法	去
	2.1	实验材	才料6
		2.1.1	细胞样品 6
		2.1.2	载体与宿主菌 6
	2.2	实验记	式剂 6
		2.2.1	实验试剂 6
		2.2.2	自配试剂 8
	2.3	实验(义器 11
	2.4	实验	方法12
		2.4.1	原代海马神经元分离与培养 12
		2.4.2	全细胞膜片钳13
		2.4.3	单通道膜片钳13
		2.4.4	钙成像 14

	2.4.5	重组质粒构建与提取 14
	2.4.6	293T 细胞培养17
	2.4.7	质粒转染 18
2.5	数据	处理
三、 研	究结果	
3.1	超声	刺激对海马神经元兴奋性的影响19
	3.1.1	超声刺激条件筛选 19
	3.1.2	超声刺激增强海马神经元的自发动作电位发放 21
	3.1.3	超声刺激增强神经元自发突触传递过程 25
3.2	超声	诱导的 Piezol 和 Cav1.3 的偶联调控 27
	3.2.1	超声刺激不会直接激活 Cav1.3 通道27
	3.2.2	超声刺激提高 Piezo1 单通道开放概率
	3.2.3	超声刺激提高 Piezo1-Cav1.3 偶联体系中的钙通道电流 30
四、讨	论	
4.1	超声	刺激可以提高神经元的兴奋性反应
4.2	超声	诱导的 Piezo1 通道和 VGCC 的偶联调控
4.3	展望	
参考文南	伏	
致谢		

摘要

超声刺激作为一种物理调控手段,在神经系统类疾病的临床治疗和神经生物 学基础研究等领域表现出极大的应用潜能。已有研究发现,超声可在整体和细胞 水平操纵神经元的功能与活动,但相关的精细动力学变化仍不明确。在中枢神经 系统中,胞外钙离子通过突触前神经末梢去极化激活的电压门控钙离子通道内流, 从而引发神经递质释放和突触传递。机械敏感通道可被超声刺激激活,却不能直 接参与突触传递,因此目前关于超声调控神经元兴奋性和突触传递的内在细胞机 制并不清楚。本课题利用整合超声刺激的电生理记录平台,以海马神经元和 HEK293T 细胞为标本,探究了超声刺激影响中枢神经兴奋性的精细动力学变化 与分子机制。

本课题研究发现,超声刺激可增强海马神经元的自发兴奋性反应和神经元的 突触传递过程,并通过增强钙离子内流调节神经元活性。通过外源表达 Cav1.3 通道和机械敏感通道 Piezo1,我们发现超声刺激无法直接激活 Cav1.3 通道,但 可显著提高 Piezo1 通道的开放概率和开放时程,并通过激活 Piezo1 通道进一步 增加 Cav1.3 的通道电流,表明机械敏感通道和电压门控钙离子通道之间可能存 在偶联机制。综上,本课题的研究成果,将为了解超声调控神经元活动提供新的 视角。

L

关键词: 神经调控, 超声刺激, 机械敏感通道, 电压门控钙离子通道

Abstract

Ultrasound stimulation, a physical modulation method, has been widely used in basic neuroscience research and treatment of neurological disorders. Previous studies have shown that ultrasound can modulate neuronal function and activity at both holistic and cellular levels. However, the specific kinetic changes in neuronal activities due to ultrasound stimulation remain unclear.

In the central nervous system, membrane depolarization at presynaptic nerve terminals activates the voltage-gated calcium channels and induces calcium influx, initiating neurotransmitter release and the subsequent synaptic transmission. However, mechanosensitive channels activated by ultrasound stimulation cannot directly mediate synaptic transmission. Therefore, the intrinsic cellular mechanisms of ultrasound stimulation on neuronal excitability and synaptic transmission are unclear.

To address these issues, we used an electrophysiological recording platform integrating an ultrasound stimulation module to investigate the kinetic forms and mechanisms of ultrasound stimulation-induced central nervous excitability in primary rat hippocampal neurons and HEK293T cells.

We found that ultrasound stimulation could enhance the spontaneous excitatory response of hippocampal neurons and synaptic transmission. It also regulated neuronal activity by increasing calcium influx. By exogenously expressing the Cav1.3 channel and the mechanosensitive channel Piezo1 in HEK293T cells, we found that ultrasound stimulation could not directly activate the Cav1.3 channel. However, it could significantly increase the open probability and duration of the Piezo1 channel and further increase the channel current of Cav1.3, suggesting a potential coupling mechanism between Piezo1 and Cav1.3 channels. In conclusion, our findings will provide new insights into the ultrasound-modulated neuronal activities.

Key words: Neuromodulation, Ultrasound stimulation, Mechanosensitive channel, Voltage-gated calcium channel

一、前 言

1.1 研究背景

1.1.1 超声神经调控技术

神经调控技术 (neuromodulation) 是一种结合医学、神经科学、生物学和物 理学等学科而快速发展的跨学科交叉技术,可用于疾病诊疗和神经功能研究。然 而以深部脑电刺激为代表的植入性神经调控技术在临床应用中往往存在风险性 高、操作复杂等问题。为实现非侵入性治疗,超声神经调控技术近年来受到了人 们的广泛关注。

超声 (ultrasound) 是指频率大于 20 kHz,高于人类可听极限的机械波^[1],早 期主要用于成像和医学检测。近年来,随着人们对超声认识的不断深入,超声已 逐渐成为一种潜在的治疗和研究工具。相比侵入性神经调控技术(例如经颅磁刺 激、经颅直流电刺激等),超声具有毫米尺度的时空分辨率和较高的组织穿透率 ^[1],可穿透完整的颅骨传递低强度超声波从而无创地调节神经活动^[2],治疗癫痫、 帕金森氏症、焦虑症等神经类疾病^[3,4]。

已有研究结果显示,低强度聚焦超声 (low-intensity focused ultrasound, LIFU) 可通过经颅刺激的方式治疗帕金森^[5]、抑郁症^[6]和癫痫^[7]等疾病,表明超声对神 经类和精神类疾病均具有潜在治疗作用。2020年,Sanguinetti 等人通过一项随机、 安慰剂对照和双盲实验研究证明了 LIFU 可用于调节人体前额叶皮层中的情绪调 节网络,从而改善患者的负面情绪^[8]。最新的研究也发现,通过调节经颅 LIFU 的刺激参数可对人体运动皮层产生兴奋性或抑制性调节作用^[9]。此外,在神经生 物学研究领域,超声神经调控还可实现对特定神经元活动与功能的精确操纵^[10]。

尽管超声神经调控技术在临床治疗和学术研究中均表现出巨大的潜能,但超 声在实际应用过程中却表现出复杂的生物学效应,包括声脉冲效应 (ping)、机械 力效应 (push)、热效应 (heat)、空化效应 (cavitate) 以及压电效应 (transduce) 等 (图 1.1)^[11]。为了阐明超声刺激的作用机制,2022年,Yoo及其研究团队使用 频率为 300 kHz 和 670 kHz 的单原件换能器以连续或脉冲刺激的模式,探究了聚 焦超声 (focused ultrasound, FUS) 在小鼠皮质神经元中的作用机制。研究结果表 明,小鼠皮质神经元在超声刺激后的兴奋性反应,是由于特定的机械敏感通道响 应机械力刺激而被激活所引发的,且这些神经元的兴奋性反应与空化、发热、形 变等因素无关^[12]。然而,目前关于超声调控神经元兴奋性和突触传递的分子细 胞机制仍不明确。



图 1.1 超声的生物学效应^[11]

A. 超声的声脉冲效应; B. 超声的机械力效应; C. 超声的热效应; D. 超声的空化 效应; E. 超声的压电效应

1.1.2 机械敏感通道

相关研究表明,超声主要通过波的机械力作用,对神经元的兴奋性产生影响^[12]。机械敏感通道 (mechanosensitive channel) 是一类能够直接响应机械力刺激 而被快速激活的通道蛋白^[13],1-10 MHz 的连续或脉冲超声对机械敏感通道(如 TRPA1、TRPP1 和 Piezo 等)具有明显的激活作用。激活的机械敏感通道随后引 发钠、钙等阳离子内流,改变细胞的膜电位,进而调控其它离子通道(如 T 型 钙离子通道)的开放(图 1.2)^[12,14]。



图 1.2 神经元响应超声刺激的分子过程[12]

在多种机械敏感通道中, Piezo 蛋白是一类广泛表达于可兴奋细胞中的机械 敏感通道,分为 Piezo1/2 两种亚型。其中, Piezo1 通道广泛表达于中枢神经系统, 参与多种神经生理过程。作为一种非选择性阳离子通道, Piezo1 的离子选择性从 大到小依次为 Ca²⁺、K⁺、Na⁺、Mg^{2+[15]},因此 Piezo1 的开放往往伴随着胞外 Ca²⁺ 的大量内流,从而调控胞内钙依赖信号通路的激活^[16, 17]。2019 年,Qiu 及其团 队首次通过超声刺激激活了 HEK293T 细胞中异源表达的 Piezo1 通道和小鼠皮层 初级神经元中的内源性 Piezo1 通道,并观察到了胞内钙离子水平的显著上升(图 1.3)^[18]。



图 1.3 超声刺激后引发 Piezo1 开放从而介导 Ca²⁺内流的示意图^[18]

尽管 Piezol 通道在神经细胞响应超声刺激的过程中发挥了重要的作用,但 Piezol 通道本身并不能直接参与突触传递等过程,因此超声对神经元突触传递的 调控作用是否涉及其他类型的离子通道,依然值得深入探索。

1.1.3 突触传递与电压门控钙离子通道

突触是中枢神经系统中神经信号传递结构和功能的基本单元。当动作电位到 达突触前神经末梢后,可引起突触前膜去极化,激活电压门控钙离子通道 (voltage gated calcium channel, VGCC),钙离子内流引发囊泡融合释放神经递质,神经递质在突触后与突触后受体结合,产生兴奋性或抑制性的信号传递(图 1.4)^[19]。由此可见,在突触传递中,电压门控钙离子通道在突触前膜囊泡融合释放神经递质的过程中扮演了重要的角色^[19]。



图 1.4 突触传递的全过程示意图^[20]

VGCC 是一种由主要亚基 α 1 和辅助亚基 α 2、 β 、 δ 、 γ 所构成的五聚体蛋白 (图 1.5 A)。其中, α 2、 β 和 δ 亚基为构成离子通道的必须亚基, γ 1 亚基只在骨 骼肌 Cav1.1 中发现,在神经系统中没有发现 γ 亚基的存在。从基因同源性上可 以将 VGCC 分为 Cav1、Cav2 和 Cav3 三大类^[21],每一类又根据其编码 α 1 亚基 的基因分为多个亚型(图 1.5 B)。此外,依据 VGCC 的电压激活特性,又可分 为低电压激活 (low-voltage activated, LVA) 的 T 型钙通道和高电压激活 (high-voltage activated, HVA) 的 L、N、P/Q 及 R 型钙通道等 (图 1.5 B, C)。虽 然已有研究表明超声可通过改变膜电位提高 T 型钙通道的开放概率^[12],但由于 HVA 钙通道激活所需的膜电位更高,因此关于 HVA 钙通道能否响应超声刺激而 被直接激活,以及相应的内在调控机制仍不明确^[22]。



图 1.5 VGCC 的分类及其电压激活特性^[21] A. VGCC 的结构; B. VGCC 不同亚型分类; C. 不同亚型 VGCC 的电压激活特性

1.2 研究内容概述

基于上述研究背景,本课题将利用整合超声刺激模块的电生理膜片钳记录平 台,探究超声诱导的机械敏感通道和电压门控钙离子通道的偶联调控及其内在神 经机制,阐明其对中枢神经突触传递的动力学调控。研究内容主要包括两个方面: (1)以原代大鼠海马神经元为标本,利用全细胞膜片钳和钙成像技术检测超声 对神经元兴奋性的影响。(2)在工具细胞 HEK293T 细胞上分别或联合表达外源 Piezo1 通道和 VGCC,探究超声诱导的偶联调控机制。本课题的研究结果,将有 助于深入了解超声刺激对神经功能的调节,为超声神经调控研究和临床应用提供 新的视角。

二、材料与方法

2.1 实验材料

- 2.1.1 细胞样品
 - 原代海马神经元培养所用实验动物是出生 1-2 天的 Sprague-Dawley (SD) 乳鼠,动物购自上海必凯科翼生物科技有限公司。
 - 2) HEK293T 细胞, 购自 ATCC 公司。

2.1.2 载体与宿主菌

1) 质粒购自 Addgene 公司,具体信息见表 2.1。

表 2.1	质粒信息

质粒名称	货号
mPiezo1-IRES-eGFP	80925
pcDNA3.1-mCherry	128744
Cav1.3e [8a,11,31b, ∆32,42a]	49333
Cav _{β3}	26574
Cavα2δ1	26575

2) 表达载体为 DH5α, 购自唯地生物, 货号 DL1001。

2.2 实验试剂

2.2.1 实验试剂

表 2.2 实验试剂

试剂名称	公司	货号	产地
DMEM 培养基	ThermoFisher	11995065	美国
Neurobasal A 培养基	ThermoFisher	10888022	美国
胎牛血清	ThermoFisher	10099141	美国
青霉素-链霉素	ThermoFisher	15140122	美国
0.25% 胰蛋白酶	ThermoFisher	25300054	美国
100× GlutaMax	ThermoFisher	35050061	美国
Poly-D-Lysine	碧云天	ST508	中国

50× B27 supplement	ThermoFisher	17504044	美国
Hank's balance salt solution (HBSS)	碧云天	C0218/C0219	中国
Fura-2 AM 染料	ThermoFisher	F1221	美国
DMSO	Sangon	A503039	中国
PBS 缓冲液	碧云天	C0221A	中国
Lipofectamine3000 转染试剂	ThermoFisher	L3000015	美国
Opti-MEM 减血清培养基	ThermoFisher	31985062	美国
Fastdigest Kit	ThermoFisher	K1991	美国
FastDigest Xba I	ThermoFisher	FD0684	美国
FastDigest Not I	ThermoFisher	FD0596	美国
FastDigest Kpn I	ThermoFisher	FD0524	美国
2× Phanta Max Master Mix	诺唯赞	P525	中国
一步法克隆试剂盒	诺唯赞	C115	中国
50× TAE	Sangon	B548101	中国
琼脂糖	Biowest	111860	西班牙
核酸染料	翊圣生物	10202ES76	中国
高纯度质粒小提试剂盒	天根	DP104	中国
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	天根	DP209	中国
质粒中提试剂盒	MACHEREY-NAGEL	740412	中国
氨苄青霉素钠	Sangon	A610028	中国
琼脂粉	Sangon	A505255	中国
胰蛋白胨	Sangon	A505250	中国
酵母提取物	Sangon	A515245	中国
NaCl	Merck	S5886	德国
KCl	Merck	V900068	德国
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	M2670	德国
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	C5080	德国
CsCl	Merck	V900481	德国
BaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	B0750	德国德国

抗坏血酸	Merck	A5960	德国
丙酮酸钠	Merck	V900232	德国
肌醇	Merck	V900492	德国
葡萄糖酸钾	Merck	P1847	德国
磷酸肌醇二钠盐	Merck	P7936	德国
三磷酸腺苷镁盐	Merck	A9187	德国
三磷酸鸟苷钠盐	Merck	G8877	德国
EGTA	Merck	E0396	德国
TEA-OH 溶液	Merck	302929	德国
TEA-Cl	Merck	T2265	德国
甲基磺酸	Merck	471356	德国
甲磺酸铯	Merck	C1426	德国
葡萄糖	Merck	V900392	德国
КОН	Merck	P4494	德国
CsOH	Merck	232041	德国
HEPES	Merck	H3375	德国
NaHCO ₃	Merck	S5761	德国
NaH ₂ PO ₄	Merck	S0751	德国
NaOH	Merck	S5881	德国

2.2.2 自配试剂

表 2.3 CM 培养基

组分	浓度 (v/v,%)	体积 (mL/50 mL)
Neurobasal A 培养基	96	48
100× GlutaMax	$1 \times$	0.5
50× B27 supplement	1×	1
青霉素-链霉素	1	0.5

组分	浓度 (v/v,%)	体积 (mL/50 mL)
DMEM 培养基	89	44.5
胎牛血清	10	5
青霉素-链霉素	1	0.5

表 2.4 完全培养基

表 2.5 高浓度母液 (stock)

组分	分子量 (g/mol)	浓度 (mol/L)	质量 (g/50 mL)
CsCl	168.36	1	8.419
HEPES	238.30	1	11.915
CsOH	149.91	1	7.450
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.01	1	7.351
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	1	10.165
EGTA	380.35	0.01	0.190

pH 至 7.0, 定容至 50 mL。

表 2.6 人工脑脊液

组成	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
NaCl	58.44	125	0.365
KCl	74.55	2.5	0.009
NaHCO ₃	84.01	25	0.105
NaH ₂ PO ₄	119.98	1.25	0.008
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	1	0.05 mL (stock)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.01	2	0.1 mL (stock)
葡萄糖	180.16	25	0.225
抗坏血酸	176.12	0.4	0.004
肌醇	180.16	3	0.027
丙酮酸钠	110.04	2	0.011

组成	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
葡萄糖酸钾	234.25	125	1.464
KCl	74.55	20	0.075
三磷酸腺苷镁盐	507.18	4	0.101
磷酸肌醇二钠盐	255.08	10	0.128
三磷酸鸟苷钠盐	523.18	0.3	0.008
HEPES	238.30	10	0.5 mL (stock)
EGTA	380.35	0.5	2.5 mL (stock)
pH: 7.4±0.1 (KOH), 0.22 μm 过滤后储存于-20℃。			

表 2.7 含 K 电极内液

表 2.8 TEA-MS 细胞外液

组成	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
TEA-MeSO ₃	-	140	7 mL (stock)
HEPES	238.30	10	0.5 mL (stock)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.01	2	0.1 mL (stock)
葡萄糖	180.16	25	0.225
渗透压: 310-320 mO	sm/L, pH: 7.4 ± 0.1 (TE.	A-OH),0.22 μm 过滤后	ī储存于4℃。

表 2.9 含 Cs 电极内液

组成	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
甲磺酸铯	228.01	138	1.573
CsCl	168.36	0.5	0.025 mL (stock)
EGTA	380.35	0.5	2.5 mL (stock)
HEPES	238.30	10	0.5 mL (stock)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	1	0.05 mL (stock)
三磷酸腺苷镁盐	507.18	4	0.101
pH: 7.4±0.1 (CsOH), 0.22 μm 过滤储存在-20℃。			

表 2.10 细胞贴附式记录细胞外液

组成	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
KCl	74.55	140	0.522
HEPES	238.30	10	0.5 mL (stock)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	1	0.05 mL (stock)

葡萄料	唐	180.16	10	0.090
渗透压: 310) - 320 mOsm/L,	pH: 7.4 ± 0.1 (KOH),	0.22 μm 过滤后储存于 4°	°C °

衣 2.11 细胞贴附式比求细胞内液				
组分	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)	
NaCl	58.44	130	0.380	
KCl	74.55	5	0.019	
HEPES	238.30	10	0.5 mL (stock)	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	1	0.05 mL (stock)	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.01	1	0.05 mL (stock)	
TEA-Cl	165.70	10	0.083	
pH: 7.4±0.1 (NaOH),0.22 μm 过滤后储存在-20℃。				

表 2.11 细胞贴附式记录细胞内液

表 2.12 LB 液体培养基和固体培养基

	LB 液体培养基 (g/L)	LB 固体培养基 (g/L)
胰蛋白胨	10	10
酵母提取物	5	5
NaCl	10	10
琼脂粉	-	15
加水定容	1000 mL	1000 mL
1M NaOH 调节 pH 至 7.0, 1	21℃ 高压湿热灭菌 20 min 后冷却	至室温,加入 1 mL 氨苄青霉
素溶液 (100 mg/mL)。		

2.3 实验仪器

表 2.13 实验仪器

仪器名称	公司	型号	产地
恒温培养箱	ThermoFisher	BB15	美国
生物安全柜	ThermoFisher	MSC1.2	美国
恒温摇床	Eppendorf	ThermoMixer C	美国
倒置荧光显微镜	Nexcope	NIB900	中国
低温超速离心机	Eppendorf	5424R	美国
膜片钳放大器	Molecular Devices	Axopatch 200B	美国
数模转换器	Molecular Devices	Digidata 1550B	美国
微操作器	Sensapex	uMp	芬兰
防震台	AMETEK	TMC	美国

单色光发生器	Sutter	DG4	美国
高速电耦合图像采集器	Meyer	QImaging optiMOS	美国
任意波形发生器	Agilent	33522A	中国
超声刺激换能器	自研	无	中国
电极拉制仪	Sutter	P-97/P1000	美国
渗透压仪	Gonotec	OSMOMAT 3000	德国
分析天平	Mettle Toledo	LE104E	美国
凝胶电泳系统统	Bio-Rad	PowerPac Basic	美国
化学发光成像系	Bio-Rad	Chemidoc	美国
微量紫外分光光度计	Thermofisher	NanoDrop One	美国
PCR 仪	Eppendorf	Mastercycler nexus	美国

2.4 实验方法

2.4.1 原代海马神经元分离与培养

- 将细胞爬片置于 24 孔板中,使用 Poly-D-lysine 于 4℃浸泡过夜后,回收 Poly-D-lysine,用无菌水清洗 2-3 遍,晾干待用;
- 使用 75%乙醇对 SD 乳鼠浸泡消毒后,立即断头处死,并将头置于冰浴的 HBSS 中将血液清洗干净;
- 3) 沿正中线从断颈处将颅骨剪开,取出脑组织置入新的冰浴 HBSS 中;
- 4) 沿中线切开左右脑,在解剖镜下将包裹于海马组织周围的血管膜以及血管移除干净后,将海马组织与其它脑组织分离(图 2.1,虚线所示);



图 2.1 海马脑区的位置

- 5) 将分离得到的海马组织转移至 15 ml 离心管中,短暂离心,弃去多余的 HBSS 溶液;
- 6) 根据海马组织的数量加入适量的 0.25% Trypsin, 于 37℃下 300 rpm 震 荡消化 7 - 10 min, 消化期间轻轻吹打数次,将组织吹散;

- 消化结束后,反复吹打至无肉眼可见的组织后,加入等体积的完全培养 基终止消化;
- 8) 1000 rpm 离心 5 min,弃上清,用完全培养基重悬细胞,将细胞接种在加有完全培养基的培养板上,置于 37℃,5% CO2 培养箱培养 1 2 h 后更换为 CM 培养基继续培养,每3-4 天半换液。

2.4.2 全细胞膜片钳

海马神经元培养至 DIV12 - 14 后进行全细胞膜片钳记录; HEK293T 细胞在转染 Cav1.3 通道 24 - 48 h 后,在荧光显微镜下观察 GFP 和 mCherry 信号,选择同时具有荧光信号且细胞形态良好的细胞进行电生理记录。

- 使用电极拉制仪拉制玻璃电极,电极电阻为4-6MΩ,并灌入含K电极 内液(钙电流记录采用含Cs电极内液);
- 搭建超声刺激平台,并在记录槽内加入预热的人工脑脊液(钙电流记录 采用 TEA-MS 细胞外液);
- 3) 将细胞爬片置于记录槽内,使用磁铁固定爬片;
- 在倒置显微镜下选择形态适宜的细胞,通过微操作器,将灌有电极内液 的玻璃电极缓慢的靠近待检测的细胞并施以负压,完成高阻封接;
- 形成高阻封接后静置约1-2min,待封接稳定后,给予负压打破细胞膜, 形成全细胞记录模式;
- 6) 自发兴奋性突触后电流记录采用的是电压钳 Episodic stimulation 模式, 钳制电位为-70 mV,单次记录时长 1 min,重复 20 次;
- 7) 自发动作电位记录采用电流钳 I = 0 下的 Gap free 模式,记录时长 20 min;
- 8) 诱发电流采用电流钳 (I-clamp) 模式;
- 9) 钙电流记录采用的是电压钳 Episodic stimulation 模式,初始钳制电位位 -70 mV,梯度刺激阶段初始电压为-70 mV,每次提高 10 mV,持续 200 ms,后续钳制电位回到-70 mV,共记录 15 次。

2.4.3 单通道膜片钳

Piezo1 通道采用细胞贴附式记录模式。HEK293T 细胞在转染 Piezo1-eGFP 质粒 24-48h 后,在荧光显微镜下观察 GFP 信号,选择有绿色荧光且细胞形态 良好的细胞进行电生理记录。

- 前1-3步与全细胞膜片钳相同,电极内液为细胞贴附式记录电极内液, 外液为细胞贴附式记录电极外液;
- 2) 形成高阻封接并稳定后,无需打破细胞膜,即可开始记录;
- 记录时采用电压钳 Episodic stimulation 记录模式,钳制电位为-80 mV, 记录时长 10 min;
- 在开始记录之前,用负压吸轻轻吸引细胞,观测有无电流产生,选择产 生电流大于 10 pA 的细胞进行记录。
- 2.4.4 钙成像
 - 将 Fura2-AM 指示剂短暂离心后,加入 50 μL DMSO 溶解,制备 1 mmol/L
 的 Fura2-AM 母液;
 - 使用前用 HBSS 溶液将 Fura2-AM 储备液稀释至 5 μmol/L 的工作浓度, 该操作注意避光;
 - 3) 吸去培养基,用 HBSS 清洗 1 2 次后,加入适量 Fura2-AM 工作液完全 浸没细胞爬片,置于 37℃ 5% CO2 培养箱中避光孵育 30 - 40 min;
 - 4) 吸去 Fura2-AM 工作液,使用 HBSS 清洗 1-2 次;
 - 在钙成像记录槽中加入预热的人工脑脊液,并将细胞爬片置于其中,使 用磁铁固定;
 - 6) 使用 Metaflour 软件记录 340 nm 和 380 nm 激发光下的荧光强度的比值;
 选取前 2 min 的比值作为基线进行归一化处理;
 - 7) 采集速度为1 fps, 共采集 1200 s。

2.4.5 重组质粒构建与提取

Cav1.3e-IRES-eGFP、Cavα2δ1-IRES-mCherry、Cavβ3-IRES-mCherry 质粒构 建均采用同源重组法构建,详细实验步骤如下:

- 使用质粒中提试剂盒提取各原始质粒(详细步骤见说明书),并送测序, 测序无误后进行重组质粒构建;
- 2) 对载体片段进行酶切处理。每 20 μL 酶切反应体系中:

 $10 \times$ Fastdigest Buffer: 2 µL

内切酶: 1 μL

质粒 DNA: 1 µg

 ddH_2O : up to 20 μL

其中 Cavβ3 质粒使用 Xba I 和 Not I 双酶切, Cavα2δ1 质粒使用 Kpn I 和 Not I 双酶切, 两种内切酶各 0.5 μL; Cav1.3 质粒使用 Not I 单酶切;

- 3) 酶切时设置未酶切的阴性对照,双酶切组分别设置单酶切和未酶切对照;
- 4) 37℃酶切 30 min, 80℃加热 5 min 使酶失活;
- 5) 使用 1%琼脂糖凝胶对酶切产物进行鉴定和分离,并使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(详细步骤见说明书)对酶切产物进行回收和纯化;
- 利用同源重组引物对 mPiezo1-IRES-eGFP 质粒中的 IRES-eGFP 片段进行 PCR 扩增,将其插入 Cav1.3e 质粒载体。引物信息见表 2.14,引物由 Sangon 合成;

表 2.14 PCR 扩增 IRES-eGFP 的引物信息

载体	目的片段	引物名称	引物序列 (5'-3')	
Cavl 2a		Cav1.3-EGFP-F	F ccactagttctagagcggcccccctctccctcccccc	
Cav1.3e IRES-eGFP	Cav1.3-EGFP-R	ccctctagactcgagcggccttacttgtacagctcgtccatgcc		

7) 利用同源重组引物对 mPiezo1-IRES-eGFP 质粒中的 IRES 片段进行 PCR 扩增,并对 pcDNA3.1-mCherry 中的 mCherry 进行 PCR 扩增,将其插入 Cavβ3 和 Cavα2δ1 质粒载体。引物信息见表 2.15,引物由 Sangon 合成;

表 2.15 PCR 扩增 IRES 和 mCherry 的引物信息

载体	目的片段	引物名称	引物序列 (5'-3')	
IRES	IDEC	Cavβ3-IRES-F	tatccagcacagtggcggcccccctctcccccccc	
	Cavβ3-IRES-R	tgctcaccatggttgtggccatattatcatcgtgt		
Cavp3	ιvβ3	Cavβ3-mCherry-F	ggccacaaccatggtgagcaagggcgag	
mCherry	Cavβ3-mCherry-R	ggtttaaacgggccctctagtcacttgtacagctcgtccatgcc		
	IDEC	Cavα2δ1-IRES-F	gtacaagtgacccctctcccccccc	
Cava2	IRES	Cavα2δ1-IRES-R	gggagaggggtcacttgtacagctcgtccatgcc	
δ1	mCherry	Cavα2δ1-mCherry-R	agcgtttaaacttaagcttggtaccatggtgagcaagggcgag	
		Cavα2δ1-mCherry-R	ccactagttctagagcggccgcggttgtggccatattatcatcgtgttt	

8) PCR 反应体系如下(每 50 µL PCR 反应体系):

2× Phanta Max Master Mix: 25 µL

上下游引物: 各 2 μL

质粒 DNA 模板: 30 ng

ddH₂O: Up to $50 \,\mu$ L

9) PCR 反应程序见表 2.16:

表 2.16 PCR 反应程序

循环步骤	温度 (℃)	时间	循环数
预变性	95	3 min	-
变性	95	15 s	
退火	56 - 72	15 s	25 - 35 cycles
延伸	72	30 - 60 s/kb	
彻底延伸	72	5 min	-

10) 使用 1%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行分离和鉴定,并使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(详细步骤见说明书)对 PCR 产物进行回收和纯化;

11)使用一步法克隆试剂盒将载体质粒与相应的目的片段进行连接,并设置标准阳性对照与无重组酶的阴性对照组(表 2.17),50 ℃连接 15 min;

表 2.17 同源重组反应体系(10 µL)

组分	重组反应 (μL)	阴性对照-1 (μL)	阴性对照-2 (μL)	阳性对照 (μL)
线性化载体	Х	Х	0	1
n 个插入片段	$Y_1 + Y_2 + \dots$	0	$Y_1 + Y_2 + \dots$	1
2× CloneExpress Mix	5	0	0	5
ddH ₂ O	Up to 10 µL			

对于单片段同源重组反应:最适克隆载体使用量 = [0.02 × 克隆载体碱基对数] ng (0.03 pmol);最适插入片段使用量 = [0.04 × 插入片段碱基对数] ng (0.06 pmol)。对于多片段同源 重组反应:最适克隆载体使用量 = [0.02 × 克隆载体碱基对数] ng (0.03 pmol);每个片段的 最适使用量 = [0.02 × 每个片段碱基对数] ng (0.03 pmol)。

- 12) 将连接产物转化至 DH5α 化学感受态大肠杆菌,并涂布于含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基中,37℃倒置培养过夜;
- 13) 挑选单克隆菌进行培养,使用高纯度质粒小提试剂盒抽提质粒(详细步

骤见说明书),获得重组质粒;

14)将重组质粒送测序,测序无误后使用质粒中提试剂盒大量提取(详细步骤见说明书),以备后续转染使用。

2.4.6 293T 细胞培养

细胞复苏

- 水浴锅预热至 37℃后,将细胞从液氮管中快速取出,置于水浴锅中边振 摇边快速解冻;
- 2) 消毒后,将冻存液转移入15 mL 离心管,1000 rpm 离心 3 min;
- 3) 弃上清,使用完全培养基重悬,并吹散细胞;
- 4) 在培养皿中加入完全培养基,将细胞悬液全部加入,混匀;
- 5) 将培养皿置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,观察细胞密度,密度大 于 80%传代。

细胞传代培养

- 1) 待细胞密度达 80 90%后,进行传代;
- 2) 吸去培养基,每皿加入1-2mLPBS 溶液清洗1-2次;
- 3) 每皿加入1mL 0.25% Trypsin, 置于 37℃培养箱中消化1-2min;
- 显微镜下观察到细胞呈圆形并从贴壁状态下脱落,或轻敲皿底后细胞呈 流沙状脱落,即为消化结束,加入与 0.25% Trypsin 等体积的完全培养基 终止消化,并吹打混匀;
- 5) 将溶液转移至 15 mL 离心管, 1000 rpm 离心 3 min;
- 6) 弃上清, 使用完全培养基重悬, 并吹散细胞;
- 7) 按照所需密度将细胞加入至培养皿中,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 按需传代或换液。

细胞冻存

- 1) 细胞密度达 80-90%后,进行冻存;
- 2) 配制冻存液: 900 μL 胎牛血清与 100 μL DMSO 混合 (v/v = 9:1)
- 3) 重复细胞传代步骤(2)-(5);
- 4) 弃去离心上清后,使用1mL冻存液缓慢轻柔重悬细胞;
- 5) 将细胞悬液转移至冻存管中,密封;

- 6) 将冻存管置于加有异丙醇的冻存盒中,放于-80℃超低温冰箱,24-48h 后取出,转移至液氮罐中保存。
- 2.4.7 质粒转染
 - 将细胞培养至放由有细胞爬片的24孔板中,待细胞密度达50-60%后, 进行转染;
 - 2) 配置转染试剂:

A 液: 将 0.5 μg 质粒加入 25 μL Opti-MEM 培养基中,充分混匀 (确 保 α 亚基、β3 亚基和 α2δ1 亚基的化学计量比为 1:1:1);

B 液: 1 μL Lipofectamine 3000 加入 25 μL Opti-MEM 培养基,充分 混匀;

- 3) 将 A 液与 B 液混合后,室温静置 10-15 min;
- 4) 将 AB 混合液加入培养皿, 混匀;
- 5) 24 h 后观察转染效果并换液。

2.5 数据处理

数据解雇均以平均值 ± 均值标准误 (Mean ± S.E.M.) 表示, n 表示细胞数量。 两组样本之间比较采用配对 Student's t-test, 两组以上样本采用 One-way ANOVA, 配合事后 Dunnett's multiple comparison test。* 表示 p < 0.05,** 表示 p < 0.01。 数据采集和分析主要软件见表 2.18:

软件名称	公司	版本	国家
Clampex	Molecualr Devices	10.7	美国
Clampfit	Molecualr Devices	10.7	美国
Metafluor	Molecualr Devices	7.0	美国
Excel	Microsoft	2021	美国
GraphPad Prism	GraphPad Software	10.1.2	美国
Igor Por	WaveMetrics	9.0.5.1	美国
Corel Draw	Corel	2024	加拿大

表 2.18 数据采集和分析软件

三、研究结果

3.1 超声刺激对海马神经元兴奋性的影响

3.1.1 超声刺激条件筛选

本实验的超声刺激由声表面波超声换能器产生。声表面波超声换能器以钽酸 锂 (LiTaO3) 晶片为基底,通过叉指换能器在表面产生驻波声场,依据换能器的 叉指密度,本实验所采用的换能器中心频率分别为 9.47 MHz 和 20.8 MHz (图 3.1 A)。我们将声表面波超声换能器通过同轴电缆将其与波形发生器的输出端相 连接,置于电生理记录平台(图 3.1 B, C, D),从而实现超声刺激和电生理记录 的同步进行。波形发生器的输出波形为正弦波,依据超声换能器的实际中心频率 设置对应的输出频率,通过调整峰峰值 (Vpp)大小来调节输出强度,最终在钽 酸锂晶片表面产生一系列驻波声场(图 3.1 E)。



图 3.1 超声刺激平台

A. 不同频率的声表面波超声换能器; B. 整合超声刺激的电生理记录平台实物图;
C. 整合超声刺激的电生理记录平台示意图; D. 整合超声刺激的电生理记录平台侧视示意图; E. 声表面波超声的声压强度分布

为探究不同频率和强度的超声刺激对神经元兴奋性变化可能会产生的影响,并筛选最适的超声刺激条件,我们使用连续刺激的形式,对原代培养海马神经元的自发动作电位 (spontaneous action potential, sAP) 的发放进行了检测。超声刺

激模式为:每次刺激 2 min,中间间隔 2 min,刺激强度逐步增加(图 3.2 A)。结果显示,超声刺激可提高神经元的 sAP 发放频率(图 3.2 A),其中 9.47 MHz, 4 Vpp 刺激条件下神经元的 sAP 发放频率的增加最为显著(图 3.2 B;表 3.1)。当输出 波强度大于 4 Vpp 时,神经元的 sAP 发放频率有所下降,表明较高的刺激强度 可能会对神经元产生一定的损伤作用(图 3.2 B, C;表 3.1)。



图 3.2 不同频率和强度的超声刺激提高海马神经元 sAP 的发放频率

A. 不同刺激频率下神经元 sAP 发放变化的示意图; B. 9.47 MHz 刺激强度下神经元 sAP 频率随超声强度变化的统计图 (n = 6, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); C. 20.8 MHz 刺激强度下神经元 sAP 频率随超声强度变化的统计图 (n = 5, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

Gro	oup	0 Vpp	2 Vpp	4 Vpp	6 Vpp	10 Vpp
0.47 MIL	Freq (Hz)	0.66 ± 0.14	1.27 ± 0.18	2.31 ± 0.43	1.87 ± 0.45	1.22 ± 0.14
9.4/ MHZ	P value	-	0.131	0.047	0.208	0.194
20.9 MIL-	Freq (Hz)	0.38 ± 0.82	0.98 ± 0.62	1.06 ± 0.72	0.74 ± 0.48	0.70 ± 0.39
20.8 MHz	P value	-	0.278	0.346	0.238	0.138

表 3.1 不同频率和强度的超声刺激下海马神经元 sAP 发放频率统计

在实验过程中,我们观察到一些神经元在超声刺激前即可产生 sAP,但仍存 在一些神经元始终无法观测到 sAP 产生。对于这类没有 sAP 产生的细胞,我们 通过电流钳模式对细胞注入一系列去极化电流,从而诱发神经元产生动作电位 (图 3.3 A),并对注入电流的大小进行了统计。注入电流的大小可用于表征神经 元动作电位的阈值大小,结果发现,超声刺激后能够降低神经元的注入电流(图 3.3 B,C;表 3.2)。当超声频率为 9.47 MHz 时,输出强度分别为 4 Vpp 和 6 Vpp 时神经元的注入电流降低最为显著(图 3.3 B;表 3.2)。



A. 注入电流模式示意图; B. 9.47 MHz 刺激强度下神经元的注入电流随超声强度变化的统计图 (n = 3, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); C. 20.8 MHz 刺激强度下神经元的注入电流随超声强度变化的统计图 (n = 3, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

	Group	0 Vpp	2 Vpp	4 Vpp	6 Vpp	10 Vpp
0.47	Inject	$246.67\pm$	$233.33 \pm$	$206.67 \pm$	$196.67 \pm$	$210.00 \pm$
9.47	current (pA)	32.83	26.03	34.80	31.80	23.09
MHZ	P value	-	0.524	0.044	0.029	0.197
20.9	Inject	$220.00 \ \pm$	$216.67 \pm$	$206.67\pm$	$190.00 \pm$	$193.33 \pm$
20.8	current (pA)	5.77	13.33	20.28	15.28	21.86
MHZ	P value		0.980	0.857	0.256	0.524

表 3.2 不同频率和强度的超声刺激下海马神经元动作电位阈值统计

上述研究结果表明,超声刺激可以提高海马神经元 sAP 的发放频率,并降低神经元动作电位的阈值,从而提高神经元的自发兴奋性反应,且神经元对不同频率的超声刺激存在不同的响应的特性。基于上述结果,我们最终选择了 9.47 MHz,4 Vpp 作为后续实验的超声刺激条件。

3.1.2 超声刺激增强海马神经元的自发动作电位发放

为精确检测超声刺激过程中神经元兴奋性的实时动态变化,我们对神经元的 sAP 进行了连续 20 min 的实时监测,并用黑色、红色、蓝色、绿色分别标记了

超声刺激前 (Pre),超声刺激过程中 (US),超声结束后 0-5 min (Post-1) 和超声 结束后 5-15 min (Post-2)。在我们所记录到的 14 个细胞中,有 9 个细胞对超声 刺激表现出明显的响应,也即 sAP 发放频率在超声刺激过程中表现出明显的增强(图 3.4 A),我们将其称为 Strong Potentiation (SP);其余 5 个细胞对超声刺激 没有表现出明显的响应(图 3.4 C),称为 No Potentiation (NP)。

在 SP 组中,我们发现在超声刺激过程中,神经元的 sAP 频率显著上升,并 在超声结束后的 Post-1和 Post-2时间段内仍保持显著上升(图 3.4 B, 左;表 3.3)。 此外,Post-2时间段内,我们观察到神经元的静息膜电位 (membrane potential, MP) 出现了明显的升高(图 3.4 B, 右;表 3.3),但神经元的 sAP 的幅度却没有出现 显著性变化(图 3.4 B, 中;表 3.3)。在 NP 组中,我们发现无论是超声刺激过程 中还是超声刺激结束后,神经元的 sAP 发放频率(图 3.4 D, 左;表 3.3)、sAP 幅度(图 3.4 D, 中;表 3.3)和静息膜电位均没有显著变化(图 3.4 D, 右;表 3.3)。

	Group	Pre	US	Post-1	Post-2
	Freq (Hz)	0.05 ± 0.02	0.18 ± 0.06	0.34 ± 0.06	0.43 ± 0.07
	P value	-	0.034	0.001	0.001
SD	Amp (mV)	79.03 ± 3.14	81.24 ± 3.09	77.48 ± 3.66	75.10 ± 4.00
SP	P value	-	0.199	0.553	0.160
-	MP (mV)	-54.70 ± 1.90	-54.63 ± 2.24	-52.14 ± 2.49	-46.87 ± 3.01
	P value	-	0.998	0.051	0.003
	Freq (Hz)	0.17 ± 0.06	0.25 ± 0.07	0.25 ± 0.06	0.17 ± 0.05
NP	P value	-	0.185	0.615	p > 0.999
	Amp (mV)	87.64 ± 3.05	87.24 ± 3.13	89.79 ± 2.68	88.42 ± 3.38
	P value	-	0.996	0.779	0.990
	MP (mV)	-56.55 ± 2.73	-56.23 ± 2.73	-55.14 ± 2.83	-52.52 ± 3.28
	P value	-	0.561	0.376	0.137

表 3.3 超声刺激对海马神经元 sAP 发放的影响



A. Strong Potentiation (SP) 组神经元的 sAP 变化示意图; B. SP 组神经元的 sAP 发放频率(左)、sAP 幅度(中)和静息膜电位(右)统计图 (n = 9, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); C. No Potentiation (NP) 组神经元 sAP 变化示意图; D. NP 组神经元的 sAP 发放频率(左)、sAP 幅度(中)和静息膜电位(右)统计图 (n = 5, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

为确保神经元在 20 min 连续记录过程中的 sAP 发放频率变化确实是由超声 引起的,我们对不施加任何超超声刺激的神经元的 sAP 进行了连续 20 min 的记

录,并依据超声刺激情况下的分析模式,使用黑色、红色、蓝色和绿色依次标记 了 0-2 min (Pre), 2-4 min (Sham), 4-9 min (Sham-P1) 和 9-20 min (Sham-P2) (图 3.5 A)。同样地,我们对不同时间段内神经元 sAP 的发放频率、幅度和静息 膜电位进行了统计。结果显示,在连续 20 min 的记录过程中, sAP 的频率、幅 度和静息膜电位均没有显著性变化(图 3.5 B;表 3.4)。



图 3.5 未施加超声刺激情况下 20 min 连续记录过程中神经元 sAP 发放情况 A. 神经元在连续 20 min 记录过程中 sAP 变化示意图; B. 神经元的 sAP 发放频率 (左)、sAP 幅度(中)和静息膜电位(右)统计图 (n = 9, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

Group	Pre	Sham	Sham-P1	Sham-P2
Freq (Hz)	0.14 ± 0.05	0.14 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.03
P value	-	0.986	0.829	0.957
Amp (mV)	90.92 ± 6.07	88.87 ± 7.13	85.22 ± 6.70	84.67 ± 6.41
P value	-	0.670	0.128	0.062
MP (mV)	-57.98 ± 1.22	-57.05 ± 1.21	-56.35 ± 1.24	-56.04 ± 1.40
P value	-	0.277	0.054	0.286

表 3.4 未施加超声刺激情况下 20 min 连续记录过程中神经元 sAP 发放情况统计

以上结果表明,超声刺激可以提高部分神经元 sAP 的发放频率,并且通过提高静息膜电位进一步促进神经元发放动作电位。

3.1.3 超声刺激增强神经元自发突触传递过程

神经兴奋性的调控主要体现在神经元的内在兴奋性活性以及神经元之间的 突触传递过程,因此为进一步明确超声对神经元自发突触传递之间的精细调控, 我们也对神经元的自发兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory post-synaptic current, sEPSC) 进行了连续 20 min 的记录。与 sAP 的记录结果类似,我们在 sEPSC 记录过程中同样观察到了对超声刺激表现出不同响应的特征的细胞,依据 神经元的 sEPSC 频率变化差异,我们将其分为 Strong Potentiation (SP) (图 3.6 A) 和 No Potentiation (NP) (图 3.6 B)两组。

在 SP 组中,神经元的 sEPSC 频率在超声刺激过程中显著上升,超声结束后 仍继续升高(图 3.6 A,下左;表 3.5),但 sEPSC 的幅度没有表现出统计学差异 (图 3.6 A,下右;表 3.5)。在 NP 组中,神经元的 sEPSC 频率(图 3.6 B,下左; 表 3.5)和幅度(图 3.6 B,下右;表 3.5)均没有统计学差异。



图 3.6 超声刺激对海马神经元 sEPSC 发放的精细调控动力学

A. Strong Potentiation (SP) 组神经元的 sEPSC 变化示意图(上)、sEPSC 发放频率 (下左)和幅度(下右)统计图 (n = 6, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); B. No Potentiation (NP) 组神经元的 sEPSC 变化示意图(上)、sEPSC 发放频率(下 左)和幅度(下右)统计图 (n = 5, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

	Group	Pre	US	Post-1	Post-2
	Freq (Hz)	0.71 ± 0.21	0.86 ± 0.25	1.23 ± 0.16	1.30 ± 0.29
SD	P value	-	0.041	0.049	0.006
SP	Amp (pA)	35.15 ± 4.98	34.82 ± 6.39	34.02 ± 6.49	38.52 ± 5.62
	P value	-	p > 0.999	0.997	0.924
	Freq (Hz)	1.32 ± 0.21	1.24 ± 0.24	1.30 ± 0.20	1.29 ± 0.17
ND	P value	-	0.109	0.934	0.819
NP -	Amp (mV)	27.80 ± 5.14	27.30 ± 4.86	28.27 ± 4.47	28.68 ± 4.44
	P value	-	0.989	0.993	0.913

表 3.5 超声刺激对海马神经元 sEPSC 发放的影响

以上结果表明,超声刺激能够提高部分神经元 sEPSC 的发放频率。由于神经元的囊泡释放取决于神经元胞内钙离子浓度的变化,因此为进一步验证超声刺激对神经元胞内钙离子浓度的影响,我们使用钙成像技术检测了超声刺激过程中神经元胞内钙离子浓度的变化。结果发现,不同神经元的胞内钙离子浓度变化对超声刺激的响应也存在明显的差异,表现为胞内钙离子浓度在超声刺激过程中缓慢上升,在超声结束后快速上升,随后胞内钙离子浓度达到稳态的 Strong Potentiation (图 3.7 A)和在记录过程中钙离子浓度未表现出任何变化的 No Potentiation 组(图 3.7 B),这一结果与超声刺激对神经元 sAP 和 sEPSC 的调控效果基本一致。钙成像实验结果表明,超声刺激可以通过增加神经元胞内钙离子浓度从而提高神经元的兴奋性反应。



A. Strong Potentiation (SP) 组神经元胞内钙离子浓度在超声刺激结束后上升 (n = 9); B. No Potentiation (NP) 组神经元胞内钙离子浓度在超声刺激前后无变化 (n = 6), 虚线框表示超声刺激过程

3.2 超声诱导的 Piezo1 和 Cav1.3 的偶联调控

3.2.1 超声刺激不会直接激活 Cav1.3 通道

我们前期的研究已经发现,超声刺激对神经元的兴奋性反应调控可能是通过 改变胞内钙离子浓度而实现的。2016 年有研究表明,超声刺激可以通过打开 L 型钙通道并增加细胞内 Ca²⁺ 浓度从而促进膀胱平滑肌收缩^[23]。最新研究发现, 低强度脉冲超声通过促进海马神经元中 L 型钙通道增加胞内钙离子水平,从而 增强神经元的自发活性^[24]。为了研究 L 型钙通道能否响应超声刺激而被直接激 活,我们在 293T 细胞中外源表达了 Cav1.3 钙通道,并检测超声刺激对钙电流的 影响。

由于 VGCC 是由多亚基构成的蛋白质复合物(图 1.5 A),因此为在体外研 究各类 VGCC 的生理学作用和通道特性,需要在受体细胞中同时转入各自的 α1 亚基以及辅助亚基 β 亚基和 α2δ 亚基。为确保受体细胞能够表达具有完整生物学 功能的 VGCCs,我们构建了带有 eGFP 荧光标记的 Cav1.3 α1 亚基质粒以及带有 mCherry 荧光标记的 Cavβ3 质粒和 Cavα2δ1 质粒(图 3.8)。将三种质粒共同转染 至 293T 细胞中,即可通过 eGFP 和 mCherry 荧光信号检测通道的表达情况,从 而对 Cav1.3 钙通道进行检测。

27



图 3.8 在 293T 细胞中共转染 Cav1.3 不同亚基后荧光表达情况

我们使用全细胞膜片钳检测了 2 min 超声刺激前后表达完整 Cav1.3 通道的 293T 细胞的钙电流(图 3.9 A)。I-V 曲线显示,超声刺激对 Cav1.3 通道的电流 不产生影响(图 3.9 B),且在-10 mV 钳制电位下的峰值电流大小和峰值电流密 度在超声刺激前后也没有表现出任何显著性差异(图 3.9 C,D)。我们的研究结 果表明,超声刺激不会直接激活 Cav1.3 通道。



图 3.9 超声刺激不影响 Cav1.3 通道的开放

A. 钙电流记录刺激模式 (左), 表达外源 Cav1.3 通道的 293T 细胞在超声刺激前后 Cav1.3 电流大小示意图(右); B. Cav1.3 通道在超声刺激前后的 I-V 曲线; C. Cav1.3 通道在超声刺激前后峰值电流大小示意图; D. Cav1.3 通道在超声刺激前后峰值电流索密度统计图 (Before US: 38.16 ± 7.65 pA/pF; After US: 36.36 ± 5.70 pA/pF, p = 0.266; n = 5, paired Student's t-test)

3.2.2 超声刺激提高 Piezo1 单通道开放概率

既然超声刺激不会对 Cav1.3 通道开放产生任何影响,表明超声刺激对神经 元钙内流的调控可能存在其他机制。尽管先前研究发现,超声刺激可以直接激活 Piezo1 通道,从引发胞外钙离子内流^[18],但目前缺乏直接的电生理证据证明超声 刺激对 Piezo1 通道的调控作用。为探究超声刺激对 Piezo1 通道的直接作用效果, 我们在 293T 细胞中表达了外源 Piezo1 通道,通过单通道膜片钳检测了超声刺激 对 Piezo1 通道开放概率和开放时程的影响。

我们对表达了外源性 Piezo1 通道的 293T 进行了 2 min 的超声刺激(图 3.10 A),并分析了超声刺激前(Pre,黑色),超声刺激过程中(US,红色),超声结束后(After-US,蓝色) Piezo1 通道的开放概率和开放时程。结果显示,在超声刺激过程中,Piezo1 通道的开放概率和开放时程显著提升,而在超声结束后下降,但仍高于超声刺激前(图 3.10 B)。



图 3.10 超声刺激对 Piezo1 通道开放的作用

A. Piezo1 通道电流变化示意图; B. Piezo1 通道开放概率(上)和开放时程(下) 统计图 (n = 5, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

Group	Pre	US	After-US
Open Probability	0.02 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.04 ± 0.01
P value	-	0.027	0.114
Dwell time (ms)	52.02 ± 6.45	122.50 ± 20.63	68.24 ± 6.39
P value	-	0.041	0.062

表 3.6 超声刺激对 Piezo1 通道开放的影响

为了确保 Piezo1 通道开放概率的增加是由超声刺激所引起的,我们在相同 记录条件下检测了未施加超声刺激时 Piezo1 通道的开放情况(图 3.11 A),结果 显示,在连续 10 min 的记录过程中, Piezo1 通道的开放概率和开放时程均未产 生显著变化(图 3.11 B)。



图 3.11 连续 10 min 单通道膜片钳记录过程中 Piezo1 通道的开放情况 A. Piezo1 通道电流变化示意图; B. Piezo1 通道开放概率(上)和开放时程(下) 统计图 (n = 5, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

Group	Pre	Sham-US	Sham-After
Open Probability	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
P value	-	0.793	0.805
Dwell time (ms)	52.14 ± 4.43	54.23 ± 6.39	55.91 ± 5.66
P value	-	0.755	0.773

表 3.7 连续 10 min 单通道膜片钳记录过程中 Piezo1 通道的开放情况统计

上述结果表明, Piezol 通道可直接响应超声刺激而增加其开放概率和开放时程, 且在超声结束后 5 min 仍可保持一定的开放。

3.2.3 超声刺激提高 Piezo1-Cav1.3 偶联体系中的钙通道电流

接下来,为进一步探究超声诱导的 Piezo1-VGCC 偶联调控机制,我们在 293T 细胞中共表达了 Cav1.3 通道和 Piezo1 通道,并对超声前后的钙电流进行了记录。 I-V 曲线结果显示,超声刺激后 Cav1.3 通道的电流密度在-10 mV 处升高(图 3.12 A, B)。随后,我们对-10 mV 钳制电位下的峰值电流进行了分析,统计结果显示, 超声刺激后 Cav1.3 通道的峰值电流密度显著升高(图 3.12 C, D),表明激活 Piezo1 通道可促进 Cav1.3 通道开放。



图 3.12 超声刺激显著提高 Cav1.3-Piezo1 共表达体系中 Cav1.3 的峰值电流密度 A. 钙电流记录刺激模式 (左), 共表达 Cav1.3 和 Piezo1 通道的 293T 细胞在超声 刺激前后 Cav1.3 通道电流大小示意图 (右); B. 共表达 Cav1.3 和 Piezo1 通道的 293T 细胞在超声刺激前后的 I-V 曲线; C. 共表达 Cav1.3 和 Piezo1 通道的 293T 细胞 在超声刺激前后 Cav1.3 通道的峰值电流大小示意图; D. 共表达 Cav1.3 和 Piezo1 的 293T 细胞在超声刺激前后 Cav1.3 通道的峰值电流密度统计图 (Before US: 46.15 ± 11.11 pA/pF; After US: 55.56 ± 10.23 pA/pF, p = 0.012; n = 3, paired Student's t-test)

31

四、讨 论

得益于超声的安全性、精确性和高效性,超声神经调控技术在神经生物学基础研究和临床治疗中展现出了极大的应用潜能。然而关于超声刺激对神经元兴奋性的精细动力学调控目前仍缺乏直接的电生理证据,同时超声神经调控的内在细胞机制仍及其潜在作用靶点也尚不明确。本课题利用整合超声刺激的电生理记录平台,探究了超声调控神经元兴奋性反应的实时动态变化,并从离子通道水平初步研究了超声刺激的可能作用靶点,研究结果主要包括以下几点:(1)超声刺激可显著提高神经元 sAP 和 sEPSC 等神经元自发兴奋性反应,且这一过程依赖于神经元胞内钙离子浓度上升;(2)Piezo1和Cav1.3通道之间存在偶联关系,超声刺激通过直接激活 Piezo1通道从而激活 Cav1.3通道,引发钙离子大量内流。本课题的研究结果,不仅为超声在神经元层面的作用提出了可能靶点和调控机制,也为超声神经调控的临床应用和治疗提供了重要的理论依据。

4.1 超声刺激可以提高神经元的兴奋性反应

我们利用整合超声刺激的电生理记录平台(图 3.1),记录了连续超声刺激过 程中神经元的兴奋性变化,从而实时精确地监控了超声刺激对中枢海马神经元的 调控作用。神经元的兴奋性反应主要体现在神经元的自发兴奋性动作电位和神经 元之间的突触传递两个方面。其中神经元的动作电位是神经信息编码的基本单元, 其发放水平受到神经元静息膜电位和去极化电流阈值等因素影响^[25]。我们的研 究的发现,在超声刺激过程中,神经元的 sAP 发放频率表现出显著上升,并在 超声结束后仍保持显著上升(图 3.4 A, B),而神经元静息膜电位在 Post-2 时间 段内的降低又进一步促进了 sAP 的发放。在实验过程中,我们还观察到部分细 胞的 sAP 在记录过程中并未表现出任何变化,与未施加超声刺激的对照组结果 一致(图 3.4 C, D,图 3.5)。我们猜测可能是由于这些神经元恰好位于驻波声波 的波节附近(图 3.1 D),此处的声波振幅较小,无法达到有效的刺激强度,从而 导致神经元对超声刺激的响应不显著。

由于海马神经元的突触前和突触后并不存在明确的"一对一"的对应关系, 因此为进一步明确超声对神经元之间自发突触传递过程的调控,我们对神经元的

32

sEPSC 进行了连续 20 min 的实时监测。与 sAP 变化情况一致,部分细胞的 sEPSC 频率在超声刺激过程中显著上升,并在超声刺激结束后仍保持升高(图 3.6 A)。 在钙成像实验中,我们也观察到了胞内钙离子浓度变化与 sEPSC 频率相一致的 变化趋势(图 3.7 A)。

2019 年, Huang 等人发现超声刺激通过增加海马神经元树突棘密度和谷氨酸受体表达水平来提高神经元兴奋性^[26],但是这一变化往往需要较长的作用时间。2022 年,Yoo 等人发现超声可在 200 ms 内提高神经元胞内钙离子水平^[12],我们的研究结果也发现,超声刺激开始后,胞内钙离子浓度立即开始升高,并且神经元的兴奋性和突触传递过程在较短时间内即可出现显著性增强,这表明超声刺激在短时间内增强神经元的兴奋性反应和突触传递过程是通过提高胞内钙离子浓度而实现的。

4.2 超声诱导的 Piezo1 通道和 VGCC 的偶联调控

我们前期的研究结果表明,超声刺激的作用效果与神经元胞内钙离子水平变 化高度相关。位于突触前膜的 VGCC 通过介导胞外钙离子内流从而引发神经元 神经递质释放和突触传递过程,因此我们猜测超声刺激对神经元的调控可能是通 过激活 VGCC 而实现的。但是通过在 293T 细胞中表达外源 Cav1.3 钙通道后, 我们发现超声刺激对钙电流不产生任何显著性影响(图 3.9),这一结果表明超声 刺激对钙内流的调控可能存在其他机制。先前研究发现,超声刺激可以直接激活 Piezol 通道,从引发胞外钙离子内流^[18]。因此我们对 293T 细胞中外源表达的 Piezol 通道进行了单通道电生理检测,结果发现超声刺激确实可以显著提高 Piezol 通道的开放概率和开放时程(图 3.10),并且将 Piezol 和 Cav1.3 通道共表 达后,可观察到钙电流在超声刺激后显著升高(图 3.12)。

机械敏感通道作为一种能够直接响应机械力刺激而被激活的离子通道,主要 分布在神经元胞体和树突等处^[27],而L型钙离子通道Cav1.3也主要位于胞体和 树突等处^[28]。2010年,Adams等人曾报道了HVA钙通道的超声激活存在钙离子 依赖的易化现象 (calcium dependent facilitation, CDF),即内流的钙离子可通过结 合钙调蛋白 (calmodulin, CaM)进一步增加VGCC的开放^[29]。因此我们推测机械 敏感通道和电压门控钙离子通道可能存在偶联,也即超声通过优先激活机械敏感 通道,引发钙离子内流,促进 L 型钙离子通道的开放,从而共同促进下游的突触传递(图 4.1)。



图 4.1 超声诱导的 Piezo1-VGCC 偶联机制

在实验过程中,我们观察到胞内钙离子浓度在超声刺激过程中的上升速 率低于超声结束后(图 3.7 A),且在超声结束后神经元的 sAP 和 sEPSC 频 率仍保持显著上升(图 3.4 A, 3.6 A)。造成这些现象的原因可能是由于超声 激活 Piezo1 通道后内流的钙离子需要一定时间才能达到激活 HVA 型 VGCC 通道所需的阈值浓度,但该猜测仍待进一步研究。

4.3 展望

尽管本课题从细胞层面探究了超声刺激对中枢神经兴奋性的精细动力学调 控与内在分子机制,但仍存在许多不足:(1)我们的研究主要以离体细胞为主要 研究对象,但在实际生理环境中,神经元与神经元以及其他细胞之间存在十分复 杂的相互作用。因此,未来的研究可以考虑从脑片或整体水平进一步验证,从而 更加全面地了解超声刺激对神经兴奋性的影响。(2)我们的研究主要集中在机械 敏感通道 Piezo1 和 L 型钙离子通道 Cav1.3,其他类型的机械敏感通道,如 TRPA1、 TRPC1 等也能够响应机械力刺激引发阳离子内流^[12],因此这些机械敏感通道和 其他亚型 VGCC 之间是否也存在类似的关联作用值得研究。(3)我们的研究仅 发现 Piezo1 和 Cav1.3 之间存在一定的关联,但二者之间的关联是否完全依赖于 钙离子内流或者二者之间是否存在结构上的互作仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Javid A, Ilham S, Kiani M. A Review of Ultrasound Neuromodulation Technologies [J]. IEEE Trans Biomed Circuits Syst, 2023, 17(5): 1084-96.
- [2] Legon W, Sato T F, Opitz A, et al. Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans [J]. Nat Neurosci, 2014, 17(2): 322-9.
- [3] Krishna V, Sammartino F, Rezai A. A Review of the Current Therapies, Challenges, and Future Directions of Transcranial Focused Ultrasound Technology: Advances in Diagnosis and Treatment [J]. JAMA Neurol, 2018, 75(2): 246-54.
- [4] Lefaucheur J P, Antal A, Ayache S S, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS) [J]. Clin Neurophysiol, 2017, 128(1): 56-92.
- [5] Zhou H, Niu L, Xia X, et al. Wearable Ultrasound Improves Motor Function in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2019, 66(11): 3006-13.
- [6] Zhang D, Li H, Sun J, et al. Antidepressant-Like Effect of Low-Intensity Transcranial Ultrasound Stimulation [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2019, 66(2): 411-20.
- [7] Chen S G, Tsai C H, Lin C J, et al. Transcranial focused ultrasound pulsation suppresses pentylenetetrazol induced epilepsy in vivo [J]. Brain Stimul, 2020, 13(1): 35-46.
- [8] Sanguinetti J L, Hameroff S, Smith E E, et al. Transcranial Focused Ultrasound to the Right Prefrontal Cortex Improves Mood and Alters Functional Connectivity in Humans [J]. Front Hum Neurosci, 2020, 14: 52.
- [9] Zhang T, Guo B, Zuo Z, et al. Excitatory-inhibitory modulation of transcranial focus ultrasound stimulation on human motor cortex [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(12): 3829-41.
- [10] Liu T, Choi M H, Zhu J, et al. Sonogenetics: Recent advances and future directions [J]. Brain Stimul, 2022, 15(5): 1308-17.
- [11] Rabut C, Yoo S, Hurt R C, et al. Ultrasound Technologies for Imaging and Modulating Neural Activity [J]. Neuron, 2020, 108(1): 93-110.
- [12] Yoo S, Mittelstein D R, Hurt R C, et al. Focused ultrasound excites cortical neurons via mechanosensitive calcium accumulation and ion channel amplification [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 493.
- [13] Zhao Q, Wu K, Geng J, et al. Ion Permeation and Mechanotransduction Mechanisms of Mechanosensitive Piezo Channels [J]. Neuron, 2016, 89(6): 1248-63.
- [14] Kubanek J, Shi J, Marsh J, et al. Ultrasound modulates ion channel currents [J]. Sci Rep, 2016, 6: 24170.
- [15] Wu J, Lewis A H, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction The Function and Regulation of Piezo Ion Channels [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(1):

57-71.

- [16] Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels [J]. Science, 2010, 330(6000): 55-60.
- [17] Hill R Z, Loud M C, Dubin A E, et al. PIEZO1 transduces mechanical itch in mice [J]. Nature, 2022, 607(7917): 104-10.
- [18] Qiu Z, Guo J, Kala S, et al. The Mechanosensitive Ion Channel Piezol Significantly Mediates In Vitro Ultrasonic Stimulation of Neurons [J]. iScience, 2019, 21: 448-57.
- [19] Simms B A, Zamponi G W. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction [J]. Neuron, 2014, 82(1): 24-45.
- [20] Wang W, Kim C K, Ting A Y. Molecular tools for imaging and recording neuronal activity [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(2): 101-10.
- [21] Dolphin A C, Lee A. Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release [J]. Nat Rev Neurosci, 2020, 21(4): 213-29.
- [22] Tyler W J. Noninvasive neuromodulation with ultrasound? A continuum mechanics hypothesis [J]. Neuroscientist, 2011, 17(1): 25-36.
- [23] Ren Y, Zhu Y, Liu L, et al. Ultrasound induces contraction of the bladder smooth muscle [J]. Int Urol Nephrol, 2016, 48(8): 1229-36.
- [24] Fan W Y, Chen Y M, Wang Y F, et al. L-Type Calcium Channel Modulates Low-Intensity Pulsed Ultrasound-Induced Excitation in Cultured Hippocampal Neurons [J]. Neurosci Bull, 2024.
- [25] Debanne D, Inglebert Y, Russier M. Plasticity of intrinsic neuronal excitability[J]. Curr Opin Neurobiol, 2019, 54: 73-82.
- [26] Huang X, Lin Z, Wang K, et al. Transcranial Low-Intensity Pulsed Ultrasound Modulates Structural and Functional Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus
 [J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2019, 66(5): 930-8.
- [27] Fernandez-Trillo J, Florez-Paz D, Inigo-Portugues A, et al. Piezo2 Mediates Low-Threshold Mechanically Evoked Pain in the Cornea [J]. J Neurosci, 2020, 40(47): 8976-93.
- [28] Lai H C, Jan L Y. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels [J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(7): 548-62.
- [29] Adams P J, Rungta R L, Garcia E, et al. Contribution of calcium-dependent facilitation to synaptic plasticity revealed by migraine mutations in the P/Q-type calcium channel [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(43): 18694-9.

致 谢

行文至此,窗外正是艳阳朝天,绿茵盎然。犹记得初次报到的那天,也是这 样一个明媚日子,喧闹的蝉鸣仿佛序曲般拉开了大学生活的序幕,青涩地开启了 热闹繁忙的四年。而今虽无阵阵蝉鸣,但窗外时不时传来的鸟语、飘来的缕缕微 风却好似弹奏着一曲关于成长和蜕变的乐章。

感谢四年求学生涯中所遇到的良师益友,在学习和生活中所给予我的无私的 指导与帮助。尤其感谢我的导师薛磊教授对我的耐心的指导和关心,引导我独立 思考,使我一步步走向科研这条道路。薛老师总能事无巨细地关注到我科研进度 与成长,不仅鼓励我们在大组会中积极提问,更经常带领我通过小组会的形式讨 论文献和阅读书籍,弥补我在专业知识上的缺漏。薛老师每周还会专门抽出时间 给我讲解各类数据分析和作图软件的使用方法,带领我一同参与课题组文章发表 过程,使我对整个科研流程和科研规范有了具体而全面的了解。在每个月的工作 汇报中,薛老师对我的实验细节有着独到的见解和把握,总能一针见血地指出我 的问题并引导我少走弯路。在文章修改、论文答辩过程中,薛老师也总会不厌其 烦地与我一遍遍地讨论和修改。总而言之,从薛老师身上,我看到了科研人员的 专注与严谨,感受到了他对学生培养的关心和重视。

如果说薛老师是我科研道路上的旗帜与标杆,那么范文勇师兄就是我在科研 探索之路上的领航员,将我带进实验的大门。范师兄是我在课题组里交流最多也 是对我帮助最大的人,由于我和范师兄的研究方向相同,因此我在实验室所学习 到的每一个实验,都是在范师兄的指导下展开的。在我眼中,范师兄似乎是无所 不能的,无论是实验基础原理还是实验操作方法,无论是软件程序设置还是数据 采集分析,范师兄都能游刃有余地完成,不仅在自己的研究领域取得了突出的成 就,还乐于分享自己的经验和知识,帮助我解决科研中遇到的问题。范师兄不仅 在科研上给予了我莫大的帮助,更为我的未来规划和职业选择提供了许多启发和 建议,帮助我更加清晰的认识自己的兴趣和能力,让我能够在科研的道路上不断 前行,不断进步。此外,也感谢实验室的胡佳琦、黄盈莹、徐玥、潘成芳师姐和 王宇琦、胡家玮、高一鸣、陆炼师兄,感谢他们在日常学习和科研中给予我的指 导和帮助。

37

最后,感谢我的父母和家人,他们是我最扎实的精神后盾,每当我遇到困难 或悲伤时,他们总是在我身边支持我、鼓励我,给我力量和勇气。没有他们的支 持和爱,我无法取得今天的成就。

窗外的阳光逐渐柔和,似乎在为我送别本科这段难忘的时光,也为我展示着 未来的光明和希望。感谢这四年的大学时光,让我变得更加坚强、更加勇敢,让 我拥有了迎接未来挑战的勇气和信心。人生的旅程还很长,而我将怀揣着这份感 恩和勇气,继续前行,迎接更多未知的挑战,去探索更广阔的世界,去实现更多 的梦想。四年,只是人生中的一个起点,而我,将继续奔向更远的未来!