



大鼠出生后发育过程中脑细胞外间隙的解剖及生理特性的变化

杨双凤¹, 韩鸿宾^{2,3}, 彭 芸¹

(1. 首都医科大学附属北京儿童医院影像中心, 北京 100045; 2. 北京大学第三医院放射科, 北京 100191; 3. 磁共振成像设备与技术北京市重点实验室, 北京 100191)

【摘要】 大鼠脑发育是一个复杂的过程, 胎儿期及生后的脑发育过程经历了组织学、细胞学和分子学的显著变化。大鼠脑的基本结构在胚胎期已形成, 而不同部位之间的联系和脑功能的完善却在出生后发展, 其间的许多变异是许多神经系统疾病的基础, 因此生后脑发育过程仍然十分关键。尽管脑细胞微环境的概念已于150多年前被提出, 但是对于在生后发育过程中发生显著变化的脑细胞外间隙的研究仍未获得显著进展。本文通过综述大鼠生后发育过程中脑细胞外间隙的解剖及生理特性的变化规律特点, 阐述脑细胞外间隙在个体发育中的重要作用, 有望为儿科发育相关的神经系统疾病的发生机制及有效治疗途径的探索提供相关依据。

【关键词】 细胞外间隙; 迂曲度; 细胞外基质; 脑发育; 扩散

【中图分类号】 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2015) 03-0073-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.14

The anatomical and physiological changes of rat brain extracellular space during postnatal development

YANG Shuang-feng¹, HAN Hong-bin^{2,3}, PENG Yun¹

(1. Imaging Center, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China;
2. Department of Radiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;
3. Beijing Key Lab of Magnetic Resonance Imaging Device and Technique, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Rat brain development is a complicated process. There are significant changes of histology, cytology and molecular biology in the process of fetal and postnatal brain development. The basic structure of brain has formed in the prenatal period. While the formation of connections between different parts and the improvement of the function of the brain occur after birth, during which many of the variations are bases of the nervous system diseases, so the postnatal brain development is still very important. Although the concept of brain microenvironment has been proposed more than 150 years ago, the research about the changing extracellular space (ECS) during the postnatal brain development has yet to gain significant progress. The author reviewed the anatomical and physiological characteristics of ECS in the process of postnatal development of the rat, stating the important role of ECS in the individual development, which is expected to provide reliable evidences for the explore of mechanisms and effective treatment approaches of pediatric development related nervous system diseases.

[基金项目] 国家自然科学基金(31271161;81171080)。

[作者简介] 杨双凤(1986-), 女, 硕士。主要研究方向: 脑细胞外间隙的发育, E-mail: feier169@126.com。

[通讯作者] 彭芸, E-mail: ppengyun@hotmail.com。

【Key words】 Extracellular space; Tortuosity; Extracellular matrix; Brain development; Diffusion

脑细胞外间隙 (extracellular space, ECS) 是存在于细胞之间不规则的, 且相互连通的狭窄空隙, 有学者称之为组织通道^[1-2]。ECS 之间填充着细胞间液 (interstitial fluid, ISF), 其与脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 成分类似, 但存在不同, ISF 中还含有由长链大分子组成的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 它们浮在 ECS 中, 可以与细胞膜附着或完全游离。ECS、ISF 和 ECM 共同构成了脑细胞微环境 (brain extracellular microenvironment, BEM), 其中 ECS 更被强调是 BEM 最重要的组成部分, 在保证脑细胞间电信号传导的稳定性, 形成细胞与血液之间物质转运通道, 以及神经突触重塑过程中发挥关键作用。

神经元之间的相互作用通过突触传递和 ECS 中神经活性物质的扩散来实现。而神经胶质细胞没有突触, 其与神经元的交流只能通过 ECS 中离子和神经活性物质的扩散来实现。神经元和神经胶质细胞均可释放离子、递质和其他各种神经活性物质, 它们的扩散常超过一个突触, 到达离释放点更远的距离。物质通过 ECS 扩散并结合到突触外通常是高度联系的, 结合点位于神经元、轴突和神经胶质细胞。这种类型的非突触传递也称为突触外传递或容量传递 (神经活性物质在 ECS 空间内运动)^[3]。突触传递是传统的一对一联系, 而突触外传递是一对多的联系。因此, 细胞外间隙是神经元、轴突和胶质细胞之间突触外传递的信息通道。此外, ECS 中的扩散对于突触传递和神经元兴奋性也同样重要。

ECS 扩散参数是不稳定的, 在生理状态如发育、老化、神经元活动或特定生理条件下如哺乳, 可以发生显著的变化, 这与结构的改变如胶质增生、星形胶质细胞的重排过程和细胞外基质的缺失有关。ECS 也是不均匀的, 扩散性能在微观水平如不同类型细胞周围, 以及宏观水平如不同脑区之间是不同的。

1 脑 ECS 测量方法及其基本参数的定义与意义

1.1 脑 ECS 测量方法

目前, 针对神经元生存的微环境的测量技术可分为三类, 脑 ECS 局部测量技术, 脑 ISF 分析技术, 脑 ECS 与 ISF 成像测量技术。

1.1.1 脑 ECS 局部测量技术: 针对脑 ECS 的测量

方法主要包括选择性微电极法 (ion-selective microelectrodes, ISMs)^[4], 集成光学成像法 (integrative optical imaging, IOI)^[5-6], 最常用的是实时离子导入法 (real time iontophoresis, RTI), 用来监测四甲基铵离子 (tetramethyl-ammonium, TMA⁺) 浓度的变化, 即 RTI-TMA⁺ 技术。

1.1.2 脑 ISF 分析技术: 针对 ISF 内容物进行分析主要集中在脑 ISF 溶质成分、含量及其理化性状^[7], 如组织间液压力、pH 值、流动速率等; 另外一个重要的方向就是 ISF 引流途径。

1.1.3 脑 ECS 与 ISF 成像分析技术: 放射性示踪法^[3], 免疫组织化学染色^[8], 激光扫描共聚焦显微成像技术^[9-10] 在研究脑 ISF 引流途径中的应用越来越广泛, 如在体双光子成像技术、多光子激光扫描系统。磁共振成像分子示踪技术实现了对脑 ECS、ISF 的同时定量分析与测量, 并实现了包括脑深部的三维可视化在活体的测量技术^[11-13]。

1.2 脑 ECS 基本参数的定义及其在发育中的变化

中枢神经系统 ECS 中许多神经活性物质的扩散效能取决于各种物质的大小、电荷、形状、结构以及 ECS 的物理-化学性能, 后者随着某一特定脑区的组织结构不同而不同, 如在不同脑区、中枢神经系统发育过程、神经活动、激素释放、年龄增长和许多病理状态下^[14]。而且, 在同一条件下, ECS 内分子的迁移受扩散屏障引导, 因此扩散被限制在某一特定方向, 这就是说, 某一脑区的扩散是各向异性的^[15]。物质在 ECS 扩散的基本限制因素是 ECS 容积分数 (α : 神经组织允许物质扩散的有限容积) 和 ECS 迂曲度 (λ : 扩散物质在两个点间由于各种障碍而增加的路径, 如细胞膜及可能的长链糖蛋白和混合的物质)^[4]。除了容积分数和迂曲度, 物质向其他细胞的扩散可以被非特异性的浓度依赖性的细胞摄取 (k_c) 所影响^[4], k_c 反映了物质从 ECS 进入细胞、穿过血脑屏障或经过其它过程的清除或丢失。

ECS 容积、迂曲度和各向异性的改变可以显著影响中枢神经系统内神经活性物质的聚集和扩散, 从而影响神经-胶质的信息交流、胶质细胞突起与突触的空间关系、谷氨酸盐或 γ -氨基丁酸“溢出”的效能和突触的串连、细胞移动、激素的作用和神经活性物质的毒性效应, 并且对于诊断、药物传递和新的治疗方法的建立非常重要^[16]。

1.2.1 ECS 容积分数

ECS 容积分数 α 定义为 ECS 容积/总脑组织容积。早期使用冷冻置换固定方法试图保留 ECS 的电镜技术显示, 生后 10 d 鼠皮层的 α 值为 41% 并随着发育成熟而下降, 成年时为 22%^[16]。传统的鼠下丘固定提示生后 1 d 鼠的 α 值为 15%, 在成年时降至 8%^[17]。这项研究中报道的 ECS 的下降是由传统的电镜技术观察到的, 其随发育成熟逐渐变小的趋势是很明显的。由于很难用电镜技术保留 ECS, 所以现在常利用扩散技术来重新观察其大小。

Lehmenkuhler 等^[18] 运用 RTI-TMA⁺ 方法在鼠脑皮层进行一项广泛的研究, 证实生后 2~4 d α 值为 40%, 但是在生后 10~11 d, α 值为 27%, 这与 Bondareff 和 Pysh^[16-17] 发现的值相反, 并且之后 α 值稳定减小, 至生后 23 d 达 20%, 相当于成年水平, 这与皮层的伸展和神经胶质形成过程相一致。

此外, 生后发育过程中个体皮层灰质的不同层面和白质内扩散参数的改变是不一致的^[18]。生后 2~3 d 的动物, 皮层 III 和 IV 的 α 值(平均值 \pm 标准差)是 0.36 ± 0.04 , 皮层 V 是 0.38 ± 0.02 , 皮层 VI 是 0.41 ± 0.01 , 白质是 0.46 ± 0.01 。 α 值最早降低是在生后 6~7 d 时出现在皮层 V 和 VI, 在生后 8~9 d 皮层 III 和 IV 降低, 在生后 10~11 d 白质降低。 α 值的进一步显著减少出现在生后 10~21 d 之间, 全脑皮层特别是白质的 α 值迅速减小。生后 21 d 至成年时期(90~120 d) α 值再无进一步降低。成年后 α 值在皮层 II - VI 及白质分别为: 0.19 ± 0.002 、 0.20 ± 0.004 、 0.21 ± 0.003 、 0.22 ± 0.003 、 0.23 ± 0.007 和 0.20 ± 0.008 。相似的, 通过 DWI 方法发现水的表观扩散系数 (ADC_w) 在生后皮层及白质发育中显著降低^[19], 可以提示, ADC_w 的降低与 ECS 大小的改变有关。

ECS 容积分数在脑发育过程中的上述改变有其特定的生理基础。较大细胞外间隙的出现伴随着大量树突和轴突的生长而细胞外间隙的变小则伴随着复杂细胞联系的发展^[20]。灰质的总厚度在生后第一个 15 d 几乎是翻倍的, 这是神经元大量生长和迁移的阶段, 其间胶质纤维酸性蛋白 mRNA 经历两次发育表达, 灰质内出现大量胶质。而 ECS 容积从出生至生后 15 d(星形细胞增殖期)增加, 随后开始下降直至生后 55 d(星形细胞变形分化期)^[21]。因此, 星形细胞增殖期与生后灰质 ECS 容积分数降低的时间进程相一致。然而, 白质的厚度从生后 15~21 d 开始增加, 相应的, 其 α 值的第一次显著降

低的时间也晚于皮层, 生后 10~11 d 白质的 α 值几乎是生后 20 d 及以上鼠脑白质的两倍, 这提示 α 值在广泛髓鞘化阶段迅速下降, 这发生在生后第 2~3 周尤其是第 3 周。在生后 21 d 以后, 灰质和白质 α 值保持不变。因此, 细胞内和细胞外容积的比值在脑发育成熟过程中是发生变化的, 总脑容积的增加是由细胞密度的增加、细胞移行、轴突生长、树突萌芽和神经胶质细胞成熟引起的。皮层灰质及皮层下白质的生长和成熟与 ECS 容积分数的减小呈负相关。

1.2.2 迂曲度

ECS 的迂曲度 λ 定义为 $(D/D^*)^{1/2}$, D 表示自由扩散系数, D^* 表示物质在神经组织中的扩散系数。迂曲度代表扩散屏障的大小和数量, 健康成年动物脑组织的 λ 约为 1.6, 这表示物质在大脑内的扩散比在自由介质慢 2.6 倍^[22]。这只在分子或离子远小于 ECS 的宽度时适用, 对于大分子, λ 是增大的, 一部分原因是大分子在通过 ECS 时与其狭窄通道壁的接触频率增加^[23]。

迂曲度的主要影响因素有两个: 几何构型和细胞外基质。要讨论 ECS 的几何构型需要意识到 ECS 在某种意义上是一个连接良好的区域, 在任何两个相隔几十微米的位置之间, 有多条路径可以通过 ECS。当分子在两点之间的运动被迫通过更迂曲的路径时, 运动时间将会增加, 导致 D^* 减小, 而 λ 增大。关于生后发育过程中迂曲度的变化趋势尚不明确, 有研究显示从生后 2~4 d 至成年, λ 值保持在 1.5~1.6 范围内^[4], 而对于这一结果产生的机制却缺乏充分的依据。在某些病理状态下, 迂曲度可能发生改变, 如发育不良皮层区域的扩散由于扩散屏障的增加而受影响, 导致迂曲度的增加, 可能是由于以下几种原因: 皮层层化的消失, 细胞外基质分子的蓄积如肌腱蛋白和星形细胞化过程的增加, 已有研究证实肌腱蛋白 R 或肌腱蛋白 C 缺陷的鼠具有较低的迂曲度^[15]。

1.2.3 各向异性扩散

迂曲度是一个张量, 具有方向依赖性^[24], 迂曲度的方向依赖性导致扩散在各个方向是不一致的, 即所谓的各向异性扩散, 其通常是 ECS 内物质和水分子沿一个方向上的直捷通道运动(如, 沿着胼胝体轴突)并因此可能是某一程度的突触外传递特异性的一个因素。

白质内各向异性扩散在发育过程中是增加的:

鼠在生后 4~9 d,未完全髓鞘化的胼胝体的扩散是各向同性的,但是随着髓鞘化进展,扩散越来越趋向于各向异性,在生后 21~23 d 髓鞘阻碍垂直于轴突走行方向的扩散,即在横过神经纤维的方向测量鼠胼胝体的迂曲度,发现其明显增加^[25],但是对于沿着轴突方向的扩散只有轻微的影响。也有研究提示鼠从出生至生后 12 d 胼胝体的扩散为各向同性,但是从生后 13~17 d 各向异性逐渐增加,除了髓鞘化过程,发生这一变化的另一个可能原因是鼠脑神经胶质的产生及伸展^[15]。在胼胝体观察到的这种趋势在鼠脊髓也同样出现,但是不太显著。 ADC_w 在髓鞘化过程中下降,这种下降在垂直轴突的方向尤为显著^[15]。此外,神经胶质细胞能够通过产生不同的细胞外基质分子及其自身的过度生长或增殖形成扩散屏障来影响各向异性扩散。

1.2.4 非特异性摄取

非特异性摄取 k' ,在生后脑发育过程中在不同的皮层和白质内也均没有显著差异,波动在 $3.3 \times 10^{-3}/s$ 到 $6.3 \times 10^{-3}/s$ 之间,提示未成熟组织的非特异性细胞摄取与成熟组织相似^[18]。已有多项动物和人体实验均表明^[26-28],ISF 及其内溶质存在于毛细血管和动脉壁中膜与外膜之间的血管周围间隙中,并沿血管周围间隙从脑内引流至颈部淋巴结^[29]。不同脑区 ECS 中物质的清除途径和方式也不尽相同,起自尾状核深部灰质的 ISF 沿各级动脉血管周围间隙(perivascular space, PVS),于软脑膜动脉穿越软脑膜时,经软脑膜的淋巴孔进入蛛网膜下腔(subarachnoid space, SAS),随后一部分随 CSF 通过神经周围的毛细淋巴管,穿过筛板至鼻粘膜等处的毛细淋巴管,进入颈淋巴结等颅外淋巴系统^[27];另一部分被 SAS 绒毛吸收,通过颅内静脉系统^[28]进入血循环。而白质区 ECS 中物质的引流则多经过扩散方式,沿神经纤维束流动,通过室管膜上皮转运入脑室,然后进入 SAS^[27]。

2 脑 ECS 在生后发育过程中发生变化的影响因素

2.1 神经胶质细胞

胶质细胞在神经组织内的功能是多方面的,包括血脑屏障形成、营养支持、发育功能、细胞外间隙 pH 值和离子稳态的控制,以及轴突的电绝缘^[3]。星形细胞在发育中的作用是指导神经元的迁移,影响神经元形态学的表型表达并参与突触重塑^[30]。生后 ECS 容积分数减小的时间进程与生后离子内

环境稳态的改变相一致。在生后早期,离子和容量的稳态是易受损的,可能是由于神经胶质的产生未完成。在未成熟脑自发性活动的某一水平常伴随着可以导致胶质细胞严重肿胀的细胞外离子改变,也与胶质增生过程中 ECS 容积降低相一致^[18]。因此,我们可以假设神经胶质细胞的形态学和功能上的成熟对生后发育过程中 ECS 容积分数的减小起到很重要的作用。

水通道蛋白 4(Aquaporin 4, AQP4)是在脑血管周围星形细胞足突高度表达的水分子选择通道家族的一员^[31]。水通道蛋白参与水稳态及中心血浆渗透压调节,并且有研究证实 AQP4 在急性脑损伤后引起脑水肿形成中具有重要作用^[32]。AQP4 表达水平在未成熟脑是低的,在出生后随个体发育逐渐增加^[33],而关于 AQP4 表达水平的高低对扩散和迂曲度的影响则尚未有一致的结果。

Badaut 等^[34]运用 MRI 方法测量的表观扩散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)值代表水分子在组织内的运动。水分子扩散可以是细胞外的,细胞内的和跨越细胞膜的,而 ADC 值反映这三种成分。有研究证实病理状态下,如低氧缺血和脑积水,ADC 值与 AQP4 表达水平直接相关^[35-36]。相继地,有研究^[34]采用 RNA 干预敲除 AQP4 表达,证实消除 AQP4 表达导致正常脑组织水分子运动的降低,在 MRI 上表现为 ADC 值的降低,由此得知,星形细胞,特别是他们的水通道,在水分子运动中起到重要作用。ADC 值的降低在神经影像中通常被解释为细胞毒性水肿的反映,可能是由于 AQP4 表达的降低。而 Xiao 等^[37]运用 IOI 方法发现 AQP4 缺失导致容积分数增加,而迂曲度不变,即说明扩散系数是不随 AQP4 表达量的多少而变化的。Yao 等^[38]也表明离体和在体状态下通过小的四甲铵阳离子(MW 74)测量 AQP4 缺失的鼠新皮层的迂曲度仍保持不变。但是,Devin K 等^[39]通过光漂白方法发现 AQP4 缺失的鼠 ECS 增大,大分子的扩散增强。上述方法提出的 AQP4 表达降低引起细胞外间隙扩散系数的变化各不相同,甚至相互矛盾。

2.2 细胞外基质

ECS 内的溶液不是单一的氯化钠溶液,其包含大量葡萄糖胺聚糖(如透明质酸盐)、糖蛋白和蛋白聚糖,它们构成细胞外基质。目前已经报道多种 ECS 分子和粘附分子,如纤维结合蛋白,肌腱蛋白,层粘连蛋白等^[29],其含量在发育、老化、损伤恢复和

许多病理过程中会发生动态变化。肌腱蛋白 R 和肌腱蛋白 C 缺乏的鼠四甲铵的表现扩散系数 (ADC_{TMA}) 和水的表现扩散系数 (ADC_w) 表现出显著的变化,提示细胞外基质分子在 ECS 扩散中具有重要作用。肌腱蛋白 C 主要在神经和非神经组织发育的早期阶段表达^[40],相反,肌腱蛋白 R 在个体发育中表达较晚,并且其表达一直持续到成年。Sykova 等^[41]对鼠皮层和海马的研究均表明肌腱蛋白 R 缺失导致 α 和 λ 的显著降低,而研究表明发育早期阶段 α 值较成年时大,由此可知幼年时较大的 α 值可能受其他因素影响。

ECM 分子是由神经元和胶质细胞产生的。前面提到迂曲度的两个主要影响因素是几何构型和细胞外基质,后者可以减慢各种神经活性物质在 ECS 的扩散。细胞外基质与扩散分子的相互作用通过以下几种可能机制:粘性或 ECS 内多聚分子的高密度产生位阻现象,基质内带负电荷的成分与运动分子阳性成分的静电相互作用,和特异性结合(空间吸引)^[22]。肌腱蛋白 R 或 C 缺陷的鼠不仅具有较低的迂曲度,而且具有更小的 ECS 容积分数^[42]。上述发现可以提示这些分子对于保持细胞结构分离,如保持 ECS 在其最佳大小是很重要的。

透明质酸酶和软骨素硫酸盐蛋白聚糖是 ECM 的必要成分,形成海马和皮层内围绕神经元的神经元周围网络(perineuronal net, PN)。发育过程中 PN 形成围绕在细胞体和中间神经元邻近树突突触的晶格状结构,并影响突触发育和稳定性。虽然 PN 的确切功能尚不清楚,但是其很有可能与维持现有突触的稳定性、阻止成熟神经元的新突触形成以及维持 ECM 与细胞骨架的连接有关,并可能影响神经元-星形细胞的相互作用^[43],PN 在中间神经元的突触周围定位可能提示其在维持突触稳定性中的作用。

发育过程中,细胞外环境是可溶的,一部分原因是透明质酸表达量较高,透明质酸可以与水相互作用并组织协调水的分布,为轴突移行和细胞运动性提供了较大的含水空间。在成年,透明质酸表达水平较低,并且可溶性更低。这些相互作用形成细胞外间隙的不溶性系统。这些不溶性系统似乎也在成熟神经系统可塑性和运动性的降低中起到重要作用。

综上所述,ECM 在 CNS 的发育中起重要作用,通过协调组织这一空间,使间隙内其他分子和细胞

处于最佳状态。ECM 有助于神经元功能的多样性,包括增殖、移行、形态分化、突触形成、突触稳定性和细胞信号级联^[44]。

3 脑 ECS 在发育中的意义

ECS 起信息通道作用的观点受到越来越多人的支持。发育中鼠脑内相对较大的 ECS 空间可能影响 ECS 内离子和神经活性物质的聚集和代谢。当 ECS 容积分数减小的时候,任何存在于或释放到 ECS 的物质浓度则相应的增加。

发育中相对较大的 ECS 容积分数会对由细胞释放的物质产生强烈的稀释作用,这对机体来说是一种保护性机制。在一些病理事件如缺氧、痉挛或扩散性抑制过程中出现的较大的活性相关的离子可能会减少,并且兴奋性氨基酸、抑制性递质以及与那些病理状态有关的代谢物质会过度聚集。未成熟脑对于低氧、缺血和癫痫的相对敏感性比成年脑小^[45],如在未成熟的海马,较大的细胞外间隙代表未成熟组织对于兴奋性刺激具有更强的抵抗性。

我们已经知道未成熟的中枢神经系统与成熟的不同,因为其血管化未完成,并且神经胶质细胞(其被假定为溶质和小分子的跨细胞转移路径)发育不完全,外部的神经胶质限制性膜也还没有完全建立。鼠大脑皮层内血管的生长在生后第一个 10 d 内同时出现。鼠在生后第一个 10 d, ECS 较大但是开放的血管很少,但是,在生后第二个 10 d,大多数血管出现开放的管腔以及由星形细胞终足形成的血管周围鞘,且 ECS 变小^[20]。因此, ECS 的大小与血管化的程度可能存在反相关,而且 ECS 可能在血管贯穿入脑之前为代谢产物运输提供主要的路径。从另一方面,扩散可能对传递可溶性物质进入细胞有效,并且扩散可能是神经元、树突、胶质细胞广泛生长之前的有效的传递形式,且先于血管化的发育^[18]。

发育过程的其它一些方面(如迁移过程的调控)也有可能依赖于 ECS 内扩散梯度的存在。多肽、激素和生长因子,以及不易透过细胞膜的药物的扩散在更大的 ECS 内会更加容易,但是在较小的 ECS 内扩散会减慢。

4 总结与展望

脑细胞外间隙是神经元生存的微环境,其正常功能对维持细胞间电信号传导、物质转运和神经突

触重塑等都具有重要意义,在生后脑发育过程中,ECS 的解剖结构及生理性能均发生变化,这一变化与多种因素有关。但是目前为止神经科学的主要进展基本都是基于 1930 年代西班牙卡哈尔的神经元学说,而对于神经元所生存的微环境一直以来都是关注的盲区^[46]。以往对于 ECS 的研究比较零散,结果有时互相矛盾,一个原因是其只能局部测量,缺少整体的宏观的解剖生理学结果支持,另一个问题是关于研究方法的模型选择与简化,参数拟合中一个尚未解决的问题是脑 ECS 与扩散分子之间电荷的相互作用,该项在扩散方程中的存在仍无定论。近年来,由 Han H^[47] 等人提出的 Gd-DTPA 介导的磁共振示踪成像法可以实现对全脑的实时、动态和可视化的定量研究,目前已完成成年鼠全脑 11 个脑区的组织通道生理特性的研究,对于发育中鼠脑的研究也正在进行。

脑发育是一个复杂的过程,其中的变异是许多神经系统疾病的基础,美国的“通过推动创新型神经技术开展大脑研究”计划也将脑发育放在重要位置。脑细胞外间隙研究在脑发育中的应用是认识发育中神经活动规律及脑病发生发展机制的重要课题。此外,脑细胞外间隙在脑病治疗和认知科学发展中具有广阔的研究前景和学术价值,脑科学研究也将进入神经细胞与神经细胞生存的微环境并行发展的新时代。

参考文献:

- [1] 王国卿,封丽芳,夏作理. 脑内物质的淋巴引流与脑细胞微环境[J]. 中国微循环,2005,9(3):215-218.
- [2] 田牛,李玉珍,刘凤英. 脑微循环的特点[J]. 微循环学杂志,1999,9(3):40-44.
- [3] Sykova E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space [J]. *Physiol Rev*, 2008,88(4):1277-1340.
- [4] Kilb W, Dierkes PW, Sykova E, *et al.* Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus[J]. *J Neurosci Res*. 2006,84(1):119-129.
- [5] Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Probing the extracellular diffusion of antibodies in brain using in vivo integrative optical imaging and ex vivo fluorescence imaging[J]. *J Control Release*. 2015,10;197:78-86.
- [6] Thorne RG, Hrabetova S, Nicholson C. Diffusion of epidermal growth factor in rat brain extracellular space measured by integrative optical imaging[J]. *J Neurophysiol*, 2004,92(6):3471-3481.
- [7] Birngruber T, Ghosh A, Perez-Yarza V, *et al.* Cerebral open flow microperfusion: a new in vivo technique for continuous measurement of substance transport across the intact blood-brain barrier[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013,40(12):864-871.
- [8] Syková E, Mazel T, Simonová Z. Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging[J]. *Exp Gerontol*. 1998,33(7-8):837-851.
- [9] Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006,103(14):5567-5572.
- [10] Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, *et al.* Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008,34(2):131-144.
- [11] Han H, Li K, Yan J, *et al.* An in vivo study with an MRI tracer method reveals the biophysical properties of interstitial fluid in the rat brain[J]. *Sci China Life Sci*, 2012,55(9):782-787.
- [12] Xu F, Han H, Zhang H, *et al.* Quantification of Gd-DTPA concentration in neuroimaging using T(1)3D MP-RAGE sequence at 3.0 T[J]. *Magn Reson Imaging*, 2011,29(6):827-834.
- [13] Han H, Xia Z, Chen H, *et al.* Simple diffusion delivery via brain interstitial route for the treatment of cerebral ischemia[J]. *Sci China Life Sci*, 2011,54(3):235-239.
- [14] Nicholson C, Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis [J]. *Trends Neurosci*, 1998,21(5):207-215.
- [15] Vargova L, Sykova E. Extracellular space diffusion and extrasynaptic transmission[J]. *Physiol Res*, 2008,57 Suppl 3: S89-S99.
- [16] Bondareff W, Pysh JJ. Distribution of the extracellular space during postnatal maturation of rat cerebral cortex[J]. *Anat Rec*, 1968,160(4):773-780.
- [17] Pysh JJ. The development of the extracellular space in neonatal rat inferior colliculus: an electron microscopic study[J]. *Am J Anat*, 1969,124(4):411-429.
- [18] Lehmenkuhler A, Sykova E, Svoboda J, *et al.* Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis [J]. *Neuroscience*, 1993,55(2):339-351.
- [19] Sizonenko SV, Camm EJ, Garbow JR, *et al.* Developmental changes and injury induced disruption of the radial organization of the cortex in the immature rat brain revealed by in vivo diffusion tensor MRI[J]. *Cereb Cortex*, 2007,17(11):2609-2617.
- [20] Edgar LT, Underwood CJ, Guilkey JE, *et al.* Extracellular matrix density regulates the rate of neovessel growth and branching in sprouting angiogenesis[J]. *PLoS One*. 2014, 22;9(1):e85178.
- [21] Riol H, Fages C, Tardy M. Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain [J]. *J Neurosci Res*, 1992,32(1):79-85.

- [22] Nicholson C, Kamali-Zare P, Tao L. Brain Extracellular Space as a Diffusion Barrier[J]. *Comput Vis Sci*, 2011,14(7):309-325.
- [23] Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006,103(14):5567-5572.
- [24] Vorisek I, Sykova E. Measuring diffusion parameters in the brain: comparing the real-time iontophoretic method and diffusion-weighted magnetic resonance[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009,195(1):101-110.
- [25] Vorisek I, Sykova E. Evolution of anisotropic diffusion in the developing rat corpus callosum [J]. *J Neurophysiol*, 1997,78(2):912-919.
- [26] Polfliet MM, Zwijnenburg PJ, van Furth AM, *et al.* Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis [J]. *J Immunol*, 2001,167(8):4644-4650.
- [27] Clapham R, O'Sullivan E, Weller RO, *et al.* Cervical lymph nodes are found in direct relationship with the internal carotid artery: significance for the lymphatic drainage of the brain[J]. *Clin Anat*. 2010,23(1):43-47.
- [28] Dickstein JB, Moldofsky H, Lue FA, *et al.* Intracerebroventricular injection of TNF-alpha promotes sleep and is recovered in cervical lymph[J]. *Am J Physiol*, 1999,276(4 Pt 2):R1018-R1022.
- [29] Kida S, Steart PV, Zhang ET, *et al.* Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages [J]. *Acta Neuropathol*, 1993,85(6):646-652.
- [30] Macaulay N, Zeuthen T. Glial K(+) clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps[J]. *Neurochem Res*, 2012,37(11):2299-2309.
- [31] Venero JL, Burguillos MA, Brundin P, *et al.* The executioners sing a new song: killer caspases activate microglia[J]. *Cell Death Differ*, 2011,18(11):1679-1691.
- [32] Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, *et al.* Water movements in the brain: role of aquaporins[J]. *Trends Neurosci*, 2008,31(1):37-43.
- [33] Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, *et al.* Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier[J]. *J Cell Sci*, 2001,114(Pt 7):1297-1307.
- [34] Badaut J, Ashwal S, Adami A, *et al.* Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011,31(3):819-831.
- [35] Meng S, Qiao M, Lin L, *et al.* Correspondence of AQP4 expression and hypoxic-ischaemic brain oedema monitored by magnetic resonance imaging in the immature and juvenile rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2004,19(8):2261-2269.
- [36] Tourdias T, Brochet B, Petry KG, *et al.* [Magnetic resonance imaging of central nervous system inflammation][J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2009,165 Suppl 3:S77-S87.
- [37] Xiao F, Hrabetova S. Enlarged extracellular space of aquaporin-4-deficient mice does not enhance diffusion of Alexa Fluor 488 or dextran polymers[J]. *Neuroscience*, 2009,161(1):39-45.
- [38] Yao X, Hrabetova S, Nicholson C, *et al.* Aquaporin-4-deficient mice have increased extracellular space without tortuosity change [J]. *J Neurosci*, 2008,28(21):5460-5464.
- [39] Binder DK, Papadopoulos M C, Haggie P M, *et al.* In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching [J]. *J Neurosci*, 2004,24(37):8049-8056.
- [40] Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function [J]. *Matrix Biol*, 2000,19(7):581-596.
- [41] Sykova E, Vorisek I, Mazel T, *et al.* Reduced extracellular space in the brain of tenascin-R- and HNK-1-sulphotransferase deficient mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2005,22(8):1873-1880.
- [42] Evers MR, Salmen B, Bukalo O, *et al.* Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C[J]. *J Neurosci*, 2002,22(16):7177-7194.
- [43] Merae PA, Baranov E, Sarode S, *et al.* Aggrecan expression, a component of the inhibitory interneuron perineuronal net, is altered following an early-life seizure[J]. *Neurobiol Dis*, 2010,39(3):439-448.
- [44] Kwok JC, Dick G, Wang D, *et al.* Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair[J]. *Dev Neurobiol*, 2011,71(11):1073-1089.
- [45] Kilb W, Dierkes PW, Sykova E, *et al.* Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus[J]. *J Neurosci Res*, 2006,84(1):119-129.
- [46] 韩鸿宾. 神经元学说的补丁—脑细胞生存的微环境[J]. *科技导报*, 2012(26):71-74.
- [47] Han H, Li K, Yan J, *et al.* An in vivo study with an MRI tracer method reveals the biophysical properties of interstitial fluid in the rat brain[J]. *Sci China Life Sci*, 2012,55(9):782-787.