

脑细胞外间隙的电化学分析与成像研究进展

金靖^{1,2} 吴菲^{1,2} 于萍^{1,2} 毛兰群^{*1,2}

¹(北京分子科学国家研究中心,中国科学院化学研究所活体分析化学重点实验室,北京 100190)

²(中国科学院大学,北京 100049)

摘 要 脑细胞外间隙(Extracellular space, ECS)是指细胞膜外充满液体的空间,约占脑体积的 1/5。作为神经元和胶质细胞赖以生存的环境,ECS 在为细胞输送物质的同时,又能保障神经元静息电位的稳定和动作电位的发生,与大脑的基本功能如突触传递、记忆、睡眠和疾病的过程等息息相关。本文着重介绍了 ECS 的基本生物物理特性,综述了利用电化学和成像方法开展体积分数和迂曲度研究的主要进展,并阐述了 ECS 在生理和病理过程中的变化规律。

关键词 细胞外间隙; 电化学分析; 成像; 体积分数; 迂曲度; 评述

1 引言

作为人体的高级神经中枢,大脑在维持人体各项生理功能的过程中发挥着不可替代的作用,因此,脑科学研究对理解各种生命过程具有重要意义。脑神经系统的基本组成单元是神经元,人类的脑中有数千亿神经元。脑神经功能的正常行使依赖于神经纤维的电信号传递和不同神经元之间突触间隙的化学信号传递。除神经元外,脑内还存在大量的胶质细胞,占脑重量的 1/2,数量是神经元的 10 ~ 50 倍^[1]。胶质细胞虽然缺乏传递电信号的功能,但其通过营养、保护、调节等多种方式维系神经元活动,在神经活动中也扮演着重要的角色。脑作为人体最重要的器官,除脑细胞外,细胞之间的间隙(如突触间隙)也在脑神经生理和病理过程发挥着重要的作用。

脑细胞外间隙(Extracellular space, ECS)^[2]是指神经细胞膜外充满液体的空间,主要包括细胞间隙、血管和脑室等。脑室充满无色透明的液体,即脑脊液(Cerebrospinal fluid, CSF)。在人的 CSF 中,除葡萄糖、少量蛋白和少量的单核细胞、淋巴细胞外,还包括无机盐离子,如 Na⁺(约 150 mmol/L)、K⁺(约 3 mmol/L)、Ca²⁺(约 1.2 mmol/L)、Mg²⁺(约 1.2 mmol/L)、Cl⁻(约 120 mmol/L)和 HCO₃⁻(约 20 mmol/L)。细胞间隙充满细胞间液,与 CSF 成分类似,但与 CSF 不同的是,细胞间液中含有长链大分子的细胞外基质,包括硫酸软骨素、硫酸肝素、透明质酸和膜蛋白质等^[2~4]。此外,细胞外基质是负电性的,可能影响离子或带电分子在 ECS 中的传递。尽管 ECS 还包括血管和脑室,但 ECS 的研究主要是针对细胞间隙而展开,一般会忽略 ECS 和细胞间隙的差别。ECS 特性的研究对理解和认识脑功能具有重要意义^[3,4]。一方面,ECS 为神经元提供丰富的离子,保证静息电位的维持和动作电位的发生,从而实现稳定的电信号传递;另一方面,ECS 为细胞输送营养物质、代谢产物和信息分子,保障细胞的生存需求并介导细胞间的通讯。此外,ECS 在神经突触和细胞连接的重塑过程中也发挥重要作用。

长期以来,脑科学研究多集中于神经元和胶质细胞构成的神经网络,而对于 ECS 的研究却相对较少。直到 20 世纪中叶,ECS 才受到关注。目前,ECS 的研究主要集中在部分微区的结构变化和分子的扩散行为。本文介绍了 ECS 的生物物理特性,以 ECS 两个参量(体积分数和迂曲度)为研究对象,对 ECS 的主要研究方法以及 ECS 在脑生理和病理过程的变化规律研究进行了评述。

2 生物物理特性

ECS 具有非均匀性和各向异性^[5,6]。非均匀性是指不同位置的脑组织其 ECS 有所差别,体现在不

2019-07-30 收稿; 2019-08-27 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 21790390, 21790391, 21621062, 21874139)和国家重点研发计划项目(No. 2018YFE0200800)资助

* E-mail: lqmao@iccas.ac.cn

同脑区和亚区。例如, 乌龟小脑皮层的颗粒细胞层 ECS 和分子层 ECS 有明显差别^[5]。ECS 是各向异性的, 其流体流速和分子扩散是矢量的, 换言之, 它们既有大小又有方向。例如, 分子更容易沿着轴突束传递, 而不是横向穿过轴突束^[6]。目前主要通过以下若干生物物理参量对 ECS 的结构进行描述。

体积分数 (Volume fraction, α) 代表 ECS 的体积占脑体积的百分比^[7], 即 $\alpha = V_{\text{ECS}}/V_{\text{tissue}}$ 。 α 具有非均匀性且动态变化, 不同生理和病理状态的 α 不同, 通常 α 在 0.15 ~ 0.30 之间, 但全脑发生缺血时会导致细胞发生水肿, α 会下降至 0.05^[8,9]。

分子在 ECS 中以扩散 (Diffusion) 的形式传递时会受到脑组织结构的阻碍, 这种阻碍作用可用迂曲度 (Tortuosity, λ) 表示^[7]。 $\lambda = (D/D^*)^{1/2}$, 其中, D 为分子的自由扩散系数, D^* 为分子在脑组织中的有效扩散系数。 λ 反映了分子在 ECS 中扩散的难易程度。在健康的脑中^[7], $\lambda \approx 1.6$ 。

细胞间隙的真实距离很难直接测得。电子显微镜表征细胞间隙为 10 ~ 20 nm^[10,11]; 而有些外源性大分子, 如聚蔗糖 (水合半径为 20 nm) 或量子点^[12] (水合半径为 17 nm), 可在细胞间隙扩散, 即至少一部分细胞间隙具有足够的距离, 允许这些大分子通过。

体流 (Bulk flow)^[13] 的来源尚未明确, 可能是血脑屏障分泌的液体在细胞间隙流动, 之后汇入脑脊液或进入淋巴管。文献 [14, 15] 提供了体流最直接的证据。Cserr 研究组^[16] 还检测了不同分子的流出速率, 虽然其扩散系数有明显差别, 但流出速率基本一致。他们还认为, 体流仅发生在毛细血管的周围间隙^[17]。据估计, 脑白质^[18] 体流流速约为 10.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ 。

3 ECS 的研究历史和理论基础

3.1 ECS 的研究历史

20 世纪中叶, 关于 ECS 的争论十分激烈^[11]。一方面, 通过固定脑组织, 以电子显微镜为手段直接观测二维区域的 ECS (图 1)^[19]。然而, 该方法只能测定 α , 且仅限于失活的脑组织; 此外, 脑组织经过固定和化学处理后有可能导致 ECS 的变化。最初电镜显示^[11,20], ECS 仅占脑体积的 5%, 甚至无法观测到 ECS; 而脑组织通过冷冻技术固定^[21] 后, 测得 α 为 0.15 ~ 0.20。但是, 冷冻过程形成的冰晶有可能会增大 α 。另一方面, 以细胞膜外探针分子或标记物的扩散分布可量化三维区域 ECS^[21], 该方法可同时测定 α 和 λ 。更重要的是, 扩散方法可在活体上研究 ECS 的动态变化。然而, 该方法对探针分子的要求较高。

早期实验测量脑中 Na^+ 和 Cl^- 分布的结果表明, ECS 可能占据高达 40% 的脑体积^[11]。而研究人员意识到 Na^+ 和 Cl^- 在细胞内有明显的分布后, 使用放射标记的蔗糖和菊粉测量 ECS 的 α 为 0.15 ~ 0.20^[21]。

Rall、Fenstermacher 和 Patlak 是利用扩散方法研究 ECS 的先驱^[21~23], 他们通过研究放射性示踪剂在脑内的扩散, 反映 ECS 的结构特征。在早期研究中, 研究人员将放射标记的蔗糖或菊粉注射至动物脑室, 通过脑切片获得其分布, 并测得 α 为 0.15 ~ 0.20, λ 为 1.52 ~ 1.64。放射性示踪剂的扩散发生在活体中, 但定量是在动物处死后某一时间点进行的, 因此该方法没有得到普遍使用。尽管如此, 其获得的数据可为其它方法提供独立的验证。不使用放射性示踪剂的实时分析技术最早由 Lux 等^[24] 建立, 后来得到了 Nicholson 等^[7] 的改进。如图 2^[19] 所示, 该方法先将探针离子或分子从玻璃毛细管中释放到脑组织后, 探针在 ECS 发生扩散, 然后在不同的位置利用离子选择性微电极或碳纤维电极, 结合电位法、伏安法或安培法等电化学方法, 检测所释放的探针浓度, 依据 Fick 第二定律得到 ECS 的生物物理参数。该方法能够研究多种探针在可控距离的扩散, 并实时监测探针在 ECS 的扩散和代谢情况, 且不受脑区深度限制, 是目前较理想的研究 ECS 的方法之一。

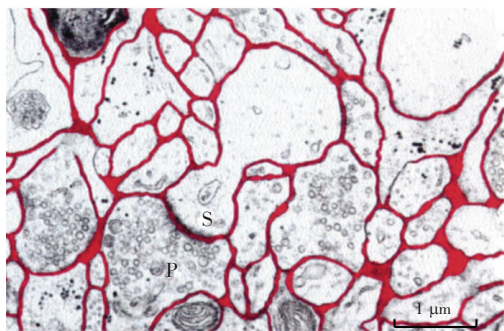


图 1 大鼠皮层树突棘和突触的电镜图像^[19]。红色的区域为 ECS, “S” 为树突棘, “P” 为突触小体

Fig. 1 Electron microscopy image of rat cortex with dendritic spine and synapse^[19]. Extracellular space (ECS) is outlined in red. “S” represents dendritic spine, and “P” represents presynaptic terminal

3.2 理论基础

探针被递送到 ECS 后会扩散,利用合适的方法对探针进行检测,可反映 ECS 的某些生物物理特性。通常,检测的距离约 100 μm ,短距离可确保 ECS 的均匀性。探针在 ECS 中的扩散基本符合 Fick 第二定律,但需要进行合理的修正^[3,4,7,11,25]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{D}{\lambda^2} \nabla^2 C + \frac{Q}{\alpha} - v \cdot \nabla C - \frac{f(C)}{\alpha} \quad (1)$$

等号左边是给定位置探针浓度 C 随时间 t 的变化。等号右边第一项是扩散本身的贡献;第二项是玻璃毛细管在 ECS 中释放探针的量 Q ;第三项表示体流的可能贡献,其为速度矢量 v 和浓度梯度 ∇C 的乘积;最后一项 $f(C)$ 表示探针在 ECS 中的不可逆损失。

探针的选择非常重要,不合适的探针不能准确反映 ECS。本质上,ECS 的研究目的决定使用探针的类型。第一类研究通过量化两个生物物理参数(α 和 λ) 反映 ECS 的性质。为此,探针应满足以下要求^[4,7]:分子足够小且是水溶性的,以探索脑内所有区域的 ECS;对脑组织无毒且浓度足够低,不影响脑组织的渗透压;与 ECS 无相互作用且不易被清除,能准确测定其浓度。这种理想的探针将探索 ECS 的所有通道,并真实反映 ECS 性能参数。第二类研究则使用不同于上述要求的探针,来尝试解决以下问题:细胞间隙大小;分子之间或分子与细胞外基质的相互作用(非特异性或特异性结合);分子是否进入细胞或穿过血脑屏障。这样的探针可能不会到达 ECS 的所有通道,也可能被保留在 ECS 或进入细胞。

4 ECS 的研究方法

ECS 的研究方法按测量方法可分为形貌测量法(电子显微镜)、电化学方法(电位法、伏安法和安培法)、光学方法和磁共振成像法;按 ECS 中分子传递方式可分为扩散方法和电渗方法;按探针递送方式可分为直接注射法、离子导入法和压力导入法。本文以 ECS 两个主要生物物理参数(α 和 λ) 为测定对象,对 ECS 的主要研究方法进行分类评述。

4.1 体积分数(α)的测定方法

目前,除电子显微镜和放射性示踪法,可测定 α 的方法还有实时离子导入法。实时离子导入法(Real-time iontophoretic method, RTI)^[7,26] 是通过离子导入的方法,将探针离子导入脑组织,并用离子选择性微电极(Ion-selective microelectrode, ISM)^[27-33] 实时监测探针离子的浓度,从而测定 ECS 的生物物理参数。RTI 可同时测定 ECS 的 α 和 λ ,是目前研究 ECS 常用方法之一。

离子导入是指离子在电流的作用下释放到 ECS 中,优点是可通过离子导入电流精确调控离子释放。离子导入是通过玻璃毛细管实现的。玻璃毛细管尖端直径为 3 ~ 6 μm ,内部填充 0.1 ~ 1.0 mol/L 的离子溶液,并插入一根 Ag/AgCl 丝作为电极,然后密封毛细管尾端防止管内液体蒸发。其中,3 ~ 6 μm 的尖端既能避免直接插入细胞,不会对脑组织造成较大的损伤。如图 3A 所示,离子导入管中的 Ag/AgCl 丝与恒电流源连通,并与琼脂中的对电极构成回路,离子从玻璃毛细管尖端导出^[19]。以 0.3% 的琼脂凝胶(含 150 mmol/L NaCl)为自由扩散基质($\alpha = 1$),计算探针的自由扩散系数和迁移数(Transport number, n_i)。琼脂凝胶的使用可排除水或等渗溶液中热对流的干扰。式(1)在 RTI 中修正为^[7,34]:

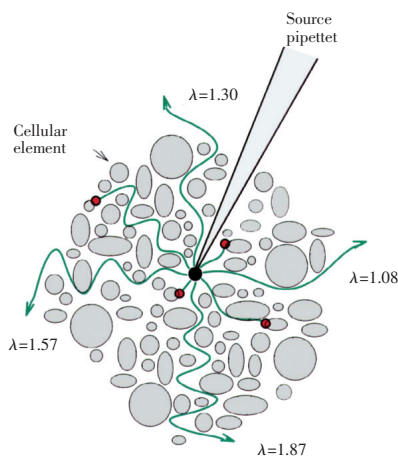


图 2 探针在 ECS 中扩散的示意图^[19]

玻璃毛细管释放探针到 ECS,释放的探针避开细胞,在 ECS 中扩散(带有箭头的线)。一些探针可能在 ECS 中某些位置(红点)消失。适当的传感器可记录探针的扩散过程。

Fig. 2 Schematic illustration of probes diffusion in ECS^[19]

Glass micropipette releases extracellular probes to the ECS. Released probes diffuse through the ECS (lines with arrowheads) around cells and possibly other barriers. Some probes may be disappeared from the ECS at some sites (red dots). The diffusion of probes is recorded by appropriate sensors.

$$C(t) = \frac{Q}{8\pi D^* \alpha r} \left[\operatorname{erfc}\left(\frac{r}{2\sqrt{D^* t}} + \sqrt{k' t}\right) \exp\left(r\sqrt{\frac{k'}{D^*}}\right) + \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{2\sqrt{D^* t}} - \sqrt{k' t}\right) \exp\left(-r\sqrt{\frac{k'}{D^*}}\right) \right] \quad (2)$$

式(2)为开始并保持离子导入后在距离毛细管尖端 r 处的离子浓度 C 。其中, erfc 为余误差函数。

$$Q = \frac{In_1}{zF}$$

其中, I 为离子导入电流, n_1 为导入离子的迁移数, z 为离子的化合价, F 为法拉第常数。

在 RTI 中, 常用的探针如表 1 所列。四乙基铵阳离子 (Tetraethylammonium, TEA⁺) 是第一个利用 RTI 方法研究 ECS 并准确测定 α 和 λ 时使用的探针。TEA⁺ 是细胞内电压门控的钾离子通道阻断剂^[4]。四甲基铵阳离子 (Tetramethylammonium, TMA⁺) 由于具有比 TEA⁺ 弱的 K⁺ 阻断效果和小的尺寸, 被广泛应用于 ECS 的研究。此外, 带负电荷的离子 (六氟砷酸盐 (Hexafluoroarsenate, AsF₆⁻)、 α -萘磺酸盐 (α -Naphthalenesulfonate, α -NS⁻)) 和二价离子^[35] (如 Ca²⁺) 也常被用于检测 ECS。

表 1 常用检测脑 ECS 的探针^[7]
Table 1 Probes commonly used for measurement of brain ECS^[7]

探针 Probes	相对分子质量 Relative molecular mass (Mr)	扩散系数 Diffusion coefficient ($D \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$)	体积分数 Volume fraction (α)	迂曲度 Tortuosity (λ)
TMA ⁺	74	11.1	1.49	0.18
TEA ⁺	130	7.90	1.48	0.21
AsF ₆ ⁻	189	14.0	1.68	0.26
α -NS ⁻	174	7.60	1.54	0.18

ISM 是由双管玻璃毛细管 (即 θ 管) 拉制而成的, 尖端外径为 $3 \sim 6 \mu\text{m}$ 。参比电极管填充 150 mmol/L NaCl 溶液, 且封装一根 Ag/AgCl 丝; 离子检测管 (指示电极) 内壁修饰有机液膜, 其中含有对探针具有选择性的载体, 随后填充 $100 \sim 150 \text{ mmol/L}$ 探针溶液且插入 Ag/AgCl 丝。离子检测管检测到的电位是与探针浓度相对应的电位和电极尖端脑组织的电位之和, 而参比电极管仅检测电极尖端脑组织的电位。因此, 两电位连续相减, 即可得到完全反映离子浓度的电位^[4,7,11]。

测试过程中, 离子导入管与 ISM 之间的距离通常为 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ (图 3A)。如图 3B 所示, 除用显微手臂操控二者距离外, 利用双光子激发荧光分子可在清醒动物上测量两者的距离^[36]。如果若在测试过程中引入两根离子导入管, 不仅可监测 ECS 中分子的扩散行为, 还可反映 ECS 的各向异性, 图 3C 为 TMA⁺ 在大鼠胼胝体中扩散的各向异性^[37]。

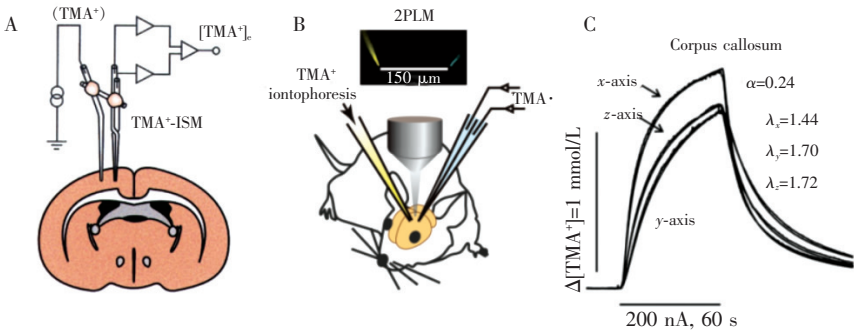


图 3 实时离子导入法: (A) 测定 ECS 的示意图^[19]; (B) RTI 应用于清醒动物^[36]; (C) TMA⁺ 在 ECS 中各向异性的扩散^[37]
Fig. 3 Real time iontophoretic method: (A) Schematic illustration of measurement of ECS^[19]; (B) Real-time iontophoretic (RTI) employed in conscious mouse^[36]; (C) Anisotropic diffusion of TMA⁺ in ECS^[37]

4.2 迂曲度(λ)的测定方法

作为与扩散系数相关的参数, λ 可依据探针在 ECS 的扩散系数计算得出。能够测定 λ 的方法除了放射性示踪法和 RTI, 还包括以下几种方法。

4.2.1 实时压力导入法 实时压力导入法(Real-time pressure method, RTP)^[34,38,39]与 RTI 类似,但探针是在压力的作用下导入到脑组织的,所以该方法因能导入带电分子和中性分子而具有更广泛的适用性。RTP 同样使用尖端外径为 3~6 μm 的玻璃毛细管,且仅尖端充满溶液。值得注意的是,在具体操作时,必须小心清除溶液中的所有气泡,因为给予压力脉冲时,气泡会阻止溶液从毛细管中出来。式(1)在 RTP 中修正为^[34,38,39]:

$$C(t) = \frac{Q}{\alpha} \frac{1}{(4D^*t\pi)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4D^*t} - k't\right) \quad (4)$$

式(4)为进行压力脉冲时距离毛细管尖端 r 处的离子浓度 C 。

$$Q = UC_f \quad (5)$$

其中, U 为导入体积, C_f 为导入溶液的浓度。然而, U 一般不准确且导入的溶液会在 ECS 中稀释,所以该方法无法得到 α 。

RTP 中一般用电中性分子或体积较大的分子作探针,如多巴胺(Dopamin, DA)^[40,41]、抗坏血酸(Ascorbic acid, AA)^[42,43]、5-羟色胺(5-Hydroxytryptamine, 5-HT)^[44,45]、右旋糖酐^[12,46,47]和荧光蛋白^[48,49]等。碳纤维电极(Carbon fiber electrode, CFE)可检测具有电化学活性的探针,其直径为 7 μm,在实现活体原位检测的同时,又可尽量减少对脑组织的损伤^[50~52]。CFE 结合电化学测量方法^[53~55]可实现对电化学活性探针的检测。

Dayton 等^[42]最早使用 CFE 研究 RTP 释放的电化学活性探针的扩散性质,其在大鼠皮层上以安培法检测压力导入的 AA、二羟基苯乙酸(Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)和 α -甲基多巴胺(α -Methyldopamine, α -MeDA),并以扩散曲线峰值时间 $t_{\max}$ 估算 D^* :

$$D_{k'=0}^* = \frac{r^2}{6t_{\max}} \quad (6)$$

研究发现,以 AA、DOPAC 和 α -MeDA 为探针,测得 ECS 的 $\lambda \approx 1.8$ 。然而 Rice 等^[40]发现,对于带负电荷的探针(AA, DOPAC)得到的结果与 Dayton 相似,但是相对于带正电荷的探针(DA, α -MeDA),其扩散系数是带负电荷探针的扩散系数的 1/4。Cragg 等^[41]以 DA 为探针,结合快速扫描循环伏安法发现,在豚鼠的黑质致密部(Substantia nigra compacta, SNc)、黑质网状部(Substantia nigra Reticulata, SNr)和腹侧被盖束(Ventral tegmental area, VTA)3 个区域, λ 为 1.68~1.80,比 RTI 测得的数值略微偏高($\lambda \approx 1.58 \sim 1.69$)。他们还发现,不同脑区 DA 的清除机制有所不同:纹状体的 DA 被快速清除,而中脑 DA 的清除速率则和细胞外 DA 的浓度成正比。

4.2.2 集成光学成像法 集成光学成像法(Integrative optical imaging, IOI)^[46]是 Nicholson 和 Tao 在 RTP 的基础上建立起来的。他们以荧光大分子作为探针,既能测定 λ ,也能表征细胞间隙距离,并反映蛋白质或大分子药物^[56]在 ECS 的行为和与细胞外基质的相互作用。如图 4 所示^[12],在 IOI 中,将荧光大分子以压力导入的方法注入到脑组织(活体或脑片),通过荧光显微镜实时记录荧光强度的变化,即探针浓度的变化。探针尺寸的下限取决于荧光标记物对其连接大分子的尺寸要求,上限是细胞间隙的距离。此外,具有生物活性的大分子可能会与受体结合,从而便于 ECS 中分子之间或分子与细胞外基质相互作用的研究。

在 IOI 中,常用的探针包括以右旋糖酐^[12,46,47,57]和蛋白质^[48,49,58]为主的球状大分子、柔性链状大分子^[59]和纳米颗粒(量子点^[12]、碳纳米管^[60]等)。右旋糖酐是葡萄糖分子形成的具有柔韧性的线圈结构,除荧光标记物外,其本身不带电荷,且极易溶于水,在水中倾向形成松散的球体^[4]。右旋糖酐具有多种分子量,其中分子量为 3 kDa 的右旋糖酐(dex3)是 IOI 中应用最广泛的探针之一。令人意外的是,无论活体,还是脑片,所有以 dex3 为探针得到的 λ 值均明显高于相同条件下以 TMA⁺为探针的值^[4]。蛋白质作为生命的物质基础之一,因其结构紧密、分子量确定,且能与特定受体结合,也被用作大分子探针,如白蛋白、铁乳蛋白、转铁蛋白和生长因子。研究发现,体积最小的白蛋白和体积最大的右旋糖酐具有近似的 λ ,这可能是因为白蛋白是刚性结构而右旋糖酐是柔韧的分子,柔性可能是导致迂曲度降低的一个因素^[4]。而柔性链状大分子 PHPMA(Poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide])^[59]不论分子量如

何,其在大鼠皮层测得的 λ 均为 $1.46 \sim 1.67$,与 TMA^+ 测得的结果相似。

由于光学方法自身的缺陷,IOI 通常局限于脑最浅表的 $200 \mu\text{m}$ 左右,且仅限于研究大脑灰质等没有明显光散射的区域^[61]。目前,双光子成像^[36, 61~64]已初步用于大鼠纹状体的探针扩散研究,虽然获得的信噪比较低,但这种方法很可能成为深度脑区 ECS 的重要研究方法。Zheng 等^[64]将时间分辨荧光各向异性成像技术与双光子激发显微镜技术结合,在切片上观测到 ECS 中分子的扩散。他们发现,在海马脑区细胞间隙中小分子的扩散系数是自由扩散系数的 70%,而突触间隙中小分子的扩散系数是自由扩散系数的 54%。此外,超分辨成像也能对 ECS 进行更精准的描述。Godin 等^[60]以注入脑室的单壁碳纳米管为探针,检测单个探针的近红外发射,进而反映出 ECS 的宽度和局部黏度信息。Tonnesen 等^[65]将荧光标记技术和三维的受激发射损耗显微镜(Stimulated emission depletion, 3D-STED)相结合,建立了脑 ECS 的超分辨阴影成像(Super-resolution shadow imaging, SUSHI)。该方法能从一定程度上缓解传统光学成像造成的光漂白和光毒性问题,能够定量给出 ECS 的结构和动力学信息。

4.2.3 磁共振成像法 作为一种非侵入性技术,磁共振成像法(Magnetic resonance imaging, MRI)^[66~72]因基于水的核磁特征可实现人体和大脑的成像,广泛应用于临床。MRI 可通过扩散加权成像(Diffusion weighted imaging, DWI)测量体内水分子的表观扩散系数和组织各向异性。基于 MRI 的 ECS 研究以水分子作为探针,但水分子扩散也同时存在于细胞内,因而无法准确描述 ECS 性质。而利用外源性探^[73](如苯丙醇胺、甘露醇、PEG 等)得到的 λ 为 $1.75 \sim 1.83$,则略高于 RTI 的结果。

Han 研究组^[74~80]开发的 MRI 示踪法可在全脑动态观察 ECS,并获得其扩散参数。该方法采用钆-二乙三胺五乙酸(Gadolinium-diethylene triaminepentaacetic acid, Gd-DTPA)为探针,作用于距离探针 0.24 nm 的水分子的氢原子核。通过缩短氢核弛豫时间和动态扫描采集图像信息,进而获得 ECS 的扩散系数。利用该方法,他们发现大鼠尾状核和丘脑虽然邻近,但两区域的细胞间液无法相互沟通且流动速度和分布范围均不相同。这表明 ECS 可能存在不同脑区的分区系统^[75]。此外,他们利用该方法也发现大鼠给予疼痛刺激后,丘脑和尾状核的 ECS 流量明显减慢^[76,77]。Song 等^[81]用该方法研究大鼠神经胶质瘤肿块中 ECS 的变化。

除 Gd-DTPA 为探针外,Madelin 等^[82, 83]提出一种基于钠磁共振成像的方法,可估算脑细胞内钠浓度,并计算出 ECS 的 α 。他们对 5 名健康志愿者进行细胞内钠的检测,均值为 11 mmol/L ,灰质的 $\alpha=0.22$,白质的 $\alpha=0.18$,与健康脑组织标准值(钠浓度: $10 \sim 15 \text{ mmol/L}$, $\alpha \approx 0.2$)接近。

4.2.4 电渗测量法 虽然对 ECS 中物质的扩散行为具有较好的理解,但对于电介导的物质传递却知之甚少。在 ECS 中,与负电性的细胞外基质抗衡的正离子会在电场作用下带动细胞间液发生流动,从而产生脑内的电渗流。Weber 研究组^[84~90]利用电渗(Electroosmosis, EO)在海马脑区测定 ECS 的 λ 和 ζ -电势。如图 5 所示,其在脑片上引入荧光分子作为探针,施加约 22 V/cm 的电场,探针在电泳和电渗

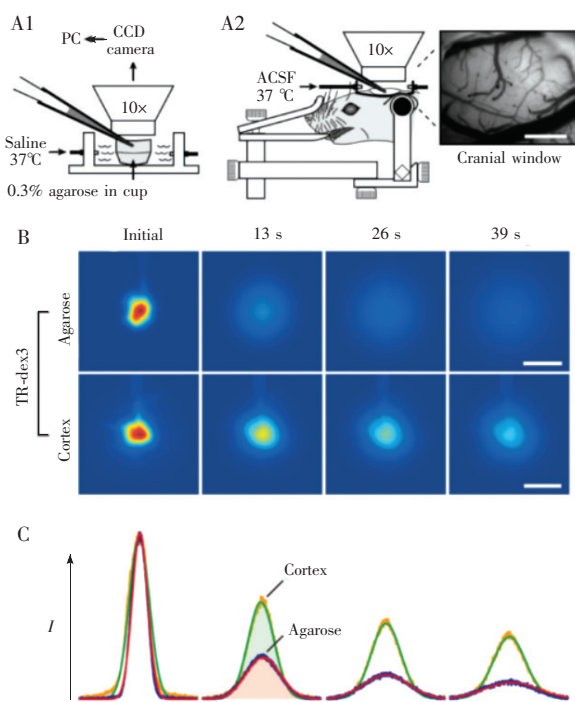


图 4 集成光学成像法^[12]: (A) 在琼脂(A1)和大鼠(A2)上的实验装置; (B) 右旋糖酐在琼脂和大鼠皮层中的扩散; (C) 荧光强度剖面和理论拟合图像。

Fig. 4 Integrative optical imaging^[12]: (A) Experimental setup for integrative optical imaging (IOI) diffusion measurement in either agarose (A1) or rats *in vivo* (A2); (B) Dextran diffusion in either agarose or cortex; (C) Fluorescence intensity profiles and theoretical fits for the images

的共同作用下发生移动,通过下列公式,可求得 ECS 的 λ 和细胞外基质的 ζ -电势。

$$v_{\text{obs}} = (1/\lambda^2)(v_{\text{eo}} + v_{\text{ep}})$$

(7)

$$v_{\text{ep}} = \mu_{\text{ep}} E$$

(8)

$$v_{\text{eo}} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E = \mu_{\text{eo}} E$$

(9)

其中, v_{obs} 为测量的速度, v_{eo} 为电渗速度, v_{ep} 为电泳速度, μ 为迁移率, E 为电场强度, η 为介质黏度, ε 为介电常数。实验测得海马 ECS 的 $\lambda = 1.83 \pm 0.06$, ζ -电势 $= (-22 \pm 2)$ mV, 其亚区 CA1 椎体细胞层、CA3 椎体细胞层和齿状回的 ζ -电势分别为 (-25.1 ± 1.6) mV、 (-20.3 ± 1.7) mV 和 (-25.4 ± 1.0) mV。此外,利用脑 ECS 的电渗现象,可定量检测 ECS 中的半胱氨酸浓度^[86, 87]和酶活反应^[88]等。

5 ECS 的生理和病理变化

5.1 不同脑区 ECS 的差异

脑组织结构复杂,具有不均一的各向异性。即使是同一物种,不同脑区的 α 和 λ 也存在较大的差别。表 2 总结了活体原位测得的成年大鼠的皮层、胼胝体、海马、纹状体、小脑和脊髓的 α 和 λ 。总体而言,神经纤维丰富的脑组织(胼胝体)因存在较多间隙,分子扩散较快;而在神经元与胶质细胞较为紧密的脑实质区(皮层),分子扩散常受到限制。

表 2 成年大鼠不同脑区的体积分数和迂曲度(RTI-TMA⁺方法)
Table 2 Volume fraction and tortuosity of different brain regions in adult rats(RTI-TMA⁺ method)

脑区 Brain regions	体积分数 Volume fraction (α)	迂曲度 Tortuosity (λ)	参考文献 Ref.
皮层 Cortex			
颞叶 Temporal Lobe	0.18 ~ 0.22	1.54 ~ 1.65	[4, 91 ~ 97]
听皮层 Auditory Cortex	0.21	(1.51, 1.66, 1.83) ^a	[96]
胼胝体 Corpus Callosum	0.2	1.55 ^b	[98]
	0.21	(1.47, 1.68, 1.68) ^a	[95]
海马 Hippocampus			
CA1	0.21 ~ 0.22	(1.46, 1.61, 1.76) ^a	[95]
CA3	0.20 ~ 0.22	(1.52, 1.60, 1.70) ^a	[95]
齿状回 Dentate Gyrus	0.20 ~ 0.22	(1.50, 1.62, 1.71) ^a	[95]
纹状体 Striatum	0.19 ~ 0.22	1.59 ~ 1.60	[99, 100]
小脑 Cerebellum			
分子层 Molecular Layer	0.18	1.49 ^b	[7]
脊髓 Spinal Cord			
背角灰质 Dorsal Horn Grey Matter	0.20 ~ 0.24	1.54 ~ 1.62	[101, 102]
白质 White Matter	0.18	1.56	[101]
腹角 Ventral Horn	0.23	1.46	[101]

注: a. 表示各向异性的迂曲度($\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z$); b. 表示没有测量各向异性。
Notes: a. represents that tortuosity is anisotropic ($\lambda_x, \lambda_y, \lambda_z$); b. represents that anisotropy is not measured.

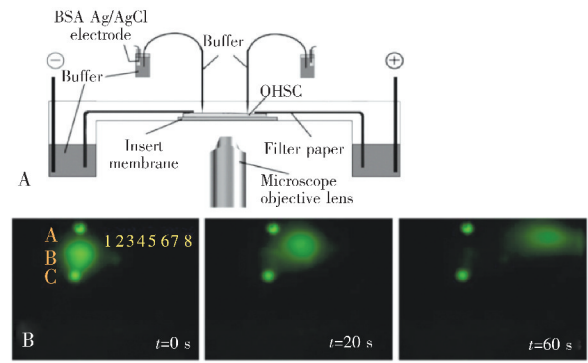


图 5 海马脑区的电渗现象: (A) 该仪器置于倒置荧光显微镜上进行图像分析,一对铂电极(标记为“-”和“+”)间施加约 22 V/cm 电场。脑片置于惰性膜上,一对 Ag/AgCl 电极测量电势梯度^[85]; (B) 荧光探针 A 和 C 注射到惰性膜上,B 注射到脑片中,在电场作用下,B 向阴极移动^[84]。

Fig. 5 Electroosmosis in rat hippocampal brain slice: (A) apparatus sits on an inverted fluorescence microscope for image analysis. A pair of platinum electrodes (labeled “-” and “+”) are applied with an electric field of about 22 V/cm. The brain is placed on an inert membrane. Ag/AgCl electrodes measure the potential gradient^[85]. (B) Fluorescent probes (A and C) are injected into the insert membrane; Probe B is injected into the slice. After applying the potential, B migrates toward the cathode^[84]

5.2 发育过程中脑 ECS 的变化

在发育过程中,脑 ECS 是动态变化的。从出生到成年再到衰老, α 随个体的发育逐渐降低,但 λ 并无明显的变化。新生大鼠^[98] 在出生的第二天(P2)到第四天(P4),其 α 约为 0.4,但是在 P10~P11, α 减小至 0.27,P23 时 α 和成年大鼠基本接近。然而 λ 在发育过程中基本保持在 1.5~1.6 之间,可能是因为大的 ECS 促进发育相关的分子的运动,并为细胞迁移提供更宽的通道。在衰老过程^[95] 中, α 从 0.21~0.22 降低至 0.17~0.19,而 λ 基本不变。此外,有研究表明, α 与学习能力相关,行为学表现越良好的老年鼠 α 越大。总之, α 随年龄增长而下降, λ 基本保持不变。

5.3 不同干预和病理模型的 ECS

5.3.1 渗透压变化 Krizaj 等^[103] 研究了乌龟小脑的 ECS 在不同渗透压下的变化,发现在生理盐溶液(302 mosmol/kg)、低渗溶液(238 mosmol/kg)和一系列高渗溶液(最高渗透压为 668 mosmol/kg)中, α 依次为 0.22、0.12 和 0.6(668 mosmol/kg), λ 依次为 1.70、1.79 和 1.50。Kume-Kick 等^[104, 105] 研究了渗透压对哺乳动物 ECS 的影响。结果表明,大鼠皮层在生理盐溶液(305 mosmol/kg)中 $\alpha=0.24$, $\lambda=1.69$;在低渗溶液(150 mosmol/kg)中, α 减小至 0.12, λ 升高至 1.86;在高渗溶液(最高 500 mosmol/kg)中, α 稳定上升至 0.42,而 λ 在渗透压为 350 mosmol/kg 的溶液中为 1.67,之后稳定不变。

5.3.2 脑缺血/缺氧 脑组织出现缺血或缺氧时,ECS 中的离子浓度迅速发生变化,其中 K^+ 浓度急剧上升至 50~70 mmol/L, Na^+ 浓度迅速下降至 48~59 mmol/L, Cl^- 浓度下降至 70~75 mmol/L, Ca^{2+} 浓度下降至 0.06~0.08 mmol/L,pH 下降至 6.4~6.6。大量 Na^+ 和 Cl^- 进入细胞后,水分子也进入细胞,造成细胞水肿,从而改变 ECS。当大鼠发生缺血/缺氧时^[8,9,57],脊髓和皮层的 α 从 0.20 最低下降到 0.05, λ 则由 1.5 上升至 2.1。

5.3.3 帕金森综合症 帕金森综合症是一种常见的神经退行性疾病。在动物黑质或纹状体脑区注射 6-羟多巴胺(6-Hydroxydopamine, 6-OHDA)能成功诱导帕金森模型,而将幼鼠的多巴胺能神经元移植到 6-OHDA 损伤的纹状体可使其功能恢复^[106]。研究发现^[100],未注射 6-OHDA 之前,纹状体的 $\alpha=0.19$, $\lambda=1.59$;建模后纹状体的 α 为 0.14, λ 为 1.50;而将幼鼠的多巴胺能神经元移植到损伤部位后, $\alpha=0.24$, $\lambda=1.80$ 。

如表 3 所示,其它模型中,如电刺激、扩散性抑制、癫痫、高血钠和戳伤等,ECS 也会发生变化。

表 3 成年大鼠不同模型的体积分数和迂曲度变化(RTI-TMA⁺法)
Table 3 Volume fraction and tortuosity of different intervening/pathological models in adult rats(RTI-TMA⁺ method)

干预/病理模型 Intervening/ Pathological models	脑区 Brain regions	体积分数 Volume fraction (α)	迂曲度 Tortuosity (λ)	参考文献 Ref.
电刺激 Electrical stimulation	脊髓背角 Spinal cord dorsal horn	0.13~0.19	1.54	[102]
化学损伤 Chemical injury	脊髓背角 Spinal cord dorsal horn	0.13~0.16	1.54	[102]
高血钠 Hypernatremia	皮层 Cortex	0.12	1.65	[91]
缺血 30 min Ischemia for 30 min	皮层 Cortex	0.07	1.88	[92]
缺氧 30 min Hypoxia for 30 min	皮层 Cortex	0.14	1.69	[97]
缺血/缺氧 Ischemia/Anoxia	脊髓背角 Spinal cord dorsal horn	0.07	2.20	[107]
扩散性抑制 Spreading Depression	皮层 Cortex	0.09	1.99	[93]
戳伤 Stab wound	皮层 Cortex	0.25~0.26	1.67~1.77	[96, 108]
帕金森综合症(注射 6-OHDA) Parkinson's disease (inject 6-OHDA)	纹状体 Striatum	0.14	1.50	[100]
癫痫(毛果芸香碱诱导) Epilepsy (Pilocarpine-induced)	皮层 Cortex	0.13	1.58	[94]

6 总结与展望

脑 ECS 占脑体积的 20% 左右,为脑细胞的生存和信息交流提供了必要的条件。与自由溶液相比,分子在 ECS 中扩散受到阻碍,溶液中自由扩散系数约为 ECS 中扩散系数的 2.6 倍。此外 ECS 是动态变化的,在大脑生理和病理状态下,ECS 的 α 和 λ 均会发生改变。然而,由于对 ECS 的认识不足,目前对

所有结果尚难有明确的解释。

为深入理解 ECS 在脑功能实现过程中的作用,研究学者发展了多种活体分析方法和技术,其中以 TMA^+ 为探针的 RTI 是较成熟的研究方法之一。RTP 和 IOI 则可选择多种分子作为探针,丰富了 ECS 的研究。MRI 作为一种无损技术,极有可能发展为人脑 ECS 的研究方法。除探针在 ECS 中的扩散,电渗测量法从新的角度阐述了 ECS 中物质的传递。

虽然人们逐渐认识到 ECS 的重要性,但 ECS 的研究仍面临诸多挑战:(1)目前的方法大多集中在对 ECS 的 α 和 λ 的研究,然而针对其它生物物理性质的研究基本空白;(2)现有方法只能测定距离脑表层 200 μm 深度的 ECS,深部脑区的 ECS 活体研究方法亟需发展,而清醒自由移动动物的 ECS 研究目前尚无良策;(3)除 MRI 外,大多数方法只能研究以毛细血管尖端为中心的 200 μm 左右的微小区域,缺乏对全脑 ECS 的整体认识;(4)探针在 ECS 中扩散的理论弱化了体流和分子的不可逆损失部分,而分子在 ECS 的真实表现仍不清楚,需要进一步加强 ECS 中分子与细胞外基质相互作用的研究,甚至单分子行为的研究,以加深对 ECS 的理解和认识。

目前,人们认为脑信息传递的途径除神经纤维的电信号传递和突触间隙的化学信号传递外,还应存在以 ECS 为主要途径的容积传递。建立和发展新的分析化学原理和方法,深入系统开展 ECS 的研究,不仅能够有助于理解物质在 ECS 传递,而且还能从新的角度阐述脑的生理过程和病理机制,为人类认识脑和利用脑奠定重要的基础。

References

- 1 YU Long-Chuan. *Neurobiology*. Beijing: Peking University Press, **2010**: 11
于龙川. 神经生物学. 北京:北京大学出版社, **2010**: 11
- 2 Bunde A, Caro J, Karger J, Vogl G. *Diffusive Spreading in Nature, Technology and Society*. Cham: Springer International Publishing AG, **2017**: 93–112
- 3 Nicholson C, Hrabetova S. *Biophys. J.*, **2017**, 113(10): 2133–2142
- 4 Sykova E, Nicholson C. *Physiol. Rev.*, **2008**, 88(4): 1277–1340
- 5 Rice M E, Okada Y C, Nicholson C. *J. Neurophysiol.*, **1993**, 70(5): 2035–2044
- 6 Vorisek I, Sykova E. *J. Neurophysiol.*, **1997**, 78(2): 912–919
- 7 Nicholson C, Phillips J M. *J. Physiol.*, **1981**, 321(DEC): 225–257
- 8 Toorn A, Sykova E, Dijkhuizen R M, Vorisek I, Vargova L, Skobisova E, Campagne M L, Reese T, Nicolay K. *Magn. Reson. Med.*, **1996**, 36(1): 52–60
- 9 Vorisek I, Sykova E. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1997**, 17(2): 191–203
- 10 Brightman M W. *Am. J. Anat.*, **1965**, 117(2): 193–219
- 11 Michael A C, Borland L M. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Boca Raton: CRC Press, **2007**: 168–199
- 12 Thorne R G, Nicholson C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103(14): 5567–5572
- 13 Abbott N J. *Neurochem. Int.*, **2004**, 45(4): 545–552
- 14 Cserr H F, Ostrach L. *Exp. Neurol.*, **1974**, 45(1): 50–60
- 15 Weller R O, Kida S, Zhang E. *Brain Pathol.*, **1992**, 2(4): 277–284
- 16 Szentistvanyi I, Patlak C S, Ellis R A, Cserr H F. *Am. J. Physiol.*, **1984**, 246(6): F835–F844
- 17 Ichimura T, Fraser P A, Cserr H F. *Brain Res.*, **1991**, 545(1–2): 103–113
- 18 Rosenberg G A, Kyner W T, Estrada E. *Am. J. Physiol.*, **1980**, 238(1): F42–F49
- 19 Nicholson C, Sykova E. *Trends Neurosci.*, **1998**, 21(5): 207–215
- 20 Gonzalez-Aguilar F. *J. Ultrastruct. Res.*, **1969**, 29(1–2): 76–85
- 21 Fenstermacher J, Kaye T. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1988**, 531(1): 29–39
- 22 Rall D P, Oppelt W W, Patlak C S. *Life Sci.*, **1962**, 1(2): 43–48
- 23 Patlak C S, Fenstermacher J D. *Am. J. Physiol.*, **1975**, 229(4): 877–884
- 24 Lux H D, Neher E. *Exp. Brain Res.*, **1973**, 17(2): 190–205
- 25 Nicholson C, Kamali-Zare P. *Neurochem. Res.*, **2019**: 10.1007/s11064-019-02793-6

- 26 Odackal J, Colbourn R, Odackal N J, Tao L, Nicholson C, Hrabetova S. *JOVE-J. Vis. Exp.*, **2017**, (125): e55755
- 27 CUI Guang-Wen, He Run-He, YAO Jian, WANG Jian-ping, ZHANG Xing-Xiang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(10): 1669–1676
崔光文, 何润合, 药 健, 王建平, 张兴祥. 分析化学, **2018**, 46(10): 1669–1676
- 28 YANG Cheng, SONG Cai-Qiao, ZHANG Ya-Qi, QU Yao. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2019**, 47(5): 765–771
杨 成, 宋彩侨, 张亚旗, 曲 瑶. 分析化学, **2019**, 47(5): 765–771
- 29 ZHOU Shuang, GUO Yu-Shi, YAN Yu, QU Jiang-Ying, HE Chun-Xiang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(1): 81–87
周 爽, 郭煜石, 颜 宇, 曲江英, 赫春香. 分析化学, **2018**, 46(1): 81–87
- 30 ZHAO Fan, SHI Guo-Yue, TIAN Yang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2019**, 47(3): 347–354
赵 凡, 施国跃, 田 阳. 分析化学, **2019**, 47(3): 347–354
- 31 Zhao L, Jiang Y, Wei H, Jiang Y, Ma W, Zheng W, Cao A, Mao L. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(7): 4421–4428
- 32 Hao J, Xiao T, Wu F, Yu P, Mao L. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(22): 11238–11243
- 33 Zhao L, Jiang Y, Hao J, Wei H, Zheng W, Mao L. *Sci. China Chem.*, **2019**; 10.1007/s11426-019-9516-5
- 34 Nicholson C. *Rep. Prog. Phys.*, **2001**, 64(7): 815–884
- 35 Nicholson C, Rice M E. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **1987**, 65(5): 1086–1091
- 36 Xie L, Kang H, Xu Q, Chen M J, Liao Y, Thiagarajan M, O'Donnell J, Christensen D J, Nicholson C, Iliff J J, Takano T, Deane R, Nedegaard M. *Science*, **2013**, 342(6156): 373–377
- 37 Sykova E. *Neurochem. Int.*, **2004**, 45(4): 453–466
- 38 Nicholson C. *J. Neurosci. Methods*, **1993**, 48(3): 199–213
- 39 Nicholson C. *Brain Res.*, **1985**, 333(2): 325–329
- 40 Rice M, Gerhardt G, Hierl P, Nagy G, Adams R. *Neuroscience*, **1985**, 15(3): 891–902
- 41 Cragg S J, Nicholson C, Kume-Kick J, Tao L, Rice M E. *J. Neurophysiol.*, **2001**, 85(4): 1761–1771
- 42 Dayton M A, Ewing A G, Wightman R M. *J. Electroanal. Chem.*, **1983**, 146(1): 189–200
- 43 LYU Yang, ZHANG Ya-Wen, TAN Lei, JI Wen-Liang, YU Ping, MAO Lan-Qun, ZHOU Fang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2017**, 45(11): 1595–1599
吕 扬, 张雅文, 谭 磊, 纪文亮, 于 萍, 毛兰群, 周 方. 分析化学, **2017**, 45(11): 1595–1599
- 44 Xin Q, Wightman R M. *Brain Res.*, **1997**, 776(1-2): 126–132
- 45 Rice M, Nicholson C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1986**, 481(1): 381–382
- 46 Nicholson C, Tao L. *Biophys. J.*, **1993**, 65(6): 2277–2290
- 47 Hrabetova S, Hrabe J, Nicholson C. *J. Neurosci.*, **2003**, 23(23): 8351–8359
- 48 Johnson E M, Berk D A, Jain R K, Deen W M. *Biophys. J.*, **1995**, 68(4): 1561–1568
- 49 Tao L, Nicholson C. *Neuroscience*, **1996**, 75(3): 839–847
- 50 Xiao T, Jiang Y, Ji W, Mao L. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(7): 4840–4846
- 51 Xiao T, Wang Y, Wei H, Yu P, Jiang Y, Mao L. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2019**, 58(20): 6616–6619
- 52 Chatard C, Meiller A, Marinesco S. *Electroanalysis*, **2018**, 30(6): 977–998
- 53 XU Sheng-Wei, WANG Li, SONG Xian-Teng, ZHANG Song, WANG Mi-Xia, YU Ping, MAO Lan-Qun, CAI Xin-Xia. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(9): 1457–1463
徐声伟, 王 力, 宋先腾, 张 松, 王蜜霞, 于 萍, 毛兰群, 蔡新霞. 分析化学, **2016**, 44(9): 1457–1463
- 54 QIN Tai-Xiang, LI Xiao-Gang, HAO Jie, YU Ping, MAO Lan-Qun. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(3): 457–462
秦泰香, 李晓刚, 郝 洁, 于 萍, 毛兰群. 分析化学, **2015**, 43(3): 457–462
- 55 LI Xiao-Gang, GUO Bin-Qian, QIN Tai-Xiang, HAO Jie, YU Ping, MAO Lan-Qun. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(9): 1465–1470
李晓刚, 郭彬乾, 秦泰香, 郝 洁, 于 萍, 毛兰群. 分析化学, **2016**, 44(9): 1465–1470
- 56 Wolak D J, Thorne R G. *Mol. Pharm.*, **2013**, 10(5): 1492–1504
- 57 Hrabetova S, Nicholson C. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2000**, 20(9): 1306–1310
- 58 Yao X, Hrabetova S, Nicholson C, Manley G T. *J. Neurosci.*, **2008**, 28(21): 5460–5464
- 59 Prokopova-Kubinova S, Vargova L, Tao L, Ulbrich K, Subr V, Sykova E, Nicholson C. *Biophys. J.*, **2001**, 80(1): 542–548

- 60 Godin A G, Varela J A, Gao Z, Danné N, Dupuis J P, Lounis B, Groc L, Cognet L. *Nat. Nanotechnol.*, **2017**, 12(3): 238–243
- 61 Hrabetova S, Cognet L, Rusakov D A, Nagerl U V. *J. Neurosci.*, **2018**, 38(44): 9355–9363
- 62 Stroh M, Zipfel W R, Williams R M, Ma S C, Webb W W, Saltzman W M. *Nat. Mater.*, **2004**, 3(7): 489–494
- 63 Stroh M, Zipfel W R, Williams R M, Webb W W, Saltzman W M. *Biophys. J.*, **2003**, 85(1): 581–588
- 64 Zheng K, Jensen T P, Savtchenko L P, Levitt J A, Suhling K, Rusakov D A. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 42022
- 65 Tonnesen J, Inavalli V, Nagerl U V. *Cell*, **2018**, 172(5): 1108–1121
- 66 CHENG Shi, WANG Xin, LIU Bao-Lin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(2): 281–287
成实, 王欣, 刘宝林. *分析化学*, **2018**, 46(2): 281–287
- 67 GU Gui-Ying, WANG Xin, ZHOU Hua-Lan, LIU Bao-Lin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(8): 1161–1168
谷桂英, 王欣, 周化岚, 刘宝林. *分析化学*, **2018**, 46(8): 1161–1168
- 68 Biswal B B, Mennes M, Zuo X N, Gohel S, Kelly C, Smith S M, Beckmann C F, Adelstein J S, Buckner R L, Colcombe S, Dogonowski A M, Ernst M, Fair D, Hampson M, Hoptman M J, Hyde J S, Kiviniemi V J, Kotter R, Li S J, Lin C P, Lowe M J, Mackay C, Madden D J, Madsen K H, Margulies D S, Mayberg H S, McMahon K, Monk C S, Mostofsky S H, Nagel B J, Pekar J J, Peltier S J, Petersen S E, Riedl V, Rombouts S A, Rypma B, Schlaggar B L, Schmidt S, Seidler R D, Siegle G J, Sorg C, Teng G J, Veijola J, Villringer A, Walter M, Wang L, Weng X C, Whitfield-Gabrieli S, Williamson P, Windischberger C, Zang Y F, Zhang H Y, Castellanos F X, Milham M P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107(10): 4734–4739
- 69 Zhang Y, Sun L, Liu E, Wang A, Yan J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2019**, 515(3): 429–435
- 70 Wu H, Wang X, Gao Y, Lin F, Song T, Zou Y, Xu L, Lei H. *Neuroscience*, **2016**, 322: 221–233
- 71 Dai J, Wang S, Shan D, Niu H, Lei H. *Neurosci. Bull.*, **2018**, 34(3): 438–448
- 72 Jin L, Gao L, Sun D, Wu H, Wang Q, Ke D, Lei H, Wang J, Liu G. *Mol. Neurobiol.*, **2017**, 54(6): 4160–4171
- 73 XU Fang-Jing-Wei, HE Qing-Yuan, HAN Hong-Bin. *J. Peking U. (Health Sci.)*, **2010**, 42(2): 234–237
许方婧伟, 和清源, 韩鸿宾. *北京大学学报(医学版)*, **2010**, 42(2): 234–237
- 74 Wang W, He Q, Hou J, Chui D, Gao M, Wang A, Han H, Liu H. *Front. Neuroinform.*, **2019**, 13: 6
- 75 Han H, Shi C, Fu Y, Zuo L, Lee K, He Q, Han H. *IEEE J. Biomed. Health. Inform.*, **2014**, 18(3): 978–983
- 76 Shi C, Lei Y, Han H, Zuo L, Yan J, He Q, Yuan L, Liu H, Xu G, Xu W. *Sci. Rep.*, **2015**, 5: 17673
- 77 Fu Y, Li Y, Guo J, Liu B, Liu H, Zhang W, Sun W, Gao Y, Ren Q, Han H. *J. Tradit. Chin. Med.*, **2016**, 36(1): 107–112
- 78 Lei Y, Han H, Yuan F, Javeed A, Zhao Y. *Prog. Neurobiol.*, **2017**, 157(S1): 230–246
- 79 ZHENG Tao, HE Qing-Yuan, LIU Lan-Xiang, HAN Hong-Bin. *Sci. Technol. Rev.*, **2015**, 33(8): 101–105
郑涛, 和清源, 刘兰祥, 韩鸿宾. *科技导报*, **2015**, 33(8): 101–105
- 80 HAN Hong-Bin. *Med. J. Chin. PAP.*, **2016**, 27(4): 325–328
韩鸿宾. *武警医学*, **2016**, 27(4): 325–328
- 81 Song G, Luo T, Dong L, Liu Q. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2017**, 50(7): e5403
- 82 Madelin G, Kline R, Walvick R, Regatte R R. *Sci. Rep.*, **2014**, 4: 4763
- 83 Goodman J A, Kroenke C D, Bretthorst G L, Ackerman J J, Neil J J. *Magn. Reson. Med.*, **2005**, 53(5): 1040–1045
- 84 Guy Y, Sandberg M, Weber S G. *Biophys. J.*, **2008**, 94(11): 4561–4569
- 85 Guy Y, Muha R J, Sandberg M, Weber S G. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(8): 3001–3007
- 86 Wu J, Sandberg M, Weber S G. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(24): 12020–12027
- 87 Wu J, Xu K, Landers J P, Weber S G. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(6): 3095–3103
- 88 Ou Y, Weber S G. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(11): 5864–5873
- 89 Rupert A E, Ou Y, Sandberg M, Weber S G. *ACS Chem. Neurosci.*, **2013**, 4(5): 849–857
- 90 Ou Y, Wu J, Sandberg M, Weber S G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(26): 6455–6468
- 91 Cserr H, DePasquale M, Nicholson C, Patlak C, Pettigrew K, Rice M. *J. Physiol.*, **1991**, 442(1): 277–295
- 92 Homola A, Zoremba N, Slais K, Kuhlen R, Sykova E. *Neurosci. Lett.*, **2006**, 404(1–2): 137–142
- 93 Mazel T, Richter F, Vargova L, Sykova E. *Physiol. Res.*, **2002**, 51(Suppl 1): S85–S94
- 94 Slais K, Vorisek I, Zoremba N, Homola A, Dmytrenko L, Sykova E. *Exp. Neurol.*, **2008**, 209(1): 145–154

- 95 Sykova E, Mazel T, Simonova Z. *Exp. Gerontol.* , **1998**, 33(7-8) : 837–851
- 96 Vorisek I, Hajek M, Tintera J, Nicolay K, Sykova E. *Magn. Reson. Med.* , **2002**, 48(6) : 994–1003
- 97 Zoremba N, Homola A, Rossaint R, Sykova E. *Exp. Neurol.* , **2007**, 203(1) : 34–41
- 98 Lehmenkuhler A, Sykova E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C. *Neuroscience*, **1993**, 55(2) : 339–351
- 99 Jansson A, Mazel T, Andbjør B, Rosen L, Guidolin D, Zoli M, Sykova E, Agnati L F, Fuxe K. *Neuroscience*, **1999**, 91(1) : 69–80
- 100 Reum T, Olshausen F, Mazel T, Vorisek I, Morgenstern R, Sykova E. *J. Neurosci. Res.* , **2002**, 70(5) : 680–693
- 101 Simonova Z, Svoboda J, Orkand P, Bernard C, Lassmann H, Sykova E. *Physiol. Res.* , **1996**, 45(1) : 11–22
- 102 Svoboda J, Sykova E. *Brain Res.* , **1991**, 560(1-2) : 216–224
- 103 Krizaj D, Rice M E, Wardle R A, Nicholson C. *J. Physiol.* , **1996**, 492(3) : 887–896
- 104 Kume-Kick J, Mazel T, Vorisek I, Hrabetova S, Tao L, Nicholson C. *J. Physiol.* , **2002**, 542(2) : 515–527
- 105 Vargova L, Chvatal A, Anderova M, Kubinova S, Ziak D, Sykova E. *J. Neurosci. Res.* , **2001**, 65(2) : 129–138
- 106 Bjorklund A. *Curr. Opin. Neurobiol.* , **1992**, 2(5) : 683–689
- 107 Sykova E, Svoboda J, Polak J, Chvatal A. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* , **1994**, 14(2) : 301–311
- 108 Roitbak T, Sykova E. *Glia*, **1999**, 28(1) : 40–48

Progress of Electrochemical Analysis and Imaging of Extracellular Space

JIN Jing^{1,2}, WU Fei^{1,2}, YU Ping^{1,2}, MAO Lan-Qun^{*1,2}

¹(*Beijing National Laboratory for Molecular Science, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

²(*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract Extracellular space (ECS) is the fluid-filled space surrounding the brain cells, accounting for about one fifth of brain volume. As an essential living environment for neurons and glial cells, ECS not only transports substances for cells, but also enables stable electrical signaling. Therefore, it is closely related to the basic functions of the brain, such as synaptic transmission, memory, sleep and diseases. This review focuses on the primary biophysical characteristics of ECS and the main progress on investigating volume fraction and tortuosity with electrochemical analysis and imaging methods. The review also expounds on the variation of ECS in physiological and pathological processes.

Keywords Extracellular space; Electrochemical analysis; Imaging; Volume fraction; Tortuosity; Review

(Received 30 July 2019; accepted 27 August 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos.21790390, 21790391, 21621062, 21874139) and the National Key Research and Develop Program of China (No. 2018YFE0200800).