技术方法

文章编号:1000-5404(2007)05-0460-02

一种适合膜片钳研究的成年大鼠DRG神经元急性分离方法

黄 华,阮怀珍,蔡文琴,吴喜贵,陈鹏慧 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立一种适合膜片钳研究的成年大鼠DRG神经元急性分离方法。**方法** 采用结合酶消化及机械分离的方法,急性分离成年大鼠DRG神经元,用于膜片钳研究。**结果** 本方法可分离2~3个月的成年大鼠,不损伤神经元的基本结构和电生理学特性,形态上易于区分。**结论** 本方法步骤单一,操作简单,分离效率高,适合膜片钳研究。

膜片钳技术对研究背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元离子通道电生理特性具有相当重要的意义。由于需要分散的、独立的、表面光滑的神经元,使该技术在研究DRG神经元时受到很大的限制。以往的研究多使用培养的鸡胚DRG神经元,随着研究的深入,势必会涉及成年哺乳动物DRG神经元的离子通道特性。近年已有研究者成功地分离得到了DRG神经元,并证实了P2X受体的配体门控通道性质。但以往的分离方法尚存在许多缺点,如分离过程过于复杂;消化酶种类过多;分离得到细胞比率低;分离得到的适合膜片钳研究的神经元较少;随着大鼠年龄增长,分离效率明显降低。本研究的目的在于改进上述缺点,重点解决分离神经元比率低及提高适合膜片钳研究的神经元比率,同时观察分离的DRG神经元离子通道特性。

1 材料与方法

1.1 DRG神经元急性分离

健康Wistar大鼠,雌雄不限,体质量180~220 g,由第三军医大学实验动物中心提供。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,断头,迅速切开背部皮肤,沿脊柱两侧剪断与之相连的肋骨,取出腰段脊柱。由脊柱正中剖开成两半,置于混合气(95% O_2 +5% CO_2)饱和的0~4 ℃的人工脑脊液中[ACSF(mmol/L):NaCl 126, KCl 5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 2, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 26, 葡萄糖10]。由剖开的椎管内侧取出所需节段神经节及其相连的神经根,在解剖显微镜下用精细角膜剪、游丝镊仔细剪除相连神经和周围的结缔组织被膜,将清除干净的神经节剪碎成2~3块,置于胶原酶溶液(3 g/L),在恒温水浴锅(37 ℃)中孵育100 min。孵育毕,在人工脑脊液中清洗数次,转移至胰蛋白酶溶液(1 g/L),在恒温水浴锅(37 ℃)中孵育10 min。消化完毕,在人工脑脊液中反复清洗,然后机械吹打制成细胞悬液,加入灌流槽内,放在倒置显微镜载物台上静置30 min,待细胞贴壁后缓慢灌流(95% O_2 +5% CO_2)混合气饱和的人工脑脊液,随后进行膜片钳全细胞记录。

作者简介:黄 华(1979-),男,湖北省松滋市人,硕士,医师,主要从事神经损伤、再生方面的研究。电话:(023)68774613, E-mail: huahg1113@tom.com

收稿日期:2006-07-27;修回日期:2006-10-11

1.2 膜片钳全细胞记录

实验在20~30 ℃室温下进行。灌流槽置于倒置显微镜载物台上,选择表面光滑、有突起的中、小直径神经元作为研究对象进行膜片钳实验。拉制玻璃微电极、充灌适量的电极内液后[(mmol/L):K-Gluconate 145, $MgCl_2$ 2, K_2 ATP 5, EGTA 0.5, HEPES 5],与Ag/AgCl电极丝构成回路,通过电极夹持器与放大器的探头相连。在倒置显微镜下先将选好的细胞移至视野的中间,再用定向推进器将电极尖端缓慢靠近细胞。电极进入浴液后始终给以正气压,防止电极尖端阻塞。使用微操纵器将电极尖端调至胞体的正上方,然后在持续正气压的同时使用微操纵器让电极尖端缓慢靠近胞体。利用特定的测试方波判断细胞的封接状态。当电极尖端接触细胞表面时,记录得到的测试方波会因封接阻抗增大而产生相应的变化。此时再给予短暂的负压吸引,如果细胞健康,电极形状好,电极与胞膜之间的电阻会迅速增大至吉欧姆(10^9 Ω)水平以上,膜与电极之间形成在机械和电学上都十分稳固的紧密封闭。此时的电极与细胞膜形成了"贴附式膜片"(cell-attached patch),这时的记录方式就是贴附式记录;再给予负压或0.5~5 ms时程的电脉冲,则可穿破电极尖端的细胞膜,使细胞内液与电极内液相通,形成"全细胞膜片"(whole cell patch),这时的记录方式就是全细胞记录。实验过程中灌流槽中通以混合气(95% O_2 +5% CO_2)饱和的ACSF灌流,调节流速(约2 ml/min),使槽内液体在1 min内完全更新。

膜片钳放大器采集的电流或电压信号,经digidata 1200 A/D转换器接口进入计算机,通过膜片钳专用软件pClamp 6程序采样录入,采样频率为10 kHz,滤波频率为1~5 kHz。PClamp 6软件可以输出命令给膜片钳放大器,通过探头、记录电极刺激细胞,钳制细胞膜电位和诱发电压门控性离子通道电流。

在电流钳下通过记录电极给以一系列由超极化到去极化的跃阶电流(-60~+140 pA, step=20 pA, 时长200 ms)刺激,得到电压-电流曲线,观察膜电位超过阈值后的诱发动作电位;或者在电压钳下,将膜电位钳制在-100 mV,给予一系列跃阶电压(-80~+30 mV, step=10 mV, 时长30 ms)刺激,观察快速激活和失活的钠电流。在电流钳下能够得到动作电位或电压钳下能够记录到快速激活和失活的钠电流的细胞被认为是状态良好的神经元。

2 结果

2.1 DRG神经元的形态

在倒置显微镜下观察,急性分离得到的DRG神经元大小

不一,有大、中、小3种类型,平均直径分别为41~60、30~40、13~29 μm。细胞表面光滑,胞体呈椭圆形、圆形,多为单极突起,部分细胞明显地连有被离断的卷曲的轴索突起残端,见图1。

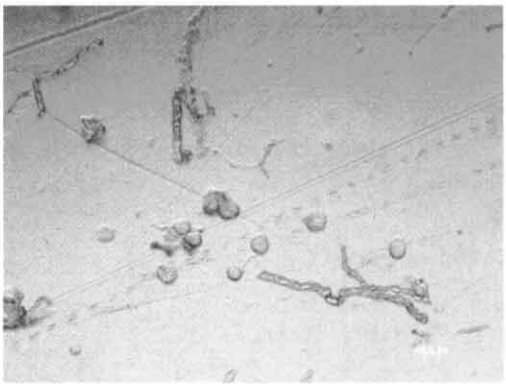


图1　急性分离的DRG神经元　(倒置显微镜×100)

2.2　DRG神经元的基本膜电生理特性

急性分离得到的DRG神经元易于形成膜片钳全细胞记录。DRG神经元平均静息膜电位(RMP)为(-54.29±4.89) mV;串联阻抗(Rs)分别为(11.37±3.96) MΩ;膜电容(Mc)为(12.63±2.27) pF。

电流钳记录模式下,给予DRG神经元一系列由超级化至去极化的阶跃电流(-60~140 pA,step=20 pA,时长200 ms)刺激,记录得到动作电位(AP),见图2。

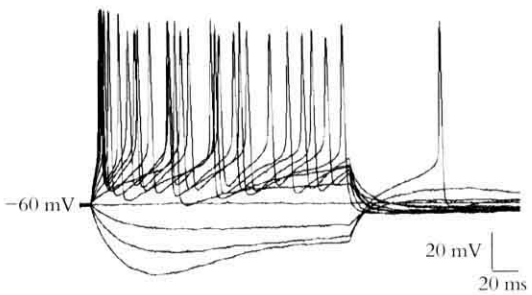


图2　膜片钳全细胞记录得到急性分离大鼠DRG神经元的动作电位

3　讨论

分离得到独立完整、表面光滑、存活时间长的神经元是膜片钳全细胞记录技术成功的关键。我们建立的DRG神经元急性分离方法是参照文献[1-3]经过改进实现的。分离时主要须注意以下几个方面:① 快速分离出脊柱,置于氧饱和的0~4 ℃的人工脑脊液中,随后快速分离出DRG及相连组织,在解剖显微镜下剔除DRG周围组织,得到完整神经节,剪碎消化。②控制酶消化浓度、温度和时间。③机械吹打制成细胞悬液过程中要轻、慢,保证吹打时间适度。

我们分离得到的DRG神经元容易封接形成全细胞记录,且维持时间长,适合膜片钳实验;细胞悬液加入灌流槽后贴壁牢固,不易受灌流液影响,结果表明RMP、Rs及Mc均在正常范围,动作电位也较容易激发,细胞状态良好。此法分离过程简单;消化酶种类少;还很大程度地提高了分离得到的神经元比率及适合膜片钳研究的神经元比率,说明此法是一种适合膜片钳全细胞记录技术的好方法。

关键词:膜片钳;DRG神经元;急性分离

中图法分类号:R329-33　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] 关兵才,李之望,周小萍.P物质对$GABA_A$和$GABA_B$受体介导的DRG神经元膜反应的调制作用[J].生理学报,1994,46(5):441-450.

[2] Li C. Novel mechanism of inhibition by the P2 receptor antagonist PPADS of ATP-activated current in dorsal root ganglion neurons[J]. J Neurophysiol, 2000, 83(5): 2533-2541.

[3] Zhou Z S, Zhao Z Q. Ketamine blockage of both tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels of rat dorsal root ganglion neurons[J]. Brain Res Bull, 2000, 52(5): 427-433.

(编辑　汪勤俭)

参考文献类型及标识

根据GB 3469规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母"A";对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母"Z"

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部