论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0238-04

分化早期胚胎大鼠神经干细胞电生理特征

冷 洁,蒋 莉,陈恒胜 (400014 重庆,重庆医科大学儿童医院神经内科)

[摘要] **目的** 探索分化早期神经干细胞的电生理特征。**方法** 分离培养胚胎大鼠海马神经干细胞。应用膜片钳全细胞记录技术检测神经干细胞和分化早期(1~3 d)神经细胞的电压门控离子电流。**结果** 未分化的神经干细胞不表达内向钠离子电流,而诱导分化1 d的神经细胞即表达内向性钠离子电流,但不能诱导产生动作电位。神经干细胞和分化早期的神经细胞均表达两种类型的外向钾离子电流,并表达内向T-型钙电流。**结论** 钠离子电流的功能性表达是神经干细胞退出细胞周期开始分化的标志。分化早期是神经干细胞离子通道发育过程的重要阶段。

[关键词] 膜片钳;海马;神经干细胞;分化;离子通道
[中图法分类号] R322.81;R329.2;R338.8 [文献标志码] A

Electrophysiological characteristics of early-differentiated neural stem cells in embryonic rats

Leng Jie, Jiang Li, Cheng Hengsheng (Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] Objective To study the electrophysiological characteristics of early-differentiated neural stem cells (NSC) in embryonic rats. Methods NSC were isolated from hippocampus of embryonic rats and cultured. The cells were plated onto poly-llysine hydrochloride glass cover-slips for 1 h or differentiated for 1 – 3 d in a differentiation medium. Whole cell patch-clamp technique was used to record the voltage-gated ion channel current. Results No inward Na^+ current was detected in any undifferentiated NSC. One day after induction of differentiation, the cells exhibited a voltage-gated Na^+ current, but could not induce an action potential. Two types of outward K^+ current (delayed rectifier K^+ and transient K^+ current) and inward T-type Ca^{2+} current were detected in NSC and early-differentiated NSC. Conclusion The functional expression of Na^+ current is a marker of early differentiation of NSC following cell cycle exit. Early differentiation of NSC is an important development stage of their ion channels.

[**Key words**] patch-clamp technique; hippocampus; neural stem cell; differentiation; ion channel

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672217) and the Science Foundation of Education Committee of Chongqing (06-2-158).
Corresponding author: Jiang Li, Tel: 86-23-63624424, E-mail: dr_jiangli@126.com

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是指具有自我更新和多向分化潜能的一类细胞[1],也被认为是有可能实现脑损伤后结构与功能重塑的"种子细胞"。因此对NSCs的增殖、分化、电生理特性的研究成为修复脑损伤的一个研究热点。尽管对神经干细胞的研究已逐步深入,但主要是通过形态学、免疫细胞化学来研究体外培养和分化的神经干细胞特性,而对其生理特性研究不多。众所周知,神经细胞具有特殊的兴奋性,而电压门控离子通道是神经细胞产生电活动的分子基础。研究提示不同状态下的神经细胞具有不同的电生理特征,离子通道的发育、分化是NSC向具有成熟生理功能神经细胞转变的关键。因此,NSC从未分化状态向分化状态转变可能伴随不同离子通道表达的改变,为此,我们采用膜片钳技术对体外培养的海马神经干细胞分化早期离子通道的表达和电生理特征进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

取孕15~16 d Wistar胚胎鼠海马细胞在含2% B27(Gibco,美国)、20 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF(Peprotech,美国)的

[基金项目] 国家自然科学基金(30672217);重庆市教委科研基金(06-2-158)
[通信作者] 蒋 莉,电话:(023)63624424,E-mail: dr_jiangli@126.com

DMEM/F12(Invitrogen,美国)培养基中培养,3 ~ 5 d 半量换液,5 ~ 7 d 后传代,形成干细胞球后取 2 ~ 3 代细胞球机械分离为单细胞或小细胞团接种于经多聚赖氨酸包被的盖玻片上,贴壁后采用添加了 2% B27,500 μmol/L 谷氨酰胺(Sigma,美国)的促神经元分化 Neurobasal 培养基(Invitrogen, 美国)2 ~ 3 d 半量换液。采用倒置相差显微镜(Nikon 公司)QCapture pro 显微镜摄像系统(Photometrics 公司)进行拍摄。取贴壁 1 h 未分化和培养 1 ~ 3 d 分化早期的细胞进行膜片钳实验,实验前用氧饱和的细胞外液替换无血清培养基。我们前期的研究证实所培养的细胞均为神经干细胞,同类离子电流检测细胞反应一致[2]。

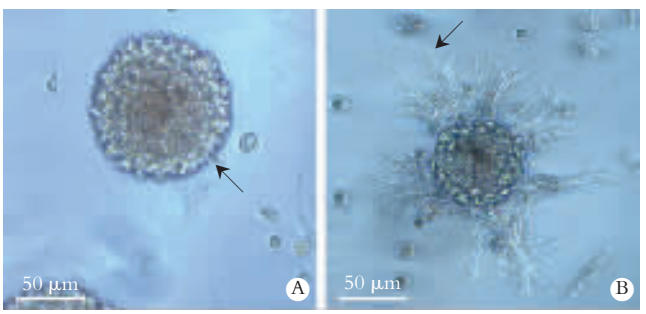
1.2　全细胞膜片钳记录

根据预先设计的刺激方案,采用电压钳和电流钳方式记录电压依赖性钠、钾、钙离子通道电流。膜片钳微电极采用两步法拉制,尖端直径 0.5 ~ 1 μm,充灌电极内液后电阻阻抗为 1.5 ~ 2.5 MΩ,将含神经细胞的盖片置于倒置显微镜记录浴槽中,选择单个未分化的神经干细胞或培养分化 1 ~ 3 d 具有 1 个或 2 个突起呈梭形或锥状胞体的神经元样细胞进行记录。用细胞外液以 3 ml/min 恒速灌流冲洗细胞表面,调节三维操纵仪进行封接,形成高阻封接(>1 GΩ)后,采用脉冲式抽吸破膜形成全细胞记录模式。电容电流和漏电流采用 P + P/4 方法消减。使用 Multiclamp 700B 膜片钳放大器、Digidata 1200A 处理器、Clampex9.2 采样软件及 Clampfit9.2 软件(Axon Instruments,美国)进行数据采集和分析。实验在室温(19 ~ 22 ℃)下进行。

标准细胞外液成分(mmol/L):NaCl 140,KCl 5,$CaCl_2$ 1.8,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,HEPES 10,D-glucose 10,用 KOH 调 pH 至 7.2;钠电流电极内液成分(mmol/L):CsF 140,HEPES 10,EGTA 10,TEA 10;钾电流电极内液成分(mmol/L):KF 140,HEPES 10,EGTA 10,ATP-Na2 5;钙细胞外液成分(mmol/L):氯化胆碱 140,CsCl 4,$BaCl_2$ 10,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,HEPES 10,D-glucose 10;钙电极内液(mmol/L):CsCl 140,HEPES 10,EGTA 10,TEA 10,钾、钠、钙电极内液及钙细胞外液均用 CsOH 调节 pH 值至 7.2。

2　结果

传代 2 ~ 3 代细胞状态好,经机械分离为单个细胞或小细胞团块后接种于多聚赖氨酸包被的玻片上形成未分化的神经干细胞球(图 1A)。将干细胞培养基换为含 B27 的无血清 Neurobasal 培养基。促分化后 2 ~ 6 h,细胞帖壁,开始长出突起,并逐渐呈放射状从神经球中迁出(图 1B)。

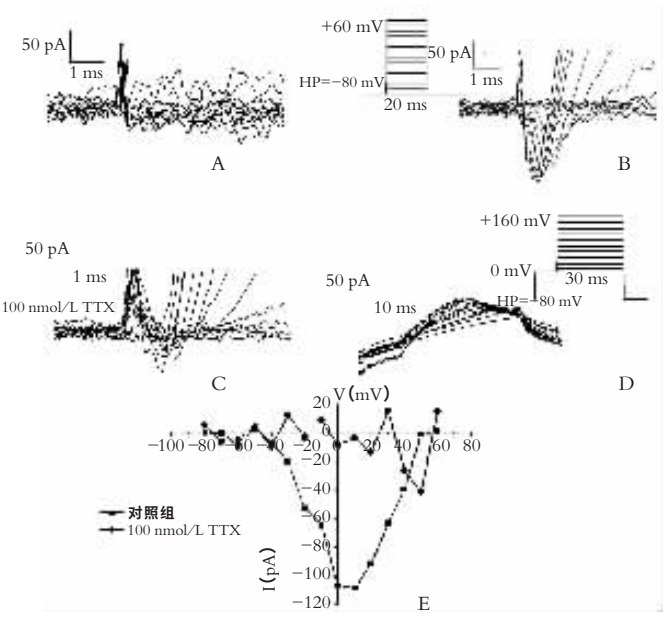


A:未分化 NSCs(箭头所示);B:分化早期 NSCs(箭头所示)

图 1　倒置相差显微镜观察未分化与分化早期 NSCs

2.1　电压依赖性钠电流及药理学鉴定

在电压钳模式下,将钳制电压(holding potential, HP)设为 −80 mV,给予体外培养未分化(n = 24)和分化的细胞(n = 18)去激化步阶刺激各组细胞对刺激反应一致,刺激电压从 −80 mV 阶跃至 +60 mV,步幅 10 mV,时程 20 ms。体外培养未分化的 NSCs 未见内向电流(图 2A)。体外诱导分化后 1 d 即可检测到明显的具有电压依赖性、快速激活、快速失活的内向电流(图 2B),此内向电流可被选择性钠通道阻断剂河豚毒素(tetrodotoxin,TTX,100 nmol/L)阻断,因此判断此电流为电压门控钠离子电流(I_{Na})(图 2C)。采用电流钳,HP 设为 −80 mV,从 0 mV 阶跃至 +160 mV 对细胞注入超过基强度的脉冲去激化电流,不能诱发动作电位产生(图 2D)。TTX 作用前后电流电压关系 I-V 曲线示 TTX 可以明显抑制内向性电流(图 2E)。



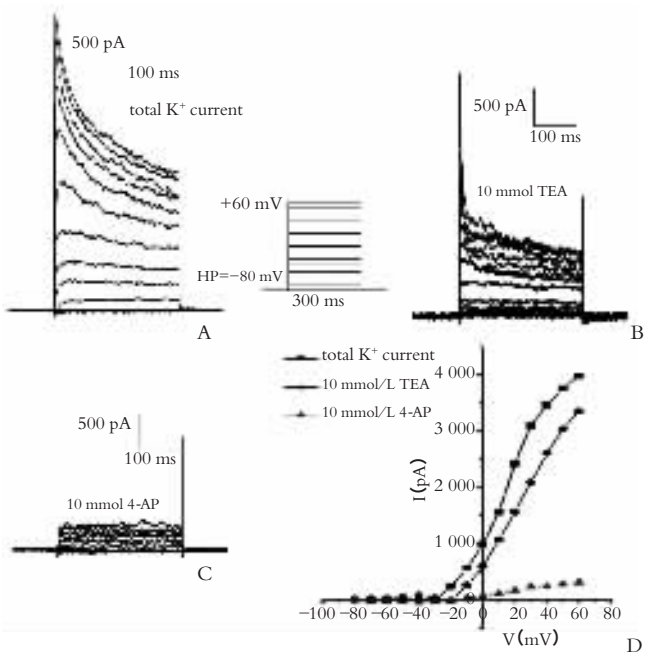
A:未分化 NSCs 未见内向电流;B:NSCs 促分化后 1 d 记录到的 I_{Na};C:向图 B 细胞中加入 TTX 使 I_{Na} 受到抑制;D:给予图 B 细胞脉冲刺激去极化电流产生的局部电位;E:TTX 作用前后 I-V 曲线图

图 2　未分化及分化早期 NSCs I_{Na} 电生理特征

2.2　电压依赖性钾电流及药理学鉴定

将 HP 设于 −80 mV 给予未分化 NSCs 去激化步阶刺激,从 −80 mV 以 10mV 的增幅复极化至 +60 mV,时程 300 ms,记录到全细胞外向电流(I_K)(图 3A)。未分化的神经干细胞(n = 22)和分化早期(n = 18)的神经细胞各组对刺激的反应一致。氯化四乙胺(Tetraethylammonium, TEA)为延迟整流钾电流[$I_{K(DR)}$]的特异性阻断剂,向细胞外液加入 10 mmol/L TEA 进行灌流后,电流幅度明显下降,出现快速失活的电流成分,随后用正常细胞外液灌洗,电流幅度较前部分恢复,提示外向电流中含有延迟整流电流成分(图 3B)。四氨基吡啶(4-aminopyridine,4-AP)是瞬时外向钾电流的特异性阻断剂,在记录到 I_K

后,向细胞外液加入 10 mmol/L 4-AP,快速失活的电流成分受到抑制(图 3C)。由此证明 I_K 中快速失活的电流成分为瞬时外向钾电流[$I_{K(A)}$],从而进一步证实在未分化的神经干细胞和分化早期的神经细胞记录到的外向电流为由 $I_{K(DR)}$ 和 $I_{K(A)}$ 组成的电压依赖性钾电流。进一步采用分化早期的 NSCs 进行相同实验,得到与未分化 NSCs 相同的结果。图 3D 为 I_K 和 TEA、4-AP 作用后的电流电压关系 I-V 曲线。

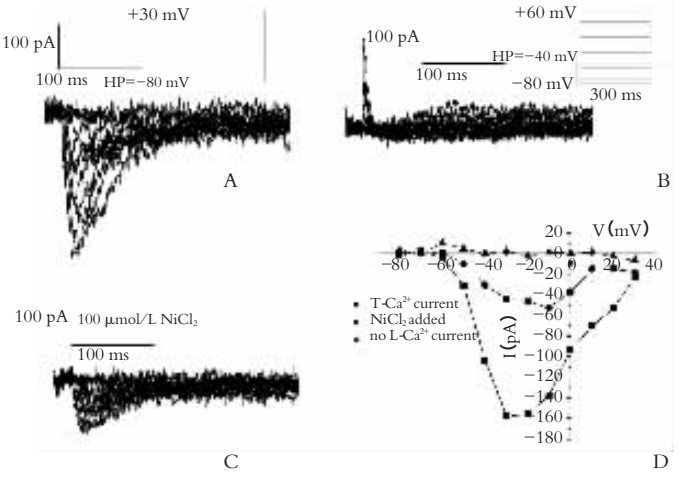


A: NSCs 或分化早期神经细胞记录到的 I_K;B: 10 mmol/L TEA 抑制 $I_{K(DR)}$;C: 10 mmol/L 4-AP 抑制 $I_{K(A)}$;D: I_K 及加 TEA 和 4-AP 后 I-V 曲线图

图 3 未分化及分化早期 NSCs I_K 电生理特征

2.3 电压依赖性钙电流及药理学鉴定

将 HP 设为 −80 mV 或 −40 mV, 分别从 −80 mV 以 10 mV 步阶递增至 +30 mV(HP = −80 mV)或 +60 mV(HP = −40 mV),时程 300 ms,分离低电压激活(low voltage-activated, LVA)和高电压激活(high voltage-activated, HVA)钙电流成分,分别对未分化(n = 25)和分化早期(n = 22)神经干细胞进行研究,各组细胞对刺激的反应表现一致。当 HP 位于 −80 mV 时,未分化和分化细胞都出现内向电流(图 4A),而 HP 为 −40 mV 时,没有内向电流产生(图 4B),提示不表达 L-I_{Ca}。根据 I-V 曲线(图 4D)得知激活电压为 −50 mV,提示内向电流属于 LVA 钙电流。硝苯地平(nifedipine)是 HVA 钙电流中 L 型钙通道的特异性抑制剂,氯化镍($NiCl_2$)是 LVA 钙电流中 T 型钙通道的特异性抑制剂,向细胞外液中加入 10 μmol/L nifedipine 不影响电流幅度而 100 μmol/L 的 $NiCl_2$ 则明显抑制内向电流幅度(图 4C),证实此内向电流为 T-I_{Ca}。提示未分化和分化早期的 NSCs 主要表达 T 型钙离子通道。



A: NSCs 或分化早期神经细胞记录到的 T-I_{Ca};B: NSCs 或分化早期神经细胞不表达 L-I_{Ca};C: 100 μmol/L $NiCl_2$ 抑制 T-I_{Ca};D: T-I_{Ca}、B 电流图和加 $NiCl_2$ 后 I-V 曲线

图 4 未分化及分化早期 NSCs I_{Ca} 电生理特征

3 讨论

我们采用膜片钳全细胞记录方法检测体外培养的 NSC 分化早期离子通道的表达特征。记录钾离子电流和钙离子电流时,我们采用特定的刺激方案和电极内外液能避免钠离子电流的激活,此外在验证相应电流时我们采用钾、钙离子通道特异性的阻断剂,因此能够说明我们所检测到的分别为钾离子电流和钙离子电流。

对 Na^+ 通道的研究发现,未分化的 NSCs 不表达 Na^+ 通道,与文献[3]结果一致。本研究还发现,体外诱导分化后 1 d 即可检测到 TTX 敏感的内向电压依赖性 I_{Na},提示 Na^+ 通道的表达在 NSC 的分化早期发生了明显变化。众所周知,电压依赖性 Na^+ 通道主要与成熟神经元动作电位的产生和传播有关,但 Na^+ 通道在神经干细胞中的作用目前尚不清楚。本实验结果显示,虽然体外培养的神经干细胞在分化早期即表达电压依赖性 Na^+ 通道,但是由于电流幅度较小,不能产生动作电位。而其表达 I_{Na} 的 I-V 曲线与成熟的神经元相似,提示尽管不能产生动作电位,但分化早期的 Na^+ 通道具有调节神经细胞兴奋性的潜能。有学者报道,脑室管膜区的神经细胞从胚胎 14 d 起开始表达功能性的 I_{Na},并在这一时期退出增殖细胞周期开始分化和迁移[4],结合本实验结果可以推测,神经发生过程中 Na^+ 通道的功能性表达是 NSCs 退出细胞周期开始分化的标志。

相关研究提示电压依赖性 K^+ 离子通道广泛存在于发育中的中枢神经系统,本研究也发现,体外培养的神经干细胞在分化前后均表达外向性 $I_{K(DR)}$ 和 $I_{K(A)}$。在神经发生过程中,钾离子通道主要参与调节 NSCs 的增殖和迁移[5-8],而对于成熟神经元,$I_{K(DR)}$ 和 $I_{K(A)}$ 则主要促进动作电位复极化。其中,$I_{K(A)}$ 是动作电位复极化早期外向电流的主要成分,减慢去极化速度,延缓动作电位产生,决定动作电位产生的频率,在重复放电和动作电位传递过程中具有重要作用[9]。

我们推测,不能诱导分化早期的 NSCs 产生动作电位,可能与 NSCs 早期表达 $I_{K(DR)}$ 和 $I_{K(A)}$,而 I_{Na} 电流幅度较小,Na^+ 通道的发育与 K^+ 离子通道发育不平衡有关;因此在未分化和分化早期的 NSCs 中发现的 I_K 可能主要在 NSCs 的增殖和迁移过程中发挥重要作用。

与 K^+ 离子通道相似,我们发现分化前和分化后的神经干细胞均表达 LVA 钙通道中的 T-Ca^{2+} 通道,Ca^{2+} 通道在神经发生早期即开始表达。有人在胚胎海鞘肌肉发育的研究发现,钙离子电流 I_{Ca} 先于快速内向和外向整流钾离子电流出现[10],在发育早期,Ca^{2+} 通过电压门控通道流入,将增加神经元 $I_{K(DR)}$ 的激活率。采用细胞内钙离子浓度成像技术已发现在神经细胞早期发育过程中,激活电压依赖性 Ca^{2+} 通道,Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 出现自发性波动,可以诱发自发性电活动产生[11]。自发的电活动在 NSCs 早期发育过程中通过影响 mRNA 的稳定性和转录水平,影响多种离子通道的表达,对神经系统的发育具有重要作用[12]。T-Ca^{2+} 通道在多种类型细胞的发育早期表达明显,T-I_{Ca} 作为潜在的起搏电流,在形成自发性电活动和信号传递过程中发挥重要作用,阻断 T-I_{Ca} 将阻断自发性电活动[13]。关于皮层和海马神经元研究发现 T-I_{Ca} 或 LVA 钙电流随着发育逐渐降低或消失[14,15],提示 T-Ca^{2+} 通道在细胞发育早期具有重要作用。

通过本研究我们初步证明体外培养的神经干细胞在分化早期功能性的表达与成熟神经元不相同的 Na^+、K^+、Ca^{2+} 通道。表达外向性 I_K 和 T-I_{Ca} 而 I_{Na} 缺失可能是 NSC 的特征之一。Na^+ 通道的表达可能标志着神经干细胞分化开始。进一步通过生长因子或细胞因子对神经干细胞分化早期进行干预调控,研究分化过程中不同类型离子通道的表达和动力学特性,对于理解神经发生,调控神经干细胞的增殖、分化和迁移,实现脑功能重建具有重要意义。

参考文献:

[1] Gage F H. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457):1433-1438.

[2] Li T, Jiang L, Chen H, *et al*. Characterization of excitability and voltage-gated ion channels of neural progenitor cells in rat hippocampus[J]. J Mol Neurosci, 2008, 35(3):289-295.

[3] Smith D O, Rosenheimer J L, Kalil R E. Delayed rectifier and A-type potassium channels associated with Kv 2.1 and Kv 4.3 expression in embryonic rat neural progenitor cells[J]. PLoS ONE, 2008, 3(2): e1604.

[4] Bahrey H L, Moody W J. Voltage-gated currents, dye and electrical coupling in the embryonic mouse neocortex[J]. Cereb Cortex, 2003, 13(3):239-251.

[5] Schwab A, Schuricht B, Seeger P, *et al*. Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K^+ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume[J]. Pflugers Arch, 1999, 438(3):330-337.

[6] Pardo L A. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation[J]. Physiology (Bethesda), 2004, 19:285-292.

[7] Kessler W, Budde T, Gekle M, *et al*. Activation of cell migration with fibroblast growth factor-2 requires calcium-sensitive potassium channels[J]. Pflugers Arch, 2008, 456(5):813-823.

[8] Schwab A. Ion channels and transporters on the move[J]. News Physiol Sci, 2001, 16:29-33.

[9] Meldrum B S, Rogawski M A. Molecular targets for antiepileptic drug development[J]. Neurotherapeutics, 2007, 4(1):18-61.

[10] Dallman J E, Davis A K, Moody W J. Spontaneous activity regulates calcium-dependent K^+ current expression in developing ascidian muscle[J]. J Physiol, 1998, 511(Pt 3):683-693.

[11] Spitzer N C. Electrical activity in early neuronal development[J]. Nature, 2006, 444(7120):707-712.

[12] Moody W J, Bosma M M. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells[J]. Physiol Rev, 2005, 85(3):883-941.

[13] Gu X, Spitzer N C. Low-threshold Ca^{2+} current and its role in spontaneous elevations of intracellular Ca^{2+} in developing Xenopus neurons[J]. J Neurosci, 1993, 13(11):4936-4948.

[14] Chameau P, Lucas P, Melliti K, *et al*. Development of multiple calcium channel types in cultured mouse hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 1999, 90(2):383-388.

[15] Tarasenko A N, Isaev D S, Eremin A V, *et al*. Developmental changes in the expression of low-voltage-activated Ca^{2+} channels in rat visual cortical neurones[J]. J Physiol, 1998, 509(Pt 2):385-394.

(**收稿**:2009-06-03;**修回**:2009-10-19)

(编辑 汪勤俭)