基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1479-03

大鼠 Meynert 核神经元钠钾钙电流观察

朱淑娟[1],钱亦华[2],史利利[2],张萌涛[2],胡晓丹[2]
(1. 重庆医科大学神经科学研究中心,重庆 400016;2. 西安交通大学医学院人体解剖与组织胚胎学系,西安 710016)

【摘 要】目的:检测 Meynert 核团(Nucless basalis of meynert,nbM)神经细胞膜上钠、钾、钙通道电流。方法:采用细胞急性分离技术获得单个神经元,运用单细胞膜片钳技术全细胞记录方式记录钠、钾、钙通道电流。结果:钠电流激活失活均很迅速,-50 mV 时峰值电流达到最大,约 3~4 nA;钾离子电流分为瞬时外向钾电流(I_A)和延迟整流性钾电流(I_k)两部分,I_A 部分失活较快,I_k 部分几乎不失活,峰值电流最大约为 7~8 nA;记录出内向的钙电流,失活较慢,大约 0~10 mV 时峰值电流达到最大,通过运用 $CdCl_2$ 证明该电流为 Ca^{2+} 离子所介导的高电位激活性钙电流。结论:在 nbM 神经元上能够诱导出钠、钾、钙电压门控通道电流,为进一步相关研究提供了实验依据。

【关键词】膜片钳;Meynert 核;钠、钾、钙电流
【中国图书分类法分类号】R322.81 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-07

The observation of sodium current, potassium current and calcium current on the neurons of nucleus basalis of Meynert in rat

ZHU Shu-juan, et al
(*Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To record normal sodium current, potassium current, and calcium current on neurons of nucleus basalis of Meynert (nbM). ***Methods***: Single-cell was obtained with cell acutely dissociated technique, sodium current, potassium current, and calcium current were recorded by patch-clamp technique of single cell under whole cell patch pattern. ***Results***: The activation and inactivation of sodium current were showed swiftly. The sodium peak current reached maximum, about 3~4 nA at -50 mV. Potassium current included transient outward potassium currents (I_A) and delayed rectifier-like potassium currents (I_k). I_A was activated swiftly, I_k was hardly inactivated. The Potassium peak current was about 7~8 nA. The inward calcium current was inactivated slowly. The calcium peak current reached maximum, while the voltage was 0~10 mV. The current was blocked by 20 μmol/L $CdCl_2$ completely. ***Conclusion***: The voltage-gated sodium channel current, voltage-gated potassium channel current, and voltage-gated calcium channel current were recorded successfully. It provided experimental data for further research.

【Key words】Patch clamp; Nucleus basalis of Meynert; Sodium current, potassium current, calcium current

在解剖学中,Meynert 核(Nucless basalis of meynert,nbM)作为基底前脑一个重要核团,位于豆状核下方,大鼠脑立体定位额状切面上,它与苍白球毗邻,其结构最明显处位于苍白球腹内侧[1]。该核团神经元比苍白球细胞大 1 倍,呈梭形,锥体形与椭圆形不等,且 90%的神经元是胆碱能神经元,发出纤维投射到皮层和海马,参与学习与记忆功能。形态学以及生化分析研究已表明其在中枢神经退行性疾病发病机制中扮演着不容忽视的角色,有关生理学方面的研究资料较少。本研究拟通过急性分离技术获取大鼠 nbM 神经元,采用单细胞膜片钳技术记录其膜上钠钾钙通道电流,从生理学角度观察研究该核团,为中枢神经系统相关疾病病理机制的研究提供实验资料。

作者介绍:朱淑娟(1975-),女,讲师,博士,研究方向:神经生物学。
通讯作者:钱亦华,女,教授,E-mail:qinyh38@xjtu.edu.cn。
基金项目:西安市科技局资助项目(编号:GG04145、GG06175)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 正常 SD 大鼠(10~15 d),体质量 25~30 g,雄雌不拘,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 HEPES、TTX、TEA-CL、Na_2ATP、EGTA、多聚赖氨酸等均购自美国 Sigma 公司;软质玻璃微电极购自美国 Sutter 公司;CsCl(中国医药集团上海化学试剂公司);$CdCl_2$(西安化学试剂厂 分析纯)。

1.1.3 主要设备 膜片钳放大器(Axonpatch 200B Axon instruments 美国),显示器与摄像头(JVC 日本),倒置相差显微镜(Leica 德国),数模转换器(Digitata 1322A Axon instruments 美国),玻璃微电极拉制仪(Model P-97 sutter instruments 美国)。

1.1.4 主要溶液及配制 标准细胞外液(mmol/L) NaCl 150, KCl 5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, 葡萄糖 10,将以上成分按

浓度溶解于三蒸水中，用 Tris-base 将 pH 调至 7.4。

多聚赖氨酸溶液　用三蒸水溶解多聚赖氨酸干粉，配成 0.5 mg/ml 储备液冻存(使用时，用三蒸水做 50 倍稀释成工作液。过滤除菌，4℃保存)。

记录用细胞外液(mmol/L)　记录钠离子：NaCl 120，KCl 5，$CaCl_2$ 2，$MgCl_2$ 1，HEPES 10，葡萄糖 10，TEA-Cl 30，$CdCl_2$ 0.02；记录钾离子：NaCl 150，KCl 5，$CaCl_2$ 2，$MgCl_2$ 1，HEPES 10，葡萄糖 10，TTX 0.001，$CdCl_2$ 0.02；记录钙离子：NaCl 120，KCl 5，$CaCl_2$ 3，$MgCl_2$ 1，HEPES 10，葡萄糖 10，TEA-Cl 30，TTX 0.001，皆调 pH 为 7.3。

记录用电极内液(mmol/L)　记录钠离子：CsCl 140，TEA-Cl 10，EGTA 10，HEPES 10，Na_2ATP 2；记录钾离子：KCl 150，HEPES 10，EGTA 10，Na_2ATP 2；记录钙离子：CsCl 140，TEA-Cl 10，EGTA 10，HEPES 10，Na_2ATP 2，皆调 pH 为 7.2。

1.2　*方法*

1.2.1　分离 nbM 核团神经元[2]　出生 10～15 d 正常 SD 大鼠，雄雌不拘。在 10%水合氯醛腹腔深度麻醉下，快速断头，取脑，修剪后用 502 胶粘到干净的标本台上，切 400 μm 厚的活脑片，入标准细胞外液中孵育，31℃条件下，用 0.016% pronase E(用充氧饱和的标准细胞外液配制)消化 25 min；再次孵育后，用特制的针扎取 nbM 核团，Pasteur 玻璃管吹散组织块，制成单细胞悬液。贴附于培养皿中预先涂有多聚赖氨酸的盖玻片上，用标准细胞外液轻轻冲洗培养皿 2、3 次，随机选取形状较大、形态特征保持良好，表面光滑的梭形、锥体形或椭圆形神经元进行膜片钳全细胞记录。

1.2.2　全细胞记录　使用单细胞膜片钳全细胞模式记录电流。玻璃微电极用外径 1.5 mm 的毛细玻璃管，电极拉制仪两步拉制。记录电极阻抗为 3～6 MΩ。记录到的膜电流经膜片钳放大器放大，再通过 A/D 和 D/A 数模转换器，输入到计算机上进行存储。用 Clampex8.2 软件进行数据采集。灌流速度：1～2 ml/min。

1.2.3　数据处理　将 Clampex8.2 软件记录下来的原始数据文件经 Clampfit8.2 软件进行测量后，作峰值电流－电压曲线图，所有数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2　结　果

2.1　*Meynert 核团神经元形态学观察*

倒置相差显微镜下可以看到该核团神经元细胞体积较大，是周围核团神经元的一倍；胞膜光滑；胞体呈梭形、锥体形及椭圆形，立体感强；胞膜光滑；胞质均一；多极神经元多见，常可观察到有 2、3 条长而明显的突起(见图 1)。

2.1　*钠电流*

细胞外液中给 20 μmol/L $CdCl_2$ 阻断钙离子通道，细胞外液中给予 60 μmol/L 的 TEA-Cl，电极内液中含有 10 μmol/L TEA-Cl，140 μmol/L CsCl 用来阻断钾离子通道，在形成全细胞记录方式后，保持钳制电压为 -80 mV，给予 -60～+30 mV 的方波刺激，步幅为 10 mV，时程为 50 ms，发现 -60 mV 时已经激活，-50 mV 时峰值电流达到最大，约是 3~4 nA；激活与失活都很迅速(表 1)。电流曲线见图 2，I-V 曲线见图 3。

2.2　*钾电流*

在形成全细胞记录方式后，细胞外液中给 10 μmol/L $CdCl_2$ 阻断钙离子通道，给 0.3 μmol/L TTX 阻断钠电流，保持钳制电压 -100 mV，给予 -40～+60 mV 的方波刺激，步幅 10 mV，时程为 200 ms，观察到该电流分为瞬时外向钾电流(I_A)和延

表 1　钠离子通道在各刺激电压下峰值电流(n=10，$\bar{x} \pm s$)

刺激电压(mV)	峰值电流(pA)
-60	-1 101.80 ± 798.40
-50	-2 928.30 ± 379.90
-40	-2 752.30 ± 236.50
-30	-2 486.00 ± 318.40
-20	-2 123.00 ± 374.670
-10	-1 754.00 ± 347.90
0	-1 387.10 ± 302.20
10	-1 030.20 ± 275.00
20	-748.80 ± 337.00
30	-494.00 ± 384.60

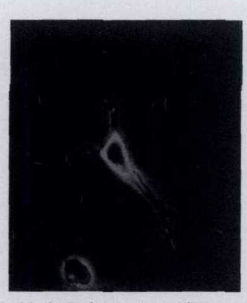


图 1　急性分离大鼠 nbM 神经元(×200)

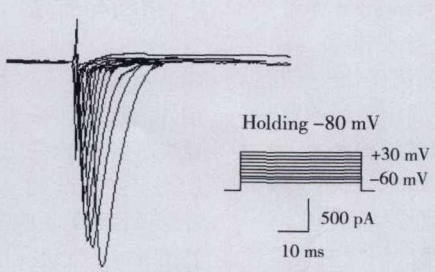


图 2　nbM 神经元钠离子电流

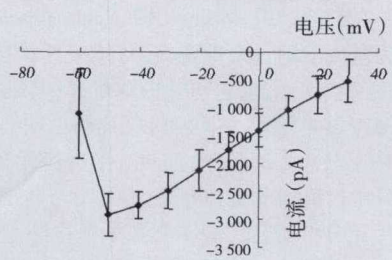
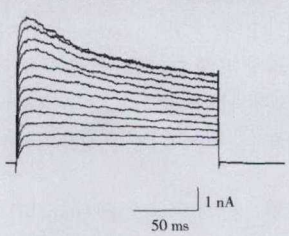


图 3　nbM 神经元钠离子 I—V 曲线



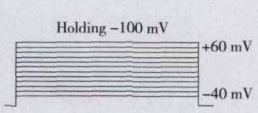


图 4　nbM 神经元钾离子电流

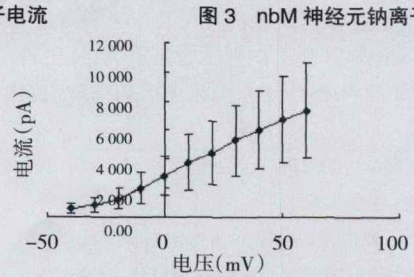


图 5　nbM 神经元钾离子 I—V 曲线

迟整流性钾电流(I_K)两部分,I_A 部分失活较快,I_k 部分几乎不失活,峰值电流最大约为 7~8 nA(表 2)。电流曲线见图 4,I-V 曲线见图 5。

2.3 钙电流

当用 TTX 阻断钠电流,细胞外液中给 TEA-Cl,电极中给 TEA-Cl、CsCl 阻断钾离子通道电流后,保持钳制电压 -70 mV,给予 -60~+50 mV 的方波刺激,步幅为 10 mV,时程 250 ms,可记录出内向的钙电流,失活较慢,大约 0~10 mV 时峰值电流达到最大(表 3),当向细胞外液中加入 20 μmol/L $CdCl_2$ 后,该电流被完全阻断。电流曲线见图 6,I-V 曲线见图 7。

表 2 钾离子通道在各刺激电压下峰值电流(n=10,$\bar{x}\pm s$)

刺激电压(mV)	峰值电流(pA)
-40	565.43 ± 324.49
-30	871.28 ± 496.70
-20	1 258.90 ± 677.30
-10	2 026.48 ± 1 088.45
0	2 811.40 ± 1 339.10
10	3 751.50 ± 1 948.80
20	4 457.66 ± 2 189.10
30	5 311.50 ± 2 461.40
40	6 033.58 ± 2 722.50
50	6 727.66 ± 3 019.20
60	7 354.80 ± 3 273.20

表 3 nbM 神经元钙离子在各刺激电压下的峰值电流(n=10,$\bar{x}\pm s$)

刺激电压(mV)	峰值电流(pA)
-60	0.42 ± 2.53
-50	-1.35 ± 3.62
-40	-6.56 ± 6.35
-30	-31.30 ± 22.50
-20	-131.00 ± 83.12
-10	-289.50 ± 164.70
0	-508.80 ± 183.00
10	-460.30 ± 105.20
20	-274.40 ± 54.20
30	-122.20 ± 17.20
40	-19.70 ± 14.50

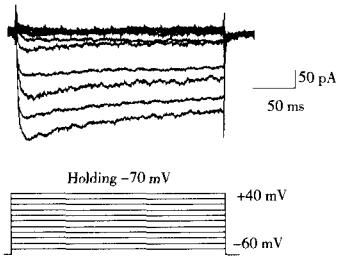


图 6 nbM 神经元正常钙离子电流

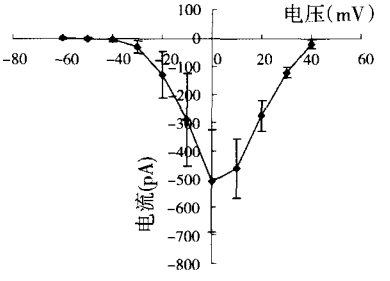


图 7 nbM 神经元钙离子 I—V 曲线

3 讨 论

基底前脑 Meynert 核团与学习记忆密切相关,大量研究表明 nbM 核是老龄过程中易受累区,核团内胆碱能神经元的大量丢失与认知功能障碍有密切关系[3-5]。nbM 核团胆碱能神经元的丢失作为阿尔茨海默病的三大病理特征之一,在其发病机制中发挥着重要作用。然而,目前有关这个核团的电生理特征报道罕见,且不是用单细胞膜片钳技术观察神经元膜上电流变化[6]。

在单细胞膜片钳全细胞记录模式下本研究结果显示:第一,内向的钠离子电流,其幅度较大,约为 3~4 nA 左右,当用钠通道阻滞剂阻断后,该电流消失,提示这是内向的钠电流;与同样年龄的 SD 正常大鼠比较,文献[7,8]表明海马 CA1 区锥体神经细胞膜上钠电流峰值只有 1~2 nA,随着年龄的增长,Na^+ 峰值增加,这可能与下列因素有关:①nbM 核团细胞自身特点(细胞大,形态多样,多为胆碱能神经元);②浴液中钠离子浓度。nbM 神经细胞膜钠通道是否会随着发育而发生变化,需要实验证据。另外该通道的激活与失活非常迅速,约 -50 mV 时达到最大,电流幅值在瞬间变化极大,时程约为 20 ms,分析它的激活与失活特征,与海马 CA1 区锥体神经元膜上钠通道比较基本相同[7];第二,当向外液中加入 TTX 阻断钠电流,加入 $CdCl_2$ 阻断钙电流时,便可以诱导出外向的钾电流,和海马神经元一样,它包括瞬时外向钾电流(I_A)和延迟整流性钾电流(I_K)两部分,I_A 激活失活较快,I_K 缓慢激活,几乎不失活,具有强烈的外向整流特性;文献报道,在大鼠生后发育过程中,海马 CA1 区锥体神经元的动作电位幅度增加,但时程缩短,提示参与动作电位和复极的钾通道在亚型和活性方面随发育可能发生变化;王斌等[9]的研究结果显示在 Wistar 大鼠的发育过程中,I_k 逐渐增加,4 周后发育基本完善。还有研究表明[10]未成年大鼠海马锥体神经元的动作电位复极主要依赖瞬时外向钾电流,而成年鼠则依赖延迟整流性钾电流;Zhang 等[11]还发现编码延迟整流钾通道的 Kv1.5 mRNA 的表达在大鼠脑皮质发育过程中逐渐增加,提示钾通道各亚型随发育而发生改变。这个核团神经元膜上的钾通道是否也表现这样的特点,值得进一步研究;第三,当用外液中 TTX 阻断钠通道,用电极内液中 CsCl、TEA-Cl 以及外液中的 TEA-Cl 阻断钾通道,给予去极化脉冲刺激即可记录到内向的钙电流,它的激活阈电位约为 -30 mV 左右,激活后失活缓慢,用 20 μ mol/L $CdCl_2$ 即可完全阻断该电流,提示这是 Ca^{2+} 介导的高电位激活性钙电流。但钙通道分型需作进一步研究。nbM 核团神经细胞膜钠、钾、钙电流的这些基本特

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1482-04

使用 hTERT 启动子联合 RNAi 靶向逆转乳腺癌的耐药性

黄金向,王继见,莫琳君
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:克隆人端粒酶逆转录酶启动子(Human telomerase reverse transcriptase,hTERT),探讨对乳腺癌细胞的特异性[1],利用 RNAi 技术靶向沉默耐药乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 乳腺癌耐药蛋白(Breast cancer resistance protein,BCRP)基因[2]的表达,观察 BCRP 的 mRNA 变化,BCRP 蛋白的表达以及对阿霉素耐药性的变化[3]。方法:构建重组质粒(pGenesil-CMV-shRNA、pGenesil-hTERT-shRNA),分别转染端粒酶阴性及阳性细胞,检测 hTERT 启动子的靶向性,应用 RT-PCR 及 Western-blot 技术检测不同组的细胞的 RNA、蛋白差异,MTT 法分析药敏性变化[4]。结果:端粒酶阳性的细胞可见很强的荧光,明显强于端粒酶阴性的细胞[5];细胞实验 RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示:BCRP 的 mRNA 和蛋白的表达受抑制与对照组其差异有显著性($P<0.05$);MTT 比色法结果显示:对阿霉素的药物敏感性明显提高。结论:使用 hTERT 启动子联合 RNAi 成功靶向沉默 BCRP 基因,乳腺癌 MCF-7/ADR 对阿霉素的敏感性明显增加,为进一步开发肿瘤的特异性基因沉默治疗奠定实验基础。

【关键词】重组质粒;启动子 hTERT;RNAi ;乳腺癌;MCF-7/ADR; 端粒酶阳性细胞
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-01

hTERT promoter targeting reverse drug resistance in breast cancer combined with RNAi

HUANG Jin-xiang, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical Universiey*)

【Abstract】*Objective*: To clone the promoter of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and investigate its selective effect on breast cancer cell, and to observe changes of breast cancer resistance protein (BCRP) mRNA, its protein expression and changes of drug resistance to doxorubicin with RNAi technology used in cell (MCF-7/ADR). *Methods*: Plasmids (pGenesil-CMV-shRNA, pGenesil-hTERT-shRNA) were recombined and transfected into telomerase-negative and-positive cells, hTERT promoter targeting was detected. RT-PCR, and Western-blot were applied to detect RNA and protein of different groups of cells. MTT was applied to analyze drug sensitivity. *Results*: Highly visible fluorescent was seen in telomerase-positive cells, which was stronger than that of telom-

作者介绍:黄金向(1980-),男,住院医师,硕士,研究方向:乳腺肿瘤。
通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:wangjj163@163.com。
基金项目:重庆市教委科学技术(编号:KJ080305)

点为进一步深入研究与 nbM 相关的中枢神经系统疾病奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 舒斯云,包新民. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社.1991.
[2] 朱淑娟,钱亦华,韩学哲. 急性分离 Meynert 核团神经元方法及其应用[J].中国老年学杂志,2006,26(6):811-813.
[3] 赵海花,赖 红,曾 亮,等.人参皂甙对老龄大鼠 Meynert 核及大脑皮质脑源性神经营养因子含量的影响[J].解剖学报,2006,37(2):223-225.
[4] 刘永红,柏 林. 学习记忆相关脑区[J].第一军医大学分校学报,2003,26(2):153-154.
[5] 张 蕲,田 青,胡茂琼,等. Meynert 基底核注射冈田酸致大白鼠空间记忆障碍[J].医药导报,2004,23(12):891-893.
[6] Bengtson C P, Osborne P B. Electrophysiological properties of cholinergic and noncholinergic neurons in the ventral pallidal region of the nucleus basalis in rat brain slices [J].J Neurophysiol,2000,83(5):2649-2660.
[7] 刘 照,张 进,陈怀红,等.皮质发育障碍大鼠海马神经元钠通道功能的变化[J].中国病理生理杂志,2008,24(12):2465-2469.
[8] 桑 楠,孟紫强.硫酸镁对大鼠海马 CA1 区神经元钠电流的抑制作用[J].生理学报,2002,54(6):539-543.
[9] 王 斌,仲崇波.大鼠海马锥体神经元延迟整流性钾电流的发育变化[J].徐州医学院学报,2008,28(8):513-517.
[10] Spigelman I, Zhang L, Carlen P L. Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K^+ currents [J]. J Neurophysiol,1992,68(1):55-69.
[11] Zhang Y L, Wang X L .Study on the mRNA exp ression of potassium channel gene Kv1.5 in the developing rat brain[J].Chin Pharmcol Bull,1999,15(6):505-508.

(责任编辑:冉明会)