文章编号: 1000-5404(1999)12-0933-03

脑片盲法全细胞记录技术的应用

技术方法

Application of whole-cell recording (blind) in brain slices

胡志安[1],李思本[2],黎海蒂[1] ([1]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]南京铁道医学院科学研究所,南京 200037)

【提要】 目的: 阐明脑片全细胞记录技术的原理,介绍获得满意封接的条件和程序。方法: 采用国内数据采样分析系统,进行微电极定位。常规膜片钳方法进行全细胞记录。结果: 在脑片上成功记录出双向的全细胞电流。突触前施加电刺激,可在突触后记录出兴奋性电流。结论: 通过提高微电极定位准确率,可有效增加盲法技术的封接成功率。

电生理记录技术的快速发展逐步满足了神经科学发展的需要。就脑片而言,迄今已有 3种类型的记录方法得到一定范围的应用,即场电位(Field potential)或细胞外(Extracellular)记录、细胞内(Intracellular)记录和全细胞(Whole-cell)记录。早在 80年代初,全细胞记录就在培养细胞和分离细胞上获得成功[1],藉此基础,脑片全细胞记录技术逐步得以发展。该技术充分地吸取了脑片技术的长处,即保留了被观察细胞周围环境的固有面貌,特别是保留了神经元的相互联系状态,不仅能让我们了解膜通道分子水平的活动,还能了解细胞之间的相互关系,对研究细胞膜离子通道、受体通道,突触传递等颇有益处[2]。我们最近在实验中采用了全细胞技术(盲法),取得了较为满意的结果。本文拟简介此项技术的原理和作者的工作体会。

1 材料与方法

1.1 基本原理

脑片全细胞记录的基本原理与培养细胞、分离细胞全细胞记录原理一致,但在封接前的具体操作方面,脑片全细胞记录有其特殊之处。问题主要来自 2个方面:① 非直视条件下的电极定位;② 神经元周围基质和胶质细胞对高阻抗封接的可能干扰。对于后者可采用物理或酶学的方法以消除可能的影响。相比之下,电极的定位则是脑片全细胞记录能否成功的关键所在。向记录电极输入外部命令电压(Command potential),电压范围 0.1~ 10 mV,同步记录该电极末端的电流变化,利用欧姆定律,亦可同步显示电阻变化。由于电阻变化完全取决于电极末端接触环境,因而电极的位置就可通过电流、电阻的变化得到准确的反映。如电极在 ACSF中时,电阻小;电极在组织间隙时,电阻变大;电极接触细胞的胞膜时,电阻显著增大;而当电极穿透胞膜时,电阻变小。由于在电极推进的过程中,电极位置的微小改变便能影响电极与胞膜的有效接触,因此及时准确确定电阻变化至关重要,对此采取的方法是,利用记忆示波仪的记忆功能或相应的设计电路连续显示电流的变化过程,当电极接触 ACSF时,此刻其电阻最小,电流因此较大(图 1中下方两电流曲线相距最远)。电极愈靠的细胞膜,电阻愈大,电流愈小(两电流曲线相距愈近)。封接成功时,电阻最大,电流最小(两曲线趋向重合)。电极如穿破胞膜,电流曲线重新分开,详见图 1。通过连续对比,可及时判定电极是否有效接触细胞膜。一旦确定电极已触及胞膜,即按常规步骤进行封接、破膜和记录。

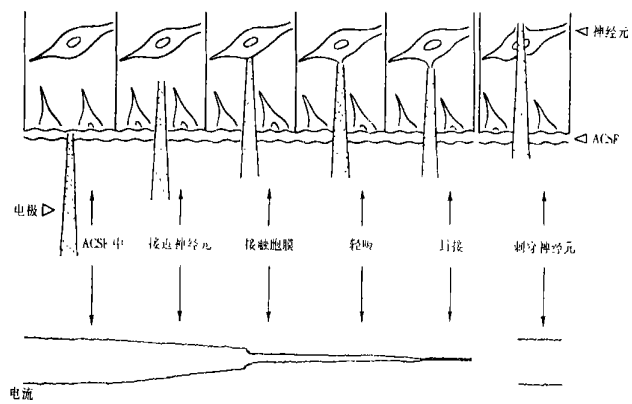


图 1 脑片全细胞记录形成过程

当电极接触 ACSF时,此刻其电阻最小,电流因此较大(图中下方两电流曲线相距最远)。电极愈靠近细胞膜,电阻愈大,电流愈小(两电流曲线相距愈近)。封接成功时,电阻最大,电流最小(两曲线趋向重合)。电极如穿破胞膜,电流曲线重新分开

1.2 实验仪器和材料

本实验主要设备包括膜片钳放大器(美国 Axonpatch 200A)、示波仪(日本光电)、倒置显微镜(国产)、微电极操纵器(日本成茂)、摄像监视器(日本索尼)、微电极拉制仪(日本)、

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39600048)

作者简介: 胡志安,男,1964.10.10生,湖北省安陆市人,在读博士生,副教授,主要从事神经生物学方面的研究,发表论文 8篇。电话: (023)68752254

收稿日期: 1998-12-24;修回日期: 1999-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

计算机及其采样分析系统 (由南京铁道医学院提供)。

实验材料: 玻璃电极 (美国产)的拉制参数为一拉 13.0,二拉 8.3 电极内液基本成分 (mmol/L): KCl 130, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 2, HEPES 10, pH值为 7.2~ 7.4,电极阻抗 2~ 3 MΩ。

1.3 脑片准备

大鼠 (3~ 5周龄)活杀断头后,取出海马,左右不限,顺海马槽纤维的走向连续切片,片厚 400~ 450μm,收集的脑片置于冰冻的人工脑脊液 (ACSF)中, ACSF成分为 (mmol/L): NaCl 124 KCl 5 $MgSO_4$ 2 NaH_2PO_4 1.25 N_2HCO_3 24 $CaCl_2$ 2 GS 10 pH值为 7.2~ 7.4 ACSF内保持 95% O_2与 5% CO_2的混合气体充灌。记录时取出结构清晰的脑片置于浴槽的尼龙网上,将脑片透明带 (神经元所在位置)走向尽量调整到与记录电极长轴一致。脑片保持 ACSF(不间断充以混合气体)灌流,速度适宜,既保证 ACSF供应,又不使脑片浮动。浴槽温度控制在 32℃~ 34℃。

2 记录结果

脑片上不仅可以完成常规的膜片钳记录,如全细胞记录、单通道记录,而且可进行类似于细胞内外记录方式的电活动观察,如兴奋性突触后电流、电位记录。这里,重点介绍以下 2项观察结果。

2.1 全细胞记录

电极封接成功后,再施加较大负压吸破胞膜,使胞浆与电极相通,形成全细胞方式。在不同的钳制电位水平下,给予电极尖端一相间 10 mV的阶梯 (Step)电压,可记录细胞膜电流反应,见图 2 从图可以看出,既有内向电流 (向下),又有外向电流。

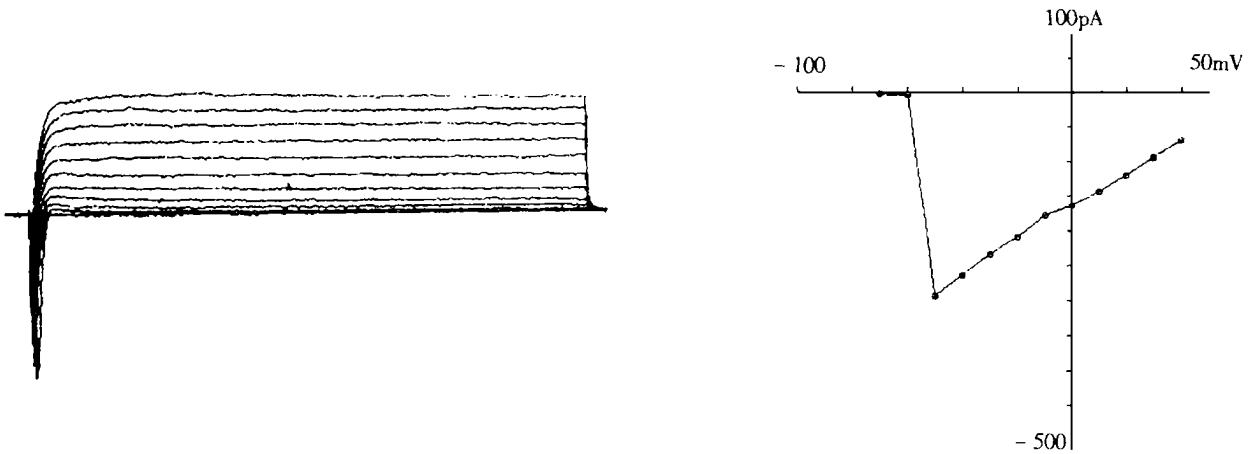


图 2 细胞膜的电流反应及电流-电压曲线

左图: 钳制电位为 - 90 mV时,不同阶跃电压情况下,神经元全细胞电流变化。右图: 据左图数据所作的电压-电流曲线。

2.2 兴奋性电流记录

全细胞记录方式形成后,在不同的钳制电位水平,电刺激海马 Schaffer侧枝记录 CA1区突触后兴奋性电流,见图 3 该电流也是既包含内向成分,又包含外向成分,用药物手段可确定每一成分的通道机制。

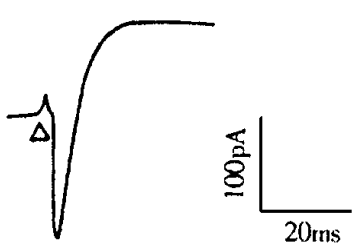


图 3 电刺激海马 Schaffer侧枝诱出的兴奋性突触后电流

3 讨论

自培养细胞、分离细胞膜片钳技术取得广泛成功后,人们便试图尝试在脑片上开展这项工作,原因在于脑片全细胞记录技术在了解神经元突触传递和膜的特性方面有其独到之处。一度认为脑片上因神经元周围有胞外基质和胶质细胞存在,而不易形成 GΩ 级封接,为此, Konnerth (1988年)采用物理方法,"清洁"神经元周围环境而使之易于封接 ("清洁"法), Miller (1989年)则采取酶消化加正压的策略,但 Blanton[1]介绍的"盲法"技术使人们相信上述问题并非经常发生。"盲法"技术的特点在于:① 稳定固定脑片;② 充分利用常规生理记录设备,如倒置显微镜等;③ 脑片不作特殊处理。现在,愈来愈多的文献支持盲法技术的合理性[3~ 5]。

脑片的"盲法"技术除需克服常规膜片钳方法的一般困难 (如高阻抗封接、保持稳定、破膜、给药方法等)外,还必须处理好脑片本身所带来的难题。针对实验中的具体情况,我们对他人的方法进行了不同程度的改

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进,使之更方便实用。下面总结的是有关封接前的两个关键技术环节与我们的做法。

3.1 电极位置显示

“盲法”技术目前国内成功开展的尚不多,究其原因主要是电极在推进过程中电极位置显示方法与技术尚不成熟,电极接触神经元的成功率低,导致记录成功率不高。我们的工作采用了经过一定程度改进的电极定位显示方法,使成功率保持在令人基本满意的水平。这项技术的特点是:电极周围环境的较小变化即可通过电阻值变化又可同时通过电流曲线的变化来指示,精确而直观。在实验中我们体会到,电阻与电流曲线的任一微小变化,都可反映出电极所处的位置。一旦电阻突然变大,将电极再推进少许,电阻值又不发生明显变化,此时即可认为电极已与细胞膜处在理想的接触位置上。

3.2 脑片准备

脑片无论是来自胎鼠还是来自成年鼠,其实验成功率并无明显差别,但在实验设计许可的情况下,尽量选择 3~5周龄的大鼠较好,这样可减少脑片准备的难度。进入浴槽的脑片,最好先在显微镜下观察大体结构是否完整、清晰。另外,为避免无谓地在同一脑片进行反复的封接尝试,随时确定脑片神经元是否处在良好的生理状态非常必要。我们发现如电极在接近胞膜过程中,电阻增大不明显,且又较快变小,细胞的状态可能不是最佳。接连出现这样情况,应考虑更换脑片。要保持细胞的状态,必须减少不必要的损害,注意准备和记录过程中 ACSF的灌流。我们采用了自己设计的浴槽,其特色是:整体容积小,网底容积更是控制在最小限度;网连同脑片可任意调整位置。优点是脑片得到有效灌流的同时,脑片稳定性好,ACSF更换速度快,操作方便。

关键词 脑片;封接;膜片钳方法
中图法分类号 R33-33 文献标识码 B

参考文献

[1] Blanton M G, Lo Turco J J, Kriegstein A R. Whole-cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex[J]. J Neurosci Meth, 1989, 30(3): 203-210.

[2] Chen W R, Midtgaard J, Shepherd G M. Forward and backward propagation of dendritic impulses and their synaptic control in mitral cells[J]. Science, 1997, 278(10): 463-467.

[3] Malinow R, Tsien R W. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recording of long term potentiation in hippocampal slices[J]. Nature, 1990, 346(8): 177-180.

[4] Manabe T, Renner P, Nicoll R A. Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents[J]. Nature, 1992, 355(12): 50-55.

[5] Kato K, Clifford D B, Zorumski C F. Long-term potentiation during whole-cell recording in rat hippocampal slices[J]. Neuroscience, 1993, 53(4): 39-47.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(1999)12-0935-02

毛囊真皮鞘成纤维细胞的培养

Culture of fibroblasts in dermal sheath hair follicle

钟白玉,吕中法,刘荣卿,伍津津 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

【提要】 目的:为了解真皮鞘成纤维细胞的生物学特征。方法:采用酶消化法、组织块法分别进行毛囊真皮鞘成纤维细胞培养。结果:2种方法均获成功。培养的真皮鞘成纤维细胞具有聚集生长的特征,胞体较大,一般有 2个突起;酶消化培养法操作简便、省时,但容易混有其它成纤维细胞;组织块法培养的细胞虽然培养速度较慢,但纯度较高。结论:组织块法是进行毛囊真皮鞘成纤维细胞研究较理想的培养方法。

脱发在临床上十分常见,一些难治性脱发如早秃目前尚无有效的治疗方法。一些研究显示毛乳头细胞在诱导毛囊再生和毛发生长周期的调控中起重要作用,已有报告毛乳头细胞在体内条件下可诱导出完整的毛囊,并且长出毛干[1]。真皮鞘是围绕毛囊最外层的真皮源性组织,有研究认为真皮鞘细胞是毛乳细胞的

作者简介:钟白玉,男,1958.09.25生,四川省邻水县人,主管技师,主要从事皮肤病理方面的研究,发表论文 11篇。电话:(023)68754114-73108

收稿日期:1999-05-01;修回日期:1999-07-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net