DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.041

新生大鼠培养神经元电压依赖性钙通道的膜片钳记录

The patch clamp recording of voltage-dependant calcium channel in cultured neuron of neonatal rat

宁 可 王正国 朱佩芳 陈长才* 李金鸣** (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室)
重庆, 630042

利用膜片钳技术对神经细胞离子通道进行研究,是近年神经电生理研究的热点之一。国内对神经细胞膜片钳的研究主要涉及某些单通道特性或全细胞的 K^+、Na^+ 通道电流,而电压依赖性 Ca^{2+} 通道电流的全细胞膜片钳记录,尚未见报道。目前对尼莫地平能否抑制 Ca^{2+} 的内流仍存在争议。本文采用较简易的方法培养新生大鼠皮层神经元,用全细胞膜片钳记录到电压依赖性 Ca^{2+} 通道电流,并观察尼莫地平对 Ca^{2+} 通道的作用。

1 材料与方法

1.1 培养液配制和鼠尾胶制备

DMEM培养基加入 10% 胎牛血清、10% 马血清、谷氨酰胺 0.5 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、$NaHCO_3$ 2.2 g/L、胰岛素 5 mg/L、青霉素 10^5 U/L、链霉素 5 mg/L,用 NaOH 调 pH 7.2~7.3 按 Bornstein[1] 法制备鼠尾胶。

1.2 新生大鼠皮层神经元分离与培养

出生后 1~2 d 大鼠,75% 乙醇浸泡 10 s 消毒,无菌操作下断头,取左顶叶皮质约 3 mm × 2 mm × 2 mm,置 4℃ 无钙无镁 Hanks 液中,在解剖显微镜下剥去软脑膜、血管及皮层下组织,置 0.25% 胰蛋白酶中(用 D-Hanks 液配制)37℃ 消化 30 min 毛细管吹打成悬液,过 200 目钢网。台盼蓝染色计数,调整细胞数为 1~2 × 10^6/ml 接种于内置 18 mm × 18 mm 盖玻片(两次涂胶原)的 35 mm 培养皿内,每个培养皿接种 2 ml 细胞悬液,24 h 更换含 10 μmol/L 阿糖胞苷的培养液,以后每 3 天换液一次,每次换半量。培养 72 h 后可做膜片钳记录。

1.3 膜片钳记录

本实验采用膜片钳技术,在 AXOPATCH-1D 型膜片钳放大器上用全细胞方式记录钙通道电流。在每次实验前用记录用细胞外液,组成为: NaCl 120 mmol/L, CsCl 5 mmol/L, TEA-Cl (氯化四乙基铵) 10 mmol/L, $BaCl_2$ 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, TTX (河豚毒素) 0.5 μmol/L,缓慢灌流。记录用玻璃电极的制作用日本 PP-83 型垂直拉制器,分二步拉成尖端内径约 1 μm,充填电极内液,其成分为: CsCl 130 mmol/L, TEA-Cl 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, $MgCl_2$ 2 mmol/L, K_2-ATP 2 mmol/L, EGTA 10 mmol/L。电极电阻约 5~8 MΩ。记录时一切指令发放及数据采集均由计算机完成,Digidata 1200 接口连接计算机与膜片钳放大器,采集参数由 pCLAMP 5.7.1 设定,并用该软件对结果进行分析及作图。本实验的电压强钳制方案为: 保持电位 -90 mV,先超极化至 -110 mV,然后用 10 mV 阶跃去极化,由 -90 mV 至 -10 mV 记录钙电流,接着用 10 μmol/L 尼莫地平灌流,观察电流变化。

2 结果

2.1 神经元形态观察

本组新生鼠分散的神经细胞呈椭圆形或三角形,多数细胞有短突起,经台盼蓝染色,细胞存活率达 90% 以上。培养 3 d 后,神经元胞体呈三角形,长约 20~30 μm,立体感强,胞核明显,突起变粗、变长并有分支(图 1),可选做膜片钳记录。



图 1 皮层神经细胞培养显微照像 72 h × 400

2.2 膜片钳记录结果

按上述记录方案,记录到的峰值钙电流为 435 ± 58 pA (n = 5)(图 2)。用 10 μmol/L 尼莫地平灌流后,峰值钙电流降至 177 ± 45 pA (n = 3),抑制率为 59.6% (P < 0.01)(图 3)。再用正常细胞外液灌流 3 min,电流值恢复至尼莫地平灌流前水平。

* 第一军医大学附属珠江医院神经外科 广州, 510000
** 中国医科大学药理学教研室 沈阳, 110000

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

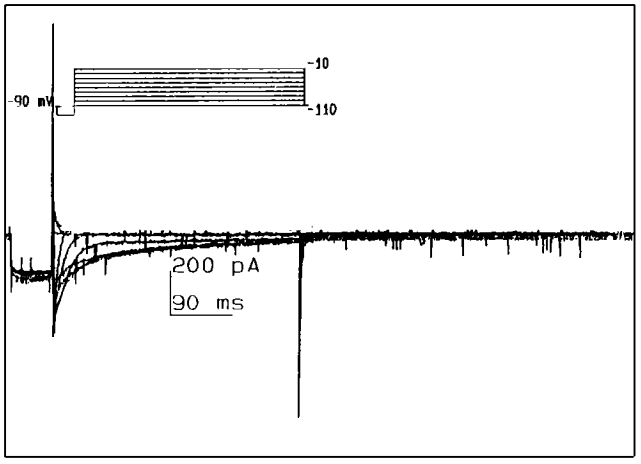


图 2 培养神经细胞钙电流图

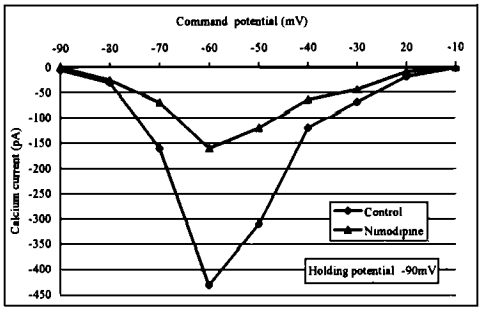


图 3 尼莫地平对培养神经细胞钙电流的影响
(电流 – 电压关系曲线)

3 讨论

本实验采用盖玻片二次涂胶原,置 35 mm培养皿内接种细胞悬液,培养新生大鼠皮层神经元。胰蛋白酶加机械分离有利于提高细胞的生存率。阿糖胞苷抑制非神经元生长,可获得具备较典型形态的神经元。用该神经元进行全细胞膜片钳记录,可记录到电压依赖性钙通道电流。本文记录到的钙电流与国外报道类似[2,3],但国内尚未见到类似报道。Netzer[4]认为, Ba^{2+} 代替 Ca^{2+} 负载做膜片钳记录可延迟失活及提高电流峰值。Ishikawa等[5]实验表明,提高细胞外液中 Ca^{2+} 或 Ba^{2+} 浓度,可增加内向钙电流,其最大有效浓度为 10 mmol/L,在此浓度 Ba^{2+} 负载的电流值为 Ca^{2+} 的 150% ,用 Nicardipine阻断钙通道的最大有效浓度为 10μmol/L。本组用 10 mmol/L $BaCl_2$代替 $CaCl_2$负载,有效地记录到钙通道电流(或称 Ba^{2+} 通道电流。用 10 mol/L尼莫地平可阻断 59.6% 的电流峰值。我们在细胞外液同时加入 CsCl和 TEA-Cl,有效地阻断了外向钾通道电流,并用 0.5 mol/L河豚毒素 (TTX)阻断了内向钾电流,可获得较纯的钙通道电流。本组参照 Study等[6]的方法,在去极化前先超极化至一定水平,可能和利于减少钙通道失活。由于本组记录从 -90 mV 去极化至 -10 mV,所获得的钙通道电流可能包含有 T、N、L、P型钙电流的成份。下一步将分别对 T、N、L、P型电压依赖 Ca^{2+} 通道电流进行研究。

关键词 神经元;膜片钳;钙通道;神经细胞培养;尼莫地平
中图法分类号 R338.1

参考文献

1 Bornstein MB. Reconstituted rat-tail collogen used as substrate for tissue culture on overslip in maximow slides and roller tubes. Lab Invest, 1958; 7: 134
2 Chen B, MxMabon DG, Mattson MP. Modulation of calcium current, intracellular calcium level and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. Brain Res, 1993; 607: 275
3 Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of L-type calcium current distorts the measurement of L-type and T-type calcium current in Purkinje myocytes. J Gen Physiol, 1993; 102: 859
4 Netzer R, Pflimlin P, Trube G. Tonic inhibition of neuronal calcium channels by G proteins removed during whole-cell patch clamp experiments. Pflugers Arch, 1994; 211: 426
5 Ishikawa T, Hume JR, Keef KD *et al*. Regulation of Ca^{2+} channels By cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. Circulation Res, 1993; 73: 1128
6 Study RE. Isoflurane inhibits multiple voltage-gated calcium current in hippocampal pyramidal neurons. Anesthesiol, 1994; 81: 104

(收稿: 1996-01-26;修回: 1996-06-27)
(编辑 张大春)

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