

大鼠背根神经节神经元的分离方法及电生理特征探讨

王 腾^{1,2}, 黄从新^{1,2}, 王高华³

1. 武汉大学人民医院心内科, 武汉 430060
2. 武汉大学心血管病研究所, 武汉 430060
3. 武汉大学人民医院精神卫生中心, 武汉 430060

摘要 在获取大鼠背根神经节神经元后, 全细胞膜片钳技术记录动作电位和钠电流, 探讨大鼠背根神经节神经元的分离方法和细胞形态以及电生理特征。结果显示, 本实验能得到完整圆形或椭圆长条形的大鼠背根神经节体。正常的单个背根神经节神经元呈圆形或椭圆形, 大小不等, 胞膜清晰, 折光性好, 隐约可见细胞核。在背根神经节细胞上记录的动作电位呈正立锐角三角形, 静息电位小, 动作电位时程短。背根神经节神经元的钠通道最大电流密度为 (-62.04 ± 4.45) pA/pF, 几乎能被河豚毒素 (TTX) 完全抑制。本实验分离方法简单易行, 背根神经节神经元容易获得和辨认, 电生理特征明确, 适用于神经系统疾病的电生理特征研究和治疗药物观察。

关键词 膜片钳技术; 背根神经节神经元; 大鼠; 电生理特征

中图分类号 R329.2+7

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)16-0032-04

Isolation Method of Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats and Their Electrophysiological Characteristics

WANG Teng^{1,2}, HUANG Congxin^{1,2}, WANG Gaohua³

1. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China
2. Cardiovascular Research Institute, Wuhan University, Wuhan 430060, China
3. Mental Health Centre, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract To investigate the isolation method of Dorsal Root Ganglion (DRG) neurons in rats and their electrophysiological characteristics, DRGs were obtained by double enzymatic dissociation. The patch clamp technique was used to record Action Potentials (AP) and sodium currents I_{Na} . The results show that a body of round and long DRG, and DRG neurons with middle measures and clear membranes and nucleus was obtained with good refraction properties. APs recorded in DRG neurons consist of five phases and in

shape of upward acute triangles, with small static potential and short action duration. I_{Na} for DRG neurons, as the peak current density, is equal to (-62.04 ± 4.45) pA/pF, and it is almost inhibited by tetrodotoxin and recovered from the inactivated state. It is concluded that the operations on the body of DRG are simple and easy to handle; DRG neurons are obtained quickly and identified; and the electrophysiological characteristics of DRG neurons are typical and clear. The methods and results may be used in investigations on electrophysiological properties and in medical treatments for diseases in nervous system.

Keywords patch-clamp technique; dorsal root ganglion neuron; rat; electrophysiological characteristics

背根神经节 (Dorsal Root Ganglion, DRG) 神经元是一类具有假单极结构特征的初级感觉神经元, 外周感觉信息起始于它的外周末梢并从中枢传导至脊髓背角, 借中枢末梢释放的神经递质作用于突触后靶细胞, 对感觉信息进行初步加工, 完成初级感觉信息的传递^[1]。由于 DRG 神经元在痛觉信息传递中起着特别重要作用, 所以在 DRG 细胞膜上促使动作电位产生传导痛觉信息的主要离子流——电压门控性钠通道的研究正受到国内外研究者越来越多的追捧^[2]。因此, 分离好的 DRG 神经元, 认知 DRG 神经元的好坏状态, 区分 DRG 神经元的电生理特性就显得尤其重要。本文首次系统介

收稿日期: 2009-06-05

作者简介: 王腾, 技师, 研究方向为人体生理学、离子通道病、冠心病等, 电子信箱: wangteng71@126.com

绍了 DRG 神经元的急性分离方法及认知活的神经元好坏形态,采用全细胞膜片钳技术记录 DRG 神经元离子通道电生理特征,目的是使借助 DRG 神经元从事膜片钳技术实验者能够正确判断和认知 DRG 神经元及其特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物与溶液试剂

实验动物均选为出生后 30 d 左右的雄性成年 Wistar 大鼠(武汉大学医学院实验动物养殖中心提供),体重 100~150 g。实验使用 Tyrode 液成分:NaCl 135 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, pH 值用 NaOH 调至 7.35。无 Ca²⁺ Tyrode 液和含有 0.2 mmol/L Ca²⁺ 的 Tyrode 液分别为 Tyrode 液中无 CaCl₂ 和仅加 0.2 mmol/L CaCl₂。记录 I_{Na} 的电极内液成分:CsCl 120 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, Na₂ATP 5 mmol/L, EGTA 11 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, pH 值用 CsOH 调至 7.3;记录 I_{Na} 的电极外液成分:NaCl 35 mmol/L, 氯化胆碱 100 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl₂ 0.1 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, pH 值用 NaOH 调至 7.3。记录动作电位的电极外液和内液分别采用记录 I_{Na} 的电极外液和内液。胶原酶 II、胰蛋白酶(type III)、胰蛋白酶抑制剂(type II-S)、HEPES、CsCl、CsOH、Na₂ATP、氯化胆碱、EGTA 均为 Sigma 公司产品,河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)购自河北省水产研究所,DMEM(Dubecco's Modified Eagle's Medium)培养液为 Gibco 公司产品,其他试剂为国产分析纯。

1.2 分离单个 DRG 神经元

参考文献[3],先阿托品(0.04 mg/kg)皮下注射,5 min 后腹腔注射 5%异戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉。将大鼠取俯卧势固定在小动物实验台上,备皮、消毒、铺无菌手术巾,按无菌操作要求钝性分离带有棘突和横突的胸腰段脊柱,置于 100% O₂ 饱和的 DMEM 液内,溶液 pH 值为 7.4,渗透压为 340 mOsm/kg。然后,在显微外科镜下用显微外科剪和显微外科镊仔细剪除与脊柱相连神经和周围的结缔组织被膜、棘突和横突,暴露椎间脊髓,牵起脊髓,咬开椎管处的椎间孔,露出膨大附着后根的 DRG,大小约 1 mm,表面光滑,小心用显微外科剪剪去 DRG 两端的脊神经干,保留膨大部分,就是 DRG 体。后用塑料滴管吸取 DRG 体,移到另一个盛有无菌 DMEM 培养液的 35 mm 培养皿中,尽可能地剪碎 DRG 体,后加入胰蛋白酶 I 型(0.5 mg/mL),胶原蛋白酶 II 型(1.0 mg/mL),并将培养皿置于恒温振荡水浴器(35℃,80 次/min)中振荡、孵育 45 min,显微镜下观察出现单个 DRG 神经元后,加入胰蛋白酶抑制剂(1.25 mg/mL)终止酶的消化作用,再将 DRG 细胞悬液转移到容积为 1~1.5 mL 经过改进的适合膜片钳记录的细胞记录槽中^[4],静置 30 min,待细胞贴壁后,用记录 I_{Na} 的细胞外液更换 DMEM 培养液 2 次,高倍镜下观察单个 DRG 神经元形态,根据目镜测微标尺所测定的细胞长轴和短轴计算得

出受检细胞直径的平均值,并开始全细胞膜片钳记录过程如下。

1.3 全细胞膜片钳记录

保持室温 22~26℃,将盛有单个 DRG 神经元的细胞记录槽置于倒置显微镜(日本 Olympus 公司,IX 70-122)载物台上,观察 DRG 神经元的形态、大小、状态的优劣度,选取直径 20~40 μm、胞膜完整、胞质清晰的优质 DRG 细胞作为记录对象。分别用记录动作电位和 I_{Na} 的细胞外液(100%氧饱和)冲灌预先加入到细胞记录槽中的静止贴壁单个 DRG 神经元 10 min,用全细胞膜片钳记录方法对细胞进行钳制,脉冲信号由 Pulse+Pulsefit 软件(version 8.31,德国 HEKA 公司)控制,经 EPC-9 放大器(德国 HEKA 公司)放大后通过 Ag-AgCl 电极丝和被填充记录动作电位或 I_{Na} 电极内液的玻璃微电极导入细胞,产生的电流信号经 EPC-9 放大器转换,信号为 Pulse 软件收集并存储于计算机的硬盘中。采用 Igor Pro 分析软件(version 3.31,美国)对实验图形进行拟合分析处理并应用到论文中。玻璃微电极是用玻璃管毛胚(中国科学院上海生理研究所,GG-17)经微电极拉制器(Narishige 公司,PP-83)二步拉制尖端为 1~1.5 μm 而成,电极冲灌电极内液,入细胞外液后电阻为 2.5~3.5 MΩ。补偿液接电位,调节三维操纵器(Narishige 公司,MN-3 和 MO-203)使电极尖端移向细胞表面,对单个 DRG 神经元进行封接。当封接电阻达 1 000 MΩ 以上后,补偿快电容,并施加负压吸破细胞膜,后给予慢电容和漏电容补偿,形成全细胞记录模式。

1.4 动作电位和钠电流的记录过程

在全细胞记录模式形成后,分别进行记录动作电位和钠电流 I_{Na} 过程。首先是记录动作电位的钳制方案,在电流钳制条件下,注入 600 pA 电流钳制,持续 10 ms,引出动作电位,稳定 5 min 后,再一次记录动作电位,作为最后的分析数据储存于计算机。动作电位观察指标:动作电位时程复极化 50% (APD₅₀)和复极化 90% (APD₉₀),静息电位(RP),动作电位幅度(APA)。记录 I_{Na} 的钳制过程采用电压钳制(voltage clamp)方案,具体要求是在细胞外液中加入 CdCl₂(100 μmol/L)以阻断 Ca²⁺ 电流,电极内液中用 CsCl 代替 KCl 以消除 K⁺ 电流的干扰,钳制电位-80 mV,指令电位-70~+30 mV,阶跃 10 mV,钳制时间 40 ms,刺激频率 0.5 Hz,可以记录到一组非常明显的快速内向性电流。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,组间比较采用 t 检验,用 Origin 6.0 (Microcal 公司,USA)统计软件进行方差分析各组实验数据,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 单个 DRG 神经元的形态特征

大鼠 DRG 呈圆形或椭圆形长条形,大小为 1~1.5 mm,颜色呈发亮的黄白色,边缘光滑,可完整地由椎间孔的附着处分离下来。高倍镜下(40×10)单个 DRG 神经元呈圆形或椭圆

等到 45 min。所用的 DMEM 液应高压灭菌,调整好渗透压和酸碱度。正如笔者实验结果中所描述,只有控制好各步骤的要求,分离出的单个神经元细胞才能胞膜清晰、表明光洁,胞浆完整,具有很好的折光性,才能符合接下来的膜片钳制要求。另外,没有特别提示要求,选择细胞大小也很关键,钳制时应选择中型细胞为佳。一个好的细胞在高阻抗封接细胞膜并打孔后,活性仍然可以保持很长时间,直到整个实验药物观察顺利完成。

为了便于读者掌握 DRG 神经元的电生理特征,本文以心肌细胞作为对比,记录并描述了 DRG 神经元细胞电动作电位特征,通过经典的钠通道敏感阻滞剂 TTX 干预从 DRG 神经元细胞上记录到的钠通道,说明钠通道的特性,可发现在正常的 DRG 细胞上记录的动作电位都是典型呈正立锐角三角形形态,静息电位小,APD₉₀ 和 APD₅₀ 都短。记录的 I_{Na} 最大电流密度为 (-62.04 ± 4.45) pA/pF,几乎能被钠通道特异性阻滞剂 TTX 完全阻滞,同时在经过正常的钠通道细胞外液冲洗交换后,被阻滞的 I_{Na} 又能回到正常值附近,表明记录的电流为典型的 DRG 神经元细胞的钠电流。

4 结论

根据本实验步骤和结果,笔者认为对于大鼠 DRG 神经元的分离和电生理特征认识,首先应在实验前查看相关资料,以无菌显微外科手术分离 DRG 体。用严格实验条件和选择双酶消化步骤分离形态适中、完整、活性好的 DRG 神经元,给相关研究人员一个清晰感观轮廓,认识单个 DRG 神经元。最后,通过膜片钳记录 DRG 神经元的动作电位和 I_{Na} 的电生

理特性,对最终判断 DRG 神经元优和劣做出定性认识,学会钳制 DRG 神经元和记录 DRG 神经元电流及其药物作用。目的是有效帮助研究神经系统疾病的科研人员正确及时分离 DRG 神经元,熟练掌握 DRG 神经元的电流活动的钳制技术,确切判定 DRG 神经元的电生理特性和药物作用。

参考文献 (References)

- [1] Yagi J, Sumino R. Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clonidine in rat dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurophysiol*, 1998, 80: 1094-1104.
- [2] Liu L, Oortgiesen M, Li L, et al. Capsaicin inhibits activation of voltage-gated sodium currents in capsaicin-sensitive trigeminal ganglion neurons [J]. *J Neurophysiology*, 2001, 85(2): 745.
- [3] Yu S S, Yu K, Gu Y, et al. Taurine-induced modulation of voltage-sensitive Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Brain Res Bull*, 2005, 66(3): 259-267.
- [4] 王腾, 甘文云, 王清秀, 等. 适用于膜片钳记录技术的细胞记录槽: 中国, ZL 200820191403.9[P]. 2008.
Wang Teng, Gan Wenyun, Wang Qingxiu, et al. Design and creation of cell chamber for patch clamp technique: China, ZL 200820191403.9[P]. 2008.
- [5] 王腾, 唐其柱, 甘文云, 等. 大鼠心肌细胞的分离技术和电生理鉴定[J]. 科技导报, 2009, 27(3): 80-82.
Wang Teng, Tang Qizhu, Gan Wenyun, et al. *Science & Technology Review*, 2009, 27(3): 80-82.
- [6] Seung L W, Hong M P, Hoon K T, et al. Effects of lysophosphatidic acid on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Brain Res*, 2005, 1035(1): 100-104.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·



“第 6 届中国通信学会学术年会”征文

由中国通信学会主办,中国通信学会学术工作委员会承办,《通信学报》和 *China Communications* 协办的“第 6 届中国通信学会学术年会”将于 2009 年 11 月召开。本届学术年会的主题是“信息通信技术创新发展与信息产业融合”,内容涵盖通信类各专业领域。本届年会将设多个分会场和青年科学家沙龙就通信领域热点话题和最新研究进展开展深入、广泛的学术交流。

会议主要征文范围包括(但不限于)以下领域:信息通信网络技术,通信管理,光通信,无线和移动通信,卫星通信,IP 应用与增值业务,通信软件,通信理论与信号处理,通信专用集成电路,国防通信,通信安全,电磁兼容,通信设备制造,通信建设工程,通信线路,通信电源,无线电应用与资源管理,多媒体通信,航天信息化,农业信息化,企业信息化。

本次会议论文集将出版两卷。符合 ISTP 检索水平的中文和英文文章将由美国 Scientific Research Publishing 公司出版 ISTP 卷。其他收录的中文论文将由国防工业出版社正式出版论文集(普通卷)。符合 Ei 检索水平的优秀中文文章可推荐至《通信学报》正刊和增刊发表。符合 SCIE 检索水平的优秀英文文章可推荐至 *China Communications*。

投稿电子信箱:cicnh@tom.com,征文截止日期为 2009 年 9 月 8 日。

联系人:冯幼荣;电话:13269103820;会议网址:www.leaderstudio.cn,http://meeting.china-cic.org.cn。