

· 论 著 ·

新生大鼠海马神经元原代培养及膜片钳全细胞记录*

徐祖才^{1#}, 徐平², 张骏², 雷显泽², 徐忠祥², 王学峰^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016; 2. 遵义医学院附属医院神经内科, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 探讨一种适用于膜片钳全细胞记录的海马神经元培养方法。方法 选择鼠龄在 1 d 内的 Wistar 大鼠, 迅速断头, 取双侧海马, 神经基础培养基添加 B-27 及 L-谷氨酰胺进行神经元原代培养, 培养至第 10 天时, 使用免疫荧光技术配合神经元特异性核蛋白 NeuN 进行细胞鉴定; 神经元的电生理特征由膜片钳全细胞记录。结果 该方法所培养神经元状态良好, 经鉴定发现纯度可高达 100%, 通过膜片钳全细胞法可记录到自发性动作电位及自发性兴奋性突触后电流。结论 本方法操作简便、高效, 所培养的海马神经元状态良好, 适用于膜片钳全细胞记录。

关键词: 大鼠, Wistar; 海马; 神经元; 细胞, 培养的; 膜片钳术

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)31-3241-02

The primary culture for hippocampal neurons of neonatal rats and patch clamp whole-cell recording*

Xu Zucui^{1#}, Xu Ping², Zhang Jun², Lei Xianze², Xu Zhongxiang², Wang Xuefeng^{1△}

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To discuss a culture method of hippocampal neurons, which is suitable for patch clamp whole-cell recording. **Methods** Neonatal Wistar rats (<1 d) were decollated and bilateral hippocampus were separated rapidly. Neural basal media supplemented with B-27 and L-glutamine were used for hippocampal neurons primary culture. On day 10, neurons were identified by immunofluorescence of neuronal nuclei (NeuN). Electrophysiological properties of neurons were recorded by patch clamp whole-cell recording. **Results** The cultured neurons were in good condition. By identifying, the purity of cultured neurons was almost high to 100%. Action potential and spontaneous excitatory postsynaptic current were recorded by whole-cell patch clamp. **Conclusion** This is a simple and efficient method, and the cultured neurons are in good condition. Moreover, neurons are suitable for patch clamp whole-cell recording.

Key words: rats, Wistar; hippocampus; neurons; cells, cultered; patch-clamp techniques

原代培养的神经元已经成为神经学科领域的同行们最常用的实验对象之一, 因此, 神经元的原代培养方法日渐增多。随着神经电生理实验技术的迅速发展, 特别是膜片钳技术在神经学科的应用以来, 对原代培养的神经元状态要求越来越高, 本实验在参考文献[1-4]的培养方法基础上稍作改进, 培养出细胞膜上各离子通道功能良好的且适应于膜片钳全细胞记录的海马神经元, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物与主要实验仪器 1 d 内新生 Wistar 大鼠购自重庆医科大学实验动物中心; SW-CJ-2FD 型超净工作台购自苏净集团安泰公司, 细胞培养箱购自美国 Thermo Forma, 细胞培养板购自美国 Costar, TE2000-U 倒置相差显微镜购自日本 Nikon; TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机购于长沙湘仪离心机仪器有限公司, TCS-SP2 型激光共聚焦扫描显微镜购自德国 Leica, NVSLM1 型振动切片机购自英国 Campden, 电极拉制仪(P-97)购自美国, 玻璃微电极管(外径 1.0 mm)购自南京六合泉实验器材厂, 膜片钳系统购自美国 Axon。

1.1.2 主要试剂 神经基础培养基(Neurobasal media)、B-27、L-谷氨酰胺及特级胎牛血清购自美国 Gibco 公司。种植液组成: 神经基础培养基、2% B-27(体积比)、0.5 μmol/L L-谷

氨酰胺及 10% 胎牛血清; 维持液: 神经基础培养基、2% B-27(体积比)和 0.5 μmol/L L-谷氨酰胺。D-Hanks 和多聚-L-赖氨酸购于美国 Sigma 公司, 胰蛋白酶由上海佰奥生物科技有限公司提供, 小鼠抗 NeuN 一抗购自美国 Millipore、兔抗小鼠 FITC 二抗由北京中杉公司分装, 重庆医科大学附属第一医院提供 10% 水合氯醛。人工脑脊液(Artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 配方及各成分浓度: NaCl 124 mmol/L, KCl 3 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.23 mmol/L, NaHCO₃ 26 mmol/L 和葡萄糖 10 mmol/L; 电流钳模式下记录动作电位的电极内液配方及各成分浓度: K₂SO₄ 60 mmol/L, N-甲基-D-葡糖胺(NMG) 60 mmol/L, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 40 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, 四乙酸(BAPTA) 0.5 mmol/L, 磷酸肌酸(phosphocreatine) 12 mmol/L, Na₂ATP 2 mmol/L 和 Na₃GTP 0.2 mmol/L; 电压钳模式下记录电流的极内液成分和相应浓度: KCl 140 mmol/L, MgCl₂ 0.5 mmol/L, 乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA) 2 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, K₂ATP 4 mmol/L, KOH 将 pH 值调至 7.2。

1.2 方 法

1.2.1 海马神经元原代培养 先在盖玻片上涂抹 0.1% 多聚-L-赖氨酸, 在超净台内, 经紫外灯照射消毒后, 放置在 24 孔细胞培养板孔内备用。选择 1 d 内的新生 Wistar 大鼠, 迅速剥出

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81071039); 两江学者专项基金; 遵义医学院附属医院硕士研究生启动基金资助项目(209.001.097.14)。 # 现工作单位: 遵义医学院附属医院神经内科。 △ 通讯作者, Tel: (023)89012875; E-mail: xfyp@163.com。

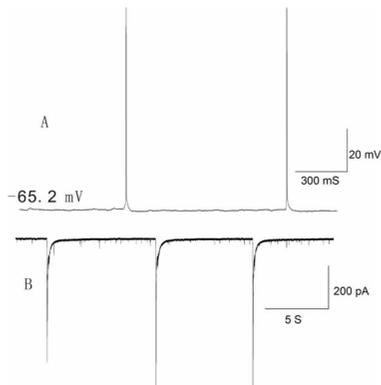
全脑,移入 0 °C D-Hanks 液中,分离双侧海马并剪碎。加入 0.125%胰蛋白酶(体积相当于脑组织的 5 倍)并置于 5%CO₂、37 °C 细胞培养箱内消化 20~30 min,后加入相同体积的种植液并维持 5 min 以终止消化。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入种植液,使用抛光冷却后的巴氏管轻柔吹打,制成细胞悬液,使用 200 目筛网过滤,经计数后,以种植液稀释成 5 × 10⁵/mL 的细胞悬液,24 孔细胞培养板的每孔按 1 mL 悬液进行接种,置入 5%CO₂、37 °C 细胞培养箱内培养 1 d 即全液更换维持液培养,后每间隔 3 d 更换一半培养液。

1.2.2 免疫荧光技术鉴定神经元 神经元核抗原(Neural nuclei, NeuN)是神经元细胞核中的一种特异性蛋白质,被认为是成熟神经元的特异性标记物^[5]。神经元培养至第 10 天时,进行细胞爬片,放置载玻片上,经 4%多聚甲醛固定 30 min 后,PBS 清洗 5 min × 3 次,10%山羊血清封闭液常温下处理 30 min,后倾去血清,加入小鼠抗 NeuN 抗体(稀释比例 1:100),置 4 °C 冰箱过夜。次日,取出后常温放置 2 h,PBS 清洗 5 min × 3 次,避光加山羊抗小鼠 FITC(稀释比例 1:50),常温 2 h 后,PBS 清洗 5 min × 3 次,50%甘油封片备用,择期在激光共聚焦扫描显微镜下拍照。

1.2.3 膜片钳全细胞记录 参照文献^[6]的方法,将备用的细胞爬片转移入浴槽中,使用输液泵持续向浴槽灌注 95%O₂ + 5%CO₂ 混合气饱和的 ACSF,浴槽流出端使用蠕动泵将液体以 3~4 mL/min 恒速泵出,调整输液泵至细胞在液面下 1~2 mm 为适。P-97 微电极控制仪控制记录微电极(直径 1~2 μm),电极内液使用 0.2 μm 的微孔滤膜滤过后充灌电极,充灌电极内液后入水电阻 2~4 MΩ。选择表面光滑且透光度好的状态良好的神经元进行实验,封接成功后,抽吸破膜即可形成全细胞记录。在电流钳模式下,记录自发性动作电位(action potential, AP);在电压钳模式下记录自发性兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC),信号采集分析均由 pClamp 9.2 软件完成。

2 结 果

2.1 海马神经元形态学观察 神经元在 1 d 后更换全液,此时在倒置相差显微镜下观察,神经元贴壁稳定,且背景较干净,部分神经元可见较短突起长出(封 2 图 1A);3 d 后,神经元突起明显变长变多,且细胞体轮廓清晰,呈锥形(封 2 图 1B);至第 10 天时,神经元形态特征明显,细胞体表面光滑,透光度好,可见细胞周围明显光晕,突起增多增长且细出现分支,从而形成明显的神经网络(封 2 图 1C、D)。



A:自发性 AP;B:sEPSC。

图 3 膜片钳全细胞记录

2.2 NeuN 鉴定海马神经元 NeuN 免疫荧光染色,激光共聚焦扫描显微镜下可见神经元细胞核着绿色,细胞质和突起不着

色,最终发现本方法所培养的神经元纯度可达 100%,见封 2 图 2。

2.3 膜片钳全细胞记录 在电流钳模式下,可记录到神经元的偶尔自发性 AP,膜电位在 -65.2 mV 左右(图 3A);在电压钳模式下,可以记录到神经元的 sEPSC(图 3B)。

3 讨 论

海马是整个中枢神经系统对缺血、缺氧、炎症等各种损伤耐受能力最差的部位之一,且所含神经元密度高,非神经元细胞相对较少,因此,海马常常被作为神经元原代培养的首选部位。作者阐述了 1 d 内鼠龄的 Wistar 大鼠海马神经元的原代培养方法,在培养 1 d 后细胞基本贴壁;3 d 开始细胞体逐渐丰满,突起开始变长;到达第 10 天时,神经元已经成熟,细胞体形态特征明显,立体感强,表面光滑,透光度良好,周围光晕明显,突起丰富且细胞与细胞之间形成明显的神经网络结构。通过神经元特异性核抗原 NeuN 及 FITC 标记,发现所培养的神经元纯度高。为了检测神经元的电生理特征是否完好,通过膜片钳全细胞记录,发现细胞封接顺利,在电流钳模式下可以记录到偶尔自发性 AP,在电压钳模式下可以记录到 sEPSC,从而证实了细胞膜以及突触传递功能良好,适合膜片钳技术的应用。

针对神经元原代培养的实验对象选择上,目前除了本实验选择的新生鼠外,还可以选用胎鼠,但由于胎鼠的胎龄不易掌控,并且胎鼠的海马剥离困难且体积偏小,而使得该方法的推广遇到了瓶颈^[7]。在培养方法上,有选择普通培养基,外加抑制细胞有丝分裂的药物阿糖胞苷,然而,该药物的使用量较难控制,过量时,在抑制胶质细胞的繁殖和生长的同时,对神经元的正常生长也有一定的毒副作用,从而影响其活性,达不到实验需求,量不够时,则不能很好地抑制胶质细胞的增殖^[8]。本实验直接选用神经基础培养基及 B-27 添加剂,能够抑制非神经元的生长而更有利于神经元的生长,从而提高神经元的纯度,此外,该组合的培养基中含有多种抗氧化剂,具有保护神经元的作用,从而保证神经元的最终活性^[9]。

随着神经学科快速发展,海马神经元及膜片钳技术有机结合在神经生理功能及病理状态的应用方兴未艾,如兴奋性氨基酸神经毒性^[10]、缺氧性损伤^[11]、癫痫^[12-14]和单纯疱疹病毒性脑炎^[15]等。本实验所提供的海马神经元原代培养方法,可为膜片钳技术的顺利应用打下良好的基础。

参考文献:

- [1] Yu Z, Liu J, Guo S, et al. Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation[J]. Neuroscience, 2009, 162(2): 396-403.
- [2] Wesley CC, David WS. Novel High-Resolution Micropatterning for Neuron Culture Using Polylysine Adsorption on a Cell Repellent, Plasma-Polymerized Background[J]. Langmuir, 2008, 24(22): 13048-13057.
- [3] 徐祖才,刘华,李雨芹,等.新生大鼠海马神经元癫痫样放电模型的初步研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(6): 696-699.
- [4] Paul D, Saias L, Pedinotti JC, et al. A "dry and wet hybrid" lithography technique for multilevel replication templates: Applications to microfluidic neuron culture and two-phase global mixing[J]. Biomicrofluidics, 2011, 5(2): 24102.

明,3,6-二羟黄酮膳食干预可显著抑制致癌剂诱导的大鼠乳腺肿瘤发生,显示出较强的乳腺癌化学预防作用。

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它可以抑制蛋白质翻译,剪切 mRNA,调节靶基因的表达,在动植物中参与转录后基因表达调控。越来越多的研究表明,miRNA 参与包括肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌及白血病在内的多种肿瘤的发生、发展^[12-13]。乳腺癌是女性最常患的一种肿瘤,男性由于缺乏对乳腺癌的免疫力,同样容易罹患此病。有研究发现作为抑癌基因和原癌基因的乳腺癌特异性 miRNA,在乳腺癌发生、发展中的作用对于防治乳腺癌具有重要意义^[14-15]。

植物黄酮抗乳腺癌作用机制中是否涉及对 miRNA 表达和功能的影响,尚少见报道,本实验研究发现,3,6-二羟黄酮抗乳腺癌发生过程中,伴随着 miRNA 表达谱的改变,提示某些 miRNA 可能在 3,6-二羟黄酮抗乳腺癌作用机制中扮演重要角色,黄酮化合物可能通过调节 miRNA 的表达进而影响某些关键靶蛋白的活性。本研究结果对深入探讨 miRNA 在植物黄酮抗肿瘤机制中的作用提供了参考。

参考文献:

- [1] 刘展,张明亮,李毅妮,等. siRNA 抑制 p63 基因表达对胆管癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012,32(2):207-210.
- [2] 姜昌丽,王惠莹. 微小 RNA 在结直肠癌中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(3):355-357.
- [3] Hui C, Yujie F, Lijia Y, et al. MicroRNA-34a and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3, 6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis[J]. Breast Cancer Res, 2012,14(3):R80.
- [4] 孙晓飞. miRNA 与乳腺癌[J]. 医学信息:下旬版, 2009, 22(9):269-270.
- [5] 李川,马纪,张越,等. 慢病毒介导的 shRNA 靶向干扰 nestin 鼻咽癌稳定细胞株的建立[J]. 南方医科大学学报,

2011,31(4):604-609.

- [6] 梁艳,李涛,周克元. 慢病毒载体在 RNA 干扰中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010,31(11):1282-1284.
- [7] Chang H, Lin H, Yi L, et al. 3, 6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in Leukemia HL-60 Cell via reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2010,648(1):31-38.
- [8] Chang H, Mi M, Ling W, et al. Structurally related anticancer activity of flavonoids: involvement of reactive oxygen species generation[J]. J Food Biochem, 2010,34(s1):1-14.
- [9] Chang H, Mi M, Ling W, et al. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells in vitro [J]. Arch Pharm Res, 2008,31(9):1137-1144.
- [10] Chang H, Yu B, Yu X, et al. Anti-cancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. Nutr Cancer, 2010,62(8):1-9.
- [11] Theodoratou E, Kyle J, Cetnarskyj R, et al. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007,16(4):684-693.
- [12] Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs [J]. EMBO J, 2007,26(3):775-783.
- [13] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers insight? [J]. Nat Rev, 2008,9(2):102-114.
- [14] 孙建国,廖荣霞,周度金,等. 基于基因芯片的乳腺癌干细胞 miRNAs 检测分析[J]. 重庆医学, 2007,36(13):1280-1282.
- [15] 黄秀芳,邵建永,颜黎栩,等. 乳腺癌差异表达的 miRNA 的筛选研究[J]. 中山大学学报, 2009,30(1):69-73.

(收稿日期:2012-03-16 修回日期:2012-07-29)

(上接第 3242 页)

- [5] 张雨平,黄其林,赵聪敏,等. 大鼠不同发育期脑神经元核抗原的表达研究[J]. 重庆医学, 2010,39(21):2901-2903.
- [6] Peng IF, Wu CF. Differential contributions of Shaker and Shab K⁺ currents to neuronal firing patterns in Drosophila[J]. J Neurophysiol, 2007,97(1):780-794.
- [7] Kim SH, Lu HF, Alano CC. Neuronal Sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture [J]. PLoS One, 2011,6(3):e14731.
- [8] 王英,车宇,苗建亭,等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003,19(2):197-199.
- [9] Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death[J]. J Neurobiol, 2002,51(1):9-23.
- [10] Vergun O, Sobolevsky AI, Yelshansky MV, et al. Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture[J]. J Physiol, 2001,531(Pt 1):147-163.

- [11] 陈秀,陈丽芬,吴万福,等. 缺氧对离体培养的海马神经元兴奋性的影响[J]. 重庆医学, 2011,40(13):1267-1262.
- [12] 徐祖才,刘华,陈阳美. 海马神经元癫痫样放电后 ERK1/2 信号通路与 C-fos 的相关性[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(23):1639-1642.
- [13] Xu ZC, Chen YM, Xu P, et al. Epileptiform discharge up-regulates p-ERK1/2, growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons[J]. Seizure, 2009,18(10):680-685.
- [14] 徐祖才,徐平,陈阳美,等. 无镁损伤海马神经元后 ERK1/2 核转移的动态变化[J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(8):735-738.
- [15] Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, et al. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro[J]. J Virol, 2001,75(8):3885-3895.

(收稿日期:2012-04-24 修回日期:2012-07-25)