

技术方法 DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.09.013

## 膜片钳技术在成年大鼠海马脑片应用的初步研究

徐祖才<sup>1</sup>, 陈恒胜<sup>2</sup>, 刘 靛<sup>1</sup>, 周 艳<sup>1</sup>, 唐 波<sup>1</sup>, 陈国俊<sup>1</sup>, 王学峰<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属儿童医院儿研所膜片钳室, 重庆 400022)

**【摘要】**目的: 制备成年大鼠海马脑片, 使其适应于膜片钳全细胞记录, 并观察海马锥体神经元的电生理特性。方法: 选 200 g 左右的成年 SD 大鼠, 雌雄不拘, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 四肢固定, 剪开胸腔, 夹闭下腔静脉, 以 0 °C 切片液进行心脏灌注, 断头, 取下全脑, 置入 0 °C 切片液中冰镇 3 min, 再修块, 切片, 厚度约 350 μm, 移入 37 °C 预热的人工脑脊液中孵育 1 h 后, 转入 23 °C 水浴中孵育 30 min 备用。倒置相差显微镜和红外微分干涉相差显微镜观察脑片的神经元形态; 全细胞膜片钳记录脑片神经元的电生理学特性。结果: 海马 CA1 区神经元光泽度好, 立体感强且突起明显; 在进行膜片钳全细胞记录时, 封接顺利, 并且可以记录到电流和动作电位的变化图形。结论: 本方法制备的成年大鼠脑片, 可以耐受离体后缺血缺氧造成的损伤, 保持电生理活性而适应膜片钳全细胞记录模式。

**【关键词】**膜片钳; 成年大鼠海马脑片; 离体损伤

**【中国图书分类法分类号】**R33-33; R742

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2012-03-12

## Preliminary study of application of patch clamp technique in adult rat hippocampal slices

XU Zucail<sup>1</sup>, CHEN Hengsheng<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, ZHOU Yan<sup>1</sup>, TANG Bo<sup>1</sup>, CHEN Guojun<sup>1</sup>, WANG Xuefeng<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Patch Clamp Room, Pediatric Research Institute, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To prepare adult rat hippocampus slices for whole-cell patch clamp recording and to observe the electrophysiological properties of hippocampus pyramidal neurons. **Methods:** Adult male or female SD rats of 200 g in weight were selected and were narcotized by 10% chloral hydrate intraperitoneal injection. The limb was fixed, chest was cut open and inferior vena cava was clamped in all the rats. After cardiac perfusion by 0 °C slices liquid, the whole brain was removed and placed in 0 °C slice liquid for 3 min, then chopped into 350 μm thickness. The brain slices were transferred to 37 °C preheated artificial cerebrospinal fluid for 1 h and then transferred to 23 °C for 30 min. The neuronal morphology of brain slices were observed by using inverted phase contrast microscope and infrared differential interference phase contrast microscopy. Electrophysiological properties of brain slices neurons were recorded by whole-cell patch clamp. **Results:** Good gloss, stereoscopic and obvious neurite pyramidal neurons were observed in hippocampal CA1 region, which were easy to sealing. With the application of patch clamp technique, the changes of the currents and action potential of pyramidal neurons in CA1 region were recorded by the whole-cell patch clamp. **Conclusions:** The adult rat brain slices prepared by this method can withstand the damage caused by ischemia and hypoxia in vitro, remain electrophysiological properties and adapt to the whole-cell patch clamp recording.

**【Key words】**patch clamp; adult rat hippocampus slice; damage in vitro

脑片已被广泛用于中枢神经系统的多种疾病的研究, 目前, 可通过体外培养和急性分离两种途径获得脑片, 体外培养脑片稳定性较好, 存活时间较长。然而, 急性分离的脑片性能更接近在体的生理状态, 在体外十几个小时内活性很好且离子通道性质不会发生改变, 48 h 内仍可保持活性<sup>[1]</sup>。全细胞

膜片钳技术对于脑片的神经元质量要求高, 不仅要求细胞具备完整的形态, 更要求其生理功能和离子通道不能受损。然而, 因为成年大鼠的脑片对离体后的缺血缺氧性损伤耐受能力较差, 导致目前常用的急性分离脑片来源于新生大鼠, 从而, 使得相关疾病的成年大鼠模型拟行膜片钳技术进行电生理研究时遭遇瓶颈。笔者将介绍成年大鼠海马脑片制备过程及全细胞膜片钳所记录 CA1 区锥体神经元的电生理特征。

**作者简介:** 徐祖才 (1981-), 男, 主治医师, 在读博士,

研究方向: 癫痫的基础与临床。

**通信作者:** 王学峰, 男, 教授, Email: xfyp@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

NVSLM1 型振动切片机 (Campden, 英国); 电极拉制仪 (P-97, 美国); 倒置相差显微镜和红外微分干涉相差显微镜 (Nikon, 日本); 膜片钳系统 (Axon, 美国)。10% 水合氯醛 (重庆医科大学附属第一医院提供)。人工脑脊液 (Artificial cerebrospinal fluid, ACSF): 124 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.23 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 和 10 mmol/L Glucose; 切片液: 2.5 mmol/L KCl, 1.25 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 220 mmol/L sucrose, 26 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 10 mmol/L Glucose。电压钳模式下记录电流的 1 号电极内液: 140 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L EGTA, 5 mmol/L HEPES, 4 mmol/L K<sub>2</sub>ATP; 电流钳模式下记录动作电位的 2 号电极内液: 60 mmol/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 60 mmol/L NMG, 40 mmol/L HEPES, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L BAPTA, 12 mmol/L Phosphocreatine, 2 mmol/L Na<sub>2</sub>ATP and 0.2 mmol/L Na<sub>3</sub>GTP, KOH 将 pH 值调至 7.2。

### 1.2 成年大鼠脑片制备

取 200 g 左右的 SD 大鼠 (重庆医科大学实验动物中心提供), 用 10% 水合氯醛腹腔注射, 待麻醉生效后, 剪开胸腔, 暴露心脏, 夹闭下腔静脉, 使用 0 °C 切片液进行心脏灌注, 待灌流液体颜色较淡结束灌注, 后断头, 取出全脑, 置入 0 °C 切片液 (提前半小时经 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 混合气饱和) 中冰镇 3 min, 修整脑块 (包含完整海马及其皮层), 502 胶水将脑块固定在底座, 迅速移入切片机水槽中 (提前将自动冷却系统打开), 倒入 0 °C 切片液, 并继续充入混合气, 沿冠状位以 350 μm 的厚度进行切片, 将脑片移入 37 °C 水浴槽中待用的 ACSF (提前半小时经混合气饱和) 中孵育 1 h, 转入 23 °C ACSF (经混合气饱和) 中继续孵育 30 min 备用<sup>[1]</sup>。

### 1.3 脑片神经元形态观察

在肉眼上大体观察健康脑片呈淡黄色, 如果脑片颜色变白, 则其活性较差。在倒置相差显微镜和红外微分干涉相差显微镜下观察脑片, 了解脑片的整体情况和神经元胞体及突起的形态, 红外微分干涉相差显微镜下观察的相应部位的神经元经放大器放大后摄取图片。

### 1.4 脑片全细胞膜片钳电生理研究

将备用的脑片转移入浴槽中, 用盖网 (将银丝弯成 U 形框架, 稀疏的尼龙丝附着其上) 轻覆于脑片上将其固定, 使用输液泵持续向浴槽灌注混合气饱和的 ACSF, 浴槽流出端使用蠕动泵将液体以 3~4 ml/min 恒速排出, 调整输液泵滴数, 以脑片浸没于液面下 1~2 mm 为适。记录电极经 P97 微电极拉制仪控制, 尖端直径 1~2 μm, 充灌电极内液后电阻 2~4 MΩ, 电极内液使用 0.2 μm 的微孔滤膜滤过后充灌电极。记录在 23 °C 的室温下进行。使用 NIKON IR-DIC 成像系统, 首先在低倍物镜下找到 CA1 区锥体细胞层, 然后在高倍浸水物镜下, 通过显示器选择到合适的细胞后, 在显示器上标记定

位。然后在低倍物镜下通过操纵器调整微电极位置, 给予微电极一定正压 (1 ml 注射器注入约 0.2 ml 空气) 入水, 记录入水电阻, 并在低倍镜和高倍镜下寻找微电极。在高倍浸水物镜可视条件下, 使电极尖接触细胞膜, 及时释放正压, 并轻施负压获得高阻抗封接。成功后, 抽吸破膜即可形成全细胞记录。在电压钳模式, 选择 1 号电极内液记录电流变化情况; 在电流钳模式下, 选择 2 号电极内液记录动作电位变化情况。将所获得的信号经 Multiclamp 700B 放大器放大后 (低通滤波 3 kHz), 与电脑系统相连接, 所有电流、电压刺激脉冲顺序及信号采集分析均由 pClamp 9.2 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 脑片神经元选择

选择肉眼观察有光泽且呈淡黄色的健康脑片, 倒置相差显微镜低倍下见脑片结构清晰, 海马锥体细胞线较细。在红外微分干涉相差显微镜经放大器放大后, 以海马 CA1 区锥体细胞为目的区, 可见细胞光泽度好, 立体感强且具明显突起, 选择该区的锥体细胞进行全细胞膜片钳记录, 封接顺利 (图 1)。



图 1 相差显微镜下的海马 CA1 区锥体神经元 (400 ×)

Fig.1 Pyramidal neurons observed in hippocampal CA1 region by phase contrast microscope (400 ×)

### 2.2 全细胞膜片钳记录

2.2.1 电压钳模式 选择脑片海马 CA1 区的锥体细胞进行全细胞记录, 将钳制电位设置在 -80 mV, 以 10 mV 的步阶脉冲去极化至 40 mV, 可记录到全细胞的电流变化图形, 当钳制电位达到 -30 mV 时, 出现内向电流 (图 2)。

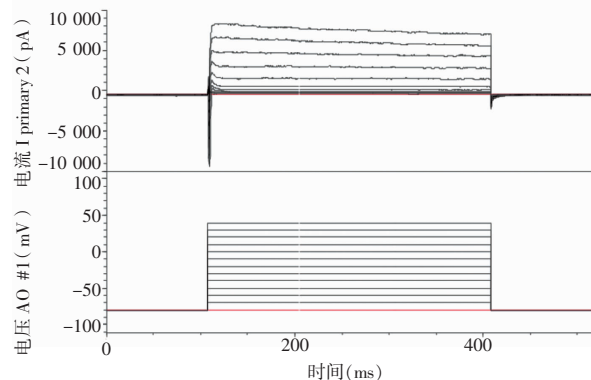


图 2 全细胞膜片钳电压钳模式下记录的电流变化图

Fig.2 Variation of the current in voltage clamp mode of whole-cell patch clamp

2.2.2 电流钳模式 选择脑片海马 CA1 区的锥体细胞进行全细胞记录,将钳制电流设置在 0 pA,以 10 pA 的步阶脉冲至 120 pA,可记录到动作电位的变化图形,当钳制电流达到 40 pA 时,即可出现动作电位(图 3)。

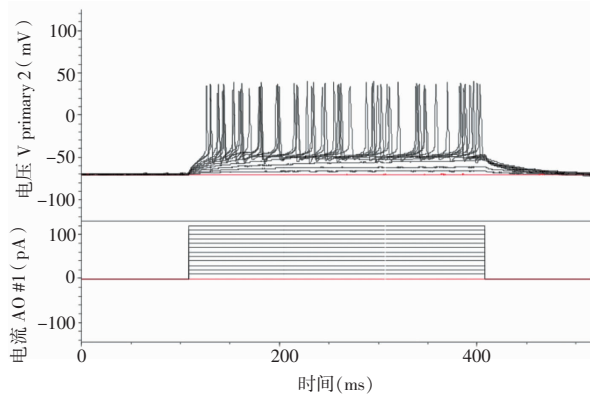


图 3 全细胞膜片钳电流钳模式下记录的动作电位变化图  
Fig.3 Variation of the voltage in current clamp mode of whole-cell patch clamp

### 3 讨论

癫痫、痴呆和脑血管病等神经系统疾病的发病机制与离子通道的相关性已经得到了广泛的认可<sup>[3]</sup>,由此,相应疾病的实验设计会涉足膜片钳记录神经元的电生理研究。全细胞膜片钳技术可以记录单个神经元的电活动情况,为了将膜片钳技术应用于神经系统疾病的实验性研究,学者们主要采用的是新生鼠的体外培养的神经元<sup>[4]</sup>以及新生鼠的体外培养<sup>[5]</sup>或急性分离的脑片<sup>[6]</sup>来建立相应的疾病模型进行研究。神经系统疾病的动物模型主要采用的是成年动物以便更好地模拟人体的相应疾病,并且可以对动物模型进行在体的基因干扰来进行相应的研究<sup>[7,8]</sup>,然而,由于成年大鼠的脑片对离体后短暂的缺血缺氧性损伤敏感,导致成年大鼠脑片不易获得,而使得对成年大鼠使用膜片钳技术观察电生理指标的研究遇到了瓶颈。

笔者所介绍的成年大鼠脑片制备方法简单,只需配置常规的切片液和 ACSF,通过本实验所制备的脑片呈淡黄色,很好地耐受了离体后的缺血缺氧性损伤,神经元光泽度好,立体感强且突起明显。在脑片制备过程中,也应注意一些关键问题<sup>[2,9]</sup>:在满足实验要求的前提下,尽可能选用鼠龄较小和体重较轻的成年大鼠;0℃切片液心脏灌注必不可少,可以很好地降低细胞代谢,维持细胞活性;尽可能为切片机的水槽配置自动冷却装置,确保在切片过程

中使得切片液保持在 0℃;脑片的厚度要适中(350 μm),脑片孵育时混合气体量不宜过大,切忌脑片在孵育槽中翻滚等等。

通过电压钳可以记录出神经元的电流变化情况,且在电流钳模式下能记录到细胞的动作电位,表明所得脑片上的神经元生理功能和离子通道完备,适合神经系统疾病使用膜片钳技术进行电生理的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 刘振伟.实用膜片钳技术[M].北京:军事医学科学出版社,2006:148-149.
- [2] Liu Z W.Practical patch clamp technique[M].Beijing: Military Medical Science Press,2006:148-149.
- [3] Huang C S,Shi S H,Ule J,et al.Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition[J].Cell,2005,123(1):105-118.
- [4] 刘 阳,吴 潇,王 伟,等.双孔钾通道 TREK-1 在神经系统疾病中的研究进展[J].神经损伤与功能重建,2011,6(6):451-455.
- [5] Liu Y,Wu X,Wang W,et al.The research progress of the double orifice potassium channels TREK-1 in disease of the nervous system[J].Neural Injury and Functional Reconstruction,2011,6(6):451-455.
- [6] Xu Z C,Chen Y M,Xu P,et al.Epileptiform discharge upregulates p-ERK1/2,growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons[J].Seizure,2009,18(10):680-685.
- [7] 王 莉,余 刚,向德兵,等.海马脑片氧糖剥离模型中血晶素对脑红蛋白表达的影响[J].重庆医科大学学报,2009,34(2):138-141.
- [8] Wang L,Yu G,Xiang D B,et al.Neuroprotective of neuroglobin induced by hemin in the hippocampal organotypic tissue cultures after combined oxygen/glucose deprivation[J].Journal of Chongqing Medical University,2009,34(2):138-141.
- [9] Chen G,Kittler J T,Moss S J,et al.Dopamine D3 receptors regulate GABA receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens[J].J Neurosci,2006,26(9):2513-2521.
- [10] Xu Z,Xue T,Zhang Z,et al.Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy[J].Neurochem Res,2011,36(12):2208-2215.
- [11] Wang L,Zhou C,Wang X,et al.Up-regulation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 in the brain tissue of human and experimental epilepsy[J].Neurochem Int,2010,57(8):899-905.
- [12] 薛庆生,夏 梦,于布为,等.大鼠脑片损伤模型和新型定量评价方法的建立[J].中国药理学通报,2003,19(8):954-957.
- [13] Xue Q S,Xia M,Yu B W,et al.The building of rats brain slices damage model and new quantitative evaluation method[J].Chinese Pharmacological Bulletin,2003,19(8):954-957.

(责任编辑:唐秋姗)