

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2017.01.005

• 论 著 •

膜片钳技术在慢性痛大鼠背根神经节神经元电生理学特性改变中的应用*

蔡捷¹ 方东² 李松¹ 邢国刚^{1△}

(¹北京大学神经科学研究所 / 基础医学院神经生物学系, 北京 100191; ²河南大学药学院, 开封 475004)

摘 要 目的: 以骨癌痛大鼠为例, 探讨全细胞膜片钳技术在慢性痛研究中的应用。**方法:** 急性分离背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元, 利用全细胞膜片钳技术分别记录对照组和骨癌痛组大鼠小直径 DRG 神经元的动作电位及 TRPV1 (transient receptor potential vanilloid channel subfamily V member 1) 的电流, 分析大鼠小直径 DRG 神经元电活动的变化。**结果:** 利用全细胞膜片钳技术可以记录到骨癌痛大鼠的小直径 DRG 神经元静息膜电位绝对值降低、动作电位发放频率增加、爆发动作电位的阈值降低、TRPV1 通道的电流幅度增大。**结论:** 全细胞膜片钳技术可以有效而直观的记录到单个神经元动作电位和电流的变化, 并由此对神经元电生理学特性进行分析, 从而进行慢性痛发病机制的研究。

关键词 全细胞膜片钳; 背根神经节; 慢性痛; 动作电位; 电流

THE APPLICATION OF PATCH-CLAMP RECORDINGS IN THE CHANGE OF DORSAL ROOT GANGLION NEURONS ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF CHRONIC BONE CANCER PAIN *

CAI Jie¹, FANG Dong², LI Song¹, XING Guo-Gang^{1△}

(¹Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University, Beijing 100191, China; ²College of pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract Objective: To investigate the application of whole-cell patch-clamp recordings in chronic bone cancer pain research. **Methods:** Analyses of the properties of action potential and capsaicin induced inward current with whole-cell patch-clamp recordings was used in acute dissociated small DRG neurons in bone cancer pain rats and control rats. **Results:** The number of spontaneous and evoked action potentials of DRG neuron is more and the threshold of evoked action potentials of DRG neuron is lower in bone cancer rats than that of PBS rats, meanwhile DRG neurons depolarize in bone cancer rats compare to DRG neurons in PBS rats. Amplitude of capsaicin induced TRPV1 current is bigger in bone cancer pain rats than that of control rats. **Conclusion:** Whole-cell patch-clamp technology can be routinely used to characterize action potentials and current flow through ionic channels in research of mechanism of chronic pain.

Key words Whole-cell patch-clamp; Dorsal root ganglion; Chronic pain; Action potential; Current

膜片钳 (patch clamp) 技术是 1976 年由德国马普生物物理研究所 Neher 和 Sakmann 创建^[1], 他们首次在青蛙肌细胞上用双电极钳制膜电位的同时记录到乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 激活的单通道离子电流, 从而产生了膜片钳技术。经过 1980 年

Sigworth 和 1981 年 Hamill 和 Neher 的不断改进^[2], 使该技术更趋完善, 现已被广泛用于生物学研究, 尤其是神经科学的研究。在神经科学的慢性痛研究领域, 由于各种原因导致的慢性疼痛中, 外周感觉神经元的电生理学特性会发生改变^[3-5], 因此利用

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81671085, 81371237, 61527815, 31171063); 科技部国家重点基础研究发展计划“973”资助项目 (2013CB531905); 卫生部行业专项基金 (201302013-01); 中国中医科学院针灸研究所基础研究开放课题项目 (ZZ04004)。

△ 通讯作者 ggxing@bjmu.edu.cn

全细胞膜片钳 (whole-cell patch-clamp) 技术中电流钳记录模式记录神经元兴奋性的改变成为分析神经元电生理学特性的重要手段。本文以利用全细胞膜片钳技术记录急性分离骨癌痛大鼠背根神经节神经元的动作电位发放以及 TRPV1 (transient receptor potential vanilloid channel subfamily V member 1) 电流为例, 详细介绍膜片钳技术操作步骤、注意事项以及结果分析。

方 法

1. 骨癌痛大鼠模型的建立

(1) 实验动物: 健康成年雌性 SD (Sprague Dawley, SD) 大鼠, 体重约 150 ~ 180 g, 由北京大学医学部实验动物中心提供。

(2) 骨癌痛大鼠模型的建立: 参照 Medhurst SJ 等的方法^[6], 微量注射器向左侧胫骨骨髓腔内注射 MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞 (4×10^4 , 4 μ l), 骨蜡封闭注射孔。建立骨癌痛大鼠模型, 术后 14 天用 von Frey 纤维丝测定大鼠同侧后爪的 50% 缩足阈 (paw withdraw threshold, PWT) 以检测造模是否成功。对照组注射等体积的磷酸盐缓冲液 (PBS 组)。

2. 大鼠 DRG 神经元的急性分离^[4,5]

(1) 准备工作: 提前一天用多聚赖氨酸 (poly-D-lysine) 包被置于 24 孔板中的圆形玻片 (直径 12 mm), 500 μ l/孔, 第二天双蒸水清洗三遍, 超净台内吹 30 min。

(2) 取材: 大鼠称重麻醉后, 迅速断头处死。消毒后剥离背侧皮肤分离出脊椎, 迅速用外科镊分离出骨癌细胞接种侧腰 4、腰 5 DRG, 剪除 DRG 胞体两侧的神经纤维, 将 DRG 胞体置于预冷的无血清 DMEM 中, 用 DMEM 清洗两遍, 眼科剪将 DRG 剪碎。

(3) 消化: 弃去 DMEM 后, 加入 1.5 ml 胶原酶 (1.5 mg/ml, type IA, Sigma), 37 $^{\circ}$ C, 110 转/分钟的恒温摇床上消化 45 分钟。然后弃去胶原酶, 加入 1.5 ml 胰酶 (2 mg/ml, type II-S, Sigma), 继续 37 $^{\circ}$ C, 110 转/分钟的恒温摇床上消化 10 分钟。

(4) 制备单细胞悬液: 消化完毕后, 加入 1.5 ml 含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养基终止消化, 将带有 DRG 组织的培养基转移到 15 ml 离心管中, 用在酒精灯上抛光后的巴斯德管将消化后的 DRG 小心吹打成细胞悬液。

(5) 接种: 将上述细胞悬液用适量的 10%FBS DMEM 培养基稀释, 接种至多聚赖氨酸包被过的

24 孔板内的盖玻片上, 500 μ l/孔, 轻轻晃动, 使其均匀分布。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 2 h 后进行电生理实验。

3. 玻璃微电极的制备

采用垂直二步拉制法 (第一步拉制温度为 58.1 $^{\circ}$ C, 第二步为 48.0 $^{\circ}$ C) 制备玻璃微电极, 拉好的电极用抛光仪热抛光, 消除残留的毛刺, 以有利于形成巨阻封接。电极抛光后的入水阻抗约为 5 ~ 8 M。

4. 膜片钳记录过程

(1) 取细胞: 将贴附有细胞的玻片从培养基中取出, 放至新的加有细胞外液的培养皿中, 将培养皿放至显微镜平台。本实验所用细胞外液 (mM): 144 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 5 HEPES, 10 glucose, 用 NaOH 调节至 pH 7.4。

(2) Patch 过程: 镜下选取直径小于 25 μ m 的 DRG 神经元。将充灌有电极内液的玻璃微电极固定在电极夹持器上, 此时电路呈断路状态, 电阻很高。用注射器给电极施以正压后用电动微操纵器将电极入水, 此时电路接通, 软件显示电极阻抗, 观察电极阻抗为 5 ~ 8 M, 单击液接电位补偿中的 “Auto” 键进行液接电位补偿。在显微镜下找到电极尖端, 用微操纵器将电极移至目标细胞附近, 调整电极位置, 使电极刚好压到细胞的正上方稍偏向电极夹持器方向一点, 镜下看细胞表面被压出一个小凹, 此时电极电阻上升 0.5 ~ 1.5 M, 撤去正压并给予轻微负压, 直至电阻增加至 1 G 以上形成高阻封接。单击 “C-Fast” 中的 “Auto” 键, 仪器自动进行快电容补偿。再次向微电极内施以负压, 打破电极尖端下的细胞膜, 单击 “C-Slow” 中的 “Auto” 键, 进行慢电容补偿, 形成全细胞 (whole-cell) 电压钳模式。最后串联电阻补偿至少 70% 以上。实验所用的电流内液 (mM): 135 K-gluconate, 5 KCl, 5 Mg-ATP, 0.5 Na₂GTP, 5 HEPES, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 0.5 CaCl₂ 用 KOH 调节至 pH 7.4; 采用 EPC10 膜片钳放大器和 Patchmaster 软件 (德国 HEKA 公司) 来记录和分析 DRG 神经元的电活动, 滤波 2 KHz、采样频率 10 KHz。

(3) 记录过程

电流钳模式: 记录模式设置为电流钳, 神经元注射电流为 0 pA, 此时记录的为神经元的静息膜电位 (resting membrane potential, RMP), 之后观察对照组和骨癌痛组细胞自发发放情况。然后给予神经元步阶命令电流 (5 pA, 100 ms), 直至诱发出第一个动作电位, 动作电位爆发的阈值 (threshold of action potential, TP) 以及恒定去极化电流 (300 pA, 500 ms)

诱发动作电位爆发的个数。

电压钳模式：以 TRPV1 电流记录为例，将神经元钳制在 -70 mV，执行 TRPV1 受体激动剂辣椒素 (capsaicin, CAP, 20 μg/μl) 灌流给药步骤（细胞外液 5 s- 激动剂 5 s- 细胞外液 20 s），记录 TRPV1 电流。

结 果

1. 神经元兴奋性分析

(1) 电流钳模式下将神经元钳制于 0 pA，观察到骨癌痛组神经元自发放电较对照组增多，而且静息膜电位绝对值减小（见图 1）。

(2) 给予步阶命令电流（5 pA, 100 ms），直至诱发出第一个动作电位，而动作电位爆发的阈值（threshold potential, TP）骨癌痛较对照组相比绝对值较大（见图 2）。

(3) 给予恒定的去极化电流（300 pA, 500 ms）发现诱发的动作电位频率骨癌痛大鼠较对照组相比增多（见图 3）。

2. TRPV1 电流变化

将神经元膜电位钳制在 -70 mV，执行 TRPV1 受体激动剂辣椒素 (capsaicin) 灌流给药步骤后，记录 TRPV1 电流发现，骨癌痛组与对照组相比 TRPV1 电流幅度增大（见图 4）。

讨 论

单细胞膜片钳技术虽然已广泛应用于神经科学研究，但是该技术掌握起来还是有一定难度，总结

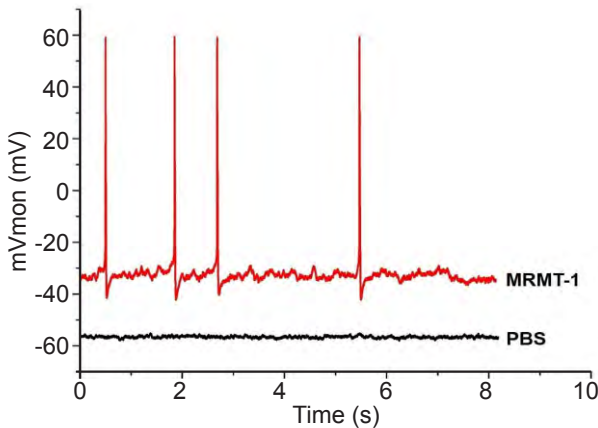


图 1 骨癌痛大鼠小直径 DRG 神经元自发放电的变化
Fig.1 The number of spontaneous action potentials of DRG neuron is more in MRMT-1 rats than that of PBS rats, meanwhile DRG neurons depolarize in MRMT-1 rats compare to DRG neurons in PBS rats

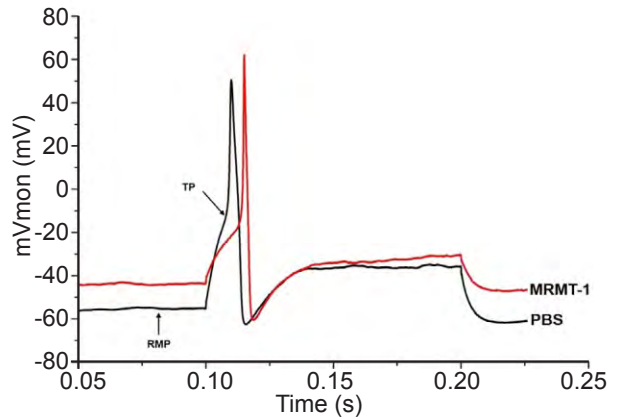


图 2 骨癌痛大鼠诱发动作电位的阈值变化
Fig.2 The threshold of evoked action potentials of DRG neuron is lower in MRMT-1 rats than that of in PBS rats

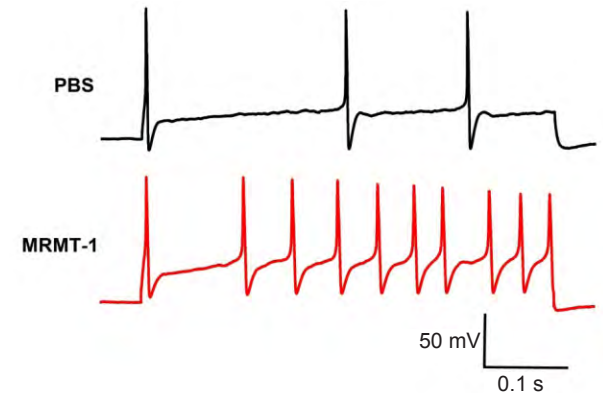


图 3 骨癌痛大鼠诱发动作电位频率变化
Fig.3 The frequency of evoked action potentials of DRG neuron is higher in MRMT-1 rats than that of in PBS rats

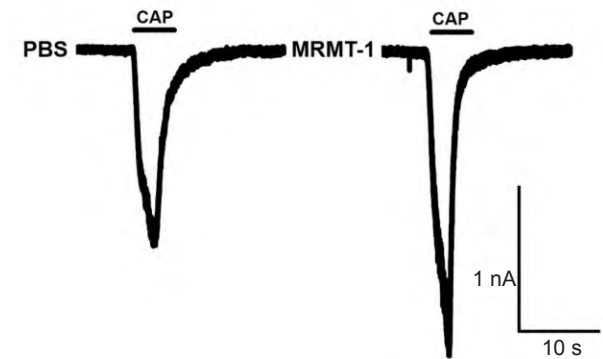


图 4 利用全细胞膜片钳技术记录到骨癌痛大鼠辣椒素诱发 TRPV1 电流的变化
Fig.4 Representative traces of capsaicin-induced currents in DRG neurons with whole-cell patch-clamp recording

经验有几个关键步骤需要注意。在 DRG 神经元的急性分离培养过程中，首先是取材要快，因要保持细胞活性，所以需要快速而准确地取出 DRG，以免时间过长细胞死亡。然后是消化阶段，一般操作流程中会有个固定的消化时间，但是因为胰酶和胶原

酶每个批次的活性都不一样,所以每次拿到新的胰酶和胶原酶都要做预实验以确定具体消化时间,否则消化过度或消化时间不够都会影响细胞状态进而影响 patch 过程。最后是制备单细胞悬液过程中的吹打步骤,要把玻璃吸管尖端烧制光滑,粗细适中,吹打力度、频率以及手法都要轻柔,避免出现气泡,这一步需要多次练习才能掌握。在细胞贴壁结束取出进行 patch 时注意要将附着有细胞的一面朝上放置,新手操作时容易将玻片放反导致细胞死亡。在电极制备时根据所用拉制仪不同还可以采用水平拉制法制备玻璃微电极,电极尖端大小及形状与拉制温度、拉力、拉制速度、拉制时间等密切相关,而且每批次电极所用拉制参数均不同,所以换新批次电极时需要重新设定拉制参数。Patch 过程中在镜下找到玻璃微电极是刚开始接触该技术的人员需要攻克的难点。首先在镜下确定好要 patch 的细胞,将其放至视野中央,然后将玻璃微电极放至光路,在镜下会看到反光,电极入水前需要给予正压,然后用微操纵器将玻璃微电极缓慢下降,下降过程中适当调整前后左右位置,如果视野中看不到电极影子先不要盲目下降,以免电极触及培养皿压碎电极尖端,当电极下到细胞上方时镜下可以看到清楚的电极尖端。Patch 过程中另一个关键步骤就是高阻封接和破膜的过程。这一过程成功与否与细胞状态和破膜技巧有关。如果细胞一破膜就掉或者溶解,有可能细胞消化过度或者吹打力度太大,如果细胞很难破膜说明消化不够,下次需要调整消化时间。

在疼痛研究中膜片钳技术最常用于研究疼痛导致神经元兴奋性改变和离子通道的电流变化^[4,5,7-9]。以本文提到的骨癌痛为例,骨癌痛大鼠的背根神经节神经元与对照组相比神经元的兴奋性增高,可以从全细胞膜片钳记录到的神经元放电分析得到。首先是神经元自发放电的变化,在注射了 PBS 的对照组大鼠 DRG 神经元自发放电很少甚至没有,而骨癌痛大鼠的 DRG 神经元自发放电明显多于对照组,而且静息膜电位绝对值较对照组明显降低,说明神经元静息膜电位更接近于爆发动作电位的阈值,更容易兴奋。当给予一系列去极化电流(5 pA, 100 ms)时,会诱发一系列动作电位的发放,可以看到骨癌痛组诱发的动作电位个数较对照组增多。具体可以从静息膜电位(resting membrane potential, RMP)、引发第一个动作电位的去极化电流阈值(current threshold, CT)、膜输入阻抗(membrane input resistance, Rin)、动作电位阈值(threshold potential, TP)、后超极化(afterhyperpolarization, AHP)等动作

电位的特征分析诱发的第一个动作电位,从而分析造模组和对照组的区别。电压钳模式下可以记录疼痛相关的离子通道的电流变化。此文中列举的 TRPV1 是配体门控的离子通道,可以给予通道的 TRPV1 受体的配体辣椒素(capsaicin, CAP)使通道开放记录通过该通道的电流。如果是电压门控的离子通道就可以通过控制细胞膜电位使离子通道开放或关闭,从而记录通道电流。因记录的每个细胞大小不同,单看幅度有时不太客观,所以常用电流幅度除以细胞膜电容得出电流密度来进行比较。

综上所述,全细胞膜片钳技术可以通过记录神经元放电和相关离子通道的电流变化来探讨疼痛发生发展的机制,是疼痛学研究领域不可或缺的关键技术之一。

参考文献

- [1] Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 1976, 260(5554): 799 ~ 802.
- [2] Hamill OP, Marty A, Neher E, *et al.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*, 1981, 391(2): 85 ~ 100.
- [3] Zheng Q, Fang D, Liu M, *et al.* Suppression of KCNQ/M (Kv7) potassium channels in dorsal root ganglion neurons contributes to the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain*, 2013, 154: 434 ~ 448.
- [4] Liu M, Yang H, Fang D, *et al.* Upregulation of P2X3 receptors by neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in dorsal root ganglions contributes to the bone cancer pain in rats. *Pain*, 2013, 154:1551 ~ 1568.
- [5] Fang D, Kong LY, Cai J, *et al.* IL-6-mediated functional up-regulation of TRPV1 receptors in DRG neurons via the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain*, 2015, 156: 1124 ~ 1144.
- [6] Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, *et al.* A rat model of bone cancer pain. *Pain*, 2002, 96: 129 ~ 140.
- [7] Li Y, Cai J, Han Y, *et al.* Enhanced function of TRPV1 via up-regulation by insulin-like growth factor-1 in a rat model of bone cancer pain. *Eur J Pain*, 2014, 18(6): 774 ~ 784.
- [8] Kim YI, Na HS, Kim SH, *et al.* Cell type-specific changes of the membrane properties of peripherally-axotomized dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 1998, 86(1): 301 ~ 309.
- [9] Chung JM, Chung K. Importance of hyperexcitability of drg neurons in neuropathic pain. *Pain Pract*, 2002, 2(2): 87 ~ 97.