

虎纹捕鸟蛛神经细胞急性分离培养及其电压门控通道膜片钳

胡朝暾 邓梅春 王美迟 杨静 梁宋平 颜亨梅*

(怀化学院生命科学系 湖南怀化 418008; 湖南师范大学生命科学院 长沙 410081)

摘要:探索了虎纹捕鸟蛛 (*Ornithoctonus huwena*) 食道下神经细胞急性分离培养条件, 并利用全细胞膜片钳技术对虎纹捕鸟蛛食道下神经细胞电压门控性钠、钾和钙通道的基本电生理学特性进行了研究。适合虎纹捕鸟蛛神经细胞离体培养的培养基为 (g/L): 葡萄糖 0.7, 果糖 0.4, 琥珀酸 0.06, 咪唑 0.06, L-15 13.7, Hepes 2.38, 酵母粉 2.8, 乳白蛋白 2.5, 青霉素 200 IU/ml, 链霉素 200 mg/ml, 小牛血清 15%; pH 6.8。该培养基非常适合虎纹捕鸟蛛神经细胞离体培养, 细胞在温度 (27 ± 2) 的培养箱中培养 2~4 h, 培养的细胞数目多、结构完整、贴壁效果好, 细胞近似汤勺形, 有一个长的单极突起, 大部分细胞在 10~30 μm 之间。全细胞模式下可以记录到钠、钾和钙三种电压门控离子通道电流。钙电流为高电压激活电流, 该电流能够被 NiCl₂ 完全抑制; 钾电流为瞬时钾电流和延迟整流钾电流, 这两类钾电流分别被细胞外液中的 4-氨基吡啶和氯化四乙胺所阻断; 钠电流为 TTX 敏感型电流。

关键词: 虎纹捕鸟蛛; 神经细胞; 电压门控离子通道; 细胞培养

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)05-60-06

Isolation and Culture of Nerve Cells from *Ornithoctonus huwena* and the Patch-clamp Study on the Voltage-gated Ion Channels in the Cultured Neurons

HU Zhao-Tun DENG Mei-Chun WANG Mei-Chi YANG Jing

LIANG Song-Ping YAN Heng-Mei*

(Department of Life Science, College of Huaihua, Huaihua 418008;

College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: In this article, the dissociation and culture of neurons isolated from the subesophageal ganglion (SUB) of the *Ornithoctonus huwena* are described. The basic electrophysiological properties of voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ channels on the cultured neurons were studied by means of whole-cell patch-clamp technique. The culture medium used for the nerve cells contained (g/L): glucose 0.7, fructose 0.4, succinic acid 0.06, imidazole 0.06, L-15 13.7, Hepes 2.38, yeast extract 2.8, lactalbumin 2.5, penicillin 200 IU/ml, streptomycin 200 mg/ml, bovin calf serum 15%; pH 6.8. The suitable culture was 27 ± 2 for 2 - 4 h. Most cells were in good condition and above 90% cells survived in the cell culture dishes. The shape of the soma of the nerve cell was in an ellipse and that of neural cell

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 39570119, 30370208);

*通讯作者, E-mail: yanhm03@126.com;

第一作者介绍 胡朝暾, 男, 讲师, 研究方向: 蜘蛛生理及蜘蛛毒素; E-mail: huzhaotun@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2009-02-10, **修回日期:** 2009-07-06

appeared like a spoon, with a single axon. The size of these cells varied from 10 to 30 μm . Whole-cell patch-clamp showed high-voltage-activated (HVA) calcium currents and two types of outward potassium currents including delayed rectifier potassium currents and rapid outward potassium currents on spider neurons. The potassium currents could be inhibited by TEA-Cl and 4-AP. Sometimes, small voltage-gated sodium currents were also recorded in the experiment.

Key words: *Ornithoctonus huwena*; Nerve cell; Voltage-gated ion channel; Cell culture

虎纹捕鸟蛛 (*Ornithoctonus huwena*) 是近年来在我国发现的一个蜘蛛新种,它主要分布在我国南部和西南的广西、云南两省的山区。该物种属大型穴居型有毒蜘蛛,善攻击,主要捕食昆虫和小型脊椎动物,是研究蛛丝、蛛蛋白及开发新药源的理想材料。到目前为止,对于虎纹捕鸟蛛的研究报道主要集中在其生态学习性、生物学特征和毒素研究等方面。梁宋平等^[1,2]对虎纹捕鸟蛛毒素进行了深入系统的研究,在虎纹捕鸟蛛毒素中发现了一些对哺乳动物和昆虫神经系统具有毒害作用的生物分子。虎纹捕鸟蛛毒素对虎纹捕鸟蛛种群个体是否有毒害作用。到目前为止,还未见相关报道。另外,在节肢动物中,用于膜片钳研究的细胞报道最多的就是昆虫的神经细胞,主要包括蜚蠊 (*Periplaneta americana*) DUM 细胞^[3,4]及棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 中枢神经细胞^[5,6]等,这些细胞对昆虫神经毒素的功能研究起了重要的作用。虽然昆虫神经细胞在膜片钳研究中应用很多,但是同属于节肢动物的蜘蛛神经细胞应用于膜片钳实验却未见报道。在虎纹捕鸟蛛食道下神经细胞急性分离培养成功的基础上,用膜片钳分析其离子通道,并对其电压门控离子通道的类型和特征进行记录和研究,使得蜘蛛神经细胞成为一类新的膜片钳研究的实验细胞。并且为进一步研究虎纹捕鸟蛛毒素作用于虎纹捕鸟蛛种群个体的毒性打下基础。

1 材料与方 法

1.1 试 蛛 虎纹捕鸟蛛采自广西宁明县桐棉乡的山上,活体带回湖南并在实验室内人工饲养。室内温度控制在 22 ~ 30 ,相对湿度为 65 % ~ 90 %,自然光照。蜘蛛每周喂食一次,将猪肝切成 1 ~ 2 cm^3 的小块放入食皿中,投食时

间为周一 15:00 ~ 17:00 时,周二 8:00 ~ 10:00 时将食皿从饲养器皿中取出,食皿放置时间为 15 ~ 19 h。

1.2 神经细胞培养用液

培养基 (g/L) (根据文献 [6] 改进):葡萄糖 0.7,果糖 0.4,琥珀酸 0.06,咪唑 0.06, L-15 13.7, Hepes 2.38, 酵母粉 2.8, 乳白蛋白 2.5, 青霉素 200 IU/ml, 链霉素 200 mg/ml, 小牛血清 15 % ;pH 6.8。

生理液 (mmol/L) (根据文献 [7] 改进):NaCl 200, KCl 3.1, CaCl₂ 5, MgCl₂ 4, Sucrose 50, Hepes 10, pH 6.8。

培养基和生理液配好后在无菌条件下过滤除菌并分装于 10 ml EP 管内保存备用。

1.3 神经细胞的急性分离和培养 虎纹捕鸟蛛食道下神经细胞的分离和培养均可在简单消毒环境下进行。具体步骤如下:用眼科小剪刀将蜘蛛的螯肢剪下,将蜘蛛全身用 75 % 酒精消毒,用维纳斯剪刀剪下并取走蜘蛛胸甲,用镊子将血窦膜扒开,然后分离得到食道下神经节组织,将神经组织剪细并用玻璃吸管轻轻吹打组织离散细胞,其细胞悬液添加到预先放有培养液的培养皿中, (27 \pm 2) 静置培养 2 ~ 4 h。

1.4 电信号记录 用高阻封接全细胞膜片钳技术记录电信号。实验前将培养皿中的培养液用细胞外液替换, 20 ~ 25 室温下置于倒置显微镜 (OLYMPUS IX70, 日本) 下进行膜片钳实验。本实验主要采用全细胞记录模式进行,具体方法如下:参考电极与细胞外液用 150 mmol/L NaCl-琼脂盐桥连接;玻璃电极经两步拉制仪 (PC-10, Narishige) 两步拉制后热抛光,所得电极尖端口径为 1.5 ~ 2 μm ,充电极内液后入水电阻为 2 ~ 4 M Ω ;细胞与电极尖端形成千兆封接后即可抽破形成全细胞记录模式;稳定 4 ~ 6

min 后施加去极化脉冲测试电流大小。记录电流经 EPC-9 膜片钳放大器以 10 kHz 滤波过滤。数据和图形用 pulsefit-pule 8.0 软件采集分析并储存。线性漏电流和电容电流用 p/4 程序予以删除。

记录钠电流 (I_{Na}) 的细胞外液 (mmol/L): NaCl 80, KCl 4, CaCl₂ 2, Glucose 10, Choline-Cl 50, Hepes 10, 4-AP 1, TEA-Cl 30, 用 NaOH 调至 pH 6.8。电极内液 (mmol/L): CsF 140, MgCl₂ 2, EGTA 10, Hepes 10, 用 CsOH 调至 pH 6.8 (根据文献[8]改进)。

记录钾电流 (I_K) 的外液 (mmol/L): NaCl 100, KCl 4, CaCl₂ 2, Glucose 10, MgCl₂ 2, Hepes 10, TTX 0.001, 用 NaOH 调至 pH 6.8。电极内液 (mmol/L): KF 140, MgCl₂ 2, EGTA 10, Hepes 10, 用 KOH 调至 pH 6.8 (根据文献[9]改进)。

记录钙电流 (I_{Ca}) 的外液 (mmol/L): NaCl 120, KCl 4, CsCl₂ 5, Glucose 10, MgCl₂ 2, Hepes 10, TEA-Cl 10, TTX 0.001。用 CsOH 调至 pH 6.8。电极内液 (mmol/L): CsCl 120, MgCl₂ 2, Hepes 10, EGTA 10, TEA-Cl 10, Na₂-ATP 2, 用 CsOH 调至 pH 6.8 (根据文献[9]改进)。

2 结果

2.1 神经细胞的分离培养 吹打分散后在倒置显微镜下观察发现神经元大都呈汤勺形, 细胞胞体成椭圆形。一般细胞都有一条长的轴突。大部分细胞都在 10 ~ 30 μm 左右 (图 1)。多数细胞在接种 2 ~ 4 h 内贴壁。适合神经细胞生长的培养基为方法 1.2 部分提到的培养基。神经细胞在 DMEM 中基本不能够存活。当培养皿中加入多聚赖氨酸, 细胞贴壁时间缩短, 小牛血清浓度从 10 % 增加到 15 % 时存活和贴壁细胞增多。电生理实验所需细胞就是在上述培养条件下在 (27 ± 2) 培养箱中培养 2 ~ 4 h 后获得, 细胞大小在 30 μm 左右。这个时期细胞状态很好, 也很容易形成高阻抗封接。

2.2 神经细胞电压门控通道膜片钳实验 电压门控性通道根据其对离子的选择通突性, 主

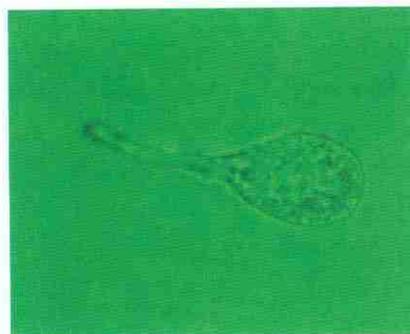


图 1 虎纹捕鸟蛛食道下神经节细胞 (×600)^[10]

Fig. 1 A neuron isolated from SUB
of *Ornithoctonus huwena*

要有钠通道、钾通道和钙通道三种。在引出每种通道电流时用特异性工具药物将另外的通道电流阻断。

2.2.1 钠电流 膜片钳实验封接成功并得到全细胞记录后, 将膜电位维持在 -80 mV, 给予脉冲宽度为 50 ms、刺激脉冲序列从 -70 ~ 40 mV、以 10 mV 步幅递增的去极化电压刺激, 可记录到一系列电流 (图 2A)。由于胞外液中加入 TEA-Cl, 电极内液中高浓度 CsF, 钾电流可被 TEA-Cl 阻断, 钙电流已被高浓度的 F⁻ 所灭活。在外液中加入 TTX, 该电流被抑制, 说明该电流为 TTX 敏感型钠电流 (图 2A)。从电流-电压关系曲线可知钠电流在 -40 mV 左右激活, 0 mV 左右达最大值 (图 2B)。

2.2.2 钾电流 将膜电位维持在 -80 mV, 给予脉冲宽度为 30 ms、以 10 mV 步幅递增的去极化电压刺激, 在不同的蜘蛛神经细胞中可记录到两种电流。在这两种电流中, 一种为缓慢激活, 几乎没有失活的电流, 即延迟整流钾电流 (图 3A), 该电流对 TEA-Cl 敏感 (图 3B); 另外一种为快速激活也快速失活的钾电流, 即瞬时钾电流 (图 4A), 这种钾电流对 4-氨基吡啶敏感 (图 4B)。

2.2.3 钙电流 将膜电位维持在 -90 mV, 给予脉冲宽度为 150 ms, 刺激脉冲序列从 -80 mV 到 +30 mV, 给予一系列以 10 mV 步幅递增的去极化电压刺激。由于细胞外液中的 TTX 和内液中的 TEA-Cl, 钠和钾电流被阻断, 所记

录的电流为钙电流(图 5A)。这种钙电流的特征为高电压激活,缓慢失活。该电流在 - 20 mV

左右时激活, + 20 mV 左右达到峰值(图 5B),此电流能被 NiCl₂ 完全抑制(图 5C)。

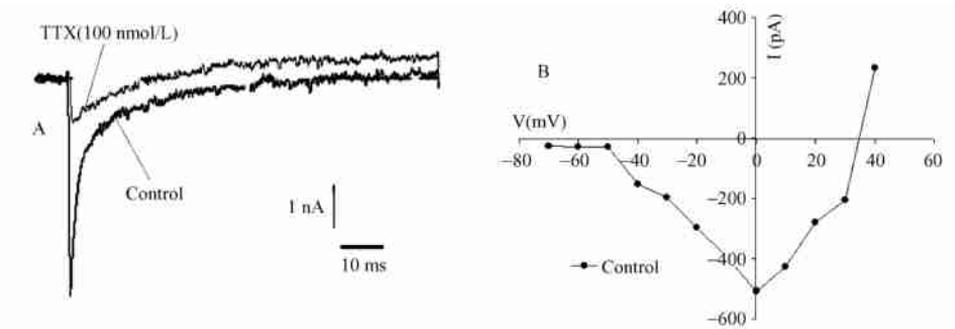


图 2 TTX 敏感型钠电流(A)及其电流-电压关系曲线(B)

Fig. 2 TTX-sensitive sodium currents (A) and the current-voltage curve of VGSCs (B)

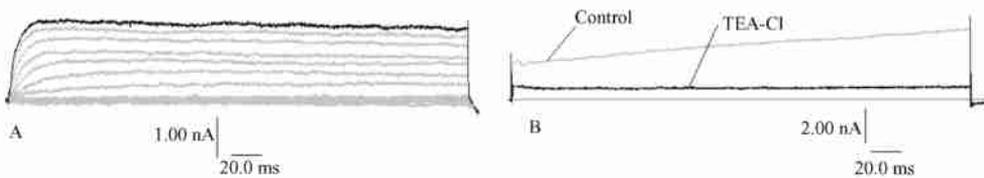


图 3 延迟整流钾电流(A)及其被 TEA-Cl 抑制(B)

Fig. 3 Delayed rectifier potassium currents (A) and the inhibition of currents by TEA-Cl (B)

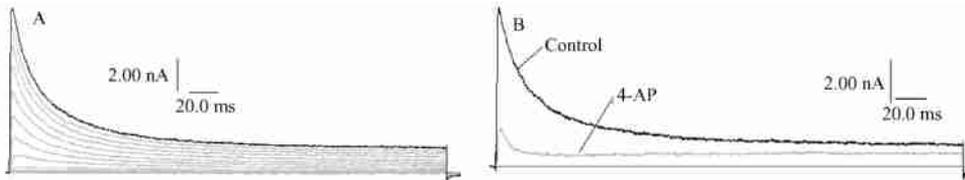


图 4 瞬时钾电流(A)及其被 4-AP 抑制(B)

Fig. 4 Rapid outward potassium currents (A) and the inhibition of currents by 4-AP (B)

3 讨论

膜片钳实验以细胞膜上的离子通道为研究对象。因此,细胞数量与状态是决定膜片钳实验能否成功的关键。笔者曾经对虎纹捕鸟蛛神经节的解剖以及神经细胞急性分离培养进行过初步的研究,其所用的培养基为:NaCl 223 mmol/L, KCl 618 mmol/L, CaCl₂ 8 mmol/L, MgCl₂ 511 mmol/L, Sucrose 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 谷氨酰胺 1 mmol/L, 青霉素 200 IU/ml, 链霉素 200 μg/ml, 小牛血清 20%, pH 7.4。结果不是很

理想,最大的问题就是细胞贴壁不好,急性分离后在显微镜下能够看到许多较大的神经细胞,但是,当用细胞外液替换培养基后,一些细胞,特别是大细胞都从培养皿中消失了,留下的都是一些小细胞。因此,在前期研究的基础上,再次对虎纹捕鸟蛛神经细胞的培养条件进行摸索,对细胞培养所需的培养基进行了更换,更换后的培养基为(g/L):葡萄糖 0.7,果糖 0.4,琥珀酸 0.06,咪唑 0.06, L-15 13.7, HEPES 2.38, 酵母粉 2.8, 乳白蛋白 2.5, 青霉素 200 IU/ml, 链霉素 200 mg/ml, 小牛血清 15%, pH 6.8。更换

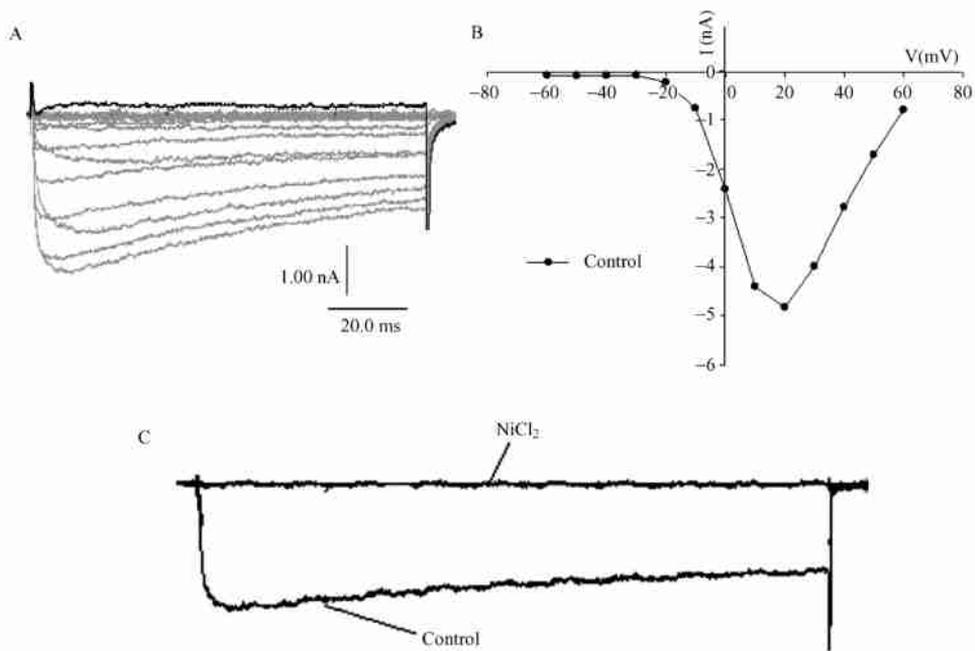


图 5 电压激活钙通道电流(A)及其电流-电压关系曲线(B)以及其被 NiCl_2 完全抑制(C)

Fig. 5 A series of high-voltage-activated calcium currents (A), the corresponding current-voltage curve (B) and the complete inhibition of currents by NiCl_2 (C)

后的培养基添加了适合节肢动物细胞培养的 L-15, 另外, 培养基中添加了细胞生长所需要的酵母粉、乳白蛋白等营养物质及琥珀酸和咪唑等细胞代谢物质。更换后的培养基更接近细胞体内环境, 有利于细胞的生长。更换后细胞贴壁效果大大提高, 很多大细胞都能够贴壁和存活, 电生理记录时也很容易封接成功。说明新的培养基更适合细胞的生长。膜片钳实验所需的细胞就是在此培养基培养条件下获得。

钠、钾和钙等电压门控性离子通道是神经元和其他兴奋细胞赖以产生电信号的分子基础, 在动作电位的产生和传导, 亦即在控制神经和肌肉的兴奋中起关键作用。特别是钠通道, 它控制着动作电位的去极化相, 它的变化决定着动作电位能否产生。当动作电位产生时, 首先就是钠离子在膜两侧浓度差的作用下由膜外流向膜内。我们在对虎纹捕鸟蛛神经细胞电压门控钠通道膜片钳实验时, 发现结果不理想, 大多数情况下都只能记录到小的钠电流。有文献报道^[11, 12], 昆虫神经细胞是非兴奋

细胞, 仅在特定条件下膜离子通道才能够被激活, 细胞表现兴奋性。由于此前未见有关虎纹捕鸟蛛神经细胞离体培养及电压门控通道膜片钳研究的报道, 因此体外培养的虎纹捕鸟蛛神经细胞是否存在类似的情况, 是否适合于膜片钳实验研究, 表达哪些电压门控性离子通道等都是未知数。本研究结果表明: 离体培养的虎纹捕鸟蛛神经细胞适合于膜片钳实验研究。全细胞模式下, 不经药物刺激, 即可记录到电压门控钙电流和钾电流, 以及小的钠电流。神经细胞不仅表达延迟整流钾通道电流和瞬时钾通道电流, 同时还表达高电压激活的钙通道电流及 TTX 敏感的钠通道电流。

参 考 文 献

- [1] 梁宋平, 覃于宾, 张东裔等. 虎纹捕鸟蛛毒的生物活性鉴定. 动物学研究, 1993, 14(1): 60~65.
- [2] Liang S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon*, 2004, 43(5): 575~585.

- [3] Golleau F, Lapiere B. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanism underlying spontaneous electrical activity. *J Exp Biol*, 2000, **203**: 1 633 ~ 1 648.
- [4] Sinakevitch I G, Geffard M, Pelhate M, et al. Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurons innervating the colleterial glands of the female cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol*, 1995, **198**: 1 539 ~ 1 544.
- [5] 贺秉军, 刘安西, 陈家童等. 棉铃虫幼虫神经细胞的急性分离培养及其电压门控通道的膜片钳研究. *昆虫学报*, 2001, **44**(4): 422 ~ 427.
- [6] 杜育哲, 李杰, 贺秉军等. 苦参碱对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道的影响. *昆虫学报*, 2004, **47**(2): 189 ~ 192.
- [7] Juusola M, French A S. Adaptation properties of two types of sensory neurons in a spider mechanoreceptor organ. *J Neurophysiol*, 1998, **80**(5): 2 781 ~ 2 784.
- [8] Lee D, Park Y, Brown T M, et al. Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol Pharmacol*, 1999, **55**(3): 584 ~ 593.
- [9] Christensen B N. Ionic currents in neurones cultured from embryonic cockroach (*Periplaneta americana*) brains. *J Exp Biol*, 1988, **135**: 193 ~ 214.
- [10] 胡朝暉, 颜亨梅. 蜘蛛神经节的解剖与神经细胞的分离培养. *动物学杂志*, 2007, **42**(2): 63 ~ 67.
- [11] Hoyle G. Cellular mechanisms underlying behavior: neuroethology. *Adv Insect Physiol*, 1970, **7**: 349 ~ 444.
- [12] Gündel J, Wicher C, Tenggigkeit M, et al. Investigations of excitability of isolated and non-isolated neurons from the terminal ganglion of *Periplaneta americana* by current/voltage clamp and intracellular perfusion. *Gen Physiol Biophys*, 1989, **8**: 579 ~ 587.

《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国科学院院士及美国国家科学院外籍院士张启发博士任主编,北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编,国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》将面向基因组学、分子遗传学、生化与分子生物学、生物信息学等基础学科领域,着重刊登农林科学、医药科学、动物科学、环境与生态科学以及生物学实验技术与方法等应用生物学领域的最新研究进展和成果。将开设综述与专论、研究论文、新技术新基因新种质等栏目。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照,实现网上领先发表模式。

《基因组学与应用生物学》,前身是原《广西农业大学学报》,创刊于 1982 年。在广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版)之综合性农业科学类的核心期刊,是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001 年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘:自然科学》(CSA:NS)、英国《动物学记录》(ZR)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉,《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进,为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台,使之成为中国科学家走向世界的桥梁。

《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》,ISSN1674-568X,CN45-1369/Q,双月刊,双月 28 日出版,国内定价:人民币 40.00/册,人民币 240.00/年;国际定价:美元 \$ 40.00/册,美元 \$ 240.00/年。