短时血清培养与多聚赖氨酸对耳蜗螺旋神经节细胞活性与贴附性的作用

江远明　唐世雄　魏晓菲　罗　琳

摘　要　目的　体外分离大鼠耳蜗螺旋神经节细胞(spiral ganglion neurons, SGN),探索急性分离后短时血清培养可提高耳蜗 SGN 的活性,同时观察多聚赖氨酸对耳蜗 SGN 的贴附性影响,为采取膜片钳技术研究耳蜗 SGN 电生理特性提供实验平台。**方法**　采用急性分离的方法获得耳蜗 SGN 后,进行短时间的血清培养,同时在培养皿的底部加入多聚赖氨酸。分别比较耳蜗 SGN 在活性和贴附性上与未进行血清培养及未加多聚赖氨酸时的差异。**结果**　急性分离后的耳蜗 SGN,短时血清培养后比不培养的能获得更好的细胞状态,可以记录出稳定的电流曲线,并且能持续良好的细胞活性约 5h,而不加血清培养的细胞,良好活性只能持续约半小时。在培养皿底加用多聚赖氨酸,可明显提高耳蜗 SGN 的贴附性。**结论**　急性分离方法得到的耳蜗 SGN,通过加血清短时培养及在培养皿底加多聚赖氨酸,可明显提高耳蜗 SGN 的活性及贴附性,增加了细胞的记录时间和封接成功率,从而有利于对耳蜗 SGN 做进一步电生理学的研究。

关键词　螺旋神经节细胞　多聚赖氨酸　贴附性

[中图分类号]　R76　　[文献标识码]　A

Effect of Serum Culture Shortly and Polylysine in Patch Clamp Research on SGNs.　*Jiang Yuanming, Tang Shixiong, Wei Xiaofei, et al. Department of Otolaryngology, Ningbo First Hospital, Zhejiang 315010, China*

Abstract　Objective　To study the effect of serum culture shortly and polylysine in patch clamp research on SGNs. **Methods**　The better activity of SGN with serum culture shortly and the promoting adherence of SGN with polylysine were observed. **Results**　The SGN with serum culture for a short time could last for at least 5 hours. It was enough for us to do some kinds of tests on the SGN. However, the SGN without serum culture just last only half an hour. The SGN with polylysine in the culture dish could hold tightly when shaking the test table, but they mostly disperse when there was no polylysine. **Conclusion**　The SGN with serum culture for a short time can last for a long time, and hold tightly with polylysine in the dish.

Key words　Spiral ganglion neurons(SGNs); Polylysine; Serum culture; Adherence

位于蜗轴与骨螺旋板相连处的耳蜗螺旋神经节神经元(spiral ganglion neurons,SGN)是听觉系统的一级神经元,可将毛细胞的信号传向听觉中枢,在听觉的产生过程中起着举足轻重的作用。膜片钳技术是研究细胞电生理活动的新技术。鉴于耳蜗 SGN 在听觉的产生过程中的重要作用,应用膜片钳技术对耳蜗 SGN 在正常及干预因素作用下电生理活动的研究,越来越受到学者们的重视[1]。耳蜗 SGN 良好的活性和稳固的贴壁是决定膜片钳实验成功的重要因素。良好的细胞活性提供足够长的时间,可在同一个细胞上进行对照及干预因素下的实验研究,提高电流记录结果的准确性。选用出生 4～7 天大鼠进行实验,采用急性分离短时血清培养来提高 SGN 的活性和通过在培养皿底部加多聚赖氨酸来提高 SGN 的贴附性。试图通过短时血清培养与多聚赖氨酸的使用来提高耳蜗 SGN 的活性和贴附性,为耳蜗 SGN 的膜片钳记录提供实验基础。

材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物及材料:出生 4 天的健康 SD 大鼠(宁波大学动物中心提供),眼科剪,镊子,35mm 培养皿,小盖玻片,显微剪等。(2)全细胞膜片钳实验仪器及材料:膜片钳记录仪为国产 PC－Ⅱ B 型(华中科技大学,武汉),毛细管(外径 1.5mm)经两步法拉制而成的玻璃微电极(尖端直径约 1μm)。

2. 方法:(1)耳蜗 SGN 的体外分离:取大鼠 6 只,雌雄不限,于－20℃冰箱冷冻麻醉 5～7min。常规消毒大鼠皮肤,引颈处死后在无菌 Hank's 液中完整取出耳蜗,置于另一个盛有 Hank,s 液的培养皿中。由于出生 4 天大鼠耳蜗尚未骨化,在

作者单位:315010　宁波市第一医院耳鼻咽喉科(江远明、唐世雄);315211　宁波大学医学院生理与药理学科系、浙江省病理生理学技术研究重点实验室(魏晓菲、罗琳)

通讯作者:罗琳,电子信箱:luolin@ nbu. edu. cn

解剖显微镜下分出基膜和螺旋韧带,保留螺旋神经节。将完整取出的螺旋神经节置于一无菌的空培养皿中,用显微剪将其尽量均匀剪碎。随后加入到含胰酶(浓度为 0.25%)的培养基中,约 37℃消化 10 ~ 15min。用胰酶抑制剂抑制消化作用。1000r/min 离心 5min 或静置约 30min 后,轻轻吸取上清,弃掉。随即加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(Sigma 公司)培养基,用带枪头的移液器轻轻吹打约 15 次制成细胞悬液。双层分样筛滤过除去未消化或散开的组织。将细胞悬液接种于已用 0.1% 多聚赖氨酸包被的小玻片上,小玻片预先置于一 35mm 培养皿中。将含有小玻片的培养皿置于 37℃、95% 空气、5% 二氧化碳培养箱中培养。约 2 ~ 3h 后将培养皿取出进行膜片钳实验。(2)耳蜗 SGN 贴附性及活性的判定:常规细胞贴附性的判定方法是将培养皿置于倒置相差显微镜下,培养皿中的培养基换成细胞外液后晃动工作台,贴附性好的细胞不随工作台的晃动而移动。膜片钳实验中细胞活性的判定主要的依据:①细胞在实验中能坚持足够长的时间,在这段时间内,实验者能够尽量完成预先设计的实验方案;②在膜片钳实验中能最终记录出准确的结果,有效地防止因实验时间较长,而致所记录电流衰减现象的发生。(3)全细胞膜片钳实验方法及结果分析:在玻璃微电极中充灌电极内液,使其在细胞外液中的阻抗为 3 ~ 7mΩ,然后在微操纵仪的推动下,将玻璃微电极尖端接触耳蜗 SGN 胞膜,并应用负压抽吸使电极尖端和细胞膜形成高阻封接,封接电阻达到 10GΩ 以上,从而对膜片造成电化学隔离。待高阻封接稳定后,再次应用负压抽吸,使吸附于电极尖端的一小片细胞膜破裂,即“破膜”。此时电极内液与细胞内液相通,形成了全细胞的膜片记录模式。进行电容补偿和串连电阻补偿后,从微电极处引出的全细胞电流通过膜片钳放大器后输入电子计算机中,应用 pClamp9 专用膜片钳分析软件进行结果采样分析。以上实验均在室温条件下(控制在 22 ~ 25℃)进行。

3. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间配对计数采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1. 细胞的贴壁效果:分别将有多聚赖氨酸包被和未被包被(作为对照)的含有培养耳蜗 SGN 的培养皿,置于膜片钳实验台的倒置相差显微镜下,轻微晃动工作台。将细胞随工作台的晃动而移动的细胞视为贴壁状态不好的细胞,反之则认为细胞贴壁较好。先取有多聚赖氨酸包被的,后取未被多聚赖氨酸包被的。随机选取细胞视野。取 13 组,将数据列入表 1,并做统计分析。

表 1　多聚赖氨酸组与无多聚赖氨酸组每显微镜视野下耳蜗 SGN 数量

视野	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
多聚赖氨酸组(个/视野)	9	10	6	5	12	14	9	7	8	11	7	8	7
无多聚赖氨酸组(个/视野)	4	3	4	3	6	7	4	2	5	6	5	4	3

以上结果显示,多聚赖氨酸包被组每视野下的贴附细胞数均明显多于无多聚赖氨酸包被组(student's t test,$P < 0.05$),有显著性差异。从而得出结论:多聚赖氨酸包被玻片,能显著提高急性分离 SGN 的贴附性。

2. 细胞活性:通过短时的血清培养,笔者选取倒置相差显微镜下胞体清晰,折光性好的细胞进行膜片钳实验,大多数细胞能保持良好的细胞状态 4 ~ 6h。在这段时间内,笔者基本能完成预先设计的实验方案。同时在电压钳模式下,笔者记录到噪声较小的电流。图 1 为耳蜗 SGN 神经元膜片钳电压外向整流性钾电流及其 I - V 曲线。从图中可以看出钾电流成明显的外向整流特性,反转电位约 -67.3mV,与文献报道一致[2]。

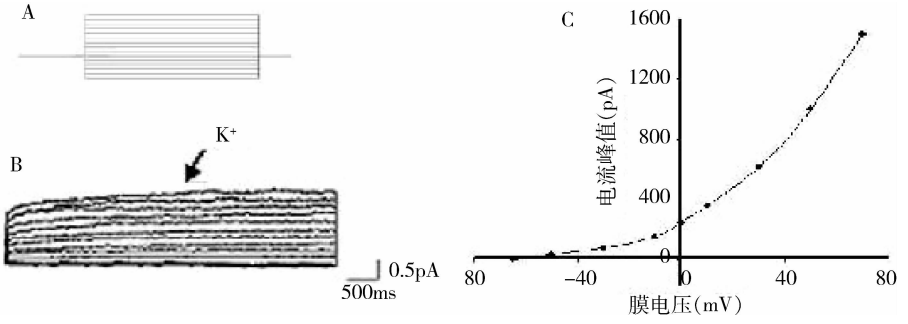

图 1　SGN 神经元膜片钳电压正常外向整流性钾电流

A. 在耳蜗 SGN 上采用的刺激方式;B. 正常耳蜗 SGN 上记录出的外向整流钾电流;C. 耳蜗 SGN 外向整流钾电流的 I - V 曲线

讨　论

在用膜片钳技术研究耳蜗 SGN 电生理活动的实验中,急性分离的方法来获得细胞标本是一种非常常用的方法[3]。急性分离获取耳蜗 SGN,在膜片钳实验中细胞状态的好坏及贴壁是否牢固是决定实验成败的关键。细胞状态的好坏决定了能否记录到所需的电流,实验时间的长短,能否在实验中对所记录的细胞实施预先设计的干预措施。而贴附性的好坏则决定着能否进行良好的封接(高阻抗)、破膜,这些因素在应用膜片钳进行电生理实验中起重要作用。为了获得活性较好的耳蜗 SGN,实验者通常针对在获取耳蜗 SGN 标本过程中容易损伤耳蜗 SGN 的几个环节进行改进。在取材时,实验者通常通过提高解剖动物标本的速度来减少标本缺血缺氧时间、器械对组织的损伤等[4]。但动物断头后短暂的缺血缺氧及解剖器械在解剖过程中对标本的损伤,是提高速度不能根本解决的。本实验在取材过程中,根据耳蜗 SGN 的生长发育特点建立一个接近其生理状态的细胞外环境,使耳蜗 SGN 在解剖过程中受损伤程度达到最小,并尽可能缩短取材时间,从而达到尽可能减小损伤细胞活性的目的。

在对耳蜗 SGN 的消化处理中,通常有 3 种分离法:机械分散法、切割分散法、酶消化法等。前两种属于物理分离法,一般作为辅助方法,主要的是酶消化法[2]。酶的种类选择、配备浓度及消化的时间直接影响细胞的活性和培养细胞是否成功。有研究者用胰酶和胶原酶或胰酶加胶原酶/ DNA 酶联合应用进行细胞的消化分离[5]。经过试验认为先采取机械分离法,再用 0.25% 的胰酶消化 10 ~ 15min,并最好在显微镜下监测组织消化的程度,可避免消化不充分或过度,引起细胞分散不充分和损伤过大。采用机械分离加酶消化法,减小了酶量,缩短了消化时间,从而也减小了对耳蜗 SGN 的损伤。多数研究者在急性分离耳蜗 SGN 标本再进行膜片钳实验时,通常获得细胞悬液静置后即进行实验。笔者在获取细胞悬液后,进行短时的血清培养。实验发现培养后的细胞活性明显增强,同时还发现培养后,耳蜗 SGN 的细胞形态特征比培养前更明显,更易辨认,从而提高实验效率。在膜片钳实验中,当玻璃电极靠近耳蜗 SGN 准备封接时的轻微震动或显微镜工作平台的微细位移或周围环境中的震动都足以使耳蜗 SGN 移位或悬浮在细胞外液中,造成封接困难或无法进行封接。更重要的是细胞的良好贴壁可以防止电生理记录过程中的许多问题,诸如漏电流过大、机械性伪迹或加药过程中高阻抗封接的崩溃。

目前研究者在解决有关细胞贴壁实验研究的过程中,常用的方法有鼠尾胶原、多聚赖氨酸等均可不同程度解决细胞贴壁的问题[6]。但鼠尾胶原多需自行提纯方法较复杂,容易污染,保存时间短等,限制了其广泛应用[7]。笔者在实验过程中选用 0.1% 多聚赖氨酸作为底物。多聚赖氨酸是合成的赖氨酸多聚体,相对分子质量为 7 ~ 30kDa 的多聚赖氨酸可作为细胞生长基质,该多聚阳离子分子与组织切片上的阴离子相互作用会产生较强的黏合力。多聚赖氨酸价格适中、使用方便、并可循环使用,可大大节省成本。活细胞大部分都贴壁良好。同时对实验结果不会产生不良影响,这点从膜片钳记录的实验结果中可以看出多聚赖氨酸既没有影响钾电流的外向整流特性,又没有改变反转电位的值。记出的电流清晰,噪声较小,为膜片钳实验的继续开展创造了条件。

参考文献

1 Rusznak Z, Szucs G. Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function[J]. Pflugers Arch, 2009, 457(6): 1303 - 1325

2 Koizumi H, Smith JC. Persistent Na^+ and K^+ - dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre - Botzinger complex in vitro[J]. J Neurosci, 2010, 28(7): 1773 - 1785

3 van Loon MC. Spiral ganglion cell morphology in guinea pigs after deafening and neurotrophic treatment[J]. Hear Res, 2011, 298: 17 - 26

4 Li Q. Long - term modulation of A - type K^+ conductances in hippocampal CA1 interneurons in rats after chronic intermittent ethanol exposure during adolescence or adulthood[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2009, 37(12): 2074 - 2085

5 Glueckert R. Deafferentation - associated changes in afferent and efferent processes in the guinea pig cochlea and afferent regeneration with chronic intrascalar brain - derived neurotrophic factor and acidic fibroblast growth factor[J]. J Comp Neurol, 2008, 507(4): 1602 - 1621

6 Buckiova D. Minimally invasive drug delivery to the cochlea through application of nanoparticles to the round window membrane[J]. Nanomedicine: Lond, 2010, 7(9): 1339 - 1354

7 Strauss HM, Keller S. Pharmacological interference with protein - protein interactions mediated by coiled - coil motifs[J]. Handb Exp Pharmacol, 2008, 186: 461 - 482

(收稿日期:2013 - 12 - 02)
(修回日期:2013 - 12 - 23)