

· 论 著 ·

## 小鼠螺旋神经节神经元的分离和 A 型钾通道的电生理特性

邓嘉虹<sup>1</sup>, 蔡春春<sup>1</sup>, 梁传余<sup>2</sup>, 姜鹤群<sup>1</sup>, 张 林<sup>1</sup>

(1. 云南省第一人民医院耳鼻喉科, 昆明 650032; 2. 四川大学华西医院耳鼻喉科, 成都 610041)

**摘要:**目的 机械分离并酶解小鼠耳蜗螺旋神经节(SGN)细胞, 观察其 A 型钾通道的电生理特性。方法 对生后 1~6 d 的小鼠耳蜗螺旋神经节组织进行机械分离并酶解, 对 SGN 进行免疫细胞化学染色鉴定, 并利用全细胞膜片钳技术记录和分析 A 型钾通道电流。结果 新生小鼠 SGN 在机械分离和酶解条件下, 可以获得良好的细胞形态。SGN 的 A 型钾通道在 -60 mV 时激活, +40 mV 时失活, 能被细胞外的 4-氨基吡啶阻滞。结论 成功建立了机械分离并酶解 SGN 细胞的方法, SGN 的 A 型钾通道具有激活快、失活快的特点。

**关键词:**螺旋神经节神经元; 免疫细胞化学; A 型钾通道

**中图分类号:**R365.35; R392.11

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2010)05-0530-03

### Dissociation of spiral ganglion neurons in postnatal mice and electrophysiological characteristics of its A-type potassium channels

DENG Jia-hong<sup>1</sup>, CAI Chun-chun<sup>1</sup>, LIANG Chuan-yu<sup>2</sup>, et al.

(1. Department of Otolaryngology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China;

2. Department of Otolaryngology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**Abstract: Objective** To mechanically dissociate and enzymolize spiral ganglion neurons (SGN) in postnatal mice and to observe the electrophysiological characteristics of those A-type potassium channels. **Methods** The mechanical dissociation and enzymolysis of spiral ganglion neurons were carried out with 1-6 d postnatal mice. Immunocytochemical stain identification was performed with fluorescent microscope. Record and analysis of A-type potassium channels' currents were carried out with whole-cell patch clamp techniques. **Results** Spiral ganglion neurons of postnatal mice had good cell forms in the condition of mechanical dissociation and enzymolysis. The A-type potassium channels were activated in the membrane voltage of -60mv and inactivated in the membrane voltage of +40mv, and were inhibited by extracellular 4-aminopyridine. **Conclusion** We successfully established the methods of mechanical dissociation and enzymolysis of SGN, the A-type potassium channels of SGN had the characteristics of quick activation and quick inactivation.

**Key words:** spiral ganglion neuron; immunocytochemistry; A-type potassium channels

耳蜗螺旋神经节神经元(spiral ganglion neuron, SGN)的体外机械分离及酶解是在体外实验条件下研究听觉传导通路中神经元的形态功能和特性的重要方法。由于耳蜗骨化常发生于哺乳动物生后极短时间内, 使 SGN 的体外分离和酶解尤为困难。国内能进行 SGN 研究的实验室通常采用直接酶解的方法, 而比较直接酶解和机械分离后酶解, 前者因应用蛋白酶浓度高较后者对神经细胞突起的损伤更大, 因此本研究选用出生 1~6 d 的乳小鼠进行 SGN 的机械分离、酶解、免疫细胞化学鉴定。SGN 的 A 型钾通道具有激活迅速、失活迅速的特点, 利用全细胞膜片钳技术对通道电生理特性进行记录和分析, 可以进一步研究听觉传导通路的机理。现报道如下。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 SGN 细胞分离、酶解与鉴定

**1.1.1 SGN 的体外分离** 选用出生 1~6 d 发育正常的昆明种乳小鼠, 共 10 只(20 耳), 在解剖显微镜(Laica 公司生产)下沿小鼠头颅矢状面正中剖开, 分别去除大脑和小脑组织, 在枕骨大孔正上方找到并取出耳蜗组织, 置入盛有 pH 7.4 的 Hank's 平衡盐溶液中。高倍镜下分离并去除骨性耳蜗。同样方法分离对侧。将分下之膜性耳蜗沿螺旋缘处将外侧血管纹、Corti's 器去除, 仅剩余内侧螺旋神经节组织部分, 将神经组织轻柔的分离并切割, 避免损伤神经元细胞。

**1.1.2 SGN 的酶解** 将 SGN 组织块仔细吸入小瓶中, 静置后吸去上层 Hank's 平衡盐溶液, 并用 D-Hank's 平衡盐溶液洗涤组织块。将解冻的 2% 的胰蛋白酶原液 1 mL 加入盛有 SGN 组织块的小瓶中孵育, 并间或轻柔摇晃。酶解完毕后加

入含胎牛血清的细胞培养液终止酶解, 并进行机械吹打。将细胞悬液离心后吸出细胞悬液, 静置在经多聚赖氨酸处理过的培养皿中的盖玻片上贴片, 随时在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁情况, 并用细胞外液小心置换含血清的培养液, 直至细胞外液清澈。

**1.1.3 免疫细胞化学染色** 采用 1:100 小鼠源神经微丝 200 单克隆抗体(Sigma, N-0142)作为一抗, 1:100 异硫氰酸盐荧光素标记的山羊抗小鼠抗体(北京中山公司生产)作为二抗对细胞进行免疫荧光细胞化学染色鉴定, 阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)或山羊血清替代一抗反应。荧光显微镜下显亮绿色的细胞即阳性细胞, 即 SGN 细胞。

##### 1.2 溶液成分

**1.2.1 电极内液** 成分(mmol/L): KCl 112, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 0.1, EGTA 11, Hepes 10, 用 KOH 调节 pH 值为 7.4, 调节渗透压为 310 mOsm/L。

**1.2.2 细胞外液** 成分(mmol/L): NaCl 137, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 1.7, MgCl<sub>2</sub> 1, 葡萄糖 17, 蔗糖 50, Hepes 10, 用 NaOH 调节 pH 值为 7.5, 调节渗透压为 300 mOsm/L。

**1.2.3 终止酶解用细胞培养液** 90% 杜伯科改良的伊格尔培养基, 10% 胎牛血清, pH 值为 7.3~7.4。

**1.2.4 A 型钾通道阻滞剂** 4-氨基吡啶(4-AP)的浓度为 0.15 mmol/L, 为了更好地观察外向 A 型钾通道电流, 应用 0.05 μmol/L 的 TTX(河豚毒素)在细胞外阻滞内向钠电流。

##### 1.3 SGN 细胞 A 型钾通道的电生理特性

**1.3.1 全细胞电压钳模式的形成和细胞外给药** 采用三步拉

制仪控制硅硼玻璃微电极,并在电极尖端涂布硅酮树脂和进行热抛光,使玻璃微电极尖端直径小于  $1\ \mu\text{m}$ ,阻抗为  $3\sim 7\ \text{m}\Omega$ 。在微操纵仪的推动下,让玻璃微电极尖端接触 SGN 细胞膜,并应用负压抽吸使电极尖端和细胞膜形成高阻封接,封接电阻在  $10\ \text{g}\Omega$  以上,对膜片造成电化学隔离。高阻封接稳定后,通过负压抽吸使吸附于电极尖端的一小片细胞膜破裂,从而形成全细胞的膜片钳记录模式。实验使用“Y 管”胞外给药装置进行局部细胞外微灌流给药。Y 管给药尖端距目标细胞  $100\sim 200\ \mu\text{m}$ ,药液高于 Y 管  $20\sim 40\ \text{cm}$  以便其能有足够的重力流出 Y 管,该给药系统能在  $20\ \text{ms}$  内使目标细胞周边的外液完全被交换。

**1.3.2 A 型钾通道电流记录参数的设定** 激活刺激参数,钳制电压( $V_H$ ):  $-100\ \text{mV}(V_{H1}), -60\ \text{mV}(V_{H2})$ ;命令电压:由  $-120\ \text{mV}$  至  $+40\ \text{mV}$ ,步长  $10\ \text{mV}$ ,时程  $500\ \text{ms}$ 。失活刺激参数,  $V_H$ :  $-100\ \text{mV}$ ,给予  $-120\ \text{mV}$  至  $+30\ \text{mV}$  的预脉冲,步长  $10\ \text{mV}$ ,再给予  $+40\ \text{mV}$  的实验脉冲,两脉冲时程均为  $500\ \text{ms}$ 。恢复刺激参数,  $V_H$ :  $-100\ \text{mV}$ ,给予  $+40\ \text{mV}$  的双脉冲刺激,间隔  $10\ \text{ms}$ ,并以  $5\ \text{ms}$  增益逐渐增大。

**1.4 数据采样和分析** 数据采样采用 pClampx8.1 软件进行,采样频率为  $10\ \text{kHz}$ ,滤波  $5\ \text{kHz}$ ,增益为 2。数据分析采用 pClampfit8.1 软件进行。电流曲线的拟合采用标准指数函数方程和 Boltzmann 方程。标准指数函数方程:  $f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$ ,其中  $A$  表示电流幅度,  $\tau$  表示时间常数,  $C$  表示  $y$  轴的截距。Boltzmann 方程:  $I/I_{\text{max}} = 1 / \{1 + \exp[(V_h - V)/k]\}$ ,其中  $I$  为某一电压条件下的电流,  $I_{\text{max}}$  为电流峰值,  $V_h$  为电流达到  $50\% I_{\text{max}}$  时的膜电势,  $k$  为斜率。可以根据方程分别得出稳态激活曲线和稳态失活曲线的斜率  $k$ 。

**2 结 果**

**2.1 SGN 的分离和免疫细胞化学鉴定** 所有小鼠耳蜗 SGN 细胞的机械分离和酶解均获成功。在倒置相差显微镜下观察 SGN 细胞稍呈椭圆形,胞体边缘光滑,细胞透明,折光性良好,并可见胞质颗粒。细胞大多数有两个突起,少数有一个突起,并且还发现极少数细胞有三个突起(封 3 图 1)。免疫细胞化学染色显示 SGN 细胞胞体呈现明显的亮绿色,可见椭圆形的胞体和神经突起,显阳性,见封 3 图 2。

**2.2 A 型钾通道的记录和分析**

**2.2.1 A 型钾通道的激活、失活和恢复** 在细胞外液中加入河豚毒素(TTX)抑制内向钠电流后,应用  $-100\ \text{mV}$  及  $-60\ \text{mV}$  两个不同的钳制电压,  $25\sim 50\ \text{ms}$  的预脉冲时间,得到两个外向电流图形,两图相减后得到分离出的 A 型钾电流,表现为瞬间活化,迅速失活的外向电流特性,可见电流图和电流-电压关系曲线(图 3,4)。A 型钾通道在  $-60\ \text{mV}$  迅速活化,于  $+40\ \text{mV}$  达到峰值,对其进行拟合得到其活化时间常数( $\tau_{\text{act}}$ )为  $(0.785 \pm 0.04)\ \text{ms}$ ,其二分之一最大活化电压( $V_{1/2}$ )为  $-2.5\ \text{mV}$ ,斜率  $k$  为  $3.4\ \text{mV}(n=30)$ 。

给予  $-120\ \text{mV}$  至  $+30\ \text{mV}$  的预脉冲,步长  $10\ \text{ms}$ ,激活 A 型钾通道,再给予  $+40\ \text{mV}$  的实验脉冲,可以记录到 A 型钾通道的失活过程(图 5)。其失活过程符合二次幂方程,失活时间常数( $\tau_{\text{inact}}$ )分别为  $(150.5 \pm 19.5)\ \text{ms}$  和  $(32.5 \pm 5.1)\ \text{ms}$ ,其二分之一最大失活电压( $V_{1/2}$ )为  $-72.3\ \text{mV}$ ,斜率  $k$  为  $3.7\ \text{mV}(n=30)$ 。

将细胞钳制于  $-100\ \text{mV}$ ,给予两个  $+40\ \text{mV}$  的实验脉冲,两脉冲间隔时间从  $10\ \text{ms}$  逐渐增大(增益为  $5\ \text{ms}$ ),可以记录到 A 型钾通道的恢复情况(图 6),其恢复过程也符合二次幂方程,恢复时间常数( $\tau_{\text{rec}}$ )分别为  $(108.3 \pm 12.6)\ \text{ms}$  和  $(23.9 \pm 2.9)\ \text{ms}(n=8)$ 。

**2.2.2 4-AP 对 A 型钾通道的阻滞和洗脱** 4-AP 为一种透膜的钾通道阻滞剂,对 A 型钾通道的作用较延迟整流钾通道强,在细胞外液中加入  $0.15\ \text{mmol/L}$  的 4-AP, A 型钾通道电流峰值明显减小,并且随着细胞外液中 4-AP 的剂量增大, A 型钾电流峰值逐渐变小。当 4-AP 作用稳定以后,用细胞外液逐渐洗脱 4-AP, A 型钾电流恢复到加药以前的水平,见图 7。



A 型钾通道失活较快,电流图有明显的陡峭的峰。

图 3 A 型钾电流图

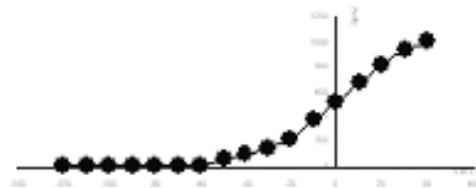


图 4 A 型钾通道电流 I-V 曲线



图 5 A 型钾通道的失活曲线



在相对不应期中部分通道开放, A 型钾电流峰值较小,随着不应期的过去,所用通道重新开放,电流峰值恢复到不应期前的水平。

图 6 A 型钾通道的恢复曲线



A: 细胞外液中加入 4-AP 前(control)、加入  $0.15\ \text{mmol/L}$  的 4-AP  $0.5\ \text{mL}$  和  $1.0\ \text{mL}$  后的峰电流曲线; B: 洗涤细胞外液中 4-AP 后的峰电流曲线,可见洗涤后电流恢复到加药以前电流水平。

图 7 4-AP 对 A 型钾通道电流的影响

**3 讨 论**

螺旋神经节神经元细胞的胞体位于螺旋神经节内,是听觉传导通路上的第 1 级神经元,属高度分化的终末细胞。哺乳动物和人听神经的神经元细胞体位于耳蜗骨螺旋板与蜗蜗相接处的 Rosenthal 隧道里,形成螺旋神经节。根据细胞大小、神经突起的形态和是否具有髓鞘,SGN 分为两型: I 型细胞为双极神经元,占 SGN 细胞的绝大多数(95%),它与内毛细胞形成突触、中枢突组成听神经; II 型细胞为假单极神经元,与外毛细胞形成突触。由于小鼠在生后很短时间范围内( $7\sim 10\ \text{d}$ )耳蜗就发生骨化,并且 I 型 SGN 细胞在生后一周内细胞髓鞘形成

并开始分化出 II 型细胞<sup>[1]</sup>, 本试验采用骨性耳蜗相对较软较薄的新生 1~6 d 的小鼠进行试验, 利于耳蜗的解剖、螺旋神经节细胞的机械分离和酶解, 以及全细胞膜片钳高阻封接的形成。

为了证实酶解神经细胞的性质, 本研究采用了免疫荧光细胞化学的方法。神经微丝蛋白(NFP)是神经细胞骨架中的重要组成成分, 存在于 SGN 的细胞胞体和突起中, 分为 3 个亚单位, 分别为 68 000、160 000 和 200 000<sup>[2]</sup>, 本实验中仅采用了 200 000 亚单位抗体作为一抗获得成功染色, 证实实验细胞为 SGN 细胞。

本试验在急性分离的 SGN 细胞上记录到瞬时外向钾电流成分, 通道在 -60 mV 左右开始激活, 并对 4-AP 敏感, 具有典型瞬时外向钾通道的特性。A 型钾通道以瞬时出现、快速激活、快速失活为特点, 故又称为瞬时外向钾电流(Ito)通道。它是在动作电位早期或细胞去极化早期出现的一种外向钾电流, 该电流的大小对动作电位的形态和时程有较大的影响。SGN 的动作电位有一超极化时相, 当细胞膜再次去极化而兴奋时, A 型钾通道被激活, 以延迟去极化达阈电位的时间, 即 A 型钾通道可以控制 SGN 的发放频率。另外 A 型钾电流(IA)在听觉形成中的作用, 可能还与其快速失活特性有关, 并可能通过短暂超极化细胞膜电位来调节细胞兴奋性。IA 通过调节突触后膜(毛细胞与 SGN 传入纤维形成的突触)的兴奋性来调节毛细胞与 SGN 之间的突触效能, 并通过减低峰电位的超极化后电位的衰减率来影响重复放电的频率, 由此限制毛细胞受体电位的频率反应。并且它可能通过调节突触后电位和降低峰间期来确立放电频率的上限<sup>[2-4]</sup>。Jagger 和 Housley<sup>[5]</sup>在原位新生大鼠听神经元的组织切片膜片钳实验中, 记录到 IA, 当 Vh 在 -60 mV 时, A 型钾通道激活, 在 -55 mV 时电流迅速上升, 并且在 -30~-40 mV 时通道迅速失活, 在静息膜电位下, A 型钾通道构成了 30% 的细胞电导, IA 在这种膜电位下构成了 60% 的去极化电流。应用 4-AP 抑制 A 型钾通道后, SGN 的动作电位释放增加, 适应性降低, 证实其对动作电位复极化有影响。本实验用 -100 mV 预脉冲条件记录的电流减去 -60 mV 预脉冲引出的电流, 分离出瞬时外向钾电流, 并进行失活、恢复等特性的研究, 结果与文献<sup>[5]</sup>研究相似, 表明啮齿类动物的 IA 生理特性比较相似。本研究在出生 1~6 d 的小鼠 SGN 细胞中记录到 IA, 表明出生后 A 型钾离子通道已经基本发育成熟, 至于其通道蛋白的表达可能主要为编码 KV 3.4 和 KV4 亚单位基因家族所控制<sup>[6]</sup>。

Jagger 和 Housley<sup>[5]</sup>认为 A 型钾通道可能主要集中在胞体和突触近端, 而 Szabo 等<sup>[7]</sup>的研究表明, 抑制 IA 对细胞放电特征中的快速失活特性没有影响, 因此认为 A 型钾通道存在于 SGN 突触末端。由于急性分离 SGN 细胞的过程破坏了较

多的神经突起, 而使其较培养的 SGN 细胞 IA 的表达少<sup>[7-8]</sup>。本研究中 IA 在急性分离细胞中的出现可能与某些时候细胞酶解后细胞状态好、细胞突起保存较好, 细胞本身的通道特性得到充分的表达有关。而 IA 的出现与神经元细胞在耳蜗的位置、细胞的大小、小鼠的天龄无关。可以认为体外急性酶解 SGN 细胞本身应具有 A 型钾通道, 但是通道的表达要求较高, 一旦外界环境, 诸如温度、湿度、细胞外液和电极内液的 pH 值、蛋白酶及终止液的浓度和终止时间的细微变化均可导致 A 型钾通道的不表达。这说明体外急性分离 SGN 细胞的实验技术需要进一步严格控制, 而 SGN 的 A 型钾通道存在的位置以及在听觉传导过程中的作用还有待进一步研究和探讨。

#### 参考文献:

- [1] Sheppard DN, Val verde MA, Represa J, et al. Transient outward currents in coclear gangliona neurons of the chick embryo[J]. *Neuroscience*, 1992, 51: 631.
  - [2] Kuijpers W, Tonnaer ELG, Peter TA, et al. Expression of intermedium filament protein in the matwe innerear of the rat and guinea pig[J]. *Hear Res*, 1991, 52: 133.
  - [3] Jan LY. Potassium channels and their evolving gates[J]. *Nature*, 1994, 371: 119.
  - [4] Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, et al. K<sup>+</sup> channel regnlation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal nenrons[J]. *J Physiol (Lond)*, 1996, 492: 97.
  - [5] Jagger DJ, Housley GD. A-Type potassium currents dominate repolarisation of neonatal rat primary auditory neurons in situ[J]. *Neuroscience*, 2002, 109(1): 169.
  - [6] Song WJ, Tratch T, Barrananskas G, et al. Somatoderdritic depolarization activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of A-type and attributable to coexpression of KV4. 2 and KV 4. 1 subunits[J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 3124.
  - [7] Szabo ZS, Harasztosi CS, Sziklai I, et al. Ionic currents determining the membrane characteristics of type I spiral ganglion neurons of the guinea pig[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16(10): 1887.
  - [8] Garcia-Diaz JF. Development of a fast transient potassium current in chick cochlear ganglion neurons[J]. *Hear Res*, 1999, 135(1-2): 124.
- (收稿日期: 2009-06-12 修回日期: 2009-09-08)
- 
- (上接第 529 页)
- [J]. *Biometrics*, 2007, 63(3): 873.
  - [5] 仲召阳, 王东, 彭斌, 等. 基于 Bayes 法建立 C-12 蛋白芯片联合检测判别函数及临床意义分析[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(1): 34.
  - [6] Meany DL, Zhang Z, Sokoll LJ, et al. Glycoproteomics for prostate cancer detection: changes in serum PSA glycosylation patterns[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(2): 613.
  - [7] Margreiter M, Stangelberger A, Valimberti E, et al. Biomarkers for early prostate cancer detection[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2008, 60(1): 51.
  - [8] Botchorishvili G, Matikainen MP, Lilja H. Early prostate-specific antigen changes and the diagnosis and prognosis of prostate cancer[J]. *Curr Opin Urol*, 2009, 19(3): 221.
  - [9] Schostak M, Schwall GP, Poznanovic S, et al. Annexin A3 in urine: a highly specific noninvasive marker for prostate cancer early detection[J]. *J Urol*, 2009, 181(1): 343.
  - [10] Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW, et al. Methylated genes as new cancer biomarkers[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(3): 335.
- (收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2009-11-06)