

毫无疑问,越来越多的信息,越来越精巧的技术,加上越来越丰富的想象,必将引导出更新的思路、更新的方法,使反义技术日趋完善。

参 考 文 献

1 Weintraub H M. *Sci Am*, 1990; 262(1):34

- 2 Stein C A *et al. Cancer Res*, 1988; 48:2659
- 3 Zon G. *ACS Symp. Ser.*, 1989; 401:170
- 4 Zamecnick P C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75:280
- 5 Inoué M. *Gene*, 1988; 72:25
- 6 Cotten M *et al. EMBO J.* 1989;8(12):3861
- 7 Armstrong L. *Business Week*, 1990; 3:88

应用膜片钳技术研究细胞分泌

曹忠升 康华光 邹寿彬 周 专

(华中理工大学自控系生物医学电子学研究室, 武汉 430074)

提 要

介绍了应用膜片钳技术研究细胞分泌机制的新进展,简述了时间分辨法在分泌研究中的基本原理与方法以及用此法研究获得的细胞分泌机制的新成果。

关键词 膜片钳,细胞分泌,膜电容,调控因子,时间分辨法

机体的发生、发展以及生命的基本活动都依赖于细胞间的信息联系和调控。生物体内的信息从胞外向胞内传递,从而引起生理效应的生化反应,一直是人们感兴趣的课题。细胞以分泌的化学物质作为传递信息的工具,通过一定的途径传给另一个细胞的化学信息传递形式,是细胞间三大信息传递形式中最重要的一种。细胞分泌的胞吐过程是在细胞膜上进行的,它会引引起细胞形态的改变和物质的流动,从而导致细胞膜电参数发生变化,其中尤其突出的是伴随着分泌活性,整个细胞表面积(与膜电容成正比)必然增加,人们可以通过测量细胞膜电容的方法来估计单细胞的分泌活性^[1-4]。这就是用电生理方法研究细胞分泌机制的基础。膜片钳(patch-clamp, PC)技术是 80 年代初逐步兴起趋于成熟的、用于检测 pA 级微电流而带宽优于 10kHz 的电子测量技术。因此,应用 PC 技术并结合细胞生理学与分子生理学等技术来研究并揭示细胞分泌的机制,是非常新颖而有效的手段。若把信息从胞外到胞内的传递途径按第一信使→受体→换能器→放大器→磷酸化

的前体→第二信使→内部效应器→细胞反应(如分泌)的形式表示,则分泌机制的研究主要

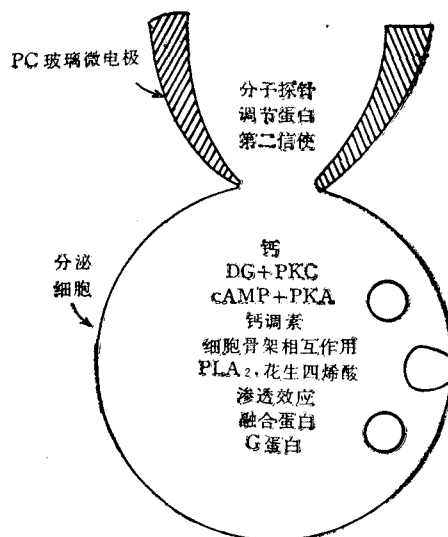


图 1 PC技术研究细胞分泌机制的模式图

围绕这一途径进行,故研究内容包括:分泌的启动、膜融合、胞吐等动态过程、动力学特性和

受体、调控因子等的作用机制^[1,2,5,6]。基本模式图如图 1 所示。

1 细胞分泌机制的 PC 研究方法

在研究细胞分泌机制中,最重要的是控制细胞内含组分的方法和监视细胞分泌反应的手段。从电生理角度讲,PC 技术是目前研究膜物理的最有优势的一种方法。

目前的 PC 仪已趋于成熟,被广泛地应用于离子单通道电流和分泌等电生理研究中。它在研究信号途径(分泌的动态过程)方面具有以下优点: a. 它允许记录与 $[Ca^{2+}]_i$ 调节有关的单通道和全细胞的电流; b. 在合适的情况下,它提供了一种通过膜电容的测量来测定分泌过程的手段,这种技术的高分辨率能检测单个囊泡的融合过程; c. 它容易与用 Ca^{2+} 指示剂 fura-2 来测量 $[Ca^{2+}]_i$ 的方法结合起来; d. 它允许细胞内与已知成分的溶液之间进行渗析; e. 能方便地对细胞设置钳位电压和电流; f. 它是现今所知的唯一能对小细胞(直径小于 $10\ \mu m$) 进行钳位记录的技术。因此,国外一些研究单位已利用这种技术在细胞分泌机制方面(细胞、刺激剂、阻断剂等选用及机制分析)取得了重大成果^[1-4,7-9]。

在分泌研究中,典型的实验示意图和等效电路见图 2^[7]。在应用该等效电路时,应满足电路参数与电压和频率无关的条件。因此,控制信号应足够小以至膜电导 G_m 的非线性可以忽略。另外,得到的电容与膜面积的正比关系的定量测量,是在假定细胞膜具有 $1\ \mu F/cm^2$ 比容且具有规则、致密表面的条件下成立的^[1]。所以,一般只研究能由图 2 等效电路中单时间常数描述的细胞。但这些参数还是随时间作缓慢变化的,这就要求各种测量方法都具有较高的时间分辨率。

对于慢全细胞(slow-whole-cell,SWC)构形,主要的差异是入口电阻变大,因此,也可利用该等效电路。这个膜的参数模型是下面介绍的时间分辨法(time-resolved)测量膜电容和其他电参数的基础。实验中,为了使 R_s 尽量

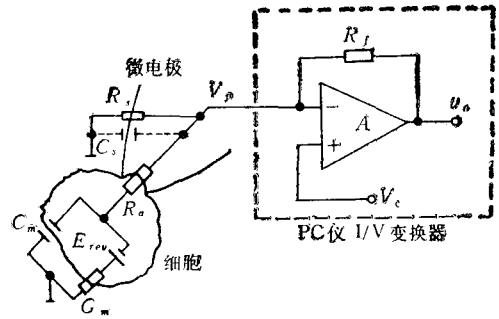


图 2 PC 快全细胞(fast-whole-cell,FWC)构形的简化等效电路

C_m : 膜电容, G_m : 膜电导, E_{rev} : 反向电势, R_s : 微电极玻管尖端的入口电阻, R_f : 封接后的漏电阻, C_i : 微电极及前置放大器的分布电容, V_c : 钳位电压(含控制信号 V_{cmd} 保持电压 V_{hold} 等)

小, R_s 足够大, C_i 尽量小,细胞的清洗,电极的材料选取、拉制、涂敷、抛光、充灌以及与细胞膜的封接操作等环节都显得很重要^[6]。下面是分泌研究中的 PC 技术简介:

1.1 微电极与细胞间的封接

1.1.1 PC 全细胞记录的紧封接构形 这种构形是当微电极玻管顶端与细胞膜接触后,在玻管内施加负压力或电压脉冲,使膜片处细胞破裂而形成的 R_s 较小($10M\Omega$ 级) R_s 很大的构形。由于 R_s 达 $G\Omega$ 级,故称为 $G\Omega$ 封接。当钳位电压施加在这种构形的细胞上时,细胞膜电位能很快达到钳位电压,所以也称这种构形为快全细胞构形^[6,7]。

1.1.2 PC 全细胞记录的松封接构形 当微电极玻管顶端与细胞膜接触后,仅使玻管-膜之间形成高阻封接,但膜片并不破裂。这样形成的构形使膜片处具有接近于正常膜的渗透性的特性。其 R_s 比较大(几百兆欧级) R_s 仍有 $G\Omega$ 水平。这种构形也称为慢全细胞构形,有利于研究膜受体在分泌中的功能。对此种构形可用同心多电极法加以改进以降低对细胞膜清洁度的要求^[10]。

1.2 信号的检测与处理方法

根据加到膜片钳 V_c 端的信号种类及提取手段的不同,可分为三种方法:

1.2.1 伪随机二进制序列(PRBS)法。它是在 V_c 端输入一个人工合成的随机二进制序

列,通过传递函数计算出膜的电参数.与下面两种方法相比,它的噪声较大、时间分辨率不高,适合于直径较大的细胞面积变化的时间过程监测^[11].

1.2.2 时域法——时间分辨法之一^[7].它是测量生物膜位移电流的最简单的方法.通过测量胞膜响应电压脉冲时的介电极化形成的电流衰减决定膜电容.这种方法仅需要一般实验设备与计算机.当计算机用递推法估算膜的三个参数 R_s 、 G_m 和 C_m 时,为使计算简化,还需假设 R_s 为无限大、 E_{rev} 变化比时间常数 ($\tau = R_s C_m$) 的变化慢等.在 FWC 和 SWC 构形中,这种方法的时间分辨率均为 5τ .时域法能同时跟踪分泌细胞等效电路中大的电容和电导的变化,因此,这是探查与离子通道有关的刺激分泌偶联较方便的方法,可应用于大小直径的分泌细胞研究中.但用此法检测单个颗粒同质膜融合导致电容增加(典型值为 $10\text{--}20\text{fF}$, $f = 10^{-15}$) 时,必须对 100 多次连续的电容测量值进行平均,这使时间分辨率大大降低.

1.2.3 频域法——时间分辨法之二^[7,9].该法是三种方法中分辨率最高的.如图 3 所示,当一个固定频率的正弦波控制信号同个直流固定电位一起加到具有图 2 等效电路的细胞上时,使用锁相放大器分析 PC 输出电流信号,则两个输出量(幅度和相位或两个相互正交相位的幅度)和固定电位的电流就能决定三个未知量 C_m 、 G_m 和 R_s (忽略 R_s).同样,此法也需满足对细胞的假设条件,只是对直流反电动势电流的大小和稳定性不必要求,只需已知条件.在此法中要着重考虑锁相相位的设置和正弦波频率($300\text{--}1500\text{Hz}$)的选择.它具有两种操作方式:一种方式以最高分辨率($1\text{--}10\text{fF}$)直接给出正比于电容小变化的输出信号;由于它平衡了常态电容,故它可适用于各种直径的细胞电容测量,但很难把 C_m 、 G_m 和 $G_s(1/R_s)$ 的变化一同给出.另一种方式是加上计算机,提供对所有细胞无源参数的估计,就像时域技术所能达到的那样,不同的是锁相放大器本身就可处理大量数据;不过当细胞参数变化较大时,

很可能找不到合适的锁相频率,因此,这种方式常用于小细胞的研究.总之,这两种方式各具特点,在 FWC 和 SWC 构形中都很适用,若结合起来使用则更臻完善.

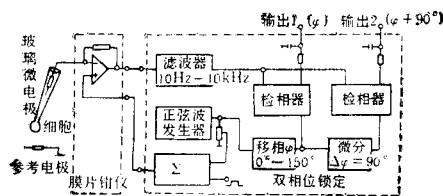


图 3 膜电容测量电路方框图

2 应用 PC 技术研究分泌机制

2.1. PC 技术所选用的细胞

电容测量已被用在几种细胞类型中,包括嗜铬细胞、PC-12 细胞、肥大细胞、 β 细胞、嗜中性白血球、卵母细胞、乳营养细胞和胰腺细胞,但其种类是受到一定限制的.根据细胞的性质,把上述细胞分为两类:一类是似神经细胞.其典型的代表细胞为牛肾的嗜铬细胞.另一类是不易兴奋性细胞.其典型的代表细胞是大鼠腹部的肥大细胞.这两类细胞在电生理测量中最明显的不同是离子电流.由于与膜面积改变有关的细胞活动有很多种,而肥大细胞去颗粒作用过程和嗜铬细胞的钙致分泌时引起的表面积变化相对大些,因而能清楚地区分出来.所以,这两种典型代表细胞不仅是这两类细胞中的极端例子,而且这两种细胞很适合于 PC 技术的实验^[1].

2.2. PC 技术的监视结果

膜融合和去颗粒作用体现在电容上的变化有三种情形(以肥大细胞为例): a. 电容阶梯式增加(胞吐过程)或者是阶梯式减少(胞纳膜回复或胞的夹断过程),如图 4a. 图 4b 所示.每个小阶梯反映了单个颗粒膜与质膜的融合或者单个液泡的胞纳. b. 在膜融合初期对应着电容的闪烁变化阶段,即以同等幅度增加后又减少,如图 4c,这是融合孔周期性开关形成的. c. 电容的平缓变化,如图 4d 所示,它可能与小囊泡的连续胞吐和回复有关.另外,在实验中, $[\text{Ca}^{2+}]$

指示剂的应用显示出在分泌同时,胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 发生瞬增^[1-5]。

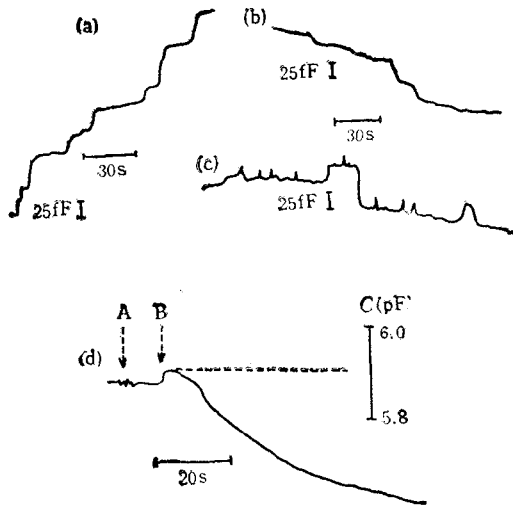


图 4 分泌细胞膜电容变化

(a),(b),(c) 给出了时间尺度 (30s) 和电容尺度 (25fF).(d) 中给出了时间尺度 (20s)、电容坐标的两个刻度值,A 箭头指向形成全细胞构形的时刻、B 箭头指向正弦波测试信号加入时刻

通过 PC 技术的实验,已初步得到了肥大细胞分泌调控模型,如图 5^[8]和嗜铬细胞分泌调控模型,后者同经典结论一致^[2]。

3 PC 技术在细胞分泌研究中的前景

一方面,在完善现有研究方法的基础上,更系统全面地研究信号传递机制。另一方面,分泌对人类而言意义更重大,特别是神经内分泌,从神经科学发展前景及需要看,PC 技术在神经内分泌机制的研究领域中大有用武之地。

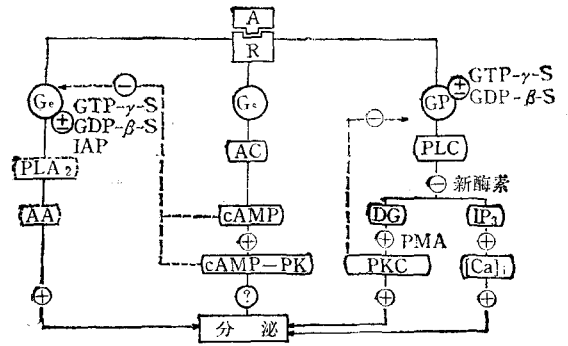


图 5 肥大细胞刺激分泌偶联多信号途径及药理作用场所假定模型

模型中假定了三种不同的 G 蛋白 (G_α , G_β , G_γ), 均由受体-激动剂 (R-A) 的相互作用激活。G 蛋白介导膜上酶的激活 (PLA₂, AC, PLC), 接着它们启动第二信使 (AA, cAMP, DG, IP₃), 然后第二信使使激活另一套酶 (cAMP-PK, PKC) 或者引起内储 Ca^{2+} 的释放。百日咳毒素 (IAP)、cAMP 能抑制 G_α 途径;新酶素和 PKC 的反馈作用对 G_β 途径有抑制作用。用虚线表示的 G_α 途径需进一步用实验研究确定。图中⊕表示加强作用,⊖表示抑制,⊙表示待定

参考文献

- 1 Penner R, Neher E. *Trends in Neurosciences*, 1989; 12(4): 159
- 2 Neher E. *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, 1988; 2: 37
- 3 Fernandez J M, Neher E, Gomperts B D. *Nature*, 1984; 312: 453
- 4 Almers W, Neher E. *J Physiol*, 1987; 386: 205
- 5 刘景生. 生理科学进展, 1987; 18(4): 367
- 6 周专, 康华光, 李之望等. 华中理工大学学报, 1990; (3): 115
- 7 Lindau M, Neher E. *Pflügers Arch*, 1988; 411: 137
- 8 Penner R. *Physiological Sciences*, 1988; 85: 9856
- 9 Neher E, Marty A. *Neurobiology*, 1982; 79: 6712
- 10 Roberts W M, Almers W. *Pflügers Arch*, 1984; 402: 190
- 11 Fernandez J M, Bezanilla F, Taylor R E. *J Gen Physiol*, 1982; 79: 41