

在体膜片钳技术的新进展*

杨 胜 周文霞** 张永祥

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 在体膜片钳是指在整体动物上直接对其中枢神经元进行全细胞膜片钳记录的技术, 在生理学和药理学研究中具有良好的应用前景. 常规采用的是盲法记录, 最近出现的可视法记录, 采用双光子靶向膜片钳 (two-photon targeted patching, TPTP) 技术, 通过基因操作在动物脑内目标神经元中构建特异表达的荧光标志, 可以做到对特定神经元亚群的靶向研究. 对这两种方法的原理和操作进行了简单的介绍.

关键词 膜片钳, 在体, 双光子显微镜

学科分类号 Q424

20 世纪 70 年代, 德国 Max-Planck (马普) 生物物理化学研究所的 Neher 和 Sakman^[1] 发明了膜片钳技术 (patch clamp technique), 从而使对细胞电活动的研究精度提高到 1 pA 的电流分辨率, 1 μm 的空间分辨率和 10 μs 的时间分辨率水平. 这一技术的出现促进了以细胞和脑组织片为本体的生命科学研究.

在过去的几十年间, 生物物理学研究主要以离体标本为主. 但是, 如想研究一些外界刺激对神经系统的影响, 在离体标本上是无法实现的, 而且离体的细胞和分子水平研究和整体的真实情况可能存在较大的差异. 因此, 在活体动物上对微小生命活动进行直接观察一直是追求的目标. 早期对神经系统的整体电生理学研究以胞外记录为主, 由于技术方法的局限性, 忽略了大量有价值的生物信号. 最近出现的在体膜片钳技术可以较好地解决这一问题, 可在动物整体无损的前提下, 深入研究大脑和脊髓神经元离子通道和突触活动的特点, 以及病理变化和药理作用. 在体膜片钳是指在麻醉动物上直接对其脊髓或大脑神经元进行膜片钳记录的技术, 与分散神经元或组织片膜片钳技术比, 最突出的优点是能够在施加外界刺激的同时, 在整体条件下研究中枢神经元离子通道和突触活动的特点, 为从宏观角度研究和探讨中枢神经系统的生物物理现象提供了更精确的手段.

20 世纪 90 年代一些实验室在借鉴脑片膜片钳技术的基础上, 尝试在整体动物 (一般是麻醉状态) 上进行膜片钳记录. 最早的报道是 Pei 和 Volgushev 等^[2~4] 在德国马普研究所的工作. 他们通过对成年猫视皮层神经元进行全细胞记录, 然后

观察来自不同方向的光刺激所对应的突触后电流反应, 以此探讨视觉信号传递和形成机理, 以及视皮层神经元功能和结构的关系. 随后日本和美国的两家实验室几乎同时把记录的部位从大脑神经元改到脊髓神经元 (Laminae I - II 区), 用以研究机体对各种伤害性或非伤害性刺激反应的神经通路^[5,6]. 从技术上讲, 脊髓的全细胞记录比脑部神经元的难度更大, 因为脊柱难以固定, 而且受循环和呼吸运动的影响更大, 所以使高阻封接难以维持足够长时间. 目前关于啮齿类动物整体全细胞记录的报道较少, 从事此类研究的实验室也只有少数几家, 集中在德、美、日等国家, 国内也开展了一些在体膜片钳的工作, 进行神经生理和神经药理学研究^[7~9], 说明这些技术的难度确实很高.

1 盲法的在体全细胞记录

对猫或大鼠进行在体膜片钳记录时, 前期准备主要有: 动物麻醉后, 继续静脉点滴麻醉剂以维持深度麻醉状态, 同时适量补充葡萄糖; 必要时需做胸廓切开术并使用人工呼吸机, 同时检测 CO_2 潮气量、血压、心跳等. 以上准备完成后, 动物固定于立体定位仪, 进行解剖以暴露神经元.

暴露清洁的皮层有利于提高封接的成功率. 尽量减小开颅的面积, 以减小呼吸和心跳对皮层的影响. 完全去除硬脑膜以避免电极污染. 为减少局部运动和分泌, 可使用阿托品. 当电极接近脑表面

* 国家自然科学基金资助项目 (30171153).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931625, Fax: 010-68211656

E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-04-14, 接受日期: 2004-05-30

时,在电极周围灌注温热的琼脂以覆盖暴露的脑表面,保持脑表面的湿度.琼脂凝固后还起到缓解脑血管波动的作用.整个实验过程要使用加热装置,保持动物体温恒定于 37°C .记录脊髓神经元时还需切除脊椎后弓,并去除位于软脑脊膜及硬膜之间的精细膜,以暴露脊髓神经.这些繁琐的步骤必须完成,以最大限度地减少呼吸循环运动等造成的系统不稳定性.有学者认为保留硬脑膜可减缓脑部的波动,通过胶原酶消化,使硬脑膜变软以利于电极穿插,这样可减少脑组织的蓬出,但是电极经过硬脑膜时的损伤几率大大增加.

由于软脑膜几乎不可能剥离,并且神经元周围有大量的胶质细胞和纤维包围,这样电极在穿插过程中很容易堵塞.有实验室尝试使用辅助电极清理神经元表面.辅助电极的尖端略大于膜片电极,施加较大正压,吹散周围组织,暴露神经元.但这样增大了操作难度,并很可能损伤脑或脊髓组织,违背应用在体膜片钳技术的初衷.目前只有通过施加正压保持电极清洁.电极给予 $100 \sim 200 \text{ mp}$ 的正压后,电极电阻增加约 50% ,直流变化达 0.5 nA .施加过程中,缓慢的坡度负压比快速的、步阶的负压更有利于形成高阻封接和全细胞记录.由于在体神经元的体积较小,这样电极是否遇到细胞就很难判断.Margrie 等^[10]认为在电极穿插过程中出现“心律性”波动是电极接触到神经元的重要标志(图1),这一标志的确立为盲法记录提供了重要参考.

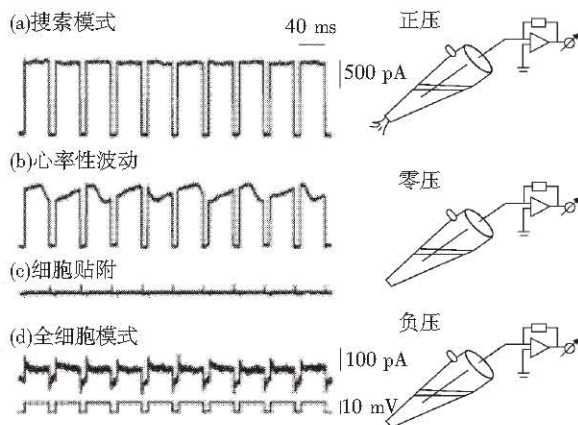


Fig. 1 Sketch map of process of whole-cell recording *in vivo*

图1 全细胞记录形成示意图

全细胞记录前的高阻抗封接可在两种模式下进行,电压钳或电流钳.在体记录时两者各有优势:电压钳状态可将细胞膜钳制于超极化水平,利于封

接.同时通过钳制电流水平,实时监测钳制状态.电流钳状态下,监测膜片电极与细胞膜的阻抗,数值变化幅度较大,利于确定封接状态.因此可根据具体设备任意选用.

2 可视法的在体全细胞记录

2.1 双光子激光扫描显微镜

盲法的在体全细胞记录只能通过解剖定位来实现对某一区域神经元的记录,无法精确到特定的神经元.但是通过结合激光扫描显微镜,使这一设想成为现实.

共聚焦激光扫描显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一项具有划时代意义的高科技新技术,是当今世界上最先进的分子生物学分析仪器,它是在荧光显微镜成像的基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用紫外光或激光激发荧光探针,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像,观察细胞的形态变化或生理功能的改变,成为形态学、分子细胞生物学、神经科学、药理学和遗传学等领域中新的有力研究工具.共聚焦激光扫描显微镜的重要优势在于,它提供了仅从单平面收集光波的可能性,与聚焦平面共轭的针孔定位 (即共焦) 可避免来自检测器之外的光,即从聚焦平面以外的其他地方反射/发射过来的光被掩盖.激光扫描显微镜可以按点和按线依次扫描样本,然后将像素信息组合成一个图像.通过这种方法,在一维中成像的样本光学切片可具有很高的对比度和分辨率.通过移动聚焦平面,可以将一个个的图像 (光学切片) 合并起来,组合成可在后期进行数字处理的三维堆栈.

双光子显微镜 (Two-photon laser scanning microscope) 常常被误解为共聚焦显微镜的一种,事实上两者的原理完全不同.它是多光子成像中的一种.在多光子成像中,染料分子的激发波长,一般比常规荧光成像或共聚焦成像所用长 2 倍左右.要被如此低能量、长波长的激光所激发,只有在极高光子流量 (能量密度) 的情况下才有可能,这样才使多重光子同时被吸收,所吸收的能量可认为是近似的相加起来.这种高选择性的激发方式造成所有荧光发射均源于样品的一个很窄区域的聚焦平面上,因而可获得较高的三维分辨率.双光子显微镜使用了两道光束作为电源,只有在两束光相交的位置才能够激发荧光.它不需要共聚焦显微镜的针孔,并且获得比之更薄的切面影像^[11,12].

双光子显微镜不是依赖于特殊的光学设计，而是着眼于荧光染料的激发方式，如激光光源的类型及其波长等，以及通过改进的 CLSM 系统来实现，这使双光子成像具有了许多优点。首先，因为采用低能量的激发波长，以至组织仅在狭窄聚焦平面内照射，避免了紫外光照射对细胞的损伤。其次，由于所使用的激光光源波长长，其穿透深度较深，十分有利于在厚样品中较深部位收集图像信息。这些特点使双光子显微镜在观察在体的脑显微结构变化中发挥了重要作用。例如，为了能够在活体动物大脑中长时间观测树突棘的动力学，学者构建了在大脑皮层局部锥体细胞转基因导入荧光标记蛋白的转基因小鼠。用双光子显微镜来观测荧光的活性，以反应锥体细胞树突棘的变化活性。研究者能够通过反复地观测相同的树突和树突棘，可获得单个神经元显微形态的动态变化情况，以及其他因素对这些显微结构的影响结果^[13,14]。

2.2 双光子靶向膜片钳技术

德国马普研究所在最新研究报告中提出了靶向定位的方案，通过结合双光子显微镜、基因操作表达荧光标志技术，建立了双光子靶向膜片钳技术（two-photon targeted patching, TPTP），进行在体全细胞记录研究^[15]。首先通过基因操作在动物脑内目标神经元中构建特异表达的荧光标记。同时，在电极内液中也加入荧光剂，然后利用浸水荧光显微镜锁定神经元特异表达的荧光标志和玻璃电极内的荧光，以此为标记，在可视条件下，进行玻璃电极和神经元的封接和全细胞记录。这样基本可以做到对特定神经元亚群的靶向研究。图 2 为其组成示意图。通过 TPTP 手段，观察位于 2/3 层感觉皮层的小清蛋白（parvalbumin）阳性的中间神经元，证实了这些中间神经元的阈下电活动频率与自发动作电位的频率是相当的，它们同步化的电学偶联直接参与感觉诱发的皮层活动的形成。

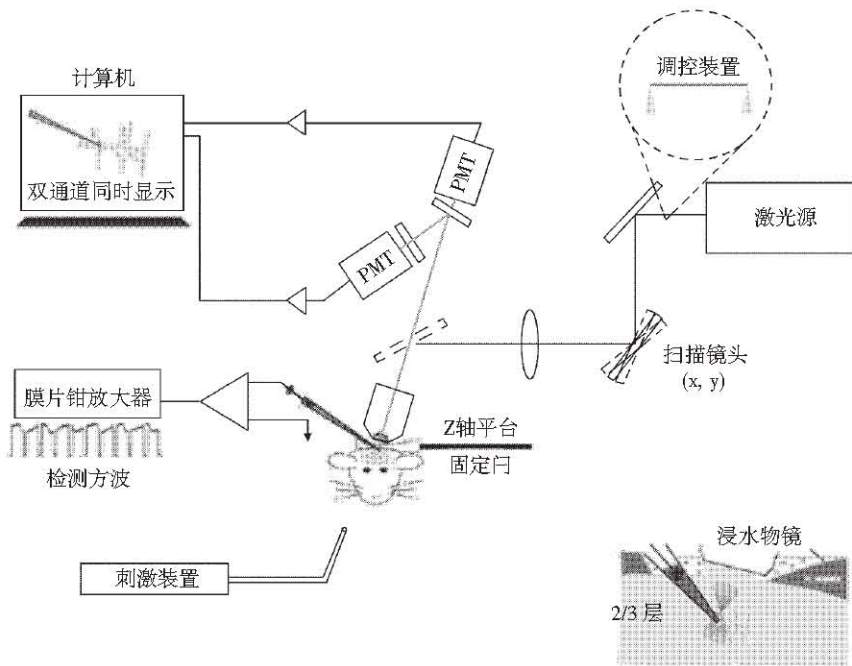


Fig. 2 Sketch map of TPTP recording in vivo

图 2 TPTP 记录示意图

右下图为软脑膜下电极位置示意图。PMT: 光电倍增管。

电极内液中使用的荧光剂，最初选择橘红色的 Ca 指示剂，但由于要施加正压，导致部分指示剂进入组织外液，而外液中也含有大量离子，所以造成背景很深，无法看清电极尖端。考虑到动物标本构建的生物荧光探针是绿色荧光蛋白（GFP），所

以电极内液中的荧光剂换为 Alexa。橘红/红色的 Alexa 探针与绿色的 GFP 反差很大，两者的激发谱也不同，并且 Alexa 对离子组成不很敏感。另外为了尽可能地降低背景荧光，对电极内液应施加较小的正压，并且尽快改为负压吸引。为了避免指示剂

弥散的叠加, 每当更换电极时要变换记录的位置. TPTP 记录技术的成功率较低. 它要求每个动物最多进行 20 次的电极穿插, 而每 5 到 10 个电极才能获得一个成功的全细胞记录.

目前利用在体全细胞记录的研究已经从皮层、嗅球神经元拓展到深层部位 (丘脑) 神经元, 结果提示, 在整体情况下, 神经元的活动特点不同于以功能单元 (single-unit) 胞外记录结果. 无论是自发的动作电位 (AP) 还是诱发的 AP, 其频率均很低, 与胞外记录的结果相差数十倍, 这些结果体现了在体研究的重要性.

总之, 整体动物实验反映的生理活动是体内各种生命过程的综合表现. 不仅视觉听觉触觉等必须应用整体动物模型, 其他基本的神经生理活动的本质也将随着高新技术的出现, 以无损伤非侵入式的方式, 在整体动物模型上得到证明. 因此, 应用在体膜片钳技术将会成为必然的选择. 虽然 TPTP 技术的研究应用还处于起步阶段, 但最终是为了实现对神经元显微结构和功能的实时定量研究. 相信随着科学技术的全面发展, 在体膜片钳技术所面临的困难将一一解决, 最终应用于生理学和生物物理学研究实践中.

参 考 文 献

- 1 Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature*, 1976, **260** (5554): 779 ~ 802
- 2 Pei X, Volgushev M, Vidyasagar T R, *et al.* Whole cell recording and conductance measurements in cat visual cortex *in vivo*. *Neuroreport*, 1991, **2** (8): 485 ~ 488
- 3 Volgushev M, Pei X, Vidyasagar T R, *et al.* Excitation and inhibition in orientation selectivity of cat visual cortex neurons revealed by whole-cell recordings *in vivo*. *Vis Neurosci*, 1993, **10**

- (6): 1151 ~ 1155
- 4 Pei X, Vidyasagar T R, Volgushev M, *et al.* Receptive field analysis and orientation selectivity of postsynaptic potentials of simple cells in cat visual cortex. *J Neurosci*, 1994, **14** (11 Pt 2): 7130 ~ 7140
- 5 Light A R, Willcockson H H. Spinal laminae I - II neurons in rat recorded *in vivo* in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol*, 1999, **82** (6): 3316 ~ 3326
- 6 Furue H, Narikawa K, Kumamoto E, *et al.* Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurones to mechanical but not thermal stimuli revealed by *in vivo* patch-clamp recording. *J Physiol*, 1999, **521** (2): 529 ~ 535
- 7 李祥瑞, 周逸峰. 活体动物全细胞记录技术及其应用. *生物物理学报*, 2002, **18** (3): 287 ~ 292
- 8 Li X R, Zhou Y F. *Acta Biophys Sin*, 2002, **18** (3): 287 ~ 292
- 9 Zhu Z, Wang Y, Xu X Z, *et al.* A simple and effective method for obtaining stable *in vivo* whole-cell recordings from visual cortical neurons. *Cereb Cortex*, 2002, **12** (6): 585 ~ 589
- 9 刘振伟, 杨 胜, 张永祥. 麻醉大鼠在体膜片钳全细胞记录技术初探. *中国应用生理学杂志*, 2003, **19** (3): 277 ~ 285
- 9 Liu Z W, Yang S, Zhang Y X. *Chin J Appl Physiol*, 2003, **19** (3): 277 ~ 285
- 10 Margrie T W, Brecht M, Sakmann B. *In vivo*, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Arch*, 2002, **444** (4): 491 ~ 498
- 11 Trachtenberg J T, Chen B E, Knott G W, *et al.* Long-term *in vivo* imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 2002, **420** (6917): 788 ~ 794
- 12 Grutzendler J, Kasthuri N, Gan W B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 2002, **420** (6917): 812 ~ 816
- 13 康华光. 膜片钳技术及其应用. 北京: 科学出版社, 2002. 167 ~ 170
- Kang H G. *Patch Clamp Technique and Its Appliance*. Beijing: Science Press, 2002. 167 ~ 170
- 14 汪 洁, 梁瑞生, 唐志列, 等. 双光子技术在生物医学中的应用与研究进展. *中国医学物理学杂志*, 2002, **19** (3): 148 ~ 150
- 14 Wang J, Liang R S, Kang Z L, *et al.* *Chin J Med Physic*, 2002, **19** (3): 148 ~ 150
- 15 Margrie T W, Meyer A H, Caputi A, *et al.* Targeted whole-cell recordings in the mammalian brain *in vivo*. *Neuron*, 2003, **39** (6): 911 ~ 918

New Advance in *In vivo* Patch Clamp Technique*

YANG Sheng, ZHOU Wen-Xia**, ZHANG Yong-Xiang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract The process of *in vivo* patch clamp is to recoding electrophysiological signal of neurons *in vivo* by whole cell techniques, which is useful approach in physical and pharmacological research. A blind patch-clamp technique in the intact brain is usually adopted. Now a new visual method are reported and termed as two-photon targeted patching, which uses two-photon imaging to guide *in vivo* whole-cell recordings to individual, genetically labeled cortical neurons, so that subset of neurons are specially focused. Here both two methods were simply reviewed.

Key words patch clamp, *in vivo*, two-photon laser scanning microscope

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30171153).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931625, Fax: 86-10-68211656, E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn

Received: April 14, 2004 Accepted: May 30, 2004