

# 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

贺秉军<sup>1</sup>, 刘安西<sup>1</sup>, 陈家童<sup>2</sup>, 孙金生<sup>1</sup>, 芮昌辉<sup>3</sup>, 孟香清<sup>3</sup>

(1. 南开大学生物系, 天津 300071; 2. 南开大学生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071;  
3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

**摘要:** 探索了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫神经细胞的急性分离与体外培养的条件, 并利用全细胞膜片钳技术首次对棉铃虫幼虫急性分离神经细胞的电压门控性钠、钾和钙通道的基本电生理学特性进行了研究。结果表明, 棉铃虫幼虫中枢神经细胞在 TC-100、L-15 和 Grace 培养基中均可贴壁生长, 在 DMEM 培养基中基本不能存活。在 TC-100 培养基分别与其它三种培养基按一定比例混合形成的培养液中, TC-100 与 L-15 等量混合培养液更适合于神经细胞的生长。全细胞电压钳条件下, 可分别记录到电压门控性钠、钾和钙通道电流。钙电流特征为高电压激活、缓慢失活; 钠电流对河豚毒素敏感; 钾电流可被细胞外液中的氯化四乙胺和 4-氨基吡啶抑制。

**关键词:** 棉铃虫; 神经细胞; 离子通道; 细胞培养

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2001) 04-0422-06

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 为世界性农业害虫, 目前已对多种农药产生抗性。神经敏感性降低是其对神经毒性杀虫剂产生抗性的重要机制之一。神经敏感性与钠通道功能密切相关。但迄今为止, 不仅未见到棉铃虫神经细胞离体培养的报道, 对于该种昆虫神经细胞膜电压门控性离子通道的基本电生理学特性以及杀虫剂是如何影响钠通道, 从而引起该种昆虫神经敏感性降低这一关键问题, 在细胞及分子水平上更无直接证据。这无疑不利于抗性机理本质的阐明以及对症药剂的筛选和该种害虫的有效治理。同时, 常规细胞培养方法程序烦琐, 费时费力。基于这些情况, 我们对棉铃虫幼虫中枢神经细胞的急性分离与培养条件进行了探索, 并利用全细胞膜片钳技术检测了急性分离神经细胞所表达的电压门控性离子通道, 以期为进一步研究棉铃虫神经细胞离子通道的药理学特性奠定基础, 从而对棉铃虫抗性机理研究和抗性治理有所裨益。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试虫

棉铃虫初始种群于 1992 年 8 月采自河北保定棉田, 并在室内连续饲养。试虫为棉铃虫 3 龄幼虫。由中国农业科学院植物保护研究所提供。

## 1.2 神经细胞分离培养用液

培养基: TC-100 (Gibico), L-15 (Sigma), Grace (1962) (Gibico), DMEM (Gibico), 或 TC-100 分别与 L-15、Grace 和 DMEM 按 4:1、3:1、2:1 或 1:1 的设定比例混合。培养基增补 10% 胎牛血清, 100 mmol/L 葡萄糖, 0.6 mmol/L 谷氨酰胺, 0.3 mg/mL 谷胱苷肽, 80 U/mL 庆大霉素, pH 6.6。

生理溶液 (mmol/L): NaCl 90, KCl 6, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, Hepes 10, 葡萄糖 140, pH 6.6 (据 Lee<sup>[1]</sup>、Bindokas<sup>[2]</sup>等改进而成)。

消化酶液 (mmol/L): NaCl 90, KCl 6, Hepes 10, 葡萄糖 25, D-甘露醇 115, 胰蛋白酶 (Sigma) 0.3%, 胶原酶 (IV型, Sigma) 0.15%, pH 6.6 (据 Lee<sup>[1]</sup>改进而成)。

培养液、生理溶液及离散神经细胞的消化酶液配好后均在无菌条件下过滤除菌, 并分装于 5 mL 玻璃小瓶备用。

## 1.3 神经细胞的急性分离与培养

棉铃虫幼虫的解剖、神经细胞的分离及培养均可在简单消毒环境下进行 (解剖器具用酒精灯消毒)。具体操作是: 棉铃虫幼虫饥饿 24 h 左右, 75% 乙醇体表消毒 3~5 min, 生理盐水漂洗 3 次。小心剔除消化道, 分离出腹神经索, 并用生理盐水漂洗 2 次, 在消化酶液中孵育 5~10 min 后去除神经鞘, 继续振动消化 25~35 min。然后用培养液终止酶液作用, 用口径 100  $\mu\text{m}$  的玻璃吸管轻轻吹打组织离散细胞, 将细胞悬液滴加于预先加有 1.5~2 mL 培养液的 35 mm 培养皿中, (27  $\pm$  1) $^{\circ}\text{C}$  静置培养。

## 1.4 电信号记录

用高阻封接全细胞膜片钳技术<sup>[3]</sup>记录电信号。信号由膜片钳放大器 (PC-IIB, 华中理工大学) 输出至计算机。低通 Bessel 滤波为 5 kHz。刺激脉冲序列的给出及数据采入均通过 IBB Clamp 软件包和 DAQ-2B 数据采集接口装置一起构成的 IBB Digitizer 数字化系统完成。电极电阻 3~5 M $\Omega$ 。

记录钠电流 ( $I_{\text{Na}}$ ) 的细胞外液为 (mmol/L): NaCl 100, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, Hepes 10, 葡萄糖 10, 氯化四乙胺 (tetraethylammonium chloride, TEA-Cl) 20, 用 NaOH 调至 pH 6.6 (据 Lee<sup>[1]</sup>、Bindokas<sup>[2]</sup>改进而成)。电极内液为 (mmol/L): CsF 100, CsCl 40, MgCl<sub>2</sub> 3, EGTA 10, Hepes 5, CsOH 调至 pH 6.6 (据 Lee<sup>[1]</sup>改进而成)。

记录钾电流 ( $I_{\text{K}}$ ) 的外液与  $I_{\text{Na}}$  的基本相同, 仅将 TEA-Cl 以 1  $\mu\text{mol/L}$  河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 替代。电极内液为 (mmol/L): KF 140, EGTA 10, Hepes 10, 用 KOH 调至 pH 6.6 (据 Christensen<sup>[4]</sup>改进而成)。

记录钙电流 ( $I_{\text{Ca}}$ ) 的细胞外液为 (mmol/L): NaCl 100, CsCl 4, CaCl<sub>2</sub> 5, MgCl<sub>2</sub> 2, Hepes 10, 葡萄糖 10, TEA-Cl 20, TTX 1  $\mu\text{mol/L}$ 。电极内液为 (mmol/L): CsCl 90, MgCl<sub>2</sub> 3, Na<sub>2</sub>-ATP 2, EGTA 10, Hepes 10, 内外液均用 CsOH 调至 pH 6.6 (据 Christensen<sup>[4]</sup>改进而成)。

# 2 结果

## 2.1 神经细胞的分离培养

酶解分散后的神经元大都呈圆形, 相差显微镜下胞体明亮, 少数细胞带有 1 条近端突起。

细胞大小悬殊,有不到  $10\ \mu\text{m}$  但仍有较长突起的小细胞,也有  $30\ \mu\text{m}$  以上的大细胞。无论大小,多数神经元在接种 2 h 内贴壁。4~6 h 后部分 (70%) 神经元胞体变形,并长出 1 条或多条长短、粗细、形状不一的突起,且多数 (90%) 细胞突起上出现周期性膨大,有的细胞突起末端以锥体 (cones) 样小节终结 (图 1: 1~5)。

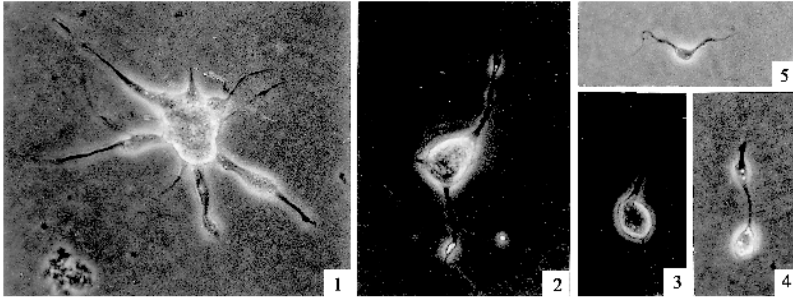


图 1 棉铃虫幼虫神经细胞具有 1、2 或多条突起 (396 $\times$ )

Fig. 1 Neurons isolated from *H. armigera* larvae with unipolar, bipolar or multipolar processes (396 $\times$ )

神经细胞在 TC-100、L-15 及 Grace 培养液中均可贴壁生长,在 DMEM 中基本不能存活。在 TC-100 分别与 L-15、Grace 及 DMEM 按一定比例混合形成的培养液中,TC-100 与 L-15 等体积混合培养液更适合于神经细胞的生长。生长状况比单一使用一种或其它配比培养液明显改善。主要表现为存活和贴壁细胞数量增加,贴壁所需时间缩短 (50 min 即可贴壁)。下面电生理实验数据均来自在 TC-100 与 L-15 等体积混合形成的培养液中培养 4~6 h,大小为  $18\sim 22\ \mu\text{m}$  的细胞。此时细胞基本定型,也极易形成高阻封接。

## 2.2 中枢神经元表达的电压门控性通道

电压门控性通道根据其对离子的选择通透性,主要有钠通道、钾通道和钙通道三种。在分离每种通道电流时,用特异性的工具药将另外一种或两种通道电流阻断。

**2.2.1 钠电流:** 得到全细胞记录构型后,置维持电压于  $-70\ \text{mV}$ , 给予脉冲宽度为 60 ms, 刺激脉冲序列从  $-60$  到  $80$ , 以  $10\ \text{mV}$  步幅递增的去极化电压刺激,可记录到一系列快速激活与失活的电流 (图 2: A)。由于胞外液中加入 TEA-Cl, 电极液中有高浓度 CsF, 钾电流可被 TEA-Cl 及高浓度 Cs<sup>+</sup> 所阻断, 钙电流已被高浓度 F 所灭活。此时向外液中加入 TTX, 该电流被取消, 证实其为 TTX 敏感的钠电流。从电流-电压关系曲线可知钠电流在  $-40\ \text{mV}$  左右激活,  $-20\ \text{mV}$  左右达峰值 (图 2: B)。

**2.2.2 钾电流:** 将膜电位维持在  $-70\ \text{mV}$ , 给予一系列以  $10\ \text{mV}$  步幅递增的去极化刺激, 可得到一系列缓慢激活、几乎没有失活的电流, 即延迟整流钾电流 (delayed rectifier potassium current,  $I_K$ ) (图 3: A), 该电流对 TEA-Cl 敏感。在部分细胞中可记录到快速激活与失活及对 4-氨基吡啶 (4-aminopyridine, 4-AP) 敏感的瞬时钾电流 (rapid outward potassium current,  $I_A$ <sup>[5]</sup>) (图 3: B)。大多数 (80%) 细胞中可同时记录到这两种电流 (图 3: C)。

**2.2.3 钙电流:** 将膜电位分别钳制在  $-70\ \text{mV}$  和  $-40\ \text{mV}$ , 给予一系列以  $10\ \text{mV}$  步幅递增的去极化刺激。记录到的钙电流特征为高电压激活, 缓慢失活。不同膜电位 ( $-70\ \text{mV}$  和  $-40\ \text{mV}$ ) 测得的钙电流在初始峰值和持续内向电流的高度上没有明显差别, 钙通道电流在

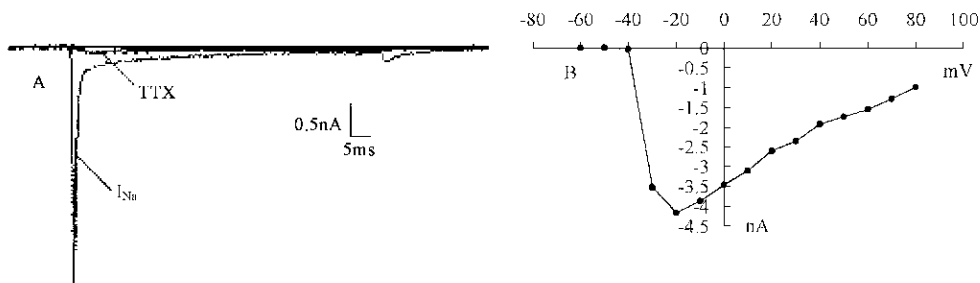


图 2 TTX 敏感钠通道电流 (A) 及其电流-电压关系曲线 (B)

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

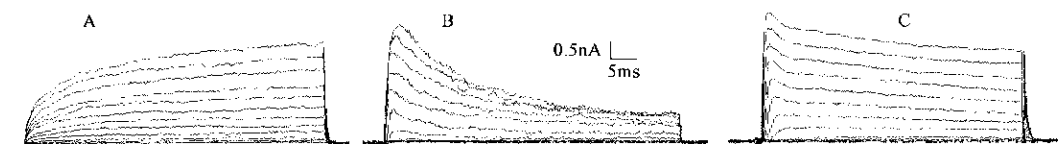


图 3 钾通道电流

Fig. 3 Potassium channel currents

A: 延迟整流钾电流 ( $I_k$ ); B: 瞬时钾电流 ( $I_A$ );

C: 同一神经细胞可同时记录到两种钾电流 ( $I_k$  and  $I_A$  recorded from the same cell)

-40 mV 左右激活, 10 mV 左右达峰值 (图 4)。由于低电压激活、快速失活的 T 型钙通道电流一般在膜电位为 -60 mV 时激活, -40 mV 时失活<sup>[6,7]</sup>, 因此这一结果表明棉铃虫中枢神经细胞主要表达高电压激活、缓慢失活的钙通道。

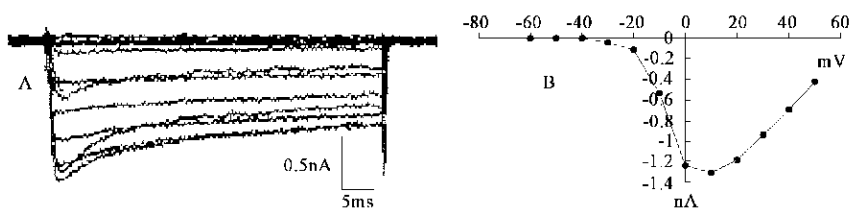


图 4 高电压激活钙通道电流 (A) 及其电流-电压关系曲线 (B)

Fig. 4 A series of high-voltage activated Ca currents (A) and the corresponding current-voltage curve (B)

### 3 讨论

膜片钳实验直接以细胞膜上的离子通道为研究对象。因此, 细胞是否易与玻璃微电极形成稳定的高阻封接是膜片钳实验能否成功的关键。我们通过对棉铃虫幼虫急性分离中枢神经细胞离体生长培养基条件的探索, 发现 TC-100 等培养基也支持神经细胞的生长, 但 TC-100 与 L-15 等量混合培养液更适合离体神经细胞的贴壁与存活, 电生理记录时也极易形成高阻封接。

这说明 TC-100 与 L-15 培养基在某些成分上具有互补作用。虽然急性分离方法存在培养基染菌现象, 但将培养基和生理液等在无菌条件下少量分装后, 每个包装只用一次, 可得到完全符合需要的细胞标本。同时这种方法也简单、省时。

钠、钾及钙等电压门控性离子通道是神经元和其它可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。昆虫神经细胞膜离子通道是多种天然毒素及合成杀虫剂的作用靶标。由于杀虫剂滥用, 导致神经敏感性降低成为害虫抗药性的重要机制之一。膜离子通道与神经敏感性密切相关。利用膜片钳技术可直接检测神经敏感程度, 分析药物或杀虫剂对神经细胞膜离子通道的作用, 从而阐明害虫抗药性机理。但有文献<sup>[8-10]</sup>报道, 节肢动物, 尤其是昆虫中枢神经系统的神经细胞是非兴奋性的, 仅在特定条件下膜离子通道才被激活, 细胞表现出兴奋性。Amar 等<sup>[11]</sup>利用全细胞及单通道膜片钳技术对体外培养的蜚蠊 *Periplaneta americana* 胚胎神经细胞进行研究, 发现神经元静息电位较低, 具电不敏感性。无药剂存在时, 电压钳条件下, 去极化步进电压不能诱发任何内向电流, 改变指令电压或给以长时程超极化脉冲也不能诱发钠电流。由于目前未见到棉铃虫神经细胞离体培养的报道, 因此体外生长的棉铃虫幼虫神经细胞是否也存在类似情况, 是否适合于膜片钳实验研究, 表达哪些电压敏感性离子通道以及哪些离子通道与杀虫剂直接起作用, 从而引起害虫抗性等均是未知数。我们的研究表明, 离体培养的棉铃虫幼虫神经细胞与玻璃微电极间极易形成高阻封接, 可持续稳定记录 100 min, 适合用于膜片钳实验研究。全细胞电压钳条件下, 不经药物刺激, 即可记录到较大的内向钠电流、钙电流和外向钾电流, 神经细胞不仅表达延迟整流钾通道和瞬时钾通道, 同时还表达 TTX 敏感的钠通道与高电压激活的钙通道。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] 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
- [2] Bindokas V P, Adams M E. Hemolymph composition of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, 90A (1): 151 ~ 155
- [3] Hamill O F, Marty A, Neher E *et al.* Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 1981, 391: 85 ~ 100
- [4] Christensen B N. Ionic currents in neurones cultured from embryonic cockroach (*Periplaneta americana*) brains. *J. Exp. Biol.*, 1988, 135: 193 ~ 214
- [5] Connor J, Stevens C F. Voltage clamp studies of a transient outward current in gastropod neural somata. *J. Physiol. Lond.*, 1971, 286: 41 ~ 60
- [6] Narahashi T, Tsunoo A, Yoshii M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.*, 1987, 383: 231 ~ 249
- [7] 潘胜军, 周兆年. 急性低氧对豚鼠心室肌细胞 L 型钙通道的影响. *生理学报*, 1995, 47 (5): 435 ~ 440
- [8] Hoyle G. Cellular mechanisms underlying behavior: neuroethology. *Adv. Insect Physiol.*, 1970, 7: 349 ~ 444
- [9] Pichon Y, Ashcroft F M. Nerve and muscle: electrical activity. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. V. Oxford: Pergamon Press, 1985. 85 ~ 113
- [10] Gündel J, Wicher C, Tennigkeit 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

- [11] Amar M, Pichon Y. Patch-clamp analysis of the effects of the insecticide deltamethrin on insect neurones. *J. Exp. Biol.*, 1992, 163: 65 ~ 84

## Acute isolation and culture of nerve cell from the cotton bollworm and the patch-clamp study on the voltage-gated ion channels in the cultured neurons

HE Bing-jun<sup>1</sup>, LIU An-xi<sup>1</sup>, CHEN Jia-tong<sup>2</sup>, SUN Jin-sheng<sup>1</sup>, RUI Chang-hui<sup>3</sup>, MENG Xiang-qing<sup>3</sup>

(1. Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Bioactive Materials Key Laboratory of Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China;

3. Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The dissociation and culture of cells isolated from the ventral nerve cord of the larva of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* are described. The properties of the voltage-gated ion channels of the cultured neurons were studied with patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Neurons survived and grew fast in either TC-100, Leibovitz's L-15 or Grace medium supplemented with glutathione, glutamine, glucose and 10% foetal calf serum. The medium made up of equal parts of TC-100 and Leibovitz's L-15 enabled better adherence, survival and growth. Most neurons showed neurite growth exhibiting unipolar, bipolar or multipolar. Neural cell bodies readily formed seals with patch pipettes, allowing stable, whole-cell patch-clamp recordings. Depolarization of the cell under voltage-clamp resulted in TTX-sensitive sodium currents, high-voltage activated calcium currents and two types of outward potassium currents. The potassium currents could be decreased by TEA-Cl and 4-AP.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; nerve cell; ion channel; cell culture