文章编号:1000-5404(2006)02-0147-04

论著

听皮层-内侧膝状体突触传递的长时程增强及其突触前机制的研究

赵明亮[1],刘国龙[1],万子兵[1],隋建峰[1],阮怀珍[2],熊 鹰[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室,[2]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 研究大鼠听皮层(AC)-内侧膝状体(MGB)突触传递的长时程增强(long-term potentiation, LTP)及其突触前机制。**方法** 刺激听辐射纤维,采用脑片膜片钳全细胞技术在MGB分离和记录兴奋性突触后电流(EPSCs);诱导LTP,并观察谷氨酸受体阻断剂对LTP的影响;采用配对脉冲实验对LTP的发生机制进行探讨。**结果** ①AC-MGB突触的兴奋性传递主要由NMDA和AMAP/kainate受体介导,可在MGB成功诱导出LTP;②应用AP-5或KYN阻断突触后神经元的去极化后仍然可在MGB成功诱导出LTP;但用无Ca^{2+}的ACSF替代正常ACSF后,在MGB难以诱导出LTP。③AC-MGB突触传递的LTP伴随着配对脉冲比率(paired-pulse ratio, PPR)的下降。**结论** AC-MGB突触传递存在LTP机制,其诱导过程不依赖于突触后NMDA受体,但依赖于细胞外Ca^{2+}的浓度;LTP的发生与突触前兴奋性神经递质释放概率增加有关。

关键词: 内侧膝状体;听皮层;长时程增强;膜片钳
中图法分类号: R338.13;R338.3 **文献标识码**: A

Presynaptic long-term potentiation of synaptic transmission in the pathway from auditory cortex to medial geniculate body

ZHAO Ming-liang[1], LIU Guo-long[1], WAN Zi-bing[1], SUI Jian-feng[1], RUAN Huai-zhen[2], XIONG Ying[1] ([1] Department of Physiology, [2] Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission in the cortico-thalamic pathway to medial geniculate body (MGB) and the mechanism underlying this synaptic potentiation. **Methods** After stimulating auditory thalamic radiation, excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were recorded at MGB neurons using whole-cell patch clamp technique in AC-MGB slices. A brief 10 Hz conditioning stimulation was used to study whether LTP of synaptic transmission could be induced in MGB neurons. If there was LTP, its mechanism was further explored with paired-pulse test and by observing the effect of glutaminic acid receptors antagonist on it. **Results** ①Synaptic transmission from AC to MGB was predominantly mediated by ionotropic glutamate receptors and the LTP could be induced. ②After application AP-5 or KYN to block depolarization in the postsynaptic cells, conditioning stimulation still induced LTP. However, LTP could not be induced if using free-Ca^{2+} ACSF while giving conditioning stimulation. ③The induction of AC-MGB LTP was concomitantly with a decrease in paired-pulse ratio (PPR) of EPSCs. **Conclusion** Activation of ionotropic glutamate receptors and depolarization of postsynaptic cell are not required for the induction of this form of LTP while extracellular Ca^{2+} is indispensable. The induction of AC-MGB LTP maybe caused by an increase in the neurotransmitter release probability and should be presynaptic.

Key words: medial geniculate body; auditory cortex; long-term potentiation; patch clamp

听皮层发出纤维直接或间接投射到皮层下听觉核团和耳蜗,与上行传入纤维构成多重反馈环路。若没有下行纤维对皮层下听觉核团生理功能的调控,听觉系统不可能准确地对声音进行正常的接收和处理[1]。在听觉下行传出系统中,由听皮层(auditory cortex, AC)到听觉丘脑内侧膝状体(medial geniculate body, MGB)的传导通路是最大的一支。MGB最主要的传入来自AC;AC-MGB纤维的数量比MGB-AC纤维的数目

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371532)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30371532)
作者简介:赵明亮(1976-),男,河南省洛阳市人,博士研究生,主要从事听觉电生理等方面的研究。电话:(023)68752254
通讯作者:熊 鹰,电话:(023)68752227,E-mail: xiongying2001@163.com
收稿日期:2005-08-30;修回日期:2005-11-05

高一个数量级[1]。离皮层纤维下行到达 MGB 并与 MGB 神经元的远端树突形成突触联系,听觉离皮层活动对 MGB 的主要作用是在信息由外周到皮层的传递中起闸门或增益控制[2]。另外,AC-MGB 下行通路参与皮层-丘脑-皮层环路通讯的建立和丘脑-皮层间振荡活动的产生[3]。已有研究证实 MGB 到 AC 的上行突触传递存在 LTP[4],但在 AC-MGB 下行通路联系中是否也存在 LTP 机制少见报道,本研究采用脑片膜片钳全细胞技术,对此进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠(第三军医大学实验动物中心)21 只,出生后 14~20 d,雌雄不拘。

1.2 主要试剂及仪器

甲磺酸铯(cesium methanesulfonate)、EGTA、Hepes、ATP、GTP、QX-314、D,L-2-氨基-5 磷酸基戊酸(D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid, AP-5)、氰基-2-硝基喹啉-2,3-二酮(6-cyano-2- nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX)、荷包牡丹碱(bicuculline methiodide, BMI)、犬尿烯酸(kynurenic acid, KYN)购于美国 Sigma 公司。膜片钳放大器(Axopatch 200B)和 A/D 转换器(1322A)为美国 Axon 公司产品,微操纵器(MC1000e)为美国 Instruments 公司产品,刺激器 Master 8 为美国 AMPI 公司产品,振动切片机为美国 MA752 型,电极水平拉制仪(P-97 型)和玻璃微电极购于美国 Sutter 公司。

1.3 MGB 脑片制备及膜片钳全细胞记录

动物经乙醚麻醉后断头,迅速取脑并置于冰冷的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中。ACSF 中各种离子成分及其浓度(mmol/L)为:NaCl 124、KCl 3、NaH_2PO_4 1.25、$CaCl_2$ 2(无 Ca^{2+} ACSF 中 $CaCl_2$ 被等摩尔浓度的 $MgCl_2$ 替代)、$MgSO_4$ 1.3、$NaHCO_3$ 26、葡萄糖 10,ACSF 中持续通以 95% O_2 和 5% CO_2,pH 值为 7.2~7.4。在振动切片机上作水平脑切片,片厚为 500 μm,包括 MGB 和听辐射纤维[5],脑片移入 ACSF 中,室温(20~25 ℃)孵育 1~2 h 备用。电极内液成分及其浓度(mmol/L)为:cesium methanesulfonate 120、$MgCl_2$ 2、Hepes 10、EGTA 0.5、ATP 2、GTP 0.3、QX-314 2(用氢氧化铯调定 pH 值为 7.1~7.2)。玻璃记录电极尖端直径约 1~2 μm,充灌上述电极内液后阻抗为 4~8 MΩ。

取一备用的脑片,放入脑片浴槽中进行全细胞记录,灌流的 ACSF 中常规加入 10 μmol/L BMI 以阻断 $GABA_A$ 受体介导的突触后电流。在体视显微镜下,MGB 位于海马内侧,可以很容易地被分辨出来(图 1)。记录电极插入 MGB 后,利用特定的测试方波脉冲以"盲法"寻找细胞,负压吸附形成高阻封接,再给予负压吸引,打破电极尖端内的细胞膜,获得 MGB 脑片全细胞模式。选择电压钳模式,并将膜电位钳制在 -70 mV。

1.4 刺激的施加和数据采集

双极钨丝刺激电极置于听辐射纤维,距离记录部位约 500 μm(图 1)。刺激为时程 100 μs 的方波,强度为能引起最大 EPSCs 刺激强度的 20%~30%。测试刺激频率为 0.05 Hz;诱导 LTP 的条件刺激频率为 10 Hz,6 串×100 个脉冲/每串,串间隔为 10 s,给予条件刺激时将电位钳制在 -30 mV;配对刺激为前后给予的,时间间隔为 50 ms 的两个方波刺激[6]。

细胞反应由膜片钳放大器放大后通过 A/D 转换器转换为数字化数据,低通滤波频率为 5 kHz,采样频率为 10 kHz,应用 Axon 公司的 pClamp9.0 软件中的 Clampex 模块进行数据采集。持续观察过程中输入阻抗和串联电阻变化超过 20% 或输入阻抗大于 30 MΩ 时,数据摒弃不用。

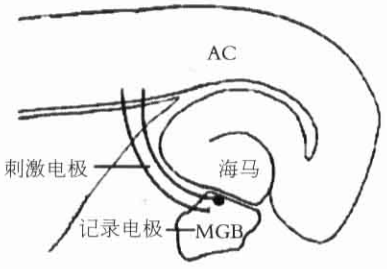


图 1 AC-MGB 脑片 刺激电极置于近 MGB 的听辐射

1.5 给药方法

采用浸润式灌流给药,离子通道阻断剂配制成母液 -20 ℃备用,使用时用 ACSF 稀释至终浓度:BMI (10 μmol/L)、AP-5 (50 μmol/L)、CNQX (20 μmol/L)、KYN(5 mmol/L)。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 Clampfit9.0,Excel2003,SPSS 10.0 行方差分析。

2 结果

2.1 谷氨酸受体阻断剂对 AC-MGB 突触传递的影响

在 11 例脑片上,灌流液中常规加入了 $GABA_A$ 受体拮抗剂 BMI,同时采用含铯和 QX-314 的电极内液阻断 $GABA_B$ 受体介导的作用,在此基础上刺激听辐射纤维,均可在 MGB 神经元记录到兴奋性突触后电流(excitatory postsynaptic currents, EPSCs)。当膜电位被钳制在 -70 mV 时,该电流是内向的,加入 AMAP/kainate 受体拮抗剂 CNQX 后,EPSCs 的幅度显著下降,进一步加入 NMDA 受体阻断剂 AP-5 后,EPSCs 几乎完全消失(图 2)。

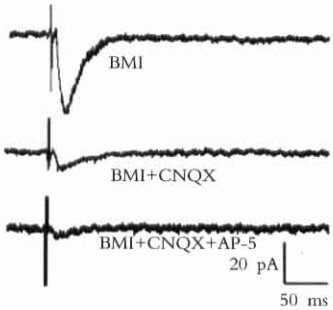
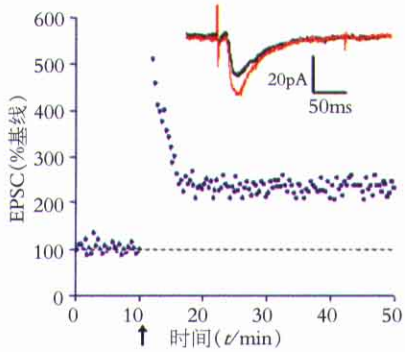


图 2 谷氨酸受体阻断剂对大鼠 AC-MGB 突触 EPSCs 的影响 (膜电位 = -70 mV)

2.2　AC-MGB 突触可诱导产生 LTP

条件刺激结束后，给予相同强度的测试刺激，每隔 20 s 记录 1 次 EPSCs 波形并计算其幅度变化。持续观察并记录，如果 EPSCs 幅度始终大于条件刺激前 EPSCs 幅度的 30 %，且持续时间超过 30 min，则视为 LTP 诱导成功[7]。

在 8 例脑片上对大鼠 AC-MGB 突触进行 LTP 诱导实验，其中有 6 例诱出 LTP，诱出率为 75%。一般在条件刺激结束后即可见到 EPSCs 幅度增大数倍，在随后数分钟内衰减到一个稳定的范围，条件刺激结束 30 min 后，平均 EPSCs 幅度为（230 ± 12）%，显著高于基础水平（$P<0.05$，图 3）。



10 Hz 条件刺激（箭头所示）使 EPSCs 的幅度显著增加，持续时间超过 30 min

图 3　AC-MGB 突触产生的 LTP

2.3　AC-MGB 突触 LTP 的诱导不需 NMDA 受体的激活和突触后神经元的去极化

在 ACSF 中加入 NMDA 拮抗剂 AP-5 后，同样强度的测试刺激下，EPSCs 的幅度显著下降，一般在给药后 3 min 之内，EPSCs 的幅度降低并维持在给药前的（77 ± 5）%。随后给予 10 Hz 条件刺激，刺激结束后立即灌流正常 ACSF 洗脱药物，并给测试刺激，记录观察 EPSCs 的变化。结果显示与条件刺激前未给药时的基础水平相比，EPSCs 显著增强，条件刺激结束 30 min 后，平均 EPSCs 幅度为基础水平的（216 ± 11）%（$n=5$，$P<0.05$，图 4A）。

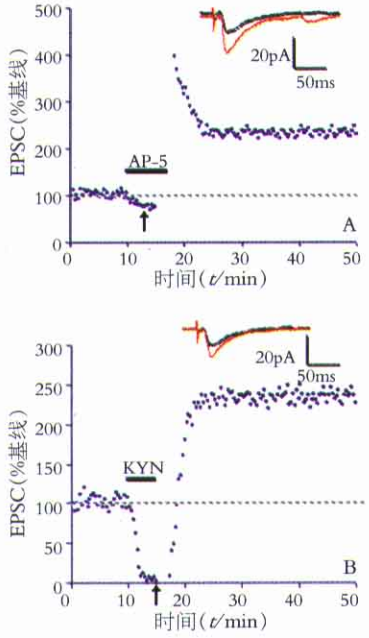
非选择性谷氨酸受体拮抗剂 KYN，能够迅速而近乎完全地阻断兴奋性突触传递活动。在 ACSF 中加入 KYN 2 ~ 3 min 后，EPSCs 几乎完全消失，这时，给予 10 Hz 条件刺激，刺激结束后洗脱药物，给测试刺激，结果发现 EPSCs 反应显著增强，条件刺激结束 30 min 后，平均 EPSC 幅度为（227 ± 15）%，显著高于条件刺激之前未给药时的基础水平（$n=4$，$P<0.05$，图 4B）。

2.4　AC-MGB 突触 LTP 的诱导依赖细胞外 Ca^{2+} 浓度

无 Ca^{2+} 的 ACSF 能够完全阻断突触传递。在 4 例实验中，给予条件刺激前，应用无 Ca^{2+} 的 ACSF 替代正常灌流液，结果均未诱导出 LTP，条件刺激结束 30 min 后，EPSCs 的幅度是基础值的（102 ± 8）%，没有显著性差异（$n=4$，$P>0.05$）。

2.5　AC-MGB 突触 LTP 对配对脉冲比率的影响

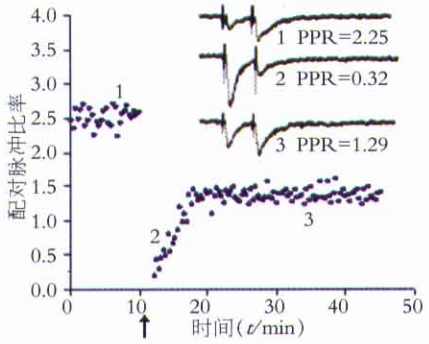
给间隔为 50 ms 的配对刺激，记录前后 2 次 EPSCs，其幅度分别为 EPSC1、EPSC2。配对脉冲比率（paired-pulse ratio，PPR）以 EPSC2/ EPSC1 表示，PPR 值大于 1 为配对脉冲易化（paired-pulse facilitation，PPF），反之为配对脉冲抑制（paired-pulse depression，PPD）。在 29 例试验中，在正常情况下给突触前纤维以配对刺激，有 25 例在 MGB 记录到 PPF，PPR 为（2.53 ± 0.49）。



预先给予 AP-5（A）或者 KYN（B）后再给予 10 Hz 条件刺激（箭头所示），仍能诱导 LTP 产生

图 4　NMDA 受体阻断剂对 AC-MGB 突触诱导产生的 LTP 的影响

在成功诱导出 LTP 的 6 例实验中，条件刺激结束后 EPSCs 幅度显著增加，但 PPR 却显著下降，甚至在刺激后数分钟内表现为 PPD。条件刺激 30 min 后，尽管表现为 PPF，但是 PPR 为 1.36 ± 0.26，显著低于条件刺激之前（$P<0.05$，图 5）。



1、2、3 分别为 10 Hz 条件刺激（箭头所示）前以及条件刺激后 1 min 和 30 min 时记录到的对配对脉冲刺激的反应

图 5　AC-MGB 突触诱导产生的 LTP 对配对脉冲比率的影响

3　讨论

我们的前期工作已成功建立了听觉丘脑脑片全细胞膜片钳记录技术[8]，本研究则在此基础上刺激听辐射内的离皮层纤维，记录 MGB 的突触后电流。AC 向 MGB 的纤维投射包括兴奋性和抑制性两种成分，为了避免结果受 GABA－IPSCs 的干扰和易化 LTP 的诱导，

我们选用了含铯和 QX-314 的电极内液，并在灌流液中常规加入了 $GABA_A$受体拮抗剂 BMI。在此基础上。当膜电位被钳制在 -70 mV 时，刺激听辐射纤维，可以在 MGB 记录到内向的 EPSCs，AMAP/kainate 受体阻断剂 CNQX 能使 EPSCs 的幅度显著降低，继续加入 NMDA 受体拮抗剂 AP-5 后 EPSCs 几乎完全消失。

本研究首次证实，给 AC-MGB 离皮层纤维 10 Hz 的条件刺激可以成功地在 MGB 诱导出 LTP。LTP 的发生包括诱导和维持两个阶段，涉及突触前和突触后因素。在以往研究的 LTP 中，LTP 的发生大多是突触后机制，依赖于突触后膜 NMDA 受体的激活和突触后神经元的去极化，仅在少数突触联系中，如海马苔藓纤维传入、大鼠三叉神经核的初级传入突触，记录到以突触前机制为主的 LTP，后者涉及递质释放的持续增加，与突触前 Ca^{2+} 浓度升高有关[7,9]。本研究表明，在 AC-MGB 突触 LTP 的诱导阶段应用 AP-5 阻断 NMDA 受体或应用非选择性谷氨酸受体拮抗剂 KYN 阻断突触后神经元的去极化活动，均不能阻断 LTP 的诱导产生，提示 AC-MGB 突触 LTP 发生的部位不在突触后，而可能在突触前。但是，AC-MGB 突触 LTP 的诱导依赖于细胞外的 Ca^{2+} 浓度，提示突触前细胞外 Ca^{2+} 内流的增加在 LTP 的诱导中是必需的。我们进一步采用配对刺激实验对 LTP 的发生机制进行了探讨。配对刺激实验是最常用的判断突触前神经递质释放概率的方法，PPR 的大小可被用来估计突触前递质释放概率，较高的突触前递质释放概率，导致在第 1 次刺激后囊泡神经递质排空，第 2 次刺激时，细胞的反应降低，表现为较低 PPR，甚至表现为 PPD；反之，较低的释放概率常伴随较高的 PPR，表现为 PPF[6]。在本研究中记录到的 AC-MGB 突触在正常情况下均表现为 PPF 现象，这和文献[6]的报道是一致的，提示离皮层纤维与 MGB 神经元的突触联系具有较低的递质释放概率。我们对 LTP 诱导前后的 PPR 进行了比较，结果显示，LTP 成功诱导后，PPR 显著下降，PPF 减弱，甚至在条件刺激刚结束后的数分钟内表现为 PPD。这进一步提示：AC-MGB 突触 LTP 伴随突触前谷氨酸神经递质释放概率的增加，其诱导和产生部位在突触前。以往在离皮层纤维与杏仁核和腹侧基底丘脑的突触也发现了突触前 LTP 现象[10,11]。

听觉下行纤维对皮层下核团的反馈调控作用对于听觉信息的处理及听觉中枢的可塑性具有重要作用。在体研究表明，微刺激氯胺酮麻醉的大鼠的 AC，可在 MGB 诱导兴奋性突触传递的 LTP[12]。电刺激蝙蝠 AC 可以改变 MGB 神经元的最佳反应频率（best frequency，BF），使 BF 发生向心或离心的移动，增加或减弱听觉中枢系统中对声音信息的神经表达和分析处理，该作用可持续 180 min 以上，提示听觉离皮层调制参与了听觉联合式学习，这一作用可能涉及突触传递的长时程改变[13]。MGB 到 AC 的上行突触传递存在 LTP[14]，而本研究又提示 AC 到 MGB 的下行离皮层突触传递同样存在 LTP，AC 与 MGB 之间的这种双向 LTP 在听觉中枢的可塑性中可能具有重要的生物学意义。

参考文献：

[1] SUGA N, XIAO Z, MA X, *et al*. Plasticity and corticofugal modulation for hearing in adult animals[J]. Neuron, 2002, 36(1): 9-18.

[2] XIONG Y, YU Y Q, CHAN Y S, *et al*. Effects of cortical stimulation on auditory-responsive thalamic neurones in anaesthetized guinea pigs [J]. J Physiol, 2004, 560(Pt 1): 207-217.

[3] STERIADE M. Coherent oscillations and short-term plasticity in corticothalamic networks[J]. Trends Neurosci, 1999, 22(8): 337-345.

[4] KUDOH M, SHIBUKI K. Importance of polysynaptic inputs and horizontal connectivity in the generation of tetanus-induced long-term potentiation in the rat auditory cortex[J]. J Neurosci, 1997, 17(24): 9458-9465.

[5] CRUIKSHANK S J, ROSE H J, METHERATE R. Auditory thalamocortical synaptic transmission *in vitro*[J]. J Neurophysiol, 2002, 87(1): 361-384.

[6] BARTLETT E L, SMITH P H. Effects of paired-pulse and repetitive stimulation on neurons in the rat medial geniculate body[J]. Neuroscience, 2002, 113(4): 957-974.

[7] REID C A, DIXON D B, TAKAHASHI M, *et al*. Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses[J]. J Neurosci, 2004, 24(14): 3618-3626.

[8] 姚小红，熊 鹰. 大鼠出生后内侧膝状体腹侧部神经元电生理和形态学特性的发育变化[J]. 生理学报，2005，57(3)：333-339.

[9] Hamba M, Onodera K, Takahashi T. Long-term potentiation of primary afferent neurotransmission at trigeminal synapses of juvenile rats[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(3): 1128-1134.

[10] TSVETKOV E, CARLEZON W A, BENES F M, *et al*. Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala[J]. Neuron, 2002, 34(2): 289-300.

[11] CASTRO-ALAMANCOS M A, CALCAGNOTTO M E. Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses[J]. J Neurosci, 1999, 19(20): 9090-9097.

[12] SILKIS I G. Long-term changes, induced by microstimulation of the neocortex, in the efficiency of excitatory postsynaptic transmission in the thalamocortical networks[J]. Neurosci Behav Physiol, 1996, 26(4): 301-312.

[13] GAO E Q, SUGA N. Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: role of the corticofugal system[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(14): 8081-8086.

（编辑 薛国文）