论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0550-04

大鼠初级听皮层神经元对声刺激反应的膜电位特征

韩 磊[1],张永海[1],肖雄健[2],熊 鹰[2] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部:生理学教研室[1],神经生物学教研室,重庆市神经生物学重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 探讨大鼠初级听皮层单个神经元对声刺激反应的膜电位特征。**方法** 运用在体细胞内微电极记录技术观察麻醉大鼠初级听皮层单个神经元对声音刺激的细胞内反应,分析声音引发的各种兴奋性和抑制性反应的成分及其膜电位特征。**结果** 在大鼠初级听皮层共记录到64个神经元,声音刺激引起其中33个神经元产生兴奋性听觉反应,24个产生抑制性反应,2个产生"on-off"双相听觉反应,其余5个神经元对声音刺激反应不明显。根据声音诱发的兴奋性突触后电位(EPSP)/抑制性突触后电位(IPSP)以及动作电位(AP)的特点,兴奋性听觉反应可分为4型:长时程EPSP型、短时程EPSP型、规律放电型、阈下EPSP型;抑制性听觉反应也可分为4型:AP-IPSP型、EPSP-IPSP型、IPSP型、AP-超极化型。声音诱发的IPSP的潜伏期(46.3±20.5)ms和上升相时程(10.1±4.4)ms显著长于EPSP[分别为(15.1±4.7)、(6.1±3.5)ms,$P<0.05$,$P<0.01$]。且"on-off"双相听觉反应的放电间隔与声音时长高度一致。**结论** 大鼠初级听皮层神经元对相同自然声刺激可以产生多种类型的反应,且各型反应的成分和膜电位特征各异,这可能是初级听皮层神经元功能多样性的基础。

【关键词】 初级听皮层;在体;细胞内记录;声音刺激;听觉反应
【中图法分类号】 R338.25;R338.3;R338.8 【文献标志码】 A

Membrane potential characteristics of intracellular responses of rat primary auditory cortex neurons to acoustic stimulation *in vivo*

Han Lei[1], Zhang Yonghai[1], Xiao Xiongjian[2], Xiong Ying[2] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 Objective To investigate the membrane potential characteristics of intracellular responses of individual rat primary auditory cortex neurons to the acoustic stimulation *in vivo*. Methods The intracellular responses of individual primary auditory cortex neurons to the acoustic stimulation *in vivo* were observed in anesthetized rats using the intracellular microelectrode recording technique. Results Sixty-four neurons were recorded in the primary auditory cortex of rats, of which thirty-three responded to the acoustic stimulation with excitatory auditory responses, twenty-four with inhibitory auditory responses, two with on-off auditory responses, and the remaining five without obvious responses. According to the characteristics of sound-evoked excitatory postsynaptic potential (EPSP)/inhibitory postsynaptic potential (IPSP) as well as action potential (AP), the excitatory auditory responses could be classified into 4 patterns: long-term EPSP pattern, short-term EPSP pattern, regular spike pattern and subthreshold EPSP pattern; the inhibitory auditory responses could also be classified into 4 patterns: AP-IPSP pattern, EPSP-IPSP pattern, IPSP pattern and AP-hyperpolarization pattern. The latency [(46.3±20.5)ms] and rising phase duration [(10.1±4.4)ms] of sound-evoked IPSP were significantly longer than those [(15.1±4.7)ms, (6.1±3.5)ms] of EPSP ($P<0.05$, $P<0.01$). The spike intervals and sound durations of on-off auditory responses were in a phase-locking mode. Conclusion Different patterns of auditory responses can be induced in the primary auditory cortex neurons of rats by the same natural acoustic stimulation. Besides, the components and membrane potential characteristics of each pattern are various, which may lay a basis for the functional diversity of primary auditory cortex neurons.

【**Key words**】 primary auditory cortex; *in vivo*; intracellular recording; acoustic stimulation; auditory responses

【基金项目】 国家自然科学基金(30770681,30911120490);教育部回国人员启动基金(200920481);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5020)
【通信作者】 熊 鹰,电话:(023)68753494,E-mail:xiongying2001@163.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770681, 30911120490); the Starting Funds for the Returned Overseas Chinese Scholars of Ministry of Education(200920481) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2008BB5020). Corresponding author: Xiong Ying, Tel: 86-23-68753494, E-mail: xiongying2001@163.com

外界环境中的各种声音信息通过外周听觉器官的传导、转化,转换为神经电信号后经中枢听觉核团和传导通路主要汇入到初级听皮层(primary auditory cortex,A1),它在声刺激的感知、动物种属特异性音调的辨别、声源定位以及特殊声刺激的适应、学习和记忆等方面均具有主导作用[1]。研究已证实,A1 神经元发放动作电位(action potential,AP)的时相和频率是 A1 编码和处理各种时间和空间听觉信息的重要方式;而 AP 的产生则是众多阈下电生理事件,包括丘脑传入及皮层内部环路中不同强度、不同时序的兴奋性和抑制性输入相互作用和动态整合的结果[2]。因此,了解 A1 神经元对声音的兴奋性和抑制性反应的膜电位特征,对于探究在体情况下 AP 的产生机制,乃至揭示整个听皮层反映、编码、处理声音信息功能的机制具有非常重要的指导意义。然而,由于多种理论上和技术上的限制因素,目前对于单个 A1 神经元对自然声音刺激反应的膜电位特征的机制尚不明确。

先前对 A1 神经元电生理特征的在体研究多采用细胞外记录的方法,集中在单位放电水平观察 A1 的反应调谐曲线和音频构筑特征[3]或在场电位水平描述多个神经元对不同声音信息的反应总和[4],很难直接反映兴奋或抑制性突触活动如何影响单个神经元的电活动。在体细胞内记录技术则可以准确反映单个神经元在感觉刺激或行为活动影响下的神经元膜的被动特性和主动反应,从而分析其机能活动及其与行为和环境变化的内在联系,进而揭示其在相关神经环路中所起的作用。故本实验采用在体细胞内记录的方法,观察并分析声音刺激在 A1 诱发的各种兴奋性和抑制性反应的成分及其膜电位特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康雌性 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 55 只,体质量 230~250 g,由本校实验动物中心提供。入选标准:动物对耳边拍手表现出惊恐-躲避反应,表明其外周及中枢的听觉通路的传导功能正常。

1.2 手术操作

动物用乌拉坦(1.5 g/kg)腹腔注射麻醉,麻醉后行气管切开术,然后固定于隔音室(加拿大 Eckel 公司)的自制脑定位仪上。去除颅顶和右颞侧皮毛、肌肉,暴露前囟和颞骨。根据 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱,大鼠 A1 区位于颞侧,前囟后 2.7~5.8 mm,颅顶平面下 3.1~5.4 mm。在该区域内用牙科钻(韩国 Saeshin 公司)将颅骨磨薄,再避开大血管钻一直径约 0.5 mm 的圆形骨窗,小心去除硬、软脑膜,暴露 A1,用于插入记录电极。记录过程中大鼠躯干置于直流电加热板上并悬吊髋部,以减少体温变化、呼吸运动和血管搏动对结果的影响。

1.3 声音刺激

采用 50~300 ms 白噪声(升降时间 5 ms,70 dB)作为声音刺激。声信号由 TDT 系统(美国 TDT 公司)的 RP2.1 模块通过 Brainware 软件(美国 TDT 公司)数字合成,经由该系统的 PA5 模块衰减,再经 ED1 模块驱动,最后由高频扬声器 ES1 输出。扬声器置于大鼠左耳 45° 角相距 10 cm 处。输出声压经 377A01 型扬声器和 426B03 型前置放大器(美国 PCB PiezotronicsINC 公司)校准。

1.4 在体细胞内记录

将 BF150-75-10 型玻璃管(美国 Sutter 公司)于 P-97 水平拉制仪(美国 Sutter 公司)上拉制,内充 1.0 mol/L 的乙酸钾溶液,制成尖端电阻 80~120 MΩ 的微电极。电极尾端由银丝联接将细胞内信号输入至 intra-767 静电计(美国 WPI 公司),信号被放大 10 000 倍,带通滤波 0~6 000 Hz;参考电极置于大鼠头部皮肤处。微电极尖端垂直于脑表面由微电极推进器(日本 Narishige 公司)推进至皮层下 200 μm 处,以后每步推进 1~2 μm,每 3 步点击 1 次静电计"Tickle"按钮以便尖端插入细胞。电极推进至皮层下 900 μm 时退回到 200 μm,重复上述步骤,每一位点重复 3 次,每一骨窗记录 3~5 个位点。电极尖端进入细胞后,可进行补偿以稳定细胞状态。实验过程中不断用温石蜡油滴润皮层,保持皮层湿润,并每隔 1 h 观察动物爪、尾疼痛反应检查麻醉深度;遇有反应者追加乌拉坦 0.3 g/kg。

1.5 数据采集

细胞内信号经由静电计的输出端传输至 micro1401mkⅡ型数模转换器(英国 Cambridge Electronic Design 公司),转换成的波形数据通过 Spike2 软件(英国 Cambridge Electronic Design 公司)实时监控和保存,并进行离线分析。膜电位低于 -50 mV 且记录时间长于 20 min 的结果计入分析对象。

1.6 统计学分析

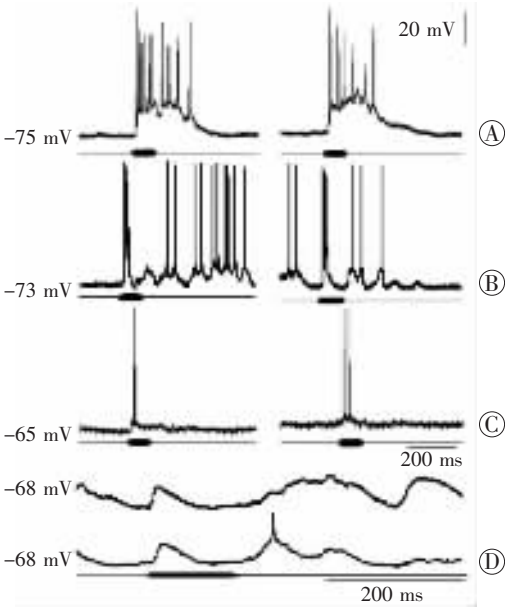
采用 SPSS 13.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经检验服从正态分布,方差具有齐同性,行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 兴奋性听觉反应

共在大鼠 A1 区域记录到 64 个神经元,分别位于皮层下 226~843 μm(Ⅱ~Ⅴ层)的范围,记录时间 25~350 min。其中 5 个神经元对声音的反应不明显,33 个神经元对声音刺激表现出兴奋性的听觉反应。根据反应的波形特点可将兴奋性听觉反应其分为 4 种类型:第 1 类为长时程兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential,EPSP)型反应,声音引发的 EPSP 时程长于刺激声的时长,通常超过 200 ms;EPSP 幅度较高,大于 15 mV;且这类 EPSP 常可引发一连串 AP 或称作放电

(spike),数目多于5个(图1A);第2类为短时程EPSP型反应,EPSP时程短于声音时长,通常小于80 ms;幅度亦较高(约15 mV),且在EPSP基础上有多于3个丛集性的放电(图1B);第3类反应为规律放电型,声音仅引发1~2个规律的放电,而EPSP的时程短于50 ms,幅度低于10 mV(图1C);第4类反应为阈下EPSP型,即仅有阈下的EPSP反应,没有任何形式的声音诱发放电(图1D)。



神经元记录波形下方的黑色粗线代表声音刺激,细线代表无声
A:长时程EPSP型反应;B:短时程EPSP型反应;C:规律放电型反应;D:阈下EPSP型反应

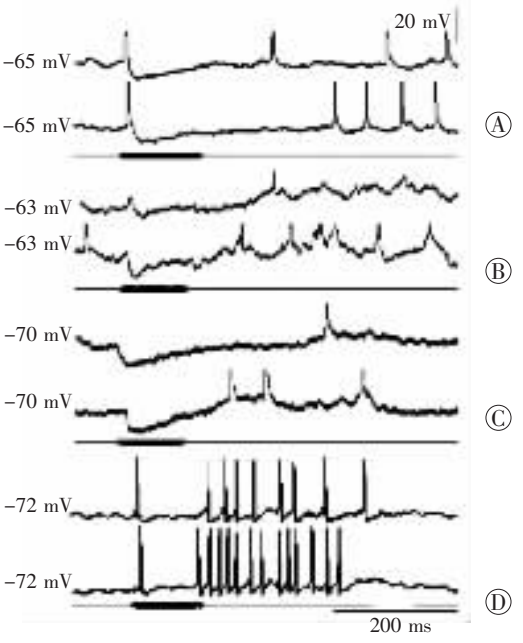
图1 大鼠初级听皮层兴奋性听觉反应

2.2 抑制性听觉反应

共记录到24个A1神经元对声音刺激产生抑制性听觉反应。根据反应的波形可将其分为4类,其中2类抑制性反应分别为在AP(图2A)或EPSP(图2B)之后伴随有抑制性突触后电位(inhibitory postsynaptic potential,IPSP)成分,分别称之为AP-IPSP型和EPSP-IPSP型反应。有一类则仅表现为声刺激诱发的IPSP,没有兴奋性成分,即IPSP型反应(图2C)。此外,还记录到一类特殊的声诱发反应,即AP-超极化型反应。它表现为单个AP之后膜电位先出现趋向于超极化,自发放电被显著抑制,但并未出现明显的IPSP(图2D),且抑制状态可维持至声音结束,甚至长于声音时程。但当抑制反应结束后常有自发放电的回跃式增加,放电频率最高可增至静息状态下的5倍。存在这类反应的神经元仅占所有记录细胞的约6%,此类反应也归为抑制性听觉反应。

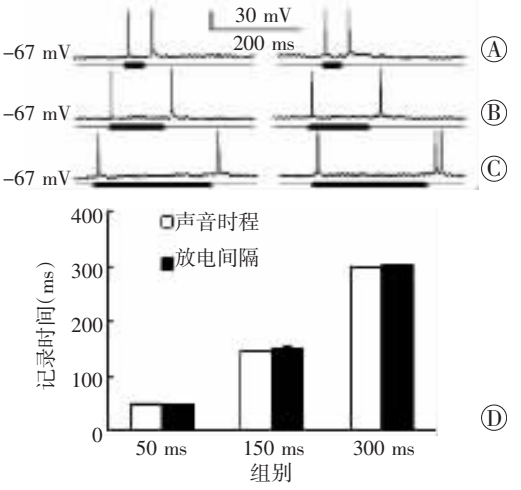
2.3 "on-off"双相听觉反应

在大鼠A1区记录到2个(仅占全部记录细胞的约3%)的神经元在声音刺激的起始(on)相和结束(off)相均产生1~2个放电,而在声音刺激过程中,膜电位稳定在基线水平,无振荡或放电活动,这类反应归为"on-off"双相听觉反应。随着刺激声时长从50 ms(图3A)增加到150 ms(图3B)再增加到300 ms(图3C),on和off相的放电间隔亦逐渐延长,且放电间隔与声音时长高度一致(图3D)。存在这类反应的神经元膜电位振荡较少,自发放电率较低。



神经元记录波形下方的黑色粗线代表声音刺激,细线代表无声
A:AP-IPSP型反应;B:EPSP-IPSP型反应;C:IPSP型反应;D:AP-超极化型反应

图2 大鼠初级听皮层抑制性听觉反应



A:50 ms声音;B:150 ms声音;C:300 ms声音;D:3种时程的声音与各自引起的放电间隔的比较

图3 大鼠初级听皮层双相听觉反应

2.4 大鼠A1神经元听觉反应的基本特点

产生兴奋性和抑制性反应的细胞的静息膜电位分别为(-71.9±7.4)mV和(-66.7±7.9)mV,两者的差异无统计学意义($P>0.05$)。声音刺激引起的EPSP与IPSP的幅度分别为(13.5±7.3)mV和(13.8±5.5)mV,时程分别为(36.8±11.1)ms和(42.4±9.0)ms,兴奋与抑制性反应的这2个参数同样不存在统计学差异($P>0.05$)。但是,EPSP发生的潜伏期(15.1±4.7)ms显著短于IPSP(46.3±20.5)ms($P<0.01$),声音诱发EPSP的上升相时程(6.1±3.5)ms也显著短于IPSP(10.1±4.4)ms($P<0.05$),说明兴奋性听觉反应的发生和发展均显著

快于抑制性的反应。相反，EPSP的下降相时程（29.5±15.4）ms也显著长于IPSP（12.4±7.2）ms（$P<0.05$），提示兴奋性听觉反应比抑制性反应需要更长的时间恢复到静息状态。

3 讨论

在体细胞内记录技术是电生理学技术中非常重要的方法之一，在研究皮层单个神经元在声刺激下的膜电位变化方面优势非常显著。20世纪90年代兴起的在体膜片钳技术，也可以在体观察单个神经元对外界刺激的反应特点，甚至在观察外界刺激对神经元通道电流的影响，以及考察神经活动的传导机制方面比在体细胞内记录技术更具优势。但由于该技术对记录稳定性的要求更高，技术难度更大，成功率更低，故在体细胞内记录技术仍是目前研究单个神经元在感觉刺激影响下膜电位变化特征的主要手段。

本实验中记录到的多数（>50%）神经元对声刺激可产生兴奋性反应（AP或EPSP），其平均潜伏期仅15 ms左右，显著短于抑制性反应的潜伏期，提示这些兴奋性听觉反应可能主要是由听觉传导通路中直接的兴奋性投射所引发，其经历的突触延搁数目较抑制性反应更少，也即信息传递的级数更少，这与丘脑-皮层离体脑片的实验结果相一致[5]；且兴奋性反应的上升相时程显著短于抑制性反应，也说明单位时间内A1神经元对兴奋性突触前输入的处理功能显著强于抑制性输入，而兴奋性与抑制性反应的持续时间和幅度大小以及下降相时程则可能与A1神经元对兴奋性输入在时间和空间上的整合功能密切相关，其具体整合和处理机制目前尚未阐明[6]。

本实验结果显示，声音引起大鼠A1神经元的抑制性反应（IPSP或超极化状态）之前多伴发有兴奋性成分（EPSP或AP），这与听觉丘脑神经元在体细胞内记录[7]、丘脑-皮层脑片膜片钳[5]和躯体感觉皮层[8]的记录结果相吻合。引发A1神经元抑制性反应的输入来源则更为复杂[9]。以往研究认为这是兴奋性丘脑-皮层投射驱动皮层内的抑制性中间神经元的结果，后者促使其他层的神经元产生IPSP[5]；感觉刺激也可以使丘脑的投射神经元兴奋，继而通过其轴突的双突触或多突触同时激活皮层的兴奋性和抑制性神经元，产生侧支抑制反应[8]。本实验结果中抑制性反应产生的潜伏期和上升相时程显著长于EPSP，也提示这种保守的IPSP或超极化是大量侧支投射的抑制性输入与先前的少量兴奋性输入在A1神经元相互作用并整合的结果。那些声音刺激仅诱发IPSP而未产生兴奋性成分（图2C）的情况，可能是由于声音激活了包括兴奋性和抑制性输入的双突触前馈环路，其中的强抑制性输入先于兴奋性输入到达A1神经元并进行整合和处理[10]。

本实验中记录到2个“on-off”双相反应的听觉神经元，在声音起始和结束后分别产生1~2个AP，这与之前在豚鼠MGB[7]和猫A1[11]记录到的结果相符。在不同时长的声音刺激的作用下，2次放电发生的时间间隔与声音的时程具有高度一致性，进一步证明在一定时域范围内（50~500 ms），A1神经元不仅可以通过放电数目，而且可以通过神经反应的时间特性编码听觉信息[10]。有研究提示2个时相的反应是由不同的突触输入所触发，其内在的机制仍未完全阐明[12]。

综上所述，A1神经元对自然声刺激可以产生多种不同类型的兴奋性和抑制性的听觉反应以及“on-off”双相反应，其可能是A1发挥编码、整合、处理声音信息的等多种功能的基础，其内在的很多传导通路和离子通道机制仍有待进一步研究。

参考文献：

[1] Oswald A M, Schiff M L, Reyes A D. Synaptic mechanisms underlying auditory processing[J]. Curr Opin Neurobiol, 2006, 16(4): 371-376.
[2] Bean B P. The action potential in mammalian central neurons [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(6): 451-465.
[3] 张永海，隋建峰，刘国龙，等. 大鼠初级听皮层神经元兴奋性频率反应域的特征[J]. 第三军医大学学报，2007，29(7)：576-578.
[4] Kaur S, Rose H J, Lazar R, *et al*. Spectral integration in primary auditory cortex: laminar processing of afferent input, *in vivo* and *in vitro* [J]. Neuroscience, 2005, 134(3): 1033-1045.
[5] Rose H J, Metherate R. Auditory thalamocortical transmission is reliable and temporally precise[J]. J Neurophysiol, 2005, 94(3): 2019-2030.
[6] Spruston N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(3): 206-221.
[7] Yu Y Q, Xiong Y, Chan Y S, *et al*. *In vivo* intracellular responses of the medial geniculate neurones to acoustic stimuli in anaesthetized guinea pigs[J]. J Physiol, 2004, 560(Pt 1): 191-205.
[8] Gabernet L, Jadhav S P, Feldman D E, *et al*. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition[J]. Neuron, 2005, 48(2): 315-327.
[9] Priebe N J, Ferster D. Inhibition, spike threshold, and stimulus selectivity in primary visual cortex[J]. Neuron, 2008, 57(4): 482-497.
[10] Zhou Y, Liu B H, Wu G K, *et al*. Preceding inhibition silences layer 6 neurons in auditory cortex[J]. Neuron, 2010, 65(5): 706-717.
[11] Qin L, Chimoto S, Sakai M, *et al*. Comparison between offset and onset responses of primary auditory cortex ON-OFF neurons in awake cats[J]. J Neurophysiol, 2007, 97(5): 3421-3431.
[12] Scholl B, Gao X, Wehr M. Nonoverlapping sets of synapses drive on responses and off responses in auditory cortex[J]. Neuron, 2010, 65(3): 412-421.

（收稿：2010-11-16 修回：2010-11-29）
（编辑 王 红）