DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.016
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)08-0697-03

论著

大鼠内侧膝状体腹侧部神经元形态和电生理特征研究

姚小红,万子兵,隋建峰,熊 鹰 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究内侧膝状体腹侧部(ventral medial geniculate body, MGBv)单个神经元的形态结构和基本电生理特性。方法 采用脑片膜片钳全细胞记录技术,观察腹侧部神经元的基本电生理特征和不同膜电位水平时动作电位,并结合组化染色观察腹侧部神经元的形态结构。结果 尼氏及Biocytin染色显示MGBv神经元胞体呈卵圆型,树突分支呈蓬丛样。经电流钳测得MGBv神经元静息电位(-54.92±10.85) mV,膜电容(5.37±1.98) pF,膜电阻(945.67±507.80) MΩ,时间常数(2 109.87±2 496.01) μs。通过注入不同的电流改变膜电位可记录到脉冲式或持续性等多样性的动作电位。在电压钳和电流钳下可记录到自发放电活动。结论 MGBv神经元树突分支较浓密,呈蓬丛状,神经元动作电位形状呈多样性。在电流钳下记录到的自发性电活动的波形与动作电位相似,可能为膜电位超过阈值后的自发动作电位。

关键词:全细胞膜片钳;动作电位;自发性电活动;蓬丛样神经元;内侧膝状体;大鼠
中图法分类号:R322.81;R338.8 文献标识码:A

Electrophysiological and morphological properties of the ventral neurons in medial geniculate body in rats

YAO Xiao-hong, WAN Zi-bing, SUI Jian-feng, XIONG Ying (Department of Physiology, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the electrophysiological and morphological properties of the single ventral neuron in the medial geniculate body (MGBv) in rats. Methods The basic electrophysiological properties and action potentials at different levels of membrane potentials were recorded by whole cell patch clamp technique. Morphological properties of ventral neurons in the medial geniculate body were studied by biocytin staining. Results Nissl and biocytin stainings indicated that MGBv neurons were composed of oval-shaped cell bodies, and the dendritic branches were tufted. In current clamp recordings, the resting membrane potential was (-54.92±10.85) mV, the input resistance (945.67±507.80) MΩ, the membrane capacitance (5.37±1.98) pF, and the time constant (2 109.87±2 496.01) μs. Action potentials under different current inputs were various. Spontaneous discharge could be recorded by voltage clamp and current clamp. Conclusion MGBv dendritic trees are fairly dense with bushy tufted neurons and variety of action potentials under different current inputs in ventral neurons of the medial geniculate body. Spontaneous activities recorded by current clamp are similar to the action potential, which may be the spontaneous action potential due to the exceeding of membrane potential over liminal value.

Key words: whole cell patch clamp; action potential; spontaneous activity; bushy tufted neuron; medial geniculate body; rat

在神经系统的研究中膜片钳全细胞记录和细胞内染色的方法可以把对神经元电生理特性的探讨和形态学观察结合起来,因此在离体和在体研究中,此方法的应用越来越广泛。Biocytin是一种新型细胞内示踪剂,它具有分子量小,易于运输,对记录电极本身的电学特性及记录神经元的电生理活动影响很小[1]。内侧膝状体腹侧部(medial geniculate body, MGB)是丘脑重要的接替核团,由腹侧部、背侧部、内侧部构成。内侧膝状体腹侧部(MGBv)神经元完全司听觉,以不同的动作电位顺序编码声音信号。以往关于MGB神经元的形态和电生理特性的研究多采用在体和离体细胞内记录的方法,而采用脑片全细胞膜片钳技术进行研究的报道极少。MGBv单个神经元形态结构和电生理特性的阐明对于了解其在听觉传导环路中的功能非常重要。本

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371532)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371532)
作者简介:姚小红(1977-),女,内蒙古自治区西苏旗县人,硕士研究生,主要从事听觉电生理等方面的研究。电话:(023)68752254
通信作者:熊 鹰,电话:(023)68752227, E-mail: yxiong@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-09-16;修回日期:2004-02-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

实验我们结合 Blanton 等的盲膜片钳全细胞记录技术和组化染色技术对 MGBv 神经元的特征进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wister 大鼠(购自第三军医大学实验动物中心), 2~3 周龄, 20 只, 雌雄不拘。

1.2 方法

1.2.1 内侧膝状体腹侧部脑片的制备及膜片钳全细胞纪录

大鼠以氟烷麻醉, 断头, 快速取出全脑块, 放入 4 ℃氧饱和人工脑脊液(ACSF)[2] 中 3~4 min。取出放在铺有滤纸的平板上, 切去脑的前 1/3 及后端小脑, 作冠状切片, 片厚 300~400 μm。实验前, 脑片在室温下孵育 3 h。取一脑片放入全浸式脑片槽中进行全细胞记录。室温下氧饱和的 ACSF 进行灌流(1~2 ml/min)。解剖显微镜下, 以海马 CA3 区、内膝体背侧部、内侧部、黑质外侧部作为 MGBv 的定位标志[3], 将充有电极内液的微电极尖端准确定位至 MGBv。其尖端直径约 1~2 μm, 阻抗为 8~10 MΩ。电极内液成分及其浓度(mmol/L)为: 葡萄糖酸钾 232.4, $MgCl_2$ 2, HEPES 5, EGTA 0.5, ATP 2, 电极液中加入 0.3% biocytin。通过 Pclamp 软件(6.0.4 版, Axon Ins. USA)的 Clampex 程序采样, 利用 Axoclamp 200B 进行电流钳、电压钳记录和信号放大。在电极尖端与腹侧部神经元之间形成 whole-cell patch 时, 含有 0.3% biocytin 的电极内液迅速置换胞内液, 待记录 20~30 min 后, 极其缓慢地将电极旋出。将脑片移至 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L PBS, pH 7.5)固定液中, 置于 4 ℃的冰箱中 24~48 h。

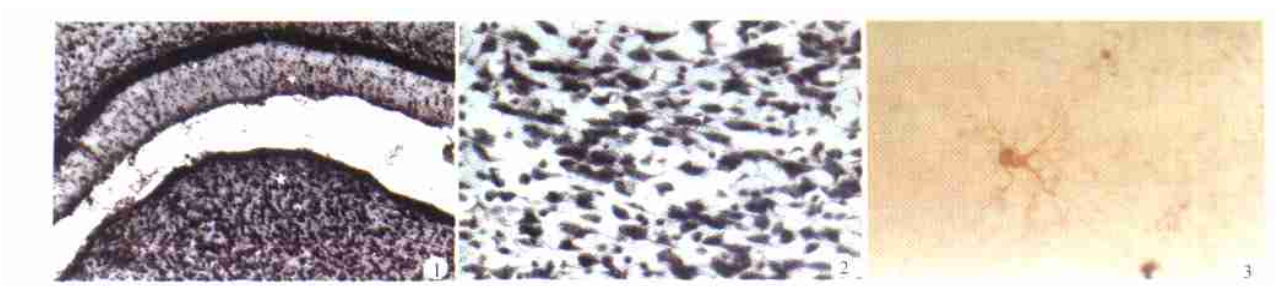
1.2.2 Biocytin 组化染色 脑片以 0.01 mol/L PBS 漂洗, 20 min/次×3。0.3% Triton-X(PBS)中放置 1~2 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗。入 ABC 复合物(avidin-biotin-HRP complex), 37 ℃ 1 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗。将切片浸入 0.05% DAB/过氧化氢的 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.6)缓冲液中 1~10 min, 观察显色适宜。0.01 mol/L PBS 漂洗, 终止显色反应。将切片晾干, 系列乙醇脱水 1~2 min, 二甲苯透明 60 min/次×2, DPX 封片。置于-20 ℃长期保存。

1.2.3 尼氏染色 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后开胸左心室插管, 以 0.1 mol/L PBS 灌流冲洗, 快速冲净血液, 再用 50~100 ml 含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)灌注固定 1 h。开颅取脑, 修整脑组织块, 移入含 30% 蔗糖的上述新鲜固定液中(4 ℃)待其沉底。用恒冷箱切片机做冠状冷冻切片, 片厚 35 μm。切片直接裱于用多聚赖氨酸处理的玻片上, 室温干燥, 0.05% 焦油紫(pH 3.2)染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, DPX 封片。显微镜观察并照相。

2 结果

2.1 内侧膝状体腹侧部神经元的形态学特性

尼氏染色可见 MGBv 细胞大小、形状较恒定, 呈卵圆形, 排列紧密, 树突分支较浓密(图 1, 2)。Biocytin 细胞内组化染色, 低倍镜下 MGBv 神经元呈蓬丛状, 高倍镜下胞体呈圆形, 表面较光滑, 直径 8~10 μm; 轴突较长呈背外侧走行, 表面较光滑仅见少量附属物; 初级树突由胞体一极发出, 分支较少, 次级树突和末梢树突分支逐渐增多, 分支较浓密具有 5~6 个分支, 在树突上可见膨体或串珠样物质。主要位于树突中间部, 附属物形态多样、大小不一(图 3)。



Arrow: Hippocampus; star: MGBv

图 1 内侧膝状体腹侧部 (冠状面, 尼氏染色 ×20)

Fig 1 Ventral medial geniculate body (coronal section, Nissl's stain×20)

图 2 内侧膝状体腹侧部神经元 (冠状面, 尼氏染色×100)

Fig 2 Ventral neuron of the medial geniculate body (coronal section, Nissl's stain×100)

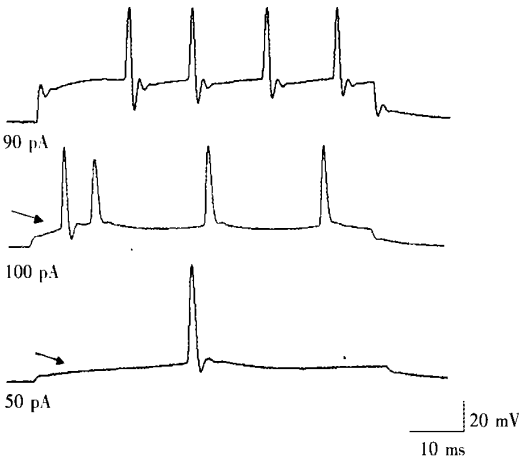
图 3 大鼠的内侧膝状体腹侧部蓬丛样神经元 (SP×200)

Fig 3 Bushy tufted neuron of the medial geniculate body (SP×200)

2.2 内侧膝状体腹侧部神经元的基本电生理特性

经电流钳测得 MGBv 神经元静息电位(-54.92±10.85) mV, 膜电容(5.37±1.98) pF, 膜电阻(945.67±507.80) MΩ, 时间常数(2 109.87±2 496.01) μs。约 89% 神经元给予去极化刺激均可诱发单个或成串的动作电位。在刺激强度较高时(100~200 pA), 串动作电位的频率随刺激强度加大而增高。电极给处于静息电位的 MGBv 注入去极化电流脉冲, 常可引起一坡形去极化(图 4)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



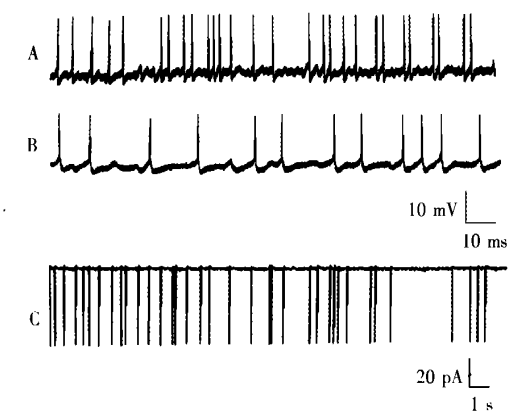
RMP= －55 mV; Arrow: firing delay

图 4　MGBv 神经元的动作电位

Fig 4　Action potential of MGBv neuron

2.3　内侧膝状体腹侧部神经元自发突触活动

电流钳和电压钳下, 采用 k-gluconate 电极内液并将神经元膜钳制在静息膜电位时, 均记录到自发性电活动(图 5)。



A, B: Spontaneous activity in current clamp

C: Spontaneous activity in voltage clamp

图 5　MGBv 神经元的自发性放电活动

Fig 5　Spontaneous electrical events in MGBv cells

3　讨论

本实验采用丘脑内侧膝状体脑片盲法膜片钳全细胞记录技术, 其操作步骤虽然比较简单, 但由于是盲插, 无法看清神经元和微电极尖端, 所以较可视法和急性分散神经元全细胞记录法形成稳定封接的难度较大。实验中我们体会到为形成稳定封接应注意以下两点: ①开颅取脑及修整脑过程要迅速, 切片时要注意切片机的速度和幅度并在 4 ℃的氧饱和 ACSF 中进行, 以防止振荡及缺氧对神经元造成损伤; ②在进行脑片盲法全细胞记录时电极尖端直径和形状对钳制的工作效率影响较大, 应保证电极尖端的直径约 1 ~ 2 μm, 表面光滑。

大鼠 MGBv 除蓬丛样神经元外还包含有中间神经元和胶质细胞, 上述细胞形态差异较大但由于本实验是盲插无法从形态上对细胞进行区分。我们以其对去极化刺激的反应为标准进行区分, 大多数中间神经元和胶质细胞对去极化刺激无反应或较弱。在本实验中动作电位幅度低于 40 mV 的神经元在实验结果中给予剔除。

本实验尼氏与组化染色结果显示 MGBv 神经元胞体呈卵圆形、树突分支呈蓬丛状, 与以往报道的结果一致[4]。MGBv 蓬丛样神经元与下丘的上行性纤维形成板层样结构, 是 MGBv 音频定位的结构基础。MGBv 神经元的兴奋具有两类发放模式, 持续性和脉冲性发放, 通过注入恒定电流改变细胞膜电位可使两类发放模式相互转化[5]。在体研究进一步证实, MGBv 对声刺激的反应在不同状态时有明显差别, 表现为动作电位的不同发放模式。本实验结果显示 MGBv 神经元动作电位形状呈多样性, 通常具有长潜伏期。经记录电极给处于静息电位的 MGBv 注入去极化电流脉冲, 常可引起一坡形去极化, 此去极化逐渐增加然后导致延搁发放。去极化斜坡和延搁发放取决于 MGBv 神经元膜电位, 其可能具有重要的意义, 使声刺激引起的皮层电位潜伏期在一定范围内变化[6]。采用盲膜片钳法, MGBv 神经元树突呈蓬丛状延伸, 因此树突记录的可能性要大于以前的推测[6], 这可能是引起 MGBv 神经元动作电位多样性的原因之一。电流钳下记录到的自发性电活动与慢启动、快衰退的动作电位波形相似, 该自发活动可能是膜电位超过阈值后自发动作电位的发放或是 MGBv 神经元的内在特性产生的, 在外侧膝状体已有报道[7]。关于自发性的突触活动的起源仍了解较少。

参考文献:

[1] Morozov Youri, Khalilov Ilgam, Ben-Ari Yehezkel, *et al*. Correlative fluorescence and electron microscopy of biocytin-filled neurons with a preservation of the postsynaptic ultrastructure[J]. J Neurosci Methods, 2002, 117(1): 81－85.

[2] Puil E, Meiri H, Yarom Y. Resonant behavior and frequency preferences of thalamic neurons[J]. J Neurophysiol. 1994, 71(2): 575－582.

[3] 包新明, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 53－57.

[4] Winer A J, Kelly J B, Larue D T. Neural architecture of the rat geniculate body[J]. Hearing Search, 1999, 130(1－2): 19－41.

[5] Bartlett E L, Smith P H, *et al*. Anatomic, intrinsic, and synaptic properties of dorsal and ventral division neurons in rat medial geniculate body[J]. J Neurophysiol, 1999, 81(5): 1999－2016.

[6] Tennigkeit F, Schwarz D W, Puil E. Mechanisms for signal transformation in lemniscal auditory thalamus[J]. J Neurophysiol, 1996, 76(6): 3597－3608.

[7] MacLeod N, Turner C, Edga J. Properties of developing lateral geniculate neurones in the mouse[J]. Int J Dev Neurosci, 1997, 15(2): 205－224.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net