DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.017
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1632 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1632-04

大鼠发育过程中视皮层神经元电学特性的研究

涂娅莉[1],刘应兵[2],张 莉[3],赵妍君[2] ([1]第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038;四川大学华西医学院:[2]生理学教研室;[3]药理学教研室,成都 610041)

提 要:目的 研究大鼠发育过程中视皮层神经元的电生理学特性,探讨相邻神经元之间的相互作用和局部神经元网络的整合功能。方法 应用脑片膜片钳全细胞记录技术(盲法)获得4~28 d龄SD大鼠视皮层神经元的全细胞记录,在电压钳下应用强度为0.1~1.0 mA刺激来引起神经元的突触后电流(Post synaptic currents, PSCs)。结果 156个大鼠视皮层神经元的PSCs可分为无反应型、单突触反应型和多突触反应型3种类型。大鼠睁眼后多突触反应型细胞所占的百分率显著增加。某些细胞在不同的刺激强度下有不同的突触反应;个别细胞在相同刺激强度下,多突触反应的曲线不同。双脉冲刺激视皮层神经元引起的时间整合作用的形式表现为突触反应增强型、压抑型和无影响型3种类型。结论 多突触反应的神经元可接受两个或多个延时不同的突触输入。视皮层神经元在出生后发育过程中,其功能的成熟表现为在视觉刺激下,视觉依赖性突触的重新分布,表明了相邻神经元之间的相互作用和局部神经元网络的整合功能。

关键词:全细胞记录;膜片钳;脑片;视皮层;多突触反应
中图法分类号:R33-33 文献标识码:A

The electrophysiological properties of neurons in the developing visual cortex in rats

TU Ya-li, LIU Ying-bing, ZHANG Li, ZHAO Yan-jun (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the electrophysiological characteristics of neurons in developing visual cortex and to observe the reciprocal connection and the function of integration between adjacent neurons. Methods Whole cell recordings of the visual cortex from SD rats (4~28 d old) were obtained by using "blind" whole cell patch-clamp recording technique. Bipolar stimulating electrodes were placed in the white border under the visual cortex. Postsynaptic currents (PSCs) were evoked by using stimulation of 0.1 Hz. Results There were three types of PSCs recorded in 156 cells in the first developmental month: irresponse, monosynaptic response and polysynaptic response. The incidence of polysynaptic PSCs increased from 12.36% before eye opening to 31.34% after eye opening ($P<0.05$). There were different synaptic responses evoked by different stimulus intensities. Some neurons showed different polysynaptic responses evoked by the same stimulus intensity. There were three types of the paired-pulse integration of neurons in the visual cortex: synaptic facilitation, synaptic suppression and non-effective synaptic response. Conclusion The polysynaptic neurons can receive two or more than two synaptic inputs with different delayed time. The functional maturity of neurons in visual cortex during the developmental course is presented as the redistribution of activity-dependent synapses, showing the reciprocal connection between adjacent neurons and the integration in local neuronal networks.

Key words: whole cell recording; patch clamp; brain slice; visual cortex; polysynaptic response

研究表明哺乳动物出生后,视觉系统有相当大的可塑性,能根据环境调整和改变与生俱有的神经联系和突触结构。在视皮层的发育过程中,视觉经验起了非常重要的作用,但视觉经验在大鼠视皮层神经元突触的形成和修饰中所发挥的作用尚不清楚。膜片钳技术使在分子水平了解细胞膜上离子通道的生理特性和病理改变成为可能[1,2]。本研究应用脑片膜片钳技术方法,研究大鼠不同发育阶段视皮层神经元的电生理学特性,探讨视觉经验在视皮层发育过程中对神经元突触的修饰作用以及相邻神经元之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 EGTA、HEPES、葡萄糖酸钾购于美国Sig-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070254)

作者简介:涂娅莉(1972-),女,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事视觉发育电生理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)65429945

收稿日期:2002-09-30;修回日期:2002-11-20

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

ma 公司, ATP 购于上海华生公司, 玻璃微电极(tw150F-4 型微玻管)购于美国 WPI 公司。

1.1.2　主要仪器　膜片钳放大器为中国科学院上海生理所产品, 微操作器、定向推进器为日本 Taiyo Koeki 公司产品, 振动切片机 1000 为美国 Ted Pella 公司产品, 电极拉制器为日本 Narishige 公司产品。

1.1.3　实验动物　采用第三军医大学实验动物中心提供, 出生后 4~30 d 的 SD 大鼠, 雌雄不拘。

1.2　方法

依年龄将 57 只 SD 大鼠分为两个组: 睁眼前组(4~7 d, 13 只; 8~14 d, 15 只); 睁眼后组(15~21 d, 12 只; 22~28 d, 17 只)。

1.2.1　视皮层脑片及电极的制备　参见文献[3]介绍的方法。

1.2.2　视皮层脑片膜片钳全细胞记录　用双极刺激电极插入脑片皮层下方的白质中, 将记录微电极插入脑片的Ⅱ~Ⅵ层中, 利用特定的测试方波电脉冲以盲法寻找细胞, 获得视皮层脑片全细胞记录[3]后, 再将细胞膜两侧电位差固定在钳制电压, 应用单脉冲刺激(幅度 0.1~1.0 mA, 时程 100 μs)引起并记录神经元 PSCs 的变化。应用间隔为 100 ms 的双脉冲刺激白质纤维, 记录视皮层神经元的反应。应用 Axon 公司的 pClamp6 软件中的 Clampfit 进行数据分析。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 计算机统计软件进行数据处理, 计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　PSCs 的反应类型

用 0.6 mA 的强度来刺激视皮层白质, 在视皮层Ⅱ~Ⅵ层记录到 156 个神经元的 PSCs。根据其反应波形的特点, 可以大致分为 3 种类型: 无反应型、单突触反应型和多突触反应型。给予刺激后没有引起反应的为无反应型细胞, 见图 1A, 给予刺激后引起了单个突触反应的细胞属单突触反应型, 见图 1B, 而多突触反应则是在刺激引起的第一个突触反应尚未结束时, 紧接着又出现了一个或多个突触反应。多突触反应型细胞的突触时间间隔为两个突触反应波峰之间的时间间隔。不同的多突触反应型细胞之间的突触时间间隔差异很大, 最长达 198.9 ms, 最短为 9.704 ms, 见图 1 C1、C2。

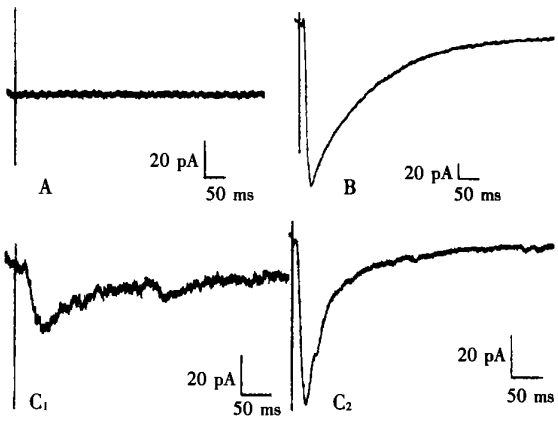
2.2　各发育阶段多突触反应型细胞数量的变化规律

睁眼前组中多突触反应型细胞所占的百分率为 12.36%, 睁眼后组中则升高为 31.34%。两组间比较差异显著($P<0.05$)。

2.3　同一多突触反应型细胞中, 刺激强度与多突触反应之间的关系

2.3.1　同一细胞不同刺激强度与多突触反应的关系　有 2 例细胞多突触反应型细胞, 在刺激强度较小时表现为无反应或只有单突触反应, 强度增大时则出现多突触反应, 图 2 a。1 例 19 d 龄细胞在不同的刺激强度下, 所记录的多突触反应曲线不同, 主要表现在两条曲线的波峰时间间隔不一致, 其中的一条的 PSCs 曲线波峰时间间隔为 23.045 ms; 另一条 PSCs 曲线的波峰时间间隔则为 31.535 ms。

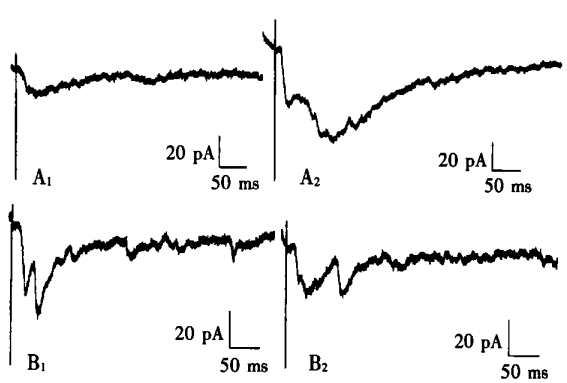
2.3.2　同一细胞在相同刺激强度下, 多突触反应的曲线不同　同一细胞在相同的刺激强度下, PSCs 曲线的特征不同, 其中 1 例 22 d 龄细胞在刺激强度为 0.6 mA 时 PSCs 既可表现为单突触反应, 也可表现为多突触反应。另 1 例 22 d 龄细胞在刺激强度为 0.6 mA 时, 表现出不同的多突触反应曲线, 两条曲线的波峰时间间隔分别为 22.1、55.9 ms, 图 2 b1、b2。



A: Irresponsive cell from a 5-day animal in layer III, showing no response to the stimulus; B: Monosynaptic responsive cell from a 17-day animal in layer III, showing a single synaptic response to the stimulus; C1: Polysynaptic responsive cell from a 22-day animal, showing the time interval between two synaptic responses is 198.9ms; C2: Polysynaptic responsive cell from a 12-day animal, showing the time interval between two synaptic responses is only 9.704 ms

图 1　视皮层神经元 3 种类型的 PSCs 曲线

Fig 1　Stimulus response curves for postsynaptic currents (PSCs) recorded from irresponsive cell, monosynaptic responsive cell and polysynaptic responsive cell at holding potential −70 mV



A: A 23 day-old neuron at −70 mV holding potential in the visual cortex showing monosynaptic response when stimulated by 0.2 mA stimulus intensity (a1), poly-synaptic response when stimulated by 0.6 mA stimulus intensity (a2); B: Different polysynaptic responses of a 22 day-old neuron stimulated by 0.6mA stimulus intensity in the visual cortex. The time intervals between two synaptic responses are 22.1 ms (b1) and 55.9 ms (b2), respectively

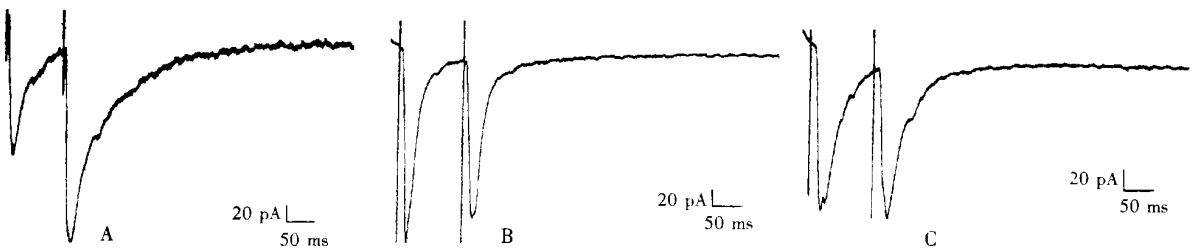
图 2　同一多突触反应型细胞中, 刺激强度与多突触反应之间的关系

Fig 2　Effect of stimuli of different intensities on polysynaptic responses in the same polysynaptic responsive cell

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

2.4 时间整合的类型及其与发育的关系

2.4.1 时间整合的类型 在双脉冲刺激下记录视皮层神经元对前后两次刺激的反应。视皮层神经元对白质电刺激的时间整合作用的形式较复杂，前一反应（条件反应）对后一反应（测试反应）的影响，可表现在后者 PSCs 的幅度，反应时程及潜伏期的变化上。我们对 45 个视皮层神经元进行了双脉冲刺激，时间整合作用的形式表现为以下 3 种类型：①突触反应增强（增强型）：在图 3A 中，当条件刺激脉冲引起的 PSCs 恢复到静止水平后，给予第二个刺激脉冲，该脉冲引起的 PSCs 幅度增大。这种类型神经元所占的百分率为 20%。②突触反应减弱（压抑型）：图 3B 中与前一类正好相反，前一个反应对后一个反应起压抑作用。这种类型神经元所占的百分率为 24.44%。③突触反应无变化（无影响型）：图 3C 中，前一个反应对后一个反应无影响。这种类型神经元所占的百分率为 55.56%。



A: Synaptic facilitation type; B: Synaptic suppression type; C: Noneffective synaptic response type

图3 双脉冲电刺激对视皮层神经元的整合作用

Fig 3 Integration of paired-pulse stimulation of neurons in the visual cortex

2.4.2 时间整合的类型与发育的关系 将 45 例不同发育阶段的视皮层神经元各种时间整合类型所占的比例进行比较，1 周龄中所有的神经元均为无影响型，2 周龄中增强型神经元所占的百分率最高，为 83.33%，3 周龄和 4 周龄中压抑型神经元所占的百分率最高，分别为 55.56%和 46.15%。

3 讨论

视觉系统的突触环路是由上百万个神经元在发育期间所形成的突触联系形成的。文献[5]报道单突触和多突触兴奋性突触后电位（Excitory post synaptic currents, EPSCs）是兴奋反应的两大形式。单突触 EPSCs 是由于锥体细胞之间的直接联系引起；而多突触的 EPSCs 则是由彼此间局部轴突侧枝联系的锥体细胞链引起[6]，它很可能是中间神经元激活后与锥体细胞形成突触和/或锥体细胞轴突侧支激活中间神经元所造成的。PSCs 的双重或多重突触成分主要通过 Ⅳ和 Ⅵ层神经末梢来传递[7]。在本实验中，刺激视皮层白质，在各层中都能记录到多突触反应，提示这些多突触反应的神经元可接受两个或多个延时不同的突触输入，因此在第一个 PSCs 尚未结束时，第二个甚至多个神经元的轴突末梢释放递质，再次引起该靶细胞的 PSCs。多突触反应型的视皮层神经元的百分比在睁眼后显著增加，提示视皮层神经元在出生后发育过程中，其功能和形态的成熟表现为在视觉刺激下，视觉依赖性突触的重新分布，表明了相邻神经元之间的相互作用和局部神经元网络的整合功能。

在本研究中，对同一个细胞给予一定强度的刺激，可以得到一条单突触和一条多突触反应曲线，或两次都记录到多突触反应，但两次反应的到达第二个波峰与到达第一个波峰所需的时间差并不相同，提示该神经元可能与不同的神经元建立了广泛的侧枝联系。由于兴奋路径的改变，传入纤维可以到达不同的神经元，从而对靶神经元产生不同的突出作用。另外，对同一个细胞给予不同强度的刺激，我们发现在较小强度时细胞表现为无反应或只有单突触反应，当刺激强度增大时可诱导多突触反应，推测当刺激强度达到一定的阈强度时，传入纤维才会兴奋另一与之有突触联系的神经元，从而影响所记录的神经元。

大鼠视皮层神经元对双脉冲电刺激的反应在时程上大致与海马锥体神经元的相似[8]，但其反应形式却比海马锥体细胞要复杂得多。本研究结果表明视皮层神经元对双脉冲刺激具有增强、抑制和无影响 3 种不同的形式，推测不同的时间整合类型可能与突触前靶细胞释放递质的频率有关。形态学研究表明，与被记录的神经元相联系的神经回路的性质可能是构成增强型和压抑型时间整合的基础[9]。在本研究中，突触反应无影响型所占的百分比最高，可能是由于所有 1 周龄细胞都表现为突触反应无影响型，使总体动物中无影响型的例数较多所致。

参考文献：

[1] Hirsch J A. Synaptic integration in layer Ⅳ of the ferret striate cortex[J]. J Physiol, 1995, 483(Pt1): 183-199.

[2] Tarczy-Hornoch K, Martin K A, Jack J J, *et al*. Synaptic interactions be-

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

tween smooth and spiny neurones in layer 4 of cat visual cortex *in vitro*[J]. J Physiol, 1998, 508(Pt2): 351—363.
[3] 涂娅莉, 刘应兵, 阴正勤, 等. 与视皮层脑片膜片钳全细胞记录相结合的生物素标记技术[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(1): 75—76
[4] 涂娅莉, 阴正勤, 刘应兵. 建立大白鼠视皮层脑片膜片钳全细胞记录技术[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 610—611.
[5] Shao Z, Burkhalter A. Role of GABAB receptor-mediated inhibitions in reciprocal interareal pathways of rat visual cortex[J]. J Neurophysiol, 1999, 81(3): 1014—1024.
[6] Douglas R J, Martin K A C. A functional microcircuit for cat visual cortex [J]. J Physiol (Lond), 1991, 440(5): 735—769.
[7] Hirsch J A. Synaptic integration in layer Ⅳ of the ferrt striate cortex[J]. J Physiol, 1995, 483(1): 183—199.
[8] Clark K A, Randall A D, Collingridge G L. A comparison of paired-pulse facilitation of AMPA and NMDA receptor—mediated excitatory postsynaptic currents in the hippocampus[J]. Exp Brain Res, 1994, 101(2): 272—278.
[9] Lund J S, Wu C Q. Local circuit neurons of macaque monkey striate cortex: Ⅳ neurons of laminae I-3A[J]. J Comp Neurol, 1997, 384(1): 109—126

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2003)18-1635-01

个案与短篇

重度阻塞性睡眠呼吸暂停综合征表现为扩张型心肌病 1 例

A case of severe obstructive sleep apnea presented as dilated cardiomyopathy

胡厚源[1], 周 林[2], 周沪明[3] (第三军医大学: [1] 附属西南医院心血管内科, [2] 科研部, [3] 附属西南医院呼吸内科, 重庆 400038)

患者, 男, 32 岁, 教师。因咳嗽 4 个月余, 加重伴活动后气促、双下肢浮肿 2 个月, 于 2001 年 1 月 10 日入院。2000 年 9 月上旬因受凉后出现鼻塞、咽痛和咳嗽, 并逐渐出现心悸、气促、双下肢浮肿等。X 线胸片示: "心影增大, 肺淤血", 但未住院诊治, 随后出现夜间阵发性呼吸困难、腹胀、下肢浮肿加重等。既往史: 一贯体胖, 23 岁时体质量已达 80 kg; 打鼾 16 年, 夜间张口呼吸, 白天精神差; 无胸闷、晕厥、高血压病史。查体: 身高 162 cm, 体质量 96 kg, 体质量指数(BMI)=36.2; BP 120/86 mmHg。24 h 动态心电图(2001 年 1 月 12 日): 总平均 HR 109 次/min (87~131 次/min), 室性早搏 576 次, 房性早搏 13 次, 短阵房性心动过速 2 次; R-R 间隙 > 1.5 s 共 4 次, 最长 1.61 s。Ⅰ度 AVB; 间歇性Ⅱ度及高度 AVB 伴交界性逸搏。2001 年 1 月 9 日 X 线胸片: 心影增大, 心胸比例 0.57, 以 LV 大为主; 心脏超声显示: 全心增大, LV 收缩功能减退, 二、三尖瓣轻度反流。临床诊断: 扩张型心肌病、心力衰竭Ⅱ度。经毒毛旋花子甙、培哚普利、单硝酸异山梨醇、双氢克尿噻、氯沙坦等治疗症状改善不满意, 并出现交替脉。2001 年 1 月 18 日行睡眠多导仪监测(美国伟康公司 PolyWin-Junion): 最长呼吸暂停 80 s, 睡眠时呼吸暂停低通气指数 78.25 次/h, 最低 SaO_2 53%, 诊断为重度阻塞性睡眠呼吸暂停综合征。于夜间睡眠时选用呼吸机持续正压通气(CPAP, SUNRISE LT 9 000, 压力为 7.0 cmH_2O), 2001 年 1 月 22 日出院随诊。继续 CPAP 治疗。2003 年 2 月 12 日心脏超声正常, 体质量已降至 78 kg、活动能力完全恢复正常。

讨论

目前认为阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(Obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)是独立于年龄、肥胖、吸烟等因素外引起高血压的原因之一, 在高血压患者中 OSAS 发生率为 20%~45%, 原来所谓的原发性高血压患者中可能有一部分是继发于 OSAS 的高血压。OSAS 并发冠心病的可能原因是: 缺氧使冠状动脉内皮受损, 脂质沉积于血管内膜; OSAS 患者红细胞增多, 血粘度增加, 血流缓慢, 血小板易在受损内膜表面聚集产生血栓, 引起冠状动脉狭窄或闭塞[1]。OSAS 与高血压、冠心病及心力衰竭的加重密切相关, 并可伴有多种心律失常[1,2]。OSAS 患者, 尤其是老年人和婴幼儿易发生夜间突然死亡, 其主要机制可能是由于 OSAS 易引起各种严重心律失常、急性心肌梗死、急性心力衰竭、脑卒中、呼吸衰竭等。Malone 等[3] 报道 8 例原因不明的扩张型心肌病患者均有阻塞性睡眠呼吸暂停综合征, CPAP 治疗四周后左室射血分数明显改善。

本例患者入院诊断为原发性扩张型心肌病, 但一般纠正心衰的措施疗效不佳。因同室病友反映其夜间睡眠时有明显的身体扳动, 并伴有鼾症, 提醒我们关注到他的睡眠呼吸暂停综合征, 患者在治疗 OSAS 两年后, 心脏大小及功能均恢复正常, 支持该患者系严重的 OSAS 所导致的扩张型心肌病。因此, 对于临床诊断为扩张型心肌病的患者, 若伴有肥胖或鼾症, 应该做睡眠呼吸监测, 避免误诊或漏诊。对发现有 OSAS 者一定要积极治疗, 才能实现对心衰的纠正, 甚至达到从根治的目的。

关键词: 心肌病, 扩张型; 心力衰竭; 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征
中图法分类号: R541.61 文献标识码: B

参考文献:

[1] 何权瀛. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与心血管疾病[J]. 中国医刊, 2003, 38(1): 14—15.
[2] 方理刚, 朱文玲. 有心血管表现的阻塞性睡眠呼吸暂停综合征成功治疗一例[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(1): 51.
[3] Malone S, Liu P P, Holloway R, *et al*. Obstructive sleep apnoea in patients with dilated cardiomyopathy: effects of continuous positive airway pressure[J]. Lancet, 1991, 338(8781): 1480—1484.

(编辑 栾 嘉)

作者简介: 胡厚源(1966—), 男, 湖北省荆州市人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事冠心病基础及临床方面的研究, 发表论文 20 余篇。电话: (023)65387390

收稿日期: 2003-04-22; 修回日期: 2003-06-14

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