DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.035
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1325-03

论著

大鼠睁眼前后视皮层神经元突触后电流变化

涂娅莉[1],刘应兵[2],阴正勤[1],胡志安[3],赵妍君[2],张 莉[2] ([1]第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038;[2]四川大学华西医学院生理学教研室,成都 610041;[3]第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究大鼠发育过程中视皮层神经元的突触后电流变化,探讨视皮层视觉依赖性突触的形成和重新分布的细胞内机制。方法 应用脑片膜片钳全细胞记录技术,获得4~28 d Sprague-Dawleg (SD)大鼠视皮层神经元的细胞内微电极记录,记录突触后电流(Post synaptic currents, PSCs)的变化。结果 (1)共记156个大鼠视皮层神经元,根据其电生理学特性可将神经元分为3种类型:无反应型、单突触反应型和多突触反应型。睁眼后无反应型细胞数量显著减少,而多突触反应型细胞数量明显增多。(2)在同一刺激强度和钳制电压下,对视皮层神经元的输入阻抗和PSCs的各项指标进行组间比较:①输入阻抗IR:睁眼前与睁眼后组之间有显著性差异,3周龄与4周龄组之间有显著性差异。②PSCs的峰值、到达峰值所需的时间、10%~90%上升时间、10%~90%下降时间、半波宽和潜伏期:1周龄组与2周龄、3周龄、4周龄组之间有显著性或非常显著性差异。结论 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形觉刺激以及局部神经元网络的整合作用下,视觉依赖性突触的形成和重新分布。

关键词:全细胞记录;膜片钳;脑片;视皮层
中图法分类号:R322.91;R338.1;R338.8 文献标识码:A

Changes of post synaptic currents of neurons in visual cortex after eyes opening of newborn rats

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

Abstract: **Objective** To investigate the changes of post synaptic currents (PSCs) of neurons in developing visual cortex for intracellular mechanisms of experience-dependent synapse formation and redistribution. **Methods** Whole cell patch-clamp recordings were carried out for PSCs in the visual cortex of 57 Sprague-Dawley rats (4—28 d). **Results** A total of 156 PSCs were recorded and might be divided into 3 types, including silent synaptic response, monosynaptic response and polysynaptic response during the first developmental month. Numbers of the neurons with the silent response was significantly larger in eye-unopened group than the eye-opened rats ($P<0.001$). However, the incidence of polysynaptic PSCs was increased after eye opening ($P<0.01$). The input resistance of the neurons was significantly stronger in rats with unopened eyes than those eye-opened, in rats within 3 weeks postnatally than those in the fourth week after born. During postnatal week 1, peak value, time of peak, 10%—90% rise time, 10%—90% decay time, half-width and latency to onset of PSCs were significantly lower than those of postnatal week 1 to 4. Before eye opened the peak value and time of peak of PSCs in layer IV were significantly lower than those in layer II—III. However, after eye opened the PSCs in layer II—III were not different from those in layer IV. **Conclusion** The function of neurons in visual cortex tends to mature after birth through activity-dependent synapses formation and redistribution under the integral effects of visual stimulating and local neuronal networks.

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

视觉发育研究发现,儿童弱视的发生发展过程与视觉系统根据环境刺激调整和改变与生具有的神经联系和突触结构的可塑性过程密切相关。视觉发育可塑性关键期内这种活动依赖性的神经机制,一直是眼科学和神经科学研究的热点。以往探讨视皮层发育的可塑性机制多以形态学的方法研究递质和受体的变化,而对视觉发育中突触联系的功能状态了解很少。近年来脑片膜片钳技术的开展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。电压膜片钳主要记录细胞的突触后电流(Post synaptic currents, PSCs),PSCs的参数有到达峰值所需的时间、10%~90%上升时间、10%~90%下降时间、半波宽及潜伏期)等,其中10%~90%上升时间反映了突触后反应去极化的速度,10%~90%下降时间表现的则是复极化速度,二者与半波宽都是PSCs的时间指标,目前复极化速度快慢的机制尚不清楚。本实验应用视皮层脑片膜片钳技术,研究大鼠视皮层神经元发育的电生理学特性,探讨视觉经验在视皮层各层次发育过程中对神经元突触的修饰作用。

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Sigma公司,ATP购于上海华生公司,玻璃微电极(tw150F-4型微玻管)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970252;39770258;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:2002-04-21;修回日期:2002-07-18

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

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和美国 Axon 公司 Axopatch 200B, 微操作器、定向推进器、刺激器、隔离器为日本 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 公司产品以及美国 Sutter 公司 P－97, A/D 转换器为美国 Axon 公司产品。

1.2 方法

依年龄将 57 只大鼠分为两个大组: 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 采用正常 Sprague-Dawleg 大鼠, 年龄为出生后 4～30 d。应用振动切片机在冠状平面上将视皮层脑块切成厚度为 400 μm 的薄片, 室温下(18～25℃)孵育 1 h 备用。应用电极拉制器拉制玻璃毛细管微电极。拉制好的电极尖端直径约 1～2 μm, 阻抗为 5～10 MΩ, 电极内液成分及其浓度(mmol/L)为: 葡萄糖酸钾 117.5, 氯化镁 2, HEPES 5, EGTA 0.5, ATP 2。

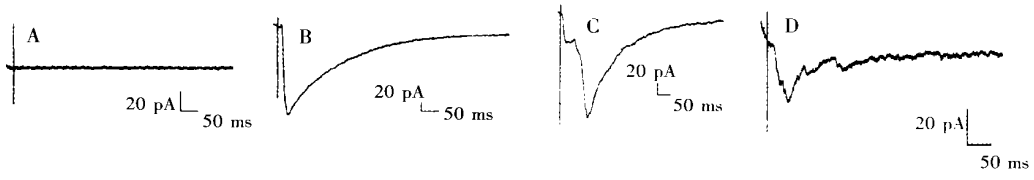
1.2.2 视皮层脑片膜片钳全细胞记录 用双极刺激电极插入脑片皮层下方的白质中, 将记录微电极插入脑片的Ⅱ～Ⅵ层中, 利用特定的测试方波电脉冲以盲法寻找细胞, 获得视皮层脑片全细胞记录[1]后, 再将细胞膜两侧电位差固定在钳制电压, 以记录神经元 PSCs 的变化。应用 Axon 公司的 pClamp 软件中的 Clampfit 进行数据分析。

1.2.3 统计学处理 采用 SPSS 计算机统计软件进行统计处理。所有计数资料采用 χ^2 检验进行百分率的比较; 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用方差分析作多个均数的两两比较。

2 结果

2.1 PSCs 的反应类型

用同一刺激强度刺激视皮层白质, 在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(图 1A～D)。出生后早期, 无反应型视皮层神经元所占的比例较高, 当发育进行时, 无反应型神经元的数量逐渐减少, 大部分神经元表现为单突触反应, 同时多突触反应型神经元的数量逐渐增多。



A: No stimulated-evoked response of a neuron in layer Ⅲ from a 5-day rat; B: Single-synaptic response of a neuron in layer Ⅲ of a 17-days rat; C: Poly-synaptic response (2 responses) of a neuron in layer Ⅲ of a rat 15—21 d postnatally; D: Poly-synaptic response of a neuron in layer Ⅳ in a rat 22—28 d after born

图 1 视皮层神经元三种类型的 PSCs 曲线

Fig 1 Three types of post synaptic currents(PSCs) in the neurons of visual cortex

2.2 无反应型和多突触反应型 PSCs 的变化规律

出生后 1～4 周龄视皮层神经元 3 种类型的 PSCs 均存在。分别记录睁眼前、后组神经元 89 和 67 个。在睁眼前、后组中, 无反应型细胞的百分率分别为 57.3% 和 11.94%, 两组间比较有显著性差异($P<0.001$)。在睁眼前、后组中, 多突触反应型细胞的百分率分别为 12.36% 和 31.34%, 两组间比较有显著性差异($P<0.01$)。

2.3 不同发育阶段视皮层神经元 PSCs 各项指标之间的比较

将所有神经元的膜电位钳制在－70 mV, 在同一刺激强度下(0.4 mA), 将 PSCs 的各指标进行组间比较, 见表 1。①输入阻抗: 睁眼前各组之间(即 1 周龄组与 2 周龄组)无显著性差异, 睁眼后各组之间(即 3 周龄组与 4 周龄组)有显著性差异。睁眼前、后组之间有显著性差异($P<0.05$)。随着年龄增长, IR 值逐渐减小。②PSCs 的峰值: 1 周龄组分别与 2 周龄、3 周龄、4 周龄组之间有非常显著性的差异(P 值均<0.01)。4 周龄组与 2 周龄组、3 周龄组之间有非常显著性或显著性的差异(P 值依次为: $P<0.01$, $P<0.05$)。③PSCs 到达峰值的时间、10%～90% 上升时间、10%～90% 下降时间、半波宽、潜伏期: 1 周龄组分别与 2、3、4 周龄组之间有非常显著性的差异。

表 1 不同年龄组 PSCs 的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of PSCs in the neurons from rats at different ages($\bar{x}\pm s$)

	Age(d)			
	4～7	8～14	15～21	22～28
Cell number	39	50	35	32
Input resistance (MΩ)	1498.35±504.30	712.30±569.45	390.37±157.39 *△△	271.18±118.00 **△△##
Peak value (pA)	−0.87±3.63	−24.21±39.65 **	−52.26±68.57 **	−121.55±87.45 **△△#
Time of peak (ms)	0.88±3.70	15.18±13.57 **	21.55±17.48 **	19.86±20.42 **
10%～90% rise time (ms)	0.58±0.23	6.57±6.75 **	7.56±7.89 **	10.68±14.98 **
10%～90% decay time (ms)	0.98±4.11	63.23±108.22 **	84.90±100.96 **	125.22±118.62 **
Half-width (ms)	0.50±2.20	20.05±27.85 **	28.83±31.62 **	36.53±39.77 **
Latency to onset (ms)	0.38±1.60	6.22±4.83 **	6.24±4.23 **	4.25±3.54 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 4～7d group; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* 8～14d group; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 15～21 d group

2.4 视皮层各层次神经元 PSCs 电生理学特性的比较

按照层次将视皮层神经元分为 3 组: Ⅱ～Ⅲ层组; Ⅳ层组; Ⅴ～Ⅵ层组。比较 118 个位于视皮层不同层次的神经元之间 PSCs 各项指标的差异。

2.4.1 睁眼前各层次神经元之间 PSCs 的比较 记录到睁眼前的视皮层神经元共 68 个, 其中Ⅳ层神经元 PSCs 的峰值和到达峰值所需的时间与Ⅱ～Ⅲ层神经元有显著性差异, 见表 2。

2.4.2 睁眼后各层次神经元之间 PSCs 的比较 记录到睁眼后的视皮层神经元共 50 个, 各层次之间神经元 PSCs 的各项指标均无显著性差异($P>0.05$), 见表 3。

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

表 2　睁眼前不同层次神经元 PSCs 之间比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Comparison of PSCs in the neurons from different layers in rats before eye opening($\bar{x}\pm s$)

	Layer II－III	Layer IV	Layer V－VI
Cell number	33	23	12
Input resistance (MΩ)	744.14±498.49	1 901.43±2 697.12	1 006.88±866.34
Peak value (pA)	－17.75±34.88	－1.37±6.02 *	－6.15±10.74
Time of peak (ms)	10.30±13.00	2.90±8.15 *	6.13±9.64
10%～90% rise time (ms)	4.20±5.89	1.13±3.80	3.01±5.51
10%～90% decay time (ms)	45.15±99.60	8.48±29.07	10.43±21.58
Half-width (ms)	14.25±26.37	2.95±9.84	5.03±8.18
Latency to onset (ms)	4.18±5.38	1.36±3.68	2.51±4.02

*: $P<0.05$ *vs* layer II－III group

表 3　睁眼后不同层次神经元 PSCs 各项指标之间比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Comparison of PSCs in the neurons in different layers of eye-opened rats($\bar{x}\pm s$)

	Layer II－III	Layer IV	Layer V－VI
Cell number	28	20	2
Input resistance (MΩ)	310.50±134.85	335.12±157.83	321.41±43.86
Peak value(pA)	－98.60±91.97	－81.27±74.58	－196.94±135.68
Time of peak(ms)	21.91±15.98	16.87±20.52	12.4±6.36
10%～90% rise time(ms)	8.74±10.12	9.49±15.98	5.15±3.61
10%～90% decay time(ms)	124.71±115.41	79.63±11.08	58.95±30.62
Half-width(ms)	35.61±34.76	29.84±43.14	19.1±0.57
Latency to onset(ms)	5.90±4.74	3.84±3.30	3.72±0.83

3　讨论

在一定的钳制电压下, 给刺激后不能诱导出反应的突触称为静息突触, 给刺激后可以诱导出反应的突触称为功能突触[2]。多突触反应可能是所记录到的靶细胞接受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, 提示局部神经元之间有广泛的神经元突触联系[3]。文献[4]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 是由彼此间局部轴突侧枝联系的锥体细胞链引起。多突触输入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。本研究中, 睁眼后大鼠视皮层无反应型细胞迅速减少, 而多突触反应型细胞数量迅速增多, 提示在视觉刺激下, 视觉依赖性突触的形成和重新分布, 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。静息突触向功能突触的转变可能是视觉依赖性突触联系修饰的一种形式。在大鼠发育期间, PSCs 的下降时间随年龄增长而逐渐延长, 这不同于海马 PSCs 的快波特点[5], 提示传入纤维传导兴奋到达细胞胞体或树突经历了较长的时间。PSCs 的下降时间取决于几个过程, 包括突触间隙神经递质的释放和清除以及突触后通道的动力学性质。实验和理论证据提示神经递质的释放和清除不可能造成延迟动力学上的差异, 因为这些过程相对于突触电流的时间过程而言相当快速。突触电流失活的速度快慢关键取决于神经递质和受体分离或对受体失去敏感的过程[6,7], 而不是递质的扩散和清除。因此, 1 周龄与 2、3、4 周龄细胞的 PSCs 延迟时间有明显差异, 可能是突触后的兴奋性和抑制性受体和/或通道本身的功能同源异质性所造成, 提示在年长者的神经元中, 通道的平均开放时间较年幼者短和/或受体密度小。

代表细胞成熟度的输入阻抗值在出生后逐渐减小, 2 周龄以前的细胞输入阻抗较高, 成熟度较低; 2 周龄以后的细胞输入阻抗较低, 成熟度较高。本研究中 2 周龄以后的细胞输入阻抗一般在 660 MΩ 以下, 未发现高输入阻抗者, 而海马的所有年龄组细胞中都存在高、低输入阻抗的神经元[8], 即同一年龄组中成熟、未成熟神经元并存, 提示在视皮层中年龄与细胞电生理特性成熟的同步化程度大于海马等皮层下结构。由于 IV层和 II/III层 NMDA 受体水平随发育的变化趋势各不相同, IV层主要轴突重建随关键期的终止而完成, 而 II/III层神经元的可塑性一直持续到成年[9]。本研究中, 睁眼前 IV层神经元 PSCs 的峰值和到达峰值所需的时间与 II～III层神经元有显著性差异, 而睁眼后 2～4 周内各层次之间神经元的 PSCs 无显著性差异, 提示在 2～4 周内, II～III层和 IV层神经元的受体或通道水平无显著变化。由于本研究中的 PSCs 是所有 EPSCs 和 IPSCs 的总和, 并没有进行 EPSCs 成分轴流的分析, 因而不能断定睁眼后 2～4 周内 NMDA 受体在 II～III层和 IV层的分布上有无差异。由于目前尚无文献报道视皮层不同层次神经元的电生理特征, 因此应用视皮层脑片膜片钳技术结合药理学方法从电生理学角度去分析不同层次的成分轴流, 探讨视觉发育过程中 NMDA 受体在视皮层不同层次的功能状况, 将使我们进一步认识视觉可塑性机制。

参考文献:

[1] 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.

[2] Rumpel S, Hatt H, Gottmann K. Silent synapses in the developing rat visual cortex: evidence for postsynaptic expression of synaptic plasticity[J]. J Neurosci, 1998, 18(21): 8 863－8 874.

[3] Tarczy-Hornoch K, Martin L A C, Jack J J B, *et al*. Dynaptic interaction between smooth and sping neurons in lay 4 of cat visual cortex *in vitro*[J]. J Physiol, 1998, 508(2): 351－363.

[4] Shao Z, Burkhalter A. Role of GABAB receptor-mediated inhibitions in reciprocal interareal pathways of rat visual cortex[J]. J Neurophysiol, 1999, 81(3): 1 014－1 024.

[5] Kneisler T B, Dingledine R. Spontaneous and synaptic input from granual cells and the perforant path to dentate basket cells in the rat[J]. Hippocampus, 1995, 75(5): 151－164.

[6] Clements J D. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function[J]. Trends in Neurosci, 1996, 19(5): 167－171.

[7] Jones M V, Westbrook G Z. Desensitized states prolong GABA A channel response to brief agonist pulses[J]. Neuron, 1995, 15(1): 181－191.

[8] Liu Y B, Lio P A, Pasternak J F, *et al*. Developmental changes in membane properties and postsynaptic currents of granule cells in rat dentate gyrus[J]. J Neuophysiol, 1996, 76(2): 1 074－1 088.

[9] Darian-Smith C, Gilbert C D. Axonal sprouting accompanies functional reorganization in adult cat striate cortex[J]. Nature, 1994, 368(6 473): 737－740.

(编辑　王　红)

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