

研究简报

幼年大鼠视皮层神经元对闪光刺激的反应特性*

谢小乔 汪浩 陈波 周逸峰**

(中国科学技术大学生命科学学院视觉研究实验室, 合肥 230027)

摘要 哺乳动物视觉系统的发育延续到出生后, 大鼠出生后 3~5 周是视觉系统发育的关键期. 在关键期中, 视皮层的兴奋性和抑制性突触连接逐渐成熟, 形成有效的皮层内回路. 为了观察发育关键期大鼠视皮层神经元的反应特性与成年大鼠的异同, 使用胞外单细胞记录的方法对比研究了幼年和成年大鼠对闪光刺激的视觉反应特性. 结果显示: 与成年大鼠相比较, 幼年大鼠视皮层神经元对持续闪光刺激显示出更强的适应性, 对光刺激的诱发放电频率更低, 而在没有光刺激时的自发放电频率更高, 从而导致信噪比更低. 这一结果表明, 幼年大鼠视皮层对连续刺激的反应能力下降, 对信号的分辨能力也更弱, 其原因可能是兴奋性突触和抑制性突触发育的不同步所致.

关键词 适应性, 信噪比, 兴奋性突触, 抑制性突触, 视皮层, 关键期

学科分类号 Q6

哺乳动物视觉系统的发育在出生后仍然持续. 新皮层突触回路的发育包括两个阶段: 第一个阶段是神经元的产生和其迁移到新皮层. 在这个阶段, 神经纤维连接的形状已经大致形成. 对大鼠来说, 这个阶段对应于出生前和出生后最初两周. 第二个阶段是突触连接发育成熟的阶段, 大鼠新皮层的大部分突触成熟发生于出生后 3 周^[1], 从出生后 3 周到 5 周是视觉系统的关键期 (critical period)^[2].

Murphy 等^[3]提出, 发育中的视皮层特性由兴奋性和抑制性突触之间发育的平衡决定. 视皮层的兴奋性输入主要经由兴奋性谷氨酸 (amino acid glutamate, Glu) 激活突触后 NMDA 受体 (ionotropic N-methyl-D received aspartate receptor) 而引起兴奋^[4], NMDA 受体主要调节突触后响应的慢成分. 有研究表明, NMDA 受体在关键期表现出最高活性^[5], 它的不同亚基 NR1 和 NR2A-D 在发育的不同时期呈现不同的表达^[6, 7], 这种表达过程与关键期视皮层的可塑性和突触的发生^[8]、突触可塑性的下降^[7]、突触修饰^[9]有很大的关系.

皮层内最主要的抑制性神经递质是 γ -氨基丁酸 (gaminobutyric acid, GABA), 它由谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD65 和 GAD67) 合成. GAD65 一般位于轴突末端突触小泡处, 而 GAD67 位于神经元胞体内. 在猫的视皮层发现, 出

生后的 GAD 浓度持续增加^[10], GABA 能受体的表达也不断增加^[11].

其他因素如离子通道, 第二信使, 生长因子和信号分子等也在视皮层的发育中起着重要作用. 研究发现, 神经营养因子可以影响关键期大鼠视皮层的突触对谷氨酸、乙酰胆碱和 GABA 的传递效率^[12]. 在 BDNF 表达水平较高的转基因小鼠上, BDNF 能加速 GABA 能抑制性突触连接的发育成熟, 视觉系统发育的关键期随之提前结束了^[13].

关键期的产生是由于兴奋性突触和抑制性突触连接的不同步发育造成的^[14]. 在大鼠离体脑片上的研究发现, 视皮层内的突触在出生后两周内, 对双脉冲刺激大部分表现为易化现象, 而双脉冲抑制却很少见, 随着大鼠的发育, 抑制现象越来越显著. 出生后 31~47 天, 双脉冲抑制作用占优势, 易化作用很少见^[15]. 本实验室之前的工作也显示, 20 天的幼年大鼠突触反应已经表现出短时程抑制现象

*教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0586)和高等学校博士学位点专项科研基金资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0551-3601436, Fax: 0551-3607014

E-mail: zhouy@ustc.edu.cn

收稿日期: 2005-05-16, 接受日期: 2005-07-06

(short-term depression, STD), 而且与 30 天的大鼠以及成年鼠相比较可见, 随着年龄的增加, 视皮层的突触抑制作用逐渐加强 (待发表数据).

本实验室还进行了对老年大鼠视皮层神经元适应性和短时程突触可塑性的研究, 结果表明, 相比于成年大鼠, 老年大鼠视皮层神经元的适应性明显增强, 自发放电频率明显升高, 信噪比明显降低 (待发表数据). 这一结果与老年猫和老年猴的结果相符^[16, 17]. 而老年猫和老年猴的视皮层功能变化被认为与中枢神经系统的抑制功能衰退有关, 即与 GABA 能系统的功能变化有关. 由于幼年大鼠在发育中通常被认为抑制系统尚未成熟, 可能会表现出与老年大鼠相似的功能变化. 为了验证这一设想, 我们采用胞外单细胞记录的方法, 观察幼年大鼠的视皮层对闪光刺激的适应性和信噪比, 以期进一步了解幼年大鼠视皮层在关键期发育时的反应特性和抑制系统的不成熟对视觉系统功能的影响.

1 材料与方法

1.1 实验动物的准备

本实验中所使用的动物为幼年 (21~24 天, 视觉系统发育关键期内) 和成年 (3 至 4 个月) Long-evans 雄性大鼠. 动物生活于 12 h 亮 /12 h 暗的照明环境之中, 并保证足够的活动空间和食物饮水. 实验开始时, 首先向大鼠腹腔内注射 20% 的乌拉坦 (1.2 g/kg) 进行麻醉 (这个剂量可以保证麻醉效应一直持续到实验结束, 中间不再补加麻醉剂). 无缩腿反应即可认为麻醉成功, 将其固定在立体定位仪上 (SR-6N Stereotaxic Instrument, Narishige Scientific Instrument Lab, Japan). 使用体温维持仪 (蚌埠市实用技术研究所, 中国) 控制大鼠体温在 (37±0.5)°C. 手术部位滴加局部麻醉剂利多卡因. 暴露大鼠颅骨, 依据大鼠脑图谱^[18], 以前囟为原点, 向后 7.0~8.0 mm, 向外侧 3.0~4.0 mm, 定出初级视皮层在水平面上的位置. 用电钻开颅, 去除硬脑膜和蛛网膜.

1.2 视觉刺激和胞外记录

将发光二极管 (light-emitting diode, LED) 置于大鼠两侧眼睛前方 1 cm 处进行闪光刺激. 眼睛保持睁开的状态, 以保证施予的刺激有效. 利用微电极水平拉制仪 (Model P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instrument Company, USA) 二次拉制单管玻璃微电极, 尖端直径 2~3 μm, 内灌生理盐水 (0.9% NaCl), 阻抗约 4.0~5.0 MΩ. 将电极插入大

鼠初级视皮层进行胞外单细胞记录. 为防止皮层干燥和波动对实验记录的影响, 在皮层上封以琼脂和石蜡.

1.3 数据采集和分析

当记录电极定位到初级视皮层后, 对双侧眼施加持续闪光刺激, 找到对刺激有良好反应的神经元, 然后分别施予单眼刺激观察神经元的反应, 确认神经元的优势响应眼 (Long-evans 大鼠部分视皮层细胞对两眼的刺激都有反应). 在实验正式开始前和结束后各记录 10 s 的自发放电. 选用时间频率分别为 1、2、4、8 Hz 的闪光刺激来研究细胞在此 4 个频率下的反应适应性. 每个频率的闪光刺激包括持续的 20 次闪光, 其给光时间和撤光时间相同, 即 1、2、4、8 Hz 的闪光刺激的给光和撤光时间分别为 0.5 s、0.25 s、0.125 s 和 0.0625 s (图 1a). 各个刺激频率记录之间有 30 s 的适应恢复时间. 实验由运行在 Power Macintosh G4 计算机 (Power Macintosh G4-400, Apple Computer Corporation, USA) 上的 Igor 程序进行控制. 记录到的数据通常先储存在计算机里, 实验结束后进行分析、统计, 也可以进行在线观察和分析.

利用 Igor 软件 (WaveMetrics, Inc.) 读取神经元自发放电的幅度和对最优闪光刺激条件下诱发放电的峰值幅度. 用 Igor 软件统计细胞的反应直方图 (poststimulus time histograms, PSTHs), 仅对诱发反应峰值幅度大于 2 倍平均自发放电幅度的细胞进行统计. 可以观察到持续闪光刺激一段时间之后神经元出现对刺激的适应性, 即单位时间之内诱发放电的频率持续下降直至稳定. 我们计算出每个神经元在某个时间频率下的适应到达平台之后的最后 5 个周期内诱发放电频率的平均值, 作为适应后的诱发放电频率值, 再计算出最初给予刺激时的 2 个周期诱发放电频率的平均值, 作为适应前诱发放电频率值, 前者与后者的比值作为适应系数 (adaptation index, AI). AI 数值越小表示神经元的适应性越强.

在记录到的每个神经元首先计算刺激前和刺激后 10 s 的自发放电频率 (spontaneous rate), 将对最优时间频率刺激下最初 5 个周期中的诱发放电频率的平均值作为诱发放电频率 (evoked responses rate). 信噪比定义为诱发放电频率与自发放电频率之比. 对细胞进行统计平均的分析结果均以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式呈现. 使用 *t* 检验对各组数据进行显著性分析.

2 结果

我们记录了 4 只幼鼠的 40 个视皮层神经元和 6 只成年鼠的 51 个视皮层神经元, 将两组细胞的适应性、自发放电频率、诱发放电频率、信噪比等指标进行比较, 得到以下结果:

2.1 视皮层的适应性

神经元的适应性是感觉系统适应性的基础, 连续的闪光刺激能使大鼠视皮层的神经元呈现明显的

快速适应. 我们使用 1、2、4、8 Hz 的闪光刺激来观察幼年大鼠视皮层神经元的适应性. 图 1a 即是我们所用的闪光刺激和所得到的诱发反应的原始图形, 可以看出, 刺激和反应两者的同步性很好. 图 1b 是 4 个频率的闪光刺激下所得到的幼年大鼠和成年大鼠的适应系数. 可以看出, 幼年大鼠的视皮层神经元适应系数在较高频率显著低于成年大鼠, 表现出较强的适应性, 而在两个较低的频率下两组之间没有显著性差异.

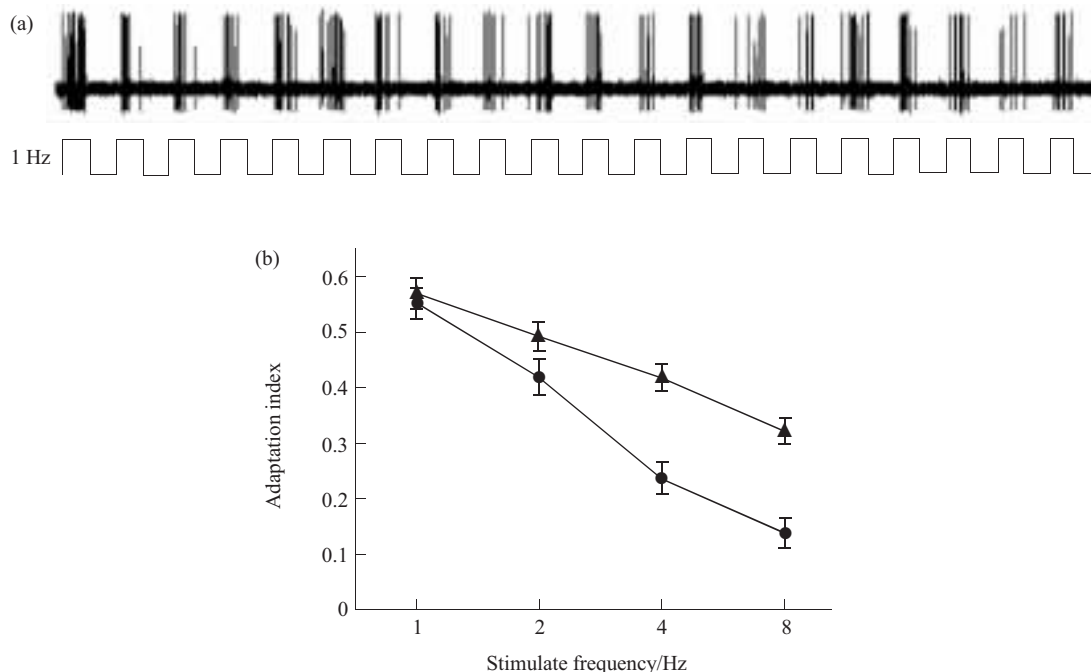


Fig. 1 An example of usual flash stimulus evoked responses and adaptation index of neurons in primary visual cortex
 (a) An example showing the visual responses of 1 Hz flash stimulus of a primary visual cortical neuron in young rat and the stimulus output DAC wave. The very well consistency could be seen. (b) The adaptation index (AI, the ratio of the average of the last five evoked response to the average of the first and second amplitude of the peak discharge) to flash stimulus at temporal frequencies of 1, 2, 4, 8 Hz. There are no significant difference of AI between young and adult rats in 1 Hz and 2 Hz, while significant difference in 4 Hz and 8 Hz between young and adult rats were found. ●—●: young; ▲—▲: adult.

2.2 信噪比

自发放电频率和信噪比也是皮层重要的电生理特性. 自发放电频率在某种程度上反映了细胞的噪音水平; 信噪比则与皮层神经元从噪音中分辨信号的能力有关. 我们所观察到的幼年 and 成年大鼠自发放电频率、诱发放电频率、信噪比等的对比见表 1. 由表 1 可见, 幼鼠的自发放电频率显著高于成年大鼠, 诱发放电频率则显著低于成年大鼠, 信噪比显著低于成年大鼠, 表明幼年视皮层神经元从噪音中分辨信号的能力较低.

Table 1 The spontaneous rate, peak response and signal to noise ratio of neurons in primary visual cortex of young and adult rats

	$\bar{x} \pm s$		
	Spontaneous rate (Action Pot./s)	Evoke response rate/ (Action Pot./s)	Signal to Noise
Young (n=40)	2.35±0.38	5.69±0.85	3.66±0.68
Adult (n=51)	1.38±0.17	12.54±1.49	11.58±1.16
Significance	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

The neurons in young rats exhibited higher spontaneous rate, lower evoked response rate and lower signal to noise ratio compared with neurons in primary visual cortex adult rats.

3 讨 论

在本实验中我们观察到, 与成年大鼠相比较, 处于关键期的幼年大鼠视皮层神经元的适应性更强、自发放电水平更高、诱发放电水平更低, 对信号的分辨能力更低(信噪比低).

在发育初期当神经元完成了组织发生并迁移到合适的位置之后, 就开始精密构筑它们的轴突和树突, 与靶细胞形成精密的突触连接, 从而初步建立起神经回路. 这个过程包括突触本身的成熟和突触的删减过程. Mower 等^[19]的研究结果表明, GABA 能系统的发育似乎不需要视觉输入. 这一结果在视觉系统和听觉系统上都得到了证明^[20]. Sutor 等^[1]认为, 大鼠出生后的视皮层突触发育是有效的兴奋性和抑制性突触依次表现出它们功能的过程. 形态学和电生理学的研究都表明, 在发育的早期, 锥体细胞通过间隙连接彼此联系, 未成熟的神经元由此相互通讯. 而在成熟的皮层中, 这种连接方式几乎消失, 被更有效的传递信息的单位——突触取代. 刚出生时, 兴奋性突触首先建立, 兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potentials, EPSPs)的时程较长, 对刺激表现出高度敏感性. 而自发的抑制性突触后电位(inhibitory postsynaptic potentials, IPSPs)在出生后的第一周开始出现, 这时人为给予 GABA 可以观察到和成熟的皮层上同样的神经反应. 诱发 IPSP 出现得更晚, 大约在出生后的第 10 天(P10)才能观察到. 在突触发生的最集中的一段时间, 即出生后第 11 天到第 20 天(P11~P20), GABA 能抑制系统发育, 锥体细胞神经元对传入兴奋的反应开始有了 EPSP 和 IPSP 两种成分. 事实上, 新皮层抑制性突触发育迟缓或功能不足会造成突触可塑性的增强和神经元活动的增强.

本实验所用动物为出生后 21~24 天的大鼠, 处于关键期刚开始的一周. 此时抑制性突触还未发育成熟, 视皮层神经元对连续闪光刺激的适应性比成年鼠强. 我们还观察到, 这种适应现象具有频率依赖性, 即随着频率的升高, 适应程度更大. 此外, 由于皮层细胞对刺激的反应不仅受丘脑-皮层输入的影响, 还受皮层-皮层间连接的影响^[21, 22], 我们推测, 持续刺激引起的反应减小可能是由于皮层细胞兴奋性突触的短时程抑制作用^[23, 24], 这种短时程抑制作用本身是频率依赖性的. 由于皮层细胞兴奋性突触受到抑制性突触的调制, 幼鼠的抑制系统发育不成熟会导致兴奋性突触的短时程抑制增强, 从

而表现出频率依赖性的适应性增强.

我们观察到的幼年大鼠视皮层神经元的自发放电频率和诱发放电频率, 也与皮层的兴奋性和抑制性突触发育不同步有关. 在没有接受光刺激的情况下, 由于抑制系统发育未成熟, 神经元的自发放电较多, 导致自发放电频率上升. 而在接受光刺激时, 未成熟的兴奋性突触传递效率较低, 导致在同样频率的持续刺激下, 幼年大鼠的视皮层神经元比成年大鼠诱发放电频率低. 这两个参数的变化直接导致了信噪比下降, 表明在突触回路尚未成熟之前, 视皮层神经元从噪音中分辨信号的能力尚未达到成年的水平. 相比于我们在老年大鼠上得到的结果, 老年大鼠的自发放电频率也比成年大鼠有显著提高, 其原因是 GABA 能抑制系统随衰老而功能下降, 与本实验中的幼年皮层的结果类似. 而老年大鼠的诱发放电频率与成年大鼠相比没有显著性差异, 也没有报道显示老年动物视皮层中的兴奋性突触有损伤, 这一点和幼年大鼠的情况不同. 在关键期的发育中, 视皮层经历了一个突触删减的过程, 正确而有效的突触连接被保留, 不必要的突触连接消失, 以强化对经常接受到的信号的分辨能力, 本文结果表明, 未成熟的视皮层神经元尚未达到对信号分辨的正常功能水平.

参 考 文 献

- 1 Sutor B, Luhmann H J. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol*, 1995, **2** (4): 409~419
- 2 Rozas C, Frank H, Heynen A J, *et al.* Developmental inhibitory gate controls the relay of activity to the superficial layers of the visual cortex. *J Neurosci*, 2001, **21** (17): 6791~6801
- 3 Murphy K M, Beston B R, Boley P M, *et al.* Development of human visual cortex: A balance between excitatory and inhibitory plasticity mechanisms. *Dev Psychobiol*, 2005, **46** (3): 209~221
- 4 Bear M F, Kleinschmidt A, Gu Q A, *et al.* Disruption of experience-dependent synaptic modifications in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *J Neurosci*, 1990, **10** (3): 909~925
- 5 Tsumoto T, Hagihara K, Sato H, *et al.* NMDA receptors in the visual cortex of young kittens are more effective than those of adult cats. *Nature*, 1987, **327** (6122): 513~514
- 6 Monyer H, Burnashev N, Laurie D J, *et al.* Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 1994, **12** (3): 529~540
- 7 Sheng M, Cummings J, Roldan L A, *et al.* Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*, 1994, **368** (6467): 144~147
- 8 Tovar K R, Westbrook G L. The incorporation of NMDA receptors

- with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses *in vitro*. *J Neurosci*, 1999, **19** (10): 4180~4188
- 9 Quinlan E M, Philpot B D, Haganir R L, *et al.* Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex *in vivo*. *Nat Neurosci*, 1999, **2** (4): 352~357
 - 10 Guo Y, Kaplan I V, Cooper N G, *et al.* Expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) during postnatal development of the cat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res*, 1997, **103** (2): 127~141
 - 11 Hornung J P, Fritschy J M. Developmental profile of GABAA-receptors in the marmoset monkey: expression of distinct subtypes in pre- and postnatal brain. *J Comp Neurol*, 1996, **367** (3): 413~430
 - 12 Sala R, Viegi A, Rossi F M, *et al.* Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci*, 1998, **10** (6): 2185~2191
 - 13 Huang Z J, Kirkwood A, Pizzorusso T, *et al.* BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, 1999, **98** (6): 739~755
 - 14 Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, **10** (1): 138~145
 - 15 Ramoa A S, Sur M. Short-term synaptic plasticity in the visual cortex during development. *Cereb Cortex*, 1996, **6** (4): 640~646
 - 16 Hua T M, Li X R, He L H, *et al.* Functional degradation of visual cortical cells in old cats. http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525480/description#description, 2005-01-31
 - 17 Leventhal A G, Wang Y C, Pu M L, *et al.* GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*, 2003, **300** (5620): 812~815
 - 18 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd. New York: Academic Press, 1986. 32~39
 - 19 Mower G D, Rustad R, White W F. Quantitative comparisons of gamma-aminobutyric acid neurons and receptors in the visual cortex of normal and dark-reared cats. *J Comp Neurol*, 1988, **272** (2): 293~302
 - 20 Gao W J, Wormington A B, Newman D E, *et al.* Development of inhibitory circuitry in visual and auditory cortex of postnatal ferrets: immunocytochemical localization of calbindin- and parvalbumin-containing neurons. *J Comp Neurol*, 2000, **422** (1): 140~157
 - 21 Douglas R J, Koch C, Mahowald M, *et al.* Recurrent excitation in neocortical circuits. *Science*, 1995, **269** (5226): 981~985
 - 22 Chung S, Ferster D. Strength and orientation tuning of the thalamic input to simple cells revealed by electrically evoked cortical suppression. *Neuron*, 1998, **20** (6): 1177~1189
 - 23 Finlayson P G, Cynader M S. Synaptic depression in visual cortex tissue slices: an *in vitro* model for cortical neuron adaptation. *Exp Brain Res*, 1995, **106** (1): 145~155
 - 24 Galarreta M, Hestrin S. Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci*, 1998, **1** (7): 587~594

Neural Response Characteristic of Neuron to Flashing Stimulus in Visual Cortex of Young Rats*

XIE Xiao-Qiao, WANG Hao, CHEN Bo, ZHOU Yi-Feng**

(Vision Research Laboratory, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract Mammalian visual system develops after birth. In rats, postnatal 3 to 5 weeks are critical for their development (namely, critical period), during which the excitatory and inhibitory synapses mature to form functional circuits in visual cortex. Extracellular single-unit recording techniques were used *in vivo* to investigate the difference of response characteristics of between neurons in young and adult rats' primary visual cortexes. It was found that: (1) The adaptation to sustaining flashing stimuli is significantly higher in neurons of young rats; (2) The evoked response rate of young visual cortex neurons is significantly lower than that of adult rats; (3) The spontaneous rate (without flashing stimuli) is significantly higher in young instead of adult rats; (4) Signal to noise ratio (SNR) is significantly lower in young visual cortex. These results indicate that the response capability to continued stimuli and the detectability is lower in developing visual cortex. It might result from the sequential development of excitatory and inhibitory synapses in postnatal rat neocortex.

Key words adaptation, signal-to-noise, excitatory synapse, inhibitory synapse, visual cortex, critical period

*This work was supported by Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0586) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education.

**Corresponding author. Tel: 86-551-3601436, Fax: 86-551-3607014, E-mail: zhouy@ustc.edu.cn

Received: May 16, 2005 Accepted: July 6, 2005