

基础研究

耳蜗核前腹核丛细胞的功能修饰先于听觉的建立

钟圣辉, 张正刚, 傅鸣宇, 杨娟, 肖中举

南方医科大学基础医学院生理学教研室, 广东 广州 510515

摘要:目的 通过全细胞膜片钳技术研究新生SD乳鼠耳蜗核前腹核(AVCN)中丛细胞在发育过程中的电生理特性变化。方法 运用全细胞膜片钳记录出生后5~21 d的SD乳鼠耳蜗核前腹核中丛细胞的动作电位(AP)反应及微小兴奋性突触后电流(mEPSC),再通过相关数据采集及分析软件分析动作电位半峰宽和mEPSC的10%~90%上升时间(10%~90% Risetime)及时间常数,并对此做进一步统计分析处理,进而比较不同年龄段新生SD乳鼠的耳蜗核前腹核中丛细胞的电生理反应特性。结果 在丛细胞动作电位半峰宽的统计分析中发现,丛细胞动作电位的时间精确性随着出生后年龄的增加而增加,在听觉建立(出生后12 d)附近变化停止。丛细胞mEPSC的时间精确性也随着出生后年龄的增加而增加,在听觉建立附近变化停止。结论 耳蜗核前腹核中丛细胞功能修饰先于听觉的建立。

关键词:耳蜗核前腹侧核;丛细胞;发育;电生理

Functional refinement of bushy cells in the anterior ventral cochlear nucleus precedes hearing onset in neonatal rats

ZHONG Shenghui, ZHANG Zhenggang, FU Mingyu, YANG Juan, XIAO Zhongju

Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the development of the electrophysiological property of bushy cells in the anterior ventral cochlear nucleus (AVCN) of neonatal Sprague Dawley (SD) rats. **Methods** The development of action potential and spontaneous miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) in AVCN bushy cells were investigated by whole-cell patch-clamp technique in SD rats during the postnatal days 5-21 (P5-21). The half band width of the action potential (AP), 10%-90% risetime and decay tau of the mEPSCs were analyzed. **Results** The AP of the bushy cells became faster with age from P5 to P21 and stopped changing around the period of hearing onset, as evidenced by the alteration of half band width of the AP. The time accuracy of mEPSCs of the bushy cells also increased with age and stabilized around hearing onset as shown by briefer 10%-90% rise time and decay tau of mEPSCs in P14/P21 than in P7. **Conclusion** The functional refinement of the bushy cells in the AVCN precedes hearing onset in neonatal rats.

Key words: anterior ventral cochlear nucleus; bushy cells; development; electrophysiological property

听觉中枢始于低位脑干的耳蜗核,几乎所有的听神经纤维都在耳蜗核转换神经元,然后投射到高位中枢^[1]。传统将耳蜗核分成3个亚核:即背核、前腹核和后腹核。在耳蜗前腹侧核中,存在两种类型主细胞,即丛细胞(BC)和星形细胞(SC)。在啮齿类动物的研究中发现,从斜方体内侧核(MNTB)到外上橄榄核(LSO)的抑制性输入的功能修饰在动物出生1周期间就已经广泛存在了^[2]。AVCN到LSO兴奋性输入的功能优化,也被证实出现在一个类似的时期。该时期功能优化主要表现在兴奋性输入中N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)成分减少, α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-

hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)成分增加^[3]。但是,就耳蜗前腹侧核中两种主细胞之一的丛细胞自身在出生后发育过程中细胞反应特性有何种变化,还没有一个详尽的研究。AVCN作为听神经输入的初级站点,其自身在发育过程中的变化对于整个听觉通路的发育变化及信息处理有着重大影响。因此,本研究有助于阐明听觉传导通路在发育过程中可塑性的机制,为研究听觉上行通路发育过程中可塑性提供基础。

1 材料和方法

1.1 脑片制备

实验采用5~21 d的SD新生大鼠,乙醚麻醉后快速断头,剥取脑组织置于0~4℃冰水混合物中急速冷却2 min。迅速修饰脑组织后固定,移入人工脑脊液(ACSF, pH=7.4)的4℃冰水混合物中做脑干冠状切片,脑片厚度250 μ m(切片机:Vibratome 1200 Series, Leica, 德国)。选取含AVCN的脑片,迅速将其移入含

收稿日期:2014-02-15

基金项目:国家自然科学基金(31171059)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31171059).

作者简介:钟圣辉,在读硕士研究生,E-mail: zhongsh1988@126.com

通信作者:肖中举,硕士,博士生导师,教授,电话:020-61648604, E-mail: xiaozj@fimmu.com

37 ℃人工脑脊液孵育槽中孵育 30 min。孵育完成后,将含有脑片的孵育槽转移至室温(25 ℃)恢复 30 min。整个制备和孵育过程,脑片所处的人工脑脊液都用混合气(95% O₂/5% CO₂)持续供给。人工脑脊液成分(mmol): 132 NaCl, 2.5 KCl, 1.4 MgSO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 20 NaHCO₃, 15 D-glucose, 3 HEPE, 2 CaCl₂。所有的化学试剂均来自 Sigma。

1.2 电生理鉴别 AVCN 中细胞类型

将脑片置于 0.5 ml 的记录槽内,室温下持续通氧(95% O₂/5% CO₂),人工脑脊液灌流。记录槽内灌流液采用温度自动控制器(TC-344B, WARNER)保持恒温循环灌流。在红外光差显微镜下,通过微操纵器 MP225(SUTTER, USA)使玻璃微电极接触细胞并施加负压形成高阻封接(大于 1 GΩ),稳定后破膜形成全细胞记录。形成全细胞记录后,在电流钳模式下向神经元细胞内注入-100 pA 到+500 pA 的步阶电流刺激用以判断细胞类型,步阶间隔 10 pA,步阶间隔时长 3 s。记录玻璃微电极由 P-97(SUTTER, 美国)型拉制仪拉制,填充电极内液后阻抗为 4~8 MΩ。电极内液成分(mmol): 140 K-gluconate, 4.5 MgCl₂, 5 EGTA, 4 Mg-ATP, 0.3 GTP, 4.4 Phosphocreatine disodium salt hydrate, 9 HEPE。所有配电极内液用的化学试剂均来自 Sigma。刺激与记录系统:EPC 10(HEKA, 德国)。数据采集软件:Patchmaster(HEKA, 德国)。

1.3 动作电位半峰宽的分析

选取阈强度去极化电流刺激下的动作电位进行分析。将动作电位阈值定义在膜电压变化速率大于或等于 50 V/s 的膜电位点^[4]。半峰宽的计算:半峰电位=(峰值电位+阈值电位),半峰宽=AP 下降支半峰时间-AP 上升支半峰时间(注:半峰时间对应半峰电位处记录时间)。

1.4 mEPSCs 的记录和分析

判断细胞类型后,将 Patchmaster 的记录模式转换至电压钳,并将钳制电压设定在-60 mv,稳定 3 min 后持续记录自发放。我们在记录液中加入 strychnine (1 μmol/L)和 gabazine (10 μmol/L),用以阻断甘氨酸能和伽马氨基丁酸能反应,目的是分离出 mEPSCs。我们通过 mEPSCs 的专用分析软件 MiniAnalysis 分析自发放,mEPSCs 的筛选模板参数设定是参照已有相关研究的同类神经元 mEPSCs 的均值^[5],检测限设定在噪声标准差的 2.5~4 倍。

1.5 细胞形态鉴别

1.5.1 biocytin 标记细胞 在记录电极内液中加入 0.25% 的 biocytin(sigma)标记 AVCN 神经元,形成全细胞记录后,电极内液中的 biocytin 可自行扩散至整个细胞。破膜后 10~15 min 即提起电极,再进行下一个神经元的记录。为了获得更好的标记效果,保证标记细胞的

完整形态,从标记脑片开始到固定完成的时间限定在 30 min 内。

1.5.2 CY3 荧光染色 用 0.4% 多聚甲醛固定完成标记脑片过夜,然后 PBS 清洗 3 次,每次 3 min。清洗完毕,加入 500 μl 的 0.3% Triton X-100,室温孵育 1.5 h 后,用 PBS 清洗(3×3 min)。加入 CY3(使用稀释比例为 1:200) 500 μl,室温避光孵育 4 h 后,PBS 清洗(3×3 min)。用吸管将脑片移到载玻片上,待脑片自然风干用抗荧光衰减封片剂封片。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,实验数据以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Post hoc Fisher 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

采用全细胞电流钳记录耳蜗前腹侧核中的神经元,共记录到 76 个丛细胞。

2.1 耳蜗前腹侧核中丛细胞和星形细胞的基本电生理反应特性及鉴别

当向丛细胞注入持续的阈上去极化电流,其动作电位主要发生在刺激的初始时间且只有一个或少数几个。与之相对的是,当向星形细胞注入持续的阈上去极化电流,细胞呈多个动作电位发放的基本模式。

2.2 AVCN 中丛细胞和星形细胞的形态鉴别

在耳蜗核前腹侧核中,丛细胞有短的丛状树突,细胞胞体较圆。星形细胞具有长的枝状树突,树突投射很宽泛。图 2 中,左侧是两个典型的丛细胞,具有较短的树突,其上部细胞电生理鉴别对应于图 1 左侧动作电位发放模式。图 2 右侧是两个典型的星形细胞,其右侧细胞电生理鉴别对应于图 1 右侧动作电位发放模式。由此,以神经元的动作电位发放模式和形态特征把 AVCN 中的神经元分为丛细胞和星形细胞。其中,丛细胞是本实验研究的目标神经元。

2.3 AVCN 中丛细胞在发育过程中动作电位半峰宽的变化

全细胞电流钳记录了 AVCN 中 76 个丛细胞的动作电位,分析统计了所有丛细胞的动作电位半峰宽。由图 3 中 A 图我们可以发现,SD 乳鼠丛细胞的动作电位半峰宽从出生后 5~12 d 程大幅减小的趋势,而在出生后 12~21 d 无明显变化趋势。将 76 个丛细胞的动作电位半峰宽分为 P5-7、P8-12、P13-15、P16-21 四个年龄段进行统计分析比较,其中 P5-7 年龄段的动作电位半峰宽为 2.04 ± 0.68 ms ($n=14$),P9-12 为 1.10 ± 0.41 ms ($n=19$),P13-15 为 0.75 ± 0.15 ms ($n=16$),P16-21 为 0.79 ± 0.25 ms ($n=27$)。各年龄组进行比较,除了 P13-15 与 P16-21 年

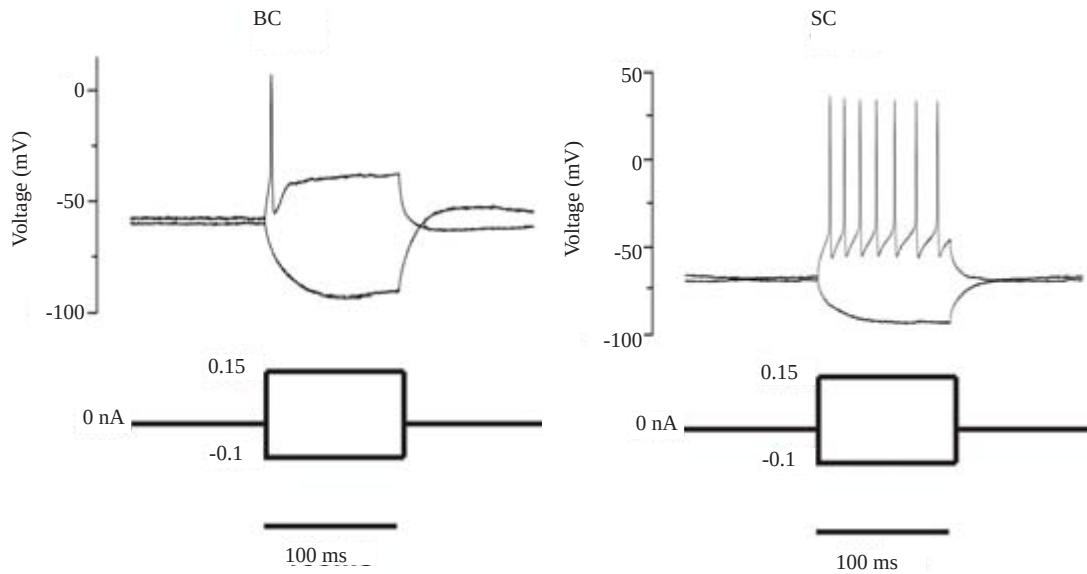


图1 AVCN中两种主细胞的电生理鉴别

Fig.1 Electrophysiological identification of AVCN neurons. BC: Bushy cell; SC: Stellate cell.

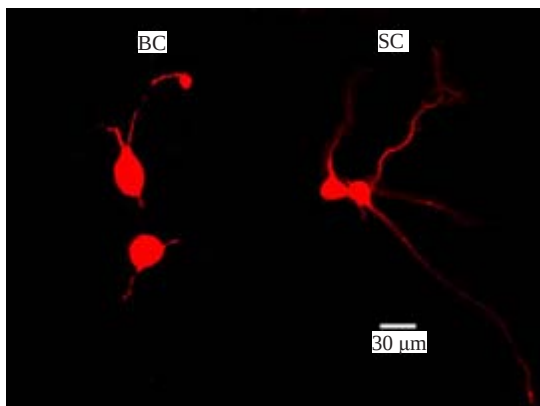


图2 AVCN中丛细胞和星形细胞的形态鉴别

Fig.2 Morphological identification of bushy cells and stellate cells in the AVCN.

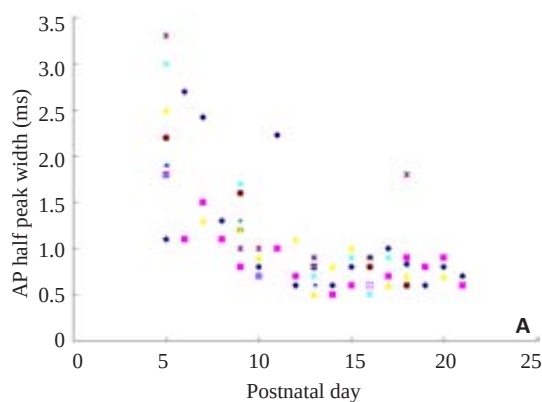


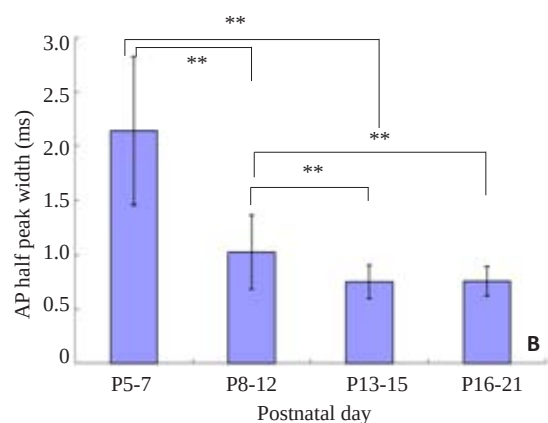
图3 AVCN中丛细胞的动作电位半峰宽随年龄的变化

Fig.3 Age-related changes in the half band width of action potentials of the bushy cells in the AVCN. A: one dot represents one cell and some dots overlap because of the same value. B: Significant differences are found between groups P5-7, P8-12, P13-15, and P16-21 ($P<0.05$), but not between P13-15 and P16-21 ($P=0.88$).

龄组间无显著性差异($P=0.88$),其他各年龄组间均存在显著性差异($P<0.05$)。

2.4 AVCN中丛细胞在发育过程中mEPSCs的变化

图4显示的是AVCN中丛细胞在发育过程中mEPSCs的变化,每个细胞记录时长10 min。其中,P7记录了5个丛细胞的mEPSCs,P14记录了7个丛细胞,P21记录了5个丛细胞。图D和图E分别比较了不同年龄SD乳鼠丛细胞mEPSCs 10%~90%上升时间均值和时间常数。图D中P7年龄组的mEPSCs 10%~90%上升时间显著大于P14和P21年龄组($P<0.05$),P14和P21年龄组间无显著性差异($P=0.85$)。图E中P7年龄组mEPSCs时间常数显著大于P14和P21年龄组($P<$



0.05),P14和P21年龄组间无显著性差异($P=0.94$)。
该实验结果在一定程度上证明,听神经与丛细胞的

突触功能成熟也发生在听觉建立附近。

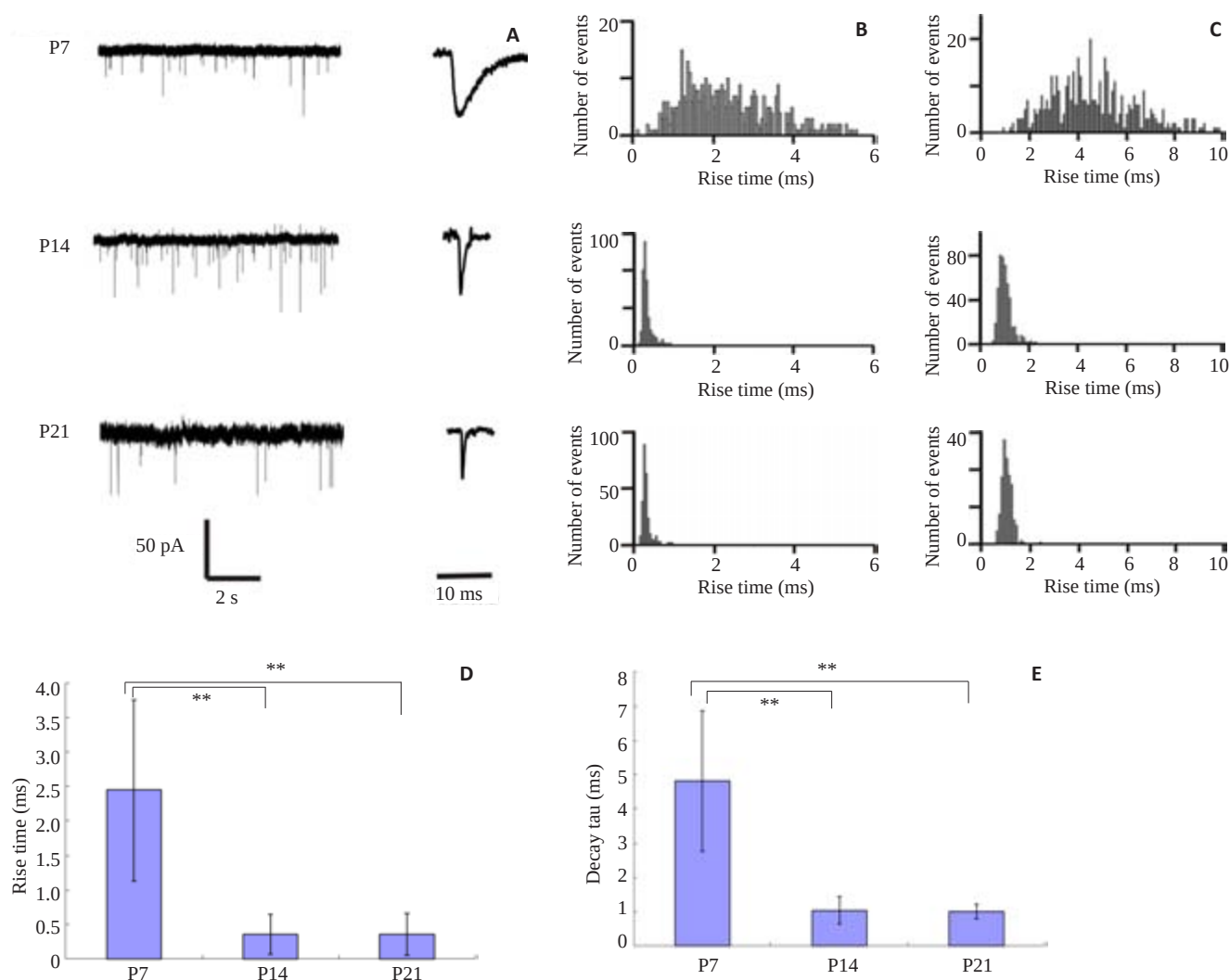


图4 不同年龄SD大鼠AVCN中丛细胞mEPSCs的时间精确性比较

Fig.4 Comparison of the time accuracy of bushy cell mEPSCs in the AVCN of SD rats of different ages. *A*, left: Three original chart recordings of mEPSCs of AVCN bushy cells from rats at P7, P14 and P21. Right: Averaged traces from mEPSCs of 3 individual cells, normalized to their peaks. *B-D*: Histogram distributions of mEPSC 10%-90% rise time (bin width of 50 μ s) and decay time constant of all events of all cells (5, 7, and 5 cells for P7, P14 and P21, respectively) at the 3 different ages. *D*: mEPSCs of bushy cells recorded from P21 rats became significantly faster than those from P7 rats shown by 10%-90% shorter rise time of mEPSCs. The difference between P14 and P21 is not significant ($P=0.94$). *E*: Decay tau of mEPSCs became progressively smaller from P7 to P21. Significant differences were detected by ANOVA ($P<0.05$), and post hoc Fisher's tests show that decay tau at P14 was significantly smaller than that at P7, and that at P21 was also significant smaller than that at P7, but no significant difference was found between P14 and P21 ($P=0.85$).

3 讨论

耳蜗将声音信息转化为电信号,经听神经向听觉中枢传递信息。在听觉脑干环路中,来自于听神经的信息在AVCN转换后上行输入到听觉中枢脑干核团LSO。与之相对应,来自于对侧的AVCN兴奋性信号在MNTB转换成抑制性信号传递至同侧的LSO。在较早的研究中发现,大鼠出生后12~14 d是其耳蜗发育的关键期^[6]。在已有的SD大鼠听觉研究中表明,从出生后第3天到听觉建立(P12)这段时期,来自于耳蜗的自发活动稳定增加^[7-9]。在AVCN到LSO功能通路的研究中发现,该通路的功能修饰发生在相似的时期^[3]。也有研

究认为该自发活动指导着MNTB到LSO通路的功能修饰^[10]。在成年动物里,MNTB-LSO的输入是纯粹的甘氨酸能输入。在新生动物的MNTB-LSO突触输入,既有GABA能成分又有甘氨酸能成分^[11]。而且,在非成熟的大鼠MNTB-LSO通路突触中存在着短暂的谷氨酸递质共释放时期,且共释放的最高峰发生在出生后第8天^[12]。在针对纯合子Circling小鼠的研究中发现,在其出生后10 d就存在着耳蜗退化和外毛细胞静纤毛缺失的现象^[13]。在之后的研究中又发现,不同于正常动物,Circling小鼠MNTB-LSO通路突触谷氨酸递质共释放可持续到出生后第16天甚至更晚^[14]。以上研究提示,

听觉中枢脑干听觉通路的功能修饰在一定程度上依赖于耳蜗的输入。这也启示我们,AVCN中神经元的功能修饰具有耳蜗输入的依赖性,那么其功能修饰的关键期与VCN到LSO、MNTB到LSO通路的功能修饰关键期可能与耳蜗功能成熟的时间窗相契合。

在对小鼠的研究中发现,听觉建立前切除耳蜗可显著改变AVCN丛细胞的突触连接,但是在听觉建立后切断耳蜗输入却不能显著影响丛细胞突触功能的发育和突触连接^[15]。由此证明,小鼠中AVCN丛细胞的功能成熟具有耳蜗依赖性,且这种依赖性在听觉建立前表现显著。此前对大鼠AVCN丛细胞的功能发育还知之甚少,在本实验研究中,我们选取出生后5~21 d的SD大鼠,将含AVCN的离体脑片作为研究载体,分析了AVCN中丛细胞的动作电位和mEPSCs。动作电位半峰宽的变化可以很好地反应突触后神经元细胞膜上钾钠通道的成熟过程,因此在研究中统计分析不同年龄和年龄段AVCN中丛细胞的动作电位半峰宽来观察突触后神经元的成熟过程。我们发现,出生后5 d到听觉建立(P12)这一时期丛细胞的动作电位的时间精确性显著增加,且在听觉建立时变化趋于停止。这一结果表明,AVCN中丛细胞自身的功能修饰与VCN到LSO、MNTB到LSO通路的功能修饰发生在相似的时间窗。不同年龄段大鼠AVCN中丛细胞mEPSCs的时间精确性可以反应突触前释放递质作用于突触后神经元这一信息传递过程的成熟度。因此,我们统计比较了P7、P14、P21三个年龄组SD大鼠AVCN中丛细胞的mEPSCs的10%~90%上升时间和时间常数。分析比较中发现,P14、P21年龄组mEPSCs的上升时间和时间常数均显著高于P7年龄组($P<0.05$),而P14与P21年龄组之间无显著性差异($P>0.1$)。该研究结果表明,AVCN中丛细胞突触前的部分功能修饰在听觉建立时也已基本完成,听神经与丛细胞的突触功能连接成熟发生在听觉建立附近。综上所述,听神经到AVCN与VCN到LSO、MNTB到LSO通路的功能修饰均发生在相似的时间窗,AVCN中主神经元丛细胞的功能成熟发生在听觉建立附近。这提示,上述3个功能通路的修饰可能运用了同一套机制或是同一种物质,这将在后续的研究中有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Brown MC, Ledwith JV. Projections of thin (type-II) and thick (type-I) auditory-nerve fibers into the cochlear nucleus of the mouse [J]. *Hear Res*, 1990, 49(1/3): 105-18.
- [2] Case DT, Gillespie DC. Pre- and postsynaptic properties of glutamatergic transmission in the immature inhibitory MNTB-LSO pathway[J]. *J Neurophysiol*, 2011, 106(5): 2570-9.
- [3] Case DT, Zhao X, Gillespie DC. Functional refinement in the projection from ventral cochlear nucleus to lateral superior olive precedes hearing onset in rat[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20756.
- [4] Kole MH, Stuart GJ. Is action potential threshold lowest in the axon [J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(11): 1253-5.
- [5] Gardner SM, Trussell LO, Oertel D. Time course and permeation of synaptic AMPA receptors in cochlear nuclear neurons correlate with input[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(20): 8721-9.
- [6] Marcotti W, Kros CJ. Developmental expression of the Potassium current I_K , n contributes to maturation of mouse outer hair cells[J]. *J Physiol*, 1999, 520(Pt 3): 653-60.
- [7] Kros CJ, Ruppersberg JP, Rüsch A. Expression of a Potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice[J]. *Nature*, 1998, 394(6690): 281-4.
- [8] Beutner D, Moser T. The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(13): 4593-9.
- [9] Tritsch NX, Yi E, Gale JE, et al. The origin of spontaneous activity in the developing auditory system [J]. *Nature*, 2007, 450 (7166): 50-5.
- [10] Sanes DH, Takács C. Activity-dependent refinement of inhibitory connections[J]. *Eur J Neurosci*, 1993, 5(6): 570-4.
- [11] Korada S, Schwartz IR. Development of GABA, glycine, and their receptors in the auditory brainstem of gerbil: a light and electron microscopic study[J]. *J Comp Neurol*, 1999, 409(4): 664-81.
- [12] Gillespie DC, Kim G, Kandler K. Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(3): 332-8.
- [13] Chung WH, Kim KR, Cho YS, et al. Cochlear pathology of the circling mouse: a new mouse model of DFNB6 [J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(3): 244-51.
- [14] Hong SH, Kim MJ, Ahn SC. Glutamatergic transmission is sustained at a later period of development of medial nucleus of the trapezoid body-lateral superior olive synapses in circling mice[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(48): 13003-7.
- [15] Lu Y, Harris JA, Rubel EW. Development of spontaneous miniature EPSCs in mouse AVCN neurons during a critical period of afferent-dependent neuron survival[J]. *J Neurophysiol*, 2007, 97(1): 635-46.

(编辑:吴锦雅)