

C57BL/6 小鼠听皮层脑片的长时程增强特性

毛玉婷, 臧绍云, 孙心德

(华东师范大学生命科学学院脑科学研究中心, 上海 200062)

摘要: 采用脑片细胞外记录群体细胞兴奋性突触后电位方法, 在成年 C57BL/6 小鼠听皮层上, 研究长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 特征。用 100 Hz 高频电脉冲刺激听皮层白质, 可在听皮层灰质 II/III 层记录到明显的 LTP。根据条件刺激后 LTP 的变化特征, 将其分为缓慢上升 (A 类) 和短暂快速上升 (B 类) 两种类型。使用模拟的 θ 节律刺激参数, 可更有效地诱导听皮层 LTP, 其群体细胞兴奋性突触后电位斜率增加更为明显 ($P < 0.01$), 诱导成功率也更高。

关键词: C57BL/6 小鼠; 听皮层; 脑片; 高频电刺激; θ 节律刺激; 长时程增强

中图分类号: Q424

1 引言

自 20 世纪 40 年代末 Hebb 提出学习与记忆的突触修饰理论以来, 突触部位的功能可塑性已成为学习与记忆研究领域的重要内容。Bliss 等^[1]在兔的海马齿状回上, 首次发现了突触传递的长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 现象, 为在突触水平研究学习与记忆的神经过程提供了一个良好的实验模型。其后, LTP 作为学习与记忆的电生理指标被广泛应用。已知海马是哺乳动物学习与记忆的重要脑区, 在短时记忆过程中具有重要作用, 以往 LTP 的研究多集中在海马。近年来, 新皮层的 LTP 研究也开始增多, 并发现 LTP 在不同的皮层表达程度不同。本文在 C57BL/6 小鼠听皮层观察了 LTP 特征, 为进一步研究听觉模态的学习与记忆的神经生理学机制提供实验依据。

2 材料和方法

2.1 实验动物

健康 C57BL/6 小鼠, 雌雄不拘, 生后 6~8 周, 体重 28~36 g。

2.2 听皮层脑片制备和孵育

实验当天配制新鲜的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)。参照 Thomas 等^[2]的实验方法, 配方 (mmol/L) 为: NaCl 124, KCl 4.4, NaH_2PO_4 1, NaHCO_3 25, MgSO_4 1.2, CaCl_2 2, Dextrose 10, pH 为 7.4。实验前半小时

准备两份 ACSF, 一份放入冰浴, 保持 1~4°C, 另一份常温, 都通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体, 备用。

动物直接迅速断头, 沿头部矢状缝剪开皮肤并剥去两侧顶骨、颞骨和硬脑膜, 将脑组织块取出, 置于 1~4°C 的 ACSF 中。平衡 2 min 后, 用 502 瞬间粘合剂固着于切片台 (小鼠专用 Tissue slicer 切片台) 上的琼脂薄片上, 手动切片, 切片厚度为 400 μm 。选取含听皮层的切片 (3~4 片) 移入氧饱和 ACSF 中, 逐步升温至 32~33°C, 孵育 1~2 h。

脑片孵育后, 全部转移到全浸式记录槽的尼龙网上, 调整好位置, 加盖另一张尼龙网以固定脑薄片, 氧饱和的 ACSF 经恒流泵匀速推动, 以 2.5 ml/min 的流速灌流, 由入水口进入内槽, 浸没脑片, 再由对侧出水口流出。外槽盛恒温蒸馏水, 以保持内槽温度恒定。整个过程中, 保持 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体通入 ACSF 内, 温度维持在 32~33°C^[3,4]。

2.3 听皮层脑片 LTP 记录

电刺激信号由 MASTER-8 刺激器产生, 经刺激隔离器 (ISO-FLEX) 输出到刺激电极。按照

收稿日期: 2003-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170313), 博士点基金项目 (20020269005) 和上海市重点学科项目

通讯作者: 孙心德, 电话: (021)62232775,

E-mail: xdsun@bio.ecnu.edu.cn

C57BL/6小鼠的脑图谱,在微操纵仪(MX7600)的控制下,将刺激电极置于初级听皮层与灰质相邻的白质处^[5-7]。刺激电极是双股绞合的绝缘镍铬丝,尖端直径为0.07 mm。记录电极为玻璃微电极,尖端直径1.0~1.5 μm ,阻抗10~20 M Ω ,内充以3 mol/L KCl。借助微操纵仪,在手术显微镜的监视下将记录电极尖端插入听皮层A1区II/III层。信号经前置放大器(ISO-DAM)和后置放大器输入电脑,由AVERAGE软件采集储存,并对信号进行数据测量。

测试刺激的参数为:频率1 Hz,波宽50 μs ,强度调整到使引出的兴奋性突触后场电位(field excitatory post-synaptic potential, fEPSP)幅度为最大fEPSP幅度的1/2~2/3。fEPSP稳定30 min后,给予条件刺激诱发LTP。诱发LTP的高频电刺激(high frequency stimulation, HFS)参数为:100 Hz,100个脉冲的串刺激三串,串间隔31 s。 θ 节律刺激(theta burst stimulation, TBS)参数为:100 Hz,5个脉冲为一串,11个串,串频率为5 Hz,串间隔为5.2 s,重复三次。HFS和TBS结束之后,分别测试刺激监测fEPSP的变化。观察1~2 h。以fEPSP增幅达到20%以上、持续时间超过1 h,判断为LTP诱出。

2.4 数据处理

将测试刺激记录到的结果,每4 min平均一次,以条件刺激前30 min内的fEPSP斜率平均值为100%,条件刺激前后各时间点记录的fEPSP斜率均值与之比较,以百分数(%)表示。实验结果表示为:平均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm\text{SEM}$)。HFS与TBS数据比较: t 检验, $P<0.05$ 为有显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

3 结 果

3.1 听皮层LTP特性

LTP诱导前,先记录稳定的fEPSP 30 min。在我们的实验条件下,诱导出的LTP明显的有两种形式,我们将其分为两类:

A类:从条件刺激开始到产生LTP,其fEPSP斜率缓慢上升,一般在2~5 min之内达到高峰,之后fEPSP一直维持在该水平,未见有明显强直后增强现象(posttetanic potentiation, PTP)。与刺激前相比,其斜率平均增加了163.84% \pm 2.25%

($n=17$),最大增幅达到200.09%,最小增幅为126.77%。记录两小时,斜率基本无显著变化(图1A)。

B类:从条件刺激开始到产生LTP,fEPSP先是迅速上升,表现出明显的PTP,然后在2~5 min之内下降到一定水平,之后fEPSP一直维持该水平。与刺激前相比,斜率平均增加了154.39% \pm 1.82%($n=19$),最大增幅达到188.38%,最小增幅为144.53%,在记录的两小时内,斜率基本无显著变化,LTP维持超过两小时(图1B)。

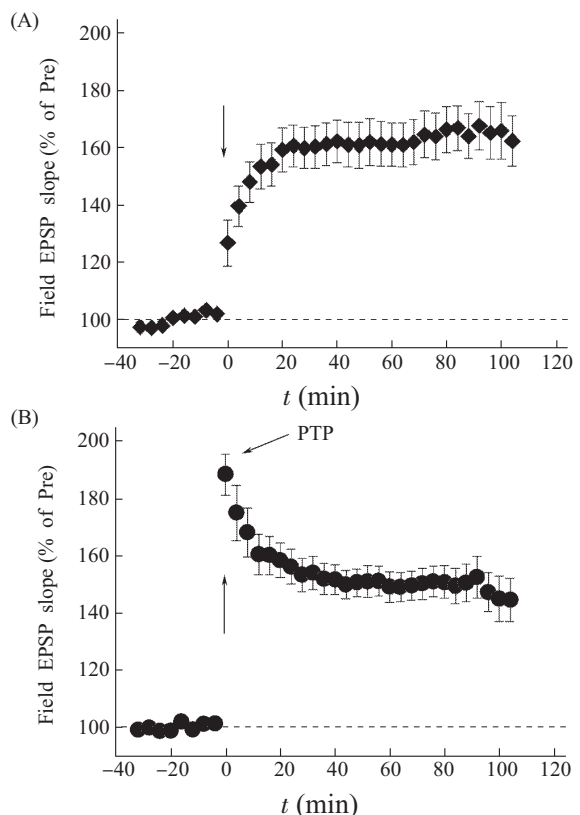


Fig.1 Two types of LTP in the auditory cortex of C57BL/6 mice. Arrows mark tetanic stimulation given. (A) Synaptic potentials are gradually potentiated without PTP ($n=17$); (B) Synaptic potentials are fast increased with PTP ($n=19$)

3.2 HFS和TBS诱导的LTP差异

实验材料为同一脑片,用不同的刺激参数诱导出LTP,比较TBS和HFS诱导的LTP的差异,发现TBS诱导的LTP比HFS诱导的LTP斜率增值更大。观察到TBS和HFS在两类LTP中的效应分别是:

A类:TBS诱导的LTP与刺激前相比,fEPSP斜率平均增大了171.57% \pm 2.50% ($n=6$,

图 2A-1), 最大增幅达到 217.78%, 最小增幅为 142.15%。HFS 诱导的 LTP, 与刺激前相比, fEPSP 斜率平均增大了 $159.64\% \pm 2.27\%$ ($n=11$, 图 2A-1), 最大增幅达到 187.80%, 最小增幅为 118.37%。 t 检验显示, 两者之间有极显著差异, $P < 0.01$ (图 2A-2)。

B 类: TBS 诱导的 LTP 与刺激前相比, fEPSP 斜率平均增大了 $158.95\% \pm 1.17\%$ ($n=8$, 图 2B-1),

最大增幅达到 185.89%, 最小增幅为 151.01%。HFS 诱导的 LTP, 与刺激前相比, fEPSP 斜率增大了 $150.93\% \pm 2.54\%$ ($n=11$, 图 2B-1), 最大增幅达到 190.40%, 最小增幅为 134.95%。 t 检验显示, 两者之间有极显著差异, $P < 0.01$ (图 2B-2)。

此外, 我们还观察到, TBS 诱导的成功率也比 HFS 诱导的成功率高, 前者诱导的成功率为 82.35%, 后者诱导的成功率则为 64.71%。

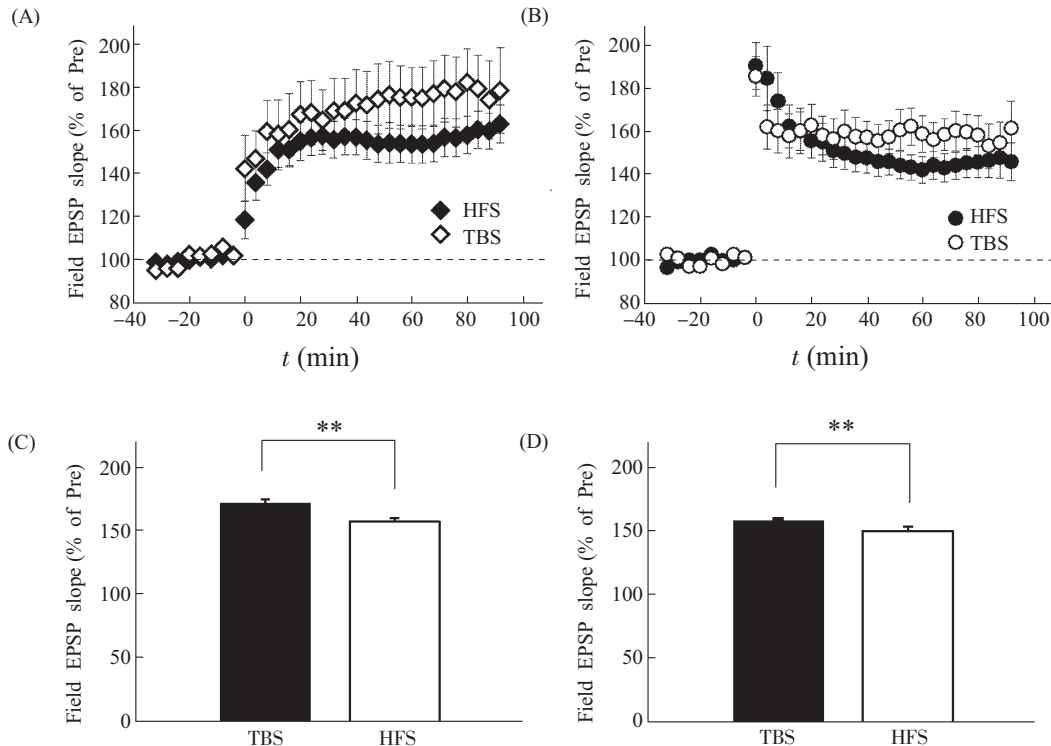


Fig.2 The differences between TBS-induced LTP and HFS-induced LTP. (A) Time courses of A type LTP in the auditory cortex slices by HFS ($n=11$) and TBS ($n=6$); (B) Time courses of B type LTP in the auditory cortex slices by HFS ($n=11$) and TBS ($n=8$); (C), (D) The average fEPSP slopes of TBS-induced LTP and HFS-induced LTP ($P < 0.01$)

4 讨 论

自 Bliss 和 Lomo 报道海马脑区突触传递长时程增强 (LTP) 现象以来, 不少学者推测, LTP 可能和学习与记忆的脑机制有关。继海马结构之后, 又陆续发现新皮层及皮层下若干脑区可诱导出 LTP, 特别是视皮层 LTP 已有不少报道^[8-10]。但听

皮层 LTP 的研究报道尚少。Kudoh 等曾报道, 强直刺激成年大鼠听皮层白质可在灰质 II/III 层诱导出 LTP^[5,6], 并发现听皮层诱导的 LTP 要比视皮层诱导的 LTP 大^[7]。我们在成年 C57BL/6 小鼠的听皮层上也诱导出 LTP, 进一步提示 LTP 现象可能广泛存在于哺乳动物各脑区, 至于它的生理学意义和产生的机制是否相同, 尚有待进一步研究。

通常认为, LTP 的形成不仅取决于脑区部位, 还取决于传入的刺激强度、频率等特征。在我们的

实验条件下, 在小鼠听皮层可明显观察到两种不同类型的 LTP。其中 A 类在条件刺激后 fEPSP 缓慢上升, 并保持在一定水平, 而 B 类则有明显的 PTP, 然后在十几分钟内逐渐下降到一稳定水平。这和在海马脑区所观察到的现象很相似。Derrick 等^[11]曾在海马苔藓纤维在体记录到 LTP 却未见有 PTP, 而 Malinow^[12]在体外记录则可见 PTP 和 LTP。在大鼠视皮层, Edagawa 等^[13]没有记录到 PTP, 突触电位在强直刺激后逐渐加强, 仅表现出如同我们记录到的 A 类神经元反应, 这可能因为不同脑区结构存在差异导致其表型的不同。Bliss^[14]曾认为弱的刺激可诱导出 PTP, 而强的刺激则诱导出 LTP。而一般认为 PTP 是由于大量的钙离子涌入胞内所致^[15], 剩余的钙离子则提高自身敏感性以维持强直刺激后短时间内大量的钙离子持续释放。因此推测 PTP 可能主要是突触前的机制^[16]。

本文选用的 TBS 条件刺激参数, 是模拟海马 θ 节律所设置的刺激参数。Staubli 等^[17]曾观察到, 使用 TBS 刺激大鼠外侧嗅束纤维, 会使动物产生嗅觉行为反应。蒋文等^[18]在大鼠上观察到, 训练后的动物, 海马 θ 节律增多, 并且与习得性 LTP 的形成相关。已有不少报道称, TBS 较 HFS 刺激诱导 LTP 更加有效^[19-21]。我们在小鼠听皮层上的实验显示, TBS 刺激参数所诱发的 LTP 效率要明显高于 HFS, 不管 A 类反应还是 B 类反应, 两种不同的刺激参数所诱发的 fEPSP 斜率都具有明显差异 ($P < 0.01$), 这显示, 类似于脑活动的自然频率可能更富有生物学意义, 至于其确切的神经机制尚有待深入研究。

参考文献:

- [1] Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 1973, 232(2):331~356
- [2] Thomas MJ, Watabe AM, Moody TD, Makhinson M, O'Dell TJ. Postsynaptic complex spike bursting enables the induction of LTP by theta frequency synaptic stimulation. *J Neuroscience*, 1998,18(18):7118~7126
- [3] 徐丽静, 孙心德. γ -氨基丁酸、谷氨酸等对蝙蝠中脑下丘薄片神经元诱发电活动的影响. *生物物理学报*, 1998,14(3):473~477
- [4] 冯瑞本, 孙心德. N-甲基-D天冬氨酸和 γ -氨基丁酸对蝙蝠下丘薄片诱发电活动的影响. *生物物理学报*, 2000,16(2):243~249
- [5] Kudoh M, Shibuki K. Long-term potentiation in the auditory cortex of adult rats. *Neurosci Lett*, 1994,171(1~2):21~23
- [6] Kudoh M, Shibuki K. Long-term potentiation of supragranular pyramidal outputs in the rat auditory cortex. *Exp Brain Res*, 1996,110(1):21~27
- [7] Kudoh M, Shibuki K. Comparison of long-term potentiation between the auditory and visual cortices. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1997,532:109~111
- [8] Artola A, Singer W. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature*, 1987,330(6149):649~652
- [9] Artola A, Singer W. The involvement of N-Methyl-D-Aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur J Neurosci*, 1990,2(3):254~269
- [10] Bear MF, Press WA, Connors BW. Long-term potentiation in slices of kitten visual cortex and the effects of NMDA receptor blockade. *J Neurophysiol*, 1992,67(4):841~851
- [11] Derrick BE, Martinez JL Jr. Frequency-dependent associative long-term potentiation at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994,91:10290~10294
- [12] Malinow R, Madison DV, Tsien RW. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature*, 1988,335:820~824
- [13] Edagawa Y, Saito H, Abe K. Serotonin inhibits the induction of long-term potentiation in rat primary visual cortex. *Proc Neuro-psychopharmacol & Biol Psychiat*, 1998,22(6):983~997
- [14] Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993,361:31~39
- [15] Zucker RS. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 1989,12:13~31
- [16] Zalutsky RA, Nicoll RA. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, 1990,248:1619~1624
- [17] Staubli U, Roman F, Lynch G. Selective changes in synaptic responses elicited in a cortical network by behaviorally relevant electrical stimulation. *Soc Neurosci Abstr*, 1985,11:837
- [18] 蒋文, 肖鹏, 徐世彤. 齿状回习得性 LTP 的形成与 θ 节律的变化. *生理学通报*, 1995,12(2):67
- [19] Brown RE, Rabe H, Reymann KG. (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) does not block theta burst-induced long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*, 1994,170(1):17~21
- [20] Vickery RM, Morris SH, Bindman LJ. Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. *J Neurophysiol*, 1997, 78(6):3039~3046
- [21] Yun SH, Mook-Jung I, Jung MW. Variation in effective stimulus patterns for induction of long-term potentiation across different layers of rat entorhinal cortex. *J Neurosci*, 2002,22(5):RC214

THE PROPERTIES OF LONG-TERM POTENTIATION IN THE AUDITORY CORTEX OF C57BL/6 MICE

MAO Yu-ting, ZANG Shao-yun, SUN Xin-de

(College of Life Science, Research Center for Brain Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Long-term potentiation of field excitatory post-synaptic potentials (fEPSP) in the auditory cortex of C57BL/6 mice was studied by extracellular recording technique. Tetanic stimulation of white matter produced LTP in layers II/III, which showed two kinds of properties. A type synaptic potential was gradually increased while B type potential was quickly increased following a lower stable level. Theta burst stimulation (TBS), which mimic natural spike burst could elicit LTP more effectively than high frequency stimulation (HFS) could. Both the slope and the incidence of TBS-induced LTP were larger than those of HFS-induced LTP ($P < 0.01$).

Key Words: C57BL/6 mice; Auditory cortex; Brain slice; High frequency stimulation; Theta burst stimulation; Long-term potentiation