

## · 实验研究 ·

# 小鼠视觉发育前关键期视皮层神经元反应特性与突触可塑性

史学锋 赵堪兴

300020 天津市眼科医院 天津市眼科学与视觉科学重点实验室 天津市眼科研究所 天津医科大学眼科临床学院

通信作者:赵堪兴, Email: zkx4260@vip. 163. com

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 04. 003

**【摘要】 背景** 人类及哺乳动物的视觉发育主要是在生后关键期内完成的,但此期并非是哺乳动物接受视觉经验刺激的最早期。小鼠等哺乳动物视觉发育的关键期前还存在前关键期。目前,前关键期视皮层神经元的反应特性及突触可塑性研究仍处于探索阶段。**目的** 探讨小鼠前关键期视皮层神经元的反应特性及突触可塑性特点。**方法** 选择生后 13~17 d 的 C57BL/6J 小鼠 48 只,分别采用在体膜片钳全细胞记录及离体脑片膜片钳全细胞记录法记录小鼠视皮层第 IV 层神经元的电生理反应。在体记录在小鼠麻醉下进行,在电流钳模式下给予步阶电流刺激,测量其在体膜反应特性。给予最优刺激参数的移动光棒刺激,测量其视觉诱发反应特性。完成在体实验后行离体实验,分别测量神经元离体膜反应特性及白质-第 IV 层通路刺激条件下的诱发反应特性。采用随机数字表法将实验动物随机分成 4 个组,各组雌雄比例分配均匀。每组测定 12 个细胞,按照刺激频率的不同分别行低频刺激(LFS)和高频刺激[θ 波脉冲刺激(TBS)]模式训练,按照刺激时序的不同进行突触前-后(pre-post)模式和突触后-前(post-pre)模式训练,在-70 mV 电压钳制下分别记录训练前后兴奋性突触后电流(EPSCs)。采用 pClamp 10 软件对原始数据进行预处理,采用 Matlab 2008a 软件进行统计分析。**结果** 在体成功记录的细胞数为 39 个,离体记录 48 个。在体和离体条件下视皮层第 IV 层神经元稳态平均发放动作电位(AP)个数分别为  $1.01 \pm 0.03$  和  $1.01 \pm 0.05$ , AP 阈值分别为  $(-40.2 \pm 3.2)$  mV 和  $(-39.6 \pm 2.0)$  mV,阈电流水平分别为  $(126.7 \pm 17.4)$  pA 和  $(129.6 \pm 17.5)$  pA,差异均无统计学意义(AP 数:  $t=0.512, P=0.610$ ; AP 阈值:  $t=-1.074, P=0.286$ ; 阈电流:  $t=-0.776, P=0.440$ )。在体最优视觉刺激条件下平均膜电位峰值幅度为  $(7.3 \pm 4.3)$  mV,未见 AP;离体最强通路刺激条件下平均膜电位峰值反应幅度为  $(6.4 \pm 2.8)$  mV,未见 AP,在体与离体记录的平均膜电位峰值幅度差异无统计学意义( $t=1.234, P=0.221$ )。离体条件下, LFS 训练前后 EPSCs 幅度分别为  $(138.1 \pm 51.9)$  pA 和  $(76.1 \pm 34.8)$  pA,差异有统计学意义( $t=4.437, P=0.001$ ),而 TBS 训练前后 EPSCs 幅度差异无统计学意义( $t=-0.756, P=0.466$ ), pre-post 训练前后 EPSCs 幅度分别为  $(122.4 \pm 62.2)$  pA 和  $(78.5 \pm 46.7)$  pA, post-pre 训练前后分别为  $(131.9 \pm 48.0)$  pA 和  $(74.3 \pm 30.7)$  pA,差异均有统计学意义(pre-post:  $t=3.558, P=0.004$ ; post-pre:  $t=4.283, P=0.001$ )。**结论** 前关键期小鼠视皮层第 IV 层已完成神经回路的基本构建,但神经元的膜反应性以及突触连接仍未成熟。在低频或高频突触前后时序差异性输入条件下,突触功能受到抑制,而在高频输入条件下突触功能得到继续保持。前关键期小鼠视觉神经系统的发育具有不同于关键期的特征。

**【关键词】** 视皮层/生长和发育;神经可塑性/生理;突触传递/生理;动作电位;兴奋性突触后电位;近交系 C57BL 小鼠;膜片钳技术

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目(30730099);国家自然科学基金面上项目(81371049);天津市自然科学基金项目(11JCYBJC12700)

**Response properties of neurons and synaptic plasticity during pre-critical period of visual development in mouse visual cortex** Shi Xuefeng, Zhao Kanxing

Tianjin Eye Hospital, Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Tianjin Eye Institute, Clinical College of Ophthalmology of Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Zhao Kanxing, Email: zkx4260@vip. 163. com

**[Abstract] Background** The visual development is completed during the critical period in human and

mammals. However, the critical period is not the initial of receiving visual experience. It is known that before the onset of critical period in mammals, such as mouse, there is an earlier stage for visual development, the pre-critical period. The research of response characteristics of the visual cortical neurons and the synaptic plasticity in the pre-critical period is still in the exploratory stage.

**Objective** The study aimed to preliminarily investigate the response properties of neurons and synaptic plasticity in mouse visual cortex during the pre-critical period. **Methods** Forty-eight postnatal day 13–17 C57BL/6J mice were used for *in vivo* whole-cell recordings and *in vitro* brain slice whole-cell recordings. *In vivo* whole-cell recordings were done in anesthetized mice. Moving bars in different directions were produced and controlled by a Matlab program. Cell recordings were obtained at the depth of layer IV of visual cortex. Step current stimuli under current clamp were given to measure the membrane response properties of neurons. Optimal visual stimuli were given to measure the *in vivo* largest responses of membrane potentials. *In vitro* experiments were performed after *in vivo* experiments. All cells were given current step stimuli to measure the membrane response properties of neurons. Different intensities of white-matter-to-layer-IV pathway stimulation were given to measure the evoked response properties. All cells from 48 mice were randomized into 4 groups according to different stimulus training modes, including low frequency stimulation (LFS), high frequency theta-burst stimulation (TBS), pre-post synaptic timing stimulation (pre-post TS) and post-pre synaptic timing stimulation (post-pre TS). Under the voltage clamp of  $-70$  mV, excitatory postsynaptic currents (EPSCs) before and after training were recorded to measure the plastic changes of excitatory synaptic connections. pClamp 10 was used for the pre-analysis of data and Matlab 2008a was used for statistical analysis. The use and care of the animals followed the Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. **Results** Thirty-nine cells and 48 cells were successfully recorded in the *in vivo* and *in vitro* experiments, respectively. The steady-state average number of action potentials (APs) were  $(1.01 \pm 0.03)/\text{sweep}$  and  $(1.01 \pm 0.05)/\text{sweep}$ , the AP thresholds were  $(-40.2 \pm 3.2)$  mV and  $(-39.6 \pm 2.0)$  mV, and the threshold step current levels were  $(126.7 \pm 17.4)$  pA and  $(129.6 \pm 17.5)$  pA in the *in vivo* and *in vitro* recordings, respectively, with no significant differences between them (APs:  $t = 0.512$ ,  $P = 0.610$ ; AP thresholds:  $t = -1.074$ ,  $P = 0.286$ ; current levels:  $t = -0.776$ ,  $P = 0.440$ ). Under the optimal visual or pathway stimulation, the average peak response of membrane potentials was  $(7.3 \pm 4.3)$  mV and  $(6.4 \pm 2.8)$  mV with rarely evoked APs in the *in vivo* and *in vitro* experiments, respectively, with no significant difference between them ( $t = 1.234$ ,  $P = 0.221$ ). Under the *in vitro* recording, the EPSCs before LFS were  $(138.1 \pm 51.9)$  pA, which was significantly higher than that after LFS  $(76.1 \pm 34.8)$  pA ( $t = 4.437$ ,  $P = 0.001$ ), but no significant differences were seen in EPSCs before and after TBS ( $t = -0.756$ ,  $P = 0.466$ ). The EPSCs before and after pre-post TS were  $(122.4 \pm 62.2)$  pA and  $(78.5 \pm 46.7)$  pA, and those before and after post-pre TS were  $(131.9 \pm 48.0)$  pA and  $(74.3 \pm 30.7)$  pA, showing significant differences between them (pre-post TS:  $t = 3.558$ ,  $P = 0.004$ ; post-pre TS:  $t = 4.283$ ,  $P = 0.001$ ). **Conclusions** The construction of fundamental neural circuits in layer IV of mouse visual cortex is completed during pre-critical period. However, the membrane responsive capability of neurons and the synaptic connections are in an immature state, and the evoked responses to visual pathway inputs are basically subthreshold. The strength of synaptic connections is depressed with low frequency stimulation or pre-post/post-pre synaptic timing stimulation, and kept unchanged with high frequency stimulation. The development of visual neural system of PSP in mouse presents different characteristics from CP.

**[Key words]** Visual cortex/growth & development; Neuronal plasticity/physiology; Synaptic transmission/physiology; Action potentials; Excitatory postsynaptic potentials; Mice, inbred C57BL; Patch-clamp techniques

**Fund program:** Key Project of National Natural Science Foundation of China (30730099); General Project of National Natural Science Foundation of China (81371049); General Project of Tianjin Municipal Natural Science Foundation (11JCYBJC12700)

人类及哺乳动物的视觉发育主要是在出生后一定时期即视觉发育关键期内完成的。目前的研究表明,该时期是出生后早期视觉神经系统的发育受到视觉经验影响最敏感的时期<sup>[1-4]</sup>。然而,视觉发育关键期的开始不代表视觉发育的开始,而且经典的关键期的定义源于 Wiesel 等<sup>[5]</sup>在单眼形觉剥夺动物模型上进行

的关于视皮层神经元眼优势实验,仅能代表眼优势可塑性的关键期,并非视觉相关神经系统所有生理功能发育的关键期<sup>[6-7]</sup>。关于视觉发育究竟从何开始和如何开始,先天性或后天性因素以及遗传因素或环境因素对最早期阶段视觉神经系统发育产生何种影响及如何预防,其他与临床密切相关的基础问题等目前尚未

阐明。目前已证实,小鼠等哺乳动物视觉发育关键期之前还存在一个视觉发育早期阶段,即前关键期<sup>[3]</sup>,但前关键期视皮层细胞的反应特性及其突触可塑性尚未详尽描述。就视觉通路的发育而言,视皮层第Ⅳ层神经元与外侧膝状体联系的建立及重构是整个视皮层功能发育的基础。本研究中分别采用在体和离体脑片膜片钳全细胞记录法研究小鼠视觉发育前关键期视皮层第Ⅳ层神经元的反应特性和突触可塑性,探讨出生后最早期视觉神经系统的发育过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 由同笼饲养的 1 只雄鼠与 2 只母鼠(SPF 级)先后交配繁殖的健康 C57BL/6J 小鼠 48 只(北京通利华实验动物技术有限公司)。饲养环境符合医学实验动物环境设施要求。母鼠孕期及围产期加强巡视与护理,准确记录幼鼠的出生日期和时间,于出生后 13~17 d(睁眼后 1~5 d)开始实验,小鼠体重 5~9 g。应用随机数字表法将动物随机分成 4 个组,每组 12 只,各组雌雄比例分配均匀。本研究经天津市眼科医院医学伦理委员会批准,遵守视觉与眼科研究协会(The Association for Research in Vision and Ophthalmology)关于眼科与视觉研究动物使用的声明(Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)。

**1.1.2 主要仪器** 700B 膜片钳放大器(美国 Molecular Devices 公司);Master-8-VP 程控电刺激器(以色列 AMPI 公司);VT1000S 振动切片机(德国 Leica 公司);P-97 电极拉制器(美国 Sutter 公司);FN-S2N 高级脑片红外荧光显微镜(日本 Nikon 公司);ViSaGe 视觉刺激发生器(英国 Cambridge Research Systems 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂配制** (1)人工脑脊液的配制:含 126.0 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L KCl、2.0 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、2.0 mmol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、1.25 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、1.25 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、10.0 mmol/L 葡萄糖、26.0 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>,调节 pH 值至 7.4,渗透压为 300 mOsmol/L。(2)电极内液的配制:含 130.0 mmol/L 葡萄糖酸钾、20.0 mmol/L KCl、10.0 mmol/L 依他酸、10.0 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES]、2.0 mmol/L ATP、0.25 mmol/L GTP 和 100 μmol/L Alexa Fluor 488,调节 pH 值至 7.25~7.30,渗透压为 295 mOsmol/L。

**1.2.2 在体膜片钳全细胞记录法记录视皮层第Ⅳ层神经元反应** (1)动物准备 动物称体质量后,腹腔内注射乌拉坦 1.0 g/kg,肌内注射氯丙硫蒽 10 mg/kg,皮下注射阿托品 0.3 mg/kg 和地塞米松 2 mg/kg。随即将动物放置到已经预热的恒温电热毯上,维持动物体温(37.2±2.0)℃。将动物固定于立体定位仪上,打开供氧装置持续供氧。剪去小鼠头皮表面毛发,碘伏消毒后用利多卡因凝胶行表面麻醉,剪开头皮,暴露颅骨,于 λ 点前 0.5~1.0 mm、中线外侧约 2.5 mm 处用颅钻磨开一直径 0.5~1.0 mm 的颅孔。(2)视皮层第Ⅳ层神经元反应的全细胞记录方法参考文献[8-9]。本研究中所用膜片钳记录电极尖端直径为 2.0~2.5 μm,电阻为 5~8 MΩ。实验中首先将电极快速下行至接近视皮层第Ⅳ层位置,随后在视皮层第Ⅳ层深度范围内在电压钳模式下采用盲法寻找细胞。如若获取全细胞记录失败,则立刻退出电极,更换电极,再次尝试。全细胞记录过程中静息膜电位保持在-55 mV 以下,串联电阻<30 MΩ,完成所有测试程序的细胞视为有效细胞。每只动物尝试记录次数不超过 8 次,尝试记录位置间距约为 100 μm。(3)步阶电流刺激和视觉刺激 在电流钳模式下给予步阶电流刺激,测量其在体膜反应特性,测量参数包括达到稳态时每次步阶电流刺激诱发的动作电位(action potential, AP)平均发放个数,诱发 AP 的阈电流水平以及 AP 阈值。视觉刺激通过放置于动物眼前 25 cm 处的显示屏、视觉刺激发生器以及自编的程序来实现,刺激图形为一个移动的 100% 对比度的光棒(图 1A)。参考文献[10-12]的方法首先通过测试获得光棒的最优刺激参数,随后在最优方向、最优宽度和最优运动速度的光棒刺激下记录细胞的膜电位反应,测量其视觉诱发反应特性。

**1.2.3 离体脑组织切片膜片钳全细胞记录法记录视皮层第Ⅳ层神经元反应** 离体脑组织切片膜片钳记录方法参考文献[13-14]。本研究中,切取后部 2/5 包含视皮层的脑组织,行厚度 400 μm 的冠状切片。膜片钳记录电极位于初级视皮层第Ⅳ层,双极刺激电极位于与之对应的白质(图 1B)。在红外微分干涉相差显微镜及电耦合式摄像机辅助下,优先寻找有荧光标记的神经元进行记录(图 1C,D)。如不成功则在同一脑片上再选取其他细胞进行尝试。实验过程中细胞静息膜电位保持在-55 mV 以下,串联电阻<20 MΩ,刺激训练实验过程中膜输入阻抗变化<15%,完成所有实验程序的细胞视为有效细胞。膜反应特性的测试方法同 1.2.2 在体膜片钳记录方法。给予不同强度的白质-Ⅳ层通路刺激,测量离体条件下通路刺激诱发反应特



性。按照动物组别不同给予不同模式的通路刺激训练。低频刺激(low frequency stimulation, LFS)模式为 1 Hz 通路刺激,高频刺激模式为  $\theta$  波脉冲刺激(theta burst stimulation, TBS)<sup>[14]</sup>,突触前-后模式时序刺激(pre-post timing stimulation, pre-post TS)为先通路刺激后细胞膜注入电流刺激的配对刺激,间隔时间为 10 ms,刺激频率为 1 Hz;突触后-前模式时序刺激(post-pre timing stimulation, post-pre TS)为先细胞膜注入电流刺激后通路刺激的配对刺激,间隔时间为 10 ms,刺激频率为 1 Hz。双极刺激电极均输出可诱发最大突触后反应的最低刺激强度。在 -70 mV 电压钳制下,分别记录训练前及训练后 30 min 兴奋性突触后电流(excitatory postsynaptic currents, EPSCs),测量其兴奋性突触联系功能的变化。每张脑组织切片只尝试进行一个细胞的刺激训练实验。

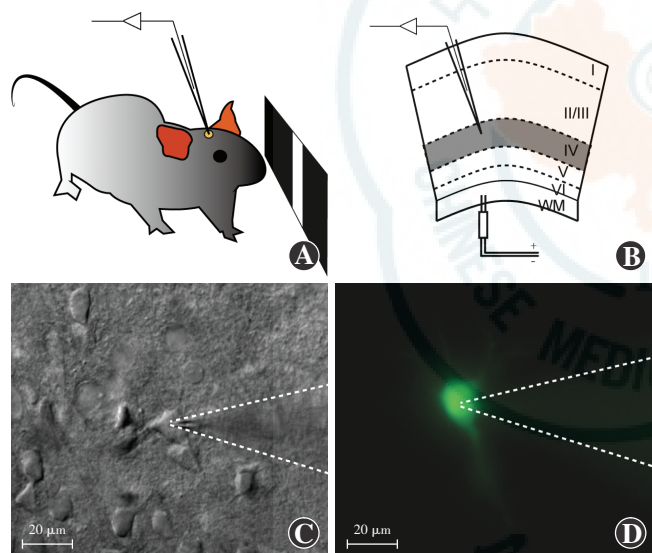


图 1 视皮层神经元反应的在体及离体膜片钳记录示意图 A: 视皮层神经元反应的在体膜片钳记录示意图 B: 视皮层神经元反应的离体脑组织切片膜片钳记录示意图 C: 红外微分干涉相差显微镜及电耦合式摄像机辅助下行可视化膜片钳记录 虚线示记录电极(标尺=20  $\mu$ m) D: 优先寻找在体记录荧光标记的细胞 虚线示记录电极(标尺=20  $\mu$ m)

### 1.3 统计学方法

采用 pClmap 10 软件(美国 Molecular Devices 公司)对原始数据进行预处理,采用 Matlab 2008a 统计软件(美国 MathWorks 公司)进行统计分析,采用 Adobe Illustrator CS6 软件(美国 Adobe 公司)进行绘图。本研究中测量指标的数据资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。小鼠在体实验和离体实验之间测量的相关参数的差异比较采用独立样本  $t$  检验;不同刺激训练模式刺激训练前后 EPSCs 幅度的差异比较采用配对  $t$  检验;将刺激训练前后

EPSCs 幅度的总变化比率(训练后 EPSCs 幅度/训练前 EPSCs 幅度)设定为 1 作为参照(即设定无突触功能改变),不同刺激训练模式刺激训练前后 EPSCs 幅度实际变化比率与总变化比率为 1 的差异比较采用配对  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠视觉发育 PCP 期视皮层神经元在体与离体膜反应特性

在体和离体条件下分别成功记录了 39 个和 48 个细胞的反应。第 IV 层神经元接受步阶电流刺激均未见簇发式 AP 的发放,所有细胞稳态 AP 平均发放个数为 1 个(图 2)。在体和离体条件下测得对注入电流的膜反应相关参数(稳态平均 AP 数、AP 阈值、阈电流水平)比较差异均无统计学意义( $t = 0.512, P = 0.610$ ;  $t = -1.074, P = 0.286$ ;  $t = -0.776, P = 0.440$ ) (表 1)。离体记录的 48 个细胞中 15 个为获得在体记录与荧光标记的细胞,获得和未获得在体记录的细胞稳态 AP 平均发放个数分别为  $1.02 \pm 0.04$  和  $1.00 \pm 0.05$ , AP 阈值分别为  $(-39.9 \pm 1.9) \text{ mV}$  和  $(-39.5 \pm 2.1) \text{ mV}$ , 阈电流水平分别为  $(130.7 \pm 14.9) \text{ pA}$  和  $(129.1 \pm 18.8) \text{ pA}$ , 二者比较差异均无统计学意义( $t = 1.208, P = 0.233$ ;  $t = -0.543, P = 0.590$ ;  $t = 0.286, P = 0.776$ )。

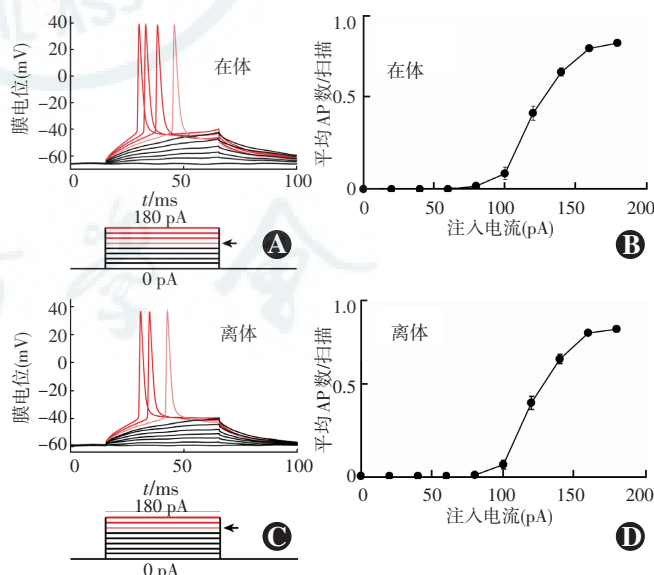


图 2 在体和离体条件下视皮层第 IV 层神经元对注入步阶电流的反应 A, C: 在体(A)和离体(C)条件下记录到的视皮层第 IV 层神经元对不同强度的步阶电流刺激的膜电位反应 红线示诱发的 AP, 箭头示阈值电流水平 B, D: 在体(B)和离体(D)条件下分别记录到的所有细胞在步阶电流刺激下的 AP 平均发放个数 AP: 动作电位

### 2.2 小鼠视觉发育前关键期视皮层神经元对视觉刺激及离体通路刺激的反应特性

前关键期小鼠视皮层第 IV 层神经元对各个方向的移动光棒刺激显示出明显的调制特性(图 3A, B), 最优视觉刺激条件下, 平均膜电位峰值幅度为  $(7.3 \pm 4.3) \text{ mV}$ 。多数细胞只记录到阈下反应, 仅在 4 只小鼠的 4 个细胞中偶见诱发的 AP(图 3C), 其中出生后第 17 天的 3 只, 出生后第 16 天的 1 只。离体条件下, 最强通路刺激诱发的平均膜电位峰值幅度为  $(6.4 \pm 2.8) \text{ mV}$ , 均为阈下反应, 未见 AP 的诱发(图 4)。在体与离体最大膜电位诱发反应幅度比较差异无统计学意义( $t = 1.234, P = 0.221$ )(表 1)。离体记录的 48 个细胞中获得和未获得在体记录的细胞最大膜电位反应幅度分别为  $(6.3 \pm 2.7) \text{ mV}$  和  $(6.4 \pm 2.9) \text{ mV}$ , 二者比较差异无统计学意义( $t = -0.077, P = 0.939$ )。

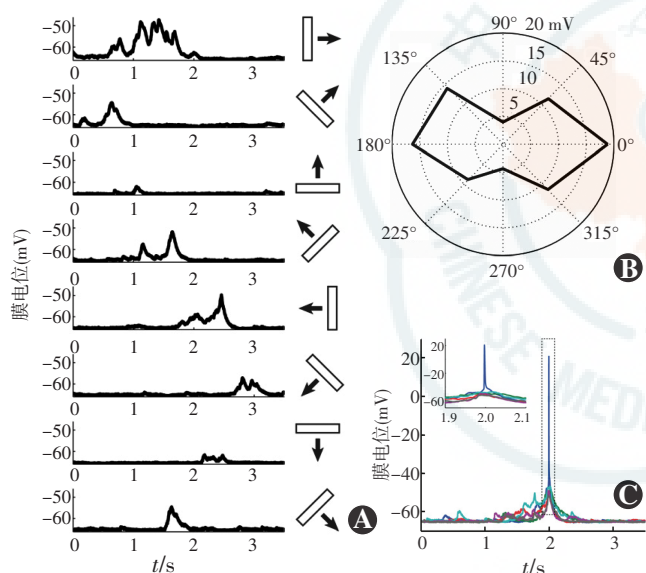


图 3 视皮层第 IV 层神经元视觉诱发反应 A: 一个视皮层第 IV 层神经元对不同方向的移动光棒刺激的膜电位反应, 可见其反应具有方位调制特性, 此细胞对水平方向运动的垂直光棒最为敏感, 但所有方向上的反应均为阈下反应, 未见 AP 发放 B: A 中所示细胞的膜电位反应峰值的方向调制曲线图 C: 另一个细胞在最优方位刺激条件下的多次测试结果, 分别以不同颜色波形曲线表示, 内插图将虚线框内原始记录放大后的各次记录曲线, 可见仅记录到 1 次 AP 发放(蓝线), 其余均为阈下反应

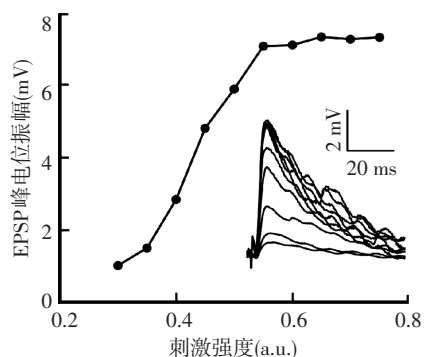


图 4 离体条件下视皮层第 IV 层神经元对通路刺激的反应 曲线示一个视皮层第 IV 层神经元对不同强度的通路刺激的膜电位峰值反应, 内插图为该曲线的原始记录 EPSP: 兴奋性突触后电位; a. u.: 任意单位

表 1 小鼠视觉发育前关键期视皮层第 IV 层神经元在体和离体反应特性参数( $\bar{x} \pm s$ )

记录方式	样本量	稳态 平均 AP 数(个)	AP 阈值(mV)	阈电流 水平(pA)	最大膜电位 反应幅度(mV)
在体	39	$1.01 \pm 0.03$	$-40.2 \pm 3.2$	$126.7 \pm 17.4$	$7.3 \pm 4.3$
离体	48	$1.01 \pm 0.05$	$-39.6 \pm 2.0$	$129.6 \pm 17.5$	$6.4 \pm 2.8$
$t$		0.512	-1.074	-0.776	1.234
$P$		0.610	0.286	0.440	0.221

注: AP: 动作电位(独立样本  $t$  检验)

## 2.3 小鼠视觉发育前关键期不同刺激频率及刺激时序模式训练前后 EPSCs 幅度变化

LFS 训练后小鼠视皮层第 IV 层神经元 EPSCs 幅度明显低于刺激训练前, 差异有统计学意义( $t = 4.437, P = 0.001$ ), 而 TBS 训练后小鼠视皮层第 IV 层神经元 EPSCs 幅度稍高于刺激训练前, 但差异无统计学意义( $t = -0.756, P = 0.466$ )。训练后与训练前 EPSCs 幅度比率为  $0.585 \pm 0.257$ , 显著低于 1.000, 差异有统计学意义( $t = -5.589, P = 0.000$ )。TBS 训练后与训练前 EPSCs 幅度比率为  $1.023 \pm 0.144$ , 接近 1.000, 差异无统计学意义( $t = 0.538, P = 0.601$ )。与刺激训练前相比, pre-post TS 及 post-pre TS 训练后 EPSCs 幅度均明显降低, 差异均有统计学意义( $t = 3.558, P = 0.004$ ;  $t = 4.283, P = 0.001$ )。pre-post TS 训练后与训练前 EPSCs 幅度比率为  $0.688 \pm 0.341$ , 显著低于 1.000, 差异有统计学意义( $t = -3.175, P = 0.009$ )。Post-pre TS 训练后与训练前 EPSCs 幅度比率为  $0.603 \pm 0.285$ , 显著低于 1.000, 差异有统计学意义( $t = -4.817, P = 0.000$ )(图 5, 表 2)。

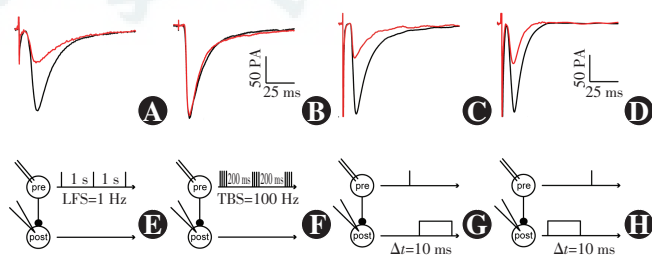


图 5 视皮层第 IV 层神经元对不同模式刺激训练的突触可塑性

A ~ D: 记录到的视皮层第 IV 层神经元在 LFS(A)、TBS(B)、pre-post TS(C)和 post-pre TS(D)刺激训练前(红线)后(黑线)的 EPSCs 反应 E ~ H: LFS(E)、TBS(F)、pre-post TS(G)和 post-pre TS(H)刺激模式图 LFS: 低频刺激; TBS:  $\theta$  波脉冲刺激; pre-post TS: 突触前-后模式时序刺激; post-pre TS: 突触后-前模式时序刺激

表 2 不同模式的刺激训练前后视皮层第Ⅳ层神经元 EPSCs 的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	样本量	不同模式刺激 EPSCs 值			
		LFS	TBS	pre-post TS	post-pre TS
刺激前	12	138.1±51.9	127.6±39.7	122.4±62.2	131.9±48.0
刺激后	12	76.1±34.8	132.0±47.9	78.5±46.7	74.3±30.7
<i>t</i>		4.437	-0.756	3.558	4.283
<i>P</i>		0.001	0.466	0.004	0.001

注:EPSCs:兴奋性突触后电流;LFS:低频刺激;TBS:θ波高频脉冲刺激;pre-post TS:突触前-后模式时序刺激;post-pre TS:突触后-前模式时序刺激(配对 *t* 检验)

### 3 讨论

视觉发育关键期是指生后早期视觉神经系统的发育受到视觉经验影响最敏感的时期<sup>[2,4]</sup>,在此时期内若接受异常的视觉经验将引起弱视、斜视等视觉发育相关性眼病<sup>[15-17]</sup>。图形视觉诱发电位是临床和实验研究中常用的视功能客观评估的主要指标<sup>[18-19]</sup>,就图形视觉经验而言,无论是人类还是小鼠均从睁眼就开始接受。小鼠出生后 13~14 d 开始睁眼,即在其关键期开始前约 1 周,视觉系统就已经开始接受图形视觉经验。无论视觉神经系统在睁眼后何时开始启动关键期可塑性,关键期的开始都不能代表视觉发育的开始。图形视觉经验的存在与关键期的开始也不一致,这就意味着或许在关键期开始之前,视觉经验已对视觉神经系统的发育产生影响。美国眼科学会眼科临床指南(Preferred Practice Pattern, PPP)提出,早产儿、低出生体重儿或者一级亲属中有弱视的儿童弱视患病率至少比正常情况下高 4 倍,发育迟缓的婴儿中弱视患病率升高 6 倍多,环境因素,包括母亲孕期吸烟、吸毒或饮酒都与弱视或斜视患病率的增加相关联<sup>[17]</sup>。这提示 CP 期前各种因素对人视觉发育具有举足轻重的影响,并可能增加 CP 期发生弱视、斜视、眼球震颤等发育性疾病的易感性。

视觉发育前关键期的定义为从外侧膝状体轴突进入视皮层第Ⅳ层开始到 CP 期开始前的一段时期。小鼠的 PCP 期为出生后 21 d 之前,包括睁眼前和睁眼后 2 个时期<sup>[3]</sup>。研究认为,视皮层眼优势柱(ocular dominance columns, ODCs)、方位选择性等结构和功能特性是在前关键期开始形成的,但这些特性是否同时受到前关键期视网膜波和视觉经验的影响尚存在争议<sup>[3,20-22]</sup>。显然,在前关键期视皮层神经回路即已发生依赖和/或不依赖于视觉经验的构建,从而使视觉系统具备基本的组织框架和功能反应特性。但前关键期,尤其是睁眼后阶段视皮层细胞的反应特性及其突

触可塑性的情况尚未见详尽描述。

本研究结果发现,在体和离体条件下小鼠视觉发育前关键期视皮层第Ⅳ层神经元 AP 阈值虽然接近于一般神经元 AP 阈值水平,但均高于 Etherington 等<sup>[23]</sup>报道的关键期视皮层细胞 AP 阈值;本研究中还发现,达到一定注入电流水平后,AP 平均发放个数达到稳态,但无论在体还是离体状态均接近于 1,未见簇发放电,说明前关键期视皮层第Ⅳ层神经元膜自身的特性决定了其难于诱发 AP 发放,特别是高频 AP 发放。神经元之间突触联系的建立及其联系的强弱是实现相关功能的基础,视皮层与外侧膝状体之间神经通路的发育对于视皮层发育尤为重要。在细胞对通路刺激的反应方面,本研究分别记录了小鼠在体条件下对视觉刺激的反应以及离体条件下对白质-第Ⅳ层通路刺激的反应,发现在视觉发育前关键期小鼠视皮层第Ⅳ层神经元已有明显的方位选择性,这与以往研究者在其他动物前关键期的研究结果类似<sup>[20-21]</sup>。本研究还发现,在最优视觉刺激条件下,平均膜电位峰值在绝大多数情况下是阈下的,鲜见 AP,在离体条件下给予最强刺激也是同样的结果,此外在体最大膜电位诱发反应幅度虽稍高于离体者,但差异无统计学意义。这些结果说明,虽然小鼠视觉发育前关键期视皮层第Ⅳ层神经元已经具备了 AP 发放的能力,但其与外侧膝状体的突触联系尚未完全建立,即便是给予最强刺激,诱发突触后阈上反应的概率也较低。

有效的突触传递是依赖于 AP 而发生的,同时足够的膜电位反应也是激活一系列信号通路,从而诱发突触可塑性的基础。对于频率依赖的突触可塑性而言,LFS 与 TBS 实际上是通过诱发突触后膜电位达到不同的电压水平来分别实现突触可塑性的长时程抑制(long-term depression, LTD)或长时程增强的,对于脉冲时序依赖的突触可塑性而言,典型的突触可塑性调制依赖于突触后 AP 的发放<sup>[24-25]</sup>。本研究中发现,对于小鼠视觉发育 PCP 期视皮层第Ⅳ层神经元而言,AP 发放能力和突触后反应水平均处于较低水平,LFS 训练诱发突触联系的 LTD, TBS 训练则未诱发突触功能变化,而 pre-post TS 或 post-pre TS 模式的时序刺激训练均可诱发突触联系的 LTD。此结果表明,由于 PCP 期视皮层神经元的低电压反应特性,在低频或突触前后时序差异性输入条件下,突触功能的变化表现为抑制或消除,而在高频输入条件下突触功能则得到继续保持,推测前关键期视皮层可塑性的这些特点对于消除不适当的突触联系,维持正确的突触联系具有重要作用,这可能有助于关键期开始前正确的 ODCs 的形



成<sup>[3]</sup>。

综上所述,本研究结果表明前关键期小鼠视皮层第Ⅳ层神经元已经完成视觉通路联系的基本构建,但神经元本身的膜反应能力以及突触联系尚未发育成熟,对视觉通路信息输入主要产生阈下反应。由于该时期神经元的低电压反应特性,其可塑性主要表现为对突触联系的抑制或保持 2 种方式。关于前关键期异常视觉经验及其他干扰因素对视皮层神经回路形成及功能发育的影响有待今后进一步研究。

## 参考文献

- [1] Horton JC, Hocking DR. Timing of the critical period for plasticity of ocular dominance columns in macaque striate cortex [J]. J Neurosci, 1997, 17(10): 3684-3709.
- [2] 赵堪兴, 史学锋. 重视婴幼儿视力异常的筛查 [J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(7): 577-579. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 07. 001.  
Zhao KX, Shi XF. Pay attention to abnormal vision screening for infants and young children [J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 49(7): 577-579. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 07. 001.
- [3] Feller MB, Scanziani M. A precritical period for plasticity in visual cortex [J]. Curr Opin Neurobiol, 2005, 15(1): 94-100. DOI: 10. 1016/j. conb. 2005. 01. 012.
- [4] 阴正勤. 视觉发育可塑性关键期“终止”机制的研究进展 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1878-1880. DOI: 10. 3321/j. issn. 1000-5404. 2003. 21. 002.  
Yin ZQ. Advances in mechanism of ending the critical period of visual plasticity during development [J]. Acta Acad Med Milit Tert, 2003, 25(21): 1878-1880. DOI: 10. 3321/j. issn. 1000-5404. 2003. 21. 002.
- [5] Wiesel TN, Hubel DH. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye [J]. J Neurophysiol, 1963, 26: 1003-1017.
- [6] Harwerth RS, Smith EL 3rd, Duncan GC, et al. Multiple sensitive periods in the development of the primate visual system [J]. Science, 1986, 232(4747): 235-238.
- [7] Lewis TL, Maurer D. Multiple sensitive periods in human visual development: evidence from visually deprived children [J]. Dev Psychobiol, 2005, 46(3): 163-183. DOI: 10. 1016/j. cub. 2013. 01. 0591002/dev. 20055.
- [8] Longordo F, To MS, Ikeda K, et al. Sublinear integration underlies binocular processing in primary visual cortex [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(6): 714-723. DOI: 10. 1038/nn. 3394.
- [9] Lien AD, Scanziani M. Tuned thalamic excitation is amplified by visual cortical circuits [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(9): 1315-1323. DOI: 10. 1038/nn. 3488.
- [10] 左绪宏, 史学锋, 谢芳, 等. 大鼠外侧膝状体神经元时空频率调谐特性发育观察 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(5): 388-391. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 05. 002.  
Zuo XH, Shi XF, Xie F, et al. Development of spatiotemporal frequency tuning in rat lateral geniculate neuron [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(5): 388-391. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 05. 002.
- [11] 王靖瑞, 史学锋, 张伟, 等. 大鼠图形视觉诱发电位的时空频率调谐特性观察 [J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(7): 511-517. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2014. 07. 007.  
Wang JR, Shi XF, Zhang W, et al. The spatiotemporal frequency tuning of pattern visual evoked potentials in rats [J]. Chin J Ophthalmol, 2014, 50(7): 511-517. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2014. 07. 007.
- [12] 谢芳, 史学锋, 许丽敏, 等. 猫初级视皮层神经元的双眼整合反应特性研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(6): 485-488. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 06. 002.  
Xie F, Shi XF, Xu LM, et al. Binocular integration of binocular neurons in striate cortex of kitten [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(6): 485-488. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 06. 002.
- [13] 刘玉燕, 史学锋, 牟海燕, 等. 视觉发育关键期大鼠视皮层Ⅱ或Ⅲ层锥体神经元 EPSC-IPSC 变化特征 [J]. 中华眼科杂志, 2012, 48(9): 799-803. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2012. 09. 008.  
Liu YY, Shi XF, Mu HY, et al. The variation characters of EPSC-IPSC in rat visual cortex Ⅱ/Ⅲ pyramidal neurons during critical period of visual development [J]. Chin J Ophthalmol, 2012, 48(9): 799-803. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2012. 09. 008.
- [14] Liu Y, Shi X, Li Y, et al. The influences of dark rearing on the transmission characteristics of layer Ⅱ/Ⅲ pyramidal cells during the critical period [J]. Brain Res, 2012, 1457: 26-32. DOI: 10. 1016/j. brainres. 2012. 03. 062.
- [15] 赵堪兴. 早期发现和早期干预努力提高弱视的防治水平 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(8): 449-451.  
Zhao KX. Early diagnosis and prompt intervention for launching a fruitful campaign against amblyopia [J]. Chin J Ophthalmol, 2002, 38(8): 449-451.
- [16] Gordon JA, Stryker MP. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse [J]. J Neurosci, 1996, 16(10): 3274-3286.
- [17] 美国眼科学会. 眼科临床指南 [M]. 赵家良, 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 589-627.
- [18] 张作明, 阴正勤. 如何合理运用视觉诱发电位检测技术 [J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(12): 1061-1063. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 12. 002.  
Zhang ZM, Yin ZQ. How to use of visual evoked potential testing technology reasonable [J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 49(12): 1061-1063. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2013. 12. 002.
- [19] 刘瑶, 余涛, 阴正勤. 图形视觉诱发电位记录双眼形觉剥夺成年大鼠视皮层可塑性的研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(12): 1106-1110. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 12. 012.  
Liu Y, She T, Yin ZQ. The visual cortex plasticity of adult rat after binocular form deprivation by pattern visual evoked potential [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(12): 1106-1110. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 12. 012.
- [20] Chapman B, Stryker MP, Bonhoeffer T. Development of orientation preference maps in ferret primary visual cortex [J]. J Neurosci, 1996, 16(20): 6443-6453.
- [21] Crair MC, Gillespie DC, Stryker MP. The role of visual experience in the development of columns in cat visual cortex [J]. Science, 1998, 279(5350): 566-570.
- [22] Hooks BM, Chen C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity [J]. Neuron, 2007, 56(2): 312-326. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2007. 10. 003.
- [23] Etherington SJ, Williams SR. Postnatal development of intrinsic and synaptic properties transforms signaling in the layer 5 excitatory neural network of the visual cortex [J]. J Neurosci, 2011, 31(26): 9526-9537. DOI: 10. 1523/JNEUROSCI. 0458-11. 2011.
- [24] Clopath C, Büsing L, Vasilaki E, et al. Connectivity reflects coding: a model of voltage-based STDP with homeostasis [J]. Nat Neurosci, 2010, 13(3): 344-352. DOI: 10. 1038/nn. 2479.
- [25] Markram H, Lübke J, Frotscher M, et al. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs [J]. Science, 1997, 275(5297): 213-215.

(收稿日期: 2016-02-25)

(本文编辑: 尹卫靖)