

膜电位的不同波动对小鼠大脑皮质 GABA 能神经元内在特性的影响

刘秀平¹, 张 茜¹, 王其一²

[摘要] 目的:探讨膜电位的不同波动对小鼠大脑皮质 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元内在特性影响及对神经编码的调控。方法:取出生 15~20 d FVB-Tg(Gad GFP)45 704 Sw_n/J 小鼠进行麻醉,断头取脑制作切片,将脑片置于充分氧合的人工脑脊液中继续孵育 2 h。采用全细胞记录方法进一步探讨快速后超极化(fAHP)、慢速后超极化(sAHP)、动作电位不同复极和快速后去极化(fADP)对神经元内在特性的影响及对神经编码的调控。结果:fAHP 和 sAHP 相比,fAHP 影响下的动作电位的绝对不应期(ARP₂)较短($P < 0.01$),阈值($V_{ts}-V_{r3}$)较高($P < 0.01$);与 fAHP 相比,动作电位未完全复极时,ARP₂ 较短,当为阈强度 0.25 倍时,ARP₂ 最短($P < 0.05$);与 fAHP 比较,fADP 程度越低,ARP₂ 越短,当在静息电位水平时,ARP₂ 最短($P < 0.05$)。结论:大脑皮质 GABA 能神经元在整合突触输入后,当膜电位波动时其内在特性发生可塑性变化,不同输入模式通过影响大脑皮质 GABA 能神经元动作电位的内在特性,从而调控 GABA 能神经元对输入信号的编程能力。

[关键词] γ -氨基丁酸能神经元;后超极化;内在特性;神经编码

[中图分类号] Q 421 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.12.002

Effect of different fluctuations of membrane potential on the intrinsic characteristics of GABA neurons in mouse cerebral cortex

LIU Xiu-ping¹, ZHANG Qian¹, WANG Qi-yi²

(1. Department of Pharmacy, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou Jiangsu 215008; 2. Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of different fluctuations of membrane potential on the intrinsic characteristics and regulation of neural coding of GABA-ergic neurons in mouse cerebral cortex. **Methods:** The brain slices were prepared from FVB-Tg(Gad GFP)4570Sw_n/J mice(postnatal day 15-20), and incubated in artificial cerebrospinal fluid with sufficient oxygenation for 2 h. The effects of fast post-polarization(fAHP), slow post-hyperpolarization(sAHP), different repolarization of action potential and fast post-polarization(fADP) on the intrinsic characteristics of neurons and regulation of neural coding were further studied by whole-cell recording. **Results:** Compared with sAHP, the absolute refractory period(ARP₂) and threshold($v_{ts}-V_{r3}$) of the action potential under the influence of fAHP were shorter and higher, respectively($P < 0.01$). Compared with fAHP, the ARP₂ was shorter when the action potential was not fully repolarized, and the ARP₂ was the shortest when the threshold intensity was 0.25 times($P < 0.05$). Compared with fAHP, the lower the fADP level was, the shorter the ARP₂ was, and the ARP₂ was the shortest at the resting potential level($P < 0.05$). **Conclusions:** After the integrating synaptic input, the plasticity of intrinsic characteristics of cerebral cortex GABA-ergic neurons changes when the membrane potential fluctuates. Different input modes affect the intrinsic characteristics of action potential of cerebral cortex GABA-ergic neurons, thereby regulating the programming ability of GABA-ergic neurons to input signals.

[Key words] γ -aminobutyric acid-ergic neuron; after-hyperpolarization; intrinsic property; neural encoding

GABA 能神经元通过编码动作电位发放模式在维持大脑功能内环境的稳态中起着关键作用。研究^[1]表明大脑皮质 GABA 能神经元的内在特性包

括阈值($V_{ts}-V_r$)和绝对不应期(absolute refractory period, ARP)共同调控着神经编码模式。神经元动作电位产生过程中有着抑制成分如后超极化(AHP)通过降低电压门控钠通道介导的阈值电位和 ARP 来调控着动作电位的编码^[2]。钾通道能以不同的方式调节神经元兴奋性和编程,例如,快速后超极化(fAHP)、慢速后超极化(sAHP)^[3-6]。然而,这些 AHP 成分如何对大脑皮质 GABA 能神经元内在特性产生影响,目前尚不清楚。

大脑皮质 GABA 能神经元接受兴奋性突触输

[收稿日期] 2019-07-18 [修回日期] 2019-11-11

[基金项目] 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2018A0228)

[作者单位] 1. 南京医科大学附属苏州医院 药剂科, 江苏 苏州 215008; 2. 蚌埠医学院 生理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 刘秀平(1974-),女,硕士,主管药师。

[通信作者] 王其一, 硕士, 讲师。E-mail: wangqi1@bbmc.edu.cn

人与抑制性突触输入的时间和空间上的总和效应^[7-8],代数和形成了膜电位的波动,正向电流促使膜电位去极化,负向电流使膜电位发生超极化。GABA 能神经元整合兴奋性和抑制性突触输入后会产生不同类型的电位波动 [fAHP、sAHP、快速后去极化(fADP)、完全复极和未完全复极],它们对于内在特性和编码的影响目前还不明确。

为了解决上述问题,我们利用出生 15~20 d 的小鼠,使用全细胞记录来探讨不同类型电位波动对神经元内在特性和神经编码的影响,为进一步了解抑制性神经元的内在特性变化及对神经编码的影响提供实验基础和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及制备

Tris-GTP (Sigma); Mg^{2+} -ATP (Sigma); Hepes (Sigma); EGTA (Sigma); Na_2 phosphocreatine (Sigma); KCl (Sigma)。人工脑脊液 (ACSF) 的制备: 10 mmol/L dextrose, 124 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 1.3 mmol/L NaH_2PO_4 , 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 和 4 mmol/L $MgSO_4$, 5 mmol/L Hepes, 26 mmol/L $NaHCO_3$ 。充分氧合后备用。

电极标准液的制备: 0.5 mmol/L EGTA; 4 mmol/L NaCl; 10 mmol/L Hepes; 150 mmol/L 葡萄糖酸钾; 4 mmol/L Mg^{2+} -ATP; 1 mmol/L Tris-GTP; 调

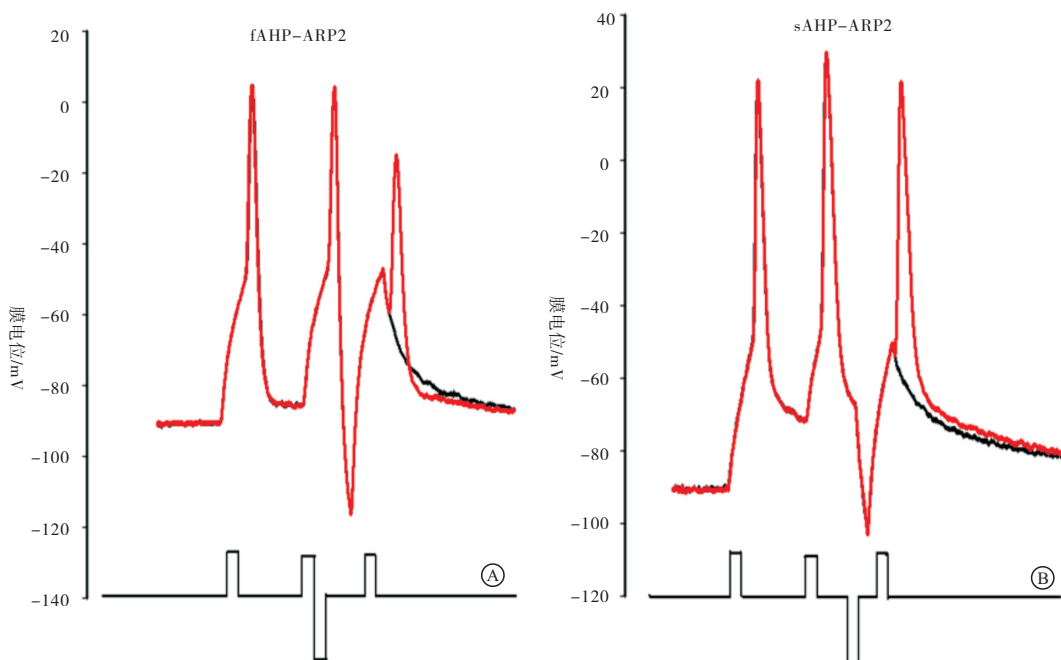
整 pH 至 7.35,渗透压 295~305 mOsmol,保持电极阻抗为 5~6 M Ω 。

1.2 实验方法

选用出生 15~20 d 的 FVB-Tg (Gad GFP) 45 704 Swn/J 小鼠,麻醉后快速断头取脑,置于备用的 ACSF 中,制成每片 400 μ m 厚度的脑片 3~5 片,将制作的脑片移至充分氧合的 ACSF 中,环境温度设置为 35 $^{\circ}C$,离体培养 1 h。取孵育的脑片 1 片,将其放置于 IR-DIC 显微镜下,温浴槽温度设置为 35 $^{\circ}C$,灌流液灌流速度不超过每分钟 50 滴。运用全细胞记录方法对脑片中大脑皮层 GABA 能神经元进行电生理学记录,使用 pClamp 10 软件将电生理学数据进行记录。

1.3 实验分组

实验分 4 组: fAHP 组、sAHP 组、动作电位复极组、fADP 组。fAHP 组: 在给予标准的去极化刺激强度后,立即给予不同强度的超极化刺激,测得相应的 ARP 和 V_{ts} - V_r ,实验模式见图 1A; sAHP 组: 在给予标准的去极化刺激强度后,在一定时间间隔后(3 ms)给予不同强度的超极化刺激,测得相应的 ARP 和 V_{ts} - V_r ,实验模式见图 1B; 动作电位复极组: 在紧跟着动作电位后给予不同标准化去极化刺激,即为阈刺激的 0、0.25、0.5、0.75 倍,以模拟动作电位未完全和完全复极化。fADP 组: 在紧跟着动作电位后给予标准化去极化刺激,即为阈刺激的 1.25、1.5 倍,以模拟动作电位的 fADP。



A:在给予标准的去极化刺激强度后,立即给予不同强度的超极化刺激;B:在给予标准的去极化刺激强度后,在一定时间间隔后(3 ms)给予不同强度的超极化刺激

图1 fAHP组与sAHP组实验模式比较

1.4 ARP、 $V_{ts}-V_r$ 的测量方法 内在特性指标包括动作电位的能障 ($V_{ts}-V_r$) 和动作电位的 ARP^[9-14]。 V_{ts} 为细胞膜去极化达到的某一临界膜电位, 此时能够促使 Na^+ 通道大量开放, 它的测量如图 2 所示^[9-10], V_r 表示静息膜电位。能障 ($V_{ts}-V_r$) 测量见图 2。ARP 的测量: 以阈强度, 刺激时程为 3 ms 的去极化电流引导细胞产生一个动作电位, 设置 20 ms 后以相同的刺激产生下一个动作电位, 改变两个动作电位的时间间隔, 当下一个动作电位刚好产生时的时间间隔为 ARP^[10]。测量方法见图 2。

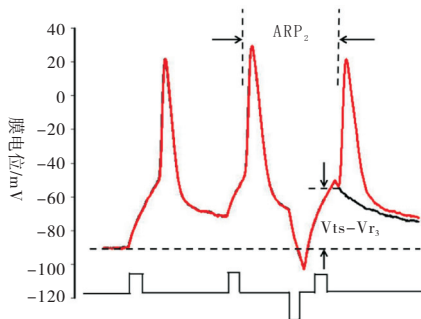


图2 ARP2和 $V_{ts}-V_{r3}$ 的测量

1.5 电生理实验步骤 通过阈强度去极化电流引导动作电位产生, 在标准化超极化刺激强度下, 即为阈刺激的 (-0.5、-1、-1.5、-2、-2.5) 倍时, 量化 fAHP 与 sAHP 的 ARP_2 值并进行比较。通过阈强度去极化电流引导动作电位产生, 在标准化超极化刺激强度下, 即为阈刺激的 (-0.5、-1、-1.5、-2、-2.5) 倍时, 量化 fAHP 和 sAHP 的 $V_{ts}-V_{r3}$ 值并进行比较。在动作电位产生后未复极之前立刻给予阈刺激的 0.25、0.5、0.75 倍的刺激, 以模拟动作电位未完全复极化, 量化 ARP_2 的值; 动作电位完全复极后测量 ARP_2 的值, 并与前 2 组进行比较。通过阈强度去极化电流引导动作电位产生, 在标准化超极化刺激强度下, 在紧跟着动作电位后给予标准化去极化刺激, 即为阈刺激的 1.25、1.5 倍, 以模拟动作电位的 fADP, 量化 ARP_2 的值。

1.6 统计学方法 采用 t 检验。

2 结果

2.1 大脑皮层两类 GABA 能神经元发放模式的比较 大脑皮层 GABA 能神经元的规则发放表现为等高的峰幅度, 逐渐延长的动作电位峰间距 (interspike intervals, ISI) 和较明显的频率适应性, 而快发放表现为等高的峰幅度, 较短的几乎相等的 ISI 和很小的频率适应性 (见图 3)。

2.2 fAHP、sAHP 对 ARP 的影响 通过阈强度去极化电流引导动作电位产生, 在标准化超极化刺激强度下, 即为阈刺激的 (-0.5、-1、-1.5、-2、-2.5) 倍时, 量化 ARP_2 值并进行比较。fAHP 和 sAHP 相比, fAHP 影响下的动作电位的 ARP_2 较短 ($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 fAHP 与 sAHP 对 ARP_2 的影响 ($\bar{x} \pm s$; ms)

分组	<i>n</i>	-0.5	-1	-1.5	-2	-2.5
fAHP	9	4.43 ± 0.04	4.32 ± 0.04	4.35 ± 0.06	4.21 ± 0.06	4.35 ± 0.07
sAHP	15	5.48 ± 0.07	7.04 ± 0.85	7.98 ± 0.61	11.23 ± 0.81	15.63 ± 1.01
<i>t</i>	—	40.94	9.51	17.64	25.73	33.16
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 fAHP、sAHP 对 $V_{ts}-V_r$ 的影响 通过阈强度去极化电流引导动作电位产生, 在标准化超极化刺激强度下, 即为阈刺激的 (-0.5、-1、-1.5、-2、-2.5) 倍时, 量化 $V_{ts}-V_{r3}$ 值并进行比较。fAHP 和 sAHP 相比, fAHP 影响下的动作电位的 $V_{ts}-V_{r3}$ 较高 ($P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 fAHP 和 sAHP 对 $V_{ts}-V_{r3}$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$; mV)

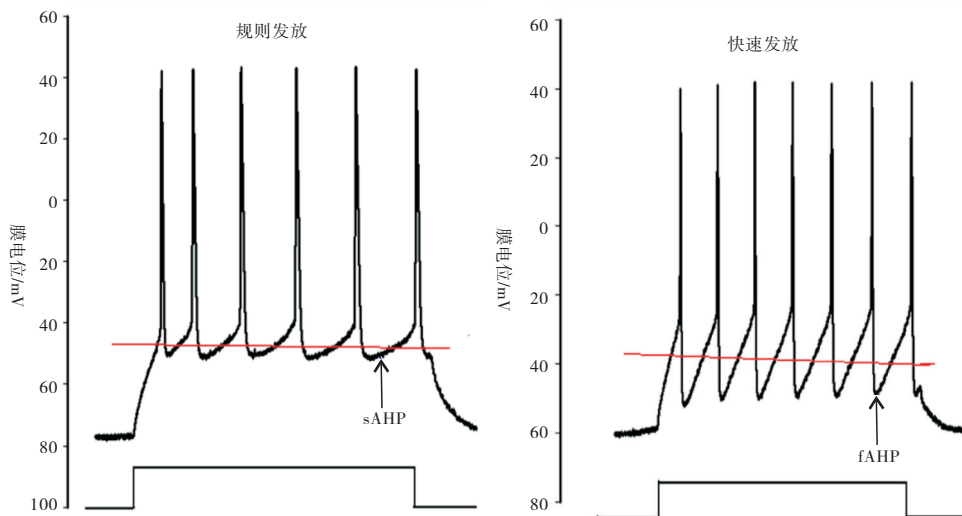
分组	<i>n</i>	-0.5	-1	-1.5	-2	-2.5
fAHP	9	38.32 ± 0.31	39.07 ± 0.46	37.4 ± 0.6	37.07 ± 0.62	35.49 ± 0.73
sAHP	15	32.35 ± 0.21	34.75 ± 0.55	35.19 ± 0.52	35.88 ± 0.60	35.63 ± 0.78
<i>t</i>	—	56.41	17.94	9.52	4.65	0.44
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

2.4 fAHP 和动作电位不同复极化对 ARP 的影响 fAHP 的影响如前所述, 即阈刺激的 (-2.5、-2、-1.5、-1、-0.5) 倍 ARP_2 值分别为 (4.43 ± 0.04)、(4.32 ± 0.04)、(4.35 ± 0.06)、(4.21 ± 0.06)、(4.35 ± 0.07) ms ($n = 12$)。动作电位完全复极, 即为阈刺激的 0 倍, 测得的 ARP_2 的值为: (3.97 ± 0.05) ms ($n = 12$)。在动作电位产生后未复极之前立刻给予阈刺激的 0.25、0.5、0.75 倍的刺激, 以模拟动作电位未完全复极化, 量化 ARP_2 的值, 分别是: (3.72 ± 0.04)、(3.81 ± 0.06) 和 (3.82 ± 0.05) ms ($n = 12$)。综上, 在阈刺激的 (-2.5、-2、-1.5、-1、-0.5、0、0.25、0.5、0.75) 倍下测得 ARP_2 值进行比较, 当为阈强度 0.25 倍时, ARP_2 最短 ($P < 0.05$)。

2.5 fAHP 和 fADP 对 ARP 的影响 fAHP 的影响如前所述, 即阈刺激的 (-2.5、-2、-1.5、-1、-0.5) 倍 ARP_2 值分别为 (4.43 ± 0.04)、(4.32 ±

0.04)、 (4.35 ± 0.06) 、 (4.21 ± 0.06) 、 (4.35 ± 0.07) ms ($n = 12$)。动作电位完全复极,即为阈刺激的 0 倍,测得的 ARP_2 的值为: (3.97 ± 0.05) ms ($n = 12$)。通过阈强度去极化电流引导动作电位产生,在标准化超极化刺激强度下,在紧跟着动作电位后给予标准化去极化刺激,即为阈刺激的 1.25、1.5

倍,以模拟动作电位的 fADP,量化 ARP_2 的值,分别是 (4.07 ± 0.06) 和 (4.26 ± 0.08) ms ($n = 12$)。综上所述,在阈刺激的(-2.5、-2、-1.5、-1、-0.5、0、1.25、1.5)倍下测得 ARP_2 值进行比较, ARP_2 在动作电位完全复极时最短($P < 0.05$)。



A:规则发放神经元复极化过程中会表现出sAHP;B:快速发放神经元复极化过程中会表现出fAHP

图3 大脑皮层两类GABA能神经元发放模式的比较

3 讨论

本实验以实验方法模拟 fAHP、sAHP、fADP、动作电位完全复极和未完全复极,量化小鼠大脑皮层 GABA 能神经元连续动作电位内在特性,包括: ARP_2 和 $V_{ts}-V_{r3}$,它们是较好地体现神经元的内在特性的指标^[12-14]。我们发现 fAHP 与 sAHP 相比较,fAHP 可以通过缩短 ARP_2 的同时增加 $V_{ts}-V_{r3}$ 以诱导第三个动作电位的产生。 ARP 变短可以使后一个动作电位波峰向前一个波峰进行移动,从而使在固定的刺激时间内增加动作电位发放的容量,动作电位发放容量增加导致神经元的快发放,其发放动作电位的能力增加;相反,sAHP 通过延长 ARP ,诱导其规则发放。阈值电位越低,对兴奋性突触输入的敏感性越高,意味着其兴奋性越高。值得注意的是,fAHP 增加了阈电位,而 sAHP 降低了阈电位。一般认为抑制性突触的兴奋性驱动,膜电位是向远离发放动作电位的阈值移动的^[15],我们的研究表明由 fAHP 诱导的更高阈电位也支持这一观点。电压门控钠通道(VGSCs)的动力学决定了动作电位的阈电位水平^[2],实验结果表明,施加 sAHP 相较于 fAHP 其激活的 VGSC 更多,所以对兴奋性突触输入更为敏感,更容易启动动作电位的发放。实验

结果表明,fAHP 可缩短 ARP ,而 sAHP 可降低阈电位,不仅能抑制神经元活动,而且能增强神经元的放电能力。由于动作电位的 ARP 和阈电位由 VGSCs 的动力学控制^[16-19],上述现象的产生表明,由 K 通道介导的 fAHP 和 sAHP^[2]可能是通过引起 VGSC 动力学的可塑性变化而影响神经元的内在特性和编码的,相关工作需要进一步进行探讨。

在 fAHP、静息电位水平和不完全复极条件下,复极电位水平越接近静息电位, ARP 就越短。如前所述,较短的 ARP 增加神经元发放容量,对于刺激的敏感性提高,兴奋性增加。大脑皮层中大多数神经元其膜电位往往处于阈下状态,使神经网络对兴奋性突触输入更为敏感^[20]。我们的结果表明,阈下电位通过缩短 ARP 来提高神经元的兴奋性,神经元内在特性的变化可能是由接近静止电位水平的膜电位复极引起的。在 fAHP、静息电位水平和 fADP 中,随着膜电位的波动, ARP_2 随 fADP 的降低而变短,在接近静息膜电位处变得最短。fADP 由钙激活非选择性电流介导,调节大脑皮层神经元动作电位早期的快发放^[21]。由于 ARP 由 VGSC 的动力学控制,施加 fAHP 与 fADP 相比,在静息膜电位下有更多 VGSC 被激活,从而缩短 ARP 以提高兴奋性。一个神经元可与多个神经元之间建立突触联系,既可

以是兴奋性的,也可以是抑制性的,它们在时间空间上进行总和,引起神经元膜电位的变化,如 fAHP、sAHP、fADP、不完全复极等。我们的研究结果证明多突触传入总和效应可以通过影响突触后神经元的内在特性,进而影响其编码,以及产生动作电位的能力,这与以前的研究^[22]一致。

综上所述,大脑皮层 GABA 能神经元在整合突触输入后,当膜电位波动时其内在特性发生可塑性变化,不同的输入模式通过影响大脑皮层 GABA 能神经元动作电位的内在特性,从而调控 GABA 能神经元对输入信号的编程能力。这些变化使神经元对突触信号输入更为敏感,使中枢神经系统^[23-24]对机体活动起到更加稳定的调节。

[参 考 文 献]

- [1] WANG Q, LIU X, GE R, *et al.* The postnatal development of intrinsic properties and spike encoding at cortical GABAergic neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378 (4): 706.
- [2] CHEN N, CHEN X, YU J, *et al.* Afterhyperpolarization improves spike programming through lowering threshold potentials and refractory periods mediated by voltage-gated sodium channels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346 (3): 938.
- [3] WOMACK MD, KHODAKHAH K. Characterization of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cerebellar Purkinje neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16 (7): 1214.
- [4] SCHWINDT PC, SPAIN WJ, FOEHRING RC, *et al.* Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro* [J]. *J Neurophysiol*, 1988, 59 (2): 424.
- [5] GU N, VERVAEKE K, STORM JF. BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells [J]. *J Physiol*, 2007, 580 (Pt 3): 859.
- [6] GOLDBERG JA, WILSON CJ. Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons [J]. *J Neurosci*, 2005, 25 (44): 10230.
- [7] WANG JH, WEI J, CHEN X, *et al.* Gain and fidelity of transmission patterns at cortical excitatory unitary synapses improve spike encoding [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 17): 2951.
- [8] KOCHARYAN A, FERNANDES P, TONG XK, *et al.* Specific subtypes of cortical GABA interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28 (2): 221.
- [9] CHEN N, CHEN S, WU Y, *et al.* The refractory periods and threshold potentials of sequential spikes measured by whole-cell recording [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340 (1): 151.

- [10] GUAN S, MA S, ZHU Y, *et al.* The intrinsic mechanisms underlying the maturation of programming sequential spikes at cerebellar Purkinje cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345 (1): 175.
- [11] JIANG L, NI H, WANG QY, *et al.* Dual face of axonal inhibitory inputs in the modulation of neuronal excitability in cortical pyramidal neurons [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12 (7): 1079.
- [12] WANG JH. Short-term cerebral ischemia causes the dysfunction of interneurons and more excitation of pyramidal neurons in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2003, 60 (1/2): 53.
- [13] ZHANG M, HUNG FS, ZHU Y, *et al.* Calcium signal-dependent plasticity of neuronal excitability developed postnatally [J]. *J Neurobiol*, 2004, 61 (2): 277.
- [14] CHEN N, ZHU Y, GAO X, *et al.* Sodium channel-mediated intrinsic mechanisms underlying the differences of spike programming among GABAergic neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346 (1): 281.
- [15] PELKEY KA, CHITTAJALLU R, CRAIG MT, *et al.* Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97 (4): 1619.
- [16] ABRIEL H. Roles and regulation of the cardiac sodium channel $Na_v 1.5$: recent insights from experimental studies [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 76 (3): 381.
- [17] COLBERT CM, PAN E. Ion channel properties underlying axonal action potential initiation in pyramidal neurons [J]. *Nature Neurosci*, 2002, 5 (6): 533.
- [18] LU W, WEN B, ZHANG F, *et al.* Voltage-independent sodium channels emerge for an expression of activity-induced spontaneous spikes in GABAergic neurons [J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 38.
- [19] WANG J, OU SW, WANG YJ. Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system [J]. *Channels*, 2017, 11 (6): 534.
- [20] KINZEL W. On the stationary state of a network of inhibitory spiking neurons [J]. *J Comput Neurosci*, 2008, 24 (1): 105.
- [21] HAJ-DAHMANE S, ANDRADE R. Calcium-activated cation nonselective current contributes to the fast afterdepolarization in rat prefrontal cortex neurons [J]. *J Neurophysiol*, 1997, 78 (4): 1983.
- [22] KAWAGUCHI Y, KUBOTA Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex [J]. *Cereb Cortex*, 1997, 7 (6): 476.
- [23] CHEN N, CHEN X, WANG JH. Homeostasis established by coordination of subcellular compartment plasticity improves spike encoding [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 17): 2961.
- [24] LU W, FENG J, WEN B, *et al.* Activity-induced spontaneous spikes in GABAergic neurons suppress seizure discharges: an implication of computational modeling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (20): 32384.