

实验技术

## 小鸡脑片突触反应长时程增强的细胞内记录和多参数分析

蒋娟<sup>1,3</sup>, 隋南<sup>1,\*</sup>, 汪萌芽<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院心理研究所心理健康重点实验室, 北京 100101; <sup>2</sup>皖南医学院细胞电生理研究室, 芜湖 241002; <sup>3</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:** 本文旨在建立日龄小鸡脑片制备及其神经元细胞内记录技术, 观察中间腹内侧原皮质(intermediate medial mesopallium, IMM)神经元的电学特性、突触反应及其长时程增强(long-term potentiation, LTP)现象。取2~10日龄小鸡制备左侧前脑切片(500 μm厚), 对69个IMM神经元进行细胞内记录, 测得静息电位(-59.4±5.3) mV、膜斜率电阻(70.8±27.2) MΩ、时间常数(10.2±4.3) ms, 动作电位幅度(85.2±9.4) mV、阈电位(-38.7±7.6) mV、超射(25.6±8.9) mV、半幅时程(2.1±0.5) ms、最大上升斜率(150.5±41.2) mV/ms、最大下降斜率(-64.3±14.0) mV/ms。其中32个神经元的放电频率随刺激电流强度增大而升高[直线回归斜率为(21.5±10.9) Hz/nA, 均 $P<0.05$ ]。在所记录IMM神经元的背侧( $n=25$ )、腹侧( $n=62$ )局部电刺激(0.1 Hz)均可诱发具有强度、膜电位依赖性的去极化突触反应(即EPSP)。对12个测试细胞给予腹侧局部强直刺激(5 Hz, 300脉冲/串, 2串, 串间隔10 min), 在6个细胞诱导出EPSP的LTP, 呈现为EPSP的幅度、曲线下面积、时程和最大上升斜率均增大(强直刺激后45 min与强直刺激前相比,  $P<0.05$ ,  $n=5$ ), 但相应的膜电学特性无明显变化( $P>0.05$ )。以上结果表明, 在日龄小鸡脑片上建立的IMM神经元细胞内记录技术稳定可靠, 可用于突触反应LTP的多参数分析。

**关键词:** 小鸡; 离体; 端脑; 突触传递; 长时程增强; 电生理学; 膜电位

**中图分类号:** R338

## Intracellular recordings and multi-parameter analysis of long-term potentiation of synaptic responses in chick brain slices

JIANG Juan<sup>1,3</sup>, SUI Nan<sup>1,\*</sup>, WANG Meng-Ya<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>The Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>2</sup>Cell Electrophysiology Laboratory, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; <sup>3</sup>Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Day-old chick is unique animal model in brain development and behavior study. The intermediate medial mesopallium (IMM), a region of the chick forebrain, is intimately involved in the early learning processes, which offers the ideal opportunity to study the neural changes that underlie behavioral plasticity. In this paper, the intracellular recordings were conducted from IMM neurons in chick forebrain slices, in which electrophysiological properties, synaptic responses and long-term potentiation (LTP) were observed. Coronal sections of left forebrains (500 μm thick), containing IMM, were prepared from domestic chicks, aged 2-10 days. In 69 IMM neurons, the resting membrane potential was measured to be (-59.4±5.3) mV, slope membrane resistance (70.8±27.2) MΩ, and time constant (10.2±4.3) ms. The amplitude, threshold, overshoot, half-width, max rise slope and max decay slope of action potential evoked by intracellular current injection were (85.2±9.4) mV, (-38.7±7.6) mV, (25.6±8.9) mV, (2.1±0.5) ms, (150.5±41.2) mV/ms and (-64.3±14.0) mV/ms, respectively. Spike-firing frequency was increased with depolarizing current intensity in 32 of 69 tested cells [linear regression slope was (21.5±10.9) Hz/nA,  $P<0.05$  in all cells]. The depolarizing synaptic responses (*i.e.* EPSPs), with stimulus intensity- and membrane potential-dependent properties, were elicited by dorsal ( $n=25$ ) or ventral ( $n=62$ ) focal electrical

Received 2009-08-11 Accepted 2009-10-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30770719) and the Natural Science Foundation of Anhui Province, China (No. 090413084).

\*Corresponding author. SUI Nan, Tel: +86-10-64857369; Fax: +86-10-64872070; E-mail: suin@psych.ac.cn; WANG Meng-Ya, Tel: +86-553-3815565; Fax: +86-553-3932589; E-mail: wangmy@wnmc.edu.cn

stimuli at 0.1 Hz in all tested IMM neurons and could be nullified reversibly by perfusion with 100  $\mu\text{mol/L}$  AP5 (NMDA receptor antagonist) and 3  $\mu\text{mol/L}$  DNQX (non-NMDA receptor antagonist), but enlarged by 6  $\mu\text{mol/L}$  bicuculline (GABA<sub>A</sub> receptor antagonist). The EPSPs evoked by ventral stimulation were persistently increased after tetanic stimulation (5 Hz, 300 pulses/train, 2 trains, train interval 10 min) in 6 of 12 tested IMM neurons. The amplitude of EPSPs was potentiated to more than 120% of control level (when analyzed at 45 min of enhancement,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ), which lasted at least 30 min and then could be referred to as LTP. Moreover, area under curve, duration and max rise slope of EPSPs were also enhanced ( $P < 0.05$ ), while no significant changes were observed in the electrophysiological parameters of IMM neurons following induction of LTP ( $P > 0.05$ ). These results suggest that the intracellular recording techniques in the chick brain slices can be used to perform multi-parameter analysis of synaptic responses and their LTP.

**Key words:** chickens; *in vitro*; telencephalon; synaptic transmission; long-term potentiation; electrophysiology; membrane potentials

小鸡属于神经系统早熟的脊椎动物, 出生后首日就具有较强的学习记忆和独立行为能力。鸡胚的孵化周期较短, 脑内递质发生、发展具有清晰的时间线索, 便于研究早期神经递质系统发育与学习记忆或其它行为的相关性。此外, 出生后小鸡的颅骨很薄, 易于进行脑内的核团定位和局部微量药物注射, 也便于在出生早期进行药物干预, 以观察相应的行为效应。因此, 在脑发育与学习记忆或相关行为的脑机制研究方面, 日龄小鸡及其实验模型具有重要的应用价值和前景<sup>[1]</sup>。

小鸡前脑的中间腹内侧原皮质(intermediate medial mesopallium, IMM)与学习记忆形成密切相关, 此核团以往又被称为中间腹内侧上纹状体(intermediate medial hyperstriatum ventrale, IMHV), 属于鸟类参与学习记忆活动最重要的核团之一。已有的研究表明, 日龄小鸡的印记学习或一次性被动回避学习行为的习得均需要 IMM 的参与<sup>[2,3]</sup>, 并发现 IMM 核团在习得后出现结构或功能上的可塑性变化<sup>[4-6]</sup>。已有离体脑片细胞外记录的研究报道, 不同阶段的日龄小鸡 IMM 神经元的突触传递可塑性有所不同<sup>[7]</sup>, 而这种突触可塑性在经过被动回避学习后也发生变化<sup>[8]</sup>。因此, 为了研究发育环境对学习记忆等行为影响的脑机制, 我们建立了日龄小鸡前脑脑片的制备技术以及神经元细胞内记录方法, 并对 IMM 神经元的电生理性质、突触反应及其长时程增强(long-term potentiation, LTP)现象进行了初步观察和多参数分析。

## 1 材料与方 法

**1.1 小鸡前脑脑片的制备** 参考报道的小鸡前脑脑片<sup>[9]</sup>和大鼠脑、脊髓切片方法<sup>[10,11]</sup>, 取 2~10 日龄小鸡(皖南麻鸡, 芜湖种禽厂), 断头后剪去颅骨, 取出全脑, 放入 0~4 °C 经混合气体(95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>)饱和的人工脑脊液(artificial cerebrospinal

fluid, ACSF)中, 用剃须刀片将全脑进行矢状对切。取左侧大脑半球沿冠状面去除头、尾两端, 头部切除 2 mm 左右, 尾部沿端脑后缘切除。然后迅速将脑组织块用胶水(super glue)固定在振荡切片机(Vibratome)的切片浴槽内, 其背侧面对刀片(Gillette), 腹侧紧靠支持用的琼脂块, 尾端朝上。用 0~4 °C 并经混合气体饱和的 ACSF 浸浴组织块, 从尾端冠状切面(切片角度 12~15°)开始横切, 首先切去 2~3 mm 左右的一片弃去, 此时可在组织块横断面上看见前联合(anterior commissure), 然后切取厚度为 500  $\mu\text{m}$  的脑片 3~4 片, 置室温(20~25 °C)下经混合气体饱和的 ACSF 中备用。所用 ACSF 的配方为(mmol/L)<sup>[9]</sup>: NaCl 113, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, glucose 11.1, CaCl<sub>2</sub> 2.5。在制备脑片过程中, 用 0~4 °C 并经混合气体饱和的 ACSF 浸浴, 整个过程控制在 10~15 min。

**1.2 IMM 神经元的细胞内记录** 将孵育 1 h 后的小鸡脑片移入全浸式记录浴槽中(容量约 0.5 mL), 用上、下两个尼龙网相夹固定, 注意暴露 IMM 核团所在区域, 恒流泵进行持续灌流混合气体饱和的 ACSF。ACSF 经加热使其温度保持在(32±1) °C, 流速约为 1~2 mL/min。

用 P-97 程控微电极拉制仪(Sutter Instrument Co., USA)拉制含纤维玻璃微电极, 内充 3 mol/L 乙酸钾, 固定于微操纵仪(MP-1, Narishige, Japan)上, 将探头(headstage)上的银丝插入电极尾端用于胞内电流注入及电位记录。选用尖端阻抗为 60~120 M $\Omega$  的微电极, 在体视显微镜下经微操纵仪对小鸡前脑脑片 IMM 所在区域进行细胞穿刺。缓慢手动推进微电极, 当微电极压在细胞膜上时, 通过 Axoclamp-2B 微电极放大器(Axon Instrument Inc., USA)的附设遥控装置(Buzz)进行触发, 引起电极尖端的电磁振荡可使微电极刺入细胞内。记录到的膜电位信号经微

电极放大器用桥平衡模式进行放大, 桥平衡模式可使同一电极同时进行膜电位记录和电流注入。放大后的信号经 Digidata 1200 接口(Axon Instrument Inc., USA)输入计算机, 用 pClamp7.0 软件(Axon Instruments Inc., USA)进行采样、记录并保存。

**1.3 电刺激方法** 细胞内刺激是在计算机由 pClamp7.0 软件设定和触发, 经 Digidata 1200 接口接入微电极放大器后, 刺激电流由探头输出经微电极注入细胞内。

细胞旁局部刺激是由三通道电刺激器(Nihon Kohden, Japan)产生的方波脉冲, 分别经刺激器中的一个通道输出, 经隔离器(Nihon Kohden, Japan)以恒压模式经同芯双极刺激电极(Frederick Haer & Co., USA)施加。刺激电极尖端(直径约 0.25 mm)放置在所记录位点背侧或腹侧 0.5 mm 处, 用于诱导突触反应及其 LTP 现象。

**1.4 用药方法** 所用药品 2-氨基-5-磷酸基戊酸(2-amino-5-phosphonopentanoic acid, AP5; Sigma)、6,7-二硝基喹诺啉-2,3-二酮(6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione, DNQX; Sigma)、荷包牡丹碱(bicuculline; Sigma)均用蒸馏水配成贮存液, 临用时再用 ACSF 配成所需浓度灌流给药。

**1.5 数据处理和分析** 实验记录资料用 pClamp 10.0 中的 Clampfit 软件(Axon Instruments/Molecular Devices, USA)进行测量分析, 数据统计分析用 Origin5.0 软件(Microcal Software Inc., USA)。数据以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 并附样本数  $n$ 。由电流-电压( $I$ - $V$ )关系曲线计算膜斜率电阻(slope membrane resistance, slope  $R_m$ )、电流-放电频率( $I$ - $F$ )关系曲线分析均用直线回归法。LTP 期间突触反应和膜电学特性各参数的变化用配对  $t$  检验。

## 2 结果

在稳定记录的 IMM 神经元中, 选静息电位(resting potential, RP)负于  $-50$  mV、细胞内去极化电流刺激诱发的动作电位(action potential, AP)有超射、持续记录 15 min 以上的 69 个细胞进行下述观察。

### 2.1 膜电学性质和 $I$ - $V$ 关系曲线

在 RP 为  $(-59.4 \pm 5.3)$  mV 的 69 个神经元, 经微电极向细胞内注入  $-0.4$  nA、100 ms 超极化电流脉冲引起超极化电紧张电位, 测得膜时间常数(time constant,  $\tau$ )为  $(10.2 \pm 4.3)$  ms。给予强度在  $\pm 0.4$  nA 范围、时程 100 ms 的一系列电流脉冲, 记录对应的电紧张电位(图 1A), 测得稳态电位变化值( $V$ )与对

应电流( $I$ )的关系数据, 作图即得  $I$ - $V$  关系曲线(图 1B)。由此经直线回归法求得膜斜率电阻为  $(70.8 \pm 27.2)$  M $\Omega$ 。

### 2.2 动作电位和 $I$ - $F$ 关系曲线

对所观察的 69 个细胞给予 0.1~2.0 nA、25 ms 的去极化电流脉冲, 可在去极化电紧张电位基础上诱发锋电位即为 AP, 由此测得 AP 的幅度为  $(85.2 \pm 9.4)$  mV, 阈电位为  $(-38.7 \pm 7.6)$  mV, 超射为  $(25.6 \pm 8.9)$  mV, 半幅时程(half-width)为  $(2.1 \pm 0.5)$  ms, 最大上升斜率(max rise slope)为  $(150.5 \pm 41.2)$  mV/ms, 最大下降斜率(max decay slope)为  $(-64.3 \pm 14.0)$  mV/ms。

对所记录的 69 个细胞给予不同强度的 300 ms 去极化电流脉冲( $I$ ), 观察锋电位的放电频率( $F$ ), 作图得到  $I$ - $F$  关系曲线。其中有 32 个细胞的放电频率随电流强度增大而升高[直线回归斜率为  $(21.5 \pm 10.9)$  Hz/nA, 均  $P < 0.05$ ], 锋电位发放呈紧张型(图 1C, D)。其余 37 个细胞, 无论电流刺激强度多大, 只在起始部诱发 1~2 次锋电位发放。

### 2.3 突触反应及其药理学分析

将两根同芯双极刺激电极分别置于所记录神经元的背侧和腹侧进行局部电刺激(0.1 Hz), 均可在 IMM 神经元诱导出去极化突触反应, 称为兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic potential, EPSP), 即背侧 EPSP (D-EPSP,  $n=25$ )和腹侧 EPSP (V-EPSP,  $n=62$ )。诱导 EPSP 的刺激参数因刺激电极位置的不同而异, 刺激强度为 20~100 V、时程为 0.01~0.5 ms。该突触反应在所测试细胞均具有刺激强度依赖性(D-EPSP:  $n=7$ ; V-EPSP:  $n=18$ )和膜电位依赖性(D-EPSP:  $n=5$ ; V-EPSP:  $n=35$ ), 当去极化达到阈电位水平可爆发 AP, 典型记录例示于图 2。在手动钳制膜电位去极化时, 有 3/5 个背侧刺激、12/35 个腹侧刺激诱发的突触反应呈现了抑制性突触后电位(inhibitory postsynaptic potential, IPSP)成分, 表明所诱导的突触反应是 EPSP 和 IPSP 的复合反应。另外, 在 4/25 个背侧刺激、7/62 个腹侧刺激诱发的突触反应, 则直接呈现为 EPSP 和 IPSP 的复合。

对诱发出突触反应的 IMM 神经元予以灌流  $N$ -甲基- $D$ -天门冬氨酸( $N$ -methyl- $D$ -aspartate, NMDA)受体阻断剂 AP5 (100  $\mu\text{mol/L}$ ,  $n=7$ )或非 NMDA 受体阻断剂 DNQX (3  $\mu\text{mol/L}$ ,  $n=4$ ), EPSP 均减小(图 3A, B), AP5 和 DNQX 共同作用后 EPSP 完全被取消(图 3C,  $n=1$ )。

对记录到突触反应的细胞予以灌流  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) A 型受体阻断剂荷包牡

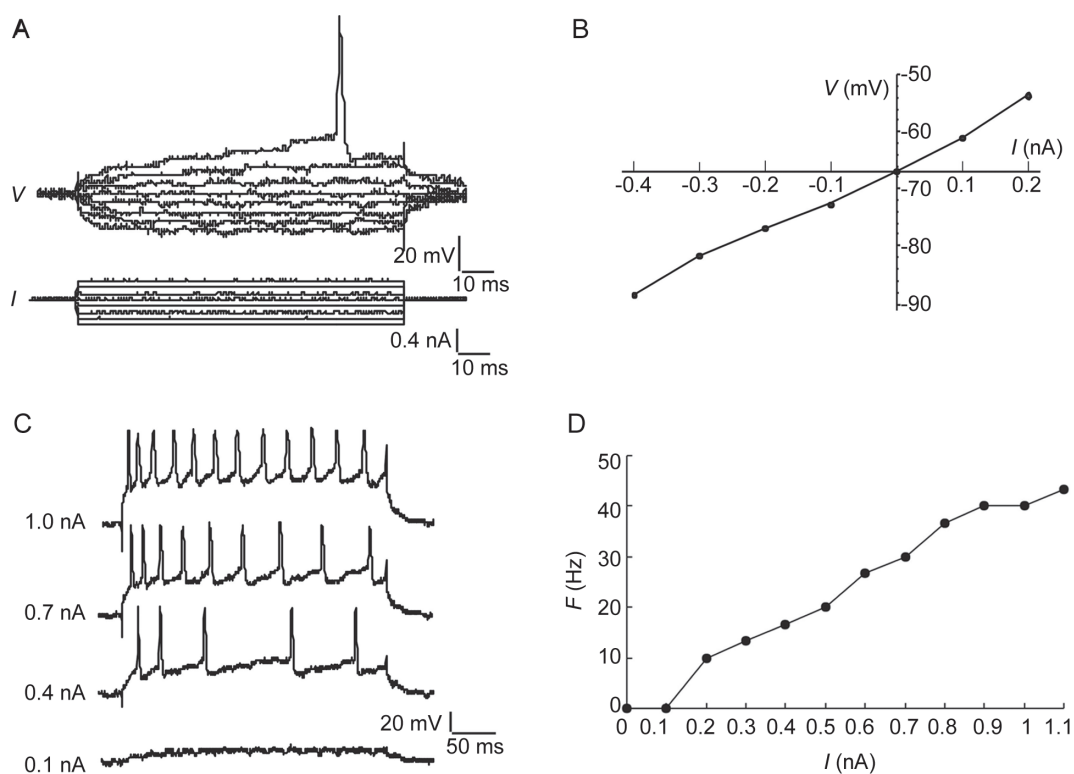


图 1. 日龄小鸡脑片中间内侧原皮质(IMM)神经元的电生理特性

Fig. 1. Electrophysiological properties of neurons in intermediate medial mesopallium (IMM) of chick forebrain slices. *A*: Experimental recordings of injected current ( $I$ ) and electrotonic potential ( $V$ ) in an IMM neuron. *B*: Plotting of steady amplitude of electrotonic potential ( $V$ ) vs current intensity ( $I$ ) from *A*, from which the slope membrane resistance was estimated as  $49 \text{ M}\Omega$  by linear regression method. Chick age: 6 days; RP:  $-67 \text{ mV}$ . *C*: Relation of spike-firing frequency to injected depolarizing current intensity (values left to the sampled traces) in an IMM neuron. *D*: Plotting of spike-firing frequency ( $F$ ) vs current intensity ( $I$ ) from *C*. Chick age: 3 days; RP:  $-58 \text{ mV}$ .

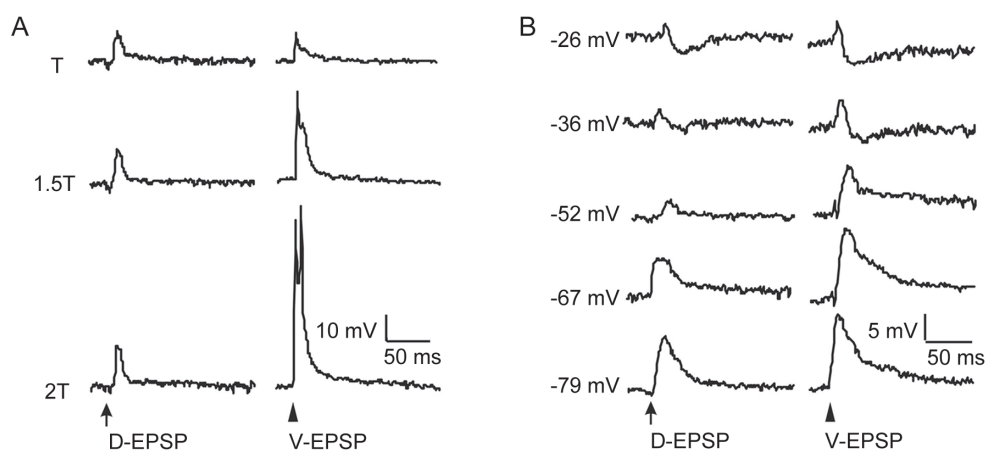


图 2. IMM 神经元去极化突触反应(EPSP)的刺激强度依赖性(A)和膜电位依赖性(B)

Fig. 2. Stimulus intensity-dependent (*A*) and membrane potential-dependent (*B*) properties of depolarizing synaptic responses (namely excitatory postsynaptic potential, EPSP) in IMM neurons *in vitro*. T: threshold intensity of stimulus. Arrows and triangles indicate stimulus artifacts of dorsal and ventral focal stimulation, respectively. D-EPSP: EPSP evoked by dorsal focal stimulation; V-EPSP: EPSP evoked by ventral focal stimulation. Each trace is the average of 5 sweeps. Note that a component of inhibitory postsynaptic potential (IPSP) was seen while membrane was depolarized in *B*. *A*: Chick age: 8 days; RP was  $-64 \text{ mV}$ . *B*: Chick age: 2 days; RP was  $-52 \text{ mV}$ .

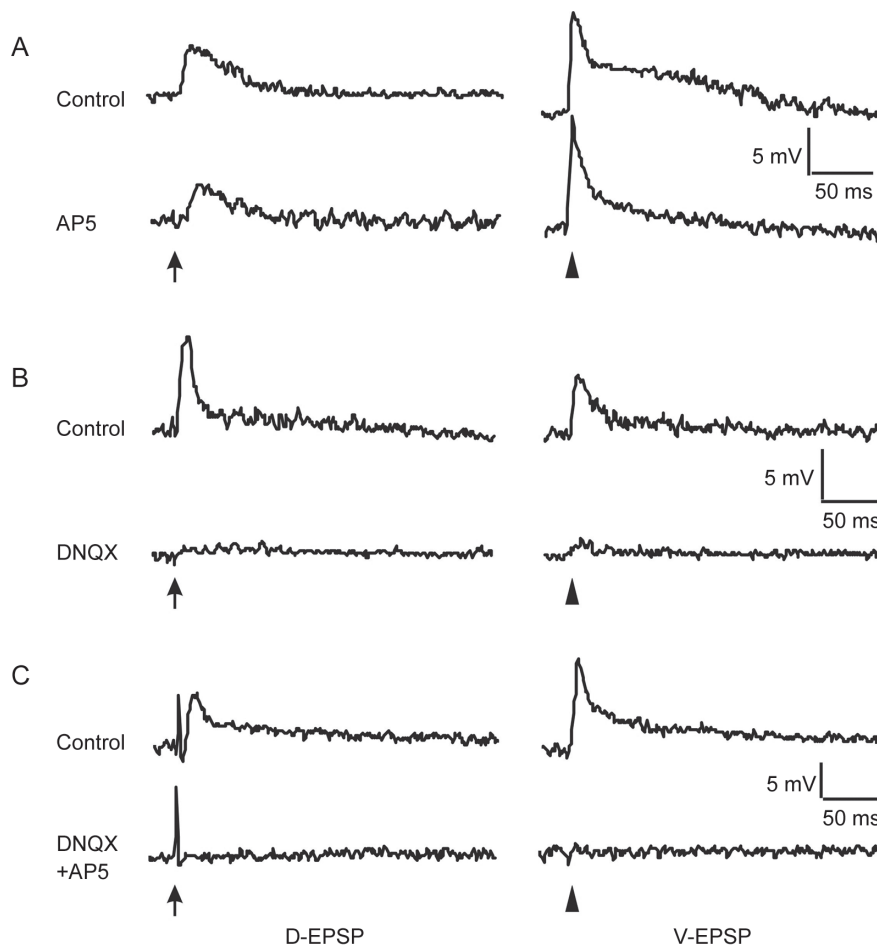


图 3. AP5 和 DNQX 对 IMM 神经元去极化突触反应(EPSP)的抑制作用

Fig. 3. Inhibitory effects of AP5 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and DNQX (3  $\mu\text{mol/L}$ ) on excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in IMM neurons *in vitro*. Arrows and triangles indicate stimulus artifacts of dorsal and ventral focal stimulation, respectively. D-EPSP: EPSP evoked by dorsal focal stimulation; V-EPSP: EPSP evoked by ventral focal stimulation. Each trace is the average of 5 sweeps. A: Chick age: 7 days; RP was  $-55\text{ mV}$ . B: Chick age: 2 days; RP was  $-52\text{ mV}$ . C: Chick age: 4 days; RP was  $-55\text{ mV}$ .

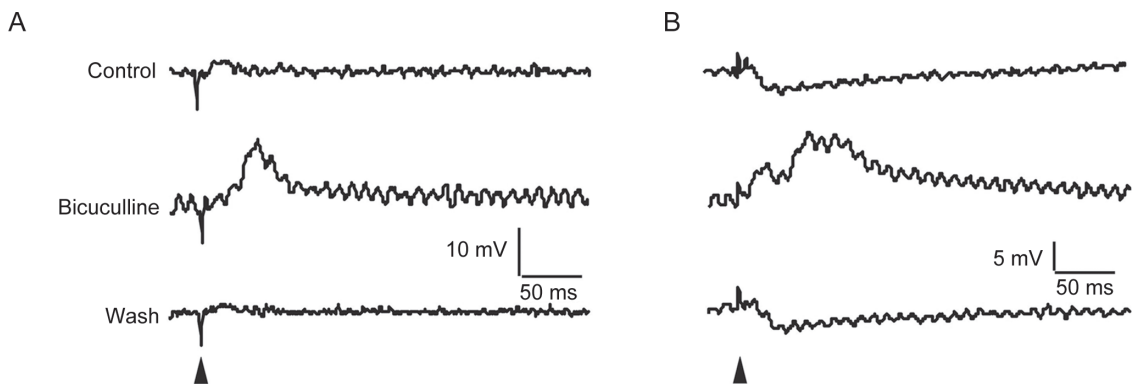


图 4. 荷包牡丹碱对 IMM 神经元突触反应的作用

Fig. 4. Effects of bicuculline (6  $\mu\text{mol/L}$ ) on ventral EPSP (A) or complex response with EPSP prior to inhibitory postsynaptic potential (IPSP) (B) in IMM neurons *in vitro*. Triangles: stimulus artifacts of ventral focal stimulation. Each trace is the average of 5 sweeps. A: Chick age: 2 days; RP was  $-67\text{ mV}$ . B: Chick age: 4 days; RP was  $-53\text{ mV}$ .

丹碱(6  $\mu\text{mol/L}$ ,  $n=6$ ), 可观察到 EPSP 幅度增大, 时程延长, 或伴有 IPSP 成分的消失(图 4)。

在不施加局部电刺激的情况下, 还可记录到自发的 EPSP (spontaneous EPSP,  $n=2$ ), 予以灌流 AP5 (100  $\mu\text{mol/L}$ )后该反应均完全消失, 说明自发 EPSP 是由 NMDA 受体介导的(图 5)。

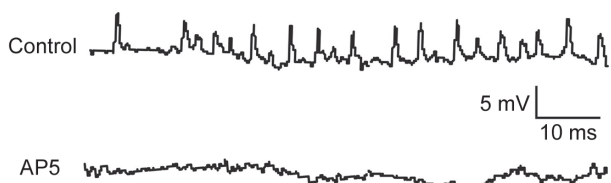


图 5. AP5 对 IMM 神经元自发突触反应的抑制作用  
Fig. 5. Inhibitory effect of AP5 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) on spontaneous EPSPs in an IMM neuron *in vitro*. Chick age: 6 days; RP was  $-60$  mV.

### 2.3 IMM 神经元突触反应的 LTP 现象

对所记录的 18 个 IMM 神经元, 局部(背侧或腹侧)施加测试刺激(0.1 Hz)诱发 EPSP, 稳定记录 30 min 后施加强直刺激(5 Hz, 300 脉冲/串, 2 串, 串间隔 10 min), 观察突触反应的变化。在腹侧施加强直刺激的 12 个细胞中有 6 个细胞的 EPSP 出现增大, 根据 LTP 的判定标准(强直刺激后 EPSP 的幅度比基础 EPSP 幅度升高 20% 以上, 维持时间 30 min 以上), 可以判定为 LTP 现象。强直刺激后, 除 EPSP 幅度增加外, 其曲线下面积、时程和最大上升斜率均增大(强直刺激后 45 min 与强直刺激前相比,  $P<0.05$ , 图 6)。表 1 是 5 个细胞 EPSP 的 LTP 现象统计分析, 另外一个细胞在强直刺激后, 其去极化突触反应上产生了 AP。LTP 诱导前后 IMM 神经元膜斜率电阻、AP 幅度等电生理学特性未见明显变化(图 7), 与强直刺激前相比, 对强直刺激后

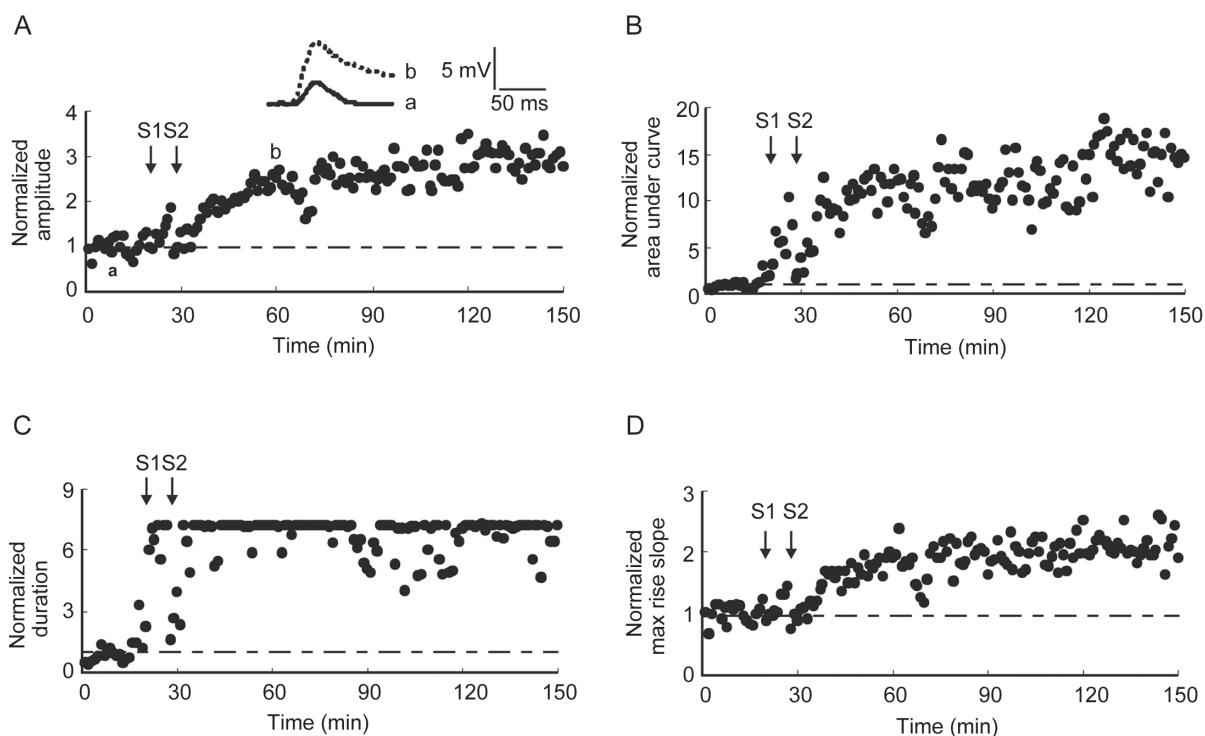


图 6. 腹侧强直刺激在 IMM 神经元诱发 EPSP 的长时程增强现象

Fig. 6. Persistent enhancement of amplitude (A), area under curve (B), duration (C) and max rise slope (D) of EPSP induced by ventral tetanic stimulation in an IMM neuron. Test stimuli were given at 0.1 Hz and the mean values were calculated every one minute. Tetanic stimulation (5 Hz, 300 pulses/train, 2 trains, train interval 10 min) was delivered at the arrows (1<sup>st</sup> train at S1 and 2<sup>nd</sup> train at S2). The dashed line is the mean response before tetanic stimulation. Insets in A show the averaged sample traces before (solid line, a) and after (dotted line, b) tetanic stimulation. Each datum point is the average value of 5 sweeps sampled during 1 min. Note the ceiling phenomenon in C is due to the recording duration limit (also see inset in A). Chick age: 3 days; RP:  $-58$  mV.



表 1. 腹侧强直刺激 IMM 神经元诱发 LTP 前后 EPSPs 各参数的比较

Table 1. Comparisons of electrophysiological parameters of EPSPs before and during LTP induced by ventral tetanic stimulation in IMM neurons

	EPSPs before LTP	EPSPs during LTP			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Amplitude (mV)	4.0±0.6	6.5±2.1*	6.2±2.5	6.4±1.8*	6.0±2.2
Area under curve (mV·ms)	199.1±273.6	683.3±783.2	783.1±770.1	619.9±367.6*	708.2±561.0
Duration (ms)	160.0±243.0	365.7±368.8*	409.1±341.9*	478.5±304.7**	453.0±327.2*
Max rise slope (mV/ms)	1.4±0.2	2.5±0.4**	2.0±0.4**	2.0±0.5**	2.2±0.6*

Mean±SD,  $n=5$ . Paired  $t$  test. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs EPSPs before LTP.

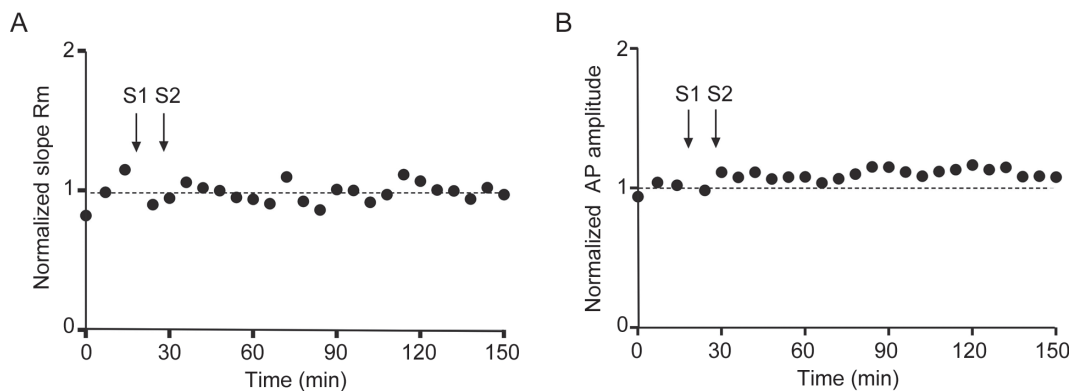


图 7. 腹侧强直刺激诱导 LTP 前后 IMM 神经元膜斜率电阻(A)和动作电位幅度(B)的变化

Fig. 7. Time course of normalized slope membrane resistance (slope Rm) (A) and amplitude of action potential (B) in an IMM neuron before and during ventral tetanic stimulation-induced LTP. Tetanic stimulation was delivered at the arrows (S1 and S2). The dashed line is the mean value before tetanic stimulation. The IMM neuron is the same one in Fig. 6.

30 min、60 min 两个时间点的膜电学参数进行统计分析, 均无显著性变化( $P>0.05$ ,  $n=5$ )。另外, 在背侧施加强直刺激的 6 个细胞均未观察到 LTP 现象。

### 3 讨论

本实验制备的日龄小鸡前脑脑片, 经体视显微镜鉴定在 IMM 核团进行细胞内记录, 稳定记录时间最长可达 8 h。所记录的 IMM 神经元存活状态良好, 细胞电生理学参数与文献报道相似<sup>[12]</sup>, 局部电刺激能诱发突触反应, 而且突触反应的细胞电生理学特性明确、对药物敏感, 表明突触联系通路得以保存, 可用于突触传递的机制及其可塑性的研究。

细胞内记录技术的关键在于制备存活良好的标本以及适宜的微电极<sup>[10]</sup>。由于突触可塑性观察需要细胞具有尽可能长时的稳定性, 因此切片质量至关重要。在剪去颅骨时应小心操作以避免损伤脑组织, 切片时避免挤压。适宜的微电极能保证穿刺的质量。在进行突触可塑性观察时, 要考虑到小鸡日

龄的选择。不同日龄、不同光照条件下, IMM 神经元 LTP 的诱导率有所差异。一般来说, 在暗孵化条件下, 出生后 2~5 d 小鸡的突触可塑性要高于其它日龄的小鸡<sup>[7]</sup>。此外, 还要注意选取含有腹侧隔中脑神经束(septomesencephalic tract)的切片, 其 LTP 诱导率相对高于其它层面的切片<sup>[13]</sup>。

对突触可塑性的观察分析通常采用细胞外记录技术<sup>[14]</sup>。与细胞外记录技术相比, 应用脑片细胞内记录技术进行突触可塑性研究有独特的优势。它不仅可以对强直刺激前后的突触反应进行多个参数的分析比较, 并且在诱导 LTP 前后可以同时观察神经元的电生理特性, 有利于对 LTP 现象进行全面的分析。本实验对稳定记录的 IMM 神经元附近予以强直电刺激, 其中腹侧强直刺激后在 50% 的神经元成功诱导出 LTP 现象, 最长可持续 4 h 以上。这种增强不仅表现在突触反应的幅度上, 而是在突触反应的时程、曲线下面积、最大上升斜率等多个参数均呈现增大, 增大的程度又有所不同, 如在 IMM 神

经元的 LTP, EPSP 的时程延长尤其突出, 表明在 LTP 分析中进行多参数分析才是更全面了解突触可塑性的必要方法。而 EPSP 时程和曲线下面积的标准差较大(表 1), 系存在长、短时程 EPSP 所致, 这不仅体现了初步观察到 LTP 现象的生理意义, 更提示了对长、短时程 EPSP 进行鉴定和相应 LTP 进行分类分析的必要性。同时, 本研究还显示 LTP 诱导前后 IMM 神经元的电生理特性无明显改变, 排除了突触后膜电学特性改变的影响, 均为 LTP 产生机制的分析, 提供了更多的资料。突触反应的 LTP 现象作为一种长时程的突触可塑性变化, 长期以来被认为是学习和记忆的主要神经机制之一<sup>[15]</sup>。故小鸡脑片的突触可塑性研究与行为学实验相结合, 有利于揭示日龄小鸡早期学习记忆与 LTP 现象之间的关系, 也可研究某些药物(如成瘾药物)对学习记忆功能的作用以及这种作用的神经元机制。

小鸡脑片中, 除 IMM 外, 参与一次性被动回避学习的另一核团——中间纹状体(medial striatum)<sup>[16]</sup>、与听觉印记相关的中喙端新纹状体-上纹状体复合体(mediorostral neostriatum-hyperstriatum complex)<sup>[17]</sup>以及海马<sup>[18]</sup>等均可诱导出 LTP 现象。应用日龄小鸡脑片细胞内记录技术, 同样可以对上述核团进行深入的研究和分析。因此, 日龄小鸡脑片神经元细胞内记录技术, 不仅可以对神经元本身的电生理特性进行分析, 还可以进行突触联系、中枢神经递质和受体、突触可塑性以及急、慢性药物作用的研究, 是对学习记忆机制进行离体细胞电生理和药理学研究的一种可靠方法。

### 参考文献

- Guan LC (管林初), Chen SS. Introduction of a method in establishing a new learning and memory model with chicks. *Acta Psychol Sin* (心理学报) 1991; 23(3): 319-324 (Chinese, English abstract).
- McCabe BJ, Horn G, Bateson PPG. Effects of restricted lesions of the chick forebrain on the acquisition of filial preference during imprinting. *Brain Res* 1981; 205(1): 29-37.
- Davies DC, Taylor DA, Johnson MH. The effects of hyperstriatal lesions on 1-trial passive avoidance learning in the chick. *J Neurosci* 1988; 8(12): 4662-4666.
- Payne JK, Horn G. Long-term consequences of exposure to an imprinting stimulus on 'spontaneous' impulse activity in the chick brain. *Behav Brain Res* 1984; 13(2): 155-162.
- Bradford CM, McCabe BJ. Neuronal activity related to memory in the intermediate and medial part of the hyperstriatum ventrale (IMHV) of the chick. *Brain Res* 1994; 640(1-2): 11-16.
- Stewart MG, Rusakov DA. Morphological changes associated with stages of memory formation in the chick following passive avoidance training. *Behav Brain Res* 1995; 66(1-2): 21-28.
- Bradley PM, Burns BD, Webb AC. The effects of age and visual experience on potentiation of responses in slices from the chick forebrain. *Proc Biol Sci* 1991; 243(1306): 25-30.
- Bradley PM, Burns BD, King TM, Webb AC. Electrophysiological correlates of past history: *in vitro* studies of the IMHV of the domestic chick. *Behav Brain Res* 1999; 98(2): 261-265.
- Bradley PM, Burns BD, Chinnery PF, Webb AC. Local circuitry in the IMHV of the domestic chick (*Gallus domesticus*). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1990; 240(1299): 479-492.
- Wang MY (汪萌芽), Shen E. Characteristics of synaptic responses of motoneurons to ventrolateral funiculus stimulation *in vitro*. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 1997; 49(6): 625-631 (Chinese, English abstract).
- Jiang J (蒋娟), Wang MY, Hu FY, Pan QW. Concentration-dependent actions of ketamine on CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus *in vitro*. *Acta Acad Med Wannan* (皖南医学院学报) 2002; 21(4): 244-246 (Chinese, English abstract).
- Bradley PM, Burns BD, King TM, Webb AC. Morphological and electrophysiological properties of neurons in an area of the chick brain involved learning. *Brain Res* 1996; 727(1-2):125-132.
- Bradley PM, Burns BD, Webb AC. Potentiation of synaptic responses in slices from the chick forebrain. *Proc Biol Sci* 1991; 243(1306): 19-24.
- Liu XJ, Huang FS, Huang C, Yang ZM, Feng XZ. Analysis of high-frequency stimulation-evoked synaptic plasticity in mouse hippocampal CA1 region. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2008; 60 (2): 284-291.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 2006; 313 (5790): 1093-1097.
- Matsushima T, Izawa E I, Yanagihara S. D<sub>1</sub>-receptor dependent synaptic potentiation in the basal ganglia of quail chicks. *Neuroreport* 2001; 12(13): 2831-2837.
- Wang X, Babinsky R, Scheich H. Synaptic potentiation and depression in slices of mediorostral neostriatum-hyperstriatum complex, an auditory imprinting-relevant area in chick forebrain. *Neuroscience* 1994; 60(3): 689-699.
- Margrie TW, Rostas JA, Sah P. Long-term potentiation of synaptic transmission in the avian hippocampus. *J Neurosci* 1998; 18(4): 1207-1216.