

## 研究论文

## AMPA受体参与的出生后大鼠海马发育早期的电生理学特点

陈雪怡<sup>1</sup>, 张皓峰<sup>2</sup>, 赵文<sup>1,3,4</sup>, 高钰丹<sup>1,3,4</sup>, 段红梅<sup>1,3,4</sup>, 郝鹏<sup>1,3,4</sup>, 杨朝阳<sup>1,3,4</sup>, 李晓光<sup>1,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>首都医科大学神经生物学系, 北京 100069; <sup>2</sup>首都医科大学附属北京友谊医院口腔科, 北京 100050; <sup>3</sup>北京航空航天大学大学生物与医学工程学院生物材料和神经再生北京市实验室, 北京 100191; <sup>4</sup>北京航空航天大学大数据精准医疗高精尖创新中心, 北京 100191

**摘要:** 本研究旨在探讨 $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)受体参与的出生后大鼠海马发育早期的电生理学特点。选择出生后0.5月龄、1月龄、2月龄和3月龄Wistar大鼠共计48只(每组各12只)。应用全细胞膜片钳技术及MED64平面微电极阵列技术检测海马CA1区锥体神经元的被动膜特性及AMPA受体参与的自发兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC)和场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)。结果显示, 海马CA1区锥体神经元在出生后0.5~3月龄期间, 在被动膜特性方面表现为: 膜电容与静息膜电位无显著性变化; 膜输入电阻与时间常数均显著下降。在主动膜特性方面, 呈现出阶段性变化: 0.5~1月龄期间, sEPSC的反应表现为: 振幅显著升高, 频率明显增大, 上升时间及下降时间显著增加; 1~3月龄期间, sEPSC的反应特性与0.5~1月龄期间相反。此外, 0.5~3月龄期间, 海马CA1区诱发出的fEPSP范围明显扩大, 而幅值显著减小; 各月龄海马CA1区诱发出的fEPSP幅值均可被AMPA受体竞争性拮抗剂6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(CNQX)明显降低。以上结果提示, 在出生后大鼠海马发育早期过程中, AMPA受体作为调节突触传递和突触联系的主要兴奋性受体, 可以促进海马的发育及功能成熟。

**关键词:** AMPA受体; 出生后发育早期; 全细胞膜片钳技术; MED64平面微电极阵列记录技术

**中图分类号:** R742

## Electrophysiological characteristics of hippocampal postnatal early development mediated by AMPA receptors in rats

CHEN Xue-Yi<sup>1</sup>, ZHANG Ai-Feng<sup>2</sup>, ZHAO Wen<sup>1,3,4</sup>, GAO Yu-Dan<sup>1,3,4</sup>, DUAN Hong-Mei<sup>1,3,4</sup>, HAO Peng<sup>1,3,4</sup>, YANG Zhao-Yang<sup>1,3,4</sup>, LI Xiao-Guang<sup>1,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurobiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China; <sup>2</sup>Department of Stomatology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; <sup>3</sup>Beijing Key Laboratory for Biomaterials and Neural Regeneration, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China; <sup>4</sup>Beijing Advanced Innovation Center for Big Data-Based Precision Medicine, Beihang University, Beijing 100191, China

**Abstract:** The present study was aimed to investigate the electrophysiological characteristics of hippocampal postnatal early development mediated by  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in rats. Forty-eight Wistar rats were divided into postnatal 0.5-, 1-, 2- and 3-month groups ( $n = 12$ ). Spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) and field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) mediated by AMPA receptors were recorded to evaluate the changes in the intrinsic membrane

Received 2017-12-23 Accepted 2018-03-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31730030, 31670988, 31771053 and 31650001), the National Basic Research Development Program of China (No. 2017YFC1104002, 2017YFC1104001), Project of International Cooperation and Exchanges (No. 31320103903), the Science and Technology Program of Beijing Municipality, China (No. Z171100002217066, Z18110001818007), Beijing Natural Science Foundation Program and Scientific Research Key Program of Beijing Municipal Commission of Education (No. KZ201810025030) and the Special Funds for the Authors of Excellent Doctoral Dissertations of Universities and Colleges in China (No. 201356).

\*Corresponding author. Tel: +86-10-83950083; E-mail: [lxgchina@sina.com](mailto:lxgchina@sina.com)

properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons by using patch-clamp and MED64 planar microelectrode array technique respectively. The results showed that, during the period of postnatal 0.5–3 months, some of the intrinsic membrane properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons, such as the membrane capacitance ( $C_m$ ) and the resting membrane potential (RMP), showed no significant changes, while the membrane input resistance ( $R_{in}$ ) and the time constant ( $\tau$ ) of the cells were decreased significantly. The amplitude, frequency and kinetics (both rise and decay times) of sEPSCs were significantly increased during the period of postnatal 0.5–1 month, but they were all decreased during the period of postnatal 1–3 months. In addition, the range of evoked fEPSPs in hippocampal CA1 region was significantly expanded, but the fEPSP amplitudes were decreased significantly during the period of postnatal 0.5–3 months. Furthermore, the evoked fEPSPs could be significantly inhibited by extracellular application of the AMPA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). These results suggest that AMPA receptor may act as a major type of excitatory receptor to regulate synaptic transmission and connections during the early stage of hippocampal postnatal development, which promotes the development and functional maturation of hippocampus in rats.

**Key words:** AMPA receptor; early postnatal development; patch clamp technique; planar microelectrode array recording technique

中枢神经系统损伤后修复被认为是二十一世纪神经科学中发展最为活跃的研究领域之一。创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 已造成全球众多患者残疾甚至死亡, 但目前对其的治疗主要集中在减少继发损伤的程度, 而不是对原发损伤的修复<sup>[1]</sup>。本研究组前期应用神经营养因子3与天然可降解的高分子材料壳聚糖耦合形成的组织工程学支架已取得了突破性进展, 显示神经营养因子3-壳聚糖载体可有效改善TBI后的认知缺陷<sup>[2]</sup>, 但其潜在机制仍不明确。

在出生后, 中枢神经系统的发育过程是发育神经生物学的重要研究内容。依照功能学标准, 可将大鼠的出生后发育过程分为发育早期(3月龄以前)、成年期(3~12月龄)以及发育晚期(12月龄以上)<sup>[3]</sup>。海马内介导兴奋性突触传递的主要神经递质为谷氨酸, 谷氨酸主要作用于N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体和 $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA)受体<sup>[4]</sup>, 二者均为离子型谷氨酸受体, 具有促进神经元分化、调节神经元发育、参与神经环路及突触可塑性形成等功能<sup>[5]</sup>。

以往的研究显示, 在出生后1周内, 谷氨酸能的兴奋性反应以NMDA受体介导为主。从出生后第2周起, NMDA受体介导的反应逐渐下降, AMPA受体介导的反应则逐渐增强<sup>[6]</sup>。免疫细胞化学和定量细胞ELISA实验表明, 在出生后2周, AMPA受体在突触募集的数量增加<sup>[7, 8]</sup>。早期研究主要致力于探讨AMPA受体在正常脑内的作用机制及生理特性<sup>[9, 10]</sup>。然而, 在出生后发育早期AMPA受体在转变过程中如何影响海马内CA1区锥体神经元的

突触传递, 及其在神经网络形成及成熟过程中作用机制尚不明了。

神经元及其构成的神经网络在不同发育阶段具有差异性。因此, 本研究应用全细胞膜片钳技术, 检测海马CA1区锥体神经元的被动膜特性及AMPA受体参与的自发兴奋性活动; 利用MED64技术, 通过刺激谢弗侧支-CA1 (Schaffer collateral-CA1, SC-CA1) 通路, 检测海马CA1区AMPA受体介导的网络活动特征, 并且结合药理学试验评估AMPA受体在兴奋性作用中的成分组成, 以探讨AMPA受体参与出生后大鼠海马早期发育中的电生理学特点。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物及分组** 正常发育早期雌性Wistar大鼠48只, SPF级, 由首都医科大学动物部提供, 许可证号: SCXK(京)2016-0006。大鼠按照年龄分为4组, 分别为出生后0.5月龄( $n=12$ )、1月龄( $n=12$ )、2月龄( $n=12$ )、3月龄( $n=12$ )组。动物实验方案获得首都医科大学动物伦理委员会批准, 伦理编号为AEEI-2016-166, 实验动物的使用均按照首都医科大学实验动物中心和北京实验动物协会的标准执行。

**1.2 主要试剂及仪器** 主要试剂: 荷包牡丹碱(bicuculline, BIC)、D-2-氨基-5-磷酸基戊酸(D-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, D-APV)、6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX)购自Sigma公司。

MED64相关仪器: MED64平面微电极阵列系统、P515A(8×8)MED64平面微电极购自日本Alpha MED Scientific公司; SHA-22L盖网及锚购

自美国 Harvard 公司; DTK-1000 振动切片机购自日本 DSK 公司; DP73 CCD 显微照相机、IX71 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

膜片钳相关仪器: Digidata-1332 数模转换器、Axonpatch-200B 放大器、SHID-22CKIT 压力锚均购自美国 Warner Instr 公司; MP-285 电动微操作器购自美国 Sutter 公司; 玻璃微电极购自中国武汉微探公司; PC-10 垂直电极拉制仪、MF-900 电极抛光仪购自日本 Narishige 公司。

**1.3 海马脑片制备** 6% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 迅速断头取脑后, 置于冰水混合态的标准人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中。ACSF 成分如下: NaCl 119 mmol/L, KCl 2.5 mmol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  26.2 mmol/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.3 mmol/L, *D*-葡萄糖 11 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mmol/L<sup>[11]</sup>。振动切片机制备 400  $\mu\text{m}$  厚的海马矢状切片, 用于膜片钳记录或 MED64 平面微电极阵列记录。切片后迅速转移至氧饱和 (95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ) 的 ACSF 中, 32  $^\circ\text{C}$  水浴锅中孵育 30 min 后转移至室温 (21  $^\circ\text{C}$ ), 至少孵育 1 h 后记录。记录时持续灌流氧饱和的 ACSF, 流速控制在 2~5 mL/min。电生理记录在断头后 6 h 内进行, 以保证细胞及组织活性。

**1.4 膜片钳全细胞记录** 海马脑片室温孵育 1 h 后, 转移至记录槽内, 利用红外倒置显微镜确定 CA1 区锥体细胞层位置, 并用锚固定脑片。在硼硅膜片钳电极内填充电极内液, 电极电阻 3~5 M $\Omega$ 。记录 CA1 区锥体神经元被动膜特性时, 电极内液成分如下: K-gluconate 130 mmol/L, NaCl 15 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, HEPES 5 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 4 mmol/L,  $\text{Na}^+$ -GTP 0.3 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  0.2 mmol/L, 用 KOH 调节 pH 至 7.3~7.4, 渗透压测定为 285 mOsm/L<sup>[12]</sup>, 其中  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 及  $\text{Na}^+$ -GTP 可保证在检测时神经元在较长时间内维持细胞活性<sup>[13]</sup>。在 -70 mV 的钳制电位下, 记录膜电容 (membrane capacitance,  $C_m$ ) 和膜电阻 (membrane resistance,  $R_m$ ), 并通过  $C_m$  与  $R_m$  的乘积计算时间常数 (time constant,  $\tau$ )<sup>[12]</sup>。在电流钳模式下, 记录稳态阈下电压对 1 s 直流电刺激在 -100~0 pA 范围内的响应, 而膜输入电阻 (membrane input resistance,  $R_{in}$ ) 表示为电压反应幅值与注入电流之间斜率的线性关系<sup>[14]</sup>。在  $I = 0$  电流钳模式下, 记录静息膜电位 (resting membrane potential, RMP), 在实验全程中监测并评估细胞活性<sup>[12]</sup>。记录 CA1 区锥体神经元主动膜特性时,

电极内液成分如下: CsOH 135 mmol/L, 葡萄糖酸 135 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  10 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 2 mmol/L,  $\text{Na}^+$ -GTP 0.2 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1 mmol/L, QX-314 2 mmol/L, 其中 CsOH 与葡萄糖酸结合后的产物及 QX-314 可避免在记录过程中动作电位的爆发<sup>[12]</sup>。实验数据使用 Axonpatch-200B 放大器、Digidata-1332 数模转换器及 Clampex 10.0 软件采集记录, 使用 Clampfit10.0 软件分析处理。数据采集使用 1 kHz 低通滤波, 采样时设置为 10 kHz。在 gap-free 电压钳模式下, 将钳制电位设定为 -70 mV, ACSF 灌流 10 min 检测噪声, 调整噪声不超过 2 pA 后, 在 ACSF 灌流液中添加  $\gamma$ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) A 型受体阻滞剂 BIC (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 及 NMDA 受体竞争性拮抗剂 D-APV (50  $\mu\text{mol/L}$ ), 记录自发兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC) 10 min, 并分析 sEPSC 的振幅、频率、上升时间及下降时间。

**1.5 MED64 平面微电极阵列记录** 实验前对于新电极使用聚氮丙啶硫化物预处理, 以增强电极探针表面的附着力与亲和性。海马脑片室温孵育 1 h 后, 置于 MED64 电极上, 倒置显微镜下将切片移动至适当位置, 使海马 CA1 区域覆盖在 64 个电极点上, 并用盖网及锚固定脑片。使用 MED64 平面微电极阵列系统中的 MED64 Mobius 0.5.0 软件采集并分析实验数据。ACSF 持续灌流 20 min 检测系统噪声, 将噪声控制在  $\pm 5 \mu\text{V}$  后开始记录, 记录时在灌流液中添加 NMDA 受体竞争性拮抗剂 D-APV (50  $\mu\text{mol/L}$ )。记录输入/输出 (I/O) 曲线, 依次获取 0~200  $\mu\text{A}$  电流刺激下产生的兴奋性突触后场电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP), 选择引起 50% 最大幅值的电流强度作为最适刺激强度进行记录, 刺激频率为 0.1 Hz。记录基线 20 min 后, 添加 10  $\mu\text{mol/L}$  AMPA 受体阻断剂 CNQX, 药物作用 20 min, 观察到 fEPSP 振幅明显被抑制后进行洗脱。

**1.6 统计学分析** 所有计量资料均表示为 mean  $\pm$  SEM, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 海马 CA1 区锥体神经元在 0.5~3 月龄间被动膜特性及主动膜特性组间差异的检验采用 Bonferroni 法, CNQX 给药前后 fEPSP 幅值差异的检验采用 LSD 法。  $P < 0.05$  时认为差异具有显著性。



## 2 结果

### 2.1 出生后发育早期海马CA1区锥体神经元被动膜特性变化

采用全细胞电流钳模式研究出生后发育早期海马CA1区锥体神经元被动膜特性,结果显示,在0.5~3月龄间,随着发育时间的延长,海马CA1区锥体神经元Cm(图1A)及RMP(图1B)无显著性变化,而Rin( $P < 0.01$ ,图1C)与 $\tau$ ( $P < 0.001$ ,图1D)均显著下降。

### 2.2 出生后发育早期海马CA1区锥体神经元主动膜特性变化

采用全细胞电压钳模式,钳制电压 $-70$  mV,在ACSF灌流液中添加GABA<sub>A</sub>受体阻滞剂BIC( $10$   $\mu\text{mol/L}$ )及NMDA受体竞争性拮抗剂D-APV( $50$   $\mu\text{mol/L}$ ),研究AMPA受体参与形成的出生后发育早期海马CA1区锥体神经元的sEPSC,结果显示,0.5~3月龄具有明显的阶段性变化:(1)0.5~1月龄间,sEPSC振幅显著升高(图2B, $P < 0.001$ ),频率明

显增大(图2C, $P < 0.01$ ),上升时间(图2D, $P < 0.001$ )及下降时间(图2E, $P < 0.001$ )显著增加;(2)1~3月龄间,sEPSC振幅明显降低(图2B, $P < 0.001$ ),频率显著减小(图2C, $P < 0.001$ ),上升时间(图2D, $P < 0.001$ )及下降时间(图2E, $P < 0.001$ )显著降低。特别地,0.5月龄与3月龄sEPSC振幅之间无显著性差异(图2B)。

### 2.3 出生后发育早期海马CA1区锥体神经元诱发放电特性变化

利用MED64平面微电极阵列记录技术,在ACSF灌流液中添加D-APV( $50$   $\mu\text{mol/L}$ )以研究AMPA受体参与形成的出生后发育早期海马SC-CA1通路的fEPSP。在同等强度的最适电流刺激下,当刺激SC时,可在海马CA1区的多通道内记录到fEPSP,随月龄增加,可记录到fEPSP位点的数目明显增多(图3, $P < 0.001$ ),而fEPSP幅值显著减小(图4, $P < 0.001$ )。在ACSF灌流液中添加CNQX( $10$   $\mu\text{mol/L}$ )后,AMPA受体介导的fEPSP反应基本

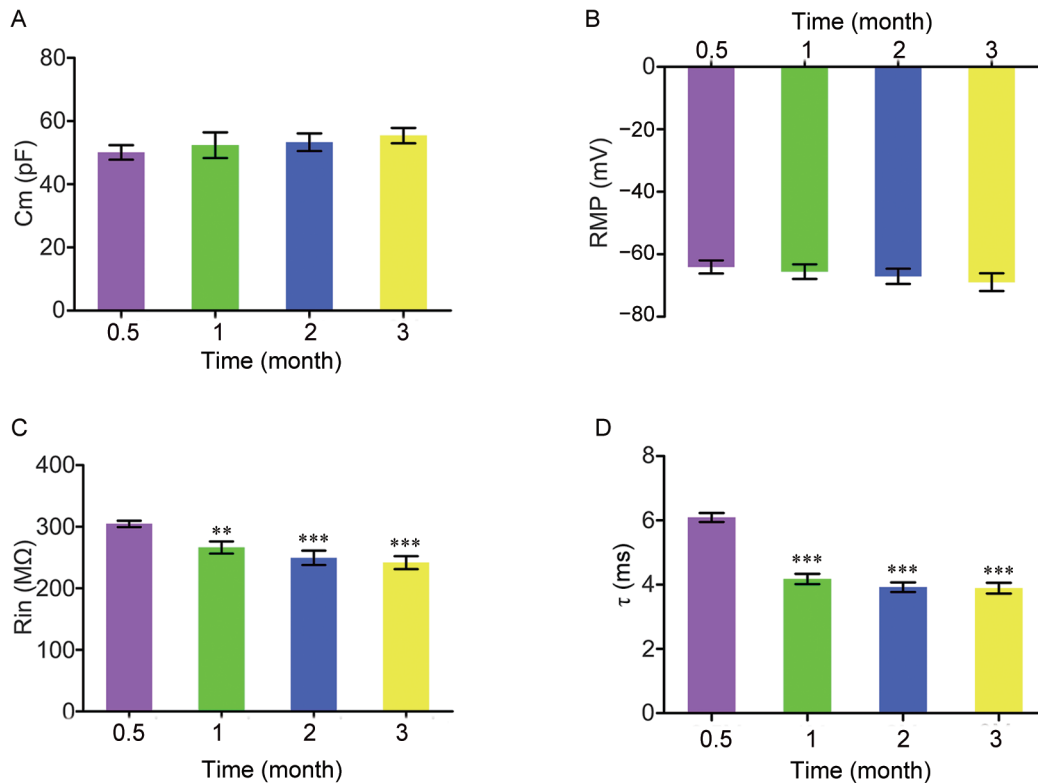


图 1. 出生后发育早期海马CA1区锥体神经元被动膜特性变化

Fig. 1. The changes of passive membrane properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons during postnatal early development. During 0.5–3 months, there was no significant change in membrane capacitance (Cm, A) and resting membrane potential (RMP, B), while membrane input resistance (Rin, C) and time constant ( $\tau$ , D) were both decreased significantly. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0.5 month.

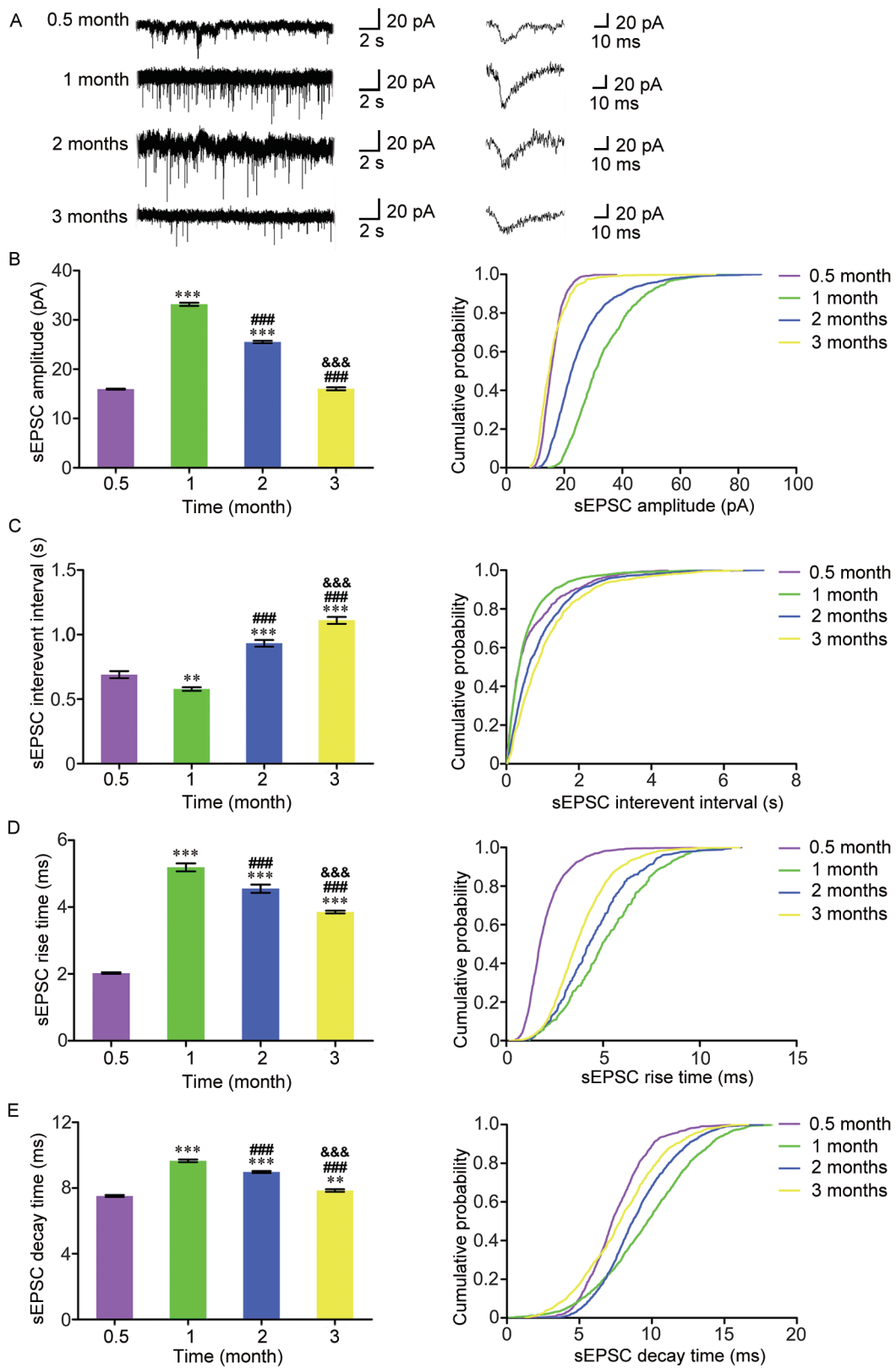


图 2. 出生后发育早期海马CA1区锥体神经元主动膜特性变化

Fig. 2. The changes of active membrane properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons during postnatal early development. *A*: Representative sEPSC traces (left) and amplification of a unitary sEPSC waveform (right). *B*: Amplitude; *C*: Frequency; *D*: Rise time; *E*: Decay time. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0.5 month; ### $P < 0.001$  vs 1 month; &&& $P < 0.001$  vs 2 months.

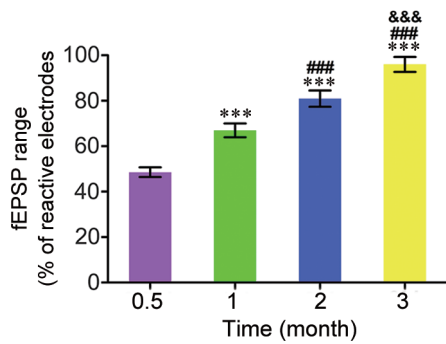


图 3. 出生后发育早期海马CA1区fEPSP范围变化

Fig. 3. The changes of fEPSP range in hippocampal CA1 region during postnatal early development. During the period of 0.5–3 months, the range of fEPSP evoked in hippocampal CA1 region significantly expanded. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs 0.5 month; ### $P < 0.001$  vs 1 month; &&& $P < 0.001$  vs 2 months.

被抑制, 并可在洗脱后恢复 (图 5)。对比基线水平, 在出生后发育早期各时间点, 加药后 fEPSP 幅值的抑制率分别为  $(93.39 \pm 0.92)\%$ 、 $(90.08 \pm 1.58)\%$ 、 $(86.56 \pm 1.32)\%$ 、 $(81.57 \pm 2.73)\%$  (图 5, 均  $P < 0.001$ )。

### 3 讨论

在中枢神经系统内, AMPA 型谷氨酸受体介导哺乳动物脑内大多数的快速兴奋性突触传递<sup>[10]</sup>。本研究结果表明, 在出生后大鼠发育早期海马, AMPA 受体作为主要的兴奋性受体, 可以调节突触传递过程, 并进一步促进海马的发育及功能成熟。

出生后发育早期海马 CA1 区锥体神经元膜特性发生以下明显变化: 随大鼠月龄增加, Rin 显著下降, Rin 受细胞膜上电压门控型钾通道密度影响, 可反映神经元功能成熟度, 并与其形态学成熟度平行<sup>[15, 16]</sup>。通常认为, 神经元越成熟, 树突分支越广泛, 细胞膜上钾通道密度越高, 而随年龄增加低 Rin 神经元逐渐增多<sup>[14]</sup>。 $\tau$  是表征瞬态过程中响应变化快慢的物理量, 可用于衡量突触整合的时间窗<sup>[14]</sup>。有研究显示, 从出生后 3 周起, 突触前递质释放的概率增加, 使得突触前膜的兴奋性驱动力增强, 并通过含 GluA1 亚基的 AMPA 受体上膜, 使突触后 AMPA 受体数量增加, 导致突触效能增强, 由突触前激活所引起的突触后放电过程效率增高<sup>[17]</sup>。本研究结果显示在出生后发育早期  $\tau$  显著减小, 提示随发育进行神经元响应变化增快, 从而可更灵敏地调控突触可塑性变化。

sEPSC 是由突触前兴奋性神经递质释放介导的

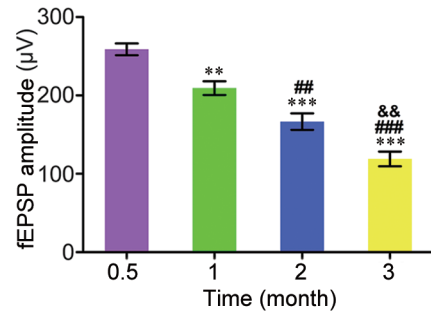


图 4. 出生后发育早期海马CA1区fEPSP幅值变化

Fig. 4. The changes of fEPSP amplitude in hippocampal CA1 region during postnatal early development. During 0.5–3 months, the amplitude of fEPSP evoked in hippocampal CA1 region decreased significantly. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0.5 month; # $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs 1 month; && $P < 0.01$  vs 2 months.

自发突触后电流, 其频率主要受突触前递质释放的影响, 其振幅主要与突触后膜兴奋性受体的功能及数量有关<sup>[18]</sup>, 而上升及下降时间分别表示突触后神经元反应的去极化及复极化阶段, 这取决于递质与受体分离或对受体失敏<sup>[19]</sup>。在出生后发育早期, 海马 CA1 区锥体神经元的主动膜特性出现阶段性变化: (1) 在 0.5~1 月龄, sEPSC 反应增强, 提示单位时间内谷氨酸释放的数目增加, 这与此时突触前递质释放的概率增加、突触后谷氨酸受体 (AMPA 受体) 的数目增多和 / 或兴奋性增强的变化相一致<sup>[12]</sup>。此外 NMDA 受体 GluN2B 被 GluN2A 取代, 促进了兴奋性突触传递的成熟, 并加速了在此期间 AMPA 受体的亚基转变 (GluA1 表达下降而 GluA3 表达增加), 使得 AMPA 受体介导的突触反应时间延长<sup>[20, 21]</sup>。(2) 在 1~3 月龄, sEPSC 反应减弱, 这主要与神经元之间侧枝联系逐渐增多有关, 并与神经环路内由单突触反应向多突触反应转变增加的报道相符<sup>[21]</sup>。然而, 由于 sEPSC 受突触前成分及突触后成分的双重影响而发生上述变化的因素较多, 可能是由于 AMPA 受体的亚基组成改变<sup>[22, 23]</sup>、不同亚基的基因表达及选择性剪接<sup>[24]</sup>等原因导致 AMPA 受体类型及密度的差异所致。本研究结果显示, 在出生后大鼠海马发育早期过程中 AMPA 受体介导 sEPSC 振幅、频率、上升时间及下降时间呈现出阶段性变化, 提示不同发育阶段海马 CA1 区突触的功能特性, 但在这一过程中突触前或突触后的具体作用机制还需要进一步的研究。

fEPSP 信号反映记录电极附近局部区域内群体

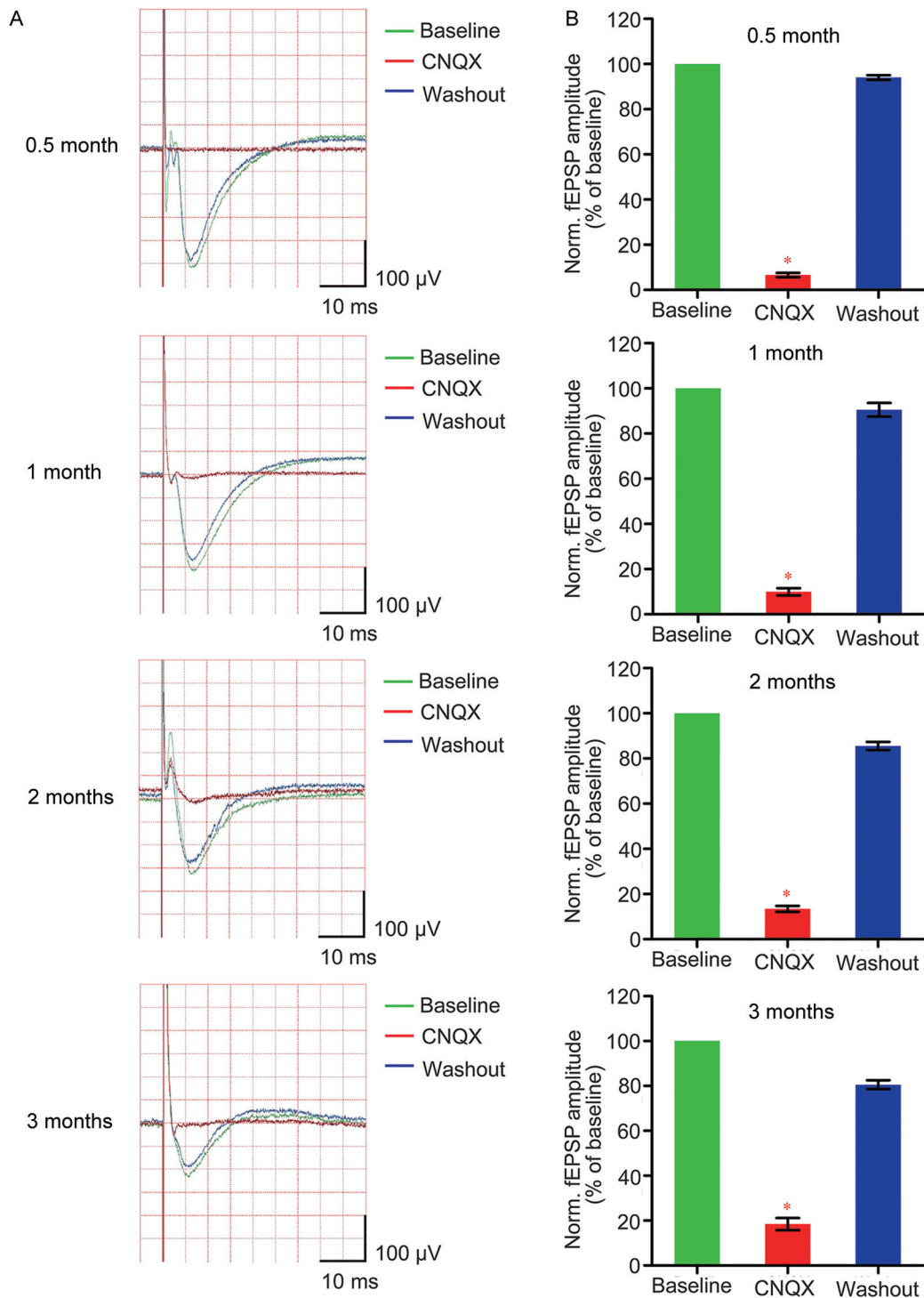


图 5. CNQX对出生后发育早期海马CA1区fEPSP的影响

Fig. 5. The effects of CNQX on fEPSP evoked in hippocampal CA1 region during postnatal early development. *A*: Representative curves of fEPSP. *B*: fEPSP amplitude. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \* $P < 0.001$  vs baseline.

神经元突触后电位的集合，fEPSP的范围及幅值反映了突触后纤维被激活程度及突触间基础传递情况，可用于评价神经发育的成熟性<sup>[25]</sup>。本研究结果显示，在出生后发育早期，通过刺激海马SC-CA1

通路，多通道内产生反应的电极数量明显上升，fEPSP范围明显扩大，而fEPSP幅值则显著减小，这说明随发育月龄增加，功能性突触数量增多，突触间联系更为复杂和广泛，神经网络更加成熟。而



CNQX 对 AMPA 受体介导的 fEPSP 幅值有显著的抑制作用, 提示 AMPA 受体在出生后发育早期海马 CA1 区广泛存在, 并参与主要的兴奋性神经传递。

综上所述, 在出生后大鼠海马发育早期过程中, AMPA 受体作为调节突触传递和参与突触联系的主要兴奋性受体, 对海马的发育及功能成熟可能具有一定的促进作用, 在今后的研究中还需结合其它技术手段, 从突触形态、AMPA 受体亚型的表达情况、谷氨酸递质的释放等方面, 进一步明确在出生后大鼠海马发育早期过程中 AMPA 受体作用机制的变化情况。而随着科学研究的进一步发展, 再生医学及干细胞移植为 TBI 的治疗带来了新的希望, 借助发育神经科学的相关知识探索 TBI 后内源性和 / 或外源性移植细胞的生物学行为可以为干细胞疗法提供重要依据。因此, 在中枢神经系统发育过程中, AMPA 受体在正常生理条件下的作用机制, 及其与其它兴奋性或抑制性受体之间相互作用的研究, 将有助于理解 TBI 后基于细胞疗法的神经再生过程。

### 参考文献

- Sun D. The potential of neural transplantation for brain repair and regeneration following traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 2016; 11(1): 18–22.
- Mo L, Yang Z, Zhang A, Li X. The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials* 2010; 31(8): 2184–2192.
- Hoffmann H, Hunt P, Spear NE. Ontogenetic differences in the association of gustatory and tactile cues with lithium chloride and footshock. *Behav Neural Biol* 1990; 53(3): 441–450.
- Essa MM, Braidy N, Vijayan KR, Subash S, Guillemin GJ. Excitotoxicity in the pathogenesis of autism. *Neurotox Res* 2013; 23(4): 393–400.
- McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 1990; 15(1): 41–70.
- Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A. Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 1996; 381(6577): 71–75.
- Pickard L, Noël J, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E. Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 2000; 20(21): 7922–7931.
- Molnar E, Pickard L, Duckworth JK. Developmental changes in ionotropic glutamate receptors: Lessons from hippocampal synapses. *Neuroscientist* 2002; 8(2): 143–153.
- Chater TE, Goda Y. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 401.
- Czöndör K, Thoumine O. Biophysical mechanisms regulating AMPA receptor accumulation at synapses. *Brain Res Bull* 2013; 93: 57–68.
- Siarey RJ, Kline-Burgess A, Cho M, Balbo A, Best TK, Harashima C, Klann E, Galdzicki Z. Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Neurochem* 2006; 98(4): 1266–1277.
- Logue OC, Cramer NP, Xu X, Perl DP, Galdzicki Z. Alterations of functional properties of hippocampal networks following repetitive closed-head injury. *Exp Neurol* 2016; 277: 227–243.
- Forscher P, Oxford GS. Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J Gen Physiol* 1985; 85(5): 743–763.
- Kowalski J, Gan J, Jonas P, Pernía-Andrade AJ. Intrinsic membrane properties determine hippocampal differential firing pattern *in vivo* in anesthetized rats. *Hippocampus* 2016; 26(5): 668–682.
- Zhang L, Spigelman I, Carlen PL. Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices. *J Physiol* 1991; 444: 25–49.
- Liu YB, Lio PA, Pasternak JF, Trommer BL. Developmental changes in membrane properties and postsynaptic currents of granule cells in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 1996; 76(2): 1074–1088.
- McHail DG, Dumas TC. Multiple forms of metaplasticity at a single hippocampal synapse during late postnatal development. *Dev Cogn Neurosci* 2015; 12: 145–154.
- Jin Z, Choi MJ, Park CS, Park YS, Jin YH. Propofol facilitated excitatory postsynaptic currents frequency on nucleus tractus solitarii (NTS) neurons. *Brain Res* 2012 13; 1432: 1–6.
- Clements JD. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 1996; 19(5): 163–171.
- Albani SH, Mchail DG, Dumas TC. Developmental studies of the hippocampus and hippocampal-dependent behaviors: insights from interdisciplinary studies and tips for new investigators. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 43: 183–190.
- Spigelman I, Zhang L, Carlen PL. Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K<sup>+</sup> currents. *J Neurophysiol*



- 1992; 68(1): 55–69.
- 22 Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH, Nicoll RA. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 2009; 62(2): 254–268.
- 23 Soares C, Lee KF, Nassrallah W, Béique JC. Differential subcellular targeting of glutamate receptor subtypes during homeostatic synaptic plasticity. *J Neurosci* 2013; 33(33): 13547–13559.
- 24 Penn AC, Balik A, Wozny C, Cais O, Greger IH. Activity-mediated AMPA receptor remodeling, driven by alternative splicing in the ligand-binding domain. *Neuron* 2012; 76(3): 503–510.
- 25 Hausteil MD, Reinert T, Warnatsch A, Englitz B, Dietz B, Robitzki A, Rübtsamen R, Milenkovic I. Synaptic transmission and short-term plasticity at the calyx of Held synapse revealed by multielectrode array recordings. *J Neurosci Methods* 2008; 174(2): 227–236.