

## 综述

# 视网膜神经节细胞的电生理学研究进展

周旭娇<sup>1</sup>, 王中峰<sup>2,\*</sup>, 吴继红<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>复旦大学附属耳鼻喉科医院实验中心, 上海市视觉损害与重建重点实验室, 上海 200031; <sup>2</sup>复旦大学脑科学研究院, 上海 200032

**摘要:** 了解视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的电生理学特性及其影响因素, 有助于深入了解其正常状态下独特的生理功能, 对于从细胞功能学角度阐明青光眼等视神经变性疾病的发病机制具有重要意义。本文就近年来随着膜片钳技术的应用, 有关RGCs电压门控离子通道、配体门控离子通道, 以及一些神经调质对这些通道的影响等方面的研究进展作一综述。

**关键词:** 视网膜神经节细胞; 电压门控离子通道; 配体门控离子通道; 神经调质

**中图分类号:** R339.14+6; R775.9

## Progress in electrophysiological studies of retinal ganglion cells

ZHOU Xu-Jiao<sup>1</sup>, WANG Zhong-Feng<sup>2,\*</sup>, WU Ji-Hong<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Department of Ophthalmology at Eye & ENT Hospital, Fudan University, Shanghai Key Laboratory of Visual Impairment and Restoration, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** The knowledge about electrophysiological properties of retinal ganglion cells (RGCs), as well as modulation of these properties, is important not only for understanding the unique physiological functions of RGCs under normal conditions, but also for exploring the cellular mechanisms of retinal neurodegeneration diseases, such as glaucoma. In this paper, we reviewed the progress in electrophysiological studies of RGCs by using patch-clamp techniques, concerning the voltage-gated ion channels, the ligand-gated ion channels and the effects of neuromodulators on these channels.

**Key words:** retinal ganglion cell; voltage-gated ion channels; ligand-gated ion channels; neuromodulator

光刺激使视网膜感光细胞产生兴奋性神经电信号, 经双极细胞向神经节细胞纵向传导; 由水平细胞和无长突细胞分别在外网状层和内网状层对神经信号进行横向调制。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)作为视网膜唯一的传出神经元, 其轴突将视觉信息以动作电位的形式传至视觉皮层的特定区域。实现这种光-电转换和电信号传递的主要机制包括神经细胞膜上离子通道介导的离子跨膜运动、膜电位的变化、配体门

控通道的调节以及广泛的突触联系等。RGC的信号处理过程受突触前后离子通道和/或递质受体分布及动力学特征的影响。打破各种离子电流的平衡状态则会驱动凋亡的发生<sup>[1]</sup>, 而RGC发生凋亡是青光眼等视神经变性类疾病引起视觉损伤最重要的病理基础。本文综述近年来应用膜片钳技术对RGC的电压门控离子通道、配体门控离子通道的研究, 以及神经调质对这些通道的影响等方面的进展。

Received 2014-04-08 Accepted 2014-06-17

This review was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31271173, 81400396), the Key Research Program of Science and Technology Committee of Shanghai Municipality, China (No. 11JC1401200), and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20110071110031).

\*Co-corresponding authors. E-mail: lwnn2006@gmail.com; zfwang@fudan.edu.cn

## 1 RGC的电压门控离子通道

### 1.1 电压门控 K<sup>+</sup> 通道

K<sup>+</sup> 通道对调控 RGC 的电生理特性至关重要, 它维持 RGC 的静息电位并调控其兴奋性。其中, 持续 K<sup>+</sup> 通道和内向整流 K<sup>+</sup> 通道与视网膜病变的发生发展密切相关。

**1.1.1 持续 K<sup>+</sup> 通道** 简称 IKv, 其介导一种持续电压门控电流 (缓慢失活), 对四乙胺 (tetraethylammonium, TEA) 敏感。IKv3 调控突触末梢神经递质的释放以及钙信号, 参与 RGC 的发育和保护作用<sup>[2,3]</sup>。IKv3.1/IKv3.2 影响动作电位的发放频率和持续时间, 从而调节细胞兴奋性。我们经全细胞膜片钳记录发现: 在急性分离的大鼠 RGCs, 外源性应用大麻素受体 (cannabinoid CB1 receptor, CB1R) 激动剂 WIN55212-2 (WIN) 浓度依赖地抑制 IKv, 其作用不能被大麻素 CB1R 和 CB2 受体 (CB2R) 特异的拮抗剂所阻断, 而且阻断胞内 cAMP/PKA 和 MAPK/ERK 信号通路对 WIN 的作用没有影响; 内源性大麻素受体的配体 AEA 和 2-AG, 以及 CB1R 特异激动剂 ACEA 和 CB2R 特异激动剂 CB65 也显示和 WIN 同样的作用, 表明 WIN 以非受体依赖的方式抑制大鼠 RGCs 的外向 K<sup>+</sup> 电流, 从而调控细胞的兴奋性<sup>[4]</sup>, 然而 WIN 在光感受器和双极细胞中对 K<sup>+</sup> 电流的调控机制则是 CB1R 依赖性的, 由此可见 RGCs 有其独特的电生理功能<sup>[5,6]</sup>, 可能 WIN 直接结合于 RGCs 上的 K<sup>+</sup> 通道, 引起门控通道的变构调节效应。

此外, 大鼠 RGCs 上表达 IKv1.1、IKv1.2 和 IKv1.3, 但不表达 IKv1.5<sup>[7]</sup>。激活电压门控 K<sup>+</sup> 通道 (IKv1 家族) 会加速大鼠 RGC 的退行性变, 增加凋亡分子的表达; 胞内注射 Kv1.1、IKv1.2 和 IKv1.3 的通道阻断剂, 以剂量依赖性的方式减缓 RGC 的凋亡<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 内向整流 K<sup>+</sup> 通道 (inwardly rectifying potassium channels)** 简称 Kir 或 Is, 其介导一种持续性的与钡离子相关的电流 (快速激活但缓慢失活)。已鉴定出如下 Kir 的亚型, 分别为 ATP 敏感的钾通道 (Kir1)、经典的钾通道 (Kir2) 和 G 蛋白偶联的钾通道 (Kir3 或 GIRK)。免疫组化研究显示 Kir 通道的多种亚基 (Kir1.1、2.1、2.3、3.1、3.2 和 3.3) 在 RGCs 上高表达, Kir1.1 主要表达在 RGC 的轴突上; Kir2.1 和 Kir2.3 均表达在 RGC 的胞体中; Kir3.1 高表达在内质网中, Kir3.2 则表达在 RGC 的胞体、树突和轴突的细胞质和细胞膜上<sup>[8]</sup>。大多数成熟的

RGCs 表达 Kir3.1, 它具有动力学上最佳的电导率, 有利于产生高频率的动作电位<sup>[9,10]</sup>。应用全细胞记录的方法表明, 在分离的 RGCs 上可记录到由 Kir 介导的内向电流。此电流具有内向整流的特性, 可以在 10 ms 内快速激活, 且没有明显的失活。低浓度 (300 μmol/L) 的 Ba<sup>2+</sup> 可显著抑制此电流。电极内加入 GDP-βS 和 GTP-γS 分别减小和增大此 Kir 电流, 说明此电流主要由 G 蛋白偶联的内向整流钾通道 (GIRK) 介导<sup>[10]</sup>。Kir 通道对神经信号传导和膜的兴奋性有重要意义。

### 1.2 电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道

Ca<sup>2+</sup> 的病理性增加是导致青光眼 RGCs 发生凋亡反应的启动因素之一。在高眼压状态时, 临床常用降眼压药物 β<sub>1</sub> 肾上腺素能受体阻滞剂 betaxolol 对 RGCs 有神经保护作用: 高眼压时, 谷氨酸释放增多, 细胞去极化, 产生动作电位。持续大量的去极化又激活细胞膜上电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道导致细胞内 Ca<sup>2+</sup> 积聚过多, RGCs 则丧失正常功能以至死亡。而 β<sub>1</sub> 肾上腺素能受体阻滞剂可直接降低 RGCs 上 Ca<sup>2+</sup> 通道的活性, 抑制病理状态下大量 Ca<sup>2+</sup> 内流<sup>[11,12]</sup>。研究还显示, 一氧化氮 (NO) 也可使 RGCs 内 cGMP 水平增加, 激活电压门控 N 型 Ca<sup>2+</sup> 通道, 使 Ca<sup>2+</sup> 内流增加<sup>[13,14]</sup>。Ca<sup>2+</sup> 是一把双刃剑, 实验者将 RGCs 预先孵育于 5 或 10 mmol/L 的 KCl 环境中, 使细胞去极化, 电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道随之打开, 然后再将 RGCs 置于 500 μmol/L 的谷氨酸中, 此时发现 RGC 的凋亡量显著减少。由此证明, 在谷氨酸诱发的兴奋毒性发生之前, 预先给予相对低浓度的 Ca<sup>2+</sup> 反而可起到神经保护的效应<sup>[15]</sup>。但是, 低浓度 Ca<sup>2+</sup> 介导的预处理保护机制还需进一步的实验研究来确定。

### 1.3 电压门控 Na<sup>+</sup> 通道

电压门控 Na<sup>+</sup> 通道决定了 RGCs 对电或光刺激的反应能力及峰电位的发放率<sup>[16]</sup>。RGCs 在胚胎发育过程中就开始分化, 介导动作电位产生的 Na<sup>+</sup> 电流的出现是 RGCs 发育成熟和具备功能的主要特征<sup>[17]</sup>。经非失活性 Na<sup>+</sup> 通道持续流入胞内的 Na<sup>+</sup> 是导致 RGCs 和轴突退行性变这一级联反应的重要启动因素。胞内 Na<sup>+</sup> 的过度聚集启动反向型 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交换体, 促使 Ca<sup>2+</sup> 外流变成逆向运动, 导致胞内 Ca<sup>2+</sup> 中毒性蓄积<sup>[18,19]</sup>。因此, 给予哺乳动物 RGCs 非失活性 Na<sup>+</sup> 通道的阻滞剂 phenytoin, 可以有效防止 RGC 的功能丧失, 对青光眼实验动物模型中的 RGCs 和视神经轴突有神经保护的效应<sup>[20]</sup>。

## 2 RGC的神经递质受体

中枢神经系统的每个神经元都接受大量的兴奋性和/或抑制性突触信息输入。视觉通路也是由不同的细胞和突触构成。通常,光感受器和双极细胞释放谷氨酸,或经离子型谷氨酸受体(iGluRs)直接改变细胞膜对离子的通透性,或经代谢型谷氨酸受体(mGluRs)激活细胞内信号通路来调节突触后神经元的活动,而且水平细胞和无长突细胞释放的抑制性神经递质又对其进行反馈性、交互性调节<sup>[21,22]</sup>。

### 2.1 NMDA离子型谷氨酸受体

分子克隆研究结果显示,哺乳动物RGCs上表达的NMDA受体有7种亚单位(NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D、NR3A和NR3B)<sup>[23,24]</sup>。NMDA受体可被 $Mg^{2+}$ 以电压依赖的方式阻断。在静息电位水平, $Mg^{2+}$ 结合在NMDA受体上,随着去极化发生, $Mg^{2+}$ 从NMDA受体上解离下来,使NMDA受体通道开放,产生 $Ca^{2+}$ 和 $Na^{+}$ 的内流。除了在维持神经系统正常生理功能中发挥重要作用外,NMDA受体通道与兴奋毒性相关的视网膜病变如青光眼、视网膜缺血和糖尿病性视网膜病密切相关。然而,各型NMDA受体亚基在兴奋毒性诱发RGC凋亡中的作用还未完全清楚。目前,有研究表明NMDA受体的NR2B和NR2D亚基缺失可以保护遭受NMDA受体介导的兴奋毒性损害的RGCs<sup>[23]</sup>。近年来,本课题组也在遗传性青光眼DBA/2J小鼠视网膜中观察到,NMDA受体NR2B亚基表达上调,和眼内压增高导致的视网膜RGC数目减少呈正相关<sup>[25]</sup>。

在体的动物模型中,玻璃体内直接注射NMDA可引起内层视网膜变薄、RGC凋亡,进而导致视力损害<sup>[26]</sup>。在离体实验中,给予NMDA或谷氨酸均可引起 $Ca^{2+}$ 依赖性的RGC凋亡,其效应可被NMDA受体拮抗剂阻断<sup>[27]</sup>。NMDA受体拮抗对缺血损伤的大鼠RGCs有神经保护作用,可维持视网膜内核层的厚度并增加RGC的存活率<sup>[27]</sup>。虽然对NMDA受体介导的兴奋毒性的直接抑制有视网膜神经保护的效应,但临床用药显示,MK-801(一种非竞争性NMDA受体拮抗剂)具有神经毒性,使其临床医用受限。因此,寻找理想的视神经保护剂仍然是目前基础和临床研究的热点。一般认为,因NMDA过度兴奋所致的青光眼等视网膜病变中,可通过调控NMDA受体的功能来减轻神经毒性对RGC的损伤作用。一些神经保护剂可以显著抑制NMDA诱发的全细胞电流及胞内 $Ca^{2+}$ 信号<sup>[28]</sup>。

### 2.2 非NMDA离子型谷氨酸受体

RGCs中自发的兴奋性突触后电流(sEPSCs)由非NMDA受体(AMPA受体)介导<sup>[29]</sup>,而诱发的EPSCs(eEPSCs)则由NMDA和非NMDA受体共同介导<sup>[30]</sup>。非NMDA受体聚集在RGCs树突的较近端,是双极细胞突触末梢递质释放后最易到达的位置。Tachibana等<sup>[31]</sup>在蝶螈的视网膜中应用双电极同步记录双极细胞和RGCs,发现RGCs上的NMDA受体可能位于RGCs树突的较远端(突触外的部位),只有当许多突触囊泡释放大谷氨酸,直至溢出突触外才能激活NMDA受体,所以认为NMDA受体主要接受双极细胞长时程的谷氨酸释放的调节。而且在静息状态下RGCs上的NMDA受体因 $Mg^{2+}$ 的阻断呈失活状态,由此认为仅由非NMDA受体主导谷氨酸的自发性的量子式释放,产生自发的兴奋性突触后电流。

AMPA受体包含四种基本的亚型(GluA1~4)。其中,GluA2亚基对AMPA受体的信号传递特征起重要调节作用。Nawy等<sup>[32]</sup>研究显示,两类AMPA受体,即包含GluA2亚基、对 $Ca^{2+}$ 不通透的AMPA受体(CI-AMPA)和GluA2亚基缺失、对 $Ca^{2+}$ 通透的AMPA受体(CP-AMPA)均参与光诱发的ON型RGC的突触反应性:光照弱时,激活CP-AMPA;光照强时,激活CI-AMPA,而且当谷氨酸重摄取被阻断时,过多的谷氨酸溢出,激活CI-AMPA。进一步研究<sup>[32]</sup>显示,AMPA具有空间分布分离的特征:分布方式1:两种AMPA类型均表达在同一个突触上,其中,CP-AMPA分布在更靠近神经递质释放处;分布方式2:CP-AMPA和CI-AMPA表达在不同的突触上,分别调控不同通路的突触传入。光剥夺8h可以导致ON型RGCs上AMPA成分从CI-AMPA转变成CP-AMPA,即激活突触前ON型双极细胞可以驱动ON型RGC突触上AMPA快速地重新分布<sup>[33,34]</sup>。

### 2.3 代谢型谷氨酸受体

代谢型谷氨酸受体(mGluRs)偶联G蛋白,有7次跨膜结构域,其谷氨酸结合位点位于细胞外的N-末端。内源性配体谷氨酸并非直接结合该受体引起门控阳离子进入,而是偶联G蛋白来调控细胞的离子通道。

穿孔膜片的电流钳模式下的研究显示,I型代谢型谷氨酸受体(mGluR I,包括mGluR1和mGluR5)

激动剂 DHPG 增加 RGC 的自发性动作电位发放,使其去极化,并激活偶联磷脂酶 C 的 G 蛋白,在 RGCs 中通过抑制钾通道来增加突触后神经元的兴奋性<sup>[35]</sup>。Awatramani 等<sup>[36]</sup>在分离的爪蟾 RGCs 上发现 mGluR I 激动剂可抑制高电压激活的钙电流 (high voltage activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents,  $I_{\text{Ca}_{\text{HVA}}}$ ),但不影响自发的或诱发的 EPSCs。在培养的成年大鼠 RGCs 上,给予 mGluR I 激动剂则增加  $\text{Ca}^{2+}$  电流,后者可通过抑制钾电导来增加神经元的兴奋性<sup>[35]</sup>。

II 型代谢型谷氨酸受体 (mGluR II, 包括 mGluR2 和 mGluR3) 和 III 型代谢型谷氨酸受体 (mGluR III, 包括 mGluR4、6~8) 通过激活不同亚型的 G 蛋白抑制腺苷酸环化酶,减少环磷酸腺苷 (cAMP) 的生成。激活 mGluR II 可调节大鼠 RGC 的低电压激活的钙电流 (low voltage activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents,  $I_{\text{Ca}_{\text{LVA}}}$ )<sup>[37]</sup>。mGluR III (mGluR6 和 / 或 mGluR8) 可调节内层视网膜 RGC 的突触传递,例如 mGluR III 激动剂 AP4 可抑制 RGCs 上电刺激诱发的 EPSCs,减少节细胞微小兴奋性突触后电流的频率而不影响其幅度,表明 mGluR III 介导了突触前递质释放作用<sup>[38]</sup>。此外,RGC 突触末梢 mGluR III 表达的调控对青光眼的靶向治疗也具有重要意义<sup>[39]</sup>。

## 2.4 GABA 受体

GABA 受体分为离子型 ( $\text{GABA}_A$  和  $\text{GABA}_C$ ) 和代谢型  $\text{GABA}_B$ 。 $\text{GABA}_A$  受体是由若干亚基 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ ) 组成的五聚体。目前 6 个  $\alpha$  亚基,4 个  $\beta$  亚基、3 个  $\gamma$  亚基和 1 个  $\delta$  亚基已经被克隆出。在视网膜中  $\text{GABA}_A$  受体最常见的聚合体是  $\alpha_1/\beta_2/\gamma_2$ ,可直接偶联氯离子通道,能被  $\text{GABA}_A$  受体阻断剂荷包牡丹碱 (bicuculline) 特异性阻断。 $\text{GABA}_B$  受体由单一肽段构成,与代谢型谷氨酸受体的氨基酸序列相似,同样也偶联 G 蛋白,激活第二信使系统,突触前的  $\text{GABA}_B$  受体调节  $\text{Ca}^{2+}$  通道从而影响神经递质释放,而突触后的  $\text{GABA}_B$  受体调节  $\text{K}^+$  通道的活性<sup>[40, 41]</sup>。 $\text{GABA}_B$  受体的激动剂 baclofen 显著增大 GIRK 电流,同时此增大的电流成分可被  $\text{Ba}^{2+}$  压抑,表明 RGCs 上的 GIRK 通道可以通过 G 蛋白与  $\text{GABA}_B$  受体偶联<sup>[10]</sup>。 $\text{GABA}_C$  受体主要存在于脊椎动物视网膜中,其上有  $\text{Cl}^-$  孔道,可被非选择性的  $\text{Cl}^-$  通道阻断剂 picrotoxin 阻断。

无长突细胞与双极细胞和 / 或 RGCs 形成抑制性交互突触,使得视网膜间的突触调节更为复杂。Tachibana 等<sup>[31]</sup>研究显示,小鼠的 ON 型瞬态无长

突细胞 GABA<sub>C</sub> 受体介导的抑制性反馈通路与双极细胞间构成交互性突触联系。当抑制性通路保持完整状态下,光诱发的 EPSCs 主要由非 NMDA 受体介导;然而阻断 ON 型瞬态无长突细胞上的 GABA<sub>C</sub> 受体时记录到的光诱发 EPSCs 的幅度和时程将发生显著变化,此效应是由 NMDA 受体介导的,因为阻断 GABA<sub>C</sub> 受体可能导致大量谷氨酸的释放,溢出至 NMDA 受体分布的较远端发挥作用<sup>[31]</sup>。上述结果表明突触前 GABA<sub>C</sub> 受体可能对双极细胞释放谷氨酸有一定程度的抑制作用。

## 3 神经调质对 RGC 信号传递的调节机制

RGCs 上表达多种神经递质或调质的受体,这些神经递质或调质 (如激素、儿茶酚胺、神经肽和生长因子等) 与受体结合,激活胞内第二信使系统,进而调控细胞离子通道。结合本课题组近几年的研究重点,现总结多种神经调质对 RGC 信号传递的调控机制。

### 3.1 褪黑素 (melatonin, MEL)

MEL 作为一昼夜节律性相关的激素,其在视网膜光反应的调节中有很重要的作用<sup>[42]</sup>。MEL 受体在视网膜中广泛表达<sup>[43, 44]</sup>,提示 MEL 可能作为一种神经调质调节视网膜的多种生理功能。MEL 由光感受器合成并释放,其在机体内的水平与昼夜节律密切相关,夜晚合成分泌,光照则抑制其合成,所以 MEL 是一代表黑暗的信号。我们的研究显示,大鼠 RGCs 特异地表达 MEL 受体  $\text{MT}_2$ ,但不表达  $\text{MT}_1$ <sup>[45]</sup>。MEL 激活 PTX 敏感的 Gi/o 偶联的  $\text{MT}_2$ ,通过细胞内非  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的 PC-PLC/PKC 信号通路增强 RGCs 上甘氨酸受体电流 (图 1);在大鼠视网膜薄片上的电生理记录证实了该作用, MEL 可增强光刺激诱导的 RGCs 上由甘氨酸受体介导的抑制性突触后电流 (eIPSCs)<sup>[45]</sup>。上述结果表明,在夜间分泌的 MEL 通过增强甘氨酸能无长突细胞介导的抑制性信号,而调制视网膜对正向或负向反差,从而提高动物夜间视觉的敏感度。视网膜中的 MEL 受体也参与调节眼内压,眼内压也是随昼夜节律在一定范围内波动,近年来研究显示 MEL 对于青光眼的防治有一定疗效<sup>[44, 46]</sup>。

### 3.2 多巴胺

在哺乳动物视网膜中,多巴胺由多巴胺能无长突细胞和网间细胞释放,作为化学递质参与信号传递过程。多巴胺的释放可维持 OFF 型细胞的发放,

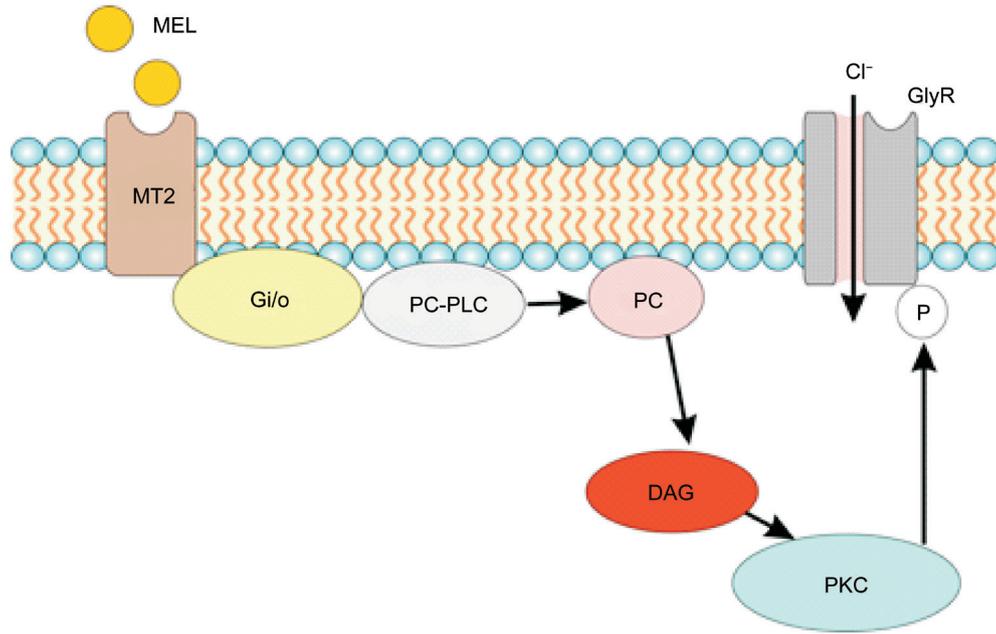


图 1. 大鼠视网膜神经节细胞上褪黑素促甘氨酸电流的可能信号通路机制

Fig. 1. A schematic diagram showing the possible signaling pathway mediating the potentiation of glycine currents by melatonin in rat RGCs. By challenging PTX-sensitive Gi/o-coupled MT2 receptors on rat RGCs, melatonin potentiates glycine currents via a distinct intracellular PC-PLC/PKC pathway. MEL: melatonin; GlyR: glycine receptor; PC-PLC: phosphatidylcholine-specific phospholipase C; PC: phosphatidylcholine; DAG: diacylglycerol; PKC: protein kinase C; P, phosphorylation. Reproduced from Zhao *et al.* [45].

但是减少 ON 型细胞的发放 [47]。在乌龟 [48] 和金鱼 [49] 急性分离的 RGC 的研究中, 学者发现多巴胺可以通过抑制乌龟 RGCs 上电压依赖性  $Ca^{2+}$  通道电流或调节金鱼电压依赖性  $Na^{+}$  通道来影响 RGC 的兴奋性 [50]。多巴胺还可通过 cAMP 和 PKA 依赖的信号通路调节超极化激活的阳离子电流 ( $I_h$ ) 从而影响大鼠 RGC 的膜特性和兴奋性 [51]。

### 3.3 大麻素

大麻素 CB1R 在哺乳动物神经系统中高表达, 也广泛分布于视网膜各种细胞、内网状层、神经节细胞层和神经节细胞轴突上; 大麻素 CB2R 主要表达在外周组织, 也表达于中枢和眼视网膜中。CB1R 和 CB2R 均为 G 蛋白偶联受体。其中, CB1R 激活后可通过调控多种离子通道来影响 RGC 的兴奋性, 在视觉信息处理的各环节中发挥重要的调节作用。CB1R 激动剂 WIN 可抑制培养的 RGCs 上高电压激活的钙电流 [52]。研究也显示, WIN 可以调节神经递质的释放, 显著减少视网膜薄片中的 RGC 的自发性兴奋性和抑制性突触后电流的频率 [53]。在大鼠视网膜薄片, 我们发现 WIN 对神经节细胞的自发动作电位发放频率和静息膜电位均没有显著影响 [54]。

在灌流液中加入 CNQX、D-APV、bicuculline 和 strychnine 以阻断 RGC 的兴奋性和抑制性传入, 再灌流 WIN 对正向电流注入 (+10 pA 到 +100 pA) 诱发的动作电位的频率也没有显著影响; 位相分析结果显示 WIN 显著降低动作电位的上升和下降相速率 ( $\pm dV/dt_{max}$ ), 该作用可被 CB1R 拮抗剂 SR141716 所阻断 [54]。由于  $Na^{+}$  和  $K^{+}$  通道分别介导了动作电位的上升相和下降相, 故认为 WIN 可能通过抑制  $Na^{+}$  和  $K^{+}$  电流来降低动作电位的上升和下降相速率。

### 3.4 Sigma受体( $\sigma$ R)

$\sigma$ R 最初被认为是一种鸦片类受体的亚型, 现已确定其为一种独特的非鸦片类非苯环己哌啶类的受体, 它与各种类型的精神类药物、神经甾体类及其它一些合成制剂相互作用。 $\sigma$ R 分为  $\sigma$ R1 和  $\sigma$ R2, 其中  $\sigma$ R1 广泛参与各种生理过程, 激活  $\sigma$ R1 可以调节电压和 / 或配体门控离子通道 (如  $K^{+}$  通道、 $Na^{+}$  通道、 $Ca^{2+}$  通道和 NMDA 受体等) 以及调控神经递质 (如多巴胺和谷氨酸) 的释放。研究也显示,  $\sigma$ R1 可能参与中枢神经系统的神经保护作用 [55, 56]。对视网膜的研究也证明了这一保护作用: 研究显示,  $\sigma$ R1 的 mRNA 和蛋白在大鼠视网膜中均有表达,

σR1 免疫阳性呈现于视网膜水平细胞、无长突细胞以及 RGCs 上<sup>[57]</sup>。特异性 σR1 配体 pentazocine 在离体和在体动物模型中均可以延缓 RGC 的凋亡<sup>[58]</sup>。σR1 激动剂可以显著抑制 RGCs 上的 NMDA 电流, 从而影响 NMDA 受体介导的光反应, 而 σR1 拮抗剂则可逆转上述作用<sup>[28]</sup>。在不同类型的大鼠 RGCs 上, σR1 作用于 Gi/o 型 G 蛋白, 影响了磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (PI-PLC) 通路, 作用于 IP<sub>3</sub> 受体介导的胞内钙库, 使细胞内的钙离子水平发生改变, 并通过蛋白激酶 C (PKC) 调节 NMDA 受体的磷酸化, 从而抑制了 NMDA 受体介导的电流, 提示在大鼠 RGCs 上激活 σR1 可能通过 G 蛋白-PLC-PKC 通路抑制 NMDA 受体的活动, 从而在病理条件下起神经保护的作用<sup>[28, 59]</sup>。此外, 将纯化培养的 RGCs 置于高 K<sup>+</sup> (20 mmol/L) 环境中, 细胞发生去极化, L 型电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道被激活, 胞内钙离子浓度增加, 然而 σR1 激活后可直接作用于 L 型电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道, 从而减少 Ca<sup>2+</sup> 内流<sup>[60]</sup>。

#### 4 问题和展望

综上所述, 近年来应用膜片钳技术研究离体标本 RGC 的电生理学特性已取得很大进展。深入了解 RGCs 在生理和病理方面的特征变化, 有助于全面阐明青光眼等视网膜及视神经疾病的发病机制, 最终为开发新的治疗手段、提高疗效提供实验依据。其次, 研究表明视神经保护药物的应用可改善视神经病变的状态, 然而临床应用的效果还有待验证。今后, 若将膜片钳技术与分子生物学等多学科技术相结合, 从细胞和分子水平研究 RGC 冲动的发放、传导途径及功能学变化, 必将对视神经保护药物的筛选、疗效评价及临床应用的发展起到积极的促进作用。此外, 突触联系的形成和效率对神经元的正常活动有很重要的作用, 它参与细胞的信息整合过程, 这提示我们可以从突触层面更深入地探索视觉信息的突触传递特征。

#### 参考文献

- 1 Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(4): 405–411.
- 2 Kuznetsov KI, Grygorov OO, Maslov VY, Veselovsky NS, Fedulova SA. Kv3 channels modulate calcium signals induced by fast firing patterns in the rat retinal ganglion cells. *Cell Calcium* 2012; 52(5): 405–411.
- 3 Kuznetsov KI, Maslov V, Fedulova SA, Veselovskiy MS. Calcium signaling induced by tonic firing in the rat eye retinal ganglion cells. *Fiziol Zh* 2011; 57(1): 3–8 (Ukrainian, English abstract).
- 4 Zhang CQ, Wu HJ, Wang SY, Yin S, Lu XJ, Miao Y, Wang XH, Yang XL, Wang Z. Suppression of outward K<sup>+</sup> currents by WIN55212-2 in rat retinal ganglion cells is independent of CB1/CB2 receptors. *Neuroscience* 2013; 253: 183–193.
- 5 Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Fan SF. Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings. *Vis Neurosci* 2000; 17(3): 391–401.
- 6 Fan SF, Yazulla S. Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2. *Vis Neurosci* 2003; 20(2): 177–188.
- 7 Koeberle PD, Wang Y, Schlichter LC. Kv1.1 and Kv1.3 channels contribute to the degeneration of retinal ganglion cells after optic nerve transection *in vivo*. *Cell Death Differ* 2010; 17(1): 134–144.
- 8 Zhong YS, Wang J, Liu WM, Zhu YH. Potassium ion channels in retinal ganglion cells (review). *Mol Med Rep* 2013; 8(2): 311–319.
- 9 Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010; 90(1): 291–366.
- 10 Chen L, Yu YC, Zhao JW, Yang XL. Inwardly rectifying potassium channels in rat retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci* 2004; 20(4): 956–964.
- 11 Hirooka K, Kelly ME, Baldrige WH, Barnes S. Suppressive actions of betaxolol on ionic currents in retinal ganglion cells may explain its neuroprotective effects. *Exp Eye Res* 2000; 70(5): 611–621.
- 12 Wood JP, Schmidt KG, Melena J, Chidlow G, Allmeier H, Osborne NN. The beta-adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: comparison with betaxolol. *Exp Eye Res* 2003; 76(4): 505–516.
- 13 Koriyama Y, Yasuda R, Homma K, Mawatari K, Nagashima M, Sugitani K, Matsukawa T, Kato S. Nitric oxide-cGMP signaling regulates axonal elongation during optic nerve regeneration in the goldfish *in vitro* and *in vivo*. *J Neurochem* 2009; 110(3): 890–901.
- 14 Manabe S, Gu Z, Lipton SA. Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(12): 4747–4753.
- 15 Brandt SK, Weatherly ME, Ware L, Linn DM, Linn CL. Calcium preconditioning triggers neuroprotection in retinal ganglion cells. *Neuroscience* 2011; 172: 387–397.
- 16 Tsai D, Morley JW, Suanning GJ, Lovell NH. Frequency-

- dependent reduction of voltage-gated sodium current modulates retinal ganglion cell response rate to electrical stimulation. *J Neural Eng* 2011; 8(6): 066007.
- 17 Schmid S, Guenther E. Alterations in channel density and kinetic properties of the sodium current in retinal ganglion cells of the rat during *in vivo* differentiation. *Neuroscience* 1998; 85(1): 249–258.
- 18 Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Neurosci* 1992; 12(2): 430–439.
- 19 Stys PK, Sontheimer H, Ransom BR, Waxman SG. Noninactivating, tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> conductance in rat optic nerve axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(15): 6976–6980.
- 20 Hains BC, Waxman SG. Neuroprotection by sodium channel blockade with phenytoin in an experimental model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11): 4164–4169.
- 21 Morgan JL, Schubert T, Wong RO. Developmental patterning of glutamatergic synapses onto retinal ganglion cells. *Neural Dev* 2008; 3: 8.
- 22 Soto F, Bleckert A, Lewis R, Kang Y, Kerschensteiner D, Craig AM, Wong RO. Coordinated increase in inhibitory and excitatory synapses onto retinal ganglion cells during development. *Neural Dev* 2011; 6: 31.
- 23 Bai N, Aida T, Yanagisawa M, Katou S, Sakimura K, Mishina M, Tanaka K. NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. *Mol Brain* 2013; 6: 34.
- 24 Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14(6): 383–400.
- 25 Dong LD, Chen J, Li F, Gao F, Wu J, Miao Y, Wang Z. Enhanced expression of NR2B subunits of NMDA receptors in the inherited glaucomatous DBA/2J mouse retina. *Neural Plast* 2013; 2013: 670254.
- 26 Schuettauf F, Stein T, Choragiewicz TJ, Rejdak R, Bolz S, Zurakowski D, Varde MA, Laties AM, Thaler S. Caspase inhibitors protect against NMDA-mediated retinal ganglion cell death. *Clin Experiment Ophthalmol* 2011; 39(6): 545–554.
- 27 Qiu W, Wei R, Zhang C, Zhang C, Leng W, Wang W. A glycine site-specific NMDA receptor antagonist protects retina ganglion cells from ischemic injury by modulating apoptotic cascades. *J Cell Physiol* 2010; 223(3): 819–826.
- 28 Zhang XJ, Liu LL, Wu Y, Jiang SX, Zhong YM, Yang XL. sigma receptor 1 is preferentially involved in modulation of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-mediated light-evoked excitatory postsynaptic currents in rat retinal ganglion cells. *Neurosignals* 2011; 19(2): 110–116.
- 29 Jacoby RA, Wu SM. AMPA-preferring receptors mediate excitatory non-NMDA responses of primate retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 2001; 18(5): 703–710.
- 30 Chen S, Diamond JS. Synaptically released glutamate activates extrasynaptic NMDA receptors on cells in the ganglion cell layer of rat retina. *J Neurosci* 2002; 22(6): 2165–2173.
- 31 Matsui K, Hasegawa J, Tachibana M. Modulation of excitatory synaptic transmission by GABA(C) receptor-mediated feedback in the mouse inner retina. *J Neurophysiol* 2001; 86(5): 2285–2298.
- 32 Jones RS, Pedisich M, Carroll RC, Nawy S. Spatial organization of AMPAR subtypes in ON RGCs. *J Neurosci* 2014; 34(2): 656–661.
- 33 Savtchouk I, Liu SJ. Remodeling of synaptic AMPA receptor subtype alters the probability and pattern of action potential firing. *J Neurosci* 2011; 31(2): 501–511.
- 34 Jones RS, Carroll RC, Nawy S. Light-induced plasticity of synaptic AMPA receptor composition in retinal ganglion cells. *Neuron* 2012; 75(3): 467–478.
- 35 Yu J, Daniels BA, Baldrige WH. Slow excitation of cultured rat retinal ganglion cells by activating group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurophysiol* 2009; 102(6): 3728–3739.
- 36 Awatramani GB, Slaughter MM. Intensity-dependent, rapid activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors at a central synapse. *J Neurosci* 2001; 21(2): 741–749.
- 37 Robbins J, Reynolds AM, Treseder S, Davies R. Enhancement of low-voltage-activated calcium currents by group II metabotropic glutamate receptors in rat retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23(3): 341–350.
- 38 Higgs MH, Romano C, Lukasiewicz PD. Presynaptic effects of group III metabotropic glutamate receptors on excitatory synaptic transmission in the retina. *Neuroscience* 2002; 115(1): 163–172.
- 39 Georgiou AL, Guo L, Cordeiro MF, Salt TE. Changes in the modulation of retinocollicular transmission through group III mGluRs long after an increase in intraocular pressure in a rat model of glaucoma. *Vis Neurosci* 2012; 29(4–5): 237–246.
- 40 Grunert U. Distribution of GABA and glycine receptors on bipolar and ganglion cells in the mammalian retina. *Microsc Res Tech* 2000; 50(2): 130–140.
- 41 Song Y, Slaughter MM. GABA(B) receptor feedback regulation of bipolar cell transmitter release. *J Physiol* 2010; 588(Pt 24): 4937–4949.
- 42 Huang H, Wang Z, Weng SJ, Sun XH, Yang XL. Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Prog Retin Eye Res* 2013; 32: 64–87.

- 43 Alarma-Estrany P, Pintor J. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther* 2007; 113(3): 507–522.
- 44 Lundmark PO, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Cardinali DP, Rosenstein RE. Melatonin in the eye: implications for glaucoma. *Exp Eye Res* 2007; 84(6): 1021–1030.
- 45 Zhao WJ, Zhang M, Miao Y, Yang XL, Wang Z. Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signalling pathway in rat retinal ganglion cells. *J Physiol* 2010; 588(Pt 14): 2605–2619.
- 46 Rosenstein RE, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Cardinali DP. Melatonin as a therapeutic tool in ophthalmology: implications for glaucoma and uveitis. *J Pineal Res* 2010; 49(1): 1–13.
- 47 Yang J, Pahng J, Wang GY. Dopamine modulates the off pathway in light-adapted mouse retina. *J Neurosci Res* 2013; 91(1): 138–150.
- 48 Liu Y, Lasater EM. Calcium currents in turtle retinal ganglion cells. II. Dopamine modulation via a cyclic AMP-dependent mechanism. *J Neurophysiol* 1994; 71(2): 743–752.
- 49 Vaquero CF, Pignatelli A, Partida GJ, Ishida AT. A dopamine- and protein kinase A-dependent mechanism for network adaptation in retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2001; 21(21): 8624–8635.
- 50 Hayashida Y, Ishida AT. Dopamine receptor activation can reduce voltage-gated Na<sup>+</sup> current by modulating both entry into and recovery from inactivation. *J Neurophysiol* 2004; 92(5): 3134–3141.
- 51 Chen L, Yang XL. Hyperpolarization-activated cation current is involved in modulation of the excitability of rat retinal ganglion cells by dopamine. *Neuroscience* 2007; 150(2): 299–308.
- 52 Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2006; 12: 1160–1166.
- 53 Middleton TP, Protti DA. Cannabinoids modulate spontaneous synaptic activity in retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 2011; 28(5): 393–402.
- 54 Jiang SX, Li Q, Wang XH, Li F, Wang ZF. Activation of cannabinoid CB1 receptors modulates evoked action potentials in rat retinal ganglion cells. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2013; 65(4): 355–362.
- 55 Peviani M, Salvaneschi E, Bontempi L, Petese A, Manzo A, Rossi D, Salmona M, Collina S, Bigini P, Curti D. Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiol Dis* 2014; 62: 218–232.
- 56 Kimura Y, Fujita Y, Shibata K, Mori M, Yamashita T. Sigma-1 receptor enhances neurite elongation of cerebellar granule neurons via TrkB signaling. *PLoS One* 2013; 8(10): e75760.
- 57 Liu LL, Wang L, Zhong YM, Yang XL. Expression of sigma receptor 1 mRNA and protein in rat retina. *Neuroscience* 2010; 167(4): 1151–1159.
- 58 Ha Y, Saul A, Tawfik A, Zorrilla EP, Ganapathy V, Smith SB. Diabetes accelerates retinal ganglion cell dysfunction in mice lacking sigma receptor 1. *Mol Vis* 2012; 18: 2860–2870.
- 59 Zhang XJ, Liu LL, Jiang SX, Zhong YM, Yang XL. Activation of the zeta receptor 1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells. *Neuroscience* 2011; 177: 12–22.
- 60 Mueller BH 2nd, Park Y, Daudt DR 3rd, Ma HY, Akopova I, Stankowska DL, Clark AF, Yorio T. Sigma-1 receptor stimulation attenuates calcium influx through activated L-type voltage gated calcium channels in purified retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 2013; 107: 21–31.