

研究论文

幼年小鼠初级听皮层第V层锥体神经元持续性放电与毒蕈碱受体亚型关系

贾慧娟, 王欣, 付欣, 杜小凤, 郑维维, 罗峰*

华中师范大学生命科学学院, 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 武汉 430079

摘要: 激活胆碱能受体结合去极化电流诱导产生的持续性放电(persistent activity, PA)是神经元产生可塑性的一种特征表现。小鼠初级听皮层(primary auditory cortex, AI)神经元PA的产生与毒蕈碱受体(即M型受体)密切相关, 但其涉及的毒蕈碱受体亚型尚不清楚。本研究采用离体脑片全细胞膜片钳技术结合药理学方法, 探讨幼年小鼠AI第V层锥体神经元PA与毒蕈碱受体亚型之间的关系。结果显示, 激活胆碱能受体并同时注入去极化电流可诱导锥体神经元产生PA。M1、M2和M3受体拮抗剂分别能阻断PA的产生, 而M4受体拮抗剂对PA的产生没有影响。该结果表明M1、M2和M3毒蕈碱受体均参与幼年小鼠AI第V层锥体神经元PA的形成, 而M4毒蕈碱受体不参与PA的形成。

关键词: 全细胞膜片钳; 毒蕈碱受体; 持续性放电; 可塑性; 小鼠

中图分类号: Q437; R329

Subtypes of muscarinic acetylcholine receptors involved in the persistent activity of layer V pyramidal neurons in the primary auditory cortex of young mice

JIA Hui-Juan, WANG Xin, FU Xin, DU Xiao-Feng, ZHENG Wei-Wei, LUO Feng*

School of Life Sciences and Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract: Cholinergic receptor activation and intracellular current injection lead to the persistent activity (PA), which may be involved in inducing neural plasticity. Our previous study showed that PA is closely related to the activation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in pyramidal neurons of mouse primary auditory cortex (AI). However, the subtypes of mAChRs involved in PA remain unclear. Thus, using whole-cell patch-clamp recording and pharmacological methods, we investigated the role of different mAChR subtypes in inducing PA in AI layer V pyramidal neurons of young mice. The results showed that activation of mAChRs with intracellular depolarizing current induced PA in layer V pyramidal neurons. Blockade of M1, M2 or M3 subtypes prevented the PA, whereas M4 receptor antagonists did not affect the production of PA. The results suggest that the PA may be induced through a mechanism involving M1, M2 and M3 muscarinic receptors, but not M4 subtype.

Key words: whole-cell patch-clamp; mAChR; persistent activity; plasticity; mouse

大脑的许多功能如学习、记忆、运动等都与听觉感知密切相关。动物依赖听信息进行交流^[1,2], 在学习过程中其听觉系统中的乙酰胆碱(acetylcho-

line, ACh)水平会显著性升高^[3]。已知胆碱能受体激活后神经元对声刺激的反应被易化, 表现为神经元对声刺激频率的反应增强, 其最佳频率向着纯音

Received 2017-07-29 Accepted 2017-11-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31300915) and the Scientific Research Project Fund for Youth Teachers from Central China Normal University (No. CCNU15A05035).

*Corresponding author. Tel: +86-27-67868508; E-mail: fluocn@gmail.com

刺激的频率发生漂移, 而加入阿托品阻断毒蕈碱受体后可阻断神经元最佳频率的漂移^[4], 这表明该听觉可塑性的形成受胆碱能系统的调控, 并且与毒蕈碱受体密切相关。使用膜片钳技术在脑片上的研究显示, 激活毒蕈碱受体并给予神经元模拟声刺激的去极化电流, 可诱导神经元持续性放电 (persistent activity, PA)^[5-7], 表现为长于刺激时程的动作电位的爆发^[8]。PA 可能促进在体条件下神经元对信息的加工和处理, 在可塑性中发挥重要作用^[9]。

以往关于 PA 的研究主要集中在记忆区域的可塑性的形成, 表明激活毒蕈碱受体结合去极化电流可以诱导感觉皮层锥体神经元产生 PA, 该 PA 受胆碱能系统调控, 并且与毒蕈碱受体亚型密切相关^[5-7, 10]。分子克隆技术表明毒蕈碱受体存在 5 种亚型, 即 M1~M5 毒蕈碱受体, 由于技术的限制以及 M5 毒蕈碱受体在皮层区的表达量少于毒蕈碱受体表达总量的 2%, 药理学只对 M1~M4 毒蕈碱受体有研究^[11, 12]。PA 到底与哪种毒蕈碱受体亚型有关, 目前尚未见研究报道。

初级听皮层 (primary auditory cortex, AI) 与听觉可塑性的形成密切相关^[13], 按照细胞构筑的不同将 AI 分为 6 层^[14-16], 其中第 V 层 (L5) 中分布有皮层-皮层神经元和皮层-丘系神经元, 具有分析和整合信息的功能, 同时 L5 又是听皮层信息输出的主要部位^[17-20], 所以 L5 在听觉通路中占有重要地位。由于小鼠在幼年期其听觉可塑性最强^[21], 所以本研究利用膜片钳技术和药理学方法探究幼年小鼠 AI-L5 锥体神经元产生的 PA 与 M1~M4 毒蕈碱受体之间的关系, 为进一步了解胆碱能调控机制及听觉可塑性机制提供参考。

1 材料方法

1.1 实验动物及脑片制备

实验动物为出生后 10~29 天 (postnatal 10 days to 29 days, P10~P29) 的听力正常的昆明小鼠 (*Mus musculus*, Km)(购自湖北省疾病预防控制中心), 雌雄不拘。根据神经元内在特性的发育情况把幼年小鼠的听觉发育关键期定为 P10~P29^[20]。整个动物实验过程获得华中师范大学伦理委员会的批准, 参照 NIH 实验动物护理和使用条例进行。戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 麻醉动物, 断头后打开颅骨, 然后迅速取出全脑浸入 0 °C 95% O₂-5% CO₂ 混合气 (购自武汉翔云工贸有限公司) 饱和的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid,

ACSF) 中 (mmol/L): KCl 5、KH₂PO₄ 1.2、MgSO₄ 1.3、D-葡萄糖 10、NaHCO₃ 26、NaCl 120、CaCl₂ 2.4, pH 7.4 (NaOH 调整)。取出脑组织放于滤纸上, 冠状切除大脑前部和小脑的 25%, 再矢状切除大脑右侧半球的 2/3。将脑组织腹面向下用 502 胶水粘贴到振动切片机 (Leica, VT1200S, 德国) 的样品座上, 放入缓冲液盘, 注入 0 °C 氧混合气饱和的 ACSF, 并持续充氧。水平 15° 切厚度为 300 μm 的脑片, 将脑片转移至 32 °C 氧混合气饱和的 ACSF 中, 温孵 45 min 后在 AI-L5 内选择锥体神经元进行记录。

1.2 全细胞膜片钳记录

实验时取一温孵好的脑片, 转移至温度控制在 32 °C 的全浸式脑片槽中并用尼龙网固定, 同时持续灌流氧混合气饱和的 ACSF (2~3 mL/min)。实验记录前, 首先在红外可视显微镜 (BX-51WI, Olympus, Japan) 低倍镜 (5×) 下对 AI 进行定位。小鼠 AI 可通过内侧膝状体 (medial geniculate body, MGB)、外侧膝状体 (lateral geniculate nucleus, LGN)、海马, 以及 MGB 和 AI 之间的白质束进行定位^[16], 尼氏染色结果见图 1。对 AI 定位后转换至高倍镜 (40×), 将高倍镜由 L1 逐渐移向 L6 层 (图 1B), 寻找 L5 所在区域。当视野内出现胞体显著增大、数量减少, 且多为大锥体神经元时, 视其为 L5 区域。记录神经元的三维坐标, 按 L5 范围占 AI 区域 (L1→L6 层) 的 50%~75%^[14], 尼氏染色进行验证。在 L5 区域内寻找表面较为光滑, 边缘清晰且立体感较强的锥体神经元进行钳制。记录电极为内径为 0.86 mm, 外径为 1.50 mm 的电极毛坯 (Sutter, USA) 通过水平拉制仪 (Sutter, P-97, USA) 拉制而成的尖端直径约 1~2 μm 的玻璃微电极, 充灌电极内液后阻抗为 5~10 MΩ。电极内液的最终成分及浓度 (mmol/L) 分别为: Na-Gluconate 8, K-Gluconate 108, KCl 8, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 1, Na-GTP 0.35, K-ATP 4, pH 7.20~7.25 (KOH 调整), 渗透压 286 mOsmol/kg (双蒸水调整)。形成全细胞记录并稳定 3~5 min 后开始记录。诱导锥体神经元产生 PA 时, 溶液灌流含 5 μmol/L 卡巴胆碱 (carbachol, CCh) 的 ACSF, 调节细胞膜电位使其维持在稍低于阈电位水平, 稳定后向神经元注入时程为 400 ms~2 s, 强度为 100~300 pA 的电流。在稳定诱导出 PA 的基础上, 溶液灌流含一定浓度的 M1 毒蕈碱受体拮抗剂 (pirenzepine dihydrochloride, 1 μmol/L, 购自 Sigma 公司), 在相同条件下记录阻断 M1 毒蕈碱受体后对神经元 PA 的影响。然后再溶液灌流含

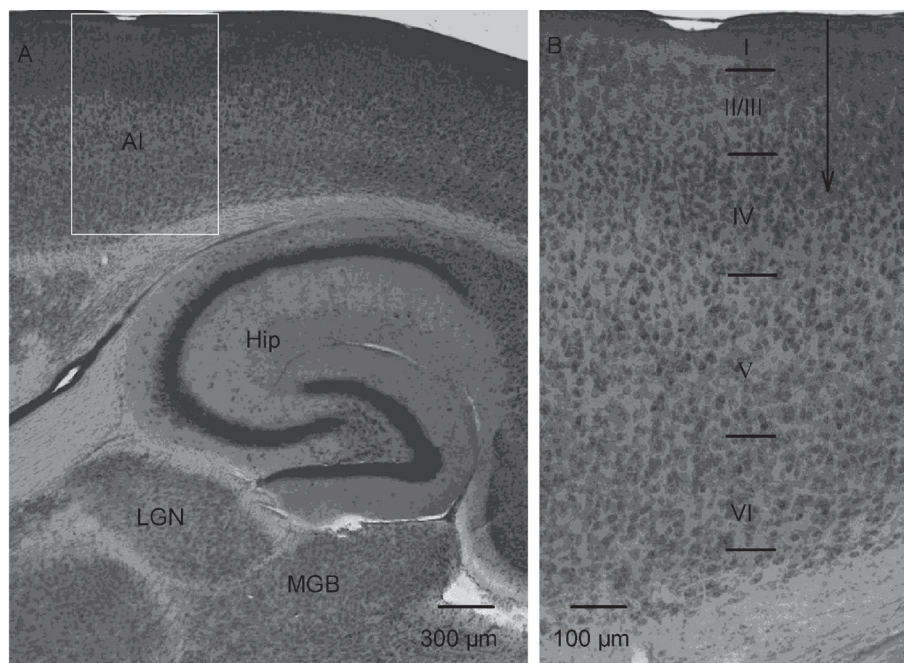


图 1. 昆明小鼠初级听皮层(primary auditory cortex, AI)的尼氏染色定位

Fig. 1. The Nissl's staining of Km mouse brain slice showing primary auditory cortex (AI). A: Landmarks used to locate AI. MGB: medial geniculate body; LGN: lateral geniculate nucleus; Hip: hippocampus. The white rectangle area is the experimental recording position. B: Different layers of AI. Vertical line represents the direction from the layer I to VI.

5 $\mu\text{mol/L}$ CCh 的 ACSF, 记录神经元 PA 的恢复情况。最后溶液灌流 ACSF, 记录神经元的状态。M2~M4 毒蕈碱受体拮抗剂 (AF-DX 116, 1 $\mu\text{mol/L}$, 购自 Sigma 公司; 4-DAMP, 1 $\mu\text{mol/L}$, 购自 Sigma 公司; PD102807, 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 购自 Tocris Bioscience 公司) 的使用方法同上。

1.3 数据分析 在电流钳模式下不注入电流, 2 min 内稳定记录的平均膜电位记为该神经元的静息膜电位 (resting membrane potential, RMP)。电流钳模式下注入 500 ms、30 pA 的负向电流, 根据神经元膜电位的变化, 利用欧姆定律计算神经元的输入阻抗 (R_{in}): $R_{in} = \Delta U/I$, 其中 ΔU 为注入电流前 3 s 内的平均膜电位与注入 30 pA 的负向电流时稳定期膜电位之间的电位差; I 为所注入负向电流的强度 (30 pA)。膜时间常数 (time constant, T) 为注入 1 s、100 pA 的负向电流时神经元的膜电位变化 63% 所用的时间。判断 PA 产生的标准为神经元在电流刺激结束后 30 s 内产生动作电位数量大于 6。PA 的发放频率为电流刺激结束后 20 s 内神经元动作电位的平均发放频率; 基线膜电位是电流刺激前 3 s 内测得的平均膜电位; 平台期电位 (plateau potential) 为电流刺激结束后引起的去极化电位, 是基线膜电

位和电流刺激结束后 20 s 内神经元平均膜电位的差值, 该值越大则神经元越容易出现动作电位的持续性爆发。神经元的阈电位 (threshold potential, E_{thr})、激活阈值 (activation threshold, A_{thr}) 和阈强度 (rheobase) 均在注入 0~100 pA, 阶跃为 10 pA 的电流时有 1~2 个动作电位时检测首个动作电位所得。 E_{thr} 为神经元形成快速去极化时膜电位的临界值, 其值越低神经元越容易兴奋; A_{thr} 是神经元 RMP 和阈电位之间的差值, 由于神经元产生兴奋的条件就是使其膜电位去极化到阈电位水平, 所以激活阈值越小, 代表神经元兴奋性越高; 阈强度是引起神经元兴奋所需达到的最低刺激强度, 所以其值越小, 代表神经元兴奋性越高。

采用软件 Patchmaster、Igor 4.04 和 Sigmaplot 10.0 进行数据处理和作图, 统计结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。用配对 t 检验 (paired t -test) 进行数据差异性分析。

2 结果

2.1 激活胆碱能受体结合去极化电流诱导 AI-L5 锥体神经元产生 PA

实验共记录 110 个 AI-L5 锥体神经元。结果显示, 激活胆碱能受体的同时向神经元注入一定强度

和时程的去极化电流, 可诱导 66.5% (72/110) 的锥体神经元产生 PA。对 66 个锥体神经元加入毒蕈碱受体拮抗剂, 分析阻断受体后对神经元 PA 的影响, 再对加入毒蕈碱受体拮抗剂的 66 个锥体神经元中的 49 个神经元电生理特性的变化进行了分析和测量。

2.2 分别阻断M1~M4毒蕈碱受体对AI-L5锥体神经元电生理特性的影响

分别阻断 M1~M4 毒蕈碱受体, 观察锥体神经元电生理特性的变化。结果表明, 阻断 M1 毒蕈碱受体, 神经元的阈电位 (E_{thr}) 和阈强度 (rheobase) 均

表1. 分别阻断M1~M4毒蕈碱受体亚型对AI-L5锥体神经元电生理特性的影响

Blocking receptor		RMP (mV)	R_{in} (M Ω)	T (ms)	E_{thr} (mV)	A_{thr} (mV)	Rheobase (pA)
M1	Before	-60.0 ± 3.6	186.9 ± 53.6	12.4 ± 4.0	-40.6 ± 3.0	19.4 ± 4.1	36.9 ± 23.2
	After	-59.7 ± 4.6	179.3 ± 45.5	12.4 ± 2.2	$-39.1 \pm 2.9^*$	20.5 ± 4.9	$52.3 \pm 35.2^*$
M2	Before	-58.4 ± 3.1	178.2 ± 38.4	13.5 ± 4.1	-39.0 ± 4.1	19.4 ± 4.8	35.0 ± 29.5
	After	-58.2 ± 3.6	192.2 ± 44.6	14.5 ± 3.4	-38.2 ± 4.6	20.1 ± 5.4	$40.0 \pm 29.1^*$
M3	Before	-55.3 ± 3.7	214.8 ± 69.8	14.9 ± 4.7	-39.3 ± 2.6	16.0 ± 4.6	23.1 ± 12.5
	After	-55.0 ± 4.5	196.2 ± 64.3	14.5 ± 3.4	$-37.3 \pm 2.8^*$	$17.7 \pm 5.9^*$	$45.4 \pm 31.0^{**}$
M4	Before	-57.2 ± 3.1	191.0 ± 35.5	13.9 ± 2.9	-38.7 ± 4.6	18.4 ± 5.2	34.0 ± 16.5
	After	-56.7 ± 3.8	198.2 ± 48.5	14.8 ± 2.2	$-37.3 \pm 4.6^{**}$	19.4 ± 5.4	37.0 ± 18.8

RMP, resting membrane potential; R_{in} , input resistance; T, time constant; E_{thr} , threshold potential; A_{thr} , activation threshold. Mean \pm SD. M1, $n=13$; M2, $n=14$; M3, $n=12$; M4, $n=10$. Paired t -test, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs Before.

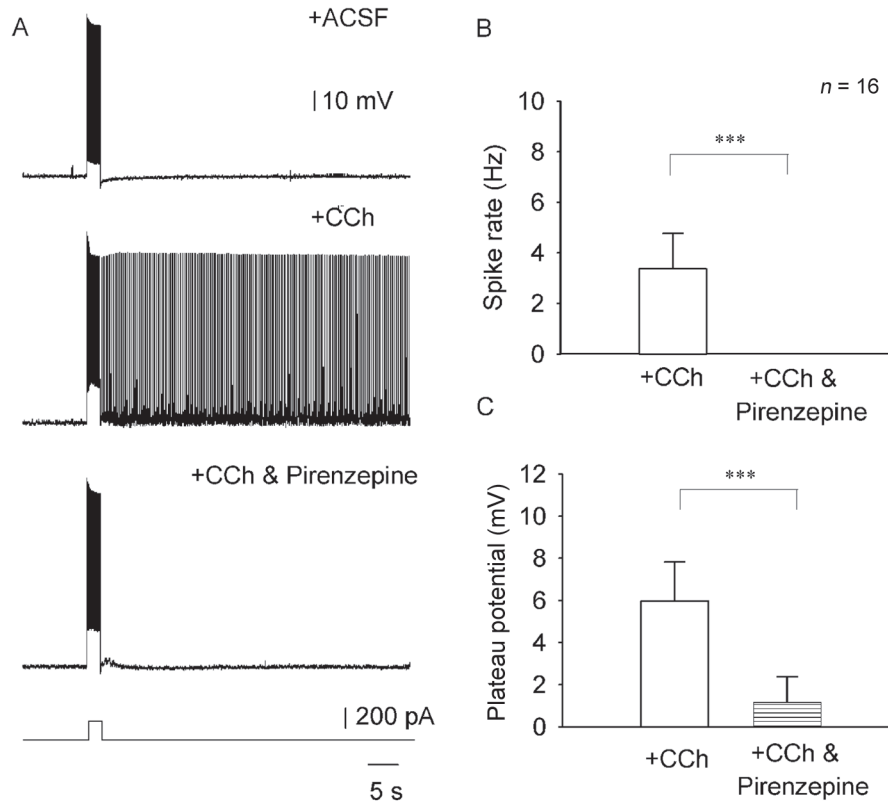


图 2. 阻断M1毒蕈碱受体后对幼年小鼠AI-L5锥体神经元持续性放电的影响

Fig. 2. The effects of M1 muscarinic receptor blockade on the persistent activity (PA) in layer V pyramidal neurons. A: PA induced by ACSF containing CCh and depolarizing current injection (200 pA, 2 s) was blocked by M1 muscarinic receptor antagonist (pirenzepine, 1 μ mol/L) in the same condition. B, C: PA frequency and plateau potential were significantly reduced by pirenzepine respectively (mean \pm SD, $n=16$, paired t -test, $^{***}P < 0.001$).

显著升高 ($P < 0.05$, $n = 13$); 阻断 M2 毒蕈碱受体, 神经元的阈强度显著升高 ($P < 0.05$, $n = 14$); 阻断 M3 毒蕈碱受体, 神经元的阈电位和激活阈值 (A_{thr}) 均显著升高 ($P < 0.05$, $n = 12$), 阈强度显著增大 ($P < 0.01$, $n = 12$); 阻断 M4 毒蕈碱受体, 神经元的阈电位显著升高 ($P < 0.01$, $n = 10$)(表 1)。以上结果说明 AI-L5 锥体神经元的细胞膜上存在 M1~M4 毒蕈碱受体。

2.3 阻断M1~M4毒蕈碱受体对幼年小鼠AI-L5锥体神经元产生PA的影响

2.3.1 阻断M1毒蕈碱受体后对神经元PA的影响

使用含 CCh 的 ACSF 结合胞内注入去极化电流诱导神经元产生 PA。然后再换用含 CCh 和 M1 受体拮抗剂 pirenzepine (1 $\mu\text{mol/L}$) 的 ACSF, 相同条件下诱导神经元 PA, 比较加入拮抗剂前后神经元反应的差异。结果显示, 加入 pirenzepine 后所记录的 16 个神经元的 PA 均消失 (图 2A), 且 PA 的放

放频率和平台期电位均显著降低 ($P < 0.001$)(图 2B 和 C)。结果表明, 阻断 M1 毒蕈碱受体可阻断幼年小鼠 AI-L5 锥体神经元 PA 的产生。

2.3.2 阻断M2毒蕈碱受体后对神经元PA的影响

记录 M2 受体拮抗剂 AF-DX 116 (1 $\mu\text{mol/L}$) 对 17 个锥体神经元 PA 的影响。结果显示, 加入 AF-DX 116 后所记录到的 17 个神经元的 PA 发放频率显著降低 ($P < 0.05$), 且平台期电位均显著降低 ($P < 0.001$)(图 3), 其中有 6 个神经元的 PA 消失。结果表明, 阻断 M2 毒蕈碱受体后可抑制幼年小鼠 AI-L5 锥体神经元 PA 的产生。

2.3.3 阻断M3毒蕈碱受体后对神经元PA的影响

记录 M3 受体拮抗剂 4-DAMP (1 $\mu\text{mol/L}$) 对 19 个锥体神经元 PA 的影响。结果显示, 加入 4-DAMP 后所记录的 19 个神经元的 PA 均消失 (图 4A), 且 PA 发放频率和平台期电位均显著降低 ($P < 0.001$) (图 4B 和 C)。结果表明, 阻断 M3 毒蕈碱受体后

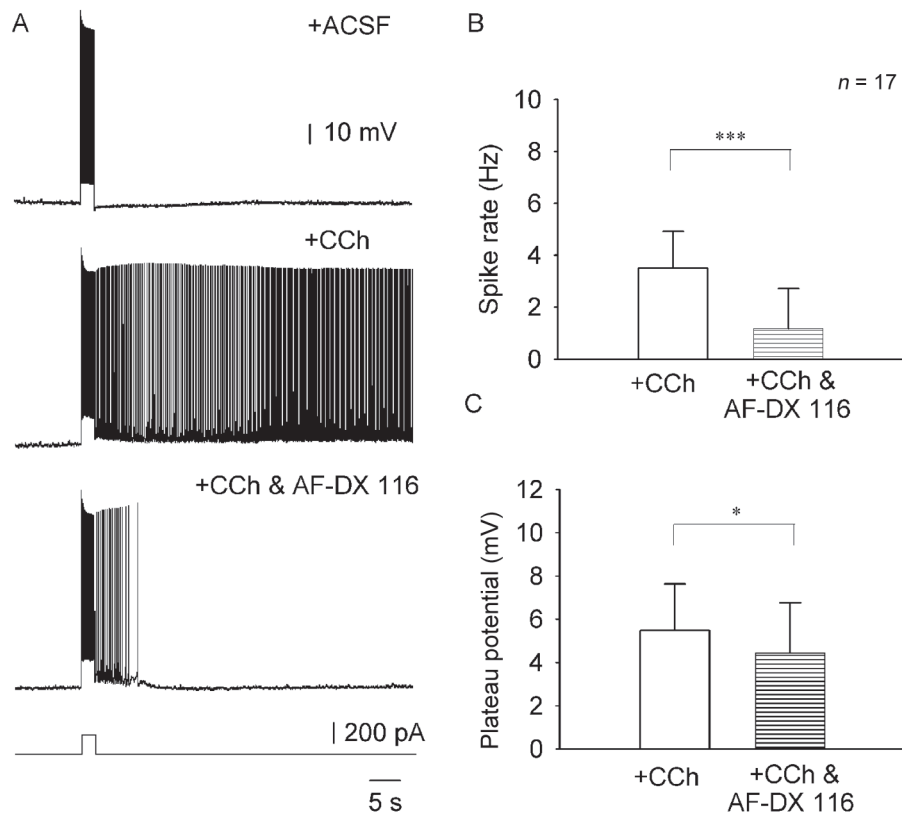


图 3. 阻断M2毒蕈碱受体后对幼年小鼠AI-L5锥体神经元持续性放电的影响

Fig. 3. The effects of M2 muscarinic receptor blockade on the persistent activity (PA) in layer V pyramidal neurons. A: ACSF containing CCh and depolarizing current injection (200 pA, 2 s) induced PA. Both PA frequency (B) and plateau potential (C) were significantly reduced after M2 muscarinic receptor antagonist (AF-DX 116, 1 $\mu\text{mol/L}$) was applied in the same conditions (mean \pm SD, $n = 17$, paired t -test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

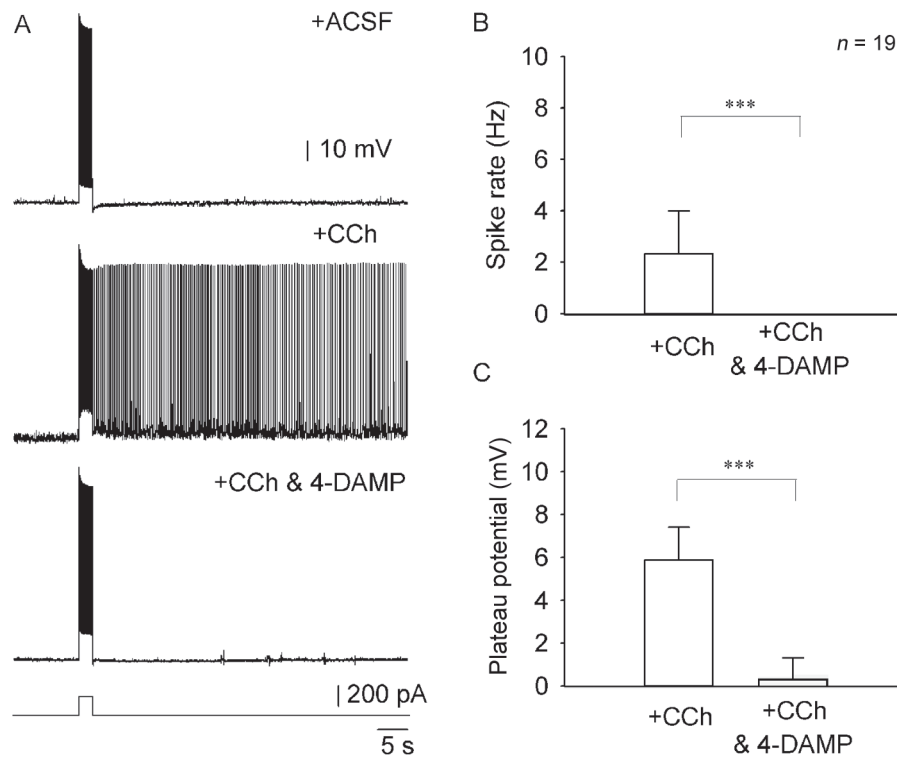


图 4. 阻断M3毒蕈碱受体后对幼年小鼠AI-L5锥体神经元持续性放电的影响

Fig. 4. The effects of M3 muscarinic receptor blockade on the persistent activity (PA) in layer V pyramidal neurons. *A*: PA induced by ACSF containing CCh and depolarizing current injection (200 pA, 2 s) was blocked by M3 muscarinic receptor antagonist (4-DAMP, 1 $\mu\text{mol/L}$) in the same conditions. *B*, *C*: PA frequency and plateau potential were significantly reduced by 4-DAMP respectively (mean \pm SD, $n = 19$, paired *t*-test, *** $P < 0.001$).

可阻断幼年小鼠 AI-L5 锥体神经元 PA 的产生。

2.3.4 阻断M4毒蕈碱受体后神经元PA不受影响

记录 M4 受体拮抗剂 PD102807 (0.25 $\mu\text{mol/L}$) 对 14 个锥体神经元 PA 的影响。结果显示, 加入 PD102807 后所记录的 14 个神经元的 PA 均未发生变化 (图 5A), 且 PA 发放频率和平台期电位均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5B 和 C)。结果表明, 阻断 M4 毒蕈碱受体不影响幼年小鼠 AI-L5 锥体神经元 PA 的产生。

3 讨论

3.1 阻断M1~M4毒蕈碱受体后AI-L5锥体神经元基本特性的变化

神经元的基本特性包括内在特性和非内在特性 (即其他电生理特性), 内在特性包括 RMP、输入阻抗 (R_m) 和时间常数; 非内在特性包括阈电位、激活阈值和阈强度。本实验结果显示阻断 M1~M4 毒蕈碱受体前后 AI-L5 锥体神经元的内在特性不发生

显著变化, 这是由于神经元的内在特性是由细胞的结构决定的。神经元的 RMP 由膜内外 K^+ 浓度差决定, 加入毒蕈碱受体拮抗剂不影响膜内外 K^+ 浓度差, 所以加入毒蕈碱受体拮抗剂前后神经元的 RMP 不发生改变。神经元的膜电阻和时间常数取决于神经元的脂质双分子的结构 (厚度、表面积等物理属性), 在结构不变的情况下, 其膜电阻和时间常数不发生改变。

阻断 M1~M4 毒蕈碱受体前后 AI-L5 锥体神经元的非内在特性有显著变化, 这是由于加入毒蕈碱受体的拮抗剂后神经元细胞膜上的通道状态发生改变。在受刺激的情况下, 离子通道状态的改变会影响离子流动, 引起阈电位、激活阈值、阈强度等非内在特性的改变。以阻断 M2 毒蕈碱受体为例, M2 毒蕈碱受体的活化状态与 Ca^{2+} 通道的开放有关^[22]。阻断 M2 毒蕈碱受体会抑制 Ca^{2+} 通道, 抑制 Ca^{2+} 的内流, 导致神经元不容易去极化, 神经元的阈强度则会升高。同时又由于毒蕈碱受体是 G 蛋白耦联

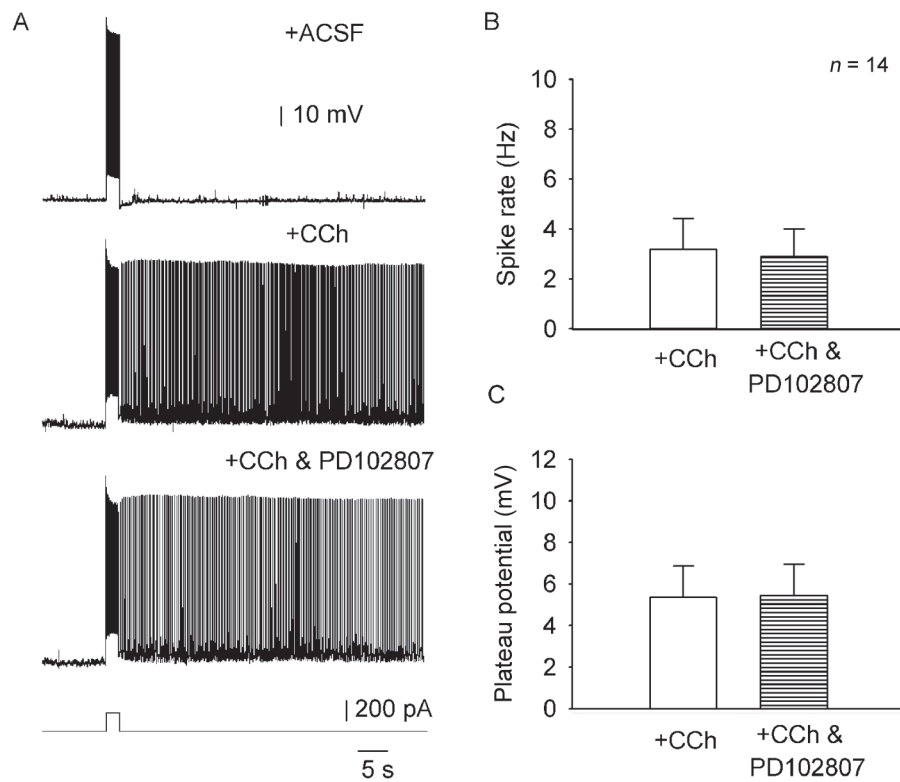


图 5. 阻断M4毒蕈碱受体后幼年小鼠AI-L5锥体神经元持续性放电不受影响

Fig. 5. Blockade of M4 muscarinic receptor did not prevent persistent activity (PA) in layer V pyramidal neurons. *A*: ACSF containing CCh and depolarizing current injection (200 pA, 2 s) induced PA. PA frequency (*B*) and plateau potential (*C*) did not change after M4 muscarinic receptor antagonist (PD102807, 0.25 μ mol/L) was applied in the same conditions ($n = 14$).

受体，不同亚型的毒蕈碱受体与不同的G蛋白相耦联，通过不同的第二信使发挥作用^[23]，所以分别阻断不同的毒蕈碱受体亚型会对神经元的阈电位、激活阈值和阈强度产生不同程度的影响。

3.2 M1~M3毒蕈碱受体参与AI-L5锥体神经元PA形成的机制

本研究结果显示阻断M1~M3毒蕈碱受体后AI-L5锥体神经元PA消失，而阻断M4毒蕈碱受体后神经元PA不受影响，推测M1、M2和M3毒蕈碱受体均参与PA的形成，M4毒蕈碱受体不参与PA的形成。已知M1和M3毒蕈碱受体主要为突触后受体，M2和M4毒蕈碱受体主要为突触前受体^[24-26]，激活这两类毒蕈碱受体后产生PA的机制不同。

研究表明激活M1和M3毒蕈碱受体后，会激活与之相耦联的磷脂酶C (phospholipase C, PLC) 的活性，进而促进磷脂酰肌醇二磷酸 (phosphatidylinositol 4,5-bis phosphate, PIP₂) 的分解，使得第二信

使肌醇三磷酸 (inositol triphosphate, IP₃) 和二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG) 的含量增加^[23, 27, 28]。IP₃结合到内质网上的特异性IP₃受体，该受体是Ca²⁺特异性离子通道，激活后Ca²⁺从内质网中进入胞浆，Ca²⁺可直接或间接激活相关的瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道 (如TRPC1、4和5)^[29, 30]，促进平台期电位的产生。平台期电位达到神经元的阈电位水平时，神经元持续性爆发动作电位，即产生PA。此外，激活M1和M3毒蕈碱受体后还可以通过增强阳离子Na⁺/K⁺电流、Ca²⁺依赖性电流和非选择性阳离子电流，或者通过抑制K⁺通道，如K_v7 (M型钾离子通道) 和K_vAMP，使神经元兴奋性增加^[28, 31-33]。激活M1和M3毒蕈碱受体后神经元的兴奋性增加，正电流刺激结束后的膜电位较基线膜电位去极化，该电位称为去极化后电位 (after depolarization potential, ADP)，当ADP达到神经元的阈电位水平时，神经元爆发动作电位进一步引起Ca²⁺内流，导致动作电位持续性爆发，即产生PA。

在大鼠听皮层中的研究表明, 激活 M2 毒蕈碱受体可抑制突触前神经元 GABA 的释放, 引起突触后神经元兴奋^[22]。同时, 当 M2 毒蕈碱受体被激活时也可抑制突触前神经元 Glu 的释放, 从而抑制突触后神经元^[34, 35]。当前者作用较强时, 突触后神经元的兴奋性增强, 易于产生 PA。

M4 毒蕈碱受体不参与调节 GABA 的释放, 却抑制 Glu 的释放^[22, 34, 35], 因此激活 M4 毒蕈碱受体表现为抑制效应, 不能引起 PA。研究表明 AI-L5 中 Glu 受体的表达较 AI 其它层的低^[36], 推测由于 AI-L5 锥体细胞接受的 Glu 的输入较少, Glu 的效应较弱, 所以加入 M4 受体拮抗剂后, PA 的发放频率不发生显著变化。

3.3 毒蕈碱受体与听觉可塑性之间的关系

听皮层的研究表明毒蕈碱受体与听觉可塑性密切相关^[37–39], 而毒蕈碱受体存在 5 种受体亚型, 目前对毒蕈碱受体亚型与听觉可塑性之间关系的研究较少。已知在皮层中 M1~M4 毒蕈碱受体的表达量占总的毒蕈碱受体表达量的比例分别为 34%、19%、10% 和 24%^[12]。研究表明当听皮层中缺少 M1 毒蕈碱受体的表达时, 听皮层的拓扑结构和频率调谐出现异常^[40, 41], 且当给予前脑基底核声刺激和电刺激时, 诱导听皮层神经元产生的特异性频率可塑性较正常小鼠弱且短^[41], 这表明 M1 毒蕈碱受体对学习诱导的听觉可塑性有重要作用。本研究表明毒蕈碱 M1~M3 毒蕈碱受体参与幼年小鼠 AI-L5 锥体神经元 PA 的形成, 推测 M2 和 M3 毒蕈碱受体亦参与听觉可塑性的形成, 后续实验可通过基因敲除 M2 和 M3 毒蕈碱受体的表达来进一步检验其在听觉可塑性中所起的作用。

参考文献

- Linden JF, Liu RC, Sahani M, Schreiner CE, Merzenich MM. Spectrotemporal structure of receptive fields in areas AI and AAF of mouse auditory cortex. *J Neurophysiol* 2003; 90(4): 2660–2675.
- Haack B, Markl H, Ehret G. Sound communication between parents and offspring. *Vts Uni* 2009; 6683–9175.
- Acquas E, Wilson C, Fibiger HC. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci* 1996; 16(9): 3089–3096.
- Ji W, Gao E, Suga N. Effects of acetylcholine and atropine on plasticity of central auditory neurons caused by conditioning in bats. *J Neurophysiol* 2001; 86(1): 211–225.
- Rahman J, Berger T. Persistent activity in layer 5 pyramidal neurons following cholinergic activation of mouse primary cortices. *Eur J Neurosci* 2011; 34(1): 22–30.
- Knauer B, Jochems A, Valero-Aracama MJ, Yoshida M. Long-lasting intrinsic persistent firing in rat CA1 pyramidal cells: A possible mechanism for active maintenance of memory. *Hippocampus* 2013; 23(9): 820–831.
- Jochems A, Yoshida M. Persistent firing supported by an intrinsic cellular mechanism in hippocampal CA3 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 2013; 38(2): 2250–2259.
- Major G, Tank D. Persistent neural activity: prevalence and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14(6): 675–684.
- Ren M, Cao V, Ye Y, Manji HK, Wang KH. Arc regulates experience-dependent persistent firing patterns in frontal cortex. *J Neurosci* 2014; 34(19): 6583–6595.
- Egorov AV, Hamam BN, Fransén E, Hasselmo ME, Alonso AA. Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* 2002; 420(6912): 173–178.
- Levey AI, Edmunds SM, Heilman CJ, Desmond TJ, Frey KA. Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience* 1994; 63(1): 207–221.
- Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Satkus SA, Weistein JS, Spagnola BV, Wolfe BB. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 1993; 43(2): 149–157.
- Weinberger NM. Auditory associative memory and representational plasticity in the primary auditory cortex. *Hear Res* 2007; 229(1): 54–68.
- Geissler DB, Schmidt HS, Ehret G. Knowledge about sounds—Context-specific meaning differently activates cortical hemispheres, auditory cortical fields, and layers in house mice. *Front Neurosci* 2016; 10: 98–118.
- Anderson LA, Christianson GB, Linden JF. Mouse auditory cortex differs from visual and somatosensory cortices in the laminar distribution of cytochrome oxidase and acetylcholinesterase. *Brain Res* 2009; 1252: 130–142.
- Broicher T, Bidmon HJ, Kamuf B, Coulon P, Gorji A, Pape HC, Speckmann EJ, Budde T. Thalamic afferent activation of supragranular layers in auditory cortex *in vitro*: a voltage sensitive dye study. *Neuroscience* 2010; 165(2): 371–385.
- Razak KA. Systematic representation of sound locations in the primary auditory cortex. *J Neurosci* 2011; 31(39): 13848–13859.
- Rock C, Apicella AJ. Callosal projections drive neuronal-specific responses in the mouse auditory cortex. *J Neurosci* 2015; 35(17): 6703–6713.
- Joshi A, Middleton JW, Anderson CT, Borges K, Suter BA,

- Shepherd GM, Tzounopoulos T. Cell-specific activity-dependent fractionation of layer 2/3→ 5B excitatory signaling in mouse auditory cortex. *J Neurosci* 2015; 35(7): 3112–3123.
- 20 Oswald AM, Reyes AD. Maturation of intrinsic and synaptic properties of layer 2/3 pyramidal neurons in mouse auditory cortex. *J Neurophysiol* 2008; 99(6): 2998–3008.
- 21 Dahmen JC, King AJ. Learning to hear: plasticity of auditory cortical processing. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17(4): 456–464.
- 22 Salgado H, Bellay T, Nichols JA, Bose M, Martinolich L, Perrotti L, Atzori M. Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca²⁺ channel modulation through activation of PI₃K/Ca²⁺-independent and PLC/Ca²⁺-dependent PKC. *J Neurophysiol* 2007; 98(2): 952–965.
- 23 Shideler KK, Yan J. M1 muscarinic receptor for the development of auditory cortical function. *Mol Brain* 2010; 3(1): 29–35.
- 24 Tzavara ET, Bymaster FP, Felder CC, Wade M, Gomeza J, Wess J, Mckinzie DL, Nomikos GG. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 2003; 8(7): 673–679.
- 25 Wess J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10(1): 69–99.
- 26 Muller JF, Mascagni F, Zaric V, Mott DD, McDonald AJ. Localization of the M2 muscarinic cholinergic receptor in dendrites, cholinergic terminals, and noncholinergic terminals in the rat basolateral amygdala: An ultrastructural analysis. *J Comp Neurol* 2016; 524: 2400–2417.
- 27 Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* 2006; 12(28): 3573–3581.
- 28 Alger BE, Nagode DA, Tang AH. Muscarinic cholinergic receptors modulate inhibitory synaptic rhythms in hippocampus and neocortex. *Front Synaptic Neurosci* 2014; 6: 18–41.
- 29 Reboreda A, Jiménez-Díaz L, Navarro-López JD. TRP channels and neural persistent activity. *Adv Exp Med Biol* 2011; 704: 595–613.
- 30 Zhang Z, Reboreda A, Alonso A, Barker PA, Séguéla P. TRPC channels underlie cholinergic plateau potentials and persistent activity in entorhinal cortex. *Hippocampus* 2011; 21(4): 386–397.
- 31 Broicher T, Wettshureck N, Munsch T, Coulon P, Meuth SG, Pape HC. Muscarinic ACh receptor-mediated control of thalamic activity via G_q/G₁₁-family G-proteins. *Eur J Physiol* 2008; 456(6): 1049–1060.
- 32 Cobb SR, Davies CH. Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* 2005; 562(1): 81–88.
- 33 Lawrence JJ, Statland JM, Grinspan ZM, Mcbain CJ. Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *J Physiol* 2006; 570(3): 595–610.
- 34 Atzori M, Kanold PO, Pineda JC, Flores-Hernandez J, Paz RD. Dopamine prevents muscarinic-induced decrease of glutamate release in the auditory cortex. *Neuroscience* 2005; 134(4): 1153–1165.
- 35 Marchi M, Bocchieri P, Garbarino L, Raiteri M. Muscarinic inhibition of endogenous glutamate release from rat hippocampus synaptosomes. *Neurosci Lett* 1989; 96(2): 229–234.
- 36 Li J (李建红), Wang S, Li X. Development of study on NMDA receptor with auditory plasticity and learning memory. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg (临床耳鼻咽喉头颈外科杂志)* 2012; 26(13): 618–623 (in Chinese with English abstract).
- 37 Gao E, Suga N. Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: role of the corticofugal system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14): 8081–8086.
- 38 Ji W, Suga N, Gao E. Effects of agonists and antagonists of NMDA and ACh receptors on plasticity of bat auditory system elicited by fear conditioning. *J Neurophysiol* 2005; 94(2): 1199–1211.
- 39 Luo F, Liu X, Wang C, Yan J. The pedunculopontine tegmental nucleus: a second cholinergic source for frequency-specific auditory plasticity. *J Neurophysiol* 2011; 105(1): 107–116.
- 40 Zhang Y, Dyck RH, Hamilton SE, Nathanson NM, Yan J. Disrupted tonotopy of the auditory cortex in mice lacking M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Hear Res* 2005; 201(1): 145–155.
- 41 Zhang Y, Hamilton SE, Nathanson NM, Yan J. Decreased input-specific plasticity of the auditory cortex in mice lacking M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Cereb Cortex* 2006; 16(9): 1258–1265.