

# 哺乳动物视网膜中星爆网络的兴奋性和功能的发育开关 Ji-jian

Zheng,<sup>1</sup> Seunghoon Lee,<sup>1</sup> Z. Jimmy Zhou\*

<sup>1</sup>阿肯色大学医学科学生理学和生物物理学系和眼科学系, 阿肯色小石城 72205。

## 总结

双膜片钳记录和  $\text{Ca}^{2+}$ 未展开的  $\text{Ca}^{2+}$ -依赖性 ACh 和 GABA 的共释放, 以及围产期兔视网膜中星爆细胞之间存在的相互烟碱和 GABA 能突触。随着成熟, 星爆细胞之间的烟碱突触急剧减少, 而 GABA 能突触保留并从兴奋性转变为抑制性, 表明星爆网络兴奋性从早期过度兴奋性到成熟的非兴奋性状态的协调转换。我们表明, 这种转变允许星爆细胞使用它们的神经递质来实现两种完全不同的功能。在早期发育过程中, 星爆网络介导了反复激发和自发视网膜波, 这对视觉系统的发展很重要。在视觉开始后, 星爆细胞在长时间释放 GABA 和  $\text{Ca}^{2+}$ -依赖性方式并通过直接 GABA 能突触横向抑制彼此, 这对于视觉整合可能很重要, 例如运动方向的检测。

## 介绍

在开发过程中, 由于 GABA 和甘氨酸的早期兴奋作用, 许多神经网络具有高度兴奋性(Ben-Ari, 2002)。这些早期的网络经常产生自发的兴奋爆发, 这对活动依赖性神经发育很重要(Katz 和 Shatz, 1996)。随着开发的进行, GABA 和甘氨酸的电离作用从激发转变为氯化物出口剂延迟表达的抑制作用(Rivera 等人, 1999 年), 从而为网络提供稳定性, 以便成熟形式的网络处理可以在没有癫痫发作的情况下发生。

在发育中的哺乳动物视网膜中, 早期的自发激发波依赖于烟碱神经传递(Feller 等人, 1996)。有人提出, 由星爆 amacrine 细胞形成的胆碱能网络负责这种复发性视网膜激发的产生和传播(Feller 等人, 1997)。然而, 尽管星爆细胞已被证明直接参与视网膜波(Zhou, 1998), 但两个基本和令人困惑的问题仍未解决。首先, 我们不知道是什么驱使星爆细胞网络在视网膜波期间爆发, 更重要的是, 没有直接证据表明星爆细胞形成能够支持反复激发的相互兴奋网络。其次, 目前尚不清楚这种本质不稳定的网络(如果存在)如何与成熟的视觉功能兼容, 因为迄今为止在 CNS 中研究的烟碱突触总是随着网络的成熟而保持兴奋性。

星爆细胞是神经系统中唯一已知合成 ACh 和 GABA Brecha 等人的神经元, 1988 年, Kosaka 等人, 1988 年, Vaney 和 Young 1988 年。放射自显影显示它们通过释放 ACh 和 GABA。  $\text{Ca}^{2+}$ -依赖性囊泡和  $\text{Ca}^{2+}$ -独立转运体机制, 分别为 O'Malley 和 Masland 1989, O'Malley 等人, 1992 年。然而, 星爆细胞释放 ACh 和 GABA 的功能作用知之甚少, 部分原因是 ACh 和 GABA 的共释放和释放机制都没有在细胞或突触水平上进行研究。与大多数视网膜神经元不同, 它们在同一

细胞群 Wassle 和 Boycott 1991 中用树突重叠平铺视视网膜, MacNeil 等人 1999, Rockhill 等人 2000, Rockhill 等人 2002, 星爆细胞重叠多达 70 倍, 它们的树突精确地共质化形成蜂窝状网络 Tauchi and Masland 1984, Vaney 1984, Famiglietti 1985, 提出了由单个神经元群体形成的网络内大规模相互突触相互作用的有趣可能性。这样的网络不仅可以介导发育过程中自发的视网膜波, 还可以介导成熟的视觉处理过程中的重要网络计算, 特别是运动方向的检测, 因为星爆细胞被认为为方向选择性(DS)神经节细胞提供必要的抑制 Yoshida 等人 2001, Amthor 等人, 2002, Euler 等人, 2002, Fried 等人, 2002, 泰勒和瓦尼 2003。关于成熟星爆细胞的功能和 DS 机制的一个关键问题是, 在 DS 神经节细胞的突触前水平上, 特别是在星爆细胞中, 是否也存在基本的 GABA 能突触抑制。

本研究的目的是确定(1)ACh 和 GABA 是否以及如何由单个星爆细胞突触共释放, (2)发育中的星爆细胞是否形成相互兴奋的网络来介导视网膜波, (3)如果存在这样的网络, 如何在成熟视网膜中保持稳定(非瞳孔), 以及(4)在视觉处理过程中是否在星爆网络内发生 GABA 能性侧向抑制。

## 结果

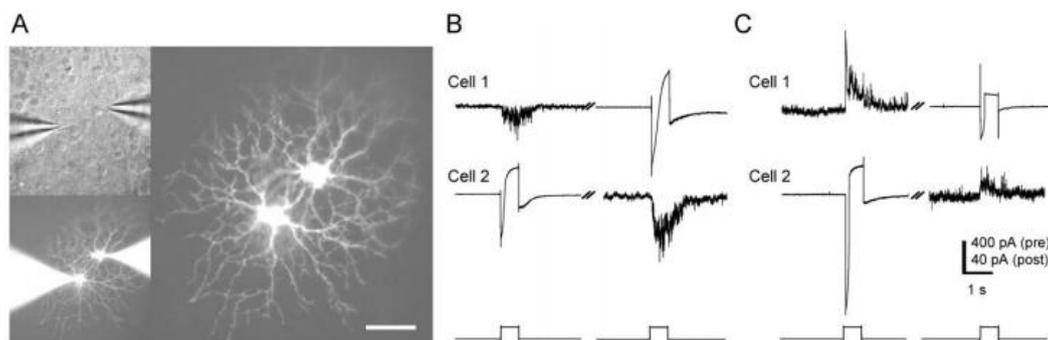


图 1 |来自 E30 视网膜中一对星爆细胞的双膜片钳记录(A)用 DIC 光学(左上)和落射荧光(左下角)观察的 Lucifer 黄色填充贴片移液器记录的一对星爆细胞的显微照片。(右)取出移液器后同一细胞对的荧光图像。比例尺, 50  $\mu\text{m}$ 。(B) 成对电压钳位记录, 显示倒数突触反应( $V_h = -70\text{mV}$ , 突触后), 由突触前去极化脉冲(从 $-70$  至  $0\text{mV}$ , 底部迹线)引起。(C)来自另一个 E30 星爆对的电压钳位记录, 显示倒数突触响应( $V_h = +45\text{mV}$ , 突触后), 由相同的突触前去极化脉冲(从 $-70$  到  $0\text{mV}$ , 底部迹线)引起。

### 星爆细胞对 ACh 和 GABA 的互斥突触共释放

双全细胞膜片钳记录由全坐骑兔视网膜神经节细胞层(GCL)中的星爆细胞对组成。最初的记录集中在围产期兔的胚胎第 29 天到出生后的第 1 天(E29-P1; 妊娠期, 31 天)。在这个年龄, 星爆细胞已经达到了独特的“星爆”形态(图 1A)。成对的电压钳记录揭示了星爆细胞( $n = 120$  对)之间的突触传输。如图 1B 所示, 将一个星爆细胞(细胞 2)从 $-70$  至  $0\text{mV}$  去极化, 在同一细胞中产生电压门控电流, 在另一个细胞中产生向内突触后电流(细胞 1, 保持在 $-70\text{mV}$ )。

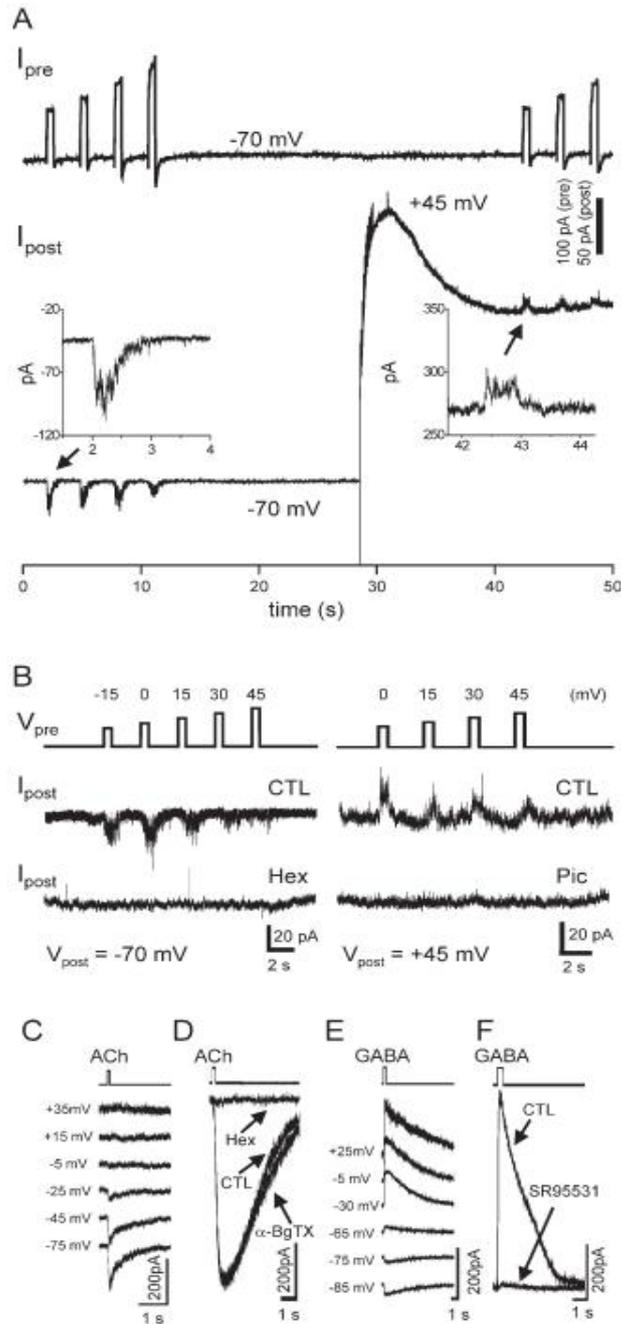


图 2 | E30 兔中星爆细胞对 ACh 和 GABA 的共释放(A) 同时记录突触前电压门控电流( $I_{pre}$ )由 600 ms 长去极化脉冲(55 mV 初始振幅, 15 mV 增量)和突触后电流( $I_{post}$ )激活(来自一对 E30 星爆细胞, 显示  $V_{pre}$  处的向内突触后电流  $h = -70$  mV 和  $V_{post}$  处的向外突触后电流  $h = +45$  mV。(插图)突触后电流的扩展视图, 用箭头标记。(B)来自两对不同星爆细胞的记录, 显示  $V_{pre}$  处突触后电流的完全阻断  $h = -70$  mV, 六甲基鎓(十六进制, 100  $\mu$ M)(左)和  $V_{post} = +45$  mV 通过皮旋毒素(Pic, 100  $\mu$ M)(右图)。(C)在 0.5 mM Cd 存在下星爆细胞对 ACh(1 mM)喷出的电流响应  $Ca^{2+}$ , 显示完全向内整流的关系。(D)ACh 诱发的电流(从另一个细胞记录的  $-70$  mV)对 Hex(100  $\mu$ M)敏感,  $\alpha$ -bungarotoxin(200 nM)不敏感。(E) 在存在 0.5 mM Cd 的情况下膨化 GABA(1 mM)  $Ca^{2+}$ 在  $\sim E$  时引发的鲁棒电流反转氯(-69 毫伏)。(F)对 GABA(来自另一个细胞, 在 +45 mV 时的反应被 SR95531(50  $\mu$ M)阻断。

突触传递通常是相互的(图 1B), 表明星爆网络内的相互突触通信。为简单起见, 我们将被诱导释放递质的细胞称为“突触前”, 而对中的另一个细胞称为“突触后”。图 1C 显示, 当突触后星爆细胞保持在+45 mV 时, 也以倒易的方式检测到强大的向外突触电流。

为了确定 ACh 和 GABA 是否由突触水平的单个星爆细胞共生, 我们首先检查了突触后反应的生物物理和药理学性质。图 2A 给出了一对 E30 星爆细胞的双电压钳位记录示例, 显示了来自同一细胞的保持电位为-70 mV 的向内突触后电流和+45 mV 的向外突触后电流。-70 mV 时向内的突触后电流(E 氯)可以被烟碱拮抗剂六甲基铵(Hex, 100 $\mu$ M, n = 5)完全阻断(图 2B), 但不受微旋毒素(Pic, 100 $\mu$ M, n = 4, 数据未显示)的影响, 这表明它们是由烟碱受体介导的。另一方面, 在+45 mV 下记录的向外突触后电流被 Pic(100  $\mu$ M, n = 3, 图 2B)或 GABA 完全阻断。一个拮抗剂 SR95531 (50  $\mu$ M, n = 3), 但不是十六进制 (100  $\mu$ M, n = 3), 表明 GABA 一个受体介导的电流。

- 确认烟碱和 GABA 均存在一个星爆细胞之间突触传递的成分, 在 0.3-1mM Cd 存在下, 我们直接在围产期视网膜的电压钳夹星爆细胞上喷出 ACh 和 GABA。它阻止了  $Ca^{2+}$ -依赖性突触传递。Puffing ACh(1 mM)唤起了强大的向内整流电流(n = 12), 这些电流可能被 Hex(100 $\mu$ M, n = 3, 图 2C 和 2D)阻挡, 但不能被 $\alpha$ -银环蛇毒素( $\alpha$ -BgTX, 200 nM, n = 2)(图 2C)阻断, 表明这些星爆细胞上存在功能性,  $\alpha$ -银环蛇毒素不敏感的烟碱受体。在星爆细胞(n = 8)上喷出 GABA(1 mM)也引发了强大的电流响应(图 2E 和 2F), 这些响应被 SR-95531(50 $\mu$ M, n = 4)或 Pic(100 $\mu$ M, n = 2)完全阻断, 并且具有接近衬里 I-V 的关系, 其反转电位接近计算的 E 氯(-70 毫伏)(图 2E 和 2F), 表明存在功能性 GABA 一个受体。综上所述, 上述结果确定, 在-70 mV 左右记录的向内突触后电流是烟碱电流, 而+45 mV 时向外突触后电流是由 GABA 介导的。一个受体。因此, 这些数据表明, 单个星爆细胞在突触水平上释放 ACh 和 GABA, 并且早期发育的星爆细胞形成了由互惠烟碱和 GABA 能突触连接的网络。

#### *由星爆细胞间烟突触通讯急剧减少引起的网络兴奋性的发育性开关*

为了确定星爆网络如何在视网膜成熟时获得视觉处理所需的稳定性, 我们通过测量星爆细胞在不同发育阶段的突触传递和功能性烟碱受体表达来检查星爆细胞之间烟突触的发育特征。值得注意的是, 我们发现星爆细胞之间的烟碱突触相互作用只能在早期发育期间检测到, 并且在出生后的第一周迅速减少。如图 3 A1-3A3 所示, 从星爆细胞对的记录中检测到烟碱(在-70 mV 时)和 GABA 一个 E 30 处的突触电流(在+45 mV 时), 但只有 GABA 在 P21 处响应。事实上, 在 P11(n = 60)之后的星爆细胞之间从未检测到烟碱突触后反应, 而 GABA 一个受体介导的突触后电流在整个发育过程中持续存在(E29-P31, n = 70)。同样, 将 ACh(1 mM)喷到星爆细胞上在 E30 处引起强大的烟碱电流, 但在 P21 处几乎没有反应(图 3C)。相反, 随着视网膜的成熟, 星爆细胞对 GABA 泡芙的反应持续存在(图 3C)。对 ACh 泡芙(1mM)的星爆反应的定量评估显示, 出生后峰值烟碱反应幅度急剧下降, 从 E29 时的平均值 1450 $\pm$ 210 pA 下降到开眼时的 97 $\pm$ 14 pA,

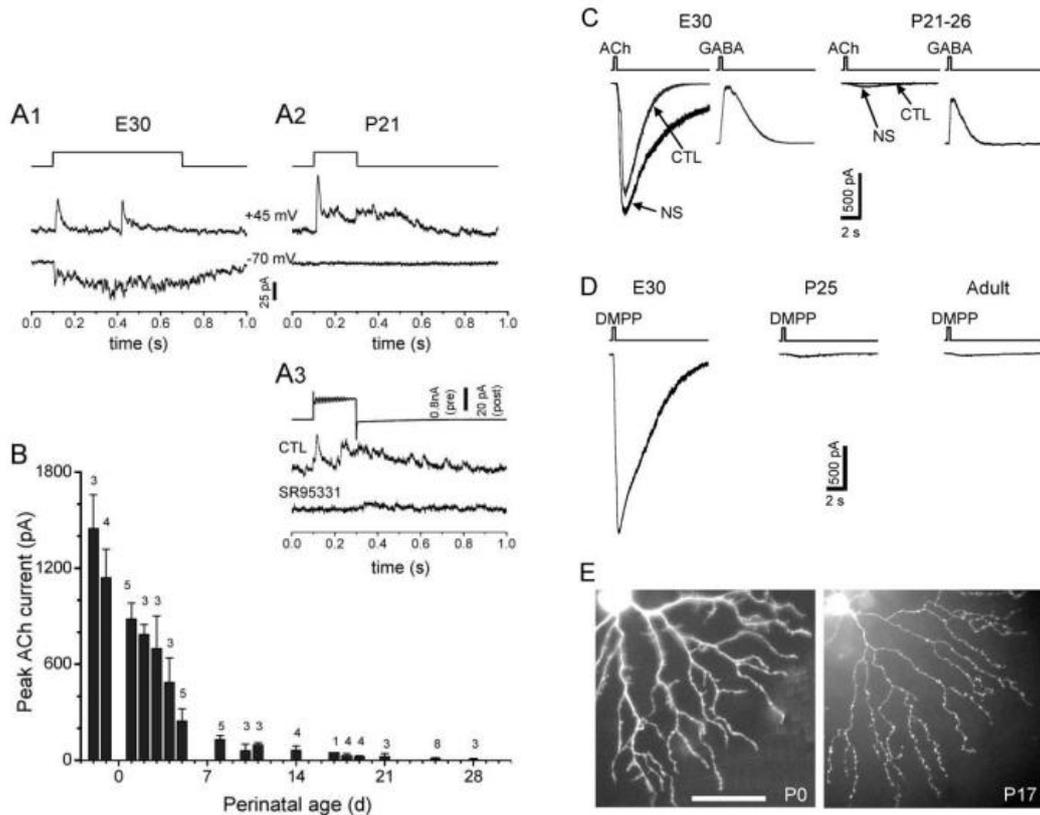


图3 | 星爆细胞兴奋性和树突结构的发育转变(A1)来自一对 E30 星爆细胞的双膜片钳记录, 向外显示两者( $V_h = +45$  mV)和向内( $V_h = -70$  mV)突触后电流响应于施加到突触前星爆细胞的电压阶跃(-70 至 0 mV, 顶部迹线)。(A2)来自一对 P21 星爆细胞的类似记录检测到突触后向外电流( $V_h = +45$  mV), 但没有向内电流( $V_h = -70$  mV)。在  $40 \mu\text{M}$  CNQX 存在下进行记录以阻断自发谷氨酸流。(A3)来自 P17 星爆对( $40 \mu\text{M}$  CNQX)的配对记录, 显示由 -70 mV 至 +10 mV (顶部迹线)的电压阶跃和 V 处的向外突触后电流引起的电压门控电流(在突触前细胞中) $V_h = +45$  mV (中间迹线), 被 GABA 完全阻挡一个-选择性拮抗剂 SR95531 ( $50 \mu\text{M}$ , 底部痕量,  $n = 5$ )。 (B)在存在 0.5-1mM Cd 时, 星爆细胞对 ACh 泡芙(1mM)的峰值电流反应的年龄依赖性下降<sup>2+</sup>.测试的细胞数量显示在直方图上方。误差线, 标准偏差。(C) 代表性的答复( $V_h = -70$  mV)的 E30 和 P26 星爆细胞在对照溶液中和新斯的明(NS,  $4 \mu\text{M}$ )存在下进行 ACh(1mM)喷浦。代表性的答复(在 V 处) $V_h$  显示 E30 和 P21 星爆细胞到 GABA(1 mM)泡芙的+ 40 mV)进行比较。控制溶液含有 1-2 mM  $\text{Cd}^{2+}$ 。(D)在存在 1 mM Cd 的情况下记录的 E30, P25 和成体星爆细胞对 DMPP 泡芙(1 mM)的代表性反应<sup>2+</sup>在 -70 mV 时。(E)P0 的树突形态(仅显示树突树的一个象限)与 P17 星爆细胞在用路西法黄色填充移液管进行全细胞膜片钳后的比较, 在 P0 处显示突出的树突状丝状体, 在 P17 处显示远端树突中有许多静脉曲张。比例尺, 50  $\mu\text{m}$ 。

并且在 P28( $n = 3$ )时几乎无法检测到( $5 \pm 5$  pA)(图 3B)。对 ACh 泡芙的反应幅度的急剧降低不能用哺乳动物视网膜中胆碱酯酶活性的发育增强来解释(Hutchins 等人, 1995 年), 因为当胆碱酯酶被新斯的明(NS,  $4 \mu\text{M}$ )抑制时, 也发现了类似

的降低,即使 NS 确实将 ACh 反应幅度从  $1140\pm 180$  pA 增加到  $1280\pm 180$ ( $n = 3$ ) 和从  $11\pm 5$  pA 增加到  $41\pm 7$ pA 在 P25 处( $n = 4$ )。同样,对不可水解烟碱激动剂 1.1-二甲基-4-苯基碘化吡啶(DMPP)(1mM)的喷出的反应幅度也从 E29 的  $2070\pm 16$  pA( $n = 3$ )急剧下降到 P26( $n = 3$ )的  $47\pm 8$  pA 和成人的  $29\pm 9$  pA( $n = 3$ , 图 3 D)。星爆细胞之间烟碱突触传递的这种显著发育下降表明程序性地消除了星爆细胞之间大量胆碱能连接的早期形式,这表明星爆网络兴奋性的重要开关。

正如引言中所描述的,为了证明 Feller 等人 1997, Feller 1999, O'Donovan 1999 的假设,即星爆系统中的反复激发介导了早期自发的视网膜波,需要回答两个关键问题。首先,星爆细胞真的会形成一个相互兴奋的网络吗?其次,是什么驱动了波浪期间的星爆细胞?通过双膜片钳记录,我们现在直接证明了围产期星爆细胞之间的倒数烟碱相互作用(图 4A1),从而证明了复发性胆碱能网络的存在。为了确定星爆细胞在波期间接收的突触输入,我们检查了早期视网膜波期间星爆细胞中突触电流的生理和药理特性。图 4A2 显示一对星爆细胞电压中的突触电流爆发,分别钳位在  $+45$  mV 和  $-70$  mV。Pic ( $100$   $\mu$ M) 完全阻断了  $+45$  mV 时的向外电流,但未影响  $-70$  mV 时的节律性向内电流(图 4A2,  $n = 6$ ) 或  $\text{Ca}^{2+}$  下的视网膜波成像( $n = 12$ , 数据未显示),表明电离子 GABA 输入虽然重要,但不是负责波的突触驱动的重要组成部分。然而,单独应用( $n = 5$ , 数据未显示)或与 Pic( $n = 3$ , 图 4A2)一起应用的 Hex( $100\mu\text{M}$ )完全可逆地阻挡了星爆细胞中的所有节律电流,表明烟碱输入与波有关。因此,在早期自发的视网膜波中,星爆网络是由星爆细胞本身之间的相互激发在突触上驱动的,而不是由外部系统驱动的。这一结果通过发现谷氨酸受体拮抗剂 CNQX( $40\mu\text{M}$ )和 AP7( $200\mu\text{M}$ ) 在波期间对星爆细胞中的突触电流(向内或向外)没有任何影响(图 4A3,  $n = 4$ ) 来证实这一结果。总之,这些数据为星爆网络内的反复激发介导早期自发视网膜波的理论提供了强有力的生理证据。

对 P4-8 星爆细胞的类似药理学分析表明,晚期视网膜波期间对星爆细胞的输入对烟碱拮抗剂不敏感(图 4B1,  $n = 4$ ),但可能被 CNQX 和 AP7 可逆阻断(图 4B2,  $n = 5$ ),与  $\text{Ca}^{2+}$ 测量的视网膜波的药理学一致现阶段的成像(Zhou 和 Zhao, 2000)。Pic( $100\mu\text{M}$ )大大增强了星爆细胞中的自发爆发(图 4B1)和  $\text{Ca}^{2+}$ 视网膜中的波(Zhou, 2001),表明 GABA 输入在这个年龄段具有抑制作用。确定何时进行 GABA 的步骤一个星爆细胞的输入从兴奋性变为抑制性,我们膨胀了 GABA 一个在 Hex( $200\mu\text{M}$ ), CNQX( $40\mu\text{M}$ )和 AP7( $100\mu\text{M}$ )存在的情况下, Fura-2AM 负载的星爆细胞上的激动剂麝香酚( $1\text{mM}$ ),这将阻断烟碱和谷氨酸受体介导的间接效应。麝香粉扑唤起了一个  $\text{Ca}^{2+}$ E29 星爆细胞上升,这种效应被  $40\mu\text{M}$  SR95531 阻断( $n = 4$ , 数据未显示)。然而,在相同条件下的麝香粉扑没有引起任何可检测到的  $\text{Ca}^{2+}$ P5 星爆细胞升高( $n = 5$ ),表明 GABA 一个星爆细胞的输入在 E29 和 P5 之间从兴奋性变为抑制性,可能是由于 KCC2 表达增加(Vu 等人, 2000)。总之,这些结果表明,星爆细胞的烟碱反应急剧下降(图 3B)与视网膜波从烟碱到谷氨酸能机制的转变具有相同的时间过程(Zhou 和 Zhao, 2000),并且还伴随着

波上强抑制性电离子 GABA 作用的出现(图 4B1)(Zhou 和 Zhao, 重要的是, 这一发现解决了一个长期存在的难题, 即为为什么烟碱相互作用不再参与晚期视网膜波。

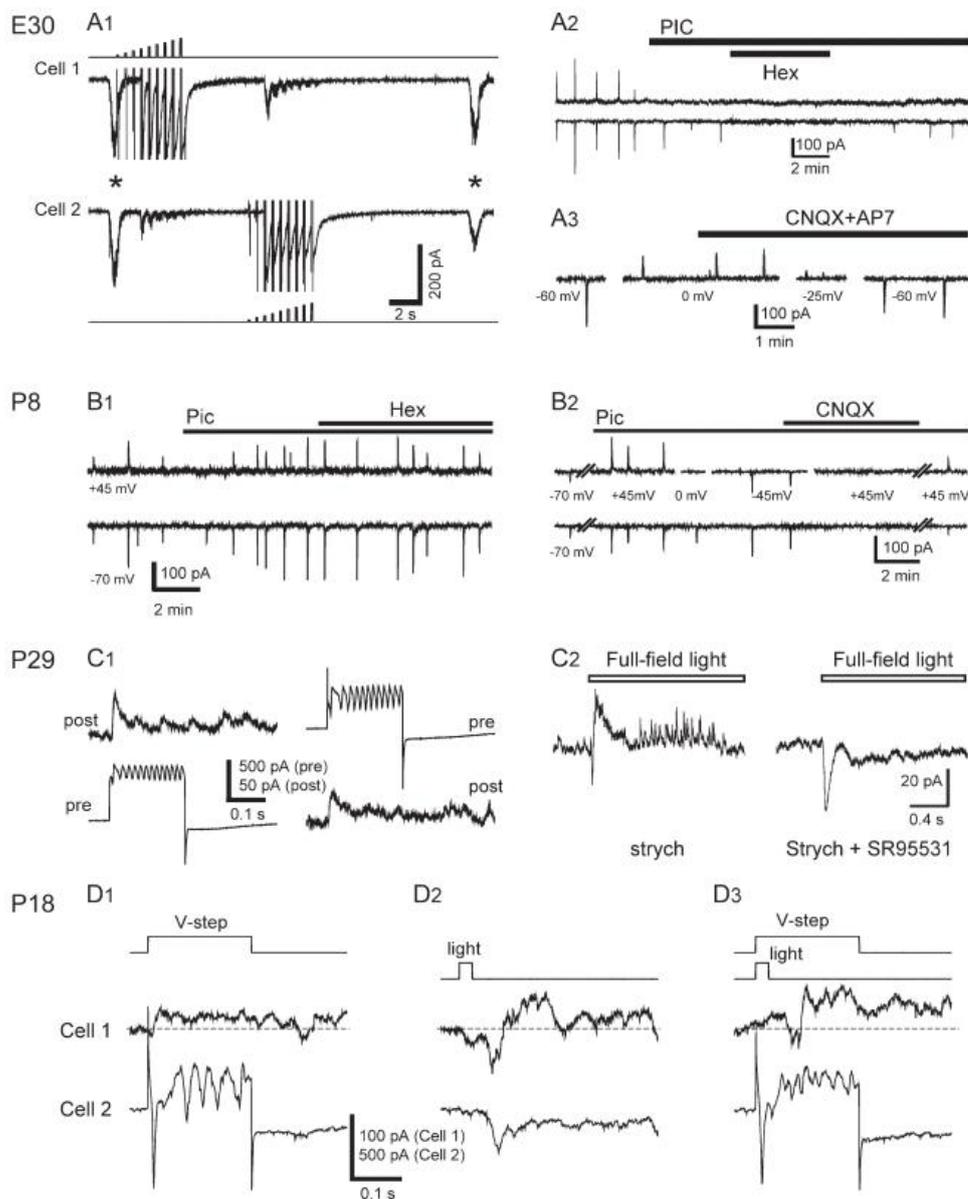


图 4 | 星爆网络功能的发展转变(A1–A3)星爆细胞之间的烟碱突触介导早期视网膜波。(A1) 视网膜波(星号)期间的自发突触输入与 E30 星爆细胞对(V)的电压脉冲(以 10 mV 为增量, 顶部和底部迹线)引起的倒数突触电流的比较  $h = -70$  mV)。(A2)一对 E30 星爆细胞中的节律性自发电流( $V_h = -70$  和  $+45$  mV)。Picrotoxin(Pic,  $100 \mu\text{M}$ )阻断了 $+45$  mV 时的向外电流, 但在 $-70$  mV 时则阻断了向内电流。添加六甲基铵(六角,  $100 \mu\text{M}$ )完全可逆地阻挡了自发电流。(A3)E30 星爆细胞的连续电压钳位记录(在四个不同电位下), 显示  $40 \mu\text{M}$  CNQX +  $200 \mu\text{M}$  AP7 的无效应。(B1 和 B2)从烟碱到视网膜波的谷氨酸能驱动过渡。(B1)来自一对 P8 星爆细胞的自发节律电流( $V_h = +45$  和  $-70$  mV), 显示 Pic ( $100 \mu\text{M}$ ) 增强电流, 缺乏十六进制 ( $100 \mu\text{M}$ ) 效应。(B2)另一个 P8 星爆细胞对中的节律电流被 Pic( $100 \mu\text{M}$ )增强, 并被 CN

QX(25 $\mu$ M)可逆阻挡。(C和D)GABA能抑制睁眼后星爆细胞光反应。(C1)往复GABA能电流( $V_h = +45$  mV)来自一对P29星爆细胞, 响应于突触前去极化(-70至0 mV)。(突触前细胞中的振荡电流对TEA和Cd敏感 $^{2+}$ , 则未显示数据。(C2)(左)对来自与(C1)(上)(V)相同的星爆细胞的全场光刺激的反应( $h = -5$  mV)在2 $\mu$ M马钱子碱存在下, 在光开始时显示出短暂的向内电流, 然后是重复的向外突触电流。(右)SR95531(50  $\mu$ M)消除了向外电流, 增加了初始向内响应分量的幅度和持续时间, 揭示了光诱发的GABA能抑制。(D1)来自星爆对的双重记录, 显示单元1(V)中向外的突触后电流( $h = -15$  mV), 响应于施加到单元2的电压脉冲(-70至0 mV, 顶部迹线)。(D2)同一星爆对中心照明(直径100 $\mu$ m, 顶部迹线)的响应。细胞2( $V_h = -70$  mV)以延迟的向内电流响应, 可能由谷氨酸介导, 而细胞1(V)的响应( $h = -15$  mV)由初始向内电流(可能是谷氨酸能)组成, 然后是向外电流, 可能由GABA和甘氨酸介导。(D3)同时对细胞2进行光刺激和步骤去极化导致细胞1的光响应向外移动, 表明细胞2对细胞1中的光响应有GABA能抑制作用。虚线表示无刺激的保持电流水平。

睁开眼睛(>P11)后, 星爆细胞被认为介导视网膜中重要的视觉处理, 特别是方向选择性;然而, 基本上对星爆细胞之间的任何生理相互作用一无所知。使用双膜片钳, 我们发现在P11-P29兔子中, 星爆细胞通过倒数GABA直接相互通信一个突触(图4C1)。在显示GABA能突触传递的40对星爆细胞(>P15)中, 发现30对具有倒数突触相互作用(预计倒数对的实际数量高于30, 因为有时 $Ca^{2+}$ 通道和其他细胞内因子可能在对中的第二个细胞进行突触释放测试之前已经耗尽)。因此, 我们相信大多数成熟的星爆细胞都是通过GABA相互连接的。一个突触。我们还在存在2 $\mu$ M马钱子碱的情况下, 在星爆细胞中检测到光诱发的突触电流( $V_h = -5$  mV, E $^{+}$ 阳离子, 图4C2,  $n = 20$ ), 它们是向外的和SR95531敏感的, 表明GABA一个星爆细胞上的受体介导的光诱发抑制。由于星爆细胞之间存在直接的GABA能突触(图3A2, 3A3和4C1), 这种光诱发GABA能抑制的很大一部分必须来自邻近的星爆细胞, 即使其他GABA能性无乳细胞类型也可能有贡献。为了直接证明这一想法, 我们研究了单个星爆细胞(细胞2, 电压钳位为-70 mV, 图4D1-4D3)对相邻星爆细胞(细胞1, 电压钳位为-15 mV, 图4D1-4D3)的光响应的贡献。我们首先确定, 具有电压阶跃(-70至0 mV)的去极化细胞2在细胞1中产生抑制(向外)电流(图4D1)。然后, 我们使用直径为100 $\mu$ m的中心光照来刺激两个细胞, 在细胞1中唤起初始的向内兴奋电流(可能由谷氨酸介导), 然后是向外的抑制电流(图4D2)。接下来, 我们让光闪烁与电压阶跃(-70至0 mV, 仅对细胞2)同时闪光。如图4D3所示, 由于电压阶跃引起的抑制性输入从细胞2到细胞1, 细胞1的光响应向外移动。在这种记录条件下, 抑制非常有效(几乎完全抵消了细胞1中唤起的光向内电流), 因为从细胞2到细胞1的抑制输入比细胞1中唤起的光向内(兴奋性)电流更早到达(图4D3)。该实验虽然在特殊的刺激条件下进行, 以揭示其他无法检测到的电流成分, 但直接证明了单个星爆细胞对其邻近星爆细胞的光响应特性的抑制作用。这种抑制也可能在星爆细胞的静息膜电位附近产生分流电压。

星爆细胞之间的直接侧向抑制可能在方向选择性中起重要作用(见讨论)。由于 P21 兔的视网膜光响应特性与成兔的视网膜光反应性质基本相同(Masland, 1977), 因此我们在 P21-P29 星爆细胞中表征的突触生理学预计将与成体非常相似。来自 ON-OFF DS 神经节细胞的膜片钳记录还揭示了强烈的定向选择性光反应以及开眼时对 DS 神经节细胞的定向选择性 GABA 能和谷氨酸能输入(S.L.和 Z.J.Z., 未发表的数据), 表明存在功能性 DS 网络, 包括 P21 之前涉及星爆细胞的前节性 DS 抑制电路。

### *星爆细胞释放 ACh 和 GABA 的机制*

接下来, 我们研究了星爆过程中 ACh 和 GABA 的突触释放是否由  $\text{Ca}^{2+}$ -依赖性囊泡机制或  $\text{Ca}^{2+}$ -独立转运蛋白。500  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  的应用在配对记录期间完全阻止了两个突触前电压门控  $\text{Ca}^{2+}$  电流和  $\text{Ca}^{2+}$ -激活电流和突触后烟碱( $n = 3$  对, E29-P0, 图 5A1)和 GABA 一个围产期星爆细胞中的电流( $n = 3$  对, E30, 图 5A2), 表明 ACh 和 GABA 释放对  $\text{Ca}^{2+}$  的依赖性通过电压门控  $\text{Ca}^{2+}$  进入渠道。 $\text{Cd}^{2+}$ (500  $\mu\text{M}$ ) 也阻断了 GABA 一个介导的 P18-P29 兔星爆细胞之间的突触传递( $n = 3$ )(图 5B)。图 5C 显示了突触前去极化与突触后 ACh(E29)和 GABA(P21)电流之间的关系。ACh(E29-P1)和 GABA(E29-P29)释放的阈值都是可变的(在 -50 至 -20 mV 之间), 可能是由于可检测突触后电流的大小, 突触接触的数量和位置以及其他实验条件的可变性。

为了进一步证明一个  $\text{Ca}^{2+}$  单独增加, 没有突触前去极化(可能激活 GABA 转运蛋白), 足以触发星爆细胞 ACh 和 GABA 的突触释放, 我们使用闪光光解来解开  $\text{Ca}^{2+}$  来自 DM-硝基酚, 通过全细胞贴片移液器引入突触前细胞。当突触前星爆细胞电压恒定钳位在 -70 mV 时, UV 闪光(1 ms 长)在钳位在 +45 mV 的突触后星爆细胞电压中引起向外突触电流, 表明直接  $\text{Ca}^{2+}$ -从突触前星爆细胞中诱发 GABA 释放(图 6A1)。类似的紫外线闪光也诱发了 -70 mV(E)的向内突触后电流(氯), 确认  $\text{Ca}^{2+}$ -ACh 释放的依赖关系(图 6A2)。作为对照, 没有 DM-硝基酚的紫外线闪光对星爆细胞没有显示出任何影响(图 6A3)(还请注意, 围产期兔的光感受器太不成熟, 无法对光做出反应)。重要的是, 当我们重复上述  $\text{Ca}^{2+}$  时, 在存在  $\text{Cd}^{2+}$  的情况下进行未冷冻实验, 我们仍然发现突触后星爆细胞在 -70 mV 时以向内的烟突触电流和在 +45 mV( $n = 3$ )时向外的 GABA 能突触电流响应(图 6B)。因为  $\text{Cd}^{2+}$  应该已经阻止了  $\text{Ca}^{2+}$ -视网膜中所有细胞的依赖性释放, 除了装有 DM-硝基酚的突触前星爆细胞外, 这一结果清楚地表明了星爆细胞之间存在单突触神经传递, 并明确证实了上述结论的  $\text{Ca}^{2+}$ -从单个星爆细胞中依赖性 ACh 和 GABA 的共释放。

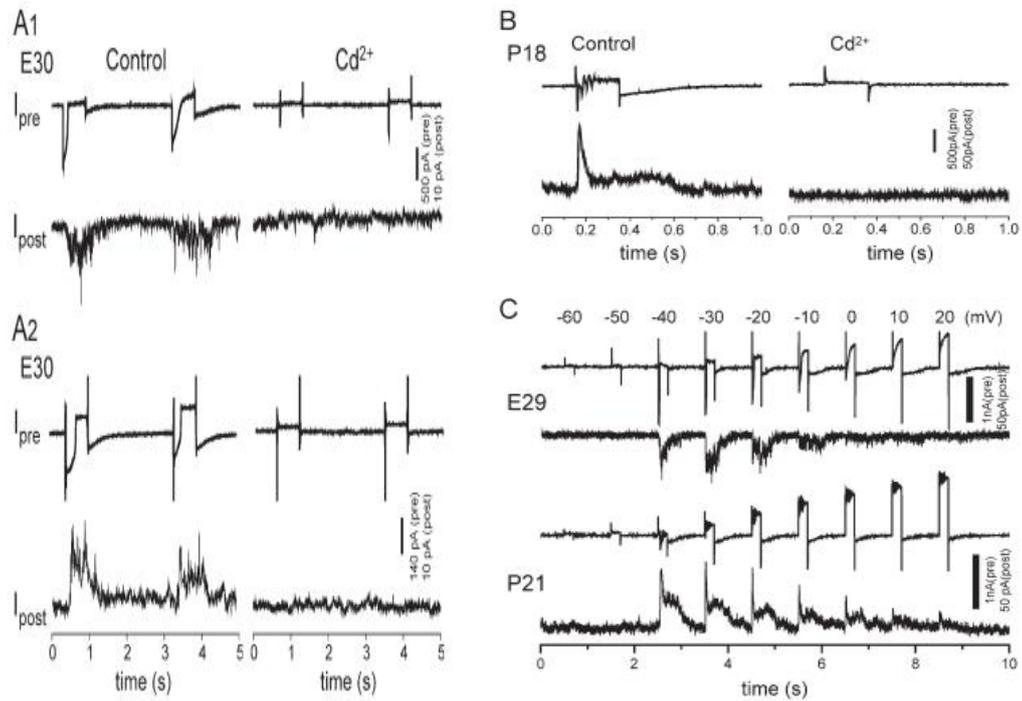


图 5 |  $\text{Ca}^{2+}$ -星爆细胞对 ACh 和 GABA 的依赖性释放(A1)来自 E30 星爆细胞对的双电压钳位记录。突触前去极化从 $-70$  到  $0$  mV(左)和从 $-70$  到  $15$  mV(右)在突触前细胞中引发一系列电压和  $\text{Ca}^{2+}$ -激活电流( $I_{\text{pre}}$ )，包括 Na 电流， $\text{Ca}^{2+}$ 电流， $\text{Ca}^{2+}$ -激活电流、小剩余 K 电流和泄漏电流。突触后星爆细胞(电压钳位在 $-70$  mV)响应向内突触电流( $I_{\text{post}}$ )。Cd $^{2+}$ ( $0.5$  mM)突触前钙阻塞和  $\text{Ca}^{2+}$ -激活电流和消除突触后电流。(A2)在与(A1)相同的条件下，来自另一个 E30 星爆细胞对的双重记录，除了突触后星爆细胞的电压钳位在 $+45$  mV，向外显示(GABA 一个)突触后电流，这些电流也被 Cd $^{2+}$ 阻挡( $0.5$  米)。(B) 来自 P18 星爆细胞对的双重记录，显示响应电压阶跃( $-70$  至  $-30$  mV)和突触后响应(V)的突触前电压激活电流(上迹线) $h = +45$  mV，更低的迹线)，在 P18 星爆细胞对中存在  $40\mu\text{M}$  CNQX。Cd $^{2+}$ ( $0.5$  mM)有效阻断突触前  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Ca}^{2+}$ -激活电流和突触后 GABA 电流。(C) 突触前电压激活电流的双重记录(测试电位显示在顶部， $V_h = -70$  mV)和突触后烟碱(上部， $V_h = -70$  mV) 和 GABA(下限， $V_h = +45$  mV)来自 P21 星爆细胞的响应，显示突触前去极化水平与突触后响应之间的对应关系。BC-SAC 共分层。a，在切向平面上，随着离 SAC 体距离的增加，SAC 树突向 IPL(中深度，红线)深入。BCs 类型的分层剖面，定义为 IPL 深度上的表面积密度。b，BC-SAC 接触面积与离 SAC 体距离的共分层预测。曲线在每个距离处都被 SAC 面积归一化，因此可以直接与图 4d 的曲线进行比较。

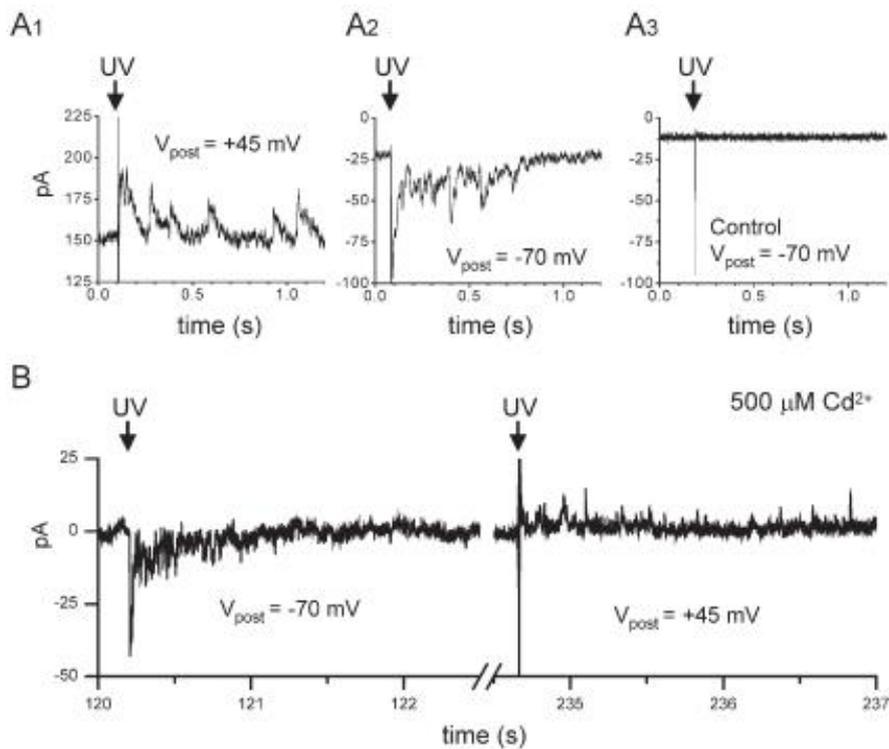


图 6 | 闪光光解和定量响应(A1)DM-硝基酚的闪光光解(持续时间为 1 ms, 用箭头表示), 将其透析到突触前星爆细胞( $V_h = -70$  mV)通过贴片移液器, 从突触后星爆细胞( $V_h = +45$  mV)在 E30 视网膜的双电压钳位下。(A2)来自另一对 E30 星爆细胞的类似记录(两个电压都钳位在  $-70$  mV), 显示紫外线诱发的向内突触后电流。(A3)相同的紫外线闪光在一对不含 DM 硝基酚的星爆细胞中未引起任何突触反应( $V_h = -70$  mV)。紫外线闪光开始时的快速尖峰是电压放电引起的刺激伪影。(B) 存在  $0.5$  mM 时的闪光光解  $\text{Cd}^{2+}$  诱发向内和向外的突触后反应(记录在突触后  $V_h$  分别为  $-70$  mV 和  $+45$  mV), 来自 E30 星爆细胞对。装有 DM 硝基酚的突触前细胞, 电压钳位在  $-70$  mV。

从突触后电流的量子性质中也明显表明了 GABA 从星爆细胞释放的水泡机制。图 7A1–7A3 显示了在 E30 星爆细胞成对记录期间由突触前电压阶跃引起的突触后 GABA 量子电流。虽然释放概率随突触前去极化水平而变化(图 7A1 和 7A2), 但突触后量子响应相似, 在  $+45$  mV 和双指数衰减阶段(时间常数  $6.3$  和  $15.3$  ms)下的平均振幅为  $25$  pA, 半衰变时间为  $11$  ms(图 7A3)。这种平均的单量子响应与自发视网膜波期间从同一细胞记录的微型突触电流(图 7A5)非常匹配(图 7A4)。同样, 量子事件也可以从  $>P21$  星爆细胞的一些成对记录中解析出来(图 7B)。然而, 在大多数情况下, 突触后反应包含大量多量子事件, 这使得详细的量子分析变得困难。

相反, 围产期星爆细胞中的烟碱突触后反应通常表现为叠加的较小事件的突发, 因此难以解析单个量子反应(图 8A)。虽然一些突触后烟碱反应在突触前电压脉冲发作后不久出现(例如, 图 2A), 但突触后烟碱反应的总体波形通常具有缓慢的上升时间(图 8A), 这类似于早期视网膜波期间自发烟碱输入星爆细胞的

波形(图 8B).星爆细胞之间烟碱突触传递的缓慢动力学似乎在很大程度上归因于突触前  $Ca^{2+}$  的动力学  $^{2+}$  入口和卡  $^{2+}$  突触前释放位点的动力学，因为突触对闪光光解的反应非常快(图 6A 和 6B)。

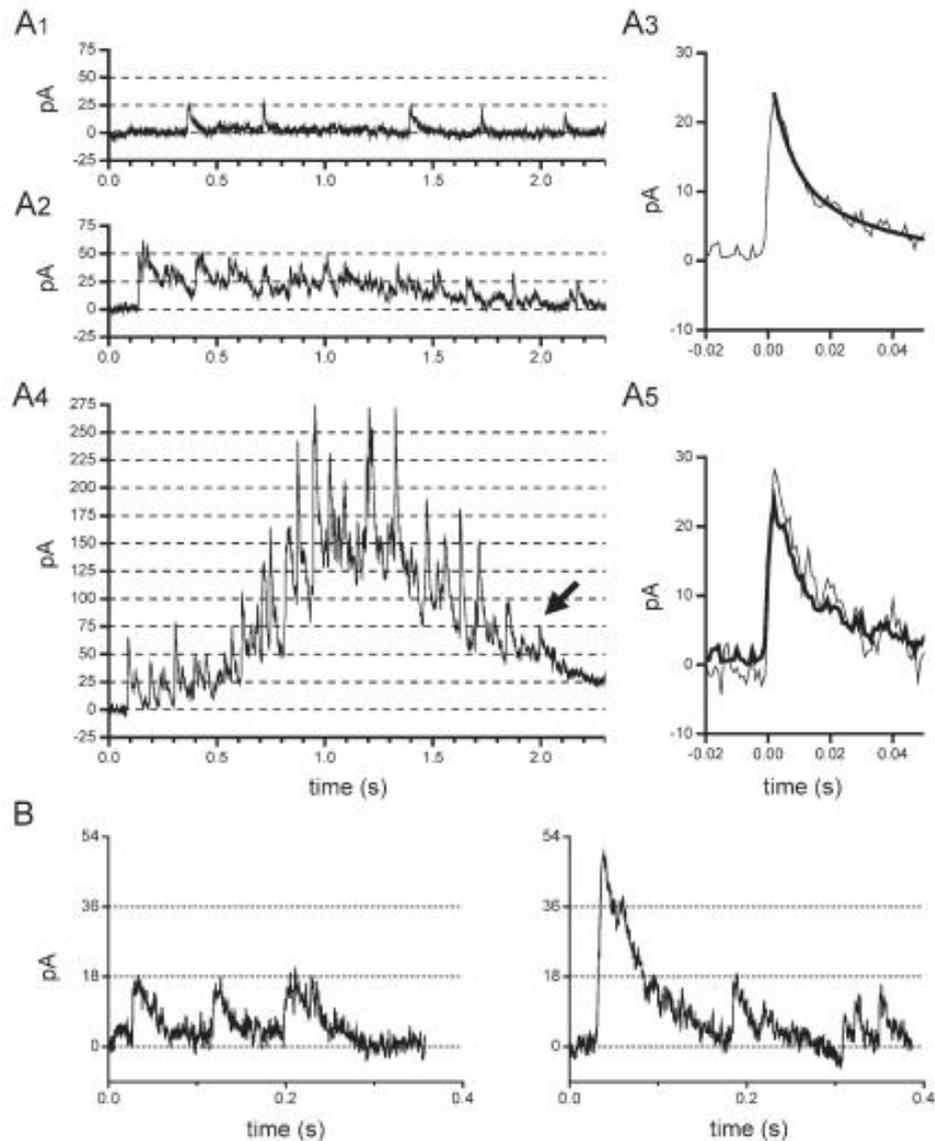


图 7 | 星爆细胞中的量子 GABA 电流(A1)来自一对 E30 星爆细胞的双电压钳位记录，显示突触后量子电流 ( $V_h = +45$  mV)，响应于  $-70$  至  $+40$  mV 的突触前电压阶跃。(A2)来自(A1)中同一细胞对的突触后电流响应于  $-70$  至  $+10$  mV 的突触前电压阶跃，显示出许多量子事件 ( $V_h = +45$  mV)和与(A1)相似的西振幅。(A3)(A1)中五个西量子事件的平均值(细线)。衰减时间过程是双指数(粗线)，时间常数为 6.3 和 15.3 ms。半衰减时间为 11 ms。(A4)自发视网膜波期间的突触电流记录自发性，来自与(A1)–(A3)(V)中相同的突触后细胞  $h = +45$  毫伏。(A5)将来自(A4)(用箭头表示)的西突触电流(细线)与(A3)中的平均量子事件(粗线)进行比较，显示出接近的匹配。(B) 突触后电流 ( $V_h = +45$  mV)，由 P29 视网膜中星爆细胞的配对记录期间从  $-70$  到  $-20$  mV(左)和从  $-70$  到  $+10$  mV(右)的突触前去极化引起的。

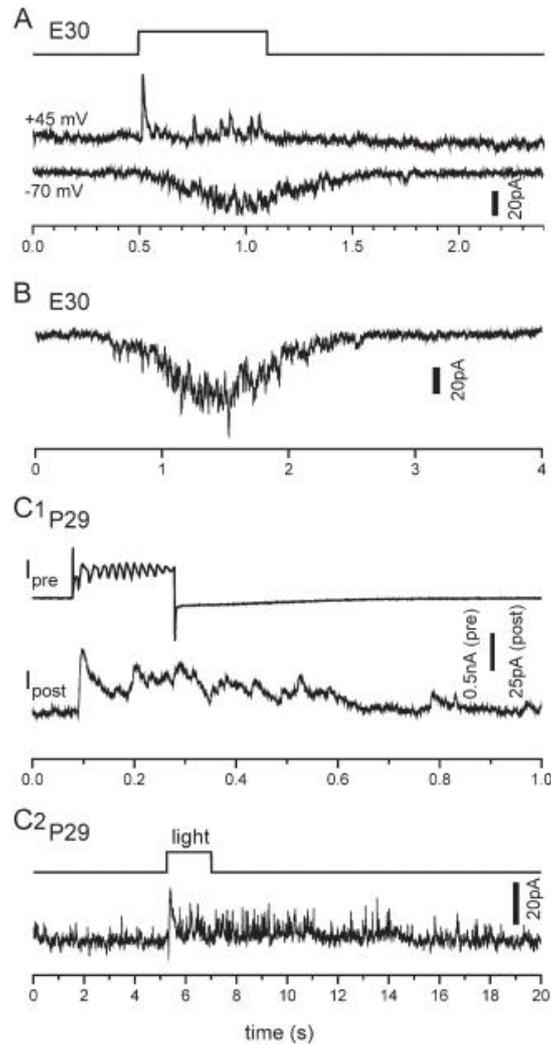


图 8 | 烟碱和 GABA 的动力学一个星爆细胞中受体介导的突触传递(A)比较突触后星爆细胞中的突触 GABA(记录在+45 mV, 中间迹线)和 ACh(记录在-70 mV, 底部迹线)电流, 以响应施加到 E30 视网膜中双膜片钳记录下的突触前星爆细胞的电压脉冲(从-70 到 0 mV, 顶部迹线)。GABA 响应由多个量子事件组成, 并且在电压阶跃开始后迅速出现, 而烟碱响应表现为更平滑的电流, 上升时间要慢得多。(B)自发突触输入到 E30 星爆细胞( $V_h = -70\text{mV}$ ), 在视网膜波中, 显示类似于(A)(底部迹线)中的烟碱突触后电流的波形。(C1)P29 星爆对的双重记录, 显示响应阶跃去极化(-70 至 -10 mV)和长时间突触后 GABA 能反应(记录在+45 mV 时)的突触前电压激活电流。(C2)与(C1)(V)中相同的突触后星爆细胞的响应  $h = 0\text{ mV}$  到全场光闪烁, 存在马钱子碱( $2\mu\text{M}$ )。重复的向外突触电流表明长时间的光诱导 GABA 能输入。

从星爆细胞中释放 GABA 的时间通常延长, 在去极化电压阶跃终止后持续长达几秒钟(图 8C1), 也许是由于  $\text{Ca}^{2+}$  延长的结果。发布站点上的高程。这种延长的 GABA 释放对于视觉处理过程中的横向抑制可能很重要, 例如, 通过提供对随后的兴奋性输入的持续抑制, 这种机制对于方向选择性至关重要 Borg-Graham 2001, Taylor 和 Vaney 2003, 特别是在对慢动作对慢动作 Oyster 等人敏感的 ON DS 神经节细胞中, 1972, Amthor 等人, 1989, 他和马斯兰 1998。为了表明星爆细胞在光刺激期间确实接收了长时间的 GABA 能抑制输入, 图 8C1 所示

的相同突触后星爆细胞保持在阳离子逆转电位(0 mV)，并在 2 $\mu$ M 马钱子碱存在下用全场光刺激。该单元中重复的向外突触电流(图 8C2)表明在闪光后 GABA 能输入延长。鉴于星爆细胞之间强烈的 GABAergic 相互作用(图 8C1)，可以想象，这种光诱发抑制输入的很大一部分直接来自其他星爆细胞，尽管其他 GABA 能性 macrine 细胞类型也可能有贡献。在视觉处理过程中星爆细胞之间突触相互作用的详细机制仍在研究中。

## 讨论

本研究产生了四项新发现。(1)我们在突触水平上证明了  $\text{Ca}^{2+}$ -从单个星爆细胞中依赖性 ACh 和 GABA 的共释放。(2)我们鉴定了一个相互兴奋的星爆细胞网络，并证明该网络中的反复激发介导了早期自发视网膜波的传播。(3)我们发现星爆细胞之间早期烟碱突触的发育性丧失伴随着从兴奋性 GABA 到抑制性 GABA 的转变。空调操作。(4)我们发现成熟星爆细胞之间存在相互 GABA 能相互作用，并检测到单个相邻星爆细胞对星爆细胞光响应的横向抑制。

### *复发性星爆网络激发在早期视网膜波中的作用*

我们的结果表明，在早期发育过程中，星爆网络通过烟碱和 GABA 能突触连接在一起，并且在早期视网膜波期间星爆细胞的基本突触输入来自星爆网络本身，而不是来自其他细胞类型。这两项发现，加上兔子视网膜中早期视网膜波严重依赖烟碱神经传递的结果(Zhou 和 Zhao, 2000)为星爆网络内的反复激发介导早期视网膜波的假设提供了强有力的证据。我们的数据表明，星爆细胞之间的相互烟碱通讯功能是放大，同步和传播星爆网络内的自发活动，尽管启动节律性自发活动的潜在机制仍有待阐明。由于大多数神经节细胞在早期视网膜波期间接受有节奏的烟碱驱动(Feller 等人, 1996)，因此从星爆细胞中释放 ACh 可能在内部丛状层(IPL)中具有空间上广泛的作用，并驱动大多数(如果不是全部)将过程发送到 IPL 的其他细胞。这似乎是可能的，因为 IPL 在这个早期阶段非常薄，并且年轻的星爆细胞有许多指向远离主要星爆分支占据的地层的丝状体(图 3E)，正如兔子(A. Ahmad 和 Z.J.Z., 未发表的数据)，雪貂(Feller 等人, 1996)和大鼠(Kim 等人, 2000)的扩散 ChAT 免疫反应性所证实的那样。ACh 也有可能扩散一段距离以作用于更远的靶细胞。

我们发现星爆细胞之间的大量烟碱相互作用是短暂的，并且在出生后的第一周迅速减少。这一结果至少部分地解释了为什么随着发育的进行，介导视网膜波电路从兔子视网膜中的烟碱系统切换到谷氨酸能系统(Zhou 和 Zhao, 2000)。伴随着星爆细胞之间烟碱突触的急剧丧失，IPL 中的电离子 GABA 能作用也从激发转变为抑制。在晚期自发波期间的 GABA 能抑制被认为在兔子(Syed 等人, 2004) 和(Sernagor 等人, 2003) 的波的减弱和最终消失中起作用。

### *星爆网络兴奋性的发展*

在睁眼前星爆细胞上 nAChR 的急剧损失表明, 星爆细胞之间相互烟碱激发的早期形式可能对视觉功能有害。虽然我们无法确定这些相互的兴奋性突触, 如果持续到成年期, 将如何影响成熟的网络, 但这些早期正反馈突触的拆除似乎有可能在星爆网络兴奋性的转变中发挥重要作用。众所周知, 许多神经网络在早期发育过程中是过度兴奋(癫痫), 然后随着网络的成熟而转变为稳定(非癫痫)状态。目前关于这种变换的理论主要基于 K-Cl 共转运蛋白的延迟表达(Rivera 等人, 1999 年), 这导致 GABA 和甘氨酸门控电流的反转电位的负偏移(Ben-Ari, 2002)。这个理论在几乎所有以前已知的情况下都非常有效, 因为这些早期网络中的大多数自发激发被认为是由 GABA 或甘氨酸输入驱动的。然而, 发育中的哺乳动物视网膜中的早期自发波是不寻常的, 因为它是由 ACh 通过互惠烟碱突触网络介导的, 如本研究所示。内在不稳定的烟碱网络如何在发育过程中改变其兴奋性? 似乎有两种概念解决方案: (1)内在的烟碱不稳定性是允许的, 并且可以通过成熟视网膜中的星爆和其他非玛克林细胞中的 GABA 能和甘氨酸能抑制来抑制;(2)这种不稳定性对视力有害, 应在开发过程中消除。我们的研究结果清楚地表明, 第二种解决方案是视网膜发育所采用的解决方案, 这表明成熟的视网膜回路是专门为了避免内在不稳定而设计的。因此, 在发育过程中网络兴奋性转化的一般机制可能包括 GABA 和甘氨酸兴奋性的切换以及早期正反馈突触的拆除。除了这两种情况之外, 神经递质和突触后受体表型中的发育开关也被报道了 Guidry 和 Landis 1998, Asmus 等人 2000, Joshi 和 Wang 2002, 提供了另一种调节(如果不是完全开关)网络兴奋性的方法。

### *视觉处理过程中的相互 GABA 能抑制和星爆细胞的功能*

方向选择性研究的最新进展表明, 不对称相互作用在星爆细胞水平上起着关键作用, 特别是关于离心优选的  $\text{Ca}^{2+}$  单个星爆过程对移动刺激的反应(Euler 等人, 2002)以及星爆和 DS 神经节细胞之间的不对称 GABA 能相互作用(Fried 等人, 2002)。剩下的一个关键问题是, 星爆过程中离心优选的反应是由星爆细胞固有的特性、网络(突触)相互作用还是两者的组合产生的。理论模型以前已经提出了星爆 - 星爆相互作用在 DS 机制中的突出作用(Borg-Graham, 2001), 但没有生理证据证明这种突触相互作用。尽管在电子显微镜水平上已经看到了成年星爆过程之间的突触接触 Brandon 1987, Millar 和 Morgan 1987, Mariani 和 Hersh 1988, Famiglietti 1991, Firth 等人 2003, 但这些接触的发生很少见(Famiglietti, 1991), 并且这些接触的神经化学身份仍然不清楚。我们的记录现在为成熟星爆细胞之间的直接 GABA 能突触相互作用提供了生理证据, 表明星爆细胞之间的大多数突触接触都是 GABA 能的。我们还表明, 星爆细胞在光刺激期间相互抑制。我们对  $\text{Ca}^{2+}$ -依赖性囊泡 GABA 的发现释放表明 GABA 释放位点仅限于突触囊泡定位的远端静脉曲张区, 这与远端区是星爆细胞的重要处理单元的概念一致。与先前的观点不同, 局部星爆处理单元主要向前馈给神经节细胞, 我们的数据表明, 这些处理单元也在重叠的星爆细胞之间发挥相互侧向抑制作用, 从而在 DS 神经节

细胞之前提供动态和复杂的横向相互作用。由于 DS 是一种在广泛的刺激条件下可以观察到的如此强大和基本的现象，因此可以想象 DS 响应的形成可能涉及多个级别的突触相互作用和几种协同网络机制。我们提出，星爆细胞之间的 GABA 能抑制，特别是在局部远端过程中，可能为增强星爆细胞释放 GABA 中的离心向心不对称性提供新的网络计算水平。GABA 能星爆-星爆相互作用也可能为横向抑制提供重要机制。

我们对 Ca 的发现<sup>2+</sup>星爆细胞释放 GABA 的依赖性对方向选择性机制有另一个直接影响。以前，离心优选 Ca<sup>2+</sup>星爆远端过程的反应被认为是局部膜去极化的迹象，这将触发转运蛋白介导的 GABA 释放(Euler 等人, 2002)。给定的 Ca<sup>2+</sup>本研究中发现的 GABA 释放的依赖性，首选 Ca<sup>2+</sup>对离心运动的反应(Euler 等人, 2002)现在表明不对称 GABA 释放比以前认为的要强得多，因为囊泡释放对 Ca<sup>2+</sup>的超线性依赖性(Ca<sup>2+</sup>合作)Dodge 和 Rahamimoff 1967, Sakaba 和 Neher 2001。

### *星爆细胞对 ACh 和 GABA 的重新释放*

星爆细胞是 CNS 中为数不多的已知神经元类型之一，它们共定位和释放两种快速神经递质 Jonas 等人 1998, Jo 和 Schlichter 1999, Tsen 等人, 2000。我们发现单个星爆细胞同时释放 ACh 和 GABA，将以前的自显像结果(O'Malley 和 Masland, 1989)扩展到突触水平。通过结合双膜片钳和闪光光解，我们进一步证明了发育中的星爆细胞之间的胆碱能和 GABA 能通信都是单突触的。我们对星爆细胞中 Ca<sup>2+</sup>-依赖性囊泡 GABA 释放机制的结论基于三个结果：Cd<sup>2+</sup>阻止了发布；开箱 Ca<sup>2+</sup>唤起了释放；和突触后量子电流。然而，我们的数据并不排除可能存在低水平 Ca<sup>2+</sup>。GABA 在突触外/非突触区域释放的独立成分。

由于星爆细胞在成人视网膜中释放 ACh 已经确定(Masland 和 Livingstone, 1976)，因此成熟的星爆细胞有望与其他细胞类型形成功能性烟突触。我们没有在成熟的星爆细胞之间检测到任何烟碱突触电流(即使在新斯的明存在下, n = 2)。鉴于星爆细胞对 1 mM DMPP 泡芙的反应从成人 E29 时的~ 2 nA 急剧下降到~ 30 pA，成熟星爆细胞之间缺乏可检测的突触反应似乎是意料之中的，并且与先前的成像研究一致，显示没有 Ca<sup>2+</sup>对来自成体星爆细胞的尼古丁的反应(Baldrige, 1996)。然而，由于成熟的星爆细胞仍然对 DMPP 或 ACh 的喷出(在 NS 存在的情况下)产生小的反应(图 3C 和 3D)，因此在成熟星爆细胞之间的远端过程中可能存在有限的烟碱相互作用或可能存在低水平的烟碱自身感受器的可能性。也有可能由于在薄的远端突处缺乏足够的空间钳夹，对 DMPP 扑气的远端反应在体细胞处没有完全解决。另一方面，由于我们可以在远端过程中检测对 GABA 泡芙的星爆反应，并解决谷氨酸介导的对远端过程(S.L.和 Z.J.Z., 未发表的数据)的斑点照射的反应，如前所述(Peters 和 Masland, 1996)，我们认为成年星爆细胞中烟碱受体表达的水平必须非常低。先前曾报道过成年兔视网膜 GCL 中胆碱能细胞的一个亚群(主要在中央视网膜中)对烟碱受体抗体的免疫反应性水平低(Keysner 等人, 2000 年)。这些低水平烟碱受体和小烟碱电流在成人星爆细胞中的功

能目前尚不清楚。在这里，我们推测三种可能性。首先，来自成体星爆细胞的少量烟碱反应可能表明存在从发育早期阶段遗留下来的受体。这可以解释为什么只发现一小群不一致的成年星爆细胞对烟碱抗体具有弱免疫反应(Keyser 等人, 2000)。然而，鉴于在发育过程中严格调节蛋白质表达的许多例子，这种可能性似乎不太可能。其次，星爆细胞远端树突之间可能存在有限数量的烟突触，但这些突触处的突触传递可能太小而无法在体细胞处检测到，原因是空间钳位不良或缺乏最佳刺激条件(例如，许多共筋膜星爆细胞缺乏协调激发)。这些局部烟碱突触的数量可能很少，但可能具有重要的功能，特别是对于局部信号传导(例如方向选择性)。第三，成熟的星爆细胞之间可能存在低水平的烟碱传递(突触或非突触)，但只在细胞的基础活性中产生微小的电变化，这在成对记录期间可能难以识别。这种胆碱能作用可以在调节星爆细胞的反应敏感性中发挥作用，类似于之前提出的神经节细胞(Ariel 和 Daw, 1982)。

我们的结果表明，星爆细胞对 ACh 和 GABA 的共释放具有功能意义。在发育中的视网膜中，我们现在证明星爆细胞释放的 ACh 对视网膜波的形成至关重要。根据我们最近的分类(Syed 等人, 2004)，II 期视网膜波(年龄 E24 和 P2 之间)由烟碱受体介导，III 期波(P4-P8)由谷氨酸和毒蕈碱受体周和赵 2000 介导，Syed 等人, 2004。星爆细胞释放 GABA 也为视网膜波期间的星爆和其他细胞提供重要的突触输入。阻断 GABA 受体显著增加了 III 期波的频率，强度和传播(Syed 等人, 2004)。然而，目前尚不清楚 GABA 是否在 II 期视网膜波中起重要作用。有人提出，在 II 期波期间 GABA 的释放对于视网膜内 GABA 系统的成熟可能很重要，特别是关于 K-Cl 共转运蛋白表达(E. Sernagor 等人, 2003, Soc. Neurosci., 摘要)。

在成人视网膜中，人们普遍认为，从星爆细胞中释放的 GABA 对于方向选择性至关重要(Fried 等人, 2002)。然而，成熟视网膜中胆碱能相互作用的确切机制和功能知之甚少，尽管 ACh 已被证明会影响神经节细胞的反应(Ariel 和 Daw, 1982)，包括 DS 神经节细胞 Amthor 等人, 1996, He 和 Masland 1997, Chiao 和 Masland 2002。令人费解的是，虽然星爆和 DS 细胞极大地处理共子囊肿，但迄今为止，对 DS 神经节细胞的直接胆碱能输入仍然难以捉摸(Fried 等人, 2002)。目前还不清楚 ACh 一旦发布，是否仅在其发布地点附近局部起作用，或者通过扩散在长距离内广泛起作用。因此，星爆细胞的确切突触机制和功能仍然是未来研究的一个有趣的问题。从本研究中我们可以得出的结论是，星爆细胞释放 ACh 和 GABA 的能力，加上网络兴奋性和连通性的动态发育修饰，使星爆网络在视觉发育和视觉功能中都发挥不同的功能作用。

## 实验程序

### 平顶兔视网膜中星爆细胞的双膜片钳记录

视网膜平架由新西兰白兔制成，年龄为 E29 至成年(~ 2.5 kg)，如描述(Zhou, 1998)。所有涉及使用动物的程序都是根据 NIH 指南完成的。对于膜片钳记录，

将一块视网膜放置在记录室中,并通过粘在铂环上的尼龙网将其固定在腔室底部,巩膜面朝下。记录室在 34°C-37°C 下与 Ames 培养基(Ames 和 Nesbett, 1981)连续融合(3-4ml / min)。移位的星爆细胞(具有位于 GCL 中的体细胞的星爆细胞群)根据其 8-10 $\mu$ m 的体细胞直径和与 IPL 的接近度进行记录。在用含有路西法黄的移液管进行全细胞记录后,用落射荧光在形态学上明确鉴定细胞类型。用大尖端贴片移液器或一对细镊子机械地去除覆盖神经节细胞层神经元的 Müller 细胞末端和细胞外结缔组织。使用 EPC9-2(Heka Elektronik, 德国 Lambrecht)或 Axopatch 700A(Axon Instruments, Inc., Union City, CA)放大器在固定台式荧光显微镜(BX50WI, 奥林巴斯美国, 纽约)上的 40 $\times$ 或 60 $\times$ 水浸物镜下,以全细胞配置进行膜片式记录。如前所述,液体结电位被校正(Fenwick 等人, 1982 年)。来自连续记录的数据在 2 kHz(fc), 以 10 kHz 的频率数字化,并由 Power Lab(AD Instruments, Castle Hill, Australia)存储在计算机硬盘上。使用软件 Pulse(Heka), pCLAMP 8(Axon Instruments), Chart 5(AD Instruments)和 Origin 6(MicroCal Software Inc., 北安普顿, MA)进行数据采集和分析。原始电压门控电流以无泄漏减法的数字显示。

#### 光刺激、闪光光解和 $Ca^{2+}$ 成像

在 P10-P29 兔子的光适应视网膜的全细胞膜下记录光响应。视网膜被黑暗适应 5-10 分钟,然后通过显微镜聚光镜或 75 W 氙气灯(带通滤光)通过 60 $\times$ 水浸物镜(NA = 0.9)和一系列中性密度滤光片(3%-30%透射率)从 100 W 卤素灯发出全场或点(直径 100 $\mu$ m)闪光。闪光灯的时间由 pClamp 8 软件通过 Uniblitz 快门控制(Vincent Associates, 罗切斯特, 纽约)。

闪光光解是使用氙气闪光灯(型号 JML-C2, Rapp 光电, 德国汉堡)通过石英光纤连接到显微镜的落射荧光端口来完成的。DM-硝基苯(10 mM)装载了  $Ca^{2+}$ (至 ~ 80%)在移液器溶液中(见下文)。紫外线闪光(持续时间为 1 ms)通过 40 $\times$ 水浸物镜(NA = 0.8)传递到视网膜。闪光灯的时间由脉冲软件(Heka)控制。

$Ca^{2+}$ 成像是由假定的位移星爆发细胞用冷却的 CCD 相机(Cascade, Roper Scientific, Princeton, NJ)通过 40 $\times$ 水浸透镜(NA = 0.8)进行的,在视网膜上加载 Fura-2AM 后(Zhou 和 Zhao, 2000)细胞形态在成像结束时用细胞内路西法黄色注射得到证实。

#### 解决方案

所有录音均采用 Ames 介质(饱和 95% O<sub>2</sub>/5% 一氧化碳 2),除非测试 Cd 的效果  $^{2+}$ (0.3-1 mM),在这种情况下,细胞外溶液(修饰的 Ames)含有 119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM 氯化钙 2, 20 mM HEPES, 10 mM 葡萄糖, 和 0.1 mM 抗坏血酸 (pH = 7.4), 并用 O 鼓泡 2.细胞内(移液器)溶液含有 110 mM CsMeSO<sub>4</sub>, 5 mM 氯化钠, 0.5 mM 氯化钙 2, 2 mM 氯化镁 2, 5 mM EGTA, 2 mM 腺苷 5'-三磷酸盐 (二钠盐), 0.5 m

M 鸟苷 5'-三磷酸盐 (三钠盐), 10 mM HEPES 和 2 mM 抗坏血酸 (pH 7.2, 与 CsOH), 并辅以 0.1%–0.3% (w/v) 路西法黄 (分子探针, Eugene, OR)。氯化镁 2 当补充 DM-硝基酚时, 移液器溶液中省略了 EGTA。使用 Picospritzer II(新泽西州费尔菲尔德的 General Valve)将烟碱和 GABA 能激动剂膨化到细胞中。所有其他药物(Sigma, St. Louse, MO)都通过浴灌注施用。

## 致谢

我们感谢杨清的细胞内注射;Mohsin Syed 进行科学讨论;和 Ruth Heidelberg er 讨论闪光光解。这项工作部分得到了 NIH 拨款(EY10894 to Z.J.Z.)以及来自预防失明研究以及 Pat and Willard Walker 眼科研究中心的无限制资助。

## 参考文献

- A. Ames, F.B. Nesbett In vitro retina as an experimental model of the central nervous system  
*J. Neurochem*, 37 (1981), pp. 867-877
- F.R. Amthor, E.S. Takahashi, C.W. Oyster Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields  
*J. Comp. Neurol*, 280 (1989), pp. 97-121
- F.R. Amthor, N.M. Grzywacz, D.K. Merwine Extra-receptive-field motion facilitation in on-off directionally selective ganglion cells of the rabbit retina  
*Vis. Neurosci*, 13 (1996), pp. 303-309
- F.R. Amthor, K.T. Keyser, N.A. Dmitrieva Effects of the destruction of starburst-cholinergic amacrine cells by the toxin AF64A on rabbit retinal directional selectivity  
*Vis. Neurosci*, 19 (2002), pp. 495-509
- M. Ariel, N.W. Daw Effects of cholinergic drugs on receptive field properties of rabbit retinal ganglion cells  
*J. Physiol. (Lond)*, 324 (1982), pp. 135-160
- S.E. Asmus, S. Parsons, S.C. Landis Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum  
*J. Neurosci*, 20 (2000), pp. 1495-1504
- W.H. Baldrige Optical recordings of the effects of cholinergic ligands on neurons in the ganglion cell layer of mammalian retina  
*J. Neurosci*, 16 (1996), pp. 5060-5072
- Y. Ben-Ari Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture  
*Nat. Rev. Neurosci*, 3 (2002), pp. 728-739
- L.J. Borg-Graham The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell  
*Nat. Neurosci*, 4 (2001), pp. 176-183
- C. Brandon Cholinergic neurons in the rabbit retina: dendritic branching and ultrastructural connectivity  
*Brain Res*, 426 (1987), pp. 119-130
- N. Brecha, D. Johnson, L. Peichl, H. Wässle Cholinergic amacrine cells of the rabbit retina contain glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyrate immunoreactivity  
*Proc. Natl. Acad. Sci. US A*, 85 (1988), pp. 6187-6191
- C.C. Chiao, R.H. Masland Starburst cells nondirectionally facilitate the responses of direction-selective retinal ganglion cells  
*J. Neurosci*, 22 (2002), pp. 10509-10513
- F.A. Dodge Jr., R. Rahamimoff Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction  
*J. Physiol*, 193 (1967), pp. 419-432
- T. Euler, P.B. Detwiler, W. Denk Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells  
*Nature*, 418 (2002), pp. 845-852
- E.V. Famiglietti Starburst amacrine cells: morphological constancy and systematic variation in the anisotropic field of rabbit retinal neurons  
*J. Neurosci*, 5 (1985), pp. 562-577
- E.V. Famiglietti Synaptic organization of starburst amacrine cells in rabbit retina: analysis of serial thin sections by electron microscopy and graphic reconstruction  
*J. Comp. Neurol*, 309 (1991), pp. 40-70
- M.B. Feller Spontaneous correlated activity in developing neural circuits  
*Neuron*, 22 (1999), pp. 653-656

- M.B. Feller, D.P. Wellis, D. Stellwagen, F.S. Werblin, C.J. Shatz Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves *Science*, 272 (1996), pp. 1182-1187
- M.B. Feller, D.A. Butts, H.L. Aaron, D.S. Rokhsar, C.J. Shatz Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves *Neuron*, 19 (1997), pp. 293-306
- A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine *J. Physiol. (Lond)*, 331 (1982), pp. 577-597
- S.I. Firth, W. Li, S.C. Massey, D.W. Marshak AMPA receptors mediate acetylcholine release from starburst amacrine cells in the rabbit retina *J. Comp. Neurol*, 466 (2003), pp. 80-90
- S.I. Fried, T.A. Munch, F.S. Werblin Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina *Nature*, 420 (2002), pp. 411-414
- G.L. Guidry, S.C. Landis Developmental regulation of neurotransmitters in sympathetic neurons *Adv. Pharmacol*, 42 (1998), pp. 895-898
- S. He, R.H. Masland Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells *Nature*, 389 (1997), pp. 378-382
- S. He, R.H. Masland ON direction-selective ganglion cells in the rabbit retina: dendritic morphology and pattern of fasciculation *Vis. Neurosci*, 15 (1998), pp. 369-375
- J.B. Hutchins, J.M. Bernanke, V.E. Jefferson Acetylcholinesterase in the developing ferret retina *Exp. Eye Res*, 60 (1995), pp. 113-125
- Y.H. Jo, R. Schlichter Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons *Nat. Neurosci*, 2 (1999), pp. 241-245
- P. Jonas, J. Bischofberger, J. Sandkuhler Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse *Science*, 281 (1998), pp. 419-424
- I. Joshi, L.Y. Wang Developmental profiles of glutamate receptors and synaptic transmission at a single synapse in the mouse auditory brainstem *J. Physiol*, 540 (2002), pp. 861-873
- L.C. Katz, C.J. Shatz Synaptic activity and the construction of cortical circuits *Science*, 274 (1996), pp. 1133-1138
- K.T. Keyser, M.A. MacNeil, N. Dmitrieva, F. Wang, R.H. Masland, J.M. Lindstrom Amacrine, ganglion, and displaced amacrine cells in the rabbit retina express nicotinic acetylcholine receptors *Vis. Neurosci*, 17 (2000), pp. 743-752
- I.B. Kim, E.J. Lee, M.K. Kim, D.K. Park, M.H. Chun Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the developing rat retina *J. Comp. Neurol*, 427 (2000), pp. 604-616
- T. Kosaka, M. Tauchi, J.L. Dahl Cholinergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat *Exp. Brain Res*, 70 (1988), pp. 605-617
- M.A. MacNeil, J.K. Heussy, R.F. Dacheux, E. Raviola, R.H. Masland The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species *J. Comp. Neurol*, 413 (1999), pp. 305-326

- A.P. Mariani, L.B. Hersh Synaptic organization of cholinergic amacrine cells in the rhesus monkey retina *J. Comp. Neurol*, 267 (1988), pp. 269-280
- R.H. Masland Maturation of function in the developing rabbit retina *J. Comp. Neurol*, 175 (1977), pp. 275-286
- R.H. Masland, C.J. Livingstone Effect of stimulation with light on synthesis and release of acetylcholine by an isolated mammalian retina *J. Neurophysiol*, 39 (1976), pp. 1210-1219
- T.J. Millar, I.G. Morgan Cholinergic amacrine cells in the rabbit retina synapse onto other cholinergic amacrine cells *Neurosci. Lett*, 74 (1987), pp. 281-285
- M.J. O'Donovan The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system *Curr. Opin. Neurobiol*, 9 (1999), pp. 94-104
- D.M. O'Malley, R.H. Masland Co-release of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid by a retinal neuron *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989), pp. 3414-3418
- D.M. O'Malley, J.H. Sandell, R.H. Masland Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells *J. Neurosci*, 12 (1992), pp. 1394-1408
- C.W. Oyster, E. Takahashi, H. Collewijn Direction-selective retinal ganglion cells and control of optokinetic nystagmus in the rabbit *Vision Res*, 12 (1972), pp. 183-193
- B.N. Peters, R.H. Masland Responses to light of starburst amacrine cells *J. Neurophysiol*, 75 (1996), pp. 469-480
- C. Rivera, J. Voipio, J.A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma, K. Kaila The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation *Nature*, 397 (1999), pp. 251-255
- R.L. Rockhill, T. Euler, R.H. Masland Spatial order within but not between types of retinal neurons *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000), pp. 2303-2307
- R.L. Rockhill, F.J. Daly, M.A. MacNeil, S.P. Brown, R.H. Masland The diversity of ganglion cells in a mammalian retina *J. Neurosci*, 22 (2002), pp. 3831-3843
- T. Sakaba, E. Neher Quantitative relationship between transmitter release and calcium current at the calyx of Held synapse *J. Neurosci*, 21 (2001), pp. 462-476
- E. Sernagor, C. Young, S.J. Eglén Developmental modulation of retinal wave dynamics: shedding light on the GABA saga *J. Neurosci*, 23 (2003), pp. 7621-7629
- M.M. Syed, S. Lee, J. Zheng, Z.J. Zhou Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina *J. Physiol*, 560 (2004), pp. 533-549
- M. Tauchi, R.H. Masland The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 223 (1984), pp. 101-119
- W.R. Taylor, D.I. Vaney New directions in retinal research *Trends Neurosci*, 26 (2003), pp. 379-385
- G. Tsen, B. Williams, P. Allaire, Y.D. Zhou, O. Ikonov, I. Kondova, M.H. Jacob Receptors with opposing functions are in postsynaptic microdomains under one presynaptic terminal *Nat. Neurosci*, 3 (2000), pp. 126-132
- D.I. Vaney 'Coronate' amacrine cells in the rabbit retina have the 'starburst' dendritic morphology *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 220 (1984), pp. 501-508

- D.I. Vaney, H.M. Young GABA-like immunoreactivity in cholinergic amacrine cells of the rabbit retina *Brain Res*, 438 (1988), pp. 369-373
- T.Q. Vu, J.A. Payne, D.R. Copenhagen Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina *J. Neurosci*, 20 (2000), pp. 1414-1423
- H. Wässle, B.B. Boycott Functional architecture of the mammalian retina *Physiol. Rev*, 71 (1991), pp. 447-480
- R.O. Wong, S.P. Collin Dendritic maturation of displaced putative cholinergic amacrine cells in the rabbit retina *J. Comp. Neurol*, 287 (1989), pp. 164-178
- K. Yoshida, D. Watanabe, H. Ishikane, M. Tachibana, I. Pastan, S. Nakanishi A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement *Neuron*, 30 (2001), pp. 771-780
- Z.J. Zhou Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina *J. Neurosci*, 18 (1998), pp. 4155-4165
- Z.J. Zhou A critical role of the strychnine-sensitive glycinergic system in spontaneous retinal waves of the developing rabbit *J. Neurosci*, 21 (2001), pp. 5158-5168
- Z.J. Zhou, D. Zhao Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves *J. Neurosci*, 20 (2000), pp. 6570-6577