

星爆细胞构成的瞬态网络的内在簇放电是视网膜波产生的基础

Jijian Zheng^{1,2}, Seunghoon Lee^{1,2} & Z Jimmy Zhou¹

¹阿肯色医科大学生理与生物物理系、眼科系，阿肯色 72205，美国

²这些作者对这项工作做出了同样的贡献。信件请寄至 ZJ.Z (zhoujimmy@uams.edu)。

摘要

在围产期兔子视网膜中，通过药理学分离的星爆大分泌细胞(SACs)自发产生半周期的钙刺突和持久的后超极化(AHPs)，由钙激活，循环 AMP 敏感的钾电流介导。这些 ahp，而不是神经递质的消耗(正如以前认为的那样)，产生了自发性视网膜波的不应期，并设置了波频率的上限。在一个波中，每个 SAC 接收大约 10~ 30 个相邻 SAC 的输入。这些输入同步并重塑了固有的爆发，以不同于单个 SACs 的节奏产生网络振荡。随着成熟，由于内在兴奋性降低和网络抑制增加，SACs 的半周期爆发消失。因此，视网膜波是由一个由细胞自主振荡器组成的短暂而特定的网络产生的，该网络通过相互的兴奋性连接进行同步。

介绍

视网膜波是在所有脊椎动物的视网膜发育过程中自发发生的半周期的兴奋爆发。尽管视网膜波的确切功能还有待阐明，但近年来越来越多的研究证据表明，视网膜波在建立精确的视网膜通道中起着关键作用，而且视网膜波的某些时空特性可能编码特定的发育线索 3-8。然而，尽管经过十多年的深入研究，视网膜波产生的机制在很大程度上仍是一种假说。根据从其他发育中的神经系统(例如脊髓)改编而来的流行理论，视网膜波是由早期复发的网络中的随机局部扰动引发的，该网络没有明确的起搏器电路，而电波的时空模式是由一个由网络压抑所控制的难解过程所形成的，比如由易于释放的神经递质池耗尽引起的突触压抑。这一理论(称为复发性网络理论今后)早期网络振荡在发展中视网膜不同于经典的起搏器模型 11-13 对于大多数成熟的神经系统中神经元振荡，它强调了网络波起始起源和网络为 *rhythmogenesis* 体内平衡。

视网膜波的递归网络理论主要基于三条观测线。首先，在有药物消除视网膜波的情况下，从未在发育中的视网膜中发现节律性活动，这驳斥了细胞自主起搏器的存在。第二，视网膜波的节律(B10 2 Hz; 参考 1,9)比大多数成熟神经系统的振荡频率慢得多 12,13。这反驳了基于传统 AHP 或离子通道激活或失活的难解机制；相反，它更倾向于网络的自我平衡过程，比如可释放神经递质的消耗。第三，基于网络兴奋性的发展变化，复发网络理论为视网膜波的最终消失提供了一个有吸引力的解释(见下文；然而，如果低频起搏器在发育过程中存在，为什么在成熟的视网膜中看不到，目前尚不清楚。但是，上述所有意见都只是笼统地提

出,从未经过严格的检验。因此,递归网络理论仍然是神秘的模糊,没有具体的机制来解释这些重要的概念,如局部扰动和网络稳态。

哺乳动物视网膜波的发育经历三个阶段 15,16。到目前为止,阶段 II 波的特征最好,在胚胎 24 天(E24)到出生后 3 ~ 4 天(P3 ~ 4; ref 15)。由于这些波是由尼古丁神经传递素驱动的,因此人们认为胆碱能(starburst)大汗腺细胞在 II 期波的形成中起着关键作用。在之前的研究中,我们确定 SACs 相互之间产生相互作用的烟碱突触和 GABAergic 突触,并且 SACs 网络中相互的烟碱兴奋会驱动 SACs 在视网膜波中爆炸 14。随着视网膜波从 II 期发展到 III 期, SACs 之间的尼古丁突触急剧减少, gaba 能突触从兴奋性转变为抑制性。这些结果表明,与递归网络理论相一致的是,确实存在一个由 SACs 形成的瞬态递归网络,即一旦活动启动,网络就能够介导视网膜波。然而,关于视网膜波起源的一个基本问题仍然没有答案:这个网络是如何产生视网膜波并产生波的节律的?

在这里,我们报道了兔 II 期视网膜波起源于 SACs 的细胞自主爆发,难治性过程由一个缓慢的 AHP 决定,它与网络相互作用一起产生了波的节奏。

结果

SACs 发育过程中的细胞自主活动

当在全细胞电流钳夹下记录围产期全贴壁兔视网膜时,移位的 SACs 经历了半周期的峰值簇放电和延长的 AHPs(图 1a,b)。这些爆发有两种相关类型。第一种类型,被定义为复合簇放电,由骑在兴奋性突触后电位(EPSP, 图 1a, 左图)上的尖峰组成,其波形与电压钳位下记录的 SACs 中的节律性突触电流相似(图 1c, 图 1c, 左图)。这表明,这种类型的爆发与自发性视网膜波期间的突触兴奋相吻合。来自邻近 SACs 和神经节细胞的双膜片钳记录(图 1d)也证实了 SACs 中的化合物爆发与神经节细胞中的节律性爆发密切相关。第二种类型的簇放电被定义为简单的或固有的簇放电,与第一种类型相似,除了它不包含 EPSP 成分(图 1a, 右插图)。与复合爆发相比,简单爆发之后通常会有一个更短的层次分析法,在少数情况下,只包含一些没有显著层次分析法的短峰值(图 1d, 星号)。简单脉冲通常出现在复合脉冲之后很长时间(>20 s),并且与邻近细胞的峰值不同步(图 1d),这表明它们与视网膜波无关。来自 SAC 和神经节细胞对的双膜片钳记录在 SAC 中发现了延长的 AHPs,但在测试的神经节细胞中没有(图 1d, 插图)。

为了区分 SACs 的节律性爆发是来自细胞自主活动还是网络相互作用,我们通过在生理溶液(Amesmedium; 参考 22),一种由 75 μ m 18 β -甘草次酸、100 μ m 六甲基铵、40 μ m 6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(CNQX)、200 μ m AP7 (D(-)-氨基-7-膦庚酸)、100 μ m 苦毒毒素、2 μ m 士的宁和 1 μ m 阿托品组成的拮抗剂鸡尾酒。这种鸡尾酒会阻断视网膜中常见的电突触和化学突触,包括对兔视网膜中 I 期(缝隙连接)、II 期(尼古丁受体)和 III 期(谷氨酸和毒瘤受体)视网膜波至关重要的突触 18。值得注意的是,虽然这鸡尾酒完全废除的有节奏的峰值电流钳位神经节细胞(图 1e, n=6)和有节奏的突触电流电压钳位囊(图 1c, n=25),这没有阻止节奏脉冲

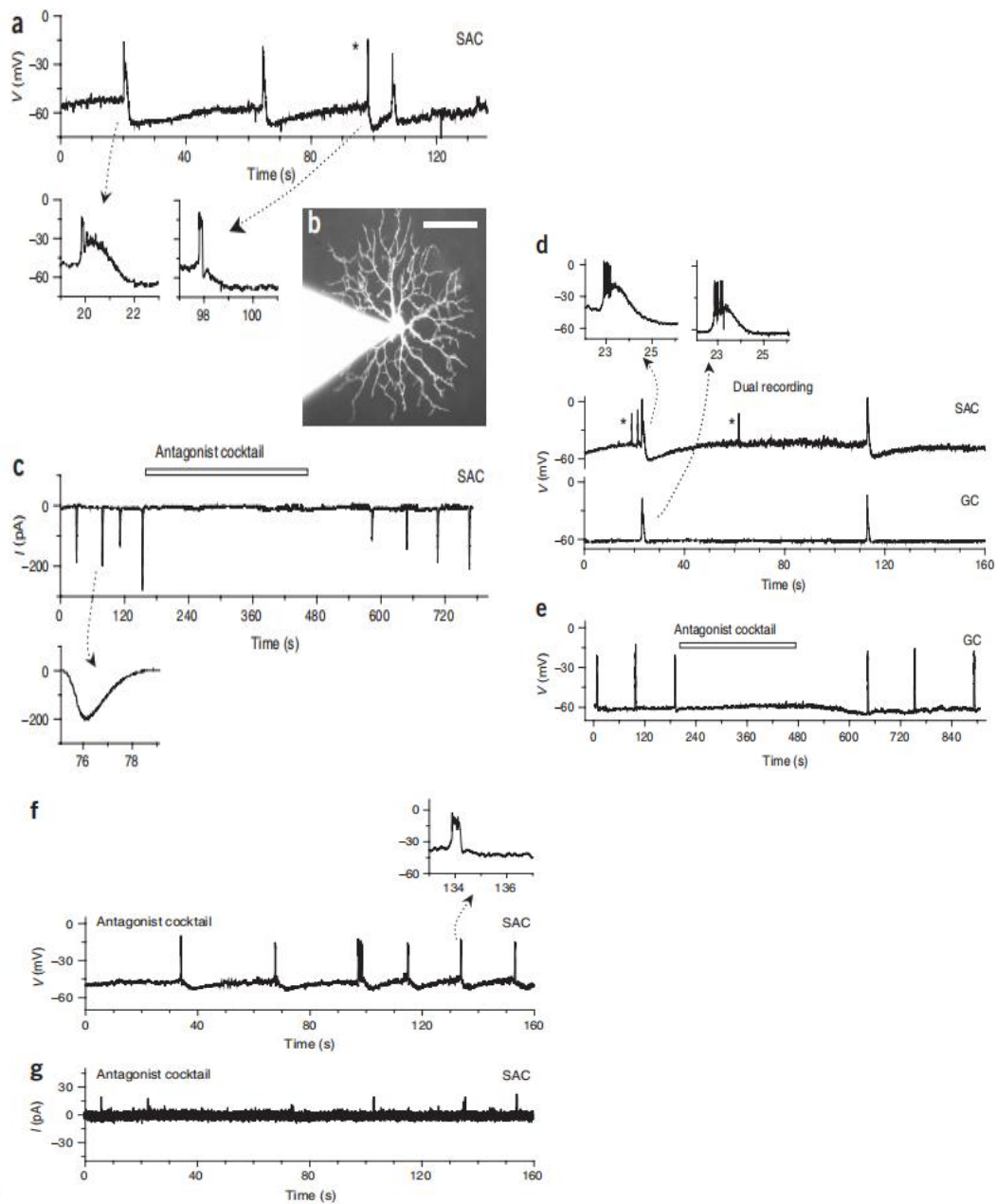


图 1: E29-P1 SACs 的细胞自主活性。(a) Ames 介质中移位 SAC 的电流钳记录($I_h=0$)显示与视网膜波相关的节律性化合物簇放电和波之间的简单簇放电(星号)。视网膜波根据 SACs 和神经节细胞(GC)记录的节律性 EPSPs 或 EPSCs 进行识别。(b)用充满硫代 hodamin 的移液管全细胞记录后移位囊膜的显微照片。(c)对电压箝位($V_h=-70$ mV) SAC 的节律性突触输入进行反向阻断的拮抗剂鸡尾酒(成分见正文)。(d)来自 SAC(上)和神经节细胞(下)的双电流钳记录,显示视网膜波期间神经节细胞的破裂峰值和 SAC 的复合破裂之间的密切相关。注意波期间囊泡和神经节细胞中都有 EPSPs 的存在;然而,明显的 AHP 只在 SAC 中发现,而不在神经节细胞中。在 SAC 的短暂刺激(星号)与神经节细胞的刺激或视网膜波无关。(e)鸡尾酒拮抗剂可逆地阻断电流钳夹($I_h=0$)神经节细胞的节律性尖峰。c 和 e 的结果表明自发性视网膜波和波相关的突触输入被阻断到 SAC。(f,g)在拮抗剂混合物存在的情况下,细胞自主节律爆发持续存在于(f)全细胞电流箝位的($I_h=0$) SAC 和(g)细胞内的、松散膜片箝位的 SAC ($V_h=0$ mV)。

或特征层次分析法在囊当前夹(图 1f,n=8)。这表明这些簇放电和 AHPs 是独立于网络交互的细胞自主活动。我们还观察到尼古丁阻滞剂六甲铵单独存在时类似的内在爆发(这足以阻断 II 期波和相关的向 SACs 的节律性突触输入 15,18 n=12)和六甲铵与苦毒素(n=10)联合使用,提示这些爆发不是由拮抗剂联合使用引起的。为了排除全细胞电流箝位记录可能无意中通过改变细胞的兴奋性而导致爆发的可能性,我们还使用细胞内松散的膜片钳记录 SACs,并观察到在存在拮抗剂混合物的情况下类似的峰值爆发(图 1g, n=5)。负载 Fura-2AM 的视网膜神经节细胞层钙成像(n=9 个视网膜,图 2a,b)显示,拮抗剂鸡尾酒阻断了相关的自发性波,但避免了 SACs 的细胞自主活动(图 2c,d)。在控制条件下,相邻 SACs 之间的关联图在滞后时间 0 s 左右出现一个尖锐的峰值,表明高水平的同步(图 2e,左)。然而,这种同步被六甲铵和苦毒酶可逆地消除(图 2e,中间和右边)。在其他 4 个视网膜上也得到了类似的结果(在线补充图 1)。

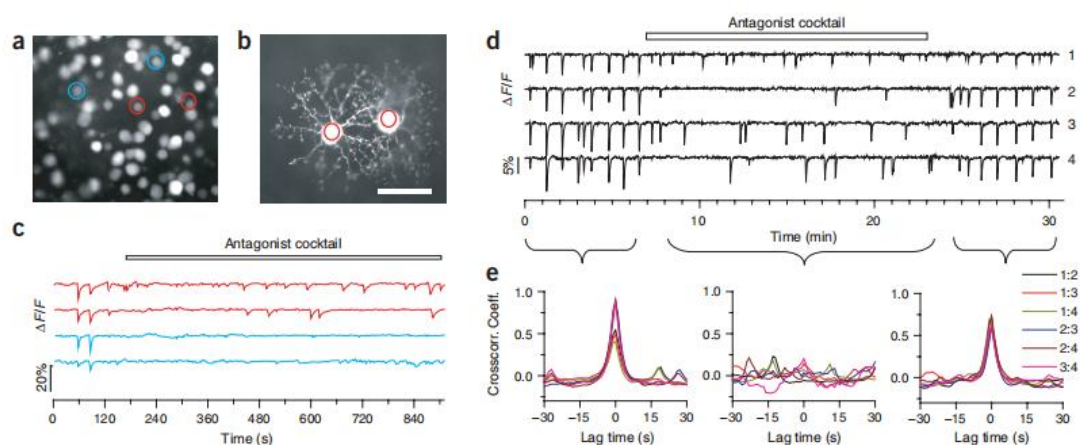


图 2: Ca^{2+} 成像下 SACs 的细胞自主活动。(a) P0 视网膜神经节细胞和移位的承载 Fura2-AM 的大腺细胞 Ca^{2+} 成像。胞体较大的细胞(例如,用蓝色圈出)可能是神经节细胞。(b) 2 个较小的细胞(a 中红色圈出)在 Ca^{2+} 显像后经 Lucifer 黄色注射鉴定为 SACs。(c) 一种鸡尾酒拮抗剂阻断了自发波(同步向下偏移)和神经节细胞的所有活动(蓝色痕迹,从 a 中的蓝色圆圈测量),但保留了 SACs 的固有活动(红色痕迹),(d) 对照、拮抗剂(100 μ m 六甲铵和 100 μ m 苦皮毒素)和冲洗条件下 P1 视网膜四个相邻 SACs(标记为 1-4)的 Ca^{2+} 成像。(e) d 中 4 个痕迹的 6 个可能的两两比较的交叉相关图的叠加,显示出在 0 秒的滞后时间附近的高水平相关性,这被拮抗剂可逆地取消。由于具有相似固有频率的异步独立振荡器仍然可能表现出一定程度的相关性,在拮抗存在的情况下,在随机延迟时间内,一些 SAC 对的互相关系数(<0.25)仍然可见小的颠簸。比例尺, 50 μ m。

在鸡尾酒拮抗剂的存在下,所有 SACs 的簇放电都变成了简单簇放电(图 1f, n=18),正如预期的那样,因为视网膜波和与波相关的节律性突触输入(EPSPs)在这种情况下被阻断了。在全细胞膜片钳条件下,鸡尾酒中簇间隔的分布(图 3a)为 15 ± 7 s(平均 \pm s.d.; n=68)。这些爆发是半周期的,两次连续爆发之间的间隔

变化范围很广, 从 <10 s 到 40 s(中位数: 13 s)。中值: 14 s, $n=26$)是通过细胞内、松散斑块记录得到的, 但簇放电间隔的变化率更大, 从 <10 s 到 80 s 不等(图 3b)。在鸡尾酒中通过全细胞或细胞内记录测量到的中间波间隔时间明显短于在 Ames 介质中测量到的中间波间隔时间(图 3c)。在我们的记录条件下, 在全细胞钳夹下检测的 SAC 中, 大约 60% (90/150)检测到半节律性簇放电, 尽管这一比例可能低估了实际具有固有簇放电的 SAC(讨论)。

SACs 内在活动的机制

SACs 中的簇放电尖峰主要是由电压门选钙(Ca^{2+})电流产生的, 因为 $0.3 \mu\text{M}$ 镉(Cd^{2+})阻断了自发节律性活动($n=8$, 数据未显示)和去极化电流步骤引起的重复尖峰(图 4a, $n=6$)。为了模拟自发波中的尖峰, 我们首先记录自发波期间电压箝位 SAC 的突触电流(类似于图 1c 插图), 然后将这些电流(以后称为波电流)注入电流箝位下的 SAC(图 4b e, 顶部)。这导致了电压响应与自发波中发现的化合物爆发非常相似, 在缓慢的去极化电位上出现重复的尖峰, 随后出现显著的 AHP(图 4b e, 底部)。河豚毒素(TTX; 1 mM)并不阻断由波电流或特征 AHP 引起的重复尖峰(图 4b), 尽管尖峰的动力学、振幅和阈值略有改变(图 4c)。 Cd^{2+} (0.3 mM, 图 4d, $n=$)阻断了这些尖刺和 AHPs, 而铯(Cs^+ ; 5 mM, 图 4e, $n=4$)没有, 显示 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 激活电流的参与, 但不涉及传统 Cs^+ 敏感的起搏器电流(IH; 参考文献 11)(在电压箝位下几乎检测不到; 图 4f)在簇放电和层次分析法的产生过程中。

当细胞保持在钾(K^+)平衡电位 E_K (-92 mV; 图 4 g)。这表明 AHP 主要是由 K^+ 电导介导的, 最可能是缓慢失活的 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电导。事实上, 笼内 Ca^{2+} (DM-硝基苯, 从膜片移液管透析到 SACs)的闪光光解引起 60mv 电压箝位下缓慢衰减的外向电流(图 4h, $n=10$)。这一电流逆转在 E_K (-92 mV, 图 4i, $n=4$), Ca^{2+} 激活, 电压独立的 K^+ 电流一致。相似的电流也被去极化脉冲诱发(图 4h, $n=15$), 并被 Cd^{2+} 阻断(数据未显示)。值得注意的是, Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流 SACs 对细胞内环 AMP (cAMP)敏感。笼内 cAMP(通过膜片移液管透析到 SACs)的闪光光解作用导致电压箝位下电流显著减少(数据未显示), 电流箝位下 AHP 快速截断(图 4j, $n=4$)。同样, 应用腺苷酸环化酶激活剂佛司可林 (1 mM)可降低 AHP 的振幅和衰减时间, 并增加自发性波的频率(图 4k, $n=4$)。佛司可林可增加视网膜波频率 23, 当单眼注射时, 可改变视网膜促生投射中的眼特异性分离 3。因此, 我们的结果(图 4)为佛司可林对视网膜自发波的重要作用提供了第一个细胞机制, 尽管佛司可林也可能通过影响参与视网膜自发波的其他细胞类型来影响视网膜自发波的动力学。

相反, Ca^{2+} 激活的 K^+ 电导(由电压脉冲激活)和缓慢的 AHP(由波或波电流诱发)在 SACs 中对蝎毒素和蜂毒明肽(分别为 50 nM 和 300 nM; $n=8$; 数据未显示)。这排除了大电导(BK)和蜂毒明肽敏感的小电导(SK) Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道的参与 24。基于其药理学, 慢动力学和敏感营地, Ca^{2+} - K^+ 电流激活囊似乎类似于缓慢的 AHP 电流(I_{SAHP})报道海马锥体神经元 25-30 虽然克霉唑(20 mM), 在培养的海

马锥体细胞 31 IsAHP 块,并没有阻止当前囊(n=6,数据未显示)。总之,我们的结果表明,药理分离的 SAC 节律性活动主要是由电压门控 Ca^{2+} 电流和缓慢的 Ca^{2+} 依赖,钳位敏感的 K^+ 电流类似于 IsAHP 介导的。 Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流的衰减在 AHP 的恢复阶段起主要作用,尽管其他电流可能对峰值和 AHP 有较小程度的贡献(见讨论)。

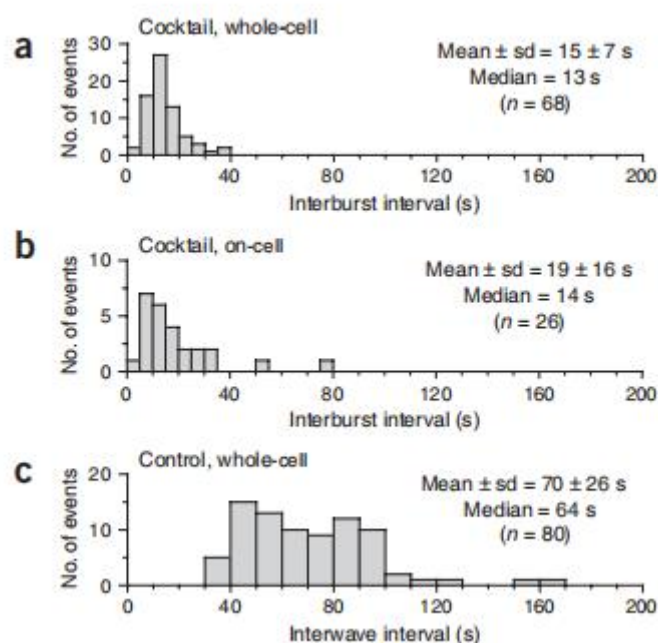


图 3: SAC 中爆发的时间特性。(a,b)在(a)全细胞膜片钳($I_h=0$)和(b)细胞松散钳夹下记录的 SAC s 存在拮抗剂鸡尾酒时的簇间隔分布。(c) Ames 介质中,全细胞膜片钳夹下 SACs 测得的自发波的间隔分布。这些波是根据在全细胞膜片钳下存在的特征性 EPSCs 或 EPSPs 来识别的。

不应期 ACh 未消耗

为了进一步了解视网膜波的节律发生机制,我们测试了一个被广泛接受的理论,即波后的难处理过程是由容易释放的神经递质消耗引起的。因为兔子 II 期视网膜波极度依赖的释放乙酰胆碱(ACh)囊(ref14)和 GABA 受体阻断器 15 不受影响,我们直接而胆碱能突触传递的功效之间囊不久之前和之后立即自发视网膜下波双膜片钳。被测试的 SAC ACh 释放(称为突触前细胞)在电流箝位(持有的正离子电流 $I_h=0$)下保持,除了在电压箝位下给予电压脉冲(-70 mV 至 -15 mV)以唤起变送器释放的短暂时刻。相邻的用于检测 ACh 释放的 SAC(称为突触后细胞)被持续保持在 -70 mV (E_{Cl}),以隔离尼古丁电流输入。我们发现,在自发波之前和之后的短时间内,突触前的电压步长会引起类似的突触后反应(图 5a, n=6),这反驳了发射机损耗理论。

为了证实上述发现,我们使用配对脉冲协议,在电流钳位下,通过两次注入波电流,模拟突触前细胞中的两个连续波,同时比较 -70 mV 电压钳位下突触后细胞的响应(图 5b)。在这种情况下,我们确实发现了成对脉冲抑制(即,通过内突触后尼古丁电流的积分测量,在第二次刺激中减少了神经传递;图 5 b)。然而,

这种配对脉冲抑制主要是由于第一次刺激激活的 IsAHP，这阻止了第二次刺激引起阈上 Ca^{2+} 尖峰(图 5b)。这不是由于可释放发射机的损耗，因为当两个脉冲的振幅足够大，在第一个和第二个脉冲中都引起超阈值簇放电时，可以消除抑制(图 5 c)。IsAHP 产生 AHP，从而使细胞远离峰值阈值；它还降低了膜输入电阻(从而降低了后续电流输入的去极化幅度)，使细胞更难产生尖峰(在线补充图 2)。除了 IsAHP 的激活，其他因素，如突触前 Ca^{2+} 通道的失活和突触后烟碱受体的脱敏，可能也有助于耐火过程的初始阶段，但这些因素似乎与延长的耐火期无关。总之，这些结果表明视网膜波的不应期主要是由 AHP 的时间进程决定的，而不是由可释放 ACh 的消耗。

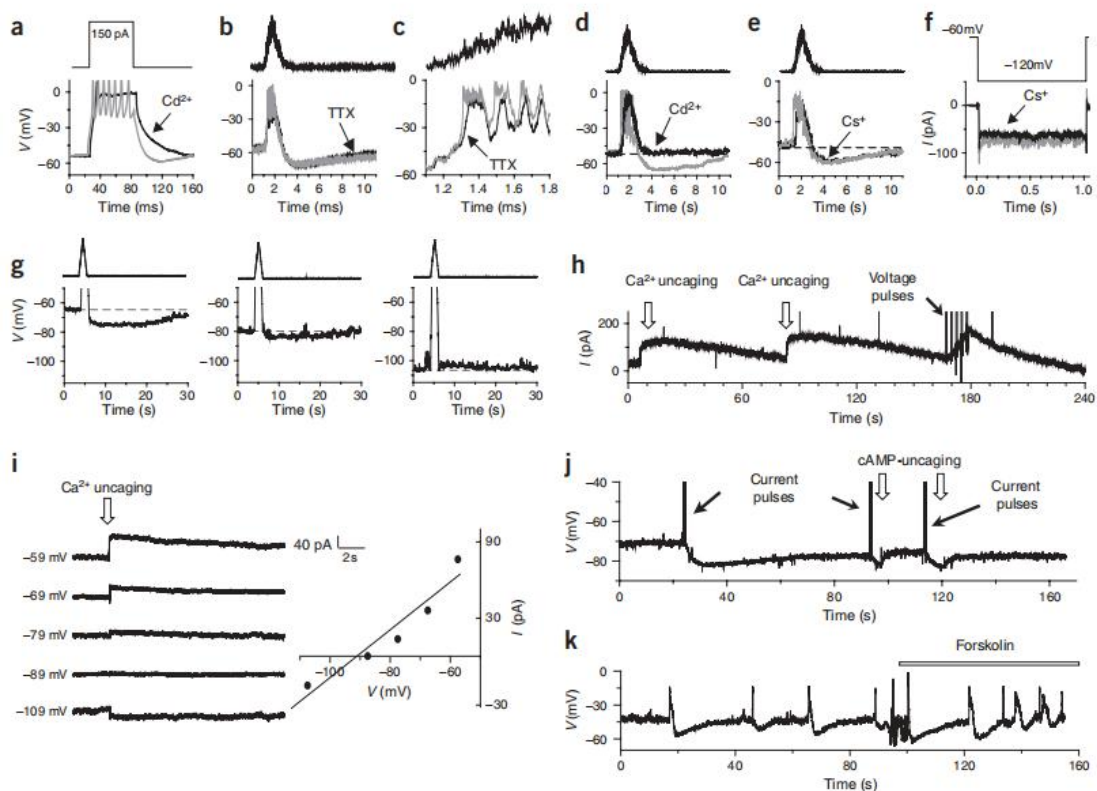


图 4: SAC 中本征爆发的离子机制。(a) 电流钳位下诱发重复 Ca^{2+} 尖峰和随后的 AHP ($I_h=0$; 灰色)。CdCl₂ (0.3 mM) 阻断了重复的刺突和 AHP，保留了初始的 Na⁺ 刺突(黑色)。(b) 在电流钳位($I_h=0$)下注入波电流(上，在自发波中预先记录为 -70 mV)，引起了类似于复合脉冲(灰色)的峰值和层次分析法。TTX 没有阻止峰值或 AHP(黑色)。(c) b 峰的放大图，TTX 降低了峰的去极化速率和振幅。(d,e) Cd²⁺ (0.3 mM, d) 而 Cs⁺ (5 mM, e) 的应用完全阻断了重复的 Ca^{2+} 尖峰和波电流诱发的特征 AHP。(f) 电压钳位下超极化未检测到 Cs⁺ 敏感的 I_h 电流。(g) AHP 的振幅(由电流梯度引起，如图所示)随保持电位变化，并在 -92 mV (E_K) 附近极性反转。(h) DM-硝基苯的闪光光解(持续时间 1 ms)在电压钳位下诱发 -60 mV Ca^{2+} 激活的外向电流，类似于电压脉冲(-60 mV ~ +5 mV)诱发的电流。(i) Ca^{2+} 解锁诱发电流的 $i-v$ 关系，在 -92 mV (E_K) 时呈现逆转电位。(j) 囚禁 cAMP 的闪光光解迅速截断了退极化电流脉冲诱发的 AHPs。(k) 佛司可林 (1 μM) 降低了电流钳位下复合物和简单簇放电 AHPs 的振幅和衰减率($I_h=0$)。

内在活动和网络活动之间的相互作用

为了确定 SAC 网络中的突触相互作用是否在视网膜波的节律发生中起作用,我们比较了在 Ames 介质中记录的 SAC 节律性爆发与在拮阻剂鸡尾酒存在的情况下记录的 SAC 节律性爆发。在没有网络交互作用的情况下(在混合过程中),内在簇放电(图 1f)之后的层次分析法的平均持续时间为 14 ± 7 s ($n=68$),这与平均簇放电间隔时间(15 ± 7 s, $n=68$, 图 3a)密切匹配,表明在这种情况下,内在层次分析法决定了簇放电间隔时间。然而,在网络相互作用完好无损的情况下(在 Ames 介质中),SACs 在每一波中都接收到大量突触输入(图 1c)。网络相互作用重塑了波期间发生的簇放电,这为簇放电增加了 EPSP 成分(图 6a),并将平均 AHP 持续时间延长到 28 ± 6 s ($n=36$)。为了确定 EPSP 是否通过增加细胞内 Ca^{2+} 来延长 AHP,我们比较了内在簇放电期间(图 6a, 左)和化合物簇放电期间(图 6a, 右)的 Ca^{2+} 内流。我们使用预先记录的固有和复合簇放电波形(图 6b, 顶部)作为电压命令,在电压钳位下激活 SACs 中的 Ca^{2+} 电流(图 6b, 中部)。我们发现,EPSP 的存在几乎使簇放电期间 Ca^{2+} 内流增加了一倍(图 6b, 底部),这一结果得到了装载 Fura-2AM 的 SACs Ca^{2+} 成像的支持(图 6c)。因此,网络相互作用增强 Ca^{2+} 进入,延长 AHP。网络对 AHP 的调控可能涉及额外的第二信使(如 cAMP)和离子通道。

复合簇放电后的平均 AHP 持续时间(28 ± 6 s, $n=36$)与自发波之间的最小间隔(30 s, 图 3c)密切匹配,表明 AHP 在很大程度上决定了波后的不应期和波频率的上限。然而,这个平均 AHP 持续时间比平均波间隔时间短(70 ± 26 s, $n=80$, 图 3c),表明 SACs 中的细胞自主爆发不能解释视网膜波节律发生的整个机制。这与我们的观察结果一致,即除了与波同步的复合爆发外,波与波之间还有异步的本征爆发(图 1a 和图 6e)。来自 SAC-SAC 和 SAC 神经节细胞对的双细胞上膜片钳和全细胞膜片钳也证实了异步内爆的存在(图 6d)。这表明,这些异步脉冲不是全细胞记录条件引起的伪影(尽管我们不能排除全细胞记录可能在一定程度上影响膜电位和 AHP 持续时间,从而改变异步脉冲频率的可能性;见讨论)。这些结果表明,并不是 SAC 的每一次簇放电都与视网膜波的起始有关,而视网膜波的产生需要内在簇放电 SAC 之间具有一定程度的同步。

接下来,我们研究了网络交互是否会影响簇放电 SACs 之间的同步。两个连续波之间的本征爆发的数量在不同的波和不同的视网膜之间变化(图 6e,f)。用低浓度六甲铵(10 mM)减少 SACs 之间的反复相互作用显著降低了波的频率,增加了波之间的异步本征爆发的数量(图 6g),表明网络相互作用增加了 SACs 之间的同步性。也许是通过 EPSP 使更多的细胞同时到达峰值阈值。当同步水平较高时,大多数簇放电与波(复合簇放电)相关,且波间间隔接近复合簇放电之后的 AHP 持续时间(图 6f)。相反,当网络交互完全被鸡尾酒阻断时,SACs 变得相互独立,

我们不再看到波(图 1f)。

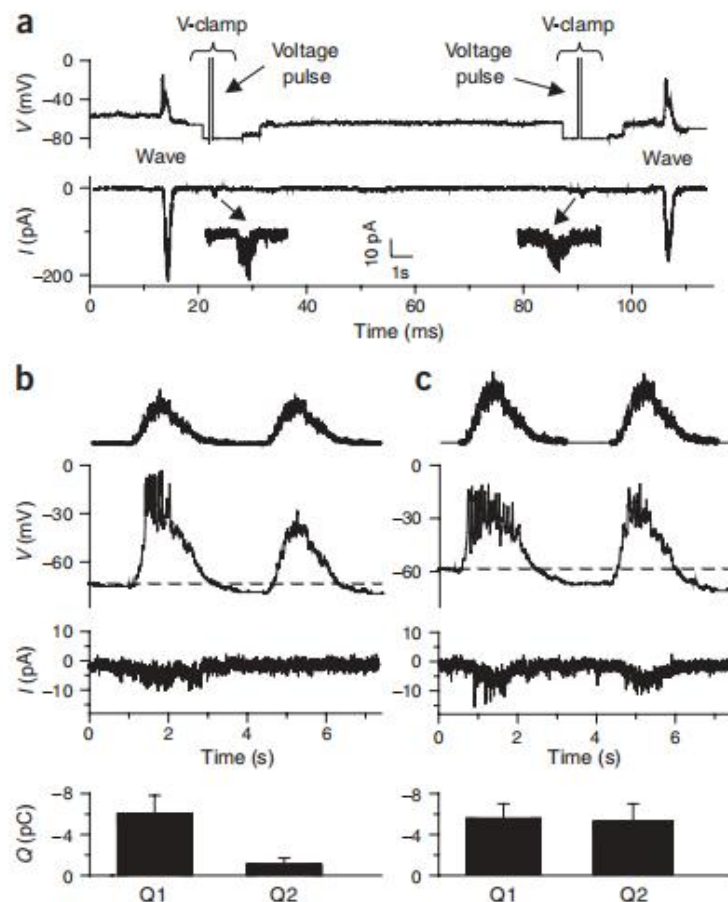


图 5: 波后难愈过程的机理。(a)来自一对 SACs 的双膜片钳, 表现出在自发波之后和前不久引起的类似突触传递。对突触前细胞进行电流箝位($I_h=0$), 除了在电压箝位下施加电压脉冲(-70 mV 至-15 mV)引起突触释放的短暂时刻外。电流箝位条件允许突触前细胞参与正常的节律性兴奋过程, 包括复合突爆发和随后的难处理过程, 然而, 电压箝位下的短电压脉冲使单元被去极化到相同的水平, 以便发射剂释放的一致比较。对突触后细胞进行-70 mV 电压箝位。(b) SACs 双膜片钳时的双脉冲波电流刺激。第一个脉冲(左上)在突触前细胞中诱发阈值上的尖峰(用 $I_h=0$ 夹闭的电流, 左中)和突触后细胞中的尼古丁电流(-70 mV 夹闭的电压, 左下)。第二个脉冲(右上)没有唤起阈上、突触前尖峰电流(右中)或突触后电流(右下)。直方图表示突触后电流的积分(来自 5 个星爆对的平均值), 显示在第二个脉冲期间突触传输减少。Q1 和 Q2 分别代表第一次和第二次刺激期间与突触后电流相关的平均电荷转移。(c)随着两个脉冲幅度的增加, 两个脉冲都可以诱发阈上峰值和突触后反应, 消除了成对脉冲的抑制(见直方图, $n=5$)。误差柱代表 s.d。

获得一个线索之间的同步程度囊在视网膜波,我们使用双膜片箝比较总烟碱输入 14(150 年 300 年峰值振幅 pA,图 6 h,左下)收到的囊在自发与烟碱突触电流波(10 15 pA 峰值振幅,图 6 h,(图 6h, 右上)接收到来自单个相邻 SAC 的信号,

该 SAC 经历了由波电流注入引起的模拟波(图 6h, 右上角)。基于线性求和的最简单假设, 我们估计一个 SAC 在一个自发波中从大约 10-30 个相邻 SAC 接收突触输入(见讨论)。事实上, 一个相邻 SAC 的 20 个这样的输入(汇集了 10 个成对的记录)产生了一个突触后电流(图 6h, 插图), 这与 SAC 在自发波中接收到的总突触输入非常相似。

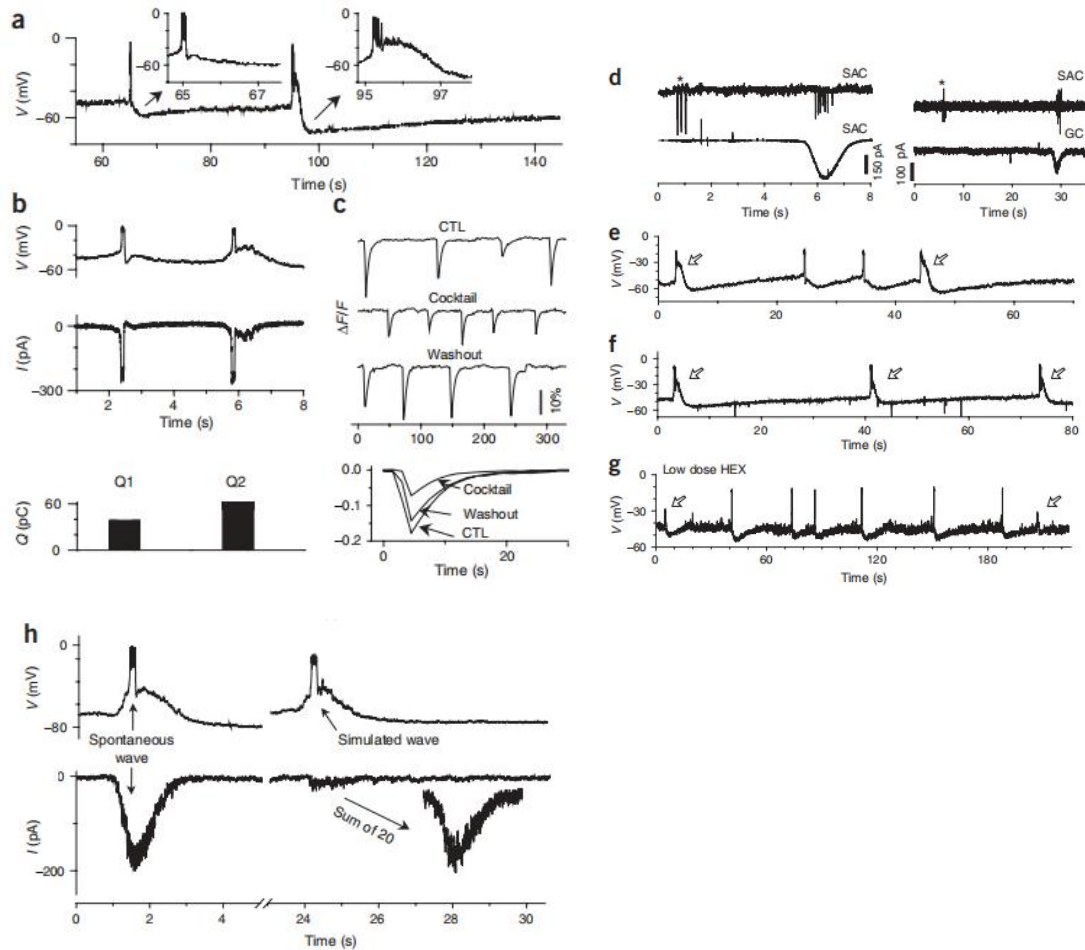


图 6: 网络对节律发生的贡献。(a)电流箴位 SAC ($I_h=0$)中的简单(左)和复合(右)簇放电波形。(b)预先记录的简单和复合簇放电波形(上)被用作电压命令, 在电压箴位 SAC 中诱导 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 激活电流(中)。净 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 激活电流是通过从对照(Ames 介质)中减去 $0.3 \text{ mM } Cd^{2+}$ 中记录的电流得到的。 Ca^{2+} 进入是通过整合内向电流来估计的(下)。(c)含有 Fura2-AM 的 SACs 的 Ca^{2+} 显像, 在鸡尾酒拮抗剂和鸡尾酒洗脱后得到控制。每个条件的平均回答(来自 5 个 SACs 的汇总)显示在底部。d, SAC(左)和 SAC 神经节细胞(右)的同步细胞内记录(上)和全细胞电压钳(下)显示与波无关的固有脉冲(星号)。(e-f)两个不同视网膜膜 SACs 的全细胞电流钳夹($I_h=0$)记录(d,f), 显示复合脉冲之间简单脉冲的数量可变(开放箭头)。(g)六甲基铵(HEX, 10 mM)减少了连续两波之间的化合物爆发的频率, 增加了简单爆发的次数(开箭头)。(h)在电流箴位(上, $I_h=0$)和电压箴位(下, $V_m=-70\text{mv}$)下, 相邻两个 SAC 同时记录。左下, 自发波期间由电压箴位的 SAC 接收突触输入。右下, 相邻 SAC(上)受到波电流刺激时接收到的突触输入。插入, 在模拟波期间 20 个突触后反应(来自 10 对录音)的总和。

囊泡内固有活性的短暂表现

为了确定 SACs 的内在活动在视网膜发育过程中是如何演变的, 我们记录了不同年龄的 SACs, 从 E29(出生前 2 天)到 P29。SACs 的本征爆发一直持续到 P4 (图 7a), 但在 P6 之后就无法检测到(图 7b, 上)。在 P4, 6 个 SACs 中有 5 个表现出特有的内在爆发。然而, 我们记录的 P6 (n=6)和更老的(n=25) SACs 中没有一个是显示这种活动。

我们发现在拮抗剂鸡尾酒的存在下, 四乙基铵(TEA; 1mM)有效地诱导了老年人(>P7) SACs 的节律性活动(图 7b, 下)。因为 TEA 可能通过阻断 K⁺通道增加了老 SACs 的兴奋性, 特别是在成熟 SACs 近端表达的 KV3 类型, 并对低浓度的 TEA 敏感(引用 32), 节律性爆发活动的丧失似乎是由 SACs 内在兴奋性的发展降低引起的。然而, 值得注意的是, 单独 TEA (1 mM)没有拮抗剂鸡尾酒不能诱导节律性活动(图 7c, 顶部); 没有 TEA, 鸡尾酒也不能单独饮用(图 7b, 上)。这表明老年视网膜中的网络相互作用(特别是>P6 SACs 之间的 GABA 能抑制; 裁判也在防止爆发中发挥了作用。

讨论

视网膜波的机制

本研究有五个主要发现: (i)囊泡可产生半周期的内爆; (ii) SACs 的 AHP 缓慢产生波后不应期; (iii)可释放 ACh 池在耐火期未耗尽; (iv)内在 SAC 振荡和网络相互作用之间的相互作用是视网膜波起始和节律发生的基础; (v) SACs 的固有峰值存在于短暂的发育时期。这些结果确定 SACs 的细胞自主活动是视网膜波激发的主要来源, 而 SACs 中的 AHP 是不应期的主要原因。综上所述, 上述发现揭示了一种机制, 即细胞自主振荡, 通过周期性兴奋网络同步, 是自发电网膜波产生的基础。这种新机制也可能为其他发育中的神经系统(如海马体)的早期网络振荡的发生提供线索。

我们的记录到目前为止还没有提供令人信服的证据, 在膜片钳下刺激单个 SAC 可以产生波。似乎一个波的起始取决于一定数量的邻近 SAC 几乎同步地达到峰值的可能性, 以及许多其他邻近 SAC 准备被吸收到一个波中。同步性的程度似乎取决于网络相互作用, 特别是 SACs 之间的相互兴奋性突触相互作用(参考文献 14)。我们发现网络交互作用至少在两个重要方面促进了节律发生。首先, 他们放大了个体 SAC 的内在爆发, 延长了 AHP。其次, 它们控制了 SAC 之间的同步性, 影响了波的起爆概率。我们估计, 基于线性求和的最简单假设, 每个 SAC 在一个自发波中从大约 10-30 个重叠的 SAC 接收突触输入。然而, 如果考虑到 SACs 之间的互反激励, 预计实际贡献 SACs 的数量会更少。因为已知 SACs 有一个非常高的重叠因子, 我们的结果表明, 重叠 SACs 总数的可变部分可能在一个波中同步。因此, 通过调节 SACs 之间相互作用的强度, 网络可以改变 SACs 内部爆发的形状和同步, 从而调节视网膜波的节奏和模式。这个网络的几个重要特征似乎与先前的视网膜波模型一致⁴⁵。波浪发生和节律发生的详细机理

有待于进一步的实验和计算研究。

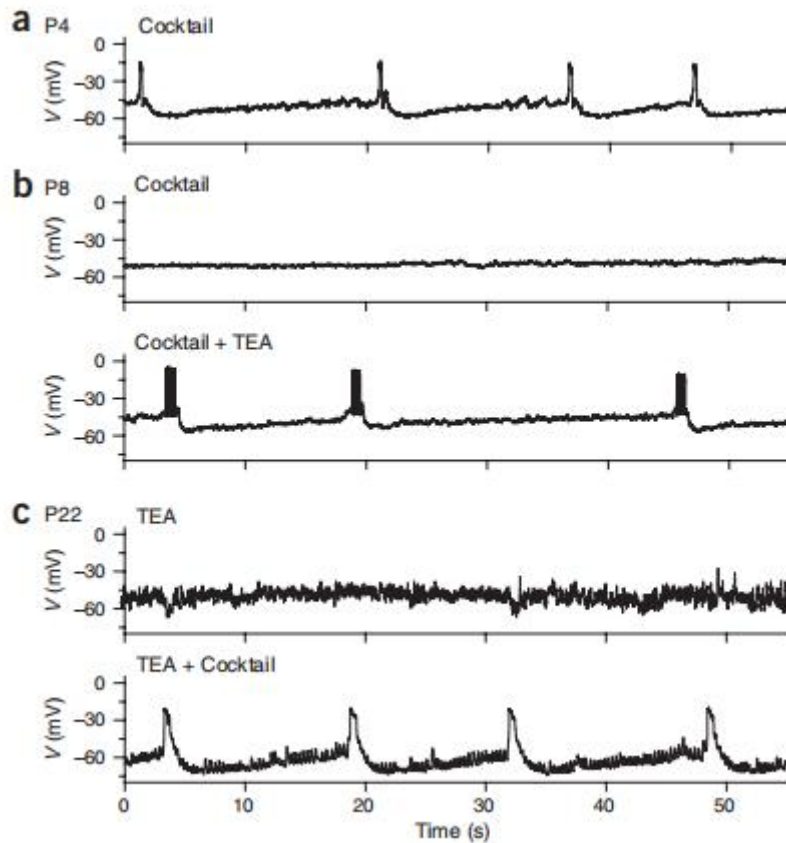


图 7: 囊泡发育中固有爆发的丧失。(a)鸡尾酒拮抗剂作用下 P4 囊膜的节律性活动。(b)鸡尾酒 P8 囊内未发现固有节律性活动。添加 1mM 的 TEA 在同一细胞中诱导了强烈的节律性活动。(c)单独 TEA (1 mM)不能诱导 P22 星爆细胞的起搏器活动,但鸡尾酒附加的突触阻滞可以诱导该细胞的节律性活动。

IsAHP 或类似 IsAHP 的电流作为 SAC 内部簇放电事件后 AHP 的基础,这一发现表明,这种电流在早期网络振荡的难解过程中发挥了关键作用。不像大多数起搏器神经元,通常依赖于起搏器电流,如 IH, T 型 Ca^{2+} 和持续的钠(Na^{2+})电流从 AHP 产生斜(反弹)去极化 11,38-40), 囊似乎很大程度上依赖 IsAHP 衰变产生的慢去极化,使细胞 AHP 的阈值(尽管它是可能的去极化,其他渠道也促成了坡道,特别是在阈值附近的膜电位峰值)。IsAHP 受多种神经递质和蛋白激酶的调节 28-30。我们的结果表明, SACs 中的 IsAHP 为视网膜波时空模式的网络调控和实验操作提供了一个重要的位点。了解 SACs 中膜电位、 Ca^{2+} 、cAMP 以及其他因素如何相互作用来调节视网膜波将是非常重要的。

在全细胞膜片钳过程中,细胞内透析也会影响 IsAHP。特别是 Ca^{2+} 螯合剂和阴离子(例如,氯离子(Cl^-)、葡萄糖酸钠和硫酸甲酯)对这一电流有矛盾的影响 41-43。因此,簇放电动力学的测量(例如, AHP 持续时间和簇放电间隔)可能会受到实验条件的影响。为了尽量减少这些影响,我们使用了含有低浓度(0.2 mM) EGTA 的移液(参见方法)。我们发现,长时间(415 分钟)的全细胞记录常常导致 S

ACs 的逐渐超极化和固有爆发消失，可能是细胞内透析的结果；这也可以解释，至少在一定程度上，为什么以前的记录没有探测到 SACs21 的内在爆发。

我们发现，在全细胞膜片钳下记录的 SACs 中，约 60%表现出自发的节律性爆发。在剩余的 SACs 中没有可检测到的爆发可能是，至少部分是由于技术原因，例如细胞内透析和细胞的健康，尽管我们不能排除只有一个 SACs 亚群具有固有节律性活动的可能性。我们还发现，在 Ca^{2+} 成像下，拮抗剂鸡尾酒中记录的 SAC 内固有 Ca^{2+} 爆发似乎比在全细胞膜片钳下记录的固有 Ca^{2+} 爆发更不规律。因此，未来的研究应该调查是什么导致了这种差异。我们的 Ca^{2+} 成像实验偶尔发现，除了 SACs，一些非星爆无分泌细胞也具有固有的爆发活动，这与从发育中的大鼠视网膜中分离的一些培养神经元(主要是非星爆 GABAergic 细胞)中固有爆发的发现一致(S.I. Firth & M.B. Feller, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45:31,2004)。然而，由于兔体内的 II 期波主要依赖于尼古丁的传递，不受 GABA 受体阻滞剂的影响 15，我们相信 E29 P4 兔体内的波来源于 SACs 的内在活动。

我们发现囊泡内固有爆发的发育丧失可能解释了为什么成熟囊泡内没有发现固有爆发活动(成熟小鼠视网膜中的囊泡收到 B3 Hz 的谷氨酸突触输入，但没有显示固有振荡活动 44)。SACs 固有活动的快速消失与视网膜的其他三个发育转变相吻合：(i)视网膜自发波从阶段 II 转换到阶段 III。15、18)；(ii) SACs 之间的互交烟碱突触的快速发育减少(参考文献 14)；(iii)兔视网膜内 gaba 能相互作用从兴奋性到抑制性的转换 14,15。因此，单个 SACs 内爆的产生与这些活动的放大、同步、传播和调节相协调，所有这些都需要经常性的星爆网络相互作用。同样，P6 后 SAC 内部爆发的消失也与 SAC 网络中反复兴奋的拆除相协调，因此相同的 SAC 可能在视觉处理中发挥不同的作用。

方法

电生理学。膜片钳记录了年龄为 E29 ~ P29 的新西兰大白兔视网膜上移位的囊泡和神经节细胞。所有涉及使用动物的程序都按照美国国立卫生研究院的指导方针进行。使用 EPC9-2 (Heka Elektronik)或 Multiclamp 700A (Axon Instruments)放大器，在 $40\times(0.8 \text{ NA})$ 或 $60\times(0.9 \text{ NA})$ 水浸镜头下，在直立显微镜(BX50 WI, Olympus)上进行全细胞和细胞上膜片钳记录。视网膜连续灌注 $34-37^\circ\text{C}$ 的 Ames 培养基($3-4 \text{ ml} / \text{min}^{-1}$)。当使用 Cd^{2+} 时，Ames Medium 中的 NaHCO_3 被 20 mM HEPES 取代。在移液管溶液中补充了用于细胞类型鉴定的硫代hodamine 101。细胞膜片钳或 Ca^{2+} 显像记录的细胞在记录结束后用细胞内注射 Lucifer-yellow 进行识别。全细胞电流钳移液管溶液包含 115 mM 的葡萄糖酸钾， 5 mM 的 KCl, 2 mM 的 MgCl_2 , 5 mM 的 NaOH, 0.2 mM 的 EGTA, 2 mM 的 5'-三磷酸腺苷(二钠盐), 0.5 mM 的 5'-三磷酸鸟苷(三钠盐), 10 mM 的 HEPES 缓冲液和 2 mM 的抗坏血酸(pH 7.2)。电压钳吸管溶液包含 110 mM CsMeSO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM NaOH, 5 mM EGTA, 2 mM 5'-三磷酸腺苷(二钠盐), 0.5 mM 5'-三磷酸鸟苷(三钠盐), 10 mM HEPES 缓冲液和 2 mM 抗坏血

酸(pH 7.2, CsOH)。用含有 Ames 介质的移液管进行细胞内、松散的补丁记录。Ca²⁺和 cAMP 开封实验的移液管溶液与全细胞电流钳实验相同，只是遗漏了 MgCl₂ 和 EGTA。将网箱 cAMP (100 mM)或 dm -硝基苯(10 mM, 载钙至 80%)直接添加到移液管溶液中。紫外光由闪光灯(JML-C2 型, Rapp 光电)产生, 并通过所述的 40 水浸透镜(0.8 NA)传送至视网膜。全细胞膜片钳数据在 2kHz (fc)进行低通滤波, 而细胞内记录数据在 0.05 Hz 至 2kHz 之间进行带通滤波。

钙成像。按照描述 18, 将分离的 E29-P1 视网膜装载 Fura-2AM (10 mM)。使用 CCD 相机(Coolsnap HQ, Roper Scientific), 在 40 个物镜(0.8 NA)下, 在 380 nm 激发和 500 nm 发射波长下对神经节细胞和被置换的大细胞进行成像。发射强度的分数变化, DF/F, 从单个细胞体中测量, 并用 MetaImaging 软件(Molecular Devices; ref 18)。用 pClamp 软件(Axon Instruments)进行相关分析。除非另有说明, 所有数据均表示平均标准差。

注: 补充信息可在自然神经科学网站上找到。

致谢

我们感谢 Q. Yang 和 T. Mon 提供了一些成像实验的帮助, 并感谢 A.Hayar 对互相关分析的讨论。这项研究得到了美国国立卫生研究院 R01EY10894 赠款(给 Z.J.Z.)、预防失明研究公司、帕特和威拉德·沃克眼科研究中心以及阿肯色大学医学科学烟草基金的不受限制的资金支持。

利益冲突声明

两位作者宣称他们没有相互竞争的经济利益。

转载和权限信息可以通过 <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions> 在线获得

参考文献

- 1 Wong, R.O. Retinal waves and visual system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 29–47 (1999).
- 2 Torborg, C.L. & Feller, M.B. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog. Neurobiol.* 76, 213–235 (2005).
- 3 Stellwagen, D. & Shatz, C.J. An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. *Neuron* 33, 357–367 (2002).
- 4 Torborg, C.L., Hansen, K.A. & Feller, M.B. High frequency, synchronized bursting drives eye-specific segregation of retinogeniculate projections. *Nat. Neurosci.* 8, 72–78 (2005).
- 5 McLaughlin, T., Torborg, C.L., Feller, M.B. & O'Leary, D.D. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron* 40, 1147–1160 (2003).
- 6 Grubb, M.S., Rossi, F.M., Changeux, J.P. & Thompson, I.D. Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 40, 1161–1172 (2003).
- 7 Chandrasekaran, A.R., Plas, D.T., Gonzalez, E. & Crair, M.C. Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. *J. Neurosci.* 25, 6929–6938 (2005).
- 8 Mrcic-Flogel, T.D. et al. Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J. Neurosci.* 25, 6921–6928 (2005).
- 9 Feller, M.B. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22, 653–656 (1999).
- 10 O'Donovan, M.J. The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 94–104 (1999).
- 11 Luthi, A. & McCormick, D.A. H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21, 9–12 (1998).
- 12 Ramirez, J.M., Tryba, A.K. & Pena, F. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 665–674 (2004).
- 13 Buzsaki, G. & Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926–1929 (2004).
- 14 Zheng, J.J., Lee, S. & Zhou, Z.J. A developmental switch in the excitability and function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron* 44, 851–864 (2004).
- 15 Syed, M.M., Lee, S., Zheng, J. & Zhou, Z.J. Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. *J. Physiol. (Lond.)* 560, 533–549 (2004).
- 16 Bansal, A. et al. Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina. *J. Neurosci.* 20, 7672–7681 (2000).
- 17 Feller, M.B., Wellis, D.P., Stellwagen, D., Werblin, F.S. & Shatz, C.J. Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* 272, 1182–1187 (1996).
- 18 Zhou, Z.J. & Zhao, D. Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves. *J. Neurosci.* 20, 6570–6577 (2000).
- 19 Wong, W.T., Myhr, K.L., Miller, E.D. & Wong, R.O. Developmental changes in the neurotransmitter regulation of correlated spontaneous retinal activity. *J. Neurosci.* 20, 351–360 (2000).

- 20 Zhou, Z.J. The function of the cholinergic system in the developing mammalian retina. *Prog. Brain Res.* 131, 599–613 (2001).
- 21 Zhou, Z.J. Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina. *J. Neurosci.* 18, 4155–4165 (1998).
- 22 Ames, A. & Nesbett, F.B. In vitro retina as an experimental model of the central nervous system. *J. Neurochem.* 37, 867–877 (1981).
- 23 Stellwagen, D., Shatz, C.J. & Feller, M.B. Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP. *Neuron* 24, 673–685 (1999).
- 24 Faber, E.S. & Sah, P. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* 9, 181–194 (2003).
- 25 Lancaster, B. & Adams, P.R. Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 55, 1268–1282 (1986).
- 26 Lancaster, B. & Nicoll, R.A. Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 389, 187–203 (1987).
- 27 Sah, P. & Clements, J.D. Photolytic manipulation of $[Ca^{2+}]_i$ reveals slow kinetics of potassium channels underlying the after hyperpolarization in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 19, 3657–3664 (1999).
- 28 Sah, P. Ca^{2+} -activated K^+ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 19, 150–154 (1996).
- 29 Sah, P. & Faber, E.S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog. Neurobiol.* 66, 345–353 (2002).
- 30 Vogalis, F., Storm, J.F. & Lancaster, B. SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3155–3166 (2003).
- 31 Shah, M.M., Miscony, Z., Javadzadeh-Tabatabaie, M., Ganellin, C.R. & Haylett, D.G. Clotrimazole analogues: effective blockers of the slow afterhyperpolarization in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *Br. J. Pharmacol.* 132, 889–898 (2001).
- 32 Ozaita, A. et al. A unique role for $Kv3$ voltage-gated potassium channels in starburst amacrine cell signaling in mouse retina. *J. Neurosci.* 24, 7335–7343 (2004).
- 33 Sipila, S.T., Huttu, K., Soltesz, I., Voipio, J. & Kaila, K. Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 5280–5289 (2005).
- 34 Tauchi, M. & Masland, R.H. The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proc. R. Soc. Lond. B* 223, 101–119 (1984).
- 35 Vaney, D.I. 'Coronate' amacrine cells in the rabbit retina have the 'starburst' dendritic morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B* 220, 501–508 (1984).
- 36 Famiglietti, E.V. Starburst amacrine cells: morphological constancy and systematic variation in the anisotropic field of rabbit retinal neurons. *J. Neurosci.* 5, 562–577 (1985).
- 37 Feller, M.B., Butts, D.A., Aaron, H.L., Rokhsar, D.S. & Shatz, J.C. Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves. *Neuron* 19, 293–306 (1997).

- 38 Jackson, A.C., Yao, G.L. & Bean, B.P. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurosci.* 24, 7985–7998 (2004).
- 39 McCormick, D.A. & Huguenard, J.R. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J. Neurophysiol.* 68, 1384–1400 (1992).
- 40 Huguenard, J.R. & McCormick, D.A. Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J. Neurophysiol.* 68, 1373–1383 (1992).
- 41 Schwandt, P.C., Spain, W.J. & Crill, W.E. Effects of intracellular calcium chelation on voltage-dependent and calcium-dependent currents in cat neocortical neurons. *Neuroscience* 47, 571–578 (1992).
- 42 Zhang, L. et al. Potentiation of a slow Ca^{2+} -dependent K^+ current by intracellular Ca^{2+} chelators in hippocampal CA1 neurons of rat brain slices. *J. Neurophysiol.* 74, 2225–2241 (1995).
- 43 Velumian, A.A. & Carlen, P.L. Differential control of three after-hyperpolarizations in rat hippocampal neurones by intracellular calcium buffering. *J. Physiol. (Lond.)* 517, 201–216 (1999).
- 44 Petit-Jacques, J., Volgyi, B., Rudy, B. & Bloomfield, S.A. Spontaneous oscillatory activity of starburst amacrine cells in the mouse retina. *J. Neurophysiol.* 94, 1770–1780 (2005).