

AII 无轴突细胞的内在簇放电是 rd1 小鼠视网膜振荡的基础

Hannah Choi,¹ Lei Zhang,² Mark S. Cembrowski,³ Carl F. Sabottke,² Alexander L. Markowitz,²
Daniel A. Butts,² William L. Kath,¹ Joshua H. Singer,² and Hermann Riecke¹

¹ 西北大学工程科学与应用数学系, 伊利诺斯州埃文斯顿

² 马里兰大学帕克学院生物系, 马里兰

³ 霍华德·休斯医学研究所, 亚农场研究校区, 阿什伯恩, 弗吉尼亚

2014 年 6 月 11 日提交; 于 2014 年 6 月 26 日以最终形式接受

摘要

在许多形式的视网膜退化中, 光感受器死亡, 但内部视网膜回路保持完整。在 rd1 小鼠中, 已建立了一种用于使视网膜疾病致盲的模型, 在 AII 无轴突和 ON 锥体双极细胞的耦合网络中自发活动会导致神经节细胞的节律性簇放电。由于此类活动可能会损害视网膜和/或皮质对恢复光感受器功能的反应, 因此了解其性质对于开发视网膜病变的治疗方法很重要。在这里, 我们分析了野生型小鼠 AII 无轴突细胞的房室模型, 以预测该细胞的内在膜特性, 特别是快速 Na 和慢速 M 型 K 电导相互作用, 当光感受器变性后, 将在光诱发的兴奋性突触输入被撤回时, 膜电位就会振荡。我们通过从 rd1 视网膜切片制备中的 AII 记录中进行实验来测试并证实了这一假设。此外, 从 rd1 视网膜的整个载片制备的神经节细胞记录表明, AIIs 中的活性可以不加改变地传播, 从而引发神经节细胞中的动作电位的簇放电。我们得出结论, 振荡不是退化的视网膜网络的新兴属性。相反, 它们主要来自单个视网膜中间神经元, 即 AII 无轴突细胞的固有特性。

AII 无轴突细胞; 簇放电; 振荡; 视网膜退化

色素性视网膜炎 (RP) 是指视网膜疾病的集合, 在这些疾病中, 光感受器死亡 (杆后是视锥细胞) (Adams 等, 2007; Hartong 等, 2006)。杆环鸟苷酸-磷酸二酯酶的 β 亚基的突变在人的 RP 和该疾病的小鼠模型中均发生 (Chang 等, 2002, 2007; Hartong 等, 2006)。rd1 小鼠是已建立的 RP 特异性模型, 通常是视网膜失明的模型 (Carter-Dawson 等, 1978; Jimenez 等, 1996)。

rd1 视网膜中的神经节细胞通过达到 10 Hz 的阶段性的突触输入来激发动作电位簇放电 (Marc 等, 2007; Margolis 等, 2008; Stasheff 2008)。由于振荡活动可能会通过诱导视觉回路的适应不良改变而抑制正常的视网膜对恢复的光感受器功能的反应, 或者可能抑制皮质对恢复的视觉输入的反应, 因此人们对阐明产生它的电路的兴趣日益浓厚。说到理解视力丧失后电路变化的重要性, 在盲人患者中恢复光反应性并不能恢复视力 (Fine et al. 2003)。

神经节细胞簇放电的突触驱动可能起源于电耦合的 AII 无轴突细胞和 ON-锥体双极 (ONCB) 细胞的网络 (Borowska 等, 2011; Trenholm 等, 2012)。

观察到 ON 和 OFF 的 α 神经节细胞的簇放电是反相关的 (Margolis et al. 2014), 正如正常视网膜中对这些细胞类型的光诱发突触激发是反相关的 (Murphy and Rieke 2006); AII 网络通过同时提供对 ON- α 细胞的间接激发和对 OFF - α 细胞的直接抑制来产生这种反相关性 (Demb and Singer 2012)。

在这里, 我们证明 rd1 视网膜的振荡是由 AII 的固有膜特性引起的。正如所建议的那样, 它们并不是具有异质内在电学特性的耦合神经网络的新兴特性 (Trenholm 等, 2012)。具体来说, 我们测试了以下假设: rd1 视网膜中的 AII 相对于其野生型对应物是超极化的, 并且这种超极化允许快速去极化的 Na 电导和慢速超极化的 M 型 K 电导之间发生相互作用, 从而产生相位簇放电, 就像在野生型视网膜中一样 (Cembrowski et al. 2012)。

AII 模型 (Cembrowski et al. 2012) 使我们能够预测 M 型 K 电流激活剂和抑制剂对视网膜切片制备中 AII 的全细胞记录过程中实验观察到的振荡的影响。在药理学上诱导的 AII 活性的改变在神经节细胞中没有发生变化, 如单个细胞的全细胞记录和群体活动的多电极阵列记录所揭示。我们得出的结论是, 我们得出结论, rd1 和野生型 AIIs 的内在特性不必不同;相反, 由依赖光的突触输入减少而产生的超极化足以揭示掩蔽簇放电。电耦合之所以相关是因为它影响 AII 的超极化。我们的发现表明, 视网膜退化的治疗可能会受益于预防 AII 的超极化。在双极性 ON 细胞中诱导光敏感性 (参见 Lagali 等, 2008) 可以实现这一点。

材料和方法

体外视网膜制剂的电子记录。从杰克逊实验室 (Barson) 获得了 C3HeJ 小鼠 (rd-1 / rd-1; RD1), 该小鼠在编码环鸟苷酸-磷酸二酯酶-亚基的 Pde6b 基因中携带突变, 并在 4 周龄时失去了外核层。在出生后 40-50 天被杀死, 当时他们的视网膜由于光感受器的丧失而对光没有反应。经马里兰大学动物保健和使用委员会批准, 在吸入异氟烷后麻醉小鼠并断头。将视网膜分离到用 95%O₂-5% CO₂ (混合氧) 混合后冷却的 (15 °C) 碳酸氢盐缓冲的 Ames 培养基 (Sigma) 中。全细胞记录是由视网膜切片中的 AII 无轴突细胞和视网膜全壁制剂中的神经节细胞制成的 (例如, Margolis 等人 2014)。

对于视网膜切片制备, 将视网膜嵌入在低熔点琼脂糖 (Sigma 型 VIIA, 3% HEPES 缓冲盐水中) 中, 并在振动切片机 (Leica) 上切割切片 (300 μ m)。将切片在室温下储存在充满碳源的 Ames 培养基中, 直至使用。对于视网膜整装准备, 将一块 2 毫米见方的视网膜组织平放, 感光器朝下, 安装在 Anodisc 滤纸上 (Whatman, Florham Park, NJ)。视网膜切片和整个支架都放置在安装在直立式视频显微镜 (Zeiss) 下方的记录室中, 以便可以用含有以下物质 (以 mM 为单位) 的移液管将感兴趣的细胞可视化并靶向全细胞记录: 95 K 葡萄糖酸盐, 15 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 8 三磷酸肌酸, 4 MgATP 和 0.4 NaGTP。对于神经节细胞, 要根据体细胞大小 (直径 18-25 μ m) 来靶向 α 细胞。接入电阻 < 25 M Ω , 且没有补偿。为了在细胞外记录神经节细胞的脉冲, 将 2 mm 正方形的视网膜组织平放, 神经节细胞侧朝下安装在 60 通道多电极阵列 (MEA; 正方形

阵列；间距为 200 μm 的 30 μm 电极）上；多渠道系统）。

在所有情况下，在记录过程中，都将组织与 Ames 培养基（34°C）进行超级融合，并在上面添加了药物。分别加入木防己苦毒素（100 μM ），士丁宁（0.5 μM ），二硝基喹啉-2,3-二酮（DNQX; 25 μM ）和 APV（50 μM ）来阻断 GABA_A 受体，甘氨酸受体，AMPA / 红藻氨酸受体和 NMDA 受体介导的电流。加入 L- (+) -2-氨基-4-磷酸基丁酸（L-AP4; 2-10 μM ）激活 ON 双极细胞上的 mGluR6 受体。加入河豚毒素（TTX; 0.5 μM ）阻止电压门控 Na 通道介导的电流，加入盐酸利诺哌啶（LP; 30 μM ）阻止 M 型 K 电流，加入氟吡汀马来酸酯（flu; 10 μM ）添加到 M 型钾电流以增强 M 型电流，将甲氯芬那酸（MFA; 100 μM ）添加到阻断间隙连接处，添加 CdCl₂（100 μM ）和 NiCl₂（50 μM ）阻止依赖电压的 Ca 电流。

使用 MultiClamp 700B 放大器进行全细胞记录，并使用 IgorPro (Wavemetrics) 控制的 ITC18 放大器获取数据。使用 MEA 工作站（MEA-1060; Multichannel Systems）进行多电极记录，并使用 MC_Rack 软件（Multichannel Systems）采集数据。

脉冲分拣多电极记录。每个电极记录都使用四极巴特沃斯滤波器在 300 和 6,000 Hz 之间进行带通滤波。然后使用与过滤后的电极数据的绝对值的中值成比例的阈值提取脉冲波形（Quiroga 等，2004）。将推定的脉冲波形映射到由前 10 个主成分，波形峰值，波形波谷，波形能量和脉冲波形一阶导数的能量定义的 14 维特征空间。使用高斯混合模型在这些空间中进行聚类。仅当簇具有隔离距离 > 3，L 比率 < 3 和 Dunn 指数 > 50 时，才将与细胞内数据的簇放电特征匹配的单个细胞包括在分析中（Harris 等人 2001；Schmitzer-Torbert 和 Redish 2004；Schmitzer-Torbert 等（2005）。在四个不同的 rd1 小鼠视网膜中进行的试验中，我们在暴露于 L-AP4 的过程中分离了 61 个单个细胞，在暴露于 LP 的过程中分离了 18 个单个细胞，在冲洗条件下分离了 34 个单个细胞。这 113 个细胞的平均 L 比率为 0.21 ± 0.55 ，平均隔离距离得分为 26.98 ± 34 。

计算模型

所有数值模拟均使用 MATLAB 进行。该代码可从 <http://senselab.med.yale.edu/modeldb/> 获得。对于 AII，我们使用了 Cembrowski 等人（2012 年）的**三室模型**，其行为类似于我们先前的研究（Cembrowski 等人，2012 年）中所示的形态学现实模型（见图 4，Ai 和 Aii）。基于填充有荧光示踪剂的 AII 建立了详细的形态学模型（请参见图 4Ai）。将 Na，A-型 K 和缓慢激活的 M-型 K 电导插入远端静脉曲张；长的神经突和体细胞被认为是被动的，而细胞的其余部分则具有低密度的 A-型 K 电导（Cembrowski 等人，2012）。先前的研究表明，在形态学详细的模型中，当在体细胞，初级树突末端的小叶和树状树突中进行测量时，对远端静脉曲张的短暂电流注入的电压响应非常相似（Cembrowski 等（2012 年）。因此，除了远端静脉曲张显示为脉冲起始部位

(Cembrowski 等 (2012) 和附着的长神经突外, 当脉冲出现时, AII 的其余部分表现为是电致密的。这有理由将体细胞和树状树突视为一个单独的房室。

具体来说, 我们的 AII 模型由代表 AII 的体细胞和树状树突的大房室 (长度 $25 \mu\text{m}$, 直径 $25 \mu\text{m}$), 代表长的来自初级树突的神经突分支的细电缆状房室 (长度 $32 \mu\text{m}$, 直径 $0.3 \mu\text{m}$) 以及小的起始部位 (长度 $2 \mu\text{m}$, 直径 $2 \mu\text{m}$; 见图 4Aii) 组成。为方便起见, 我们将大房室称为“体细胞”, 将细电缆房室称为“线缆”, 将小静脉曲张房室称为“起始部位”。与 Cembrowski 等人不同 (2012 年), 在确认此更改没有显著差异之后, 此处将线缆视为 1 个房室而不是 11 个房室。在所有三个房室中, 都有一个被动泄漏电导, 膜电阻率为 $40,000 \cdot \text{cm}^2$ 。膜的比电容和轴向电阻率分别为 $1 \mu\text{F} / \text{cm}^2$ 和 $150 \Omega / \text{cm}$ 。此外, 起始位置具有快速的 Na 电导 ($g_{\text{ISNa}} = 0.2 \text{ S} / \text{cm}^2$), 不完全失活的 A-型 K 电导 ($g_{\text{IS,A}} = 0.08 \text{ S} / \text{cm}^2$) 和缓慢的非失活的 M-型 K 电导 ($g_{\text{IS,M}} = 0.03 \text{ S} / \text{cm}^2$), 因为该单个远端起始位置已显示为脉冲产生以及其缓慢调节的部位 (Cembrowski et al 2012)。尽管发现体细胞本身是被动的 (Tian 等, 2010), 但由于三房室模型的体室被认为包含树突状树突, 因此该房室中包含了 A-型 K 电导 ($g_{\text{IS,A}} = 0.004 \text{ S} / \text{cm}^2$)。这些具有逆电位 $E_{\text{Na}} = 50 \text{ mV}$ 和 $E_{\text{K}} = -77 \text{ mV}$ 的活性电导具有以下动力学。

Na 电流由

$$i_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} m_{\text{Na}}^3 h_{\text{Na}} (V - E_{\text{Na}}) \quad (1)$$

激活变量和失活变量由

$$\tau_{m_{\text{Na}}} \frac{dm_{\text{Na}}}{dt} = m_{\infty, \text{Na}} - m_{\text{Na}}, \quad (2)$$

$$\tau_{h_{\text{Na}}} \frac{dh_{\text{Na}}}{dt} = h_{\infty, \text{Na}} - h_{\text{Na}}, \quad (3)$$

其中

$$m_{\infty, \text{Na}}(V) = \left[1 + \exp\left(-\frac{(V - V_{1/2, m_{\text{Na}}})}{k_{m_{\text{Na}}}}\right) \right]^{-1}, \quad (4)$$

$V_{1/2, m_{\text{Na}}} = -48 \text{ mV}, k_{m_{\text{Na}}} = 5 \text{ mV}$

$$h_{\infty, \text{Na}}(V) = \left[1 + \exp\left(\frac{(V - V_{1/2, h_{\text{Na}}})}{k_{h_{\text{Na}}}}\right) \right]^{-1}, \quad (5)$$

$V_{1/2, h_{\text{Na}}} = -49.5 \text{ mV}, k_{h_{\text{Na}}} = 2 \text{ mV}$.

Na 电流的激活和失活都很快, 时间常数分别为 $\tau_{m_{\text{Na}}} = 0.01 \text{ ms}$, $\tau_{h_{\text{Na}}} = 0.5 \text{ ms}$ 。

M-型 K 电流

$$i_{\text{M}} = \bar{g}_{\text{M}} m_{\text{M}} (V - E_{\text{K}}) \quad (6)$$

激活变量

$$\tau_{m_{\text{M}}} \frac{dm_{\text{M}}}{dt} = m_{\infty, \text{M}} - m_{\text{M}} \quad (7)$$

其中

$$m_{\infty, M}(V) = \left[1 + \exp\left(-\frac{(V - V_{1/2, m_M})}{k_{m_M}}\right) \right]^{-1},$$

$$V_{1/2, m_M} = -40 \text{ mV}, k_{m_M} = 4 \text{ mV}. \quad (8)$$

M 型 K 电流是非失活的，并且随着时间常数 $\tau_{mM} = 50\text{ms}$ 缓慢地激活。

A-型 K 电流

$$i_A = \bar{g}_A m_A [c h_A^{(1)} + (1 - c) h_A^{(2)}] (V - E_K), \quad (9)$$

$$c = \left[1 + \exp\left(-\frac{(V + 45)}{15}\right) \right]^{-1}, \quad (10)$$

其激活和失活变量分别为

$$\tau_{m_A} \frac{dm_A}{dt} = m_{\infty, A} - m_A, \quad (11)$$

$$\tau_{h_A^{(1)}} \frac{dh_A^{(1)}}{dt} = h_{\infty, A} - h_A^{(1)}, \quad (12)$$

$$\tau_{h_A^{(2)}} \frac{dh_A^{(2)}}{dt} = h_{\infty, A} - h_A^{(2)}, \quad (13)$$

其中

$$m_{\infty, A}(V) = \left[1 + \exp\left(-\frac{(V - V_{1/2, m_A})}{k_{m_A}}\right) \right]^{-1},$$

$$V_{1/2, m_A} = -10 \text{ mV}, k_{m_A} = 7 \text{ mV}, \quad (14)$$

$$h_{\infty, A}(V) = f \left[1 + \exp\left(\frac{(V - V_{1/2, h_A})}{k_{h_A}}\right) \right]^{-1} + (1 - f),$$

$$V_{1/2, h_A} = -40.5 \text{ mV}, k_{h_A} = 2 \text{ mV}, f = 0.83. \quad (15)$$

A-型 K 电流分别有一快速激活 $\tau_{m_A} = 1\text{ms}$ 与一快速失活 $h_A^{(1)}$ 和一个缓慢失活 $h_A^{(2)}$ 。正如 f 在上述稳态表达式中所捕捉到的，随着时间尺度的变化，失活是不完全的

$$\tau_{h_A^{(1)}}(V) = 25 - 20 \left[1 + \exp\left(-\frac{(V + 35)}{6}\right) \right]^{-1}, \quad (16)$$

$$\tau_{h_A^{(2)}}(V) = \min\left\{ \frac{(V + 17)^2}{4} + 26, 100 \right\}. \quad (17)$$

电压钳记录很好地限制了 A 型 K 电导的参数 (Tian et al.2010)，而其他参数适合重现实验观察到的野生型 AII 中的小脉冲和簇放电 (Cembrowski et al.2012)。在此三室式 AII 模型中，我们省略了 AII 细胞中存在的 L 型 Ca 电导 (Habermann 等人, 2003 年)，因为在感兴趣的方案中不需要复制真实的 AII 反应。对于第一组模拟 (参见图 4)，该模型由隔离的三室 AII 组成，表明单个 AII 能够产生强脉冲和簇放电。我们调整了 AII 的泄漏逆转电位，以重现实验记

录的野生型和 rd1 AII 膜电位。我们使用 -10 mV 的泄漏逆转电位将 AII 置于强脉冲机制中，而使用 -50 mV 的 AII 置于簇放电态中，捕获了与野生型 AII 相比 rd1 AII 相对超极化的情况。

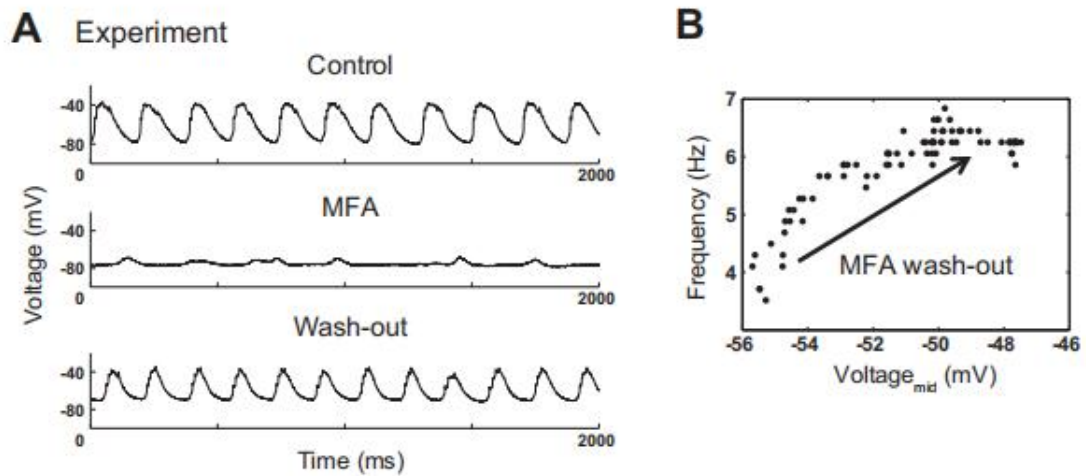


图 1: 甲氯芬那酸 (MFA) 会阻止频率降低和 AII 的超极化之后的振荡。在 MFA 清洗和在 rd1 AII 上冲洗期间进行实验。A: rd1 AII 的代表性记录表明, MFA 消除了振荡。在冲洗过程中, MFA 抑制的振荡得以恢复, 其频率缓慢增加。B: 在 MFA 冲洗过程中, 将每 5 秒扫描的平均频率绘制为 AII 中点膜电位的函数。

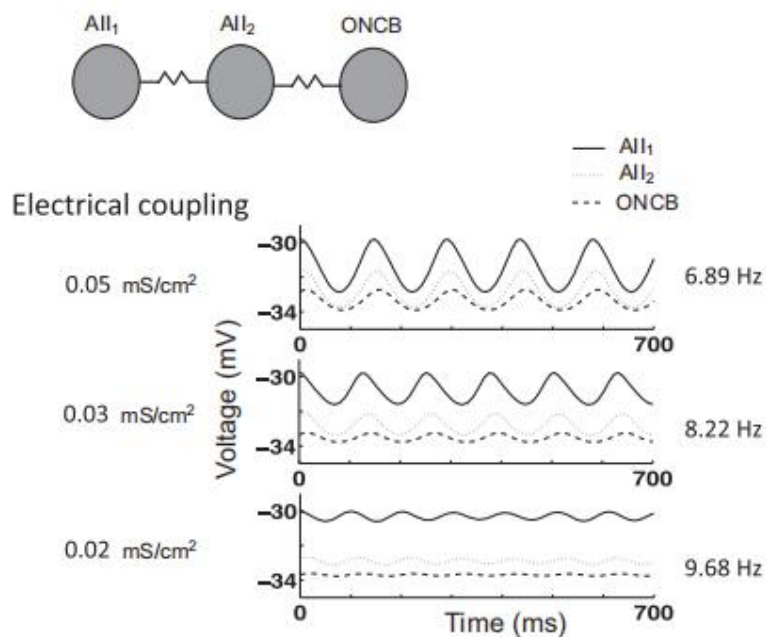


图 2: 基于异构 AII 之间的缝隙连接的模型无法解释 MFA 引起的频率降低。Trenholm 等人的模型 (2012 年) 指定异质 AII 的缝隙-节点耦合网络作为 rd1 振荡的关键, 但并未解释在 MFA 应用下实验观察到的频率降低。该模型由 2 个具有 Na, 延迟整流器 K 和泄漏电导的稍微异质的 AII 细胞, 以及一个具有超极化激活电流和泄漏电流的 ON 锥双极 (ONCB) 细胞组成。所有细胞都具有单个房室, 并且彼此电耦合。随着耦合强度的降低 (模仿 MFA 的作用), 振荡幅度降低, 但与我们的 MFA 实验相比, 振荡频率增加 (图 1B)。此处使用的所有参数与 Trenholm 等人的相同 (2012 年)。

对于其余的模拟（请参见图 5-8、13 和 14），将 ONCB 细胞电耦合到三室 AII 细胞。将 ONCB 细胞建模为表面积为 440 平方微米，膜电阻率为 12,000 平方厘米的被动单房室细胞。ONCB 模型与 AII 模型的“体细胞”房室耦合，通过电导为 750 pS 的间隙结捕获其与 AII 树突状树突的耦合。这在报道的耦合强度范围内，对于 5 型，6 型和 7 型 ONCB 细胞，耦合强度范围从 100 到 1500pS (Veruki 和 Hartveit 2002)。在此耦合的 AII-ONCB 模型中，将 AII 和 ONCB 细胞的泄漏反向电势分别调整为 -65 和 -35 mV，以重现在 rd1 视网膜中实验观察到的膜电势。

结果

MFA 首先会减慢速度，然后消除 rd1 视网膜的振荡。 先前已有报道，间隙连接阻滞剂 MFA 消除了 rd1 视网膜的振动 (Menzler 和 Zeck, 2011; Trenholm 等, 2012)。基于该观察，已经提出振荡是 AII 无突触和 ONCB 细胞的电耦合网络的新兴性质。更具体地说，在具有稍微异质性的 AII 的模型网络中，电耦合可能导致 AII 进入振荡状态，即使单个 AII 本身不是固有振荡的 (Trenholm 等人, 2012)。

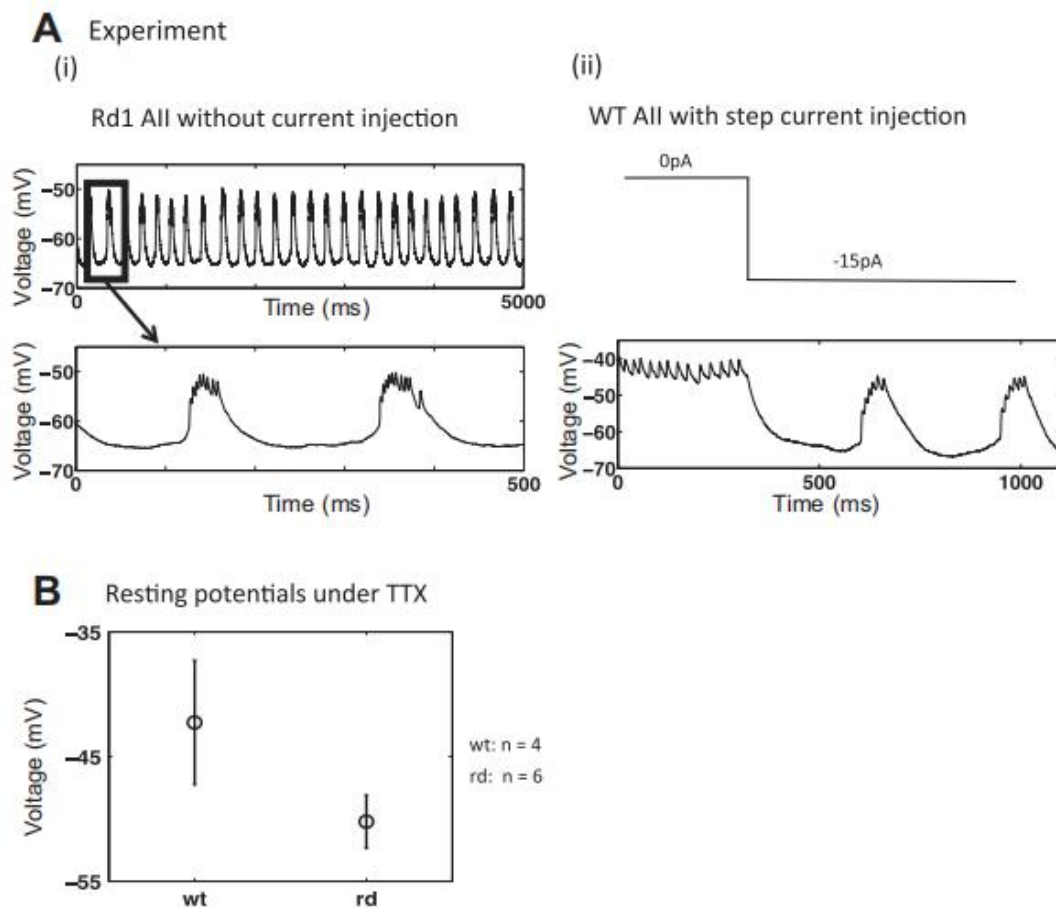


图 3: 在超极化野生型 (WT) AII 中簇放电会在 AII-圆锥双极网络中引起 rd-型振荡。A: 代表性的细胞内 rd1 和 WT AII 记录。Ai: 不注入超极化电流 rd1 AII 中的振荡。Aii: WT AII 在静止时 (直至 t=300 ms 时) 表现出自发的小脉冲，当它被超极化时 (t=300 ms 后) 会经历簇放电的转变。B: 在河豚毒素 (TTX) 下，WT AIIs (n=4) 的静息膜电位比 rd1 AII (n=6) 的去膜电位更去极化。

为了更详细地描述 MFA 对 AII 网络的影响，我们记录了 rd1 小鼠的 AII 无轴突细胞的膜电压。我们的记录证实了 rd1 小鼠 AII 的自发振荡活动 (Trenholm et al.2012; Yee et al.2012; Menzler and Zeck 2011; Stasheff 2008)，频率范围为 5-15 Hz，与之前的研究一致 (Trenholm et al. 等人, 2012; Yee 等, 2012; Menzler 和 Zeck, 2011; Stasheff, 2008; Margolis 等, 2014)。然后，我们应用 MFA 并测量 rd1 AII (n=4) 的振荡频率和膜电位。在我们的实验中，在应用 MFA 之后确实消除了振荡 (图 1A)。在 MFA 效应发作期间，随着 AII 超极化，振荡的频率逐渐降低。在 MFA 冲洗过程中，振荡频率缓慢增加，直到恢复原来的频率，同时平均 AII 膜电位也增加。图 1B 显示振荡频率直接随膜电位变化。

接下来，我们研究了 Trenholm 等人 (2012) 提出的模型是否可以解释 MFA 应用期间的这种行为。在由两个具有不同固有电特性的 AIIs 和一个 ONCB 细胞组成的网络模型中，表明减小间隙连接电导之后消除了振荡。基于此模拟，已提出异质 AII 网络的突现特性作为振荡源。在此模型中，两个 AII 相互电耦合，ONCB 细胞与 AII 之一电耦合。ONCB 细胞具有超极化激活的阳离子电流，延迟的整流 K 电流和泄漏电流。每个 AII 具有快速的 Na 电导，延迟的整流 K 电导和泄漏电导。重要的是，AII 的最大 Na 和漏电导率略有不同 (有关详细信息，请参见 Trenholm 等, 2012) (图 2)。

我们在 Trenholm 等人 (2012 年) 的模型中降低了间隙连接耦合强度，并观察到振荡幅度下降，并最终停止振荡。但是，振荡频率在此过程中增加 (图 2)，这与 MFA 引起的实验观察到的降低不一致 (图 1)。Trenholm 等人 (2012) 模型的行为与我们在实验中观察到的神经元行为明显不一致，这促使我们开发一种替代模型，来描述 rd1 振荡的实验测量参数。

AII 在 rd1 视网膜中超极化。在仔细检查从 rd1 AII 记录的电压波形后，在振荡的去极化阶段会出现小脉冲 (图 3Ai, 插图) (另请参阅 Borowska 等人, 2011)。这些振荡与我们先前在野生型 AII 的轻度超极化之后观察到的振荡极为相似 (Cembrowski 等, 2012) (图 3Aii)。

因为膜电位的超极化对于诱导野生型 AII 的簇放电是必要的，所以我们假设 rd1 视网膜中 AII 的体细胞电压相对于野生型 AII 而言是超极化的。因为野生型 AII 是自发的脉冲 (在 -45 至 -40 mV 范围内, n=6, 也见 Cembrowski 等人 2012) (图 3Aii, 在注入超极化电流之前) 和 rd1 AII 是自发振荡的 (在范围为 -65 至 -50 mV, n=6; 图 3Ai)，无法直接比较其静息电位。因此，我们比较了存在 TTX 时野生型和 rd1 AII 的静息电位：尽管存在显著的可变性，但 TTX 下 rd1 AII 的静息电势比野生型 AII 的静息显然更负 (-50.2 ± 2.1 mV, n=6 vs. -42.3 ± 4.9 mV, n=4; 二值 t 检验, P < 0.015)，如图 3B 所示。

Rd1 振荡类似于 AII 中的电缆滤波固有簇放电。先前的电生理和计算分析表明，AII 中记录的小体细胞小穗是在末梢电动房室中引发的完整动作电位的衰减形式 (Cembrowski 等人, 2012)。引用的计算分析使用了多房室模型；单室模型无法充分描述 AII 的峰值 (Apollo 等人, 2013)。

Cembrowski 等人（2012 年）的多房室模型包括一个体细胞，一个单脉冲过程，和树突树的其余部分（代表许多单独的房室）以及实验约束的膜电导（图 4Ai）。由于 Na 电导仅限于单个末梢脉冲起始位置，因此该位置的全动作电位仅会在体细胞中引起较小的电压偏转（“小穗”）。实验观察到的超极化 AII 的簇放电是由 Na 电导与抑制脉冲的缓慢 M 型 K 电导之间的相互作用所解释的：在簇放电状态下，Na 电流产生的快速脉冲会缓慢激活 M 型 K 电流，从而反过来会使神经元超极化，终止脉冲并完成簇放电。

由于预测在簇放电期间树突和体细胞中的电压相似，因此我们通过将体细胞和树突聚集到一个单独的小室中，将多室模型简化为三室模型（图 4Aii）。与详细的形态学模型一样，脉冲起始位置的内在簇放电会引起在去极化阶段诱导小脉冲的体细胞中的小电压振荡，（图 4Bii）。

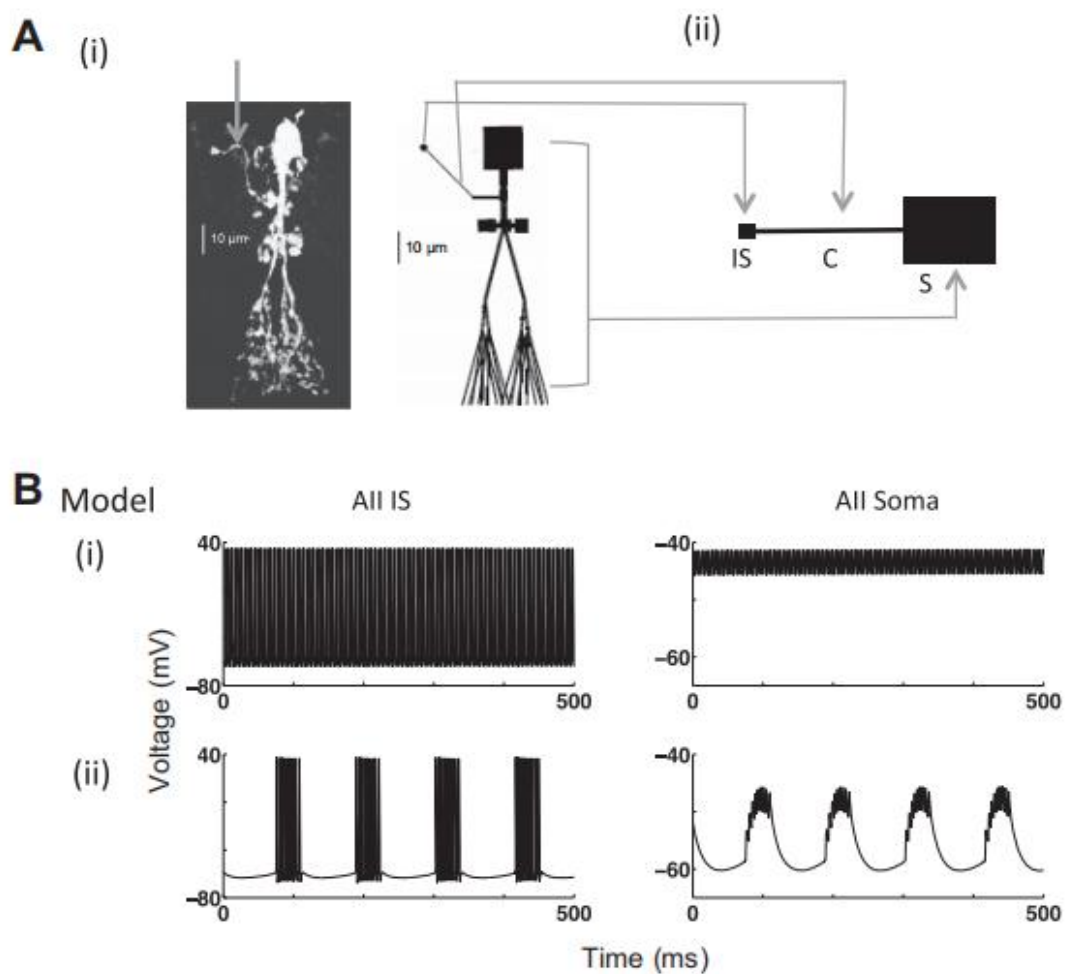


图 4：模拟显示一个 AII 的强直性脉冲和簇放电。 Ai： AII 的共焦图像（左）和形态详细的模型（右）。 Aii： AII 的简化 3 房室模型由三部分组成，分别是一个“起始位置”（IS）和一个“电缆”（C），该电缆对应于从 AII 的初级树突（Ai 中的箭头）形成的细神经突分支，以及一个体细胞（S），代表其他 AII（体细胞和树突）。 Bi： IS 中的强直性脉冲会导致 wt AII 模型的体细胞中出现小穗。 Bii： 当通过将泄漏逆电势从 -10 mV 降低到 -50 mV 使 AII 超极化时，为了重现实验观察到的 wt 和 rd1 AII 的膜电势，模型 AII 显示出自发簇放电。

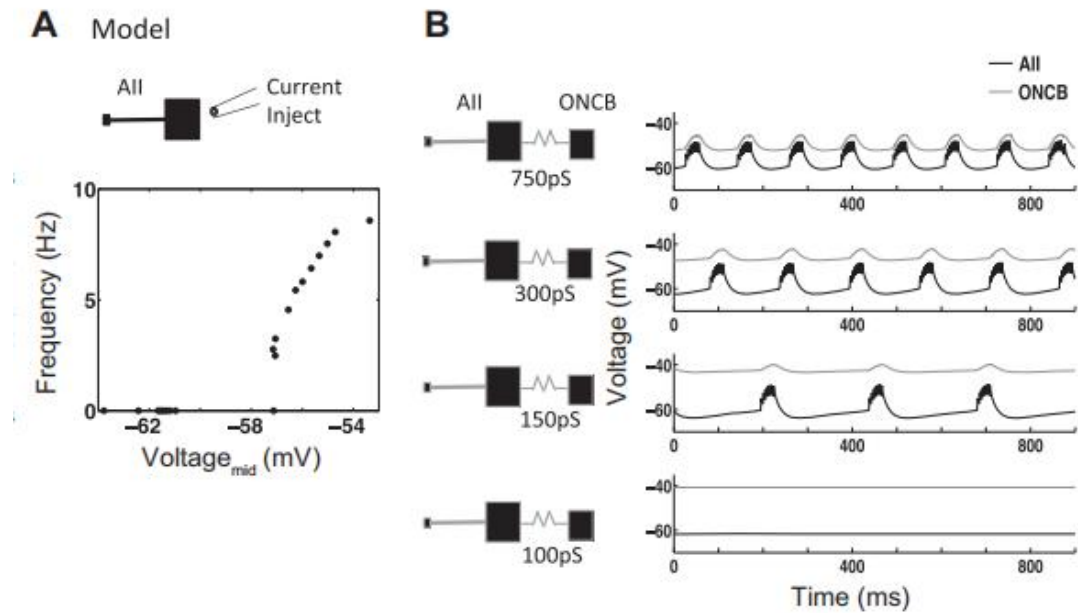


图 5: 仿真支持 MFA 通过 AII 的超极化来阻止振荡。A: 模拟向 AII 注入超极化电流。簇放电频率显示为 AII 膜电位中点的函数。B: 模拟通过间隙连接耦合到 ONCB 的 AII。随着间隙结的耦合强度降低, 簇放电频率也降低。当耦合强度降低到 100 pS 时, 消除了簇放电。

rd1 AII 和超极化野生型 AII 中的电压波形之间的相似性使我们得出一个假设, 即 rd1 视网膜中的振荡反映了 AII 的内在簇放电性活动, 而不是电耦合网络的某些簇放电特性。下面, 我们通过操纵 AII 中的间隙连接和 K 电导并确定实验观察到的效果是否与我们的 AII 模型一致来检验该假设。

该模型再现了 MFA 对 rd1 视网膜簇放电的影响。 此新模型的第一个测试是它是否正确再现了由于使用 MFA 而导致的减慢和消除簇放电现象。MFA 不仅影响 AIIs 之间的耦合, 还影响 AII-ONCB 网络。它也减少了 AIIs 和 ONCB 细胞之间的耦合 (Pan 等, 2007)。阻断 rd1 视网膜中 AII 和 ONCB 细胞之间的电耦合应使 AIIs 超极化, 因为这些 ONCB 细胞(V_m 振荡在 -50 mV, Borowska 等人, 2011 年) 相对于 AIIs 是去极化的 (V_m 振荡在 -65 至 -50 mV, 图 3Ai)。我们的模型预测, 簇放电性 AIIs 的额外超极化将抑制簇放电 (图 5A)。这种行为模仿了我们的实验结果 (图 1)。

为了进一步测试这种解释, 我们扩展了模型, 将间隙连接耦合到被动的 ONCB 细胞。我们通过降低 AII 和 ONCB 细胞之间的耦合强度来模拟 MFA 的作用。不出所料, 与我们的实验一致, 减弱 AII 与 ONCB 细胞之间的耦合强度会使 AII 超极化, 从而降低了振荡频率, 然后消除了 AII 中的振荡 (图 5B)。Trenholm 等人 (2012) 也报道了类似的结果。如果 MFA 通过使固有振荡的 AIIs 超极化来停止振荡, 那么应该可以在应用 MFA 之后通过向 AII 中注入去极化电流来恢复振荡。确实, 在实验 (图 6A; $n=4$) 和模型 (图 6B) 中, 体细胞电流注入 ~15-20 pA 均可恢复 AIIs 的簇放电。

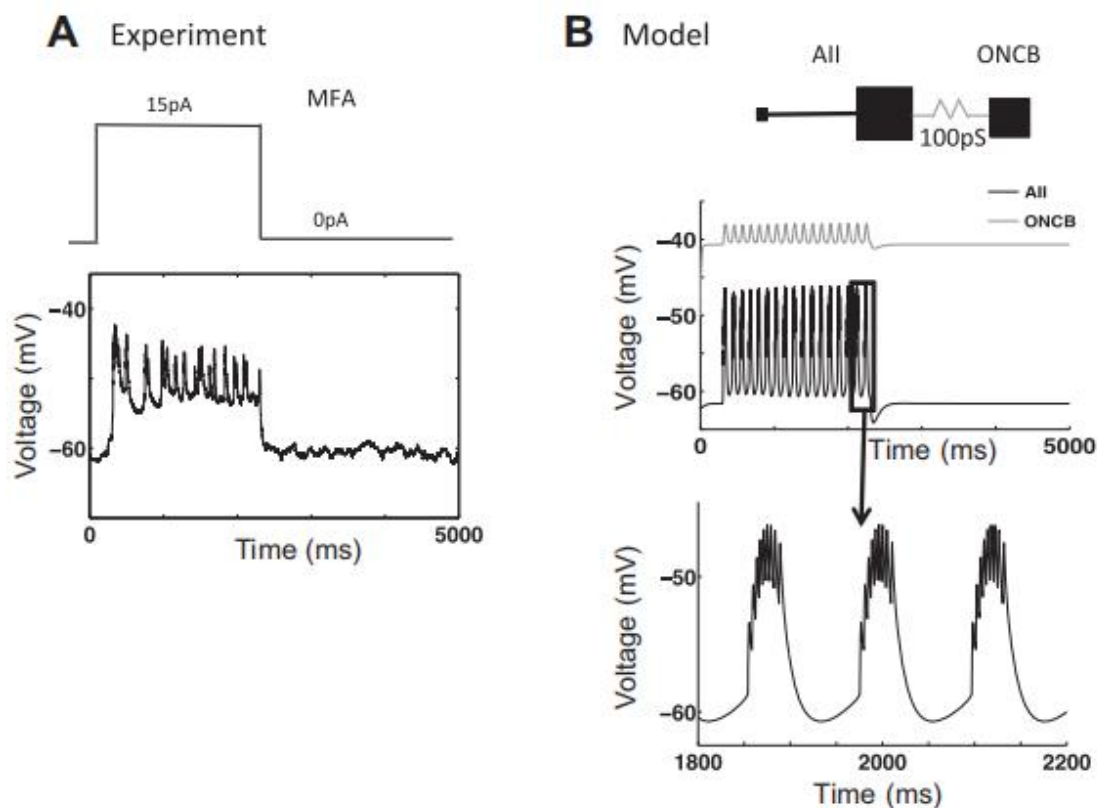


图 6: 应用 MFA 后的电流注入可恢复 rd1 AII 中的振荡。A: 来自 rd1 AII 的实验记录, 其中通过 15 pA 的去极化电流注入恢复了 MFA 应用所消失的振荡。B: 模拟对模型 rd1 AII 注入 5 pA 的去极化电流, 其与 ONCB 的间隙连接耦合降低至 100 pS, 以模仿 MFA 的作用。通过减少间隙连接耦合来消除振荡 (图 5B), 并通过注入去极化电流来恢复振荡。恢复的振荡具有典型波形 (底部)。

该模型可准确预测 K 通道操纵对 rd1 视网膜簇放电的影响。我们的模型在簇放电中为 M 型 K 电导起着核心作用。因此, 我们测试了增强和阻断 M 型 K 电导对 rd1 视网膜 AII 簇放电的影响, 以确定这些影响是否与我们的模型预测一致。首先, 我们测试了 M-电流激活剂氟吡汀的作用。氟吡汀通过将其激活转移到更多的负电压来激活 M 型 K 电流 (Wu 等人, 2012)。

在氟吡汀的洗涤过程中, 振荡首先降低频率, 然后停止 (图 7, Ai 和 Aii)。氟吡汀冲洗后, 这种情况发生了逆转: 静止的 AII 首先开始以低频振荡, 然后振荡频率上升。伴随着频率的变化, 振荡的波形得以发展 (图 7Ai)。为了量化波形的变化, 我们在膜电位下测量了簇放电的宽度, 该电位对应于每次扫描中最大振荡幅度 (长 1,667-ms) 的 30%。如图 7, Aiii 和 Aiv 所示, 在氟吡汀洗净过程中, 簇放电变窄了 (从 79.3±4.5 到 44.9±9.5 ms)。发现氟吡汀的作用是显著的 (通过双向方差分析 ANOVA, $P < 10^{-3}$)。从生物物理上讲, 随着 M-型 K 电流的激活曲线向左移动, 需要更少的脉冲来生成足以切断脉冲的向外电流。

我们还通过将 M 型 K 电流的半激活电压 ($V_{1/2}$) 移至更多的负电压来模拟氟吡汀在 AII 模型中的作用。与实验一致, 这种操作降低了簇放电频率, 然后使细胞静止 (图 7B)。虽然频率通常随着 M-型 K 电流的 $V_{1/2}$ 变得更负而降低,

但

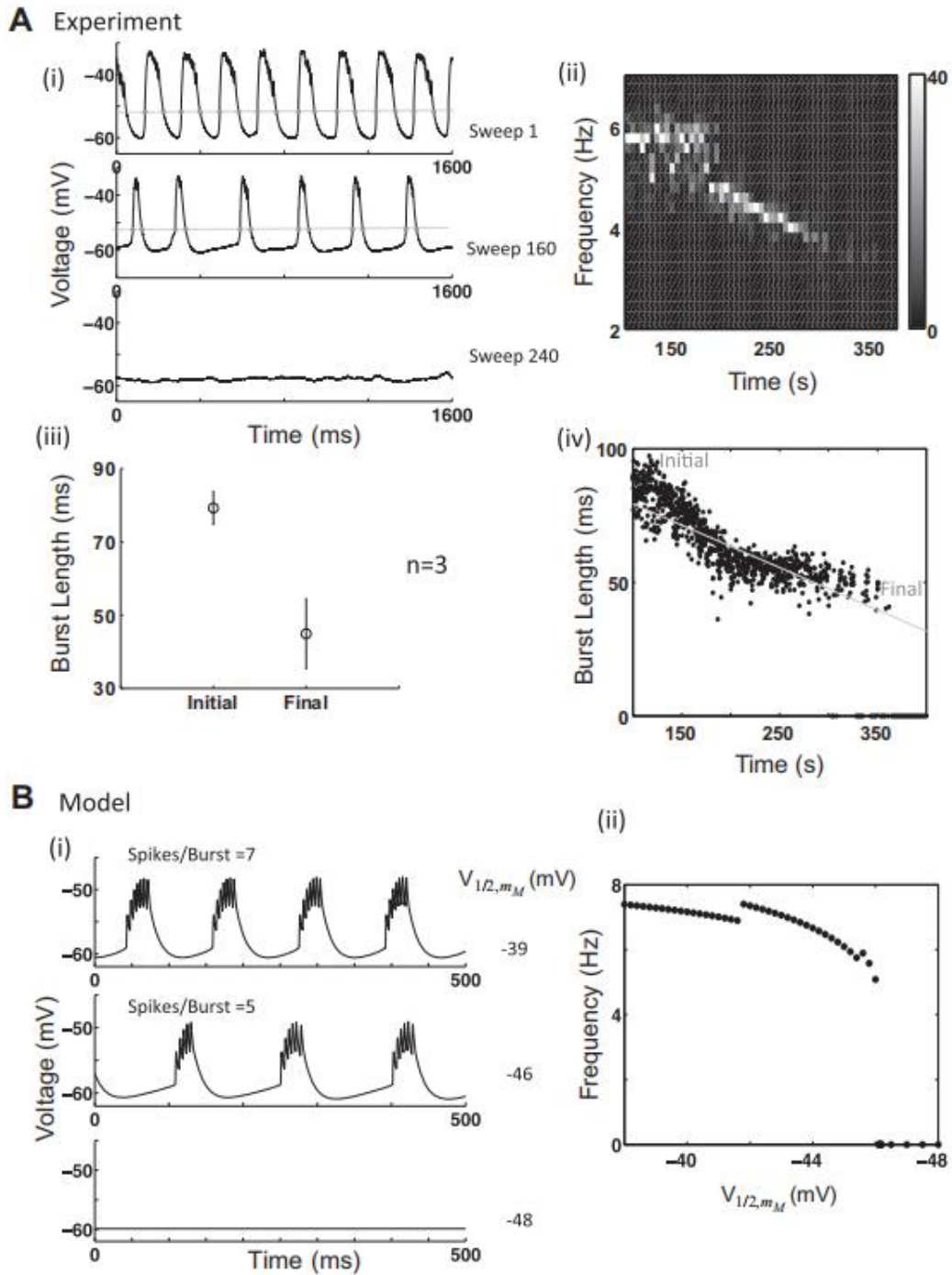


图 7. 打开 M-型 K 电流可降低频率和簇放电长度并停止振荡。A: 在 rd1 AII 上进行氟吡汀洗涤的实验。Ai: 氟吡汀洗涤期间 AII 膜电位的代表性踪迹。Aii: Ai 中记录的频谱图显示, 在氟吡汀应用下, 频率降低, 最终导致振荡终止。Aiii: 氟吡汀洗涤末(最终)的簇放电长度明显小于开始(初始)的簇放电长度 ($n=3; P < 10^{-3}$)。Aiv: 典型记录氟吡汀洗涤过程中的簇放电长度。对于每条 1,667 毫秒长的扫描 (Ai 中的虚线), 测量的长度为最大振荡幅度的 30%。“初始”和“最终”指示在何处测量初始和最终簇放电长度。B: 通过向左移动 M 电导的半激活电压 $V_{1/2}$ 来模拟氟吡汀的应用。Bi: AII 模型的代表性膜电位迹线。随着频率的降低, 每个簇放电的脉冲数量也减少, 导致簇放电长度减少。Bii: 在模型中, 簇放电频率随着 M 电导的半激活电压 $V_{1/2}$ 的降低而降低。离散跳跃对应于每个簇放电的脉冲

数目的减少。最终，AII 变得静止。

在 $V_{1/2} = -42$ mV 和 $V_{1/2} = -45$ mV 附近也存在离散的跳跃（图 7Bii）。这些跳跃的发生是由于每个簇放电的脉冲数量减少。在实验中，各个脉冲串变化太大，以至于无法识别此类细节（参见图 3Ai）。但是，与实验一样，簇放电宽度减小了（图 7Bi）。

为了确定对抗 M-型 K 通道如何影响 rd1 振荡，我们使用了 LP（请参阅 Cembrowski 等人 2012）。阻断 M-型 K 电流会降低簇放电频率（图 8, Ai 和 Aii; $n=5$ ）。但是，簇放电持续时间从 87.4 ± 41.1 增至 175.0 ± 34.7 ms；这与氟吡汀对簇放电持续时间的作用相反。尽管在整个记录的细胞中有明显的变化，但增加还是非常显著的（ $P < 10^{-3}$ ；图 8, Aiii 和 Aiv）。与该观察结果一致，当最大 M 电导减小时，计算模型还产生了较低的簇放电频率和较长的簇放电持续时间（图 8B）。这是可以预期的，因为已确定 M-型 K 电流是终止脉冲的原因（Cembrowski 等（2012））。

在模型中，减小 M-型 K 电流会导致簇放电持续时间无限制地增加，并最终变为强直脉冲。然而，在实验中，LP 并不能消除所有振荡，也不会引起强直性脉冲。相反，当簇放电持续时间增加到超过 ~ 200 ms 时，会发生向另一种低频（ ~ 1 Hz）振荡的过渡（图 8Ai，底部和 9B）。翻越这些缓慢振荡之上的是更快，不规则的 5 至 10 Hz 的脉冲簇放电。这些簇放电让人想起在没有 LP 的情况下观察到的 rd1 特征振荡。当首先通过应用 L-AP4 使 ONCB 细胞超极化时，也观察到了这种现象，而 L-AP4 本身并不会阻止 rd1 视网膜的振荡（Borowska 等，2011）（ $n=6$ ）。由于这种过渡到质量上不同的振荡类型，由 LP 引起的簇放电持续时间增加的测量取决于过渡时间的确定。我们使用持续时间变异性的突然增加作为该过渡的标准。

当抑制被阻断时，慢频率振荡在频率和形状上均类似于在大鼠，小鼠和金鱼视网膜的 ONCB 细胞中观察到的慢的 Ca 通道介导的振荡（Ma 和 Pan 2003；Yee 等人 2012；Eth 等，2012；Zenisek 和 Matthews 1998）。为了测试慢振荡是否确实是由 Ca 通道介导的，我们在确定了 LP 诱导的慢振荡后（在 L-AP4 存在 $n=4$ 之下）应用了镉（Cd²⁺）和镍（Ni²⁺）这两种非选择性电压门控 Ca²⁺通道阻滞剂。LP 引起的慢振荡的特征形状和频率被 Ni²⁺和 Cd²⁺破坏，支持我们的假设：在 LP 应用下出现的慢振荡需要 Ca 通道，因此是由不同于 ~ 10 Hz 振荡的机制引起的（图 9）。

因此，阻止或增强 M-型 K 电导可以消除 rd1 AII 中的特征性 5 至 10 Hz 的振荡（图 7 和 8）。观察到的振荡频率和簇放电持续时间的变化是由我们的单个 AII 模型预测的。这表明，缓慢的 M-型 K 电流在产生 rd1 振荡中起着与在野生型 AII 中产生簇放电具有相同的关键作用。

注意，Trenholm 等人（2012 年）研究了不包括 M 电流，因而不允许任何与这些实验有关的预测的模型。

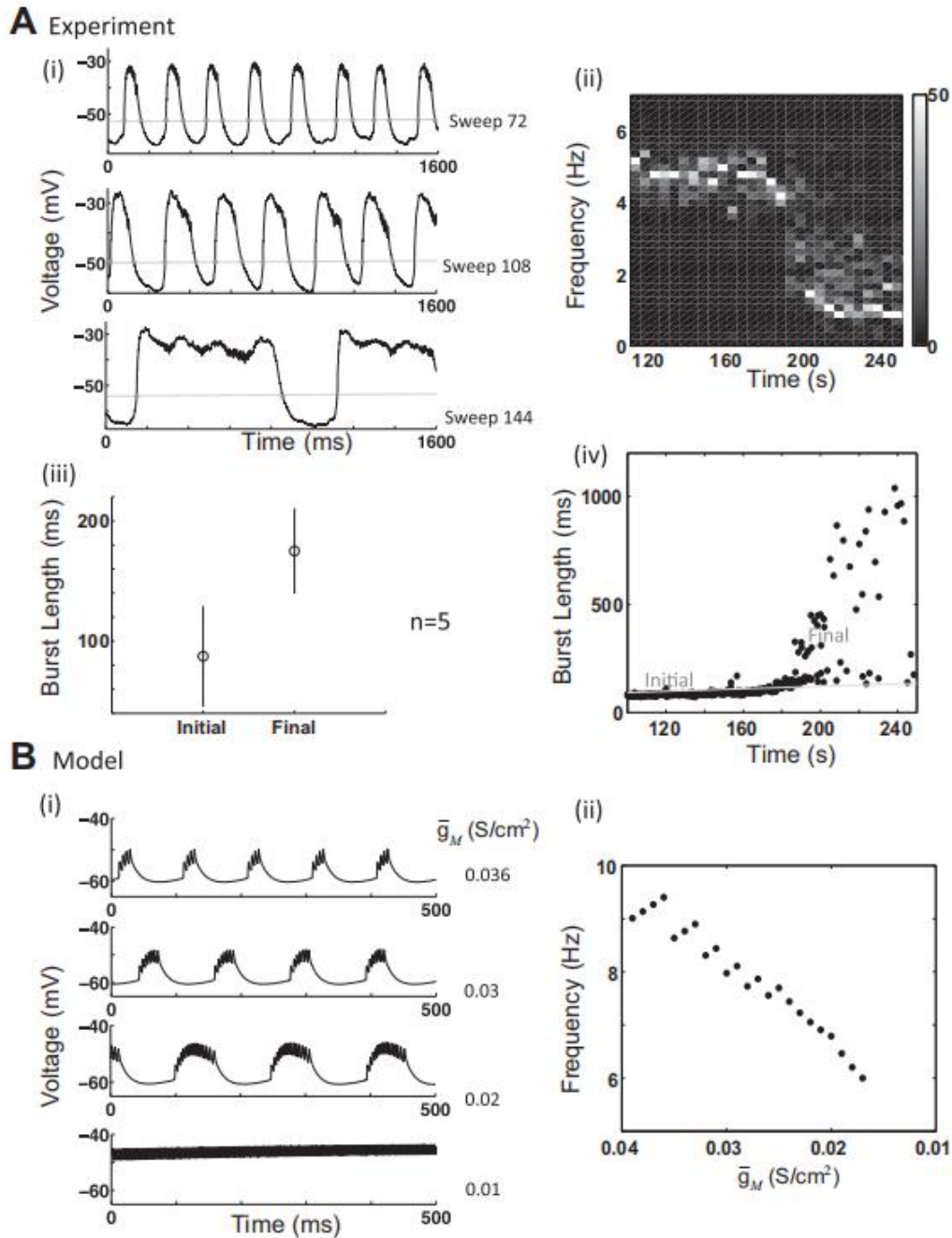


图 8: 阻塞 M-型 K 电流会降低频率并增加簇放电长度。A: 在 rd1 AII 上进行盐酸利尼哌啉 (LP) 洗涤时的实验。Ai: 在 LP 洗涤过程中 AII 膜电位的代表性踪迹。对应于~1 Hz 频率 (底部) 的迹线具有一个特征波形, 该特征波形由跨越期和平稳期组成, 与典型 rd1 振荡的波形不同。Aii: Ai 中记录的频谱图显示, 在 LP 应用下, 频率降低, 最终达到~1 Hz 的极低频率。Aiii: LP 洗涤过程中的初始和最终簇放电长度显著增加 ($n=5$, $P < 10^{-3}$)。最终簇放电长度是在过渡到~1-Hz 振荡之前测量的。Aiv: 在有代表性的记录的 LP 清洗期间簇放电长度增加。对于每个 1,667ms 长的扫描, 测量的长度为最大振荡幅度的 30% (Ai 中的虚线)。初始和最终指示在哪里测量初始和最终簇放电长度。B: 通过减小 M-型 K 电流最大电导 \bar{g}_M 来模拟 LP 应用。Bi: AII 模型的代表性膜电位踪迹。当簇放电频率降低时, 每个簇放电的脉冲数量增加, 从而导致簇放电长度增加。Bii: 在模型中, 簇放电频率随着 M 电导的降低而降低。离散跳跃对应于每个簇放电的脉冲数量的增加。低于 $\bar{g}_M = 0.015 \text{ S/cm}^2$, AII 表现出强直性脉冲。

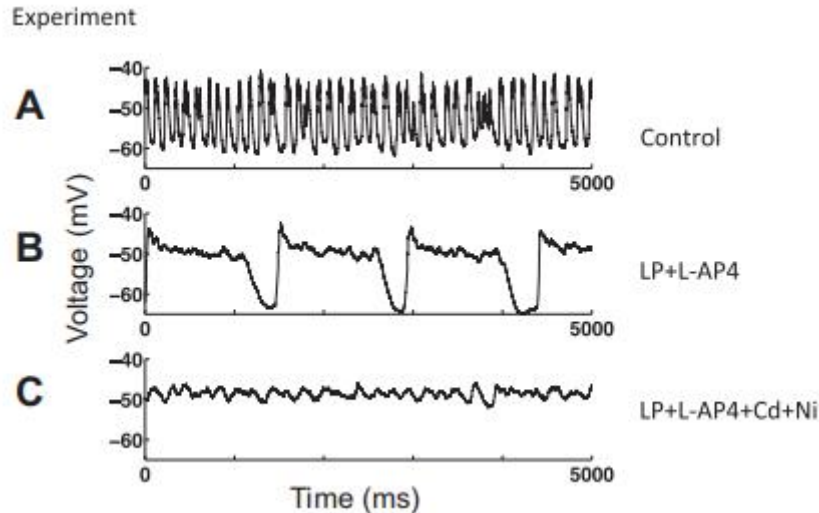


图 9：阻塞 Ca^{2+} 通道会破坏低频振荡。 A：在 LP 和 Ca^{2+} 阻滞剂下 rd1 AII 的代表性记录。不受 L-(+)-2-氨基-4-磷酸基丁酸 (L-AP4; A) 影响的 rd1 振荡特性被 LP 破坏，并被低频振荡 (B) 取代。 Ni^{2+} 和 Cd^{2+} (C) 消除了低频振荡。

*AII*s 的固有振荡不改变地传播到 rd1 视网膜的神经节细胞。在 rd1 视网膜中的视网膜神经节细胞 (RGCS) 中也观察到 5 至 15 Hz 的振荡。这些振荡反映了节律性突触输入 (Margolis 等人 2008; Borowska 等人 2011; Menzler 和 Zeck 2011; Stasheff 2008; Ye 和 Goo 2007; Yee 等人 2012)，以及 ON 和 OFF alpha RGCS 中活性的反相关暗示 AII 是这种突触输入的主要贡献者 (Margolis 等人, 2014)。在这里，已经找到了证据支持 AII 的 rd1 振荡是由它们的 M-型 K 电导固有地产生的，接下来，我们通过测试 LP 和氟吡汀对 d1 视网膜中 RGCS 的振荡的影响，研究了这些 AII 振荡是否确实是 RGCS 振荡的起源。振荡是通过 rd1 整个视网膜上的单个 alpha 神经节细胞内记录以及通过 MEA 的单个和多个细胞外记录来测量的。

氟吡汀和 LP 都破坏了在 ON 和 OFF alpha RGCSs 中在整个细胞结构中记录的振荡突触电流和膜电位。观察到的频率和簇放电持续时间与 AII 振荡的变化一致；氟吡汀消除了频率和簇放电持续时间减少后的振荡，而 LP 在消除 rd1 振荡之前降低了簇放电频率并增加了簇放电持续时间。在氟吡汀和 LP 下神经节细胞膜电位的代表性迹线以及它们的频率和簇放电持续时间变化示于图 10, Ai, Aii 和 Aiv, 以及 Bi, Bii 和 Biv。图 10 Aiii 和 Biii 显示了氟吡汀和 LP 下簇放电持续时间变化的集合数据。在接受 LP (n=4) 治疗的视网膜中，神经节细胞簇放电的宽度增加了 (从 38.5 ± 27.8 增至 305.3 ± 108.5 ms, $P < 10^{-3}$)。在氟吡汀作用下的四分之三的细胞中，簇放电宽度降低 (从 51.7 ± 12.4 降至 17.4 ± 8.4 ms, $P < 10^{-3}$)。在一种情况下，氟吡汀的应用几乎立即消除了振荡，因此不可能观察到簇放电持续时间的缓慢变化。另外，在氟吡汀处理过的四分之三的细胞中，在细胞变得静止之前，簇放电频率变得不规则。但是，在所有情况下，氟吡汀的应用后，脉冲的频率降低。

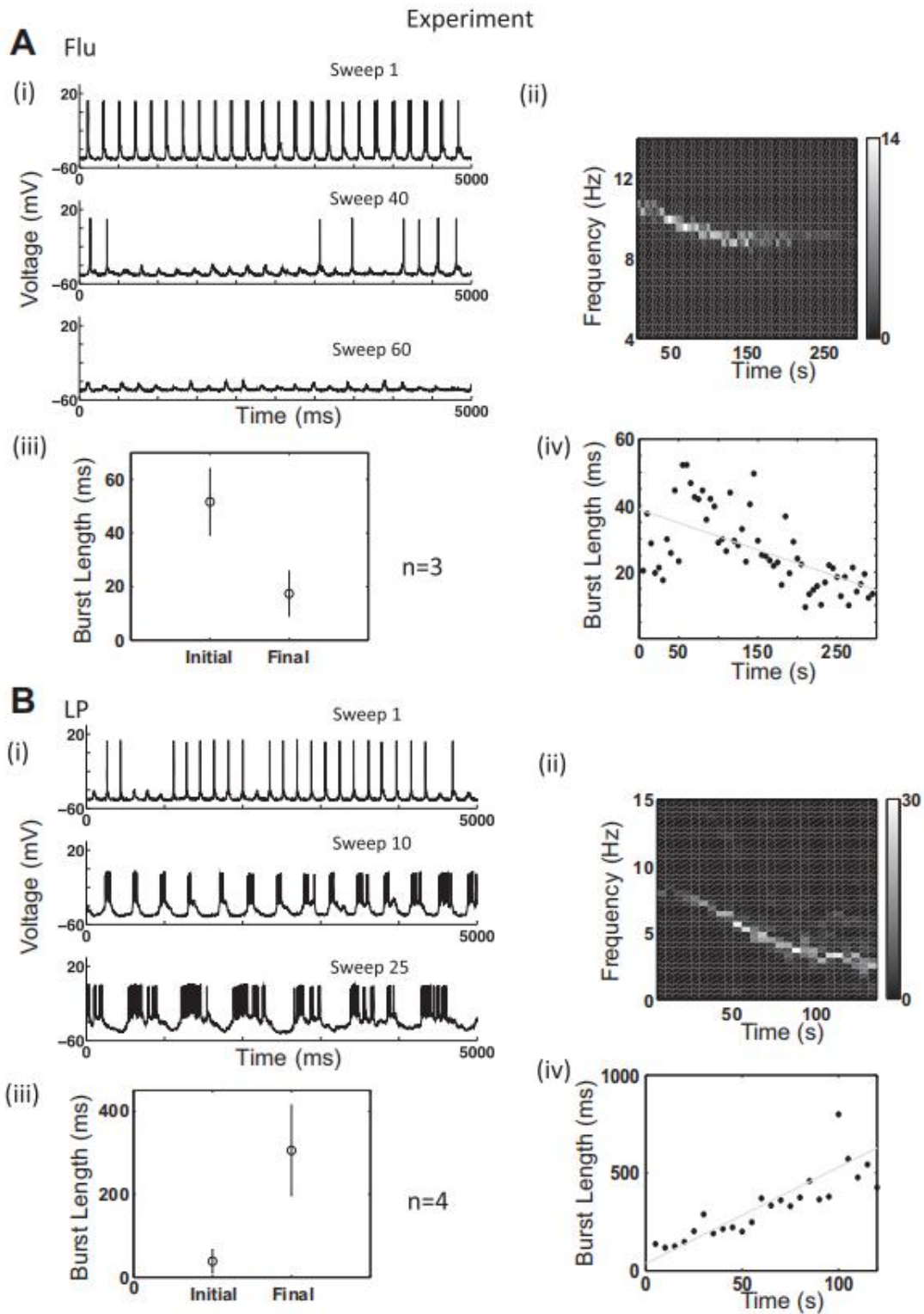


图 10: 视网膜神经节细胞 (RGCs) 中细胞内记录的 rd1 振荡的变化与 M-电流激活剂和阻断剂作用下的 AII 中的变化类似。A: 在氟吡汀的存在下, RGCs 的 rd1 振荡被破坏。Ai: 氟吡汀下代表性的 RGCs 膜电位。氟吡汀降低了振荡频率 (Aii) 并降低了簇放电持续时间 (Aiv)。Aiii: 氟吡汀洗涤期间初始和最终簇放电长度显著减少 ($n=3$, $P<10^{-3}$)。B: 在 LP 存在下, RGCs 中的 rd1 振荡被破坏。Bi: LP 下代表性的 RGCs 膜电位。LP 导致振荡频率 (Bii) 降低, 簇放电持续时间 (Biv) 增大。每次持续 5 s 的扫描是平均簇放电持续时间。Biii: LP 冲洗期间的初始和最终簇放电长度显著增加 ($n=4$; $P<10^{-3}$)。

在细胞外电极记录中，我们研究了每个单位以及多单位活性（MUA）中存在的振荡。在 LP 应用下，单个和多个活性都与 AII 振荡的变化一致。代表性的单个单位活性在图 11A 中示出。显然，LP 下的振荡比 L-AP4 和冲洗条件下的振荡慢。同样，在 LP 下，峰值间间隔显示的非零峰值（810 毫秒）比在 L-AP4 或冲洗下更高。图 11B 显示了单个单位的综合簇放电统计。在 L-AP4（n=61）下，单个单位簇放电长度的中位数为 49 ms，四分位间距（IQR）为 45-59 ms。这些振荡的频率中值为 6.2 Hz，IQR 为 4.8 - 6.7 Hz。使用 LP 时，单个单位的簇放电长度（n=18）增加到 64 ms，其 IQR 范围从 40 到 120 ms。这些振荡的频率下降到中值 1.37 Hz，IQR 为 1.08-1.6 Hz，这与我们在 LP 下从 AII 观察到的一致。然后，对于冲洗条件，单个单位的振荡频率（n=34）增加返回接近为初始 L-AP4 条件找到的值，并且平均簇放电长度降低至 51 ms，IQR 为 39-67 ms。

我们还检查了 LP 对 MUA 的影响。图 12A 中 MUA 的频谱图表明，LP 应用减慢了 MUA 振荡。基于 MUA，在 L-AP4 条件下（n 52）的振荡通道的中值振荡频率为 7.5 Hz，IQR 为 4.8–9.6 Hz。对于 LP 条件（n 70），振荡通道的中值频率为 1.75 Hz，IQR 为 1.2–4.8 Hz。然后，对于冲洗条件（n 66），我们观察到振荡频率朝着其初始值增加（图 12B）。

在氟吡汀下也进行了细胞外记录（2 个实验），我们观察到完全消除了振荡或降低了簇放电频率。但是，我们在此未报告氟吡汀对 RGCS 的簇放电活性的细胞外记录摘要统计信息，因为在这种情况下，我们没有分离出统计学上显著数量的单个单位（n=7）

总之，细胞内记录，单个单位细胞外记录和多单位细胞外记录均显示在 LP 和氟吡汀下消除了 RGCS 中的振荡活性。此外，RGCS 的簇放电频率和簇放电持续时间变化与 AIIs 一致，这提供了强有力的证据证明 RGCS 的振荡确实来自 rd1 视网膜的上游 AII 细胞。

讨论

实验和计算相结合的方法用于检验 rd1 视网膜内 AII 振荡是固有的以及快速，去极化 Na 和慢速，超极化 M 型 K 电导之间相互作用的结果的假设。在这种情况下，振荡是由于 rd1 AII 相对于野生型 AII 超极化而在末梢房室中自主簇放电的结果。我们分析了 AII 的房室模型（Cembrowski 等，2012），以预测 AII 对 M-型 K 电流的药物处理的预期电生理反应，并进行了这些实验。计算和实验结果相结合，完全符合我们的假设。此外，神经节细胞的单细胞和多电极阵列记录表明，改变的 AII 活性未改变地传播到神经节细胞。我们的结论是，在 rd1 视网膜中神经节细胞的振荡输出反映了 AII 无轴突细胞的内在特性。

rd1 视网膜神经元簇放电的潜在机制。 rd1 视网膜中间神经元中的自发振荡活性已经在许多研究中得到了证明（Borowska 等，2011； Margolis 等，2014； Toychiev 等，2013； Trenholm 等，2012）。因为阻断 AII 之间以及 AII 与 ONCB 细胞之间的电传递会抑制它，所以该活性已被表征为异质神经网络的新兴特性（Trenholm et al. 2012）。

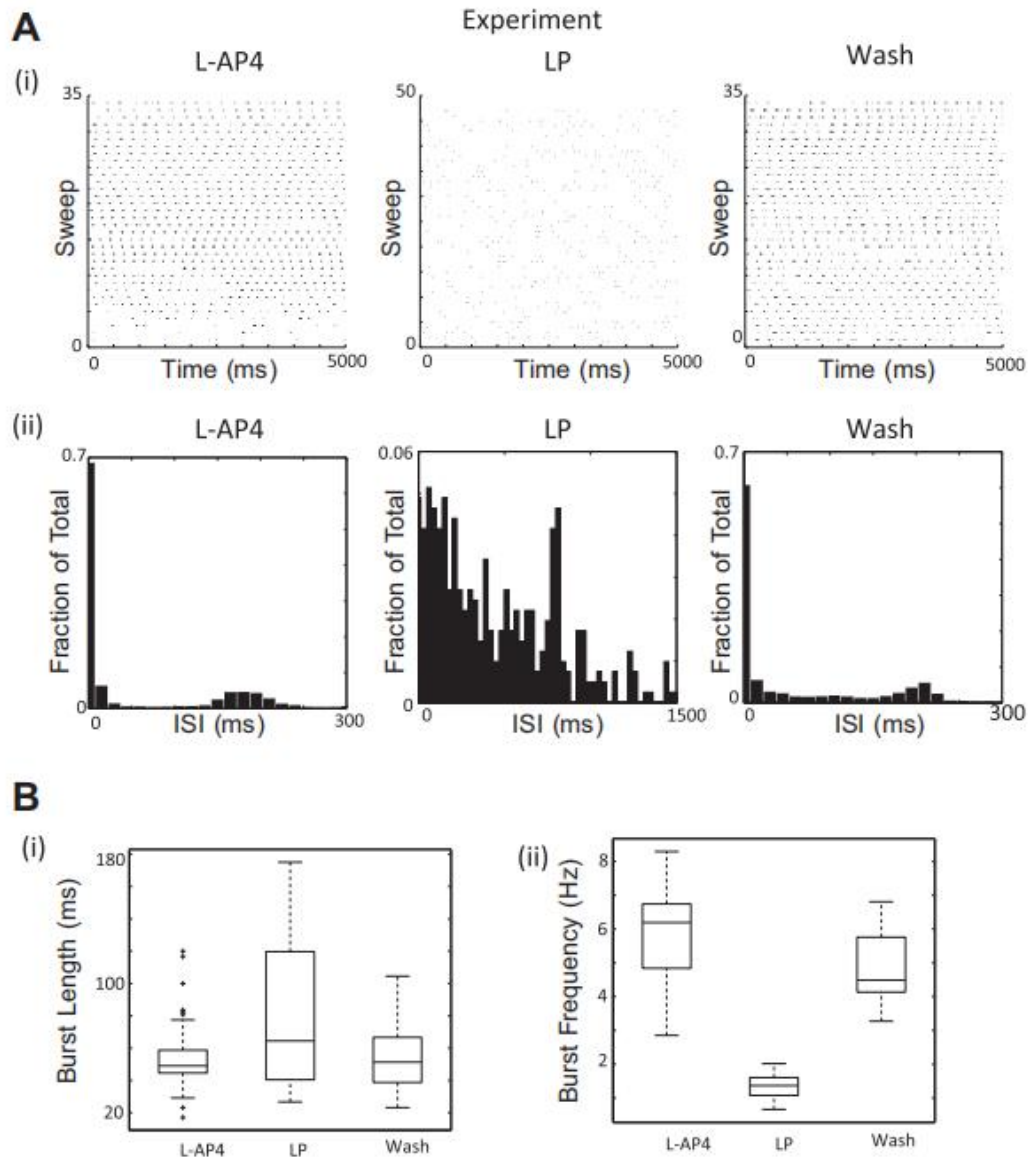


图 11: 单个 RGCs 的细胞外记录显示消除了 M-电流阻滞剂下的振荡。A: 代表单个单位。Ai: 在 L-AP4, LP 和冲洗条件下的代表性单个细胞的条形图, 以及它们的 (Aii) 峰电位间距 (ISI) 分布, 对于 L-AP4 /冲洗和 LP 条件分别具有 15-ms 和 30-ms 仓位大小。在 LP 条件下, ISI 分布的非零峰值出现在~810 ms 内, 这明显高于 L-AP4 (180 ms) 和冲洗 (210 ms) 下的峰值。与 L-AP4 和冲洗条件相比, LP 下的条形图还显示出较慢的节奏活动。B: 单个单位的簇放电统计。Bi: L-AP4, LP 和冲洗条件的平均簇放电长度。Bii: L-AP4, LP 和冲洗条件的振荡频率。

然而, 我们的研究支持一个不同的结论: rd1 视网膜的振荡主要由 AII 无轴突细胞的内在特性解释, 与野生型 AII 中所观察到的相比, 它们具有超极化的电势 (图 3)。我们的 AII 房室模型预测的许多实验结果都支持这种说法。特别是, rd1 视网膜中 AII 的簇放电波形非常类似于由超极化引起的野生型 AIIs 的簇放电 (图 3)。我们的房室模型会重现这些簇放电, 这使我们能够预测簇放电的特征, 特别是 M 型 K 电流所起的作用, 然后可以进行实验测试。

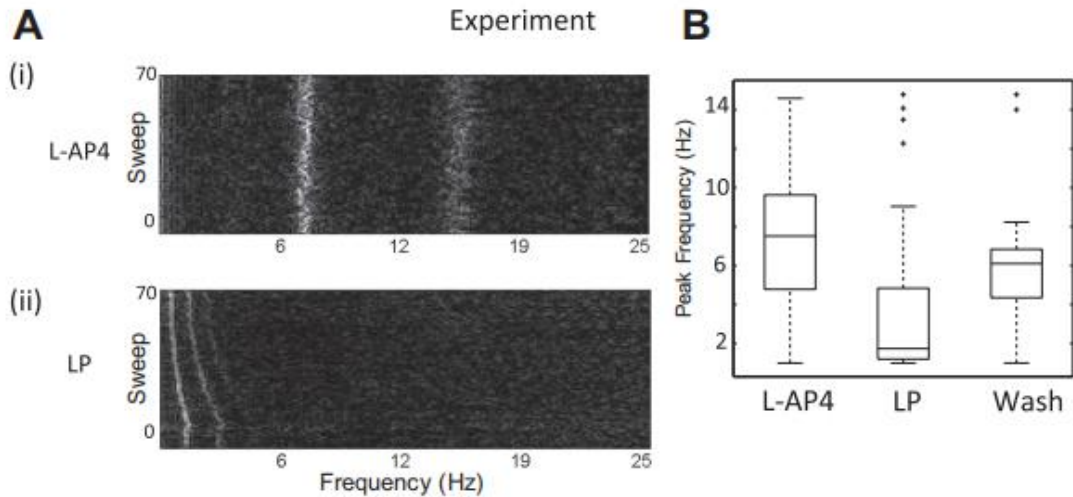


图 12: 细胞外记录的多单位活性(MUA)显示 RGC 振荡对 M-型 K 电流的依赖性。MUA 振荡分析。A: 在 L-AP4 和 LP 条件下, 通道 MUA 振荡示例。光谱图以 5-s 长的扫描间隔, 重叠 2.5-s。对于 MUA, L-AP4 条件下有 52 个通道具有振荡活性, LP 条件下有 70 个通道具有振荡活性, 冲洗条件下有 66 个通道具有振荡活性。B: L-AP4, LP 和冲洗条件下 MUA 振荡频率的箱线图。

我们的模型表明, 增强 M-型 K 电流将首先减少簇放电持续时间并降低振荡频率, 然后消除振荡, 阻塞 M-型 K 电流将增加簇放电持续时间并降低振荡频率, 我们的实验证实了这些预测 (图 7 和 8)。在神经节细胞中也观察到了 M-型 K 电流的药理作用的相应作用 (图 10 12), 这表明 AII 中的活性未改变地传播到神经节细胞。

在我们的模型中初始地产生了 AII 的簇放电, 这表明 rd1 小鼠中 AII 的超极化可能是振荡的主要原因。由于我们的模型是在对野生型 AII 的研究中开发的 (Cembrowski 等人, 2012), 因此我们建议 rd1 视网膜中的 AII 在功能上与野生型 AII 类似。与此概念一致, TTX 阻止了 rd1 AII 中的簇放电, 就像在野生型 AII 中一样 (Cembrowski 等人 2012; Trenholm 等人 2012; Margolis 等人 2014)。但是, Menzler 和 Zeck (2011) 使用的 TTX 浓度较低, 并未消除与 rd1 小鼠神经节细胞振荡相关的局部场电势振荡。

总而言之, rd1 振荡是电缆过滤的脉冲串, 由快速脉冲产生的 Na 和缓慢激活的 M-型 K 电导之间的相互作用产生。当在野生型视网膜中将 AIIs 相对去极化时, 细胞表现出自发的强直性脉冲, 而过多的超极化会使细胞进入静止状态。但是, 介于两者之间的膜电位范围会导致 AII 中的自动簇放电。

正如其他人所观察到的那样 (Trenholm 等人, 2012), 在我们的实验中, 间隙连接的阻碍剂变慢, 然后阻止了 rd1 视网膜的振荡 (图 1)。我们的模型也对此进行了预测 (图 5)。此外, 我们的模型进一步预测, 并且我们的实验证实, 可以通过注入去极化电流来恢复存在 MFA 的单个 AII 的簇放电 (图 6)。这支持了振荡是由单个的 AII 引起的, 而不是由先前提出的网络效应引起的 (Trenholm

et al. 2012)。根据这些结果，我们认为，MFA 的主要作用是通过消除 AII 与更多去极化 ONCB 细胞的偶合作用来实现 AII 的超极化。因此，我们的研究支持以下结论：AII 之间的同型电耦合不会促进 AII 的簇放电，AII 与 ONCB 细胞之间的异型电耦合主要是相关的，因为它会影响 AII 的膜电位。

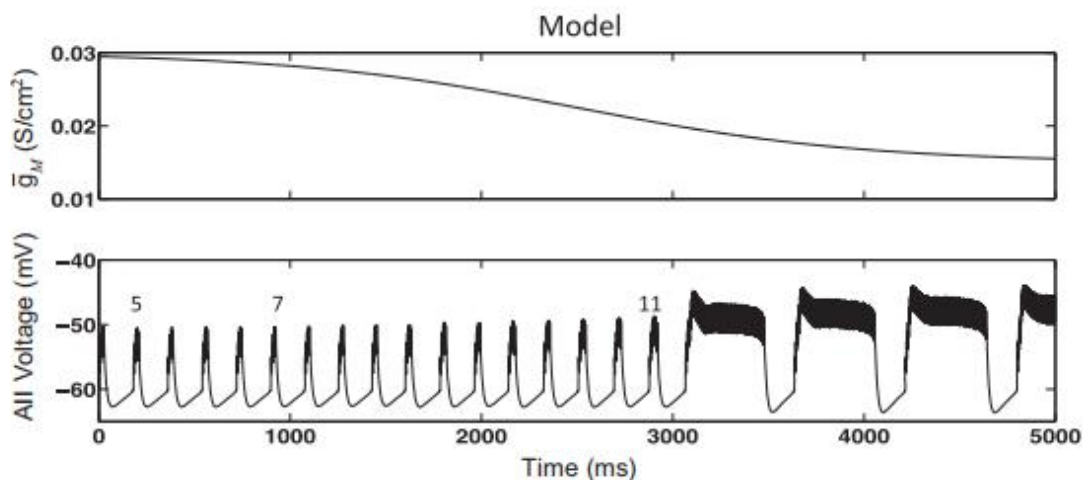


图 13: FitzHugh-Nagumo 型 Ca^{2+} 模型介导了与 AII 耦合的 ONCB 中的慢振荡。在这个模拟中， \bar{g}_M 以 S 型的方式减少，模仿 LP 应用程序。脉冲持续时间增加，当它达到一个临界值时，波形从特征的 rd1 振荡过渡到性质不同的慢振荡。如上图所示，每次突刺的数量随着下降 \bar{g}_M 而增加。

慢的 Ca 通道依赖性振荡。我们发现，应用 M-型 K 电流阻碍剂 LP 可以降低振荡频率并延长簇放电持续时间，与我们的模型一致（图 8）。然而，LP 也会在似乎涉及 Ca 通道的 AII 中引起缓慢的（~1 Hz）振荡（图 9）。这些缓慢振荡的簇放电频率和波形类似于先前在孤立的 ONCB 细胞中观察到的 Ca 通道依赖性再生性（Ma 和 Pan, 2003 年），以及在抑制被阻滞时在整个视网膜中观察到的现象（Yee 等, 2012）。我们推测，在 LP 存在下增强的簇放电持续时间可能会允许 AII 中的活性触发 ONCB 细胞中的此类再生事件。反过来，ONCB 细胞中的再生事件会调节 AII 电压。

为了说明这种情况的可行性，我们扩展了被动 ONCB 细胞模型，使其包含 FitzHugh-Nagumo 类型的简单模型（Fitzhugh 1961），以允许发生再生事件。活跃的 ONCB 细胞与模型 AII 耦合（Choi 2014）。在该模拟中，减小最大的 M 型 K 电导以模仿 LP 的施加会导致从短脉冲突然过渡到更长的去极化事件，在这些事件上叠加了脉冲（图 13）。但是，我们没有评估该模型是否涵盖了实验观察到的由 LP 引起的缓慢振荡过渡的所有方面。尽管这是一个有趣的问题，但我们认为它超出了当前工作的范围。

图 13. Ca^{2+} 介导的 ONCB 与 AII 耦合的慢振荡的 FitzHugh-Nagumo 型模型。在此仿真中， \bar{g}_M 以类似于 LP 应用的 S 形形式降低。簇放电持续时间增加，并且当达到临界值时，波形会从特征 rd1 振荡过渡到定性不同的慢速振荡。如图所示，随着 \bar{g}_M 降低，每个簇放电的脉冲数量增加。

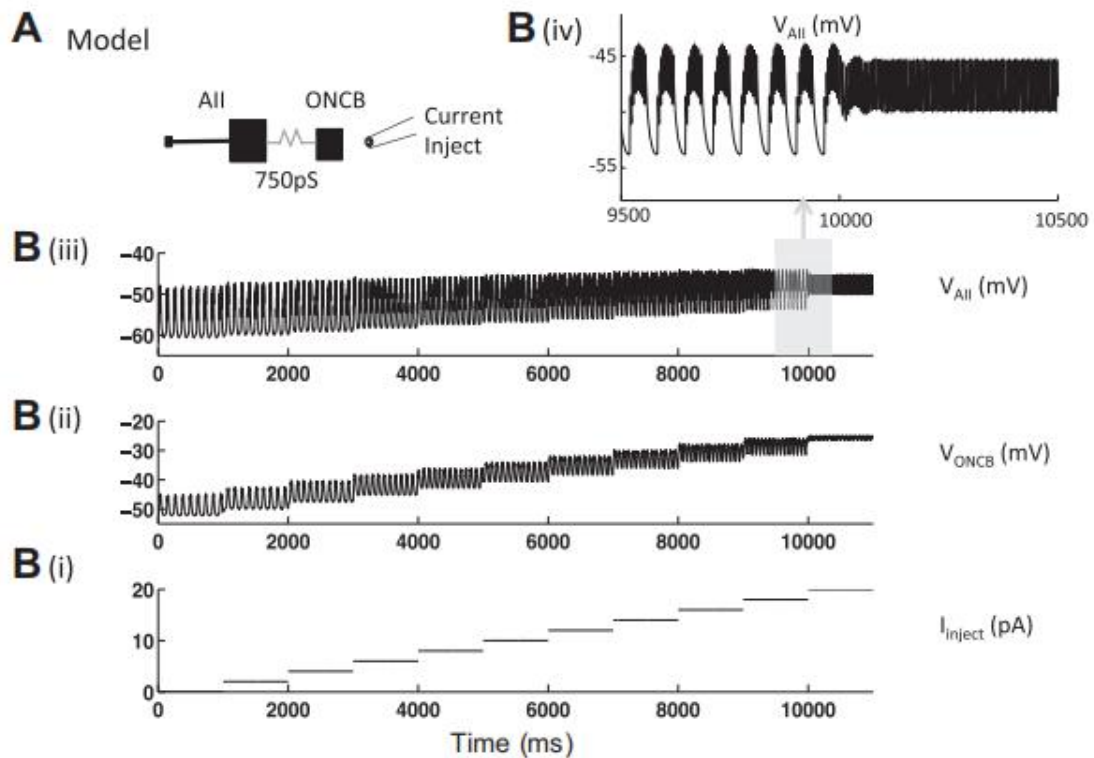


图 14: 在模型中, 对 ONCB 注入去极化电流可抑制耦合的 AII 中的簇放电。A: 被动 ONCB 以 750 pS 的耦合强度耦合到 AII 细胞。B: 当前在 ONCB (Bi) 中注入 20 pA 的电流可使 ONCB (Bii) 去极化, 并消除了耦合的 AII (Biii 和 Biv) 中的簇放电。

临床意义。最近的一项研究表明, MFA 阻断了 rd10 小鼠视网膜的特征性振荡活性, 而 rd10 小鼠的视网膜退化表型不如 rd1 小鼠严重, 并且改善了从存活的光感器到神经节细胞的信号传递 (Toychiev et al.2013)。但是, 由于间隙连接介导了许多不同类别的视网膜神经元之间的相互作用, 因此这一发现难以解释。因此, 阻塞所有间隙连接可能不是最有利的治疗手段。

我们的研究表明, MFA 的应用不是通过解耦 AII 网络, 而是通过对固有活性 AII 进行超极化来消除振荡。因此, 以其他方式操纵 AII 的静息膜电位可能是恢复恶化的视网膜中信号的有效且良性的方式。将光敏性引入双极细胞 (Lagali 等, 2008; Doroudchi 等, 2011) 或用视网膜假体刺激它们 (Stingl 等, 2013), 可能足以减少 AII 的超极化并防止其簇放电。

在最近的光遗传学实验中, 通过电穿孔 (Lagali 等, 2008) 或病毒载体 (Doroudchi 等, 2011) 在 ON 双极细胞中引入通道视紫红质-2 表达已成功地恢复了光诱导的生理和行为反应。因此, 研究这种光敏度在抑制 rd1 振荡方面的有效性将很有趣。为了预测 ONCB 细胞需要多少去极化来抑制振荡, 在我们的电耦合到 750 pS 的 AII 细胞的被动 ONCB 细胞模型中, 通过电流注入模拟了 ONCB 细胞的去极化 (图 14)。在我们的模型中, 电流注入 20 pA 会导致耦合的 ONCB 产生~20 mV 的去极化, 抑制了 AII 中的振荡活动并引起了强直性脉冲。尽管耦合强度和耦合 ONCB 细胞数量的可变性使我们无法预测所需的精确去极

化量,但此模拟预测 ONCB 细胞中~20 mV 的去极化足以消除耦合 AII 中的振荡。当前在 ON 双极细胞中引入光敏性的方法是否可以将 rd1 视网膜带入非簇放电状态将是未来工作的有趣话题。

参考文献

- Adams NA, Awadein A, Toma HS. The retinal ciliopathies. *Ophthalmic Genet* 28: 113–125, 2007.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Apollo N, Grayden DB, Burkitt AN, Meffin H, Kameneva T. Modeling intrinsic electrophysiology of AII amacrine cells: preliminary results. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2013: 6551–6554, 2013.
PubMed | Google Scholar
- Borowska J, Trenholm S, Awatramani GB. An intrinsic neural oscillator in the degenerating mouse retina. *J Neurosci* 31: 5000–5012, 2011.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 489–498, 1978.
PubMed | ISI | Google Scholar
- Cembrowski MS, Logan SM, Tian M, Jia L, Li W, Kath WL, Riecke H, Singer JH. The mechanisms of repetitive spike generation in an axonless retinal interneuron. *Cell Rep* 1: 155–166, 2012.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 42: 517–525, 2002.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Chang B, Hawes NL, Pardue MT, German AM, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Rengarajan K, Boyd AP, Sidney SS, Phillips MJ, Stewart RE, Chaudhury R, Nickerson JM, Heckenlively JR, Boatright JH. Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Res* 47: 624–633, 2007.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- 37. Choi H. *Modeling of Oscillations and Bursting in Retinal AII Amacrine Cells* (PhD thesis). Evanston, IL: Northwestern Univ., 2014.
Google Scholar
- Demb JB, Singer JH. Intrinsic properties, and functional circuitry of the AII amacrine cell. *Vis Neurosci* 29: 51–60, 2012.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Doroudchi MM, Greenberg KP, Liu J, Silka KA, Boyden ES, Lockridge JA, Arman AC, Janani R, Boye SE, Boye SL, Gordon GM, Matteo BC, Sampath AP, Hauswirth WW, Horsager A. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther* 19: 1220–1229, 2011.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Fine I, Wade A, Brewer A, May M, Goodman D, Boynton G, Wandell B, MacLeod D. Long-term deprivation affects visual perception and cortex. *Nat Neurosci* 6: 915–916, 2003.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Fitzhugh R. Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane. *Biophys J* 1: 445–466, 1961.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Habermann C, O'Brien B, Wassle H, Protti D. AII amacrine cells express L-type calcium channels at their output synapses. *J Neurosci* 23: 6904–6913, 2003.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar

- Harris KD, Hirase H, Leinekugel X, Henze DA, Buzsaki G. Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 32: 141–149, 2001.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368: 1795–1809, 2006.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Jimenez AJ, Garcia-Fernandez JM, Gonzalez B, Foster RG. The spatio-temporal pattern of photoreceptor degeneration in the aged rd/rd mouse retina. *Cell Tissue Res* 284: 193–202, 1996.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Lagali P, Balya D, Awatramani G, Munch T, Kim D, Busskamp V, Cepko C, Roska B. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 11: 667–675, 2008.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Ma YP, Pan ZH. Spontaneous regenerative activity in mammalian retinal bipolar cells: roles of multiple subtypes of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Vis Neurosci* 20: 131–139, 2003.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, Wensel T, Lucas RJ. Neural reprogramming in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3364–3371, 2007.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Margolis DJ, Gartland AJ, Singer JH, Detwiler PB. Network oscillations drive correlated spiking of ON and OFF ganglion cells in the rd1 mouse model of retinal degeneration. *PLoS One* 9: e86253, 2014.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Margolis DJ, Newkirk G, Euler T, Detwiler PB. Functional stability of retinal ganglion cells after degeneration-induced changes in synaptic input. *J Neurosci* 28: 6526–6536, 2008.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Menzler J, Zeck G. Network oscillations in rod-degenerated mouse retinas. *J Neurosci* 31: 2280–2291, 2011.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Murphy G, Rieke F. Network variability limits stimulus-evoked spike timing precision in retinal ganglion cells. *Neuron* 52: 511–524, 2006.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Pan F, Mills SL, Massey SC. Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 24: 609–618, 2007.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Quiroga RQ, Nadasdy Z, Ben-Shaul Y. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Comput* 16: 1661–1687, 2004.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Schmitzer-Torbert N, Jackson J, Henze D, Harris K, Redish AD. Quantitative measures of cluster quality for use in extracellular recordings. *Neuroscience* 131: 1–11, 2005.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Schmitzer-Torbert N, Redish AD. Neuronal activity in the rodent dorsal striatum in sequential navigation: separation of spatial, and reward responses on the multiple T task. *J Neurophysiol* 91: 2259–2272, 2004.
Link | ISI | Google Scholar

- Stasheff SF. Emergence of sustained spontaneous hyperactivity, and temporary preservation of OFF responses in ganglion cells of the retinal degeneration (rd1) mouse. *J Neurophysiol* 99: 1408–1421, 2008.
Link | ISI | Google Scholar
- Stingl K, Bartz-Schmidt K, Besch D, Braun A, Bruckmann A, Gekeler F, Greppmaier U, Hipp S, Hortdorfer G, Kernstock C, Koitschev A, Kusnyerik A, Sachs H, Schatz A, Stingl K, Peters T, Wilhelm B, Zrenner E. Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS. *Proc Biol Sci* 280: 20130077, 2013.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Tian M, Jarsky T, Murphy GJ, Rieke F, Singer JH. Voltage-gated Na channels in AII amacrine cells accelerate scotopic light responses mediated by the rod bipolar cell pathway. *J Neurosci* 30: 4650–4659, 2010.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Toychiev AH, Ivanova E, Yee CW, Sagdullaev BT. Block of gap junctions eliminates aberrant activity and restores light responses during retinal degeneration. *J Neurosci* 33: 13972–13977, 2013.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Trenholm S, Borowska J, Zhang J, Hoggarth A, Johnson K, Barnes S, Lewis T, Awatramani G. Intrinsic oscillatory activity arising within the electrically-coupled AII amacrine/ON cone bipolar cell network is driven by voltage-gated Na⁺ channels. *J Physiol* 590: 2501–2517, 2012.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Veruki ML, Hartveit E. Electrical synapses mediate signal transmission in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci* 22: 10558–10566, 2002.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Wu SN, Hsu MC, Liao YK, Wu FT, Jong YJ, Lo YC. Evidence for inhibitory effects of flupirtine, a centrally acting analgesic, on delayed rectifier K⁺ currents in motor neuron-like cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 148403, 2012.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Ye JH, Goo YS. The slow wave component of retinal activity in rd/rd mice recorded with a multi-electrode array. *Physiol Meas* 28: 1079–1088, 2007.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar
- Yee CW, Toychiev AH, Sagdullaev BT. Network deficiency exacerbates impairment in a mouse model of retinal degeneration. *Front Syst Neurosci* 6: 8, 2012.
Crossref | PubMed | Google Scholar
- Zenisek D, Matthews G. Calcium action potentials in retinal bipolar neurons. *Vis Neurosci* 15: 69–75, 1998.
Crossref | PubMed | ISI | Google Scholar