

荷包牡丹碱和马钱子碱对小鼠皮层及下丘听神经元声反应潜伏期的影响*

张娟^{1,2)} 邱强^{1,2)} 唐杰^{1,2)} 肖中举^{1,3)**} 沈钧贤^{1)**}

¹⁾中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101;

²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039; ³⁾南方医科大学基础医学院生理教研室, 广州 510515)

摘要 频率和强度是声音的两个重要参数, 通常以听觉神经元动作电位发放频次编码这两个参数. 研究表明, 声反应潜伏期也可编码声音频率和强度, 但尚不清楚潜伏期编码这两个参数究竟发生于哪一级听觉核团. 如果声音参数由同级中枢编码, 则这样的编码方式可能发生改变. 反之, 如果编码方式未发生变化, 则意味着声音信息是由低位神经元编码的. GABA 和甘氨酸 (Gly) 是听中枢普遍分布的抑制性递质. 通过施加它们的拮抗剂荷包牡丹碱和马钱子碱, 观测小鼠皮层和下丘听神经元声反应潜伏期的变化. 结果表明, 由反应潜伏期表征声音频率和强度的关系不因 GABA 和 Gly 作用的变化而发生变化, 提示频率和强度与反应潜伏期之间的编码关系可能是由低位听神经元编码并向上传递的, 而不是在同级中枢 (皮层或下丘) 完成的.

关键词 听觉神经元, 反应潜伏期, 特征频率, 声强, 荷包牡丹碱, 马钱子碱

学科分类号 Q6

用神经元放电时间模式而不是放电频次来编码感觉刺激, 在过去十几年越来越受到重视. 研究表明, 神经动作电位脉冲所携带的毫秒级时间信息可能比脉冲发放数目编码更多的信息^[1-6]. 尽管长时间脉冲发放的累积平均结果会有助于用放电频次编码的准确性, 但是, 如果单次刺激诱发的神经元脉冲发放数目很小, 则脉冲发放频次所编码的信息就很难准确. 在听觉通路的一些结构中, 如听皮层, 神经元脉冲发放可能只有一个, 尤其是对瞬间声刺激的反应^[7,8], 此时脉冲发放的时间信息似乎更为重要. Petersen 等^[9](2001年)指出, 体感总信息的82%~85%包含在脉冲发放的时间信息中, 而以第一个脉冲发放的时间信息尤为重要. 第一动作电位潜伏期 (first-spike latency, FSL) 定义为从刺激开始到第一个脉冲发放所需要的时间; 在使用重复刺激情况下, 用平均潜伏期更为有意义. 前人研究表明: 一部分与刺激时程相关的下丘听神经元的反应潜伏期可以被 GABA-A 或甘氨酸 (Gly) 的拮抗剂荷包牡丹碱 (bicuculline) 或马钱子碱 (strychnine) 减小至最小值^[10]. 考虑到 GABA、Gly 是听中枢广泛存在的两种抑制性递质, 本文研究在 GABA 和 Gly 的作用下声音频率和强度与反应潜伏期之间关系的变化, 寻找频率和强度信息的编码位置.

1 材料和方法

1.1 动物与手术

实验动物为雌性成年 BALB/c 小鼠, 4~6 周龄, 体重 12~16 g, 由维通利华动物实验中心提供. 手术前, 皮下注射阿托品 (atropine, 0.25 mg/kg) 以减少呼吸道的分泌物, 然后腹腔注射戊巴比妥钠 (sodium pentobarbital, 60 mg/kg) 进行麻醉. 在下丘实验时, 剪开小鼠头部皮肤暴露颅骨, 将一平底螺丝钉用离子粘合剂固定在颅骨前部正中, 然后暴露右侧下丘, 除去硬脑膜. 在听皮层实验时, 暴露左侧皮层, 除去硬脑膜. 手术后, 用生理盐水浸过的脱脂棉球敷在创口表面. 实验中, 将小鼠置于电磁屏蔽、防震、无回声、恒温的隔音室中, 用螺丝钉将小鼠头部固定, 保持水平. 实验中, 给予戊巴比妥钠 (10~15 mg/kg) 以维持其处于半清醒状态.

*国家自然科学基金资助项目(90208012, 30170250, 30270440), 国家科技部基础研究重大项目前期研究专项(2100CCA00700), 中国科学院创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-602-2)和广东省自然科学基金资助项目(32870).

** 通讯联系人.

沈钧贤. Tel: 010-64888542, E-mail: shenjx@sun5.ibp.ac.cn

肖中举. Tel: 020-61360219, E-mail: xiaozj@fimmu.com

收稿日期: 2005-05-10, 接受日期: 2005-07-08

1.2 声音刺激

用纯音作为声音刺激(时程 50 ms, 上升和下降时间各 5 ms). 试验中使用 Tucker-Davis Technologies-3 系统提供声刺激和信号记录: 用软件 SigGen 合成声音信号, 用软件 BrainWare 通过硬件 RP2.1 型 Real-time Processors 产生声信号, 传送到衰减器(PA5 Programmable Attenuator)进行强度衰减, 经喇叭驱动器(ED1 Electrostatic Speaker Driver)使高频喇叭(ES1 型 Free-Field Electrostatic Speaker)发声, 给予动物声音刺激. 通过软件 SigGen 和 BrainWare 进行自动或者手动调节声音频率和强度. 试验前, 喇叭在各种声音频率下的输出由 B&K4135 型探头和 2610 型测量放大器校正, 以 dB SPL (0 dB SPL 相当于 20 μ Pa) 表示. 实验开始用声强 79.5 dB SPL 的噪声作为刺激寻找神经元. 给声速率为下丘 1 次 /s, 皮层 1 次 /3 s. 喇叭与小鼠双耳处于同一个水平高度, 位于小鼠双耳连线中线正前方 50 cm 处.

1.3 神经元反应记录

记录使用玻璃微电极, 记录电极固定在尖端偏离五管 piggy-back (WPI) 电极 20° 约 10 μ m 左右的位置. 记录电极管内灌注 2 mol/L NaAc 溶液, 通过推进器 (SM-21 型, Narishige 公司) 控制分别垂直于下丘及皮层表面刺入, 推进速度为 1 μ m/step. 用扫频声音作为刺激, 连续推进电极来寻找听神经元. 在找到一个神经元后, 用不同频率和强度的纯音刺激确定该神经元的特征频率 (characteristic frequency, CF) 及最低阈值 (minimum threshold, MT, 神经元发放脉冲的频次为 0.1 左右时的声刺激强度定义为该频率下的反应阈值). 以神经元的 CF、MT 之上不同强度, 以及不同频率、MT 以上 10 dB 的纯音作为声音刺激, 记录神经元动作电位的发放, 重复记录 10 次.

1.4 药物电泳

用五管 piggy-back (WPI) 电极 (尖端直径 10~15 μ m) 电泳注入抑制性神经递质的拮抗剂. 多管内分别注入甘氨酸 (Gly) 受体的拮抗剂马钱子碱 (strychnine hydrochloride, Stry; 20 mmol/L, pH 5.8~6.0), GABA-A 受体的拮抗剂荷包牡丹碱 (bicuculline methiodide, BMI; 20 mmol/L, pH 3), NaCl (165 mmol/L) 作为平衡电流. 实验中, 使用 -15 nA 的保持电流阻止药物的渗透, 使用 +100 nA 电流作为给药电流. 给药 BMI 记录后, 恢复一段时间, 再给药 Stry 进行相同记录.

1.5 数据的采集和处理

记录电极尖端直径约 1 μ m, 阻抗 10~20 M Ω , 通过前置放大器 (RA16PA, 16 道 Medusa PreAmp) 进行信号放大, 用软件 BrainWare 在 RA16 型 Medusa Base Station 进行信号采集. 寻找到一个神经元后, 以该神经元的 CF、阈上不同强度以及不同的频率、最低阈值以上 10dB 的纯音作为刺激, 记录神经元的脉冲发放, 重复记录 10 次, 得到一系列累计刺激前后直方图 (cumulative peristimulus time histograms, PSTH), 神经脉冲发放频次和第一个神经脉冲的平均潜伏期. 然后给药 BMI, 同样记录以上内容; 待恢复正常后, 给药 Stry, 记录相同内容. 分析第一个神经脉冲的潜伏期与声刺激强度和频率的关系.

2 结 果

本实验中记录到 17 个下丘神经元的特征频率范围为: 13~36 kHz, 12 个皮层 A1 区神经元的特征频率范围为 11~19 kHz, 下丘神经元的反应阈值为 25~74 dB SPL, 潜伏期范围 9.86~20.55 ms, 皮层神经元反应阈值为 38~82 dB SPL, 潜伏期范围 10.81~23.54 ms.

一个下丘听觉神经元声反应时脉冲发放的示波图如下:



2.1 药物影响听觉神经元的兴奋性

通常以听觉神经元的脉冲发放数目来表示神经元的兴奋性. 在记录到的全部下丘和皮层 A1 区神经元中, 施加 BMI 或 Stry 都能明显提高这些神经元的兴奋性. 以 A1 神经元为例 (图 1), 给药 BMI 前后频率反应曲线有显著性变化 (成对 *t* 检验, $t = 4.121$, $P < 0.005$, $n = 7$), 给药 Stry 前后也有显著性变化 ($t = 4.473$, $P < 0.005$, $n = 7$).

2.2 给药 BMI 后反应潜伏期变化

全部 12 个皮层 A1 区神经元中有 8 个记录到给药 BMI 后的反应. 反映在声音频率 - 潜伏期曲线关系中, 有 6 个神经元潜伏期减小 (占 75%), 给药前后反应潜伏期有着显著性的变化 (图 2a,

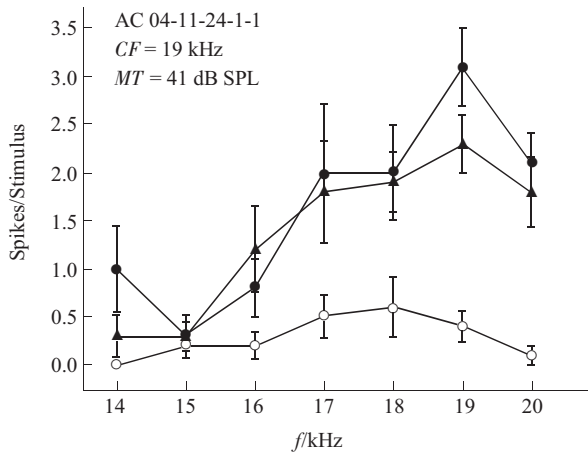


Fig. 1 Frequency - spike count curves of an auditory neuron in A1 area after application of BMI, or strychnine ●—●: After application of BMI; ○—○: No drug application; ▲—▲: After application of strychnine. The excitability of an auditory cortical neuron was enhanced after the iontophoresis of BMI (paired *t*-test, $t = 4.121$, $P < 0.005$, $n = 7$) or strychnine (paired *t*-test, $t = 4.473$, $P < 0.005$, $n = 7$).

AC04-12-06-5-1 神经元, 成对 *t* 检验, $t = 4.172$, $P < 0.005$, $n = 8$), 但曲线的形状在给药前后变化比较小, 其余 2 个神经元潜伏期基本不变 (占 25%), 给药前后曲线的形状变化也不大。

反应潜伏期不管是减小还是不变, 这些曲线的基本形状变化都比较小, 曲线的最低点在给药前后都对应着该神经元的特征频率 ($CF = 14$ kHz, 图 2a), 意味着这些神经元反应的潜伏期与声音频率之间的编码关系维持着相对的稳定。

在声音强度 - 潜伏期曲线关系中, 有 7 个神经元的潜伏期减小 (占 87.5%), 给药 BMI 前后反应的潜伏期有着显著性变化 (图 3a, AC04-12-06-5-1 神经元, 成对 *t* 检验, $t = 4.467$, $P < 0.001$, $n = 9$), 但给药前后曲线形状变化比较小, 另外有 1 个神经元的潜伏期增大 (占 12.5%), 曲线的形状在给药前

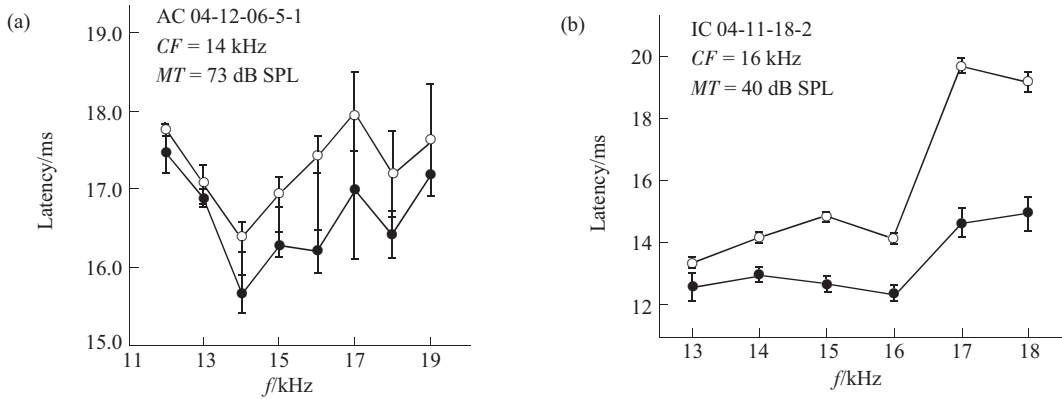


Fig. 2 Effect of BMI on the frequency-latency curves of auditory neuron in mouse

(a) The frequency-latency curves of an auditory neuron in A1 area after application of BMI and no application. ●—●: After application of BMI; ○—○: No application. The two curves differ significantly (paired *t*-test, $t = 4.172$, $P < 0.005$, $n = 8$). (b) The frequency-latency curves of an auditory neuron in IC before and after application of BMI. ●—●: After application of BMI; ○—○: No application. The two curves differ significantly (paired *t*-test, $t = 4.53$, $P < 0.005$, $n = 6$).

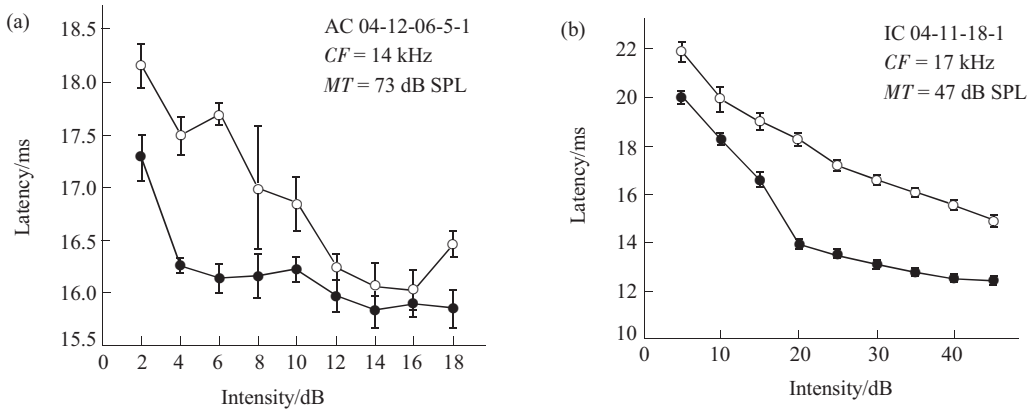


Fig. 3 Effect of BMI on the intensity-latency curves of auditory neuron in mouse

(a) The intensity-latency curves of an auditory neuron in A1 area before and after application of BMI. (The *x*-coordinate is expressed by the intensity over the neuron threshold, MT). ●—●: After application of BMI; ○—○: No application. The two curves differ significantly (paired *t*-test, $t = 4.467$, $P < 0.001$, $n = 9$). (b) The intensity-latency curve of an auditory neuron in IC before and after application of BMI. (The *x*-coordinate is expressed by the intensity over the neuron threshold, MT). ●—●: After application of BMI; ○—○: No application. The two curves differ significantly (paired *t*-test, $t = 9.74$, $P < 0.001$, $n = 9$).

后变化也比较小. 较小的声音强度 - 潜伏期曲线基本形状变化, 意味着这些神经元反应的潜伏期与声音强度之间编码关系维持着相对稳定.

记录到的 17 个下丘神经元中有 11 个观测到给药 BMI 的影响: 在声音频率 - 潜伏期曲线中, 有 10 个神经元的潜伏期减小 (占 90.91%), 并且反应的潜伏期在给药前后有着显著性的变化 (图 2b, IC04-11-18-2 神经元, 成对 t 检验, $t = 4.53$, $P < 0.005$, $n = 6$), 但曲线的形状在给药前后变化比较小, 还有 1 个神经元的潜伏期是增大的 (占 9.09%), 曲线的形状在给药前后变化也比较小.

声音强度 - 潜伏期曲线中, 听觉神经元反应的潜伏期均显著性减小 (图 3b, IC04-11-18-1 神经元, 成对 t 检验, $t = 9.74$, $P < 0.001$, $n = 9$), 但给药前后曲线的形状变化不大.

因此, 对于所记录到的下丘和皮层 A1 区听神经元, 它们的声音频率及强度与潜伏期的关系基本不受 BMI 的影响, 即具有相对的不变性, 可以用反应潜伏期来表征听觉神经元的特征频率和声刺激强度.

2.3 给药 strychnine 后反应潜伏期变化

12 个皮层 A1 区神经元中, 观测到 7 个神经元在给药 strychnine 后的影响. 在声音频率 - 潜伏期曲线关系方面, 有 6 个神经元 (占 85.7%) 的反应潜伏期在给药前后明显地减少 (图 4a, AC04-12-02-1-1 神经元, 成对 t 检验 $t = 4.37$, $P < 0.01$, $n = 7$), 但曲线的形状变化比较小. 另外 1 个神经元的潜伏期基本不变 (占 14.3%).

在给药前后的反应潜伏期不管是减小还是不

变, 听觉神经元的声音频率 - 潜伏期曲线的基本形状变化比较小, 曲线的最低点在给药前后都对应对应着该神经元的特征频率 ($CF = 12$ kHz, 图 4a), 意味着这些神经元反应的潜伏期与声音频率之间的编码关系维持着相对的稳定.

在声音强度 - 潜伏期曲线关系中, 给药前后全部神经元的潜伏期均为显著减小 (图 5a, AC04-12-17-1-1 神经元, 成对 t 检验 $t = 7.26$, $P < 0.001$, $n = 9$), 但曲线基本形状变化比较小. 给药 strychnine 前后, 声音强度 - 潜伏期曲线基本形状变化比较小意味着这些听神经元反应的潜伏期与声音强度之间编码关系具有相对的不变性.

17 个下丘神经元中有 10 个观测到给药 strychnine 的影响: 声音频率 - 潜伏期曲线中, 全部神经元的反应潜伏期在给药前后均为显著减小 (图 4b, IC04-12-17-1-1 神经元, 成对 t 检验 $t = 3.798$, $P < 0.05$, $n = 5$), 但曲线的形状在给药前后变化并不明显.

声音频率 - 潜伏期曲线的最低点在给药前后都对应对应着该神经元的特征频率 (14 kHz, 图 4b), 其基本形状维持一定的稳定性, 意味着这些神经元反应的潜伏期与声音频率之间的编码关系维持着相对的不变性.

声音强度 - 潜伏期曲线中, 有 8 个神经元的潜伏期减小 (占 80%), 并且反应的潜伏期在给药前后有着显著性变化 (图 5b, 04-11-18-1 神经元, 成对 t 检验 $t = 9.64$, $P < 0.001$, $n = 6$), 有 1 个神经元的潜伏期增大 (占 10%), 另 1 个神经元的潜伏期不变 (占 10%), 曲线的形状在给药前后变化均比较

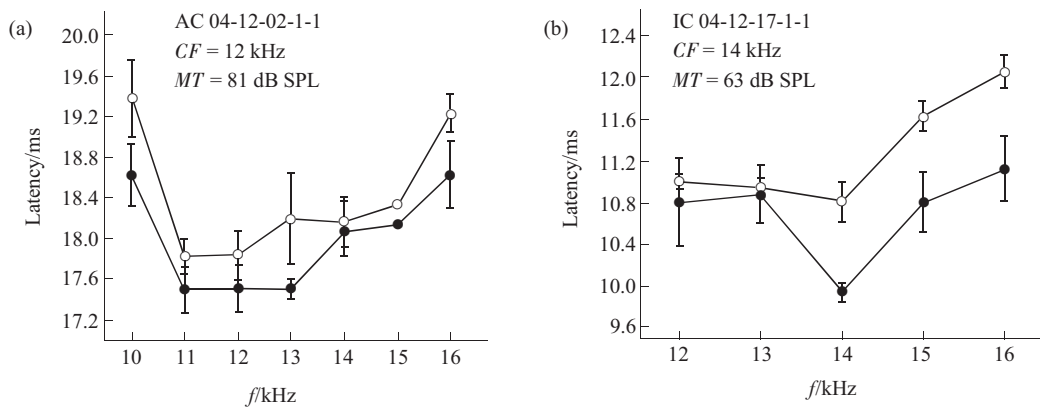


Fig. 4 Effect of strychnine on the frequency-latency curves of auditory neuron in mouse

- (a) The frequency-latency curves of an auditory neuron in A1 area after application of strychnine and no application. ●—●: After application of strychnine; ○—○: No drug application. The two curves differ significantly (paired t -test, $t = 4.37$, $P < 0.01$, $n = 7$).
- (b) The frequency-latency curves of an auditory neuron in IC after application of strychnine and no drug application. ●—●: After application of strychnine; ○—○: No drug application. The two curves differ significantly (paired t -test, $t = 3.798$, $P < 0.05$, $n = 5$).

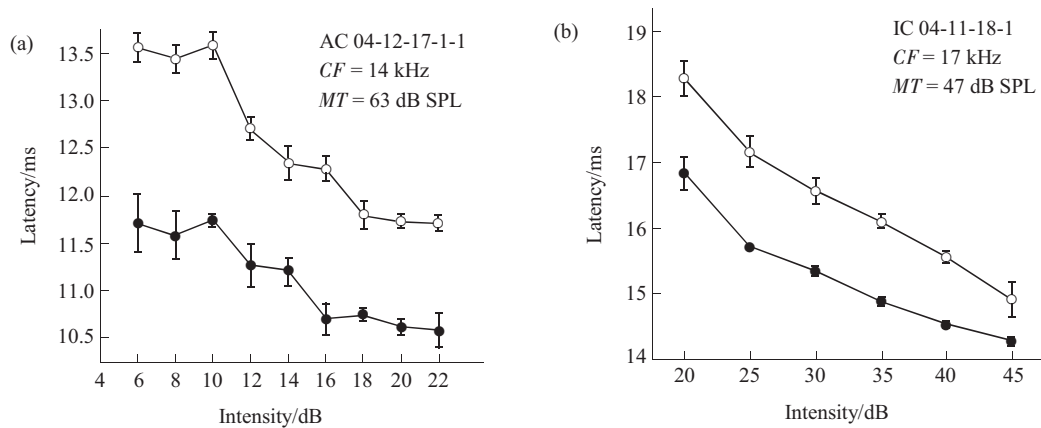


Fig. 5 Effect of strychnine on the intensity-latency curves of auditory neuron in mouse

(a) The intensity-latency curve of auditory neuron in A1 area before and after application of strychnine. (The x -coordinate is expressed by the intensity over the neuron threshold, MT). ●—●: After application of BMI; ○—○: No drug application. The two curves differ significantly (paired t -test, $t = 7.26$, $P < 0.001$, $n = 9$). (b) The intensity-latency curve of auditory neuron in IC before and after application of BMI. (The x -coordinate is expressed by the intensity over the neuron threshold, MT). ●—●: After application of BMI; ○—○: No drug application. The two curves differ significantly (paired t -test, $t = 9.64$, $P < 0.001$, $n = 6$).

小. 这意味着这些神经元反应的潜伏期与声音强度之间编码关系维持着相对稳定.

这些结果表明, 听觉神经元的声音频率及强度与潜伏期的关系基本不受 strychnine 的影响, 用潜伏期表征神经元的特征频率和声音强度具有相对不变性.

3 讨 论

本研究结果表明, 施加 BMI 或 strychnine 前后, 听觉神经元的声音频率 - 潜伏期曲线和声音强度 - 潜伏期曲线的基本形状变化比较小, 说明这些曲线反映的基本性质维持着相对的稳定. 例如, 在声音频率 - 潜伏期曲线中, 反应潜伏期的最小值总是与该神经元的特征频率相对应. 这意味着反应潜伏期所表征的听觉神经元的特征频率和强度特征分别是由 IC 或 AC 以下的低位中枢进行编码, 而不是由本级中枢表征. 此外, 这样的信息表征在传递过程中不受 GABA-A 和 Gly 受体的影响, 因为在施加它们的拮抗剂后, 尽管细胞的兴奋性有所改变, 但听觉神经元对声音强度和特征频率的表征并没有改变.

本研究还观测到 GABA-A 和 Gly 的拮抗剂的作用并不总是使反应的潜伏期减小. 实际上, 有的减小, 有的增加或不变, 尽管大部分记录的神经元都表现为潜伏期减小. 原因可能是听觉神经元不都是 GABA-A 能或者甘氨酸能.

实验中还记录到了一些潜伏期比较长的神经元: 下丘神经元中反应潜伏期最长的达 20.55 ms, 而皮层神经元中反应潜伏期最长的达 23.54 ms, 明显长于该级中枢神经元的平均的反应潜伏期. 推测这些神经元可能是离皮层听觉神经元, 参与调节离皮层信息加工.

蝙蝠下丘有些听神经元编码声音时程, 反应潜伏期随着刺激时程增加而增加, 但给药马钱子碱或荷包牡丹碱后, 潜伏期被减小至最小, 且随刺激时程的变化而变化不大^[9]. 这意味着至少在下丘, GABA 和 Gly 并不影响声音基本参数(如频率、强度)表征. 那么, 声音频率和强度的编码到底发生在哪级神经元, 还有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Rieke F, Warland D, de Ruyter van Steveninck R, *et al.* Spikes. Exploring the Neural Code. Cambridge: MIT Press, 1997. 101~188
- 2 Wright B D, Sen K, Bialek W, *et al.* Spike timing and the coding of naturalistic sounds in a central area of songbirds. In: Dietterich TG, Becker S, Ghahramani Z, eds. In Advances in Neural Information Processing Systems 14. Cambridge: MIT Press, 2002. 309~316
- 3 Panzeri S, Pola G, Petersen R S. Coding of sensory signals by neuronal populations: the role of correlated activity. *Neuroscientist*, 2003, **9** (3): 175~180
- 4 Wiener M C, Richmond B J. Decoding spike trains instant by instant using order statistics and the mixture-of-poissons model. *J Neurosci*, 2003, **23** (6): 2394~2406
- 5 Mickey B J, Middlebrooks J C. Representation of auditory space by

- cortical neurons in awake cats. *J Neurosci*, 2003, **23** (25): 8649~8663
- 6 Heil P. Auditory cortical onset responses revisited. I . Firstspike timing. *J Neurophysiol*, 1997, **77** (5): 2616~2641
- 7 Heil P. Auditory cortical onset responses revisited. II . Response strength. *J Neurophysiol*, 1997, **77**: 2642-2660.
- 8 DeWeese M R, Wehr M, Zador A M. Binary spiking in auditory cortex. *J Neurosci*, 2003, **23** (21): 7940~7949
- 9 Petersen R S, Panzeri S, Diamond M E. Population coding of stimulus location in rat somato sensory cortex. *Neuron*, 2001, **32** (3): 503~514
- 10 Casseday J H, Ehrlich D, Covey E. Neural measurement of sound duration: Control by excitatory-inhibitory interactions in the inferior colliculus. *J Neurophysiol*, 2000, **84** (3): 1475~1487

The Effect of Bicuculline and Strychnine on The Latency of Neuron in Inferior Colliculus and Auditory Cortex of BALB/c Mouse*

ZHANG Juan^{1,2}, QIU Qiang^{1,2}, TANG Jie^{1,2}, XIAO Zhong-Ju^{1,3}**, SHEN Jun-Xian¹**

¹State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

³Basic Medical School, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Frequency and intensity are two of the important parameters of sounds. Many researchers use spike rate of auditory neurons to represent the two parameters generally. Some studies showed that response latency may represent frequency and intensity too. However, it is not clear where the two parameters are encoded by response latency in the auditory pathway. GABA and glycine are two ubiquitous inhibitory neurotransmitters. Iontophoretically bicuculline (antagonist to GABA-A) or strychnine (antagonist to glycine) was injected to observe the change of response latency. If the relationship between response latency and intensity or frequency has changed, sound may be encoded locally. If the relationship keeps unchanged, this information may be transferred from the inferior nervous centres. The auditory neurons in the inferior colliculus and A1 area of auditory cortex of BALB/c mouse were studied. The results show that the relationship between response latency and intensity or frequency didn't change after the application of bicuculline or strychnine. It suggests that the encoding relationship between response latency and intensity or frequency didn't be completed in the inferior colliculus or A1 area of auditory cortex, but it is probably transferred from the inferior nervous centres.

Key words auditory neuron, latency, characteristic frequency, intensity, bicuculline, strychnine

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (90208012, 30170250, 30270440), Special Prophase Project on Basic Research of The National Department of Science and Technology (2100CCA00700), Innovative Program of The Chinese Academy of Sciences (KGCX2-SW-602-2) and Guangdong Natural Science Foundation (32870).

**Corresponding author .

SHEN Jun-Xian. Tel: 86-10-64888542, E-mail: shenjx@sun5.ibp.ac.cn

XIAO Zhong-Ju. Tel: 86-20-61360219, E-mail: xiaozj@fimmu.com

Received: May 10, 2005 Accepted: July 8, 2005