

• 研究报告 •

大鼠发育过程中外毛细胞对 GABA 的反应*

冯伟伟¹ 唐杰¹

[摘要] 目的:用电生理方法验证 GABA 能诱使 SD 大鼠发育中外毛细胞产生反应,并为外毛细胞上有 GABA 受体提供证据及研究 GABA 作用与发育期外毛细胞之间的关系。方法:全细胞记录顶部外毛细胞在 GABA 作用下膜电位及电流的变化。然后电生理数据进行统计,电生理数据中 GABA 能引起细胞发生膜电位变化或电流变化占所记录细胞的比例,并以此来分析其与发育之间的关系。结果:电生理数据显示 GABA 能使细胞发生超极化或产生内向电流,而且细胞反映百分数也是随发育逐渐减少的。结论:GABA 引起外毛细胞的作用随发育逐渐减少,这意味着该递质在外毛细胞发育过程中可能有牵引传出纤维到达外毛细胞区域或促进 MOC-OHC 突触形成的作用。

[关键词] GABA;外毛细胞;发育;电生理

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.22.017

[中图分类号] R764 **[文献标志码]** A

The response of GABA eliciting the rats outer hair cells during development

FENG Weirwei TANG Jie

(Department of Physiology School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China)

Corresponding author: TANG Jie, E-mail: jietang@smu.edu.cn

Abstract Objective: We used electrophysiological methods to study that whether GABA could elicit OHCs outward currents provide evidence for existence of GABA-A receptor and investigate the relationship between the effect of GABA and the development of OHCs. **Method:** We used whole-cell recording OHCs at current-clamp or voltage-clamp to verify the function of GABA receptor on OHCs. Then we counted the responsive cells vs. total number cells, and according to results to study the relationships between the GABA receptor and development of OHCs. **Result:** OHC was elicited outward current or hyperpolarized by GABA and the responsive cells were decreased with development. **Conclusion:** The result of GABA receptor decreasing with development suggested that the receptor may draw efferents to OHCs or facilitate the MOC-OHC synapse formation.

Key words GABA; outer hair cell; development; electrophysiology

哺乳动物听觉系统中,听觉感受器细胞分为 2 类:形态呈烧瓶状的内毛细胞(inner hair cell, IHC)与圆柱状的外毛细胞(outer hair cell, OHC)^[1]。2 类细胞在听觉系统中是不一样的功能^[2]。内毛细胞将声音信息转换成神经冲动并通过传入纤维传至中枢,外毛细胞则接收来自内侧橄榄耳蜗(medial olivocochlear, MOC)传出纤维的抑制信息进而抑制毛细胞的活动并以此达到保护耳蜗受强噪声损害的作用^[3-4]。乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)是 MOC-OHC 的主要抑制性递质^[3]。其作用机制是 MOC 传出纤维释放乙酰胆碱,作用在外毛细胞的乙酰胆碱受体,激活胞体上的钙离子

通道,钙离子内流进而激发钙依赖性钾通道,钾离子外流从而使细胞发生超极化^[5-6]。γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统(central nervous system, CNS)的重要抑制性递质(Sivilotti 等,1991),那么它在外周神经系统(耳蜗)内是否也有作用。有研究在 MOC-OHC 传出纤维末端发现 GABA, CGRP 与 Ach 共存^[7],并且在此突触发现 GABA 能纤维及外毛细胞区域有 GABA 受体信使 RNA 的表达。Zenner 发现外毛细胞胞体底部有 GABA-A 受体的表达及 GABA 能诱使细胞发生超极化。但另外也有证据不支持这种观点,在外毛细胞不同时期或钳制在不同电压水平时, GABA 不能诱使外毛细胞产生电流变化^[8-9],因此, GABA 是否能引起外毛细胞发生膜电位或电流变化是一个有争议的问题,并且 GABA 作为中枢神经系统的抑制性递质,其在神经元发育

* 基金项目:国家自然科学基金(No:31271179);“973”项目(No:2014CB943002)

¹ 南方医科大学基础医学院生理学教研室(广州,510515)
通信作者:唐杰, E-mail: jietang@smu.edu.cn

过程中有促进神经元前体细胞迁移^[10]及神经元发育成熟^[11]的作用,而本实验将致力于研究 GABA 作用于大鼠发育不同时期外毛细胞的反应及其可能具有的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

L-15 购自 Life 公司;GABA、荷包牡丹碱(bicuculine)、胶原酶 IV 等皆从 sigma 公司购进。

1.2 方法

1.2.1 剥离毛细胞 实验采用 SD 乳鼠,CO₂ 麻醉后快速断头,去除脑组织,剪下颞骨(含耳蜗)部分置于 L-15 液(pH=7.4,290~310 mOsm)中。于体视显微镜下(Nikon,日本)取出耳蜗,挑针去掉骨质,根据需要取不同部位的基底膜。

1.2.2 电生理记录 在剪碎的基底膜加入胶原酶消化 3~5 min,吹散开于光学显微镜下进行电生理实验。通过微操纵器 MP285(SUTTER,USA)使玻璃微电极接触细胞并施加负压形成高阻封接,稳定后破膜形成全细胞记录。电生理记录外毛细胞在 GABA 作用下膜电位及电流的变化。1 mmol/L GABA 通过一个压力装置进行给药^[21]。将药灌注于给药电极内,待记录细胞稳定后,微操纵器调给药电极至距离毛细胞 20~40 μm 处(如图),轻轻给压力,使药物作用在细胞上。电极内液成分(mmol/L):120 KCl,2 MgCl₂,10 EGTA,10 HEPES。所有配电极内液用的化学试剂均来自 sigma 公司。

1.2.3 数据分析 电生理数据均由 Pluse 软件(Clampex10.0,美国)采集,采集的数据由 Clamfit 软件打开,然后将所获得的数据导出来并在 Origin 8.0 软件中作图。实验以电生理记录给药前后所记录的差值作为研究。

数据统计分析通过统计学软件 SPSS 13.0 软件完成。2 组数据间均数的比较采用两样本独立 *t* 检验和多组数据间的比较用单因素方差分析,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

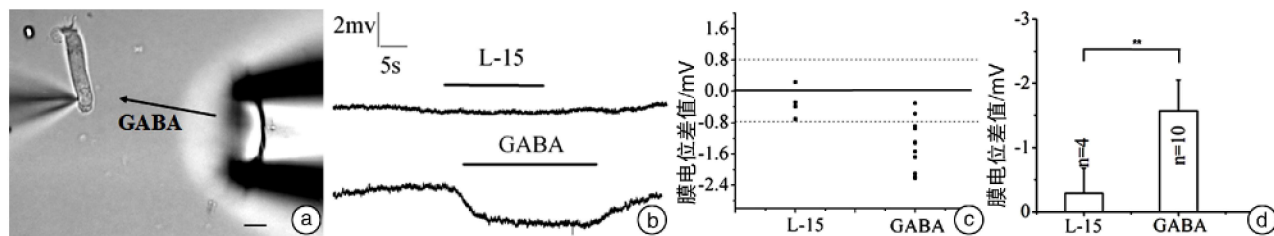
因外毛细胞在鼠出生后 2 周其功能基本达到成年水平,所以以 P15 天顶部外毛细胞作为代表,全细胞记录细胞在 GABA 作用下膜电位和电流的变化。

2.1 GABA 引起 P15 天顶部外毛细胞超极化

图 1b 为了排除因给药冲力造成的干扰,以 L-15 代替 GABA 设置对照,实验组为正常情况下细胞在 GABA 作用下记录膜电位变化。细胞在给药前后平台期均值的差值作为膜电位值的变化,并以这些差值的 $\bar{x} \pm 2SD$ 作为评判细胞膜电位是否发生变化的标准(图 1c)。结果显示 1 mmol/L GABA 作用于顶部外毛细胞时,细胞发生超极化,而对照组 L-15 引起膜电位变化的值均在波动范围内(图 1c)。实验组中所记录的 12 个细胞,其中约 83.3% 的细胞发生超极化,幅度为 $(1.57 \pm 0.48) \text{ mV} (n=10)$,与对照组比较差异有统计学意义(图 1d)。

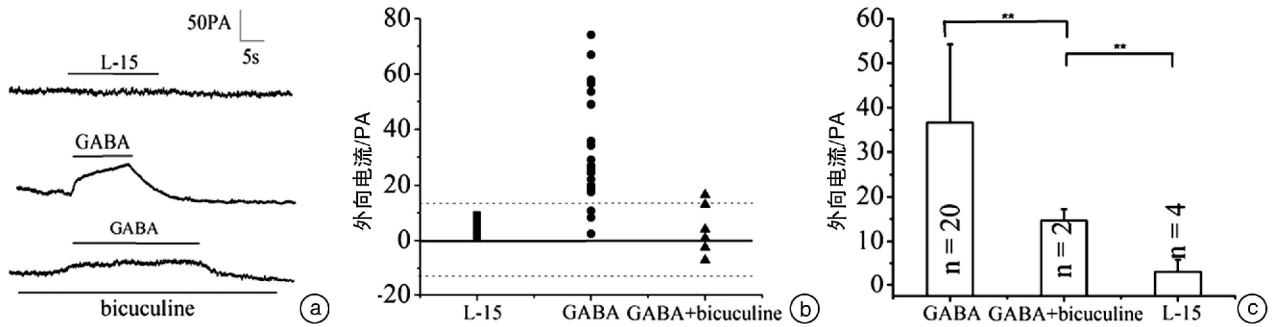
2.2 GABA 诱使 P15 天顶部外毛细胞产生外向电流且被 bicuculine 阻断

图 2a 全细胞分别记录细胞在 L-15,GABA 及 GABA 受体阻断剂 bicuculine 存在情况下电流的变化。与膜电位处理方式一样,将 3 种情况下记录的电流差值进行分析,对照组及大部分阻断剂存在情况下记录的细胞所引起电流差值均在波动范围内(图 2b)。而且对图 2b 中 3 种情况下所记录的所有细胞进行分析,结果显示在 GABA 作用下所记录的 45 个细胞中,约有 44.4% 的细胞产生了外向电流 $(36.65 \pm 17.6) \text{ pA} (n=20)$,而在阻断剂存在下,所记录的 6 个细胞中,只有 2 个产生外向电流 $(14.68 \pm 2.53) \text{ pA} (n=2)$ 。而且在阻断剂存在情况下,GABA 所诱使的外向电流幅度明显低于仅 GABA 作用下的电流幅度(图 2c)。此结果说明 GABA 对外毛细胞的作用会被 bicuculine 阻断。



a: P15 天顶部外毛细胞在给 GABA 刺激时电生理记录图;GABA 在距细胞 40 μm 左右处给药,标尺为 10 μm;b: P15 天顶部外毛细胞分别在 1 mmol/L GABA 和 L-15 作用下膜电位的变化;上边的为对照组。下边的是 1 mmol/L GABA 作用下膜电位的变化(水平线为药物作用时间);c:以在给药后平台期的均值与给药前的差值作为膜电位的变化,并把差值的 $\pm 2SD$ 外的数值定义为由 GABA 作用引起的膜电位变化;对照组的膜电位变化均在波动范围内;d:给药 GABA 或 L-15 引起膜电位超极化的均值 \pm 标准差。

图 1 GABA 诱使 P15 天顶部外毛细胞发生超极化

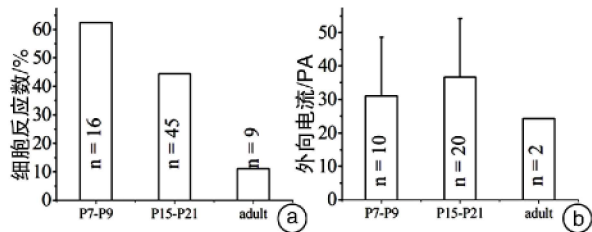


a: P15 天顶部外毛细胞钳制在 0 mv 下, 1 mM GABA 诱发细胞电流的变化; 上边的为对照组, 中间的为仅在 GABA 作用下电流的变化, 下边的为在 bicuculline 存在下, GABA 引起的电流变化; b: 同前电流钳处理结果一样; 对照组及实验组中未能引起外向电流的视为在电流波动范围内; c: 在 bicuculline 存在情况下, GABA 引起细胞产生外向电流幅度 ($\bar{x} \pm s$) 明显低于仅在 GABA 作用下细胞的反应幅度; 数值 ($\bar{x} \pm s$) 由 bicuculline 加入前后及 L-15(作为对照)作用下引起细胞电流的变化得出。

图 2 P15 天顶部外毛细胞在 GABA 作用下电流的变化

根据前期研究, 外毛细胞在出生 1 周后其能动性开始出现, 其功能也在此后开始形成, 而且在两周后, 外毛细胞的形态及功能基本接近成年水平。因此, 选择 P7~P9, P15~P21 及成年这 3 个年龄段来进行实验研究。

2.3 发育过程中, GABA 引发顶部外毛细胞的反应情况



a: 发育不同时期, 能引起电流变化的细胞数占所记录细胞数的比例。b: 发育不同时期, 细胞有外向电流变化的 $\bar{x} \pm s$ 。

图 3 发育不同时期顶部外毛细胞对 GABA 的反应情况

图 3 是 3 个不同时期 GABA 作用于顶部外毛细胞的反应情况。其中 P7-P9 记录的 16 个细胞, 约有 62.5% 的细胞产生了外向电流 (30.97 ± 17.65) PA ($n=10$), 而成年水平所记录的 9 个细胞中, 只有 2 个细胞产生了外向电流。图 3 B 做统计学分析(单因素方差分析, $P > 0.5$), 结果显示 3 个年龄段细胞所产生的外向电流幅度相差不大, 但图 3A 显示 3 个年龄段的细胞反应百分数则是随着发育逐渐递减的。

3 讨论

本次实验采用电生理技术验证了 GABA 能使外毛细胞产生外向电流或发生超极化, 这不仅为外

毛细胞胞体上有 GABA 受体提供了证据, 而且结果还说明了 GABA 作用于发育时期外毛细胞产生的电流幅度相差不大, 同时根据细胞的反映百分数我们发现其是呈随发育逐渐递减的趋势, 这暗示着 GABA 在毛细胞发育过程中可能有一定的作用。

外毛细胞接收 MOC 传出纤维的抑制信息从而减弱细胞的活动, 并以此保护内耳在强噪声环境下的损伤。据前期的研究, MOC 传出纤维主要释放乙酰胆碱作为抑制性递质, 与外毛细胞上的胆碱性受体结合, 激发相关离子通道的开放, 进而使细胞发生超极化, 从而抑制细胞的活动。前期研究采用 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 Ach 作用于成年外毛细胞时, 使其产生的外向电流幅度至少 100 PA 左右, 膜电位超极化至少 5 mV 左右^[2~12]。相关研究 Ach 在沙鼠外毛细胞发育中的作用, P6 天左右 Ach 对外毛细胞作用开始产生外向电流, 而且其作用幅度也随发育而逐渐增强, 约在 P11 天, 细胞反应百分数和幅度逐渐接近成年水平(He 等, 1999)。而我们的实验数据显示在外毛细胞接近成年水平的时期(P15~P21), GABA 作用于外毛细胞时引起的外向电流幅度较小, 膜电位的变化幅度也小。GABA 的作用微弱, 这也说明了在成年水平外毛细胞主要接收 Ach 作为抑制性递质的原因。

发育中的外毛细胞在 Ach 作用下产生的外向电流幅度及细胞反应百分数随发育而逐渐递增, 并在 P11 天左右接近成年水平。而本实验发现 GABA 作用于发育中外毛细胞产生时, 其产生的电流幅度在各个年龄段差异不大, 但细胞反应百分数却随发育呈逐渐递减的趋势, 该结果暗示了 GABA 引起外毛细胞的反应可能与年龄有关, 并且此作用很可能在发育过程中有一定的生理作用。

正常情况下, GABA 是中枢神经系统中的主要

抑制性递质。但据相关研究,GABA 在神经系统发育过程中不是一直作为抑制性递质存在。许多研究表明 GABA 在发育早期可使神经元产生去极化,从而对细胞产生兴奋性作用^[13];并且 Kasyanov 等^[14]研究表明 GABA 介导的去极化有利于谷氨酸突触可塑性的调节,同时也有利于神经发育对兴奋性依赖的调节;另外在海龟视觉系统的研究^[20]揭示了 GABA 的兴奋-抑制转换发生的必然性,此转变使视网膜电活动终止,促使系统发育成熟,这也暗示了这种转换有利于中枢神经系统发育成熟。据推测 GABA 介导的早期兴奋性作用到成熟水平的抑制性作用的转变机制可能就是由于细胞内氯离子浓度的失衡或 GABA-A 受体自身激活导致的^[15]。而且在神经元发育早期,谷氨酸能系统未发育之前,GABA 是作为神经元发育早期兴奋性的主要来源,在神经元和突触的发生、发育及突触的可塑性等方面发挥着重要的作用。

因此,根据 GABA 在神经元发育过程中不仅作为递质外,还有促进神经元发育的作用,我们推测在外周神经系统发育过程中,GABA 在发育中外毛细胞可能也有相同的作用。结合本实验结果,GABA 作用于外毛细胞的电流幅度随发育呈逐渐递减的趋势,我们推测 GABA 在外毛细胞发育过程中有促使传出纤维到达外毛细胞区域的牵引作用或促进 MOC-OHC 突触形成等的作用。

参考文献

- [1] RAPHAEL Y, ALTSCHULER R A. Structure and innervation of the cochlea[J]. *Brain Res Bull*,2003, 60: 397-422.
- [2] VETTER D E, KATZ E, MAISON S F, et al. The $\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system[J]. *Proceedings National Academy Sciences*,2007,104: 20594-20599.
- [3] ELGOYHEN A B, KATZ E. The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse[J]. *J Physiol Paris*, 2012,106: 47-56.
- [4] MAISON S F, CASANOVA E, HOLSTEIN G R, et al. Loss of GABAB receptors in cochlear neurons: threshold elevation suggests modulation of outer hair cell function by type II afferent fibers[J]. *J Association Res Otolaryngol*,2009,10: 50-63.
- [5] GLOWATZKI E, FUCHS P A. Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea[J]. *Science*,2000, 288: 2366-2268.
- [6] OLIVER D, KLOCKER N, SCHUCK J, et al. Gating of Ca^{2+} -activated K^{+} channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells[J]. *Neuron*,2000,26:595-601.
- [7] MAISON S P F, ADAMS J C, LIBERMAN M C. Olivocochlear innervation in the mouse: Immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization[J]. *J Comparative Neurol*,2003,455:406-416.
- [8] WEDEMEYER C, ZORRILLA DE SAN MARTIN J, BALLESTERO J, et al. Activation of presynaptic GABAB(1a,2) receptors inhibits synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear-hair cell synapses[J]. *J Neurosci*,2013, 33:15477-15487.
- [9] EVANS M G, KILN J, PINCH D. No evidence for functional GABA receptors in outer hair cells isolated from the apical half of the guinea-pig cochlea[J]. *Hear Res*,1996, 101: 1-6.
- [10] LUJÁN R, SHIGEMOTO R, LÓPEZ-BENDITO G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain[J]. *Neuroscience*,2005, 130: 567-580.
- [11] SERNAGOR E, YOUNG C, EGLIN S J. Developmental modulation of retinal wave dynamics: shedding light on the GABA saga[J]. *J Neurosci*,2003, 23: 7621-7629.
- [12] GÓMEZ-CASATI M E, FUCHS P A, ELGOYHEN A B, et al. Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells[J]. *J Physiol*,2005, 566: 103-118.
- [13] KILB W. Development of the GABAergic system from birth to adolescence[J]. *Neuroscientist*,2012, 18: 613-630.
- [14] KASYANOV A M, SAFIULINA V F, VORONIN L L, et al. GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004, 101: 3967-3972.
- [15] 朱海雷,王殿仕,李继硕. GABA 在中枢神经系统发育的早期阶段具有兴奋作用[J]. *生理科学进展*, 2003,34(1): 60-63.

(收稿日期:2015-08-19)