

外周输入依赖的嗅球颗粒细胞的突触结构可塑性*

饶小平^{1, 3) **, ***} 许智祥^{1, 3) **} 王莉^{1, 3)} 徐富强^{1, 2) ***}

⁽¹⁾ 中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉 430071;

⁽²⁾ 武汉光电国家实验室, 生物医学光子学实验室, 武汉 430074; ⁽³⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 活动依赖的突触结构可塑性是学习和记忆的基础。哺乳动物, 尤其是啮齿类动物, 具有高度发达的嗅觉系统和惊人的气味学习和记忆能力。本研究以 CNGA2 敲除而导致外周输入缺失的小鼠为模型, 研究嗅球内活动依赖的突触结构可塑性。利用特异性的突触前和突触后标记物, 发现外周输入缺失减少了突触标记蛋白突触素(synaptophysin)和抑制性突触标记蛋白桥蛋白(gephyrin)在嗅球外网状层和颗粒细胞层中的表达; 兴奋性突触标记蛋白囊泡谷氨酸转运蛋白 1(VGluT1)的表达水平只在外网状层中有显著下降, 而在颗粒细胞层中没有明显变化。进一步通过活体质粒电转标记嗅球颗粒细胞后发现, CNGA2 敲除小鼠颗粒细胞上位于外网状层中的远端树突棘密度显著减小, 而位于颗粒细胞层中的近端树突棘密度没有明显变化。这些结果表明颗粒细胞上的树-树突触具有对外周活动依赖的结构可塑性, 而轴-树突触则无。

关键词 活动依赖的突触结构可塑性, 嗅球, CNGA2 敲除, synaptophysin, gephyrin, VGluT1, 颗粒细胞

学科分类号 Q4, Q189

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00629

突触可塑性是指活动依赖的神经元之间连接的改变, 一般被认为是学习和记忆的基础^[1]。成年神经环路的突触可塑性包括功能可塑性和结构可塑性, 前者特指已存在的突触连接的增强或减弱, 而后者则涉及突触的形成或消失^[2-3]。长时间的活体成像研究表明, 成年动物大脑内绝大多数轴突和树突都能保持较高的稳定性, 但是也有一些细微结构如轴突结(axonal bouton)和树突棘(dendritic spine)具有形成和消失的现象, 同时伴随着功能性突触的形成和消失^[2-5]。越来越多的证据表明, 哺乳动物的大脑皮层在发育、学习和记忆、神经和精神疾病等过程中具有惊人的结构可塑性^[2-3, 6-7]。

小鼠的嗅觉系统能探测和辨别无数气味。气味的感知起始于气味分子与鼻腔中嗅上皮(olfactory epithelium, OE)表面纤毛内嗅感神经元(olfactory sensory neurons, OSNs)的气味受体(odor receptor, OR)结合, OSNs 把化学信息转变为动作电位送入嗅球(olfactory bulb, OB)中的投射神经元——僧帽/丛状(mitral/tufted, M/T)细胞, M/T 细胞将信息进一步传送到嗅皮层以及高级情感或认知皮层如杏仁核或内嗅皮层^[8]。嗅球中的投射神经元和中间神经

元在不同层构成复杂程度不同的局部微环路。在嗅小球层(glomerular layer, GL), M/T 细胞的主/顶树突与球旁神经元(periglomerular neurons, PGNs)形成范围较小的树-树突触, 而 M/T 细胞的次/侧树突与颗粒细胞(granular cells, GCs)的顶树突在外网状层(external plexiform layer, EPL)中形成大范围的树-树交互性突触连接^[9]。成熟的 GCs 上处于颗粒细胞层(GCL)的近端树突同时还接受源于皮层的离心轴突和僧帽细胞的轴突分支的谷氨酸能输入^[10]。这些神经环路对气味刺激的信息处理、表征以及输出具有重要作用^[11]。

哺乳动物的嗅觉系统是一个研究感觉经验对突触可塑性影响的理想模型^[12]。利用双光子延时显微

* 国家自然科学基金资助项目(91132307/H09, 31171061/C090208, 20921004), 中国科学院战略性先导专项(XDB020505005), 科技部国家科技支撑项目(2012BAI23B02)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。Tel: 027-87197091

徐富强。E-mail: fuqiang.xu@wipm.ac.cn

饶小平。E-mail: raomiaoping0902@126.com

收稿日期: 2013-05-22, 接受日期: 2013-06-04

成像技术长期观察成年小鼠的嗅球,发现 GL 内的 M/T 细胞顶树突在不同的气味条件下能保持高度的稳定性^[13]。但是,嗅球中成年新生(adult-born)的 PGNs 和 GCs 这两种中间神经元却具有较高水平活动依赖的结构可塑性^[14],尤其是嗅球内数量最多的 GCs^[15]。很多研究发现堵鼻子可以引起成年新生 GCs 的树突棘密度发生下降^[16-18]。但是,几乎所有的有关 GCs 结构可塑性研究都集中于成年新生的 GCs^[14, 16-19],而先前存在的 GCs 突触结构可塑性很少有报告。此外,OB 中每天增加的成年新生神经元的数量大约有 10 000~30 000 个,只相当于成年小鼠 OB 中几百万 GCs 的不到 1%^[20-21],并且这些新生的颗粒细胞只有很小部分可以存活下来并整合到嗅球的局部神经环路中去^[22],因此嗅球中新生 GCs 的数量相比于先前存在的 GCs 微乎其微^[23]。而且,有关颗粒细胞结构可塑性的研究主要集中在整合到嗅球局部网络前后^[14, 16-19],这也是其发育成熟的过程,而一旦存活下来,有不少颗粒细胞的存活时间可以长达 19 个月^[22]。此外,抑制神经发生对小鼠的很多嗅觉行为都没有明显影响^[24-27],说明在嗅觉感知活动中已经存在的颗粒细胞可能比新生的颗粒细胞发挥更加重要的作用。因此本研究以非成年新生的 GCs 突触结构可塑性为主。

感觉剥夺是研究活动对突触动态性和可塑性的经典模型^[28]。本研究采用 CNGA2 敲除小鼠(CNGA2 KO)为模型。环腺苷酸门控离子通道 $\alpha 2$ (CNGA2 或 OCNC1)是气味刺激引起 OSNs 信号转导的关键通道^[29]。气味分子与 OR 结合激活 G 蛋白(G_{olf}),接着激活腺苷酸环化酶 III,从而导致胞内 cAMP 浓度上升,接着打开 CNG 通道,胞外 Na^+ 和 Ca^{2+} 内流去极化, Ca^{2+} 进一步激活 Cl^- 通道引起 Cl^- 外流,进一步使细胞去极化,所以,CNGA2 敲除小鼠内几乎所有的 ORNs 对气味的电反应活动完全消失^[30-31]。通过检测嗅觉外周输入缺失对嗅球中 GABA 能和谷氨酸能突触特异性标记蛋白质表达水平的影响,以及嗅球中数量最多的 GCs 上树突棘密度的变化情况,发现由外周输入缺失引起的嗅球突触结构可塑性变化主要发生在 GCs 的树-树突触,而非 GCs 上的近端谷氨酸能突触。

1 材料与方法

1.1 实验动物

通过将雌性 CNGA2 敲除的杂合子小鼠与雄性

C57BL/6 小鼠配对繁殖(武汉大学实验动物中心)或将雌性杂合子 CNGA2 敲除小鼠与雄性 CNGA2 敲除小鼠配对繁殖,可以得到本实验所需的嗅觉缺失转基因小鼠。雌性杂合子 CNGA2 敲除小鼠来自罗敏敏博士实验室(北京生命科学研究所以)。所有实验动物均饲养在中国科学院武汉物理与数学研究所实验动物房内,室内保持 14:10 的光暗周期及 $(22 \pm 2)^{\circ}C$ 的室温。CNGA2 敲除小鼠后代出生后 28 天断乳、分窝,并剪尾鉴定其基因型。本实验所用 CNGA2 敲除小鼠年龄在 12~16 周内,阴性同胞作为对照组。动物随时可以得到食物和水。灭菌的木屑用作实验动物的巢材,并每周更换。

1.2 成年小鼠嗅球活体质粒电转

所有的动物实验步骤均经中国科学院动物伦理协会批准。腹腔内注射戊巴比妥(剂量:1 mg/kg)动物麻醉后,将大脑在支架上固定,暴露头骨,并在解剖镜下用颅骨钻在每个嗅球上部钻两个孔,将野生型(WT)注射深度设为 2.4 mm, CNGA2 敲除小鼠由于嗅球萎缩,注射深度设为 2.2 mm (以前卤为参照点)^[30],以 0.5 $\mu l/min$ 的速度向每个位点立体定位注射 1.5 μl 质粒溶液(pLL 3.7, 5 g/L),每个位点注射后间隔 5 min 再进行下一个位点注射(Hamilton, Nevada, USA)。电转的步骤参照文献^[32]。质粒注射完毕后,用 PBS 溶液作为电导液涂抹于小鼠头部四周,然后用圆形电极(直径:1 cm)在嗅球头骨处夹紧,在电转仪器(ECM 830, BTX, Harvard Apparatus)上设定为 150 V 直流方波,50 ms,连续电击 5 次。电击方向分别为上下 1 次,左右 2 次。动物每次电击后,进行人工心脏按摩,并置于 37 $^{\circ}C$ 恒温箱内保持动物体温。手术结束后,给动物注射头孢曲松钠(0.2 g/kg,华北制药,石家庄)用于抗菌消炎。待动物清醒后放回笼内。

1.3 组织样品制备、免疫组化及蛋白质印迹分析

手术一周后,向动物腹腔注射水合氯醛(WT: 6 只; CNGA2 KO: 6 只)麻醉(1 mg/kg),暴露心脏并用生理盐水(250 ml)进行灌流,之后用 4%多聚甲醛的 PBS 溶液(150 ml)对脑组织进行固定。取出脑组织后继续在该溶液浸泡 4 h,然后在振荡切片机(LEICA VT 1000S, Germany)上将嗅球切成 60 μm 的脑片。所有脑片均储藏在 -20 $^{\circ}C$ 的防冻液中(20% 丙三醇, 30% 乙二醇, 50% PBS, 体积比),拍照前用含有 DAPI 的甘油(1 mg/L)封片。

用于免疫组化的动物(WT: 2 只; CNGA2 KO:

2只), 灌流的程序与上述相同. 脑组织取出后继续用 4%多聚甲醛的 PBS 溶液固定 24 h, 然后浸入 30%蔗糖溶液, 并在 4℃冰箱内保存 2 天. 固定和脱水后, 在冷冻切片机(LEICA CM1850, Germany)上将包埋好的脑组织切成 20 μm 的脑片. 将脑片贴在载玻片上后用 PBS 清洗 5 min 后, 室温下浸入 0.3% Triton-X 的 PBS 溶液打孔 1 h, 之后再用 PBS 清洗 5 min. 脑片用含 10%羊血清的 PBS 溶液室温下封闭 1 h, 并与一抗(anti-synaptophysin, Syn, Abcam, ab8049, 1:100; anti-gephyrin, Gephy, Abcam, ab25784, 1:1000; anti-vesicular glutamate transporter 1, VGluT1, Abcam, ab104898, 1:1000)的 PBS 溶液在 4℃条件下孵育 24 h; 再用 PBS 溶液于水平摇床中洗片 3 次, 每次 5 min; 之后加入二抗 PBS 溶液(羊抗兔 IgG FITC conjugative, KPL, 172-1506, 1:200; CY3 标记羊抗鼠 IgG, Jackson ImmunoResearch, 072-01-18-06, 1:500), 在 37℃条件下孵育 90 min, 再用 PBS 溶液洗片 3 次, 每次 5 min; 最后将切片分别浸入 75%, 80%, 95%, 100%乙醇溶液进行梯度脱水, 晾干后用含有 DAPI 和 DABCO (2%)的甘油进行封片.

用于蛋白质印迹分析(Western blot)的动物(WT: 2只; CNGA2 KO: 2只)腹腔注射水合氯醛麻醉(1 mg/kg)后, 在冰上快速解剖得到嗅球, 置于预冷的蛋白提取缓冲液中, 用玻璃研磨器在冰上研磨, 液体变得透亮后在 4℃下以 12 000 r/min 离心 15 min, 之后吸取上清, 即为总蛋白溶液. 蛋白质样品先后在 80 V 和 120 V 电压下用 5%和 12%聚丙烯酰胺凝胶进行浓缩和分离后, 80 V 电压下转膜 45 min 至 PVDF 膜; 在 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 1 h, 然后 4℃条件下孵一抗(anti-Gephy, Abcam, ab25784, 1:400; anti-VGluT1, Abcam, ab104898, 1:400; Anti-GAPDH, Millipore, AB2302, 1:6000)过夜; 用 TBST 溶液洗膜 3×10 min; 后在 HRP 偶联的二抗 TBST 溶液中(1:3000)室温孵育 1.5 h, 再次用 TBST 洗膜 3×10 min, 最后在化学发光仪(Alpha Innotech)暗室内加 ECL 试剂(Thermo, 34080)后显色.

1.4 拍照及定量分析

Syn 的免疫组化和树突棘的图片是用奥林巴斯 BX51 荧光显微镜(OLYMPUS, Japan)和奥林巴斯 DP71 CCD (OLYMPUS, Japan)拍摄, 之后用

Image-Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics)软件对图片进行叠加和对比; 用 NeuroJ(NIH)软件分析 GCs 树突的长度, 并对其上的树突棘进行计数. Gephy 和 VGluT1 免疫组化的图片是用荧光共聚焦显微镜(Zeiss, LSM710, Germany)拍摄获得, EPL 和 GCL 中光密度的分析采用 Image-Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics)软件. Western blot 条带的拍摄以及灰度分析采用 FluorChem HD2 软件(NatureGene Corp., USA). 荧光光密度以及树突棘密度采用 SPSS 13.0 软件中的独立样本 t 检验, Western blot 条带灰度值的比较采用配对样本 t 检验.

2 结 果

2.1 嗅觉外周输入缺失引起嗅球中所有层突触前标记物的表达水平下降

为了研究嗅觉外周输入缺失是否会引起嗅球发生结构可塑性变化, 首先使用了 Synaptophysin (Syn)的信号改变作为突触结构变化的标志. 比较 Syn 在 CNGA2 敲除和野生型(WT)小鼠嗅球中的表达水平后, 发现 Syn 的荧光信号在 CNGA2 敲除小鼠嗅球中的各个层内均有减弱, 包括 GL、EPL 和 GCL(图 1). 由于 Syn 是一个位于突触前神经递质囊泡的通用蛋白^[33], 这个结果揭示了嗅球发生突触结构可塑性的位置可能位于 GL、EPL 和 GCL 这三个层内.

2.2 嗅觉外周输入缺失引起嗅球中 EPL 和 GCL 内 Gephyrin 表达水平的下降

Syn 信号的减弱可能来源于抑制性突触、兴奋性突触或(和)突触总数的减少, 或仅是由于蛋白质本身表达量的改变, 或这几种情形的组合. 由于 Syn 的信号不能区分谷氨酸能和 GABA 能突触, 我们进一步利用 Gephyrin (Gephy)这一抑制性特异性突触后折叠蛋白为标志物^[34], 检测嗅觉外周输入缺失对嗅球中抑制性突触的影响. 免疫组化的结果显示, 相比于 WT 小鼠的嗅球(图 2a~c), CNGA2 敲除小鼠嗅球的 EPL 和 GCL 内 Gephy 的表达水平都有降低(图 2d~f); Western blot 的定量分析也表明, CNGA2 敲除小鼠 OB 内 Gephy 表达水平发生显著下降($\text{CNGA2 KO} / \text{WT} = 0.64 \pm 0.10$, $P = 0.02$; Paired-Samples t test)(图 2g~h). 这些都说明嗅球的 EPL 和 GCL 内 GABA 能突触可能具有活动依赖的结构可塑性.

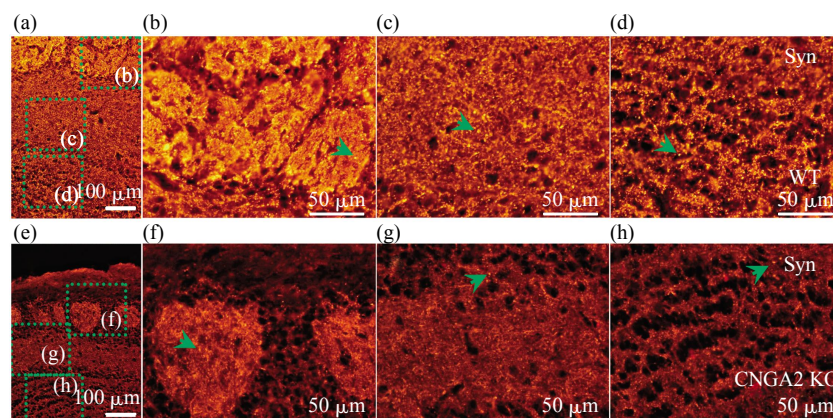


Fig. 1 Anosmia induced decreases in expression of Synaptophysin (Syn) in all OB layers

(a) Immunofluorescence of Syn in the OB of WT mice. (b~d) The Syn expressed in the GL (b), EPL (c) and GCL (d) of the OB in the WT mice respectively, and these images were enlarged from the regions as indicated with green rectangles in panel (a). (e) Immunofluorescence of Syn in the OB of CNGA2 KO mice. (f~h) The signals of Syn decreased in the GL (f), EPL (g) and GCL (h) of the OB in the CNGA2 KO mice respectively, and these images were enlarged from the regions as indicated with green rectangles in panel (e). Green arrows showed the typical punctiform signals of Syn in different layers.

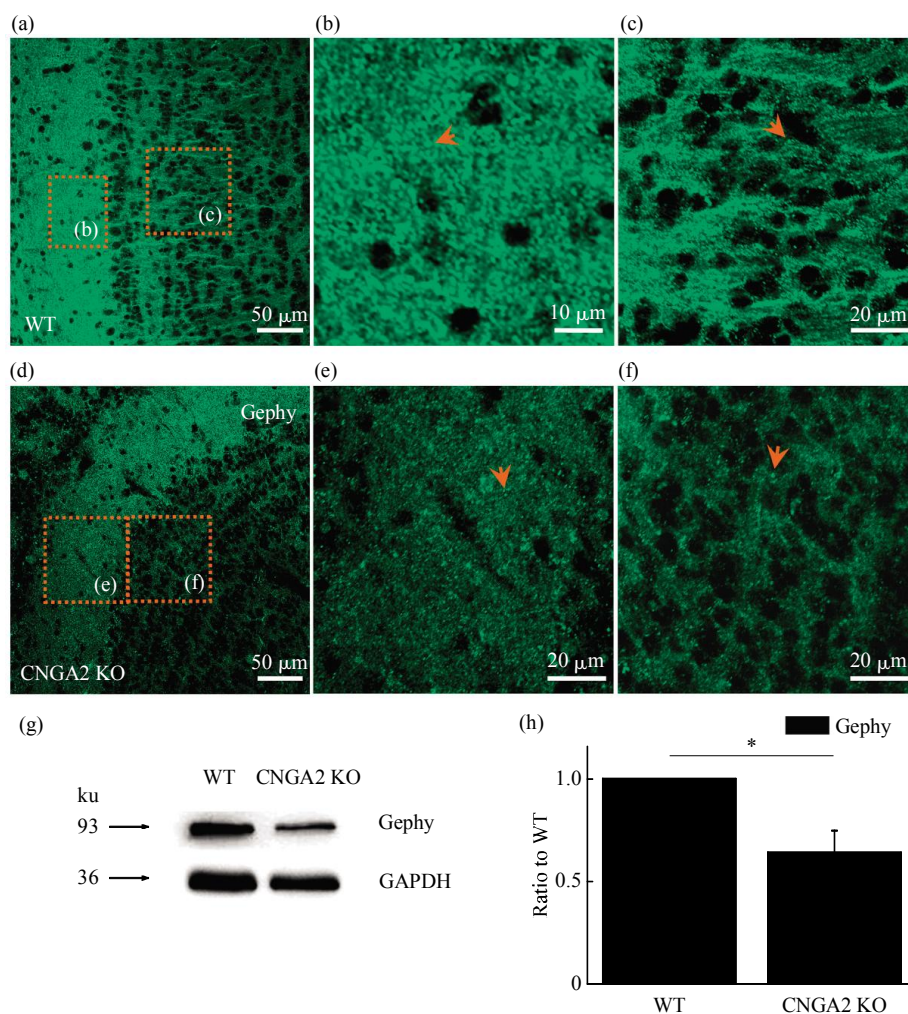


Fig. 2 Anosmia induced decreases in expression of Gephyrin (Gephy) in the EPL and the GCL of the OB

(a~c) Immunofluorescence of Gephy in the OB of WT mice. Gephy immunoreactivity was observed in the EPL (b) as well as in the GCL (c), and these images were enlarged from the regions as indicated with orange rectangles in panel (a). (d~f) Immunofluorescence of Gephy in the OB of CNGA2 KO mice. The signals of Gephy decreased in the EPL (e) and GCL (f) of the OB in the CNGA2 KO mice respectively, and these images were enlarged from the regions as indicated with orange rectangles in panel (d). (g) Western blots showed the changes of Gephy expression (arrows) in the OB of WT and CNGA2 KO mice. (h) Quantification of the immunoblots in (g), data were normalized to WT and compared with paired-samples *t* test. Orange arrows showed fluorescent signals of Gephy. Data were presented as $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05.

2.3 嗅觉外周输入缺失引起 VGluT1 在 EPL 中的表达下降, 而在 GCL 中变化不明显

EPL 和 GCL 中的抑制性突触可能具有结构可塑性, 我们继续观察兴奋性突触是否也具有结构可塑性. 突触内囊泡膜上的谷氨酸转运体 1(vesicular glutamate transporter 1, VGluT1)是将兴奋性递质——谷氨酸包装入突触囊泡的一种转运蛋白^[35], 可用来标记嗅球中谷氨酸能的突触. 免疫组化的结果发现, CNGA2 敲除小鼠嗅球的 EPL 内 VGluT1 免疫荧光的光密度显著下降(WT: 0.12 ± 0.01 ; CNGA2 KO: 0.10 ± 0.02 ; $P < 0.001$; $n = 40$;

Independent-Samples *t*-Test), 但是在 GCL 内却没有明显改变(WT: 0.08 ± 0.01 ; CNGA2 KO: 0.08 ± 0.01 ; $P = 0.63$; $n = 40$), 而总的光密度(EPL + GCL)也没有显著改变(WT: 0.09 ± 0.01 ; CNGA2 KO: 0.09 ± 0.01 ; $P = 0.11$; $n = 40$) (图 3a~c). Western blot 结果也验证了 VGluT1 在 CNGA2 敲除小鼠 OB 中的表达量没有显著变化(CNGA2 KO / WT = 1.03 ± 0.18 , $P = 0.87$; Paired-Samples *t* test) (图 3d~e). 这表明嗅觉外周输入缺失时, 嗅球的 EPL 中的兴奋性突触可能具有结构可塑性, 而 GCL 中的兴奋性突触可能不受明显影响.

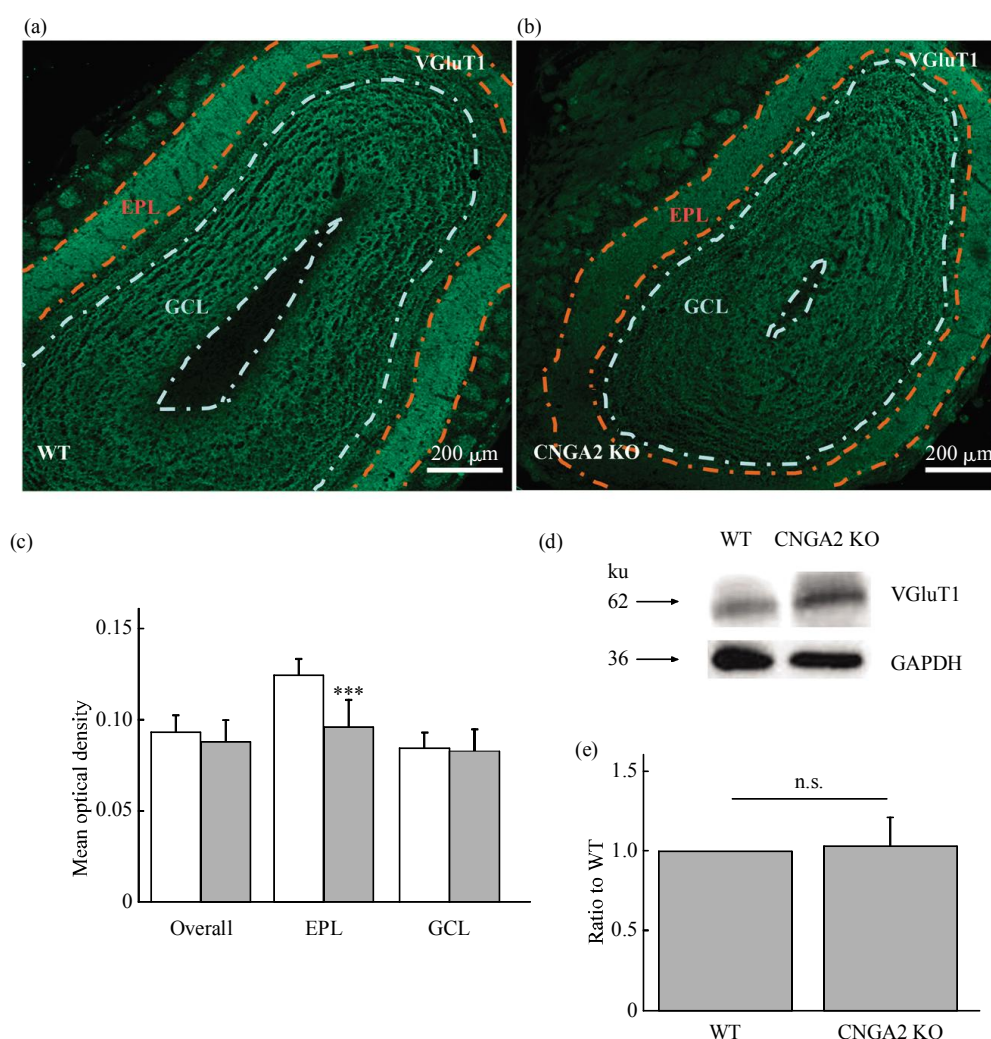


Fig. 3 Anosmia induced significant decreases in the expression of VGluT1 in the EPL, but not in the GCL of the OB

(a, b) The VGluT1 expression in the OB of WT (a) and CNGA2 KO (b) mice. The region between two orange dashed lines indicates the EPL of the OB, and the region between the two gray dashed lines indicates the GCL of the OB, these regions were used for further optical density analysis. (c) The mean optical density of VGluT1 decreased in the EPL, but not the GCL and overall (EPL and GCL) in the CNGA2 KO mice. Data were analyzed with independent-samples *t* test. □: WT; ■: CNGA2 KO. (d) Western blots showed the changes in VGluT1 expression (arrows) in the OB of WT and CNGA2 KO mice. □: VGluT1. (e) Quantification of the immunoblots in (d), data were normalized to WT and compared with paired-samples *t* test. Data were presented as $\bar{x} \pm s$ in (c) and $\bar{x} \pm s$ in (e). *** $P < 0.001$; n.s. Indicated $P > 0.05$.

2.4 嗅觉外周输入缺失引起 GCs 的 EPL 内树突棘密度减少, 而 GCL 内变化不明显

GCs 是 EPL 和 GCL 中的突触主要参与者, 而树突棘(dendritic spine)是哺乳动物中枢神经系统中绝大多数的兴奋性突触后结构标志, 新的活动/经历和神经疾病都能引起树突棘的形态和动态发生改变^[36-37]. 上述免疫组化和 Western blot 的结果共同揭示了兴奋性和抑制性突触均可能发生了改变. 为了进一步揭示谷氨酸能突触的数目在外周输入缺失时的变化情况, 我们采用质粒电转标记嗅球中 GCs 发现, CNGA2 敲除小鼠嗅球中的 GCs 上总的树突棘密度(EPL + GCL)发生显著下降(overall spines, WT: (0.12 ± 0.06) spines/ μm ; CNGA2 KO: (0.10 ± 0.06) spines/ μm ; $P = 0.02$; $n = 196$) (图 4a~c). 上述结果表明 GCs 上的兴奋性突触具有活动依赖的

结构可塑性.

GCs 主要接受两类不同的兴奋性输入, 一类是来自于嗅皮层神经元的轴突和僧帽细胞的轴突分支, 另一类来自 M/T 细胞的侧树突, 分别位于 GCL 和 EPL 内^[10]. 因此, GCs 在 EPL 中的顶端树突棘(distal spines)与 M/T 细胞形成的树-树突触; 而位于 GCL 中的顶树突和基底树突上的近端树突棘(proximal spines)与来自嗅皮层的离心轴突或 M/T 轴突分支形成轴-树突触^[38]. 进一步分析发现, CNGA2 敲除小鼠嗅球中 GCs 的顶端树突棘密度显著下降(WT: (0.15 ± 0.01) spines/ μm ; CNGA2 KO: (0.07 ± 0.01) spines/ μm ; $P < 0.001$; $n = 72$) (图 4d~f), 而近端树突棘密度没有变化(WT: (0.10 ± 0.01) spines/ μm ; CNGA2 KO: (0.10 ± 0.01) spines/ μm ; $P = 0.88$; $n = 165$) (图 4g~i). 这些数据表明嗅觉

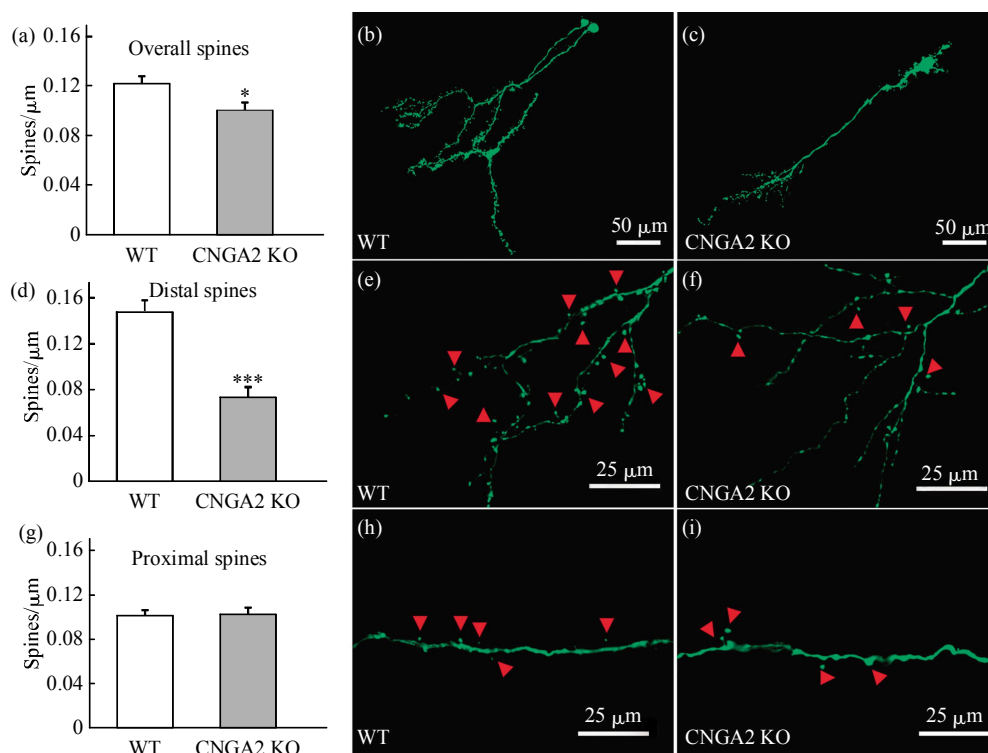


Fig. 4 Anosmia induced a decrease of the spine density on the distal apical dendrites, not on the proximal dendrites of GCs in the OB

(a) The overall spine density of GCs was showed as total spines divided by the total dendrites length. There was significant decrease in the density of overall spines of GCs in CNGA2 KO mice ($P = 0.02$). (b, c) High-magnification images of the dendritic trees of GCs in WT (b) and CNGA2 KO (c) OB. (d) The distal spine density of GCs was showed as total spines in EPL divided by the apical dendrite length in EPL. Distal spines density in CNGA2 KO was significant fewer with WT ($P < 0.001$). Red arrows point to individual spines along the apical dendrite of GCs in the EPL of WT (e) and CNGA2 KO mice (f). (g) The proximal spine density of GCs was showed as total spines in GCL divided by the proximal dendrites length in GCL. No significant difference was observed in proximal spine density ($P = 0.88$). Red arrows pointed to individual spines along the proximal dendrite of GCs in GCL of WT (h) and CNGA2 KO mice (i). Data were presented as $\bar{x} \pm s$ and analyzed with independent-samples t test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

外周输入主要影响 EPL 中的树 - 树突触的结构可塑性, 而 GCL 中谷氨酸能的轴 - 树突触则没有受到明显影响. 这与前面的 VGluT1 免疫组化结果一致.

3 讨 论

本研究采用 CNGA2 敲除小鼠来检测嗅球内活动依赖的结构可塑性, 发现嗅觉缺失能导致突触素 (Synaptophysin) 和桥蛋白 (Gephyrin) 在 EPL 和 GCL 中的表达水平发生下降, VGluT1 的表达水平在 EPL 中有下降, 但是 VGluT1 在 GCL 中的表达水平没有明显改变. 此外, 活体质粒电转标记 GCs 后发现, CNGA2 敲除小鼠嗅球 EPL 中的树突棘密度减少, 而 GCL 中的树突棘密度没有改变, 与 VGluT1 染色结果一致. 因此, 当外周嗅觉输入缺失时, 小鼠嗅球中 GCs 的突触结构可塑性变化主要发生在顶端的树 - 树交互性突触, 而非近端兴奋性的轴 - 树突触.

抑制性中间神经元占据成年大脑皮层的 20%~30%, 在局部微环路调控中起着重要作用^[39]. 不过, 对于中间神经元结构动态性的研究较少, 一般认为兴奋性神经元和抑制性神经元具有相同程度的结构可塑性^[3]. 双光子活体成像观察 GFP 标记的新生 GCs, 揭示了感觉剥夺不仅可以引起成年新生 GCs 在 EPL 中的树突棘密度发生下降^[18], 也可以引起整个树突棘密度下降^[16]. 通过特异性突触蛋白标记发现, 感觉剥夺在成年新生的 GCs 成熟过程中不会引起基底树突上的突触数量发生改变, 而使主树突的近端突触数量上升^[17]. 在本研究中, 虽然发现 CNGA2 敲除小鼠嗅球中 GCs 总树突棘密度发生了显著的下降, 但是近端兴奋性输入没有改变. 因为基底树突和位于 GCL 中的近端顶树突都是接受来自于嗅皮层和嗅球投射神经元轴突分支的输入^[10, 38], 我们将这两个区域合并为 GCs 的近端区域, 再加上基底树突常有分支^[40-41], 因此合并后主树突近端树突棘密度所占比例较小, 这可能是我们得到和先前研究不同结果的原因. 几乎所有的关于 GCs 结构可塑性的研究都集中于成年新生的 GCs^[14, 16-19], 但是嗅球中新生的 GCs 只是所有 GCs 中的小部分^[23], 这可能也是本研究在近端树突棘的结构可塑性方面得到不同于以往研究结果的另一个原因.

VGluT1 作为谷氨酸能突触的标记蛋白, 可以检测 GL 和 EPL 中的 M/T 细胞和嗅球中间神经元

形成的树突触, 以及 GCL 中轴树突触^[35]. 本研究中, VGluT1 在 CNGA2 敲除小鼠嗅球中的整体光密度 (EPL + GCL) 没有显著改变 (图 3a), 而电转实验发现整体树突棘密度发生下降 (图 4a). 这可能是因为 VGluT1 在 EPL 和 GCL 中的信号除了 GCs 上的谷氨酸能输入, 还包括其他和 M/T 细胞之间形成的谷氨酸能突触^[42]. 此外, 感觉剥夺可能会引起兴奋性突触增强^[43], 而在 VGluT1 染色中发现其在嗅球内所有层内的信号几乎都发生下降. 这是因为 VGluT1 在嗅球中主要标记 M/T 的胞体和 GCs, 而 VGluT2 主要表达在 GL 的 OSN 轴突末端^[35, 44], 因此没有发现外周输入缺失引起的兴奋性增强.

将来有关嗅球和其他皮层的突触结构可塑性研究中, 采用穿颅的双光子成像来同时观察树突棘和轴突结的动态性, 可能会得到有关结构可塑性更全面的认识^[3]. 此外, 监测其他类型突触的动态性也相当重要.

致谢 感谢北京生命科学研究所罗敏敏博士慷慨提供雌性 CNGA2 敲除的杂合子小鼠; 感谢廖元丽鉴定 CNGA2 敲除小鼠的基因型.

参 考 文 献

- [1] Ho V M, Lee J A, Martin K C. The cell biology of synaptic plasticity. *Science*, 2011, **334**(6056): 623-628
- [2] Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 2009, **10**(9): 647-658
- [3] Fu M, Zuo Y. Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci*, 2011, **34**(4): 177-187
- [4] De Paola V, Holtmaat A, Knott G, *et al.* Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron*, 2006, **49**(6): 861-875
- [5] Zuo Y, Lin A, Chang P, *et al.* Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 2005, **46**(2): 181-189
- [6] Alvarez V A, Sabatini B L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, 2007, **30**: 79-97
- [7] Bhatt D H, Zhang S, Gan W B. Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol*, 2009, **71**: 261-282
- [8] Wilson R I, Mainen Z F. Early events in olfactory processing. *Annu Rev Neurosci*, 2006, **29**: 163-201
- [9] Shepherd G M, Greer C A. Olfactory bulb. In: Shepherd G M. *The Synaptic Organization of the Brain*. New York: Oxford Univ Press, 1998: 159-203
- [10] Balu R, Pressler R T, Strowbridge B W. Multiple modes of synaptic excitation of olfactory bulb granule cells. *J Neurosci*, 2007, **27**(21): 5621-5632

- [11] Murphy G J, Darcy D P, Isaacson J S. Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(3): 354–364
- [12] Tyler W J, Petzold G C, Pal S K, *et al.* Experience-dependent modification of primary sensory synapses in the mammalian olfactory bulb. *J Neurosci*, 2007, **27**(35): 9427–9438
- [13] Mizrahi A, Katz L C. Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*, 2003, **6**(11): 1201–1207
- [14] Mizrahi A. Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci*, 2007, **10**(4): 444–452
- [15] Shepherd G M, Chen W R, Willhite D, *et al.* The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev*, 2007, **55**(2): 373–382
- [16] Dahlen J E, Jimenez D A, Gerkin R C, *et al.* Morphological analysis of activity-reduced adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Front Neurosci*, 2011, **5**: 66
- [17] Kelsch W, Lin C W, Mosley C P, *et al.* A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *J Neurosci*, 2009, **29**(38): 11852–11858
- [18] Saghatelian A, Roux P, Migliore M, *et al.* Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron*, 2005, **46**(1): 103–116
- [19] Arenkiel B R, Hasegawa H, Yi J J, *et al.* Activity-induced remodeling of olfactory bulb microcircuits revealed by monosynaptic tracing. *PLoS One*, 2011, **6**(12): e29423
- [20] Biebl M, Cooper C M, Winkler J, *et al.* Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, 2000, **291**(1): 17–20
- [21] Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 1994, **264**(5162): 1145–1148
- [22] Winner B, Cooper-Kuhn C M, Aigner R, *et al.* Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 2002, **16**(9): 1681–1689
- [23] Richard M B, Taylor S R, Greer C A. Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(35): 15613–15618
- [24] Kageyama R, Imayoshi I, Sakamoto M. The role of neurogenesis in olfaction-dependent behaviors. *Behav Brain Res*, 2012, **227**(2): 459–463
- [25] Kim W R, Kim Y, Eun B, *et al.* Impaired migration in the rostral migratory stream but spared olfactory function after the elimination of programmed cell death in Bax knock-out mice. *J Neurosci*, 2007, **27**(52): 14392–14403
- [26] Lazarini F, Mouton M A, Gheusi G, *et al.* Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One*, 2009, **4**(9): e7017
- [27] Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, *et al.* Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(20): 8479–8484
- [28] Lledo P M, Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci*, 2005, **28**(5): 248–254
- [29] Biel M, Michalakakis S. Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, **191**: 111–136
- [30] Zhao H, Reed R R. X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell*, 2001, **104**(5): 651–660
- [31] Lin W, Arellano J, Slotnick B, *et al.* Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system. *J Neurosci*, 2004, **24**(14): 3703–3710
- [32] Barnabe-Heider F, Meletis K, Eriksson M, *et al.* Genetic manipulation of adult mouse neurogenic niches by *in vivo* electroporation. *Nat Methods*, 2008, **5**(2): 189–196
- [33] Sudhof T C, Jahn R. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, 1991, **6**(5): 665–677
- [34] Tretter V, Mukherjee J, Maric H M, *et al.* Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Front Cell Neurosci*, 2012, **6**: 23
- [35] Gabellec M M, Panzanelli P, Sassoe-Pognetto M, *et al.* Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 2007, **25**(5): 1373–1383
- [36] Yu X, Zuo Y. Spine plasticity in the motor cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 2011, **21**(1): 169–174
- [37] Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott G W, *et al.* Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature*, 2006, **441**(7096): 979–983
- [38] Kelsch W, Sim S, Lois C. Watching synaptogenesis in the adult brain. *Annu Rev Neurosci*, 2010, **33**: 131–149
- [39] Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci*, 2004, **5**(10): 793–807
- [40] Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 2002, **22**(14): 6106–6113
- [41] Price J L, Powell T P. The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 1970, **7**(1): 91–123
- [42] Eyre M D, Antal M, Nusser Z. Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci*, 2008, **28**(33): 8217–8229
- [43] Vale C, Sanes D H. The effect of bilateral deafness on excitatory and inhibitory synaptic strength in the inferior colliculus. *Eur J Neurosci*, 2002, **16**(12): 2394–2404
- [44] Nakamura K, Hioki H, Fujiyama F, *et al.* Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGLUT)1 and VGLUT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J Comp Neurol*, 2005, **492**(3): 263–288

Peripheral Input-dependent Structural Plasticity of Granule Cells in The Mouse Olfactory Bulb*

RAO Xiao-Ping^{1,3)**}, XU Zhi-Xiang^{1,3)**}, WANG Li^{1,3)}, XU Fu-Qiang^{1,2)***}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Magnetic Resonance, Atomic and Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

⁽²⁾ Division of Biomedical Photonics, Wuhan National Laboratory of Optoelectronics, Wuhan 430074, China;

⁽³⁾ University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract Activity-dependent synaptic structural plasticity underlies the learning and memory. Mammals, especially the rodents, are very sensitive to odorants, and have considerable capability of odor learning and memory. Here, the activity-dependent synaptic structural plasticity in the olfactory bulb (OB) of the CNGA2 knock-out transgenic mice (CNGA2 KO), which is anosmic, was investigated. Using immunohistochemistry for specific presynaptic and postsynaptic markers, it was found that deficits of peripheral inputs induced significant decreases in the expression of synaptophysin, a general marker for synapses, and gephyrin, a marker for inhibitory synapses, in the external plexiform layer (EPL) and the granule cell layer (GCL), but the vesicular glutamate transporters 1 (VGluT1) decreased only in EPL, not in GCL. Western-blot showed the decreases in the expression of gephyrin in the OB of CNGA2 KO mice, but not in the expression of the VGluT1. The results of immunohistochemistry and Western blot revealed that the excitatory and inhibitory synapses may have changed after deficits of peripheral inputs. GCs were the main participants in the EPL and GCL in the OB. Dendritic spines are the postsynaptic sites of the majority of excitatory synapses in the mammalian central nervous system, and the morphology and dynamics of dendritic spines change in response to novel experiences and neuropathologies. In the OB, spines on mature GCs are recipients of glutamatergic synapses in the GCL and reciprocal synapses in the EPL. Almost all study related to structural plasticity of GCs concentrated on the adult-born GCs, but the number of new-born granule cells in the OB is negligible compared with the number of preexisting GCs. In order to further reveal the quantitative changes of glutamatergic synapses on GCs, *in vivo* adult brain plasmid electroporation to label mature GCs in the OB directly were adopted. Here, the spines in EPL were defined as distal spines and the spines in GCL as proximal spines. It was revealed that the density of spines on granule cells decreased significantly in EPL (distal spines) of CNGA2 KO mice, but did not change significantly in GCL (proximal spines), as same as the result of optical density analysis in the VGluT1 immunolabeling. These data suggest that the structural plasticity of the distal dendrodendritic synapses, rather than the proximate axon-dendritic synapses on granular cells of the OB, are significantly affected by the peripheral olfactory inputs.

Key words activity-dependent synaptic structural plasticity, olfactory bulb, CNGA2 KO, synaptophysin, gephyrin, VGluT1, granule cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00629

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (91132307/H09, 31171061/C090208, 20921004), The Chinese Academy of Sciences (XDB02050500) and The Ministry of Science and Technology of China (2012BAI23B02).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

XU Fu-Qiang. E-mail: fuqiang.xu@wipm.ac.cn

RAO Xiao-Ping. E-mail: raomiaoping0902@126.com

Received: May 22, 2013 Accepted: June 4, 2013