



基于成串刺激计算立即释放囊泡池(RRP)大小的改进方法*

朱 颖^{1,2)} 孙坚原^{1,3)**}

(1) 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (2) 中国科学院大学, 北京 100049; (3) 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055)

摘要 突触囊泡的立即释放囊泡池(RRP)概念已被广泛用于突触传递的分析. 基于这些囊泡池中囊泡性质是均匀的假设, 通过外推成串刺激累积诱发的突触后兴奋性电流, 已经开发了几种确定RRP大小的方法. 然而, 使用不同刺激频率确定这些成串刺激得到的RRP大小结果不同. 这种频率依赖性显示了这些估算方法的不完备性, 与RRP的定义相矛盾. 因此, 我们提出了基于成串刺激计算RRP大小的改进算法. 假设RRP的填充率正比于RRP释放的部分, 并且矫正RRP的未使用部分, 给出RRP释放过程的完整数学描述, 得到具体的解析结果. 与已知的两种常用方法做比较, 该方法很好地描述了RRP的释放和填充过程, 得到了比较好的RRP大小和囊泡释放概率大小的评估. 该方法不受刺激频率的条件限制, 可以很好地适用于不能给予高频刺激的细胞.

关键词 RRP, calyx of Held突触, STP, 突触囊泡循环

中图分类号 Q6, R338

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0384

立即释放囊泡池(readily releasable pool, RRP)是指一群已经在突触前膜入坞(docked)且促成熟(primed), 并能够响应刺激在一定的概率下立即释放的突触囊泡. 在神经活动中, RRP很大程度上决定着每次动作电位触发的神经递质释放量, 它与囊泡释放率(release probability, Pr)一起成为决定突触传递强度的主要因素^[1]. 也因如此, RRP容量的检测及其调控研究备受关注^[2]. 到目前为止, 多种RRP检测的方法被提出, 其中大多数方法是基于RRP的耗竭来检测^[3]. 其主要原理是基于突触前动作电位连续发放导致RRP逐渐消耗, 突触传递强度逐渐变弱^[4]. 这些方法包括: a. 钙解笼锁(Ca^{2+} uncaging), 是由一个短暂的紫外线辐射脉冲诱导的, 瞬时和均匀地增加胞内 Ca^{2+} 的浓度, 从而诱导RRP囊泡全部释放^[5]; b. 高渗刺激(hypertonic stimulation), 用0.5 mol/L高渗蔗糖溶液刺激RRP囊泡释放, 这种方法的机制还不完全清楚^[6]; c. 方差均值分析(variance-mean analysis), 利用突触传递的统计特性来确定释放位

点的数量, 从而在位点100%占用的情况下确定最大的RRP大小^[7]; d. 动作电位成串刺激(AP-train stimulation), 用一串刺激频率通常在20~100 Hz范围内的动作电位刺激诱发突触传递, 通过RRP的消耗和有限的被促成熟囊泡补充来计算RRP的容量^[8]. 使用不同的刺激方式、检测手段和不同的实验对象得到RRP大小的结果不尽相同.

需要指出的是, 由于技术和标本特性的限制, 前3种方法仅适用于少数类型的突触. 此外, 响应这些非生理刺激的囊泡池可能与通过生理类似动作电位刺激释放的囊泡池并不等同^[3]. 而第4种方法是基于在生理条件下引起的突触反应, 目前被较广泛地应用于多种类型的突触. 这种方法不仅可估计RRP的囊泡数目, 而且还能同时计算囊泡释放率^[9]. 这一方法的基本原理是, 囊泡释放取决于

* 国家自然科学基金(31871033)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888537, E-mail: jy.sun1@siat.ac.cn

收稿日期: 2020-10-23, 接受日期: 2020-12-04

RRP的大小和动作电位引起单个囊泡融合的概率^[10].当给予成串动作电位刺激时,随着RRP的消耗动作电位诱发的突触后兴奋性电流(excitatory postsynaptic current, EPSC)将快速衰减,伴随着衰减的产生,突触中囊泡循环池的囊泡被促成熟来填充RRP.当RRP的消耗和囊泡促成熟达到平衡,即突触囊泡填充率等于囊泡释放率时,EPSC到达稳态平台期^[11].基于这个基本原理,研究者提出了两种确定突触RRP和Pr大小的方法.第一种方法是由成串刺激触发的EPSC累积释放量与刺激次数的关系,从稳态区的数据作线性反向外推到第一个刺激点得到初始时RRP的容量.这一方法假定对RRP的填充速率为一恒定值,Pr可以由第一个EPSC值除以RRP得到^[8].第二种方法是对第一种方法的矫正,以非线性反向外推得到初始时RRP的容量.这一方法认为对RRP的填充速率正比于RRP释放了的部分,同样,Pr可以由第一个EPSC值除以RRP得到^[12].这一方法先将EPSC的幅值归一化到最大的EPSC,之后再用1减去各个归一化后的值,将得到的曲线每个点累加,然后将得到的曲线按比例与累积EPSC幅值平台期时进行缩放,就可以得到矫正的反向延长线,此反向延长线与y轴的交点即为RRP的大小.这两种方法都得到了广泛的使用.但是,这两种方法得到的都是RRP释放了的部分,并没有对未释放部分加以矫正,且作图法得到的结果没有完整的数学描述,没有给出具体的解析结果^[3].

本文提出了RRP消耗的完整动力学描述,提出了两种解析解算法:a.假设RRP的填充率在刺激时是恒定的,并且矫正了RRP的未使用部分;b.假设RRP的填充率正比于RRP释放的部分,同样矫正了RRP的未使用部分.囊泡释放率Pr由第一个EPSC除以RRP大小得到.通过比较这4种方法得到的RRP和Pr,我们发现,基于第二种假设的动力学算法很好地描述了RRP的释放和填充过程,得到了比较良好的RRP大小和Pr大小的评估.该方法不受刺激频率的条件限制,可以很好地适用于不能给予高频刺激的细胞.

1 方 法

1.1 含有Calyx突触的脑片标本制备及电生理实验

实验使用出生后14~15 d的野生型(WT)

C57BL/6品系小鼠.小鼠用乙醚麻醉后,断头并迅速分离脑组织置于约为4°C的持续通入二元气(95% O₂, 5% CO₂)的切片用人工脑脊液中(成分: 125 mmol/L NaCl、25 mmol/L NaHCO₃、3 mmol/L 肌醇、2 mmol/L 丙酮酸钠、2.5 mmol/L KCl、1.25 mmol/L NaH₂PO₄、25 mmol/L 葡萄糖、0.4 mmol/L 维生素C、0.1 mmol/L CaCl₂、3 mmol/L MgCl₂, pH值约为7.2,渗透压约为300 mOsm,药品购自Sigma, USA).使用VT1200S震动切片机(Leica, Germany)切取2~3片厚度约为200 μm的包含MNTB区的脑片,并将脑片转移至37°C持续通入二元气的孵育用人工脑脊液(成分为: 25 mmol/L NaHCO₃、3 mmol/L 肌醇、2 mmol/L 丙酮酸钠、2.5 mmol/L KCl、1.25 mmol/L NaH₂PO₄、25 mmol/L 葡萄糖、0.4 mmol/L 维生素C、2 mmol/L CaCl₂、1 mmol/L MgCl₂, pH值约为7.2,渗透压约为300 mOsm,药品购自Sigma, USA)中孵育30 min.

孵育后脑片使用Axopatch 200B放大器(Axon Instruments Inc., CA)以全细胞电压钳模式对突触后进行电生理实验,串联电阻(series resistances) <10 MΩ,并进行95%的补偿.0.1 mmol/L 环噻嗪(cyclothiazide, CTZ; 药品购自Sigma, USA)加入人工脑脊液用于防止突触后EPSC饱和.通过双极电极置于斜方体中缝处给予突触前传入神经纤维电刺激(0.1 ms, 3~30 V).使用EPC-10放大器(HEKA, Germany)采集突触后自发释放和诱发释放电流.记录用玻璃电极使用P97(Sutter Instrument, USA)拉制仪制备.电极内液成分为: 125 mmol/L 葡萄糖酸钾(K-gluconate), 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L 磷酸肌酸钠(phosphocreatine), 4 mmol/L MgATP, 0.3 mmol/L 鸟苷三磷酸钠(NaGTP), 0.5 mmol/L EGTA, pH值约为7.2,渗透压约300 mOsm,药品购自Sigma, USA.记录电流时以5 kHz低通滤波,数据采集频率为20 kHz.实验动物的管理与使用符合中国科学院生物物理研究所伦理道德委员会的要求,严格遵守《中国科学院实验动物管理办法》和《实验动物管理条例》.

1.2 计算RRP大小的改进方法

成串刺激消耗RRP的过程可以由以下方程描述:

$$RRP_0 \times Pr_1 = EPSC_1 \quad [1]$$

$$(RRP_0 - EPSC_1 + Supply_1) \times Pr_2 = EPSC_2 \quad [2]$$

$$(RRP_0 - EPSC_1 - EPSC_2 + Supply_1 + Supply_2) \times Pr_3 = EPSC_3 \quad [3]$$

.....

$$(RRP_0 - EPSC_1 - \dots - EPSC_{N-1} + Supply_1 + \dots + Supply_{N-1}) \times Pr_N = EPSC_N \quad [N]$$

其中 RRP_0 代表初始 RRP 大小, Pr 代表任意时刻的囊泡释放率, $EPSC$ 代表 RRP 的释放量, $Supply$ 代表 RRP 的补充量.

假设当第 N 次刺激结束后, RRP 大小进入稳定态, 由于稳定态时 RRP 大小不变, 所以 RRP 的释放量 $EPSC$ 和补充量 $Supply$ 相同, 且 Pr 与 $EPSC$ 不再改变, 可以将之后的稳定态描述为以下过程:

$$(RRP_0 - \sum_i^N EPSC_i + \sum_i^N Supply_i) \times Pr_N = EPSC_N \quad [N+1]$$

首先假设 Pr 在囊泡释放过程中变化不大, 可以将方程 $[N+1]$ 除以方程 $[1]$, 就可以得到 RRP_0 的大小:

$$\frac{RRP_i}{RRP_0} = \frac{EPSC_{i+1}}{EPSC_1}$$

$$RRP_{i\_empty} = RRP_0 - RRP_i = RRP_0 \times (1 - \frac{EPSC_{i+1}}{EPSC_1})$$

$$Supply_i = k \times RRP_{i\_empty} = k \times RRP_0 \times (1 - \frac{EPSC_{i+1}}{EPSC_1})$$

由于稳定态时 RRP 大小不变, 所以 RRP 的释放量 $EPSC$ 和补充量 $Supply$ 相同, 所以有:

$$Supply_N = EPSC_N$$

$$\frac{Supply_i}{Supply_N} = \frac{Supply_i}{EPSC_N} = \frac{1 - \frac{EPSC_{i+1}}{EPSC_1}}{1 - \frac{EPSC_{N+1}}{EPSC_1}}$$

$$Supply_i = EPSC_N \times \frac{1 - \frac{EPSC_{i+1}}{EPSC_1}}{1 - \frac{EPSC_{N+1}}{EPSC_1}} = \frac{EPSC_1 - EPSC_{i+1}}{\frac{EPSC_1}{EPSC_N} - 1}$$

由上式可以得到:

$$RRP_0 = \frac{\sum_i^N EPSC_i - \sum_i^N Supply_i}{1 - \frac{EPSC_N}{EPSC_1}} \quad (1)$$

a. 如果假设 RRP 任意时刻的补充量都相同, 可以得到:

$$Supply_i = EPSC_N$$

$$RRP_0 = \frac{\sum_i^N EPSC_i - N \times EPSC_N}{1 - \frac{EPSC_N}{EPSC_1}} \quad (2)$$

分子即为之前提出的作图法描述的反向延长线与 y 轴交点的结果, 由于该方法只能描述使用过的 RRP 部分, 而 RRP 始终有一部分没有释放, 所以分母是对这一未释放部分的矫正.

b. 已知对 RRP 的补充量是受 RRP 使用过的部分决定的, 即 RRP 消耗越多补充量越多, 所以假设任意时刻对 RRP 的补充量正比于此时 RRP 消耗了的部分. 首先令任意时刻的 RRP 大小为 RRP_i 就可以得到 RRP 使用过的部分大小及此时 RRP 消耗了的部分 RRP_{i_empty} , 假设任意时刻对 RRP 的补充量与此时 RRP 消耗了的部分比值为 k , 就可以得到:

$$\begin{aligned}
 RRP_0 &= \frac{\sum_i^N EPSC_i - \sum_i^N \frac{EPSC_1 - EPSC_{i+1}}{\frac{EPSC_1}{EPSC_N} - 1}}{1 - \frac{EPSC_N}{EPSC_1}} \\
 &= \frac{\sum_i^N EPSC_i - \sum_i^N \frac{EPSC_1}{\frac{EPSC_1}{EPSC_N} - 1} + \sum_i^N \frac{EPSC_{i+1}}{\frac{EPSC_1}{EPSC_N} - 1}}{1 - \frac{EPSC_N}{EPSC_1}} \\
 &= \frac{\sum_i^N EPSC_i - \sum_i^N \frac{EPSC_1 \times EPSC_N}{EPSC_1 - EPSC_N} + \frac{EPSC_N}{EPSC_1 - EPSC_N} \times \sum_i^N EPSC_{i+1}}{1 - \frac{EPSC_N}{EPSC_1}} \\
 &= \frac{\sum_i^N EPSC_i - N \times \frac{EPSC_1 \times EPSC_N}{EPSC_1 - EPSC_N} + \frac{EPSC_N}{EPSC_1 - EPSC_N} \times (\sum_i^N EPSC_i - EPSC_1 + EPSC_N)}{1 - \frac{EPSC_N}{EPSC_1}}
 \end{aligned} \quad (3)$$

所以, 可以由 EPSC 的累积值以及初始 EPSC 和平台期 EPSC 的值得到 RRP 的初始大小.

1.3 数据分析

数据用平均值±标准误表示, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示相差显著, $P < 0.001$ 表示相差非常显著. 统计学数据均用 SigmaPlot (版本 10.0, Systat Software Inc., USA) 与 Igor Pro 6.32A (WaveMetrics, USA) 软件包处理.

2 结 果

2.1 生理温度下 RRP 填充的恢复时间

突触需要产生和维持一个一定大小的立即释放囊泡池 (RRP) 来触发同步释放^[13]. 当神经元活动放电后, RRP 将被来自突触终末内储存池的突触囊泡填充^[14]. 对室温下中枢神经突触 RRP 填充时间的研究表明, 与刺激之前的 RRP 相比, 10 s 足以恢复 RRP 的总囊泡个数^[15]. 为了测定在生理温度条件下不同频率刺激 Calyx of Held 突触 RRP 的恢复时间, 本实验分别给予细胞 50 个 10 Hz、20 Hz、50 Hz 或 100 Hz 的传入纤维刺激用于消耗 RRP, 之后给予一定的恢复时间, 最后再给予相应频率的 50 个传入纤维刺激用于测定 RRP 的恢复情况 (图 1a, b). 为了定量描述 RRP 的恢复率, 分别测量恢复后的第一个突触后兴奋性电流和累积的 50 个刺激产生的 EPSC 总和, 之后归一化到相应静息时的

第一个突触后兴奋性电流和累积的 50 个刺激产生的 EPSC 总和 (图 1c, d). 结果发现, 不同频率的刺激下 15 s 足以恢复 RRP 的总囊泡个数, 这个结果与之前的结果相似. 50 Hz 和 100 Hz 的高频刺激恢复时间明显快于 10 Hz 和 20 Hz 的低频刺激, 说明囊泡填充动力学依赖于突触前输入的频率, 这个结果同样印证了钙依赖囊泡停泊模型的可行性^[16].

2.2 同一细胞记录不同频率的成串刺激

为了评估不同频率刺激下 RRP 的消耗程度, 本实验给予 Calyx of Held 突触多个不同频率的成串刺激. 首先, 给予突触前 100 Hz 的传入纤维刺激, 之后静息 15 s 用于恢复 RRP 大小, 接着给予细胞 50 Hz 的传入纤维刺激, 依此类推, 分别给予细胞 100 Hz、50 Hz、20 Hz 和 10 Hz 的传入纤维刺激 (图 2a). 之后得到不同刺激频率下每个 EPSC 的幅值 (图 2b, 3a). 对得到的 EPSC 的幅值进行累加, 就可以基于成串刺激计算 RRP 大小的方法得到 RRP 的大小 (图 2c, d). 结果发现, 进入平台期后, 刺激频率越强, EPSC 平台期幅值越小, 表明刺激强度越高, RRP 消耗数目越多, 基于直线拟合或曲线拟合得到的 RRP 在刺激频率改变时得到了不同的大小, 这也反映了这两种方法在计算 RRP 大小时存在局限性^[3].

2.3 不同方法计算 RRP 容量的比较

基于成串刺激计算 RRP 大小的方法主要有两种且这两者都为作图法测定. 第一种是用直线拟合

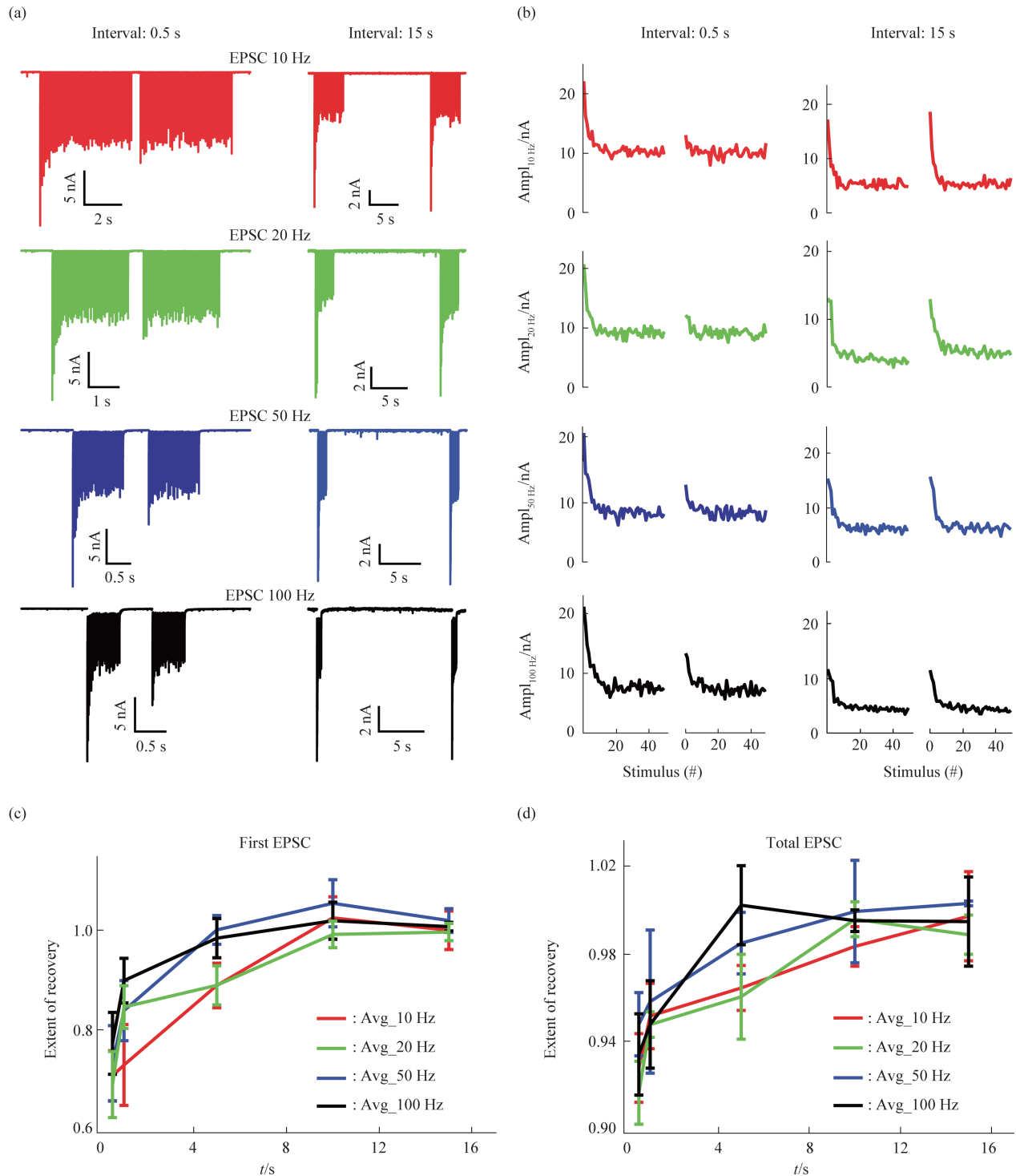


Fig. 1 Recruitment time of vesicles pool refilling at physiological temperature

(a, b) Representative EPSCs (a) and the corresponding amplitudes (b) during pair train stimulation at 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz and 100 Hz at physiological temperature. (c) Averaged time course of first EPSC recovery at 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz and 100 Hz. (d) Averaged time course of total EPSC recovery at 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz and 100 Hz.

进入平台期后的累积 EPSC 幅值曲线并反向延长，与 y 轴的交点即为 RRP 的大小，我们命名为 RRP_{train} ，这也是现在最常用的方法（图 2c）。第二

种是基于第一种方法的矫正版本，反向延长时用一条曲线而非直线与 y 轴相交，我们命名为 RRP_{cor} ，这一方法先将 EPSC 的幅值归一化到最大的 EPSC，

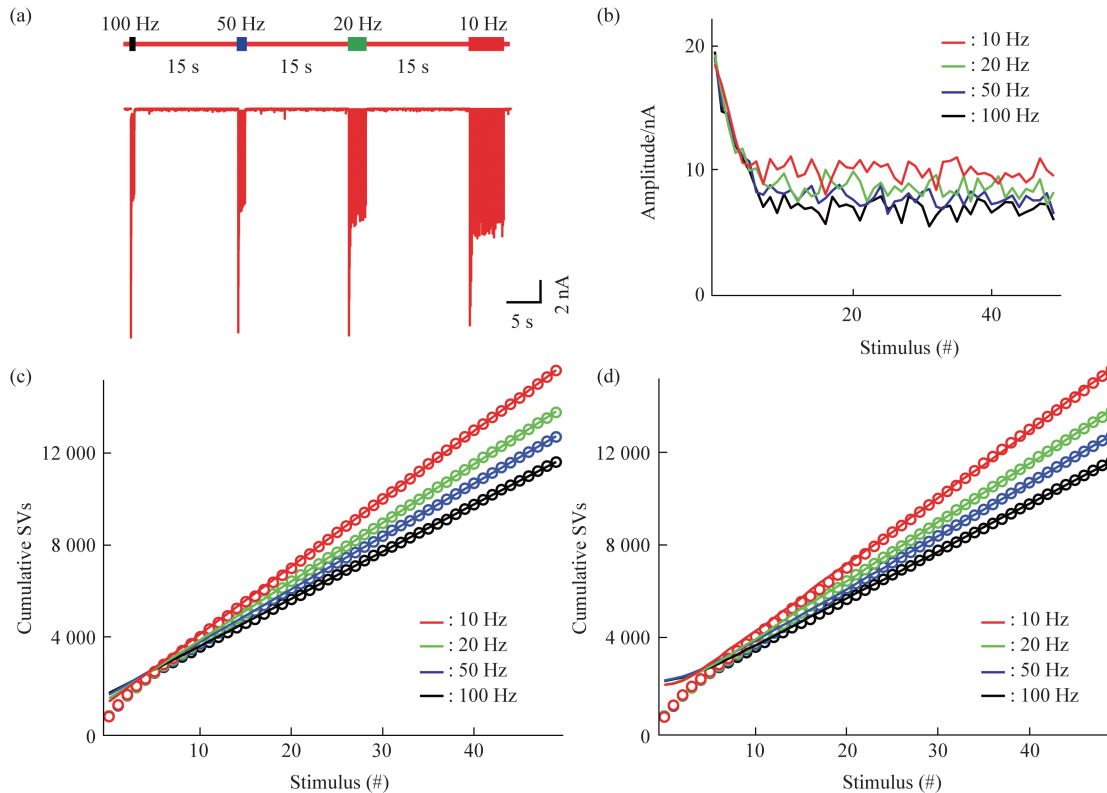


Fig. 2 Train EPSC recorded in the same cell with different frequencies

(a, b) Representative EPSCs (a) and the corresponding amplitudes (b) during train stimulation at 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz and 100 Hz in the same cell at physiological temperature. (c, d) Cumulative released synaptic vesicles (SVs) at 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz and 100 Hz during train stimulation and plot of corresponding effective RRP size by linear fitting (c) and corrected method (d).

之后再用1减去各个归一化后的值, 将得到的曲线每个点累加, 然后将得到的曲线按比例与累积EPSC幅值平台期时进行缩放, 就可以得到矫正的反向延长线(图2d). 本研究中, 提出RRP消耗的完整动力学描述, 提出两种解析解算法: a. 假设RRP的填充率在刺激时是恒定的, 并且矫正了RRP的未使用部分, 命名为 RRP_{M1} (公式(2)); b. 假设RRP的填充率正比于RRP释放的部分, 同样矫正了RRP的未使用部分, 命名为 RRP_{M2} (公式(3)). 囊泡释放率 Pr 由 $EPSC_i$ 除以 RRP 得到. 由于EPSC幅值平台期在这几种算法中的重要性, 本实验首先基于M2方法比较了RRP大小随着刺激次数增加的变化. 结果表明, 随着刺激次数的增加, RRP大小逐渐增大并进入稳态, 所以选取EPSC幅值平台期的最后25个点作为稳态的度量(图3b). 这4种方法得到的结果表明: RRP_{M2} 最大, 相应的 Pr 最小; RRP_{M1} 与 RRP_{cor} 大小相似, 相应的 Pr 也相似; RRP_{train} 最小, 相应的 Pr 最大; 最重要的是, M2方

法得到的不同频率下RRP大小与 Pr 大小没有明显频率依赖性, 而其他3种方法表现出明显的频率依赖性(图3c, d). 所以, M2方法比较好地描述了RRP的消耗过程, 该方法不受刺激频率的条件限制, 可以很好地适用于不能给予高频刺激的细胞.

2.4 不同方法计算 Pr 与双脉冲比的比较

已知, 双脉冲比(pair pulse ratio, PPR)反比于 Pr , 常用于比较 Pr 的大小. 以往的方法使用 $EPSC_i$ 除以 RRP 得到的囊泡释放率与 $1-PPR$ 相比出入较大. 本实验比较了4种方法得到的 Pr 与100 Hz刺激时的 $1-PPR$, 之所以选取100 Hz刺激时的 $1-PPR$ 相比较, 是因为100 Hz的传入纤维刺激时刺激间隔只有10 ms, 此时前两个刺激对RRP的供给囊泡数最少. 本实验比较了所有频率下每条曲线得到4种方法的结果与 $1-PPR$ 的结果(图4). 结果表明, M2方法得到的 Pr 与 $1-PPR$ 没有差异, 而其他3种方法得到的 Pr 与 $1-PPR$ 具有显著差异, 这进一步表明M2方法很好地描述了RRP的释放和填

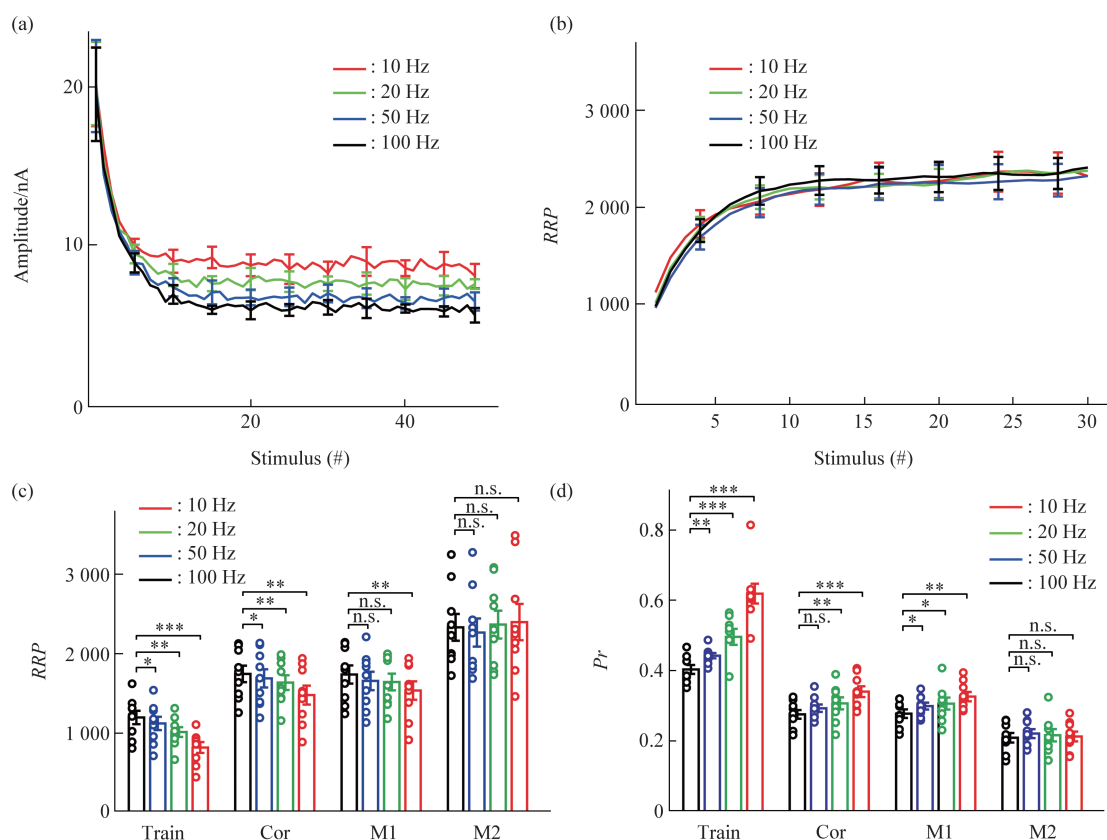


Fig. 3 RRP capacity calculated by different methods

(a) Averaged EPSC amplitudes at 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz and 100 Hz during train stimulation from seven synapses. (b) Plot of effective RRP size by M2 method during train stimulation. (c) Summary of the effects of altered stimulation frequency and calculated method on the RRP size of synaptic transmission. (d) Summary of the effects of altered stimulation frequency and calculated method on the RRP release probability. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s.: no significance.

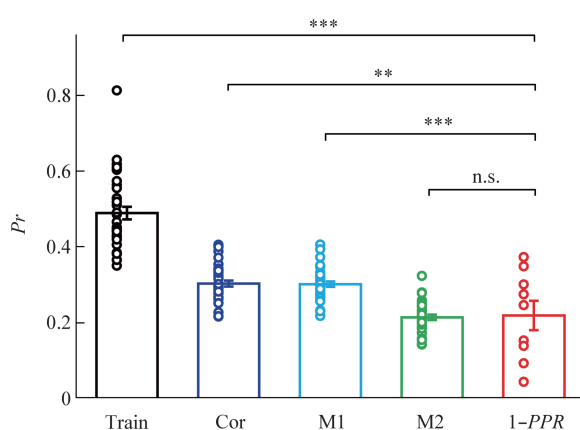


Fig. 4 P_r calculated by the first EPSC divided by RRP size compared with 1-PPR

Summary of the effects of calculated method on the RRP release probability compared with 1-PPR in the same synapse. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s.: no significance.

充过程, 得到了比较良好的 RRP 大小和 P_r 大小的评估.

3 讨论

3.1 生理温度下 RRP 的恢复时间

为了在同一细胞上比较不同频率刺激时得到的 RRP 大小, 需要先知道当特定频率耗竭 RRP 后 RRP 需要多长时间恢复到初始状态. 考虑到用成串刺激定量计算 RRP 方法的不精确性, 本实验使用归一化后成串刺激的第一个突触后兴奋性电流 (EPSC) 和累积 50 个刺激产生 EPSC 的总和作为 RRP 大小恢复的定量评估. 两种方法的结果都表明, 15 s 足以恢复 RRP 大小 (图 1), 这一结果与室温下报道的结果相似^[15]. 同样的, 当给予 15 s 恢复时间, 记录不同频率刺激时, 也发现成串刺激的第一个突触后兴奋性电流得到了完全恢复, 这进一步表明 15 s 恢复时间的可靠性 (图 2b, 3a). 同时发现, 刺激频率越高, 稳态时 EPSC 幅值越小, 这说明更短的恢复时间填充了较少的囊泡数 (图

3a). 由于 RRP 囊泡的填充过程具有钙离子依赖性, 而不同频率刺激可以诱导不同浓度的钙离子浓度, 所以恢复时间的结果表现出了明显的频率依赖性^[16].

3.2 改进算法计算RRP大小

RRP 的计算方法有很多种, 由于成串刺激方法是基于在生理条件下引起的突触反应, 可以很容易地应用于多种类型的突触, 所以本文讨论最为常用的成串刺激求解 RRP 的方法. 这一方法一般假设 RRP 中囊泡的性质是均匀的, RRP 中所有囊泡都有相同的释放率. 在这一前提假设下, 这一方法存在两大缺陷: a. 成串刺激强度相对较弱, 不能耗尽所有的 RRP 囊泡池, 所以得到的 RRP 大小一般都是 RRP 消耗了的部分; b. RRP 的消耗需要一定时间, 有新的囊泡从囊泡循环池对 RRP 进行了填充. 这两大原因一般认为造成了不同频率刺激得到 RRP 大小的差异. 通过完整的数学描述, 本文对 RRP 未消耗部分做了矫正, 并假设囊泡循环池对 RRP 的填充正比于 RRP 消耗了的部分, 这一假设也从本实验结果中得到了验证. 不同频率刺激初始消耗 RRP 时产生的 EPSC 相似, 说明初始 EPSC 的减小主要由 RRP 的消耗引起, 初始对 RRP 的囊泡填充数可以忽略, 印证了本文对囊泡填充速率与使用过的 RRP 部分成正比的假设. 使用本文的改进算法, 得到的 RRP 大小与 Pr 大小没有明显频率依赖性, 并且该 Pr 与 1-PPR 得到的结果基本一致, 说明该方法较好地矫正了不同频率刺激时造成的 RRP 大小差异 (图 3、4). RRP_{cor} 这一方法虽然对 RRP 囊泡的填充过程与本文 M2 方法有相同的假设, 但这一方法得到的 RRP 大小与 M1 方法得到的 RRP 大小具有相似精度且都显示频率依赖性, 由于 M2 方法矫正了 RRP 未消耗的部分, 说明了对 RRP 未消耗部分矫正的必要性^[12]. 还有研究报道 RRP 可以分为两个亚池, 在这一基础上提出了更为符合实际的非均一的囊泡池模型, RRP 囊泡释放率可以连续变化, 但这些模型都相对复杂, 不能简单应用^[3]. 本文的方法不受刺激频率的条件限制, 可以很好地适用于不能给予高频刺激的细胞, 且可以简单应用.

参 考 文 献

- [1] Neher E, Sakaba T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 2008, **59**(6): 861-872
- [2] Südhof T C. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 2004, **27**(1): 509-547
- [3] Neher E. Merits and limitations of vesicle pool models in view of heterogeneous populations of synaptic vesicles. *Neuron*, 2015, **87**(6): 1131-1142
- [4] Sara Y, Mozhayeva M G, Liu X, *et al.* Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. *J Neurosci*, 2018, **22**(5): 1608-1617
- [5] Wadel K, Neher E, Sakaba T. The coupling between synaptic vesicles and Ca^{2+} channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron*, 2007, **53**(4): 563-575
- [6] Rosenmund C, Stevens C F. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 1996, **16**(6): 1197-1207
- [7] Clements J D, Silve R A. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci*, 2000, **23**(3): 105-113
- [8] Schneggenburger R, Meyer A C, Neher E. Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron*, 1999, **23**(2): 399-409
- [9] Thanawala M S, Regehr W G. Determining synaptic parameters using high-frequency activation. *J Neurosci Methods*, 2016, **264**: 136-152
- [10] Brenowitz S, Trussell L O. Minimizing synaptic depression by control of release probability. *J Neurosci*, 2001, **21**(6): 1857-1867
- [11] Hennig M H, Postlethwaite M, Forsythe I D, *et al.* A biophysical model of short-term plasticity at the calyx of Held. *Neurocomputing*, 2007, **70**(10-12): 1626-1629
- [12] Thanawala M S, Regehr W G. Presynaptic calcium influx controls neurotransmitter release in part by regulating the effective size of the readily releasable pool. *J Neurosci*, 2013, **33**(11): 4625-4633
- [13] Alabi A R A, Tsien R W. Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect in Biol*, 2012, **4**(8): a013680
- [14] Neher E, Zucker R S. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, 1993, **10**(1): 21-30
- [15] Wang L Y, Kaczmarek L K. High-frequency firing helps replenish the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Nature*, 1998, **394**(6691): 384-388
- [16] Walter A M, Pinheiro P S, Verhage M, *et al.* A sequential vesicle pool model with a single release sensor and a Ca^{2+} -dependent priming catalyst effectively explains Ca^{2+} -dependent properties of neurosecretion. *Plos Comput Biol*, 2013, **9**(12): e1003362

An Improved Method to Calculate RRP Size Based on Train Stimulation*

ZHU Ying^{1,2)}, SUN Jian-Yuan^{1,3)**}

⁽¹⁾*Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

⁽²⁾*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*

⁽³⁾*Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)*

Abstract Readily releasable pool (RRP) of synaptic vesicles as the concept that defines the capacity of vesicle availability has been widely used in the study of synaptic transmission. Several approaches have been developed to determine the size of RRP by extrapolating the cumulative EPSCs corresponding to a train stimulation based on the assumption that the properties of vesicle in this pool are homogeneous. However, the estimated RRP sizes by these approaches often vary with different stimulation frequencies. The frequency dependence displays the incompleteness of estimation and is contradictory to the definition of RRP. Here, we proposed an improved approach to estimate RRP size. Given the replenishment rate proportional to the released part of RRP and corrected the unreleased part of RRP, we obtained a complete mathematical description of the RRP release process and derived the analytic solution. Compared with the two commonly used methods, it has been found that this scheme well describes the dynamic process of RRP, and obtains a relatively good evaluation of RRP size and release probability. This approach is not limited by the stimulation frequency and can be well applied to the cells that cannot be stimulated by high frequency.

Key words RRP, calyx of Held, STP, vesicle recycling

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0384

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(31871033).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64888537, E-mail: jy.sun1@siat.ac.cn

Received: October 23, 2020 Accepted: December 4, 2020