文章编号:1000-5404(2009)07-0561-04

论著

OrexinA 对小鼠前额叶皮层 PL 区不同细胞的作用

李 博,闫 洁,陈 芳,胡志安 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 应用膜片钳全细胞记录技术,探讨觉醒肽 orexinA 对小鼠前额叶皮层 PL 区细胞的作用。**方法** 制备小鼠前额叶皮质脑片,在膜片钳全细胞记录模式下,观察记录 PL 区锥体神经元和中间神经元的电生理学特点及其对 orexinA 的反应情况。**结果** 54 例锥体神经元对 orexinA 总反应率为 51.9%。36 例 Ih(+)锥体神经元对 orexinA 反应率为 66.7%,18 例 Ih(-)锥体神经元对 orexinA 反应率为 22.2%,两者差异具有统计学意义($P<0.01$);15 例中间神经元对 orexinA 均无反应。**结论** orexinA 对前额叶皮层 PL 区锥体神经元具有一定兴奋性效应,并且表现该兴奋性反应的细胞倾向分布于具有 Ih 电流的锥体神经元中。

关键词:orexinA;前额叶皮层 PL 区;锥体神经元;中间神经元;Ih 电流
中图法分类号:R322.81; R329.25; R341 **文献标识码**:A

Effect of exogenous orexinA on different neurons in mouse prefrontal cortex prelimbic area

LI Bo, YAN Jie, CHEN Fang, HU Zhi-an (Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of exogenous orexinA on the pyramid neurons and interneurons in the prefrontal cortex prelimbic (PL) area. **Methods** The pyramid neurons and interneurons in PL area of Kunming mice were selected from prefrontal cortex slices by infrared visual patch clamp technique. The morphology and electrophysiological features of the pyramid neurons and interneurons were observed. The effect of exogenous orexinA at a concentration of 400 nmol/L on these cells was studied using the whole cell configuration. **Results** The pyramid neurons were large, pyramidal in cell body with clear apical dendrites extending vertically and several basal dendrites radiating. The interneurons were comparatively smaller and had several processes from cell body. In current clamp mode, all 54 pyramid neurons having been recorded showed frequency adaption, and the 15 recorded interneurons discharged rapidly and had no frequency adaption. While in voltage clamp mode, 36 pyramid neurons were regarded as Ih(+) pyramid neurons for recorded hyperpolariztion-activated cation current, and the left 18 and 15 interneurons were Ih(-). Exogenous orexinA had a total reaction rate of 51.9% on 54 recorded pyramid neurons under current clamp, and a rate of 66.7% on 36 Ih(+) pyramid neurons and of 22.2% on the Ih(-) pyramid neurons under voltage clamp. All 15 recorded interneurons had no reaction to exogenous orexinA under either mode. **Conclusion** OrexinA plays excitatory effect on pyramid neurons in the prefrontal cortex PL area, and this effect is much more noticeable in pyramid neurons with Ih currents.

Key words: orexinA; prefrontal cortex prelimbic area; pyramid neurons; interneurons; Ih currents

Orexin(又称 hypocretin)是 1998 年发现的一类小分子神经肽,主要由外侧下丘脑区特定神经元产生。Orexin 系统包括来源于同一前体分子的 2 个单体 orexinA 和 orexinB,以及 2 种特异的 G 蛋白耦联受体 OX1R 和 OX2R。Orexin 神经元的分布较为局限,但其纤维投射以及受体分布却非常广泛,遍及多个脑区。Orexin 系统与机体一系列生理功能的调控相关,目前认为其最重要的功能是对睡眠-觉醒的调节[1-3]。大

基金项目:国家自然科学基金(30670668);全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA195)
Supported by the National Natural Foundation of China (30670668) and the Foundation of "Eleventh Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (06MA195)
作者简介:李 博,男,山东省德州市人,硕士研究生,主要从事脑觉醒与认知方面的研究。E-mail:libo_soldier@yahoo.com.cn
通信作者:胡志安,电话:(023)68752254,E-mail:zhianhu@yahoo,com.cn
收稿日期:2008-10-15;修回日期:2008-11-03

脑皮层是睡眠-觉醒调节系统的最终作用靶区,尤其是内侧前额叶皮层在觉醒、认知等脑高级功能中发挥着重要作用。内侧前额叶皮层主要由阈下皮层(the infralimbic cortex, IL)、缘前皮层(the prelimbic cortex, PL)和腹前扣带回皮层组成(ventral anterior cingulate cortex, AC),其中文献[4]报道 PL 区可能与脑高级神经的执行关系更为密切。另外,已有研究证实前额叶皮层能够接受 orexin 能纤维的支配并表达 orexin 受体[1,2];我室前期研究也表明 orexinA 对前额叶皮层锥体神经元具有直接兴奋作用[5-7]。但是对于前额叶皮层某些特定区域的不同细胞群体,orexinA 的作用情况尚不清楚。本实验采用脑片膜片钳技术,分别观察小鼠前额叶皮层 PL 区锥体神经元及中间神经元对 orexinA 的反应情况,并初步探讨其中的作用规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 10~15 d 的昆明小鼠 30 只,雌雄不限,由本校实验动物中心提供。

1.2 试剂

人工脑脊液(artifical cerebrospinal fluid, ACSF, mmol/L): NaCl 124, KCl 3, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 2, NaH_2PO_4 1.23, $NaHCO_3$ 26, D-glocuse 10; 切片液(mmol/L): sucrose 220, KCl 2.5, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 6, NaH_2PO_4 1.25, $NaHCO_3$ 26, D-glocuse 10。2 种溶液混合气(95% O_2 +5% CO_2)饱和条件下用 NaOH 和 HCl 调 pH 至 7.3~7.4。电极内液(mmol/L):葡萄糖酸钾 140, $MgCl_2$ 2, K_2ATP 2, EGTA 1.1, HEPES 10,用 NaOH 和 HCl 调 pH 至 7.2~7.3,另外加入 biocytin(0.5%)用作细胞形态鉴定,之后电极内液经 0.22 μm 微孔膜过滤分装后 -20 ℃冻存备用。

OrexinA 用去离子水配制成 800 μmol/L 母液,分装后 -20 ℃ 冻存备用,实验当天用新鲜 ACSF 配制成终浓度。

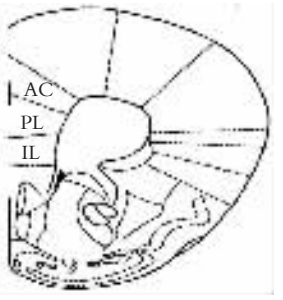
葡萄糖酸钾、EGTA、K_2ATP、HEPES、biocytin、orexinA 均为 Sigma 公司产品。

1.3 前额叶脑片的制备

小鼠快速断头取脑,置入 0~4 ℃混合气饱和的切片液中,30~60 s 后取出修块,用少许 502 胶把修好的组织块固定在切片机的标本托上,在 0~4 ℃混合气饱和的切片液中,用振动切片机将前额叶按冠状面切成约 350 μm 的薄片(图 1)。全部脑片置于混合气饱和的 ACSF 中室温下(20~24 ℃)孵育 90 min 以上备用。

1.4 脑片固定、灌流与给药

采用盖网固定法,即用银丝制成 U 形框架,将稀疏的尼龙丝附着其上,制成盖网轻压于脑片上。使用恒流泵持续向脑片浴槽灌注混合气饱和的 ACSF,脑片浸没于液面下 1~2 mm。给药采用局部喷射给药装置,药物配成终浓度后加入装置中,通过尖端直径约 50 μm 的管口喷出。



IL:阈下皮层;PL:缘前皮层;AC:腹前扣带回皮层

图1 小鼠前额叶冠状切面示意图

1.5 膜片钳记录

采用软质中性有芯玻璃管(直径 1.5 mm,长 8 cm,南京泉水教学实验器材公司)于拉制仪(Sutter, P-97)上拉制成尖端 2~3 μm 的微电极。充满电极内液后阻抗为 2~4 MΩ。实验采用 EPC-10 膜片钳放大器,PULSE 记录软件和 Igor 分析软件(均为 HEKA 公司产品)。采样频率 10 kHz,滤波频率 3 kHz。在前额叶皮层 PL 区分别选择典型的大锥体神经元及小中间神经元进行膜片钳实验。形成全细胞记录后,记录静息膜电位。首先进行锥体神经元和中间神经元电生理学特点的观察:①电流钳模式下,给予 1 s 一定强度的内向电流刺激,观察动作电位的发放有无频率适应现象[8,9];②电压钳模式下,给予一串跃阶超极化测试电压,观察有无超极化激活的阳离子电流(hyperpolarization-activated cation current, Ih)产生[10]。然后在电流钳模式下分别观察给予 orexinA(400 nmol/L)后锥体神经元和中间神经元的反应情况,前期预实验已表明记录细胞在 orexinA 为 400 nmol/L 时反应情况最佳。除静息膜电位的测量以外,其余指标均在膜钳制电压为 -60 mV 的条件下采集。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

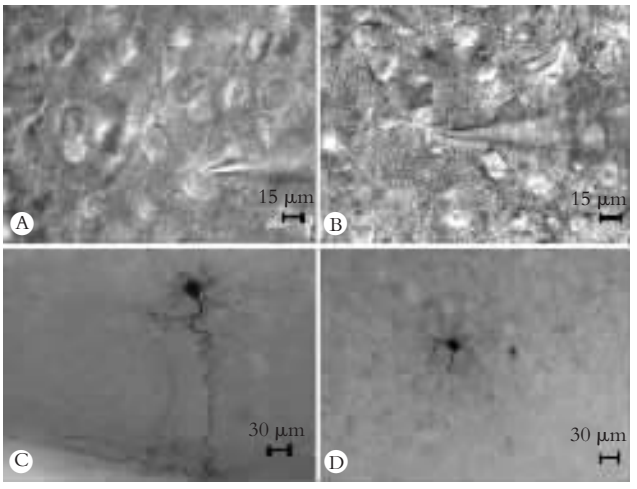
2.1 PL 区锥体神经元和中间神经元的形态学特点

在红外干涉相差技术下,可以较为清晰的看到细胞的细胞体形态和树突走行,锥体神经元胞体积较大,镜下直径 30~35 μmol/L,呈锥体形态,并且可以清楚辨别出顶树突的发出段(图 2A);中间神经元细胞体积较小,镜下直径 20~25 μmol/L,形态多不规则(图 2B)。细胞经生物素 biocytin 染色固定后,光镜下进一步做形态学鉴定:锥体神经元细胞体积大,具有明显的顶树突延伸至皮层表面,另有若干基底树突(图 2C);中间神经元细胞体积小,细胞体周围发出若干长度不等的突起,无顶树突(图 2D)。

2.2 PL 区锥体神经元和中间神经元的电生理学特征

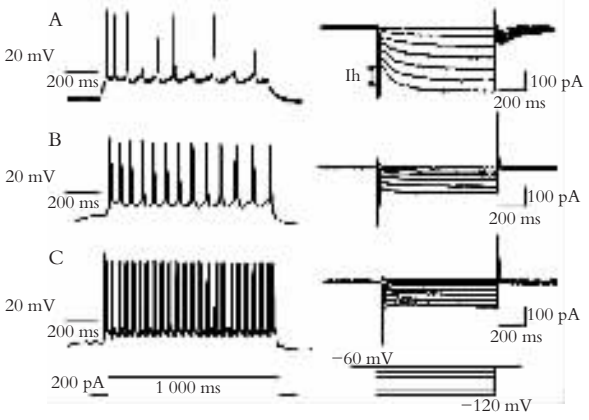
成功封接记录锥体神经元 54 例,静息电位水平为(62.4±5.6)mV;中间神经元 15 例,静息电位水平为(66.4±6.4)mV。电流钳模式下,给予 200 pA 的内向电流刺激,持续 1 s,54 例锥

体神经元动作电位的发放均表现出频率适应现象(frequency adaption,相邻动作电位发放的时间间隔逐渐延长)(图 3A、B);15 例中间神经元的动作电位表现为快频发放,均无频率适应现象(图 3C)。电压钳模式下,在 -120 ~ -60 mV 跃阶超极化电压刺激下,54 例锥体神经元中有 36 例细胞记录出超极化激活的阳离子电流(hyperpolarization-activated cation current,Ih),记为 Ih(+)锥体神经元(图 3A),18 例细胞没有记录出 Ih 电流,记为 Ih(-)锥体神经元(图 3B);15 例中间神经元均没有记录出 Ih 电流(图 3C)。



A、B:干涉相差显微镜下图像;C、D:biocytin 标记后显色

图 2　小鼠前额叶皮层 PL 区锥体神经元(A、C)和中间神经元(B、D)观察



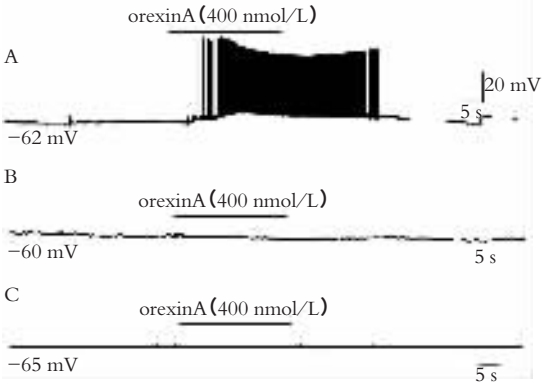
左:电流钳记录;右:电压钳记录

A: Ih(+)锥体神经元;B: Ih(-)锥体神经元;C: 中间神经元

图 3　PL 区锥体神经元和中间神经元的电生理学特征

2.3　PL 区锥体神经元和中间神经元对 orexinA 的反应

电流钳模式下,给予 orexinA(400 nmol/L),观察记录细胞对药物的反应。54 例锥体神经元中有 28 例细胞加药后发生兴奋性变化(膜电位去极化伴动作电位发放,冲洗后可恢复),26 例细胞加药后无变化,药物总反应率为 51.9%。进一步分析发现:36 例 Ih(+)锥体神经元中,有 24 例细胞给予 orexinA 后发生兴奋性变化(图 4A),其余 12 例细胞膜电位均无变化,药物反应率为 66.7%;18 例 Ih(-)细胞中只有 4 例细胞给予 orexinA 后发生兴奋性变化,其余 14 例细胞加药前后膜电位无变化(图 4B),药物反应率为 22.2%。15 例中间神经元给予 orexinA 后膜电位均无变化(图 4C),药物反应率为 0。两类锥体神经元对 orexinA 的反应率具有显著的统计学差异($P<0.01$)。



A: Ih(+)锥体神经元;B: Ih(-)锥体神经元;C: 中间神经元

图 4　PL 区锥体神经元和中间神经元对 orexinA 的反应

3　讨论

前额叶皮层是与觉醒水平高度相关的脑区,在脑行使许多高级认知功能,尤其是内侧前额叶皮层与高级神经功能的执行关系更为密切[4]。已有报道前额叶皮层接受来自 orexin 能纤维的投射并表达有 orexin 受体[1,2]。我室前期的研究结果也已经显示 orexinA 可以兴奋前额叶皮层锥体细胞[5,6],但对于前额叶皮层某些特定区域尤其是内侧前额叶皮层的不同细胞群体,orexinA 的作用情况还不清楚。因此在本实验中我们充分利用红外可视脑片膜片钳的技术特点,首先根据形态学特点把前额叶皮层 PL 区锥体神经元和中间神经元加以区分,然后再结合两者的电生理学特征作进一步的鉴定。54 例锥体神经元动作电位的发放均表现出频率适应现象,符合前额叶皮层兴奋性锥体神经元动作电位的发放特点[8]。另外,在超极化电压刺激下约有 2/3 的细胞记录出 Ih 电流;而 15 例中间神经元的动作电位表现为快频发放,均无频率适应现象,且在超极化电压刺激下记录不出 Ih 电流,此与皮层抑制性中间神经元的电生理学特点相一致[9]。因此,在明确了前额叶皮层 PL 区锥体神经元和中间神经元形态和电生理学特点的基础上,我们进一步观察两者对 orexinA 的反应情况,结果表明:锥体神经元对 orexinA 具有较高的反应率(51.9%),而中间神经元对 orexinA

无反应,其中 orexinA 对该区域锥体神经元的反应率远高于其对体感皮层、视皮层等其他皮层脑区锥体神经元的反应率[11],此一结果亦与 orexin 受体在前额叶皮层呈中等密度分布[1,2]的形态学论断相吻合。另外,我们进一步分析发现:Ih(+)锥体神经元对 orexinA 的反应率为 66.7%,远远高于 Ih(-)锥体神经元对 orexinA 的反应率 22.2%($P<0.01$),此结果提示 orexinA 与 Ih 电流具有密切关系。在不同的神经结构中,orexins 的兴奋作用涉及不同的离子基础,如钾通道的阻滞[5],钠-钙交换的激活[12]等,而本实验结果表明 Ih 电流很可能是 orexinA 在前额叶皮层发挥兴奋性作用的另一离子靶点。

Ih 电流主要由超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(hyperpolarization -activated, cation nonselective, HCN)所介导。HCN 通道在细胞膜超极化时被激活,产生内向阳离子电流,即 Ih 电流。Ih 电流对维持细胞兴奋性和静息膜电位,整合突触信息等具有重要作用[13,14]。在中枢神经系统中,目前已知多种神经递质和化学药物可以通过其对 HCN 通道的调控来影响或者改变神经元的兴奋性。例如,DA 通过增加 HCN 通道电导降低内嗅皮层锥体细胞的兴奋性[15];在前额叶皮层,NA 通过激活 α2 型受体抑制 Ih 电流,从而增加了锥体细胞在工作记忆"延迟"期中的放电活动[16];抗癫痫药物拉莫三嗪(lamotrigine)通过上调 Ih 电流幅值可以选择性地减少海马 CA1 区锥体神经元的放电[17];睡眠调节肽皮质抑素(cortistatin)通过增强 Ih 电流可以抑制海马神经元的活动[18]。综上可以得出,增强 Ih 电流可以降低神经元的兴奋性,反之,抑制 Ih 电流则可以增加神经元的兴奋性。在本实验中,觉醒肽 orexinA 对前额叶 PL 区 Ih(+)锥体神经元具有很高的兴奋性效应,而 orexinA 的这种兴奋性效应是否也是由 Ih 电流所介导尚且缺乏直接的实验证据,因此,在前额叶皮层探讨 orexinA 与 Ih 电流的关系是我们下一阶段实验所要重点解决的问题。

参考文献:

[1] Ohno K, Sakurai T. Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness[J]. Front Neuroendocrinol, 2008, 29(1): 70-87.

[2] Nishino S. The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control[J]. Neuropeptides, 2007, 41(3):117-133.

[3] 宋承辉,胡志安. Orexin:觉醒通路中一种重要的下丘脑神经肽[J]. 第三军医大学学报,2003,25(13):1207-1209.

[4] 陈伯成,赵红梅,谌小维,等. Orexin A 对麻醉大鼠前额叶皮层神经元单位放电的影响及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 105-107.

[5] Nasif F J, Sidiropoulou K, Hu X T, *et al*. Repeated cocaine administration increases membrane excitability of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(3): 1305-1313.

[6] Xia J, Chen X, Song C, *et al*. Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin A through the inhibition of potassium currents[J]. J Neurosci Res, 2005, 82(5):729-736.

[7] 张春青,夏建霞,陈 鹏,等. 大鼠前额叶皮层锥体细胞中 Orexin A 对谷氨酸介导电流的调节效应[J]. 第三军医大学学报,2007,29(10):922-924.

[8] Degenetais E, Thierry A M, Glowinski J, *et al*. Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an *in vivo* intracellular recording study[J]. Cereb Cortex, 2002, 12(1):1-16.

[9] Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, *et al*. Interneurons of the neocortical inhibitory system[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(10): 793-807.

[10] Park K, Lee S, Kang S J, *et al*. Hyperpolarization-activated currents control the excitability of principal neurons in the basolateral amygdala[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(3):718-724.

[11] Bayer L, Serafin M, Eggermann E, *et al*. Exclusive postsynaptic action of hypocretin-orexin on sublayer 6b cortical neurons[J]. J Neurosci, 2004,24(30):6760-6764.

[12] Burdakov D, Liss B, Ashcroft F M. Orexin excites GABAergic neurons of the arcuate nucleus by activating the sodium-calcium exchanger[J]. J Neurosci, 2003, 23(12): 4951-4957.

[13] Day M, Carr D B, Ulrich S, *et al*. Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and Kleak channels[J]. J Neuronsci, 2005, 25(38): 8776-8787.

[14] Robinson R B, Siegelbaum S A. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function[J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65:453-480.

[15] Rosenkranz J A, Johnston D. Dopaminergic regulation of neuronal excitability through modulation of Ih in layer V entorhinal cortex[J]. J Neurosci, 2006, 26(12):3229-3244.

[16] Wang M, Ramos B P, Paspalas C D, *et al*. Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex[J]. Cell, 2007, 129(2): 397-410.

[17] Poolos N P. The Yin and Yang of the H-Channel and Its Role in Epilepsy[J]. Epilepsy Curr,2004,4(1):3-6.

[18] Schweitzer P, Madamba S G, Siggins G R. The sleep-modulating peptide cortistatin augments the h-current in hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 2003, 23(34):10884-10891.

(编辑 汪勤俭)