DOI:10.16016/j.1000-5404.202001149

Orexin 对蓝斑底核神经元活动的调控作用及机制研究

文思怡,冯 慧,庞钰洁,乔啟城,杨 念,张 骏 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院生理学教研室

[摘要] **目的** 研究 orexin 对蓝斑底核(sublaterodorsal tegmental nucleus, SLD)神经元的调控作用及其机制,初步探讨 orexin 对 SLD 神经元放电活动的影响以及在其介导的快速眼动(rapid eye movement,REM)睡眠调控中可能发挥的作用。**方法** 采用 vglut1、GAD 67、orexin-1/2 型受体以及 NeuN 对 SLD 脑区进行免疫荧光染色,对 SLD 神经元的形态学基础进行初步研究;采用出生后 8~14 d 的 SPF 级 SD 大鼠,制备包含 SLD 脑区且具有生理活性的离体脑片,采用全细胞膜片钳记录结合神经药理学的方法来研究 orexin 对 SLD 神经元的调控作用及机制。**结果** SLD 脑区大多数神经元均表现为 vglut1 和 orexin-1/2 型受体阳性;orexin 在 SLD 神经元上引起了明显的去极化反应($P<0.01$)并伴随 SLD 神经元膜电位阈下振荡的增强($P<0.05$);orexin 主要增强了 SLD 神经元膜电位在 delta($P<0.05$)和 theta($P<0.05$)频段阈下振荡的功率;orexin 使 SLD 神经元的放电与 delta 频段振荡的锁相关系提前($P<0.05$),并使神经元更容易放电;orexin 使 SLD 神经元膜电位在 theta 频段的阈下振荡更加规则和稳定($P<0.05$),从而稳定 SLD 神经元的放电。**结论** Orexin 一方面通过提高 SLD 神经元的兴奋性,另一方面通过调控 SLD 神经元膜电位的阈下振荡使得 SLD 神经元的放电更加高效稳定,进而调控 SLD 神经元的活动并可能参与其介导的 REM 睡眠调控。

[关键词] orexin;蓝斑底核;神经元活动;阈下振荡

[中图法分类号] Q516; R322.81; R338.63 [文献标志码] A

Orexin enhances firing activities of neurons in neonatal rat sublaterodorsal tegmental nucleus

WEN Siyi, FENG Hui, PANG Yujie, QIAO Qicheng, YANG Nian, ZHANG Jun Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing,400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and underlying mechanism of orexin in modulating the firing activties of sublaterodorsal tegmental nucleus (SLD) neurons and its possible role in mediating rapid eye movement (REM) sleep regulation. **Methods** Immunostaining for vglut1, GAD 67, orexin-1/2 receptors and NeuN was performed on brain slices of male adult rats to characterize the distribution pattern of orexin signaling machineries in the SLD. Whole-cell patch-clamp recordings were conducted to investigate the modulatory effect of orexin on membrane potential level and sub-threshold membrane potential oscillations of SLD neurons in brain slices from neonatal SD rats(8~14 d old), and the contribution of these orexin-elicited modulations to the firing activities of SLD neurons was analyzed. **Results** Immunostaining results showed that the vast majority of SLD neurons were positive for vglut1 and orexin-1/2 receptors. In current-clamp configurations, orexin elicited obvious depolarization in the membrane potential ($P<0.01$) and increased the delta (1~4 Hz, $P<0.05$) and theta (4~12 Hz, $P<0.05$) band power in sub-threshold membrane potential

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471346)

[通信作者] 张 骏,E-mail:zhangjun@tmmu.edu.cn

oscillations of SLD neurons. The locking phase of SLD neuronal spikes was pre-shifted in sub-threshold delta oscillations ($P<0.05$), and the stability of sub-threshold theta oscillation increased significantly in the presence of orexin ($P<0.05$), resulting in enhanced firing activities of SLD neurons. **Conclusion** Orexin enhances the firing activities of SLD neurons by eliciting the depolarization of the membrane potential and modulating the sub-threshold membrane oscillations of the neurons, and thus plays a role in REM sleep regulation.

[**Key words**] orexin; sublaterodorsal tegmental nucleus; neuronal activity; sub-threshold oscillations

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471346). Corresponding author: ZHANG Jun, E-mail: zhangjun@tmmu.edu.cn

Orexin,也称为 hypocretin,是由外侧下丘脑区(lateral hypothalamic area, LHA)和穹隆周区(perifornical area, PeF)orexin 神经元产生的一种肽类递质,自被发现以来,orexin 与睡眠-觉醒调控的密切关系引起了广泛的关注。人的 orexin 能神经系统受损后引起嗜睡猝倒症,主要表现为觉醒维持困难[1]。因此,orexin 既往被认为是一种觉醒肽。有意思的是,除了广泛投射到觉醒相关脑区,orexin 神经元对睡眠相关脑区也有直接的纤维投射[2],提示 orexin 可能参与了睡眠的调控。文献[3]报道中等强度的 orexin 纤维投射到与快速眼动(rapid eye movement, REM)睡眠转换和维持密切相关的蓝斑底核(sublaterodorsal tegmental nucleus, SLD),且 orexin 能纤维末梢呈曲张体样地表达于 SLD 神经元周围。在 SLD 注射 orexin,对于处于非快速眼动(non-rapid eye movement, NREM)睡眠期间的动物,orexin 可以诱导出稳定的快速眼动(rapid eye movement, REM)睡眠[4]。以上实验证据表明 orexin 很有可能通过调控 SLD 参与了 REM 睡眠的调控,然而 orexin 调控 SLD 的机制尚不清楚。

中枢神经系统中神经元的活动是相关脑区行使高级功能的基础。既往离体膜片钳实验证明 orexin 可以通过去极化 SLD 神经元,使 SLD 神经元产生一个兴奋效应,从而影响 SLD 神经元的功能[5]。然而,在体情况下决定一个神经元功能的因素除了神经元膜电位的变化,还有一系列因素,例如神经元的放电以及神经元膜电位的阈下振荡等。已有研究表明,orexin 可以通过调控神经元膜电位的阈下振荡,增加神经元的放电效率,甚至促进神经元网络的同步化放电[6]。业已证明,SLD 神经元普遍存在各个频段的阈下膜电位振荡,这种振荡可以规范神经元放电的模式[7],使 SLD 神经元网络的放电更加高效和同步,而 SLD 脑区神经元网络的高效同步化放电是 REM 睡眠转换和维持的核心机制。因此,orexin 对 SLD 神经元膜电位水平、膜的特性以及膜电位阈下振荡的调控效应以及相关的生理意义值得进一步研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

在免疫荧光组织化学实验中所使用的实验动物均为体质量在 300~350 g 之间的 SPF 级的成年 SD 雄性大鼠,而在膜片钳实验中所使用的实验动物均为出生后 8~14 d 之间的 SPF 级 SD 乳大鼠。以上所有实验动物均取自于陆军军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF),配方(mmol/L):NaCl 120,KCl 3,$NaHCO_3$ 25,$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.25,$CaCl_2$ 1.2,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.2,glucose 11,丙酮酸钠 3,抗坏血栓钠 1。

切片液(section solution),配方(mmol/L):sucrose 90,NaCl 60,$NaHCO_3$ 26.5,KCl 2.75,$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5,$CaCl_2$ 1,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5,glucose 9,丙酮酸钠 3,抗坏血栓钠 1。

电极内液(internal solution),配方(mmol/L):potassium gluconate 130,KCl 5,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2,Hepes 10,EGTA 0.1,Na_2-ATP 2,Na_2-GTP 0.2。

Orexin-A 购置于英国 Tocris Bioscience 公司,DNQX、MK801、Picrotoxin、河豚毒素(TTX)均来自于美国 Med Chem Express 公司,orexin-1/2 型受体一抗来自于中国 Bioss 生物技术公司,vglut1 一抗、GAD 67 一抗和 NeuN 一抗均来自于美国 Millipore 生物技术公司。主要仪器:PH 测试仪(中国医药集团有限公司),玻璃微电极自动拉制仪(美国,Sutter P-97),振动切片机(德国,Leica VT-1200s),双通道膜片钳放大器(美国,Axon 700B),相差显微镜(日本,Olympus BX51WI),红外成像系统(美国,Dage-MTI IR-1000),显微操作仪(美国,Sutter)。

1.3 免疫荧光染色

脑组织按照常规方法制备冰冻切片,将包含 SLD

脑区的脑组织冠状切成 16 μm 的脑片,然后用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次。配置含 1% Triton 和 10% 驴血清的封闭打孔混合液,将脑片置于混合液中在 37 ℃下孵育 40 min,随后配置合适浓度的一抗孵育液:vglut1(1∶1 000)、GAD 67(1∶500)、orexin-1/2 型受体(1∶500)、NeuN(1∶2 000),将脑片置于配制好的一抗中在 4 ℃冰箱孵育过夜。孵育好之后,再次用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,随后用对应的二抗在室温下避光孵育 2 h,然后再次重复漂洗操作。最后将漂洗好的脑片进行贴片,风干后用封片剂进行封片,封片完成后即可在荧光显微镜或共聚焦显微镜下观察相应实验目标的表达模式或形态特征。

1.4 包含 SLD 脑区的脑干冠状切离体脑片的制备

出生后 8~14 d 的 SD 乳大鼠,用异氟烷进行气体麻醉后,快速将其断头,小心将颅骨剥开暴露出脑组织,并将完整的脑组织拨到装有冷冻过后切片液的培养皿中进行修块,在不损伤 SLD 脑区的前提下将脑组织修成近似的正方体,然后将修好的脑组织转移至振动切片机的凹槽内固定,缓慢倒入冷冻后的切片液,开始进行切片。根据实验要求,采用冠状切的方式,制备厚度为 300 μm 的包含 SLD 脑区的脑干离体脑片,并将切好的脑片转移到通有 5% CO_2 和 95% O_2 的混合气的 ACSF 中孵育 40 min,即可进行膜片钳实验。

1.5 全细胞膜片钳记录

1.5.1 SLD 神经元封接与记录 将孵育好的包含 SLD 脑区的离体脑干脑片转移至灌流系统的孵育槽中,用压网固定好,在室温下(25~35 ℃)持续灌流通有 5% CO_2 和 95% O_2 混合气的新鲜 ACSF,流速为 2 mL/min。然后在红外相差显微镜下准确定位 SLD 脑区的范围,并在目标区域筛选边界清晰、实质感强、表面光滑的神经元。打开 pClamp 记录软件,然后打开封接测试的界面,通过给予测试脉冲(5 mV,5 ms)来实时监测封接情况。通过三维立体显微操作仪和相差显微镜,用灌有电极内液的玻璃微电极(3~5 MΩ)对筛选好的 SLD 神经元进行封接,然后将神经元逐步钳制到-70 mV,直至封接电阻上升至 G 欧水平,待封接稳定后,通过短促的吸力由弱到强地对目标神经元进行破膜,从而形成膜片钳的全细胞记录模式,接下来在电流钳模式下对该神经元进行记录,并实时监测串联电阻,保证记录完成前后串联电阻的变化不超过 20%。

1.5.2 SLD 神经元膜电位分析 在电流钳模式下,将所有记录的 SLD 神经元的膜电位水平钳制到-60 mV 左右,采用 DNQX、MK 801、picrotoxin 和 TTX 来阻断化学突触的传递,通过灌流 orexin-A 来研究 orexin 对 SLD 神经元的膜电位的调控作用。通过灌流泵持续灌流 2 min 100 nmol/L 的 orexin-A,选取正在记录的 SLD 神经元在灌流 orexin-A(100 nmol/L)之前基本稳定的 10 s,用 Clampfit 计算出这一时间段内膜电位的平均值作为对照,然后选取正在记录的 SLD 神经元在灌流 orexin-A 引起的反应达到平台期后基本稳定的 10 s,用同样的方法计算出加入 orexin-A 后膜电位的平均值,将两个膜电位进行比较。

1.5.3 SLD 神经元膜电位阈下振荡分析 在加入 orexin-A 之前,采用 MATLAB 对 SLD 神经元膜电位不同频段的阈下振荡进行滤波获取后,选取各频段振荡较为稳定的 30 s,计算其功率作为对照,在 orexin-A 诱发的去极化反应达到平台期后,同样选取各频段振荡较为稳定的 30 s 计算其功率,分析 orexin 对 SLD 神经元膜电位不同频段阈下振荡的影响。

1.5.4 SLD 神经元膜电位阈下振荡自相关分析 对加入 orexin-A 前后 SLD 神经元膜电位 delta 和 theta 频段阈下振荡进行自相关分析,在时间 lag=0 的点两侧出现的峰为自相关系数,代表了振荡的规则程度,分别比较加入 orexin-A 前后 delta 和 theta 频段阈下振荡的自相关系数。

1.5.5 SLD 神经元放电与膜电位阈下振荡相位锁定分析 将记录到的全细胞膜电位进行带通滤波,其中 1~4 Hz 的带通滤波可得到 delta 频段膜电位阈下振荡,4~12 Hz 的带通滤波可得到 theta 频段膜电位阈下振荡,此时将不同频段的阈下振荡进行希尔伯特变换(Hilbert transform),可转化出每一时刻点对应的振荡相位。对放电活动与膜电位振荡关系的锁相分析是在该段膜电位记录中,对产生了放电活动的时刻(以锋电位产生时刻作为标准)相应的振荡相位的分布进行 Rayleigh 氏球形均一性检验,如存在相位锁定关系,则说明放电活动主要集中在某一特定相位附近出现,统计报告 $P<0.05$。此时,可用每一放电对应相位值的加权平均值来表示锁相关系的平均相位值,代表了放电活动主要在膜电位振荡的某一特定相位时刻产生。

1.6 统计学分析

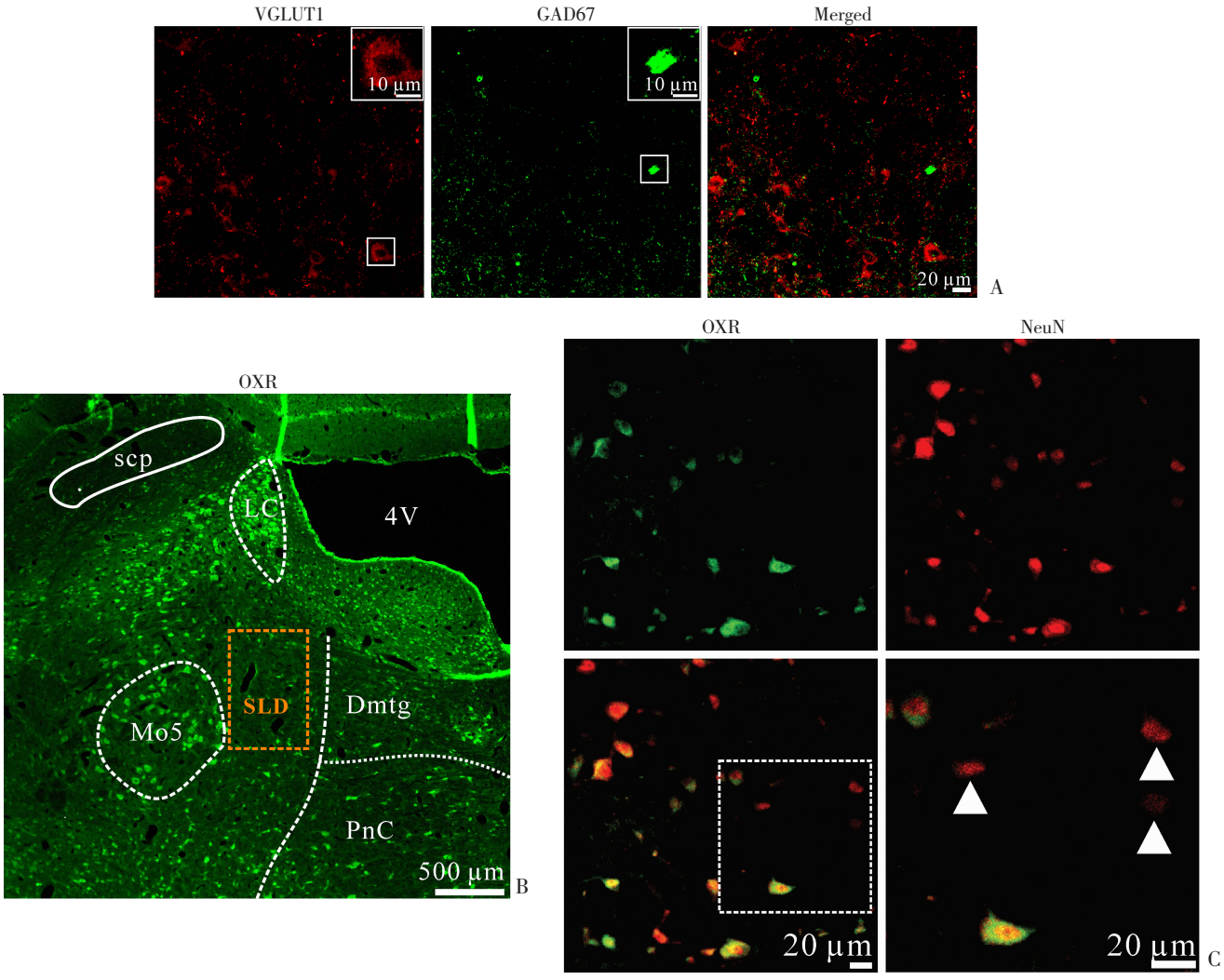
数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 的方式表示,数据分析处理与图像制作均采用 Clampfit、Origin 和 Graphpad Prism 软件完成,数据统计分析采用 SPSS 22,当数据分布符合正

态分布时采用配对 t 检验或两独立样本 t 检验,不符合正态分布时采用 Wilcoxon 符号秩和检验进行统计检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 SLD 神经元大多数表现为 vglut1 和 orexin-1/2 型受体阳性

采用 vglut1 和 GAD 67 对 SLD 脑区进行免疫荧光染色,发现在该区域存在大量 vglut1 阳性的谷氨酸能神经元,只有少量 GAD 67 阳性的 GABA 能神经元散在分布(图 1A)。3 只实验动物同一 SLD 区域中谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元的计数结果显示,在该统计区域,所有参与计数的谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元中,97.4%的神经元均为谷氨酸能神经元,而 GABA 能神经元比例极低。采用 orexin-1/2 型受体对 SLD 神经元进行免疫荧光标记,结果显示在 SLD 脑区,orexin 能受体中等程度地表达于 SLD 神经元上(图 1B)。Orexin-1/2 型受体与 NeuN 进一步的免疫荧光双标结果显示,大部分 SLD 神经元均表达 orexin 受体(图 1C),扩大数据量对 3 只动物同一 SLD 区域中不表达 orexin 受体的神经元和表达 orexin 受体的神经元的数量进行统计分析,发现在所有计数的 136 个神经元中,有 91 个(66.9%)神经元均表达 orexin 受体。上述结果表明在 SLD 脑区,大部分 SLD 神经元均表达 orexin 受体,orexin 可能通过作用于 orexin 受体进而调控 SLD 脑区 orexin 受体阳性神经元的活动。



A:vglut1 和 GAD 67 免疫荧光双标实验,红色:vglut1,绿色:GAD 67;B:免疫荧光实验,绿色:orexin-1/2 型受体;C:Orexin-1/2 型受体与 NeuN 免疫荧光双标实验,红色:NeuN,绿色:orexin-1/2 型受体

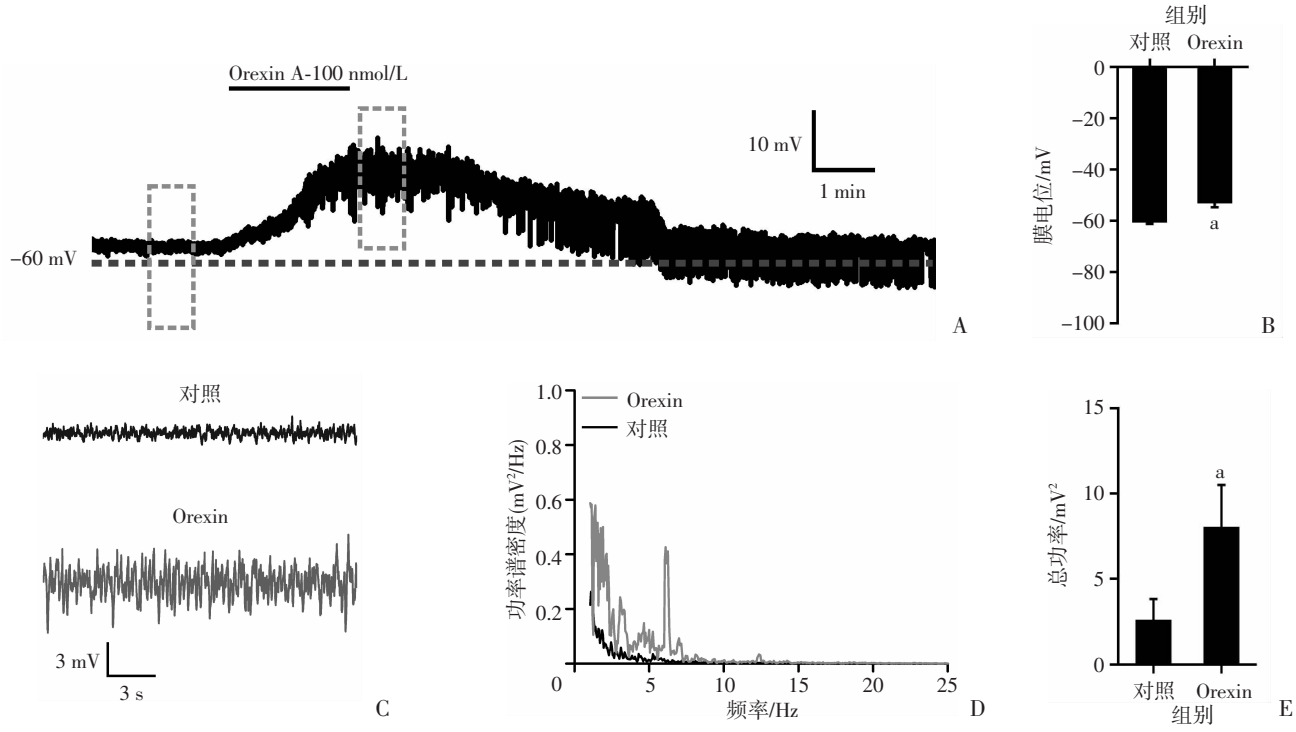
图 1 SLD 脑区主要的神经元类型及 orexin 受体在 SLD 脑区的分布特征

2.2　Orexin 导致 SLD 神经元膜电位的去极化以及阈下振荡水平的增强

在电流钳模式下,将所有记录的 SLD 神经元的膜电位水平钳制到-60 mV 左右,并全程灌流 DNQX(50 μmol/L)、MK801(100 μmol/L)、picrotoxin(100 μmol/L)和 TTX(1 μmol/L)。在此条件下,灌流 2 min 的 orexin-A(100 nmol/L)在记录到的对 orexin 有反应的 7 个 SLD 神经元上引起了明显的去极化反应(去极化幅度:7.56±1.47 mV, $n=7$,配对 t 检验,$P<0.01$,图 2A、B)并增强了 SLD 神经元膜电位的阈下振荡(图 2C)。频谱分析结果显示,orexin-A 明显增强了 SLD 神经元膜电位阈下振荡的在低频段的功率谱密度(power spectral sensity,图 2D)。7 例神经元的统计数据表明,orexin-A 显著增强了 0.5~25 Hz 频段内 SLD 神经元膜电位阈下振荡的总功率(对照:2.54±1.30 mV^2;orexin:7.98±2.52 mV^2,$n=7$,非参检验,$P<0.05$,图 2E)。因此,orexin 可以不依赖于化学突触直接影响 SLD 神经元膜的特性,对其膜电位水平和膜的振荡均起促进作用。

2.3　Orexin 主要增强 SLD 神经元膜电位阈下振荡在 delta 和 theta 频段的功率

0~25 Hz 主要包括 delta(1~4 Hz)、theta(4~12 Hz)、beta(15~25 Hz)这 3 个频段,其原始波形显示,在加入 orexin-A 后各频段的振荡幅度均明显增强(图 3A、B、C)。对各频段的功率变化进行统计分析,结果显示,加入 orexin-A 之后,delta(对照:1.93±1.16 mV^2;orexin:5.90±2.01 mV^2,$n=7$,非参检验,$P<0.05$)和 theta(对照:0.50±0.22 mV^2;orexin:1.85±0.84 mV^2,$n=7$,非参检验,$P<0.05$)频段振荡的功率显著增强,beta(对照:0.10±0.06 mV^2;orexin:0.23±0.08 mV^2,$n=7$,非参检验,$P=0.18$)频段则无统计学差异(图 3D)。除低频振荡外,SLD 神经元还存在高频的阈下膜电位振荡,例如 low gamma(25~48 Hz)和 high gamma(52~150 Hz)频段。高频段膜电位信号分析结果显示,加入 orexin-A 之后,low gamma(对照:0.05±0.03 mV^2;orexin:0.06±0.02 mV^2,



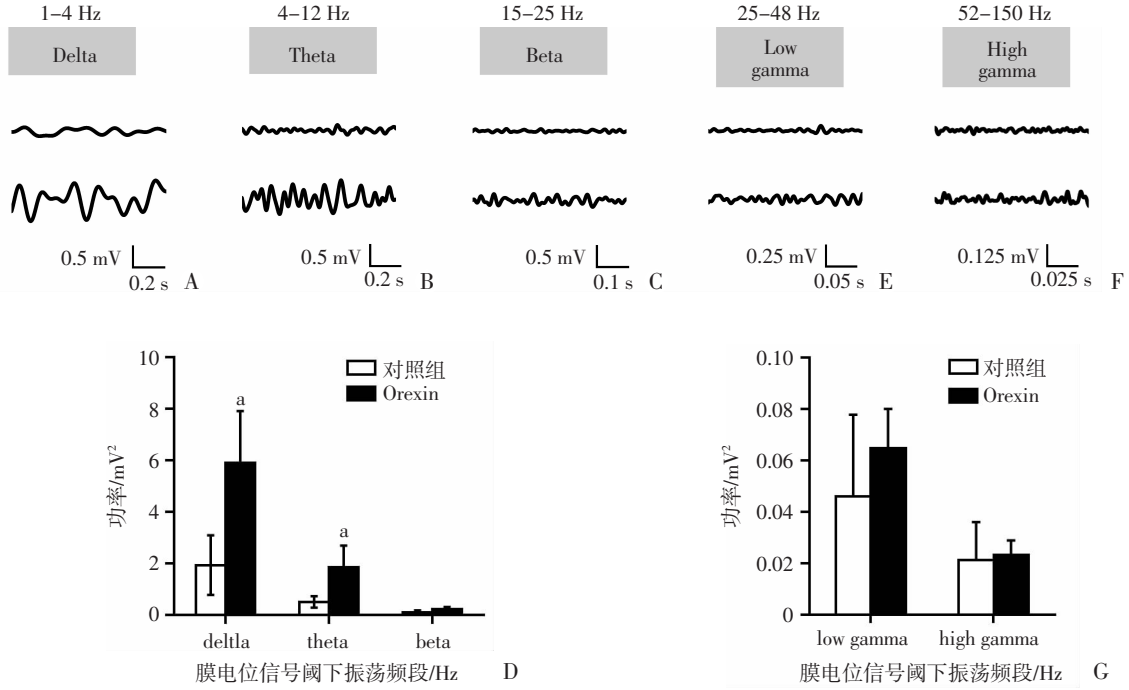
A:全细胞膜片钳技术电流钳模式记录加入 orexin 后 SLD 神经元膜电位的变化;B:分别统计对照与加入 orexin 之后 SLD 神经元的膜电位　a:$P<0.01$,与对照组比较;C:全细胞膜片钳技术电流钳模式记录加入 orexin 后 SLD 神经元膜电位阈下振荡水平的变化;D:统计分析对照与加入 orexin 之后 SLD 神经元膜电位阈下振荡在 0~25 Hz 频段内的功率谱密度曲线;E:分别统计对照与加入 orexin 之后在 0.5~25 Hz 频段内 SLD 神经元膜电位阈下振荡的总功率　a:$P<0.05$,与对照比较

图 2　Orexin 对 SLD 神经元膜电位的调控作用

$n=7$,非参检验,$P=0.24$)和 high gamma(对照:0.02±0.01 mV^2;orexin:0.02±0.01 mV^2,$n=7$,非参检验,$P=0.24$)频段振荡的功率在加入 orexin-A 前后无统计学差异(图 3E、F、G)。以上结果表明 orexin 主要增强了 SLD 神经元在 delta 和 theta 频段的膜电位阈下振荡的功率。

2.4 Orexin 通过前移放电与 delta 频段膜电位振荡的锁定相位提高 SLD 神经元的放电效率

在电流钳模式下,将所记录的 SLD 神经元钳制到 -60 mV 左右,并全程灌流 DNQX(50 μmol/L)、MK801(100 μmol/L)和 picrotoxin(100 μmol/L)以阻断化学突触传递。灌流 2 min 的 orexin-A(100 nmol/L)在记录到的对 orexin 有反应的 7 个 SLD 神经元上均引起了明显的去极化反应,并在其中 5 个神经元上诱导出了放电活动(放电频率:1.31±0.53 Hz,图 4A)。时间频谱分析结果显示,加入 orexin-A 后,SLD 神经元膜电位阈下振荡信号在 delta 和 theta 频段的功率谱密度明显增强,且更加连续(图 4B、C)。SLD 神经元在 delta 频段的阈下振荡信号自相关分析结果显示,加入 orexin-A 之后,SLD 神经元膜电位在 delta 频段的阈下振荡的规则程度与对照没有统计学差异(对照:0.24±0.02;orexin:0.20±0.02,$n=7$,配对 t 检验,$P=0.15$,图 4D、E)。设置 4 例 SLD 神经元为对照组,将其从 -60 mV 的钳制电位直接去极化钳制到 -53 mV 左右(100 nmol/L orexin-A 引起 SLD 神经元的平均去极化水平),这 4 例 SLD 神经元均被诱导出放电活动,并以 orexin 引起放电的 5 例 SLD 神经元为实验组。膜电位和放电时刻的相位锁定分析结果显示,实验组和对照组 SLD 神经元的放电活动均能稳定地锁定到 delta 频段膜的电位上,而且实验组 SLD 神经元的放电与 delta 频段膜电位振荡的锁定相位相较于对照组明显前移(对照:1.36±0.11,$n=4$;orexin:0.62±0.26,$n=5$,非配对 t 检验,$P<0.05$,图 4F、G),上述结果表明 orexin 使得 SLD 神经元的放电可以相对于 delta 频段膜电位阈下振荡前移,即可以在膜电位更低的情况下产生放电,降低了 SLD 神经元放电的阈值。

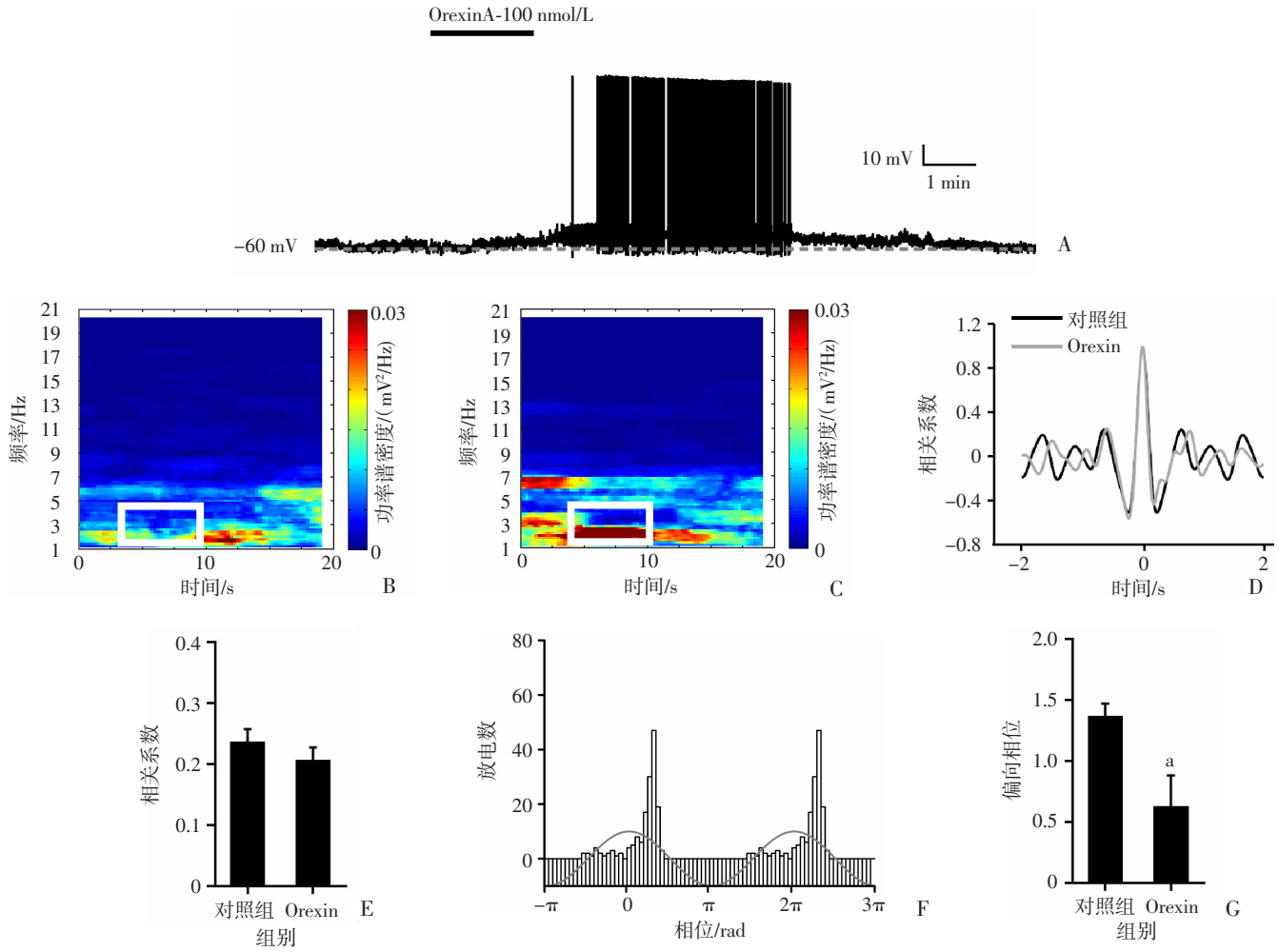


A:加入 orexin 前后 SLD 神经元 delta 频段阈下膜电位振荡原始波形图;B:加入 orexin 前后 SLD 神经元 theta 频段阈下膜电位振荡原始波形图;C:加入 orexin 前后 SLD 神经元 beta 频段阈下膜电位振荡原始波形图;D:分别统计加入 orexin 前后 SLD 神经元 delta、theta 和 beta 频段阈下膜电位振荡的功率 a:$P<0.05$,与对照组比较;E:加入 orexin 前后 SLD 神经元 low gamma 频段阈下膜电位振荡原始波形图;F:加入 orexin 前后 SLD 神经元 high gamma 频段阈下膜电位振荡原始波形图;G:分别统计加入 orexin 前后 SLD 神经元 low gamma 和 high gamma 频段阈下膜电位振荡的功率

图 3 Orexin 对 SLD 神经元不同频段膜电位阈下振荡的调控作用

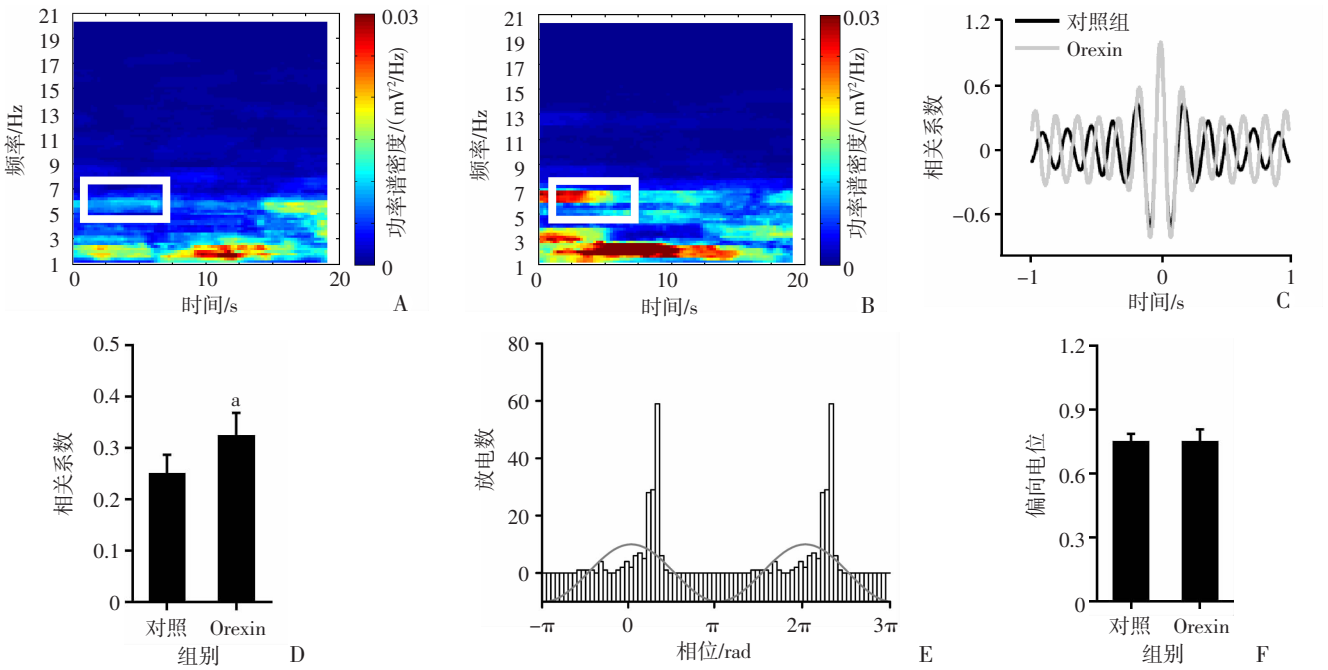
2.5　Orexin 通过稳定 SLD 神经元膜电位信号在 theta 频段的阈下振荡来稳定神经元放电

时间频谱分析结果显示,加入 orexin-A 后,SLD 神经元膜电位阈下振荡信号在 theta 频段更加连续和稳定(图 5A、B)。进一步的自相关分析结果显示,orexin-A 明显增加了 SLD 神经元膜电位在 theta 频段振荡的自相关系数(对照:0.25±0.04;orexin:0.32±0.05,n=7,配对 t 检验,P<0.05,图 5C、D)。以上结果表明,SLD 神经元在 theta 频段存在较为稳定的阈下膜电位振荡,而 orexin 使得 SLD 神经元膜电位在 theta 频段的阈下振荡更加规则、连续和稳定。相位锁定分析结果表明,实验组 SLD 神经元放电与 theta 频段膜电位的锁定相位与对照组没有统计学差异(对照:0.75±0.04,n=4;orexin:0.75±0.06,n=5,非配对 t 检验,P=0.50,图 5E、F)。以上结果提示 orexin 可以通过稳定 SLD 神经元膜电位在 theta 频段的阈下振荡来稳定神经元放电,提高神经元的放电效率并促进神经元网络的同步化放电。



A: 全细胞膜片钳技术电流钳模式记录加入 orexin 后 SLD 神经元膜电位及放电活动的变化; B:对照组 SLD 神经元阈下膜电位振荡的时间频谱分析图;C:加入 orexin 后 SLD 神经元阈下膜电位振荡的时间频谱分析图;D:orexin 引起 SLD 神经元 delta 频段阈下膜电位振荡自相关系数的变化情况;E:分别统计加入 orexin 前后 SLD 神经元 delta 频段阈下膜电位振荡的自相关系数;F:加入 orexin 后 SLD 神经元放电时刻与 delta 频段膜电位的相位锁定分析;G:分别统计加入 orexin 前后 SLD 神经元放电时刻与 delta 频段膜电位的偏向锁定相位　a:P<0.05,与对照组比较

图 4　Orexin 对 SLD 神经元 delta 频段阈下振荡的调控作用及其对 SLD 神经元放电的影响



A:对照组 SLD 神经元阈下膜电位振荡的时间频谱分析图;B:加入 orexin 后 SLD 神经元阈下膜电位振荡的时间频谱分析图;C:orexin 引起 SLD 神经元 theta 频段阈下膜电位振荡自相关系数的变化情况;D:分别统计加入 orexin 前后 SLD 神经元 theta 频段阈下膜电位振荡的自相关系数 a:$P<0.05$,与对照组比较;E:加入 orexin 后 SLD 神经元放电时刻与 theta 频段膜电位的相位锁定分析;F:分别统计加入 orexin 前后 SLD 神经元放电时刻与 theta 频段膜电位的偏向锁定相位

图 5 Orexin 对 SLD 神经元 theta 频段阈下振荡的调控作用及其对 SLD 神经元放电的影响

3 讨论

本研究采用膜片钳技术,研究 orexin 对 SLD 神经元兴奋性及膜电位阈下振荡的调控作用,实验结果证明,orexin 对 SLD 神经元的活动具有调控作用,提高了 SLD 神经元的兴奋性并增强了 SLD 神经元的放电能力。然而,orexin 对 SLD 神经元活动的下游调控机制及这一调控通路的生理意义尚不清楚。

尽管 orexin 神经元胞体局限地分布于 LHA 以及 PeF 区域,但其发出的神经纤维广泛地分布于整个皮层及皮层下神经系统,通过释放 orexin 神经肽并作用于突触后 orexin 受体参与了机体多种生理功能的调控[8]。迄今为止,除研究报道发现视交叉上核神经元 orexin 受体的激活发挥直接的抑制性调控作用之外[9],突触后 orexin 受体的激活主要对神经元产生兴奋性效应。例如:在前额叶皮层 2/3 层[10]、小脑的间位核[11]、蓝斑核[12]等等,orexin 均是通过激活突触后 orexin 受体对其神经元发挥一个兴奋性调控作用。我们采用全细胞膜片钳技术,通过外源性加入 orexin 可以直接观察 orexin 对 SLD 神经元的调控作用。发现在 SLD 区域,orexin 可以直接去极化 SLD 神经元从而产生一个兴奋效应,这与既往的报道相互印证,说明 orexin 主要对 SLD 脑区和 SLD 神经元发挥兴奋性调控作用。

我们在研究过程中发现 orexin 对 SLD 神经元的兴奋效应不仅仅只表现为膜电位的去极化,还表现为更加复杂的 SLD 神经元膜电位阈下振荡的增强及其引起的神经元放电模式的改变。已有研究表明,神经元膜电位的阈下振荡可以影响神经元放电的频率、精确度以及时机[13-15]。例如有研究报道,豚鼠额叶皮层神经元持续的膜电位振荡可以使神经元产生特定频率的电信号,而且更倾向对同一频率的传入信号做出反应,因此使得特定频率的电信号在神经元网络中扩布[16]。基于神经元膜电位阈下振荡的重要功能,我们进一步研究了 SLD 神经元膜电位阈下振荡及其与放电的关系以及 orexin 对两者的调控作用,发现 SLD 神经元膜电位存在不同频段的阈下振荡,而 orexin 主要增强了 SLD 神经元在 delta 和 theta 频段的膜电位阈下振荡的功率。对 SLD 神经元 delta 频段阈下振荡的分析结果表明,orexin 主要通过前移 SLD 神经元 delta 频段膜电位阈下振荡与放电的锁定相位,降低 SLD 神经元放电的阈值,从而提高 SLD 神经元的兴奋性,增加

SLD 神经元的放电频率。与之不同的是,对 theta 频段阈下振荡的分析结果显示,orexin 则是通过稳定 SLD 神经元膜电位在 theta 频段的阈下振荡来稳定神经元放电,从而使神经元放电更加规则有序。以上结果表明,orexin 对 SLD 神经元膜电位在 delta 和 theta 频段阈下振荡的这两种不同的调控作用共同促进了 SLD 神经元的放电,使 SLD 神经元的放电更加稳定高效。

与上述推论一致的是,膜片钳记录结果显示,orexin 确实可以增加 SLD 神经元的放电频率。因此,orexin 可以通过调控 SLD 神经元膜电位水平和膜电位阈下振荡间接影响神经元放电的模式。既往研究表明,机体各项生理功能的实现依赖于神经元的放电活动,例如:orexin 可以通过对浦肯野细胞直接的突触后兴奋性效应,增加其放电活动,从而参与小脑介导的运动行为的调控[17];orexin 可以直接兴奋 6b 层皮层神经元,增加神经元的放电活动,促进随意运动的发生[18];下丘脑 orexin 能系统还可以通过突触后兴奋效应引起神经元放电,增强前庭外侧核对外界信息响应后的整体输出以及其反应敏感性,从而参与前庭外侧核介导的躯体姿势调控[19]。目前的实验结果表明 orexin 不仅能直接增加 SLD 神经元的放电频率,还能够通过调控 SLD 神经元膜电位的阈下振荡影响神经元放电的模式,使其放电更加稳定、高效、规则,并有可能趋于同步化。我们所关注的 SLD 区域, SLD 神经元的特征性同步化放电是 REM 睡眠的转换和维持的核心机制[20],这说明 orexin 很有可能通过调控 SLD 神经元的放电活动参与了 SLD 介导的 REM 睡眠调控的关键环节,orexin 能系统的缺陷也很有可能导致 REM 睡眠的障碍。与我们的猜想一致,已有临床研究表明,orexin 能系统缺陷的病人除觉醒维持困难外,还表现为明显的 REM 睡眠状态的异常,包括 REM 睡眠行为障碍、睡眠麻痹等。

综上所述,本研究揭示 orexin 对 SLD 神经元具有调控作用,不仅能增强 SLD 神经元的兴奋性,还能增强并稳定 SLD 神经元膜电位低频段的阈下振荡,有可能使 SLD 神经元的放电更加稳定高效。此外,SLD 神经元膜电位振荡与放电有稳定的锁相关系,而 orexin 可以将这一锁相关系前移,从另一个方面促进 SLD 神经元的放电。Orexin 对 SLD 神经元调控作用的相关机制及其与 REM 睡眠的关系还有待进一步研究。

参考文献:

[1] BRISBARE-ROCH C, DINGEMANSE J, KOBERSTEIN R, *et al*. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans[J]. Nat Med, 2007, 13(2): 150-155. DOI: 10.1038/nm1544.

[2] SAKURAI T, MIEDA M, TSUJINO N. The orexin system: roles in sleep/wake regulation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1200: 149-161. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05513.x.

[3] TORTEROLO P, SAMPOGNA S, CHASE M H. Hypocretinergic and non-hypocretinergic projections from the hypothalamus to the REM sleep executive area of thePons[J]. Brain Res, 2013, 1491: 68-77. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.10.050.

[4] XI M C, CHASE M H. The injection of hypocretin-1 into the nucleus pontis oralis induces either active sleep or wakefulness depending on the behavioral state when it is administered[J]. Sleep, 2010, 33(9): 1236-1243. DOI: 10.1093/sleep/33.9.1236.

[5] XI M C, FUNG S J, YAMUY J, *et al*. Induction of active (REM) sleep and motor inhibition by hypocretin in the nucleus pontis oralis of the cat[J]. J Neurophysiol, 2002, 87(6): 2880-2888. DOI: 10.1152/jn.2002.87.6.2880.

[6] VAN DEN TOP M, NOLAN M F, LEE K, *et al*. Orexins induce increased excitability and synchronisation of rat sympathetic preganglionic neurones[J]. J Physiol (Lond), 2003, 549(Pt 3): 809-821. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.033290.

[7] URBANO F J, D'ONOFRIO S M, LUSTER B R, *et al*. Pedunculopontine nucleus Gamma band activity-preconscious awareness, waking, and REM sleep[J]. Front Neurol, 2014, 5: 210. DOI: 10.3389/fneur.2014.00210.

[8] PEYRON C, TIGHE D K, VAN DEN POL A N, *et al*. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems[J]. J Neurosci, 1998, 18(23): 9996-10015.

[9] BELLE M D, HUGHES A T, BECHTOLD D A, *et al*. Acute suppressive and long-term phase modulation actions of orexin on the mammalian circadian clock[J]. J Neurosci, 2014, 34(10): 3607-3621. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3388-13.2014.

[10] YAN J, HE C, XIA J X, *et al*. Orexin-A excites pyramidal neurons in layer 2/3 of the rat prefrontal cortex[J]. Neurosci Lett, 2012, 520(1): 92-97. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.05.038.

[11] YU L, ZHANG X Y, ZHANG J, *et al*. Orexins excite neurons of the rat cerebellar nucleus interpositus via orexin 2 receptors *in vitro*[J]. Cerebellum, 2010, 9(1): 88-95. DOI: 10.1007/s12311-009-0146-0.

[12] SOFFIN E M, EVANS M L, GILL C H, *et al*. SB-334867-A antagonises orexin mediated excitation in the locus coer-

uleus[J]. Neuropharmacology, 2002, 42(1): 127-133. DOI: 10.1016/s0028-3908(01)00156-3.

[13] DESMAISONS D, VINCENT J D, LLEDO P M. Control of action potential timing by intrinsic subthreshold oscillations in olfactory bulb output neurons[J]. J Neurosci, 1999, 19(24): 10727-10737.

[14] HAAS J S, WHITE J A. Frequency selectivity of layer II stellate cells in the medial entorhinal cortex[J]. J Neurophysiol, 2002, 88(5): 2422-2429. DOI: 10.1152/jn.00598.2002.

[15] SCHAEFER A T, ANGELO K, SPORS H, *et al*. Neuronal oscillations enhance stimulus discrimination by ensuring action potential precision[J]. PLoS Biol, 2006, 4(6): e163. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040163.

[16] GUTFREUND Y, YAROM Y, SEGEV I. Subthreshold oscillations and resonant frequency in Guinea-pig cortical neurons: physiology and modelling[J]. J Physiol (Lond), 1995, 483(Pt 3): 621-640. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020611.

[17] NISIMARU N, MITTAL C, SHIRAI Y, *et al*. Orexin-neuromodulated cerebellar circuit controls redistribution of arterial blood flows for defense behavior in rabbits[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(35): 14124-14131. DOI: 10.1073/pnas.1312804110.

[18] 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. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1783-04.2004.

[19] ZHANG J, LI B, YU L, *et al*. A role for orexin in central vestibular motor control[J]. Neuron, 2011, 69(4): 793-804. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.01.026.

[20] KARLSSON K A, BLUMBERG M S. Active medullary control ofAtonia in week-old rats[J]. Neuroscience, 2005, 130(1): 275-283. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.002.

(收稿:2020-01-16;修回:2020-02-02)

(编辑 吴培红)