DOI:10.16016/j.1000-5404.202105119

联合型运动学习过程中小鼠内侧前额叶皮层神经元放电活动研究

胡昱博[1],章利彬[2],陈 浩[3],熊 雁[1] 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)大坪医院骨科[1];833000 新疆维吾尔自治区 乌苏,中国人民解放军第 948 医院普通外科[2];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院基础医学教学实验中心[3]

[**摘要**] **目的** 研究联合型运动学习过程中小鼠内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)不同类型神经元放电活动变化的规律及其与学习行为的相关性。**方法** 以痕迹性眨眼条件反射(trace eyeblink conditioning, tEBC)作为联合型运动学习的行为模型。以 150 ms 脉冲蓝色 LED 光作为条件刺激(conditioned stimulus, CS),100 ms 角膜吹气作为非条件刺激(unconditioned stimulus,US),进行每日 100 次的 CS-US 配对训练。连续 5 d,训练小鼠(n=4)建立 tEBC。在此过程中,使用钨丝 tetrode 电极记录小鼠 mPFC 神经元放电活动。根据神经元放电的频率和峰电位谷-峰波宽,将 mPFC 神经元区分为假定的锥体细胞(n=174)和中间神经元(n=40),并分析两类神经元活动在 tEBC 建立早期和后期与条件眨眼反应(conditioned eyeblink responses, CR)行为的相关性。**结果** 通过 5 d CS-US 配对训练,小鼠 CR 发生率从训练第 1 天的(38.1±8.2)%上升到第 5 天的(66.7±10.0)% (P<0.001)。统计学分析显示,相较于 CR 习得早期,CR 习得后期 CS 所诱发的锥体细胞放电活动显著降低(P<0.05)。与此相适应,CR 习得后期 CS 诱发的中间神经元放电活动显著增高(P<0.05),表现为 CS 诱发增强型放电的中间神经元比例显著增高(早期:25.0%;后期:66.7%,P<0.05)。此外,锥体细胞在 CR 出现和无 CR 出现时的 CS 诱发放电活动无显著区别(P>0.05),而中间神经元在 CR 出现时 CS 诱发放电活动则显著更高(P<0.05)。**结论** 在联合型运动学习过程中,小鼠 mPFC 锥体细胞和中间神经元的放电活动随学习会发生相反的变化,提示它们可能以不同方式参与联合型运动学习。中间神经元放电活动与 CR 出现更为相关。

[**关键词**] 条件反射;眨眼;运动性学习;内侧前额叶皮层;多通道记录
[**中图法分类号**] R338.25; R338.64; R338.8 [**文献标志码**] A

Neuronal discharge activity in mouse medial prefrontal cortex during associative motor learning

HU Yubo[1], ZHANG Libin[2], CHEN Hao[3], XIONG Yan[1] [1]Department of Orthopaedics, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042; [2]Department of General Surgery, No. 948 Hospital of PLA, Wusu, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 833000; [3]Experimental Center of Basic Medicine, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the discharge profiles of different types of neurons in the medial prefrontal cortex (mPFC) during associative motor learning and their correlation with learning behaviors. **Methods** Trace eyeblink conditioning (tEBC) was used as the behavioral model of associative motor learning. Freely-moving mice (n=4) were trained to acquire tEBC for 5 consecutive days. During daily tEBC training, the mice were received 100 paired presentations of the conditioned stimulus (CS, 150-ms blue

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81871039)
[**通信作者**] 熊 雁,Email:xiongyandoctor@163.com
陈 浩,Email:haochen@tmmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

LED pulse) and unconditioned stimulus (US, 100-ms corneal airpuff). Tungsten tetrodes were utilized to record the discharge activity of mPFC neurons. The mPFC neurons were categorized into putative pyramidal cells ($n=174$) and putative interneurons ($n=40$) according to the discharge rate and width of the mean spike waveform from trough to peak for each neuron. The correlation between the activity of distinct mPFC neurons and the performance of conditioned eyeblink responses (CR) was analyzed in either the early- or the late-learning stage. **Results** After 5 days' CS-US paired training, the mice exhibited increased CR incidence from (38.1±8.2)% on the 1st day to (66.7±10.0)% on the 5th day ($P<0.001$). The statistical analysis revealed that the CS-evoked discharge activity of putative mPFC pyramidal cells at the late-leaning stage was significantly weaker than the early-learning stage ($P<0.05$). In contrast, the CS-evoked discharge activity of putative interneurons at the late-learning stage was significantly greater than that at the early-learning stage ($P<0.05$). Consistent with this, the proportion of CS-evoked increased firing interneurons was significantly greater at the late-learning stage (66.7%, 14/21) than the early-learning stage (25.0%, 4/16, $P<0.05$). Moreover, there was no significant difference in the CS-evoked activity of mPFC pyramidal cells between the CR and the non-CR states ($P>0.05$), whereas the CS-evoked activity of mPFC interneurons in the presence of CRs was stronger than in the lack of CRs ($P<0.05$). **Conclusion** During the acquisition of tEBC, the change of CS-evoked firing activities in mPFC interneurons is opposite to that in mPFC pyramidal cells, suggesting that these 2 types of mPFC neurons might participate in associative motor learning in different ways. In particular, the CS-evoked firing activity of mPFC interneurons is closely correlated with the CR performance.

[**Key words**] conditioning responses; eyeblink; motor learning; medial prefrontal cortex; multiple channels recording

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81871039). Corresponding authors: XIONG Yan, E-mail: xiongyandoctor@163.com; CHEN Hao, E-mail: haochen@tmmu.edu.cn

联合型运动学习(associative motor learning)是一种人们将不同时间发生的事件联系起来,从而产生适宜的运动行为反应的脑高级功能[1]。它对于人的生产和生活具有重要意义。特别的是,联合型运动学习能力在老化、精神分裂症、自闭症等疾病发生时会出现早期损害[2-4]。因此,阐明联合型运动学习的发生机制,可望为相关疾病的早期诊断和治疗效果评价提供有意义的启示。痕迹性眨眼条件反射(trace eyeblink conditioning,tEBC)是研究联合型运动学习的常用行为模型[5]。通过 tEBC 训练,动物可学会一个针对条件刺激(conditioned stimulus, CS)的条件眨眼反应(conditioned response, CR),以有效躲避非条件刺激(unconditioned stimulus, US)(如角膜吹气)带来的伤害。文献已报道[6],抑制内侧前额叶皮层(medial prefnntal cortex, mPFC)会显著损害 tEBC 的建立,提示 mPFC 在 tEBC 建立的过程中发挥重要作用。在体电生理记录实验也发现,mPFC 神经元在 tEBC 训练过程中会被 CS 诱发出显著的放电活动[7]。尽管如此,mPFC 参与 tEBC 建立的细胞活动机制仍不完全清楚。在既往的电生理研究中,由于微电极阵列的记录位置会随 tEBC 训练而不断推进,以获取尽可能多的神经元活动信息,导致缺乏对同一神经元群体在联合型运动学习过程中活动的连续监测资料[7]。此外,对于 mPFC 不同类型神经元在此过程中的活动变化也缺乏比较分析。为解决这些问题,本研究将微电极阵列固定于 mPFC 特定区域,以连续监测同一神经元群体放电活动,并比较该区不同类型神经元在 tEBC 建立过程中的活动特点及其与联合型运动学习行为的相关性。以期揭示 mPFC 中特定类型神经元在联合型运动学习中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选用 3~4 月龄雄性 C57/BL6 小鼠 4 只,体质量 25~30 g,由陆军军医大学实验动物中心提供。从电极阵列手术前 2 天开始,对小鼠进行单笼饲养,直至全部实验结束。在实验环境中,动物可以进行自由饮水和进食。

1.2 电极阵列植入手术

手术基本流程参照课题组近期工作[8]。使用异氟烷(Isoflurane,浓度:0.5%~0.7%,瑞沃德,中国)麻醉小鼠,并将其头部固定于脑立体定位仪(瑞沃德,中

国)。使用立体定位臂测量小鼠前、后囟高度(二者高度差值需<100 μm),调整并确保颅骨水平。在双侧小脑上方,使用颅钻开 2 个直径为 0.5 mm 的圆形小孔,植入 2 颗已消毒的不锈钢螺钉,分别焊接地线与参考线。在小鼠左侧上眼睑中部和后部,穿刺 2 根不锈钢电极丝(型号:791000,裸径:76 μm,绝缘后直径:140 μm,A-M Systems,美国)作为眼轮匝肌肌电信号的记录电极。使用颅钻在左侧前额叶皮层区上方磨出一矩形骨窗(长×宽=1.0 mm×0.4 mm)。骨窗的中心位置坐标为:前囟前 1.5 mm,左侧旁开:0.5 mm。挑开硬脑膜,用立体定位臂,植入 1 组 16 通道记录阵列电极(4 个 tetrode 电极/组,tetrode 电极间距 160 μm)至 mPFC 区,初始深度为 0.8~1.0 mm。用牙科水泥固定微电极阵列推进器底座,将低黏度硅胶覆盖骨窗。术后小鼠需经历至少 7 天恢复期。在此期间,通过微电极阵列推进器将记录电极尖端以 40~70 μm/d 的速度缓慢向目标区域推进,直到可以稳定记录到 mPFC 区神经元的放电活动。

1.3 联合型学习行为训练

本实验采用 tEBC 作为联合型运动学习的行为学模型。行为训练周期包括 2 d 适应和 5 d 的 tEBC 训练。在适应期,小鼠被放置于声光电屏蔽的行为学训练箱中。小鼠头顶部连接 1 个 16 通道前置放大器、LED 光源以及气管导管。受试小鼠可以自由活动并探索行为训练环境,适应时长 30~40 min/d。适应期间,不给予小鼠任何刺激。tEBC 训练在适应期结束后的第二天开始。将小鼠置于适应期间相同的训练环境中,CS 是 1 个持续 150 ms 的蓝色 LED 光脉冲,US 是一束持续 100 ms 的医用氧气气流。从 CS 结束到 US 开始的刺激间期时长为 250 ms。小鼠每天需要接受 100 次 CS 和 US 的配对刺激,每组配对刺激间隔 18~28 s。

1.4 电生理信号记录

在 tEBC 训练过程中,连续记录小鼠左侧 mPFC 的神经元放电活动。记录方法和流程参照本课题组近期工作[9]:以 20 000 Hz 的采样频率采集神经元放电信号。电信号通过前置放大器(C3334, Intan Technologies,美国)放大 1 000 倍再传输至数据记录仪(RHD2000,Intan Technologies,美国)。眼轮匝肌肌电活动的差分信号采集带宽为 150~1 000 Hz,信号同样放大 1 000 倍。所有记录到的信号均使用 Neuroscope 软件实现可视化观察。

1.5 数据分析

针对行为学数据,将每天 100 次配对训练中 CS 开始前的 300 ms 信号作为基线活动,并将该信号活动的平均值+4 倍标准差定义为 CR 的检测阈值。眨眼条件反应必须满足以下条件:①眼轮匝肌活动的肌电信号大于阈值;②眼轮匝肌活动出现在 CS 开始后 50 ms 至 US 开始前的时间段内;③满足条件①和②的时间总和至少要超过 20 ms。

离线状态下对神经元放电原始信号进行带通(800~6 000 Hz)滤波处理。首先,使用 KlustaKwik 软件对每个 tetrode 记录电极上采集的放电信号数据进行自动甄选,并将它们归为相应的峰电位集群。之后,自动甄选出的峰电位集群还需要进一步通过 Klusters 软件进行手动判别和再甄选,以筛除在自动甄选过程中误判的噪声信号和包含过多干扰信号的峰电位集群,最终获取单个神经元的峰电位信号。根据动物行为学成绩,将训练分成 2 个阶段:早期阶段(第 1~2 天)和后期阶段(第 4~5 天)。神经元放电的峰电位信号按照训练分期进行统计和比较。

1.6 记录位点的组织学验证

电生理记录实验完成后,通过记录电极用直流电(强度:30 μA,总时程:10 s)损毁记录电极尖端所在脑区。损毁 48 h 后,向小鼠腹腔注射致死剂量的戊巴比妥钠(浓度:3%,注射量:0.4 mL)。先后经心脏灌注生理盐水和 4%多聚甲醛溶液各 100 mL。取出脑组织置于 4%多聚甲醛溶液中固定 12 h,而后转移至 30%蔗糖溶液中继续脱水 24 h。脱水后的脑组织,再用 CM1900 冰冻切片机(Leica,德国)制成厚度为 50 μm 的连续冠状切片。经 DAPI 染色后,在 BX53 荧光显微镜(Olympus,日本)下观察和拍摄记录电极尖端的损毁位点。只有损毁位点明确在 mPFC 的电极记录信号数据才可以被纳入数据分析。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。小鼠 CR 发生率变化采用重复测量数据的单因素方差分析进行检验。对神经元放电强度随训练的强度变化比较采用独立 t 检验。神经元活动模式比例变化的比较,采用 Pearson χ^2 检验。mPFC 神经元放电 CR 和 no-CR 状态下的比较采用配对 t 检验。统计学分析的检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 小鼠联合型运动学习的行为学表现

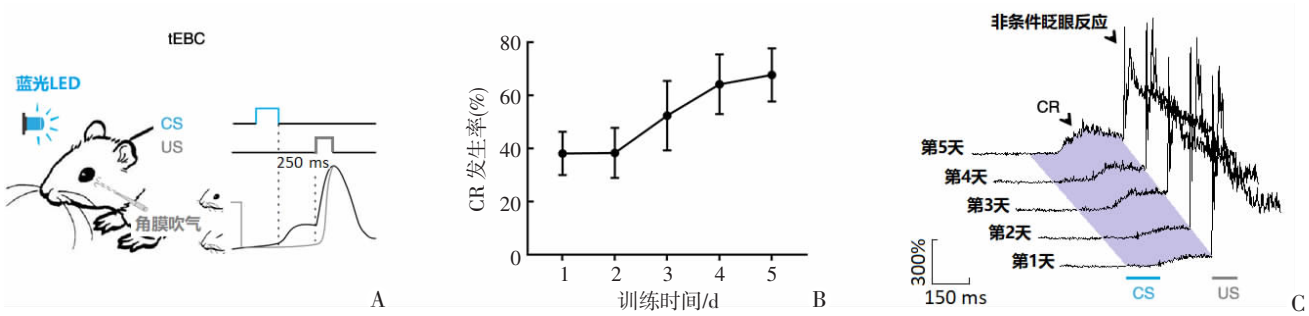
在本实验中,我们以 tEBC 作为联合型运动学习行为学范式,训练小鼠建立蓝光 CS 和角膜吹气 US 之间的联系(图 1A)。如图 1B 所示,在连续 5 d 的 CS 与 US 配对刺激训练过程中,小鼠逐渐建立起 CS 和 US

之间的联系,表现为针对 CS 的 CR 发生率的增加。统计分析显示,小鼠的 CR 发生率从训练第 1 天的(38.1±8.2)%上升到第 5 天的(66.7±10.0)%,CR 发生率显著增加[$F(4,12)=11.249$,$P<0.001$,图 1B~C]。根据 CR 发生率的水平,在本实验中,我们将第 1~2 天定义为 CR 习得早期,第 4~5 天定义为 CR 习得后期。习得后期的 CR 发生率显著高于习得早期 CR 发生率($P<0.05$,图 1B~C)。

2.2　联合型运动学习过程中 mPFC 锥体细胞的活动变化

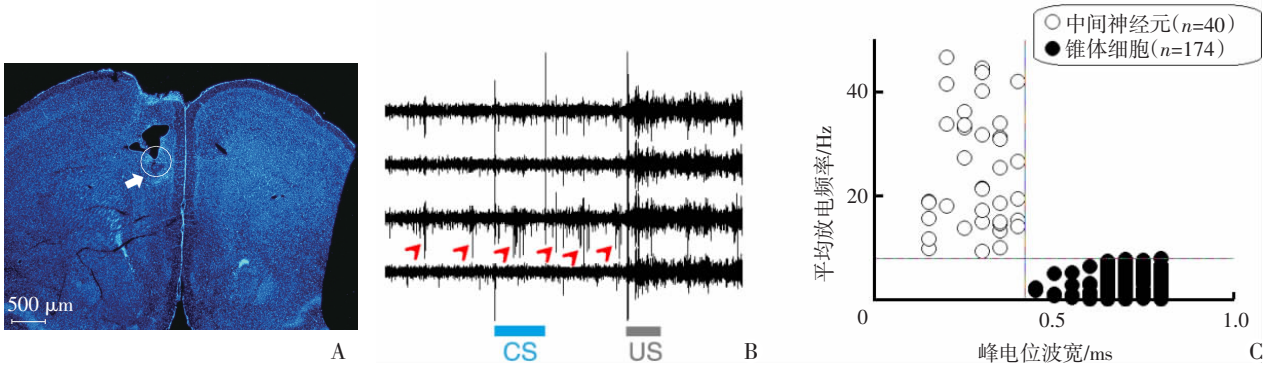
根据电生理记录实验结束后的电损毁组织学定位,记录位点准确位于 mPFC(以前扣带回亚区为主)的数据方可被纳入统计分析(图 2A)。在 5 d 实验中,我们记录到 272 个 mPFC 神经元,并观察分析了其在 tEBC 训练过程中的活动(图 2B)。根据既往的文献报道,我们将平均放电频率<8 Hz、峰电位谷-峰宽度>0.4 ms 的神经元定义为假定的锥体细胞($n=174$,图 2C);而平均放电频率≥8 Hz、峰电位谷-峰宽度≤0.4 ms 的神经元定义为假定的中间神经元($n=40$,图 2C)。其余无法明确归入到上述分类中的神经元则不用于分析。

研究首先分析了假定的小鼠 mPFC 锥体细胞在 tEBC 建立过程中的放电活动变化。统计分析显示,在小鼠 CR 习得的早期和后期,锥体细胞的平均放电频率无显著变化($P>0.05$,表 1)。但进一步分析则显示,锥体细胞可被 CS 诱发出明显的放电活动变化,表现为放电活动增强(图 2B、3A)和减弱(图 3A)等类型。特别是相对于 CR 习得早期,CR 习得后期 CS 诱发的 mPFC 锥体细胞放电活动显著降低($P<0.05$,图 3B)。与此相一致,在 CR 习得后期,CS 诱发减弱型放电的锥体细胞比例更高[CR 习得早期:7.8%(5/64);CR 习得后期:20.5%(18/88),图 3A]。可见,CS 所诱发的 mPFC 锥体细胞群体放电活动随联合型运动学习的进行而逐渐减弱。



A:小鼠 tEBC 训练模式及参数;B:第 1~5 天小鼠 CR 发生率的变化;C:第 1~5 天 tEBC 训练过程中小鼠上眼睑活动变化的代表图

图 1　小鼠联合型运动学习行为表现



A:代表性小鼠 mPFC 区的阵列电极记录位点(虚线圆圈和白色箭头所指);B:tEBC 训练过程中的小鼠 mPFC 神经元放电活动;C:小鼠 mPFC 锥体细胞和中间神经元的电生理特征区分

图 2　小鼠 mPFC 神经元放电记录

2.3　联合型运动学习过程中 mPFC 中间神经元细胞的活动变化

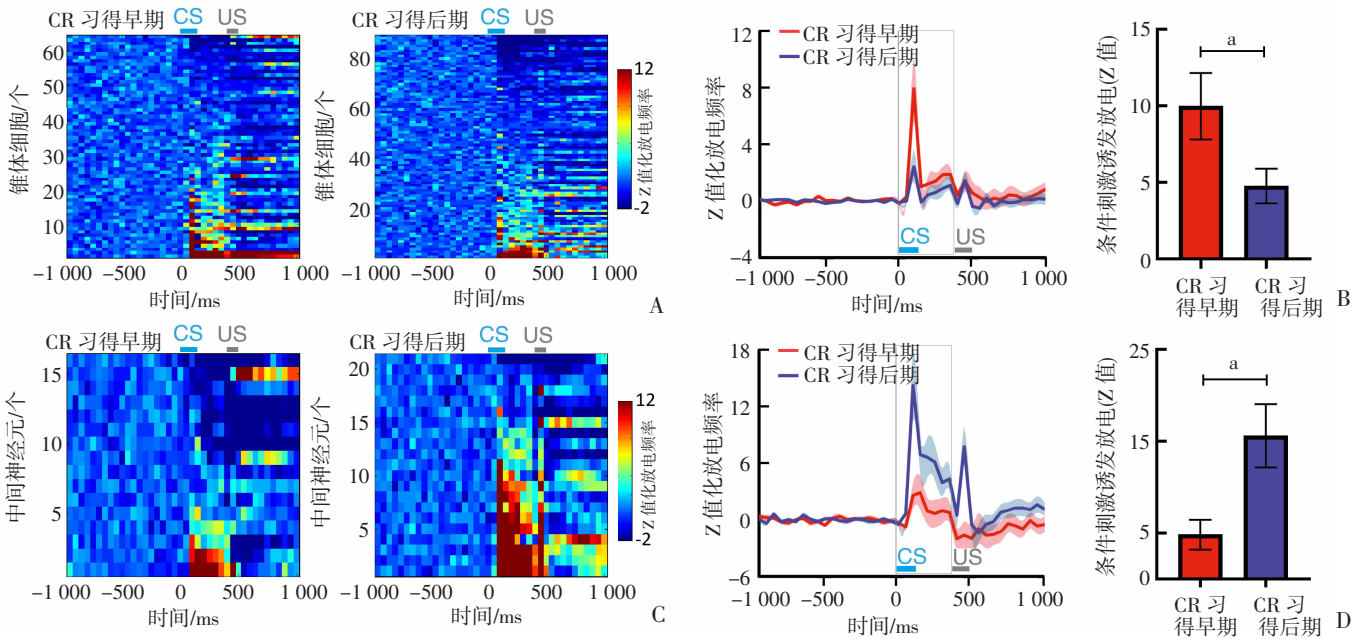
接下来,我们进一步分析了假定的 mPFC 中间神经元在 tEBC 建立过程中的放电活动变化。与锥体细胞的情况相类似,在 CR 习得早期和后期,假定中间神经元的平均放电频率并无显著变化($P>0.05$,表 1)。但中间神经元可被 CS 诱发出显著的放电活动变化,且主要表现为放电活动增强(图 3C)。相对于 CR 习得早期,CR 习得后期 CS 诱发的 mPFC 区中间神经元放电活动显著增加($P<0.05$,图 3D)。与此一致,CR 习得后期表现为 CS 诱发增强型放电的中间神经元比例显著更高[习得早期:25%(4/16);CR 习得后期:66.7%(14/21),$P<0.05$,图 3C]。因此,CS 诱发的 mPFC 中间神经元群体放电活动会随联合型运动学习的进行而逐渐增强。

2.4　mPFC 神经元放电活动与联合型运动学习行为的相关性

由于 mPFC 锥体细胞和中间神经元的放电活动随联合型运动学习的训练会发生相反方向的变化,我们推测:它们可能会以不同的方式参与联合型运动学习。为验证这个推测,我们分别比较了假定的 mPFC 锥体细胞和中间神经元在出现 CR 和不出现 CR 两种状态下的放电活动差异(图 4A)。由于 CR 主要发生在训练后期(即训练第 4~5 天),我们将分析限定于这一阶段。统计结果显示:在出现 CR 和不出现 CR 两种状态下,CS 诱发的 mPFC 锥体细胞放电活动并无显著区别($P>0.05$,图 4B)。与此不同的是,相比无 CR 出现的训练测试,在出现 CR 的训练测试中 CS 所诱发的 mPFC 中间神经元放电活动水平显著更高($P<0.05$,图 4C)。综上结果支持了我们之前的推测,即 CS 诱发的 mPFC 中间神经元放电活动与 tEBC 训练过程中的 CR 出现高度相关,而锥体细胞的活动则与 CR 出现相关性不大。

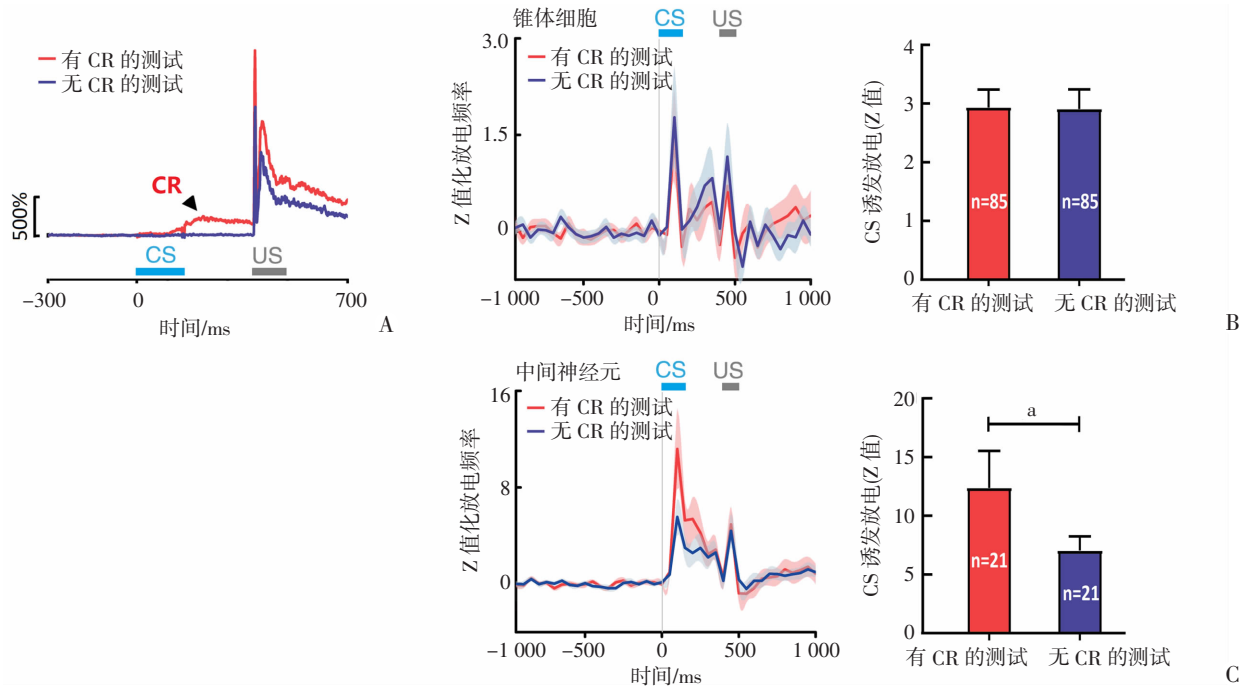
表 1　CR 习得早期与习得后期 mPFC 锥体细胞和中间神经元电生理学参数比较($\bar{x}\pm s$)

时间点	锥体细胞			中间神经元		
	细胞数(个)	放电频率(Hz)	峰电位波宽(ms)	细胞数(个)	放电频率(Hz)	峰电位波宽(ms)
训练早期(第 1~2 天)	64	2.65±0.26	0.70±0.01	16	23.85±4.22	0.24±0.02
训练晚期(第 4~5 天)	88	2.93±0.25	0.71±0.01	21	29.23±2.56	0.33±0.01
统计值		$t_{(150)}=-0.760\ 0$	$t_{(150)}=-1.511\ 0$		$t_{(35)}=-1.177\ 9$	$t_{(35)}=-3.554\ 4$
P		0.448 5	0.123		0.246 8	0.001 1



A:伪彩图显示 mPFC 锥体细胞在 CR 习得早期与后期的放电活动;B:在 CR 习得后期,CS 所诱发的锥体细胞放电活动显著低于习得早期　a:$P<0.05$;C:伪彩图显示 mPFC 中间神经元在 CR 习得早期与习得后期的放电活动;D:在 CR 习得后期,CS 所诱发的中间神经元放电活动显著强于习得早期　a:$P<0.05$

图 3　小鼠 mPFC 神经元在 tEBC 建立过程中的放电活动变化



A：在 CR 习得后期,有(红色)和无(蓝色)CR(箭头所示)的测试；B：CS 诱发的 mPFC 锥体细胞放电活动与 CR 是否出现无显著相关性；C：CS 诱发的 mPFC 中间神经元放电活动与 CR 是否出现具有显著相关性。在出现 CR 的测试时,其放电活动显著强于无 CR 出现的测试　a：$P<0.05$

图 4　小鼠 mPFC 神经元放电活动与 tEBC 行为的相关性

3　讨论

既往研究报道[6-7],mPFC 在以 tEBC 为代表的联合型运动学习过程中发挥重要作用,但相关的细胞活动基础仍不完全清楚。在此,我们利用在体多通道记录技术研究发现,在 CR 习得早期和后期,mPFC 锥体细胞可被 CS 诱发出显著的放电活动变化。相对于 CR 习得早期,CR 习得后期 CS 诱发的 mPFC 锥体细胞放电活动显著降低。与此相反的是,CR 习得后期 CS 诱发的 mPFC 中间神经元电活动则显著增强,其活动与 CR 的出现显著相关。这些结果表明,mPFC 中间神经元活动会随着联合型运动学习而发生可塑性变化,这些变化可能是联合型运动学习发生的细胞活动基础之一。

已经知道,小脑皮层是以 tEBC 为代表的联合型运动学习发生的关键部位[10],平行纤维-浦肯野细胞突触传递的长时程抑制是其关键机制。但该突触传递可塑性的诱导有赖于 CS 和 US 信号同时传递至小脑皮层[11]。但由于 CS 和 US 在出现的时间上存在间隔,故小脑皮层难以独立地实现平行纤维-浦肯野细胞突触传递长时程抑制的诱导产生。研究表明[7],mPFC 锥体细胞可以被 CS 诱发出显著的放电反应,且该放电反应可以持续至 US 阶段,从而跨越 CS 与 US 的时间间隔。特别是,近年研究发现,这种持续放电活动可以经脑桥核传递至小脑,被认为是 mPFC 参与 tEBC 建立的重要机制式[6,12]。与上述研究相一致,本研究中也观察到 CS 可诱发 mPFC 锥体细胞产生持续性放电反应(图 3A)。但不同的是,我们发现:锥体细胞的持续性放电反应会随训练进行而强度逐渐减弱。同时,表现出这种放电模式锥体细胞的比例也会下降,这与 CR 习得的趋势相反(图 3A)。造成这一现象的原因可能有:第一,它可能反映了 mPFC 在 tEBC 建立过程中参与作用的变化。在本实验中,多通道记录的位点主要在小鼠 mPFC 的前扣带回亚区(图 2)。文献曾报道,前扣带回区在注意力等功能实现的过程中发挥重要作用[13]。该区域锥体细胞可能在联合型运动学习的初期,由于对 CS 和 US 联系关注的需要而增强放电;而在学习后期,则由于关注降低而逐渐减少放电。第二,它可能是由于本研究所采用的记录方法所致。在既往研究中,为尽可能多记录神经元放电活动,研究者往往需要在记录过程中不断变换记录位点。因此,既往研究结果可能反映了不同位点 mPFC 锥体细胞在联合型运动学习过程中的先后变化[7]。在本实验中,由于记录电极阵列的优势,使我们可在不调整记录位点的条件下记录到足够多的 mPFC 锥体细胞,故我们

的记录位点保持不变。这可以实现对同一群体锥体细胞在联合型运动学习过程中活动的动态监测。因此,我们的结果可能主要反映了前扣带回的同一锥体细胞群体在 tEBC 建立过程中的动态变化过程,这与既往研究显著不同。

除了锥体细胞活动,本研究还对 mPFC 中间神经元活动进行了记录和分析。我们发现 mPFC 中间神经元同样可被 CS 诱发出显著的放电活动变化(图 3B)。但与锥体细胞不同,相对于 CR 习得早期,CR 习得后期 CS 所诱发的 mPFC 中间神经元放电活动显著增强,表现为 CS 诱发增强型放电活动的中间神经元比例显著增高(图 3)。这些结果因此提示,在 tEBC 建立过程中,mPFC 中间神经元会发生与锥体细胞相反的活动可塑变化。目前认为,中间神经元对邻近锥体细胞的活动具有抑制效应,可以通过降低背景噪声而达到提高信噪比、提升信息传递效率的目的[14]。因此,我们推测,mPFC 中间神经元很可能也参与了 tEBC 的建立过程。支持这一推测的证据在于,CS 诱发的内侧前额叶皮层中间神经元放电活动与 CR 出现密切相关(图 4C)。

综上所述,本研究探究了 tEBC 建立过程中 mPFC 锥体细胞与中间神经元的活动变化及其与条件反射行为之间的相关性。结果显示小鼠 mPFC 不同神经元在联合型运动学习过程中有不同的变化特征。其中,中间神经元可能与 tEBC 建立密切相关。这些结果对原有的关于 mPFC 参与 tEBC 建立过程中的细胞活动特征的认识进行了补充,并为后期进一步深入探索 mPFC 中间神经元在 tEBC 中的作用奠定了基础,也可望为将来防治因前脑结构损伤或病变造成的联合型运动学习障碍提供了新角度的启示。

参考文献:

[1] CALIGIORE D, MIRINO P. How the cerebellum and prefrontal cortex cooperate during trace eyeblinking conditioning [J]. Int J Neural Syst, 2020, 30(8): 2050041. DOI: 10.1142/S0129065720500410.

[2] NOURIZIABARI B, SARKAR S, TANNINEN S E, *et al*. Aberrant cortical event-related potentials during associative learning in rat models for presymptomatic stages of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 63(2): 725-740. DOI: 10.3233/JAD-171033.

[3] LAIDI C, LEVENES C, SUAREZ-PEREZ A, *et al*. Cognitive impact of cerebellar non-invasive stimulation in a patient with schizophrenia[J]. Front Psychiatry, 2020, 11: 174. DOI: 10.3389/fpsyt.2020.00174.

[4] SIEGEL J J, CHITWOOD R A, DING J M, *et al*. Prefrontal cortex dysfunction in fragile X mice depends on the continued absence of fragile X mental retardation protein in the adult brain[J]. J Neurosci, 2017, 37(31): 7305-7317. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0571-17.2017.

[5] TAKEHARA-NISHIUCHI K. The anatomy and physiology of eyeblink classical conditioning[J]. Curr Top Behav Neurosci, 2018, 37: 297-323. DOI: 10.1007/7854_2016_455.

[6] WU G Y, LIU S L, YAO J, *et al*. Optogenetic inhibition of medial prefrontal cortex-pontine nuclei projections during the stimulus-free trace interval impairs temporal associative motor learning[J]. Cereb Cortex, 2018, 28(11): 3753-3763. DOI: 10.1093/cercor/bhx238.

[7] SIEGEL JJ, KALMBACH B, CHITWOOD R A, *et al*. Persistent activity in a cortical-to-subcortical circuit: bridging the temporal gap in trace eyelid conditioning[J]. J Neurophysiol, 2012, 107(1): 50-64. DOI: 10.1152/jn.00689.2011.

[8] ZHANG J, ZHANG K Y, ZHANG L B, *et al*. A method for combining multiple-units readout of optogenetic control with natural stimulation-evoked eyeblink conditioning in freely-moving mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1857. DOI: 10.1038/s41598-018-37885-w.

[9] QIN H, FU L, HU B, *et al*. A visual-cue-dependent memory circuit for placenavigation[J]. Neuron, 2018, 99(1): 47-55.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.05.021.

[10] BEEKHOF G C, OSÓRIO C, WHITE J J, *et al*. Differential spatiotemporal development of Purkinje cell populations and cerebellum-dependent sensorimotor behaviors [J]. Elife, 2021, 10: e63668. DOI: 10.7554/eLife.63668.

[11] KAKEGAWA W, KATOH A, NARUMI S, *et al*. Optogenetic control of synaptic AMPA receptor endocytosis reveals roles of LTD in motor learning[J]. Neuron, 2018, 99(5): 985-998.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.07.034.

[12] CHEN H, WANG Y J, YANG L, *et al*. Theta synchronization between medial prefrontal cortex and cerebellum is associated with adaptive performance of associative learningbehavior[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20960. DOI: 10.1038/srep20960.

[13] NORMAN K J, RICEBERG J S, KOIKE H, *et al*. Post-error recruitment of frontal sensory cortical projections promotes attention inmice[J]. Neuron, 2021, 109(7): 1202-1213.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.02.001.

[14] SCHEGGIA D, MANAGÒ F, MALTESE F, *et al*. Somatostatin interneurons in the prefrontal cortex control affective state discrimination in mice[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(1): 47-60. DOI: 10.1038/s41593-019-0551-8.

(**收稿**:2021-05-11;**修回**:2021-10-13)

(编辑 张艺霖)