DOI:10.16016/j.2097-0927.202110197

激活 PV 阳性抑制性神经元对脑缺血引起记忆障碍的改善作用

刘 畅[1],王若兰[1],胡 俊[2],穆建坤[1] 400050 重庆,重庆医科大学附属康复医院神经康复科[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院神经内科[2]

[摘要] **目的** 探讨激活小白蛋白(parvalbumin, PV)阳性抑制性神经元对额叶皮层缺血所致记忆功能障碍的影响,并分析其作用机制。**方法** 采用随机数字表法,将成年 PV-Cre 小鼠分为 3 组:对照组[额叶皮层 PV 神经元表达 hM3D-mCherry,额叶皮层注射 0.9% NaCl 溶剂+腹腔注射氯氮平(clozapine N-oxide hydrochloride, CNO)]、模型组(额叶皮层 PV 神经元表达 mCherry,额叶皮层区注射内皮素+腹腔注射生理盐水)、干预组(额叶皮层 PV 神经元表达 hM3D-mCherry,额叶皮层注射内皮素+腹腔注射 CNO)。其中,通过病毒微量注射技术,使得模型组小鼠额叶皮层 PV 神经元特异表达 mCherry,而对照组和干预组小鼠额叶皮层区 PV 神经元特异表达 hM3D-mCherry。通过药物遗传学,在干预组注射 CNO 可通过 hM3D 特异激活 PV 阳性神经元。通过 T-迷宫和物体位置识别检测小鼠的记忆和运动功能。应用高尔基染色分析额叶皮层区锥体神经元树突棘密度的改变。**结果** 额叶皮层给予内皮素可引起局部缺血。与对照组比较,额叶皮层缺血后引起其锥体神经元上树突棘密度减少,造成小鼠在 T-迷宫中选择正确率下降,在物体空间位置识别任务中探索分数降低($P<0.01$)。激活 PV 阳性神经元能够显著增加额叶皮层树突棘的密度,显著提高小鼠在 T-迷宫中的选择正确率($P<0.05$),提高在物体位置识别任务中的探索分数($P<0.05$)。激活额叶皮层 PV 阳性神经元并未影响动物运动功能。**结论** 激活 PV 阳性神经元可改善额叶皮层缺血引起的记忆功能障碍,其可能与提高额叶皮层内树突棘密度有关。

[关键词] 额叶皮层;PV 阳性神经元;记忆

[中图法分类号] R363.22; R743.31; R749.13 [文献标志码] A

Improvement of activation of parvalbumin positive inhibitory neurons to memory impairment caused by frontal cortex ischemia

LIU Chang[1], WANG Ruolan[1], HU Jun[2], MU Jiankun[1] [1]Department of Neurorehabilitation, the Affiliated Rehabilitation Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400050; [2]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of activating parvalbumin (PV) positive inhibitory neurons on memory impairment caused by frontal cortex ischemia and analyze the related mechanism. **Methods** Adult PV-Cre mice were randomly divided into control group [frontal cortex injection of 0.9% NaCl+ intraperitoneal injection of clozapine N-oxide hydrochloride (CNO)], model group (frontal cortex injection of endothelin+intraperitoneal injection of 0.9% NaCl) and intervention group (prefrontal cortex injection of endothelin+intraperitoneal injection of CNO). Among them, virus microinjection technology was adopted to specifically express mCherry in the PV neurons in the frontal cortex of mice from the control group, while specifically express hM3d-mCherry in the PV neurons from the model group and the intervention group. Injection of CNO was performed in the intervention group to specifically activate PV positive neurons through

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873755)

[通信作者] 穆建坤,E-mail:234630639@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

hM3d. The memory and motor functions of mice were detected by T-maze and object location and recognition tasks. The changes of dendritic spine density of pyramidal neurons in frontal cortex were analyzed by Golgi staining. **Results** The administration of endothelin in frontal cortex caused local ischemia. Compared with the normal control group, the density of dendritic spines on pyramidal neurons was decreased after frontal cortex ischemia, resulting in the decrease of selection accuracy in T-maze and exploration scores in object location and recognition tasks ($P<0.01$). On the contrary, activation of PV positive neurons significantly increased the density of dendritic spines in frontal cortex, and significantly improved the selection accuracy of mice in T-maze test ($P<0.05$) and the exploration score in object location and recognition tasks ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of PV positive neurons can improve memory impairment caused by frontal cortex ischemia, which may be related to increasing the density of dendritic spines in frontal cortex.

[**Key words**] frontal cortex; PV positive neurons; memory

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873755). Corresponding author: MU Jiankun, E-mail: 234630639@qq.com

缺血性卒中是导致死亡和残疾的主要原因之一,其中占卒中总数近3%的大脑前动脉卒中可导致额叶受损,从而导致记忆、执行功能以及情感功能受损。业已揭示,额叶缺血早期会引起锥体神经元放电频率增加,导致兴奋性氨基酸神经递质浓度急剧增加。大量兴奋性谷氨酸神经递质会产生兴奋性毒性,最终引起神经元坏死,并造成严重的记忆等行为功能障碍[1-3]。目前,额叶皮层早期缺血引起兴奋性递质异常释放的神经机制尚不完全清楚,干预手段更是有限。

小白蛋白(parvalbumin,PV)阳性的抑制性神经元占额叶皮层γ-氨基丁酸(γ-aminobutiric acid,GABA)能抑制性神经元的35%~40%。PV神经元与额叶皮层兴奋性锥体神经元构成局部微环路,对额叶锥体神经元有强烈的抑制作用[4-5]。正常生理条件下,PV阳性的抑制性神经元对产生γ振荡以及相关的空间记忆至关重要。近来研究表明在缺血的早期(24 h内)PV阳性神经元兴奋性显著下降[6]。基于这一现象,我们提出如下假设:缺血早期PV阳性的抑制性神经元兴奋性下降,导致兴奋性锥体神经元放电频率增加,释放更多谷氨酸,造成兴奋毒性和细胞损伤。鉴于此,本研究拟探索缺血早期提高PV阳性抑制性神经元能否减轻细胞损伤,并改善记忆功能障碍。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂和仪器

10~12周龄健康雄性C57BL/6小鼠(PV-Cre)购自美国Jackson Lab(库存编号:008069),在重庆医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)2018-0003]进行繁殖和扩增,体质量20~25 g,室温(22±2)℃,明暗周期12 h,并自由进食与饮水。共使用小鼠69只,其中T-迷宫使用30只,空间物体位置识别使用25只,高尔基染色使用14只。动物操作符合重庆医科大学实验动物伦理规范。

氯氮平(clozapine N-oxide hydrochloride,CNO,批号:SML2304)购自美国西格玛公司。内皮素(批号:Cat. No. 121204)购自Tocris公司(英国)。用于药物遗传学干预的病毒购自武汉枢密公司。用于脑区内微量注射的微量注射仪(IVM-1000)购自英国Scientifica公司。冰冻切片机(CM1950)用于脑组织切片,购自德国Leica公司。脑定位仪购自瑞沃德公司(深圳)。

1.2 方法

1.2.1 病毒微量注射与给药导管埋植 将雄性小鼠用异氟醚麻醉后,固定在脑立体定位仪上,使用加热垫将体温维持在35 ℃。去除头皮,清除表面组织,暴露颅骨。根据额叶的坐标,在颅骨两侧钻2个小孔(前囟后+1.5 mm,旁开1.4 mm,深度-1.5 mm)用于注射病毒。连接玻璃移液管的Nanoject Ⅱ用于病毒微量注射。针对化学遗传学实验,病毒注射方法参见文献[7]。将Cre诱导型AAV-EF1α-DIO-hM3D-mCherry(病毒滴度:1×10^{12} vg/mL)注射到对照组、干预组PV-Cre小鼠的双侧额叶皮层中,总体积约200 nL。模型组注射Cre诱导型AAV-EF1α-DIO-mCherry(病毒滴度:1×10^{12} vg/mL)作为对照。注射后,移液管在原位保持1 min,然后以约100 nL/2 min的速度注射病毒。移液管在注射部位再保持5 min,然后缓慢取出。

本研究采用药物遗传学技术,该技术已被广泛用于特定神经元的操控[8-9]。其技术原理是使hM3D(乙酰胆碱毒蕈碱受体的一种人工修饰形式)特异表达在某种类型神经元上。CNO可特异性激活人工设计的hM3D受体,进而激活Gq信号通路,Gq信号激活后可

增强神经元的兴奋性。因此,表达 hM3Dq 的神经元经 CNO 处理后,其兴奋性可急剧增加。本研究所选择的病毒注射剂量和病毒滴度主要参考文献[7, 10]。

病毒注射完成后,将导管沿着骨孔缓慢移至额叶皮层区域,双侧埋置导管。导管的高度高于病毒注射位点 0.5 mm。应用牙科水泥将导管固定于颅骨表面。完成后将大鼠放于饲养笼中恢复,7 d 后进行造模。

1.2.2 动物分组和造模 将手术后的 PV-Cre 小鼠分为 3 组:①对照组,动物额叶皮层 PV 神经元表达 hM3D-mCherry,并在额叶皮层注射 0.9% NaCl 溶剂 0.5 μL;②模型组,动物额叶皮层 PV 神经元表达 mCherry,并在额叶皮层区注射 400 pmol/μL 内皮素 0.5 μL;③干预组,动物额叶皮层 PV 神经元表达 hM3D-mCherry,并在额叶皮层区注射 400 pmol/μL 内皮素 0.5 μL。注射完成后,在早起第 6、12、18、24 小时,分别向对照组和干预组腹腔注射 CNO(5 mg/kg),向模型组腹腔注射生理盐水。内皮素和 CNO 的浓度和体积主要依据文献[3, 6, 11],脑内微注射速度 0.05 μL/min,药物注射后留针 2 min 使药物在脑内充分扩散。CNO 给药完成后 7 d 进行行为测试。

1.2.3 T-迷宫任务 T-迷宫常用于检测动物空间工作记忆。主要包括两个阶段。首先是适应阶段,即训练前 4 d 进行限食,使小鼠体质量降至限食前 85%~90%,并且每天让小鼠在 T-迷宫中自由探索 6 min,让其熟悉空间环境。其次是训练和测试阶段,T-迷宫包括中央臂和 2 个选择臂。中央臂长 30 cm,宽为 15 cm。采用交替选择的 T-迷宫训练法。小鼠每天训练 10 次,时间间隔为 30 s。第 1 次时关闭一侧选择臂,小鼠从中央臂出发,进入另一侧开放的选择臂。在开放的选择臂末端可找到食物,在剩下的 10 次训练中,选择臂两侧入口均开放,小鼠进入上 1 次已经进入过的臂式,就会没有食物,此时记录为 1 次错误选择。若小鼠进入前 1 次未进入的臂则会得到食物奖赏,此时记录为 1 次正确选择。

T-迷宫任务中,对照组、模型组及干预组每组最终纳入 10 只小鼠,共计 30 只小鼠。

1.2.4 空间物体位置识别任务 让小鼠在白色实验场(50 cm×50 cm)中自由探索 2 个相同的物体(A 物体和 B 物体)5 min,4 面墙上有黄色正方形、紫色五角星形、粉色三角形和橙色圆圈。间隔 5 min 后,接着进行 5 min 的实验阶段。在此阶段,改变 1 个物体(物体 B)的空间位置,允许小鼠重新探索两个物体。进行录像记录探索活动,以便进一步分析。

通过探索分数来反映动物物体空间位置记忆能力,探索分数计算公式为:$T_m(B) - T_m(A) / T_m(B) + T_m(A)$。$T_m$ 代表对每一物体的探索时间。空间物体位置识别任务中,对照组纳入 8 只小鼠,模型组纳入 8 只小鼠,干预组纳入 9 只小鼠,共计 25 只小鼠。

1.2.5 缺血区域的形态鉴定 在注射内皮素后,用过量的 1%戊巴比妥钠深度麻醉小鼠,并经心脏灌注生理盐水。大脑被迅速从头骨中取出并放在冰上。在 0~4 ℃下使用振动刀制备矢状切片(500 μm 厚)。为了量化缺血损伤,在 37 ℃的黑暗条件下,将切片用 2% 2,3,5-三苯基四氮唑氯化物溶液(TTC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)在盐水中染色 20 min,然后将其放入 4%多聚甲醛中 1 h。按顺序拍摄脑切片,检测缺血的区域。

1.2.6 病毒表达的特异性鉴定 行为训练后的小鼠进行灌注固定和取脑。将脑组织置于 4%多聚甲醛后固定。随后移至 30%蔗糖和 4%多聚甲醛溶液中进行脱水。待组织沉底后,进行冰冻切片,切片厚度为 20 μm。脑切片随后进行免疫组织化学染色。为了检测 hM3D-mCherry 是否在 PV 阳性神经元中特异表达,将含有额叶皮层的切片用 PBS 洗涤 3 次,每次持续 5 min。然后,在含有 0.1% Triton X-100 和 5%血清的封闭溶液中,37 ℃孵育 40 min。切片在 4 ℃孵育溶液中与抗小白蛋白抗体的一抗(1∶500, ab11427, Abcam)孵育 48 h。用 PBS 洗涤 3 次,每次持续 5 min。将切片在二抗(1∶800, Alexa Faur 488, Invitrogen)中孵育 2 h。脑片用 PBS 清洗后,进行贴片和封片,然后用共焦显微镜观察。

1.2.7 膜片钳验证药物遗传激活 PV 阳性神经元的有效性 小鼠注射病毒 3 周后进行验证,脑片制备如下:在 0~4 ℃人工脑脊液(ACSF, 119 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L $NaHPO_4$, 25 mmol/L $NaHCO_3$, 125 mmol/L 葡萄糖, 2 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L $CaCl_2$)中,用振动冰机(VT1000,徕卡微系统)制备含脑片(400 μm),同时 ACSF 中持续灌流 95% O_2 和 5% CO_2。切片转移到 ACSF 中孵育,在记录之前,在室温(20~24 ℃)下至少孵育 40 min。

目标神经元通过荧光显微镜进行识别。使用玻璃电极(电阻为 3~5 MΩ)封接目标细胞,电极内液为 125 mmol/L 葡萄糖酸钾, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L $MgCl_2$, 4 mmol/L ATP。使用 EPC 10 放大器(HEKA Elektronik, EPC-10)获取数据,使用 Pulse/Pulsefit v. 8.74(HEKA Elektronik)和 Igor Pro v. 4.03(WaveMatrics)进行分析。如果记录期间串联电阻增加>15%或超过 25 MΩ,则将细胞从分

析中排除。稳定至少 5 min 后,灌流给予 10 μmol/L CNO 观测其对神经元放电的影响。

1.2.8　高尔基染色　　采用 FD 快速高尔基染色试剂盒(FD 神经技术公司)。取额叶皮层区域,将其置于浸渍溶液中。在黑暗中储存 2 周后,将组织移到蔗糖溶液中。在 4 ℃下储存 2~7 d 后,使用振荡切片机制备含有额叶的切片(100 μm)。额叶切片在蒸馏水中冲洗,并放入硝酸银溶液中 10~15 min。然后将载玻片在乙醇中脱水,用二甲苯清除,并用非酸性合成香脂和盖玻片覆盖。

所有图像采集和数据分析以盲法进行。图像通过使用放大 400 倍的 ZESIS 共焦显微镜获得。选择用于分析的锥体神经元符合以下标准:细胞体和二级树突完全浸染;在额叶皮层的锥体神经元的二级树突中,树突棘计数的树突长度大于 20 μm。对照组纳入 11 个细胞(4 只小鼠),模型组纳入 11 个细胞(5 只小鼠),干预组纳入 12 个细胞(5 只小鼠),共计 34 个细胞,来自 14 只小鼠。

1.3　统计学分析

采用 Sigma Plot 12.5 软件进行作图以及数据统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。单因素方差分析用于组间比较,两两比较采用 Fisher LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

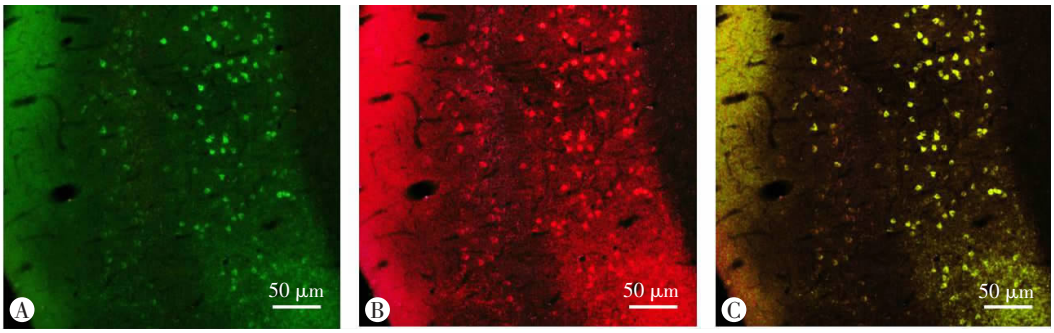
2.1　利用 PV-Cre 小鼠特异激活 PV 阳性抑制性神经元

免疫组化染色结果发现,hM3D-mCherry 特异的表达在 PV 阳性神经元上,与 PV 阳性神经元的共标率在 90%以上(图 1)。由于 CNO 能够结合 hM3D,进而引起细胞放电增加,故此采用的化学遗传学技术能够特异激活 PV 阳性神经元。

进一步采用全细胞膜片钳记录技术,观测灌流 CNO 对表达 hM3D-mCherry 的 PV 阳性抑制性神经元的影响。在电流钳模式下,记录细胞的膜电位。在灌流 CNO 后,细胞膜电位出现去极化,并显著引起细胞的放电增加($P<0.01$, 图 2)。结果证明,药物遗传学技术能够显著激活额叶皮层 PV 阳性抑制性神经元。

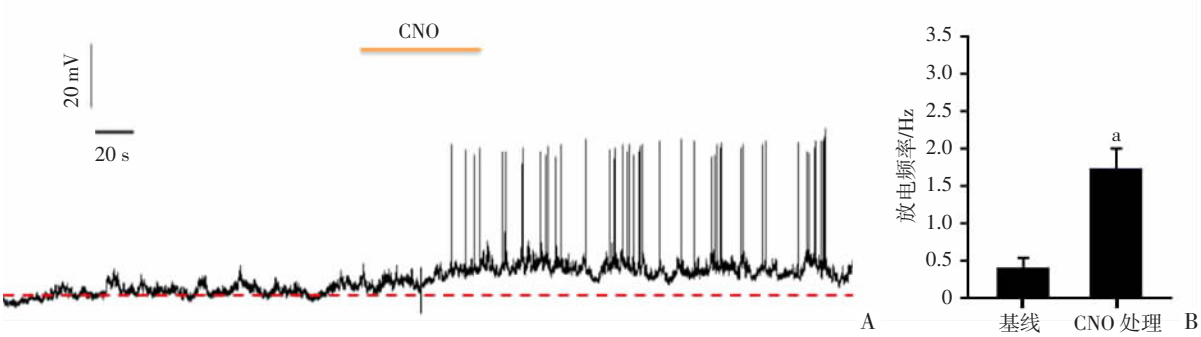
2.2　缺血后早期激活 PV 阳性神经元可改善空间工作记忆障碍

实验中采用 TTC 染色发现额叶皮层呈现苍白色,并且缺血损伤主要局限于额叶皮层,而其他脑区并无明显改变(图 3)。



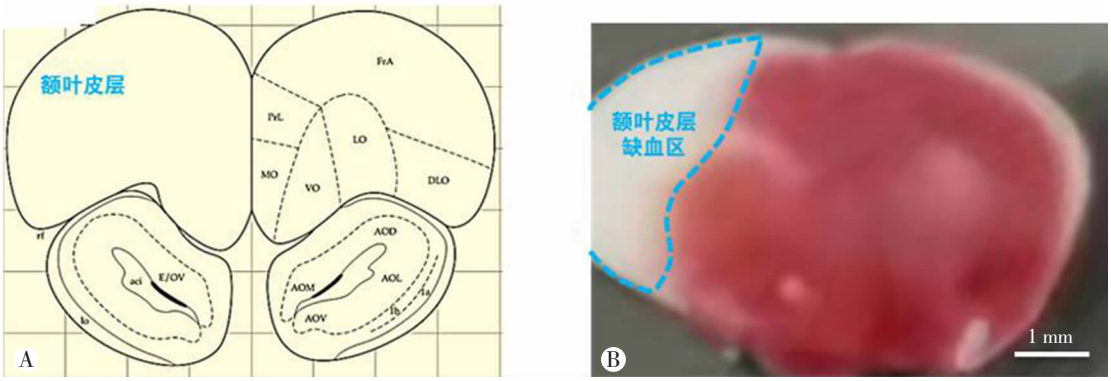
A:免疫组化对 PV 蛋白染色;B:hM3D-mCherry 荧光蛋白表达;C:PV 蛋白染色和 hM3D-mCherry 荧光蛋白叠加

图 1　hM3D-mCherry 在 PV 阳性的抑制性神经元中选择性地表达



A: 膜片钳记录表达 hM3D-mCherry 细胞的膜电位;B:CNO 对 PV 阳性细胞放电频率的影响　a:$P<0.01$,与基线比较

图 2　CNO 能降低表达 hM3D-mCherry 的 PV 阳性的抑制性神经元放电频率

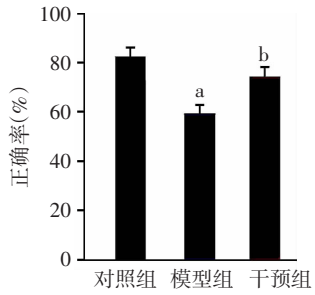


A:小鼠脑图谱显示额叶皮层;B:TTC 染色显示缺血的区域

图 3 TTC 染色发现缺血的区域位于额叶皮层

额叶皮层与空间工作记忆高度相关,因此采用 T-迷宫检测激活 PV 阳性神经元后对空间工作记忆的影响。与对照组比较,模型组在 T-迷宫中选择的正确率下降($P<0.01$)。这说明额叶皮层局部微量注射内皮素可引起缺血缺氧,导致空间工作记忆功能损伤。

与模型组比较,干预组的正确率显著提高($P<0.05$,图 4),表明早期激活 PV 阳性神经元可改善缺血缺氧所引起的空间工作记忆功能障碍。



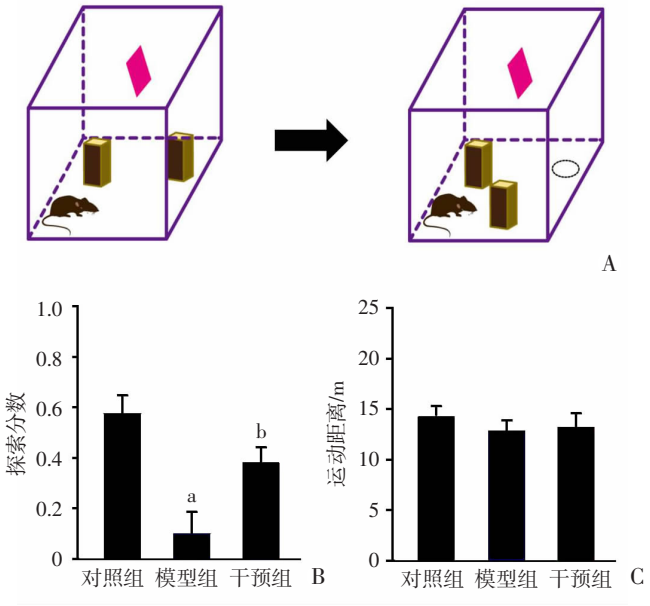
a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 4 激活 PV 阳性抑制性神经元对空间工作记忆的影响

2.3 缺血后早期激活 PV 阳性神经元可改善物体位置记忆障碍

与对照组比较,模型组在物体位置识别记忆任务中探索分数下降($P<0.01$,图 5A、B),说明额叶皮层缺血缺氧导致物体位置记忆功能损伤。

与模型组比较,干预组的探索分数显著提高($P<0.05$,图 5B),表明早期激活 PV 阳性神经元可改善缺血缺氧所引起的物体位置记忆功能障碍。在进行空间物体探索时,与对照组比较,模型组和干预组并未影响动物的运动功能(图 5C)。

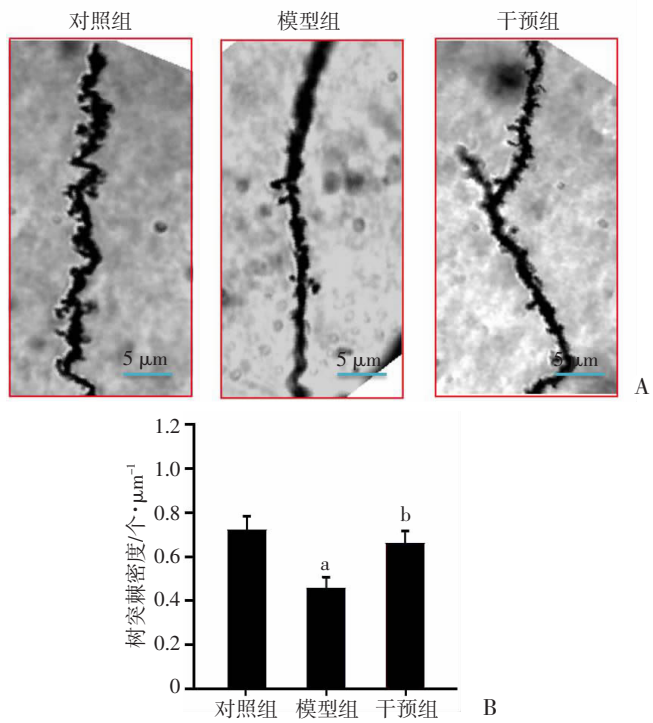


a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较
A:小鼠行为训练模式;B:各组小鼠物体探索分数分析;C:各组小鼠运动距离分析

图 5 激活 PV 阳性抑制性神经元对物体位置记忆的影响

2.4 缺血后早期激活 PV 阳性神经元可提高额叶皮层锥体神经元树突棘密度

通过高尔基染色,发现缺血后神经元树突棘丢失,导致其密度减少,表明缺血后神经元功能受损。相反,激活 PV 阳性神经元后较模型组树突棘密度显著增加($P<0.05$, 图 6)。提示早期激活 PV 阳性神经元可降低锥体神经元的兴奋性,减少兴奋毒性和树突棘的丢失,进而改善记忆障碍。



A:额叶皮层高尔基染色显示锥体神经元树突棘;B:神经元树突棘密度统计结果 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 6 激活 PV 阳性抑制性神经元后对额叶锥体神经元树突棘密度的影响

3 讨论

本研究的主要发现是缺血后早期激活 PV 神经元可以改善额叶缺血引起的空间工作记忆障碍和物体位置记忆障碍,而不影响运动功能。早期激活 PV 神经元可能主要通过减少缺血后树突棘丢失发挥作用。这些结果显示,缺血早期 PV 神经元功能活动下降可能是脑缺血引起认知损害的重要机制,并且 PV 神经元可能是缺血早期干预的重要靶点。

缺血后一个突出的细胞事件是锥体神经元的高兴奋性以及过度的谷氨酸释放[12]。在额叶皮质、海马和纹状体等其他多个脑区均检测到这一现象[13-15]。在体外缺氧后也观察到类似现象。过度升高的谷氨酸激活 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体,进而使钙超载,导致神经元变性[16-17]。目前,为何会导致锥体神经元兴奋性高和过度释放谷氨酸尚不清楚。业已揭示,锥体神经元的活动由不同类型的 GABA 能抑制性神经元控制,如 PV、SOM 阳性抑制性神经元。研究显示,急性缺血后皮质和纹状体中细胞外 GABA 浓度降低[18]。通过细胞类型特异性干预,本研究进一步发现额叶皮层缺血后激活 PV 抑制神经元可减少树突棘丢失,改善记忆功能障碍。鉴于 PV 神经元对其邻近的锥体神经元具有强烈的抑制性控制[4],故此缺血早期 PV 神经元兴奋性下降会导致锥体神经元的去抑制,使其释放大量谷氨酸,进而诱导了兴奋性毒性过程。为此,本研究为解释缺血诱导的病理损伤提供了一种新的机制。

研究表明,额叶皮层缺血可导致记忆障碍。额叶皮层缺血后 1~4 个月导致物体识别功能和行为灵活性的损伤,而对运动功能无明显作用[19]。在 2~4 周后的额叶皮层缺血小鼠中也观察到执行功能和空间记忆的显著损伤[3,11]。本研究发现早期(24 h 内)通过化学遗传学选择性激活 PV 神经元可改善额叶缺血诱导的记忆损伤,这一发现为改善缺血后早期认知障碍提供了重要的潜在细胞靶点。在此基础上,进一步探索激活 PV 阳性神经元改善缺血引起记忆功能障碍的机制。树突棘是锥体神经元形成兴奋性突触的重要组成部分,是神经元接受信息的重要部位。树突密度与额叶皮层记忆功能高度关联[20-21]。树突棘密度减少可显著引起记忆障碍。本研究发现额叶皮层缺血后神经元树突棘密度减少,激活 PV 阳性神经元后树突棘密度显著增加。这些结果表明激活 PV 阳性神经元可能通过降低了锥体神经元的兴奋性,减少兴奋毒性,减少了树突棘的丢失,从而改善了记忆障碍。

值得注意的是,本研究主要探索激活 PV 阳性神经元对缺血损伤的效应。目前尚不清楚 PV 神经元和其他抑制性中间神经元在缺血后不同阶段的活动是如何动态改变,后续还需进一步研究。尽管我们进行了行为测试,发现额叶皮层缺血并不会影响基本的运动功能,但不能排除额叶皮层缺血可能会影响一些高级运动技能。总之,本研究发现缺血后 PV 神经元兴奋性的降低可能是缺血损伤的一个重要机制,缺血后干预 PV 神经元可能是保护缺血损伤的一种新策略。

参考文献:

[1] LIVINGSTON-THOMAS J M, JEFFERS M S, NGUEMENI C, *et al*. Assessing cognitive function following medial prefrontal stroke in the rat[J]. Behav Brain Res, 2015, 294: 102-110. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.07.053.

[2] QÜ M, MITTMANN T, LUHMANN H J, *et al*. Long-term changes of ionotropic glutamate and GABA receptors after unilateral permanent focal cerebral ischemia in the mouse brain[J]. Neuroscience, 1998, 85(1): 29-43. DOI: 10.1016/s0306-4522(97)00656-8.

[3] ZHOU L Y Y, WRIGHT T E, CLARKSON A N. Prefrontal cortex stroke induces delayed impairment in spatial memory [J]. Behav Brain Res, 2016, 296: 373-378. DOI: 10.

1016/j.bbr.2015.08.022.

[4] TREMBLAY R, LEE S, RUDY B. GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits[J]. Neuron, 2016, 91(2): 260-292. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.033.

[5] IACCARINO H F, SINGER A C, MARTORELL A J, *et al*. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia[J]. Nature, 2016, 540(7632): 230-235. DOI: 10.1038/nature20587.

[6] CHEN L, HU J, MU J K, *et al*. Specific stimulation of PV+ neurons at early stage ameliorates prefrontal ischemia-induced spatial working memory impairment[J]. Behav Brain Res, 2021, 414: 113511. DOI: 10.1016/j.bbr.2021.113511.

[7] SAIKA F, MATSUZAKI S, KISHIOKA S, *et al*. Chemogenetic activation of CX3CR1-expressing spinal microglia using gq-DREADD elicits mechanical allodynia in male mice[J]. Cells, 2021, 10(4): 874. DOI: 10.3390/cells10040874.

[8] ALLEN D C, JIMENEZ V A, CARLSON T L, *et al*. Characterization of DREADD receptor expression and function in rhesus macaques trained to discriminate ethanol[J]. Neuropsychopharmacology, 2021: 1-9. DOI: 10.1038/s41386-021-01181-5.

[9] KHAMBHATI A N, BASSETT D S. A powerful DREADD: revealing structural drivers of functional dynamics[J]. Neuron, 2016, 91(2): 213-215. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.07.011.

[10] GOMEZ J L, BONAVENTURA J, LESNIAK W, *et al*. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation *via* converted clozapine[J]. Science, 2017, 357(6350): 503-507. DOI: 10.1126/science.aan2475.

[11] DÉZIEL R A, RYAN C L, TASKER R A. Ischemic lesions localized to the medial prefrontal cortex produce selective deficits in measures of executive function in rats[J]. Behav Brain Res, 2015, 293: 54-61. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.07.003.

[12] HAZELL A S. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies[J]. Neurochem Int, 2007, 50(7/8): 941-953. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.04.026.

[13] ERDEMLI G, CRUNELLI V. Response of thalamocortical neurons to hypoxia: a whole-cell patch-clamp study[J]. J Neurosci, 1998, 18(14): 5212-5224. DOI: 10.1523/jneurosci.18-14-05212.1998.

[14] KRNJEVIĆ K. Electrophysiology of cerebral ischemia[J]. Neuropharmacology, 2008, 55(3): 319-333. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.002.

[15] CALABRESI P, PISANI A, MERCURI N B, *et al*. Hypoxia-induced electrical changes in striatal neurons[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(6): 1141-1145. DOI: 10.1038/jcbfm.1995.142.

[16] CHEN X, ZHANG J, SONG Y, *et al*. Deficiency of anti-inflammatory cytokine IL-4 leads to neural hyperexcitability and aggravates cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(9): 1634-1645. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.05.002.

[17] SONG H, MYLVAGANAM S M, WANG J, *et al*. Contributions of the hippocampal CA3 circuitry to acute seizures and hyperexcitability responses in mouse models of brain ischemia[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 278. DOI: 10.3389/fncel.2018.00278.

[18] GŁODZIK-SOBAŃSKA L, SŁOWIK A, KOZUB J, *et al*. GABA in ischemic stroke. Proton magnetic resonance study[J]. Med Sci Monit, 2004, 10(Suppl 3): 88-93.

[19] KRIMER L S, GOLDMAN-RAKIC P S. Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide Arbor interneurons[J]. J Neurosci, 2001, 21(11): 3788-3796. DOI: 10.1523/jneurosci.21-11-03788.2001.

[20] COSTA J F, DINES M, LAMPRECHT R. The role of rac GTPase in dendritic spine morphogenesis and memory[J]. Front Synaptic Neurosci, 2020, 12: 12. DOI: 10.3389/fnsyn.2020.00012.

[21] MAS R, ZUO Y. Synaptic modifications in learning and memory—a dendritic spine story[J]. Semin Cell Dev Biol, 2021. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.05.015.

(收稿:2021-10-30;修回:2022-01-09)

(编辑 王 红)