DOI:10.16016/j.2097-0927.202212122

外侧下丘脑食欲素能神经元-内侧内嗅皮层神经环路对空间记忆的调控作用

廖翊翔[1],郑孜艺[1],程晓芳[1,2],文茹懿[1],夏建霞[1],任栓成[1,3],何 超[1],胡志安[1] 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,脑与智能研究院[1];050499 石家庄,联勤保障部队第九八〇医院神经内科[2];857000 西藏 日喀则,陆军第953医院急诊医学科[3]

[摘要] **目的** 探究外侧下丘脑(lateral hypothalamus,LH)食欲素(hypocretin,Hcrt)能神经元-内侧内嗅皮层(medial entorhinal cortex,MEC)神经环路对空间记忆的调控作用。**方法** 利用光纤记录技术,观察Hcrt能神经元在空间记忆中的活动模式。通过逆行神经示踪技术鉴定Hcrt能神经元与MEC浅层神经元的形态学联系特征。利用化学遗传学及光遗传学技术探究LH_{Hcrt}-MEC通路对空间记忆的影响。**结果** 光纤记录实验发现LH的Hcrt能神经元在空间记忆相关行为中高水平激活($P<0.01$)。逆行神经示踪实验发现Hcrt能神经元投射至空间记忆相关的MEC,LH投射至MEC的Hcrt能神经元在空间记忆中激活。化学遗传学抑制LH_{Hcrt}-MEC通路明显增加小鼠寻找食物正确空间位置的潜伏期($P<0.05$)及小鼠寻得食物过程累计错误次数($P<0.05$)。光遗传学激活LH_{Hcrt}-MEC通路显著降低小鼠早期寻找食物正确位置的潜伏期($P<0.05$)。**结论** Hcrt能神经元参与空间记忆,LH投射至MEC浅层的Hcrt能神经元在空间记忆中激活,化学遗传学抑制LH_{Hcrt}-MEC通路损害空间记忆;光遗传学激活LH_{Hcrt}-MEC通路增强空间记忆。

[关键词] 外侧下丘脑;食欲素;内侧内嗅皮层;空间记忆
[中图法分类号] R-332;R338.27;R338.64 [文献标志码] A

Regulatory role of lateral hypothalamus hypocretin neurons-medial entorhinal cortex neural circuit in spatial memory in mice

LIAO Yixiang[1], ZHENG Ziyi[1], CHENG Xiaofang[1,2], WEN Ruyi[1], XIA Jianxia[1], REN Shuancheng[1,3], HE Chao[1], HU Zhi'an[1] [1]Department of Physiology, Collaborative Innovation Center for Brain Science, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Neurology, No. 980 Hospital of PLA Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang, Hebei Province, 050499; [3]Department of Emergency, No. 953 Hospital of PLA Army, Shigatse, Tibet Autonomous Region, 857000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulatory effects of hypocretin (Hcrt) neurons in lateral hypothalamus (LH_{Hcrt})-medial entorhinal cortex (MEC) circuit on spatial memory. **Methods** The activity pattern of Hcrt neurons in spatial memory was recorded using *in vivo* fiber photometry. The morphological characteristics of connections between the Hcrt neurons and MEC neurons were identified with retrograde nerve tracer technique. Chemogenetics and optogenetics were subsequently adopted to confirm the effects of LH_{Hcrt}-MEC pathway on spatial memory. **Results** The optical fiber recording showed high levels of activation of Hcrt neurons during the spatial memory-related behaviors ($P<0.01$). The retrograde neural tracer test indicated that Hcrt neurons were projected to MEC which was associated with spatial memory, and those projected Hcrt neurons were confirmed being activated in spatial memory. Inhibition of the LH_{Hcrt}-MEC pathway by chemogenetics significantly prolonged the latency of mice to find the correct spatial location of food ($P<0.05$), and increased the number of errors in the process of finding food ($P<0.05$). However, photoactivation of the LH_{Hcrt}-MEC pathway by optogenetics remarkably reduced the latency of mice to find the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31970945);重庆市杰出青年科学基金项目(CSTB2022NSCQ-JQX2897)
[通信作者] 胡志安,E-mail:huzhian@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

food location at the initial training blocks ($P<0.05$). **Conclusion** Hcrt neurons are involved in spatial memory, and those Hcrt neurons projected from LH to the shallow layer of MEC are activated in spatial memory. Chemogenetic inhibition of the LH_{Hcrt}-MEC pathway impairs spatial memory, while optogenetic activation of this pathway enhances the function.

[**Key words**] lateral hypothalamus; hypocretins; medial entorhinal cortex; spatial memory

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31970945) and the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Chongqing (CSTB2022NSCQ-JQX2897). Corresponding author: HU Zhi'an, E-mail: huzhian@aliyun.com

空间记忆(spatial memory)是表征外界环境的记忆[1-2]。为了适应外界复杂环境变化,动物不断地产生、维持和更新空间记忆[3]。空间记忆作为大脑最基本且十分重要的高级功能之一,其依赖海马、内侧内嗅皮层(medial entorhinal cortex, MEC)神经环路[4-5]。MEC是海马的"门户",向海马输入信息的同时接受海马的信息输出。近来研究表明,MEC中有一群能主动编码空间信息并参与空间导航的神经元,如网格细胞、速度细胞、边界细胞等[6-7]。不仅如此,临床证据证实,MEC相关的功能障碍是空间导航能力缺陷的基础,可导致广泛的疾病症状[8-9]。

食欲素是下丘脑食欲素能神经元中特异性mRNA编码的两种神经肽[hypocretin 1(Hcrt1)和hypocretin 2(Hcrt2)][10-11]。Hcrt能神经元数量较少且局限分布于外侧下丘脑及下丘脑穹窿周区,其广泛投射于整个大脑,支配蓝斑、基底前脑、腹侧被盖核、中缝背核等脑区[12]。自1998年发现以来,下丘脑Hcrt能神经元已被证实参与包括觉醒、睡眠、奖赏、动机、摄食、恐惧和焦虑等多种神经生理功能[13-16]。近来有研究者发现,Hcrt能神经元通过增强海马突触可塑性从而调控记忆[17],敲除Hcrt能神经元可导致空间记忆障碍[18]。此外,有研究表明衰老小鼠Hcrt能神经元显著丢失以及空间记忆受损,补充Hcrt可改善相关症状[19-21]。然而,Hcrt能神经元在调控空间记忆方面的具体作用和潜在机制尚不清楚。

为此,本研究首先通过光纤记录的方法观察Hcrt能神经元在空间记忆中的活动模式,随后利用逆行神经示踪技术探索Hcrt能神经元与MEC神经通路具体形态学联系,最后采用化学遗传学和光遗传学的方法特异性操控LH_{Hcrt}-MEC神经通路,为食欲素能神经元调控空间记忆的作用机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J野生型小鼠购自陆军军医大学实验动物中心;Hcrt-Cre小鼠受赠于Luis de Lecea教授(精神病学和行为科学系,斯坦福大学,美国);vGlut2-cre小鼠购自Jackson实验室。本研究均使用SPF级健康成年雄性小鼠(8~12周龄,体质量18~25 g),饲养于12 h/12 h(光照/黑暗)环境中,环境温度控制在(24±1)℃,食水充足且小鼠可自由获得。以下有关动物的操作流程严格遵守陆军军医大学实验动物福利和伦理相关规定,并尽可能减少实验动物的痛苦,降低小鼠使用量。

1.1.2 主要试剂 AAV2/9-EF1α-DIO-GCaMP6f(上海和元),AAV2/9-EF1α-DIO-TVA-EGFP、AAV2/9-EF1α-DIO-RVG、RV-ENVA-ΔG-dsRed(武汉枢密),Red RetroBeads(美国Lumaflouor),AAV2/9-EF1α-DIO-mCherry、AAV2/9-EF1α-DIO-Hm4D-mCherry、AAV2/9-EF1α-DIO-ChR2-mCherry(武汉枢密),氯氮平N-氧化物(4936,CNO,美国Tocris),磷酸盐缓冲溶液(ZLI-9061,中国中杉金桥),4%多聚甲醛(158127,美国Sigma),蔗糖(中国生工),免疫染色封闭液(p0102,上海碧云天),免疫染色一抗稀释液(p0103,上海碧云天),大鼠多克隆抗c-fos抗体(226 017,1∶1 000,SYSY),兔多克隆抗Hcrt-A抗体(AB3704,1∶1 000,美国Millipore),驴抗兔405免疫荧光二抗(ab175651,1∶500,美国Abcam),驴抗大鼠488免疫荧光二抗(ab150153,1∶500,美国Abcam)。

1.2 方法

1.2.1 行为学实验 行为学实验中,小鼠采用系统随机法分配到不同的实验条件及测试顺序。行为学实验前对小鼠进行限食,控制其体质量为初始体质量的85%。放置4个直径为1.5 cm、高度为1 cm的圆形容器于50 cm × 50 cm旷场的4个方向,相邻容器以黑色和白色区分。布置不同图案于旷场环境的4个壁上。为排除新环境对小鼠行为学实验的干扰,实验前在4个容器中均放置食物,小鼠适应环境5 min,过程中可自由进食。正式训练过程中,食物仅放置于其中1个容器中,小鼠于旷场中自由探索,直至成功探索至食物所在的容器,此过程定义为一个trial。后续的每个trial间隔2 min,放置食物的容器每个trial中均在变化,而食物的位置保持固定不变。小鼠再次自由探索。如若探索5 min仍未探索至食物所在容器,帮助

小鼠寻至放置食物的容器。实验结束,用75%酒精擦拭环境,消除食物气味的干扰。小鼠寻到食物位置的潜伏期及其寻至食物位置前与错误位置容器接触的次数纳入其行为的评价标准。每只小鼠每天训练6个trial,连续4 d,共计24个trial。计算3个trial的均值为1个Block,以此进行分析。

1.2.2 光纤记录实验 光纤记录实验使用Hcrt-Cre小鼠,在同一批5只小鼠LH注射100 nL AAV2/9-EF1α-DIO-GCaMP6f。病毒感染21 d后,进行光纤埋置。术后恢复7 d,在空间探索任务过程中同步记录神经元钙信号活动的变化。神经元内钙离子浓度与神经元活动状态密切相关,因此可以通过探测神经元钙离子浓度反映神经元活动水平[22]。

脑立体定位注射操作流程参考实验室已发表的工作[23]。小鼠于通有浓度2.0%、流速0.8 mL/min的科研用异氟烷(瑞沃德,中国)的麻醉诱导盒中气体诱导麻醉5 min,固定小鼠头部于单臂数显脑立体定位仪(瑞沃德,中国),调整麻醉浓度为1.5%,流速不变,手术过程中根据小鼠术中生命体征调整浓度。将医用红霉素软膏厚涂于小鼠眼部,覆盖棉球保护,防止术中长时间强光照射致盲。完成小鼠头部备皮操作后,沿中线剪开小鼠头皮,暴露术野,范围为前后囟前后5 mm左右,用棉球蘸取3%的过氧化氢溶液擦拭颅表,清理结缔组织。以前囟点为坐标轴原点,于手术显微镜下调整双侧耳杆及鼻侧螺丝,保证小鼠前后囟及左右对称的位置位于同一水平。参照第2版Franklin & Paxinos小鼠脑图谱,确定LH(Bregma, AP=-1.58 mm;ML=±1.10 mm;DV=-4.85 mm)注射坐标并于定位处钻一直径约为0.5 mm骨窗,挑开硬脑膜。吸取100 nL AAV2/9-EF1α-DIO-GCaMP6f于尖端开口直径约为20 μm玻璃微电极(3-000-203-G/X, Drummond Scientific公司,美国)中,将玻璃微电极缓慢下降至对应位置并停留3 min后,以15 nL/min速度推注病毒,注射完成后留针8 min,待病毒扩散,脑组织回缩后,缓慢升起电极。消毒后缝合创口,取下小鼠,待其恢复清醒后,放回饲养笼。病毒感染21 d后,于LH埋置光纤,坐标不变。缓慢植入光纤,并于目标位置上方约0.5 mm处开始实时探测钙信号。植入深度为4.7~4.75 mm,当幅值稳定不再上升后,停止植入,于颅表用紫外固化牙科水泥固定光纤,待完全固定后,取下小鼠,待其恢复清醒后,放回饲养笼。术后恢复7 d,在空间探索任务过程中,同步记录钙信号,行为范式如上所述。为防止GCaMP漂白,光纤尖端激光强度为10~20 μW,使用光纤记录软件(Inperstudio Alpha 8.2, Inper, 中国),以40 Hz记录光纤钙信号。对采集数据进行基线矫正,滤波处理,噪声扣除后,用$\Delta F/F=(F-F_0)/F_0$的值来表征事件周围的钙信号变化。

1.2.3 逆行神经示踪实验 vGult2-Cre小鼠用于单突触逆行示踪实验。将100 nL(1∶1体积混合)的AAV2/9-EF1α-DIO-TVA-EGFP和AAV2/9-EF1α-DIO-RVG注射到小鼠的MEC浅层(from posterior fontanelle, AP=-0.2 mm;ML=±3.75 mm;DV=-1.95 mm)。病毒感染21 d后,于MEC浅层注射200 nL的RV-ENVA-ΔG-dsRed。术后恢复7 d,观察形态。以上实验流程在生物安全级别为2的条件下进行。C5BL/6J野生型小鼠用于逆行示踪实验。将500 nL red retrobeads注射到小鼠的MEC浅层。病毒感染5 d,于行为学训练后,取材观察形态。

1.2.4 灌注取材 将小鼠麻醉后,以30 mL、37 ℃的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)及30 mL、4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)进行心脏灌流后,将脑取出。脑组织置于4%PFA中后固定12 h,转移至30%蔗糖溶液中脱水。

1.2.5 脑片制备与免疫荧光染色 取出脱水完毕的脑组织,修块后用冰冻切片机(CM1900,美国Leica)于-20 ℃下连续切片,切片厚度为40 μm。收集含有LH或MEC的脑片,保存于PBS溶液中。为了研究red retrobeads及c-fos在Hcrt能神经元中的特异性表达,每只小鼠取相同层面的脑片,PBS漂洗10 min×3次,置于免疫染色封闭液中在37 ℃烘箱中封闭30 min。完成封闭后,将大鼠多克隆抗c-fos抗体及兔多克隆抗Hcrt-A抗体用免疫染色一抗稀释液按1∶1 000进行稀释。4 ℃过夜,第2天再次使用PBS漂洗10 min×3次,加入用PBS按1∶500进行稀释的驴抗大鼠488免疫荧光二抗及驴抗兔405免疫荧光二抗。室温下避光孵育2 h,孵育结束,再次使用PBS漂洗10 min×3次,进行封片。蔡司荧光显微镜用于拍摄目标脑区,高分辨图像拍摄于激光共聚焦显微镜Zeiss LSM800。将图像与第2版Franklin & Paxinos小鼠脑图谱进行拟合,以确定每个脑区的边界,用Image J软件分析c-fos阳性神经元数量。

1.2.6 化学遗传学实验 Hcrt-Cre小鼠用于化学遗传学实验。为了观察特异性抑制LH_{Hcrt}-MEC通路对空间记忆的影响,将同一批16只小鼠按完全随机化分为2组,分别在LH注射AAV2/9-EF1α-DIO-mCherry(对照组)及AAV2/9-EF1α-DIO-Hm4D-mCherry(实验组)。感染病毒21 d后,于双侧MEC浅层处置入给药导管。病毒注射及埋置过程同前所述。术后恢复7 d,进行行为学训练。任务模式同前,每天训练前15 min,用微量注射泵经给药导管于双侧MEC匀速给予500 nL CNO

(5 μmol/L,注射速度为 250 nL/min)。行为训练完成后,取材观察形态,只有病毒表达与导管埋置位置均准确的小鼠才纳入统计。该实验中,2 组小鼠共计排除 4 只。

1.2.7　光遗传学实验　　Hcrt-Cre 小鼠用于光遗传学实验。为了观察特异性激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路对空间记忆的影响,将同一批 14 只小鼠按完全随机化分为 2 组,分别在 LH 注射 AAV2/9-EF1α-DIO-mCherry(对照组)及 AAV2/9-EF1α-DIO-ChR2-mCherry(实验组)。感染病毒 21 d 后,于双侧 MEC 置入光纤。病毒注射及埋置过程同前所述。术后恢复 7 d,进行行为学训练。任务模式同前。进行空间探索训练时,通过光纤在双侧 MEC 给予 470 nm 蓝光(20 Hz、10 ms)持续光照。行为训练完成后,取材观察形态,只有病毒表达与光纤埋置位置均准确的小鼠才纳入统计。该实验中,2 组小鼠共计排除 2 只。

1.3　统计学分析

采用 SigmaPlot 12.5 统计软件进行分析。实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。正态性检验通过且方差齐,采用配对或非配对 t 检验、单因素方差分析;不满足正态分布则采用非参数检验。行为学训练数据使用重复测量双因素方差分析。当 $P<0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

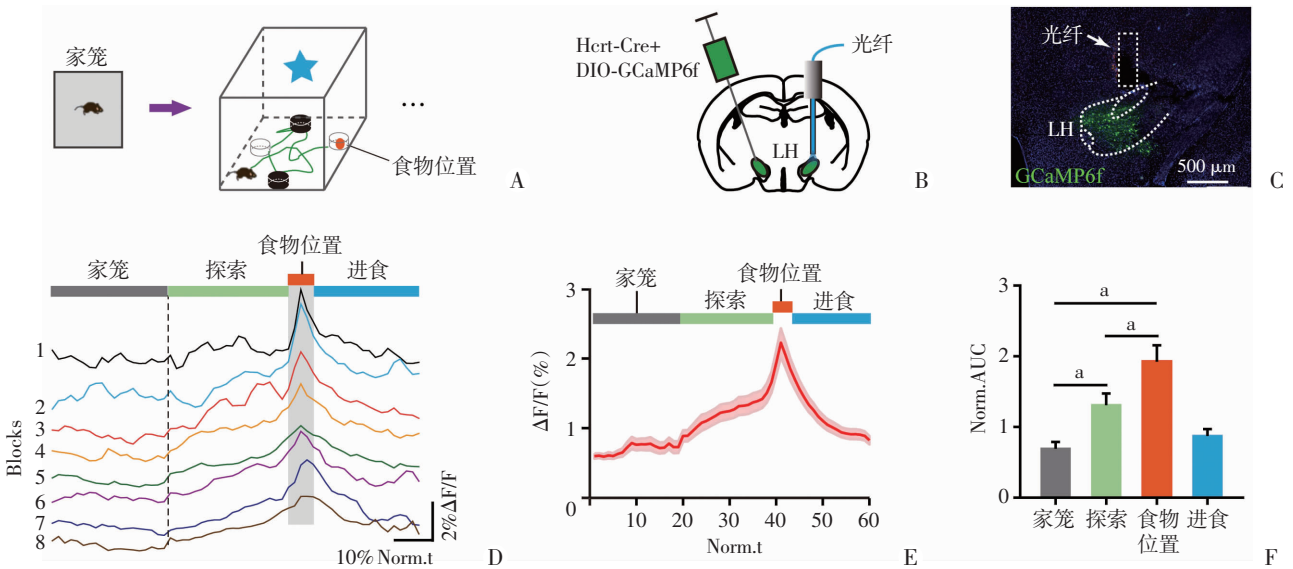
2　结果

2.1　Hcrt 能神经元在空间记忆相关行为中高水平激活

为了明确 Hcrt 能神经元在空间记忆中的作用,采用光纤记录钙信号的方法观察 Hcrt 能神经元在空间探索任务中的活动模式(图 1A~C)。通过行为学训练同步记录钙信号的方法,发现该群神经元在空间探索过程中明显活跃。当小鼠成功到达食物的位置时,Hcrt 能神经元的钙信号强度达到峰值,而当小鼠开始进食,其迅速下降至基线水平(图 1D~F)。在此期间,小鼠几乎处于静止状态,表明短暂的钙信号峰值几乎不可能是由运动引起。这提示 Hcrt 能神经元参与空间记忆。

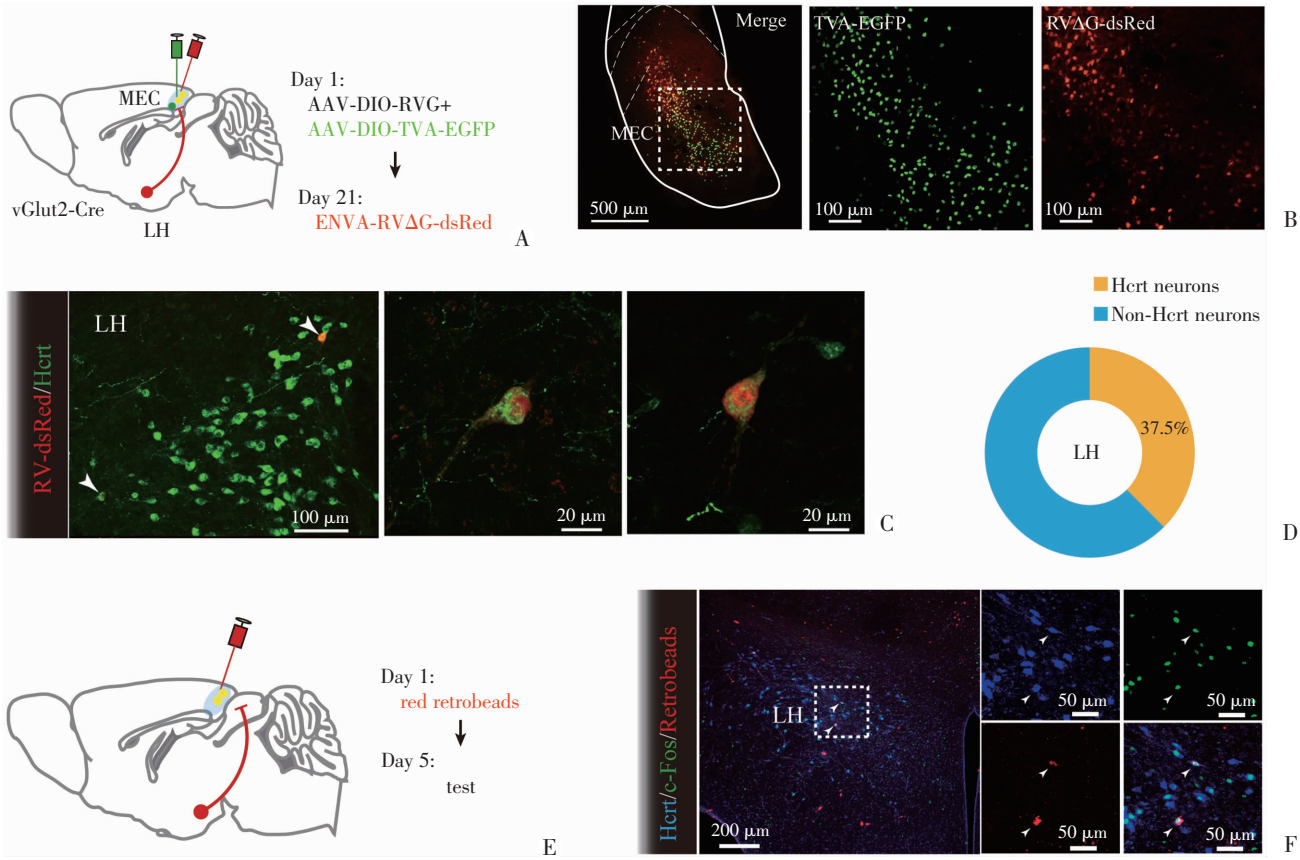
2.2　Hcrt 能神经元投射至空间记忆相关的 MEC

鉴于 MEC 在空间导航和空间记忆中具有关键作用,为进一步明确 LH 的 Hcrt 能神经元是否直接与 MEC 的神经元产生突触联系,利用基于 Cre 依赖的狂犬病毒的逆行病毒示踪技术在 vGult2-Cre 小鼠上进行测试(图 2A)。组织学证据显示,同时表达 EGFP 和 dsRed 的起始细胞集中分布在 MEC(图 2B)。免疫荧光染色结果显示,在 LH 内存在 dsRed 逆行标记的神经元(图 2C)。逆行标记的神经元中,37.5%表达 Hcrt(图 2D),提示 Hcrt 神经元与 MEC 中的神经元形成单突触联系。为进一步验证 Hcrt 能神经元在空间记忆中的作用是否依赖于其向 MEC 的投射,通过 red retrobeads 来标记投射至 MEC 的 Hcrt 能神经元(图 2E),并验证这些 Hcrt 能神经元内是否存在 c-fos 的表达。完成空间探索任务后,小鼠投射至 MEC 的 Hcrt 能神经元中发现 c-fos 表达(图 2F)。以上结果表明,LH 投射至 MEC 的 Hcrt 能神经元在空间记忆中激活。



A:空间探索任务示意图;B:DIO-GCaMP6f 病毒注射及光纤埋置示意图;C:注射位点病毒感染情况及光纤埋置位置典型图;D:光纤记录实验记录 LH 的 Hcrt 能神经元钙信号变化　每个 Block 为 3 个连续训练 trail 的均值,每个 Block 的时间尺度已被标准化;E:LH 的 Hcrt 能神经元钙信号分析($n=5$);F:均一化各个过程的曲线下面积的重复测量方差分析($n=5$)　a:$P<0.01$

图 1　Hcrt 能神经元在空间记忆相关行为中高水平激活



A:狂犬病毒介导逆向跨单突触示踪示意图;B:注射位点病毒表达情况　右图为左图中虚线框内放大视图;RVΔG:囊膜糖蛋白缺失的狂犬病毒;TVA:禽类肉瘤病毒受体 A;C:逆行神经示踪实验观察小鼠 LH 投射至 MEC 的 Hcrt 能神经元　右图为左图中白色箭头指示神经元放大视图;D:LH 中 RV-dsRed 标记神经元中 Hcrt 能神经元百分占比(黄色);E:red-retrobeads 注射示意图;F:LH-MEC 神经元 c-fos 表达　白色箭头示 red-retrobeads 标记 c-fos 阳性的 Hcrt 能神经元

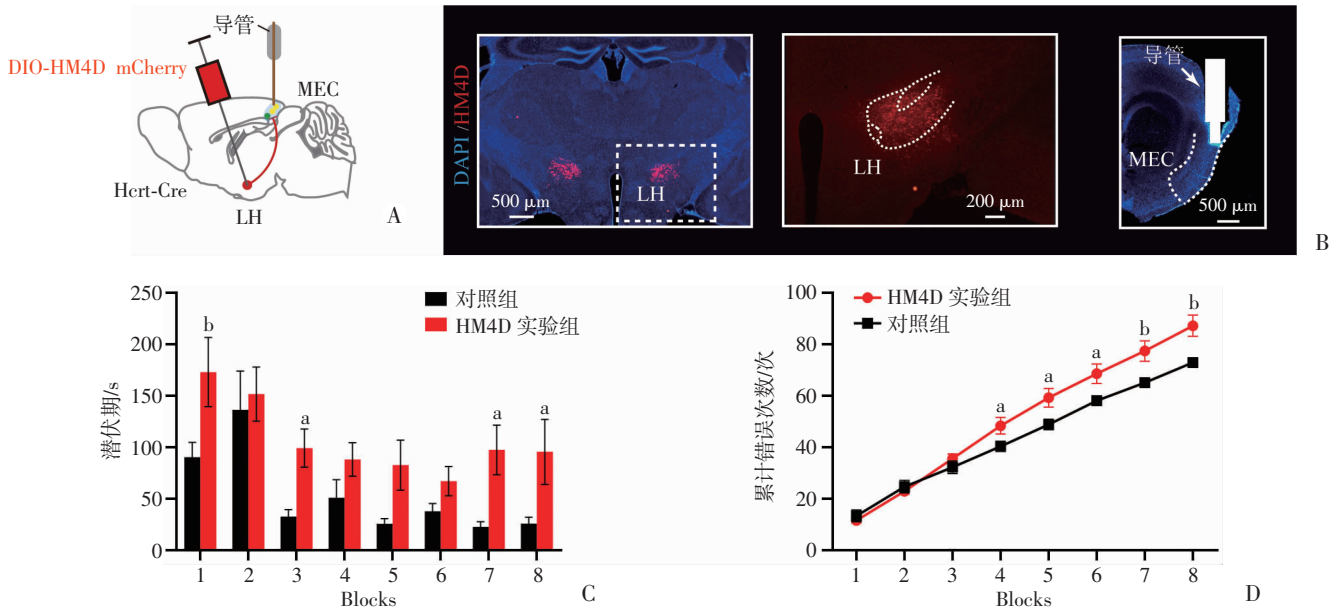
图 2　Hcrt 能神经元投射至空间记忆相关的 MEC

2.3　化学遗传学抑制 LH_{Hcrt}-MEC 通路损害空间记忆

由于前两部分实验表明 Hcrt 能神经元参与空间记忆且可投射至 MEC,有必要进一步探究在体情况下 LH_{Hcrt}-MEC 通路对 MEC 相关的空间记忆的调控。实验范式同前,Hcrt-Cre 小鼠 LH 注射 Cre 依赖的病毒 AAV2/9-EF1α-DIO-Hm4D-mCherry,3~4 周后在 MEC 浅层埋置给药导管(图 3A)。手术恢复 1 周后,在行为学训练前,通过局部注射 CNO 实现特异性抑制 MEC 浅层的 Hcrt 纤维。形态学证据表明导管植入位点在 MEC 上方且 Hm4D-表达神经元集中分布在 LH(图 3B)。特异性抑制 MEC 的 Hcrt 纤维后,小鼠花费更长的时间在空间探索的过程上,其找到空间环境中正确食物位置的潜伏期较对照组显著增加($P<0.01$,图 3C);同时,实验组小鼠在整个空间探索过程中触碰错误容器的次数存在增加的趋势($P<0.05$,图 3D)。结果表明化学遗传学抑制 LH_{Hcrt}-MEC 通路损害空间记忆。

2.4　光遗传学激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路增强空间记忆

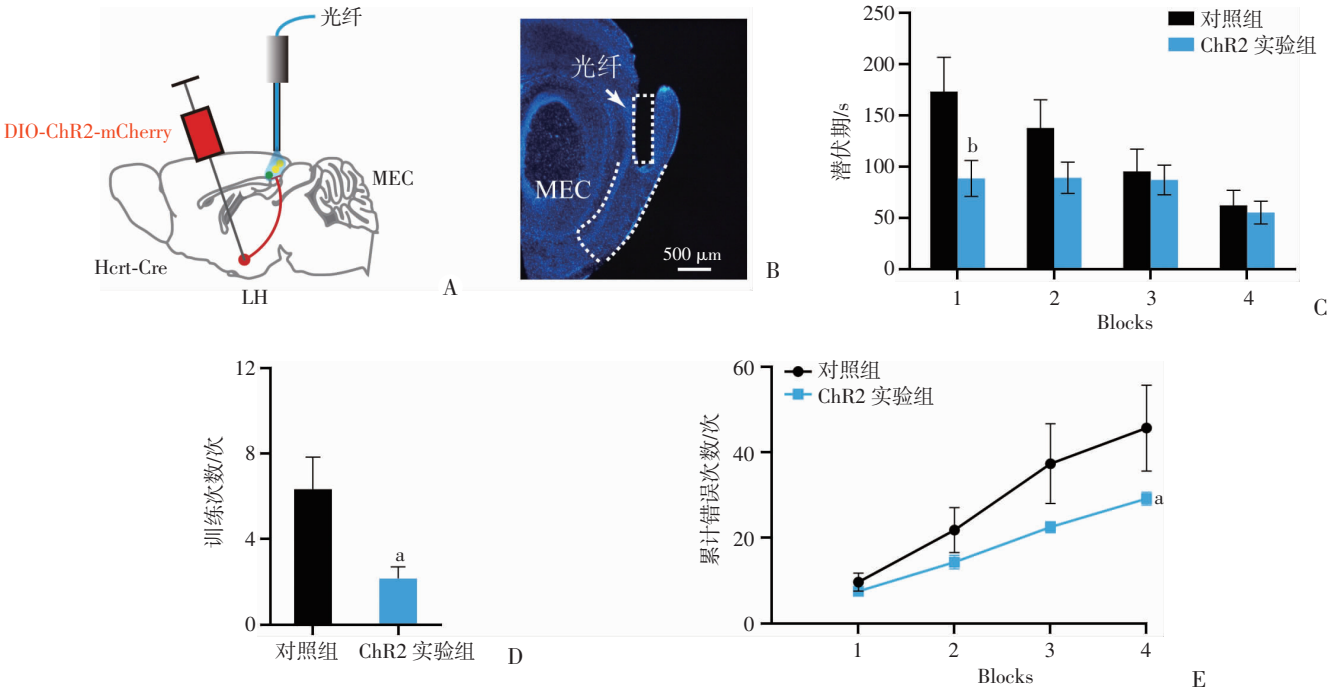
为了进一步说明 Hcrt 对 MEC 相关的空间记忆的重要性,利用相同的行为学范式,于 Hcrt-Cre 小鼠 LH 注射 Cre 依赖的病毒 AAV2/9-EF1α-DIO-ChR2-mCherry,3~4 周后在 MEC 浅层埋置光纤(图 4A)。通过形态学鉴定,光纤植入位点位于 MEC 上方(图 4B)。在空间探索任务中,持续以蓝光特异性激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路。发现光激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路显著减少了小鼠早期寻找食物正确位置的潜伏期($P<0.01$,图 4C),经过 4 个 Block 的训练,对照组小鼠的表现相对稳定,寻找食物正确位置的平均潜伏期约为 60 s,基于这些结果,量化达到潜伏期小于 60 s 所需的训练次数。进一步发现,光激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路减少了小鼠达到潜伏期小于 60 s 标准所需的训练次数($P<0.05$,图 4D)。此外,实验组小鼠在整个空间探索过程中表现出更少的触碰错误容器次数的趋势($P<0.05$,图 4E)。结果表明 LH_{Hcrt}-MEC 通路对空间记忆十分重要。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:DIO-Hm4D-mCherry 病毒注射示意图;B:注射位点病毒表达情况(左),中图为左图虚线框内放大视图,右图示导管埋置位置;C:化学遗传学抑制 LH_{Hcrt}-MEC 通路后,小鼠寻到食物位置的潜伏期($n=6$);D: 抑制 LH_{Hcrt}-MEC 通路后,小鼠寻到食物位置过程累计错误次数($n=6$)

图 3 化学遗传学抑制 LH_{Hcrt}-MEC 通路损害空间记忆



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:DIO-ChR2-mCherry 病毒注射示意图;B:光纤埋置位置典型图;C:光遗传学激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路后,小鼠寻到食物位置的潜伏期($n=6$);D: 激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路后,小鼠达到行为测试标准所需训练次数($n=6$);E:激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路后,小鼠寻找食物位置过程累计错误次数($n=6$)

图 4 光遗传学激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路强化空间记忆获得

3 讨论

大脑的记忆系统是由多个脑区(前额叶皮层、海马、内嗅皮层等)复杂联系、相互作用而形成。空间记忆有助于生物体适应外界环境变化,研究揭示内嗅皮层在空间记忆过程中的重要作用,损毁内嗅皮层,动物在水迷宫任务中寻找平台的潜伏期明显延长[24]。HUNSAKER 等[25]的研究详细解释了外侧内嗅皮层和内侧内嗅皮层的功能差异,其中空间记忆主要依赖内侧内嗅皮层。Hcrt 能神经元参与多种神经功能,近年来,Hcrt 能神经元对认知的影响得到了许多研究者的重视[26]。值得注意的是,临床观察和动物实验均表明,Hcrt 能神经元缺失导致的发作性睡眠患者或啮齿动物在学习和记忆方面表现出明显的损伤,这表明 Hcrt 能神经元参与了学习记忆的控制[27-29]。尽管如此,目前很少有研究关注 Hcrt 能神经元对空间记忆的影响及潜在机制。

本研究构建了一种检验 MEC 相关空间记忆的行为范式。为了迅速获得食物,小鼠必须记忆食物位置相关的特定空间标识,而忽略不同容器带来的影响。既往 MILEYKOVSKIY 等[30]对 Hcrt 能神经元活动的记录表明,Hcrt 能神经元在觉醒阶段最大限度地激活,尤其是动物从事诸如进食和探索行为等自愿行为。本研究发现,在空间探索任务中,小鼠 Hcrt 能神经元钙活动增加,与 MILEYKOVSKIY 等[30]的发现相似,不同的是,本研究在空间探索食物的基础上引入了空间位置相关记忆。小鼠 LH 的 Hcrt 能神经元在空间探索任务中激活,在寻找到食物位置时钙信号达到峰值。更有趣的是,当小鼠开始进食,其 Hcrt 能神经元钙信号迅速下降。排除运动带来的影响,这提示 Hcrt 能神经元可能参与空间记忆。PEYRON 等[31]的研究表明,Hcrt 能神经元向整个大脑发出投射,目前的研究主要集中在 Hcrt 的几个主要靶点,如蓝斑、腹侧被盖核、中缝背核、结节乳头核和基底前脑等。这种分布表明 Hcrt 能神经元在觉醒和睡眠调节中的作用。利用逆行神经示踪技术,我们从形态学上证实了 LH 与负责空间记忆的 MEC 存在突触联系,LH 投射至 MEC 的 Hcrt 能神经元在空间记忆过程中激活,这提示 LH 的 Hcrt 能神经元存在向空间记忆相关的 MEC 的投射且 LH_{Hcrt}-MEC 通路可能参与空间记忆。众所周知,记忆分为许多不同的类型,由不同的脑区如海马 CA1、海马 CA2、前额叶皮层、外侧内嗅皮层、内侧内嗅皮层等分工协调。内侧内嗅皮层主要负责空间记忆,本研究主要关注 Hcrt 能神经元对空间记忆及内侧内嗅皮层的调控作用,但是在后续实验中还需更进一步探究此通路是否对其他类型的记忆存在调控作用。

已有大量的研究结果表明,记忆的编码、存储和提取阶段均发生在觉醒期间,良好的空间记忆需要完整的觉醒系统支持,促觉醒系统在支持空间记忆中具有不可替代的作用[32]。例如,胆碱能和单胺能系统直接支配 MEC 和其他与空间记忆相关的大脑区域,形成神经回路,通过调节记忆印记神经元兴奋性[33-34]和突触可塑性[35]在空间记忆中发挥支持作用。Hcrt 能神经元特殊的投射模式提示,其在觉醒调控以及觉醒期间多种生理功能的关键作用[36]。阻断 Hcrt 受体或敲除 Hcrt 基因导致空间记忆受损[18];相反,补充 Hcrt 可改善空间记忆缺陷动物模型的记忆障碍。本研究结果表明光遗传学激活 LH_{Hcrt}-MEC 通路增强正常生理情况下的空间记忆,已有相关研究证实 MEC 处理空间记忆依赖其内部微环路,表现为 θ 振荡及 γ 振荡协调整合,本课题组其他研究发现 Hcrt 能神经元可以通过易化 MEC 内部的 γ 振荡提高 MEC 处理空间信息的能力,提示适度的增强觉醒水平有助于提高空间记忆能力以应对周围环境变化。值得注意的是,本工作仍存在一定的局限性。Hcrt 能神经元作为一个典型的促觉醒系统,其在空间记忆发挥支持作用,机制上同其他促觉醒系统有无异同,各个促觉醒系统对空间记忆的支持作用是否存在相互联系,Hcrt 对记忆的作用是否可以完善觉醒系统支持记忆的具体框架,这需要我们进一步的研究。

综上所述,本研究结果表明,LH 的 Hcrt 能神经元在空间记忆中激活,并通过 LH_{Hcrt}-MEC 神经通路影响空间记忆。研究结果为后续解析 Hcrt 能神经元调控空间记忆机制研究提供了新的环路方向。

参考文献:

[1] BUZSÁKI G, LLINÁS R. Space and time in the brain[J]. Science, 2017, 358(6362): 482-485. DOI: 10.1126/science.aan8869.

[2] BURGESS N. Spatial memory: how egocentric and allocentric combine[J]. Trends Cogn Sci, 2006, 10(12): 551-557. DOI: 10.1016/j.tics.2006.10.005.

[3] EGNOR S E R. Spatial memory: Mice quickly learn a safe haven[J]. Curr Biol, 2017, 27(10): R388-R390. DOI: 10.1016/j.cub.2017.04.007.

[4] BROADBENT N J, SQUIRE L R, CLARK R E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(40): 14515-14520. DOI: 10.1073/pnas.0406344101.

[5] BRUN V H, OTNASS M K, MOLDEN S, *et al*. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry[J]. Science, 2002, 296(5576): 2243-2246. DOI: 10.1126/science.1071089.

[6] TUKKER J J, BEED P, BRECHT M, *et al*. Microcircuits for spatial coding in the medial entorhinal cortex[J]. Physiol Rev, 2022, 102(2): 653-688. DOI: 10.1152/physrev.00042.2020.

[7] OBENHAUS H A, ZONG W, JACOBSEN R I, *et al*. Functional network topography of the medial entorhinal cortex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(7): e2121655119. DOI: 10.1073/pnas.2121655119.

[8] ARMSTRONG C, WANG J, YEUN LEE S, *et al*. Target-selectivity of parvalbumin-positive interneurons in layer Ⅱ of medial entorhinal cortex in normal and epileptic animals[J]. Hippocampus, 2016, 26(6): 779-793. DOI: 10.1002/hipo.22559.

[9] YUN S, REYNOLDS R P, PETROF I, *et al*. Stimulation of entorhinal cortex-dentate gyrus circuitry is antidepressive[J]. Nat med, 2018, 24(5): 658-666. DOI: 10.1038/s41591-018-0002-1.

[10] SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, *et al*. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior[J]. Cell, 1998, 92(4): 573-585. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80949-6.

[11] DE LECEA L, KILDUFF T S, PEYRON C, *et al*. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(1): 322-327. DOI: 10.1073/pnas.95.1.322.

[12] JACOBSON L H, HOYER D, DE LECEA L. Hypocretins (orexins): The ultimate translational neuropeptides[J]. J Intern Med, 2022, 291(5): 533-556. DOI: 10.1111/joim.13406.

[13] LI S B, JONES J R, DE LECEA L. Hypocretins, neural systems, physiology, and psychiatric disorders[J]. Curr Psychiatry Rep, 2016, 18(1): 7. DOI: 10.1007/s11920-015-0639-0.

[14] FENG H, WEN S Y, QIAO Q C, *et al*. Orexin signaling modulates synchronized excitation in the sublaterodorsal tegmental nucleus to stabilize REM sleep[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3661. DOI: 10.1038/s41467-020-17401-3.

[15] FLANIGAN M E, ALEYASIN H, LI L, *et al*. Orexin signaling in GABAergic lateral habenula neurons modulates aggressive behavior in male mice[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(5): 638-650. DOI: 10.1038/s41593-020-0617-7.

[16] HIRANO A, HSU P K, ZHANG L, *et al*. DEC2 modulates orexin expression and regulates sleep[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(13): 3434-3439. DOI: 10.1073/pnas.1801693115.

[17] YANG L, ZOU B, XIONG X, *et al*. Hypocretin/orexin neurons contribute to hippocampus-dependent social memory and synaptic plasticity in mice[J]. J Neurosci, 2013, 33(12): 5275-3284. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3200-12.2013.

[18] DANG R, CHEN Q, SONG J, *et al*. Orexin knockout mice exhibit impaired spatial working memory[J]. Neurosci Lett, 2018, 668: 92-97. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.01.013.

[19] JAEGER L B, FARR S A, BANKS W A, *et al*. Effects of orexin-A on memory processing[J]. Peptides, 2002, 23(9): 1683-1688. DOI: 10.1016/s0196-9781(02)00110-9.

[20] LI S B, DAMONTE V M, CHEN C, *et al*. Hyperexcitable arousal circuits drive sleep instability during aging[J]. Science, 2022, 375(6583): eabh3021. DOI: 10.1126/science.abh3021

[21] HOU Z, YANG X, LI Y, *et al*. Electroacupuncture enhances neuroplasticity by regulating the orexin A-mediated cAMP/PKA/CREB signaling pathway in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8694462. DOI: 10.1155/2022/8694462

[22] VENDRELL M, CURRAN T, MORGAN J I. A gene expression approach to mapping the functional maturation of the hippocampus[J]. Mol brain Res, 1998, 63(1): 25-34. DOI: 10.1016/s0169-328x(98)00248-4.

[23] REN S, WANG Y, YUE F, *et al*. The paraventricular thalamus is a critical thalamic area for wakefulness[J]. Science, 2018, 362(6413): 429-434. DOI: 10.1126/science.aat2512.

[24] VAN CAUTER T, CAMON J, ALVERNHE A, *et al*. Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition[J]. Cereb Cortex, 2013, 23(2): 451-459. DOI: 10.1093/cercor/bhs033.

[25] HUNSAKER M R, CHEN V, TRAN G T, *et al*. The medial and lateral entorhinal cortex both contribute to contextual and item recognition memory: a test of the binding of items and context model[J]. Hippocampus, 2013, 23(5): 380-391.

DOI: 10.1002/hipo.22097.

[26] CHEN Q, DE LECEA L, HU Z, *et al*. The hypocretin/orexin system: an increasingly important role in neuropsychiatry[J]. Med Res Rev, 2015, 35(1): 152-197. DOI: 10.1002/med.21326.

[27] MAHONEY C E, COGSWELL A, KORALNIK I J, *et al*. The neurobiological basis of narcolepsy[J]. Nat Rev Neurosci, 2019, 20(2): 83-93. DOI: 10.1038/s41583-018-0097-x.

[28] NEPOVIMOVA E, JANOCKOVA J, MISIK J, *et al*. Orexin supplementation in narcolepsy treatment: A review[J]. Med Res Rev, 2019, 39(3): 961-975. DOI: 10.1002/med.21550.

[29] SCAMMELL T E. Narcolepsy[J]. N Engl J Med, 2015, 373(27): 2654-2662. DOI: 10.1056/NEJMra1500587.

[30] MILEYKOVSKIY B Y, KIYASHCHENKO L I, SIEGEL J M. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons[J]. Neuron, 2005, 46(5): 787-798. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.035.

[31] 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. DOI: 10.1523/jneurosci.18-23-09996.1998.

[32] 胡志安,夏建霞.觉醒系统的活动对学习记忆的影响[J].第三军医大学学报,2011,33(11):1091-1094.
HU Z A, XIA J X. Influence of activities in arousal system on learning and memory[J]. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(11):1091-1094.

[33] HE C, LUO F, CHEN X, *et al*. Superficial layer-specific histaminergic modulation of medial entorhinal cortex required for spatial learning[J]. Cereb Cortex, 2016, 26(4): 1590-1608. DOI: 10.1093/cercor/bhu322.

[34] CHOWDHURY A, LUCHETTI A, FERNANDES G, *et al*. A locus coeruleus-dorsal CA1 dopaminergic circuit modulates memory linking[J]. Neuron, 2022, 110(20): 3374-3388.e8. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.08.001.

[35] TAKEUCHI T, DUSZKIEWICZ A J, SONNEBORN A, *et al*. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory[J]. Nature, 2016, 537(7620): 357-362. DOI: 10.1038/nature19325.

[36] SCAMMELL T E, ARRIGONI E, LIPTON J O. Neural circuitry of wakefulness and sleep[J]. Neuron, 2017, 93(4): 747-765. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.01.014.

(**收稿**:2022-12-20;**修回**:2023-01-15)

(编辑 吴培红)