

丰富环境干预对小鼠梨状皮层锥体神经元兴奋性的影响

陈昌锋¹, 陈磊¹, 江勤¹, 尹艳艳^{1,2}

摘要 目的 探讨丰富环境干预下的小鼠梨状皮层锥体神经元兴奋性的变化特点。方法 选用15日龄的C57BL/6小鼠30只,随机分为丰富环境组(EE组)15只和常规环境组(SE组)15只,EE组采用丰富环境刺激饲养3周,SE组则在正常实验室环境下饲养3周。全细胞电流钳模式下记录小鼠梨状皮层锥体神经元的各电生理指标,锥体神经元的兴奋性指标包括动作电位间距(ISI)、能障($V_{ts}-V_r$)和绝对不应期(ARP)。结果 与常规环境组比较,丰富环境干预下的小鼠梨状皮层神经元的ISI减小($P < 0.05$), $V_{ts}-V_r$ 降低($P < 0.05$),ARP缩短($P < 0.05$)。结论 丰富环境干预可提高梨状皮层锥体神经元的兴奋性,提示丰富环境可能有助于梨状皮层锥体神经元的发育成熟。

关键词 丰富环境;梨状皮层;锥体神经元;膜片钳

中图分类号 R 338.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)06-0898-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.015

丰富环境(enriched environment, EE)是多种外环境有益刺激和多信息交流的综合体,与常规环境(standard environment, SE)相比,前者拥有更为宽大的活动场所和多样的生活场景,以提供丰富的各类有益刺激,同类动物数量的增加可提供更多的动物之间的信息交流。丰富环境作为一种经典的实验干预方法,主要研究复杂多样的外环境刺激对神经元发育的影响以及对疾病的治疗效果等,已有研究^[1]提示丰富环境对老年痴呆、脑卒中和自闭症等动物模型具有一定的治疗效果。丰富环境所产生的良性应激刺激对哺乳类动物大脑的结构和功能有重要影响,外环境的复杂感觉刺激对脑内神经元的生长和发育也至关重要。

小鼠等多数啮齿类动物属夜行动物,主要通过嗅觉和触觉探索周围环境,嗅觉功能在小鼠的整个

生命活动中显得尤为重要,梨状皮层是小鼠嗅觉的脑部投射区,小鼠生长发育过程中各种外环境刺激对小鼠梨状皮层的生长和发育都有着重要作用。以往的研究^[2-3]主要集中在丰富环境对视皮层和听觉皮层的影响,梨状皮层作为啮齿类动物重要的感觉皮层却鲜有报道,同时锥体神经元是哺乳类动物大脑皮层重要的兴奋性神经元,其电生理特性的变化对梨状皮层的功能可能产生重要影响。该实验运用离体脑片电生理的实验方法,通过全细胞模式记录锥体神经元电生理指标,以期阐明丰富环境干预下,小鼠梨状皮层锥体神经元兴奋性的变化特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验选用出生后15 d的C57BL/6小鼠30只,雌雄不限,体重(8.0 ± 5) g,随机分成两组:丰富环境组(EE组)和常规环境组(SE组)各15只。

1.1.2 药品与试剂 NaH_2PO_4 购自天津大茂化学试剂厂; dextrose 购自国药集团化学试剂有限公司; MgSO_4 、HEPES 和 Tris-GTP 均购自美国 Sigma 公司; 切脑液(mmol/L): NaH_2PO_4 1.2、HEPES 5、 CaCl_2 0.5、NaCl 124、 MgSO_4 5、KCl 3、 NaHCO_3 26 和 dextrose 10, pH 7.4; 人工脑脊液(灌流液, mmol/L): NaH_2PO_4 1.25、 CaCl_2 2、 NaHCO_3 26、 MgSO_4 2、NaCl 126、dextrose 25、KCl 2.5 和 HEPES 5, pH 7.4; 全细胞记录电极内液(mmol/L): 葡萄糖酸钾 155、EGTA 0.5、 Mg-ATP 4、NaCl 4、HEPES 10 和 Tris-GTP 1, pH 7.35。

1.1.3 器材 Axoclamp-200B 放大器(美国 Axon 公司); 震荡切片仪(德国 Leica 公司), Sutter P-97 电极拉制仪和玻璃微电极(美国 SUTTER 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 不同饲养范式的干预方法 EE组小鼠在丰富环境箱中饲养,丰富环境饲养箱的规格是 $70 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$,内部包含管道、小屋、木质玩物以及小鼠筑巢的一些材料如棉花等,除常规垫料外,额外添加一些碎纸、卷纸以及布块等其他一些不同触

2018-03-12 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH186)

作者单位: 安徽医科大学¹ 机能实验中心、² 药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈昌锋,男,助理实验师;

尹艳艳,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yinyan-yan5678@126.com

感的材料。每天固定时间调整饲养箱内各物体的位置一次,每天更换垫料一次,每个箱内饲养小鼠10只。SE组小鼠按照实验室标准饲养环境进行喂养,普通饲养箱,箱内无其他物品,常规垫料,每个箱内饲养4只小鼠。动物房内保持正常的昼夜节律,温度适宜,无杂音干扰。所有小鼠给予充足的水和食物。

1.2.2 脑片的制备方法 不同饲养范式干预结束后,取小鼠麻醉,断头取脑,剪开头部皮肤,暴露颅骨,将颅骨沿中间剪开,左右分开颅骨,使脑组织充分暴露,用挖脑勺迅速将小鼠脑组织取出置于冰水混合的切脑液中,切脑液应预先通氧($95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$)。将取下的脑组织稍作修整,用胶水将小鼠脑固定在振荡切片机的平台上,切片机的槽内应预先放入切脑液的冰水混合物,进行冠状切片,切片厚度为 $350 \sim 450 \mu\text{m}$,切好的脑片放入充分氧合的人工脑脊液中, 25°C 条件下持续通氧孵育1 h。

1.2.3 细胞电生理实验方法 孵育结束后将脑片置于显微镜平台的浴槽内,辅以U形盖网固定,人工脑脊液持续通氧灌流。根据小鼠脑图谱提示的皮层位置关系,在显微镜下找到梨状皮层区。根据锥体神经元的形态呈现锥形这一特点,且与其他神经元相比锥体神经元的顶树突比较容易观察到,同时结合记录到的神经元动作电位发放规律来确定锥体神经元。玻璃电极内充灌电极内液,手指轻弹排空气泡,入液前给予一定正压,以防灌流液中杂质堵塞玻璃电极尖端,利用显微操作系统将玻璃电极尖端贴住神经元,释放正压的同时给予负压吸引,待形成兆欧封接后,用嘴给予负压破膜,利用Axonclamp-200B放大器,在电流钳模式下对梨状皮层锥体神经元进行全细胞纪录,玻璃微电极的入液电阻是 $5 \sim 7 \text{M}\Omega$ 。实验数据选用的标准是锥体神经元的静息电位负值超过 -60mV 且动作电位的振幅超过 90mV 。

1.3 统计学处理 实验运用Clampex 10.0对电生理数据进行采集,采用Clampfit 10.0和SigmaPlot 10.0软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用单因素方差分析和独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 锥体神经元动作电位间距(inter-spike intervals, ISI)的变化 在全细胞记录模式下,通过电极给予细胞一段去极化脉冲刺激,调整该刺激脉冲大

小,使其达细胞阈刺激,诱发细胞产生动作电位,动作间距即为阈刺激下相邻动作电位峰值之间的时间间隔,其值的大小表示细胞将兴奋性信号输入转换为编码动作电位的能力的大小。EE组记录的数值分别是 $\text{ISI}_{1-2} \sim \text{ISI}_{4-5} (\text{ms})$: (14.28 ± 1.1)、(22.34 ± 2.3)、(28.2 ± 1.73)和(31.83 ± 1.82),SE组的数值分别是 $\text{ISI}_{1-2} \sim \text{ISI}_{4-5} (\text{ms})$: (18.3 ± 1.33)、(28.52 ± 2.67)、(33.83 ± 2.43)和(38.23 ± 2.31) (图1A、B和C)。EE组的动作电位间距与SE组相比均减小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 锥体神经元能障(energybarrier, $V_{\text{ts}}-V_{\text{r}}$)的变化 细胞的兴奋性受阈电位和静息电位的影响。如图1A所示,阈电位(threshold potentials, V_{ts})是动作电位的起始点,其与静息电位(resting potentials, V_{r})之间的差值($V_{\text{ts}}-V_{\text{r}}$)记为神经元的能障,其含义表示神经元受到兴奋性刺激越过能级障碍产生动作电位的能力。EE组各能障值分别是 $V_{\text{ts}}-V_{\text{r}_1} \sim V_{\text{ts}}-V_{\text{r}_5} (\text{mV})$: (26.52 ± 1.34)、(31.34 ± 1.54)、(32.51 ± 1.2)、(31.73 ± 1.76)和(33.53 ± 1.62),SE组各能障值分别是 $V_{\text{ts}}-V_{\text{r}_1} \sim V_{\text{ts}}-V_{\text{r}_5} (\text{mV})$: (30.93 ± 1.15)、(36.92 ± 1.98)、(37.3 ± 2.16)、(38.81 ± 1.21)和(38.34 ± 1.33) (图1A、B和D)。EE组与SE组相比能障均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 锥体神经元绝对不应期(absolute refractory periods, ARP)的测定 实验通过软件Clampex 10.0连续向神经元输入2个相同的去极化脉冲刺激,通过调整这两个脉冲刺激之间的间隔时间,使第2个脉冲刺激诱导神经元产生动作电位的几率正好是50%,此时产生第2个动作电位的时间点即为第1个动作电位绝对不应期的临界点,定义此时2个脉冲刺激的时间间隔为绝对不应期,其值的大小表示细胞的兴奋程度。图2A显示的是EE组与SE组锥体神经元的ARP的轨迹图,由图2B得知EE组的ARP要小于SE组,EE组ARP数值是: (3.682 ± 0.583) ms,SE组数值是: (4.45 ± 0.862) ms,两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

丰富环境除了包含了新奇多样的饲养元素,同时为了模拟同类的社交活动在同一环境中还增加了共同饲养的动物数目。丰富环境中所布置的物品会定期进行位置重设和更新,以增加环境新奇性,激发小鼠的探索行为,模拟小鼠的自然生活习性。已有

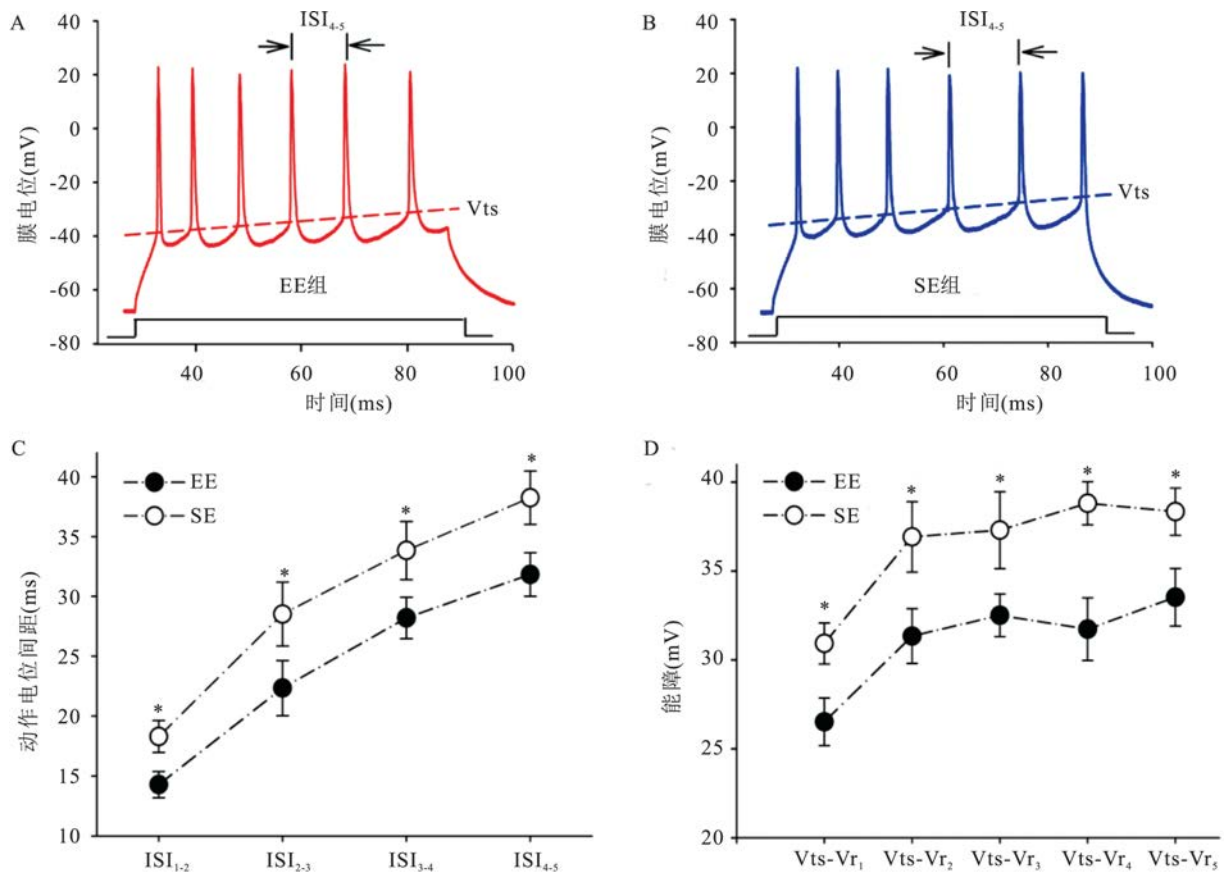


图1 不同饲养环境对小鼠梨状皮层锥体神经元 ISI 和 Vts-Vr 的影响

A: 全细胞模式下记录的 EE 组 ISI 的轨迹图; B: 全细胞模式下记录的 SE 组 ISI 的轨迹图; C: ISI 的统计图; D: Vts-Vr 的统计图; 与 SE 组相比较: * $P < 0.05$

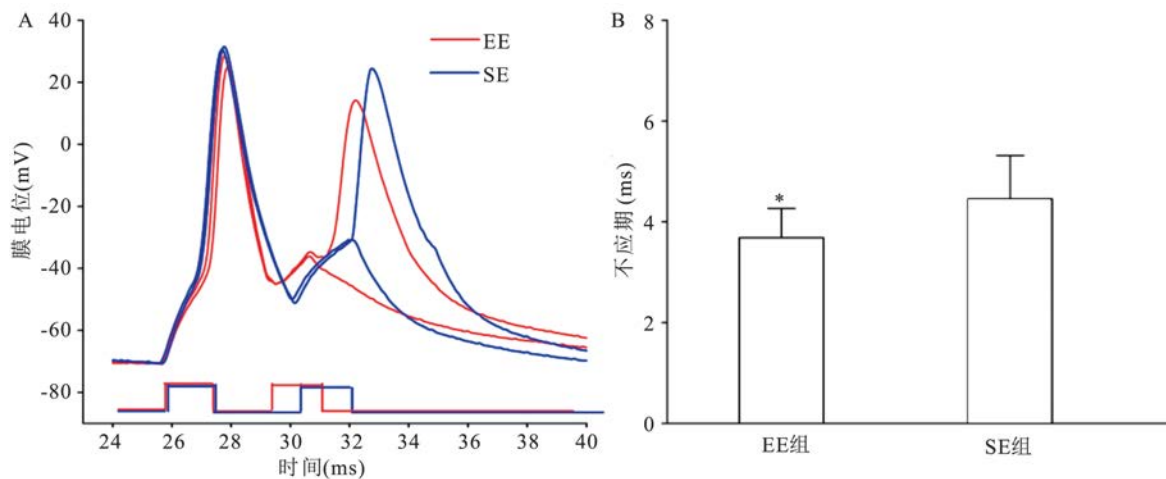


图2 不同饲养环境对小鼠梨状皮层锥体神经元 ARP 的影响

A: 全细胞模式下记录的 EE 组和 SE 组 ARP 的轨迹图; B: ARP 的统计图; 与 SE 组比较: * $P < 0.05$

的研究^[4-5]显示,丰富环境可促进海马齿状回神经元前体细胞的存活,并增加海马区神经元的数量。早期的丰富环境干预还可增加海马区 GABA 能神经元的传递效率,促进突触的发育成熟。近来的研

究^[6]还表明,丰富环境可以促进视觉系统的发育,可见丰富环境刺激在神经回路的形成和功能中起着至关重要的作用。本实验则研究嗅觉系统在早期丰富环境干预下的发育特点。

小鼠嗅觉系统可对来自外环境的上万种不同气味进行识别,这种识别过程主要由分布于嗅黏膜上的气味受体、嗅小球和梨状皮层共同完成。嗅小球将不同的气味信号处理后,传递到更高级的梨状皮层。实验选取了能障、动作电位间距和绝对不应期作为评价梨状皮层锥体神经元内在特性的指标^[7-9]。实验中,丰富环境对小鼠梨状皮层锥体神经元电生理特性的影响主要表现在,丰富环境可使锥体神经元的 $V_{ts}-V_r$ 降低、ISI 减小和 ARP 的缩短。 $V_{ts}-V_r$ 降低表明锥体神经元在受到去极化刺激后由静息状态到形成动作电位的能力增加,对兴奋性刺激更加敏感。在受到相同去极化刺激下,丰富环境组锥体神经元更容易爆发出动作电位。ISI 体现的是在神经元输入一段兴奋性刺激后所爆发出的动作电位的密度,ISI 减小表明相同的刺激输入能诱导出更多的动作电位,即动作电位的发放频率增加。ARP 的缩短提示神经元在特定的刺激时间内爆发的动作电位数量增加,即动作电位的发放容量增加,这与 ISI 的减小是相符的,进一步证明了丰富环境组小鼠梨状皮层锥体神经元兴奋性提高。

本实验研究主要集中在锥体神经元的电生理特性的改变,从神经元的角度揭示了丰富环境对梨状皮层的影响,可提高锥体神经元的兴奋性。以往的研究^[10]显示丰富环境刺激对小鼠大脑的影响可能是多方面的,其中还包括神经元的树突棘密度及突触形态的改变,甚至一些突触相关蛋白的表达都可能受到影响。本实验选取了小鼠大脑发育的关键时期进行差别化的干预饲养,但前人的研究^[11]提示丰富环境对小鼠大脑不同时期可能同样存在影响,这些还有待于后续的进一步研究。

参考文献

[1] Li G, Gan Y, Fan Y, et al. Enriched environment inhibits mouse

- pancreatic cancer growth and down-regulates the expression of mitochondria-related genes in cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7856.
- [2] Shakhawat A M, Gheidi A, Hou Q, et al. Visualizing the engram: learning stabilizes odor representations in the olfactory network [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(46): 15394–401.
- [3] Zheng J, Ding W, Li B, et al. Enriched environment promotes remyelination and motor function recovery through modulation of HDAC1/2 in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 655: 121–30.
- [4] Bian W J, Miao W Y, He S J, et al. Coordinated spine pruning and maturation mediated by Inter-Spine competition for Cadherin/Catenin complexes [J]. *Cell*, 2015, 162(4): 808–22.
- [5] He S, Ma J, Liu N, et al. Early enriched environment promotes neonatal GABAergic neurotransmission and accelerates maturation [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(23): 7910–6.
- [6] Li M Y, Miao W Y, Wu Q Z, et al. A critical role of presynaptic Cadherin/Catenin/p140Cap complexes in stabilizing spines and functional synapses in the neocortex [J]. *Neuron*, 2017, 94(6): 1155–72.
- [7] Chen N, Chen S, Wu Y, et al. The refractory periods and threshold potentials of sequential spikes measured by whole-cell recordings [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 151–7.
- [8] 丁正霞, 薛天, 鲍进, 等. 小鼠腹外侧视前区神经元的鉴定及其昼夜发放频率 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(9): 1235–8.
- [9] Yan F, Gao Z, Chen P, et al. Coordinated plasticity between barrel cortical glutamatergic and GABAergic neurons during associative memory [J]. *Neural Plast*, 2016: 5648390.
- [10] Pielarski K N, van Stegen B, Andreyeva A, et al. Asymmetric N-cadherin expression results in synapse dysfunction, synapse elimination, and axon retraction in cultured mouse neurons [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54105.
- [11] Hilal M L, Moreau M M, Racca C, et al. Activity-dependent neuroplasticity induced by an enriched environment reverses cognitive deficits in scribble deficient mouse [J]. *Cereb Cortex*, 2017, 27(12): 5635–51.

Effects of enriched environment intervention on excitability of pyramidal neurons in piriform cortex of mice

Chen Changfeng, Chen Lei, Jiang Qin, et al

(Functional Central Laboratory, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the changes of the excitability of pyramidal neurons in the piriform cortex influenced by enriched environment (EE). **Methods** Thirty C57 BL/6 mice of 15 day age were divided into 2 groups as follows: fifteen mice were reared in EE for 3 weeks (EE group) and the others were reared in standard environment (SE) for 3 weeks (SE group) randomly. Current-clamp recordings with whole-cell patch clamp were

利拉鲁肽对动脉硬化大鼠模型的疗效评价

郭晶晶¹, 李娜¹, 霍琴琴², 钟兴¹, 潘天荣¹

摘要 目的 根据血管张力、血管病理及血清学指标来评价利拉鲁肽治疗高脂诱导动脉硬化大鼠模型的疗效。方法 32只SPF级雄性大鼠,随机分为高脂组20只、对照组12只。将造模成功的高脂组随机分为利拉鲁肽组和安慰剂组,并继续给予高脂饲料喂养,同时分别皮下注射利拉鲁肽或生理盐水,对照组继续给予普通饲料喂养。干预16周末,检测血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(CHO)、低密度脂蛋白(LDL)、空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平,检测血清一氧化氮(NO)和内皮素1(ET-1)水平评价血管内皮功能改变;血管组织HE染色及Masson染色观察血管壁改变;血管张力检测仪检测各组大鼠血管张力变化。采用方差齐性检验分析实验数据。结果 与安慰剂组相比,利拉鲁肽组大鼠血清TG、CHO、LDL、FINS、ET-1水平均明显下降($P < 0.05$),NO水平升高($P < 0.05$);血管病理结果显示血管内皮损伤程度显著减轻,血管平滑肌细胞增殖及迁移减少;血管张力检测结果利拉鲁肽组血管舒张功能显著改善($P < 0.05$)。结论 利拉鲁肽能明显减轻高脂饮食诱导的动脉硬化大鼠的血管内皮损伤,保护内皮细胞,抑制平滑肌细胞增殖及迁移,有可能成为改善动脉硬化程度的新药物。

关键词 利拉鲁肽;动脉硬化;血管张力;内皮素1;一氧化氮

中图分类号 R 543.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0902-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.016

2018-03-08 接收

基金项目: 安徽省科技厅公益性技术应用研究联动项目(编号: 15011d04042);安徽省高等学校自然科学研究重点项目(编号: KJ2017A174、KJ2018A0202)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院内分泌科,合肥 230601

² 安徽医科大学附属阜阳医院,阜阳 236000

作者简介: 郭晶晶,女,硕士研究生;

潘天荣,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ptr1968@163.com

长期高脂血症是动脉硬化发生发展的重要危险因素。脂质沉积破坏内膜的平滑性和完整性,促进血浆中自由基产生和炎症反应发生、平滑肌细胞增生及迁移,而血管内皮损伤是动脉硬化的始动因素,保护血管内皮细胞、减轻内皮损伤是防治动脉硬化的重要环节。目前动脉硬化的防治措施,一方面是饮食及生活方式干预;另一方面是药物治疗,包括扩张血管、调节血脂、抗血小板聚集、抗凝等。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是一种由肠道L细胞合成和分泌的内源性肠促胰岛素激素,呈葡萄糖依赖性的促进胰岛素的分泌,同时具有改善血管内皮功能,保护心血管系统的效应^[1]。利拉鲁肽(Liraglutide)是一种GLP-1类似物,与天然GLP-1有97%的同源性,具有GLP-1的生理功能。该研究建立高脂饮食诱导的动脉硬化大鼠模型,通过比较血清学指标、血管病理及血管张力的变化,评价利拉鲁肽对动脉硬化大鼠模型的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及干预药物 清洁级雄性SD大鼠32只,约(170±10)g,购自安徽省实验动物中心。随机分为高脂组22只、对照组10只。

1.2 实验药物、试剂及仪器 利拉鲁肽(诺和力)购自丹麦诺和诺德公司(批号: FP51752-2);胰岛素ELISA试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;大鼠内皮素1(endothelin 1, ET-1)ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;ADVIA2400全自动生化分析仪购自德国西门子公司;荧光正置显微镜(尼康80i)购自南京飞达光学仪器公司。

made in pyramidal neurons of the piriform cortex. The excitability indexes of pyramidal neurons include inter-spike intervals (ISI), energy barrier ($V_{ts}-V_r$) and absolute refractory periods (ARP). **Results** The pyramidal neurons of the piriform cortex had lower $V_{ts}-V_r$ ($P < 0.05$) and shorter ARP in EE group compared with SE group ($P < 0.05$). Meanwhile, the ISI values significantly decreased in EE group compared with SE group ($P < 0.05$). **Conclusion** Rearing in EE can enhance the pyramidal neuron sensitivity of the piriform cortex which indicates enriched environment may help to accelerate pyramidal neurons development and mature.

Key words enriched environment; piriform cortex; pyramidal neurons; patch clamp