

网络出版时间: 2016-8-1 14:07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160801.1407.002.html>

◇基础医学研究◇

## 小鼠腹外侧视前区神经元的鉴定及其昼夜发放频率

丁正霞<sup>1</sup>, 薛天<sup>2</sup>, 鲍进<sup>2</sup>, 王媛<sup>1</sup>, 张瑾<sup>1</sup>, 王烈成<sup>1</sup>

**摘要** 目的 鉴定腹外侧视前区(VLPO)的神经元,记录神经元在昼夜的动作电位(AP)的发放频率,揭示不同VLPO神经元昼夜发放的规律。方法 4~6周龄野生型小鼠新鲜脑片根据形态、对药物去甲肾上腺素的响应及电特性对VLPO的神经元进行鉴定;膜片钳方式记录VLPO区域的神经元在白天的11:00~16:00以及夜间的22:00~02:00动作电位的发放;采用 $t$ 检验对神经元动作电位的发放频率进行统计学分析。结果 成功在VLPO鉴定出两类神经元,一类为多极三角形、去甲肾上腺素抑制性神经元,其阈值有低阈值发放(LTS)特性;一类呈两极梭形、去甲肾上腺素兴奋性神经元,其阈值无LTS特性。在记录的59个VLPO区域的神经元中,LTS特性的神经元有44个,非LTS特性的有15个; $t$ 检验分析显示去甲肾上腺素抑制的、有LTS特性的神经元在白天动作电位的发放频率明显高于夜间神经元动作电位的发放频率( $P < 0.01$ );去甲肾上腺素兴奋的、非LTS特性的神经元白天动作电位的发放频率也明显高于夜晚动作电位的发放频率( $P < 0.05$ )。结论 VLPO存在两类神经元,这两类神经元的白天动作电位发放频率皆高于夜间动作电位发放频率,提示两类神经元都参与了昼夜节律的调控。

**关键词** 腹外侧视前区;动作电位;LTS;非LTS

**中图分类号** R 338.6

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)09-1235-04

2000年,Saper et al<sup>[1]</sup>成功地在下丘脑前部分离出一个促睡眠的脑区—腹外侧视前区(ventrolateral preoptic nucleus,VLPO),实验数据显示VLPO是体内重要的促睡眠调节中枢之一<sup>[2]</sup>。Gallop et al<sup>[3]</sup>根据神经元的形态、大小、对药物的响应、递质的组成在VLPO区域成功的区分出两类神经元,并将它

们命名为促睡眠神经元与中间神经元。但VLPO区域的神经元与昼夜节律的内在联系却鲜有报道。该研究试图通过单细胞脑片膜片钳记录的方式,对VLPO区域神经元进行鉴定,并试图通过比较神经元在昼夜的发放频率,探讨其在昼夜节律调节中的功能。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性纯种健康成年C57BL/6小鼠30只,4~6周龄,20~25g,由中国科学技术大学生命科学学院脑功能与脑疾病重点实验室薛天研究组提供。小鼠置于透明有机玻璃鼠笼(长37cm,宽15cm,高17cm)内单独饲养,12h:12h明暗交替(光照08:00~20:00),室温( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.2 电生理溶液配制** 切片液(mmol/L):NMDG 92、HCl 92、KCl 1.2、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2、 $\text{NaHCO}_3$  30、Glucose 25、HEPES 20、L-corbic 5、Na-pyruvate 3、Thiourea 2、 $\text{MgSO}_4$  10、 $\text{CaCl}_2$  0.5,渗透压( $310 \pm 5$ ) mOsm, pH为( $7.4 \pm 0.1$ )  $^{\circ}\text{C}$ 保存。内液(mmol/L):Kgluconate 135、KCl 10、HEPES 10、EGTA 0.1、ATP-Mg 5、GTP-Na 0.5,渗透压( $310 \pm 5$ ) mOsm, pH为( $7.2 \pm 0.1$ ),  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。外液(mmol/L): $\text{NaCl}$  125、KCl 1.25、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25、 $\text{NaHCO}_3$  25、Glucose 25,渗透压( $310 \pm 5$ ) mOsm, pH为( $7.2 \pm 0.1$ )  $^{\circ}\text{C}$ 保存。所有试剂购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

**1.3 小鼠脑切片** 小鼠经异氟烷(0.04%)气体麻醉后断头取脑,在冰盒上用吉利刀片修整脑片,并将修整好的脑片用502胶水固定在Leica VT-1200S切片机的底座上,加入切片液的冰水混合物,以300 $\mu\text{m}$ 的厚度开始水平切片,对照小鼠脑图谱<sup>[4]</sup>,将含有VLPO的脑片转移到36.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温外液中,通95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 混合气,孵育30~45 min。

**1.4 玻璃电极的控制** 用SUTTER INSTRUMENT P-1000电极拉制仪拉制尖端为1 $\mu\text{m}$ 、入液电阻为5~7 M $\Omega$ 的玻璃电极。

**1.5 膜片钳记录及数据分析** 将孵育完成的脑片

2016-04-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81571293、81371066、31322024);中国科学院脑功能与脑疾病重点实验室开放课题(编号:2013-1)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>中国科学技术大学生命科学学院脑功能与脑疾病重点实验室,合肥 230027

作者简介:丁正霞,女,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wan-gliecheng@ahmu.edu.cn

放在记录槽中,转移到 Scientifica SS600 电生理台上,用通 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气的新鲜外液对记录槽中的脑片进行灌流。40 倍镜下找到 VLPO 神经元。判断神经元的形态,随后用玻璃电极 patch 细胞,进入全细胞记录模式。电流钳模式下记录神经元动作电位的发放,用气压给药的方式给予 1~3 s、300 μmol/L 重酒石酸去甲肾上腺素(上海禾丰有限公司),观察神经元对药物的响应;静息膜电位水平下向神经元注入 1 s、-60 pA 电流,观察神经元从超极化膜电位恢复到静息膜电位时是否产生动作电位;分别在白天的 11:00~16:00 以及夜晚的 22:00~02:00 记录神经元的自发放电,比较白天与夜晚神经元动作电位发放频率的差异。

**1.6 统计学处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 ANOVAs 方差分析和 Dunnett's-t 检验进行显著性比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 VLPO 区域神经元的不同形状及对去甲肾上腺素的不同响应** 显微镜下观察显示,在 VLPO 脑区中有两种不同形态的神经元,一类呈多级三角形(图 1A),正常状态下该神经元的发放是连续的,给予去甲肾上腺素(300 μmol/L)后神经元的发放受到抑制,药物撤掉以后神经元又恢复到正常的发放频率(图 2A);一类呈两极梭形(图 1B),正常状态下该神经元的发放是连续的,给予去甲肾上腺素(300 μmol/L)后神经元的发放频率进一步增加,药物撤掉以后该神经元又恢复到正常的发放频率(图 2B)。

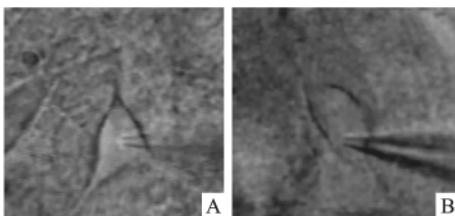


图 1 小鼠脑片上 VLPO 区域不同神经元的形态  
A: 神经元的形态呈多级三角形; B: 神经元的形态呈两极梭形

**2.2 VLPO 区域神经元的不同电特性** 电流钳模式下,在神经元静息膜电位水平的基础上向神经元注入 -60 pA 的超极化刺激,注入时间为 1 s,观察神经元从超极化膜电位水平恢复到静息膜电位水平时是否产生动作电位。去甲肾上腺素抑制性神经元从超极化膜电位水平恢复到静息膜电位水平时能产

生动作电位,且阈值比静息膜电位水平下产生动作电位的阈值低,红色星号表示神经元从超极化膜电位水平恢复到静息膜电位水平时产生动作电位的位置(图 3A)。这种电特性称作低阈值发放(LTS)。而去甲肾上腺素兴奋性神经元无 LTS 特性(图 3B)。黑线表示没有给任何刺激的情况下神经元的自发放电,蓝线显示注入电流(-60 pA, 1 s)使神经元超极化。在记录的 59 个 VLPO 区域的神经元中,有 LTS 特性的神经元有 44 个,非 LTS 神经元有 15 个。

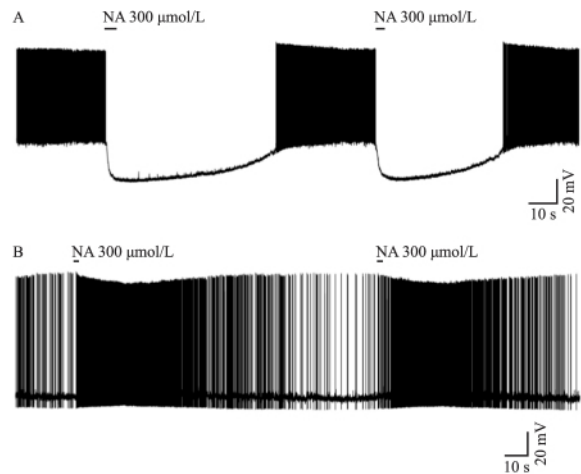


图 2 VLPO 区域神经元对去甲肾上腺素的不同响应

A: 去甲肾上腺素抑制性神经元; B: 去甲肾上腺素兴奋性神经元

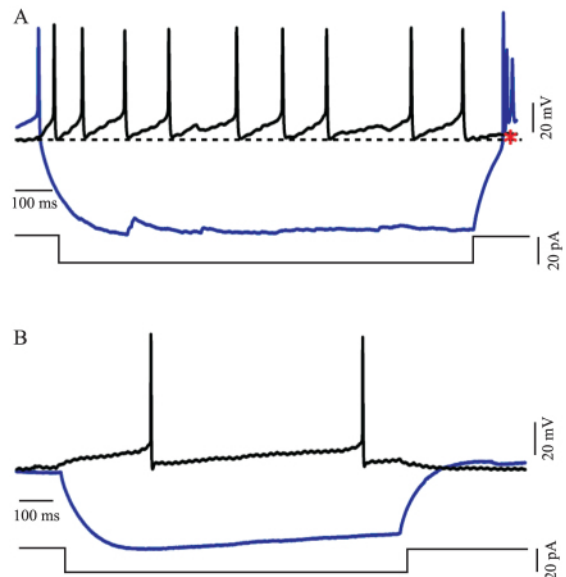


图 3 小鼠脑片上 VLPO 区域两类神经元的不同电特性

A: VLPO 区域去甲肾上腺素抑制的神经元有 LTS 特性; B: VLPO 区域去甲肾上腺素兴奋性神经元无 LTS 特性

**2.3 VLPO 区域神经元在白天和夜晚呈现出不同动作电位发放频率** 分别在白天的 11:00~16:00

以及夜间的 22:00 ~ 02:00 记录 VLPO 区域神经元的发放。通过比较显示,有 LTS 特性的神经元在白天的动作电位发放的频率 ( $5.36 \pm 0.09$ ,  $n = 21$ ) 明显高于夜间动作电位发放的频率 ( $1.86 \pm 0.05$ ,  $n = 23$ ;  $P < 0.01$ ); 同时,非 LTS 特性神经元白天动作电位发放的频率 ( $8.08 \pm 1.85$ ,  $n = 9$ ) 也高于夜间动作电位发放的频率 ( $1.16 \pm 0.58$ ,  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

早在 1930 年, *Economo*<sup>[5]</sup> 就发现损毁下丘脑后部会引起睡眠量的增加,这一现象提示下丘脑后部有参与觉醒调控的机制。与此相类似,临床检查显示一些失眠症患者的下丘脑前部与基底前脑都有不同程度的损伤,这一现象表明,下丘脑前部与基底前脑存在促睡眠机制。这些猜想在随后的研究中都得到了大力的证实<sup>[6]</sup>。目前,基与“跷跷板”假说<sup>[7]</sup>是睡眠-觉醒发生机制假说中较为主流的假说之一,该假说认为大脑中存在有促睡眠脑区和促觉醒脑区,并且这两种脑区有相互抑制的作用,实现睡眠与觉醒的快速转换,以减少中间状态存在的概率。“跷跷板”模型的一端是与觉醒相关的脑区,包括蓝斑、基底前脑<sup>[8]</sup>、腹侧髓质<sup>[9]</sup>、中缝核、视结节乳头,另外一端是与睡眠相关的脑区 VLPO。Gallop et al<sup>[3]</sup> 研究表明,本实验中所记录到的去甲肾上腺素抑制的、有 LTS 特性的神经元就是促睡眠神经元,这类神经元有 LTS 特性的原因与钙离子通道有关,而与钠离子通道无关,然而并没有证据可以证明此类具有 LTS 特性的神经元会激发神经元本身的某种固有的节律。早在 19 世纪 40 年代中期,研究者就用 3 种行为特征定义了动物的睡眠,即对外界环境刺激响应的减少,对强烈刺激快速响应,以及觉醒阈值的增加。促睡眠神经元之所以有 LTS 的电特性,从生理功能上来说可能是有助于神经元对外

界刺激作出快速响应,从而实现睡眠与觉醒的快速切换。

鼠类是夜行性动物,本实验结果显示促睡眠神经元在小鼠觉醒时(晚间)的发放频率明显低于睡眠时(白天)的发放频率,这与相关研究<sup>[3]</sup>一致,表明 VLPO 中促睡眠神经元的活跃程度与其觉醒-睡眠功能活动相一致。另外,本实验结果也显示 VLPO 中非 LTS 特性神经元的发放频率也呈现出觉醒时低、睡眠时高的现象,提示 VLPO 区域其他神经元可能也参与了小鼠昼夜节律的调控。这一发现为研究 VLPO 的睡眠调控作用提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] Saper C B. The neurobiology of sleep [J]. *Continuum (Minneapolis)* 2013, 19(1 Sleep Disorders): 19-31.
- [2] Williams R H, Chee M J, Kroeger D, et al. Optogenetic-mediated release of histamine reveals distal and autoregulatory mechanisms for controlling arousal [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(17): 6023-9.
- [3] Gallop T, Fort P, Eggemann E, et al. Identification of sleep-promoting neurons *in vitro* [J]. *Nature*, 2000, 404(6781): 992-5.
- [4] Franklin, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates 3rd edn [M]. 2007, Academic Press.
- [5] *Economo* C V. Sleep as a problem of localization [J]. *J Nerv Ment Dis*, 1930, 71(3): 249-59.
- [6] Lu J, Greco M A, Shiromani P, et al. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep [J]. *J Neurosci* 2000, 20(10): 3830-42.
- [7] Saper C B, Chou T C, Scammell T E. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(12): 726-31.
- [8] Xu M, Chung S, Zhang S, et al. Basal forebrain circuit for sleep-wake control [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(11): 1641-7.
- [9] Weber F, Chung S, Beier K T, et al. Control of REM sleep by ventral medulla GABAergic neurons [J]. *Nature*, 2015, 526(7573): 435-8.

## Identification of ventrolateral preoptic nucleus and their different firing rate within day and night

Ding Zhengxia<sup>1</sup>, Xue Tian<sup>2</sup>, Bao Jin<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup> Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University Hefei 230032;

<sup>2</sup> CAS Key Laboratory of Brain Function and Disease, School of Life Science, University of Science and Technology of China Hefei 230027)

**Abstract Objective** To identify the types of ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) and record the action potential (AP) of these neurons within day and night for investigating their firing roles during day and light. **Methods**

## 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 增强血管紧张素 II 对人成纤维样滑膜细胞的增殖、迁移与侵袭的作用及机制

罗学霞, 严尚学, 王颖, 吴华勋, 陈镜宇, 魏伟

**摘要** 目的 明确肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )增强血管紧张素 II (Ang II) 对人成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖、迁移与侵袭的作用及其部分机制。方法 体外培养正常人 FLS, 用 Ang II ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L)、TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 单用或联合使用, 刺激 48 h 后, 采用 CCK8 试剂盒检测 FLS 增殖功能; Transwell 小室法检测迁移与侵袭功能; 激光共聚焦、免疫荧光或蛋白免疫印迹法检测 Ang II 受体及 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 的表达。结果 Ang II ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) 能促进人 FLS 的增殖 ( $P < 0.05$ ), 最适浓度为  $10^{-7}$  mol/L; TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 能显著增强 FLS 的增殖 ( $P < 0.05$ ); Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 与 TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 联合使用可进一步促进 FLS 增殖 ( $P < 0.05$ ); 单用 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L)、TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) 或者联合使用都能显著促进 FLS 的迁移 ( $P < 0.01$ ) 与侵袭能力 ( $P < 0.05$ ); 单用 Ang II 可显著升高 FLS 血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) 的表达水平 ( $P < 0.05$ ), GRK2 水平有上升趋势 ( $P > 0.05$ ); 单用 TNF- $\alpha$  可显著升高 FLS 的 AT1R 和 GRK2 的蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ );

Ang II 与 TNF- $\alpha$  联合使用, AT1R 与 GRK2 的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); GRK2 抑制剂可以下调 Ang II 与 TNF- $\alpha$  联合诱导的 FLS 迁移、侵袭功能 ( $P < 0.01$ )。结论 Ang II 促进 FLS 增殖、迁移和侵袭, TNF- $\alpha$  可以促进 Ang II 介导的 FLS 增殖、侵袭和转移, 其机制可能与上调 FLS 的 AT1R 和 GRK2 表达有关。

**关键词** 血管紧张素 II; 肿瘤坏死因子; 滑膜细胞; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 977.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1238-06

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种严重危害人类健康的进展性、慢性自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。RA 的成纤维样滑膜细胞 (RA fibroblast-like synoviocyte, RA-FLS) 在 RA 的发生、发展中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。RA-FLS 与免疫细胞共同作用, 通过分泌炎症因子如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、促血管生成因子或基质金属蛋白酶进入滑膜液中, 导致炎症加剧、血管翳形成、基质降解, 并最终引起关节骨与软骨破坏<sup>[3]</sup>, 抑制 RA-FLS 的增殖、侵袭和迁移是 RA 治疗的重要策略。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是血管紧张素-醛固酮系统中的重要组成部分, 有两型受体包括 1 型受体

2016-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81503084、81330081、81302784)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

作者简介: 罗学霞, 女, 硕士研究生;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

The fresh slices were made from WT mice aged 4~6 weeks, and the neurons were identified by their shape, different reaction to noradrenaline (NA) and electrical characteristics. AP firings of neurons were recorded during 11:00~16:00 and 22:00~02:00 with patch-clamp recording. The firing rates of these neurons were analyzed using *t*-test. **Results** The neurons in VLPO were successfully identified into two types. One type neurons with triangular and multipolar shape could be hyperpolarized by NA and had the electrical property of low-threshold spike (LTS). The other type neurons with fusiform and bipolar shape could be depolarized by NA and lacked the electrical property of LTS (non-LTS). Of 59 recorded neurons in VLPO, 44 neurons had the character of LTS, and 15 neurons were non-LTS. Using *t*-test of statistics, AP firing rate of LTS neurons which were hyperpolarized by NA showed higher at day time than that at night ( $P < 0.01$ ). Non-LTS neurons which were depolarized by NA showed the similar tendency, that AP firing rate at day time was higher than that at night ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There are two types of neurons in VLPO. Both of them show high firing rate at day time and low firing rate at night time, which indicates they participate in regulating circadian rhythm.

**Key words** ventrolateral preoptic nucleus; action potential; LTS; non-LTS