

食欲素 B 增强视皮层第 2/3 层传入到第 6b 层锥体神经细胞的突触传递

黄梦瑶, 童昕, 蒋斌

(中山大学中山医学院广东省脑功能与脑疾病研究重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究小鼠视皮层第 6b 层中对食欲素(Orexin B)敏感的神经元的细胞类型以及食欲素调控其敏感神经元中来自第 2/3 层传入的突触传递和机制。【方法】用生物细胞素(biocytin)标记小鼠视皮层第 6b 层中被 Orexin B 受体激动剂直接兴奋的神经细胞, 双光子显微镜下观察这些神经元的细胞形态; 外膝体注射逆行标记荧光染料(CTB555)标记小鼠视皮层第 6b 层中反馈投射到外膝体的神经元, 电刺激视皮层第 2/3 层传递到第 6b 层中由 CTB555 标记的、反馈投射到外膝体的神经元的传入神经通路, 并记录兴奋性突触后电流(EPSC)。【结果】在视皮层第 6b 层中 58.1% 的锥体细胞和 52.9% 的多极细胞是 Orexin B 敏感的神经元; Orexin B 能增强第 6b 层中经 CTB555 标记的、反馈投射到外膝体的神经元中来自第 2/3 层的传入纤维的突触传递。这种增强作用可分别被 Orexin B2 型受体阻断剂 [Ctr: (119.33±2.51)%, $n = 15$ cells, 7 mice; TCS OX229: (103.17±2.75)%, $n = 30$ cells, 10 mice; $P < 0.001$]、磷脂酶 C 抑制剂 [Ctr: (125.51±1.4)%, $n = 11$ cells, 5 mice; U173332: (103.89±1.04)%, $n = 10$ cells, 5 mice; $P < 0.001$]、细胞内 Ca^{2+} 螯合剂 [Ctr: (125.54±1.53)%, $n = 11$ cells, 5 mice; BAPTA: (102.86±1.7)%, $n = 9$ cells, 4 mice; $P < 0.001$] 和 mGluR5 受体拮抗剂所阻断 [Ctr: (126.14±3.87)%, 12 cells, 5 mice; MPEP: (106.32±2.65)%, $n = 12$ cells, 6 mice; $P < 0.001$]。【结论】小鼠视觉皮层第 6b 层中, 大部分锥体神经元和多极神经元是 Orexin B 敏感的神经元, 第 6b 层中反馈投射到外膝体的神经元细胞膜上的食欲素受体被激活后可以通过激活细胞内磷脂酶 C 的活性而增强来自第 2/3 层的传入的突触传递。

关键词: 视皮层; 第 6b 层; Orexin B; Orexin B 敏感神经元; 兴奋性突触传递

中图分类号: R338.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2020)03-0379-10

Orexin B Potentiates Synaptic Transmission from Layer 2/3 into Pyramidal Neuron in Layer 6b of Mouse Visual Cortex

HUANG Meng-yao, TONG Xin, JIANG Bin

(Guangdong Province Key Laboratory of Brain Function and Disease, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080)

Correspondence to: JIANG Bin; E-mail: jiangb3@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To investigate which cell types of neurons are sensitive to Orexin B in layer 6b of mouse visual cortex and whether Orexin B mediates the synaptic transmission from layer 2/3 to neurons feedback projection to lateral geniculate nucleus (LGN) in layer 6b and its underlying mechanisms. 【Methods】The neurons in layer 6b were labeled by biocytin which were directly excited by Orexin B receptor agonist, and the morphologies of these neurons were analyzed under a two-photon microscope; CTB555 was injected into LGN to label the neurons feedback projection to LGN from L6b, and the excitatory postsynaptic current (EPSC) in these neurons labeled by CTB555 was recorded by whole-cell recording evoked from layer 2/3. 【Results】About 58.1% of pyramidal neuron and 52.9% of multipolar spiny neuron

收稿日期: 2020-01-07

基金项目: 国家自然科学基金(81870869/H0903)

作者简介: 黄梦瑶, 硕士研究生, 研究方向: 视皮层神经突触可塑性, E-mail: 258606849@qq.com; 蒋斌, 通信作者, 教授, 研究方向: 视皮层神经突触可塑性, E-mail: jiangb3@mail.sysu.edu.cn

in mouse layer 6b were sensitive to Orexin B; Orexin B induced an enhancement of EPSC recorded in neurons labeled by CTB555 in layer 6b evoked from layer 2/3. This effect was blocked by Orexin B 2 receptor (OXR2) antagonist [Ctr: (119.33±2.51)%, $n = 15$ cells, 7 mice; TCS OX229: (103.17±2.75)%, $n = 30$ cells, 10 mice; $P < 0.001$], by phospholipase C (PLC) inhibitor [Ctr: (125.51±1.4)%, $n = 11$ cells, 5 mice; U173332: (103.89±1.04)%, $n = 10$ cells, 5 mice; $P < 0.001$], by mGluR5 receptor blocker, by Ca^{2+} chelator intracellularly [Ctr: (125.54±1.53)%, $n = 11$ cells, 5 mice; BAPTA: (102.86±1.7)%, $n = 9$ cells, 4 mice; $P < 0.001$] and mGluR5 receptor antagonist [Ctr: (126.14±3.87)%, 12 cells, 5 mice; MPEP: (106.32±2.65)%, $n = 12$ cells, 6 mice; $P < 0.001$], respectively. 【Conclusions】 In layer 6b of mouse visual cortex, the majority of pyramidal neuron and multipolar spiny neurons are Orexin-sensitive neurons. Activation of orexin B receptor in the neurons feedback projection to LGN in layer 6b potentiates the excitatory synaptic transmission from layer 2/3 to these Orexin-sensitive neurons through the activation of PLC.

Key words: visual cortex; layer 6b; Orexin B; Orexin-sensitive neurons; excitatory synaptic transmission

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(3): 379-388]

食欲素(orexin 或 hypocretin)是由下丘脑外侧区食欲素神经细胞合成和分泌的兴奋性神经肽,分为 Orexin A 和 Orexin B (hypocretin-1 and hypocretin-2),主要参与睡眠觉醒、能量代谢、奖赏与药物成瘾等重要生理功能的调节^[1-5]。食欲素结合食欲素 1 型受体(orexin 1 receptor, OX1R)或食欲素 2 型受体(orexin 2 receptor, OX2R)后发挥生物学作用,在大脑皮层中以 OX2R 的分布为主^[6-8]。而在皮质下,除了蓝斑神经元以 OX1R 为主,OX2R 也占较大比例,食欲素与受体相结合后,通过降低钾通道电导、激活钠钙离子交换体和非选择性阳离子通道,提高神经元兴奋性,以及调节突触传递等作用^[6]。Orexin 神经元胞体位于下丘脑外侧区,以及穹隆周围核,但其神经纤维广泛的投射至整个大脑皮质区域,包括视皮层^[9-11]。在小鼠的初级感觉皮层包括视皮层、体感皮层、运动皮层的第 6b 层(layer 6b, L6b)中均发现有一些神经元可以被 OX2R 的激动剂所激活产生高频发放的动作电位,称之为 Orexin 敏感的神经元^[12]。然而皮层 L6b 层的细胞种类繁多,根据神经元的形态和电生理特性分为以下 5 种类型:锥体神经元(pyramidal neuron)、多极神经元(multipolar spiny neuron)、水平朝向神经元(“horizontally” oriented neuron)、倒置朝向神经元(“inverted” neuron)、以及不定朝向神经元(“tangentially” oriented neuron)^[13]。为了明确小鼠视皮层 L6b 中的 Orexin 敏感的神经元的具体细胞类型,我们首先用细胞生物素(biotin)标记视皮层中 L6b 对 Orexin 敏感的细胞、外膝体注射逆行标记荧光染料(CTB555)标记 L6b 反馈投射到外膝体的神经元,再研究食

欲素是否调控这些反馈投射到外膝体的神经元接受第 2/3 层的传入的突触传递及其机制。结果表明小鼠视皮层 L6b 层中, Orexin B 敏感的神经元主要是锥体神经元和多极神经元。外源 Orexin B 受体的激动剂,显著增强反馈投射到外膝体的神经元接受 2/3 层的神经传入的突触传递。Orexin B 通过增强第 2/3 到 L6b 锥体细胞的突触传递和直接兴奋 L6b 层的锥体神经元两个途径来强化 L6b 层细胞的活动,加强到外膝体的反馈控制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所涉及的动物实验获得中山大学实验动物伦理委员会批准[中山医动伦(2018)第 156 号],并严格遵循动物伦理要求进行动物实验操作。本实验采用 P19-P28 的雌雄 C57BL/6J 小鼠(SPF 级,购于中山大学动物实验中心)。分笼饲养,自由摄入水食,室温控制在(22±1)℃,12-12 h 昼夜循环光照。实验动物严格遵守《中山大学实验动物管理条例》,实验后,动物尸体按照中山大学实验动物管理办法进行处理。

1.2 脑立体定位注射逆行标记荧光染料 CTB555

选择 P19-P21 左右的 C57 小鼠,称重,按剂量 1 mL/20 kg 体重质量,腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠溶液使之麻醉。根据小鼠大脑立体定位图谱确定外侧膝状体(lateral geniculate nucleus, LGN)的坐标,将 Bregma 定为零点(0, 0, 0), Bregma 后 2.3 mm, 中线左右(2.0~2.1) mm,用颅骨钻打磨颅骨,钻出合适大小的骨窗。注射浓度为 2 mg/mL 的 CTB555

(Cholera Toxin Subunit B, Alexa Fluoro™ 555 Conjugate, Invitrogen, USA) 0.2 μL , 注射速度控制在 0.02 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。为了保证足够的注射量和扩散面积,在相应位置上注射两个点。注射完毕后留针 5~10 min。动物苏醒后,正常条件下饲养。整个实验过程中将小鼠置于恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 的电热毯上,并涂上眼膏防止小鼠眼睛干燥。

1.3 视皮层脑片制备

选用 P22-28 的健康 C57BL/6J 小鼠,异氟烷麻醉,快速断头,打开颅骨,取出大脑放入氧饱和的冰冷切片液中,1 min 后转移至预冷的装有冰冷切片液的平板中修块,去除小脑组织,切下大脑枕叶,以横断面为底座用瞬间粘合胶固定到振动切片机平台上,随后立即倒入冰冷切片液浸没脑组织,通以体积分数 95% O_2 和 5% 的 CO_2 混合气体。调整切片速度为 3,振幅 7~8,将脑组织切成 8~10 片 300 μm 厚度的含有视皮层的冠状脑片,后随即转移至氧饱和的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中,34 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,后转移至室温使用。

1.4 脑片上记录细胞的自发兴奋性突触后电位

用装有电流钳内液的玻璃电极 (内含 0.2% Biocytin, Sigma, USA),电流钳方式钳住皮层第 6b 层 (L6b) 中的神经细胞,记录 L6b 中各种细胞上的自发兴奋性突触后电位 (spontaneous excitatory postsynaptic potential, sEPSP; 图 1、2)。待细胞稳定下来后 (约 3 min),置换成含有 100 nmol/L Orexin B (Tocris Bioscience, UK) 的 ACSF (其中含有兴奋性和抑制性突触受体的阻断剂),给药灌流 3 min 后,再用普通 ACSF 进行洗脱,观察被记录的细胞是否能被 Orexin B 的激动剂所兴奋。本实验通过 PClamp 软件可以实现封接电阻,串联电阻和输入电阻的读取,并在实验全程对串联电阻进行实时监控,对于串联电阻前后变化不超过 20% 的数据才进行统计分析。

1.5 标记 L6b 神经细胞类型

细胞载入 Biocytin 后 (至少持续记录 sEPSP 5 min),缓慢移出电极,保持细胞活性状态,即刻将脑片转移至 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定,避光保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。24 h 后,取出脑片盛放在 12 孔板的小孔里,用 0.01 mol/L PBS 溶液漂洗 3~5 次。再将脑片放入体积分数 0.3% Triton-100 的 PBS 中 2 h。按 1:200 稀释度加入 Avidin 555 (Streptavidin,

Alexa Fluoro 555 conjugate, Invitrogen corporation, USA), 混匀后,用锡纸包裹,放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。后再用 0.01 mol/L PBS 溶液漂洗,双光子显微镜扫描拍照,观察细胞的形态 (图 1、2)。

1.6 自发兴奋性突触后电流和微小兴奋性突触后电流的记录

外膝体注射 CTB555 一周后的小鼠,异氟烷使之麻醉,断头,制作视皮层脑切片。电压钳模式下,钳住经 CTB555 标记的、反馈投射到外膝体的 L6b 中的神经元 (图 3),将膜电位钳制于 -70 mV,记录细胞的自发兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory post synaptic current, sEPSC; 图 4A),先用普通的 ACSF 记录 3 min,然后换成含有 100 nmol/L Orexin B (Tocris Bioscience, UK) 的 ACSF (其中含有兴奋性和抑制性突触受体的阻断剂),给药灌流 3 min 后,再用普通 ACSF 进行洗脱。观察外源 Orexin B 给药后,由 LGN 逆行标记的视皮层 L6b 细胞是否产生内向电流。

微小兴奋性突触后电流 (miniature excitatory post synaptic current, mEPSC) 与 sEPSC 一样,只是在灌流液 ACSF 中分别加入 Tetrodotoxin (TTX, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、Picrotoxin (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、CNQX (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 以及 APV (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 阻断所有突触传递 (图 4C)。通过比较 Orexin B 加药前后的振幅和频率,判断 Orexin B 对 Orexin B 敏感神经元的作用是突触前作用还是突触后作用。

1.7 Evoked EPSC (eEPSC) 的记录

外膝体 CTB555 注射一周后的小鼠,异氟烷使之麻醉,断头,制作视皮层脑切片。电压钳模式下,钳住被经 CTB555 标记的、反馈投射到外膝体的 L6b 中的神经元,将电极尖端直径为 125 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的双极同心圆电极放置于视皮层的第 5 层 (L5),刺激来自 L2/3 的传入到该细胞的神经传入,记录由电刺激 L2/3 引起的 AMPAR-EPSC (图 5、6)。实验通过 PClamp 软件可以实现封接电阻,串联电阻和输入电阻的读取,并在实验全程对串联电阻进行实时监控,对于串联电阻前后变化不超过 20% 的数据才进行统计分析。

1.8 数据的统计与分析

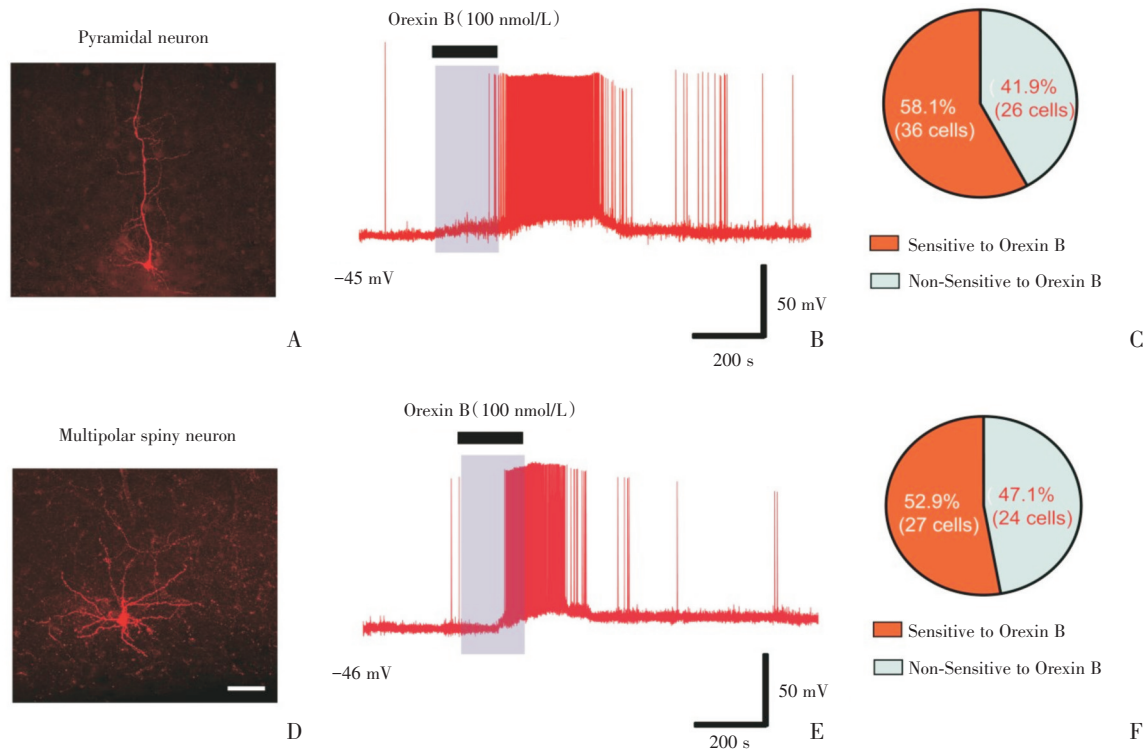
本实验所以的电生理数据均由 PClamp 软件记录并分析处理,mEPSC 数据由 Minianalysis software 软件分析,最后用 GraphPad software 对数据进行 t 检验或方差分析。

2 结果

2.1 Orexin B直接兴奋小鼠视皮层第6b层中的神经元

为了探究小鼠视皮层L6b中的神经元细胞类型以及是否存在对Orexin B敏感的神经元,我们在P19-P28 C57BL/6J小鼠视皮层离体脑片上,在电流钳模式下,用含有0.2% biocytin的记录电极随机钳住细胞,记录神经元的兴奋性突触后电位(sEPSP)。由于哺乳动物神经元的静息电位离阈电位之间有一定的差值,因此我们通过改变灌流液ACSF中的K⁺浓度,适当降低神经元的膜电位水平使细胞的膜电位接近阈电位水平。观察Orexin B灌流给药3 min后,记录电位的变化。为了减少药物干扰,所有实验每个脑片只记录一个细胞,实验结束后立即将脑片转移至40 g/L的多聚甲醛中固定,后续通过免疫染色后,在双光子显

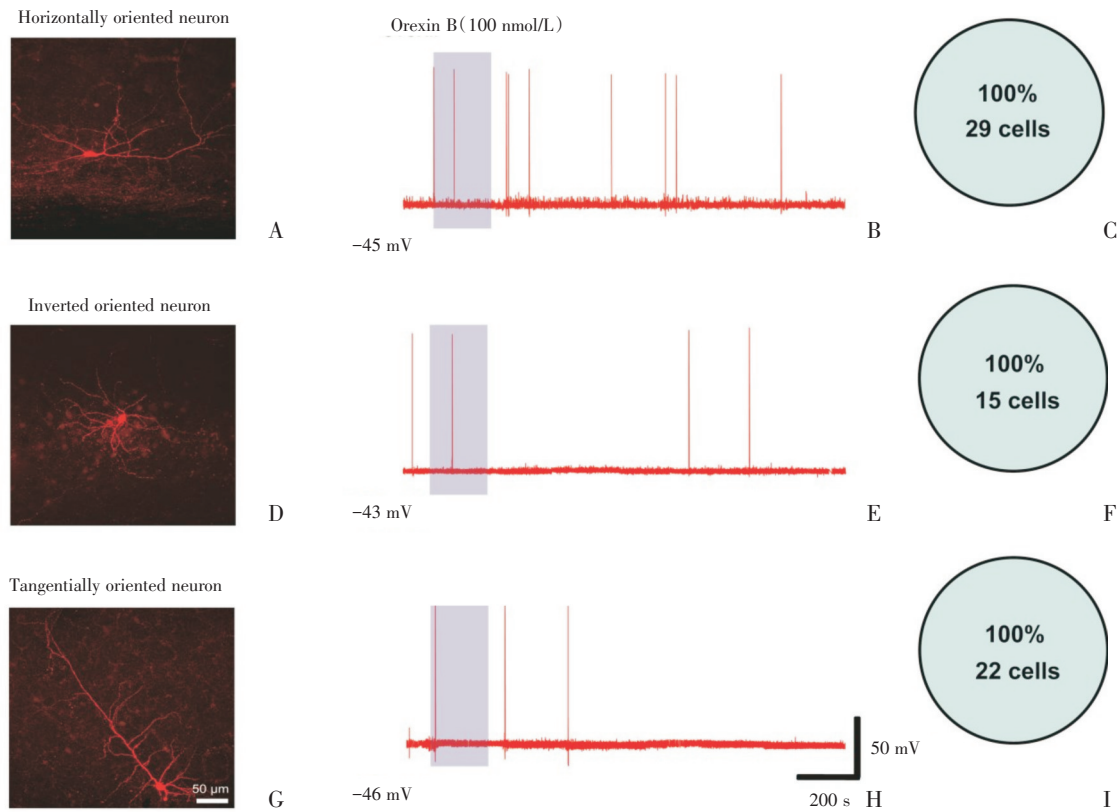
微镜下对细胞进行形态分析。结果显示,小鼠视皮层L6b中细胞的形态主要有锥体神经元、多极神经元、水平朝向神经元、倒置朝向神经元、以及不定朝向神经元(图1 A、D和图2A、D、G),结果与文献报道的一致^[13]。分析每种细胞对应的电生理数据(图1B、E和图2B、E、H)发现,小鼠视皮层中确实存在Orexin B敏感的神经元(图1B、E)。通过外源激活Orexin B受体可以直接对Orexin B敏感细胞产生兴奋性调节效应。其中大部分锥体细胞(58.1%)和多极细胞(52.9%;图1 C、F)为Orexin B敏感的神经元。在Orexin B(100 nmol/L)作用3 min后,细胞膜发生去极化并伴有成串的动作电位,且随着正常的ACSF洗脱,动作电位的频率降低。然而水平朝向神经元、不定朝向神经元和倒置朝向神经元在Orexin B(100 nmol/L)作用前后膜电位水平无明显变化(图2B、E、H)。说明水平朝向神经元、不定朝向神经元和倒置朝向神经元为Orexin B不敏感神经元。



A-C: Orexin B (100 nmol/L) induced the depolarization and an increase in the firings in pyramidal neurons. A: Image of a pyramidal cell labeled by biocytin. B: Orexin B directly excited neurons which are sensitive to Orexin B. C: The morphological analysis of L6b cells labeled by biocytin, 58.1% of pyramidal neurons which are sensitive to Orexin B. D-F: Orexin B (100 nmol/L) induced depolarization and an increase in firing in multipolar spiny neuron. D: Image of a multipolar spiny neuron labeled by biocytin, bar = 50 μ m. E: Orexin B directly excited neurons which are sensitive to Orexin B. F: The morphological analysis of L6b cells labeled by biocytin, 52.9% of multipolar spiny neurons which are sensitive to Orexin B.

图1 Orexin B直接兴奋小鼠视皮层第6b层中的锥体神经元和多极神经元

Fig.1 Orexin B directly excited the pyramidal neuron and multipolar spiny neuron in layer 6b of visual cortex



A, D, G: Images of a horizontally oriented neuron an inverted oriented neuron and a tangentially oriented neuron labeled by biocytin, respectively. B, E, H: Orexin B (100 nmol/L) didn't induced depolarization in horizontally oriented neurons, inverted neurons and tangentially oriented neurons respectively. C, F, I: The morphological analysis of L6b cells labeled by biocytin, no neurons are sensitive to Orexin B.

图2 小鼠视皮层第6b层中水平朝向神经元、不定朝向神经元和倒置朝向神经元为食欲素不敏感神经元

Fig.2 Horizontally oriented neurons, inverted neurons and tangentially oriented neurons were Orexin B-insensitive neurons in layer 6b of visual cortex

2.2 逆行标记荧光染料CTB555标记视皮层第6b层中的神经元

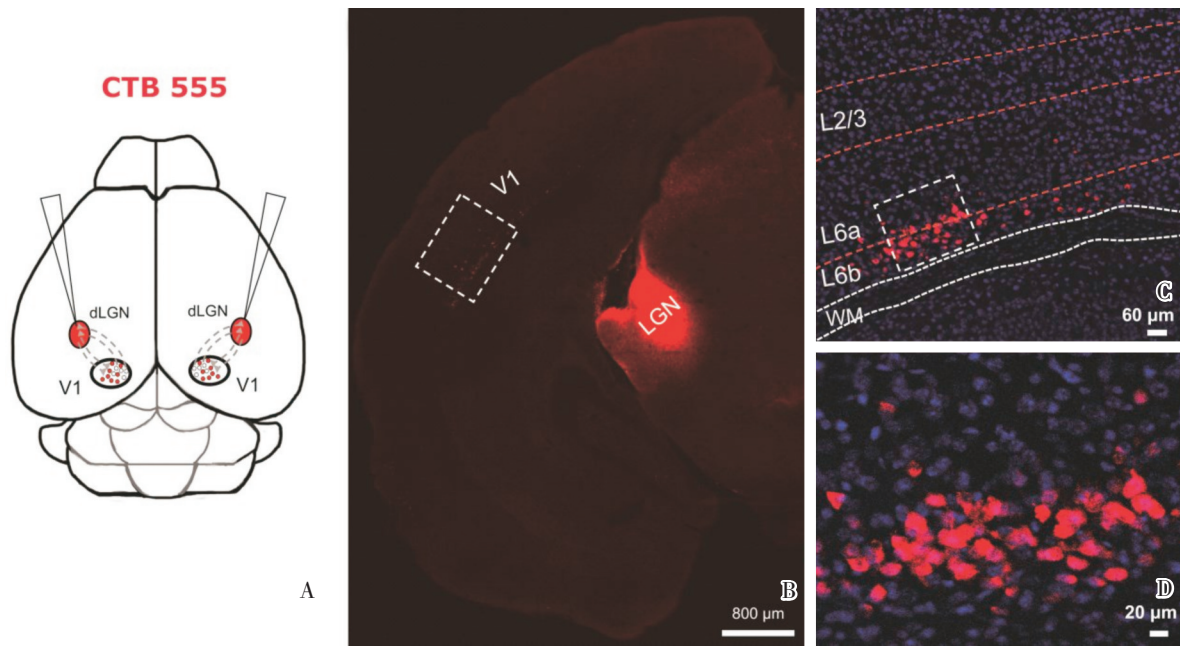
视皮层L6b同时接收来自第2/3层纤维自上而下的传入,同时也接受来自外膝体纤维自下而上的传入。因此视皮层中L6b也是一个重要的输出层,反馈投射到LGN以及其它间脑核团。为了标记视皮层第6b中的神经元,我们在小鼠两侧的LGN中注射逆行病毒标记物CTB555(图3A),7~10 d后切脑片在双光子显微镜下观察病毒标记情况。结果(图3B)所示,病毒染料CTB555成功标记了视皮层L6b中的神经元,即第6b层中反馈投射至LGN的神经元。

2.3 Orexin B增大视皮层第6b层中投射到外侧膝状体的神经细胞的兴奋性突触后电流的振幅

为了研究Orexin B对视皮层L6b层中投射至LGN的神经元的兴奋性突触后电流(sEPSC)的作用,我们在电压钳模式下,采用全细胞记录模

式,记录被CTB555标记的红色荧光细胞的sEPSC(图4),在被CTB555标记的红色荧光细胞上,直接激活Orexin B受体可以记录到去极化电流(图4A)。为了研究Orexin B的浓度与去极化电流之间的关系。采用10、20、50、100和200 nmol/L进行浓度梯度灌流,相关系数为0.7168, $P = 0.0212$,发现两者之间为正相关关系,且100 nmol/L时引起的去极化电流已达到最大值[10 nmol/L: (24.78 ± 2.03) pA, $n = 13$ cells, 8 mice; 20 nmol/L: (53.12 ± 2.24) pA, $n = 13$ cells, 6 mice; 50 nmol/L: (74.56 ± 2.66) pA, $n = 17$ cells, 8 mice; 100 nmol/L: (79.5 ± 2.41) pA, $n = 12$ cells, 7 mice; 200 nmol/L: (83.56 ± 2.36) pA, $n = 12$ cells, 7 mice;图4B; $F = 99.69, P < 0.0001$]。

为了进一步研究Orexin B引起的去极化效应是源于突触前还是突触后,我们在ACSF中分别加入Tetrodotoxin (TTX, 1 μ mol/L), Picrotoxin (50 μ mol/L)、CNQX (20 μ mol/L)以及APV (100 μ mol/L)



A: Schematic of CTB555 injection into dorsal lateral geniculate nucleus (LGN). V1 presents primary visual cortex and dLGN, dorsal lateral geniculate nucleus. B: The labeled cells by CTB555 in V1 from LGN. The primary visual cortex is indicated by V1. C: The amplified image of the white dashed box in B, the L6b neurons with red fluorescence located in L6b are from LGN, red dotted lines indicate the boundary of L6a and L6b. DAPI staining in blue was also shown. Scale bar = 60 μm . D: Enlargement of the white dashed frame in C, red fluorescent cells are mainly in L6. Scale bar = 20 μm .

图3 标记小鼠视皮层第6b层中投射至外侧膝状体的神经元

Fig.3 Neurons in L6b of visual cortex projecting to the dorsal lateral geniculate nucleus labeled by CTB555

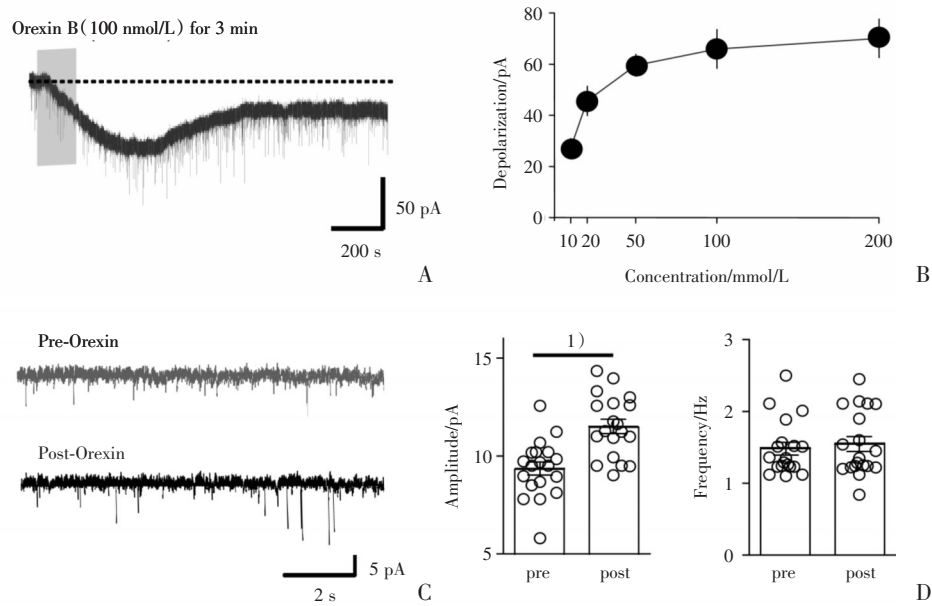
阻断所有突触传递并记录微小兴奋性突触后电流 (mEPSC), 将细胞钳制于 -70 mV , 稳定记录 3~5 min, 后切换含 Orexin B 的灌流液, 记录 5~8 min, 用 mini-analysis 分析统计 mEPSC 的振幅和频率 (图 4C)。发现 Orexin B 增加了 mEPSC 的振幅 [Ctr: $(9.36 \pm 0.034)\text{ pA}$, Orexin B: $(11.51 \pm 0.036)\text{ pA}$, $n = 19\text{ cell}$ from 7 mice, paired t -test, $P = 0.03$] 但其频率没有变化 [Ctr: $(1.48 \pm 0.08)\text{ Hz}$, Orexin B: $(1.55 \pm 0.09)\text{ Hz}$, $n = 19\text{ cell}$ from 7 mice, paired t -test, $P = 0.67$], 该结果说明 Orexin 增强突触传递是通过突触后效应 (图 4D)。

2.4 Orexin B 增强视皮层第 6b 层中投射到 LGN 的神经细胞接受第 2/3 层神经传入的突触传递

为了探究 Orexin B 是否调节 L6b 的 Orexin B 敏感神经元接受第 2/3 神经传入的突触传递, 用金属电极刺激来自第 2/3 的神经传入, 电压钳钳住 L6b 中被 CTB555 标记的荧光细胞, 记录兴奋性突触后电流 (eEPSC)。将细胞膜电阻变化前后不超过 10%, 系列电阻变化不超过 15% 的记录细胞数据纳入分析 (图 5A)。Orexin B 加入后, EPSC 逐渐增大, 到药物开始洗脱时 EPSC 达到最大值,

随着洗脱减小, 最后趋于平缓 (图 5A、C)。EPSCs 的记录为每 15 s 给予一对刺激, 刺激时间间隔为 0.1 s (图 5A), 通过对配对脉冲比率 (paired-pulse ratio, PPR) 的值 ($\text{PPR} = \text{P2}/\text{P1}$, P1 和 P2 分别为第 1 个刺激和第 2 个刺激诱发 EPSC 的振幅大小)。

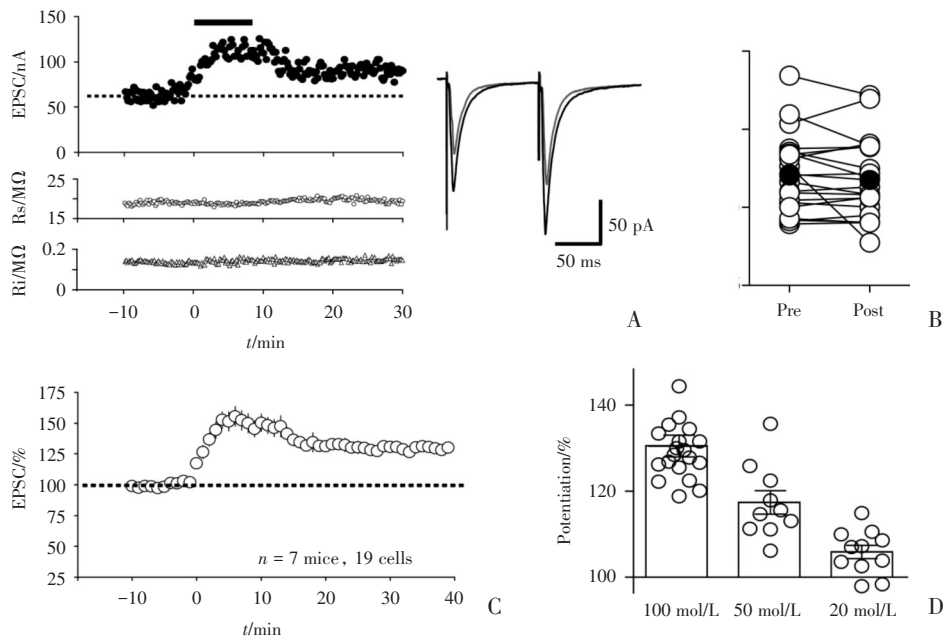
Orexin B 加药之前 PPR 为 1.21 ± 0.05 , 加药后 PPR 为 1.17 ± 0.05 ($n = 20\text{ cells}$, paired t -test, $P = 0.64$; 图 5B), 加药前后 PPR 无显著变化, 因此 Orexin B 对 L6b 中其敏感神经元上来自第 2/3 层的输入纤维突触传递的增强作用是突触后效应。为了探究 Orexin B 对 L6b 层中来自 2/3 层传入纤维的突触传递的增强是否存在剂量依赖性效应, 我们分别用不同浓度的 Orexin B 20、50 和 100 nmol/L 的 Orexin B 重复上述实验。发现 Orexin B 浓度越大, 加药后突触后电流 (EPSC) 增大越明显 [加入 Orexin B 并洗脱后 20~25 min, 100 nmol/L: $(130 \pm 2.5)\%$, $n = 19\text{ cells}$, 8 mice; 50 nmol/L: $(117 \pm 2.7)\%$, $n = 10\text{ cells}$, 5 mice; 20 nmol/L: $(105 \pm 1.8)\%$, $n = 9\text{ cells}$, 5 mice; 图 5D, $F = 19.86$, $P < 0.0001$]。



A: Orexin B (100 nmol/L) induced an inward current-(depolarization) in Orexin B-sensitive neurons; B: dose-dependent effect of Orexin B on the depolarization in sEPSC; C: Example trace of mEPSC before and after Orexin B application; D: Orexin B (100 nmol/L) increased the amplitude of mEPSC (¹pair *t* test, *P* = 0.03) but kept frequency intact (pair *t* test, *P* = 0.67).

图4 Orexin B在视皮层第6b层中投射至LGN的Orexin B敏感神经元的sEPSC和mEPSC的效应

Fig.4 The effects of Orexin B on the sEPSC and mEPSC in Orexin-sensitive neurons in layer 6b of visual cortex



A: An example of time course of changes in EPSC amplitude after application of Orexin B (100 nmol/L) recorded in the neurons labeled by CTB555. EPSC amplitude was enhanced by bath application of Orexin B. The representative traces are showed in the right for before application (gray) and after application (black) of Orexin B. B: Paired-pulse ratio of evoked EPSC was not changed before and after application of Orexin B. C: Time course of changes in EPSC amplitude (pool data) after application of Orexin B (100 nmol/L) recorded in the neurons labeled by CTB555. EPSC amplitude was enhanced by bath application of Orexin. D: Dose-dependent effect of Orexin B on the amplitude of EPSC.

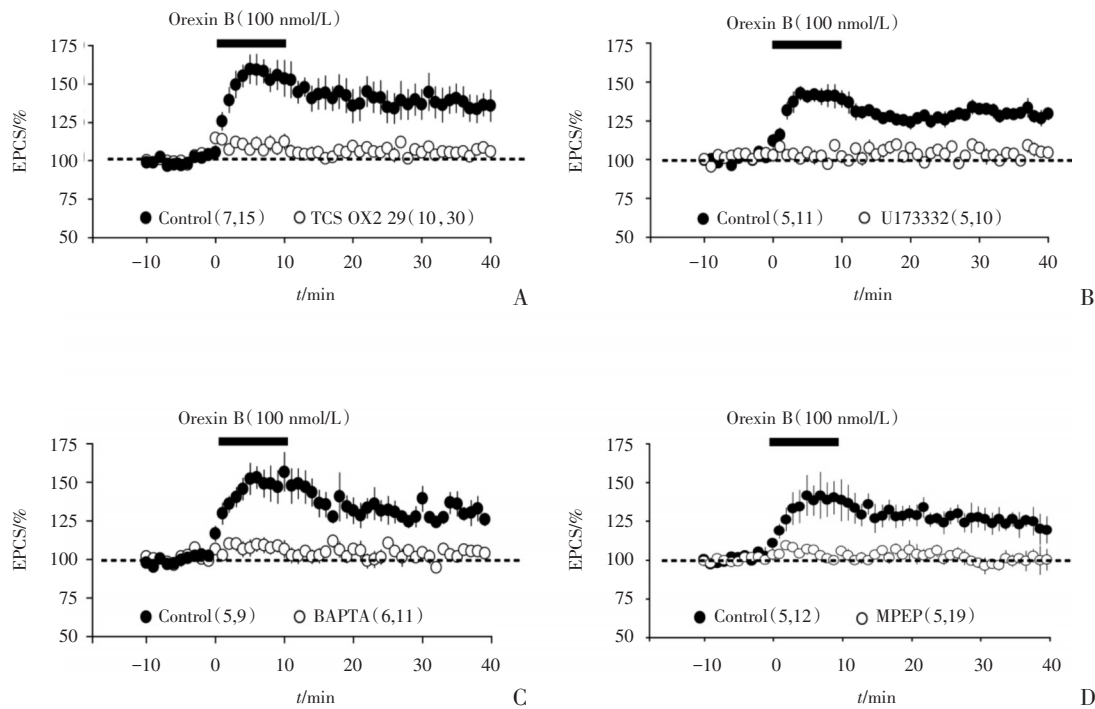
图5 Orexin B增强视皮层L6b层中Orexin B敏感神经元上接受第2/3层神经传入通路的突触传递

Fig.5 Orexin B enhanced the synaptic transmission onto Orexin B-sensitive neurons in layer 6b from layer 2/3 input

2.5 Orexin B 的突触传递增强效应由 ORX2 介导, mGluR5 的参与, 并激活 PLC 引起胞内 Ca^{2+} 上调而产生

为探索 Orexin B 增强第 2/3 层传递到 Orexin B 敏感神经元的突触传递的具体机制, 我们首先加入 OX2R 受体的阻断剂 TCS OX2R 29 ($10 \mu\text{mol/L}$), 发现增强现象被阻断[加入 Orexin B 并洗脱后 20~25 min, (Ctr: $(119.33 \pm 2.51)\%$, $n = 15$ cells, 7 mice; TCS OX229: $(103.17 \pm 2.75)\%$, $n = 30$ cells, 10 mice); 图 6A; unpaired t -test, $P = 0.000$]。为了研究 OX2R 受体激活后引起的细胞内分子机理, 我们加入磷脂酶 C (phospholipases C, PLC) 的阻断剂 U173332 后, Orexin B 的增强作用也被阻断 [Ctr: $(125.51 \pm 1.4)\%$, $n = 11$ cells, 5 mice; U173332: $(103.89 \pm 1.04)\%$, $n = 10$ cells, 5 mice; 图 6B, unpaired t -test, $P = 0.000$], 表明 OX2R 受体激活后,

导致细胞内的 PLC 活性上调。在电极内液中加入 BAPTA (胞内 Ca^{2+} 的螯合剂 10 mmol/L), 细胞破膜形成全细胞模式 5 min 后开始记录, 以使 BAPTA 扩散进入细胞。在 BAPTA 存在的情况下, Orexin B 的增强效应也完全被阻断 [Ctr: $(125.54 \pm 1.53)\%$, $n = 11$ cells, 5 mice; BAPTA: $(102.86 \pm 1.7)\%$, $n = 9$ cells, 4 mice; 图 6C; unpaired t -test, $P = 0.000$]。因此, Orexin B 的增强作用需要胞内 Ca^{2+} 水平升高。加入受体 mGluR5 的拮抗剂, MPEP ($10 \mu\text{mol/L}$), Orexin B 的增强效应也被阻断 [Ctr: $(126.14 \pm 3.87)\%$, 12 cells, 5 mice; MPEP: $(106.32 \pm 2.65)\%$, $n = 12$ cells, 6 mice, unpaired t -test, $P = 0.000$], 表明 Orexin B 调控第 2/3 层传入到 L6b 中的 orexin 敏感神经元的突触增强效应是由 ORX2 介导, mGluR5 的参与, 并激活 PLC 引起胞内 Ca^{2+} 上调而引起。



A: Time course of changes in EPSC amplitude after application of Orexin B (100 nmol/L) recorded in the neurons labeled by CTB555 in normal ACSF (filled circles) and in the presence of TCS OX2R 29 ($10 \mu\text{mol/L}$, open circles). The effect of Orexin B was blocked by TCS OX2R 29; B: Time course of changes in EPSC amplitude after application of Orexin B (100 nmol/L) recorded in the neurons labeled by CTB555 in normal ACSF (filled circles) and in the presence of U 173332 ($10 \mu\text{mol/L}$, open circles). The effect of Orexin B was blocked by U 173332. C: Time course of changes in EPSC amplitude after application of Orexin B (100 nmol/L) recorded in the neurons labeled by CTB555 in normal internal solution (filled circles) and in the internal solution with Ca^{2+} chelator (BAPTA, 10 mmol/L , open circles). The effect of Orexin B was blocked by BAPTA. D: Time course of changes in EPSC amplitude after application of Orexin B (100 nmol/L) recorded in the neurons labeled by CTB555 in normal ACSF (filled circles) and in the presence of MPEP ($10 \mu\text{mol/L}$, open circles). The effect of Orexin B was blocked by MPEP.

图6 Orexin B 增强食欲素敏感神经元接受第 2/3 层神经传入的突触传递的机制

Fig.6 The mechanisms of Orexin B to enhance synaptic transmission onto Orexin B-sensitive neurons from layer 2/3 inputs

3 讨论

大脑皮层由 6 层组成,各层中呈现出不同的神经细胞类型以及不同的神经连接。作为多形细胞层的第 6 层又分为位于浅部的第 6a 层(L6a)和深部临近白质(white matter, WM)的 6b 层(L6b)^[14-16]。尽管有报道^[12]发现视皮层 L6b 亚层中的一些细胞对 Orexin 敏感,即激活 Orexin B 可以直接兴奋 L6b 中的一些神经元。但没有明确具体的神经细胞类型。本研究发现 Orexin B 能直接兴奋第 6 层中的大部分的锥体神经元和多极神经元,但 Orexin B 不直接兴奋 L6b 中的水平朝向神经元,倒置朝向神经元和不定朝向神经元。我们还发现在 L6b 中由 CTB555 标记的、反馈投射到外膝体的神经元 92.5% 为锥体神经元,且这些锥体神经元中有 63.3% 对 Orexin 敏感^[17],因此, Orexin B 除了直接兴奋由外膝体逆行标记的锥体神经元和多极神经元外,还增强第 2/3 层传入到位于 L6b 中由 CTB 555 标记的,反馈投射到外膝体的锥体神经元之间的突触传递。

探索 L6b 中 Orexin 敏感细胞的形态和神经连接以及 Orexin 在视皮层内部突触传递中的效应对理解 Orexin 在视觉处理中的作用至关重要。视觉信号由视网膜传送到丘脑的外膝体,信号经处理后主要传递到视皮层第 4 层,少量传至到第 2/3 层以及第 5/6 层^[18-19],而视皮层的第 6 层也将接受视皮层第 2/3 层的信号反馈传递给丘脑背侧外膝体(dLGN)和丘脑侧后核群(LP),从而形成重要的反馈环路^[20-21]。第 6 层到外膝体的反馈环路在视觉信息的筛选和精练中起重要作用。第 6 层细胞的活动加强,即加强了 L6b 细胞到外膝体的反馈控制可以锐化 LGN 的视觉信息并传到第 4 层,因此,第 6 层细胞是外膝体信息传入的监控器,放大或减弱 LGN 到视皮层的信息输入^[22]。研究结果提

示: Orexin B 通过增强第 2/3 到第 6 层锥体细胞的突触传递和直接兴奋第 6 层的锥体神经元两个途径来强化第 6 层细胞的活动,加强到外膝体的反馈控制。由于 Orexin 的主要作用是维持动物的觉醒状态^[1-2],据此推测动物在清醒的状态,投射到视皮层的 Orexin 系统激活后强化第 6 层细胞的活动,可使动物在清醒、警觉的状态下更为有效地对视觉信息有效的筛选,增强视皮层对视觉信息的分辨率。

食欲素直接兴奋大脑中的某些神经元,特别是在感觉皮层的机制已有详细的报道^[12], Orexin 使神经元产生缓慢而持久的去极化,这种变化足以使神经元爆发动作电位,若神经元已经爆发动作电位, Orexin 则可以提高其放电频率。概括起来, Orexin 对神经元的去极化可归因于三个机制: ①在静息电位时关闭钾离子通道^[23]; ②Na⁺/Ca²⁺ 交换器的激活^[24-25]; ③非选择性阳离子通道(NSCCS)的激活^[26-27]。我们的结果表明在视皮层, Orexin B 选择性地作用于 L6b 中的锥体神经元。 Orexin B 增加了 mEPSC 的振幅,但频率却不受影响,表明 Orexin B 对 L6b 中的锥体神经元的作用是通过直接的突触后作用。第 6 层锥体细胞膜上的 OX2R 在 Orexin B 的激活下发挥作用。

尽管已有研究表明初级视皮层第 6b 是对 Orexin 有反应的唯一亚层^[12]。然而 Orexin B 参与对第 6b 层其敏感的神经元接受的传入纤维的突触传递的调控至今未见报道。本文研究了 Orexin B 调节小鼠视皮层 L6b 层锥体神经元接受来自 L2/3 信息传入的突触传递的效应以及生理学机制,发现 Orexin B 增强 L6b 的锥体神经元接受第 2/3 层传入纤维的突触传递,这种突触增强效应由 ORX2 介导, mGluR5 的参与,并激活 PLC 引起胞内 Ca²⁺ 上调而引起。在视觉信息传递过程中,通过接收 L2/3 的前馈传入,从而增强第 6b 锥体细胞的兴奋性。

参考文献

- [1] Branch AF, Navidi W, Tabuchi S, et al. Progressive loss of the orexin neurons reveals dual effects on wakefulness[J]. *Sleep*, 2016, 39(2): 369-377.
- [2] Sakurai T, Mieda, M. Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(8): 451-462.
- [3] Walker LC, Lawrence AJ. The role of orexins/hypocretins in alcohol use and abuse[J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2017, 33: 221-246.
- [4] Martin-Fardon R, Cauvi G, Kerr TM, et al. Differential role of hypothalamic orexin/hypocretin neu-

- rons in reward seeking motivated by cocaine versus palatable food[J]. *Addict Biol*, 2018, 23(1): 6–15.
- [5] James MH, Mahler SV, Moorman DE, et al. A decade of orexin/hypocretin and addiction: where are we now?[J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2017, 33: 247–281.
- [6] Chieffi S, Carotenuto M, Monda V, et al. Orexin system: the key for a healthy life[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 357.
- [7] Xu TR, Yang Y, Ward R, et al. Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(12): 2413–2423.
- [8] Nixon JP, Smale L. A comparative analysis of the distribution of immunoreactive orexin A and B in the brains of nocturnal and diurnal rodents [J]. *Behav Brain Funct*, 2007, 3: 28.
- [9] Burgess CR, Scammell TE. Narcolepsy: neural mechanisms of sleepiness and cataplexy [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(36): 12305–12311.
- [10] Ciriello J, Caverson MM. Hypothalamic orexin-A (hypocretin-1) neuronal projections to the vestibular complex and cerebellum in the rat[J]. *Brain Res*, 2014, 1579: 20–34.
- [11] Inutsuka A, Yamanaka A. The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 18.
- [12] Bayer L, Serafin M, Eggermann E, et al. Exclusive postsynaptic action of hypocretin-orexin on sublayer 6b cortical neurons [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(30): 6760–6764.
- [13] Marx M, Feldmeyer D. Morphology and physiology of excitatory neurons in layer 6b of the somatosensory rat barrel cortex[J]. *Cereb Cortex*, 2013, 23(12): 2803–2817.
- [14] Kanold PO, Luhmann HJ. The subplate and early cortical circuits [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2010, 33: 23–48.
- [15] Radnikow G, Feldmeyer D. Layer- and cell type-specific modulation of excitatory neuronal activity in the neocortex[J]. *Front Neuroanat*, 2018, 12: 1.
- [16] Marx M, Qi G, Hanganu-Opatz IL, et al. Neocortical layer 6b as a remnant of the subplate – a morphological comparison[J]. *Cereb Cortex*, 2017, 27(2): 1011–1026.
- [17] 童昕, 黄梦瑶, 蒋斌. 食欲素 B 增强外膝体纤维投射至视皮层第 6b 层锥体细胞的突触传递[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2020, 41(2): 201–209.
- Tong X, Huang MY, Jiang B. Orexin B enhances the synaptic transmission from LGN to Orexin sensitive neurons in L6b of visual cortex [J]. *J Sun Yat-sen Univ (med sci)*, 2020, 41(2): 201–209.
- [18] Constantinople CM, Bruno RM. Deep cortical layers are activated by thalamus [J]. *Science*, 2013, 340(6140): 1591–1594.
- [19] Morgenstern NA, Bourg J, Petreanu L. Multilaminar networks of cortical neurons integrate common inputs from sensory thalamus [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(8): 1034–1040.
- [20] Hoerder-Suabedissen A, Hayashi S, Upton L, et al. Subset of cortical layer 6b neurons selectively innervates higher order thalamic nuclei in mice [J]. *Cereb Cortex*, 2018, 28(5): 1882–1897.
- [21] Andolina IM, Jones HE, Wang W, et al. Corticothalamic feedback enhances stimulus response precision in the visual system [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(5): 1685–1690.
- [22] Yang ST, Wang M, Paspalas CD, et al. Core differences in synaptic signaling between primary visual and dorsolateral prefrontal cortex [J]. *Cereb Cortex*, 2018, 28(4): 1458–1471.
- [23] Li GY, Zhuang QX, Zhang XY, et al. Ionic mechanisms underlying the excitatory effect of orexin on rat subthalamic nucleus neurons [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 153.
- [24] Liu ZL, Wu X, Luo YJ, et al. Signaling mechanism underlying the histamine-modulated action of hypoglossal motoneurons [J]. *J Neurochem*, 2016, 137(2): 277–286.
- [25] Kukkonen JP. Orexin/hypocretin signaling [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2017, 33: 17–50.
- [26] Leonard CS, Kukkonen JP. Orexin/hypocretin receptor signalling: a functional perspective [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(2): 294–313.
- [27] Sachidanandan D, Reddy HP, Mani A, et al. The neuropeptide Orexin-A inhibits the GABAA receptor by PKC and Ca²⁺/CaMKII-dependent phosphorylation of its beta1 subunit [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(4): 459–467.

(编辑 余 菁)