

PD 模型小鼠未定带 GABA 能神经元的放电变化

李昂,陈凤华,王紫君,石丽敏

(青岛大学医学部基础医学院生理学与病理生理学系,山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 探讨 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的帕金森病(PD)模型小鼠未定带 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元的放电变化。方法 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 14 只,随机分为对照组及 MPTP 组,每组 7 只。MPTP 组采用连续 5 d 腹腔注射 MPTP($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)的方法制备 PD 小鼠模型,对照组注射等量生理盐水。利用免疫荧光技术观察小鼠黑质区酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元的数目变化,旷场实验观察小鼠运动行为变化,膜片钳技术观察未定带区 GABA 能神经元的放电变化。结果 与对照组相比,MPTP 组小鼠黑质区 TH 阳性神经元数目明显减少($t=2.775, P<0.05$);旷场检测结果显示,MPTP 组小鼠在旷场中的运动距离较对照组明显减少($t=17.870, P<0.001$);MPTP 组小鼠未定带区 GABA 能神经元放电频率较对照组降低,差异具有统计学意义($t=5.895, P<0.001$)。结论 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠未定带 GABA 能神经元放电频率显著降低。

[关键词] 帕金森病;未定带;GABA 能神经元;电生理学;小鼠

[中图分类号] R338.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)03-0345-04

doi:10.11712/jms.2096-5532.2023.59.096

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://link.cnki.net/urlid/37.1517.R.20230804.1521.004>;

2023-08-04 18:31:34

CHANGE IN GABAERGIC NEURON FIRING IN THE ZONA INCERTA IN A MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE LI

Ang, CHEN Fenghua, WANG Zijun, SHI Limin (Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the firing change of gamma-aminobutyric acid (GABA)-ergic neurons in the zona incerta in a mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). **Methods** Fourteen 8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into control group and MPTP group, with seven mice in each group. A MPTP model was prepared by intraperitoneal injection of MPTP ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for continuous five days in the MPTP group. The control group was injected with an equal amount of normal saline. The number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the substantia nigra was determined by the immunofluorescence technique. The locomotor activity of mice was observed by the open field test. The firing change of GABAergic neurons in the zona incerta was measure using the patch clamp technique. **Results** Compared with that of the control group, the number of TH-positive neurons in the substantia nigra of the MPTP group was significantly reduced ($t=2.775, P<0.05$). The MPTP group showed a significantly shorter distance of movement in the open field than the control group ($t=17.870, P<0.001$). The firing rate of GABAergic neurons in the zona incerta was significantly lower in the MPTP group than in the control group ($t=5.895, P<0.001$). **Conclusion** In the MPTP-induced PD model in mice, the firing rate of GABAergic neurons in the zona incerta was significantly reduced.

[KEY WORDS] Parkinson disease; zona incerta; GABAergic neurons; electrophysiology; mice

帕金森病(PD)是一种常见的神经退行性疾病,主要发生于老年人^[1],其神经病理学基础是黑质致密带多巴胺能神经元选择性丢失,纹状体轴突末梢多巴胺含量减少,基底神经核直接和间接通路失衡^[2-3],从而引起一系列运动症状,包括静止性震颤、运动迟缓、僵硬和姿势不稳等^[4]。脑深部电刺激是临床治疗 PD 运动症状的高效治疗手段,被认为能干预被刺激核团神经元的放电活动,并影响相关神

经传导通路的信息传递,从而调控脑区的功能^[5]。丘脑底核和苍白球内侧部是最经典的刺激靶点,最近的研究表明未定带也可作为脑深部电刺激的靶点,未定带电刺激与丘脑底核电刺激相比效果相似甚至更优^[6-8],且无明显副作用,病人术后吞咽、认知和语言功能均未受影响^[9]。脑深部电刺激改善 PD 病人运动症状的机制可能是影响了神经元的放电活动^[10],但在 PD 状态下未定带神经元的放电是否发生了变化目前尚不清楚。本实验选用神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备 PD 小鼠模型,利用脑片膜片钳技术观察其未定带 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元的放电变化,为了解未定带

[收稿日期] 2022-12-02; **[修订日期]** 2023-06-16

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(32171132)

[第一作者] 李昂(1998-),女,硕士研究生。

[通信作者] 石丽敏(1982-),女,博士,副教授,硕士生导师。E-mail:liminshi@qdu.edu.cn。

在 PD 进展和治疗中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

SPF 级 8 周龄 C57BL/6 小鼠,由北京维通利华公司提供。小鼠饲养于 25 ℃、12 h 昼夜循环光照条件下,可自由饮水、摄食、活动。动物手术符合青岛大学动物伦理学要求。MPTP 购自美国 Sigma 公司,酪氨酸羟化酶(TH)抗体购于美国 Millipore 公司。参考文献方法配制人工脑脊液及冷冻切片液进行脑片膜片钳实验^[11]。

1.2 分组及给药方法

将 26 只小鼠随机分为对照组和 MPTP 组,每组 13 只,其中 7 只小鼠用于旷场实验和免疫荧光实验,6 只小鼠用于脑片膜片钳实验。MPTP 组小鼠连续 5 d 腹腔注射 MPTP(30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹),对照组小鼠连续 5 d 腹腔注射等量生理盐水。

1.3 旷场实验

在给药结束 24 h 后进行旷场实验,将小鼠放于旷场测试盒里,让其自由活动,利用 Ethvision XT7 系统设定好旷场程序,将待测小鼠放在测试盒的中心位置,点击开始,计时 10 min 记录小鼠的运动情况。每次检测结束后用体积分数 0.75 的乙醇及擦手纸擦拭,彻底清理测试盒,散去味道后开始下一只小鼠的测试,避免陌生味道对小鼠行为产生干扰。

1.4 脑标本采集

旷场实验结束之后进行脑标本的采集。麻醉小鼠,固定其四肢,暴露心脏,将静脉注射针头小心插入左心室同时剪开右心耳。先用 9 g/L 的 NaCl 对小鼠进行灌注,再应用 40 g/L 的多聚甲醛溶液(用 0.1 mol/L 的 PBS 配制,pH 值 7.2~7.4,现用现配,4 ℃ 避光保存)对小鼠进行灌注。待小鼠肝脏由红色变为黄白色且四肢和尾部出现僵直时,停止灌注操作。立刻取出小鼠大脑,在 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定过夜,再用 200 g/L 蔗糖溶液(用 0.1 mol/L 的 PBS 配制)脱水,大脑沉底后,转入到 300 g/L 蔗糖溶液中脱水,大脑沉入底部提示脱水完成。

1.5 脑组织切片及免疫荧光染色

用恒温冷冻切片机(Leica,CM1950)进行冷冻切片。切片之前将机器预冷至-20 ℃,将脑组织用包埋剂 OCT(Sakura Finetek)包埋并固定在冻头托上。将小鼠脑组织切成厚度为 20 μm 的脑片,黑质区脑片切成完整的 4 套,将脑片置于含有 0.01 mol/

L PBS 溶液的 12 孔板中放在 4 ℃ 保存,进行免疫荧光实验时取出完整的 1 套进行染色。使用 TH 一抗(稀释比为 1 : 1 000,rabbit)和 PBST 稀释的荧光二抗(donkey anti-rabbit 555,稀释比为 1 : 500),参照文献方法进行免疫荧光染色^[12]。在 Olympus 光学显微镜下拍片,应用 OlyVIA 软件进行计数。计数该套脑片在 20 倍物镜下黑质区 TH 阳性神经元个数,再乘以 4 即可得到黑质区 TH 阳性神经元的个数。统计黑质区每个高倍视野(400 倍)内的阳性细胞数目并取平均值。

1.6 离体未定带脑片制备及电生理学记录

记录电极由水平拉制仪拉制而成,尖端直径为 1~2 μm。选取电阻为 4~9 MΩ 的玻璃电极进行实验。参考文献的方法进行离体未定带脑片的制备及电生理学记录^[11]。

1.7 统计学分析

应用 Graph Pad Prism 6 软件进行统计学分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PD 模型小鼠黑质 TH 阳性神经元数目及运动行为的变化

免疫荧光染色结果显示,与对照组相比,MPTP 组小鼠黑质区 TH 阳性神经元数目减少,差异具有统计学意义(*t* = 2.775, *P* < 0.05),提示小鼠出现黑质区多巴胺能神经元损伤。旷场实验结果显示,与对照组相比,MPTP 组小鼠在旷场中的运动距离明显减少(*t* = 17.870, *P* < 0.001),提示小鼠出现运动障碍,PD 模型制备成功。见图 1 及表 1。

表 1 两组小鼠黑质区 TH 阳性神经元数目及旷场运动距离比较(*n* = 7, $\bar{x} \pm s$)

组别	TH 阳性神经元(个)	运动距离(<i>l</i> /cm)
对照组	3 947 ± 823	2 476.79 ± 254.76
MPTP 组	2 785 ± 612 *	532.03 ± 78.70 **

与对照组比较,**t* = 2.775, *P* < 0.05; ***t* = 17.870, *P* < 0.001。

2.2 PD 模型小鼠未定带 GABA 能神经元的放电变化

在全细胞记录形成之后,转为电流钳模式,给予神经元-200 pA 的超极化电流刺激,神经元膜电位未出现显著的内向整流特征,且在 Gap free 模式下,神经元表现出较快且规则的自发放电活动,判断

为 GABA 能神经元^[13]。本实验记录到的未定带神经元放电频率约为 24.17 Hz,动作电位时程较短,半宽高为(1.36±0.65)ms,符合 GABA 能神经元的放电特征。本实验在每组 6 只小鼠中各记录 10 个神经元,对照组和 MPTP 组小鼠未定带 GABA 能

神经元放电频率分别为(24.17±8.60)和(6.73±2.18)Hz,MPTP 组小鼠未定带 GABA 能神经元放电频率较对照组显著降低($t=5.895,P<0.001$)。提示在 PD 状态下,未定带 GABA 能神经元放电活动发生了变化。见图 2。

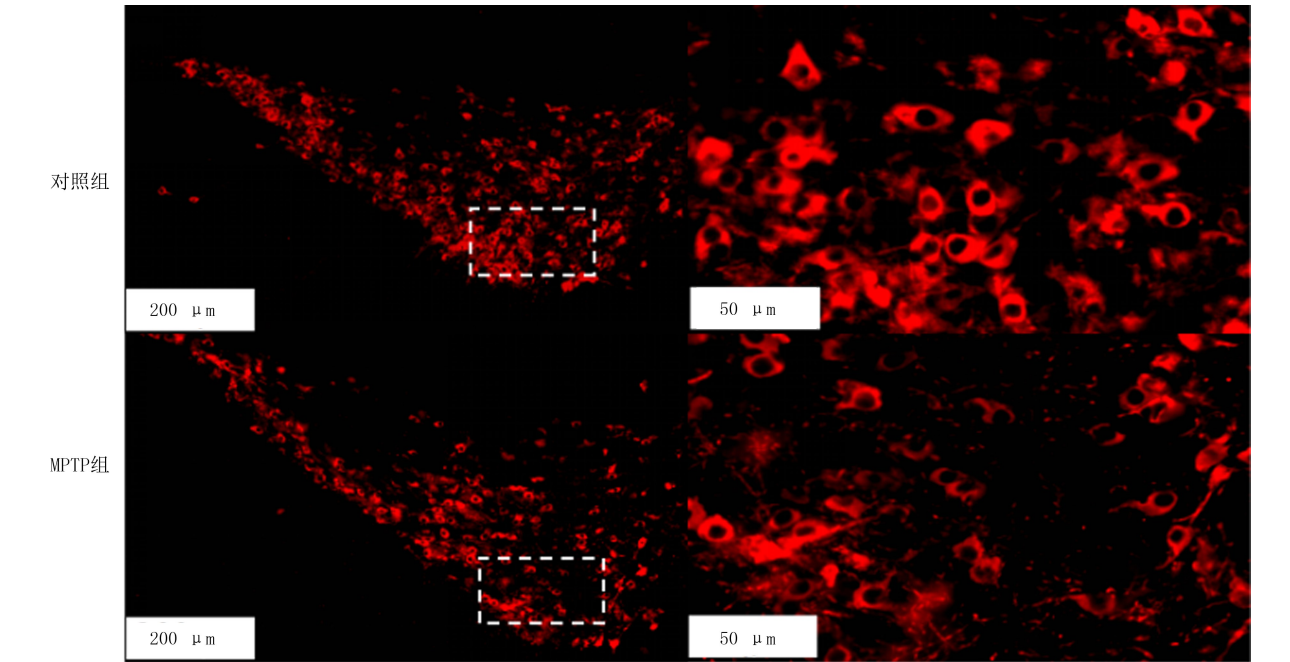


图 1 PD 模型小鼠黑质区 TH 阳性神经元数目变化

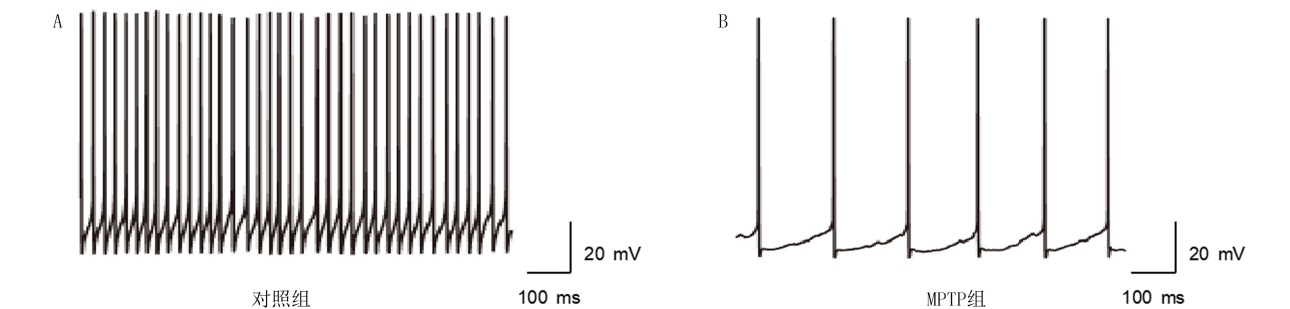


图 2 PD 模型小鼠未定带 GABA 能神经元的放电变化

3 讨 论

未定带是底丘脑的重要核团,被认为是中脑网状结构的吻部延伸,主要含 GABA 能神经元^[14]。在啮齿类动物中,未定带大致分为 4 个亚区(吻侧区、背侧区、腹侧区和尾侧区),各亚区与不同的大脑区域具有纤维联系,如背侧区和吻侧区的 GABA 能神经元投射到皮质和丘脑,腹侧区的 GABA 能神经元投射到基底前脑和脑干,尾侧区接收来自小脑的纤维投射。此外,未定带内部的 GABA 能神经元之间也有互相联系^[7]。通过复杂的纤维投射,未定带在机体多种功能的调控中均发挥重要作用,影响摄

食、姿势与运动、睡眠与觉醒、大脑皮质发育、神经病理痛等多种生理病理过程^[14-17]。

未定带与 PD 的研究近年来也受到较多关注。有临床研究观察到,在未定带实施脑深部电刺激术可显著改善 PD 病人的运动症状^[18],这提示在 PD 疾病状态下,未定带神经元出现异常的电活动。已知大脑的许多功能都与神经元的电活动相关,脑深部电刺激术被认为能干预被刺激核团神经元的异常放电活动,并影响相关神经传导通路的信息传递,从而调控脑区的功能^[9]。本实验首次在 MPTP 制备的 PD 模型小鼠中,利用脑片膜片钳技术观察比较未定带 GABA 能神经元的自发放电活动变化。本

研究首先通过免疫荧光染色观察到黑质 TH 阳性神经元数目减少,证实多巴胺能神经元受损,旷场行为学检测进一步证明 PD 模型建立成功,然后观察到未定带 GABA 能神经元自发放电频率在模型小鼠中显著降低。以往研究也表明,在 PD 动物模型中,多个与 PD 发病相关核团神经元的电活动都出现了变化。例如,内侧苍白球神经元放电频率较正常动物增加 20%~50%,其中爆发式的放电类型显著增加^[19];PD 大鼠模型中黑质网状带区 GABA 能神经元自发放电频率显著增高,并且簇状放电的神经元增多^[20]。但神经元电活动出现变化的具体机制还不明确,推测可能与离子通道的开放程度有关。探索 PD 状态下神经元电活动的变化可为脑深部电刺激提供可选择的刺激靶点。鉴于本团队前期研究已经证实未定带神经元数目在 PD 小鼠模型中减少^[21],我们推测,在 PD 状态下未定带神经元出现损伤,同时放电活动降低。本实验为进一步了解未定带神经元在 PD 中的病理改变提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] BLOEM B R, OKUN M S, KLEIN C. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2021,397(10291):2284-2303.
- [2] TAO M Z, DOU K X, XIE Y J, et al. The associations of cerebrospinal fluid biomarkers with cognition, and rapid eye movement sleep behavior disorder in early Parkinson's disease [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2022,16:1049118.
- [3] JELLINGER K A. The pathobiological basis of depression in Parkinson disease: challenges and outlooks [J]. *Journal of Neural Transmission*, 2022,129(12):1397-1418.
- [4] PAJARES M, I ROJO A, MANDA G, et al. Inflammation in Parkinson's disease: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Cells*, 2020,9(7):1687.
- [5] YUAN G H, ZHENG Y J, WANG Y, et al. Multiscale entropy and small-world network analysis in rs-fMRI—new tools to evaluate early basal Ganglia dysfunction in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022,13:974254.
- [6] BAUMGARTNER A J, THOMPSON J A, KERN D S, et al. Novel targets in deep brain stimulation for movement disorders [J]. *Neurosurgical Review*, 2022,45(4):2593-2613.
- [7] OSSOWSKA K. Zona incerta as a therapeutic target in Parkinson's disease[J]. *Journal of Neurology*, 2020,267(3):591-606.
- [8] MARCO R D, BHARGAVA D, MACEROLLO A, et al. Could ZI have a role in DBS for Parkinson's disease? An observational study to optimize DBS target localization[J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2020,77:89-93.
- [9] PHILIPSON J, BLOMSTEDT P, FREDRICKS A, et al. Short- and long-term cognitive effects of deep brain stimulation in the caudal zona incerta versus best medical treatment in patients with Parkinson's disease[J]. *Journal of Neurosurgery*, 2020,134(2):357-365.
- [10] AUBIGNAT M, LEFRANC M, TIR M, et al. Deep brain stimulation programming in Parkinson's disease: introduction of current issues and perspectives[J]. *Revue Neurologique*, 2020,176(10):770-779.
- [11] CHANG X L, MA Z G, SHI L M, et al. Effects of ghrelin on the electrical activities of substantia nigra dopaminergic neurons treated with MPP [J]. *Neurochemistry International*, 2020,138:104780.
- [12] IM K, MARENINOV S, DIAZ M P, et al. An introduction to performing immunofluorescence staining[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019,1897:299-311.
- [13] TRAGESER J C, BURKE K A, MASRI R, et al. State-dependent gating of sensory inputs by zona incerta[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2006,96(3):1456-1463.
- [14] YANG Y, JIANG T, JIA X Y, et al. Whole-brain connectome of GABAergic neurons in the mouse zona incerta[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2022,38(11):1315-1329.
- [15] YE Q Y, ZHANG X B. Serotonin activates paraventricular thalamic neurons through direct depolarization and indirect disinhibition from zona incerta[J]. *The Journal of Physiology*, 2021,599(21):4883-4900.
- [16] OH S G, HWANG Y G, LEE H S. LIM homeobox 6 (Lhx6)⁺ neurons in the ventral zona incerta project to the core portion of the lateral supramammillary nucleus in the rat[J]. *Brain Research*, 2020,1748:147125.
- [17] HU T T, WANG R R, DU Y, et al. Activation of the intrinsic pain inhibitory circuit from the midcingulate Cg2 to zona incerta alleviates neuropathic pain[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2019,39(46):9130-9144.
- [18] STENMARK PERSSON R, NORDIN T, HARIZ G M, et al. Deep brain stimulation of caudal zona incerta for Parkinson's disease: one-year follow-up and electric field simulations[J]. *Neuromodulation*, 2022,25(6):935-944.
- [19] HOOVER J E, STRICK P L. The organization of cerebellar and basal ganglia outputs to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of Herpes simplex virus type 1[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 1999,19(4):1446-1463.
- [20] BOLAM J P, HANLEY J J, BOOTH P A, et al. Synaptic organisation of the basal Ganglia[J]. *Journal of Anatomy*, 2000,196(Pt 4):527-542.
- [21] 曹中凯,陈凤华,谢俊霞,等. 帕金森病模型小鼠 PV 和 NOS 阳性神经元数目变化[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2022,58(3):345-348.

(本文编辑 马伟平)