

研究论文

去甲肾上腺素通过 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体调制小鼠小脑皮层浦肯野细胞自发性放电活动

张旭东^{1,2,#}, 王丽菲^{3,#}, 玄芳玲^{1,2}, 邱德来^{1,2}, 张斌斌^{1,2,*}, 初春平^{1,2,*}

延边大学¹脑科学研究中心; ²医学院生理学与病理生理学教研室, 延吉 133002; ³长春科技学院医药学院基础医学部, 长春 130600

摘要: 小脑皮层浦肯野细胞(Purkinje cell, PC)具有简单峰电位(simple spike, SS)和复杂峰电位(complex spike, CS)两种放电形式。我们前期研究发现去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)能够抑制PC的CS, 双向调节SS, 但是NA对SS的增强作用被其兴奋分子层中间神经元产生的强烈抑制所掩盖, 目前为止NA对SS放电频率的增强作用机制尚不明确。因此本研究在活体小鼠小脑和急性小脑切片上, 应用细胞贴附式及全细胞膜片钳记录与药理学方法, 研究了NA增强小脑皮层PC的SS的机制。本研究全程采用100 $\mu\text{mol/L}$ picrotoxin阻断GABA_A受体。在体实验结果显示NA明显减少自发性CS的小穗(spikelets)数目, 增强SS放电频率, 而不影响CS的放电频率; 离体实验显示NA减少了电刺激诱发的CS小穗数目和后超极化电位(after hyperpolarization potential, AHP), 增加了SS放电频率, 同时NA也减小了平行纤维(parallel fiber, PF)-PC的兴奋性突触后电流(excitatory postsynaptic current, EPSC)的振幅, 明显提高了配对脉冲比值(paired-pulse ratio, PPR)。给予 $\alpha 2$ -肾上腺素能受体(adrenergic receptor, AR)阻断剂育亨宾(yohimbine)能够完全消除NA对SS的增强作用, 而 $\alpha 2$ -AR激动剂UK14304提高了SS放电频率。 β -AR阻断剂普萘洛尔(propranolol)不影响NA对PC的作用。上述结果表明阻断GABA能抑制性网络后, NA能够通过活化 $\alpha 2$ -AR (而不是 β -AR)减弱爬行纤维(climbing fiber, CF)-PC突触传递, 抑制CS, 减小AHP, 从而提高了PC的SS放电频率。该研究结果提示蓝斑核的NA能神经元能够通过调节CF-PC突触传递对PC信号输出进行精细微调节。

关键词: 去甲肾上腺素; 简单峰电位; 复杂峰电位; 小脑浦肯野细胞; GABA_A受体; 肾上腺素能受体

Noradrenaline modulates the spontaneous firing activities of Purkinje cells via $\alpha 2$ -adrenergic receptor in mouse cerebellar cortex

ZHANG Xu-Dong^{1,2,#}, WANG Li-Fei^{3,#}, XUAN Fang-Ling^{1,2}, QIU De-Lai^{1,2}, ZHANG Bin-Bin^{1,2,*}, CHU Chun-Ping^{1,2,*}

¹Brain Science Research Center of Yanbian University; ²Department of Physiology and Pathophysiology, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China; ³Department of Basic Medicine, College of Medicine, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China

Abstract: Cerebellar Purkinje cells (PCs) exhibit two types of discharge activities: simple spike (SS) and complex spike (CS). Previous studies found that noradrenaline (NA) can inhibit CS and bidirectionally regulate SS, but the enhancement of NA on SS is overwhelmed by the strong inhibition of excitatory molecular layer interneurons. However, the mechanism underlying the effect of NA on SS discharge frequency is not clear. Therefore, in the present study, we examined the mechanism underlying the increasing effect of NA on SS firing of PC in mouse cerebellar cortex *in vivo* and in cerebellar slice by cell-attached and whole-cell recording technique and pharmacological methods. GABA_A receptor was blocked by 100 $\mu\text{mol/L}$ picrotoxin in the whole process. *In vivo* results showed that NA significantly reduced the number of spikelets of spontaneous CS and enhanced the discharge frequency of SS, but did not

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31760273, 32171005, 32070986).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. CHU Chun-Ping: Tel: +86-434-2435988, E-mail: cpchu@ybu.edu.cn; ZHANG Bin-Bin: Tel: +86-434-2435052, E-mail: bbZhang@ybu.edu.cn

affect the discharge frequency of CS. *In vitro* experiments showed that NA reduced the number of CS spikelets and after hyperpolarization potential (AHP) induced by electrical stimulation, and increased the discharge frequency of SS. NA also reduced the amplitude of excitatory postsynaptic current (EPSC) of parallel fiber (PF)-PC and significantly increased the paired-pulse ratio (PPR). Application of yohimbine, an antagonist of α 2-adrenergic receptor (AR), completely eliminated the enhancing effect of NA on SS. The α 2-AR agonist, UK14304, also increased the frequency of SS. The β -AR blocker, propranolol, did not affect the effects of NA on PC. These results suggest that in the absence of GABA_A receptors, NA could attenuate the synaptic transmission of climbing fiber (CF)-PC via activating α 2-AR, inhibit CS activity and reduce AHP, thus enhancing the SS discharge frequency of PC. This result suggests that NA neurons of locus coeruleus can finely regulate PC signal output by regulating CF-PC synaptic transmission.

Key words: noradrenaline; simple spike; complex spike; cerebellar Purkinje cell; GABA_A receptor; adrenergic receptor

小脑是重要的运动控制中枢, 参与维持躯体平衡、调节肌肉张力, 同时还参与认知过程、感觉辨别以及随意运动^[1-3]。哺乳类动物小脑皮层可分为三层, 由表及里分别是分子层 (molecular layer, ML)、浦肯野细胞层 (Purkinje cell layer, PCL) 以及颗粒细胞层 (granule cell layer, GCL), 主要含有篮状细胞 (basket cell, BC)、星型细胞 (stellate cell, SC)、浦肯野细胞 (Purkinje cell, PC)、颗粒细胞 (granule cell, GrC) 及高尔基细胞 (Golgi cell, GoC) 等 5 种神经元。除 GrC 为兴奋性神经元外, 其它均是以 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 作为神经递质的抑制性神经元。PC 接收并整合传入小脑皮层的各种信息, 同时作为小脑皮层唯一的传出神经元, 将整合后的信息传递至小脑深部核 (deep cerebellar nuclei, DCN)^[2-7], 并进行运动调节。小脑皮层中 PC 典型的电活动特征表现为在自发性简单峰电位 (simple spike, SS) 中间伴有不规则的复杂峰电位 (complex spike, CS)^[1]。

外部信息可以通过 3 条途径传入小脑: 第一条是经爬行纤维 (climbing fiber, CF), 它是来自下橄榄核的投射纤维, 传入的兴奋性冲动可引起 PC 兴奋, 产生 CS; 第二条是经苔状纤维 (mossy fiber, MF) 传入的外部信息可通过 GrC 的平行纤维 (parallel fiber, PF) 来兴奋 PC, 使 SS 增多; 第三条是多层纤维途径^[1-4], 来自脑内神经调节中枢的单胺能神经纤维, 即多层投射纤维通路^[4, 8], 其中脑干蓝斑核 (locus coeruleus, LC) 的去甲肾上腺素 (noradrenaline, 也称 norepinephrine, 缩写 NA) 能纤维投射到包括 ML、PCL 以及 GCL 的小脑皮层, 这些神经元的投射纤维进入小脑后, 层层分支, 遍及小脑的每一个部分。这条传入途径在小脑中的生理作用及其调节机制还不被人们所熟知, 其功能调节尚不十分明确。

研究报道, LC 投射到小脑的 NA 能神经纤维

在紧邻 PC 树突处形成轴突膨体^[9]。在体实验结果显示, LC 激活时释放的 NA 可引起小脑皮层 PC 自发性 SS 放电频率降低和 ML 中间神经元-PC 的 GABA 能突触传递增强, 提示 NA 可调节小脑皮层的抑制性突触传递^[10]; 同时也有人认为 NA 可调节小脑皮层的 PF-PC 兴奋性突触传递^[11-13]。另一方面, 抑制 CS 或者去除下橄榄核能够增加 PC 的 SS 放电活动^[16-19], 反之, 反复刺激 CF 使 SS 活动减少, 甚至最终停止活动^[16, 17], 说明 CF-PC 突触传递效能变化对 SS 放电活动调节意义重大。有研究报道, NA 对 PC 具有双向调节作用^[11], 本课题组前期研究结果显示 NA 能够抑制 CS 活动^[14, 15], 双向调节 SS 活动^[4], 但是 NA 对 SS 活动的增强作用被其兴奋 ML 中间神经元产生的强烈抑制作用所掩盖, 目前为止 NA 对 SS 放电频率的增强作用机制尚不明确。因此, 本研究应用在体小鼠小脑和离体小脑切片, 结合电生理学、神经药理学方法, 研究 NA 增强小鼠小脑皮层 PC 的 SS 放电活动的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验动物选用 4~6 周龄的 ICR 小鼠 (雌雄各半), 体重 18~22 g, 由吉林大学实验动物中心提供, 许可证号为 SYSK (吉 2007-0011)。分笼进行饲养并自由摄食、饮水, 动物室温度为 (22 ± 2) °C, 湿度为 (55 ± 5)%。所有实验操作均遵循国际动物保护条例, 并受延边大学动物保护委员会的监督。

1.2 实验药品 NA 购于英国 Tocris 公司, 乌拉坦 (Urethane)、UK14304、育亨宾 (yohimbine, Yohi)、普萘洛尔 (propranolol, Pro)、picrotoxin、NaCl、KCl、CaCl₂、NaH₂PO₄、NaHCO₃、D-葡萄糖等试剂全部购于 Sigma 公司。

1.3 实验动物准备 在体实验: 小鼠用 20% 的乌

拉坦 (1.3 g/kg) 进行腹腔注射麻醉, 待无角膜反射后, 将其放置在特制的脑立体定位仪上。参照小鼠脑立体定位图谱^[20], 在小脑 Vermis 处行直径为 1~1.5 mm 的开颅术, 小心除去硬脑膜, 暴露出记录区域。手术暴露的部位使用蠕动泵 (MiniPuls 3, Gilson, France) 持续灌流人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF, mmol/L): 125 NaCl、3 KCl、1 MgSO₄、2 CaCl₂、1 NaH₂PO₄、5 NaHCO₃、10 D- 葡萄糖, pH 值为 7.4, 渗透压保持在 290~300 mOsm, 速度为 0.5 mL/min。在整个手术和记录过程中, 使用体温维持仪和加热垫保证动物体温维持在 (37.0 ± 0.2) °C。

离体实验: 小鼠用异氟烷吸入麻醉并迅速断头取脑, 置于充氧 (95% O₂/5% CO₂) 的冰 ACSF 中。随后使用 Vibratome 全自动震动切片机 (VT 1200S, Leica, Germany) 制备 300 μ m 厚的小脑皮层矢状切片, 在室温条件 (24~25 °C) ACSF 中孵育 60 min 以上, 再进行电生理记录。

1.4 电生理记录 参照我们之前的文献报道^[4, 14, 15]。在体实验: 通过细胞外记录模式记录 PC 的电生理活动。利用微电极拉制仪 (PB-10, Narishige, Japan) 将细玻璃管 (外径: 1.5 mm) 拉制成记录电极, 电极阻抗为 4~6 M Ω 。记录电极内加入 10 μ L ACSF, 在显微镜 (Nikon Eclipse E600FN, Japan) 下确定具体的记录部位, 通过微操纵仪 (Sutter, USA) 将电极慢慢刺入软脑膜下 (150~200 μ m), 找到 PC 放电, 通过调节记录电极与 PC 的距离, 调整 PC 的放电振幅为 0.5 mV 以上。判定 PC 放电的依据是有规律性的 SS 中夹杂不规则的 CS^[1, 7]。PC 放电记录采用型号为 Axopatch-200B 的膜片钳放大器和 Clampfit 10.4 数据采集与分析软件 (Molecular Device, USA)。离体实验: 通过全细胞膜片钳技术记录 PC 电活动。记录电极内液 (mmol/L): 120 葡萄糖酸钾, 10 HEPES, 1 EGTA, 5 KCl, 3.5 MgCl₂, 4 NaCl, 4 Na₂ATP, 0.2 Na₂GTP (pH 7.3; 渗透压 300 mOsm)。记录电极阻抗为 4~6 M Ω , 系统电阻在 10~20 M Ω 范围内。而刺激电极内加入 ACSF, 其阻抗为 0.1~0.5 M Ω 。记录电极与刺激电极均被安装于电动微操作器 (Sutter, USA), 将刺激电极置于小脑的 GCL (刺激 CF) 或 ML (刺激 PF)。采用全细胞膜片钳记录模式, 膜电位或电流使用 Axopatch 700B 放大器监测, 以 5 kHz 过滤后, 使用 Clampex 10.4 软件, 通过 Digidata 1440 系列模拟-数字接口采集到电脑中。只有记录完整且基线相对稳定的实验数据用于最后的处理和

分析。后超极化电位 (after-hyperpolarization potential, AHP) 的测量是在膜电位位置画一条水平线, CS 之后超极化部分的最低点到该直线的垂直距离为 AHP 的幅值。数据的标准化是将所有的数据均除以对照组的均值乘以 100%。CS 的小穗 (spikelets) 数目是对照、给药中和给药后各 100 s CS 的小穗个数的总和除以 CS 个数, 然后进行标准化。

实验中所需的实验药品均溶解于 ACSF 中, 通过蠕动泵进行给药。本研究是在阻断 GABA_A 受体活性的前提下进行的, 因此均在记录前 15 min 在 ACSF 中加入 GABA_A 受体阻断剂 100 μ mol/L picrotoxin, 其它药品均在含有 picrotoxin 的 ACSF 中配制。

1.5 统计学分析 电生理数据采用 Clampfit 10.4 软件进行分析。所有的数据表示为 mean ± SEM。用 SPSS17.0 软件对数据进行统计学分析, 使用 *t* 检验和单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验组间差异是否具有显著性。*P* < 0.05 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在阻断 GABA_A 受体活性条件下, NA 对小鼠小脑皮层 PC 放电活动的影响

我们研究了阻断 GABA_A 受体活性后 PC 自发性 CS 的变化。如图 1 所示, 在 GABA_A 受体阻断剂 100 μ mol/L picrotoxin 存在的条件下, 与之前的结果相似, NA 仍然抑制 CS 的小穗数目 [对照: (100.00 ± 5.63)%; 25 μ mol/L NA: (75.17 ± 5.33)%, *P* < 0.05, 图 1A、C], 没有影响 CS 的频率 [对照: (100.00 ± 3.44)%; 25 μ mol/L NA: (99.52 ± 3.65)%, *P* > 0.05, 图 1A、B], 结合前期研究结果, 说明无论有无 GABA_A 受体作用, NA 都不影响自发性 CS 的放电频率, 都能明显减弱自发性 CS 的活动, 提示 NA 对 CS 的抑制作用是对 CS 的直接作用。

因为自发性 CS 出现没有规律且频率变化大^[16, 18, 21], 为进一步对比研究 NA 调节 CS 和 SS 活动的影响及其相互作用机制, 我们采用了离体小脑切片实验, 通过电刺激 CF 诱发产生 CS, 采用固定诱发 CS 频率的方式, 观察 SS 活动的变化。在 GABA_A 受体阻断剂 100 μ mol/L picrotoxin 存在的条件下, 电流钳模式记录 PC 电活动, 同时用 1 Hz, 5 个脉冲 (刺激波宽 0.2 ms) 的电刺激刺激 CF, 诱发 PC 产生 CS, 然后对比给予 25 μ mol/L NA 对 PC 的 SS 放电

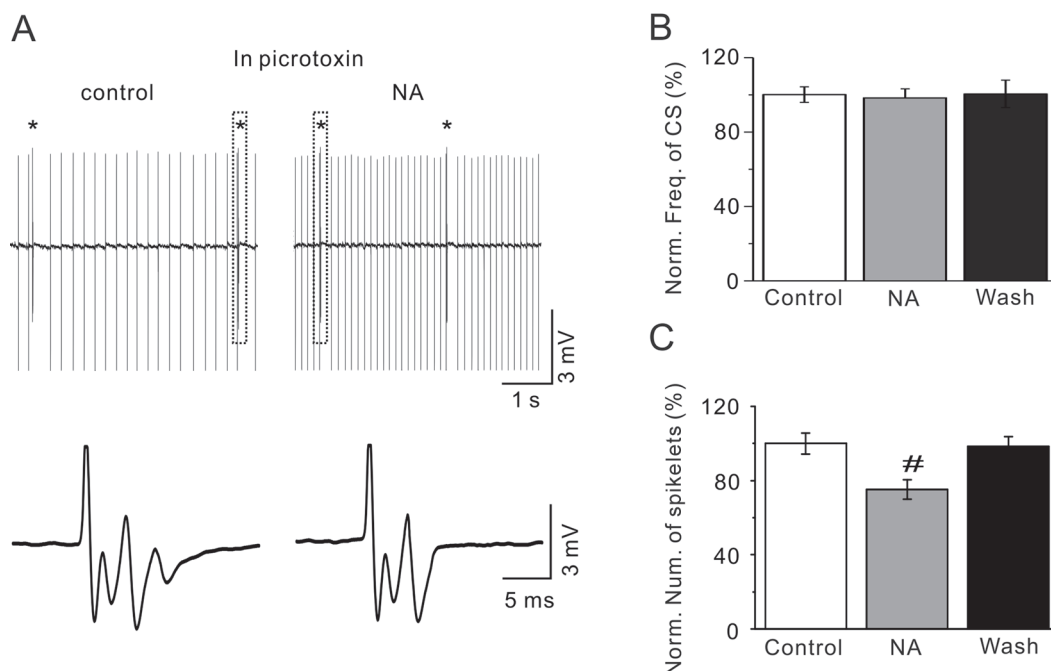


图 1. 在阻断GABA_A受体活性条件下去甲肾上腺素对在体小鼠浦肯野细胞自发性复杂峰电位活动的影响

Fig. 1. Effects of noradrenaline (NA) on the complex spike (CS) activity of cerebellar Purkinje cells (PCs) *in vivo* in the absence of GABA_A receptors activity. *A*: Upper panel: two representative traces showing the spontaneous firing recorded from a PC in treatments: (left) control (in artificial cerebrospinal fluid; ACSF) and (right) 25 μmol/L NA in the presence of 100 μmol/L picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). CSs are indicated by asterisks. Lower panel: enlarged trace of CS from the upper quadrangle. *B*: Summary of data shows the normalized frequency of CS in control, NA and washout. *C*: Pooled data showing the normalized spikelet number of CS in control, NA and washout. [#] $P < 0.05$ vs control, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

频率和CS活动的影响(图2, 3)。结果显示, NA增加了PC的SS放电频率[对照: $(100.00 \pm 1.45)\%$; 25 μmol/L NA: $(116.25 \pm 3.64)\%$, $P < 0.05$, 图2A, B], 同时伴有PC的CS小穗数目减少[对照: $(100.00 \pm 0.80)\%$; 25 μmol/L NA: $(75.55 \pm 6.03)\%$, $P < 0.05$, 图3A, B]和AHP减小[对照: $(100.00 \pm 2.20)\%$; 25 μmol/L NA: $(82.33 \pm 5.06)\%$, $P < 0.05$, 图3A, C]。上述结果提示给予NA能够减弱离体小脑切片PC的CS活动, 减小AHP, 增强SS活动。

2.2 NA对PF-PC突触传递的影响

PF是PC的兴奋性输入, PC的SS放电频率增强可能与PF的兴奋性输入增多有关^[4, 22], 因此我们在离体小鼠小脑切片上观察了NA对PF-PC突触传递的影响。在阻断GABA_A受体的情况下, 将刺激电极放置于ML, 在电压钳记录条件下采用配对脉冲电刺激PF(波宽0.2 ms, 10~100 μA, 双脉冲间隔50 ms), 诱发PC产生兴奋性突触后电流(evoked-excitatory postsynaptic currents, eEPSCs)。结果显示, 与对照 $[(100.00 \pm 1.39)\%]$ 相比, NA显著

抑制电刺激诱发PC EPSC1(P1)和EPSC2(P2)的振幅[25 μmol/L NA: $(90.52 \pm 2.82)\%$, $P < 0.05$, 图4A、B、C]。同时, NA还能够显著提高配对脉冲比值(paired-pulse ratio, PPR, P2/P1 ratio)(对照: 1.399 ± 0.040 ; 25 μmol/L NA: 1.630 ± 0.060 , $P < 0.05$, 图4D)。这些结果表明, 阻断GABA_A受体的抑制作用, NA仍然可以抑制PF-PC突触传递, 且这种作用是通过抑制突触前活动来实现的, 提示NA不是通过增强PF-PC突触传递引起SS放电频率增多, NA的这种增强作用另有原因。

2.3 CF-PC突触传递在NA调节SS放电活动中的作用

PC电活动的调节十分复杂, CS是CF-PC突触传递在PC诱发的电活动, 有报道称CS对SS的活动具有调节作用^[16, 17], CS活动增强则抑制SS的活动, CS活动减弱则可以增强SS的活动。我们之前的研究结果表明^[14], NA可以通过活化α2-肾上腺素能受体(adrenergic receptor, AR)抑制CS活动, 因此, 本研究在阻断GABA_A受体的情况下, 应用α2-AR阻断剂Yohi(100 μmol/L)观察了NA(25 μmol/L)

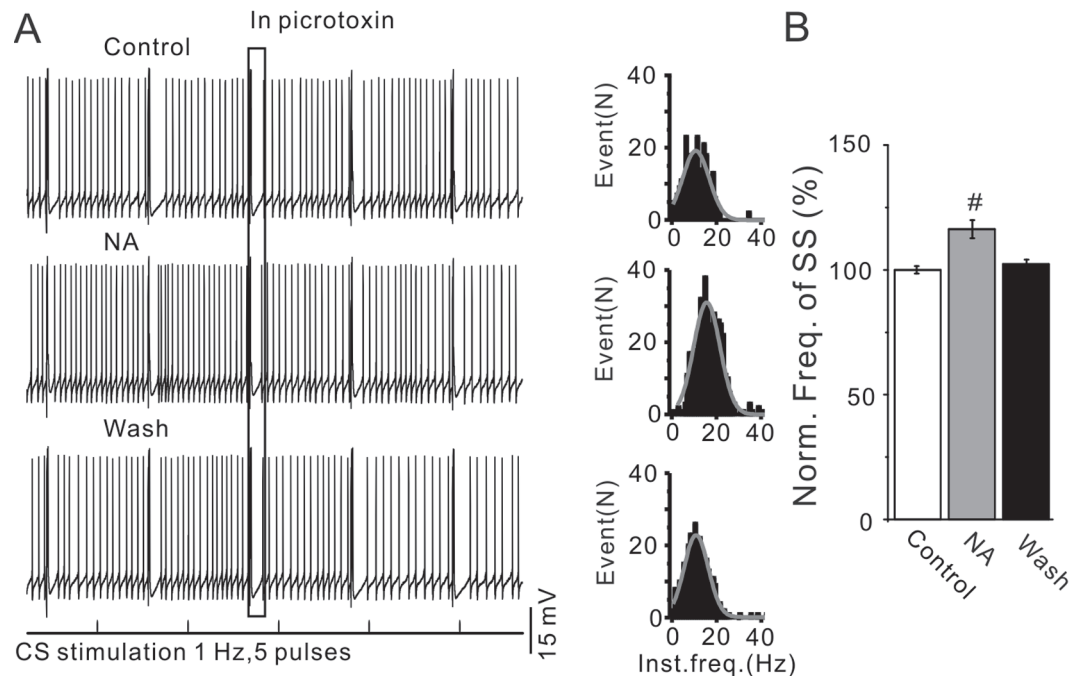


图 2. 在离体切片上阻断GABA_A受体活性条件下去甲肾上腺素对浦肯野细胞的简单峰电位放电频率的影响
Fig. 2. Effects of noradrenaline (NA) on simple spike (SS) firing rate of cerebellar Purkinje cells (PCs) *in vitro* in the absence of GABA_A receptors activity. A: Left: three representative traces showing the SS firing recorded from a PC in treatments: (upper) control, (middle) 25 μ mol/L NA and (lower) washout in the presence of 100 μ mol/L picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). Right: instant frequency histogram (bin = 0.5 s) showing the SS events of the PC in treatments of (upper) control, (middle) NA and (lower) washout. B: Bar graph showing normalized frequency of SS in control, NA and washout. [#] $P < 0.05$ vs control, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

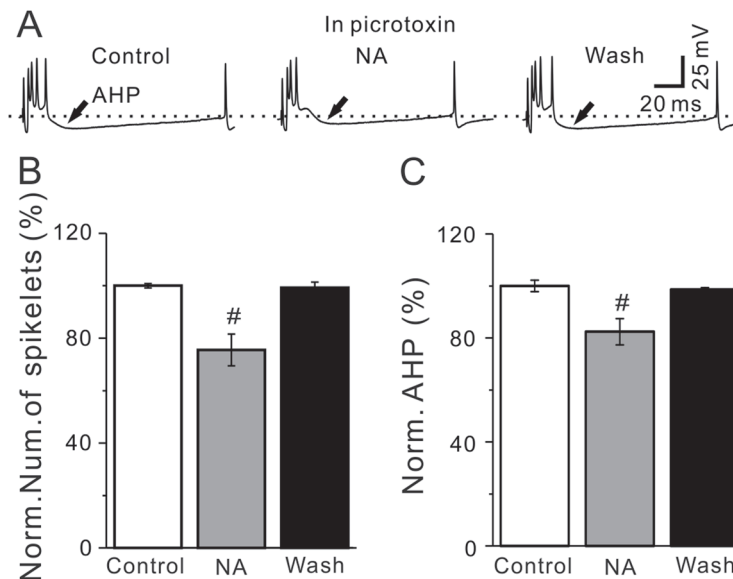


图 3. 在离体切片上阻断GABA_A受体活性条件下去甲肾上腺素对电刺激诱发浦肯野细胞的复杂峰电位活动的影响
Fig. 3. Effects of noradrenaline (NA) on electric stimulus-evoked complex spike (eCS) activity of cerebellar Purkinje cells (PCs) *in vitro* in the absence of GABA_A receptors activity. A: Representative traces showing the eCS activity recorded from a PC in treatments: control, 25 μ mol/L NA and washout in the presence of 100 μ mol/L picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). After-hyperpolarization potential (AHP) is indicated by a black arrow. B: Summary of data showing the normalized number of eCSs spikelets in each treatment. C: Pooled data showing the normalized AHP of eCSs in each treatment. [#] $P < 0.05$ vs control, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

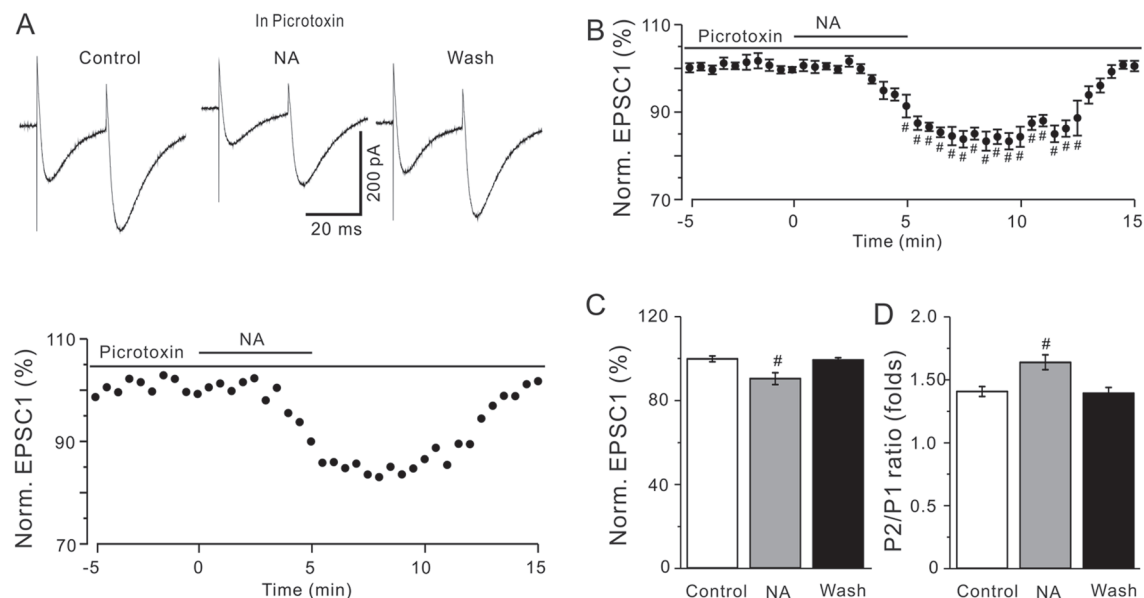


图 4. 在离体切片上阻断GABA_A受体活性条件下去甲肾上腺素对电刺激诱发平行纤维-浦肯野细胞兴奋性突触后电流的影响
Fig. 4. Effects of noradrenaline (NA) on electric stimulus-evoked parallel fiber (PF)-Purkinje cell (PC) evoked-excitatory postsynaptic current (EPSC) of cerebellar PCs in the absence of GABA_A receptors activity *in vitro*. **A:** Upper: three representative traces showing the electric stimulus-evoked PF-PC EPSC recorded from a PC in treatments: control, 25 $\mu\text{mol/L}$ NA and washout in the presence of 100 $\mu\text{mol/L}$ picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). Lower: the time course of the normalized EPSC1 before and after delivery of the NA. **B:** Summary of data showing the time course of the normalized EPSC1 before and after delivery of the NA. **C:** Pooled data showing the normalized EPSC1 in control, NA and washout. **D:** Summary of data showing the P2/P1 ratio (paired-pulse ratio, PPR) in each treatment. # $P < 0.05$ vs control, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

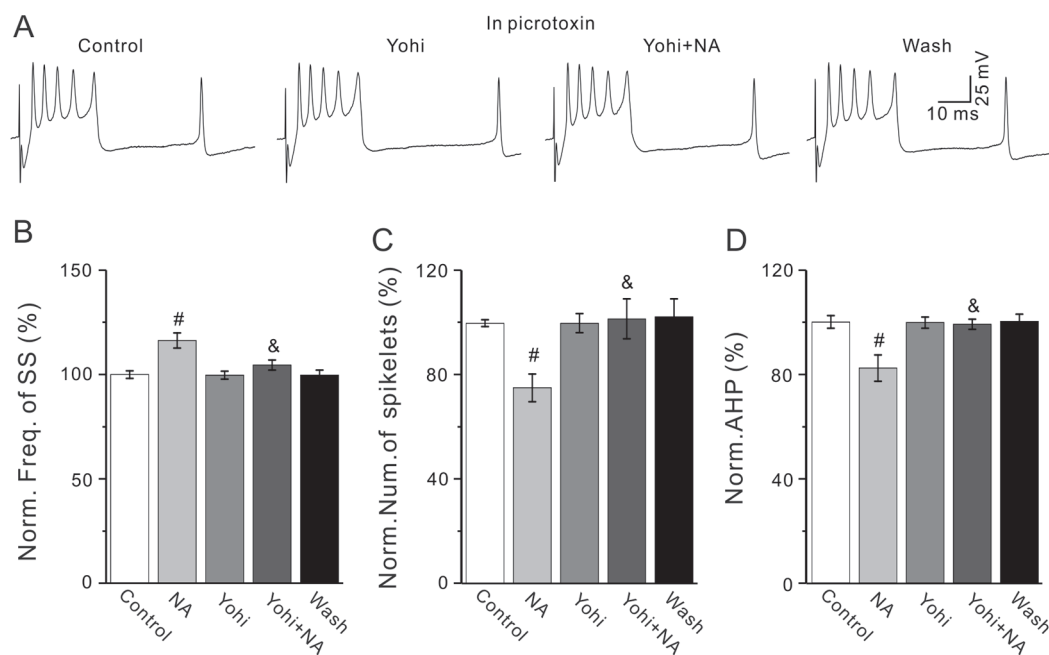


图 5. 在阻断GABA_A受体活性条件下阻断 α_2 -AR时NA对离体小鼠小脑PC SS和eCS活动的影响
Fig. 5. Effects of NA on the SS and eCS activity of cerebellar PCs when blocking α_2 -AR activity in the absence of GABA_A receptors activity *in vitro*. **A:** Representative traces showing the eCS activity recorded from a PC in treatments: control, 100 $\mu\text{mol/L}$ Yohi (α_2 -AR antagonist), 100 $\mu\text{mol/L}$ Yohi+25 $\mu\text{mol/L}$ NA and washout in the presence of 100 $\mu\text{mol/L}$ picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). **B:** Summary of data showing the normalized frequency of SS in control, NA, Yohi, Yohi+NA and washout. **C, D:** Pooled data showing the normalized spikelet number (C) and AHP (D) of eCS in each treatment. # $P < 0.05$ vs control, & $P < 0.05$ vs NA, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

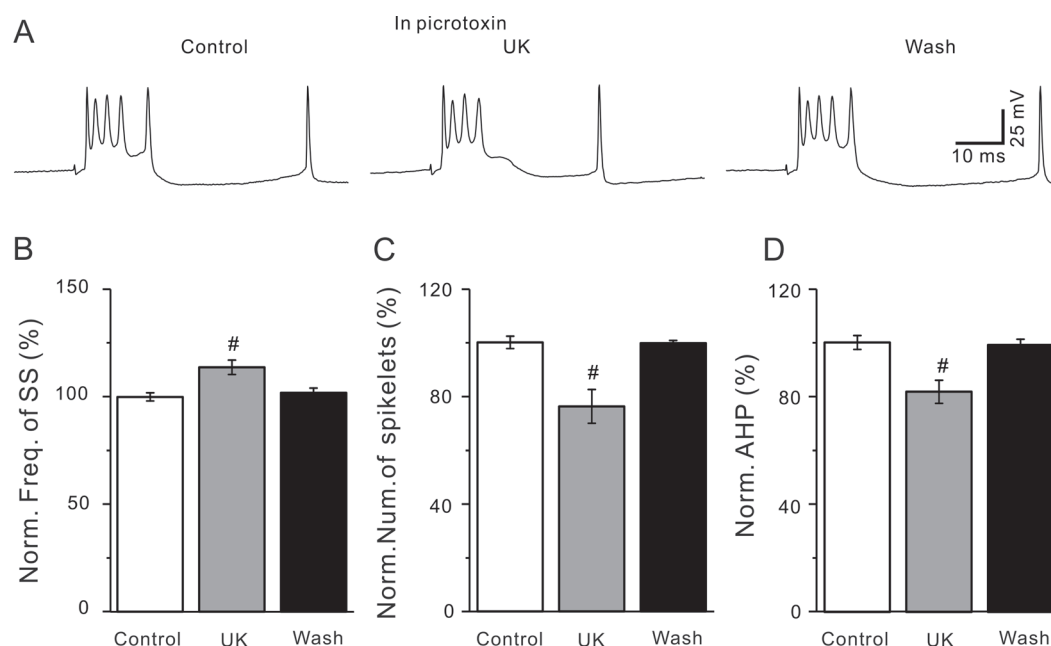


图 6. 在阻断GABA_A受体活性条件下活化 $\alpha 2$ -AR对离体小鼠小脑PC SS和eCS活动的影响

Fig. 6. Effects of activating $\alpha 2$ -AR on the SS and eCS activity of cerebellar PCs in the absence of GABA_A receptors activity *in vitro*. A: Representative traces showing the eCS activity recorded from a PC in treatments: control, 1 μ mol/L UK ($\alpha 2$ -AR agonist) and washout in the presence of 100 μ mol/L picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). B: Summary of data showing the normalized frequency of SS in control, UK, and washout. C, D: Pooled data showing the normalized spikelet number (C) and AHP (D) of CS in each treatment. [#] $P < 0.05$ vs control, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

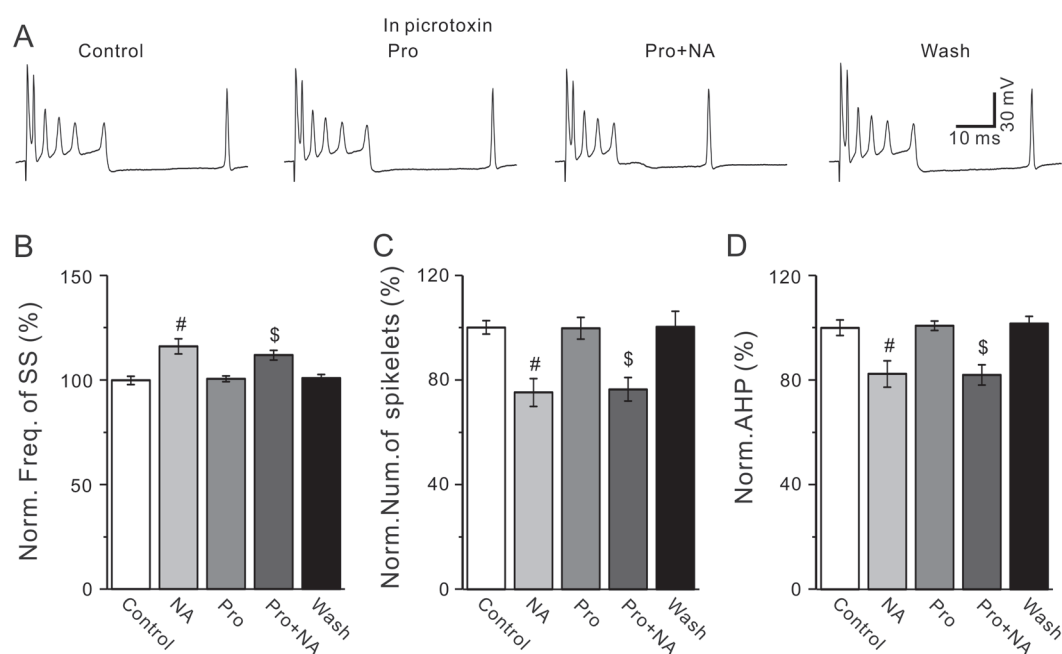


图 7. 在阻断GABA_A受体活性条件下阻断 β -AR活性时NA对离体小鼠小脑PC SS和eCS活动的影响

Fig. 7. Effects of NA on the SS and eCS activity of cerebellar PCs when blocking β -AR activity in the absence of GABA_A receptors activity *in vitro*. A: Representative traces showing the eCS activity recorded from a PC in treatments: control, 100 μ mol/L Pro (β -AR blocker), 100 μ mol/L Pro + 25 μ mol/L NA and washout in the presence of 100 μ mol/L picrotoxin (GABA_A receptor antagonist). B: Summary of data showing the normalized frequency of SS in control, NA, Pro, Pro+NA and washout. C, D: Pooled data showing the normalized spikelet number (C) and AHP (D) of CS in each treatment. [#] $P < 0.05$ vs control, ^{\$} $P < 0.05$ vs Pro, mean $\pm$ SEM, $n = 6$.

对 PC SS 和 eCS (evoked complex spike) 活动的影响。结果显示 Yohi 阻断了 NA 对 SS 的增多作用 [对照: $(100.00 \pm 1.84)\%$; NA: $(116.25 \pm 3.64)\%$; Yohi: $(99.72 \pm 1.90)\%$; Yohi+NA: $(104.52 \pm 2.43)\%$, NA 和 Yohi+NA 比较 $P < 0.05$, 图 5A], 同时也阻断了 NA 对 eCS 小穗的抑制作用 [对照: $(100.00 \pm 1.29)\%$; NA: $(75.17 \pm 5.33)\%$; Yohi: $(100 \pm 3.65)\%$; Yohi+NA: $(101.67 \pm 7.71)\%$, NA 和 Yohi+NA 比较 $P < 0.05$, 图 5B] 以及对 AHP 的减小作用 [对照: $(100.00 \pm 2.44)\%$; NA: $(82.33 \pm 5.06)\%$; Yohi: $(99.75 \pm 2.14)\%$; Yohi+NA: $(99.14 \pm 1.88)\%$, NA 和 Yohi+NA 比较 $P < 0.05$, 图 5C]。以上结果提示, 阻断 $\alpha 2$ -AR 活性消除了 NA 对 CS 的抑制作用和对 SS 的放电频率的增强作用, 表明 NA 对 SS 的影响可能主要是通过调节 CS 来实现的。为了进一步证明这一假设, 我们又应用了 $\alpha 2$ -AR 激动剂 UK14304, 结果显示和 NA 的结果相同, $1 \mu\text{mol/L}$ UK14304 明显增强 SS 的活动 [对照: $(100.00 \pm 1.87)\%$; UK: $(113.77 \pm 3.33)\%$, $P < 0.05$, 图 6A, B], 同时也抑制 CS 的小穗数目 [对照: $(100.00 \pm 2.33)\%$; UK: $(76.19 \pm 6.31)\%$, $P < 0.05$, 图 6C] 和 AHP [对照: $(100.00 \pm 2.56)\%$; UK: $(81.70 \pm 4.30)\%$, $P < 0.05$, 图 6D]。这些结果提示, NA 可能通过 $\alpha 2$ -AR 调节 CS 的活动, 从而影响 SS 活动, 即通过抑制 CF-PC 突触传递增强 PC 的 SS 放电频率。

2.4 β -AR 在 NA 增强 SS 放电频率中的作用

有报道显示, β -AR 通过突触后作用能够增强 PC 的兴奋性^[11, 23], 因此我们也观察了 β -AR 阻断剂 Pro 对 NA 增强 PC SS 放电活动作用的影响。结果显示, 给予 $50 \mu\text{mol/L}$ Pro 阻断 β -AR 受体后再给予 NA ($25 \mu\text{mol/L}$), PC 的 SS 频率与只给予 NA 时没有显著性差异 [对照: $(100.00 \pm 1.98)\%$; NA: $(116.25 \pm 3.64)\%$; Pro: $(100.67 \pm 1.38)\%$; Pro+NA: $112.124 \pm 2.35\%$, NA 和 Pro+NA 比较 $P > 0.05$, 图 7A、B], 同时对 NA 引起 CS 的小穗数目 [对照: $(100.00 \pm 2.58)\%$; NA: $(75.17 \pm 5.33)\%$; Pro: $(99.67 \pm 4.14)\%$; Pro+NA: $(76.33 \pm 4.48)\%$, NA 和 Pro+NA 比较 $P > 0.05$, 图 7C] 和 AHP 的变化 [对照: $(100.00 \pm 3.00)\%$; NA: $(82.33 \pm 5.06)\%$; Pro: $(100.81 \pm 1.77)\%$; Pro+NA: $(81.99 \pm 3.92)\%$, NA 和 Pro+NA 比较 $P > 0.05$, 图 7D] 均没有显著影响。以上结果表明, β -AR 在 NA 对 SS 活动的增强作用中没有明显作用。

3 讨论

本研究主要发现无论是在体还是离体 NA 都对 PC 的 CS 具有抑制作用, 使 CS 的小穗数目减少, 而对 SS 放电频率具有增强作用, NA 的这种增强 SS 频率的作用与活化 $\alpha 2$ -AR 从而抑制 CS 活动和减小 AHP 有关, 而与 PF-PC 突触传递和 β -AR 受体的作用没有明显关系。该研究结果揭示了 NA 对小脑皮层唯一输出神经元 PC 活动调节的复杂性, 表明 NA 可以通过改变 CS 活动即 CF-PC 突触传递对其在 PC 上的抑制程度进行调整, 这也可能正是小脑独具特色的精细调节运动功能的关键所在。

AR 广泛存在于小脑皮质的 ML、PCL 和 GL^[24, 25], 其内源性配体来自 LC 的 NA 能投射纤维。因为 NA 能神经纤维广泛投射于小脑皮层, 因此 NA 被认为参与调节小脑的学习与记忆神经环路。在体实验已经证实, 在小脑网络中 NA 的抑制性作用是通过激活 AR 来实现的^[12–15], 并且这种抑制作用存在浓度依赖性, 提示 NA 在小脑皮层网络中主要是抑制 PC 的活动。目前有研究认为: NA 可以增强 GABA 能的抑制输入和谷氨酸的兴奋性输入, 双向调节 PC 的自发活动, 但是在体内 NA 抑制性输入的作用很强, 掩盖了兴奋性输入的作用, 表现为抑制作用, 即 NA 通过双向调节小鼠小脑皮层抑制性和兴奋性输入的强弱影响 PC 的自发活动^[4]。

在阻断 GABA_A 受体的条件下, NA 能够增强 PC SS 的放电活动^[4], 然而这种增强作用的机制还不十分清楚。因此, 我们应用 GABA_A 受体阻断剂阻断来自 ML 中间神经元的抑制性输入后, 研究了 NA 对 PC 的 SS 活动的调节机制。因为小脑皮层中 5 种主要神经元的 4 种均为 GABA 能神经元, 为了充分阻断 GABA_A 受体的作用, 我们选用了较高浓度的 picrotoxin ($100 \mu\text{mol/L}$)^[26]。本研究的在体实验结果显示阻断 GABA_A 受体后小脑表面灌流 NA 对 CS 的影响与没有阻断时结果一样, PC 的自发性 CS 频率没有变化, 只有小穗数目减少, 同时对 SS 产生了增强作用, 我们之前的研究结果证实这种增强作用在阻断 AMPA 受体时消失^[4], 这提示其与 AMPA 受体参与的突触传递有关, 而 AMPA 受体在 PF-PC 与 CF-PC 突触传递中都起主要作用。为了探究这两者在 NA 兴奋 PC 中的作用, 本研究应用离体实验模拟在体实验, 采用 1 Hz 、5 个脉冲的刺激模式, 模拟小鼠小脑皮层 PC 自发性 CS 放电模式, 从而研究 NA 的作用机制。结果发现在

GABA_A受体阻断剂存在的情况下, PC的CS和SS频率变化和在体实验结果一致, 即NA能够增加SS的放电频率、减少CS的小穗数目和减小AHP(图2, 3), 这提示CS的变化可能与SS频率变化相关。此外PC还与GC的轴突PF形成突触联系, 当兴奋性传入信息传来, PF-PC突触前膜释放谷氨酸, 作用于突触后的AMPA受体, 提高SS的放电频率, 因此, 能够影响SS活动的因素都是我们需要进行排除的。我们又观察了NA对电刺激PF诱发PC产生EPSC的影响, 结果显示在缺乏GABA_A受体活动的基础上NA明显抑制了PF-PC突触传递, 减小EPSC1的幅值(图4), 并且使PPR增大, 这与Lippello等^[11]报道的结果一致, 也就是说即使阻断GABA_A受体NA仍然对PF-PC突触传递产生抑制作用, 而且这种抑制作用可能是通过突触前机制影响的, 结果表明NA可能通过活化突触前AR抑制了谷氨酸的释放, 使突触后膜活化的AMPA受体减少进而减弱PF-PC突触传递, 将使SS的放电频率下降, 因而, 这些结果表明NA对SS的增强作用不是通过PF-PC突触传递增强引起。

CF兴奋在PC产生一个强大的CS, 其包括1个短暂的钠动作电位和多个Ca²⁺依赖性小穗^[27], 有研究表明CF通过影响PC活动调节运动行为^[28]。CS的出现被认为是小脑皮质产生运动影响的一个重要信号, 其传递时间信息并参与突触可塑性的形成^[29-31]。研究报道, 抑制CS或者去除下橄榄核能够增加PC的SS放电活动^[16-19], 另外, 反复刺激CF能够引起SS进行性减少, 最终停止活动^[16, 17], 表明CS活动在SS的调节中具有重要意义, 我们的前期研究^[14, 15]显示NA能够影响CS的活动, 提示NA也可以通过影响CS对SS产生调节作用, NA对CS的抑制作用可能是SS增强的原因之一。下橄榄核的兴奋性信息经CF传入小脑皮层, 在CF-PC突触前膜释放谷氨酸, 作用于突触后膜的AMPA受体从而诱发产生CS, CS又对PC的SS产生一定的调节作用, CS增强SS则减弱, 反之亦然。我们的前期研究结果显示NA对CS有抑制作用^[14, 15], 因此, 本研究结果提示NA对SS增强作用可能是由于CF-PC突触传递减弱, 谷氨酸释放减少, 突触后膜激活的AMPA受体减少, CS产生的小穗数目减少, 从而降低了CS对SS的抑制作用, 结果使SS频率增加, 而正常情况下这种SS活动增强作用被GABA能的抑制作用所掩盖, 只有在阻

断GABA_A受体的情况下才能表现出来, 提示在NA抑制PC的SS活动的同时, 还可以通过调节下橄榄核自发性活动的传入, 随时修饰PC的传出信号, 从而改变PC对下级神经元的抑制程度, 以便达到精确调节小脑皮层的运动学习功能。

我们的前期研究结果显示, NA可以通过激活突触前而不是突触后 $\alpha 2$ -AR抑制CS^[14, 15], 为了进一步证明NA是否通过改变CS影响SS的放电频率, 我们研究了阻断或者活化 $\alpha 2$ -AR对NA的这种增强SS和抑制CS的影响。结果显示阻断 $\alpha 2$ -AR消除了NA对CS的抑制作用, 也使SS的增强作用消失(图5), 而单纯活化 $\alpha 2$ -AR时出现与NA相同的结果(图6), 即CS被抑制, SS频率增高, 提示NA对SS的增强作用与其抑制CS活动有关, 表明NA可以通过影响CS来调节SS的放电活动, 即当下橄榄核神经元的兴奋传到CF末端CF-PC突触前, NA通过活化CF-PC突触前膜上的 $\alpha 2$ -AR, 激活G蛋白耦联受体的Gi/o蛋白, 抑制腺苷酸环化酶, 减少cAMP, 降低PKA通路活性, 调节突触前谷氨酸的释放, 使突触前膜释放的谷氨酸减少, 从而使PC上产生的CS活动减弱^[15], CS减弱降低了对SS的抑制作用, 因而SS的放电频率增多。有报道表明, SS放电频率主要受T型钙通道以及小电导(small conductance, SK)和大电导(large conductance, BK)钙活化钾电流控制^[32], SK参与AHP的形成, 而AHP与一些神经元的动作电位产生密切相关^[33, 34], 还有研究结果显示, 在小脑皮层去除细胞外钙或螯合细胞内钙均可引起CS诱发的AHP振幅降低, 同时SS放电频率增加, 抑制SK通道活性可降低AHP波幅, 增加SS放电频率, 自发CF放电通过激活小鼠小脑PC中的SK通道有助于降低SS放电频率^[18], 反之, 减小CS引起的AHP能够增加PC的SS放电活动。本研究结果显示NA能减少CS小穗数目和减小AHP振幅, 提示NA对SS放电的增强作用可能通过减弱CS活动进而引起SK减少, 降低AHP的幅度进而增加了SS的放电频率, 但是这还需要进一步的实验证明。

一些研究结果显示, NA对PC活动的影响以抑制为主, 也有结果显示活化 β -AR可以引起神经元产生去极化, 主要的机制是通过降低钾离子电导减少钾外流, 激活腺苷酸环化酶易化超极化活化电流(I_h), 以及增强电压依赖性Ca²⁺电流^[35, 36]。另外, 还有报道显示, 在小脑皮层NA通过 β -AR引起

ML 中间神经元释放 GABA 从而产生了对 PC 的抑制作用^[37–39], 特异性 β -AR 激动剂可以兴奋小脑皮层 PF-PC 突触传递^[11], 突触后的 β -AR 活化能够直接调节 PC 的输出信号^[40, 41], 在海马和皮层神经元, 活化 β -AR 也可通过降低 K^+ 电导或激活腺苷酸环化酶使神经元去极化^[42, 43]。因此, 我们也观察了阻断 β -AR 对 NA 增强 SS 活动的影响, 结果显示阻断 β -AR 活性对 NA 引起的 PC 的 SS 增强作用没有影响 (图 7), 而且 β -AR 阻断剂也没有改变 NA 对 CS 的抑制作用, 表明 NA 对 SS 的增强作用不是通过活化突触后 β -AR 产生的, 这些结果与 Carey 和 Regehr^[44] 的结果一致, 这可能是由于 NA 与 β -AR 的亲和力较低, 也可能是由于剂量关系, 在本研究的实验条件下没有表现出突触后 β -AR 的兴奋作用, 至于内源性 NA 的作用还有待于进一步研究。

综上所述, 本研究结果提示 NA 不是通过增加 PF-PC 突触传递以及 β -AR 的直接兴奋作用使 PC 的 SS 放电频率增加, 至少一部分可能是通过活化的 $\alpha 2$ -AR 减弱下橄榄核传入信息引起的 CS 活动, 从而抑制了 AHP, 使 PC 的 SS 活动增强, 但是在 GABA_A 受体存在的情况下, 因为抑制作用强大而不能被观察到, 提示这样的调节机制也可能是多核团对小脑活动进行微调的一种模式, 因此, 本研究结果为明确小脑皮层微环路的调节机制提供了一定的理论数据。

参考文献

- Apps R, Hawkes R. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10(9): 670–681.
- Tang Y, An L, Yuan Y, Pei Q, Wang Q, Liu JK. Modulation of the dynamics of cerebellar Purkinje cells through the interaction of excitatory and inhibitory feedforward pathways. *PLoS Comput Biol* 2021; 17(2): e1008670.
- Bower JM. Model-founded explorations of the roles of molecular layer inhibition in regulating purkinje cell responses in cerebellar cortex: more trouble for the beam hypothesis. *Front Cell Neurosci* 2010; 4: 27.
- Guo A, Feng JY, Li J, Ding N, Li YJ, Qiu DL, Piao RL, Chu CP. Effects of norepinephrine on spontaneous firing activity of cerebellar Purkinje cells *in vivo* in mice. *Neurosci Lett* 2016; 629: 262–266.
- Mittmann W, Koch U, Häusser M. Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 2005; 563(Pt 2): 369–378.
- Han VZ, Magnus G, Zhang Y, Wei AD, Turner EE. Bidirectional modulation of deep cerebellar nuclear cells revealed by optogenetic manipulation of inhibitory inputs from Purkinje cells. *Neuroscience* 2014; 277: 250–266.
- Asan AS, Lang EJ, Sahin M. Entrainment of cerebellar purkinje cells with directional AC electric fields in anesthetized rats. *Brain Stimul* 2020; 13(6): 1548–1558.
- Lippiello P, Hoxha E, Cristiano C, Malvicini E, Stanley A, Russo R, Tempia F, Miniaci MC. Role of $\beta 3$ -adrenergic receptor in the modulation of synaptic transmission and plasticity in mouse cerebellar cortex. *J Neurosci Res* 2020; 98(11): 2263–2274.
- Abbott LC, Sotelo C. Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices. *J Comp Neurol* 2000; 426(2): 316–329.
- Bloom FE, Hoffer BJ, Siggins GR. Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of art cerebellum. I. Localization of the fibers and their synapses. *Brain Res* 1971; 25: 501–521.
- Lippiello P, Hoxha E, Volpicelli F, Lo Duca G, Tempia F, Miniaci MC. Noradrenergic modulation of the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mouse cerebellum. *Neuropharmacology* 2015; 89: 33–42.
- Moises HC, Woodward DJ. Potentiation of GABA inhibitory action in cerebellum by locus coeruleus stimulation. *Brain Res* 1980; 182(2): 327–344.
- Herold S, Hecker C, Deitmer JW, Brockhaus J. $\alpha 1$ -Adrenergic modulation of synaptic input to Purkinje neurons in rat cerebellar brain slices. *J Neurosci Res* 2005; 82(4): 571–579.
- Sun N, Li BX, Hong YJ, Bing YH, Qiu DL, Chu CP. Noradrenaline depresses spontaneous complex spikes activity of cerebellar Purkinje cells via $\alpha 2$ -adrenergic receptor *in vivo* in mice. *Neurosci Lett* 2019; 703: 38–44.
- Cui LN, Sun N, Li BX, Wang LF, Zhang XY, Qiu DL, Chu CP. Noradrenaline inhibits complex spikes activity via the presynaptic PKA signaling pathway in mouse cerebellar slices. *Neurosci Lett* 2020; 729: 135008.
- Barmack NH, Yakhnitsa V. Climbing fibers mediate vestibular modulation of both “complex” and “simple spikes” in Purkinje cells. *Cerebellum* 2015; 14(5): 597–612.
- Cerminara NL, Rawson JA. Evidence that climbing fibers control an intrinsic spike generator in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 2004; 24(19): 4510–4517.
- Jin XH, Wang HW, Zhang XY, Chu CP, Jin YZ, Cui SB, Qiu DL. Mechanisms of spontaneous climbing fiber discharge-evoked pauses and output modulation of cerebellar purkinje cell in mice. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 247.
- Montarolo PG, Palestini M, Strata P. The inhibitory effect of the olivocerebellar input on the cerebellar Purkinje cells in the rat. *J Physiol* 1982; 332: 187–202.

- 20 Franklin KBJ, Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Third edition. Elsevier/Academic Press, 2007.
- 21 Zang Y, De Schutter E. Climbing fibers provide graded error signals in cerebellar learning. *Front Syst Neurosci* 2019; 13: 46.
- 22 Chu CP, Zhao GY, Jin R, Zhao SN, Sun L, Qiu DL. Properties of 4 Hz stimulation-induced parallel fiber-Purkinje cell presynaptic long-term plasticity in mouse cerebellar cortex *in vivo*. *Eur J Neurosci* 2014; 39(10): 1624–1631.
- 23 Haggerty DC, Glykos V, Adams NE, Lebeau FE. Bidirectional modulation of hippocampal gamma (20–80 Hz) frequency activity *in vitro* via alpha(α)- and beta(β)-adrenergic receptors (AR). *Neuroscience* 2013; 253: 142–154.
- 24 Happe HK, Coulter CL, Gerety ME, Sanders JD, O'Rourke M, Bylund DB, Murrin LC. Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience* 2004; 123(1): 167–178.
- 25 Schambra UB, Mackensen GB, Stafford-Smith M, Haines DE, Schwinn DA. Neuron specific alpha-adrenergic receptor expression in human cerebellum: implications for emerging cerebellar roles in neurologic disease. *Neuroscience* 2005; 135(2): 507–523.
- 26 Beas BS, Wright BJ, Skirzewski M, Leng Y, Hyun JH, Koita O, Ringelberg N, Kwon HB, Buonanno A, Penzo MA. The locus coeruleus drives disinhibition in the midline thalamus via a dopaminergic mechanism. *Nat Neurosci* 2018; 21(7): 963–973.
- 27 Eccles JC, Llinas R, Sasaki K. The excitatory synaptic action of climbing fibres on the Purkinje cells of the cerebellum. *J Physiol* 1966; 182: 268–296.
- 28 Simpson JI, Wylie DR, De Zeeuw CI. On climbing fiber signals and their consequence(s). *Behav Brain Sci* 1996; 19: 384–398.
- 29 Welsh JP, Llinás R. Some organizing principles for the control of movement based on olivocerebellar physiology. *Prog Brain Res* 1996; 11: 449–461.
- 30 Hansel C, Linden DJ, D'Angelo E. Beyond parallel fiber LTD: The diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 2001; 4: 467–475.
- 31 Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 2001; 81: 1143–1195.
- 32 Swensen AM, Bean BP. Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 9650–9663.
- 33 Stocker M, Krause M, Pedarzani P. An apamin-sensitive Ca^{2+} activated KC current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4662–4667.
- 34 Pedarzani P, Mosbacher J, Rivard A, Cingolani LA, Oliver D, Stocker M, Adelman JP, Fakler B. Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 9762–9769.
- 35 Ramos BP, Arnsten AFT. Adrenergic pharmacology and cognition: Focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 523–536.
- 36 Marzo A, Bai J, Otani S. Neuroplasticity regulation by noradrenaline in mammalian brain. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7: 286–295.
- 37 Mitoma H, Konishi S. Monoaminergic long-term facilitation of GABA-mediated inhibitory transmission at cerebellar synapses. *Neuroscience* 1999; 88: 871–883.
- 38 Lin AM, Freund RK, Palmer MR. Ethanol potentiation of GABA-induced electrophysiological responses in cerebellum: requirement for catecholamine modulation. *Neurosci Lett* 1991; 122: 154–158.
- 39 Llano I, Gerschenfeld HM. Beta-adrenergic enhancement of inhibitory synaptic activity in rat cerebellar stellate and Purkinje cells. *J Physiol* 1993; 468: 201–224.
- 40 Hoffer BJ, Siggins GR, Bloom FE. Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. II. Sensitivity of Purkinje cells to norepinephrine and related substances administered by microiontophoresis. *Brain Res* 1971; 25: 523–534.
- 41 Siggins GR, Hoffer BJ, Bloom FE. Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. 3. Evidence for mediation of norepinephrine effects by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Brain Res* 1971; 25: 535–553.
- 42 Hagen H, Hansen N, Manahan-Vaughan D. β -Adrenergic control of hippocampal function: subserving the choreography of synaptic information storage and memory. *Cereb Cortex* 2016; 26: 1349–1364.
- 43 McBurney-Lin J, Lu J, Zuo Y, Yang H. Locus coeruleus-norepinephrine modulation of sensory processing and perception: A focused review. *Neurosci Biobehav Rev* 2019; 105: 190–199.
- 44 Carey MR, Regehr WG. Noradrenergic control of associative synaptic plasticity by selective modulation of instructive signals. *Neuron* 2009; 62: 112–122.