

· 基础研究 ·

东莨菪碱对小鼠边界细胞空间信息编码的影响

何 雷

东南大学生命科学与技术学院,江苏 南京 210096

[摘要] 目的:探讨东莨菪碱对小鼠边界细胞空间信息编码及空间记忆能力的影响。方法:将健康雄性2月龄C57BL/6小鼠随机分为生理盐水对照组和东莨菪碱组,使用morris水迷宫实验分析两组的空间记忆能力,随后向压后皮质(retrosplenial cortex, RSC)植入32通道微丝电极;手术后恢复7 d,进行旷场实验并同时记录电信号,通过计算分离出边界细胞。随后通过腹腔给药方式,给予小鼠25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 东莨菪碱或等体积的生理盐水,24 h后进行旷场实验并同时记录电信号,与给药前记录到的边界细胞的放电信号进行对比。结果:生理盐水对照组和东莨菪碱组水迷宫实验的学习曲线差异有统计学意义($P < 0.05$),目标象限时间、穿越平台次数差异均有统计学意义($P < 0.05$)。注射东莨菪碱或生理盐水24 h后,小鼠旷场总路程差异无统计学意义($P > 0.05$);注射东莨菪碱对小鼠边界细胞放电频率无显著性影响($P > 0.05$);注射东莨菪碱后,边界细胞陆地移动距离(earth mover's distance, EMD)显著增加($P < 0.05$),而注射生理盐水无明显影响($P > 0.05$)。结论:东莨菪碱可能是通过影响小鼠边界细胞编码从而影响其空间记忆能力的。

[关键词] 东莨菪碱;压后皮质;边界细胞;旷场**[中图分类号]** R338**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)09-1230-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20220905

Effects of scopolamine on boundary coding of border cells in mice

HE Lei

School of Life Sciences and Technology, Southeast University, Nanjing 210096, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate how scopolamine affects on boundary coding of border cells and spatial memory of mice. **Methods:** Healthy male 2-month-old C57BL/6 mice were randomly divided into saline control group and scopolamine group. Morris water maze was used to evaluate spatial memory ability. Then 32 channel microwire electrodes were implanted into retrosplenial cortex(RSC). After 7 days of recovery, the open field experiment was carried out and the electrical signals were recorded at the same time. Border cells were isolated after analysis. Then 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ scopolamine or equivalent volume of normal saline was intraperitoneally injected. After 24 hours, the open field experiment was carried out and the electrical signals were recorded at the same time. The changes of border cells recorded before and after treatment were analyzed. **Results:** There were significant differences in the learning curve of water maze experiment between saline control group and scopolamine group ($P < 0.05$), the time in the target quadrant ($P < 0.05$) and the number of crossing platform ($P < 0.05$). After intraperitoneal injection of scopolamine or normal saline for 24 hours, the total distance of mice in open field had no significant difference ($P > 0.05$). Injection of scopolamine had no significant effect on the firing frequency of border cells in mice ($P > 0.05$). The earth mover's distance (EMD) was significantly increased after scopolamine injection ($P < 0.05$), while normal saline injection had no significant effect on EMD ($P > 0.05$). **Conclusion:** Scopolamine may affect the ability of spatial memory by affecting boundary coding of border cells in mice.

[Key words] scopolamine; retrosplenial cortex; border cell; open field test

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(09): 1230-1234]

多项临床研究表明,小剂量东莨菪碱治疗抑郁症时有快速抗抑郁的效应^[1-5],但会对认知及学习记忆功能产生一定的不良反应,特别是空间定位能

力。动物实验表明,应用东莨菪碱会降低空间定位的学习能力,表现异常的空间记忆唤起,对新环境的探究时间延长和认知能力下降等,但其作用机制

不甚明确。已有实验研究发现^[6-9],动物的空间定位能力是通过利用环境中的标记来判断自身的位置和距离,例如,在旷场区域内,动物通过房间内标记可以判断自身的位置,从而寻找合适的路径来完成迷宫任务。这种空间定位能力与一些相关功能的神经元活动有关,例如位置细胞、网格细胞和边界细胞。这些集群细胞发放可以指征动物所处的位置信息,例如位置细胞主要位于海马CA1区和CA3区,其在旷场中能以精确到厘米级别的分辨率区分自身位置,并可以记录到该位置所对应的位置细胞的信号发放;而网格细胞分布在内侧内嗅皮层(medial entorhinal cortex, MEC)中,其在旷场中可以按网格化形状分布发放信号;边界细胞则是分布于压后皮质(retrosplenial cortex, RSC)中的一类特殊细胞,当动物靠近边界时会密集发放信号,用于指征动物是否靠近边界。边界细胞对于感官和空间线索影响下的自我为中心的坐标系建立有重要作用,边界细胞放电紊乱会导致空间信息编码错误,影响动物判断自身位置和空间距离^[6]。此外,边界细胞放电还与海马的theta振荡具有同步化反应,提示RSC边界细胞在自我中心的空间信息编码期间与海马位置细胞有重要交流,这些交流是支持空间坐标系转换、生成异中心坐标的关键因素。RSC边界细胞与MEC神经元之间也有重要联系^[10-12],如果抑制RSC边界细胞则会导致MEC网格细胞空间信息编码异常,提示RSC边界细胞在进行异中心坐标向自我中心坐标转换的过程中起着重要作用。

本研究选取特异存在于RSC的边界细胞为研究对象,研究使用东莨菪碱对小鼠边界细胞及空间记忆能力的影响,希望可以找到东莨菪碱诱发空间定位能力缺陷的原因。Morris水迷宫是现今研究者们公认的用来测试空间学习记忆行为的经典方法,本研究首先利用Morris水迷宫实验来测试东莨菪碱对小鼠空间记忆能力的影响。由于在水迷宫实验中无法同时记录在体电生理信号,于是设计旷场实验来判断东莨菪碱对小鼠自发活动能力及边界细胞空间信息编码的影响。通过向边界细胞所在的RSC区域植入微丝电极,在旷场测试实验的同时记录电信号,分离边界细胞的放电频率,探讨东莨菪碱是否会影响边界细胞的空间信息编码,从而产生空间定位能力下降。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级健康成年C57BL/6雄性小鼠26只,鼠龄

8周,体重25~30 g,购自浙江维通利华实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0001,实验动物使用许可证号SYXK(苏)2016-0014。实验动物饲养于SPF级屏障环境动物室,饲养条件为12 h/12 h昼夜节律,恒温25℃,相对湿度(60±5)%,所有小鼠自由饮食饮水。本研究所有小鼠实验均严格遵循动物实验“3R”原则,按照中华人民共和国国家标准《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 27416-2014)执行。

东莨菪碱氢溴酸盐(中国上海阿拉丁公司),戊巴比妥钠(北京华业寰宇化工有限公司),双氧水(南京晚晴化玻仪器有限公司)。

水迷宫、旷场仪器购自上海欣软公司,记录和分析软件为Anymaze。记录电信号的设备为64通道在体记录系统(Plexon Inc公司,美国)。信号采样率为40 kHz,用于记录和分析神经元胞外动作电位。

电极制备:32通道微丝阵列电极主要由微丝阵列、连接器两部分组成。将32根聚酰亚胺电极导引管(内径为75 μm,外径为150 μm,Polymicro technologies公司,美国)切割成5 mm长度,用快速胶固定组成4×8的阵列,向每个导引管插入长度为40 mm的微丝电极(直径为0.001 4 inch, California Fine Wire公司,美国),并用快速胶固定微丝与导引管。通过涂抹导电银漆使微丝的另一端与连接器pin脚相接。连接器(Omnitronics Connector公司,美国)与记录系统接口相连。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及给药

C57BL/6小鼠适应性饲养1周后,随机分为生理盐水对照组和东莨菪碱组。向小鼠RSC植入32通道微丝电极后恢复7 d,进行旷场实验,观察其旷场活动速度,并同时记录电信号。随后通过腹腔给药方式,给予小鼠25 μg/kg东莨菪碱^[13]或等体积的生理盐水,24 h后进行旷场实验并同时记录电信号,分析其对边界细胞放电及边界细胞陆地移动距离(earth mover's distance, EMD)的影响。水迷宫实验中,在训练阶段每次训练前注射同上浓度的东莨菪碱或等体积生理盐水,5 d之后的测试阶段则不注射任何药物。

1.2.2 电极植入手术

使用戊巴比妥钠(腹腔注射10 mg/kg体重)麻醉。刮去头顶上方皮毛,固定在立体定位仪上。使用剪刀剪开头皮,暴露出颅骨,使用双氧水去除表面结缔组织。根据小鼠图谱定位到RSC上方(AP 2.0 mm; ML 0.8 mm; DV 1.0 mm),使用微型颅钻在

小鼠定位处开孔,直径约为1.2 mm。用注射针倒钩挑开硬脑膜,清理植入窗面,将制备好的32通道微丝阵列电极通过气动微推缓慢植入小孔中,达到目标深度后使用医用胶封闭颅骨开孔,待干后用牙科水泥将电极导引管及连接器固定在小鼠颅骨上。等待7 d,便可开始观察记录。

1.2.3 Morris 水迷宫实验

利用Morris水迷宫实验来检测动物的学习记忆能力。Morris水迷宫由1个圆形水池(直径1.0 m、深0.6 m)和用于监测动物运动轨迹与速度的视频监控系统组成。实验时保持水温36℃。利用Anymaze软件将水迷宫划分成4个虚拟象限,每个象限中间位置安置实体空间标志(正上方45 cm处),选择其中1个象限为目标象限,放置透明逃生平台,位于水下1.5 cm,其他3个象限设定4个动物入水点。训练阶段共5 d,每天8次,每4次之间间隔1 h,每次训练时间1 min。每4次训练,入水点的释放顺序采用伪随机方式,将小鼠面向池壁放入水中。每只小鼠在台上停留20 s用来观察空间标志,若小鼠超过1 min未寻台成功,则引导其寻台。训练阶段结束后24 h进行probe测试,实验时间1 min。取出逃生平台,在目标象限的对侧象限中间位置释放动物,记录并统计动物在各象限的停留时间及穿过平台位置的次数。

1.2.4 旷场测试

利用旷场测试来判定小鼠自发活动能力,并配合电信号分析判断边界细胞放电。提前将小鼠放入测试室1 h,测试时将小鼠放入旷场内,记录10 min,并同步记录在体电生理信号。每次实验结束后使用稀释的酒精完全清洁旷场,并晾干,以免上次动物余留的信息影响下次测试结果。

1.2.5 数据处理方法

在体采集到的电生理信号以pl2文件格式保存在电脑上,使用Offline Sorter软件对记录到的单细胞放电信号进行聚类分析,区分出单个神经元的放电活动。将预处理好的单神经元放电时间序列导出,使用自行编写的matlab程序,同时导入Anymaze分析的轨迹时间信息,计算神经元放电分布,计算EMD从而判断边界细胞等信息。EMD的计算参考已发表的文献^[14]。计算过程为 $(C_m - D_m)/(C_m + D_m)$,其中 C_m 定义为任何墙面的单个最大覆盖面积, D_m 则表示平均放电点的距离,计算得到区域内所有计算单位离最近墙面的平均距离,对于每一面独立的墙都计算,选取最大的分数作为此细胞的EMD。EMD值越小,说明该细胞表征边界的程度越好。

1.3 统计学方法

使用SPSS 20.0对数据进行统计学处理,使用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的方法表示数据。分析各组水迷宫学习过程运用二因素重复测量方差分析,使用最小显著差异法(least-significant difference, LSD)进行事后检验。对照组和东莨菪碱组各自注射前后的EMD数据对比运用配对 t 检验,旷场下总路程、边界细胞放电频率、EMD数值采用独立样本 t 检验进行两组比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 东莨菪碱对小鼠水迷宫中空间记忆的影响

分别对两组小鼠在水迷宫中的表现进行分析,东莨菪碱组在学习过程中就表现出与对照组的明显差异,寻台时间明显比对照组长,学习速度明显慢于对照组。在测试阶段,东莨菪碱组无论是在平台所在象限的停留时间或穿越平台的次数都明显少于对照组(图1)。以上结果均表明,注射小剂量东莨菪碱会导致小鼠空间记忆能力下降。

2.2 小剂量东莨菪碱对小鼠旷场行为的影响

利用旷场测试来判断东莨菪碱对小鼠自发活动能力的影响。电极植入手术完成后,两组小鼠的旷场平均活动时间差异没有统计学意义。通过腹腔给药方式,分别给予两组小鼠25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 东莨菪碱或等体积生理盐水24 h后,观察其旷场活动速度。实验发现,与生理盐水对照组比较,东莨菪碱组的活动速度没有显著差异($P > 0.05$,表1)。表明两组小鼠旷场总路程差异无统计学意义,注射小剂量东莨菪碱不会影响小鼠的旷场活动能力。

2.3 边界细胞分离

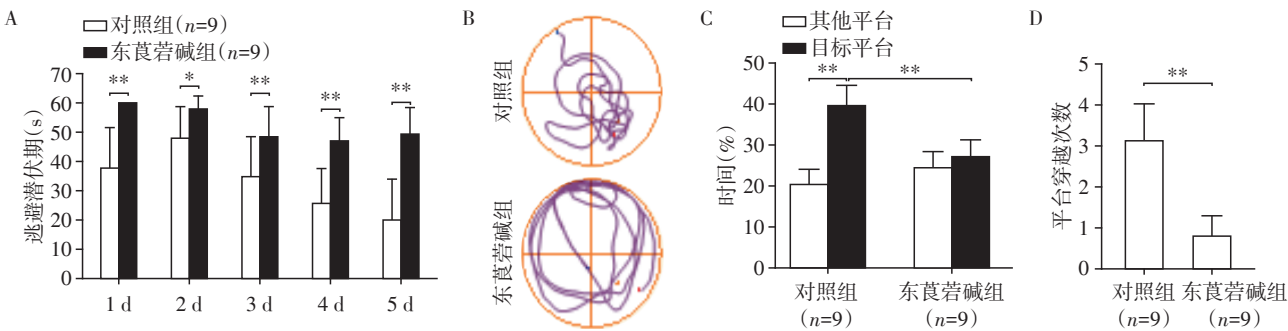
分别对两组小鼠进行旷场测试并同时记录电信号,在此基础上成功分离出数个信噪比较好的单细胞Spike信号,通过分析EMD判断为边界细胞(图2)。

2.4 小剂量东莨菪碱对边界细胞放电特征的影响

通过腹腔给药方式,分别给予两组小鼠25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 东莨菪碱或等体积生理盐水24 h后,观察给药前后对之前分离的边界细胞放电频率的影响。实验发现,两组小鼠边界细胞的放电频率差异并无统计学意义($P > 0.05$,表2)。结果表明,注射小剂量东莨菪碱对边界细胞的基础活动没有明显影响。

2.5 小剂量东莨菪碱对边界细胞EMD的影响

EMD是反映边界细胞空间信息编码状态的重要标志,EMD增加表明边界细胞对空间信息编码异常。本研究通过腹腔给药方式,分别给予两组小鼠



A: 对照组与东莨菪碱组在水迷宫5 d学习过程中到达平台的时间变化; B: Probe检测阶段各组典型的活动轨迹; C: Probe检测阶段各组在其他平台所在象限与其他象限停留的时间百分比; D: Probe检测阶段各组穿越平台的平均次数。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 东莨菪碱影响小鼠水迷宫中空间记忆
Figure 1 Scopolamine affected spatial memory in mouse water maze

表1 注射药物前后两组小鼠体重和旷场实验的测试值
Table 1 Body weight and open field test value of mice in two groups before and after drug injection

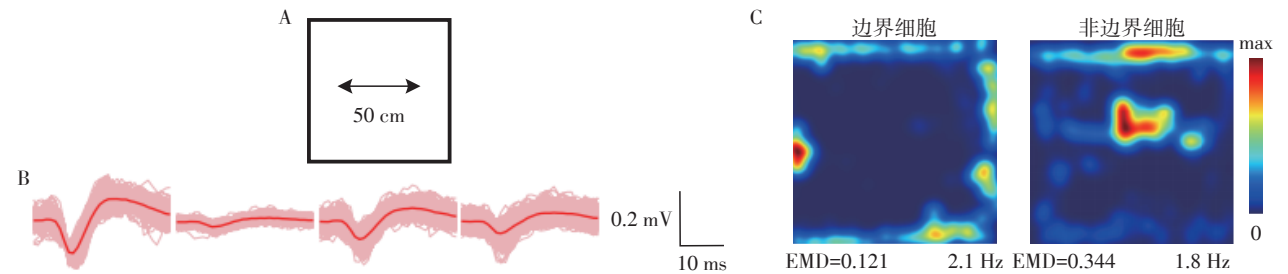
组别	体重(g)	旷场平均活动速度(m/s)	
		给药前	给药后
对照组(n=13)	24.6 ± 2.4	0.041 ± 0.024	0.039 ± 0.040
东莨菪碱组(n=13)	23.9 ± 3.6	0.046 ± 0.026	0.047 ± 0.032
P值	0.729	0.661	0.391

25 μg/kg 东莨菪碱或等体积生理盐水 24 h 后, 观察给药前后对之前分离的边界细胞 EMD 的影响。实验发现, 注射东莨菪碱后, 边界细胞 EMD 明显增加, 边界细胞效应明显下降, 表明注射小剂量东莨菪碱影响边界细胞编码, 影响边界细胞行使功能 ($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

近年研究发现, 东莨菪碱有快速抗抑郁的效果, 但同时会产生认知学习、空间定位能力缺陷等不良反应, 其作用机制尚不明确。而 RSC 的边界细胞承担着动物在迷宫活动中判断迷宫边界距离及自我中心位置的重要作用^[15-16]。在旷场的二维空间内, RSC 边界细胞的相关放电会构成动物的空间感受野, 这种信号能定位以动物自身为中心的坐标系。所以通过研究东莨菪碱对特异存在于 RSC 的边界细胞的影响, 可以帮助找到东莨菪碱诱发空间定位能力缺陷的原因, 对理解药理机制, 降低联合用药不良反应具有重要意义。

本研究首先通过水迷宫实验来测试使用东莨



A: 所使用记录信号的旷场; B: 分离到的 1 个 spike 信号的一组波形; C: 通过计算 EMD 判断是否为边界细胞, 左下为 EMD 数值, 右下为最大发放频率。

图2 分离 Spike 信号并通过 EMD 判断是否为边界细胞
Figure 2 Separating spike signals and judging whether they were boundary cells by EMD

表2 注射药物前后两组小鼠边界细胞放电频率变化
Table 2 Discharge frequency of border cells in two groups before and after drug injection

组别	分离边界细胞数	边界细胞放电频率(Hz)	
		给药前	给药后
对照组	17	2.14 ± 4.1	1.80 ± 3.3
东莨菪碱组	21	1.97 ± 2.7	1.89 ± 3.2
P值		0.473	0.714

表3 注射药物前后两组小鼠边界细胞 EMD 变化
Table 3 EMD changes of border cells in two groups before and after drug injection

组别	分离边界细胞数	EMD		P 值
		给药前	给药后	
对照组	17	0.131 ± 0.099	0.128 ± 0.136	0.893
东莨菪碱组	21	0.127 ± 0.087	0.262 ± 0.188	0.005
P值		0.398	0.019	

莨菪碱对小鼠空间记忆能力的影响,结果发现,东莨菪碱组在学习阶段寻台时间明显比对照组长,学习速度明显慢于对照组;在测试阶段,东莨菪碱组无论是在平台所在象限的停留时间或穿越平台的次数都明显少于对照组。结果表明,注射小剂量东莨菪碱会导致小鼠空间记忆能力下降。

前人研究结果表明,边界细胞的空间信息编码对动物的空间定位功能极其重要^[6],边界细胞空间信息编码异常会导致其空间定位能力下降。所以本研究随后设计了旷场实验,通过旷场测试同时记录电信号的方法来判断东莨菪碱是否会对小鼠的自发活动能力及边界细胞空间信息编码产生影响。结果显示:①注射小剂量东莨菪碱24 h后,两组小鼠的旷场活动速度差异没有统计学意义,说明注射小剂量东莨菪碱不会影响小鼠的旷场活动能力;②两组小鼠边界细胞的放电频率差异并无统计学意义,说明这一剂量及作用时间不会影响RSC脑区边界细胞的基础活动;③东莨菪碱组的边界细胞EMD明显增加,说明这一剂量及作用时间可能会影响RSC脑区边界细胞行使功能。这些结果说明,注射小剂量东莨菪碱会导致边界细胞空间信息编码异常。

综上所述,注射小剂量东莨菪碱会导致小鼠空间记忆能力下降,并会导致旷场中小鼠边界细胞空间信息编码异常。而边界细胞对于边界距离及动物自我中心位置的判断具有重要作用,其相关放电能标定自我中心的坐标系定位,边界细胞空间信息编码异常会导致空间定位障碍。故可以推测,东莨菪碱可能是通过影响小鼠边界细胞空间信息编码从而影响其空间记忆能力,通过影响边界细胞空间信息编码,从而影响距离判断,导致自我中心定位出错。但后续还需进一步研究来探讨两者间的直接关系,可以设计T迷宫或Y迷宫等实验,来监测空间定位过程中边界细胞空间信息编码的变化情况。

[参考文献]

- [1] DREVETS W C, BHATTACHARYA A, FUREY M L. The antidepressant efficacy of the muscarinic antagonist scopolamine: past findings and future directions [J]. *Adv Pharmacol San Diego Calif*, 2020, 89: 357-386
- [2] WOHLER E S, GERHARD D, THOMAS A, et al. Molecular and cellular mechanisms of rapid-acting antidepressants ketamine and scopolamine [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2017, 15(1): 11-20
- [3] FUREY M L, DREVETS W C. Antidepressant efficacy of the antimuscarinic drug scopolamine: a randomized, placebo-controlled clinical trial [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2006, 63(10): 1121-1129
- [4] DREVETS W C, FUREY M L. Replication of scopolamine's antidepressant efficacy in major depressive disorder: a randomized, placebo-controlled clinical trial [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(5): 432-438
- [5] ZHOU J J, YANG J, ZHU X Q, et al. The effects of intramuscular administration of scopolamine augmentation in moderate to severe major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Ther Adv Psychopharmacol*, 2020, 10: 2045125320938556
- [6] ITO H T. Prefrontal-hippocampal interactions for spatial navigation [J]. *Neurosci Res*, 2018, 129: 2-7
- [7] KITANISHI T, ITO H T, HAYASHI Y, et al. Network mechanisms of hippocampal laterality, place coding, and goal-directed navigation [J]. *J Physiol Sci*, 2017, 67(2): 247-258
- [8] DOLLEMAN-VAN DER WEEL M J D V, GRIFFIN A L, ITO H T, et al. The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior [J]. *Learn Mem Cold Spring Harb N Y*, 2019, 26(7): 191-205
- [9] MOSER E I, KROPFF E, MOSER M B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2008, 31: 69-89
- [10] ALEXANDER A S, CARSTENSEN L C, HINMAN T R, et al. Egocentric boundary vector turning of the retrosplenial cortex [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(8): eaaz2322
- [11] ALEXANDER A S, RANGELLM, TINGLEY D, et al. Neurophysiological signatures of temporal coordination between retrosplenial cortex and the hippocampal formation [J]. *Behav Neurosci*, 2018, 132(5): 453-468
- [12] LONG X Y, ZHANG S J. A novel somatosensory spatial navigation system outside the hippocampal formation [J]. *Cell Res*, 2021, 31(6): 649-663
- [13] 时丹丹, 杨健, 张金钮, 等. 东莨菪碱对大鼠强迫游泳行为的影响及其作用靶点 [J]. *首都医科大学学报*, 2018, 39(5): 630-635
- [14] SOLSTAD T, BOCCARA C N, KROPFF E, et al. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex [J]. *Science*, 2008, 322: 1865-1868
- [15] VAN WIJNGAARDEN J B G, BABL S S, ITO H T. Entorhinal-retrosplenial circuits for allocentric-egocentric transformation of boundary coding [J]. *Elife*, 2020, 9: e59816
- [16] ALEXANDER A S, ROBINSON J C, DANNENBERG H, et al. Neurophysiological coding of space and time in the hippocampus, entorhinal cortex, and retrosplenial cortex [J]. *Brain Neurosci Adv*, 2020, 4: 2398212820972871

[收稿日期] 2022-02-21

(本文编辑:陈汐敏)