DOI:10.16016/j.2097-0927.202501016

睡眠剥夺对海马PV中间神经元痕迹性眨眼条件反射相关放电活动的影响

詹 悦[1,2],李容瑢[3],张 洁[3],李红丽[1] 陆军军医大学基础医学院:[1]基础医学教学实验中心,[2]组织胚胎学教研室,[3]生理学教研室

[摘要] **目的** 研究睡眠剥夺对小鼠海马小清蛋白阳性中间神经元(Parvalbumin-expressing interneuron, PV-IN)在痕迹性眨眼条件反射(Trace eyeblink conditioning,tEBC)训练过程中和恢复性睡眠期间峰电位发放活动的影响。**方法** 15只PV-Cre小鼠随机分为睡眠剥夺组(n=8)和对照组(n=7)。2组小鼠均接受连续5 d的行为训练。睡眠剥夺组小鼠每天tEBC训练后进行1.5 h的睡眠剥夺,之后再被允许进行1.5 h的恢复性睡眠。对照组小鼠则在tEBC训练后允许自由睡眠。利用多通道记录和光遗传学刺激技术,在体条件下标记海马PV-IN。**结果** 睡眠剥夺组小鼠的条件性眨眼反应(Conditioned eyeblink response, CR)发生率并未随训练日的增加而增加(P>0.05)。在第3~5训练日,睡眠剥夺组小鼠CR发生率显著低于对照组小鼠(P<0.05);与对照组相比,睡眠剥夺组小鼠海马PV-IN在tEBC训练过程中被条件刺激(Conditioned stimulus, CS)所诱发的放电增强反应显著更低(P<0.05);与训练前睡眠期相比,睡眠剥夺组小鼠海马PV-IN在恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时的峰电位发放显著增强(P<0.05),且增强效应显著高于对照组(P<0.05);睡眠剥夺对海马非PV中间神经元在tEBC训练过程中和恢复性睡眠期间峰电位发放活动的影响均不显著(P>0.05)。**结论** 睡眠剥夺对海马PV-IN在tEBC训练过程中和恢复性睡眠期间放电反应有着双重影响,这可能是睡眠剥夺引起tEBC记忆形成和巩固障碍的细胞活动机制。

[关键词] 睡眠剥夺;海马;中间神经元;痕迹性条件反射

[中图法分类号] R322.81;R338.1;R338.8 [文献标志码] A

Effect of sleep deprivation on firing activity of hippocampal parvalbumin-expressing interneurons associated with trace eyeblink conditioning

ZHAN Yue[1,2], LI Rongrong[3], ZHANG Jie[3], LI Hongli[1] [1]Experimental Center of Basic Medicine, [2]Department of Histoembryology, [3]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective To investigate the effects of sleep deprivation on the firing activity of hippocampal parvalbumin-expressing interneuron (PV-IN) of mice during trace eyeblink conditioning (tEBC) training and during recovery sleep. Methods A total of 15 PV-Cre mice were randomly assigned into a sleep deprivation group (n=8) and a control group (n=7). After daily tEBC training, the sleep deprivation group experienced 1.5 h of sleep deprivation followed by 1.5 h of recovery sleep, and the control group mice were allowed to sleep freely, for 5 consecutive days. Multichannel recording and optogenetic techniques was

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82101561),重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0905)

[通信作者] 李红丽,lihongli@tmmu.edu.cn

张 洁,zhang_j@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:詹 悦,李容瑢,张 洁,等. 睡眠剥夺对海马PV中间神经元痕迹性眨眼条件反射相关放电活动的影响[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(04):307-317. DOI:10.16016/j.2097-0927.202501016.

Citation:ZHAN Y, LI R G, ZHANG Jie, *et al*. Effect of sleep deprivation on firing activity of hippocampal parvalbumin-expressing interneurons associated with trace eyeblink conditioning[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(04):307-317. DOI:10.16016/j.2097-0927.202501016.

applied to identify the hippocampal PV-IN *in vivo*. **Results** The sleep deprived mice failed to show significant increase in the incidence of conditioned eyeblink response (CR) across 5 training days ($P>0.05$). On training days 3~5, the CR incidence was significantly lower in the sleep deprived mice than the control mice ($P<0.05$). The enhancement of conditioned stimulus (CS)-evoked firing activity in hippocampal PV-INs during tEBC training was significantly lower in the sleep deprived mice when compared to the control mice ($P<0.05$). The sleep deprived mice obtained notably strengthened firing activity of hippocampal PV-INs peri sharp wave ripple events during recovery sleep period when compared with the pre-training sleep period ($P<0.05$), and the enhancement was remarkably greater than that in the control mice ($P<0.05$). Sleep deprivation had no obvious effects on the firing activity of hippocampal non PV-IN during either tEBC training or recovery sleep ($P>0.05$). **Conclusion** Sleep deprivation produces dual effects on the firing activities of hippocampal PV-INs during tEBC training and recovery sleep. These effects may be the cellular mechanisms of tEBC memory formation and consolidation disorders caused by sleep deprivation.

[**Key words**] sleep deprivation; hippocampus; interneuron; trace conditioned reflex

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82101561) and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0905). Corresponding author: Li Hongli, E-mail: lihongli@tmmu.edu.cn; Zhang Jie, E-mail: zhang_j@tmmu.edu.cn

将在不同时间或不同场景发生的刺激联合起来并在大脑内形成记忆,是机体对外界刺激做出适宜反应所需的重要脑功能[1]。在当今时代,多种因素的共同作用使人们的睡眠时间普遍减少。业已证实,各种原因引起睡眠时间减少所导致的睡眠剥夺,会使联合型记忆功能发生显著损害[2]。因此,揭示睡眠剥夺导致联合型记忆损害的完整机制,有望为改善睡眠剥夺后联合型记忆的损害症状提供新思路、新靶点。

海马是联合型记忆形成和巩固的关键脑区之一[3]。海马锥体细胞可通过持续性放电活动,联系不同时间或不同场景发生的刺激[4-5]。研究发现,睡眠剥夺可以在多个层次引起海马内的广泛变化,进而损害记忆。例如,蛋白质合成水平降低[6]、突触的数量减少[7]、突触传递长时程增强减弱[8]以及锥体细胞兴奋性下降[9]。海马神经元在联合型记忆形成和巩固过程中的放电活动变化与记忆行为改变具有最直接的因果联系。近年来已有研究发现:训练后睡眠剥夺会显著抑制海马锥体细胞在联合型记忆训练过程中的放电活动,提示睡眠剥夺还可能通过对海马锥体细胞信息编码放电活动的干预来影响记忆的形成[10]。

值得注意的是,海马中不仅存在锥体细胞,还存在大量的中间神经元[11]。不同类型的中间神经元分别参与调控锥体细胞对信号输入的整合、锥体细胞的输出[12],对海马内神经振荡的形成以及锥体细胞的功能有重要影响。在多种类型的中间神经元中,小清蛋白阳性的中间神经元(Parvalbumin-expressing interneuron, PV-IN)主要支配海马锥体细胞的近端树突和胞体,控制大量锥体细胞的输出,并被证明参与联合型记忆的形成[13-14]。然而,睡眠剥夺是否以及如何调控海马PV-IN联合型记忆相关的放电活动尚未阐明。因此,本研究以痕迹性眨眼条件反射(Trace eyeblink conditioning, tEBC)为联合型记忆的行为学范式[14],结合多通道记录和光遗传学刺激技术在体条件下标记海马PV-IN。研究睡眠剥夺对PV-IN在tEBC训练过程中、以及训练后恢复性睡眠期间放电活动的影响,以期更加全面地理解睡眠剥夺影响联合型记忆形成和巩固的海马细胞活动机制。

1 材料方法

1.1 实验动物

实验选用3~5月龄雄性PV-Cre小鼠,体质量22~25 g。在实验前适应期、术后恢复期以及电生理记录期间,环境温度为21~25 ℃,并维持12 h光照/12 h黑暗的昼夜交替节律。所有实验和方案均通过陆军军医大学动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC 20210397),涉及动物处理的程序符合实验动物护理机构的指南。

1.2 病毒质粒注射

为了标记背侧海马PV-IN,将病毒质粒pAAV-Ef1α-DIO-hChR2(H134R)-mCherry(上海和元生物技术公司,中国)微注射到PV-Cre小鼠的双侧背侧海马。病毒质粒通过Nanoject III微量注射器(Drummond Scientific,美国)配合微玻璃电极(尖端直径:30~50 μm)进行脑立体定位注射。每侧海马注射3个位点,双侧共计6个注射位点。病毒质粒微注射的坐标如下:以前囟为参考点,位点1和2:前囟后1.7 mm,前囟旁开±1.25 mm,深度1.15 mm;位点3和4:前囟后1.9 mm,前囟旁开±1.7 mm,深度1.15 mm;位点5和6:前囟后

2.2 mm,前囟旁开 ±2.0 mm,深度 1.15 mm。每个位点病毒质粒的注射量为70 nL。

1.3 光纤-四极管电极阵列制作

选用直径 25 μm、长度约 25 cm 钨丝(California Fine Wire,美国)。两次对折钨丝,制成四股螺旋状的四极管电极。将制备好的4组四极管电极逐一穿入平行排列的石英管(Polymicro Technologies,美国,型号:TSP100170),每组间距为170 μm,四极管电极阵列与微推进器进行偶联。将一根直径200 μm的光纤(Thorlabs,美国,型号:FT200EMT)与四极管电极阵列组合在一起。使用光功率计(Thorlabs,美国,型号:PM100D),按照实验参数设定(见后述)测量脉冲蓝光刺激的照射功率。

1.4 光纤—四极管电极阵列和眼肌电电极植入

用浓度1%~2%的异氟烷对小鼠进行麻醉。将小鼠头部固定于脑立体定位仪(瑞沃德,中国,型号:68045)上,调整颅骨呈水平位。在双侧小脑上方的对称位置钻两个直径0.5 mm的孔,各植入一颗不锈钢螺丝,分别作为地线与参考电极的连接点。在背侧海马植入准备好的光纤-四极管电极阵列(坐标:前囟后1.9 mm,前囟旁开1.6 mm,深度1.0 mm)。将2根绝缘的不锈钢丝(裸径:76 μm;绝缘直径:140 μm;A-M systems,美国,型号:791000)植入左侧上眼轮匝肌皮下。手术后小鼠恢复5~7 d,在此期间,小鼠的体质量和进食量逐渐恢复至术前水平。

1.5 tEBC训练

tEBC训练在隔音、避光的屏蔽箱体内进行。手术恢复后的小鼠需要先进行2 d的实验环境适应,确保其在行为训练和电生理记录过程中能自然表现。适应训练期间,小鼠被放置于屏蔽箱内的训练盒中,其头部的光纤-四极管电极阵列通过前置放大器与多通道记录系统(Intan Technologies,美国,型号:RHD2000)相连接。小鼠每天在训练盒中进行自由适应活动约30 min。适应训练完成后,小鼠进行连续5 d的tEBC训练。在每个训练日中,小鼠接受100次条件刺激(conditioned stimulus,CS)和非条件刺激(unconditioned stimulus,US)配对给予训练。配对刺激的时间间隔为18~28 s。CS为持续150 ms的LED闪光,US为正对左眼角膜、持续100 ms的气流。CS结束与US开始间有250 ms的时间间隔。

1.6 睡眠剥夺

每天的tEBC训练在上午10:00~10:30进行。训练结束后,一组小鼠(睡眠剥夺组,n=8)被放回其饲养笼中。参照VECSEY等[15]在文献报道的“轻柔刺激睡眠剥夺法”,使小鼠保持觉醒状态1.5 h,之后睡眠剥夺组小鼠被允许睡眠1.5 h,该阶段被定义为恢复性睡眠。另一组小鼠(对照组,n=7)在tEBC训练后被立即放回饲养笼中,并可自由睡眠1.5 h(即训练后睡眠)。两组小鼠在tEBC训练前都被允许有1.5 h的睡眠(即训练前睡眠)。

1.7 光遗传学操控

通过植入的光纤-四极管电极阵列进行光遗传刺激。为在体条件下识别背侧海马PV-IN,用激光二极管(Osram,德国,型号:PL450B)发出蓝光刺激。激光二极管由二极管电流控制器(Thorlabs,美国,型号:LDC-205C)输出的脉冲电流(120~150 mA)控制。用一个可编程脉冲发生器(Pulse Pal v,Sanworks)用于控制二极管电流控制器。当小鼠处于训练前睡眠阶段时,会发出100次蓝光脉冲闪烁(波长为450 nm,脉冲刺激串持续时间为500 ms,频率为20 Hz,光亮:10 ms,光灭:40 ms。串刺激时间间隔平均108 s)。

1.8 电生理信号记录

使用多通道记录系统(Intan Technologies,美国,型号:RHD2000),以20 000 Hz的采样频率对小鼠背侧海马CA1区神经元单位放电信号、局部场电位信号进行同步采样。条件刺激和眼轮匝肌肌电信号通过输入端口同步传入多通道记录系统。局部场电位信号在后期还需以1 250 Hz的频率进行离线的重采样,以用于随后的数据分析。

1.9 数据分析

1.9.1 大脑觉醒-睡眠状态判定 参考既往文献[10],结合背侧海马局部场电位活动和头颈三维加速度判定小鼠的大脑觉醒-睡眠状态。具体判定标准如下:①觉醒状态下,背侧海马呈现显著的theta频带(5~10 Hz)振荡,伴随小鼠头颈三维加速度显著增加,持续时间超过10 s;②非快速眼动(non-rapid eye movement,NREM)睡眠状态下,背侧海马呈现高振幅、低频(1~4 Hz)振荡活动,且小鼠头颈部三维加速度无明显变化,持续时间超过10 s;③快速眼动(rapid eye movement,REM)睡眠状态下,背侧海马同样呈现明显的theta频带振荡,但小鼠头颈三维无加速现象,且持续时间超过10 s。

1.9.2 峰电位甄选 记录的局部场电位数据进行带通滤波(800~6 000 Hz)处理。使用KlustaKwik软件自动甄选每组四极管电极的单位放电信号,归为不同的峰电位集群。通过Klusters软件进行手动甄别,以获得高信度的海马CA1区神经元峰电位信号。

1.9.3 神经元类型电生理区分 参照文献标准[14,16],

区分锥体细胞与中间神经元,即检测单个海马神经元的自发放电率和峰电位宽度(从峰电位谷值到峰值的时程)。在本研究中,平均总体放电率<6 Hz且峰电位持续时间>0.35 ms的神经元被归类为锥体细胞,而总体放电率≥6 Hz且峰电位持续时间≤0.35 ms的神经元被归类为中间神经元。

1.9.4 尖波涟漪波离线检测 在NREM睡眠期间检测尖波涟漪波振荡。在海马区多通道记录信号中,选择尖波涟漪波振荡幅度最大的通道作为检测通道,以没有尖波涟漪波振荡的通道作为参考通道,对2个通道的信号进行差分处理,并对差分信号进行100~250 Hz的带通滤波处理。尖波涟漪波振荡事件被定义为振幅超过基线均值+4倍基线标准差的事件。

1.9.5 条件性眨眼反应定义 依据文献算法,对眼轮匝肌电活动进行1 ms时间常数积分。量化100次试验中基线期(条件刺激前1~350 ms)的眼肌电活动,计算其均值与标准差,并将均值加4倍标准差设为阈值。超出此阈值的最大基线眼肌电活动试验视为无效测试。仅在有效测试中,测量条件性眨眼反应。眨眼反应被定义为眼肌电活动超过基线均值4倍标准差且持续至少25 ms。发生在条件刺激后51~400 ms时间段内的显著眨眼反应被定义为条件性眨眼反应。

1.9.6 神经元在tEBC训练过程中的反应 在每个有效测试试验中,从条件刺激开始前1 000 ms至条件刺激开始后1 000 ms的时间长度被均分为40个50 ms的时间窗。所有记录到的峰电位发放被分配到对应时间窗中。计算有效试验中每个时间窗的发放频率。用条件刺激开始前20个时间窗的峰电位发放频率的平均值量化基线的活动值及其标准差,并对各时间窗的放电频率作标准化处理。

1.9.7 在体条件下标记PV-IN 将所有电生理标准鉴定中间神经元,根据其对蓝光脉冲刺激的反应进行定义。观察每个中间神经元在每次蓝光脉冲刺激前1 s和脉冲刺激开始后500 ms内的峰电位发放频率变化。如果该中间神经元能被蓝光激脉冲稳定诱发出短潜伏期(3~5 ms)的峰电位发放活动,并且其峰电位发放最主要发生在尖波涟漪波振荡的上升相位,则该中间神经元被标记为PV-IN[14]。

1.10 组织形态学鉴定

所有实验结束后,对小鼠进行电损毁。48 h后,戊巴比妥(100 mg/kg,腹腔注射)麻醉小鼠,用生理盐水和4%多聚甲醛溶液经心脏灌流。剥离取出脑组织后,将其置于4%多聚甲醛溶液后固定24 h,转移至30%蔗糖溶液脱水48 h,4 ℃冰箱保存。脑组织固定于冰冻切片机作连续冠状切片(40 μm),脑片收集于PBS溶液中。挑选目标脑区脑片进行PBS溶液漂洗后,将脑片置于免疫染色封闭液40 min。脑片于一抗溶液(PV,1∶400,Abcam,货号:11427),在4 ℃条件下孵育过夜。次日,PBS溶液漂洗脑片10 min重复3次后,室温下与二抗(AlexaFluor568 1∶800,Invitrogen,货号:A10042)孵育2 h。PBS溶液漂洗,使用DAPI染色。细胞核。完成染色的脑片进行贴片后,阴干封片。共聚焦激光扫描显微镜(Olympus,日本,型号:IXplore SpinSR)拍摄荧光图像,以确认光敏感通道的表达范围、特异性以及四极管电极尖端的位置。

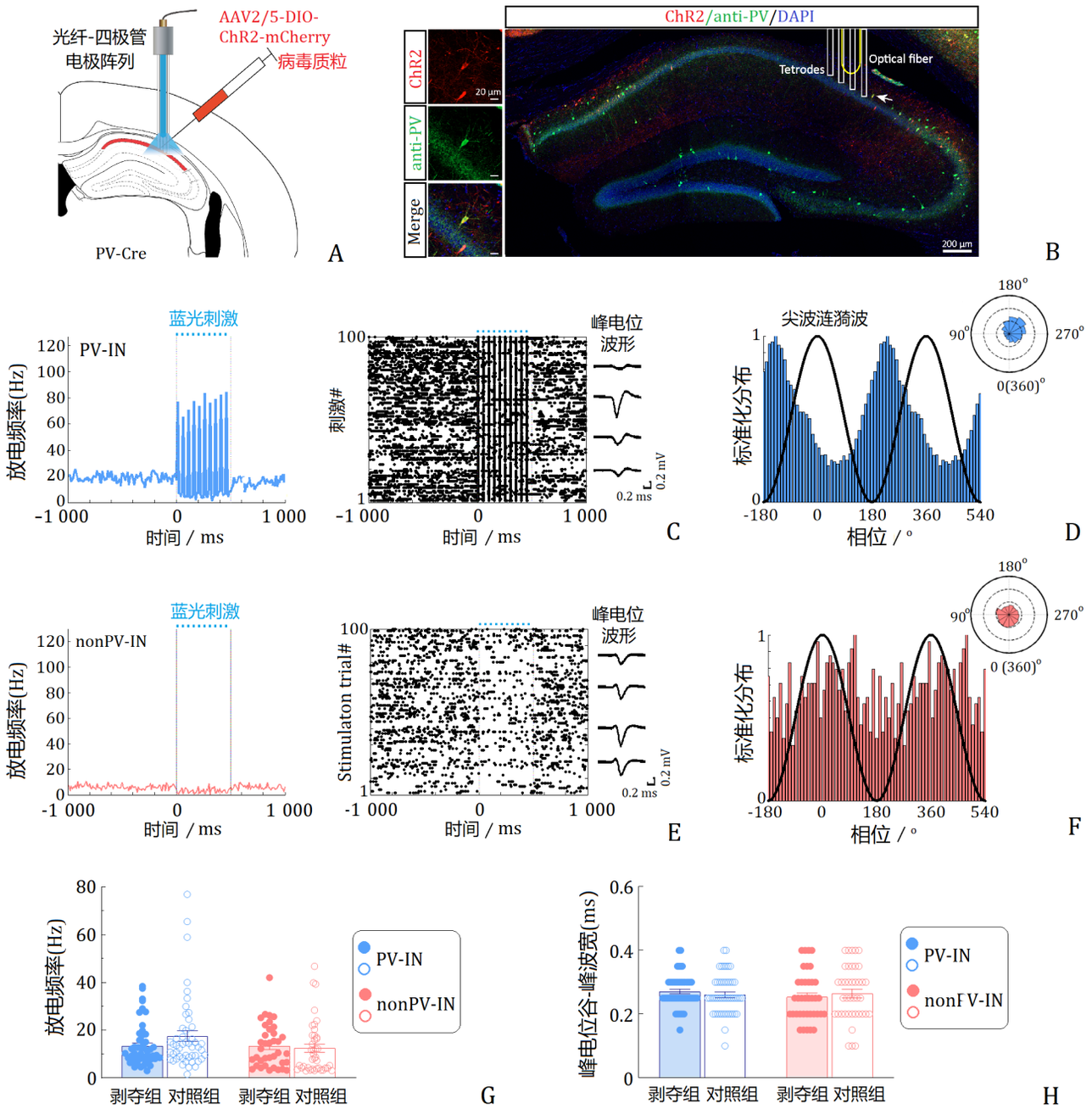
1.11 统计学分析

所有统计结果以$\bar{x}\pm s$来表示,使用SPSS 20.0软件进行统计分析。行为学数据的统计分析运用了重复测量设计的单因素或双因素方差分析。对于2组间放电活动的差异性分析,选用了双尾独立样本t检验;对于同组2种状态(如训练前睡眠与训练后睡眠/恢复性睡眠)的放电活动对比采用配对样本t检验。当$P<0.05$时,认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在体条件下标记小鼠背侧海马PV中间神经元

实验选择用PV-Cre小鼠,在其背侧海马微注射AAV2/5-DIO-ChR2-mCherry病毒质粒(图1A),使该区域PV-IN特异表达光敏感通道ChR2(图1B),并将多模光纤-四极管微电极阵列植入到小鼠背侧海马(图1A、B)。用蓝光脉冲刺激(波长:450 nm,频率为20 Hz,光亮10 ms,光灭40 ms,串刺激持续时间500 ms)背侧海马神经元(图1C)。PV-IN被定义为能被蓝光脉冲刺激在3~5 ms内稳定诱发出峰电位的放电单位,且该放电单位的峰电位波形符合海马中间神经元的基本特征(图1C)。本研究共计标记和记录到99个PV-IN(睡眠剥夺组50个、对照组49个),其峰电位发放最主要发生在尖波涟漪波振荡的上升相位(图1D)。此外,本研究还记录到了77个其它类型中间神经元(睡眠剥夺组37个、对照组40个)。它们对于蓝光刺激没有显著的峰电位发放变化(图1E),其峰电位发放在尖波涟漪波振荡相位上无显著偏好(图1F)。这类放电单位被定义为非PV中间神经元(nonPV-IN)。统计分析显示:与对照组小鼠相比,睡眠剥夺组所标记和记录的PV-IN在峰电位发放频率[(13.5±1.3) *vs.* (17.6±2.2) Hz, $t(97)=-1.631\ 1$, $P=0.106\ 1$,图1G左]和峰电位谷-峰波宽[(0.271±0.007) *vs.* (0.261±0.009) ms, $t(97)=0.857\ 8$, $P=0.393\ 1$,图1H左]上并无显著区别。类似的,



A:背侧海马在体多通道记录与光遗传刺激示意图;B:背侧海马PV-IN(绿色荧光)特异表达光敏感通道ChR2(红色荧光);C:PV-IN在蓝光刺激前后的峰电位发放频率变化和峰电位发放反应;D:尖波涟漪波振荡发生时PV-IN峰电位发放的代表性相位;E:nonPV-IN在蓝光刺激前后的峰电位发放频率变化和峰电位发放反应;F:尖波涟漪波振荡发生时nonPV-IN峰电位发放的代表性相位;G:睡眠剥夺组和对照组小鼠海马PV-IN、nonPV-IN峰电位发放频率的比较;H:睡眠剥夺组和对照组小鼠海马PV-IN、nonPV-IN峰电位谷-峰波宽的比较

图1 在体标记背侧海马PV-IN

与对照小鼠相比,睡眠剥夺组所记录的nonPV-IN在峰电位发放频率[(13.4±1.5) *vs.* (12.5±1.8) Hz, $t(75)=0.375\ 7$, $P=0.708\ 2$,图1G右]和峰电位谷-峰波宽[(0.254±0.013) *vs.* (0.265±0.014) ms,$t(75)=-0.592\ 0$, $P=0.555\ 7$,图1H右]上也无显著区别。此外,无论在睡眠剥夺组小鼠,抑或是在对照组小鼠,其PV-IN和nonPV-IN在峰电位发放频率[睡眠剥夺组:$t(85)=0.065\ 2$,$P=0.948\ 1$;对照组:$t(87)=1.756\ 9$,$P=0.082\ 5$,图1H]和峰电位谷-峰波宽[睡眠剥夺组:$t(85)=1.240\ 4$, $P=0.218\ 2$;对照组:$t(87)=-0.241\ 7$,$P=0.809\ 5$,图1H]

方面均无显著差异。综上结果,本研究中标记的海马PV-IN主要由其对蓝光刺激的兴奋反应及其峰电位在尖波涟漪波振荡的相位来确定。

2.2 训练后睡眠剥夺损害小鼠tEBC的习得

评估训练后睡眠剥夺对小鼠tEBC习得的影响,将2组小鼠进行连续5 d的行为训练。剥夺组小鼠在每天的tEBC训练后立即放回其饲养盒中,先进行1.5 h的睡眠剥夺,之后再被允许进行1.5 h的恢复性睡眠。对照组小鼠则在tEBC训练后被允许进入其饲养盒进行自由睡眠。通过连续5 d训练,对照组小鼠逐渐建立CS与US之间的联系,表现为CR发生率的显著增加[n=7,$F(4,24)$=2.979,P=0.039,图2A]。睡眠剥夺组小鼠在第1训练日的CR发生率与对照组小鼠并无显著区别[(46.3±6.9)% *vs.* (45.8±6.0)%,$t(13)$=0.062 1,P=0.951,图2B]。但经过训练后的睡眠剥夺,剥夺组小鼠的CR发生率并未随着训练日增加而显著增加[$F(4,28)$=1.181,P=0.341,图2A]。特别是,在第3~5训练日,睡眠剥夺组小鼠CR发生率显著低于对照组小鼠[(37.2±2.6)% *vs.* (59.6±4.8)%,$t(43)$=−4.367 5,P<0.000 1,图2C]。

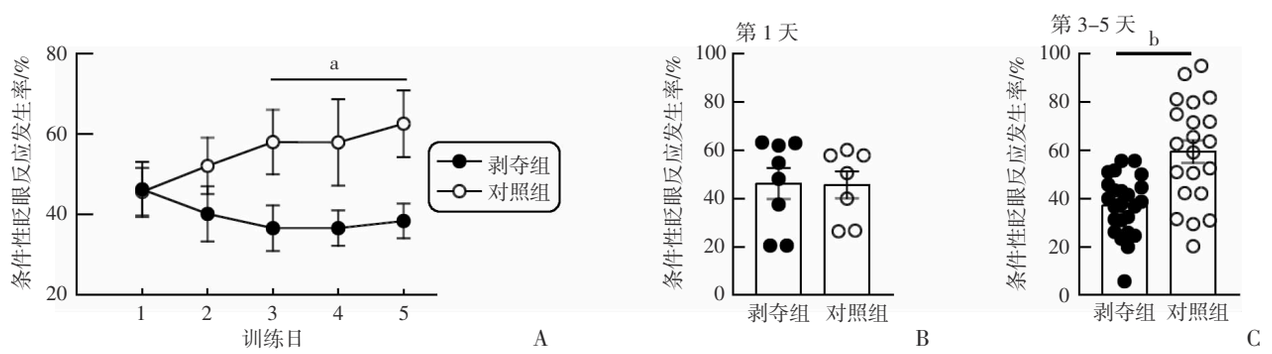
2.3 睡眠剥夺降低海马PV中间神经元在tEBC训练过程中的放电活动

实验进一步分析了睡眠剥夺是否以及如何影响海马PV-IN在tEBC训练过程中的放电活动。在本研究对照组小鼠中可观察到条件刺激诱发的海马PV-IN放电增强反应(图3A)。但与对照组相比,睡眠剥夺组小鼠海马PV-IN被条件刺激所诱发的放电增强反应显著更弱(P<0.05,图3A~C)。结果显示,在训练第1天,剥夺组和对照组小鼠海马PV-IN被条件刺激所诱发的放电反应无显著差异[Z值化放电频率(9.74±2.31) *vs.* (9.42±2.03),$t(23)$=0.103 9,P=0.9181,图3D]。而在训练后进行睡眠剥夺,会使睡眠剥夺组小鼠海马PV-IN被条件刺激所诱发的放电反应显著降低[Z值化放电频率:(4.28±0.76) *vs.* (6.61±0.81),$t(50)$=−2.042 3,P=0.046 4,图3E]。

然而,条件刺激诱发的海马nonPV-IN峰电位发放增强程度较低(图4A、B)。在训练第1天,睡眠剥夺组和对照组小鼠海马nonPV-IN被条件刺激所诱发的放电反应无显著差异[Z值化放电频率:(1.25±0.63) *vs.* (4.23±4.23),$t(11)$=−1.027 7,P=0.326 2]。在tEBC训练后进行睡眠剥夺,睡眠剥夺组小鼠海马nonPV-IN被条件刺激诱发的放电反应与对照组仍无显著差异[Z值化放电频率:(4.65±1.33) *vs.* (5.05±1.15),$t(47)$=−0.223 0,P=0.824 5,图4E]。

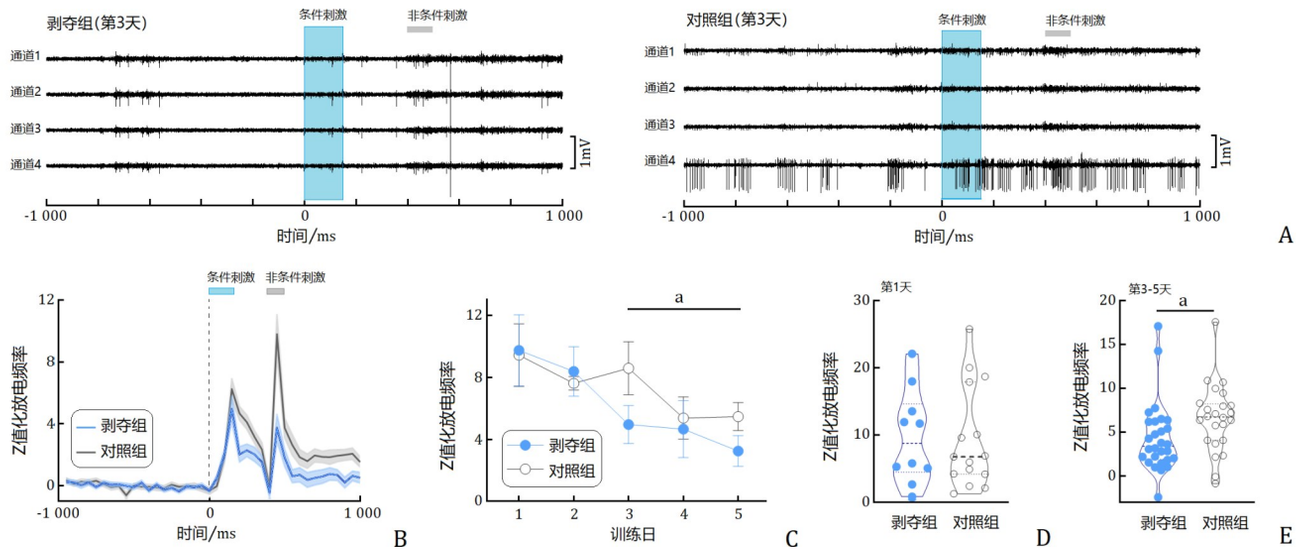
2.4 睡眠剥夺增强海马PV-IN在tEBC训练后恢复性睡眠期间的放电活动

最后,实验评估睡眠剥夺对tEBC训练后恢复性睡眠期间海马PV-IN放电活动的影响,研究发现:海马PV-IN在NREM睡眠期尖波涟漪波振荡出现时会显著增强放电活动,参与对记忆重激活的调控[18]。为此,我们记录并比较两组小鼠在tEBC训练前、后睡眠期尖波涟漪波发生时海马PV-IN峰电位发放的变化及其差异。结果显示,相较于训练前睡眠,海马PV-IN在睡眠剥夺后的恢复性睡眠期尖波涟漪波发生时的峰电位发放增加(图5A)。但相较于训练前睡眠,对照组小鼠海马PV-IN在训练后睡眠期尖波涟漪波发生时的峰电位发放没有明显变化(图5B)。剥夺组小鼠海马PV-IN在恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时的放电频率显著高于训练前睡眠期[Z值化放电频率:(12.57±1.26) *vs.* (10.63±1.23),$t(49)$=4.483 7,P<0.000 1,图5C],对照组小鼠海马PV-IN在训练后睡眠期尖波



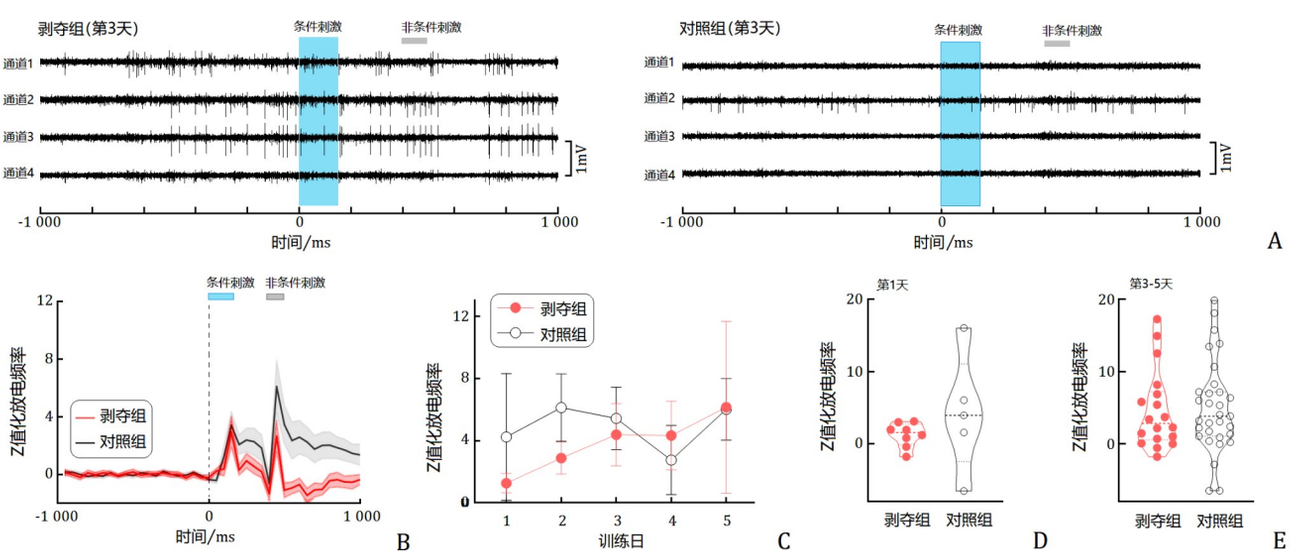
A:睡眠剥夺组和对照组小鼠tEBC训练第1~5天的CR发生率比较;B:睡眠剥夺组和对照组小鼠tEBC训练第1天CR发生率的比较;C:睡眠剥夺组和对照组小鼠tEBC训练第3~5天CR发生率的比较 a:P<0.05,b:P<0.0001

图2 训练后睡眠剥夺对tEBC习得的影响



A：睡眠剥夺组和对照组小鼠海马PV-IN在条件刺激施予后的峰电位发放；B：睡眠剥夺组和对照组小鼠海马PV-IN在条件刺激施予前、后1000 ms的峰电位发放频率曲线图；C：睡眠剥夺组和对照组小鼠在tEBC训练第1~5天条件刺激诱发的海马PV-IN峰电位发放频率比较；D：tEBC训练第1天睡眠剥夺组和对照组小鼠条件刺激诱发的海马PV-IN峰电位发放频率比较；E：tEBC训练第3~5天睡眠剥夺组和对照组小鼠条件刺激诱发的海马PV-IN峰电位发放频率比较 a：$P<0.05$

图3　训练后睡眠剥夺降低条件刺激所诱发的PV-IN放电反应

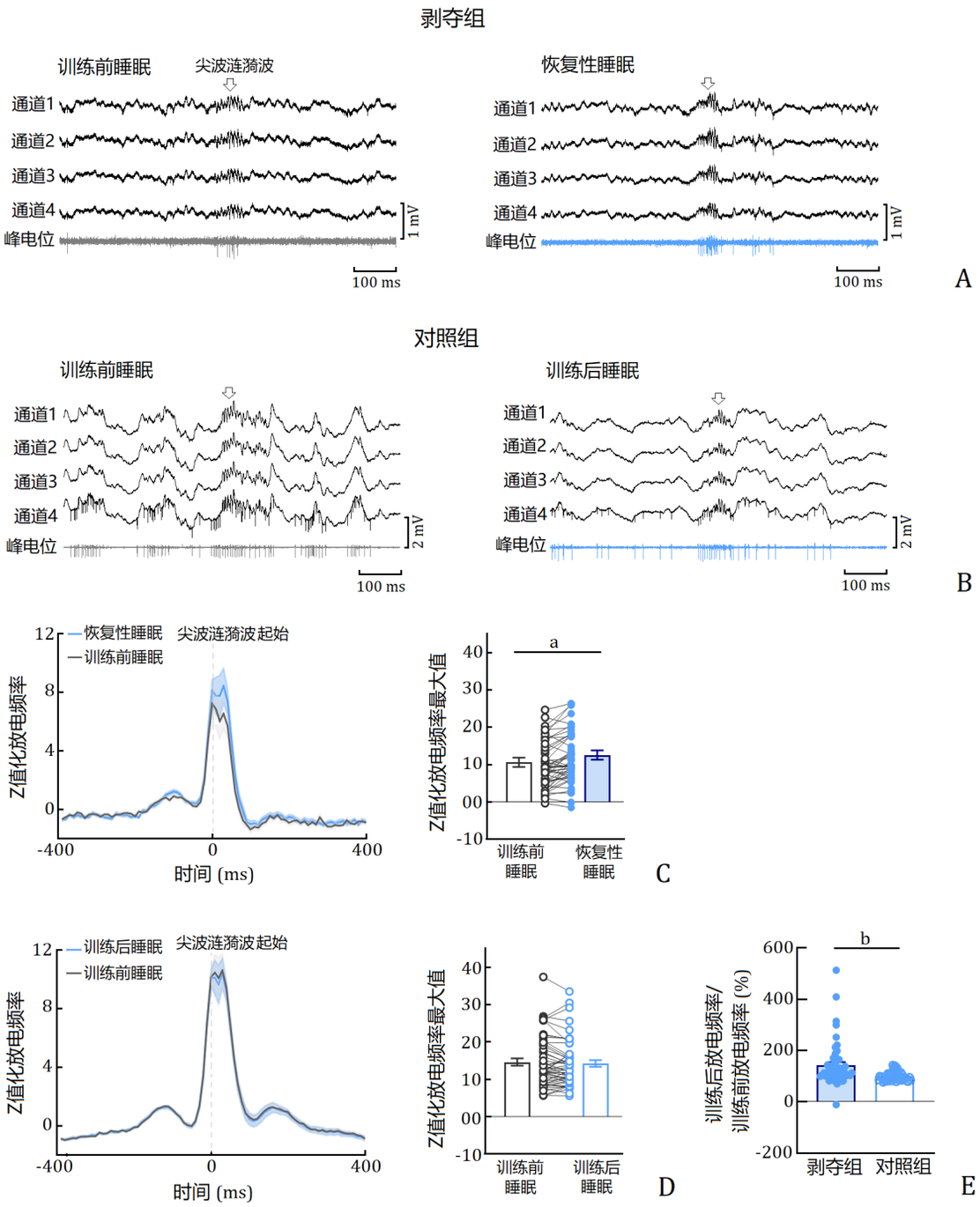


A：剥夺组和对照组小鼠海马nonPV-IN在条件刺激施予后的峰电位发放；B：睡眠剥夺组和对照组小鼠海马nonPV-IN在条件刺激施予前、后1 000 ms的峰电位发放频率曲线图；C：睡眠剥夺组和对照组小鼠在tEBC训练第1~5天条件刺激诱发的海马nonPV-IN峰电位发放频率比较；D：tEBC训练第1天睡眠剥夺组和对照组小鼠条件刺激诱发的海马nonPV-IN峰电位发放频率比较；E：tEBC训练第3~5天睡眠剥夺组和对照组小鼠条件刺激诱发的海马nonPV-IN峰电位发放频率比较

图4　训练后睡眠剥夺不影响条件刺激所诱发的非PV-IN放电反应

涟漪波发生时的放电频率与训练前睡眠期无显著区别[Z值化放电频率：(14.24±0.90) *vs.* (14.61±0.99)，$t(48)=-1.071\,0$，$P=0.289\,5$，图5D]。剥夺组小鼠在恢复性睡眠期尖波涟漪波发生时的峰电位发放增加显著强于对照组[(143.0±12.5)% *vs.* (10.5±2.5)%，$t(97)=3.327\,5$，$P=0.001\,2$，图5E]。

相较而言，海马nonPV-IN在NREM睡眠期尖波涟漪波振荡出现时激活较弱(图6A、B)。尽管剥夺组小鼠海马nonPV-IN在恢复性睡眠期尖波涟漪波发生时的峰电位发放频率也高于训练前睡眠期($P<0.05$，图6C)，但其增强的程度与对照组小鼠并无显著差异($P=0.160$，图6D、E)。综上结果提示，睡眠剥夺可能更多增强了海马PV-IN、而非nonPV-IN在恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时的峰电位发放活动。

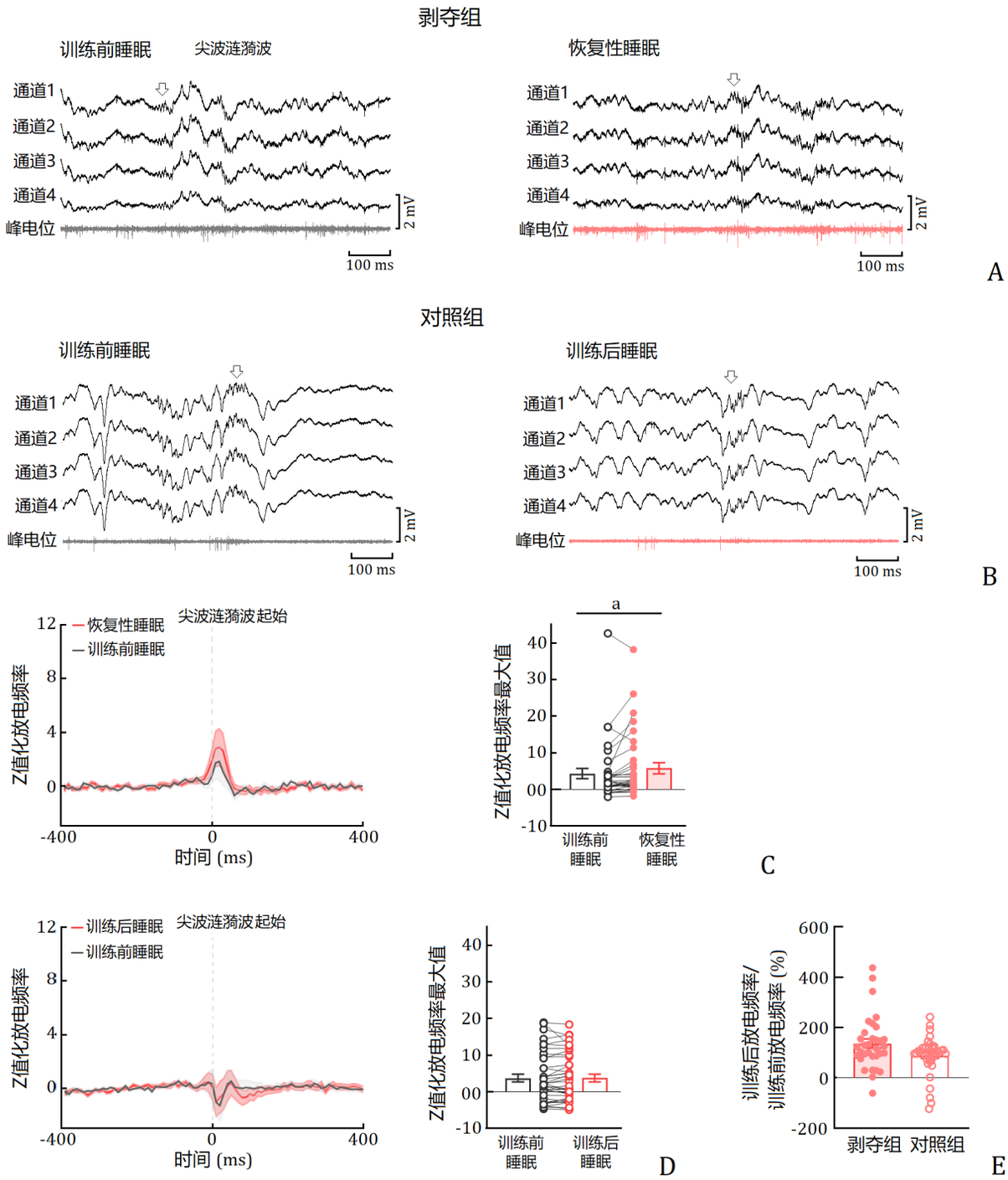


A:睡眠剥夺组小鼠海马PV-IN在tEBC训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放;B:对照剥夺组小鼠海马PV-IN在tEBC训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放;C:睡眠剥夺组小鼠海马PV-IN在tEBC训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放的比较;D:对照剥夺组小鼠海马PV-IN在tEBC训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放的比较;E:睡眠剥夺组和对照组小鼠海马PV-IN在训练后睡眠期峰电位发放相对于训练前睡眠期的增加量比较 a:$P<0.001$;b:$P<0.01$

图5 训练后睡眠剥夺对恢复性睡眠期PV-IN放电反应的影响

3 讨论

本研究综合利用在体多通道记录和光遗传学刺激技术,研究了睡眠剥夺对海马PV-IN在tEBC训练过程中以及剥夺后恢复性睡眠期间放电活动的影响。研究结果显示,睡眠剥夺会减弱海马PV-IN在tEBC训练过程中条件刺激诱发的放电反应,增强海马PV-IN在恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时的放电反应,



A:睡眠剥夺组小鼠海马 nonPV-IN 在 tEBC 训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放;B:对照剥夺组小鼠海马 nonPV-IN 在 tEBC 训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放;C:睡眠剥夺组小鼠海马 nonPV-IN 在 tEBC 训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放的比较;D:对照剥夺组小鼠海马 nonPV-IN 在 tEBC 训练前睡眠期、恢复性睡眠期尖波涟漪波振荡发生时峰电位发放的比较;E:睡眠剥夺组和对照组小鼠海马 nonPV-IN 在训练后睡眠期峰电位发放相对于训练前睡眠期的增加量比较 a:$P<0.05$

图 6 训练后睡眠剥夺对恢复性睡眠期非 PV-IN 放电反应的影响

但睡眠剥夺对海马 nonPV-IN 在上述两个阶段的放电活动则没有显著影响。考虑到 PV-IN 对于海马锥体细胞信息的整合后输出、局部神经振荡的关键调控作用,这些结果有望为全面理解睡眠剥夺导致联合型记忆损害的细胞活动机制提供了新的认识。

PV-IN 是海马中一种重要的中间神经元亚型[19]。该类中间神经元通过投射至锥体细胞近端树突和胞体的轴突,强烈控制着锥体细胞的兴奋活动,进而控

制海马中诸如theta(5~10 Hz)[20]、gamma(30~80 Hz)[14]以及ripple(100~250 Hz)[18]等频带的振荡活动,在多种记忆的形成和巩固中发挥重要作用。近年研究发现,PV-IN在tEBC训练过程中可被条件刺激诱发持续放电增强反应[17],且该反应是条件性眨眼反应习得所必需的[14]。本研究发现,训练后睡眠剥夺会损害条件刺激所诱发的PV-IN放电增强反应。由于PV-IN可与锥体细胞相互作用,介导tEBC训练过程中gamma频带振荡的产生和信息处理[14],推测睡眠剥夺导致的tEBC训练过程中条件刺激诱发的PV-IN放电增强受损,可能影响其与海马锥体细胞的相互作用,进而损害联合型记忆的形成。

NREM睡眠具有促进记忆巩固的作用[21-22]。系统巩固理论是用于解释NREM睡眠如何促进记忆巩固的重要学说之一[23]。支持系统巩固理论的重要发现是海马中编码记忆信息的锥体细胞群体在训练后睡眠期间的重激活现象[24]。大量实验证实,海马中的锥体细胞重激活发生在尖波涟漪波振荡事件期间[24]。锥体细胞重激活时,通过其与PV-IN的交互兴奋-抑制作用,产生高频的尖波涟漪波振荡[25]。本研究发现,在睡眠剥夺后恢复性睡眠期间,海马PV-IN在尖波涟漪波振荡发生时的激活显著更强。由于海马锥体细胞会受到PV-IN的回返或侧支抑制,推测编码记忆信息的锥体细胞的重激活势必受到抑制。事实上,最近的研究发现,睡眠剥夺后锥体细胞的重激活确实被显著抑制,这可能是睡眠剥夺后记忆受损的另一原因[14,24]。而关于为何睡眠剥夺后PV-IN在尖波涟漪波振荡是更强激活,这可能是由于睡眠剥夺后海马锥体细胞突触末梢前膜上的腺苷A2受体被激活所致[26]。睡眠剥夺可导致海马中腺苷水平提升,进而激活腺苷A2受体引起锥体细胞前膜释放的兴奋递质增加。既往研究主要关注睡眠剥夺对海马锥体细胞活动的影响[14,23],本研究则在此基础上进一步研究了睡眠剥夺对特定类型海马中间神经元活动的影响,这拓展了对睡眠剥夺引起记忆损害的细胞活动的新认识。

本研究利用在体多通道记录和光遗传学刺激技术,结合已有的电生理学标准,对海马中间神经元进行了区分标记。其中,一部分对蓝光脉冲刺激没有显著兴奋反应的中间神经元被定义为nonPV-IN。这部分中间神经元对蓝光脉冲刺激没有反应不太可能是因为其未有效转染光敏感通道,主要有三点证据:①nonPV-IN的峰电位发放对于尖波涟漪波振荡没有显著的相位偏好;②在对照组小鼠,nonPV-IN在tEBC训练过程中的峰电位发放反应变化趋势与PV-IN截然不同,前者保持相对稳定,而后者呈现逐渐下降趋势;③在训练后睡眠期尖波涟漪波振荡发生时,nonPV-IN激活的激活程度较弱。表明,本研究中的nonPV-IN确实区别于PV-IN,不能单纯地将中间神经元对光不敏感归咎于它们没有表达光敏感通道。更为重要的是,睡眠剥夺对于nonPV-IN在tEBC训练过程中以及剥夺后恢复性睡眠期间放电活动的影响不显著。而海马内中间神经元种类多样,nonPV-IN仍包含了多种亚型的中间神经元[19]。已有文献报道,睡眠剥夺可通过诱发腺苷分泌而抑制海马胆囊收缩素中间神经元活动,发挥去抑制PV-IN放电活动的效应[27]。因此,不能排除睡眠剥夺可能对其中特定亚型nonPV-IN具有显著的影响作用,并参与睡眠剥夺损害记忆的过程。后期的研究需要进一步细致地评估睡眠剥夺对于不同亚型海马中间神经元的影响效应。

综上所述,本研究揭示了睡眠剥夺对海马PV-IN在联合型记忆形成和巩固过程中放电活动的影响,进一步丰富了对睡眠剥夺导致联合型记忆损害细胞活动机制的理解。此外,PV-IN可能作为改善联合型记忆损害的重要靶点,通过特异性干预记忆训练后睡眠期尖波涟漪波振荡发生时PV-IN的放电活动,改善或缓解睡眠剥夺所造成的记忆损害。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] GREWE B F, GRÜNDEMANN J, KITCH L J, *et al*. Neural ensemble dynamics underlying a long-term associative memory [J]. Nature, 2017, 543(7647): 670-675. DOI: 10.1038/nature2168.

[2] KRAUSE A J, SIMON E B, MANDER B A, *et al*. The sleep-deprived human brain [J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(7): 404-418. DOI: 10.1038/nrn.2017.55.

[3] DAUME J, KAMIŃSKI J, SALIMPOUR Y, *et al*. Persistent activity during working memory maintenance predicts long-term memory formation in the human hippocampus [J]. bioRxiv, 2024: 2024.07.15.603630. DOI: 10.1101/2024.07.15.603630.

[4] KORNBLITH S, QUIAN QUIROGA R, KOCH C, *et al*. Persistent single-neuron activity during working memory in the human medial temporal lobe [J]. Curr Biol, 2017, 27(7): 1026-10. DOI: 10.1016/j.cub.2017.0.01.

[5] KAMIŃSKI J, SULLIVAN S, CHUNG J M, *et al*. Persistently active neurons in human medial frontal and medial temporal lobe support working memory [J]. Nat Neurosci, 2017, 20(4): 590-601. DOI: 10.1038/nn.4509.

[6] LYONS L C, VANROBAEYS Y, ABEL T. Sleep and

memory: The impact of sleep deprivation on transcription, translational control, and protein synthesis in the brain[J]. J Neurochem, 20, 166(1): 24-46. DOI:10.1111/jnc.15787.

[7] KOUKAROUDI D, QIU Z, FRANSÉN E, *et al*. Sleep maintains excitatory synapse diversity in the cortex and hippocampus[J]. Curr Biol, 2024, 34(16): 3836-384.e5. DOI:10.1016/j.cub.2024.07.0.

[8] WANG C, GAO W R, YIN J, *et al*. Chronic sleep deprivation exacerbates cognitive and synaptic plasticity impairments in APP/PS1 transgenic mice[J]. Behav Brain Res, 2021, 412: 113400. DOI:10.1016/j.bbr.2021.113400.

[9] WU K W, HAN W Y, TIAN Q J, *et al*. Activity- and sleep-dependent regulation of tonic inhibition by Shisa7[J]. Cell Rep, 2021, 34(12): 108899. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108899.

[10] LI R R, YAN J, CHEN H, *et al*. Sleep deprivation impairs learning-induced increase in hippocampal sharp wave ripples and associated spike dynamics during recovery sleep[J]. Cereb Cortex, 20, 32(4): 824-838. DOI: 10.1093/cercor/bhab247.

[11] TZILIVAKI A, TUKKER J J, MAIER N, *et al*. Hippocampal GABAergic interneurons and memory[J]. Neuron, 20, 111(20): 3154-3175. DOI: 10.1016/j.neuron.20.06.016.

[12] TOPOLNIK L, TAMBOLI S. The role of inhibitory circuits in hippocampal memory processing[J]. Nat Rev Neurosci, 20, 23(8): 476-49. DOI:10.1038/s41583-022-00599-0.

[13] HIJAZI S, SMIT A B, VAN KESTEREN R E. Fast-spiking parvalbumin-positive interneurons in brain physiology and Alzheimer's disease[J]. Mol Psychiatry, 20, 28(12): 4954-4967. DOI:10.1038/s41380-023-02168-y.

[14] LI R R, ZHANG W W, ZHANG J, *et al*. Sustained activity of hippocampal parvalbumin-expressing interneurons supports trace eyeblink conditioning in mice[J]. J Neurosci, 20, 42(44): 8343-8360. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0834-.20.

[15] VECSEY C G, HUANG T, ABEL T. Sleep deprivation impairs synaptic tagging in mouse hippocampal slices[J]. Neurobiol Learn Mem, 2018, 154: 136-140. DOI:10.1016/j.nlm.2018.0.016.

[16] 杨丹阳, 张维维. 痕迹性眨眼条件反射习得和巩固阶段海马中间神经元的放电活动变化[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(16): 1874-1881. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202312040.
YANG D Y, ZHANG W W. Changes in hippocampal interneuronal activity during acquisition and consolidation of trace eyeblink conditioning in mice[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(16): 1874-1881. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202312040.

[17] ZHANG W W, LI R R, ZHANG J, *et al*. Hippocampal interneurons are required for trace eyeblink conditioning in mice[J]. Neurosci Bull, 2021, 37(8): 1147-1159. DOI: 10.1007/s12264-021-00700-0.

[18] JUDÁK L, CHIOVINI B, JUHÁSZ G, *et al*. Sharp-wave ripple doublets induce complex dendritic spikes in parvalbumin interneurons *in vivo*[J]. Nat Commun, 20, 13(1): 6715. DOI:10.1038/s41467-022-34520-1.

[19] HU H, GAN J, JONAS P. Interneurons. fast-spiking, parvalbumin$^+$ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function[J]. Science, 2014, 345(6196): 125526. DOI:10.1126/science.125526.

[20] AMILHON B, HUH C Y L, MANSEAU F, *et al*. Parvalbumin interneurons of hippocampus tune population activity at *Theta* frequency[J]. Neuron, 2015, 86(5): 1277-1289. DOI:10.1016/j.neuron.2015.05.027.

[21] GIRARDEAU G, LOPES-DOS-SANTOS V. Brain neural patterns and the memory function of sleep[J]. Science, 2021, 374(6567): 560-564. DOI:10.1126/science.abi8370.

[22] CHANG H Y, TANG W B, WULF A M, *et al*. Sleep microstructure organizes memory replay[J]. Nature, 2025. DOI:10.1038/s41586-024-08340-w.

[23] BRODT S, INOSTROZA M, NIETHARD N, *et al*. Sleep-a brain-state serving systems memory consolidation[J]. Neuron, 20, 111(7): 1050-1075. DOI: 10.1016/j.neuron.20.0.005.

[24] GIRI B, KINSKY N, KAYA U, *et al*. Sleep loss diminishes hippocampal reactivation and replay[J]. Nature, 2024, 630(8018): 935-94. DOI:10.1038/s41586-024-07538-.

[25] XIE B X, ZHEN Z H, OUYANG G, *et al*. Progress on the hippocampal circuits and functions based on sharp wave ripples[J]. Brain Res Bull, 20, 200: 110695. DOI: 10.1016/j.brainresbull.20.110695.

[26] CUNHA R A, JOHANSSON B, VAN DER PLOEG I, *et al*. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus[J]. Brain Res, 1994, 649(1/2): 208-216. DOI:10.1016/0006-8993(94)91066-9.

[27] CUNHA R A, RIBEIRO J A. Purinergic modulation of [(3)H] GABA release from rat hippocampal nerve terminals[J]. Neuropharmacology, 2000, 39(7): 1156-1167. DOI: 10.1016/s0028-3908(99)00237-.

(收稿:2025-01-06;修回:2025-01-15)
(编辑 严 涵)