

· 医药生物技术 ·

# TrkB受体依赖的PV神经元调控小鼠视觉方位辨别能力的机制

宛晨晨<sup>1</sup>, 周逸峰<sup>1\*</sup>, 徐光威<sup>1\*</sup>, 刘嘉琛<sup>2</sup>, 刘晓明<sup>1</sup>

1 中国科学技术大学生命科学与医学部, 安徽 合肥 230026

2 安徽医学高等专科学校医学技术学院, 安徽 合肥 230601

宛晨晨, 周逸峰, 徐光威, 刘嘉琛, 刘晓明. TrkB受体依赖的PV神经元调控小鼠视觉方位辨别能力的机制[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4150-4167.

WAN Chenchen, ZHOU Yifeng, XU Guangwei, LIU Jiachen, LIU Xiaoming. TrkB receptor-dependent PV neurons regulate visual orientation discrimination in mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4150-4167.

**摘要:** 神经营养因子-酪氨酸受体激酶 B (tyrosine receptor kinase B, TrkB)信号通路在调控初级视觉皮层(primary visual cortex, V1)兴奋与抑制平衡上发挥着重要的作用, 以往的研究揭示了其通过增加兴奋性传递效率来调控皮层兴奋性水平的机制, 却并未阐明 TrkB受体如何通过抑制系统来调控兴奋与抑制平衡, 进而影响视觉皮层功能。为了探讨 TrkB信号通路如何特异性地调控最主要的抑制性神经元——PV神经元进而对小鼠视觉皮层功能产生影响, 本研究通过病毒特异性地降低 V1区的 PV神经元上 TrkB受体的表达水平, 并通过在体多通道电生理手段记录初级视觉皮层抑制性与兴奋性神经元功能变化, 通过行为学实验测试小鼠的方位辨别能力改变。结果表明, 初级视觉皮层中的 PV抑制性神经元上的 TrkB受体表达减少会显著增加兴奋性神经元的反应强度, 减弱抑制性神经元与兴奋性神经元的方位辨别能力, 增加二者的信噪比, 但是小鼠个体水平的方位辨别能力出现下降。这些结果说明, TrkB信号通路并非单纯通过增加靶向 PV神经元的兴奋性传递来调控 PV神经元的功能, 其对神经元信噪比的影响也并非由于抑制系统的增强所致。  
**关键词:** TrkB受体; 初级视觉皮层; 电生理; 兴奋-抑制平衡系统

资助项目: 安徽省自然科学基金(2022AH052326)

This work was supported by the Anhui Provincial Natural Science Foundation (2022AH052326).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Yifeng, zhouy@ustc.edu.cn; XU Guangwei, weixu@ustc.edu.cn

Received: 2022-12-29; Accepted: 2023-04-06

# TrkB receptor-dependent PV neurons regulate visual orientation discrimination in mice

WAN Chenchen<sup>1</sup>, ZHOU Yifeng<sup>1\*</sup>, XU Guangwei<sup>1\*</sup>, LIU Jiachen<sup>2</sup>, LIU Xiaoming<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China

<sup>2</sup> School of Medical Technology, Anhui Medical College, Hefei 230601, Anhui, China

**Abstract:** The neurotrophin-tyrosine receptor kinase B (TrkB) signaling pathway plays an important role in regulating the balance of excitation and inhibition in the primary visual cortex (V1). Previous studies have revealed its mechanism of regulating the level of cortical excitability by increasing the efficiency of excitatory transmission, but it has not been elucidated how TrkB receptors regulate the balance of excitation and inhibition through the inhibitory system, which in turn affects visual cortex function. Therefore, the objective of this study was to investigate how the TrkB signaling pathway specifically regulates the most important inhibitory neuron-PV neurons affects the visual cortex function of mice. The expression of TrkB receptor on PV neurons in the V1 region was specifically reduced by the virus, the functional changes of inhibitory and excitatory neurons in the primary visual cortex were recorded by multi-channel electrophysiological *in vivo*. The orientation discrimination ability of mice was tested by behavioral experiments, and altered orientation discrimination ability of mice was tested by behavioral experiments. The results showed that reduced expression of TrkB receptors on PV inhibitory neurons in primary visual cortex significantly increased the response intensity of excitatory neurons, reduced the orientation discrimination ability of inhibitory and excitatory neurons, and increased the signal-to-noise ratio, but the orientation discrimination ability at the individual level in mice showed a decrease. These results suggest that the TrkB signaling pathway does not modulate the function of PV neurons solely by increasing excitatory transmission targeting PV neurons, and its effect on neuronal signal-to-noise ratio is not due to enhancement of the inhibitory system.

**Keywords:** TrkB receptor; primary visual cortex; electrophysiology; excitation-inhibition balance system

在神经系统中, 神经营养因子是神经元存活、生长发育、功能和可塑性调节的重要调节因子, 能够促进神经元再生和修复, 在整个发育<sup>[1]</sup>、成年期和衰老过程中<sup>[2]</sup>起着重要作用。神经营养因子和其特异性受体酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 介导着许多重要的过程, 能够调控神经元反应特性、神经元可塑性、突触连接能力和调控皮层的兴奋-抑制

平衡系统<sup>[3]</sup>。

神经营养受体酪氨酸激酶 2 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 2, Ntrk2) 是编码 Ntrk 蛋白家族成员之一。TrkB 信号通路的作用似乎特定于神经元类型<sup>[4]</sup>, 众所周知, TrkB 受体是重要的可塑性调节蛋白, TrkB 介导的可塑性在小鼠的视觉皮层中得到了特别好的表征, 实验发现成年小鼠视觉皮层中含有小清蛋白的中间神经

元的 TrkB 受体的光遗传学激活使神经环路的可塑性增强<sup>[5]</sup>。TrkB 受体在不同类型的神经元中发挥着不同的作用,有研究证明,TrkB 受体能够调控神经元的发放强度,介导锥体神经元兴奋性的急性和长期变化<sup>[6]</sup>,在皮层兴奋性的稳态调节中起着至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>;同时,TrkB 信号传导对于皮层抑制系统的发育及功能也很重要,释放 4-氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)的抑制性中间神经元是脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的主要靶标<sup>[9]</sup>,对于皮层抑制系统的发育及功能也很重要。TrkB 信号的短期作用可以调节突触传递来促进 GABA 能神经元功能,上调抑制系统的能力<sup>[10]</sup>;而长期的 TrkB 表达活性降低会选择性降低 GABA 能中间神经元的兴奋性,导致大脑神经元抑制功能失调<sup>[11]</sup>。对 TrkB 信号诱导的短期和长期研究表明,TrkB 的信号传导对兴奋性、抑制性神经元的功能起着重要调控作用,但其调控机制尚不清楚。TrkB 受体在初级视皮层(primary visual cortex, V1)各层中广泛表达,对 V1 的神经元突触强度、神经系统的发育和可塑性有重要调节作用,TrkB 受体已被证明能够调控眼优势可塑性<sup>[5]</sup>、视觉敏锐度<sup>[12]</sup>和对比敏感度<sup>[13]</sup>等;V1 中 TrkB 的表达水平降低可能导致 GABA 能抑制系统的衰弱及神经元的反应特性的变化<sup>[14]</sup>,也可能是视觉功能下降的重要原因之一。研究大多通过遗传干扰<sup>[15]</sup>、药物控制<sup>[16]</sup>等手段全局性调控整个大脑皮层或皮层锥体细胞的信号通路<sup>[12]</sup>,缺少对抑制性系统的针对性研究,所获得的结果缺乏特异性,同时遗传缺失的模型会影响动物出生后成熟和皮层神经元的正常网络功能。

初级视觉皮层中的一群小清蛋白抑制性中间神经元(parvalbumin, PV),在皮层发育和成熟、调控兴奋-抑制平衡系统中发挥重要作用,

为了进一步探究 V1 的 PV 中间神经元中的 TrkB 受体如何调控视觉信息处理,本研究构建了一种环化重组酶(cyclization recombinase, cre)依赖性的腺相关病毒载体,可以与 PV-cre 小鼠的 PV 抑制性中间神经元特异性结合。本实验下调了小鼠初级视觉皮层中 PV 抑制性神经元上的 TrkB 受体蛋白的表达,并通过电生理手段记录神经元活动以及使用行为学实验测试小鼠的方位方向辨别能力,结果表明能够抑制初级视皮层中 PV 神经元的 TrkB 信号传导能够调控抑制性中间神经元和锥体神经元的反应特性、感受野特征及反应变异性、信噪比,对小鼠的方位辨别能力也有一定的调控作用。本研究结果证明了初级视皮层中 PV 神经元的 TrkB 信号通路的衰弱能够通过抑制性神经元的活性变化进一步调控皮层兴奋性神经元,进而影响皮层兴奋-抑制系统平衡,导致视觉功能障碍,完整的 TrkB 信号传导在初级视皮层网络和个体水平的视觉信息处理过程中发挥重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

小鼠是神经生物学研究领域最常用的模式生物,它们具有特征明确的视觉反应和较短的妊娠时间,是研究发育和成熟中的视觉系统的一个有价值的模型。本研究方案经中国科学技术大学伦理委员会(伦理号:USTCACUC24120122084)批准,所有实验过程均严格按照本机构实验动物指南进行,使用的动物均为成年 PV-cre 基因型的转基因小鼠,体重约 20 g,年龄为 8-14 周龄。本实验将小鼠分为 2 组,2 组小鼠的实验条件一致。小鼠在 23-25 °C 的环境温度下饲养,保持 12 h 光照/12 h 黑暗的循环(8:00-20:00),小鼠被安置在标准啮齿动物笼子里,每个笼子最多 5 只成年鼠,可随意获取水和食物。

实验将小鼠分为 2 组,包括 TrkB 受体正常表达的实验组(即 Ctrl 组)与 TrkB 受体表达下调的实验组(即 TrkB Down 组,下文均简称 TrkB.D 组)。实验所用小鼠分组及数目如下,免疫荧光分析实验:8–14 周龄成年雄性 PV-cre Ai9 小鼠( $n=3$ );电生理实验:8–14 周龄成年雄性 PV-cre 小鼠,分为实验组( $n=12$ )和对照组( $n=9$ );行为学实验:8–14 周龄成年雄性 PV-cre 小鼠,分为实验组( $n=13$ )和对照组( $n=14$ )。

## 1.2 病毒构建和 cre 依赖性基因表达

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体, rAAV-U6-shRNA(trkb)-CMV-EGFP-SV40, 其生成的干扰 RNA (干扰序列 TrkB.T1 或 TrkB.T2)选择性结合 cre<sup>+</sup>神经元的 *Ntrk2* 基因座结构,使其无法正常转录生成 TrkB 受体。对照组病毒 AAV-U6-shRNA(scramble)-CMV-EGFP-pA 为无效序列。体外细胞实验证明,病毒表达后生成的干扰 RNA (T1 或 T2)对靶基因 *Ntrk2* 的干扰效果显著。体外实验结果、病毒靶向位点数据已提交国家微生物科学数据中心(附件 1 和附件 2,编号:NMDCX0000230)。

## 1.3 病毒注射

实验在具有无菌手术环境的实验动物平台进行病毒注射。动物固定在典型的立体定位仪上(标准型脑立体定位仪, RWD)并使用微量注射器(刻度高硼硅玻璃毛细管)填充矿物油和病毒。将小鼠置于立体定位装置上并麻醉(三溴乙醇),并用红霉素眼膏覆盖眼睛。剃除头部多余毛发,使用碘伏消毒后的手术剪,在头部皮肤做一个切口,去除头骨周围的结缔组织,以便清楚地看到颅骨。微调立体定位仪参数并借助定位针使小鼠颅骨前后左右保持在同一水平面。参照小鼠立体定位图谱,标记颅骨处前囱向后 3.5 mm,中线左右 2.5 mm 位置即初级视皮层区域。在钻孔时颅骨钻应尽量垂直于颅骨

表面,避免直接损伤视皮层。打开颅窗后(约 0.25 mm<sup>2</sup>)使用注射器针头取出剩余的头骨,暴露出硬脑膜,将微量注射器的尖端通过硬脑膜降低至初级视皮层中间位置(0.5 mm),以 10  $\mu$ L/min 速度注射 400  $\mu$ L 病毒(注射点三维坐标为:–3.5 mm,  $\pm$ 2.5 mm, –0.5 mm)。完成注射后,微量注射器保持在原位 5 min 后缓慢移除。对进行电生理的小鼠使用碘伏消毒头部创口和带线缝合针(6–0, 3/8 2.5 $\times$ 8 双针)后,将创口缝合,监测小鼠直到完全恢复,然后放入笼子中,5 周后进行心脏灌流或电生理实验。

## 1.4 组织处理和切片

病毒表达 5 周后,用三溴乙醇深部麻醉小鼠用 1 $\times$ PBS (0.1 mol/L, pH 7.4)经心灌注,然后灌注 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA) (pH 7.4)。从颅骨中取出灌注后的大脑,并在 4  $^{\circ}$ C 条件下用 4%的 PFA 固定 16 h,随后使用不同梯度蔗糖溶液(15%、30%)分别先后浸泡使组织脱水下沉。将沉糖后的脑组织从蔗糖溶液中取出,用无尘擦拭纸吸干表面液体并晾置片刻,使表面完全干燥。用冰冻切片包埋剂将脑组织固定在样品托上,使用冷冻切片机(Leica CM 1950)进行冠状切片(25  $\mu$ m 厚度),并使切片悬浮于 1 $\times$ PBS 溶液中,于 4  $^{\circ}$ C 条件下即时保存,24 h 内进行后续处理。

## 1.5 免疫荧光分析

将切片组织在 1 $\times$ PBS 溶液中反复清洗 3 次(10 min,置于 120 r/min 的轨道式实验室摇床),用 10%正常牛血清 4  $^{\circ}$ C 封闭 1 h,然后与一抗 [TrkB 抗体(F-1): sc-377218, 圣克鲁斯生物技术(上海)有限公司]、在 1 $\times$ PBS 溶液 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育 24 h。然后使用 1 $\times$ PBS 洗涤 3 次,并与物种特异性荧光团偶联的二抗 (Goat Anti-Mouse IgM/Alexa Fluor 647, 北京博奥森生物技术有限公司)在 1 $\times$ PBS 中孵育 6 h。接下来使用 1 $\times$ PBS

(10 min, 置于 120 r/min 的轨道式实验室摇床)连续洗涤切片后放载玻片上。所有切片均使用荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)进行盖玻片。使用全景组织细胞定量分析系统以 10×放大倍率采集图像。PV 特征性蛋白(PV-cre Ai9 小鼠的 PV 神经元自发红色荧光)、TrkB 蛋白和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP) (病毒携带的绿色荧光蛋白)的荧光共表达使用软件 ImageJ 进行量化。

### 1.6 胞外电生理技术

实验准备: 对病毒注射 5 周后的小鼠进行电生理记录。使用异氟烷麻醉剂急性麻醉小鼠后, 将其固定在电生理平台上, 并持续使用氧气和异氟烷混合气体(氧气:异氟烷=100:1)维持麻醉状态。使用红霉素眼膏保护小鼠双眼, 防止其长时间暴露在强光下。消毒后清除小鼠颅骨处的头皮, 暴露出病毒注射位置(即初级视皮层)并将皮层表面碎骨及结缔组织清除。此外, 还需在小脑上打开一个颅窗用作参考, 排除干扰。

视觉刺激: 小鼠面前 30 cm 处放置 CRT 显示器(Sony), 显示器的分辨率为 640×480, 刷新率为 75 Hz。实验使用的视觉刺激是由(MATLAB, 2003)和心理物理扩展程序包 Psychtoolbox-3 (PTB-3)编写的特定程序来呈现的正弦移动光栅, 视觉刺激共有 10 个周期, 12 个不同方位的视觉刺激(0°、30°、60°、90°、120°、150°、180°、210°、240°、270°、300°、330°和 360°)随机呈现, 刺激时长为 1 s, 每 2 个视觉刺激间均夹杂着空白刺激以避免上一个方位图像对神经元的影响残留且空白刺激可用于获得神经元的自发放水平。每一次记录前都需要先测量电极记录位点附近符合大多数神经元的相对最优时间频率和相对最优空间频率参数, 随后根据得到的相对最优数据检测神经元在该条件下对

不同方位的调谐能力。下文均简称为最优刺激。

实验记录: 用线性阵列电极(A1×32, poly2, electrode array width-50 μm; site area-177 μm<sup>2</sup>; Neuro Nexus, Ann Arbor, MI, 8.3 mm; Acute 32 channel assembly; LOTUSBIOCHIPS, Diagnostic biochips)对小鼠初级视皮层神经元进行胞外电生理记录植入, 深度为 V1 处皮层下约 800 μm 处(三维坐标为: -3.5 mm, ±2.5 mm, -0.8 mm), 所有神经信号经过前端放大器的滤波和放大(截止频率为 10 kHz, 1 000 Blackrock)传递至神经信号处理系统(采样频率为 30 kHz, 16 位, BLACKROCK), 神经信号处理系统将所记录的电信号转化为数字信号保存。

### 1.7 GO/NO-GO 行为学

手术处理: 将小鼠分为 2 组, 分别注射对照病毒和 TrkB 病毒后, 使用过氧化氢去除颅骨表面及头皮切口处多余的组织及黏液, 将组织胶(3M™ Vetbond™ Tissue Adhesive 1469SB)薄涂于头皮切口以防组织生长, 并用牙科丙烯酸树脂将钛合金贴片固定于小鼠头部, 术后小鼠于温度适宜的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)环境中持续观察至少恢复 1 周后进行行为学训练, 恢复期间小鼠可自由获取饮水和食物。

进行病毒注射及头部贴片的小鼠至少恢复 1 周后方可开始 GO/NO-GO 行为学训练。实验主要分为前期限水适应阶段、初级训练阶段、简单任务阶段、复杂任务阶段及行为学检测阶段。

前期限水适应阶段: 称量手术恢复后的小鼠体重后, 限制每只每天饮水量约 1 mL, 食物可自由获取, 限水期间需与小鼠互动使其熟悉实验人员及行为学平台, 防止后续训练过程中出现应激情况。限水持续至小鼠体重降至原来的 80% 后, 将小鼠头部固定在行为学架子上, 面前屏幕距离小鼠眼睛 25 cm, 屏幕呈现灰屏刺激, 与行为学架子所在直线方向呈 45°夹角, 小鼠前方给水口不限制出水, 小鼠舔舐即可获得 4 μL 水作

为奖励,直至小鼠喝饱水结束训练,每日一次持续 4-7 d,使小鼠学会从给水口获取奖励。

**初级训练阶段:**固定小鼠头部,显示器出现亮屏闪烁作为任务提示,任务提示的 1 s 后呈现垂直方位的正弦光栅为视觉刺激,刺激时长为 4 s,在刺激出现后的 2-4 s 为响应窗口,小鼠在响应窗口舔水即给予 4  $\mu$ L 水作为奖励,不舔或在其余时间舔水均无奖励,这一阶段即为一个循环,每天一轮训练包含 200 个循环,训练后不额外给水,直至小鼠在一轮训练中获得 150 次以上的奖励即视为学会将舔水奖励与视觉光栅相结合。

**简单任务阶段:**显示器出现闪光亮屏闪烁作为任务提示,任务提示的 1 s 后呈现随机出现的垂直方位或竖直方位的正弦光栅为视觉刺激,刺激时长为 4 s,在刺激开始出现后的 2-4 s 为响应窗口;刺激结束后出现 4-8 s 的灰屏,避免神经元对上一个刺激的反应影响对下一个视觉刺激反应。垂直方位的正弦光栅朝左方向移动,视为正确刺激,在此响应窗口期间舔水则给水奖励,称为一次 hit;不舔水则不给水奖励,称为一次 miss。竖直方位的正弦光栅朝上方向移动,视为错误刺激,在此响应窗口期间舔水则给予喷气处罚,称为一次 false;不舔水则不给水奖励或惩罚,称为一次 correct reject。相同方位的光栅出现的次数不会超过 3 次。之后使用 norminv 函数(正态累积分布函数的反函数)计算  $d'$  值来判断小鼠的训练情况。其中  $d'$  值越大,即分辨任务表现越好。 $d'=1$  为阈值,当  $d'$  大于阈值时表明小鼠学会该阶段训练任务,即学会了分辨 2 种不同方位方向的光栅并可作出正确响应,可进入下一阶段训练。

**复杂任务阶段:**显示器出现亮屏闪烁作为任务提示,任务提示的 1 s 后呈现随机出现的垂直方位(90°)、竖直方位(0°)、120°方位或 60°方

位的正弦光栅为视觉刺激,且相同方位的光栅出现的次数不会超过 3 次。刺激时长为 4 s,在刺激出现后的 2-4 s 为响应窗口。此阶段当  $d' > 1$  时表明小鼠学会该阶段训练任务,即学会分辨不同方位方向的光栅,可在干扰中分辨出正确的光栅并作出响应,小鼠可进入检测阶段。

**行为学检测阶段:**测试阶段有 3 种不同的干扰角度,与正确刺激的偏离角度为 10°、15°、20°。显示器出现亮屏闪烁作为任务提示,任务提示 1 s 后呈现随机出现的垂直方位(90°)、竖直方位(0°)、100°(或 105°、或 110°)方位或 80°(或 75°或 70°)方位的正弦光栅为视觉刺激。同样只有垂直方位的正弦光栅为正确刺激,计算  $d'$  值表征小鼠行为学方位方向辨别测试的表现。

## 1.8 数据分析

数据结果使用 Offline Sorter x64 V3 软件,利用主成分分析,通过波形特征(峰值、面积、谷值、峰谷比和峰宽等)手动分选和识别单个 unit,使用 matlab 工具包、NeuroExplorer 5×64 进行拟合、分析,采用 GraphPad Prism 9 进行数据统计。结果表示为 SEM±平均值,显著性阈值: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ 。

(1) 神经元对视觉刺激的反应强度:自发发放和最优刺激下的峰值发放。

(2) 神经元方位调谐能力及敏感性的衡量:方位偏好指数(orientation bias index, OB)、方向偏好指数(direction bias index, DB)。

**方位偏好指数 OB:**公式中  $R_k$  表示神经元在方位为  $\theta_k$  的刺激朝向上的反应值。OB 值从 0-1 不等,OB 等于 0 意味着神经元对任何方位都没有选择性,OB 等于 1 意味着神经元只对特定方位有反应。OB 的计算方式如下:

$$OB = \left| \frac{\sum_k R_k e^{i2\theta_k}}{\sum_k R_k} \right|$$

方向偏好指数 DB: 公式中  $R_k$  表示神经元在方向为  $\theta_k$  的刺激方向上的反应值。表征神经元的方向敏感性, DB 是神经元在所有刺激方向上反应的矢量和与在所有方向上反应强度总和的比值。DB 值越大神经元对偏好方位的选择性就越强, 与 OB 一样, DB 的取值范围处于 0-1 之间。当 DB 为 0, 表示神经元对方向没有选择性, 而等于 1 的 DB 值则表示神经元只对某一特定运动方向产生反应。DB 的计算方式如下:

$$DB = \left| \frac{\sum_k R_k e^{i\theta_k}}{\sum_k R_k} \right|$$

(3) 神经系统中的信噪比(signal-to-noise ratio, SNR)是衡量保真度的最重要参数之一, 代表单个神经元信号提取能力和抗干扰能力及对重复刺激反应变异性的衡量。过去的工作中 SNR 大多单纯以诱发与自发反应强度的比值来表示, 具有局限性, 而本实验综合利用神经元自发、诱发反应的变异性和发放强度, 使用受试者工作特征(ROC)曲线来进行计算, 更加全面地反映信噪比。对单个神经元在最优方位条件下的发放归一化, 并按时间窗划分, 时间窗的大小与视觉刺激的最优时间频率有关。对该穿刺的最大发放以 1 为步长, 将阈值设置为从 0 到最大发放加 1。时间窗中的诱发发放高于阈值即为 hit; 时间窗内的自发发放高于阈值, 即为 false。hit 的比率即为正确预测的概率(correct predictions); false 的比率则记为假报(false alarms)。由此得到一系列不同阈值下的 hit 和 false 比率, 并据此绘制 ROC 曲线, 以曲线下面积(AUC)作为信噪比。

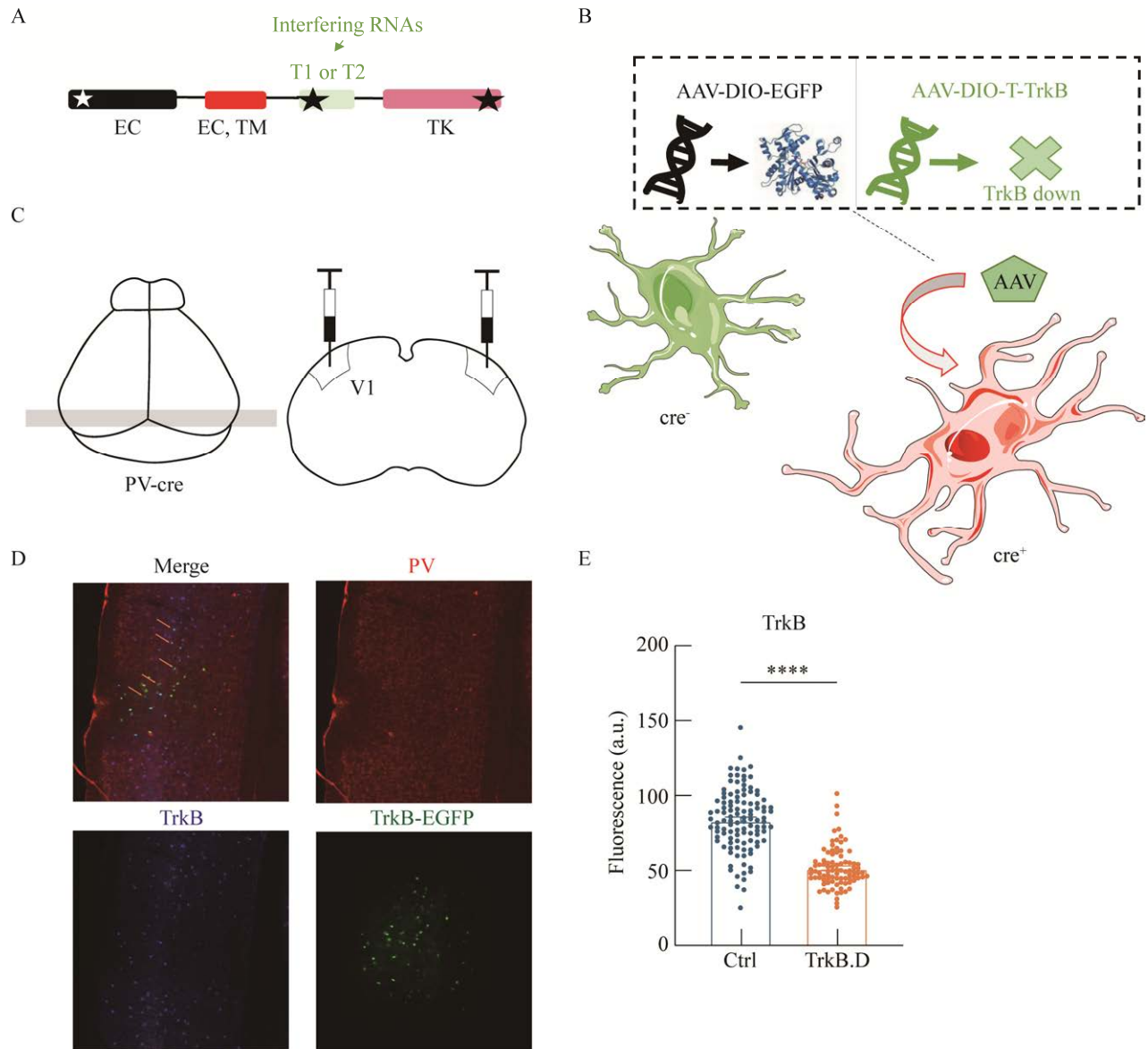
(4) 行为学测试中使用  $d'$  值判断小鼠训练习得情况, 由 hit、miss、false、correct reject 的数值计算, 使用 norminv 函数(正态累积分布函数的反函数)计算。 $d'$  值越大, 说明小鼠分辨任务表现越好。

$$d' = \text{norminv} \left( \frac{\text{hit}}{\text{hit} + \text{miss}} \right) - \text{norminv} \left( \frac{\text{false alarm}}{\text{false alarm} + \text{correct reject}} \right)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 TrkB 靶向成年小鼠 V1 的 PV 中间神经元

为了探究 TrkB 受体如何通过抑制系统调控视觉皮层功能, 本研究构建了一种 cre 依赖性表达的 AAV 载体, 图 1A 为 *Ntrk2* 基因座结构, 干扰 RNA 作用于绿色部分编码区。病毒载体表达 shRNA 选择性结合 cre<sup>+</sup>神经元的 *Ntrk2* 基因座结构, 影响其转录生成 TrkB 受体的过程, 干扰表达的模式图如图 1B 所示, 表达 cre<sup>+</sup>的神经元由病毒转导后表达干扰 RNA 作用于特定神经元, 使 TrkB 蛋白表达下调, 体外细胞实验已证明干扰 RNA 对靶基因 *Ntrk2* 的干扰效果显著。小鼠 V1 中主要包括兴奋性的锥体神经元和抑制性中间神经元, PV 神经元的抑制作用占主导地位<sup>[17]</sup>, 将病毒注射到 8-14 周龄 PV-cre 小鼠的 V1 中, 病毒表达的 shRNA 与 PV 神经元编码 TrkB 基因的 mRNA 特异性结合, 干扰 TrkB 受体蛋白的表达, 病毒注射至 V1 的示意图 1C。病毒注射 5 周后, PV-cre 小鼠 V1 中的代表性免疫荧光检测如图 1D 所示, 在实验组(TrkB 受体表达降低, 以下均简称为 TrkB.D 组)和对照组(Ctrl 组)小鼠的初级视皮层神经元中都检测到病毒表达的绿色荧光。免疫荧光结果验证了 V1 中 TrkB.D-EGFP 病毒特异性靶向表达的 PV 中间神经元也表达 PV 蛋白。PV 是一种钙结合蛋白, 具有活性调节的表达<sup>[18]</sup>。本研究进一步分析了 2 组小鼠 V1 中 PV 神经元的 TrkB 表达水平, 结果显示与对照组相比, 实验组中的 TrkB 表达水平显著降低了(mean of



**图 1** 病毒下调 V1 中 PV 神经元的 TrkB 蛋白的表达水平 A: *Ntrk2* 基因座. 构成性外显子以黑色、红色框表示, 替代性外显子以绿色、粉色框表示, 白色和黑色的星星分别表示起始密码子和终止密码子的位置, 绿色部分为编码区. B: 病毒干扰 TrkB 表达的模式图. C: 病毒注射示意图. D: PV 神经元(红色)、TrkB 受体蛋白(紫色)、病毒(绿色)共表达, Merge 图中的橙色箭头为共表达神经元. E: TrkB 受体蛋白表达水平下降. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$

Figure 1 Virus down-regulates the expression level of TrkB protein in PV neurons in V1. A: *Ntrk2* locus. Constitutive exons are indicated by black and red boxes, alternative exons are indicated by green and pink boxes, white and black stars indicate the positions of the start codon and the stop codon, respectively, and the green part is the coding region. B: Pattern diagram of viral interference with TrkB expression. C: Virus injection diagram. D: PV neurons (red), TrkB receptor protein (purple), and viruses (green) are co-expressed, and the orange arrows in the Merge plot are co-expressing neurons. E: Decreased expression levels of TrkB receptor protein. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



Ctrl=83.76±1.95; mean of TrkB.D=51.7±1.42, \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ) (图 1E), 验证了该病毒在体内体外都能够降低 TrkB 受体蛋白的表达水平。

## 2.2 初级视皮层中 TrkB 蛋白表达影响视觉反应强度

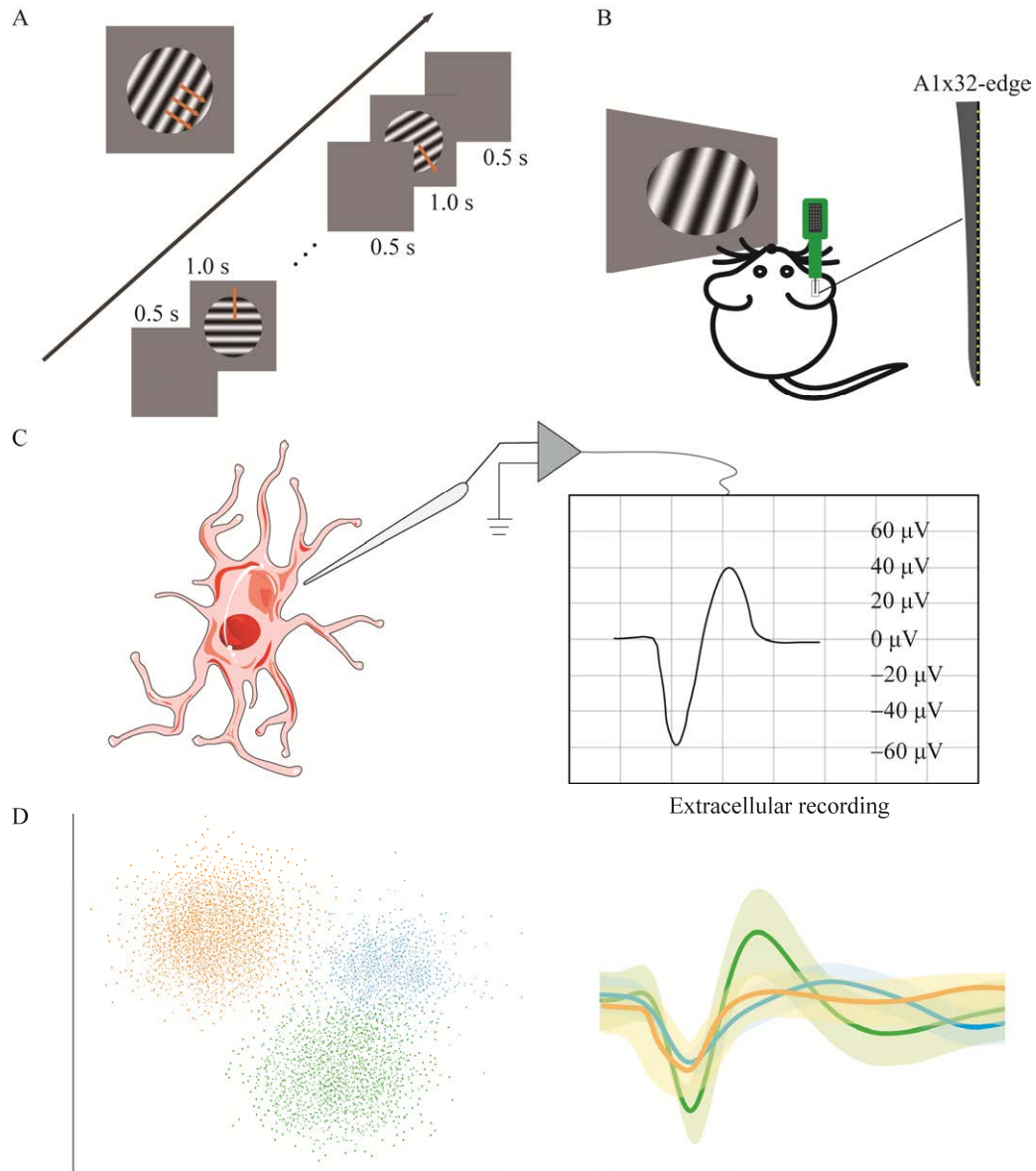
为了进一步探究调控 V1 中 PV 神经元上 TrkB 受体表达对单个神经元和视皮层反应水平的影响, 本研究对 8-14 周龄的 PV-cre 小鼠的 V1 分别注射了该病毒及对照病毒并在病毒表达 5 周后对小鼠的初级视皮层进行了胞外电生理记录。实验所用屏幕与小鼠身体垂直线的夹角为 45°, 距离小鼠眼睛 30 cm。如图 2A 所示, 实验采用的视觉刺激为正弦移动光栅, 示例的刺激光栅在橙色箭头的方向上移动, 光栅刺激的运动方位与运动方向正交, 刺激流程图中显示, 视觉刺激首先呈现一个灰屏(即空白对照)刺激 0.5 s, 光栅刺激与空白对照刺激交替呈现, 不同方位的光栅随机出现, 使用多通道电极对小鼠接收视觉刺激的眼睛的对侧初级视皮层的神经元进行胞外记录(图 2B), 图 2C 为胞外记录初级视皮层神经元的电活动示意图, 将电极放在初级视皮层神经组织的表面以获取附近神经元的电活动, 细胞外记录所得到的电位幅度大小和波形因细胞以及电极位置不同而异。图 2D 是单个穿刺的一个电极记录位点分离出的 3 个单神经元散点图及其波形示意图, 分别展示了主成分分析(principal components analysis, PCA)散点图和散点图代表的 spikes 波形示意图, 显示了 3 个分离良好的单个神经元(single neurons, SU), 不同的颜色代表不同的 SUs。

为了探究 PV 神经元中的 TrkB 受体表达减少是否会调控皮层抑制性神经元和兴奋性神经元活性及功能变化, 实验检测了空白刺激呈现时皮层神经元的自发反应及视觉光栅刺激呈现时皮层神经元的峰值反应以表征神经元活性。

本研究根据神经元的波形特征(较短的波形谷底-峰值持续时间、较大的波形峰谷比和负的波形末端斜率等动作电位特性)将皮层神经元分为两类: 常规发放(regular-spiking, RS)和快速发放(fast-spiking, FS)神经元, 在皮层中它们通常代表兴奋性神经元和抑制性神经元(图 3A、3B), 通过神经元分类, 可以进一步探究视皮层 PV 神经元的 TrkB 受体表达的变化对兴奋-抑制平衡的影响。图 3C 为视觉皮层中 Ctrl 组和 TrkB.D 组的单个 FS 神经元发放示例图, 图中上部分为每个示例神经元发放的 Raster 图, 下部分为 2 s 内神经元发放的密度变化图。分析记录到的实验组( $n=12$ )和对照组( $n=9$ )神经元的自发发放和在最优刺激下的峰值发放, 结果如图 3D-3E 所示, 相比于对照组, TrkB.D 组小鼠的抑制性神经元的自发反应和对最优视觉刺激引起的峰值反应强度有下降趋势(自发发放 mean of Ctrl=4.873±0.379,  $n=347$ ; Mean of TrkB.D=2.744±0.227,  $n=235$ , ns 无显著差异)。而在兴奋性神经元中, TrkB.D 组小鼠的峰值反应强度显著则强于对照组(自发发放 mean of Ctrl=3.983±0.230,  $n=545$ ; Mean of TrkB.D=2.672±0.247,  $n=522$ ,  $P=0.0011$ ; 峰值发放 mean of Ctrl=7.407±0.323,  $n=545$ ; Mean of TrkB.D=8.950±0.488,  $n=522$ ,  $P=0.0030$ )。以上结果说明, 在 V1 中抑制 PV 神经元的 TrkB 表达能够提高了兴奋性神经元的反应活性。

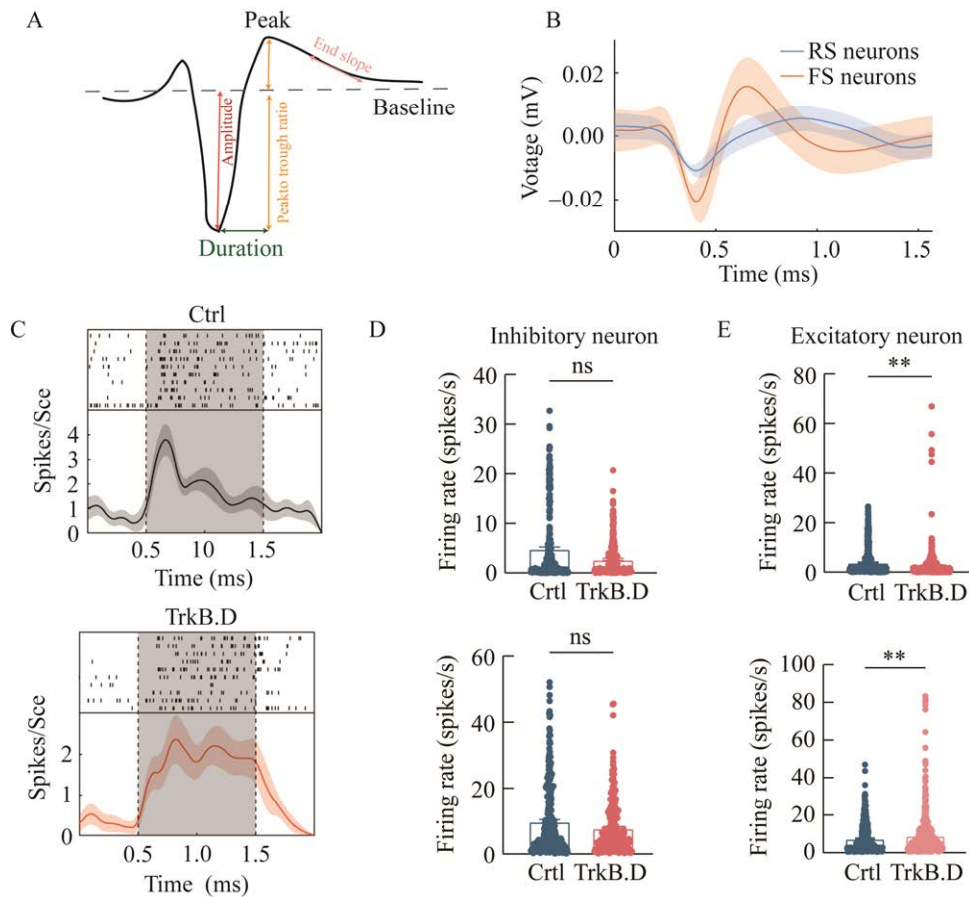
## 2.3 TrkB 受体影响感受野特征

为了探究初级视皮层中 PV 神经元上的 TrkB 受体对皮层感受野特征的影响, 本研究利用在体多通道电生理分别记录并分析了实验组和对照组神经元的方位偏好指数 OB、方向偏好指数 DB。图 4A 显示的是实验组和对照组的视觉皮层典型抑制性神经元的方位、方向偏好示例图。当 OB 值越大时, 封闭图形越窄(如图左



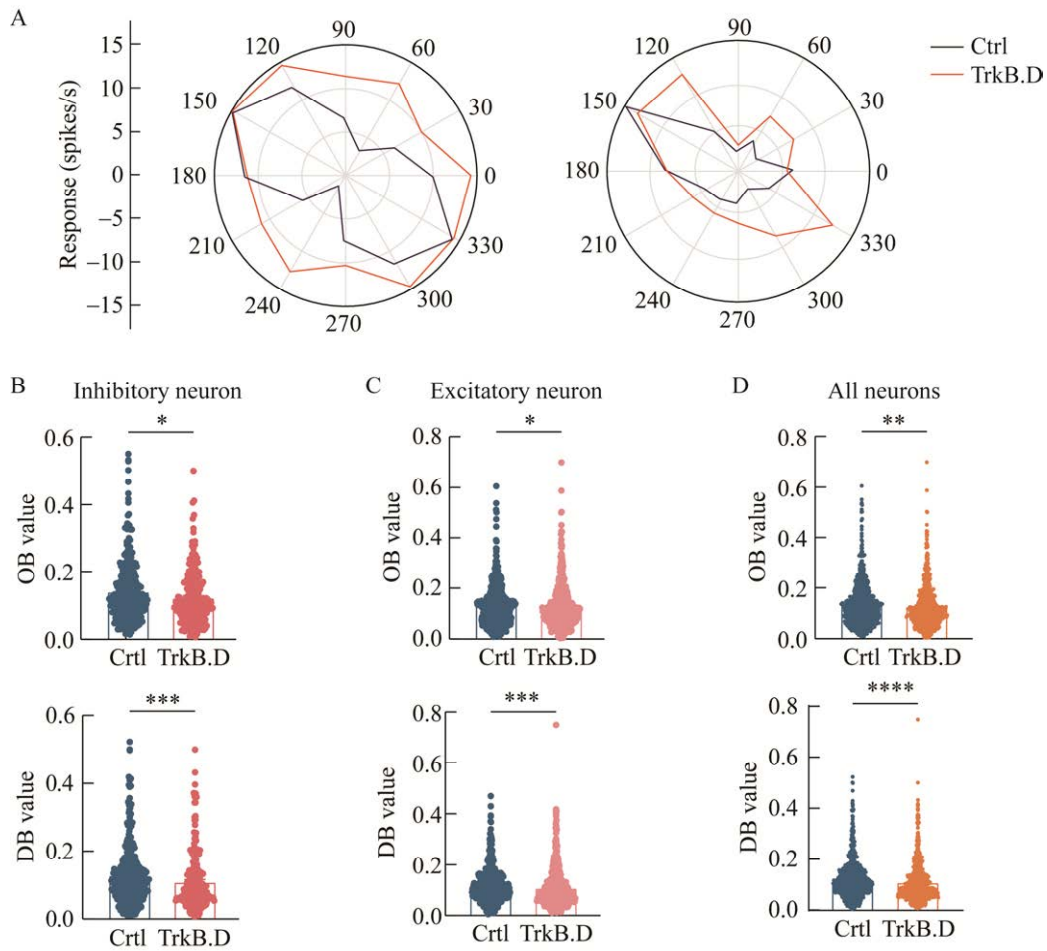
**图 2** 在体电生理记录的视觉刺激设计及记录 A: 运动正弦移动光栅示例(左上)及刺激呈现的流程图(右下)。视觉刺激和空白刺激交替呈现, 共 10 个周期, 每个周期中视觉刺激光栅朝 12 个不同的方向随机移动( $0\text{--}330^\circ$ , 间隔  $30^\circ$ , 还有一个空白刺激用于记录自发活动)。B: 电生理记录示意图。1 $\times$ 32 通道电极记录对侧 V1 神经元信号。C: 电极胞外记录示意图。图为抑制性神经元电活动。D: Spikes 分类的代表性结果和波形示意图

Figure 2 Design and recording of visual stimuli *in vivo* electrophysiological recording. A: Moving sinusoidal moving grating example (upper left) and stimulus presentation flow chart (lower right). Visual stimuli and blank stimuli were alternately presented for a total of 10 cycles. In each cycle, the visual stimulus grating was randomly moved in 12 different directions ( $0\text{--}330^\circ$ , interval  $30^\circ$ , and a blank stimulus was used to record spontaneous activity). B: Electrophysiological recording diagram. The signal of contralateral V1 neurons was recorded by 1 $\times$ 32 channel electrode. C: Electrode extracellular recording diagram. The figure is a schematic diagram of inhibitory neuronal electrical activity. D: Representative results and waveform diagrams of Spikes classification.



**图 3 神经元分类及神经元反应强度变化** A: V1 神经元波形示例. 持续时间(duration)代表波谷和峰值之间的时间间隔; 峰谷比(peak to trough ratio)代表峰值和波谷之间的比率; 末端斜率(end slope)代表波谷 0.5 ms 后的波形斜率, 振幅(amplitude)代表 spikes 距离基线位置的最大位移. B: FS 神经元和 RS 神经元示例. 根据波形特征分类, 快速发放神经元(FS neurons)的波谷至波峰持续时间较短, 峰谷比较大, 末端斜率为负. C: 多神经元(MU)活动的 Raster 图和平均发放密度图. Ctrl 组(上)、TrkB.D 组(下)的 MU 活动对光栅刺激的反应的 10 次试验的 spikes 轨迹统计(750–4 000 Hz 滤波处理), 灰色阴影代表视觉刺激呈现窗口, 垂直虚线表示视觉刺激的开始和结束. D: 抑制性神经元的自发反应(上)和峰值反应(下)强度变化. ns: 无显著差异. E: 兴奋性神经元的自发反应(上)和峰值反应(下)强度变化. \*\*:  $P < 0.01$

**Figure 3** Classification of neurons and response intensity of neurons. A: Example of the waveform of V1 neurons. Duration represents the interval between the trough and the peak; Peak to trough ratio is the ratio of trough to peak. End slope represents the waveform slope after the trough of 0.5 ms, and amplitude represents the maximum displacement of spikes from the baseline position. B: The FS and RS neurons. According to waveform characteristics classification, trough-peak duration of FS neurons is short, peak-trough is large and terminal slope is negative. C: Raster plot and mean emission density plot of multi-neuron (MU) activity. Spikes trace statistics (filtered at 750–4 000 Hz) of MU activity in the experimental group (top) and the TrkB. D group (bottom) for 10 trials in response to raster stimuli. Gray shadows represent the visual stimulus presentation window, and vertical dashed lines represent the beginning and end of the visual stimulus. D: Changes in the intensity of spontaneous responses (top) and peak responses (bottom) of inhibitory neurons. ns: Non-significant. E: Changes in the intensity of spontaneous responses (top) and peak responses (bottom) of pyramidal neurons. \*\*:  $P < 0.01$ .



**图 4 TrkB 受体表达减少引起皮层神经元的方位、方向选择性下降** A: 示例实验组、对照组中记录位点处的单个神经元的方向(左)、方位(右)调谐曲线变化. B-D: 与对照组相比, 发生显著改变. \*:  $P < 0.1$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$

**Figure 4** Reduced expression of TrkB receptors causes decreased orientation and direction selectivity of cortical neurons. A: The direction (left) and orientation (right) tuning curve changes of a single neuron at the recording site in the example experimental group and the control group. B-D: Compared with Ctrl group, the difference was extremely significant. \*:  $P < 0.1$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

侧橙色曲线), 说明神经元的方位选择性越强; 当 DB 值越大时, 封闭图形越偏向于某一角度(如右侧橙色曲线), 说明神经元的方向选择性越强。统计结果发现, 与对照组相比, TrkB.D 组小鼠皮层抑制性神经元和兴奋性神经元的 OB、DB 均显著下降, 兴奋性神经元的 DB 也显著下降(抑制性神经元: OB, mean of Ctrl=0.1413±0.0048, n=347; Mean of TrkB.D=0.1237±0.0052, n=235,

$P=0.0117$ ; DB, mean of Ctrl=0.1312±0.0046, n=347; Mean of TrkB.D=0.1116±0.0054, n=235,  $P=0.0001$ ; 兴奋性神经元: OB, mean of Ctrl=0.1309±0.0034, n=545; Mean of TrkB.D=0.1260±0.0038, n=522,  $P=0.0939$ ; DB, Mean of Ctrl=0.1171±0.0029, n=545; Mean of TrkB.D=0.1100±0.0034, n=522,  $P=0.0005$ ; 皮层所有神经元: OB, mean of Ctrl=0.1349±0.0028,

$n=892$ ; Mean of TrkB.D= $0.1253 \pm 0.0031$ ,  $n=757$ ,  $P=0.0017$ ; DB, mean of Ctrl= $0.1226 \pm 0.0025$ ,  $n=892$ ; Mean of TrkB.D= $0.1105 \pm 0.0029$ ,  $n=757$ , \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ), 说明神经元的方位、方向选择性出现衰减(图 4B-4D)。结果表明调控 V1 中 PV 神经元的 TrkB 信号表达能够调节皮层兴奋性和抑制性神经元的感受野特征, 降低了视皮层神经元的方位、方向选择性。

#### 2.4 TrkB 受体影响皮层神经元信息编码能力

在大脑进行皮层信息处理时, 神经元需要正确区分信号与背景噪声从而确保信息编码的精准性和有效性, 本研究发现 PV 神经元的 TrkB 受体表达的降低会引起视觉皮层的神经元反应活性和感受野特征的变化, 那么, 该受体的变化可能也会影响皮层的信息编码能力。皮层神经元的信噪比(signal-to-noise ratio, SNR)可评估神经元信号提取和抗干扰能力, 两者均可作为评估神经元功能的指标。本研究中除了神经元活性和感受野特征的变化, 也进一步发现神经元信息处理能力的变化。本实验分析了初级视皮层神经元的 SNR 并进行了统计。结果发现, 在抑制性和兴奋性神经元中, SNR 相

比对照组出现增加(图 5)(抑制性神经元: Mean of Ctrl= $0.5927 \pm 0.0048$ ,  $n=298$ ; Mean of TrkB.D= $0.6099 \pm 0.0066$ ,  $n=147$ ,  $P=0.0475$ ; 兴奋性神经元: Mean of Ctrl= $0.5787 \pm 0.0034$ ,  $n=492$ ; Mean of TrkB.D= $0.6050 \pm 0.0047$ ,  $n=404$ , \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ; 皮层所有神经元 mean of Ctrl= $0.5084 \pm 0.0028$ ,  $n=790$ ; Mean of TrkB.D= $0.6065 \pm 0.0038$ ,  $n=578$ , \*\*\*\*:  $P<0.0001$ ), 即从整体来看, 皮层神经元的 SNR 显著上升, 意味着减少 TrkB 受体表达能够诱导视皮层神经元的反应变异性 and 编码保真度的增大。上述结果说明成年小鼠 V1 中 PV 神经元的 TrkB 信号表达参与调控皮层神经元的视觉编码。

#### 2.5 抑制 TrkB 受体表达能够降低小鼠方位辨别能力

在前面的研究中发现, 抑制 TrkB 受体表达会影响小鼠皮层神经元的信息编码能力, 接下来想要探究初级视皮层中 TrkB 蛋白损伤引起的视皮层神经网络变化是否会引个体水平上的视觉功能的变化, 实验小鼠分为 2 组, 一组小鼠的 V1 区域注射了对照病毒( $n=13$ ), 另一组小鼠的 V1 区域注射了 TrkB 病毒( $n=14$ ), 分别对 2 组小鼠进行了 GO/NO-GO 的任务训练。图 6A

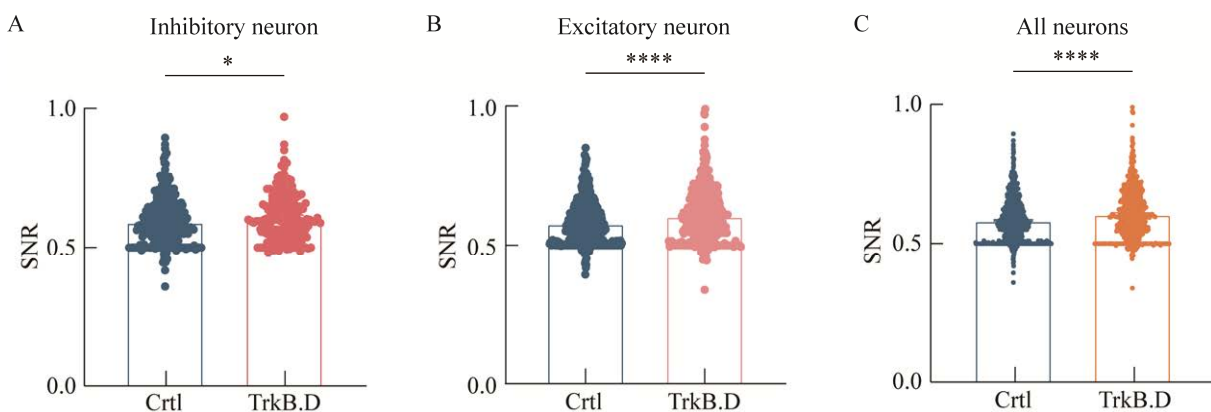


图 5 视皮层神经元的信噪比升高 A-C: 与对照组相比发生显著改变. \*:  $P<0.1$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$   
Figure 5 The signal-to-noise ratio of visual cortical neurons increased. A-C: Compared with Ctrl group, the difference was extremely significant. \*:  $P<0.1$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ .

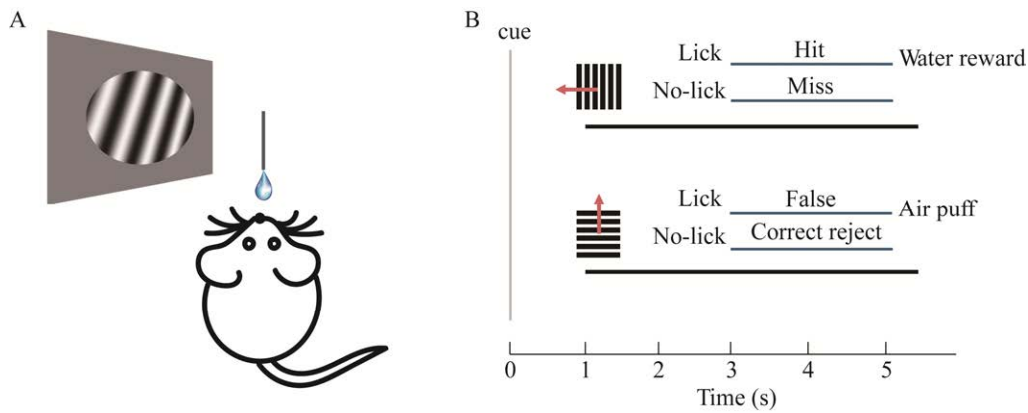


图 6 GO/NO-GO 行为学范式 A: 小鼠固定示意图. B: 0 s 时灰色竖线代表灰屏刺激提示(cue); 1 s 时随机出现不同的光栅; 红色箭头为光栅运动方向; 1-3 s 为小鼠反应阶段, 不会给予水奖励或者吹气惩罚; 3-5 s 即蓝色横线位置为响应阶段.

Figure 6 GO/NO-GO behavioral paradigm. A: Fixed schematic diagram of mice. B: Gray vertical line represents gray screen stimulation cue at 0 s. 1 s; Different gratings appear randomly; The red arrow is the direction of grating motion; 1-3 s was the reaction stage of mice, and no water reward or blowing punishment was given; 3-5 s was the blue horizontal line position is the response stage.

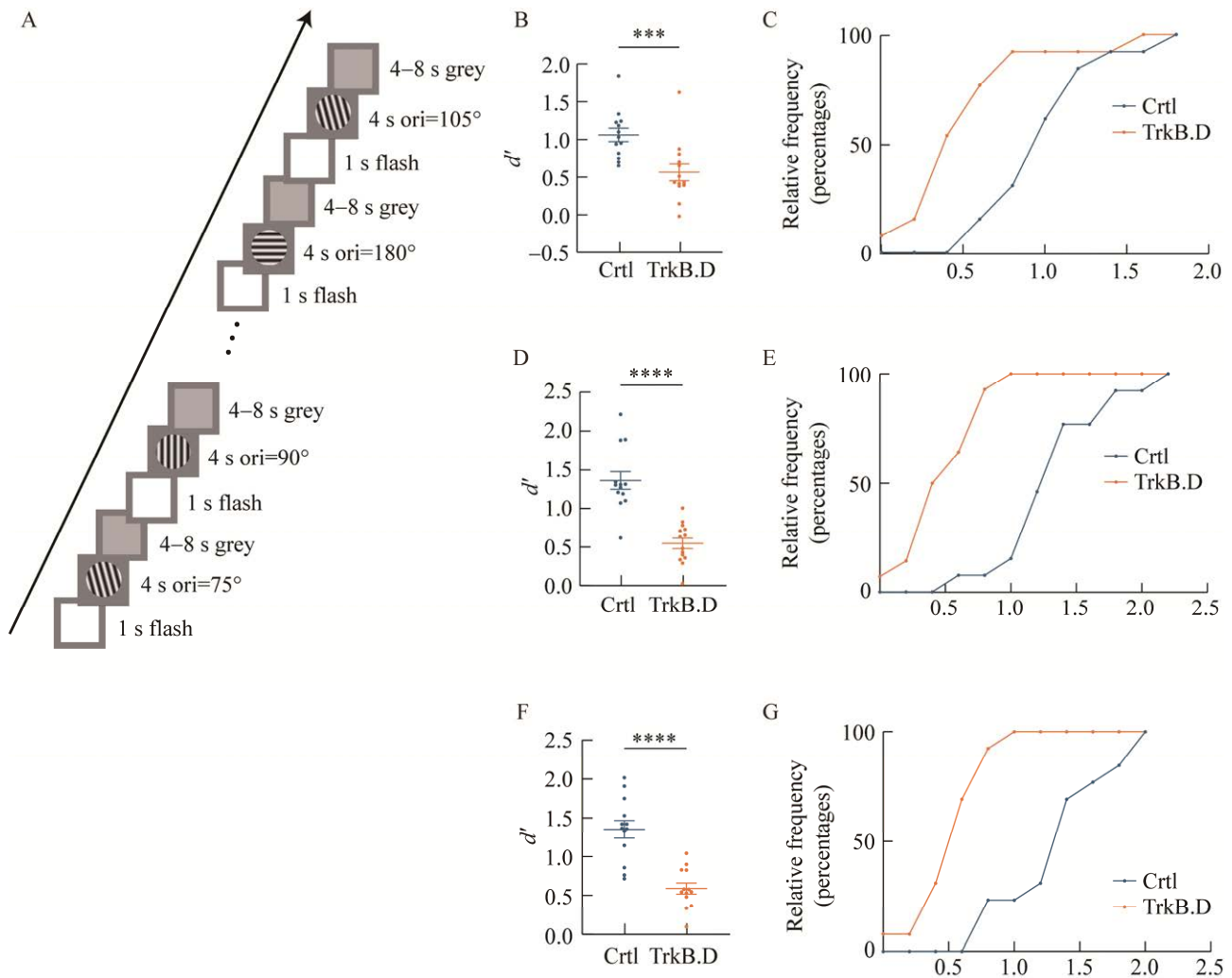
是小鼠行为学范式示意图。小鼠被固定在架子上, 左前方 45° 距眼睛 30 cm 处放置一个电脑显示屏以呈现光栅刺激, 小鼠需要对刺激做出反应(舔水或不舔水)。图 6B 为单个视觉刺激呈现的时间轴示意图(示意图仅显示错误刺激为水平光栅的情况), 0 s 时出现灰屏刺激提示(cue), 提示 1 s 后出现光栅刺激, 刺激出现后的 2-4 s 内为反应窗口, 小鼠只有在出现正确的 GO 光栅(水平运动的竖直光栅)时才可获得水的奖励, 即一次 hit; 不舔水则无奖励, 即一次 miss。小鼠在出现错误的 NO-GO 光栅(图示为竖直运动的水平光栅)时获得吹气惩罚, 即一次 false; 不舔水则无奖励, 即一次 correct reject。

小鼠在简单和复杂任务阶段后已经基本学会判断正确和错误光栅刺激, 图 7 是 2 组小鼠完成前期训练任务后进行检测任务的统计结果。对小鼠进行了 3-5 d 的检测, 并将测试结果的平均值进行统计。图 7A 为检测任务的视觉刺激, 该阶段视觉刺激包括 4 种视觉刺激: 垂直方位(90°)、竖直方位(0°)、100° (或 105°、

或 110°)方位或 80° (或 75°或 70°), 根据公式计算出 2 组小鼠的  $d'$  值, 有 3 种测试角度(与正确视觉刺激的方位的偏离角度为 10°、15°、20°), 结果如图 7B-7G 所示, 相对于对照组小鼠, TrkB.D 组小鼠的  $d'$  值出现明显下降(10°: Mean of Ctrl=1.060±0.090,  $n=13$ ; Mean of TrkB.D=0.569 8±0.112 0,  $n=14$ ,  $P=0.000 6$ ; 15°: Mean of Ctrl=1.366±0.115,  $n=13$ ; Mean of TrkB.D=0.549 0±0.069 4,  $n=14$ , \*\*\*\*:  $P<0.000 1$ ; 20°: Mean of Ctrl=1.352±0.113,  $n=13$ ; Mean of TrkB.D=0.586 8±0.071 4,  $n=14$ , \*\*\*\*:  $P<0.000 1$ ), 说明 2 组小鼠的方位辨别能力有显著性的差异, 对照组的方位辨别能力显著性高于实验组。结果表明, PV 中间神经元上的 TrkB 受体损伤不仅会引起皮层网络水平上神经元的视觉信息处理能力的变化, 还会导致小鼠个体水平上的方位辨别能力的损伤。

### 3 讨论与结论

为了探究初级视觉皮层 PV 神经元的 TrkB 受体是否会调控神经元的反应特性、影响皮层



**图 7 TrkB 蛋白表达障碍降低了小鼠的方位辨别能力** A: 测试阶段视觉刺激. 该图中仅显示测试的视觉刺激的方位分别为 90°、180°、75°、105° 的流程, 图例测试的方位差为 15°. B、C: 方位差为 10° 时, 对照组(Ctrl 组)和实验组(TrkB.D 组)小鼠的  $d'$  值统计图和累积频率分布曲线, 每一个点表示一只小鼠. \*\*\*:  $P < 0.001$ . D、E: 方位差为 15° 时, 对照组(Ctrl 组)和实验组(TrkB.D 组)小鼠的  $d'$  值统计图和累积频率分布曲线. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . F、G: 方位差为 20° 时, 对照组(Ctrl 组)和实验组(TrkB.D 组)小鼠的  $d'$  值统计图和累积频率分布曲线. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$

**Figure 7 Impaired expression of TrkB protein reduced orientation discrimination in mice.** A: Visual stimulation during the test phase. The figure only shows the flow of the orientation of the tested visual stimuli of 90°, 180°, 75° and 105°, and the orientation difference of the tested stimuli is 15°. B, C: When the azimuth difference was 10°,  $d'$  values of mice in control group (Ctrl) and experimental group (TrkB.D) were statistically plotted and cumulative frequency distribution curves, with each point representing a mouse. \*\*\*:  $P < 0.001$ . D, E: When the azimuth difference was 15°,  $d'$  value statistics and cumulative frequency distribution curves of mice in control group (Ctrl) and experimental group (TrkB.D) were obtained. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . F, G: When the azimuth difference was 20°,  $d'$  value statistics and cumulative frequency distribution curves of mice in control group (Ctrl) and experimental group (TrkB.D) were obtained. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

视觉功能,本研究构建了一种 cre 依赖的病毒载体靶向 PV 中间抑制性神经元,在 8-14 周龄的 PV-cre 小鼠的初级视皮层注射该病毒 5 周后,使用胞外在体电生理技术记录小鼠初级视皮层单个神经元的电生理数据,进一步分析单个神经元和群体神经元的反应、感受野特征及皮层信息编码能力;还通过 GO/NO-GO 行为学实验检测小鼠的方位辨别能力。为了进一步探究其机制,通过神经元的波形特征将其分为兴奋性神经元和抑制性神经元。结果表明,相对于对照组,抑制性神经元的反应强度没有明显变化,方位方向选择性下降,信噪比显著升高;兴奋性神经元的 TrkB.D 组神经元的峰值发放反应上升、方位方向选择性下降,信噪比提高。同时还发现,小鼠对不同方位的视觉光栅刺激的方位辨别能力降低。

皮层负责判断、决策等高阶功能,皮层神经元介导的兴奋性和抑制性信号的平衡能够维持大脑正常生理功能,在视觉皮层中,PV 中间抑制性神经元是最主要的抑制性神经元,为锥体神经元提供了抑制输入<sup>[19]</sup>,本研究结果显示,病毒引起的初级视皮层上的 PV 抑制性神经元 TrkB 受体的表达降低能够导致皮层中抑制性神经元的反应活性有下降趋势,而兴奋性神经元诱发反应活性上升。有研究发现,TrkB 受体所介导的信号通路能够调控 PV 神经元对锥体神经元兴奋性信号的接受<sup>[20]</sup>,本研究结果暗示 TrkB 受体在 PV 神经元调控皮层兴奋-抑制平衡中发挥着重要作用。

视觉皮层神经元的方位方向选择性的形成依赖皮层通路的前馈输入,同时受到皮层内抑制系统的调控。皮层内抑制系统的衰退会导致神经元方位方向调谐能力的减弱<sup>[21]</sup>,这是冰山效应的体现。一直以来,TrkB 受体介导的信号通路会调控视觉皮层的视觉信息处理能力已被广泛认可,

但目前尚不清楚 TrkB 受体如何通过兴奋/抑制平衡来调控,本研究试图对抑制性神经元进行分类调控,部分解释了从 TrkB 受体到 PV 神经元再到神经元功能变化等三者之间的关系。

本研究发现下调 PV 神经元上 TrkB 受体的表达水平后,兴奋性神经元的信噪比出现了升高。信噪比通常用来衡量信号传输的保真度,受到神经元反应强度、神经元反应的变异性以及神经元发放强度的影响。由于抑制系统对神经元反应的变异性以及神经元的反应强度都有调控作用,因此信噪比在一定程度上受到 GABAergic 抑制系统的控制<sup>[22]</sup>。比如,Leventhal 等<sup>[23]</sup>在 2003 年报道增强 GABAergic 抑制系统会增加神经元的信噪比,Yao 等也报道抑制 PV 神经元会导致皮层兴奋性神经元信噪比的下调<sup>[22]</sup>。这些报道中抑制系统强弱与信噪比呈现正相关的关系,然而本研究中,PV 神经元的反应强度降低时,抑制性神经元和兴奋性神经元中的信噪比都显著上升,这与他人的结果并不相同。信噪比体现了信号强度(神经元反应强度)与噪声(反应变异性)之比。因此,信号强度与噪声对抑制系统调控的敏感程度差异也会导致抑制强度与信噪比之间并非单一的正相关关系。这可能是本研究中信噪比变化与前人报道存在差异的最主要原因。同时本研究中并非直接调控 PV 神经元,而是下调了 PV 神经元上 TrkB 受体的表达,虽然也在电生理检测中表现出 PV 神经元反应强度的下调,但其对神经元反应鲁棒性的影响可能与直接使用光遗传调控并不相同,这可能是本研究结果与他人之间差异的原因之一,当然这一猜测需要进一步验证。

在行为学部分,我们使用 GO/NO-GO 行为范式检测了下调 PV 神经元 TrkB 受体表达对小鼠方位调谐的影响,发现相比正常对照组,实验组小鼠的方位辨别能力出现了明显下调,这



与我们使用电生理方法检测到视觉皮层神经元的表现一致,表明神经元方位方向调谐对动物个体的方位辨别能力起着关键作用。视觉皮层神经元的方位、方向选择性是保障个体的方位及方向感知以及视觉信息边界检测的基础能力,有实验证明,个体的方位选择能力与单神经元的方向、方位敏感性指数相关。本研究中,我们对实验组和对照组小鼠进行了视觉任务的训练,并且对其方位辨别能力进行了检测。实验中的训练阶段与检测阶段呈现的视觉刺激并不相同,且2组小鼠的学习效率并没有太大差异,排除了小鼠在任务阶段的学习记忆对检测阶段表现的影响,基本说明了小鼠进行检测时的行为学结果是由其视觉皮层功能决定的。本研究结果发现,TrkB受体的表达降低调控了皮层神经元的OB、DB,与之对应的是,在GO/NO-GO行为学实验中同样也发现了实验组小鼠相对于对照组,方位辨别能力出现了下降,说明TrkB受体减少引起小鼠的视觉功能损伤。

总之,本实验抑制初级视皮层中PV神经元的TrkB受体表达影响了TrkB信号传导,使平衡向兴奋性方向偏移,神经元表现出刺激驱动的反应活性、感受野特征变化,神经元提取信息与传递信息的能力也受到影响,神经网络水平的兴奋-抑制平衡的失调又进一步导致小鼠个体水平上的视觉信息辨别能力的减弱。

长久以来,TrkB受体信号通路增强兴奋性突触的传递,被认为参与调控皮层整体的兴奋性,增强TrkB受体信号会增加皮层的兴奋性。然而,在增强兴奋性突触传递过程中,抑制性神经元也更加可能被更大程度激活,兴奋抑制平衡却向皮层反应强度增强偏移,抑制性神经元与兴奋性神经元在TrkB受体的调控下分别如何变化是解释兴奋/抑制平衡偏移的关键,也是解释TrkB受体如何通过抑制系统调控V1神

经元功能的关键。因此本研究先对PV神经元上TrkB受体的调控方式进行了探究,对TrkB受体、PV神经元以及视觉皮层神经元功能变化三者之间的关系进行了探究,表明TrkB受体确实调控皮层神经元的反应强度,并进一步通过抑制系统调控V1区神经元方位方向调谐以及小鼠个体的方位辨别能力。在对信噪比的探究中,发现TrkB受体对信噪比的影响与使用传统方法直接调控抑制性神经元发放对信噪比造成的影响并不相同,这也是后续值得进一步探究的地方。

前期的工作发现,在衰老过程中视觉皮层的TrkB受体信号也出现了衰退,这与老化过程中抑制系统的衰退之间存在何种联系也是本研究展开的促进因素之一。本研究仅仅对抑制系统中的PV神经元进行了探究,希望这些结果能够为老化过程中抑制系统的衰退提供部分解释,也为未来衰老的干预提供一定的借鉴。

## REFERENCES

- [1] GOTTMANN K, MITTMANN T, LESSMANN V. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses[J]. *Experimental Brain Research*, 2009, 199(3/4): 203-234.
- [2] QIN XS, ZHAO Y, ZHANG TY, YIN CH, QIAO J, GUO W, LU B. TrkB agonist antibody ameliorates fertility deficits in aged and cyclophosphamide-induced premature ovarian failure model mice[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 914.
- [3] WU YC, LIU QZ, GUO B, YE FF, GE JL, XUE L. BDNF activates postsynaptic TrkB receptors to induce endocannabinoid release and inhibit presynaptic calcium influx at a Calyx-type synapse[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2020, 40(42): 8070-8087.
- [4] ABIDIN İ, AYDIN-ABIDIN S, MITTMANN T. Neuronal excitability and spontaneous synaptic transmission in the entorhinal cortex of BDNF heterozygous mice[J]. *Neuroscience Letters*, 2019, 690: 69-75.
- [5] WINKEL F, RYAZANTSEVA M, VOIGT MB, DIDIO G, LILJA A, LLACH POU M, STEINZEIG A,

- HARKKI J, ENGLUND J, KHIRUG S, RIVERA C, PALVA S, TAIRA T, LAURI SE, UMEMORI J, CASTRÉN E. Pharmacological and optical activation of TrkB in Parvalbumin interneurons regulate intrinsic states to orchestrate cortical plasticity[J]. *Molecular Psychiatry*, 2021, 26(12): 7247-7256.
- [6] GRAVES AR, MOORE SJ, SPRUSTON N, TRYBA AK, KACZOROWSKI CC. Brain-derived neurotrophic factor differentially modulates excitability of two classes of hippocampal output neurons[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2016, 116(2): 466-471.
- [7] DESAI NS, RUTHERFORD LC, TURRIGIANO GG. BDNF regulates the intrinsic excitability of cortical neurons[J]. *Learning & Memory*, 1999, 6(3): 284-291.
- [8] GUO Y, SU ZJ, CHEN YK, CHAI Z. Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 regulate axon initial segment location and affect neuronal excitability in cultured hippocampal neurons[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2017, 142(2): 260-271.
- [9] ARENAS YAIZA M, MAR M, MARTA L, VICENTE F. Enhanced BDNF and TrkB activation enhance GABA neurotransmission in cerebellum in hyperammonemia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11770.
- [10] MARTY S, MDAP B, BERNINGER B. Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons[J]. *Trends in Neurosciences*, 1997, 20(5): 198-202.
- [11] HOLM MM, NIETO-GONZALEZ JL, VARDYA I, VAEGTER CB, NYKJAER A, JENSEN K. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2009, 29(40): 12412-12418.
- [12] ALEXANDER HEIMEL J, SAIEPOUR MH, CHAKRAVARTHY S, HERMANS JM, LEVELT CN. Contrast gain control and cortical TrkB signaling shape visual acuity[J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(5): 642-648.
- [13] SHOSHINA II, HOVIS JK, FELISBERTI FM, SANTOS NA, ADREEVA A, BUTLER PD, FERNANDES TP. Visual processing and BDNF levels in first-episode schizophrenia[J]. *Psychiatry Research*, 2021, 305: 114200.
- [14] TONG CW, CAO SY. Study on the mechanism of visual aging in cats' primary visual cortex based on BDNF-TrkB signal pathway[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 10576.
- [15] LESNIKOVA A, CASAROTTO PC, FRED SM, VOIPIO M, WINKEL F, STEINZEIG A, ANILA H, UMEMORI J, BIOJONE C, CASTRÉN E. Chondroitinase and antidepressants promote plasticity by releasing TRKB from dephosphorylating control of PTP $\sigma$  in parvalbumin neurons[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2021, 41(5): 972-980.
- [16] SANSEVERO G, BARONCELLI L, SCALI M, SALE A. Intranasal BDNF administration promotes visual function recovery in adult amblyopic rats[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 145: 114-122.
- [17] INGRAM TGJ, KING JL, CROWDER NA. Divisive inhibition prevails during simultaneous optogenetic activation of all interneuron subtypes in mouse primary visual cortex[J]. *Frontiers in Neural Circuits*, 2019, 13: 40.
- [18] GUYON N, ZACHARIAS LR, van LUNTEREN JA, IMMENSCHUH J, FUZIK J, MÄRTIN A, XUAN Y, ZILBERTER M, KIM H, MELETIS K, LOPES-AGUIAR C, CARLÉN M. Adult trkB signaling in parvalbumin interneurons is essential to prefrontal network dynamics[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2021, 41(14): 3120-3141.
- [19] XIANG ZX, HUGUENARD JR, PRINCE DA. Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer V of rat visual cortex[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2002, 88(2): 740-750.
- [20] CHEN L, HU J, MU J, LI C, WU GY, HE C, XIE Y, YE JN. Specific stimulation of PV+ neurons at early stage ameliorates prefrontal ischemia-induced spatial working memory impairment[J]. *Behavioural Brain Research*, 2021, 414: 113511.
- [21] ATALLAH BV, BRUNS W, CARANDINI M, SCANZIANI M. Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli[J]. *Neuron*, 2012, 73(1): 159-170.
- [22] ZHU YJ, QIAO WH, LIU KF, ZHONG HY, YAO HS. Control of response reliability by parvalbumin-expressing interneurons in visual cortex[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6802.
- [23] LEVENTHAL AG, WANG YC, PU ML, ZHOU YF, MA YY. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys[J]. *Science*, 2003, 300(5620): 812-815.

(本文责编 郝丽芳)