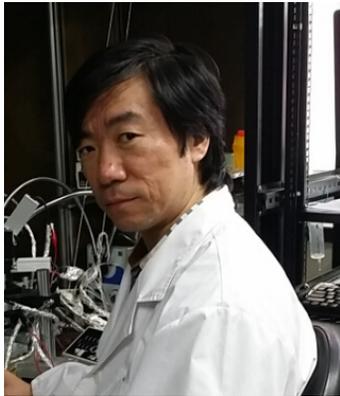


## 领域前沿 · 中国



李澄宇, 中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所研究员。1999年毕业于北京大学, 获得学士学位; 2004年毕业于中科院上海生命科学研究院神经科学研究所, 获得博士学位。2004~2009年在美国加州大学伯克利分校进行博士后研究。2009年加入中科院上海生命科学研究院神经科学研究所, 任课题组长、研究员、博士生导师, 主要研究领域为系统神经科学, 利用光遗传、行为学分析、在体胞外电生理、在体全细胞记录等技术手段, 研究工作记忆这一重要脑功能的神经环路基础; 目前主要以小鼠为动物模型, 研究以基于嗅觉的工作记忆为核心的行为范式。2011年入选中国科学院“百人计划”。近期, 其课题组在Science上发表文章, 阐明内侧前额叶皮层在工作记忆任务学习期间的功能角色(Liu D, *et al.* Science, 2014)。

## 内侧前额叶在“延迟期间”电活动对工作记忆任务学习的贡献

刘 鼎 顾晓炜 朱 嘉 李澄宇\*

(中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 上海 200031)

“工作记忆”(working memory)是一种重要的短时程记忆, 它负责对实时信息进行短暂的储存和运用。这个短暂储存的时间被称为记忆的“延迟期”(delay period)<sup>[1-3]</sup>。比如在做心算时(例如 $17 \times 24$ ), 大脑需要按照运算法则对不同数位的数字进行依次运算, 而中间结果需要在记忆延迟期内暂时存储下来, 最后得到计算结果。又如在打电话时, 当被告知一个陌生号码时, 我们需要在工作记忆中把这个号码暂时存储下来, 然后将电话拨出。

前人的研究表明, 大脑前额叶皮层(prefrontal cortex, PFC)对处理工作记忆非常重要。因为在灵长类背外侧前额叶(dorsolateral PFC)以及啮齿类内侧前额叶(medial PFC, mPFC)都记录到了与工作记忆相关的延迟期神经元电活动, 而且干扰前额叶电活动会损害工作记忆的准确性<sup>[3-10]</sup>。然而, 前额叶延迟期电活动的具体功能还不十分清楚。这是因为除了最有可能的对记忆的维持(memory retention)和对注意力的控制(attentional control)这两个功能<sup>[2-3, 11]</sup>

之外, 前额叶还参与其他功能<sup>[3, 12-13]</sup>, 如抑制控制(inhibitory control)<sup>[14]</sup>、抉择制定(decision making)<sup>[15]</sup>和运动选择(motor selection)<sup>[16]</sup>等。在经典的延迟-反应任务(delayed-response task)中, 抉择在延迟期之前已经做出, 这使得“抉择”和“记忆”在行为时序上很难分开<sup>[3, 12]</sup>。因此, 使用这类任务来研究延迟期电活动, 就不能很好地阐明其功能。与此同时, 传统的干预手段, 比如经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation)<sup>[17]</sup>和微电流刺激(electrical stimulation)<sup>[18]</sup>, 都不能实现对不同神经元类型进行“秒”级时间尺度的操控。因此, 这类方法也不能阐明前额叶延迟期间电活动参与工作记忆任务的具体机制。

为了解决这些问题, 我们采用了一个在时间上可以将记忆储存和其他功能分开的工作记忆任务<sup>[5-6, 19-20]</sup>, 并且通过“光遗传学”(optogenetics)手段<sup>[21]</sup>, 实现了在特定行为时相对不同类型神经元进行双向调控(激活或抑制)的目的。

我们训练小鼠学习一个嗅觉任务——“延迟非匹配样本”(delayed nonmatch to sample)任务(图1A和图1B)。在这个任务中, 平时限制饮水的小鼠会先后闻到两个一样(match)或者不一样(nonmatch)的气

\*通讯作者。Tel: 021-54921824, E-mail: tonylicy@ion.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921824, E-mail: tonylicy@ion.ac.cn

网络出版时间: 2014-12-01 19:55

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.9001.html>

味。如果气味不一样,小鼠可以在出水口舔到水作为奖励;如果气味一样,小鼠则需要抑制自己不去舔水(即使舔也没有水)。在闻到两次气味之间,有一段4~5秒无气味的“延迟期”,在这段时间里,小鼠需要记住第一个气味,然后和第二个气味作比较以完成任务。这一任务的特点和优势就在于,“延迟期”将记忆存储和抉择行为分开,从而可以分时段、特异性地研究信息的存储和抉择等不同行为。

在任务学习过程中,小鼠的行为正确率稳步上升。正确率的上升主要体现为气味相同时(match trials),正确拒绝次数(correct rejection rate)的增加(也就是抑制自己不去舔水行为的增加);而气味不同时(nonmatch trials)的正确命中率(hit rate)一直处于较高水平。我们发现,随着延迟期时间的增长,小鼠的行为正确率会逐渐下降,这也符合工作记忆准确性随时间衰减的基本特征<sup>[1,3]</sup>。

为了证明mPFC参与上述任务,我们在小鼠双侧mPFC表达一种可以被特异性药物clozapine-N-oxide(CNO)激活的受体蛋白hM4Di<sup>[22]</sup>。这个受体一旦被激活,受体所在神经元的电活动将会受到抑制。我们发现,通过上述方法抑制mPFC电活动可以显著地降低小鼠任务学习的正确率。这一结果说明,mPFC的确参与了小鼠学习上述工作记忆任务的过程。

接下来我们使用“光遗传学”的手段,进一步探究了mPFC锥体神经元(pyramidal neurons)在延迟期间的功能。我们首先在双侧mPFC抑制性神经元(GABAergic inhibitory neurons)<sup>[23]</sup>中表达channel rhodopsin 2(ChR2,一种可以被蓝光激活的阳离子通道,激活后使神经元去极化产生动作电位)<sup>[21]</sup>。在双侧mPFC埋置光纤并进行持续蓝光(473 nm, 2 mW)照射,可以有效激活抑制性神经元,从而实现对锥体神经元的间接抑制。在小鼠训练任务时,我们特异性地在延迟期间给光,发现这种操作可以显著地降低小鼠学习的正确率和正确拒绝次数。然而出乎我们意料的是,一旦小鼠熟练掌握了任务(well-trained),这种操作就不能影响行为正确率。一些研究认为,PFC更多地参与到新的和需要集中注意力的任务中,而不是常规的、反复练习的熟练任务<sup>[2-3,12,24]</sup>。因此,我们的研究结果和前人的观点是一致的。

为了直接验证延迟期锥体神经元的作用,我们在小鼠双侧mPFC表达halo-rhodopsin(NpHR,一种绿

光激活的氯离子泵,可以使神经元超极化,抑制其电活动)<sup>[21]</sup>,并在延迟期间通过双侧埋植的光纤施以持续绿光(532 nm, 10 mW)照射。结果和上述实验是一致的,即在延迟期间抑制mPFC锥体神经元电活动,可以显著地降低小鼠学习工作记忆任务的正确率;并且这一操作不影响习得以后的行为(图1C)。

因为在每次任务中第一个气味是不同的,所以每次任务延迟期的记忆储存也是不同的,而且在不断更新。于是,我们设计在任务学习的某些延迟期间对mPFC进行光遗传抑制操作,而另一些则不抑制。结果发现,进行抑制的行为正确率要明显低于不进行抑制的情况。这提示我们,mPFC延迟期间电活动介导了不断更新的信息。与此同时,我们选择初级体感皮层(S1)作为对照,发现对该区域延迟期电活动进行抑制,不会影响小鼠学习的正确率。

既然抑制mPFC锥体神经元会影响学习,那么兴奋这些神经元会不会促进学习呢?为了回答这个问题,我们在双侧mPFC锥体神经元中表达ChR2,并在延迟期间进行持续蓝光激活(473 nm, 0.8 mW)。结果发现,这一操作也会导致学习正确率的下降。这提示我们,神经元内在的放电模式(endogenous pattern)是很重要的,无论是同步的抑制还是同步的激活,都会影响到这种模式,从而影响行为。

为了探索mPFC在不同行为阶段的功能特异性,我们在第二个气味出现时(即抉择行为期间)进行光遗传抑制。结果发现,在学习的早期,这种操作不会影响行为;然而在学习的后期一直到完全习得,抑制mPFC则会显著地导致行为正确率的下降。这一结果说明,mPFC在不同时段的功能的确存在差异。这也解释了为何在前人的一些实验中,PFC也参与习得以后工作记忆的处理:因为其参与了抉择行为,而非延迟期间的记忆储存。

为了进一步阐明mPFC在延迟期间的功能,我们设计了两个对照实验。在其中一个实验中,两次气味之间的延迟期被去掉,在这种情况下,并不需要保持记忆,但是抉择、抑制控制、运动选择等其他功能依然需要。在另一个对照实验中,虽然在任务结构上保留了“延迟期”,但是小鼠的选择只和第二个气味有关,因此也没有记忆保持的要求。我们发现,在这两种情况下,光遗传抑制操作都不会影响小鼠的学习正确率。这一结果提示我们,延迟期mPFC电活动更有可能参与了工作记忆的维持,而不是其

他功能。

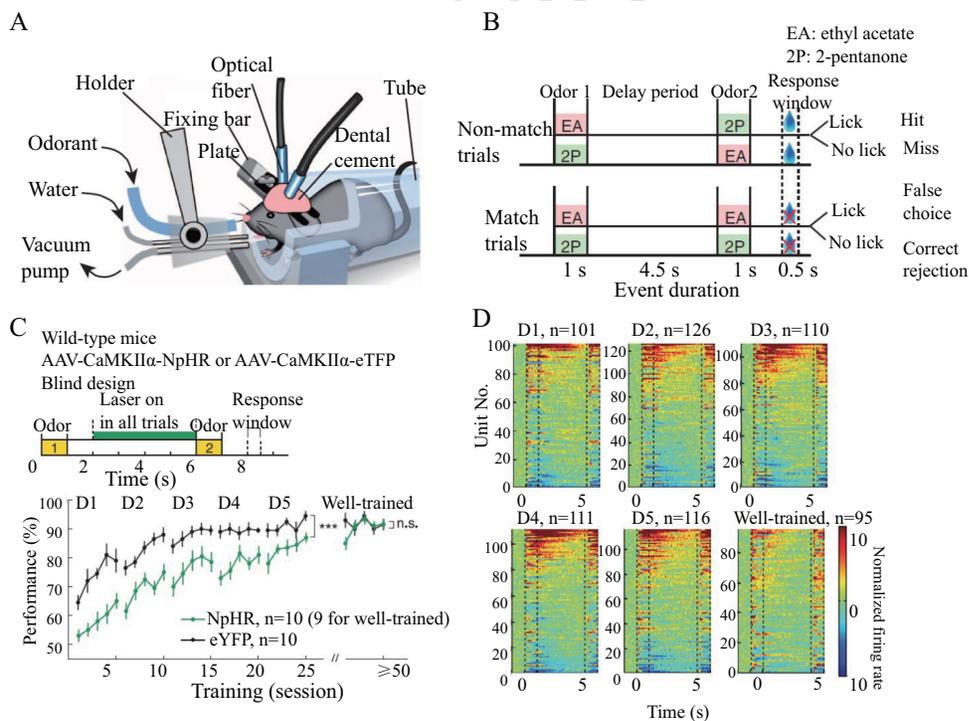
接下来,我们在小鼠学习任务过程中,对mPFC神经元电活动进行了细胞外电生理记录。我们使用自己制作的tetrodes电极可以记录和分检出符合要求的单个神经元电活动(single unit activity)。在学习阶段,我们在15只小鼠上共记录到564个神经元;在习得以后,我们在15只小鼠上共记录到95个神经元。经过分析发现,在学习期间,延迟期间电活动较习得之后更加明显(图1D);神经元电活动被激活或被抑制的程度也在学习期间更显著。

为了在延迟期间保持第一个气味的记忆信息,群体神经元电活动应该在不同的第一个气味之后呈现出不同的反应模式。为了验证这个假设,我们对群体神经元电活动数据进行了主成分分析(principal component analysis)<sup>[25]</sup>。我们将不同记忆相关的群体电活动在前三个主成分空间内随时间变化的轨迹

画出来,并进一步计算出轨迹之间的距离。结果发现,在学习期间的轨迹距离显著大于习得以后。而且在学习期间,行为正确时的轨迹距离要比行为错误时更大。这提示我们,延迟期间mPFC神经元群体电活动很有可能参与了记忆的编码。与此同时,在解码分析(decoding analysis)<sup>[26]</sup>中也观察到,在学习期间的群体电活动比习得之后能够更有效地推测出第一个气味是什么。

接下来,我们分析了神经元延迟期间气味选择性和小鼠行为正确率之间的关系。我们发现,来自同一只小鼠神经元的平均气味选择性和这只小鼠的行为正确率在学习期间有显著的正相关关系,而一旦小鼠习得任务,这种相关性就不复存在了。

综上所述,我们的工作通过“延迟期”的设计,使行为中“记忆储存”和“抉择行为”相分离;在此基础上,使用光遗传学的手段特异性地在延迟期间或



A: 小鼠行为训练系统; B: 工作记忆任务示意图; C: 行为学和光遗传学操作结果。行为正确率=(正确命中+正确拒绝)/全部。每个点代表一组(session)训练的成绩,每天5组(共100次,每组20次)。抑制工作记忆期间的神经活动可以明显地降低学习期间的行为正确率(\*\* $P < 0.001$ ),但不影响习得后行为(n.s.); D: 内侧前额叶神经元在整个训练过程中群体电活动的变化。每一行代表一个神经元,颜色代表神经元电活动的放电频率(标准化后)。1~5秒是工作记忆的延迟期。结果显示学习中延迟期间反应更强。

A: behavioral training system; B: working memory task paradigm; C: behavioral performance and optogenetic experiment results. Each dot represents the performance correct rate of 20 trials (or 1 session). Performance=(Hit+Correct rejection)/Total number of trials. For each day, mice performed 100 trials; D: modulation of population activity, which was normalized in Z-score and averaged across all trials for each neuron. 1~5 s is the delay period.

图1 学习工作记忆任务过程中内侧前额叶神经元电活动以及光遗传学操作记忆延迟期电活动对行为正确率的影响(根据参考文献[27]修改,经过Science Press许可)

Fig.1 Modulation of mPFC delay-period activity in learning the working memory task and the impaired behavior performance by suppressing mPFC delay-period activity (modified from reference [27], with permission from Science Press)

者抉择行为期间对mPFC神经元进行操作; 进而阐明了延迟期mPFC电活动对任务学习期间工作记忆储存的重要贡献。这一工作也间接提示可能有其他脑区参与任务习得以后工作记忆的储存。

### 参考文献 (References)

- 1 Baddeley AD. Working memory. Oxford Oxfordshire New York: Clarendon Press; Oxford University Press; 1986.
- 2 Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Ann Rev Neurosci* 2001; 24(1): 167-202.
- 3 Fuster JM. The Prefrontal Cortex. 4 ed: Academic Press; 2008.
- 4 Fuster JM, Alexander GE. Neuron activity related to short-term memory. *Science* 1971; 173(3997): 652-4.
- 5 Miller EK, Erickson CA, Desimone R. Neural mechanisms of visual working memory in prefrontal cortex of the macaque. *J Neurosci* 1996; 16(16): 5154-67.
- 6 Romo R, Brody CD, Hernandez A, Lemus L. Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* 1999; 399(6735): 470-3.
- 7 Baeg EH, Kim YB, Huh K, Mook-Jung I, Kim HT, Jung MW. Dynamics of population code for working memory in the prefrontal cortex. *Neuron* 2003; 40(1): 177-88.
- 8 Fujisawa S, Amarasingham A, Harrison MT, Buzsaki G. Behavior-dependent short-term assembly dynamics in the medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 2008; 11(7): 823-33.
- 9 Erlich JC, Bialek M, Brody CD. A cortical substrate for memory-guided orienting in the rat. *Neuron* 2011; 72(2): 330-43.
- 10 Meyers EM, Qi XL, Constantinidis C. Incorporation of new information into prefrontal cortical activity after learning working memory tasks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(12): 4651-6.
- 11 Desimone R. Neural mechanisms for visual memory and their role in attention. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 13494-9.
- 12 Passingham RE, Wise SP. The neurobiology of the prefrontal cortex: Anatomy, evolution, and the origin of insight. 1st ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2012.
- 13 Wang SH, Morris RG. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 2010; 61: 49-79, C1-4.
- 14 Dias R, Aggleton JP. Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: Differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility. *Eur J Neurosci* 2000; 12(12): 4457-66.
- 15 Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 2012; 76(6): 1057-70.
- 16 Matsumoto K, Suzuki W, Tanaka K. Neuronal correlates of goal-based motor selection in the prefrontal cortex. *Science* 2003; 301(5630): 229-32.
- 17 Allen EA, Pasley BN, Duong T, Freeman RD. Transcranial magnetic stimulation elicits coupled neural and hemodynamic consequences. *Science* 2007; 317(5846): 1918-21.
- 18 Sobotka S, Diltz MD, Ringo JL. Can delay-period activity explain working memory? *J Neurophysiol* 2005; 93(1): 128-36.
- 19 Otto T, Eichenbaum H. Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: Evidence for hippocampal processing in recognition memory. *Hippocampus* 1992; 2(3): 323-34.
- 20 Lu XC, Slotnick BM, Silberberg AM. Odor matching and odor memory in the rat. *Physiol Behav* 1993; 53(4): 795-804.
- 21 Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 389-412.
- 22 Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(12): 5163-8.
- 23 Chao HT, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, *et al.* Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 2010; 468(7321): 263-9.
- 24 Ostlund SB, Balleine BW. Lesions of medial prefrontal cortex disrupt the acquisition but not the expression of goal-directed learning. *J Neurosci* 2005; 25(34): 7763-70.
- 25 Rabinovich M, Huerta R, Laurent G. Neuroscience. Transient dynamics for neural processing. *Science* 2008; 321(5885): 48-50.
- 26 Meyers EM, Freedman DJ, Kreiman G, Miller EK, Poggio T. Dynamic population coding of category information in inferior temporal and prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 2008; 100(3): 1407-19.
- 27 Liu D, Gu X, Zhu J, Zhang X, Han Z, Yan W, *et al.* Medial prefrontal activity during delay period contributes to learning of a working memory task. *Science* 2014; 346(6208): 458-63.