

*Otx1*在小鼠癫痫样行为中的潜在作用机制： 大脑皮质第5皮层锥体神经元生理功能的“调节者”

张云峰^{1*} 文正伟²

(¹温州医科大学眼视光学院、温州医科大学附属眼视光医院, 温州 325027; ²温州医科大学基础医学院, 温州 325027)

摘要 转录因子*Otx1*在大脑皮质第5皮层锥体神经元中特异性表达。该研究利用全细胞膜片钳记录技术和神经元三维形态模拟重构及定量分析平台探讨*Otx1*在小鼠癫痫样行为中的潜在作用机制。结果表明, 在大脑皮质运动区第5皮层锥体神经元中鉴定到四种不同放电类型的神经元, 即固有爆发式、节律性振荡爆发式、适应性规律式及紧张性放电型。与对照相比, *Otx1*突变小鼠中规律式放电神经元的比例显著升高, 而爆发式放电神经元的比例显著减少并表现出增强的兴奋性。此外, *Otx1*突变促使神经元动作电位(action potential, AP)阈值、输入阻抗及快速后超极化电位都显著降低, 进而使其兴奋性增强。*Otx1*突变降低神经元基树突形态结构复杂性, 主要表现为基树突表面积、体积、分节表面积及分节体积的显著降低。可见, *Otx1*突变导致大脑皮质运动区第5皮层锥体神经元生理功能的改变可能是小鼠癫痫样行为的潜在原因。

关键词 全细胞膜片钳记录; 癫痫样行为; 第5皮层锥体神经元; *Otx1*突变; 基树突

The Potential Role of *Otx1* in Epileptic-like Behavior Mice: the “Modulator” of Physiological Function of Layer V Pyramidal Neurons in the Cerebral Cortex

Zhang Yunfeng^{1*}, Wen Zhengwei²

(¹School of Ophthalmology & Optometry, The Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China;

²School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract The transcription factor *Otx1* is specifically expressed in layer V pyramidal neurons (L5PNs) in the cerebral cortex. This study used the whole-cell patch clamp recording and 3D neuronal morphological reconstruction and analysis to investigate the potential role of *Otx1* in epileptic-like behavior mice. Four types of L5PNs with distinct firing patterns, namely intrinsically bursting (IB), rhythmic oscillatory bursting (ROB), adapting regular spiking (RS_{AD}) and tonic firing (TF) were confirmed. Compared with controls, the proportion of regular spiking neurons increased significantly while the burst firing neurons decreased remarkably with enhanced excitability in the *Otx1* mutant mice. The AP-thresholds, input resistance and fast after-hyperpolarization of L5PNs decreased markedly in the *Otx1* mutant mice, leading to an enhanced neuronal excitability. Moreover, *Otx1* mutation reduced basal dendritic morphological structural complexity, which mainly exhibited as the significant decrements in the surface area, the volume, the segment surface area and the segment volume. It suggested that change in physiologi-

收稿日期: 2014-12-25 接受日期: 2015-02-12

国家自然科学基金(批准号: 81301117)和温州市科技计划项目(批准号: Y20140049)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88067935, E-mail: zhangyunfeng1983@163.com

Received: December 25, 2014 Accepted: February 12, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81301117) and the Science and Technology Project in Wenzhou (Grant No.Y20140049)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88067935, E-mail: zhangyunfeng1983@163.com

网络出版时间: 2015-05-05 17:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150505.1749.001.html>

cal function of L5PNs resulting from the mutation of *Otx1* in the cerebral cortex was a potential mechanism of the epileptic-like behavior of the *Otx1* mutant mice.

Keywords whole-cell patch clamp recording; epileptic-like behavior; layer V pyramidal neurons; *Otx1* mutation; basal dendrites

癫痫是神经系统常见疾病之一,世界卫生组织(WHO) 2001年的数据显示,其发病率在发达国家为8.2:1 000,发展中国家为10:1 000^[1]。世界上约有5 000万癫痫患者,其中有近80%在发展中国家。目前,我国的癫痫患者已经突破千万,并以每年40~60万新增患者的速度增长且速度越来越快,我国有近千万个家庭因家人得了癫痫而承受着巨大的压力^[2]。虽然近年来的研究为阐明癫痫的发病机理提供了不少有用的线索,但是问题远未解决。癫痫治疗的疗效约为70%,而在发展中国家仍有约75%的受影响人群未能得到有效的治疗,这可能是由癫痫发病原因的多样性和癫痫致病机理的复杂性所导致的。因此,更加深入地阐明癫痫的发病机理是迫切和必要的^[3]。

癫痫是一种遗传性疾病,其产生可能与癫痫相关基因的异常有关^[4],如*SCN1A*、*KCNQ2*^[5]和*Otx1*^[6]等。研究表明,*Otx1*缺失小鼠会表现出自发的高速转圈和头部快速来回摆动等癫痫样行为^[6-7]。脑电图记录结果显示,*Otx1*缺失小鼠其海马和大脑皮质区群体神经元电活动会出现异常^[6]。然而,*Otx1*缺失如何影响单一神经元的电生理功能?其诱发癫痫行为的具体生理作用机制是什么?这些方面仍缺乏足够的实验证据。此外,*Otx1*缺失小鼠会出现运动行为失调^[6-7],表明*Otx1*可能在维持小鼠协调运动行为中起到重要作用^[8]。*Otx1*突变小鼠也同样表现出自发的高速转圈和头部快速来回摆动等癫痫样行为。研究表明,大脑皮质运动区(初级运动皮层)神经元的电生理反应与运动行为的许多参数诸如肌肉力量^[9-10]、运动方向和速度^[11-12]以及不同活动姿势的调控^[13-14]之间有着密切的联系。可见,大脑皮质运动区*Otx1*的突变可能与小鼠癫痫样行为有密切关系。

*Otx1*属于*Otx*基因家族,*Otx*基因是脊椎动物中与果蝇*orthodenticle*基因同源的一类基因^[15-17],在哺乳动物大脑皮质和感觉器官的发育过程中发挥了重要的作用^[6-7]。果蝇中该类基因的缺失会直接导致其发育过程中头部前端结构的丢失^[18]。*Otx1*高水平表达于早期脑室层神经祖细胞,这些细胞最终分化

为大脑皮质的第5、6皮层,使*Otx1*特异性表达于大脑皮质的第5、6皮层^[19]。研究表明,小鼠大脑皮质第5、6皮层在癫痫放电的产生和传播过程中发挥了重要的作用^[20-22]。这提示,*Otx1*可能通过影响大脑皮质第5、6皮层神经元的电生理活动而诱发癫痫行为。大脑皮质第5皮层作为最主要的输出皮层,含有最大的锥体神经元。关于第5皮层锥体神经元的形态结构、生理和突触特征已有广泛的研究^[23-27]。同时,研究证实,*Otx1*突变影响第5皮层锥体神经元轴突修剪过程,致使第5皮层间以及其与皮层下的突触联系出现障碍^[28]。然而,*Otx1*突变是否影响大脑皮质运动区第5皮层锥体神经元的生理功能?*Otx1*突变产生的影响在小鼠癫痫样行为中的潜在作用机制是什么?目前仍缺乏充分的实验证据。

综上,我们推测*Otx1*突变小鼠大脑皮质运动区第5皮层锥体神经元电生理活动的改变可能是小鼠癫痫样行为产生的一个潜在原因。因此,我们以癫痫样行为小鼠为模型,利用全细胞膜片钳记录技术研究第5皮层锥体神经元电生理功能的变化,并借助神经元三维形态模拟重构和定量分析系统探讨神经元形态结构的变化,从而揭示*Otx1*在调节癫痫样行为小鼠大脑皮质运动区第5皮层锥体神经元生理功能中的潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

对照和*Otx1*突变小鼠购自美国杰克逊实验室(the Jackson Laboratory),小鼠种系名称为C57BL/6J-*Otx1*^{flv}/GrsrJ。杰克逊实验室已证实*flv*是*Otx1*的等位基因,遗传互补实验证实*Otx1*突变小鼠是*Otx1*等位基因*flv*突变的结果(<http://jaxmice.jax.org/strain/000531.html>)。对照和*Otx1*突变小鼠均为黑色,对照小鼠的相关基因型为*a/a Otx1*^{flv/+},*Otx1*突变小鼠的相关基因型为*a/a Otx1*^{flv/Otx1}^{flv}。*Otx1*突变小鼠(*Otx1*^{flv})是在杰克逊实验室C57BL/6J纯系株的基础上发展而来的。纯合子的*Otx1*突变小鼠会表现出自发的高速转圈和摆头等癫痫样行为。

利用购买的小鼠在实验室内杂交繁殖, 杂交方式是利用有转圈和摇头现象的雄性小鼠(纯合子)与无转圈和摇头现象的雌性小鼠杂交。只有不转圈且是杂合子的雌性小鼠(*a/a Otx1^{fl/+}*)才能与转圈的纯合子雄性小鼠(*a/a Otx1^{fl/Otx1^{fl}}*)杂交, 从而获得转圈的纯合子小鼠(*Otx1*突变组)和不转圈的杂合子小鼠(对照组)。小鼠出生后4周左右可以观察到有无转圈和摇头现象。

1.2 全细胞膜片钳记录实验

1.2.1 离体脑片的制备 小鼠(P28-P35)被迅速引颈处死, 迅速取出大脑并粘贴在金属桩上, 大脑冠状面与金属桩保持平行并用胶水牢固粘于其上, 金属桩与振动切片器(Sigmann Elektronik, Heidelberg, Germany)刀片成10°角, 尽量保持切出的脑片中神经元结构完整。在人工脑脊液中对大脑进行冠状切片(300 μm厚)。切好的脑片在35 °C的人工脑脊液(所处环境: 5% CO₂+95% O₂平衡气)中孵育15~30 min后置于室温平衡, 保持通气(5% CO₂+95% O₂平衡气)。人工脑脊液成分包括: 125 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 25 mmol/L D-glucose, 25 mmol/L NaHCO₃, 1.25 mmol/L NaH₂PO₄, 2 mmol/L CaCl₂和1 mmol/L MgCl₂。

1.2.2 神经元电生理反应记录 利用微分干涉相差显微镜(BX 51WI, Olympus, fitted with a 603 LUMPlan FI, Japan objective)定位脑片运动区第5皮层中的锥体神经元, 并使之在显示器(WV-BM 1410, Panasonic, Osaka, Japan)上显示。选择位于脑片表面以下约50 μm的神经元进行记录。

在35 °C的人工脑脊液环境下对神经元进行记录, 记录的信号通过Axoclamp-2B放大器(Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA)进行放大。在电流钳模式下记录神经元的反应电压。刺激电极内的细胞内液成分如下: 110 mmol/L potassium gluconate, 10 mmol/L KCl, 4 mmol/L ATPMg, 10 mmol/L phosphocreatine, 0.3 mmol/L GTP, 10 mmol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N9-2-ethanesulfonic acid(pH7.3, 310 mOsm adjusted with sucrose)和0.5% biocytin。利用Flamming/Brown微电极控制仪P-97(Sutter Instruments Co, Novato, CA)控制记录所用的玻璃电极。放大器输出的信号连接于信号转换器ITC(ITC-18, Instrutech Co, Port Washington, NY), ITC连接于装有Igor Pro(Wavemetrics, Portland, OR)的HP电脑上, 利

用Igor Pro对电生理信号进行采集。

1.3 生物胞素标记和免疫组化实验

全细胞膜片钳记录过程中, 记录电极内装有的生物胞素(5 mg/mL)可以通过一超极化的电流(200 ms, 5 Hz, 0.2~0.5 nA)刺激神经元, 使其灌注到神经元的胞体内。记录完成后, 首先将含有记录神经元的脑片放入含有4%多聚甲醛、1%戊二醛以及3%苦味酸的冷磷酸盐缓冲液(100 mmol/L, pH7.4)中固定至少24 h。然后, 漂洗脑片并移至含有3%过氧化氢的磷酸盐缓冲液中终止内源性过氧化物酶的活性。磷酸盐缓冲液漂洗脑片后, 移至含有卵白素(抗生物素)-生物素-过氧化物酶复合物(ABC-Elite, Vector Labs, Burlingame, CA; 5%亲和素、5%生物素化酶和0.25% Triton X-100)的溶液中, 4 °C孵育过夜。接着, 用磷酸盐缓冲液漂洗脑片, 在立体显微镜(Leica, Wetzlar, Germany)可视条件下用二氨基联苯胺(DAB substrate kit, Vector Labs)处理直至神经元形态结构的各个部分清晰可见为止。最后, 将脑片移至磷酸盐缓冲液中终止反应。磷酸盐缓冲液漂洗脑片并将其放置于水溶性封固剂中以备用。

1.4 神经元形态三维模拟重构和定量分析

在光学显微镜下利用NeuroLucida software(Micro-BrightField, Magdeburg, Germany)对1.3中染色的神经元进行三维形态的模拟重构。利用NeuroExplorer(MicroBrightField)对三维形态重构的神经元进行定量分析。形态结构的定量分析是建立在重构神经元轴突和树突的许多参数基础之上的。

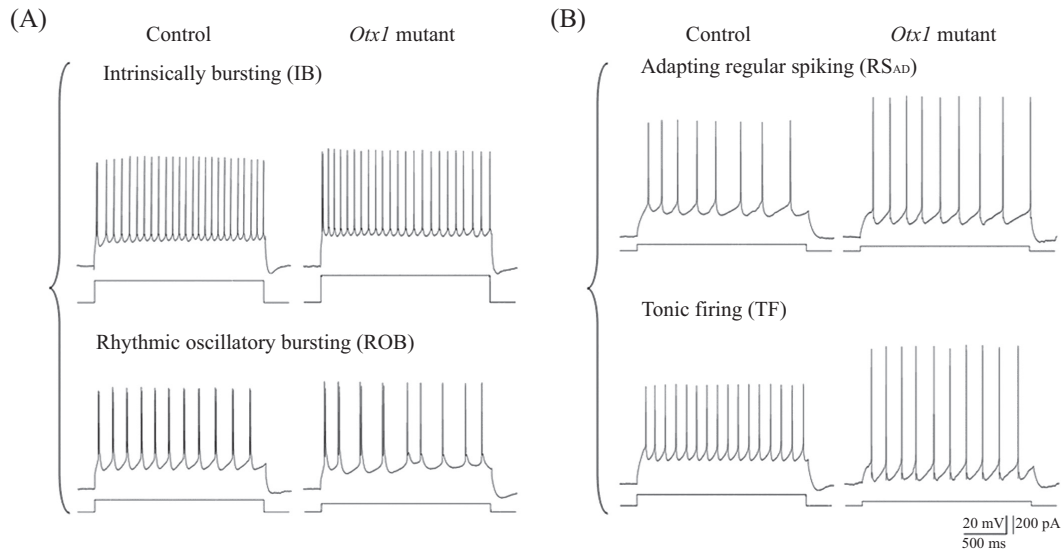
1.5 数据采集与统计

电生理数据通过自定义编写的程序Igor Pro 6.0(Igor Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA)进行采集。实验数据以mean±SEM的形式表示, 显著性差异分析用SPSS 20.0软件进行, 统计方法采用独立样本 t 检验和卡方检验(χ^2), $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 *Otx1*突变显著降低爆发式放电神经元比例但增强其兴奋性

根据动作电位(action potential, AP)发放特征, 在对照($n=359$ 个神经元, 来自42只小鼠)和*Otx1*突变小鼠($n=309$ 个神经元, 来自41只小鼠)运动区第5皮层锥体神经元中都鉴定到了四种不同放电类型的神经元, 即固有爆发式(intrinsically bursting, IB)、节律性振荡



A: 固有爆发式(左上)和节律性振荡爆发式(左下)放电型神经元电生理反应图; B: 适应性规律式(右上)和紧张性(右下)放电型神经元电生理反应图。
A: electrophysiological responsive traces of intrinsically bursting (IB) (upper trace, left panel) and rhythmic oscillatory bursting (ROB) (below trace, left panel) firing neurons; B: electrophysiological responsive traces of adapting regular spiking (RS_{AD}) (upper trace, right panel) and tonic firing (TF) (below trace, right panel) neurons.

图1 对照和*Otx1*突变小鼠中四种不同放电类型神经元电生理反应代表图(根据参考文献[30]改编)

Fig.1 Representative electrophysiological responsive traces of four types neurons with different firing patterns in the control and *Otx1* mutant mice (modified from reference [30])

表1 对照和*Otx1*突变小鼠中四种放电类型神经元的比例

Table 1 Proportions of four types of neurons with different firing patterns in the control and *Otx1* mutant mice

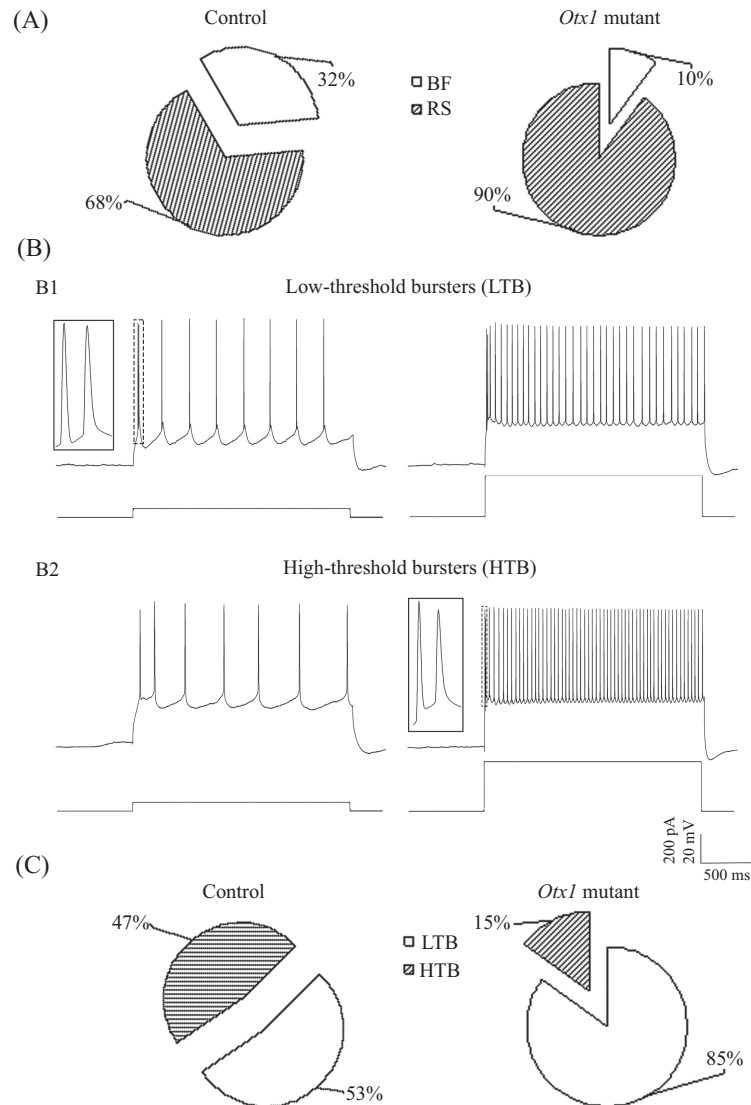
放电类型	对照(%)	<i>Otx1</i> 突变(%)	<i>P</i> 值
Firing pattern	Control (%)	<i>Otx1</i> mutant (%)	<i>P</i> value
IB	28	9	0.000 6
ROB	4	1	0.005 0
RS_{AD}	45	66	0.000 3
TF	23	24	0.991 0

爆发式(rhythmic oscillatory bursting, ROB)、适应性规律式(adapting regular spiking, RS_{AD})和紧张性放电型(tonic firing, TF)。IB神经元动作电位放电以高频率双峰起始,紧接着是规律式放电模式;ROB神经元动作电位呈现重复的双峰放电模式; RS_{AD} 神经元动作电位的峰频率呈现逐步减少的特征,而TF神经元动作电位的峰频率呈现无或很小的变化。四种不同放电类型神经元电生理反应如图1所示。

对照组中IB神经元占28%,ROB占4%, RS_{AD} 占45%,TF占23%,而*Otx1*突变组中IB、ROB、 RS_{AD} 及TF神经元占的比例分别为9%、1%、66%和24%(表1)。与对照相比,*Otx1*突变小鼠中 RS_{AD} 神经元比例显著升高,而IB和ROB神经元的比例显著减少($\chi^2=27, 34$ 和 $39, P<0.05$)。TF神经元的比例两组之间没有显著性差异($\chi^2=0.001, P>0.05$)。IB和ROB神经元统

称为爆发式(bursting firing, BF)放电神经元, RS_{AD} 和TF神经元统称为规律式(regular spiking, RS)放电神经元(图1)。与对照组相比,*Otx1*突变小鼠中RS放电神经元比例显著升高,而BF放电神经元的比例显著减少($\chi^2=39, P<0.05$)(图2A)。根据BF放电神经元放电时双峰出现所需刺激电流的大小,可将其分为低阈值爆发式(low-threshold bursters, LTB)(≤ 100 pA)或高阈值爆发式(high-threshold bursters, HTB)(>100 pA)放电神经元^[29](图2B)。*Otx1*突变小鼠中,LTB/HTB放电神经元的比例[6:1(85%:15%)],显著高于对照组[1:1(53%:47%)]($\chi^2=11, P<0.05$)(图2C)。可见,与对照组相比,尽管*Otx1*突变小鼠中BF放电神经元的比例显著降低,但却表现出增强的兴奋性。

通过一系列不同的刺激参数和电流强度(Igor Pro 6.0)刺激运动区第5皮层锥体神经元并分析这



A: 对照(左)及*Otx1*突变小鼠(右)中爆发式和规律式放电神经元所占比例的比较; B: 低/高阈值爆发式放电神经元代表性电生理反应图; C: 对照(左)及*Otx1*突变小鼠(右)中低/高阈值爆发式放电神经元所占比例的比较。

A: comparison of proportions of burst firing (BF) and regular spiking (RS) neurons between the control and *Otx1* mutant mice; B: representative electrophysiological responsive traces of low/high-threshold bursters neurons; C: comparison of proportions of low/high-threshold bursters neurons between the control and *Otx1* mutant mice.

图2 对照和*Otx1*突变小鼠中爆发式、规律式放电神经元及低/高阈值爆发式放电神经元的比例分布

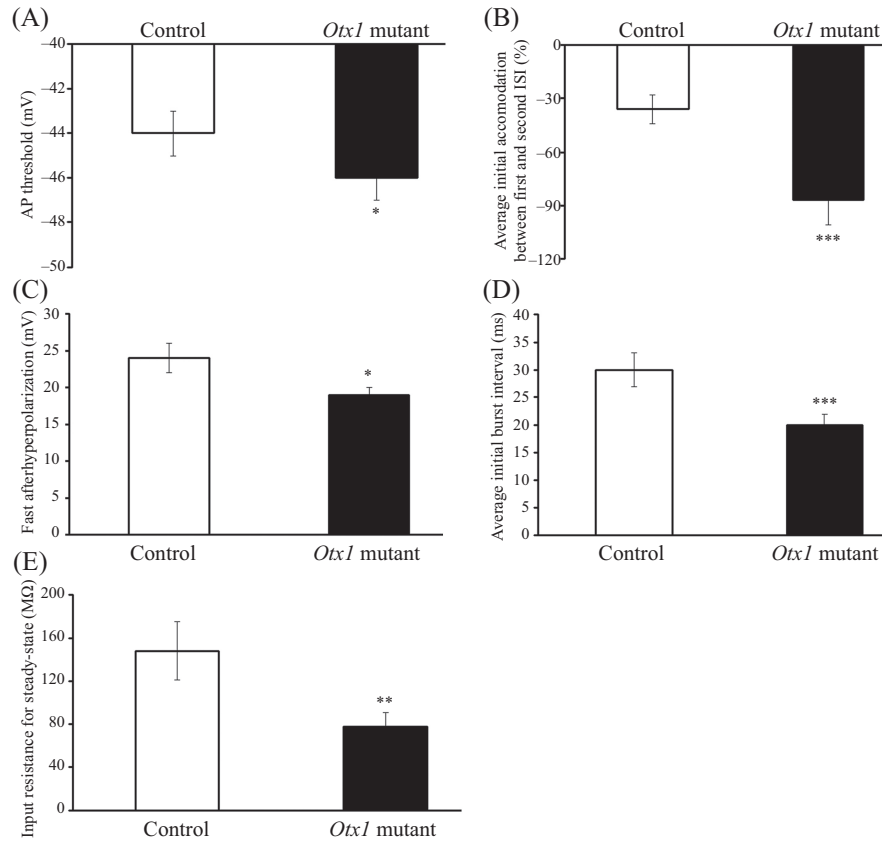
Fig.2 Proportions of burst firing, regular spiking and low/high-threshold bursters neurons in the control and *Otx1* mutant mice

些神经元的电生理反应, 可获得其固有的电生理反应特性(图3)。与对照组相比, *Otx1*突变小鼠中第5皮层锥体神经元动作电位阈值显著降低[对照组(-44.0 ± 0.8) mV vs 突变组(-46.3 ± 0.7) mV], 输入阻抗[(148 ± 27.3) M Ω vs (77.7 ± 12.7) M Ω]以及快速后超极化电位[(24.1 ± 2.1) mV vs (19.5 ± 1.3) mV]都显著下降($t=2.26, 2.65$ 和 $2.06, P<0.05$)。可见, *Otx1*突变小鼠中运动区第5皮层锥体神经元兴奋性显著增强。此外, *Otx1*突变小鼠中神经元动作电位初始平均峰间隔的适应程度增强[(-69 ± 6)% vs (-109 ± 10)%], 而平

均初始双峰间隔却显著降低[(30 ± 3) vs (20 ± 2) ms] ($t=2.81$ 和 $2.32, P<0.05$), 这提示*Otx1*突变小鼠运动区第5皮层锥体神经元爆发式放电能力可能减弱。

2.2 *Otx1*突变降低第5皮层锥体神经根基树突的大小和形态结构复杂性

对全细胞膜片钳记录过程中用生物胞素标记的第5皮层锥体神经元通过免疫组化实验进行染色。利用神经元三维形态模拟重构和定量分析系统(Neurolucida Software and Neuro Explorer)对染色中具有高质量形态结构的神经元进行三维形态结构的



A: 动作电位阈值; B: 动作电位初始平均峰间隔的适应程度; C: 快速后超极化电位; D: 平均初始双峰间隔; E: 输入阻抗。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比较。

A: AP threshold; B: average initial accommodation between the first and second inter-spike interval; C: fast afterhyperpolarization; D: average initial burst interval; E: input resistance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图3 对照和*Otx1*突变小鼠中运动区第5层锥体神经元电生理特性的比较

Fig.3 Comparison of electrophysiological properties of L5PNs in the motor cortex between the control and *Otx1* mutant mice

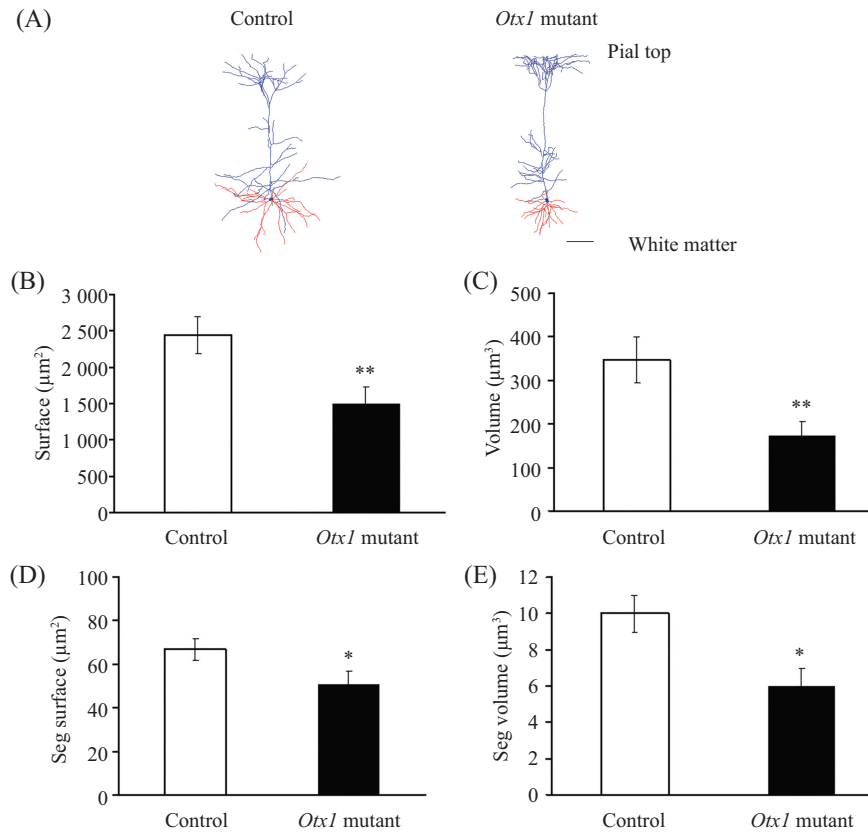
重构和分析(图4)。与对照($n=55$)相比, *Otx1*突变小鼠中重构的第5层锥体神经元($n=29$)基树突分枝复杂性降低(图4A)。与对照相比, *Otx1*突变小鼠中神经元基树突表面积[对照组($2\,447 \pm 258$) μm^2 vs 突变组($1\,504 \pm 231$) μm^2]、体积[(348 ± 52) μm^3 vs (171 ± 33) μm^3]、分节表面积[(67 ± 5) μm^2 vs (51 ± 6) μm^2]以及分节体积[(10 ± 1) μm^3 vs (6 ± 1) μm^3]($t=2.90, 3.11, 2.20$ 和 $2.39, P < 0.05$)都显著降低(图4B~图4E)。可见, *Otx1*突变导致第5层锥体神经元基树突形态结构复杂性降低。

3 讨论

本研究以癫痫样行为小鼠为模型, 探讨*Otx1*对大脑皮质运动区第5层锥体神经元电生理反应及形态结构的影响, 进而阐明*Otx1*在小鼠癫痫样行为中的潜在生理作用机制。在运动区第5层锥体神经元中鉴定到四种不同放电类型的神经元, 即固有爆发式(IB)、节律性振荡爆发式(ROB)、适应性规

律式(RS_{AD})以及紧张性放电型(TF)神经元。本研究证实, *Otx1*突变显著升高RS神经元比例而降低BF神经元的比例, 这与早期研究具有很好的一致性^[31]; 同时, *Otx1*突变会显著降低第5层锥体神经元基树突形态结构的复杂性。这提示, *Otx1*在调节小鼠大脑皮质运动区第5层锥体神经元生理功能的过程中发挥重要作用, 其对神经元生理功能的调节很可能是通过改变神经元电生理反应特性和形态结构实现的。*Otx1*突变小鼠大脑皮质运动区第5层锥体神经元生理功能的异常可能是小鼠癫痫样行为的重要潜在原因之一。

*Otx1*在第5层锥体神经元中的特异性表达可能对其基树突的正常发育起到重要的作用。*Otx1*突变小鼠中神经元基树突表面积、体积、分节表面积及分节体积都显著降低, 基树突主干总长度也有下降的趋势。早期研究揭示, 通过调节神经元树突的形态结构可以改变神经元的放电类型^[32]。可见,



A: 神经元三维形态重构(对照, 左侧; *Otx1*突变, 右侧)。神经元胞体和顶树突以蓝色显示, 基树突以红色显示, 轴突以绿色显示。神经元朝向顶部皮层的软膜表面。标尺=100 μm ; B~E: 基树突形态结构特性(表面积、体积、分节表面积及分节体积)的比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比较。

A: 3D morphological reconstructions of L5PNs of the control (left column) and *Otx1* mutant mice (right column). Somata and apical dendrites were in blue, basal dendrites in red, and the axons in green. Neurons were oriented with the pial surface at the top. Scale bar=100 μm ; B~E: comparison of basal dendritic morphological properties (surface, volume, seg surface and seg volume). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图4 对照和*Otx1*突变小鼠运动区第5层锥体神经元三维形态重构和基树突形态结构特性的比较

Fig.4 3D morphological reconstructions and comparison of basal dendritic morphological properties of L5PNs in the motor cortex of the control and *Otx1* mutant mice

*Otx1*突变小鼠第5层锥体神经元基树突形态结构的改变很可能影响其放电类型。换言之, *Otx1*突变小鼠中第5层锥体神经元基树突形态结构复杂性的降低可能与BF放电型神经元比例的显著减少密切相关。另一方面, 神经元形态结构的改变会影响突触联系的形成^[33]。树突作为突触联系信号传入的“动态整合器”, 其在大脑皮质神经信息加工处理过程中起到重要的作用^[34-35]。*Otx1*突变小鼠第5层锥体神经元形态结构复杂性的降低可能在一定程度上降低了神经元之间突触联系形成的概率, 减弱了相邻神经元间信号传递和加工的能力, 进而可能导致小鼠癫痫样行为的产生。

*Otx1*突变小鼠大脑皮质运动区第5层锥体神经元电生理活动的改变与小鼠癫痫样行为有密切关系。*Otx1*突变小鼠中神经元动作电位阈值、输入阻

抗及快速后超极化电位都显著下降, 这使神经元受到刺激时更容易放电进而表现出更强的兴奋性。神经元兴奋性的增强会促使场电位的形成^[36], 这对于*Otx1*突变小鼠大脑皮质运动区神经网络高度同步的神经元活动(例如癫痫发作时大脑皮质的异常放电)的形成至关重要^[37]。可见, *Otx1*突变小鼠中神经元兴奋性的增强可能会使大脑皮质运动区兴奋性神经微环路兴奋性强度上调, 当该兴奋性强度达到一定水平时进而诱发小鼠癫痫样行为。

综上, 本研究证实, *Otx1*在调控大脑皮质运动区第5层锥体神经元电生理活动及形态结构复杂性等方面发挥了重要作用, 揭示了*Otx1*突变会引起神经元兴奋性增强并可能使兴奋性神经微环路兴奋性强度上调, 这是造成*Otx1*突变小鼠癫痫样行为的重要潜在原因之一。

参考文献 (References)

- 1 Bravo-Martínez J, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Cell calcium extrusion systems and their role in epileptogenesis. *Open Neurosci J* 2010; 4: 1-12.
- 2 郑健刚. 癫痫治疗研究进展. 医学综述(Zheng Jiangan. Progress in the treatment of epilepsy. Medical Review) 2004; 10(10): 637-9.
- 3 古金海. 癫痫发病机理研究进展. 上海医学(Gu Jinhai. Progress in studies on the pathogenesis of epilepsy. Shanghai Medicine) 1996; 1: 56-9.
- 4 韩仰同. 癫痫发病机制. 中国社区医师(Han Yangtong. The pathogenesis of epilepsy. Chinese Community Doctors) 2004; 20(21): 10-1.
- 5 Poduri A. Expect the unexpected in epilepsy genetics: Mutations in a "Benign" epilepsy gene result in a severe phenotype. *Ann Neurol* 2012; 71(1): 1-2.
- 6 Acampora D, Mazan S, Avantiaggiato V, Barone P, Tuorto F, Lallemant Y. *et al.* Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the *Otx1* gene. *Nat Genet* 1996; 14(2): 218-22.
- 7 Acampora D, Barone P, Simeone A. *Otx* genes in corticogenesis and brain development. *Cereb Cortex* 1999; 9(6): 533-42.
- 8 Weimann JM, Zhang YA, Levin ME, Devine WP, Brulet P, McConnell SK. Cortical neurons require *Otx1* for the refinement of exuberant axonal projections to subcortical targets. *Neuron* 1999; 24(4): 819-31.
- 9 Evarts EV. Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. *J Neurophysiol* 1968; 31: 14-27.
- 10 Sergio LE, Kalaska JF. Changes in the temporal pattern of primary motor cortex activity in a directional isometric force versus limb movement task. *J Neurophysiol* 1998; 80(3): 1577-83.
- 11 Georgopoulos AP, Kalaska JF, Caminiti R, Massey JT. On the relations between the direction of two-dimensional arm movements and cell discharge in primate motor cortex. *J Neurosci* 1982; 2(11): 1527-37.
- 12 Moran DW, Schwartz AB. Motor cortical representation of speed and direction during reaching. *J Neurophysiol* 1999; 82(5): 2676-92.
- 13 Caminiti R, Johnson PB, Urbano A. Making arm movements within different parts of space: Dynamic aspects in the primate motor cortex. *J Neurosci* 1990; 10(7): 2039-58.
- 14 Scott SH, Sergio LE, Kalaska JF. Reaching movements with similar hand paths but different arm orientations. II. Activity of individual cells in dorsal premotor cortex and parietal area 5. *J Neurophysiol* 1997; 78(5): 2413-26.
- 15 Finkelstein R, Perrimon N. The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Nature* 1990; 346(6283): 485-8.
- 16 Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 1992; 358(6388): 687-90.
- 17 Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, *et al.* A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* 1993; 12(7): 2735-47.
- 18 Hirth F, Therianos S, Loop T, Gehring WJ, Reichert H, Furukubo-Tokunaga K. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in *Drosophila*. *Neuron* 1995; 15(4): 769-78.
- 19 蔡文琴, 李海标. 发育神经生物学. 北京: 科学出版社(Cai Wenqin, Li Haibiao. Developmental Neurobiology. Beijing: Science Press) 2007, 339.
- 20 Chagnac-Amitai Y, Connors BW. Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol* 1989; 62(5): 1149-62.
- 21 Silva LR, Gutnick MJ, Connors BW. Laminar distribution of neuronal membrane properties in neocortex of normal and reeler mouse. *J Neurophysiol* 1991; 66(6): 2034-40.
- 22 Telfeian AE, Connors BW. Layer-specific pathways for the horizontal propagation of epileptiform discharges in neocortex. *Epilepsia* 1998; 39(7): 700-8.
- 23 Reyes A, Sakmann B. Developmental switch in the short-term modification of single EPSPs evoked in layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex. *J Neurosci* 1999; 19(10): 3827-35.
- 24 Shepherd GM, Stepanyants A, Bureau I, Chklovskii D, Svoboda K. Geometric and functional organization of cortical circuits. *Nat Neurosci* 2005; 8(6): 782-90.
- 25 Molnar Z, Cheung AF. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res* 2006; 55(2): 105-15.
- 26 Frick A, Feldmeyer D, Sakmann B. Postnatal development of synaptic transmission in local networks of L5A pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. *J Physiol* 2007; 585(1): 103-16.
- 27 Hattox AM, Nelson SB. Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J Neurophysiol* 2007; 98(6): 3330-40.
- 28 Weimann JM, Zhang YA, Levin ME, Devine WP, Brulet P, McConnell SK. Cortical neurons require *Otx1* for the refinement of exuberant axonal projections to subcortical targets. *Neuron* 1999; 24(4): 819-31.
- 29 Schwindt P, O'Brien JA, Crill W. Quantitative analysis of firing properties of pyramidal neurons from layer 5 of rat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 1997; 77(5): 2484-98.
- 30 Zhang YF, Liu LX, Cao HT, Ou L, Qu J, Wang Y, *et al.* *Otx1* promotes basal dendritic growth and regulates intrinsic electrophysiological and synaptic properties of layer V pyramidal neurons in mouse motor cortex. *Neuroscience* 2015; 285: 139-54.
- 31 Sancini G, Franceschetti S, Lavazza T, Panzica F, Cipelletti B, Frassoni C, *et al.* Potentially epileptogenic dysfunction of cortical NMDA- and GABA-mediated neurotransmission in *Otx1*^{-/-} mice. *Eur J Neurosci* 2001; 14(7): 1065-74.
- 32 Mainen ZF, Sejnowski TJ. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 1996; 382(6589): 363-6.
- 33 Chklovskii DB. Synaptic connectivity and neuronal morphology—two sides of the same coin. *Neuron* 2004; 43(5): 609-18.
- 34 Spratling M. Cortical region interactions and the functional role of apical dendrites. *Behav Cognitive Neurosci Rev* 2002; 1(3): 219-28.
- 35 Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A. Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25(1): 127-49.
- 36 Reimann MW, Anastassiou CA, Perin R, Hill SL, Markram H, Koch C. A biophysically detailed model of neocortical local field potentials predicts the critical role of active membrane currents. *Neuron* 2013; 79(2): 375-90.
- 37 Wang Y, Zhang G, Zhou H, Barakat A, Querfurth H. Opposite effects of low and high doses of Abeta42 on electrical network and neuronal excitability in the rat prefrontal cortex. *PLoS One* 2009; 4(12): e8366.