



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R322

U D C 611

密 级 公开

博士学位论文

背内侧前额叶皮层对慢性痛
的下行调控作用及其机制

 尹俊滨

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 基础医学

二级学科(专业) 人体解剖与组织胚胎学

研 究 方 向 慢性痛及镇痛的机制

指 导 教 师 李云庆 教授

培 养 单 位 基础部人体解剖学教研室

二〇一七年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目 录

缩略语表	1 -
中文摘要	4 -
ABSTRACT	8 -
前 言	13 -
文献回顾	15 -
正 文	27 -
第一部分 dmPFC-vIPAG 神经通路参与慢性痛下行调控的形态学研究	27 -
1 材料	28 -
1.1 实验动物	28 -
1.2 实验材料和试剂	28 -
2 方法	29 -
2.1 脑内核团立体定位注射	29 -
2.2 FG 逆标神经元的免疫荧光结合荧光原位分子杂交双重染色	30 -
2.3 免疫组织化学染色	31 -
2.4 狂犬病毒跨单级突触标记系统	33 -
2.4 染色切片观察和图像采集	34 -
2.5 结果统计和分析	35 -
3 结果	35 -
3.1 dmPFC-vIPAG 神经通路的形态学证实	35 -
3.2 dmPFC 内 PV 阳性神经元的传入投射	44 -
3.3 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元的传出投射	49 -
4 讨论	54 -
4.1 传统逆行和顺行示踪剂在束路追踪中的非特异性标记	55 -
4.2 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的分布和化学性质	55 -
4.3 dmPFC 的传入投射	56 -
4.4 dmPFC-vIPAG 的传出投射	57 -
第二部分 dmPFC-vIPAG 神经通路参与慢性痛下行调控的机能学研究	58

1	材料	59
1.1	实验动物	59
1.2	实验材料和试剂	59
2	方法	60
2.1	脑内核团立体定位注射	60
2.2	脑内核团埋置光纤和套管	60
2.3	免疫组织化学染色	62
2.4	CPNL 痛模型的制备	64
2.5	机械性痛阈值的检测	64
2.6	旷场实验 (open field, OF) 检测动物的负性情绪	65
2.7	高架十字迷宫实验 (elevated plus maze, EPM) 检测动物的负性情绪	65
2.8	光遗传学、化学遗传学和行为药理学方法对动物机械性痛阈值和旷场高架行为学的检测	66
2.9	Western blot 检测	67
2.10	染色切片观察和图像采集	68
2.11	结果统计和分析	69
3	结果	69
3.1	化学毁损双侧 dmPFC 对慢性痛及其负性情绪的影响	69
3.2	光遗传学方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛和负性情绪的影响	77
3.3	化学遗传学方法特异性激活 dmPFC 内的抑制性中间神经元对慢性痛和负性情绪的影响	83
3.4	dmPFC 参与慢性痛下行调控的分子机制研究	90
4	讨论	97
4.1	dmPFC-vIPAG 神经通路维持正常情况下的痛阈值	98
4.2	毁损双侧 dmPFC 对痛行为和焦虑样行为的影响	99
4.3	特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路增加动物在高架十字迷宫开放臂内的活动	100
4.4	dmPFC 参与慢性痛和负性情绪调控的分子机制	101
小	结	104

参考文献	105 -
附 录	117 -
个人简历和研究成果	118 -
致 谢	120 -

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
5-HT	5-hydroxytryptamine	5-羟色胺
AAV	adeno-associated virus	腺相关病毒
ACC	anterior cingulate cortex	前扣带回皮质
Aq	aqueduct	导水管
BLA	basolateral nucleus of the amygdala	杏仁核基底外侧部
BNST	bed nucleus of stria terminalis	终纹床核
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin dependent protein kinase II	II 型钙调蛋白蛋白激酶
CL	centrolateral nucleus of thalamus	丘脑中央外侧核
CLA	claustrum	屏状核
CNO	clozapine- <i>N</i> -oxide	氯氮平- <i>N</i> -氧化物
CPNL	common peroneal nerve ligation	腓总神经结扎
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride	二氨基联苯胺
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
dmPFC	dorsal medial prefrontal cortex	背内侧前额叶皮层
DIO	double-floxed inverted open-reading-frames	有两对 flox 颠倒的开放读码框
DR	dorsal raphe nucleus	中缝背核
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein	增强型黄色荧光蛋白
FG	fluoro-gold	荧光金

FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GABA _A R	γ-amino butyric acid receptor A	γ-氨基丁酸 A 型受体
GAD67	glutamate decarboxylase 67	谷氨酸脱羧酶 67
GFAP	glial fibrillary acidic protein	胶质原纤维酸性蛋白
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
hChR2	human channelrhodopsin-2	人源第 2 型离子通道视紫质
HIP	hippocampus	海马
hM3Dq	human M3 muscarinic DREADD receptor coupled to Gq	M3 型的人源和 Gq 类 G 蛋白耦合的毒蕈碱受体
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IC	insular cortex	岛叶皮质
IPAG	lateral subdivision of periaqueductal gray	中脑导水管周围灰质外侧区
MD	mediodorsal nucleus of thalamus	丘脑内侧背核
mGluR1	metabotropic glutamate receptor 1	代谢性谷氨酸受体 1
mPFC	medial prefrontal cortex	内侧前额叶皮质
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
NeuN	neuronal nuclei	神经元核抗原
PAG	periaqueductal gray	中脑导水管周围灰质
PB	phosphate buffer	磷酸缓冲液
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PL	prelimbic cortex	缘前皮层
PT	paratenial nucleus of thalamus	丘脑带旁核
PV	parvalbumin	小清蛋白

PVA	paraventricular nucleus of thalamus, anterior part	丘脑室周核前部
PVP	paraventricular nucleus of thalamus, posterior part	丘脑室周核后部
PWT	paw withdrawal threshold	缩足阈值
Re	reuniens nucleus of thalamus	丘脑 reuniens 核
Rh	rhomboid nucleus of thalamus	丘脑菱形核
RVM	rostral ventromedial medulla	延髓吻段腹内侧结构
SDH	spinal dorsal horn	脊髓背角
SERT	serotonin transporter	5-羟色胺转运体
TBS-T	tris buffer saline-tween 20	含吐温 20 的 tris 缓冲液
Vgat	vesicular GABA transporter	囊泡膜 GABA 转运体
VGLUT1	vesicular glutamate transporter 1	I 型囊泡膜谷氨酸转运体
VGLUT2	vesicular glutamate transporter 2	II 型囊泡膜谷氨酸转运体
vlPAG	ventrolateral divisions of periaqueductal gray	中脑导水管周围灰质腹外侧区
VM	ventromedial nucleus of thalamus	丘脑腹内侧核

背内侧前额叶皮层对慢性痛的下行调控作用及其机制

博士研究生：尹俊滨

导师：李云庆 教授

辅导教师：董玉琳 副教授

第四军医大学人体解剖学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81371239，81620108008）

国家留学基金委建设高水平大学公派研究生项目（201503170405）

第四军医大学优秀博士课题资助（2015D06）

中文摘要

慢性痛对机体的危害不仅是持续的疼痛感受，还可导致情绪低落和认知功能的下降。迁延、持续的疼痛更容易形成一个“慢性痛后的恶性循环”：慢性痛后可以导致焦虑、抑郁等负性情绪，同时还可因睡眠功能紊乱，活动减弱导致认知功能的降低；而后负性情绪和认知下降又会进一步的加剧慢性疼痛，形成疼痛-负性情绪和认知下降-疼痛的恶性循环。尽管已经有许多的研究开始关注疼痛的情绪成份，探究情绪痛的神经环路，但关于此“慢性痛后的恶性循环”的潜在神经机制仍不明确。

而解决这一问题的关键是找到一个同时参与了疼痛的调控、负性情绪的形成和认知功能维持的神经核团。背内侧前额叶皮层（dmPFC），包括吻侧前扣带回（rACC）和缘前皮层（PL）就是这样一个可同时参与疼痛、负性情绪和认知功能的关键中枢部位。dmPFC 已经被证实广泛参与了焦虑抑郁负性情绪和认知功能障碍的产生。尽管也有研究观察到 dmPFC 可以参与慢性痛，但其详细的神经通路仍不清楚。中脑导水管周围灰质（PAG）-延髓吻端腹内侧结构（RVM）-脊髓背角（SDH）是中枢神经系统内重要的下行疼痛调控通路，但关于此条神经通路上位中枢的传入研究鲜有报道。那么 dmPFC 是否可以下行投射到腹外侧中脑导水管周围灰质（vlPAG，与 PAG 内的其他亚核相比，被认为与疼痛调控更加密切）而参与慢性痛的下行调控呢？

为解决这一系列问题，我们开展了此项研究。本研究综合运用多种形态学方法证明 dmPFC-vIPAG 神经通路的存在并进行该通路的传入和传出研究；利用化学损毁、光遗传、化学遗传和行为药理学等多种方法全面探讨 dmPFC-vIPAG 神经通路在慢性痛和负性情绪中的作用。故，本论文分为以下两个部分进行探讨：

1、dmPFC-vIPAG 神经通路参与慢性痛下行调控的形态学研究

目的：证实 dmPFC-vIPAG 神经通路的存在并进行 dmPFC 内 PV 阳性神经元的传入投射研究和 vIPAG 向 RVM 的传出投射研究。

方法：(1) 应用束路追踪的方法分别观察 dmPFC 向 vIPAG 的投射、vIPAG 向 RVM 的投射及 RVM 向脊髓背角的投射，并结合免疫荧光双标或荧光原位杂交的方法探讨了其中投射神经元的化学性质；(2) 腺相关病毒感染 dmPFC 内的锥体神经元后观察病毒感染标记的纤维在 vIPAG 内的分布和与向 RVM 投射神经元的位置关系；(3) 运用狂犬病毒跨单级突触标记系统分别研究 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元、dmPFC 内 PV 阳性神经元和 RVM 内 5-HT 阳性神经元的跨突触投射情况。

结果：(1) 将逆行示踪剂荧光金 (FG) 注射到 vIPAG 后，可在 dmPFC 内观察到大量的 FG 标记的投射神经元，所有的神经元与兴奋性神经元的标志物 CaMKII 免疫共存，且都表达 VGLUT1 mRNA 而不表达 VGLUT2 mRNA 和抑制性神经元的标志物 GAD67；将顺行示踪剂生物素葡聚糖胺 (BDA) 注射到 dmPFC 后，可在 vIPAG 内观察到大量的顺行标记的纤维；将 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC 后，同样在 vIPAG 内观察到大量的 EYFP 标记的神经纤维；运用狂犬病毒跨单级突触标记系统，将狂犬病毒 3 联病毒注射到 VGLUT2-Cre 小鼠的 vIPAG 后，可在 dmPFC 内观察到 dsRed 跨突触标记的向 vIPAG 中 VGLUT2 阳性神经元投射的神经元。

(2) 同样将狂犬病毒 3 联病毒注射到 PV-Cre 小鼠的 dmPFC 内，可在前扣带回 (ACC)、内侧前额叶皮层 (mPFC)、岛叶 (IC)、屏状核 (CLA) 等皮层结构，丘脑室旁核 (PVT)、丘脑带旁核 (PT)、丘脑内侧背核 (MD)、丘脑中央外侧核 (CL)、丘脑菱形核 (Rh) 和丘脑 reuniens 核 (Re) 等丘脑核团，终纹床核 (BNST)、杏仁核基底外侧部 (BLA) 及尾侧海马 (HIP) 观察到 dsRed 跨突触标记的向 dmPFC 中 PV 阳性神经元投射的神经元。

(3) 在将狂犬病毒 3 联病毒注射到 Sert-Cre 小鼠的 RVM 后，可在 vIPAG 内观察到 dsRed 跨突触标记的向 RVM 中 5-HT 阳性神经元投射的神经元；结合荧光原位

杂交和免疫荧光双标的方法,可观察到 vIPAG 内向 RVM 投射的神经元中有超过 90% 的神经元表达 VGLUT2 且在脊髓背角注射 FG 后 RVM 中可观察到 FG 标记的向脊髓投射的 5-HT 阳性神经元接受 VGLUT2 阳性纤维终末的密切接触; 分别将 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC, 将 FG 注射到 RVM 后, 可在 vIPAG 内观察到 EYFP 标记的纤维终末与向 RVM 投射的 FG 阳性神经元形成密切接触。

结论: dmPFC 内含 VGLUT1 的兴奋性锥体神经元投射到 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元形成兴奋性的神经通路, 这一通路可以通过从 vIPAG 发出的 VGLUT2 阳性的纤维终末正向调控 RVM 内的 5-HT 神经元, 从而形成从皮层到脊髓 Top-Down 的下行调控神经通路。同时, dmPFC 内的抑制性中间神经元可以接受许多传递痛相关信息核团的密集投射。

2、dmPFC-vIPAG 神经通路参与慢性痛下行调控的机能学研究

目的: 通过多种方法沉默或兴奋 dmPFC-vIPAG 神经通路, 观察对动物痛行为及其相关焦虑样行为的影响, 并初步揭示 dmPFC 参与慢性痛可能的分子机制。

方法: (1) 建立腓总神经结扎 (CPNL) 慢性神经病理性痛模型, 而后进行痛行为和焦虑样行为的检测; (2) 运用 Von Frey 纤维丝测定双侧后足的机械性痛阈值, 旷场和高架十字迷宫检测动物的焦虑样行为; (3) 注射海人藻酸 (KA) 毁损 dmPFC, 光遗传学方法激活 dmPFC-vIPAG 神经通路或运用化学遗传性方法特异性兴奋 dmPFC 内的 Vgat 阳性神经元, 观察对动物痛行为及其相关焦虑样行为的影响; (4) Western blot 检测慢性痛后 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 的表达, 通过行为药理学的方法 dmPFC 内局部给予两种受体的特异性拮抗剂观察对痛行为及其相关焦虑样行为的影响。

结果: (1) 将 KA 注射到双侧的 dmPFC 对其化学毁损后, 不仅可降低正常小鼠的疼痛阈值, 还可显著减少其在旷场内的活动总路程和旷场中央区活动时间百分比以及小鼠在高架十字迷宫内开放臂停留时间百分比和进入开放臂次数百分比; 对化学毁损双侧 dmPFC 的小鼠进行 CPNL 后, 同样可降低小鼠的机械性痛敏, 增加小鼠对非伤害性刺激的反应次数, 但与单纯 CPNL 小鼠相比并未观察到其在旷场内和高架十字迷宫内的行为学改变。

(2) 将 AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP 注射到 dmPFC 内后, 将光纤置于 vIPAG

的上方，给予蓝光刺激（10 mW, 20 Hz）时可显著的提高小鼠 CPNL 术后 7 天双侧后足的机械性缩足反射阈值；同时可明显增加小鼠 CPNL 术后 14 天在高架十字迷宫内开放臂停留时间百分比和进入开放臂次数百分比，但对小鼠在旷场内的行为学无明显影响。

(3)将 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrine 注射入 Vgat-Cre 小鼠双侧 dmPFC 内，腹腔注射 CNO 1 mg/kg 后 30 分钟进行行为学测试，不仅可降低正常小鼠的疼痛阈值，还可显著减少其在旷场内的活动总路程和旷场中央区活动时间百分比以及小鼠在高架十字迷宫内开放臂停留时间百分比和进入开放臂次数百分比；同样还可降低 CPNL 术后 7 天神经病理性痛后小鼠的机械性痛敏；减少 CPNL 术后 14 天小鼠在旷场内的活动总路程，进一步降低其在旷场中央区活动时间百分比以及小鼠在高架十字迷宫内开放臂停留时间百分比和进入开放臂次数百分比。

(4)小鼠 CPNL 术后 7 天 Western blot 检测观察到 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 的表达显著增加；通过行为药理学的方法将套管置于 dmPFC 局部给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂 bicuculline 和 LY367385，均可显著的改善小鼠 CPNL 术后 7 天双侧后足的机械性痛敏；同时可明显增加小鼠 CPNL 术后 14 天在旷场内的活动总路程和旷场中央区活动时间百分比以及在高架十字迷宫内开放臂停留时间百分比和进入开放臂次数百分比。

结论：dmPFC-vIPAG 神经通路参与了维持小鼠正常情况下疼痛的阈值及在旷场和高架十字迷宫内的行为。毁损双侧 dmPFC 或特异性兴奋 dmPFC 内的抑制性神经元间接沉默 dmPFC-vIPAG 神经通路，可降低动物正常时和慢性痛时的机械性痛阈值，增加动物对机械性刺激的反应，导致动物焦虑样负性情绪的产生，兴奋 dmPFC 内的抑制性神经元还可恶化慢性痛所致的负性情绪。而兴奋 dmPFC-vIPAG 神经通路可产生镇痛作用，并可改善慢性痛后的负性情绪。慢性痛时 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 表达的上调能够抑制 dmPFC-vIPAG 下行镇痛通路，参与了慢性痛的发生、发展及负性情绪的形成。

关键词：背内侧前额叶皮层；腹外侧导水管周围灰质；慢性痛；负性情绪；神经通路；光遗传；化学遗传；抑制性中间神经元

The descending modulatory effects of dorsal medial prefrontal cortex on pain and its mechanism

Candidate for Ph.D.: Jun-Bin Yin

Supervisor: Prof. Yun-Qing Li

Tutor: A.P. Yu-Lin Dong

Department of Human Anatomy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: Natural Science Foundation of China (81371239, 81620108008); China Scholarship Council (201503170405); Best Doctoral Project Foundation of the FMMU (2015D06)

Abstract

The people who have chronic pain suffered not only the severe pain perception, but also the negative emotions and declined cognitive abilities. Intractable and permanent pain condition easily developed into a 'chronic pain recycle': chronic pain can induce negative emotion including anxiety and depression, sleep disorder, and reduced movement and can also affect the cognitive abilities, vice versa. Negative emotion and reduced cognitive abilities can worsen chronic pain. Although there are many studies focused on the emotional component of pain and tried to find out the neural pathway for emotional pain. However, the underlying mechanisms for the 'chronic pain recycle' are still unclear.

What is the most important to answer this question is to find out the nucleus, which is involved into the pain, emotion, and cognitive ability modulation. Dorsal medial prefrontal cortex (dmPFC) including rostral anterior cingulate cortex (rACC) and prelimbic cortex (PL) is the nucleus involved into these processes modulations. There are many studies have demonstrated that dmPFC participated into the negative emotion and declined cognitive abilities. A few studies also suggest that dmPFC is related to the pain perception. However, the exact neural pathway coming from the dmPFC involved into the pain modulation is not reported. The pathway periaqueductal gray (PAG)-rostral ventromedial medulla (RVM)-spinal dorsal horn (SDH) is one of the most important neural pathway involved into the descending pain modulation. The investigation about the superior projection to the PAG involved into the pain modulation is rare. Is there the

possibility that dmPFC projecting to vlPAG participate into the descending modulation, which is the most related division to pain in PAG?

To fulfill this aim, many various kinds of morphological approaches were used to establish the neural pathway dmPFC-vlPAG and investigate the inputs of dmPFC and the outputs of vlPAG. Chemical damages, optogenetic, chemogenetic, molecular biology and behavioral pharmacological approaches were applied to illustrate the involvement of dmPFC-vlPAG into the pain modulation and negative emotion. Thus, this study can be divided into the following two sections:

1. The morphological studies of dmPFC-vlPAG neural pathway involved into the descending pain modulation

Objective: To reveal the dmPFC-vlPAG neural pathway and investigate the inputs of PV-ir neurons in the dmPFC and projections from the vlPAG to the RVM.

Methods: 1) The projections from the dmPFC to the vlPAG, the vlPAG to the RVM, and the RVM to the SDH were observed by using tracing methods. Meanwhile, we also investigated the chemical properties of these projection neurons with the help of fluorescence immunostaining or *in situ* hybridization. 2) Adeno-associated virus (AAV) was injected into the dmPFC and the fibers of dmPFC-vlPAG projection neurons were observed in the vlPAG. The locations of these infected fibers and vlPAG-RVM projection neurons were also checked. 3) The rabies virus labeling system was used to study the inputs of VGLUT2-ir neurons in the vlPAG, PV-ir neurons in the dmPFC, and 5-HT-ir neurons in the RVM, which could label presynaptic neurons.

Results: 1) Retrograde tracer Fluoro-Gold (FG) was injected into the vlPAG. A lot of FG-labeled projection neurons can be observed in the dmPFC, which were also CaMKII-immunoreactivity and expressed VGLUT1 mRNA. Moreover, the FG-ir neurons cannot express VGLUT2 mRNA and GAD67, a marker for the inhibitory interneurons. Then, the anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA) was injected into the dmPFC and tons of fibers can be observed in the vlPAG. For further confirmation, AAV2/2-CaMKII α -EYFP was injected into the dmPFC to infect the excitatory pyramidal neurons. After 4 weeks, a lot of EYFP-labeled fibers can be observed in the vlPAG, which

belongs to the infected pyramidal neurons in the dmPFC. Helper viruses (AAV2/9-DIO-GFP-TVA and AAV2/9-DIO-G) and RV-EnvA- Δ G-dsRed was injected into the vIPAG of VGLUT2-Cre mice, separately. Many dsRed trans-synaptic labeled projection neurons in the dmPFC can be observed. There exists the descending neural pathway dmPFC-vIPAG.

2) What is similar with the above methods, helper viruses and RV-EnvA- Δ G-dsRed was injected into the dmPFC of PV-Cre mice, separately. The dsRed trans-synaptic labeled projections neurons were observed in some cortex regions, including mPFC, ACC, insular cortex (IC), claustrum (CLA). The dsRed trans-synaptic labeled projections neurons were also found in some nuclei of the thalamus, such as paraventricular nucleus of thalamus (PVT), mediodorsal nucleus of thalamus (MD), paratenial nucleus of thalamus (PT), centrolateral nucleus of thalamus (CL), ventromedial nucleus of thalamus (VM), rhomboid nucleus of thalamus (Rh), and reuniens nucleus of thalamus (Re). There were also some dsRed trans-synaptically and retrogradely labeled neurons in the bed nucleus of stria terminalis (BNST), basal lateral nucleus of amygdala (BLA) and hippocampus.

3) Helper viruses and RV-EnvA- Δ G-dsRed was injected into the RVM of Sert-Cre mice, separately. The dsRed trans-synaptically labeled projection neurons distributed in the vIPAG. By using fluorescence *in situ* hybridization and immunostaining, the FG-labeled RVM projection neurons in the vIPAG can be observed and most of them express VGLUT2 mRNA. What is more, the FG-labeled SDH projection neurons in the RVM expressing 5-HT can receive a lot of VGLUT2-ir contacts. AAV2/2-CaMKII α -EYFP was injected into the dmPFC and FG was injected into the RVM. FG-labeled RVM projection neurons in the vIPAG receive the EYFP-labeled fiber contacts.

Conclusion: There was an excitatory neural pathway from dmPFC to vIPAG, which used glutamate as neurotransmitter and acted on VGLUT2-ir neurons in the vIPAG. The 5-HT-ir neurons in the RVM can receive the projection from VGLUT2-ir neurons in the vIPAG. A Top-Down (dmPFC-vIPAG-RVM-SDH) neural pathway was revealed. Meanwhile, the PV-ir neurons in the dmPFC received intense projections from the nucleus, which were closely related to the nociceptive information transmission.

2. The functional studies of dmPFC-vIPAG neural pathway involved into the descending pain modulation

Objective: To observe the effects of silencing or activating the dmPFC-vIPAG neural pathway on the pain and anxiety behaviors by using different methods and reveal the underlying molecular mechanisms of dmPFC involved into the chronic pain.

Methods: 1) The common peroneal nerve ligation (CPNL) model was established to observe the pain and anxiety behaviors. 2) The mechanical thresholds of hind paw were tested by Von Frey filaments and the anxiety behaviors were observed in the open field test and elevated plus maze test. 3) The pain and anxiety behaviors were also checked after chemical lesions of dmPFC by kainic acid (KA), optogenetic activation of dmPFC-vIPAG pathway, and chemogenetic activation of Vgat-ir neurons in the dmPFC. 4) Western blot was used to check the expressions of GABA_AR and mGluR1 in the dmPFC. The antagonists of GABA_AR and mGluR1 were injected into the dmPFC to observe the effects on the pain and anxiety behaviors.

Results: 1) KA was injected into the bilateral dmPFC and all kinds of neurons in the dmPFC died due to the over excitation. The pain threshold of mice in the normal condition reduced, and the total distance and time in the central area (% of the total time) in the open field test were also reduced. Meanwhile, the entries into the open arms (% of the total entries) and time spent in the open arms (% of the total time) both decreased in the elevated plus maze test. The dmPFC lesions can also reduce the mechanical threshold of mice received CPNL and increase the responses to the innociceptive stimulus. But, these lesions did not worsen the behavior in the open field and elevated plus maze.

2) AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP was injected into the dmPFC and fiber was implanted into the vIPAG. By using 473 nm blue light 10 mW 20 Hz to stimulate, the mechanical hyperalgesia of bilateral hindpaw can be significantly reversed on mice with CPNL 7 day. Moreover, the reduced time spent in the open arms (% of total time) and entries into the open arms (% of total entries) were also reversed on mice with CPNL 14 day. However, the behavior in the open field was not improved.

3) AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrin was injected into the bilateral dmPFC of

Vgat-Cre mice, and then the behavior was tested following intraperitoneal (*i.p.*) injection of 1 mg/kg clozapine-*N*-oxide (CNO) 30 min. The pain threshold of mice in the normal condition, the total distance and time in the central area (% of the total time) in the open field and the time spent in the open arms (% of the total time) and entries into the open arms (% of the total entries) in the elevated plus maze were all reduced, after bilateral activating inhibitory interneurons in the dmPFC. These inhibition of dmPFC-vIPAG neural pathway also increased the mechanical hyperalgesia of bilateral hindpaw on mice with CPNL 7 day. Moreover, time in the central area (% of the total time) in the open field and the time spent in the open arms (% of the total time) and entries into the open arms (% of the total entries) in the elevated plus maze were further reduced after CPNL 14 day.

4) By using Western blot to test the expressions of GABA_AR and mGluR1, significantly increasing of GABA_AR and mGluR1 expressions can be observed in the dmPFC. The cannula was implanted into the dmPFC and used to inject the specific antagonists of GABA_AR and mGluR1. The injections of bicuculline and LY367385 both rescued the mechanical hyperalgesia of bilateral hindpaw on mice with CPNL 7 day. The total distance and time in the central area (% of the total time) in the open field and the time spent in the open arms (% of the total time) and entries into the open arms (% of the total entries) in the elevated plus maze were increased after CPNL 14 day.

Conclusion: The dmPFC-vIPAG play important roles in maintaining the mechanical threshold of paw and normal behavior in the open field and elevated plus maze. The mechanical thresholds of hind paw were reduced at both normal and chronic pain condition, after the dmPFC-vIPAG pathway was silenced by chemical lesions or specific activation of inhibitory neurons in the dmPFC. Meanwhile, the increased responses to the mechanical stimuli and anxiety behaviors were also observed. The activation of inhibitory neurons in the dmPFC even worsen the negative emotion after chronic pain. The analgesic and anxiolytic effects were observed after activating the dmPFC-vIPAG pathway. GABA_AR and mGluR1 in the dmPFC was involved into the initial and maintenance of chronic pain and negative emotion.

Key words: dmPFC; vIPAG; chronic pain; negative emotion; neural pathway; optogenetic approach; chemogenetic approach; inhibitory interneurons

前 言

疼痛是一种令人不愉悦的主观感受，不仅包括了客观的痛觉感受，同时也包括了情感和认知的改变^[18,176]。因此，慢性痛对机体的危害不仅是持续的疼痛感受，还可以导致情绪低落、睡眠障碍和认知功能的下降，从而影响病人的生活质量^[55,162]。慢性痛的病人往往会伴随着情绪低落如焦虑和抑郁，神经病理性痛的病人的这一比例约为 30%^[3]，而肌纤维痛综合症的病人的这一比例可以达到 80%^[42]。反过来，认知和情感的因素也可显著影响疼痛的感受。在临床中，消极的期望可以完全逆转瑞芬太尼的镇痛作用^[11]；而对疼痛缓解的期望是安慰剂镇痛的重要机制^[9]。同样一个人的负性情绪可以增加疼痛的感受，而积极乐观的情绪可以减弱疼痛的感受^[145]。因此，持续的疼痛便容易形成一个“慢性痛后的恶性循环”：慢性痛后可以导致焦虑、抑郁等负性情绪，同时睡眠功能紊乱，活动减弱导致认知功能的降低；而后负性情绪和认知下降又会进一步的加剧慢性疼痛，形成疼痛-负性情绪和认知下降-疼痛的恶性循环，严重困扰着慢性痛患者，减弱慢性痛的治疗效果^[18,176]。

有许多慢性痛发生时，并没有明确的病理性改变（如，肌纤维痛综合症和肠易激综合症）^[34]。另有许多慢性痛疾病早期虽然有组织或是神经的损伤（如下腰痛和带状疱疹后遗神经痛），但是治愈损伤多年后，在损伤处及其邻近区域仍会继续出现持续的慢性疼痛。尽管病人服用了大量的镇痛药物，但仍然还会有疼痛的主观感受。这便反应了疼痛研究中的另一个难题，尽管慢性痛已经十分的常见和普遍^[69]，但是对于急性痛向慢性痛转变的机制仍然不清楚。

脑功能的影像学研究显示不同的脑区感受疼痛的不同部分（伤害性客观感觉、情绪部分和认知部分）。躯体感觉皮层（S1 区和 S2 区）主要感受疼痛的客观伤害性信息。疼痛的痛觉感受包括痛觉的刺激强度，位置，来源（是深部组织还是浅层皮肤）和性质（烧灼样还是针刺样疼痛等）。主要与外周感受器的活化，感受外周机械或是温度神经元的激活以及化学损伤有关^[52,109]。而前扣带回皮层（anterior cingulate cortex, ACC）、岛叶皮层（isular cortex, IC）和内侧前额叶皮层（medial prefrontal cortex, mPFC）作为脑内边缘系统的一部分，主要参与感受疼痛时情绪的改变^[7,173]。而 dmPFC

同时还与动物的认知功能、空间记忆及工作记忆密切相关。但作为同时参与疼痛时产生负性情绪和认知下降的 dmPFC 是否同时直接参与疼痛的内源性调控,其功能是下行易化还是抑制,其是否参与了“慢性痛后的恶性循环”和疼痛的慢性化过程?以上问题尚未见报道,所以开展 dmPFC 下行神经通路参与疼痛的内源性调控的研究,对于探讨打破“慢性痛后的恶性循环”和慢性化过程,指导临床实践,增强慢性痛的治疗效果,提高慢性痛患者的生活质量具有重要意义。

文献回顾

一、中枢内的痛觉下行调控

在机体中除了从外周到中枢神经系统产生疼痛的上行传递系统以外，中枢神经系统内还有一套从上到下的内源性疼痛调控系统。正常时，这两个系统处于平衡状态，但在外周组织或神经系统发生炎症或是存在病理性改变的情况下内源性镇痛系统的功能减弱，镇痛作用减弱甚至丧失，两个系统之间失衡，最终也会导致或易化增强疼痛。在神经系统内有多条的下行调控通路可以直接作用于脊髓产生下行镇痛作用，但从中脑导水管周围灰质（periaqueductal gray, PAG）中继于延髓吻端腹内侧结构（rostral ventralmedial medulla, RVM），终止于脊髓背角的神经通路是下行镇痛系统最重要的一条神经通路（图 1）^[7,41,104,173]。同时，该通路也是目前研究最多，且在临床影像学研究中得到证实的一条通路^[15,89,174]。有许多的神经活性物质参与其中，可以产生镇痛作用。随着内源性镇痛系统研究的不断深入，人们观察到电刺激 PAG 或是 RVM 处或是向核团内注射肽类等药物，除了可以产生镇痛作用之外，还可以易化疼痛。即，刺激 PAG-RVM 神经通路既可产生下行抑制，也可产生下行易化^[163,176]。在相同的解剖结构中产生完全相反的效应，这与 PAG、RVM 和脊髓背角不同的解剖结构层面有着复杂的机制是密切相关的。

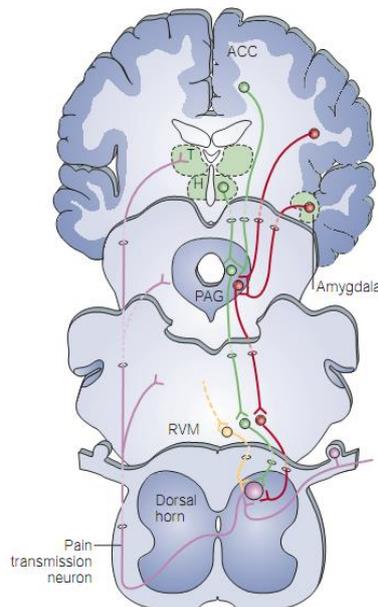


图 1 中枢神经系统内 PAG-RVM 下行痛觉调控通路及其传入传出联系

中脑内的 PAG 可接受来自下丘脑(hypothalamus, H)、杏仁核 (Amygdala) 和包括前扣带回皮层 (anterior cingulate cortex, ACC) 在内的皮层结构的纤维传入, 进而通过 PAG-RVM 这一通路影响脊髓背角内传递伤害性信息的神经元。其中绿色线条代表对疼痛的下行抑制, 红色线条代表对疼痛的下行易化, 紫色线条代表疼痛的上行传递。引自 Fields H, 2004^[41]。

RVM 内 5-HT 能神经元被认为是内源性疼痛下行调控的关键神经元, 5-HT 即可产生下行抑制又可产生下行易化^[75,104,164]。是由于脊髓背角内 5-HT 受体亚型的不同及分布在初级传入或是固有神经元等的位置不同所引起的, 但目前认为兴奋 RVM 内的 5-HT 能神经元主要产生下行镇痛作用 (图 2)。现也有文献证实 RVM 内的抑制性神经元不仅可以在局部环路内调控 5-HT, 也可直接投射到脊髓背角通过抑制其内抑制性神经元的活动产生下行易化疼痛的作用^[46]。因此 RVM 内关于下行疼痛调控的神经递质/调质类型比较固定, 神经元类型也比较明确。但目前为止, PAG 内并不能找到一个明确的递质/调质或是神经元类型可以作为下行镇痛或是下行易化的研究靶点。尤其是光遗传学技术和化学遗传学技术问世后, 鲜有研究关注 PAG 内神经元对疼痛的下行调控作用。

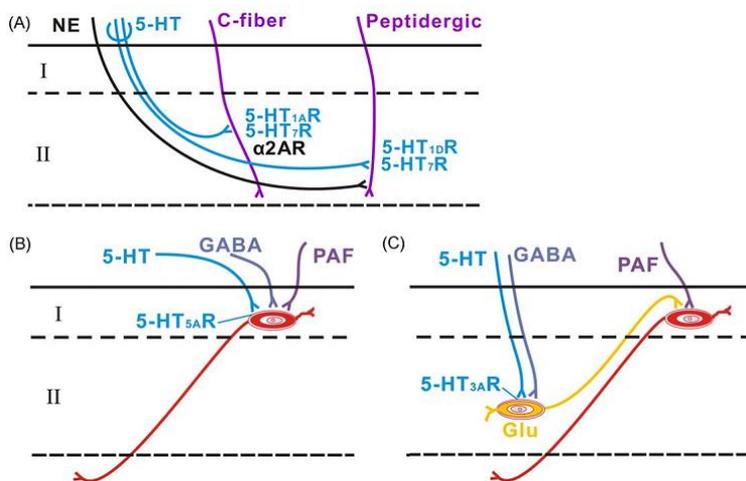


图 2 下行投射 5-HT 纤维在脊髓背角内的分布。

(A) 脊髓内的下行 5-HT 纤维通过突触前的 5-HT_{1A}R、5-HT_{1B}R 或者 5-HT₇R 抑制传递伤害性信息的初级传入纤维; (B) 脊髓内的下行 5-HT 纤维通过表达在投射神经元上的 5-HT_{5A}R 抑制投射神经元对痛信息的传导, 投射神经元还可接受来自 RVM 内 GABA 纤维的调控; (C) 脊髓内的下行 5-HT 纤维通过表达在兴奋性中间神经元上的 5-HT_{3A}R 抑制痛信息的传导。引自 Wu

SX, 2009^[159]。

PAG 位于中脑，处于各种上行和下行通路的必经之地，因此其神经纤维联系广泛，功能非常复杂和多样。根据其与其他核团联系的不同和功能的差异，可以分为四个亚区：背内侧 PAG (dorsomedial divisions of PAG, dmPAG)，背外侧 PAG (dorsolateral divisions of PAG, dlPAG)，外侧 PAG (lateral divisions of PAG, lPAG)和腹外侧 PAG (ventrolateral divisions of PAG, vlPAG)，其中在这四个亚区中 vlPAG 与疼痛的关系更加密切^[101,105]。我们前期的研究工作也证实了在 PAG 中主要是 dmPAG，lPAG 和 vlPAG 向 RVM 进行投射^[175]，并且在急性痛时 vlPAG 内有更多的 RVM 投射神经元被激活^[163]。因此在本课题中我们也选择了 vlPAG 作为代表进行通路的研究和探讨。在 PAG 层面，从 PAG 向 RVM 投射的神经元，含有神经活性物质的种类繁多，不同的神经活性物质可分别会产生下行抑制或是下行易化，甚至同一种神经活性物质既可以参与下行抑制也可参与下行易化^[104]。既往的研究已证实 PAG 中向 RVM 投射的神经元中含有几十种的神经递质或调质如 P 物质 (Substance P, SP)、神经降压素 (Neurotensin, NT)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 及脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) ^[26,28,104,151,163]。这些递质或调质均被证实可以下行调控疼痛，有时是产生下行镇痛，有时是导致下行易化疼痛^[104,164,176]。这可能与受体的种类或是给药浓度大小密切相关。既往在 PAG 内尚不可像 RVM 内确定一种明确的、大家认可的递质或调质来介导从 PAG 向 RVM 的信息传递。尽管已经有研究证实慢性炎性痛后 PAG 内的 BDNF 表达上调且 BDNF-免疫阳性的神经元可以投射到 RVM^[163]。RVM 处的 BDNF 可通过突触后的机制参与下行易化，BDNF 通过增加突触后 NMDA 受体 NR2A 亚型的磷酸化，或是下调突触后的 K⁺/Cl⁻共转运体，易化疼痛的发生^[54,169]。PAG 内的 BDNF 可被认为是产生下行易化的重要神经调质。但其实，在他们的研究中和既往的研究中同样因为 BDNF 浓度的调整也会产生镇痛作用。这些都成为了研究 PAG 内的镇痛机制难以克服的障碍。新近发表的一篇 Nature 文章第一次运用光遗传的方法证实了兴奋 vlPAG 内的 II 型囊泡膜谷氨酸转运体 (vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2) 阳性神经元可产生明显的镇痛作用，显著增加小鼠在浸尾试验中的甩尾潜伏期^[140]。而 vlPAG 内的 GABA 神经元可抑制 VGLUT2 阳性神经元的活化。尽管并未明确 VGLUT2 阳性神经元是通过谷氨酸或是其他的递质、肽类产生的下行镇痛作用。但至少为我们提供了一个研究下行疼痛调

控作用在 PAG 内的靶细胞, PAG 内镇痛神经元的确定为我们课题研究中 dmPFC-PAG 下行神经通路找到了靶点。凡是能够兴奋 PAG 内, 尤其是 vlPAG 内 VGLUT2 阳性神经元的通路或方法便可产生下行镇痛, 反之便产生下行易化或是减弱下行镇痛的作用。

二、PAG 的传入研究

尽管近几十年有大量的关于 PAG-RVM 神经通路参与下行疼痛调控的研究, 它们或关注于 PAG 内不同的神经递质向 RVM 的投射产生下行镇痛/易化, 或集中在 PAG 内局部神经环路的调节^[26,36,127], 更或者是深入研究 RVM 内向脊髓的投射及调控^[53,75,111,155]。鲜有研究探讨 PAG-RVM 神经通路是接收来自何处的下行调控命令? 以及上行传递的疼痛信息是如何接力影响到下行调控通路的? 尽管也有些研究报道了从外侧僵核向 PAG 的投射, 但并未进行深入的关于外侧僵核通过 PAG 对疼痛的下行调控的研究^[87,160]。从下丘脑的核团向 PAG 的投射^[24,153], 通过逆行示踪的研究方法观察了下丘脑内的不同核团(背内侧核、腹内侧核及弓状核等)分别对 PAG 内的四个亚区的投射做了研究。同时, 观察到从下丘脑投射来的内源性吗啡肽 1 (endomorphine 1, EM1) 的纤维通过抑制 PAG 内的抑制性中间神经元, 对向 RVM 投射的 5-HT 神经元产生去抑制从而产生下行镇痛的作用^[26]。也有一系列的研究证实了从腹外侧眶皮质(ventrolateral orbital cortex, VLO)向 PAG 的投射, 并对其镇痛的功能做了深入的研究^[64,65,120,136]。其中 VLO 又可接受来自丘脑内中央下核(submedius nucleus, Sm)的纤维投射形成了 Sm-VLO-PAG 这样一条感知疼痛并对疼痛进行下行调控的神经通路(图 3), 且在这一通路中阿片类受体、5-HT 受体、GABA 受体和多巴胺受体均参与了对疼痛的下行调节。这也是比较全面的报道丘脑、皮层等上位中枢对 PAG 的调控研究。

近年来随着病毒标记技术和光遗传学技术的发展, 为研究通路的功能提供了很多的便利。对于 PAG 传入的研究及其参与多种功能的研究也逐渐的多了起来。有研究证实腹内侧下丘脑内表达类固醇生成因子-1 的神经元可以发出向 dlPAG 的投射, 并且特异性的激活腹内侧下丘脑-dmPAG 这一通路可以引起小鼠“僵化不动”的防御性反射行为^[153], 并且这些向 dlPAG 投射的腹内侧下丘脑内的神经元还可向下丘脑前核发出分支投射, 但却引起小鼠的厌恶和逃跑行为。另外, 中央杏仁核内的抑制性

投射神经元也可向 vIPAG 发出投射通过抑制 PAG 内的抑制性中间神经元间接地兴奋 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元，该通路同样可以引起小鼠“僵化不动”的防御性反射行为^[140]。另一篇文献报道用光遗传学的方法特异性激活中央杏仁核-vIPAG/IPAG 通路可以增强动物在猎食行为中的运动能力^[57]，并且这一行为同样依赖于 PAG 中的 VGLUT2 阳性神经元，而不是抑制性神经元。从中央杏仁核向 PAG 的投射还参与了恐惧记忆的形成^[115]。但是关于这些从下丘脑和杏仁核向 PAG 的神经通路，还是欠缺关于疼痛方面的研究，尤其是应用光遗传学技术和化学遗传学技术后的特异性通路研究。

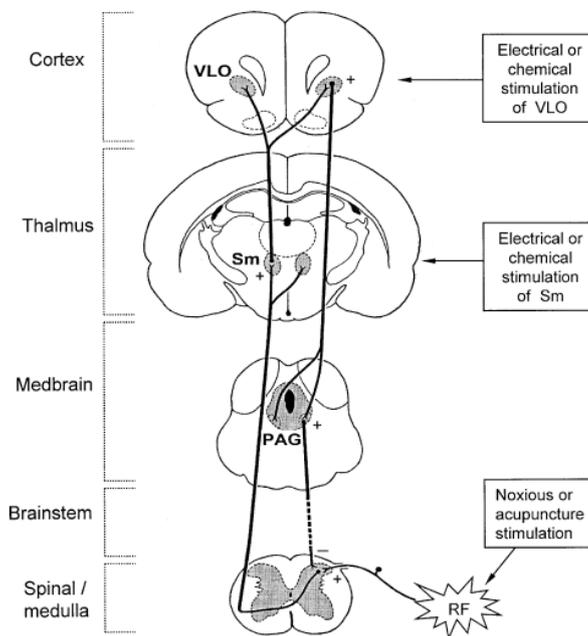


图 3 设想的感知疼痛-调控疼痛的反馈调节环路：脊髓/延髓-丘脑中央下核（Sm）-腹外侧眶皮质（VLO）-导水管周围灰质（PAG）-脊髓/延髓。引自 Tang JS, 2009^[136]。

前额叶皮层的解剖结构

前额叶皮层 (prefrontal cortex, PFC) 的概念最先见诸于灵长类动物大脑的研究中，尤其是人类大脑的影像学研究将在大脑额叶前部不同于运动、感觉皮层的一系列皮层结构统称为 PFC，主要包括背外侧前额叶皮层 (dorsolateral PFC, dlPFC)、腹内侧前额叶皮层 (ventromedial PFC, vmPFC)、吻侧前扣带回皮层 (rostral anterior cingulate cortex, rACC) 和眶皮层 (orbital frontal cortex, OFC) ^[82,125]。主要的功能为对认知和

情绪的调控作用，尤其是在高级认知功能中发挥了重要作用，如基于奖赏的学习和做出决定^[5,82,125]。事实上灵长类动物的大脑不仅在体积上远远大于啮齿类动物的大脑（几百上千倍体积），更重要的是灵长类动物的大脑发育分化的更加完全，更加复杂，因此功能上也会相应的复杂和细致^[135]。在这种情况下人们就会要问，在啮齿类动物的大脑中是否都有与灵长类动物大脑中相对应的功能相近或相似的核团结构，尤其是像 PFC 这样发挥高级功能的皮层结构，在低等的未分化成熟的啮齿类动物中是否有相应的前额叶结构与之发挥相近的功能^[141]？在啮齿类动物中，PFC 同样位于大脑额叶的前部，可以分为三个部分，分别是：内侧部、外侧部和腹侧部^[143,144]。内侧部又可分为背内侧 PFC（dorsal medial PFC, dmPFC，包括吻侧前扣带回（rACC），中央前回（precentral cortex）和缘前皮层的背部（dorsal prelimbic cortex, PLd））和腹内侧 PFC（ventral medial PFC, vmPFC，包括缘前皮层的腹部（ventral PL, PLv）、缘下皮层（infralimbic, IL）、脚背皮层（dorsal peduncular, DP）和内侧眶皮质（medial orbital, MO））。外侧部主要由眶额部皮质（orbital frontal cortex, OFC）和岛叶皮质（insula cortex, IC）的前部构成；腹侧部主要为腹侧眶皮质（ventral orbital, VO）和腹外侧眶皮质（ventral lateral orbital, VLO）。根据不同区域纤维联系的不同和功能的差别，也可将 PFC 分为 dmPFC、vmPFC、额眶皮质和岛叶皮质。此四块区域内为异质性的，根据细胞构筑学和特异性投射核团的不同，也可进一步划分为许多的亚区(图 4)。PFC 在灵长类动物和啮齿类动物间还有一点不同便是啮齿类动物的 PFC 均无第 IV 层颗粒层。从细胞构筑学和位置上，啮齿类动物的 mPFC 和灵长类动物的 rACC 和 vmPFC 相对应，其中 PL 可被认为是灵长类中的 vmPFC，而从功能上来看灵长类动物中的 dlPFC 同样也与啮齿类动物中的 PL 功能相似^[128,141]。PFC 中传出神经元主要为兴奋性谷氨酸能的锥体神经元，此类神经元受局部 GABA 能中间神经元的调控。PFC 主要有六方面的功能：诱因突现性、应激、负性情绪、疼痛、习惯和决策制定^[51,122]。其中 dmPFC 包括 rACC 和 PL 与疼痛及疼痛后情感和认知功能的改变最为密切相关^[18,109]。不同的神经功能是与其相应的解剖结构相关的，而 PFC 与其他神经核团的纤维联系广泛进而决定了其多样化的功能参与。关于 PFC 功能的介绍放在后面的传入和传出纤维联系中一起介绍，分别说明 PFC 在不同的神经通路中发挥的不同功能。

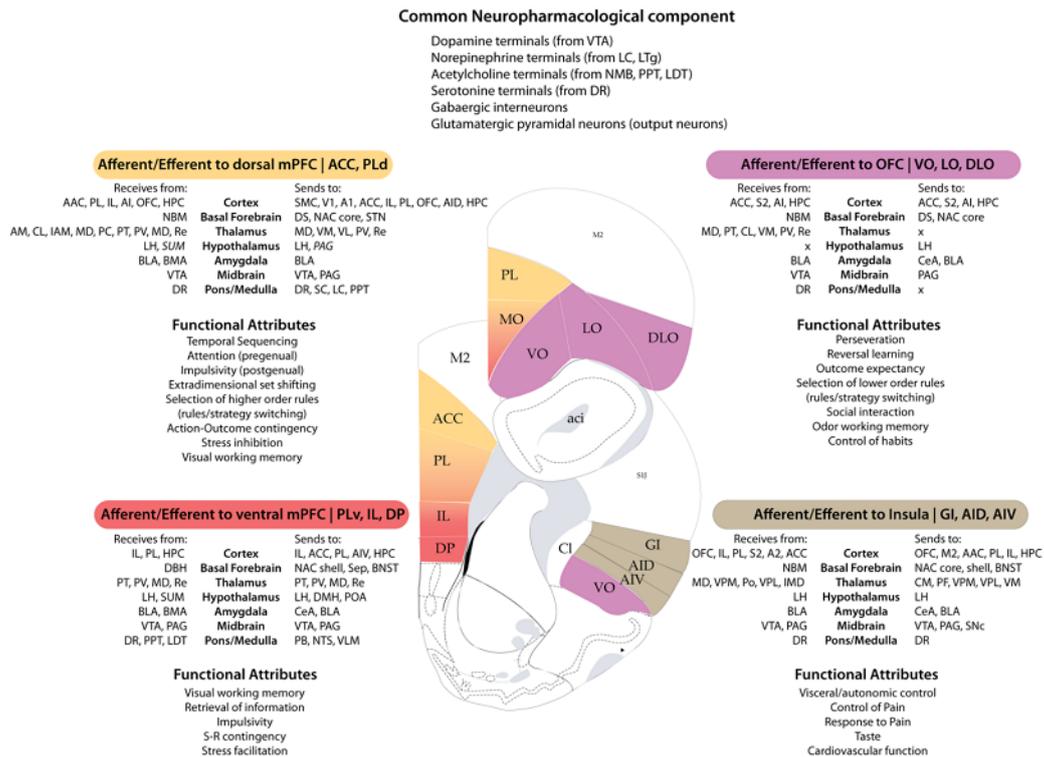


图 4 啮齿类动物前额叶皮层 (PFC) 的解剖学、功能学的亚区划分。

根据 PFC 内不同亚区解剖学联系和功能的不同, 可将其分为四个主要的区域: 背内侧 PFC (dmPFC)、腹内侧 PFC (vmPFC)、眶皮质 (orbital frontal cortex, OFC) 和岛叶皮质 (insula cortex, IC)。这四个亚区并不是同质性的, 还可根据细胞构筑学和其投射区域的不同进一步区分。dmPFC 包括吻侧前扣带回皮层 (rACC) 和缘前皮层背侧部 (dorsal PL, PLd), vmPFC 包括缘前皮层腹侧部 (ventral PL, PLv)、缘下皮层 (infralimbic cortex, IL) 和脚背侧皮质 (dorsal peduncular cortex, DP), OFC 包括腹侧眶皮质 (ventral orbital cortex, VO)、外侧眶皮质 (lateral orbital cortex, LO) 和背外侧眶皮质 (dorsolateral orbital cortex, DLO), IC 包括颗粒皮质 (granular insula cortex, GI)、无颗粒皮质背侧部 (granular insula cortex, dorsal part, AID) 和无颗粒皮质腹侧部 (granular insula cortex, ventral part, AIV)。引自 George O, 2010^[51]。

dmPFC 的纤维联系和功能研究

鉴于 dmPFC 功能的多样, 包括影响情绪, 认知功能, 工作记忆和做出决定等以及在疼痛研究领域的重要性^[14,48,93]。以往对其传出投射在多个动物种属已经做了研究, 并且深入的探讨了其不同传出的功能机制研究。但对于其传入投射的研究还是

知之甚少。早期神经解剖学家运用顺行示踪剂 *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L), 将其注射到大鼠的 mPFC 内, 全脑普查 PHA-L 标记纤维的分布^[130]。PL 投射的区域主要包括: PFC、ACC 和鼻周皮层 (perirhinal cortex) 皮层结构, 背内侧和腹侧的纹状体, 脑基底核团, 杏仁核基底外侧部 (basolateral nucleus of the amygdala, BLA), 外侧下丘脑, 丘脑的背内侧核、中线核群和板内核群, 导水管周围灰质 (PAG), 腹侧中脑被盖区, 背外侧被盖核及中缝核群。同时, 在嗅前核, 梨状皮质和脑桥被盖核-楔形核的区域内也可观察到 PHA-L 的纤维终末。另一项研究用放射自显影顺行示踪的技术分别研究了猫的 mPFC 中 PL 和 IL 的投射区域的不同, 观察到 IL 投射的区域不同于 PL 多集中在边缘系统的结构中并且在丘脑、纹状体、皮层和杏仁核内两者的投射区域都是各不相同的^[123]。实际上 mPFC 内 ACC、PL 与 IL 三者之间是相互投射的, 且都投射至对侧的同源区, 在丘脑内 ACC 和 PL 主要投射至丘脑的背内侧核团和所有的中线核群, 而 IL 主要投射到丘脑的板内核群和中线核群, 同样在杏仁核中 ACC 和 PL 主要投射至杏仁核的外侧核、基底外侧核和基底内侧核, 而 IL 主要投射至杏仁核的内侧核, ACC 和 PLd 还可投射到上丘而 PLv 和 IL 投射到两侧的臂旁核及延髓结构, 在其他的投射区三者之间无明显的差别^[16]。投射区域的不同也恰恰说明了 ACC、PL 和 IL 之间功能的差异和不同, 鉴于 ACC 和 PLd 投射区域的相近, 有时可作为 dmPFC 统一进行研究。近年来随着病毒技术和光遗传学技术的应用, 有大量的研究关注从 mPFC 发出的某一神经通路进行深入的功能研究。mPFC 可发出纤维投射到中缝背核 (dorsal raphe, DR) 中, 既可与 DR 中的 5-HT 神经元形成突触联系, 又可直接兴奋 DR 中的抑制性神经元, 并且兴奋 vmPFC 到 DR 中抑制性神经元的神经通路可以加重动物的社交缺陷^[22,172]。事实上 mPFC 不仅可以向 DR 内的 5-HT 神经元投射, 同时 mPFC 中的神经元也可接受来自 DR 中 5-HT 神经纤维的支配参与动物的任务关注行为^[1,139]。mPFC 尤其是 PL 区可以接受来自腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 的多巴胺能纤维的投射, 特异性的激活这些多巴胺能的纤维终末可以降低 PL 内抑制性神经元对 V 层兴奋性锥体神经元的抑制, 并且这些锥体神经元主要投射到伏核的核心部^[17]。同样运用光遗传学的方法兴奋或抑制 mPFC 向脑桥核 (pontine nucleus, PN) 投射的神经通路, 证明 mPFC 参与了高级认知功能和关联运动的学习^[157]。从 vmPFC 向杏仁核中央内侧部 (centromedial nucleus of the amygdala, CeM) 的神经投射可以调控动物的情绪, 影响动物的恐惧记忆和焦

虑样行为,同时从 CeM 向 vmPFC 由下到上的神经通路也可对动物奖赏相关的行为进行调节^[116,129]。从 mPFC 向伏核的投射还参与了睡眠剥夺后引起的异常奖赏行为^[94],在动物对可卡因的寻找行为中也发挥了重要作用^[133]。同时 mPFC 内的抑制性神经元也可作为投射神经元投射到伏核内参与了动物厌恶行为的形成^[81]。

尽管上述已经有大量的文献报道了对于 mPFC 的传出研究,但对于 mPFC 的传入研究还相对较少,尤其是鲜有对于 mPFC 内不同亚区的投射研究^[31,43,63]。将逆行示踪剂 FG 分别注射到大鼠 mPFC 的四个亚区中,观察逆行标记投射神经元在全脑中的分布。dmPFC 包括中央前回和背侧 ACC 主要接收来自传递感觉信息的皮层及丘脑相关核团的投射,而 vmPFC 包括 PL (腹侧 ACC) 和 IL 主要接收来自边缘系统核团的投射 (如:内侧眶额叶皮层、岛叶皮层、内嗅皮层、海马、屏状核、杏仁核基底部及丘脑的中线核群等)。根据传入和传出纤维联系的特点,大鼠 mPFC 内的 PL 与灵长类动物中的 l/dIPFC 功能相似,而 IL 则与灵长类动物的眶内侧皮层功能相近^[63]。而更加细致的研究,分别将 FG 注射到小鼠背侧 ACC 和腹侧 ACC 来观察两者之间传入纤维的异同。背侧 ACC 和腹侧 ACC 均可接受来自皮层结构、前脑基底核、丘脑核团、下丘脑和脑干核团的投射,两者之间在纤维来源上没有明显的差异,仅仅是数量上的差别^[43]。近来也有学多的神经通路研究关注不同核团向 mPFC 的投射从而参与多种生理功能。小鼠的丘脑室旁核 (paraventricular nucleus of thalamus, PVT) 可以投射到 mPFC 并且直接兴奋其内的抑制性神经元,从而参与了蛙皮素 (cerulein) 导致的慢性内脏痛。通过化学毁损药物抑制 PVT 的功能或者直接兴奋 mPFC 内的锥体神经元可以缓解上述内脏痛的疼痛情况^[70]。从腹侧海马 (ventral hippocampus, vHIP) 向 mPFC 投射的神经通路参与了焦虑相关行为的产生^[113],并且兴奋 vHIP-mPFC 神经通路在氯胺酮产生的持久性抗抑郁过程中发挥重要的作用^[21]。从海马向 mPFC 投射的神经通路也参与了与任务相关的空间工作记忆的形成^[132]。对 mPFC 传入研究较多的还是从 BLA 到 mPFC 的神经通路,从 BLA 发出的兴奋性神经纤维可直接投射并兴奋 mPFC 内的抑制性神经元从而抑制 mPFC 的活动,这一过程参与了暗示性恐惧的形成和保持以及其他负性情绪行为^[29,76,100]。

dmPFC 参与痛觉下行调控的形态和功能学研究

在传统示踪剂刚刚开始应用到神经解剖学研究时，鉴于 PAG 在内源性镇痛系统中的关键作用，既往已经有大量在大鼠、兔子、猫和猴子脑中进行的逆行（辣根过氧化物酶，horseradish peroxidase, HRP）和顺行（PHA-L）示踪研究证实，dmPFC 内 V 层有大量的投射神经元可以发出纤维投射到 PAG，尤其是 vIPAG 处^[8,16,30,45,102]。同样的，近年来也有文献报道了 mPFC 向 PAG 的投射，但对这一神经通路的突触证据欠缺，且未具体阐明投射神经元的神经化学性质及 PAG 亚区内下行投射纤维的分布，更未进行功能方面的深入研究，探究 dmPFC-vIPAG 通路对疼痛的调控作用及对负性情绪的影响^[29,32]。

关于 dmPFC 与疼痛相关功能学的研究也有报道。神经病理性痛后 1 周，全细胞膜片钳记录 dmPFC 内 II/III 层的锥体神经元，观察到 NMDA/AMPA 的比率明显增加并且与痛敏成正相关^[103]。在慢性关节炎痛模型中，PL 内 V 层锥体神经元的自发放电或是诱发放电均显著性的减少，这种放电的减少或抑制可以被 GABA_A 受体的特异性拮抗剂荷包牡丹碱（bicuculline）所逆转。同时，在正常情况下给予 mGluRI 的激动剂 3,5-二羟基苯甘氨酸（3, 5-Dihydroxyphenyl-glycine, DHPG）也可产生类似慢性痛后的自发放电或诱发放电的减少^[67]。同样在这种慢性关节炎痛模型中，PL 内 V 层锥体神经元的诱发抑制性突触后电流（inhibitory postsynaptic currents, IPSCs）的 Input-Output 曲线左移而诱发的兴奋性突触后电流（excitatory postsynaptic currents, EPSCs）没有明显的改变，说明了慢性痛后抑制性突触传递增强了，而兴奋性突触传递没有受到影响。这种增强的抑制性突触传递是由非-NMDA 受体的谷氨酸受体所介导的。这种对锥体神经元抑制性的增强可能是由于抑制性中间神经元突触前的 mGluRI 活性增强所导致的^[68,134]。

对于慢性痛后 ACC 内 II/III 层锥体神经元电生理特性改变的研究较多且明确。可以观察到在慢性神经病理性痛后，II/III 层锥体神经元的兴奋性增强，且可产生长时程增强的现象（long-term potential, LTP）。这些突触传递的增强可能与突触后的 GluR1 的上膜（trafficking）增多密切相关^[78,173]。同样，在慢性痛后还可观察到 ACC 内 V 层向脊髓投射神经元的兴奋性也是增强的，且与突触后的 GluR1/3 亚型在突触后致密带的分布增加相关^[25,27]。上述这些结果均提示，PL 和 ACC 内的 V 层锥体神经元在慢性痛后均可发生突触传递的改变，或减弱或增强，其潜在的神经机制各不

相同。

Hardy SG 在 PL 处给予电刺激可以观察到明显延长动物热板和甩尾实验的潜伏期^[59], 并且观察到在刺激 PL 后中脑导水管附近的神经元的反应与这种刺激是相匹配的^[60]。已有研究证实电或化学刺激兴奋 ACC 内的神经元可以易化大鼠对疼痛的反应, 并且这种下行易化可能是通过 RVM 发挥作用的^[19]。同时, 损毁 ACC 后可以观察到慢性痛动物的焦虑/抑郁行为的消失^[6,119]。直接在 ACC 内的 V 层给予 GluR1/3 的拮抗剂后也可以逆转神经病理性痛^[27]。上述结果提示, 兴奋 PL 或是抑制 ACC 可以产生镇痛作用, 且可能是通过 PAG-RVM 痛觉下行调控通路而发挥作用的。结合多种转基因动物特异性的激活 ACC 内兴奋性锥体神经元可明显地降低小鼠的疼痛阈值, 而将锥体神经元沉默或者兴奋 PV 阳性的抑制性神经元则在慢性炎性痛模型中可产生明显的镇痛作用^[72]。运用光遗传学的方法特异性的激活 PL 内的 PV 阳性抑制性神经元可以进一步降低神经病理性导致的机械性疼痛阈值, 而沉默抑制性神经元后可产生明显的镇痛效果^[168]。同时直接用光遗传学方法激活 PL 内的锥体神经元可在神经性病理性痛中产生明显的镇痛作用, 这种作用可被伏核内局部给予谷氨酸受体的拮抗剂所阻断, 直接兴奋伏核内由 PL 投射来是神经纤维同样可观察到明显的镇痛作用^[83]。特异性的兴奋 PL 内的锥体神经元不仅可以在慢性炎性痛模型中产生明显的镇痛作用, 而且还可以产生显著的抗焦虑样作用, 而抑制锥体神经元则可降低小鼠正常情况下的疼痛阈值并产生焦虑样作用^[148]。尽管上述研究都观察到了 dmPFC 对疼痛的重要调控作用, 但并未进一步的探讨 dmPFC 是如何影响到了疼痛的上行传递神经通路抑或是疼痛的下行调控神经通路。

关于前额叶皮层对疼痛的调控, 临床上也有许多的研究关注于此。已有许多临床影像学的研究, 观察到偏头痛的病人前扣带回皮层/前额叶皮层与 PAG 间的静息状态功能性联系的减弱, 当患者的疼痛得到缓解后皮层和 PAG 间的功能联系恢复正常^[88]。同时背外侧的前额叶皮层、腹内侧前额叶皮层及吻侧的前扣带回皮层与 PAG 间功能的联系也参与了安慰剂对各种疼痛痛的治疗^[37,77,146], 同时这也为其他治疗疼痛的方法(如针灸刺激和物理疗法)提供了神经精神的机制(图 5)。但关于从高级的感觉中枢皮层向 PAG 的投射还是欠缺相关机制的深入研究。

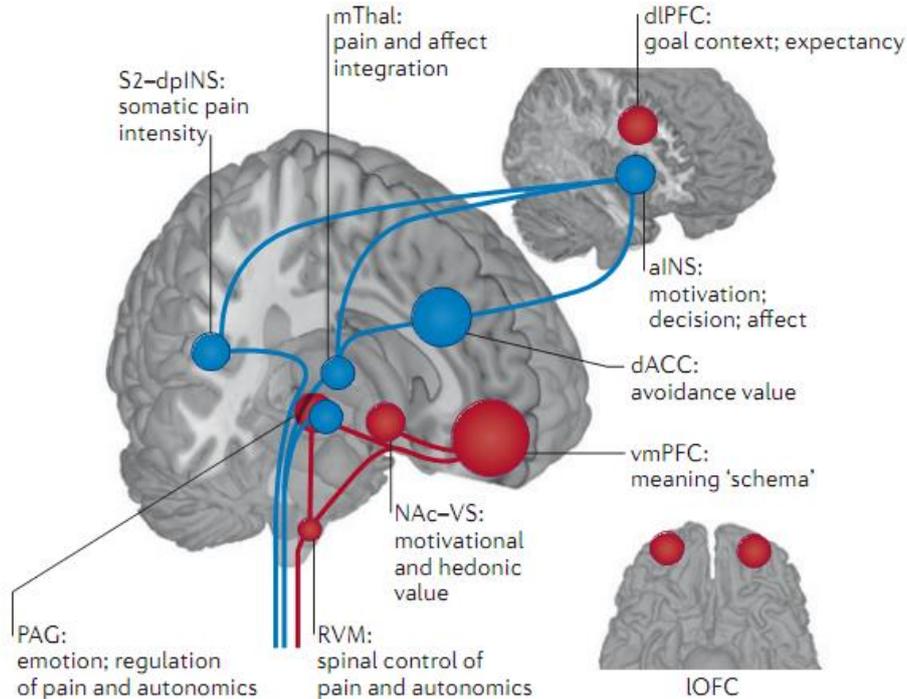


图 5 安慰剂镇痛的神经生理机制。

图中所示的蓝色区域为疼痛后兴奋性增加的区域，相对应的在安慰剂治疗后兴奋性减弱，包括：中间丘脑(medial thalamus, mThal)、岛叶前部(anterior insula, aINS)、背侧前扣带回皮层(dorsal anterior cortex, dACC)、导水管周围灰质(PAG)和第二感觉皮层-背侧岛叶尾部(secondary somatosensory cortex-dorsal posterior insula, S2-dpINS); 红色的区域为安慰剂镇痛后兴奋性增加的区域, 这些区域参与了安慰剂的镇痛效应, 包括: 腹内侧前额叶皮层(ventromedial prefrontal cortex, vmPFC)、背外侧前额叶皮层(dorsolateral PFC, dIPFC)、外侧眶皮质(lateral orbitofrontal cortex, IOFC)、伏核-腹侧纹状体(nucleus accumbens-ventral striatum, Nac-VS)、PAG 和延髓吻端内侧结构(RVM)。引自 Wager TD, 2015^[146]。

综上所述, 我们可以推测确实存在 dmPFC-vIPAG 的下行神经通路, 且可参与痛觉的下行调控。作为感受慢性痛后负性情绪和认知下降的高级神经中枢 PL 和 ACC 在慢性痛时因对疼痛下行抑制的减弱从而参与了“慢性痛后的恶性循环”和慢性痛的维持。在上述研究基础上进一步开展深入、系统和广泛地研究, 对于揭示慢性痛难治不愈, 利用内源性镇痛系统提供新的镇痛策略均具有重要的临床意义和应用前景。

正 文

第一部分 dmPFC-vIPAG 神经通路参与慢性痛 下行调控的形态学研究

中枢神经系统神经核团内的神经元类型和其传入传出的纤维联系等解剖结构基础决定了该核团或相关神经通路的功能特性。因此，为了能够更好的阐明 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛的下行调控及其机制，我们需要首先研究清楚此条神经通路中与疼痛相关的传入纤维来源及传出纤维投射的靶核团以及在此条通路中以何种神经递质作为信使传递神经信息。首先，我们需要分别运用顺行示踪、逆行示踪、和狂犬病毒逆行跨单级突触标记系统等技术方法证明确实存在从 dmPFC 向 vIPAG 投射的神经通路。通过免疫荧光双标的方法揭示谷氨酸可能作为主要的神经递质传递 dmPFC 到 vIPAG 的下行调控信息。其次，鉴于 dmPFC 中的抑制性中间神经元尤其是 PV 阳性的抑制性神经元在疼痛传入信息中扮演的重要作用，我们再次利用狂犬病毒跨单级突触标记系统的方法做全脑的普查，筛选出向 dmPFC 内 PV 阳性的抑制性神经元传递信息与疼痛相关的神经核团。也可从侧面说明 dmPFC 在疼痛信息的传递中扮演的重要作用和角色。最后，借助 PAG-RVM 这一经典且关键的疼痛下行调控神经通路，分别运用狂犬病毒跨单级突触标记系统的方法、逆行示踪、荧光原位杂交和免疫荧光双标的方法探讨 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元可能扮演了重要的中继作用将 dmPFC 传来的兴奋性神经冲动传递到 RVM 内的 5-HT 阳性神经元中。通过以上形态学的研究方法，一条从皮层到脊髓的 dmPFC-vIPAG-RVM-脊髓背角 Top-Down 的内源性下行疼痛调控通路，便被勾勒出来。该部分研究结果为后续探索 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛的下行调控作用及其相应的神经和分子机制提供了坚实的解剖结构基础和重要的理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

本实验所用的动物为清洁级健康雄性成年 C57BL/6J 小鼠（10-12 周，体重 20-25 g），均购自第四军医大学实验动物中心；所用的转基因小鼠包括：PV-Cre 小鼠、VGLUT2-Cre 小鼠、Sert-Cre 小鼠和 GRP-Cre/TdTomato 小鼠，均为实验室从实验动物中心购回雌性 C57 小鼠后自行杂交繁殖。在饲养、繁殖和实验过程中，实验室均能保证室温 22-25℃，08:00-22:00 的光照时间，适宜的空气湿度并保持通风，小鼠可自由获得食物、饮水。本实验的全部操作方法均遵循第四军医大学动物使用和实验动物管理伦理委员会的规定。

1.2 实验材料和试剂

药物和试剂：荧光金（fluoro-gold, FG）、生物素化葡聚糖胺（biotinylated dextran amine, BDA）、磷酸缓冲液（phosphate buffer, PB）、磷酸缓冲盐溶液液（phosphate buffer saline, PBS）、30%蔗糖溶液、焦炭酸二己酯（Diethylpyrocarbonate, DEPC, DH098-2, Genview, Houston, TX）、二甲基联苯胺（3,3-diaminobenzidine, DAB）、AAV2/2-CaMKII α -EYFP、AAV2/9-DIO-GFP-TVA、AAV2/9-DIO-G、和 RV-EnvA- Δ G-dsRed 等。

抗体：详细信息如下：

单克隆豚鼠抗 FG 血清	NM-101	PROTOS BIOTECH CORP, New York, NY, USA
多克隆兔抗 FG 血清	A153-I	Millipore, Billerica, MA, USA
单克隆小鼠抗 NeuN 血清	MAB377	Millipore, Billerica, MA, USA
多克隆兔抗 CaMKII 血清	ab34703	Abcam, Cambridge, MA, USA
单克隆小鼠抗 GAD67 血清	MAB5406	Millipore, Billerica, MA, USA
多克隆豚鼠抗 VGLUT2 血清	AB2251	Millipore, Billerica, MA, USA
多克隆兔抗 P2X3 血清	Ab10269	Abcam, Cambridge, MA, USA
多克隆山羊抗 5-HT 血清	20079	ImmunoStar, Houston, Texas, USA
Alexa488 结合的驴抗小鼠 IgG	A-21202	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa488 结合的山羊抗豚鼠 IgG	A-11073	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Alexa594 结合的山羊抗豚鼠 IgG	A-11076	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa594 结合的驴抗山羊 IgG	A-11058	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa647 结合的驴抗豚鼠 IgG	AP193SA6	Millipore, Billerica, MA, USA
Alexa647 结合的驴抗兔 IgG	A-31573	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa647 结合的驴抗小鼠 IgG	A-31571	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
生物素结合的驴抗豚鼠 IgG	AP193B	Millipore, Billerica, MA, USA
FITC 标记的 Avidin	A-2001	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2 方法

2.1 脑内核团立体定位注射

为确信 dmPFC-vIPAG 神经通路确实存在，分别将逆行示踪剂 FG 立体定位注射到 vIPAG，将顺行示踪剂 BDA 或 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC；为研究 vIPAG 的传出投射，分别将逆行示踪剂 FG 立体定位注射到 RVM 或脊髓背角。方法步骤均按照实验室既往的定位注射流程^[163]。

野生型的 C57BL/6J 小鼠经 7% 水合氯醛进行腹腔麻醉（4 mg/kg）后，备皮，稳固固定于立体定位注射仪（Narishige, 日本）上，确保两侧耳杆对称。在充分消毒后，切开颅顶皮肤将其向两侧掀开，充分暴露 Bregma 和 Lamda 点校正颅顶的平面。根据小鼠脑图谱定好坐标后，用牙科钻在颅骨上钻孔。将 0.04 ul 的 4% FG 用前端粘有玻璃电极的微量注射器（1 ul, Hamilton, NV, USA）立体定位注射到 vIPAG 内（坐标：bregma 后 4.8 mm，右侧偏 0.5 mm，深度为 2.8 mm），注射约 3 分钟，留针约 10 分钟。将 10% BDA 0.1 ul 或 0.3 ul 的 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 病毒立体定位注射到 dmPFC 内（坐标：bregma 前 2.5 mm，右侧偏 0.4 mm，深度为 2.5 mm）。将 0.04 ul 的 4% FG 立体定位注射到 RVM 内（坐标：bregma 后 5.9 mm，中线，深度为 5.7 mm）。将 0.1 ul 的 4% FG 立体定位注射到腰段的脊髓背角内。定位注射时，注射速度为 20 nl/min，留针 10 分钟。定位注射完成后，消毒并缝合颅顶和背部皮肤，待动物完全清醒后放回笼内继续饲养。

2.2 FG 逆标神经元的免疫荧光结合荧光原位分子杂交双重染色

2.2.1 组织准备

1) 灌注固定：待 FG 注射到小鼠的 vIPAG 或 RVM 一周后，用 100 mg/kg 的戊巴比妥溶液腹腔注射，使动物深度麻醉；用心脏灌注的方法，将动物的心脏完全暴露，将灌注的尖针插入动物的左心室，先用约 20 ml 的含 0.1% (v/v) DEPC 处理过的 0.01 M PBS (pH=7.4) 冲去体内血液，而后用含 4% (w/v) 多聚甲醛的 0.1 M PB 溶液 50 ml 进行灌注固定；

2) 取材、后固定、脱水：去除颅骨后将小鼠全脑完整取出，放入上述 4% 的多聚甲醛固定液中后固定，4℃ 后固定 72 小时，而后将脑组织浸泡于 DEPC 处理过的 30% 蔗糖溶液中，4℃ 至组织沉底；

3) 包埋切片：分别将含 dmPFC、vIPAG 或 RVM 的脑组织用 OCT (Tissue-Tek; Sakura; Torrance, CA, USA) 包埋后，用恒冷箱切片机 (Leica CM1850; Heidelberg, Germany) 冠状切片，切片厚度为 25 μm ，分别收入盛有 DEPC 处理过的 0.01 M PBS 中，漂洗 3 次后进行后续的荧光原位杂交和免疫荧光染色。(准备切片、切片和漂洗过程中注意空气、器械和孔板中的 RNA 酶对切片的污染)

2.2.2 荧光原位杂交组织化学染色

1) 处理切片：上述漂洗后的切片放入 2% 双氧水中处理 10 分钟后转入 0.1 M PB (DEPC 处理过) 室温漂洗 10 分钟，而后用含 0.3% Triton X-100 (v/v) 的 0.1 M PB (DEPC 处理过) 室温漂洗 20 分钟，再在乙酰化液 (含 0.25% 醋酸酐 (v/v) 的 0.1 M 的三乙醇胺) 中漂洗 10 分钟，最后 0.1 M PB (DEPC 处理过) 室温漂洗 2 次每次 10 分钟；

2) 预杂交：将已处理好的切片放入预杂交液中，杂交炉中 58℃ 孵育 1-1.5 小时，预杂交液配方如下 (每 1000 μl)：去离子甲酰胺 (Formamide)，500 μl ；20X 柠檬酸钠盐缓冲液 (SSC)，200 μl ；10% 封闭剂 (Blocking Reagent)，200 μl ；2% 月桂酰肉酸 (NLS)，50 μl ；10% SDS，10 μl ；

3) 杂交：在上述预杂交液中分别加入针对 VGLUT1 mRNA 或者 VGLUT2 mRNA 用地高辛标记的 cRNA 探针使其浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，再次将切片放回杂交炉中，58℃ 杂交 18-20 小时；

4) 杂交后漂洗：杂交完成后，切片转入含 50% Formamide 和 0.1% NLS 的 2X

SSC 溶液中 58 °C 漂洗 2 次每次 20 分钟，然后在含 20 µg/ml RNA 酶的 10 mM Tris-HCL (pH=8.0) 缓冲液中 37°C 孵育 30 分钟，再分别用 2X SSC 和 0.2X SSC 缓冲液 37 °C 漂洗 2 次每次 20 分钟；

5) 检测地高辛：切片经 TS7.5 (含 0.1 M Tris-HCL, pH=7.5 和 0.15 M NaCL) 室温漂洗 5 分钟，使用含 1% Blocking Reagent 的 TS 7.5 室温封闭 30 分钟后，加入过氧化物酶结合的抗地高辛抗体 (11-207-733-910, 1:2000, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 和单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200)，室温下孵育过夜，而后利用 TSA-Biotin 反应 (生物酰化酪胺-氧化酶复合物混合溶液) 对杂交信号进行放大处理，此过程中切片均用 TNT (TS 7.5+0.05% Tween20) 漂洗，最后分别用 FITC 结合的 Avidin (1:1000) 对杂交信号显色和 Alexa594 结合的山羊抗豚鼠 IgG (1:500) 显示 FG；

6) 裱片、封片：反应完毕，切片经 0.01 M PBS 漂洗后裱到干净的载玻片上，晾干后用含抗淬灭剂 (50% 甘油, v/v; 5% 三亚乙基二胺, w/v) 的封片剂封片，避光于 4°C 下保存。

2.3 免疫组织化学染色

2.3.1 组织准备

1) 灌注固定：待 FG 注射到 GRP-Cre/TdTomato 小鼠的 vIPAG 一周后，FG 注射到 C57 小鼠脊髓背角 10 天后，BDA 注射到 C57 小鼠的 dmPFC 两周后，AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC 四周且 FG 注射到 RVM 一周后，用 100 mg/kg 的戊巴比妥溶液腹腔注射，使动物深度麻醉；同上述，用心脏灌注的方法，将灌注的尖针插入动物的左心室，先用约 20 ml 的 0.01 M PBS 冲去体内血液，而后用含 4% 多聚甲醛的 0.1 M PB 溶液 50 ml 进行灌注固定；

2) 取材、后固定、脱水：去除颅骨后将小鼠全脑完整取出，放入上述 4% 的多聚甲醛固定液中后固定，4°C 后固定 6 小时，而后将脑组织浸泡于 30% 蔗糖溶液中，4°C 至组织沉底；

3) 包埋切片：分别将含 dmPFC、vIPAG 或 RVM 的脑组织用 OCT 包埋后，用恒冷箱切片机做冠状切片，片厚为 40 µm，放入 0.01 M PBS 中，漂洗 3 次后进行后续的组织化学染色。

2.3.2 DAB 染色

1) 封闭非特异性抗原: 将上述漂洗后的 FG 注射入 vIPAG 和 BDA 注射入 dmPFC 的含 dmPFC 和 vIPAG 的切片用含 10% 正常驴血清 (normal donkey serum, NDS) 的 0.01 M PBS (v/v) 室温下孵育封闭 30 分钟;

2) 孵育一抗: 将封闭后的切片直接放入用抗体稀释液 (5% NDS, v/v; 0.3% TritonX-100, v/v; 0.25% 角叉菜胶, w/v; 0.05% 叠氮钠, w/v) 稀释的单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200) 中, 室温下孵育过夜;

3) 孵育二抗: 孵育完一抗的切片用 0.01 M PBS 漂洗 (3 次, 10 分钟/次) 后, 移入用抗体稀释液稀释的生物素结合的驴抗豚鼠 IgG (1:500), 室温下孵育 5 小时;

4) A、B 液孵育: 将 A 液 (1:200, Vector Laboratories) 和 B 液 (1:200, Vector Laboratories) 提前 30 分钟用 0.01 M PBS 稀释、混合, 将上述切片用 0.01 M PBS 漂洗后移入 A、B 混合液中; 注射 BDA 的切片经过封闭非特异性抗原后直接置入 A、B 混合液中, 室温下孵育 3 小时

5) DAB 反应: 切片漂洗后, 进行 DAB 反应, 每 5 ml 的 Tris-HCL (pH=7.6) 溶解 1 mg 的 DAB (1102, Sigma) 并加入 10 μ l 的 0.3% 双氧水, 边反应边观察, 至阳性结果显示完成后, 终止反应;

6) 裱片、脱水透明及封片: 反应完的切片经漂洗后, 裱于挂过明胶的载玻片上, 晾干后依次经过 70%、80%、90%、95%、100%、100% 的梯度酒精脱水和二甲苯透明, 最后中性树胶封片, 待晾干后观察。

2.3.3 免疫荧光组织化学染色

1) 封闭非特异性抗原: 将上述漂洗后的 FG 注射到 vIPAG (C57 小鼠和 GRP-Cre/TdTomato 小鼠), FG 注射到脊髓背角和 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC 且 FG 注射到 RVM 的切片用含 10% NDS 的 0.01 M PBS 室温下孵育封闭 30 分钟;

2) 孵育一抗: 将封闭后的切片直接放入用抗体稀释液稀释的一抗混合液中: 单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200); 单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200) / 单克隆小鼠抗 NeuN 血清 (1:500); 单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200) / 多克隆兔抗 CaMKII 血清 (1:200); 单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200) / 单克隆小鼠抗 GAD67 血清 (1:500); 单克隆豚鼠抗 FG 血清 (1:200) / 多克隆兔抗 P2X3 血清 (1:1,000); 多克隆兔抗 FG 血清 (1:200)

/多克隆山羊抗 5-HT 血清 (1:500) /多克隆豚鼠抗 VGLUT2 血清 (1:1,000); 室温下孵育过夜;

3) 孵育二抗: 孵育完一抗的切片用 0.01 M PBS 漂洗后, 移入用上述抗体稀释液稀释的一抗混合液中: Alexa647 结合的驴抗豚鼠 IgG (1:500); Alexa488 结合的驴抗小鼠 IgG (1:500) / Alexa594 结合的山羊抗豚鼠 IgG (1:500); Alexa488 结合的驴抗兔 IgG (1:500) / Alexa594 结合的山羊抗豚鼠 IgG (1:500); Alexa488 结合的驴抗小鼠 IgG (1:500) / Alexa647 结合的驴抗豚鼠 IgG (1:500); Alexa594 结合的驴抗兔 IgG (1:500) / Alexa647 结合的驴抗豚鼠 IgG (1:500); 生物素结合的驴抗豚鼠 IgG (1:500) / Alexa594 结合的驴抗山羊 IgG (1:500) / Alexa647 结合的驴抗兔 IgG (1:500); 室温下孵育 5 小时;

4) 孵育 FITC 结合的 avidin: 最后一组切片用 0.01 M PBS 漂洗后, 加入用 0.01 M PBS 稀释的 FITC 结合的 avidin (1:1,000), 室温下孵育 2 小时;

5) 裱片、封片: 步骤 3) 和步骤 4) 中的切片用 0.01 M PBS 漂洗后, 在避光环境下裱到干净的载玻片上, 晾干后用上述的含抗淬灭剂的荧光封片剂封片, 4℃避光保存。

2.4 狂犬病毒跨单级突触标记系统

狂犬病毒 (Rabies Virus, RV) 属于弹状病毒科中的狂犬病毒属。野生型 RV 具有逆行跨越突触传播的特点, 可以用于灵长类及啮齿类动物神经解剖学的研究。利用 RV 做逆行示踪工具病毒具有独特的优势, 除了可跨突触传播外, RV 感染神经系统后, 主要标记神经元, 而对胶质细胞几乎不进行标记, 且不感染没有突触连接的过路神经纤维; 经过感染性克隆构建的缺陷性重组 RV 具有较高的安全性, 感染后对神经元的毒性较低, 被感染的神经元几乎不会发生明显的病变和裂解, 可清晰的标记神经元的精细形态。

正常情况下注射 RV 后, 随着时间的推移理论上可以逆行跨越无数级的突触, 这样反而会干扰我们对神经通路联系观察。在 RV 中, 其囊膜糖蛋白 (Glycoprotein, G) 是负责逆行跨突触的必需蛋白。若 G 蛋白缺失, RV-ΔG 便会丧失跨突触的能力, 只能停留在本级神经元中, 但是其基因组的复制和转录却不会受到影响 (可持续可丰度的表达)。此时若在被 RV-ΔG 感染的本级神经元中给予外源性的 G 蛋白, RV-ΔG

便可和 G 蛋白组装成完整的 RV 具有逆行跨突触的能力从而感染上一级的神经元。但是在上一级的神经元中并未给予 G 蛋白，则跨越一级突触后的 RV- Δ G 因缺少跨突触的能力停留在上一级的神经元中不能继续跨突触传播，从而可以实现可控的跨单级突触标记神经通路和环路。为了能够实现 G 蛋白和 RV- Δ G 在同一神经元中的共表达，还需借助禽类肉瘤病毒的外膜蛋白 EnvA 和其同源的特异性受体 TVA 来介导病毒特异性的感染细胞。因 TVA 只存在于禽类细胞中，在啮齿类动物的神经元中并无表达，故不会发生非特异性的感染细胞的情况。利用 EnvA 膜外区与 RV 的 G 蛋白跨膜及胞内区融合得到重组囊膜蛋白包装缺陷型的 RV-EnvA- Δ G，其需要借助 TVA 的表达才可感染神经元，需要借助 G 蛋白的补偿才可实现跨突触。结合特异的表达 Cre 重组酶的转基因动物品系及 Cre-LoxP 系统，可以将 TVA 及 G 蛋白在指定核团特异性地神经元中实现表达，最后利用 RV-EnvA- Δ G 实现对特异类型神经元的逆行跨单级突触标记。同时，还可借助荧光蛋白的标记对本级神经元和上一级神经元的分别显示。

按照上述的脑内核团立体定位注射的方法将动物用 7%水合氯醛 4 mg/kg，腹膜腔麻醉后，备皮固定于立体定位仪上。消毒后，切开颅顶的皮肤，充分暴露 Bregma 点和 Lamada 点后调整使这两点在同一高度和矢状面上。根据小鼠脑图谱的坐标选择位置，坐标同前面所述：分别在 PV-Cre 的小鼠中注射到 dmPFC 内，VGLUT2-Cre 小鼠注射到 vIPAG 内，Sert-Cre 小鼠注射到 RVM 内。钻孔后用前端为玻璃电极的微量注射器（1 μ l, Hamilton）将 AAV2/9-DIO-GFP-TVA（AAV-903, 滴度, 3×10^{12} μ g/ml, 武汉枢密脑科学技术有限公司，中国，武汉）和 AAV2/9-DIO-G（AAV-902, 滴度, 4×10^{12} μ g/ml, 武汉枢密脑科学技术有限公司）按照 1:2 的体积比进行混合，注射 300 nl 的混合病毒，注射速度为 20 nl/min，留针约 10 分钟，消毒，缝合待动物清醒饲养于笼内。待病毒注射 4 周充分表达后即在同一区域内立体定位注射 RV-EnvA- Δ G-dsRed（RV-306, 滴度, 3×10^8 IFU/ml, 武汉枢密脑科学技术有限公司），RV-EnvA- Δ G-dsRed 注射一周后将动物灌注。

2.4 染色切片观察和图像采集

注射 FG 动物的切片、注射 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 动物的切片和注射狂犬三联病毒动物的切片在避光的环境下裱于载玻片上，用封片剂封片后，可直接用荧光显

显微镜 (Olympus BX-60; Tokyo, Japan) 观察 FG 和病毒的注射区和投射区 (分别用紫外光观察 FG, 蓝色荧光观察 AAV 病毒的感染情况和绿色荧光观察狂犬病毒的感染情况)。并用 CCD 摄像系统直接拍照采集图像, 存储为 TIFF 格式。荧光原位杂交和免疫荧光组织化学染色的切片用激光共聚焦显微镜 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) 观察并拍照采集图像。不同的荧光蛋白或抗体选择合适的激发波长和发射波长: Alexa488、EYFP 和 FITC 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 520 nm; Alexa594、dsRed 和 TdTomato 的激发波长为 594 nm, 发射波长为 618 nm; Alexa647 的激发波长为 647 nm, 发射波长为 666 nm。采用共聚焦显微镜自带的图像软件 (FV10-ASW 1.7; Olympus) 采集图像, 并存储为 OIB 格式, 用软件将图片的明暗度和对比度调好后输出为 TIFF 格式。对于 DAB 染色的切片用明视野显微镜 (AHBT3, Olympus) 进行观察并采集图像。

2.5 结果统计和分析

参照小鼠脑图谱 (George Paxinos 和 Keith B. J. Franklin 主编, 第 2 版), 对 dmPFC 和 vIPAG 进行边界和亚区的划分。为了能够更加准确的计数, 只有染色清晰、看清轮廓的神经元才会被选择计数, 分别计数各自免疫阳性的细胞数目和双标染色的神经元数, 统计时用平均值 \pm 标准误来标示。

3 结果

3.1 dmPFC-vIPAG 神经通路的形态学证实

3.1.1 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的分布和化学性质

为了证实 dmPFC 向 vIPAG 的投射, 首先运用逆行示踪的方法将逆行示踪剂 FG 立体定位注射到 vIPAG 内, 观察 dmPFC 内 FG 逆行标记的投射神经元的分布和神经化学性质。

为了更清楚的显示 FG 的标记, 对 FG 进行了免疫组织化学染色并且用 DAB 反应呈色的方法显示。在中脑的切片中, FG 的注射区包括了 vIPAG 和一小部分其外侧的区域 (图 1-1 A), 在前脑的切片上可以观察到多个神经核团内含有向 vIPAG 投射的 FG 逆行标记的神经元, 以同侧分布为主, 对侧也可见。FG 逆行标记的投射神经元主要分布在 dmPFC (包括 rACC 和 PL), IL, ACC 和岛叶 (图 1-1 B、C)。从高

倍镜图像中可观察到 FG 免疫阳性的投射神经元形态均为锥体形, 多分布于皮质的深层 (图 1-1 D)。

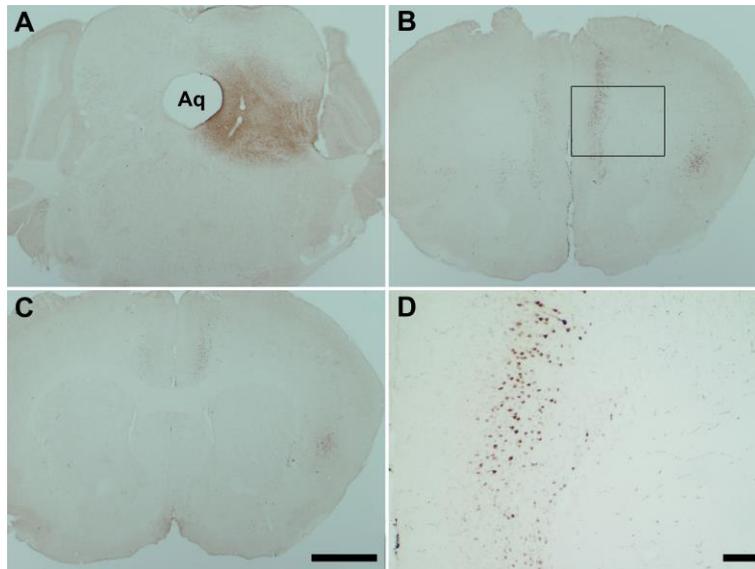


图 1-1 逆行示踪方法显示 dmPFC 向 vIPAG 的投射情况

图 A-D 为在中脑和前脑切片中对 FG 的 DAB 染色结果观察, 图 A 为 FG 立体定位注射到 vIPAG 后的注射区, 图 B、C 分别为 dmPFC 平面和 ACC 平面 FG 标记的投射神经元在不同核团内的分布, 图 D 显示图 B 内黑色方框内区域的放大图像。Aq, aqueduct, 导水管。Scale bars=300 μm (图 C 内 bar 适用于图 A-B, 图 D)

为进一步观察和确认在 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的分布位置和特点, 我们做了 FG 和神经元标志物 NeuN 的免疫荧光双标染色 (图 1-2)。观察到 dmPFC 内向 vIPAG 投射的神经元主要分布于皮质的 V 层和 VI 层, 以 V 层为主, 在 II 层、III 层内几乎观察不到 FG 免疫阳性神经元的分布。这一结果也与皮质内 V、VI 层锥体神经元为传出神经元相契合。

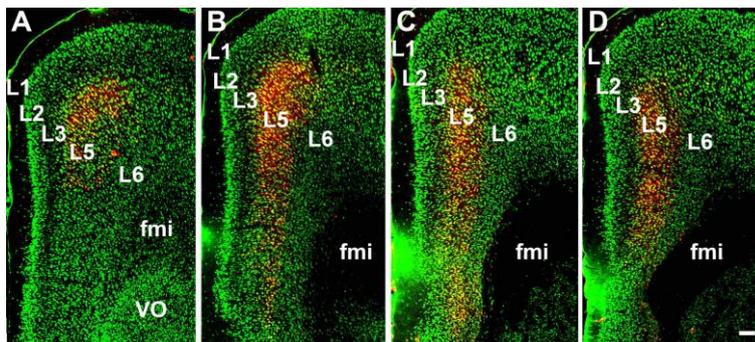


图 1-2 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的分布位置特点

图 A-D 显示的为不同的 dmPFC 平面内 FG 定位注射到 vIPAG 后逆行标记的 FG (红色) 和 NeuN (绿色) 免疫荧光双标情况。L1-L6 所标记的纵行条层分别为 dmPFC 内的 I-VI 层皮质; fmi, forceps minor of the corpus callosum, 胼胝体的小钳; VO, ventral orbital cortex, 腹侧眶皮层。Scale bars=100 μm (图 A-D)

上述实验中我们观察到向 vIPAG 投射的神经元形态为锥体形, 提示为兴奋性的锥体神经元。为了验证该结果, 我们进一步检测了 FG 逆行标记投射神经元的神经化学性质。通过免疫荧光双标染色观察到, 所有 FG 免疫阳性的投射神经元均可表达皮层内兴奋性神经元的标志物 CaMKII (图 1-3 A-C), 证实了 dmPFC 内向 vIPAG 投射的神经元都为兴奋性锥体神经元。通过免疫荧光原位杂交结合荧光组织化学双标染色的方法, 进一步观察到皮层内有大量的 VGLUT1 mRNA 阳性神经元且 dmPFC 内向 vIPAG 投射的神经元全部为 FG/VGLUT1 mRNA 双标神经元 (图 1-3 D-F), 而含有 VGLUT2 mRNA 的神经元分布稀疏, 并未观到 FG 免疫阳性的投射神经元表达 VGLUT2 mRNA (图 1-3 G-I)。这些结果显示从 dmPFC 向 vIPAG 投射的神经元均为兴奋性的锥体神经元, 以谷氨酸为神经递质且都表达 VGLUT1, 而不表达 VGLUT2。

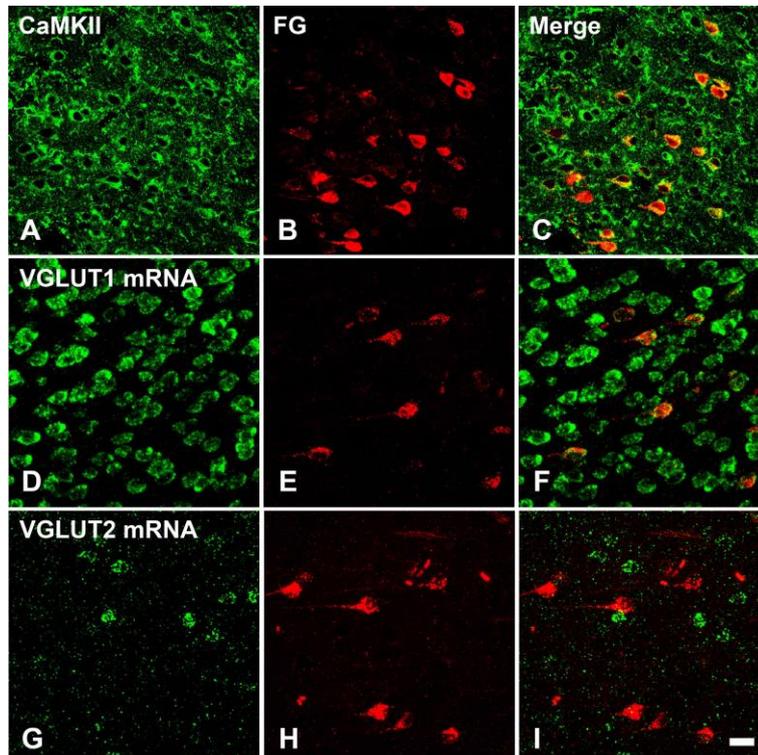


图 1-3 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元所含的神经递质

图 A-C 显示为逆行标记 dmPFC-vIPAG 投射神经元的 FG (红色) 和兴奋性神经元的标志物 CaMKII (绿色) 免疫荧光双标情况。图 D-F 显示为逆行标记 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的 FG (红色) 与 VGLUT1 mRNA (绿色) 荧光原位杂交染色双标情况。图 G-H 显示为逆行标记 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的 FG (红色) 与 VGLUT2 mRNA (绿色) 荧光原位杂交染色双标情况。Scale bars=20 μm (图 A-I)

为了进一步明确 FG 逆行标记投射神经元的神经化学性质, 与抑制性神经元的标志物 GAD67 进行免疫荧光双标染色, 结果显示 dmPFC 内未观察到 FG/GAD67 双标神经元 (图 1-4 A-C); 在 GRP-Cre/TdTomato 小鼠中, Tomato 代表了 GRP 阳性神经元的分布, 少量 FG 免疫阳性的投射神经元可以表达 Tomato (图 1-4 D-F); 同时超过 90% 的下行投射神经元还可表达 ATP 的受体 P2X3 受体 (图 1-4 G-I)。这些结果更加证实了从 dmPFC 向 vIPAG 投射的神经元为兴奋性锥体神经元, 部分神经元可同时表达 GRP 或 P2X3 受体。

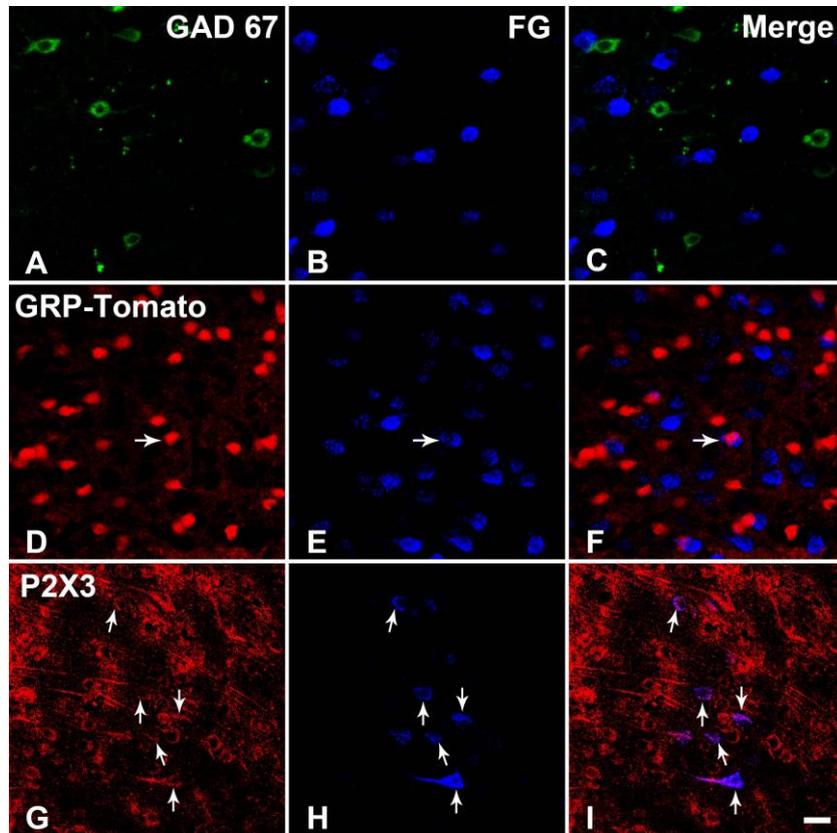


图 1-4 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的神经化学性质

图 A-C 显示为逆行标记 dmPFC-vIPAG 投射神经元的 FG (红色) 和抑制性神经元的标志物 GAD67 (绿色) 免疫荧光双标情况。图 D-F 显示为 GRP-Cre/TdTomato 小鼠中, 逆行标记 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的 FG (蓝色) 和 Tomato (红色) 免疫荧光双标情况。图 G-H 显示为逆行标记 dmPFC 内向 vIPAG 投射神经元的 FG (蓝色) 和 P2X3 受体 (红色) 免疫荧光双标情况。图中箭所指的神经元为双标神经元。Scale bars=20 μm (图 A-I)

3.1.2 vIPAG 内从 dmPFC 投射来的神经纤维的分布

与上述的逆行束路追踪研究相对应, 我们将顺行束路追踪剂 BDA 注射到 dmPFC 内, 在 vIPAG 内观察下行投射神经纤维的分布。图 1-5 A 所示为 BDA 注射到 dmPFC 内的 DAB 染色结果, 可观察到注射区域主要位于 mPFC 的背侧部, 很少扩散到腹侧部。在中脑平面, IPAG 和 vIPAG 内可见大量 BDA 标记的神经纤维 (图 1-5 B), 在高倍镜下可见纤维中的膨体样结构 (图 1-5 C、D), 提示 dmPFC 内的神经元可以下行投射到 vIPAG。

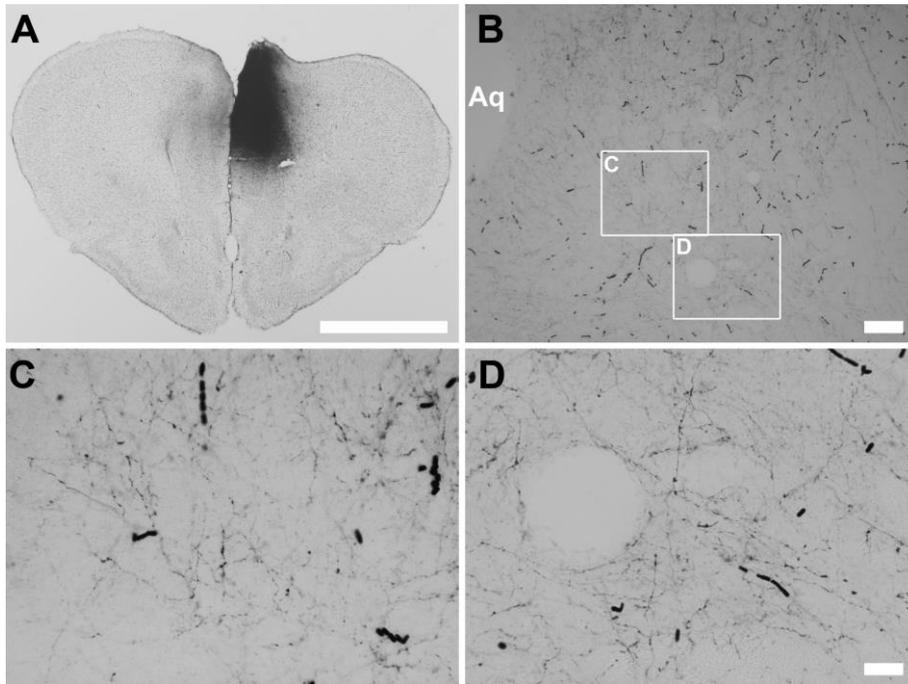


图 1-5 BDA 注射到 dmPFC 的注射区和 vIPAG 内的投射纤维

图 A-D 为 DAB 染色显示 BDA 的注射区及 PAG 内 BDA 顺行标记的神经纤维。图 A 为 BDA 压力注射到 dmPFC 后的注射区, 图 B 为 IPAG 和 vIPAG 内 BDA 标记纤维的低倍镜图, 图 C、D 为选取的图 B 内区域的放大图像。Aq, 导水管。Scale bars=500 μm (图 A), 100 μm (图 B), 25 μm

(图 C、D)。

为了进一步确实顺行示踪的结果，我们借助腺相关病毒优越的感染标记效果，将 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC 内。该病毒可以特异性的感染皮层内的兴奋性锥体神经元。在低倍镜下，可观察到 AAV 病毒对 dmPFC 的感染，并且在其对侧的 dmPFC 和同侧的纹状体内可观察到病毒感染纤维的分布（图 1-6 A、B），在高倍镜下可见注射区内有大量的被感染神经元，可观察到长长的顶树突，提示感染的细胞为锥体神经元。

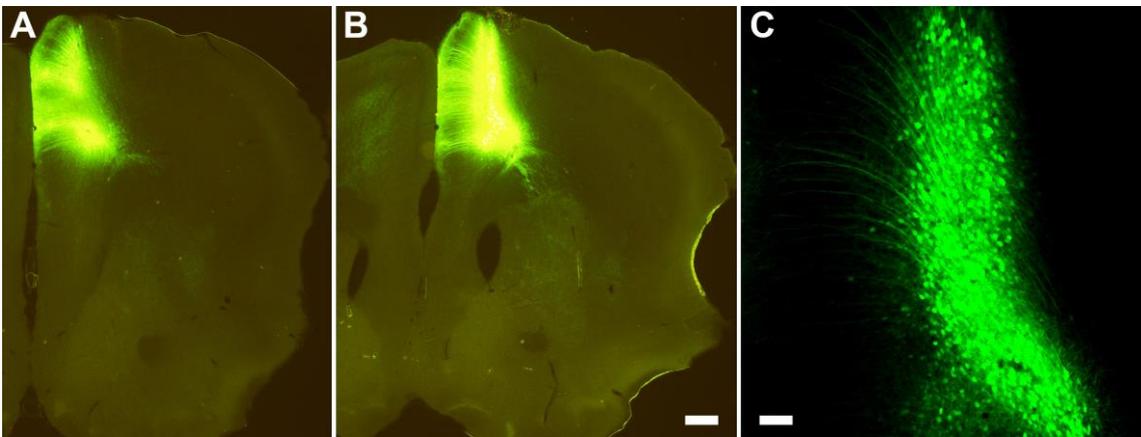


图 1-6 AAV 病毒注射到 dmPFC 的注射感染区

图 A-C 为将 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC 后的注射区图，图 A 和 B 分别为 AAV 病毒注射到不同平面的 dmPFC 内后的注射感染区，图 C 为图 B 内注射感染区域的放大图像。Scale bars=100 μ m (图 A 和 B)，50 μ m (图 C)。

因病毒所携带的 EYFP，我们无需做进一步的染色可直接在共聚焦显微镜下观察病毒感染的神经纤维在 PAG 内的分布。分别从吻侧到尾侧选取 6 个 PAG 不同的平面进行观察，可见 AAV 病毒感染的神经元纤维分布于吻尾方向上的所有 PAG 平面，但纤维在同侧的 vlPAG、lPAG 和 dmPAG 内分布更加密集，在对侧区域内也可见（图 1-7）。同时，在 PAG 的外侧区域及中缝背核（dorsal raphe nucleus, DR）内也可观察到神经纤维的分布（图 1-7 C-E）。

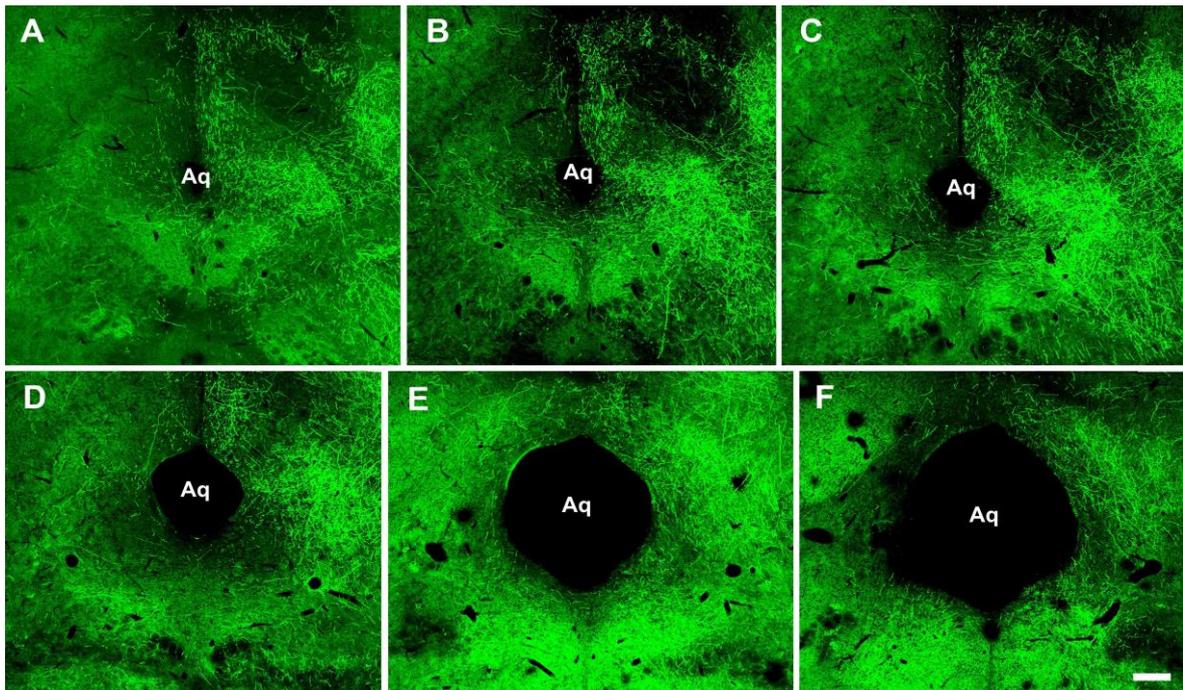


图 1-7 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 病毒注射到 dmPFC 内感染锥体神经元后在 PAG 内 EYFP 标记神经纤维的分布

图 A-F 为从吻侧到尾侧 6 个不同的 PAG 平面内病毒感染的神经纤维的分布，各个平面上均可观察到 PAG 内密集的神经纤维分布。Aq, 导水管。Scale bar=200 μ m (图 F, 适用 A-E)。

通过传统示踪剂 BDA 的顺行束路追踪和 AAV 病毒感染的结果，可以明确 vIPAG 内确实可以接受 dmPFC 内锥体神经元投射来的神经纤维。结合前面 FG 的逆行标记结果，dmPFC 到 vIPAG 间确实有一直接神经通路的存在，即 dmPFC 内的兴奋性锥体神经元可发出神经纤维投射到 vIPAG 内调控其功能。以往研究报道 vIPAG 内含有大量的 VGLUT2 阳性神经元，且 VGLUT2 阳性神经元在下行疼痛调控中发挥着非常重要的作用^[126,140]。因此，为了进一步排除 dmPFC 向 vIPAG 投射为过路纤维的可能性并且证明 dmPFC 内的兴奋性神经纤维可以直接支配 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元，我们接下来运用狂犬病毒逆行跨单级突触标记系统和 VGLUT2-Cre 小鼠进行检测。

3.1.3 dmPFC 投射到 vIPAG 内的神经纤维和其内的 VGLUT2 神经元形成直接突触

结合狂犬病毒跨单级突触标记系统的原理（工作的模式见图 1-8），我们分别将辅助病毒（包括 AAV2/9-DIO-GFP-TVA 和 AAV2/9-DIO-G，用 GFP 进行显示）和 RV- Δ G (RV-EnvA- Δ G-dsRed, 用 dsRed 进行显示) 相隔 4 周分 2 次注射到 VGLUT2-Cre 小鼠的 vIPAG 内（前后 2 次注射保持相同的坐标）。注射 RV-EnvA- Δ G-dsRed 一周后将小鼠进行灌注固定。

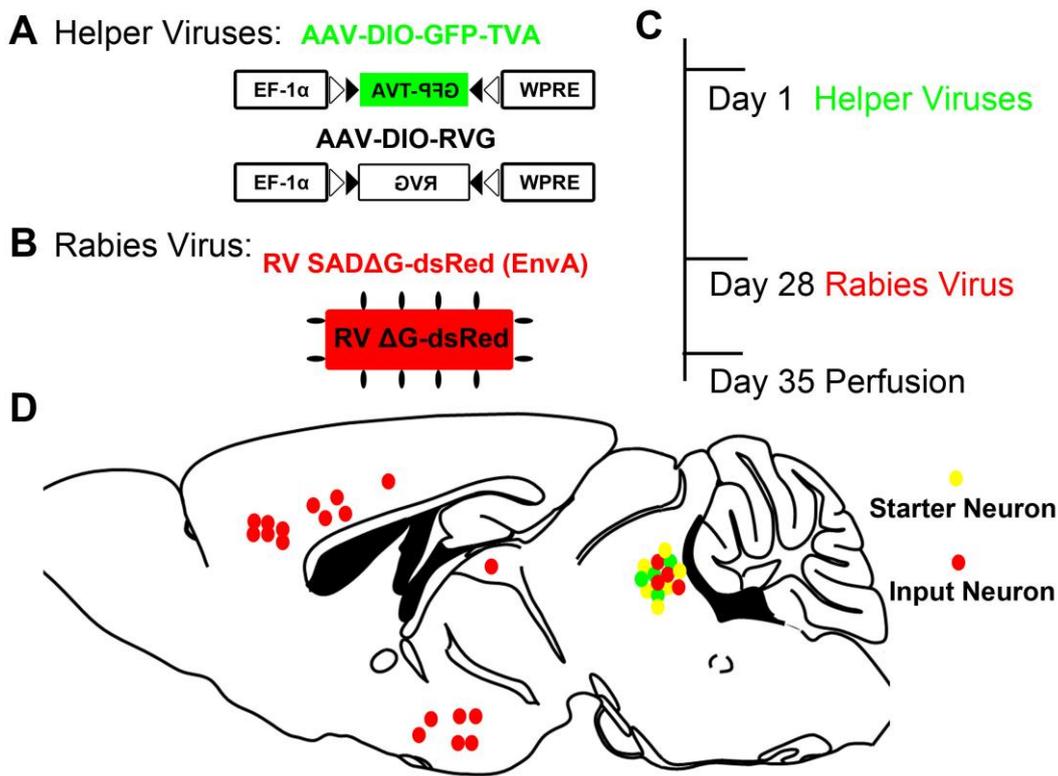


图 1-8 狂犬病毒跨单级突触标记系统的原理模式图

图 A 显示的为两种辅助病毒 AAV-DIO-GFP-TVA 和 AAV-DIO-G 的构成模式图，图 B 显示的为重组狂犬病毒 RV-EnvA- Δ G-dsRed 的构成模式图，图 C 显示的为分别注射辅助病毒、重组狂犬病毒及灌注的时间节点，图 D 显示的为全脑矢状切面上起始神经元（黄色，红绿双标）和投射神经元（红色）的分布示例。

在 VGLUT2-Cre 小鼠的中脑内，GFP 标记的为辅助病毒感染的 VGLUT2 阳性神经元，在 vIPAG 内 dsRed 标记的为 RV- Δ G 感染的神经元，包括辅助病毒感染的 VGLUT2 阳性神经元和可向其投射形成突触的局部中间神经元，故在 vIPAG 内 GFP

(绿色) 和 dsRed (红色) 双标的 (黄色) 神经元为表达 VGLUT2 的起始神经元。在 vIPAG 区域内可见大量的 GFP 单独标记、dsRed 单独标记和两者双标的神经元(图 1-9 A-C)。在高倍镜下可更清楚的观察 GFP 和 dsRed 的双标情况, 可见 vIPAG 和 DR 内有大量 dsRed 单标神经元的分布, 提示在其中存在局部调控的微环路, VGLUT2 阳性神经元受中间神经元的调控 (图 1-9 D-F)。

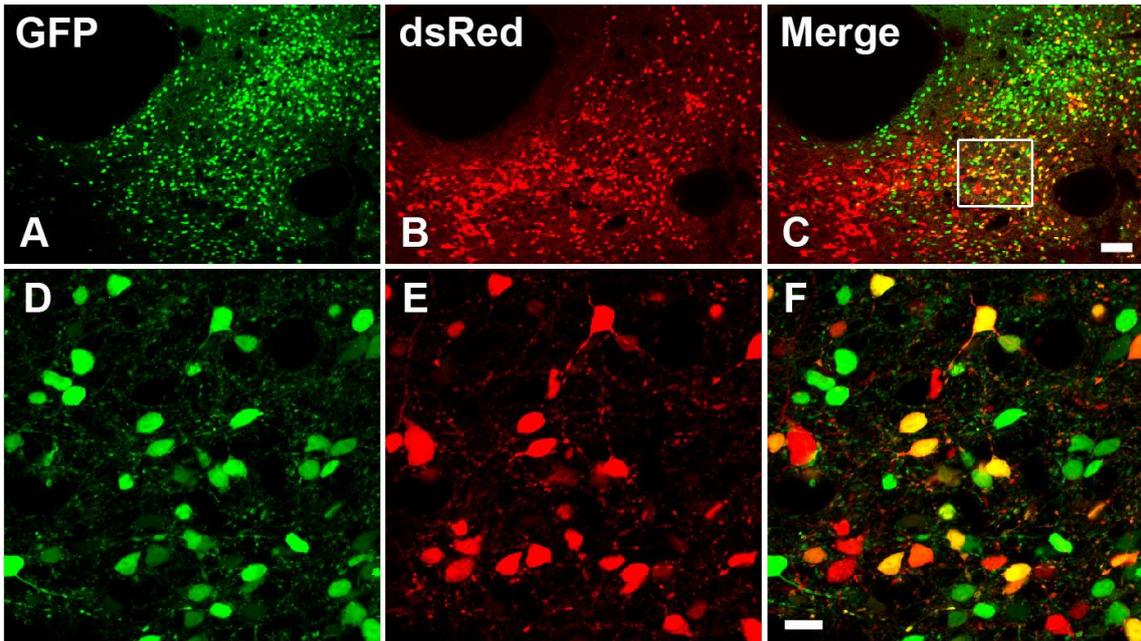


图 1-9 狂犬病毒辅助病毒和 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒注射到 VGLUT2-Cre 小鼠 vIPAG 内感染神经元后的分布

图 A-C 显示的为 GFP 标记的辅助病毒感染的神经元 (绿色)、dsRed 标记的 RV- Δ G 病毒感染的神经元 (红色) 及起始神经元 (黄色) 在注射区域 vIPAG 内的分布, 图 D-F 显示的图 C 内方形区域放大后的图像。Scale bars=100 μ m (图 C, 适用 A、B), 20 μ m (图 F, 适用 D、E)。

在前脑的切片中, 不需要进行染色直接观察 dsRed 阳性神经元的分布。可在 dmPFC、ACC 和 IC 内观察到 dsRed 跨单级突触标记的投射神经元的分布 (图 1-10 A 和 C), 高倍镜下可见神经元形态为发出顶树突的锥体形, 排列规则, 位于皮质的深层 (图 1-10 B 和 D)。这说明 dmPFC 内确实有神经元可以投射到 vIPAG 内且与 VGLUT2 阳性的神经元形成直接突触联系, 参与调控此类神经元的功能。

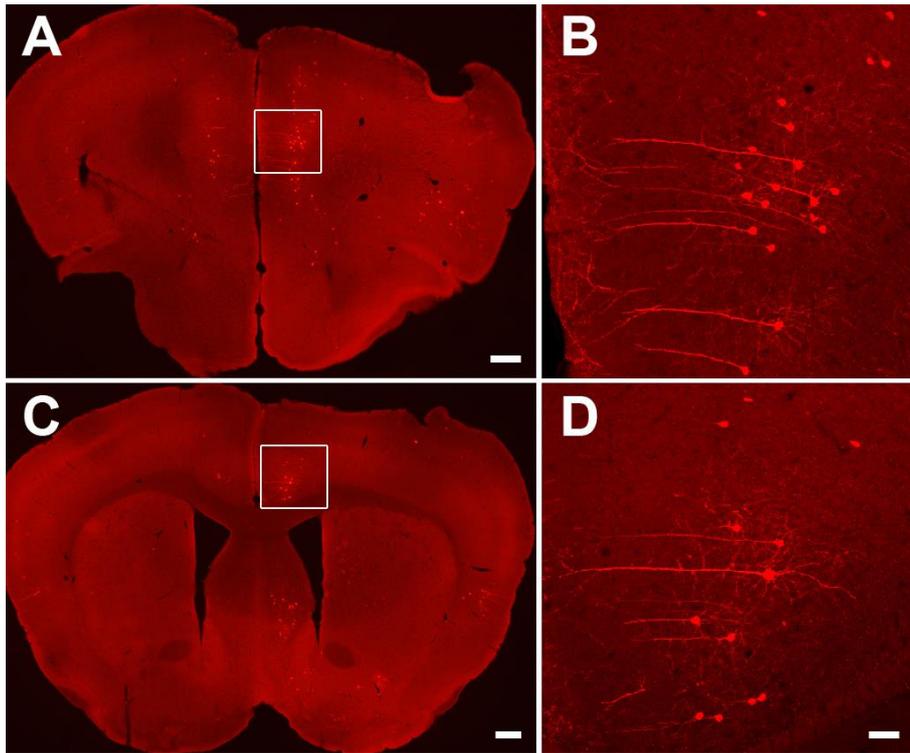


图 1-10 dsRed 标记的投射神经元在 dmPFC 内的分布

图 A 和 C 为狂犬病毒三联病毒逆行跨单级突触方法显示与 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元形成突触联系的投射神经元 (dsRed 标记, 红色) 在 dmPFC 和 ACC 内的分布, 图 B 和 D 显示的为图 A 和 C 内方框区域的放大图像。Scale bars=200 μm (图 A 和 C), 50 μm (图 D, 适用图 B)。

综合 FG 逆行标记、BDA 和 AAV 顺行标记及狂犬病毒逆行跨单级突触标记技术所得到的结果, 我们可以如下结论: dmPFC 可直接投射到 vIPAG, dmPFC-vIPAG 神经通路是以谷氨酸为主要神经递质, 可兴奋性的支配和调控 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元的功能和活动。为了进一步地阐明 dmPFC-vIPAG 神经通路在疼痛调控中的作用, 还需要明确其接受哪些神经核团的神经传入投射。

3.2 dmPFC 内 PV 阳性神经元的传入投射

鉴于 dmPFC 内传入神经的投射特点和抑制性神经元在其中发挥的重要作用, 为了更加特异的了解 dmPFC 内抑制性神经元的神经传入, 我们利用狂犬病毒跨单级突触标记系统的方法, 分别将辅助病毒和 RV-EnvA- Δ G-dsRed 注射到 PV-Cre 小鼠的 dmPFC 内, 在全脑内普查寻找含有投射神经元的核团 (工作的模式见图 1-8)。

同上述, 在 PV-Cre 的小鼠中, GFP 标记的为辅助病毒感染的 PV 阳性神经元,

在 dmPFC 内 dsRed 标记的为 RV-EnvA- Δ G-dsRed 感染的神经元,包括辅助病毒感染的 PV 阳性神经元和可向其投射形成突触的神经元,故在 dmPFC 内 GFP (绿色)和 dsRed (红色)双标的(黄色)神经元为表达 PV 的起始神经元。在 dmPFC 区域内可见大量 GFP 单独标记、dsRed 单独标记和双标的神经元(图 1-11 A-C)。在高倍镜下可更清楚的观察 GFP 和 dsRed 的双标情况,可见 dmPFC、IL、ACC 和 IC 内有許多 dsRed 单标神经元的分布,提示在其中存在向 dmPFC 投射的神经元,可与 dmPFC 内 PV 阳性的神经元形成直接的突触联系,从而调控 PV 阳性神经元的活动(图 1-11 D-F)。

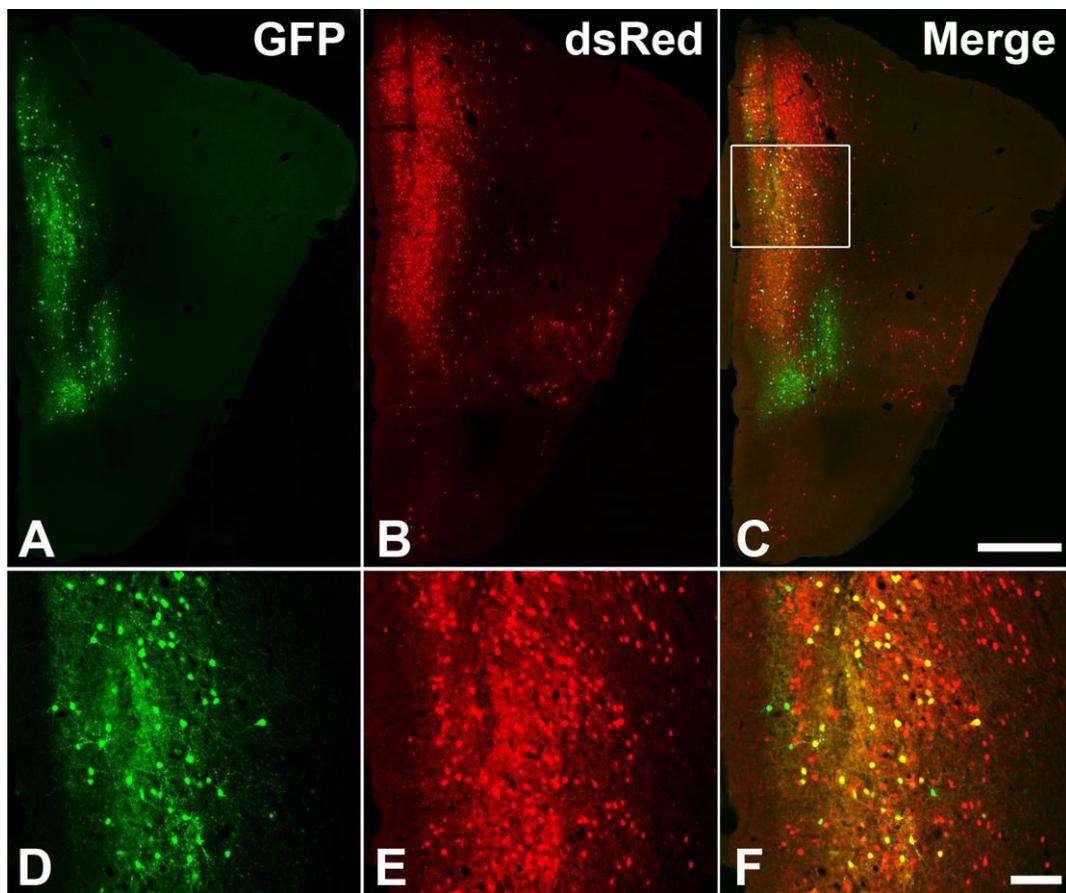


图 1-11 狂犬病毒辅助病毒和 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒注射到 PV-Cre 小鼠 dmPFC 内感染神经元后的分布

图 A-C 显示的为 GFP 标记的辅助病毒感染的神经元(绿色)、dsRed 标记的 RV- Δ G 病毒感染的神经元(红色)及起始神经元(黄色)在 PV-Cre 小鼠注射区域 dmPFC 内的分布,图 D-F 显示的图 C 内方形区域放大后的图像。Scale bars=500 μ m (图 C, 适用 A、B), 100 μ m (图 F, 适用 D、E)。

在全脑的切片中，不需要进行染色直接在显微镜下观察 dsRed 阳性神经元的分布。图 1-12 中所显示的为脑内从 Bregma +1.98 mm 到 Bregma -0.46 mm 的不同平面内 dsRed 跨单级突触标记的投射神经元的分布。可观察到在 dmPFC、IL、腹内侧眶皮质（ventromedial orbital cortex, VMO）、IC、屏状核（claustrum, CLA）、终纹床核（bed nucleus of stria terminalis, BNST）及丘脑室周核前部（paraventricular nucleus of thalamus anterior part, PVA）内有大量的投射神经元的分布。

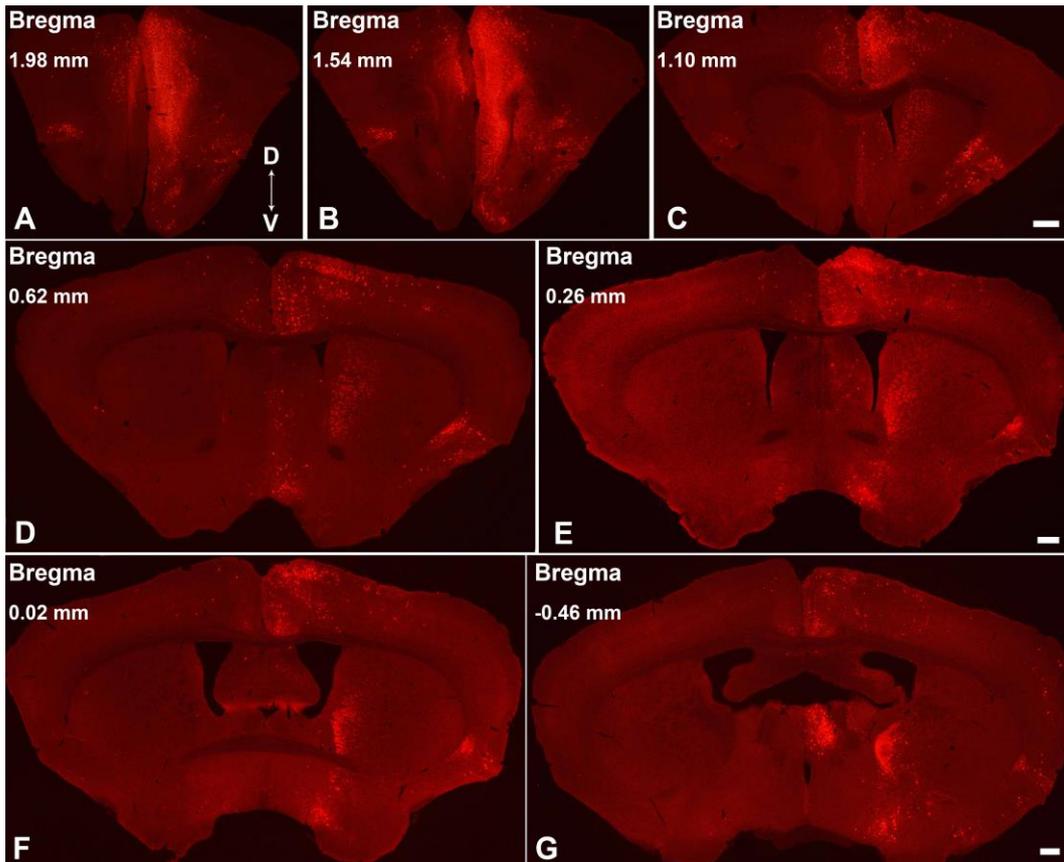


图 1-12 dsRed 跨单级突触标记的向 dmPFC 内 PV 阳性神经元投射的神经元分布

图 A-G 显示的为向 PV-Cre 小鼠中 dmPFC 内注射三联病毒后，dsRed 跨单级突触标记的 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒感染的投射神经元（红色）在前脑各个平面内的分布图。Scale bars=100 μ m (图 C, 适用 A、B), 100 μ m (图 E, 适用 D), 100 μ m (图 G, 适用 F)。

图 1-13 中所显示的为脑内从 Bregma -0.94 mm 到 Bregma -6.24 mm 的不同平面内 dsRed 跨单级突触标记的投射神经元的分布。可观察到在丘脑室周核后部（paraventricular nucleus of thalamus posterior part, PVP）、丘脑内侧背核（mediodorsal nucleus of thalamus, MD）、丘脑带旁核（paratenial nucleus of thalamus, PT）、丘脑中

央外侧核 (centrolateral nucleus of thalamus, CL)、丘脑菱形核 (rhomboid nucleus of thalamus, Rh)、丘脑 reuniens 核 (reuniens nucleus of thalamus, Re)、杏仁核基底外侧部 (basolateral nucleus of the amygdala, BLA) 及海马尾部有密集神经元的分布, 尤以丘脑内核团, BLA 和海马内分布集中。

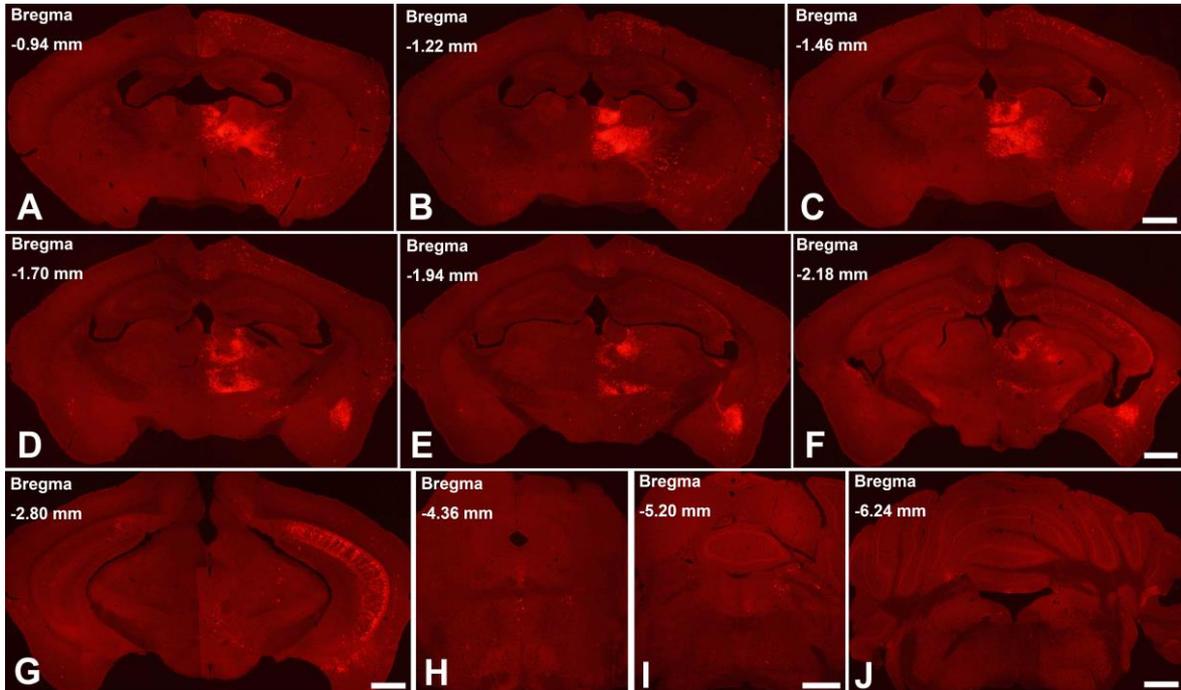


图 1-13 dsRed 跨单级突触标记的向 dmPFC 内 PV 阳性神经元投射的神经元分布 (续)

图 A-J 显示的为向 PV-Cre 小鼠中 dmPFC 内注射三联病毒后, dsRed 跨单级突触标记的 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒感染的投射神经元 (红色) 在前脑、中脑及脑干各个平面内的分布图。Scale bars=200 μ m (图 C, 适用 A、B), 200 μ m (图 F, 适用 D、E), 200 μ m (图 G), 200 μ m (图 I, 适用 H), 200 μ m (图 J)。

为了进一步的明确投射神经元的分布位置和形态, 图 1-14 集中展示了在图 1-12 和 1-13 中观察到的神经元分布集中的核团的高倍镜图像。可见神经元主要分布于与疼痛传递密切相关的皮层结构如: PFC、ACC 和 IC, 丘脑内的一系列核团如: PVA、PVP、CL 和 MD 等以及 BLA。

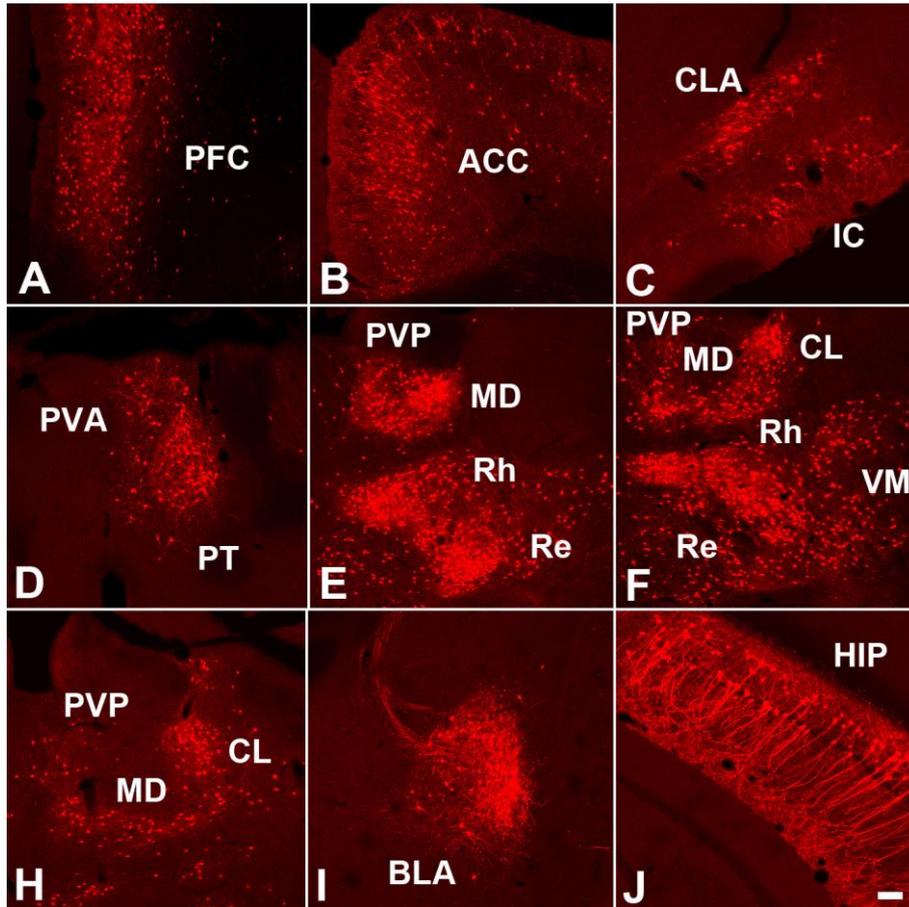


图 1-14 dsRed 跨单级突触标记的向 dmPFC 内 PV 阳性神经元投射的神经元分布 (续)

图 A-J 显示的为向 PV-Cre 小鼠中 dmPFC 内注射三联病毒后, dsRed 跨单级突触标记的 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒感染的投射神经元 (红色) 分布较为密集的核团高倍镜图像。ACC, 前扣带回; BLA, 杏仁核基底外侧部; CL, 丘脑中央外侧核; CLA, 屏状核; IC, 岛叶; MD, 丘脑内侧背核; PFC, 前额叶皮层; PT, 带旁核; PV, 丘脑室周核; PVA, 丘脑室周核前部; Re, 丘脑 reuniens 核; Rh, 丘脑菱形核; VM, 丘脑腹内侧核。Scale bars=100 μ m (图 J, 适用 A-I)。

通过结合狂犬病毒跨单级突触标记系统和 PV-Cre 转基因小鼠的逆行示踪研究了不同核团内 dsRed 跨单级突触标记投射神经元的分布。这些结果提示我们, 在 dmPFC 内向其他核团 (包括 vIPAG) 投射的神经元接受许多与痛密切相关的皮层结构和丘脑核团的纤维投射, 更加说明了 dmPFC 在疼痛感受和调控中的重要作用, dmPFC 更是一个容易受疼痛所抑制功能的核团。

3.3 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元的传出投射

我们已经对 dmPFC-vIPAG 神经通路及其传入联系做了初步的形态学研究，那么该神经通路的传出联系是怎样的呢？即 vIPAG 内神经元的下游核团是哪里？鉴于 RVM 内 5-HT 能阳性神经元在疼痛下行调控中的重要作用，我们考虑 vIPAG 内接受 dmPFC 投射的 VGLUT2 阳性神经元是否可能下行投射到 RVM，影响其内的 5-HT 神经元进而调控脊髓内疼痛信息的传递呢？我们结合各种形态学的研究方法对这些问题进行了初步研究。

利用狂犬病毒跨单级突触标记系统的方法，分别将辅助病毒和 RV-EnvA- Δ G-dsRed 注射到 Sert-Cre 小鼠的 RVM 内，在 vIPAG 内观察投射神经元的分布。图 1-15 所示为 RVM 内 GFP（绿色）和 dsRed（红色）双标的（黄色）神经元为表达 5-HT 的起始神经元。在 RVM 区域内可见大量 GFP 单独标记、dsRed 单独标记和双标的神经元（图 1-15 A-C）。在高倍镜下可更清楚的观察 GFP 和 dsRed 的双标情况，可见中缝大核和旁边的网状结构内有许多 dsRed 单标神经元的分布，提示在 RVM 中存在局部微环路，大量的中间神经元可以调控 5-HT 阳性神经元的下行调控功能（图 1-15 D-F）。

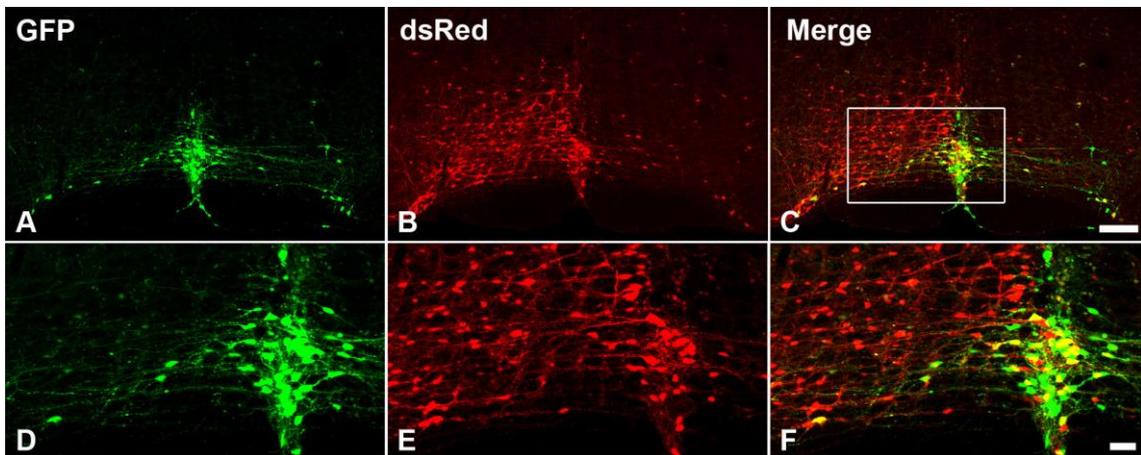


图 1-15 狂犬病毒辅助病毒和 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒注射到 Sert-Cre 小鼠 RVM 内感染神经元后的分布

图 A-C 显示的为 GFP 标记的辅助病毒感染神经元（绿色）、dsRed 标记的 RV- Δ G 病毒感染的神经元（红色）及起始神经元（黄色）在 Sert-Cre 小鼠注射区域 RVM 内的分布，图 D-F 显示的图 C 内方形区域放大后的图像。Scale bars=100 μ m (图 C，适用 A、B)，50 μ m (图 F，适用 D、E)。

方法同前，在中脑的切片中，不需要进行染色直接观察 dsRed 跨单级突触标记投射神经元的分布。可在吻、尾方向 6 个不同的 PAG 平面内及其外侧的区域观察到 dsRed 标记的投射神经元的分布，尤以 vIPAG 内分布较多，同时可在 lPAG 和 dmPAG 内见到投射神经元的分布(图 1-16)。这说明 vIPAG 内确实有神经元可以投射到 RVM 内与 5-HT 阳性的神经元形成突触，直接调控此类神经元的功能从而参与疼痛的下行调控。

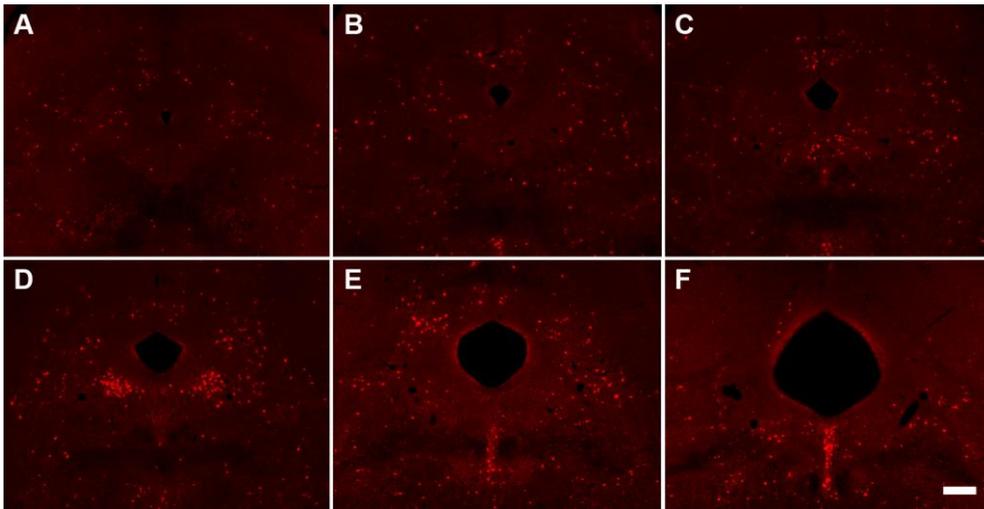


图 1-16 dsRed 跨单级突触标记的投射神经元在 PAG 不同平面内的分布

图 A-F 显示的为 dsRed 跨单级突触标记的 RV-EnvA- Δ G-dsRed 病毒感染的向 RVM 内 5-HT 阳性神经元投射直接形成突触的神经元(红色)在吻尾 6 个不同的 PAG 平面内的分布。Scale bars=200 μ m (图 F, 适用 A-E)。

结合前面 AAV2/2-CaMKII α -EYFP 注射到 dmPFC 内的顺行标记结果,同时将 FG 立体定位注射到 RVM 内,观察在 vIPAG 内从 dmPFC 投射来的神经纤维和向 RVM 投射神经元的位置关系。在低倍镜下可见 vIPAG 内有大量的病毒感染后 EYFP 标记的神经纤维和 FG 逆行标记的向 RVM 投射的神经元分布(图 1-17 A-C)。在高倍镜下观察两者的位置关系,可见有“串珠样”膨体的神经纤维不仅可以与 FG 免疫阳性的神经元胞体形成紧密的接触(图 1-17 D-I),同时还可与同一神经元的树突形成紧密接触(图 1-17 J-L)。这些荧光双标的结果提示,从 dmPFC 下行投射来的神经纤维可直接接触并调控 vIPAG 内向 RVM 投射的神经元的功能,进而参与疼痛的下行调控。

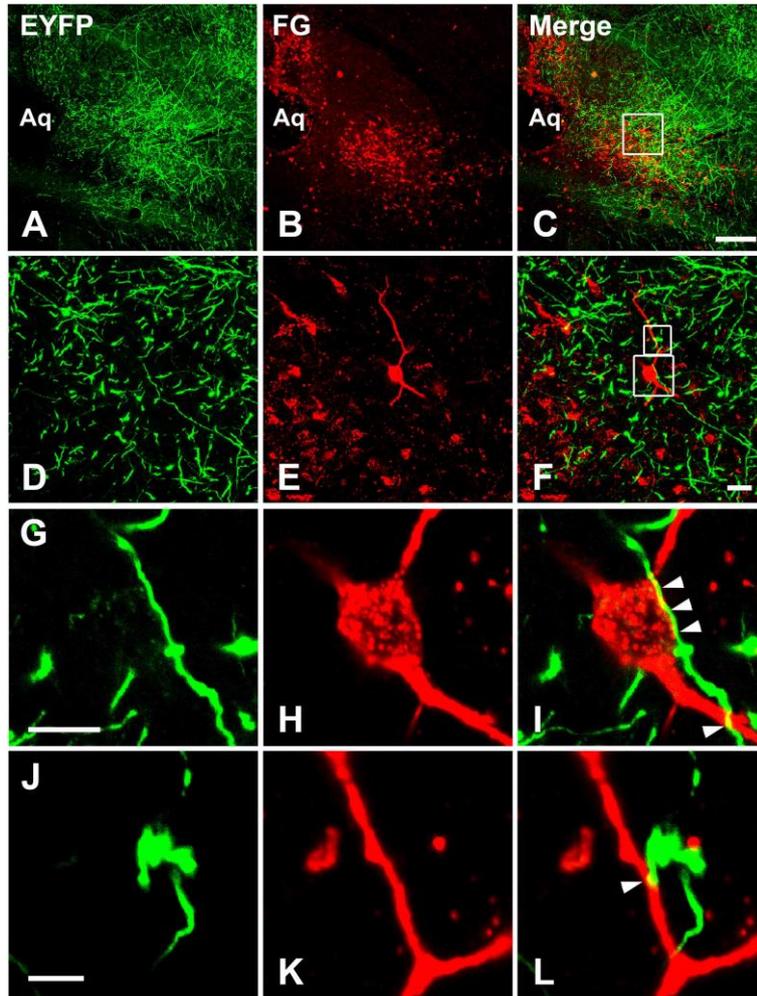


图 1-17 vIPAG 内 EYFP 标记的神经纤维和 FG 标记的投射神经元的位置关系

图 A-C 显示为 vIPAG 内 EYFP 标记的从 dmPFC 投射来的神经纤维（绿色）和 FG 逆行标记的向 RVM 投射神经元（红色）的位置关系。图 D-F 显示为图 C 中白色方框区域内的放大图像，FG 标记神经元的周围有大量的 EYFP 标记的神经纤维的分布。图 G-I 和图 J-L 分别显示为图 F 中白色方框区域内的放大图像，均有 EYFP 标记的神经纤维和 FG 标记的神经元胞体和树突形成紧密的接触（白色箭头所指示的区域，黄色）。Aq，导水管。Scale bars=100 μm (图 C，适用 A、B)，20 μm (图 F，适用 D、E)，10 μm (图 I，适用 G、H)，5 μm (图 J，适用 K、L)

鉴于 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元在下行疼痛调控中的重要作用，结合前面 dmPFC 可下行投射到 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元，我们可以推测 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元可向 RVM 发出投射并调控 5-HT 神经元的下行镇痛功能。

首先，运用荧光组织原位杂交的方法检测了 VGLUT2 mRNA 在 PAG 吻尾不同平面的分布情况（图 1-18）。可见在 PAG 内的各个亚区内都有 VGLUT2 mRNA 阳性

神经元的密集分布,各亚区间分布没有明显的差异。然而,在DR内含VGLUT2 mRNA神经元分布十分稀疏(图1-18 C和D),也间接的说明了VGLUT2 mRNA在PAG内原位杂交显色的特异性。

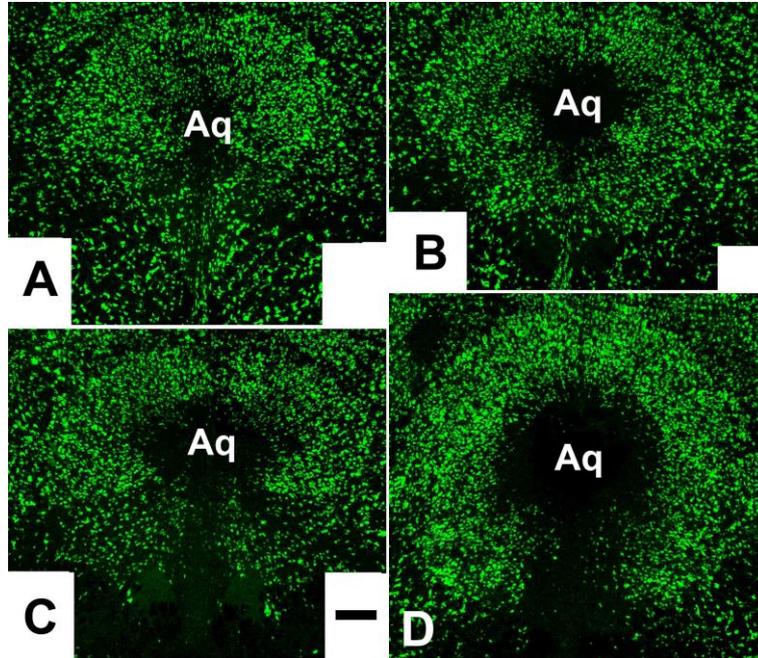


图 1-18 荧光原位杂交染色显示 VGLUT2 mRNA 在 PAG 内的分布

图 A-D 显示的为通过荧光组织原位杂交染色的方法显示 VGLUT2 mRNA 在吻、尾不同的 PAG 平面内的分布情况。Aq, 导水管。Scale bars=200 μ m (图 C, 适用 A-D)

在将 FG 立体定位注射到 RVM 后,取 PAG 的切片做荧光组织原位杂交染色结合免疫荧光染色检测 vIPAG 内向 RVM 投射的神经元是否可表达 VGLUT2 mRNA 及其所占的比例为多少?在 vIPAG 内可观察到大量的 VGLUT2 mRNA 阳性的神经元和 FG 逆行标记的投射神经元(图 1-19 A-C),高倍镜下可见两者之间存在大量的共存双标(图 1-19 D-I),统计显示有 $91.3 \pm 4.5\%$ 的 FG 标记的向 RVM 投射的神经元表达 VGLUT2 mRNA。提示在 vIPAG 内向 RVM 投射的神经元绝大部分为 VGLUT2 阳性的神经元,结合前面已得到的 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元可以接受 dmPFC 内神经元的直接支配,或许 dmPFC-vIPAG 神经通路作用到 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元而后下行投射到 RVM 内参与疼痛的下行调控。

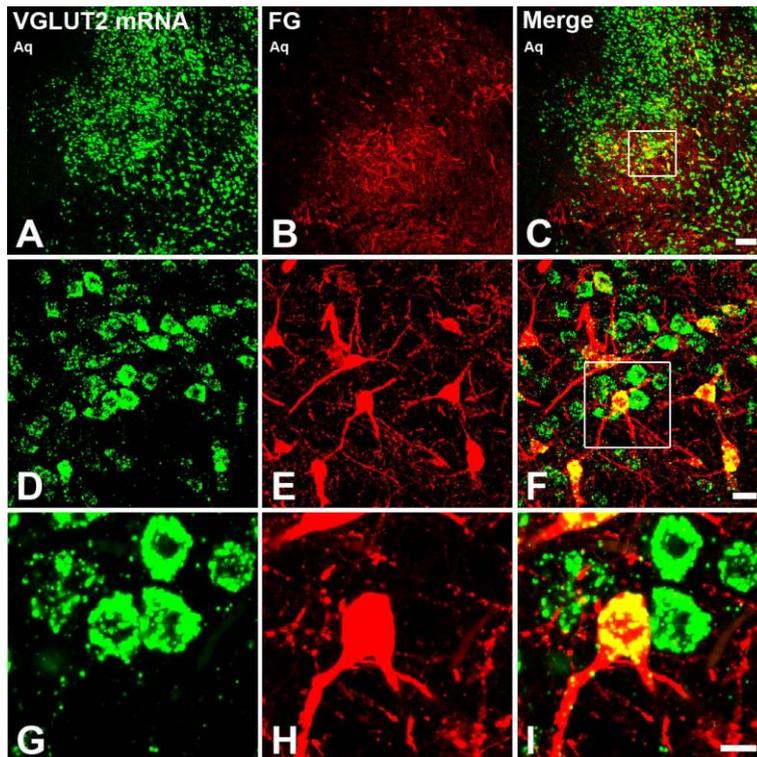


图 1-19 荧光原位杂交结合免疫荧光显示 VGLUT2 mRNA 和 FG 在 vIPAG 内的双标情况

图 A-C 显示的为荧光组织原位杂交技术显示的 VGLUT2 mRNA (绿色) 和 FG 逆行标记的向 RVM 投射神经元 (红色) 在 vIPAG 内的分布, 图 D-F 显示的为图 A-C 内白色方框区域的高倍镜图像, 除了各自单标的神经元还可见双标共存的神经元 (黄色), 图 G-I 显示的为图 D-F 内白色方框区域的高倍镜图像。Aq, 导水管。Scale bars=100 μm (图 C, 适用 A、B), 20 μm (图 F, 适用 D、E), 10 μm (图 I, 适用 G、H)

为进一步确认 vIPAG 内 VGLUT2 阳性神经元对 RVM 内神经元的下行调控, 我们将 FG 立体定位注射到腰段脊髓背角后, 取 RVM 的切片检测 VGLUT2 阳性的终末和 FG 逆行标记的向脊髓背角投射神经元的位置关系。图 1-20 所示为 FG 注射到脊髓背角后 FG 和神经元的标志物 NeuN 免疫荧光双标情况, FG 注射的范围局限在脊髓背角的一侧且集中在背角的浅层。

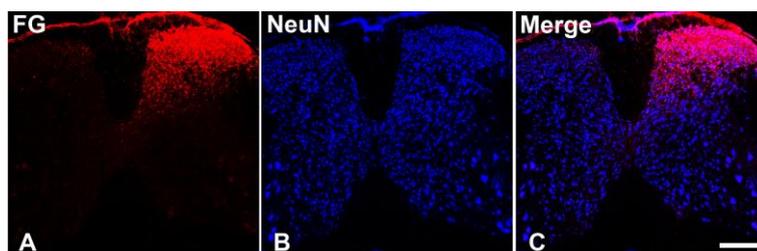


图 1-20 免疫荧光双标染色显示脊髓内 NeuN 和 FG 的双标情况

图 A-C 显示的为免疫荧光组织化学双标染色显示注射到脊髓背角的 FG（红色）和神经元的标志物 NeuN（蓝色）在脊髓的双标情况。Scale bars=200 μm (图 C, 适用 A、B)

通过免疫荧光三标染色的方法,观察到 RVM 内 VGLUT2 阳性的神经终末与 5-HT 免疫阳性且向脊髓背角投射的 FG 逆行标记投射神经元形成紧密的接触 (图 1-21), 可见 5-HT 和 FG 免疫双标神经元的周围环绕密集的一圈 VGLUT2 阳性终末。这一结果提示, 在 RVM 内下行调控的神经元接受 VGLUT2 纤维终末的支配, 而这些 VGLUT2 阳性的神经纤维可能由 vIPAG 内的神经元投射而来。

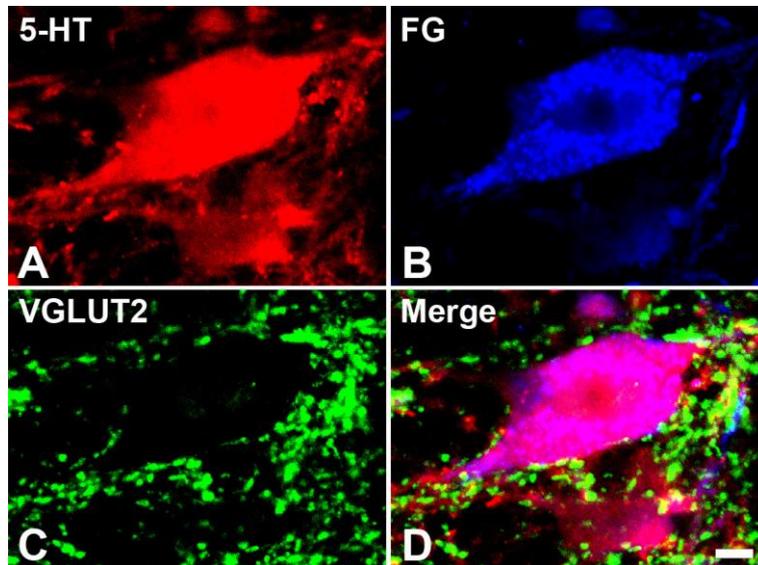


图 1-21 免疫荧光三标染色显示 RVM 内 5-HT、FG 和 VGLUT2 的三标情况

图 A-D 为免疫荧光组织化学三标染色显示的 5-HT 免疫阳性的神经元（红色）和 FG 逆行标记的向脊髓背角投射神经元（蓝色）双标共存, 且接受 VGLUT2 免疫阳性神经纤维的紧密接触联系（绿色）。Scale bars=5 μm (图 D, 适用 A-C)

4 讨论

本部分实验综合运用多种神经形态学研究方法, 明确了 dmPFC 内谷氨酸能的锥体神经元可下行投射到 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元形成突触 (确立 dmPFC-vIPAG 神经通路); dmPFC 内 PV 阳性的抑制性神经元可以接受与疼痛信息传递密切相关的皮层中枢、丘脑核团及 BLA 的神经传入 (dmPFC 的传入投射研究); vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元可以下行投射到 RVM 内支配 5-HT 阳性神经元参与

疼痛的下行调控（vlPAG 的传出投射研究）。尽管并未从功能上对 dmPFC 和 vlPAG 进行深入的探讨，但形态学的研究结果提示我们 dmPFC-vlPAG 神经通路在疼痛的感受和下行调控中发挥了非常重要的作用。

4.1 传统逆行和顺行示踪剂在束路追踪中的非特异性标记

传统的逆行示踪剂（如 FG）和顺行示踪剂（如 BDA）在束路追踪中均会存在非特异性的标记：容易感染过路的纤维逆行标记或者顺行的纤维路过核团而不是真正的形成突触，有时需要将顺行示踪和逆行示踪结合起来才能更加准确的判断^[25,64,151]。我们的研究结果中用狂犬病毒跨单级突触标记系统的方法在 VGLUT2-Cre 小鼠的 dmPFC 内观察到 dsRed 跨突触逆行标记的神经元的数目明显少于 FG 逆行标记的投射神经元的数目，AAV2/2-CaMKII α -EYFP 病毒感染 dmPFC 后在 vlPAG 内观察到许多粗大的 EYFP 标记的神经纤维（可能为 dmPFC 神经元投射到其他核团路过 vlPAG 的神经纤维）都从侧面说明了传统示踪剂的缺点。既往注射顺行示踪剂后，结合免疫电镜的方法来观察目标核团内顺行示踪剂是否可与神经元或树突形成突触可在一定程度上克服光镜下逆行标记和顺行标记的这一缺点^[35,49]。但对逆行标记神经元的多少和突触后神经元的类型仍不能反应出来。我们运用狂犬病毒跨单级突触标记系统便可很好的排除非特异性的标记这一缺点，并且也可证实突触的存在和说明突触后神经元的类型特点。尽管如此，我们仍然不能忽视狂犬病毒跨单级突触标记系统的缺点，受制于 Cre 动物的种类、病毒注射区感染范围的大小和动物存活时间长短的影响以及病毒感染过程中引起跨突触标记神经元的数目、神经通路的改变。

4.2 dmPFC 内向 vlPAG 投射神经元的分布和化学性质

既往研究中用逆行示踪剂霍乱毒素 B 亚单位（cholera toxin subunit B, CTB）分别注射到 dlPAG 和 vlPAG 观察 mPFC 内 CTB 标记投射神经元的分布，与我们试验中观察到的相同：投射神经元主要分布于同侧偏吻侧的 mPFC 内，主要分布在第 V 层，少数见于 VI 层，且由吻侧到尾侧标记的投射神经元的数目逐渐减少^[45]。尽管也有文献报道 mPFC 内的一部分抑制性神经元（不共表达谷氨酸）可以发出长的轴突投射到伏核参与动物在实时位置偏爱中的厌恶行为^[13,62,81]。但在本研究中并未观察到 dmPFC 内 FG 逆标神经元与 GAD67 的双标，说明从 dmPFC 向 vlPAG 的投射全为兴奋性的神经支配。或者在 dmPFC 中，GAD67 阳性的神经元并不能代表所有类型的

抑制性神经元，在以后的研究中可以尝试用其他抑制性神经元的标志物进行研究^[80,147]。而 mPFC 中 GRP 阳性的神经元作为一种兴奋性的中间神经元可以释放 GRP 作用于 GRPR 受体增加锥体神经元的抑制性突触后电流，参与疼痛信息的调控或是恐惧性记忆的形成^[20,107]。在中枢神经系统内的许多突触可以单独释放三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）或者是与其他神经递质（如谷氨酸、GABA 等）一起释放作用于突出后的离子型 P2X 受体及代谢型 P2Y 受体。P2X 受体可在突触后与多种离子通道受体相互作用，调节突触可塑性产生突触的长时程易化（调控 NMDA 受体）或长时程抑制（调控 GABA_AR）^[33,114]。同时在 mPFC 中神经元上表达的 P2X3 受体参与了肠易激综合症所导致的内脏痛，内脏痛时 mPFC 内的 P2X3 表达显著上调^[152,156]。其实在临床影像学研究中，慢性疼痛时在 DLPFC 内血流信号的减少同样也反映了其内 P2X3 受体在其中发挥的重要作用^[23,99]。

4.3 dmPFC 的传入投射

既往对于啮齿类动物中 dmPFC 的传出研究较多，而关于向 dmPFC 投射的神经核团研究较少，且均应用传统的逆行示踪剂来进行研究^[43,63]。一般认为位于 II、III 层的锥体神经元是皮层内接受传入纤维联系的神经元，而后将信息处理后传递给 V 层或 VI 层内的锥体神经元再将信息发出^[78,170,171]。但也有大量的文献提示投射到 dmPFC 内的传入纤维不仅可以直接作用于锥体神经元，也可先投射作用于抑制性中间神经元上，而后再将信号传递到锥体神经元中进一步处理、整合^[29,70,100]。这种作用的模式是与兴奋传入核团而对 dmPFC 产生总体抑制的效应是相匹配、吻合的^[70,100]。且鉴于转基因动物种类的限制，我们在本次课题研究中只进行了 PV-Cre 阳性小鼠 dmPFC 传入核团的检测和普查。参考既往的文献，运用传统的非选择性的逆行示踪剂（FG）注射到 dmPFC 内，进行全脑的普查观察到主要是边缘系统的皮层结构、丘脑内的神经核团、BLA 和海马投射到 dmPFC 内^[63]。我们通过两部分结果的对比可观察到 dmPFC 的传入神经核团基本相同，提示向 dmPFC 内兴奋性神经元和抑制性神经元的传入核团并没有特异性。皮层内抑制性的神经元主要包括 PV 阳性的、somatostatin (SOM) 阳性的和 vasoactive intestinal peptide (VIP) 阳性的神经元等^[74,79,117]。但在 dmPFC 中 PV 阳性和 SOM 阳性抑制性神经元的数目要远远多于 VIP 阳性抑制性神经元的数目^[124,161]。运用光遗传学的方法直接光照激活从 BLA 投射来

的兴奋性神经纤维引起 mPFC 内锥体神经元、PV 阳性神经元和 SOM 阳性神经元的动作电位和内向电流，不仅对 PV 阳性和 SOM 阳性神经元的兴奋作用要大于对锥体神经元的兴奋作用，并且 PV 阳性神经元的电流强度和发放的动作电位数也多于 SOM 阳性神经元^[100]。尽管我们的研究中只在 PV-Cre 小鼠中进行了狂犬病毒跨单级突触标记系统的研究，但也能从一定程度上反应抑制性中间神经元的传入联系，且与 FG 标记的核团没有太大的差别。

4.4 dmPFC-vIPAG 的传出投射

尽管已经有文献报道证实，兴奋 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性的神经元可以产生明显的镇痛效果，但并不能说明 vIPAG 内所有的 VGLUT2 阳性的神经元均为投射神经元可以投射到 RVM 内，仍不能排除其为局部兴奋性神经元的可能性^[57,110,140,163]。我们通过荧光原位杂交组织化学方法检测到的 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元数目要远远多于向 RVM 投射的 FG 逆标神经元的数目也说明了这一点。除了 dmPFC 直接投射到 vIPAG 内向 RVM 投射的 VGLUT2 阳性神经元外，我们不能排除 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性兴奋性中间神经元仍然可以接受 dmPFC 投射的可能性。同时，从 vIPAG 下行投射到 RVM 内的 VGLUT2 纤维除了可以与 5-HT 神经元形成突触外，是否还可与直接投射到脊髓背角下行调控疼痛的抑制性神经元直接形成突触^[28,46,167]，需要在后面的研究中进一步证实。尽管 dmPFC-vIPAG 神经通路的传出神经元为 VGLUT2 阳性神经元，但我们仍然不清楚 VGLUT2 阳性神经元是以何种神经递质参与了下行镇痛？谷氨酸虽然可以参与这一过程，但我们不能排除其他肽类、单胺类及调质类神经活性物质介导 VGLUT2 阳性神经元的下行镇痛作用^[97,104,163]。在 vIPAG 内还有许多的抑制性中间神经元的分布，可对 VGLUT2 阳性神经元产生抑制作用^[85,127,140]，同时也有文献证实 vIPAG 内部分向 RVM 投射的神经元也表达抑制性神经元的标志物 GAD67^[71,106]。这提示抑制性神经元不仅是作为局部中间神经元，而且还可下行调控 RVM 内的 5-HT 神经元和抑制性神经元参与疼痛的下行调控。运用化学遗传学的方法特异性的激活 vIPAG 内的抑制性神经元可以易化疼痛，而特异性的抑制 vIPAG 内的抑制性神经元则可产生下行镇痛作用^[126]。同时，dmPFC 内的投射神经元是否可以直接与 vIPAG 内抑制性神经元形成突触呢？还需要后面在 Vgat-Cre 的小鼠上运用狂犬病毒跨单级突触标记系统进行研究。

第二部分 dmPFC-vIPAG 神经通路参与慢性痛下行调控的机能学研究

通过第一部分的形态学研究我们已经知道 dmPFC-vIPAG 神经通路不仅可以接受许多与传递疼痛信息密切相关的皮层中枢、丘脑核团及 BLA 的传入联系，同时还可直接或间接发出神经纤维到 RVM 内与重要的疼痛下行调控神经元 5-HT 阳性神经元形成突触。这一系列的神经通路、传入投射和传出投射等形态学的解剖结构基础强烈提示 dmPFC-vIPAG 神经通路与疼痛的调控密切相关。为了能够进一步的阐明 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛的调控及其机制，我们需要在形态学研究的基础上沉默或者激活 dmPFC-vIPAG 神经通路观察对正常痛阈、慢性疼痛及相应的焦虑抑郁样行为的影响，并在此基础上探讨 dmPFC 内相应的分子机制。首先，我们运用化学毁损的方法将双侧 dmPFC 区域损毁观察对动物疼痛阈值、慢性痛时机械性痛敏及焦虑抑郁样行为的影响。为了明确 dmPFC 向 vIPAG 投射的神经通路在慢性痛及相关负性情绪中的影响，运用光遗传学的方法将 dmPFC 内的锥体神经元特异性的表达光敏通道蛋白 (hChR2)，用蓝光特异性地激活 vIPAG 内由 dmPFC 投射来表达 hChR2 的神经纤维，观察对慢性痛行为和负性情绪的影响。进一步通过化学遗传学的方法特异性的激活双侧 dmPFC 内的抑制性神经元，观察其对慢性痛行为及负性情绪的影响；最后通过分子生物学技术和行为药理学的方法来探讨 dmPFC 内参与慢性痛调控的分子机制。通过以上这些机能学的研究，试图阐明 dmPFC-vIPAG 神经通路既可以维持正常情况下动物的疼痛阈值、参与慢性痛的发生和发展，同时还可对慢性痛后的负性情绪产生影响。dmPFC 可能为慢性痛和负性情绪间相互促进、相互恶化的关键核团，而 dmPFC-vIPAG 神经通路在这一现象中发挥了非常重要的作用。

1 材料

1.1 实验动物

本实验所用的动物为清洁级健康雄性成年 C57BL/6J 小鼠 (10-12 周, 体重 20-25 g), 均购自第四军医大学实验动物中心; 所用的转基因小鼠为 Vgat-Cre 小鼠, 实验室从实验动物中心购回雌性 C57 小鼠后自行杂交繁殖。在饲养、繁殖和实验过程中, 实验室均能保证室温 22-25°C, 08:00-22:00 的光照时间, 适宜的空气湿度并保持通风, 小鼠可自由获得食物、饮水。本实验的全部操作方法均遵循第四军医大学动物使用和实验动物管理伦理委员会的规定, 手术和行为学实验中最大程度减少动物的使用数量, 减轻对动物的创伤。

1.2 实验材料和试剂

药物和试剂: 海人藻酸(Kainic acid, KA)、磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PB)、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、30%蔗糖溶液、A 液、B 液、二甲基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)、焦油紫染色液、AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP、AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrin、氯氮平 (clozapine-N-oxide, CNO)、[R-(R*,S*)]-5-(6,8-dihydro-8-oxofuro[3,4-e]-1,3-benzodioxol-6-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-6,6-dimethyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinoliniumiodide (bicuculline)、(S)-(+)- α -amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385)等。

抗体: 详细信息如下:

多克隆兔抗 FOS 血清	ab209794	Abcam, Cambridge, MA, USA
单克隆兔抗 NeuN 血清	12943	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
单克隆小鼠抗 GFAP 血清	MAB3402	Millipore, Billerica, MA, USA
多克隆鸡抗 GFP 血清	GFP-1020	Aves Labs, Tigard, OR, USA
多克隆小鼠抗 GAD67 血清	AB2251	Millipore, Billerica, MA, USA
单克隆小鼠抗 β -actin 血清	A1978	Sigma, St. Louis, MO, USA
多克隆兔抗 GABA _A R 血清	ab72446	Abcam, Cambridge, MA, USA
多克隆兔抗 mGluR1 血清	ab82211	Abcam, Cambridge, MA, USA
DAPI	SC-3598	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Alexa488 结合的驴抗小鼠 IgG	A-21202	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FITC 结合的山羊抗鸡 IgY	A16055	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa594 结合的驴抗兔 IgG	A-21207	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa594 结合的驴抗小鼠 IgG	A-21203	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alexa647 结合的驴抗兔 IgG	A-31573	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
生物素结合的驴抗兔 IgG	AP182B	Millipore, Billerica, MA, USA
HRP 结合的山羊抗兔 IgG	ZB-2301	ZSGB-BIO, Beijing, China
HRP 结合的山羊抗小鼠 IgG	ZB-2305	ZSGB-BIO, Beijing, China

2 方法

2.1 脑内核团立体定位注射

为毁损双侧 dmPFC 需将 KA 注射到双侧 dmPFC 内, 为进行光遗传学研究需将 AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP 注射到单侧 dmPFC 内, 为进行化学遗传学研究需将 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrine 注射到 Vgat-Cre 小鼠双侧的 dmPFC 内, 均需要进行脑内核团的立体定位注射, 方法、步骤均按照实验室既往定位注射的流程以及第一部分的具体做法和坐标^[26,151,163]。

野生型的 C57BL/6J 小鼠经 7% 水合氯醛进行腹腔麻醉 (4 mg/kg) 后, 备皮, 稳固固定于立体定位注射仪 (Narishige, 日本) 上, 确保两侧耳杆对称。在充分消毒后, 切开颅顶皮肤将其向两侧掀开, 充分暴露 Bregma 和 Lambda 点校正颅顶的平面。根据小鼠脑图谱定好坐标后, 用牙科钻在颅骨上钻孔。分别将 0.2 μ l 的 1 μ g/ μ l 的 KA 溶液、0.3 μ l 的 AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP (或 AAV2/2-CaMKII α -EYFP) 或者 0.3 μ l 的 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrine 用前端粘有玻璃电极的微量注射器 (1 μ l, Hamilton, NV, USA) 立体定位注射到 dmPFC 内 (坐标: bregma 前 2.5 mm, 右侧偏 0.4 mm, 深度为 2.5 mm)。注射速度为 20 nl/min, 留针 10 分钟。定位注射完成后, 消毒并缝合颅顶皮肤, 待动物完全清醒后放回笼内继续饲养。注射 KA 一周后进行行为学的检测, 注射两种病毒一个月后分别进行行为学检测。

2.2 脑内核团埋置光纤和套管

将 AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP (或 AAV2/2-CaMKII α -EYFP) 注射到 dmPFC

内 4 周病毒感染充分后,需将光纤埋置到 vIPAG 内进行 dmPFC-vIPAG 神经通路的功能研究,方法步骤与上述的立体定位注射流程和坐标相似。在此之前首先要制作合格的光纤,分别将直径 100 μm 的光纤(百奥金生物科技有限公司,北京,中国)按照 vIPAG 的深度用光纤剥离器和钻石刀截断光纤约 11 mm,用不同颗粒直径的砂纸分别对光纤的两头进行打磨、抛光,而后用 AB 胶将光纤和陶瓷头(长度约 7 mm)粘接到一起,晾干后待用。在埋置光纤前用光强计测试光纤的导光效率和检测是否有光的散射,只有光纤的导光效率大于 80%才被选择留用,其余的舍弃。

注射完病毒 4 周后的小鼠经 7%水合氯醛进行腹腔麻醉(4 mg/kg)后,备皮,稳固固定于脑立体定位注射仪(Narishige,日本)上,确保两侧耳杆对称。在充分消毒后,切开颅顶皮肤将其向两侧掀开,充分暴露 Bregma 和 Lamda 点校正颅顶的平面。根据小鼠脑图谱定好坐标后,用牙科钻在颅骨上钻孔。用电极夹持器将上述制作的带有陶瓷头的光纤立体定位于和注射病毒同侧的 vIPAG 内(坐标: bregma 后 4.8 mm,右侧偏 0.5 mm,深度为 2.6 mm)。先用强力胶水将光纤粘于颅骨的表面,在前脑上方的颅骨两侧分别固定两枚螺丝钉而后用牙科水泥将光纤和螺丝钉牢固固定于颅骨表面,不需要缝合皮肤待牙科水泥晾干和动物清醒后放回笼内继续饲养。埋置光纤一周动物恢复后进行行为学的检测。

为向 dmPFC 内注射 GABA_AR 和 mGluR1 的拮抗剂,按照实验室之前的方法,需将套管埋置于 dmPFC 处^[27,149,150]。正常野生型的 C57 小鼠经 7%水合氯醛进行腹腔麻醉(4 mg/kg)后,备皮,稳固固定于脑立体定位注射仪(Narishige,日本)上,确保两侧耳杆对称。在充分消毒后,切开颅顶皮肤将其向两侧掀开,充分暴露 Bregma 和 Lamda 点校正颅顶的平面。根据小鼠脑图谱定好坐标后,用牙科钻在颅骨上钻孔。而后用套管夹持器将按照 dmPFC 的深度购买的导管(62002, OD 0.56 X ID 0.38 mm,长 3.0 mm,瑞沃德生命科技有限公司,深圳,中国)立体定位于 dmPFC 的上方(坐标: bregma 前 2.5mm,右侧偏 0.4 mm,深度为 2.2 mm)。先用强力胶水将套管粘于颅骨的表面,在脑干上方的颅骨两侧分别固定两枚螺丝钉而后用牙科水泥将导管和螺丝钉牢固固定于颅骨表面,不需要缝合皮肤待牙科水泥晾干和动物清醒后将导管帽(62102, OD 0.30 mm,瑞沃德生命科技有限公司)拧到导管上,动物放回笼内继续饲养。埋置导管一周动物恢复后进行行为学的检测。

2.3 免疫组织化学染色

2.3.1 组织准备

1) 灌注固定: 待 KA 毁损双侧 dmPFC、光遗传学病毒感染 dmPFC 和化学遗传性病毒感染 dmPFC 及 dmPFC 内放置套管的小鼠完成所有行为学检测后, 用 100 mg/kg 的戊巴比妥溶液腹腔注射, 使动物深度麻醉; 同第一部分所述, 用心脏灌注的方法, 将灌注的尖针插入动物的左心室, 先用约 20 ml 的 0.01 M PBS 冲去体内血液, 而后用含 4% 多聚甲醛的 0.1 M PB 溶液 50 ml 进行灌注固定;

2) 取材、后固定、脱水: 去除颅骨后将小鼠全脑完整取出, 放入上述 4% 的多聚甲醛固定液中后固定, 4℃ 后固定 6 小时, 而后将脑组织浸泡于 30% 的蔗糖溶液中, 4℃ 至脑组织沉底;

3) 包埋切片: 分别将含 dmPFC 或 vIPAG 的脑组织用 OCT 包埋后, 用恒冷箱切片机做冠状切片, 片厚为 40 μm , 分别收入 0.01 M PBS 中, 漂洗 3 次后进行后续的注射区、投射区观察和相应的免疫组织化学染色。

2.3.2 Nissl 染色

1) 裱片、脱脂: 将上述漂洗后的 KA 或 Saline 注射入 dmPFC 的切片裱于挂有明胶的载玻片上晾干, 而后置于 75% 的酒精中, 放入 37℃ 恒温箱中孵育过夜;

2) Nissl 染色: 将脱脂后的切片先用双蒸水冲洗掉酒精, 而后将其放入焦油紫染色液中染色约 3 个小时;

3) 分色、脱水、透明及封片: 焦油紫染色后的切片经 70% 酒精、80% 酒精、氯仿酒精分色、95% 酒精 (显微镜下观察决定脱色的时间)、100% 酒精、100% 酒精、二甲苯 I 和 II 后, 中性树胶封片。

2.3.3 DAB 染色

1) 封闭非特异性抗原: 将上述漂洗后的 KA 或 Saline 注射入 dmPFC 的切片用含 10% 正常驴血清 (normal donkey serum, NDS) 的 0.01 M PBS (v/v) 室温下孵育封闭 30 分钟;

2) 孵育一抗: 将封闭后的切片直接放入用抗体稀释液 (5% NDS, v/v; 0.3% TritonX-100, v/v; 0.25% 角叉菜胶, w/v; 0.05% 叠氮钠, w/v) 稀释的单克隆兔抗 FOS 血清 (1:500) 中, 室温下孵育过夜;

3) 孵育二抗: 孵育完一抗的切片用 0.01 M PBS 漂洗 (3 次, 10 分钟/次) 后,

移入用上述抗体稀释液稀释的生物素结合的驴抗兔 IgG (1:500), 室温下孵育 5 小时;

4) A、B 液孵育: 将 A 液 (1:200) 和 B 液 (1:200) 提前 30 分钟用 0.01 M PBS 稀释、混合, 将上述切片用 0.01 M PBS 漂洗后移入 A、B 混合液中, 室温下孵育 3 小时;

5) DAB 反应: 切片漂洗后, 进行 DAB 反应, 每 5 ml 的 Tris-HCL (pH=7.6) 溶解 1 mg 的 DAB 并加入 10 μ l 的 0.3% 双氧水, 边反应边观察, 至阳性结果显示完成后, 终止反应;

6) 裱片、脱水透明及封片: 反应完的切片经漂洗后, 裱于挂过明胶的载玻片上, 晾干后依次经过 70%、80%、90%、95%、100%、100% 的梯度酒精脱水和两次二甲苯透明, 最后用中性树胶进行封片, 待中性树胶晾干后观察。

2.3.4 免疫荧光组织化学染色

1) 封闭非特异性抗原: 将上述漂洗后的 KA 注射入 dmPFC, AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP 注射入 dmPFC, AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrin 注射入 dmPFC 及套管置入 dmPFC 的切片用含 10% NDS 的 0.01 M PBS 室温下孵育封闭 30 分钟;

2) 孵育一抗: 将封闭后的切片直接放入用抗体稀释液稀释的一抗混合液中: 单克隆兔抗 NeuN 血清 (1:200) / 单克隆小鼠抗 GFAP 血清 (1:2,000); 单克隆兔抗 FOS 血清 (1:500); 单克隆鸡抗 GFP 血清 (1:200) / 单克隆小鼠抗 GAD67 血清 (1:500) / 单克隆兔抗 FOS 血清 (1:500); 室温下孵育过夜;

3) 孵育二抗: 孵育完一抗的切片用 0.01 M PBS 漂洗后, 移入用上述抗体稀释液稀释的一抗混合液中: Alexa488 结合的驴抗小鼠 IgG (1:500) / Alexa594 结合的驴抗兔 IgG (1:500); Alexa594 结合的驴抗兔 IgG (1:500); FITC 结合的驴抗鸡 IgG (1:500) / Alexa594 结合的驴抗小鼠 IgG (1:500) / Alexa647 结合的驴抗兔 IgG (1:500); 室温下孵育 5 小时;

4) DAPI 衬染: 最后一组切片用 0.01 M PBS 漂洗后, 加入用 0.01 M PBS 稀释的 DAPI (1:10,000, Molecular Probes) 溶液中, 室温下孵育 15 分钟;

5) 裱片、封片: 步骤 3) 和步骤 4) 中的切片用 0.01 M PBS 漂洗后, 在避光环境下裱到干净的载玻片上, 晾干后用上述的含抗淬灭剂的荧光封片剂封片, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

2.4 CPNL 痛模型的制备

按照文献报道中已有的详细方法进行手术^[25,142]。

野生型的 C57BL/6J 小鼠或者 Vgat-Cre 的小鼠经 7%水合氯醛进行腹膜腔麻醉(4 mg/kg)后,眼睛上涂眼膏防止对动物眼睛的损伤,剃去膝关节周围约 2 cm X 2 cm 的毛发,将动物侧躺放置。消毒后,待小鼠对夹持的伤害性测试无反应后开始手术。在膝关节外侧的皮肤前、后肌群之间可见一明显的凹陷,沿着这条凹陷从腓骨小头开始纵行切开皮肤约 1 cm 长的切口。切开皮肤后可见在后群肌肉下有一条白色的类似筋膜样的结构,便是腓总神经(common peroneal nerve, CPN)。将皮下覆盖在肌肉上方的筋膜去除后,可将 CPN 暴露出来。将后群肌肉向外侧和后侧牵拉后将 CPN 暴露更加明显,可见与之伴行的动脉血管,可帮助判断是否为 CPN。用 5 号尼龙手术缝线将 CPN 进行结扎,结扎时慢慢拉紧至看到小鼠后足明显的屈背反射后停止。不可过分用力以免因线的切力太大将神经切断,注意放置缝线的过程中不可损伤或者将伴行动脉一起结扎。结扎后只需用缝线将皮肤缝合,消毒后注意保温等待动物清醒。在此模型中并未将神经切断,更未对肌肉造成损伤因此对小鼠的运动功能影响较小。

假手术组的小鼠仅在切开皮肤和皮下筋膜,将后侧肌群向后和向外拉开暴露 CPN 后,直接将皮肤缝合,而不对神经进行结扎操作。动物清醒后放回笼内饲养,术后第 1 天便可检测小鼠后足的机械性痛阈的改变。

2.5 机械性痛阈值的检测

根据我们实验室以前的试验方法^[158,164],按照刺激强度由低到高的顺序进行测定。为保证结果的稳定性,在实验前 1 周就令动物对行为学房间进行适应。同时,我们也采用盲法进行检测,检测人员事先不知道动物的分组情况。

将小鼠置于金属网上透明的有机玻璃盒中(7 cm X 7 cm X 10 cm),金属网距离实验台约 30 cm,先让小鼠适应 30 min 后进行检测。当小鼠在盒内相对安静时,用 vonFrey 纤维丝 0.04g (2.44), 0.07 g (2.83), 0.16 g (3.22), 0.4 g (3.61), 0.6 g (3.84), 1.0 g (4.08), 1.4 g (4.17) (Stoelting, Kiel, WI, USA) 由下向上垂直于小鼠后足中央刺激足底皮肤直至纤维丝弯曲呈 S 形,每次持续 3 s,如果出现明显的与 vonFrey 丝刺激相关地缩足、添足或抬足反应,均视为阳性反应,同一足底刺激的两次测试时

间间隔 10 min。对小鼠手术同侧和对侧足均进行测试，每个刺激强度给予 5 次刺激有超过 3 次反应的刺激强度便记为小鼠后足回缩阈值(paw withdrawal threshold, PWT)，即机械性痛阈值。在 CPNL 手术后 1 天、3 天、7 天和 14 天分别进行测定。对于小鼠 CPNL 手术后异常性疼痛的测定，只用 0.04g 的纤维丝进行测试（正常的小鼠很少会对其有阳性的缩足、抬足或添足反应），每侧后足共测试 10 次，刺激和反应标准同前，分别记录反应的次数后计算反应的百分比。

2.6 旷场实验 (open field, OF) 检测动物的负性情绪

根据我们既往的研究^[118,165]，在本研究中心内旷场行为学实验室开展实验。为保证结果的稳定性，在实验前 1 周就会使动物对行为学房间进行适应。同时，我们也采用盲法进行检测，检测人员事先不知道动物的分组情况。

测试前提前 30 min 将小鼠放入旷场行为室，测试时将小鼠置于白色背底的 50 cm X 50 cm X 45 cm 的方形盒子中央区域，通过摄像记录系统记录小鼠 15 分钟内在旷场内的活动（上海移数科技信息有限公司，上海，中国）。实验过程中用红色的灯光保持微弱照明，保持房间内的通风和安静。摄像完成后用配套的系统软件对动物的活动轨迹进行分析并生成轨迹图和导出相应的数据。本实验中选取小鼠在旷场内的活动总路程作为评价动物运动能力和欲望的指标，小鼠在旷场中央 50% 区域活动的时间占总活动时间的百分比作为评价动物焦虑抑郁样行为的指标。

2.7 高架十字迷宫实验 (elevated plus maze, EPM) 检测动物的负性情绪

同样根据我们既往的研究^[118,165]，在高架十字迷宫行为学实验室开展实验。为保证结果的稳定性，在实验前 1 周就会使动物对行为学房间进行适应。同时，我们也采用盲法进行检测，检测人员事先不知道动物的分组情况。

测试前提前 30 min 将小鼠放入高架十字迷宫行为室，测试时将小鼠置于白色背底的高架十字迷宫中，通过摄像记录系统记录小鼠 5 分钟内在旷场内的活动（上海移数科技信息有限公司）。该迷宫由垂直交叉的开放臂 (open arms, OA, 60 cm X 5cm) 和闭合臂 (closed arms, OA, 60 cm X 5cm X 25 cm) 构成，交叉处为 5 cm X 5 cm 的中央区域，迷宫距地面高 50 cm。测试开始将小鼠置于中央区使头朝向开放臂，高架实验过程中用动物照明灯进行照明，保持放间内的通风和安静。摄像完成后用配套的系统软件对动物的活动轨迹进行分析并生成轨迹图和和导出相应的数据。本实验

中选取在EPM内小鼠在开放臂活动的时间占总时间的百分比和小鼠进入开放臂的次数占进入开放和闭合臂总次数的百分比作为评价动物焦虑抑郁样行为的指标。

2.8 光遗传学、化学遗传学和行为药理学方法对动物机械性痛阈值和旷场高架行为学的检测

为深入研究 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛的调控和对负性情绪的影响，分别采用光遗传和化学遗传的方式特异性激活的 dmPFC-vIPAG 神经通路或者是 dmPFC 内的抑制性中间神经元。在实验过程中，我们也采用盲法进行检测，检测人员事先不知道动物的分组情况。

在进行行为学测试前先将动物放置在相应的行为学实验室内适应后，先将激光器（BOGS-1，百奥金生物科技有限公司，北京，中国）的光纤与小鼠的陶瓷头连接起来，使小鼠适应 30 分钟，而后分别进行机械性痛阈值、旷场和高架十字迷宫行为实验的检测。实验中所使用的蓝光（波长 473 nm）频率为 20 Hz，光强度为 10 mW，检测机械性痛阈值时，在激光刺激前先测得小鼠的机械性痛阈值，光照刺激时再检测小鼠的机械性痛阈值，刺激参数为开 2 分钟-关 2 分钟-开 2 分钟，持续刺激至将阈值测出。在测定小鼠在旷场和高架十字迷宫内的行为时，直接将小鼠放置在旷场和高架十字迷宫中连续测试 9 分钟的运动轨迹，刺激参数为 3 分钟关-3 分钟开-3 分钟关，频率和强度同上。

在用化学遗传学的方法进行行为学测试前先将动物放置在相应的行为学实验室内适应后，腹腔注射氯氮平（CNO, C0832, Sigma）1 mg/kg 后，使小鼠适应 30 分钟，而后分别进行机械性疼痛阈值、旷场和高架十字迷宫行为实验的检测。所使用的方法均与正常测定疼痛阈值、旷场行为测试和高架十字迷宫行为测试相同。

在用行为药理学的方法进行行为学测试前先将动物放置在相应的行为学实验室内适应后，将通过 PE 管（62320，OD 0.85 X ID 0.42 mm，瑞沃德生命科技有限公司）与微量注射泵相连的注射内管（62202，OD 0.36 X ID 0.20 mm，瑞沃德生命科技有限公司）插入给药导管内并用锁紧螺帽（62502，OD 0.30 X L 7.0 mm，瑞沃德生命科技有限公司）固定，使小鼠适应 30 分钟后，分别注射 GABA_AR 的特异性拮抗剂 bicuculline (14343, Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.1 ug 或者是 mGluR1 的特异性拮抗剂 LY367385 (1237, Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) 0.4 nmol，两者均用生理

盐水进行稀释，而后分别进行机械性疼痛阈值、旷场行为和高架十字迷宫行为实验的检测。注射给药的体积为 0.4 μ l，给药速度为 50 nl/min，所使用的方法均与正常测定疼痛阈值、旷场行为测试和高架十字迷宫行为测试相同。

2.9 Western blot 检测

2.9.1 组织准备

腹腔注射 25%乌拉坦溶液（6 mg/kg）将小鼠深度麻醉后，断头、开颅取脑，将前脑切开后置于冰上的培养皿中，用手术刀切取 CPNL 对侧的 dmPFC，并放入干净 1.5 ml 离心管中，-80℃保存备用。

2.9.2 提取总蛋白

取出 dmPFC 的组织称重后，放置于冰上待用；每管组织中加入 200 μ l 含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，超声粉碎后在冰上放置 30 分钟；高速离心机内，4℃，12000 r/min 离心 10 分钟；吸取上清液，移入新的 1.5 ml 离心管中；使用 Pierce BCA 法蛋白定量试剂盒，测定每个样品的总蛋白浓度；计算后，用 5 X SDS 上样缓冲液按 4:1 加入到蛋白样品中进行稀释，使所有样品的蛋白浓度相同，99℃加热 5 分钟，蛋白质变性后置于-20℃保存。

2.9.3 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 1) 清洁制胶专用的玻璃板，准备组装制胶装置。
- 2) 配制 10%的分离胶（共 10 ml）：双蒸水 2.7 ml，30%的 Arc-Bis（29:1）3.3 ml，1 mol/L Tis (pH 8.8) 3.8 ml，10%的 SDS 0.1 ml，10%的 AP 0.1 ml 和 TEMED 10 μ l，将其充分混匀后加入玻璃板夹层之间，为保证压缩胶的长度使分离胶上缘与低玻璃板上缘的距离比梳齿的长度长约 1 cm；在分离胶溶液上方吸入一层异丙醇，待分离胶室温下凝固后，倒掉异丙醇。
- 3) 配制 6%的压缩胶（3 ml）：双蒸水 2.1 ml，30%的 Arc-Bis（29:1）0.5 ml，1 mol/L Tis (pH 8.8) 0.38 ml，10%的 SDS 0.03 ml，10%的 AP 0.03 ml 和 TEMED 6 μ l，充分混匀后加到分离胶上层，立刻插入配套的干净梳子，室温下凝固。
- 4) 加样：凝固后拔出梳子，用蒸馏水冲去多余的胶块，并将凝胶玻璃板固定于电泳仪上；在电泳槽内加入 500 ml 的电泳缓冲液后，取出保存的蛋白样品依次加入上样孔中，并在一侧加入标准蛋白 Marker。

5) 电泳: 根据正负极接通电源后开始电泳, 压缩胶采用恒压 80 mV, 分离胶采用恒压 120 mV, 直至溴酚蓝到达分离胶的底部。

2.9.4 湿法转膜

电泳完成后将凝胶轻轻取出, 根据 Marker 把多余的凝胶切掉, GABA_AR 蛋白约为 55 kDa, mGluR1 蛋白约为 110 kDa, β -actin 约为 42 kDa; 根据凝胶的大小裁剪 2 张滤纸和 1 张预先在甲醇中激活的 PVDF 膜; 在转膜缓冲液中进行组装, 从黑色夹板开始, 依次放置海绵垫、滤纸、分离胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫和白色夹板, 尽量排除每层之间的气泡; 接通电源, 在冰盒中恒流 300 mA 转膜 120 分钟; 转膜结束后做好标记, 放入 TBS-T 溶液漂洗。

2.9.5 孵育抗体、发光检测

- 1) 封闭: 将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 中, 室温下摇床慢摇封闭 1 小时。
- 2) 孵育一抗: 加入用 TBS-T 溶液稀释的一抗溶液中, 单克隆兔抗 GABA_AR 血清 (1:1000) 或单克隆兔抗 mGluR1 血清 (1:1000) 或单克隆小鼠抗 β -actin 血清 (1:5000), 室温下孵育 4 小时后放入 4°C 孵育过夜。
- 3) 孵育二抗: TBS-T 溶液漂洗 3 次后, 加入用 TBS-T 溶液稀释的二抗溶液中, HRP 结合的驴抗兔 IgG (1:5000) 或 HRP 结合的山羊抗小鼠 IgG (1:5000), 室温下孵育 2 小时。
- 4) 发光检测和分析: TBS-T 溶液漂洗 3 次后, 用 ECL 增强发光试剂盒, 避光下按照 1:1 体积比混合 2 种检测试剂, 将发光液滴到膜上放入 Bio-Rad 化学发光仪中, 选择好曝光时间后获取图像, 用其自带的软件进行调整将条带图导出; 条带的密度用 Image J 软件进行分析, 每个样本的蛋白质含量均用蛋白质的密度相对于其对应的 β -actin 密度的比值来标示。

2.10 染色切片观察和图像采集

dmPFC 注射 AAV2/2-CaMKII α -hChR2-EYFP 并将光纤埋置到 vIPAG 内进行 dmPFC-vIPAG 神经通路光遗传研究的动物和注射到 Vgat-Cre 小鼠双侧 dmPFC 内 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrine 进行化学遗传的动物的切片在避光的环境下裱于载玻片上, 用封片剂封片后, 可直接用荧光显微镜 (Olympus BX-60; Tokyo, Japan) 观察 EYFP 和 mCitrine 病毒的注射区和投射区 (用蓝色荧光分别观察 AAV-EYFP

和 AAV-mCitrine 病毒的感染情况)。并用 CCD 摄像系统直接拍照采集图像。免疫荧光组织化学染色的切片用激光共聚焦显微镜 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) 观察并拍照采集图像。不同的荧光蛋白或抗体选择合适的激发波长和发射波长: Alexa488、EYFP 和 FITC 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 520 nm; Alexa594 的激发波长为 594 nm, 发射波长为 618 nm; Alexa647 的激发波长为 647 nm, 发射波长为 666 nm。采用显微镜自带的图像软件 (FV10-ASW 1.7; Olympus) 采集图像, 并存储为 OIB 格式, 用软件将图片的明暗度和对比度调好后输出为 TIFF 格式。对于 DAB 染色的切片用明视野显微镜 (AHBT3, Olympus) 进行观察并采集图像。

2.11 结果统计和分析

参照小鼠脑图谱 (George Paxinos 和 Keith B. J. Franklin 主编, 第 2 版), 对 dmPFC 和 vIPAG 进行边界和亚区的划分。统计时用平均值 \pm 标准误来标示, 并用单或双因素方差分析 (ANOVA) 进行统计分析, $P < 0.05$ 被认为有显著性统计学差异。

3 结果

3.1 化学毁损双侧 dmPFC 对慢性痛及其负性情绪的影响

为了研究 dmPFC-vIPAG 神经通路在慢性痛下行调控中发挥的作用, 我们首先将 KA 立体注射到双侧的 dmPFC 内, 由于 KA 产生的细胞兴奋性毒性非特异性的损毁 dmPFC 内的神经元, 观察化学毁损双侧 dmPFC 后对小鼠基础的机械性痛阈值、慢性痛后的机械性痛敏及小鼠在旷场和高架十字迷宫中行为学的影响 (图 2-1)。

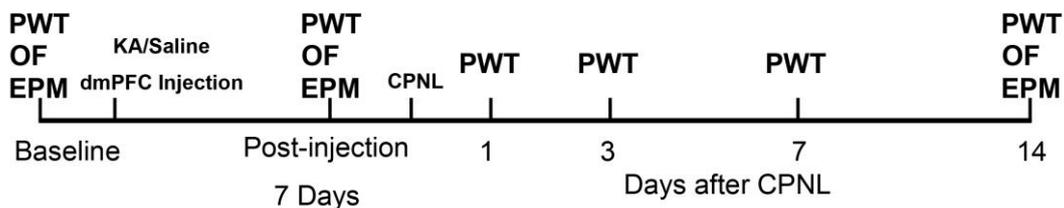


图 2-1 化学毁损双侧 dmPFC 实验过程流程图

CPNL, 腓总神经结扎; EPM, 高架十字迷宫; OF, 旷场实验; PWT, 后足回缩阈值。

为了更清楚的显示 KA 对 dmPFC 的损毁效果, 我们分别通过 Nissl 染色、FOS 免疫组织化学染色和 GFAP/NeuN 免疫荧光双标的方法来确实 KA 对 dmPFC 的化学

毁损。Nissl 染色结果显示注射 KA 后相比较于生理盐水注射到 dmPFC 内, 双侧 dmPFC 内的细胞排列紊乱, 细胞密度明显下降 (图 2-2 A 和 B)。我们进而检测了 CPNL 手术后 dmPFC 内 FOS 蛋白的表达情况, 在生理盐水对照组小鼠 dmPFC 内可见有大量的 FOS 阳性神经元的分布, 说明慢性痛后可以激活 dmPFC 内的一部分神经元; 而注射 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后, 在慢性痛的条件下并未观察到 dmPFC 内有非常密集 FOS 蛋白的表达 (图 2-2 C 和 D)。

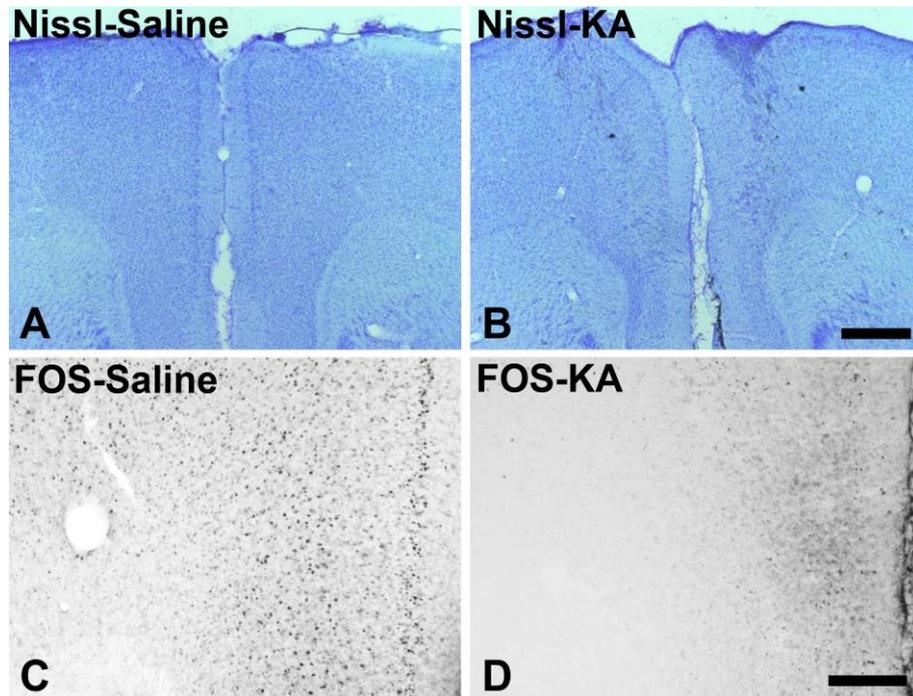


图 2-2 Nissl 染色和免疫组织化学染色显示 KA 注射到 dmPFC 的毁损情况

图 A-B 分别显示生理盐水或 KA 注射到 dmPFC 后 Nissl 染色的情况; 图 C-D 分别显示生理盐水或 KA 注射到 dmPFC 且行 CPNL 手术后, 该核团内 FOS 蛋白的 DAB 染色情况。Scale bars=200 μm (图 B、D, 适用 A、C)

为进一步明确 KA 的化学毁损效果, 根据 KA 毁损后会明显导致胶质细胞增生的特点^[47,138]。我们运用免疫荧光双标的方法检测了星形胶质细胞的标志物 GFAP 和神经元的标志物 NeuN 在 dmPFC 内的表达情况。可观察到注射 KA 化学毁损后注射区内有大量 GFAP 的表达, 明显高于周围的区域, 同时此区域内的 NeuN 表达密度和强度有明显的下降, 低于周围区域的表达 (图 2-3)。这一结果再次展示了 KA 注射到 dmPFC 后确实可以对其产生化学毁损的效果, 因细胞的兴奋性毒性杀死 dmPFC

内的大量神经元，而对神经元的性质并无选择。

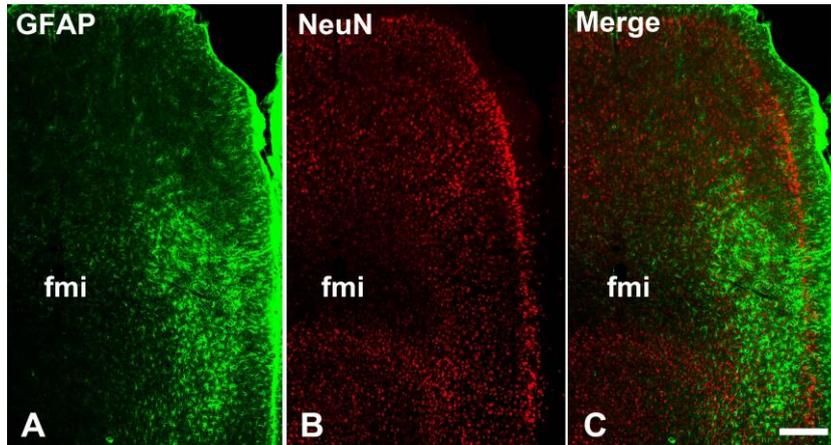


图 2-3 KA 注射到 dmPFC 化学毁损后，免疫荧光双标染色显示 GFAP 和 NeuN 在 dmPFC 内的表达情况

图 A-C 为免疫荧光组织化学双标染色显示的 GFAP 免疫阳性的星形胶质细胞（绿色）和神经元的标志物 NeuN 免疫反应（红色）的共存情况。fmi，胼胝体小钳。Scale bars=5 μ m (图 C, 适用 A、B)

注射 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后会对动物的疼痛阈值产生什么样的作用呢？在注射 KA 7 天后，我们首先检测了对动物基础机械性痛阈的影响。图 2-4 A 所示，注射 KA 毁损双侧 dmPFC 后可显著降低两侧后足的正常疼痛阈值（同侧后足：注射前为 1.16 ± 0.10 g，注射后为 0.56 ± 0.12 g， $P < 0.05$ ，成对 t 检验， $n=5$ ；对侧后足，注射前为 1.16 ± 0.10 g，注射后为 0.56 ± 0.04 g， $P < 0.05$ ，成对 t 检验， $n=5$ ），而双侧注射生理盐水后对同侧后足（注射前为 1.16 ± 0.16 g，注射后为 1.16 ± 0.10 g， $P > 0.05$ ，成对 t 检验， $n=5$ ）和对侧后足（注射前为 1.08 ± 0.15 g，注射后为 1.0 ± 0.18 g， $P > 0.05$ ，成对 t 检验， $n=5$ ）的正常疼痛阈值并无明显的改变。接着我们在 KA 注射 7 天测试完所有的行为学后，在相同的动物上实施腓总神经结扎（CPNL），建立 CPNL 慢性神经病理性痛模型。手术后的第 1、3、7 和 14 天分别监测了动物的手术同侧足和对侧足的机械性痛阈值的改变。腓总神经结扎后无论是同侧后足还是对侧后足随着时间变化均可观察到进行的疼痛改变（图 2-4 B 和 C）。双侧 dmPFC 内注射 KA 化学毁损组动物的机械性痛敏进展更加快，相对于双侧 dmPFC 内注射生理盐水的动物易化了慢性痛的机械性痛敏（同侧后足， $F_{(1, 32)}=6.07$ ， $P=0.04$ ，two-way repeated measures

ANOVA, $n=5$; 对侧后足 $F_{(1,32)}=4.22, P=0.07$, two-way repeated measures ANOVA, $n=5$)。用 Bonferroni posttests 在 CPNL 术后第 3 天可观察到对侧后足显著性地易化疼痛的效果 ($t=2.97, P<0.05$)。为了能够更加灵敏地反应出化学毁损双侧 dmPFC 后对疼痛的易化作用, 我们用正常情况下不会引起疼痛的机械性刺激来观察化学毁损双侧 dmPFC 后对小鼠慢性神经病理性痛后异常性痛的影响。在正常时用 0.04 g 的 vonFrey 丝刺激小鼠的后足并无缩足、添足和抬足等的阳性反应, 化学毁损双侧 dmPFC 后, 后足对该刺激的阳性反应也未见明显的增加 (图 2-4 D, $P>0.05$, 成对 t 检验, $n=5$)。CPNL 后小鼠的同侧后足和对侧后足对这一非伤害性的刺激反应明显增加, KA 化学毁损双侧 dmPFC 后显著易化了这种异常性的疼痛反应 (同侧后足, $F_{(1,32)}=9.80, P=0.014$, two-way repeated measures ANOVA, $n=5$; 对侧后足 $F_{(1,32)}=10.68, P=0.011$, two-way repeated measures ANOVA, $n=5$)。用 Bonferroni posttests 在同侧后足的术后第 3 天 ($t=2.86, P<0.05$), 第 7 天 ($t=3.86, P<0.01$) 和对侧后足的术后第 1 天 ($t=3.43, P<0.01$), 第 3 天 ($t=3.05, P<0.05$), 第 7 天 ($t=3.43, P<0.01$) 均可观察到双侧 dmPFC 化学毁损后对慢性痛的易化作用。

上述疼痛行为学的结果提示我们, 注射 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后不仅可以降低小鼠正常的疼痛阈值, 并且还可降低慢性痛后小鼠的机械性痛阈值, 增加小鼠对非伤害性刺激的反应, 产生更加明显的异常性疼痛。这一系列的改变证实, 化学毁损双侧 dmPFC 后对慢性痛产生了明显的下行易化作用, 或者是将原先 dmPFC 产生的下行镇痛作用明显减弱所导致的易化疼痛阈值的效果。

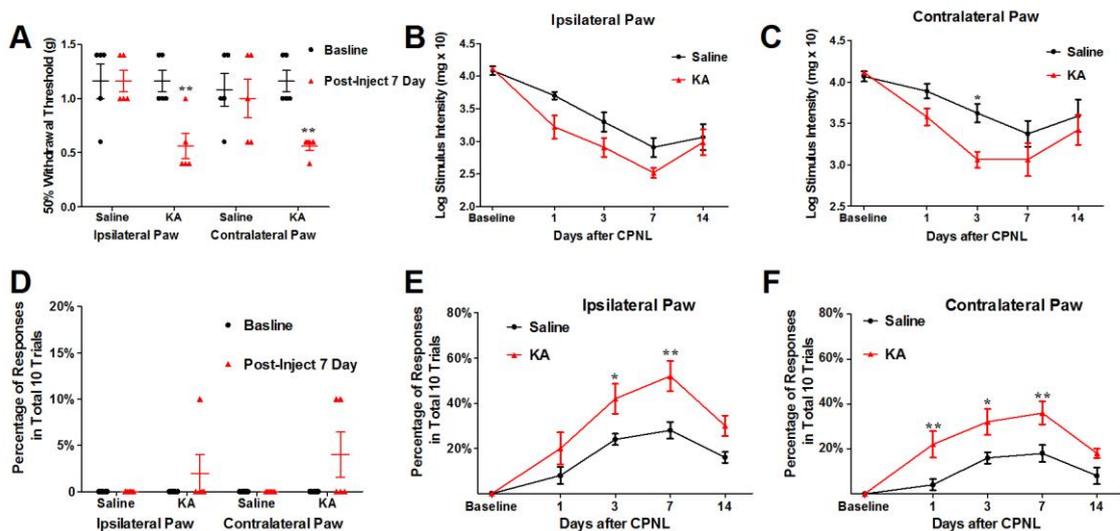


图 2-4 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后对小鼠双侧后足正常疼痛阈值及慢性神经病理性痛后机械性疼痛阈值和异常性疼痛的影响

图 A 显示的为 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后对小鼠双侧后足正常疼痛阈值的影响, $**P<0.01$, 成对 t 检验, $n=5$; 图 B 和 C 显示的为 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后分别对小鼠 CPNL 手术同侧后足($n=5, P=0.04$, two-way repeated measures ANOVA)和对侧后足($n=5, P=0.07$, two-way repeated measures ANOVA)疼痛阈值的影响, 用 Bonferroni posttests 在对侧足的术后第 3 天($t=2.97, P<0.05$)可观察到显著性的易化疼痛的效果; 图 D 显示的为 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后对小鼠双侧后足对非伤害性刺激反应的影响, $n=5$; 图 E 和 F 显示的为 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后分别对小鼠 CPNL 手术同侧后足 ($n=5, P=0.014$, two-way repeated measures ANOVA) 和对侧后足 ($n=5, P=0.011$, two-way repeated measures ANOVA) 对非伤害性刺激反应的影响, 用 Bonferroni posttests 在同侧足的术后第 3 天($t=2.86, P<0.05$), 第 7 天($t=3.86, P<0.01$)和对侧足的术后第 1 天($t=3.43, P<0.01$), 第 3 天($t=3.05, P<0.05$), 第 7 天($t=3.43, P<0.01$)可观察到显著性的易化疼痛的效果; $*P<0.05, **P<0.05$ 。

慢性疼痛往往和负性情绪是相互伴随出现, 并且相互促进的。既然注射 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后可以易化疼痛或是减弱下行镇痛的作用, 那么化学毁损双侧 dmPFC 后对小鼠在旷场和高架十字迷宫内的行为有何种影响呢? 首先我们运用旷场行为学实验测试了注射 KA 7 天后小鼠在旷场内行为学的改变。图 2-5 A 所示, 注射 KA 前、注射 KA 7 天后(毁损双侧 dmPFC)及注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天, 分别记录小鼠在旷场内的行为学轨迹。可以观察到注射 KA 毁损双侧 dmPFC 后小鼠在旷场内的活动轨迹的总路程明显减少, 且多在旷场的四周活动, 在旷场中央区的活动轨迹也明显减少。用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析, 小鼠运动的总路程在 dmPFC 内注射生理盐水各组之间无明显的差异(图 2-5 B, $F_{(2, 8)}=0.11, P=0.90$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, dmPFC 内注射生理盐水 7 天后对小鼠运动的总路程并不会对产生影响($P>0.05$), dmPFC 内注射生理盐水且行 CPNL 术后 14 天对小鼠在旷场内的运动总路程也未产生明显的影响($P>0.05$)。而小鼠旷场中央区活动时间的百分比在 dmPFC 内注射生理盐水各组之间有明显的差异(图 2-5 C, $F_{(2, 8)}=5.97, P=0.03$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, dmPFC 内注射生理盐水后对小鼠旷场中央区活动

时间的百分比并不会对产生影响 ($P>0.05$), dmPFC 内注射生理盐水且行 CPNL 术后 14 天可显著降低动物在旷场中央区内活动时间的百分比 ($P<0.05$)。小鼠运动的总路程在 dmPFC 内注射 KA 化学毁损各组之间有显著性的差异 (图 2-5 B, $F_{(2, 8)}=24.97$, $P<0.001$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, 无论是注射 KA 7 天后 (毁损双侧 dmPFC) ($P<0.05$) 还是注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天 ($P<0.01$) 均可显著性的降低小鼠在旷场内的活动总路程, 但注射 KA 7 天后 (毁损双侧 dmPFC) 和注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天间无明显的差异 ($P>0.05$)。结果类似的是, 小鼠在旷场中央区活动时间的百分比在 dmPFC 内注射 KA 化学毁损各组之间有显著性的差异 (图 2-5 C, $F_{(2, 8)}=9.33$, $P<0.01$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, 无论是注射 KA 7 天后 (毁损双侧 dmPFC) ($P<0.05$) 还是注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天 ($P<0.01$) 均可显著性的降低小鼠在旷场中央区活动时间的百分比, 但注射 KA 7 天后 (毁损双侧 dmPFC) 和注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天间小鼠在旷场中央区活动时间的百分比无明显的差异 ($P>0.05$)。

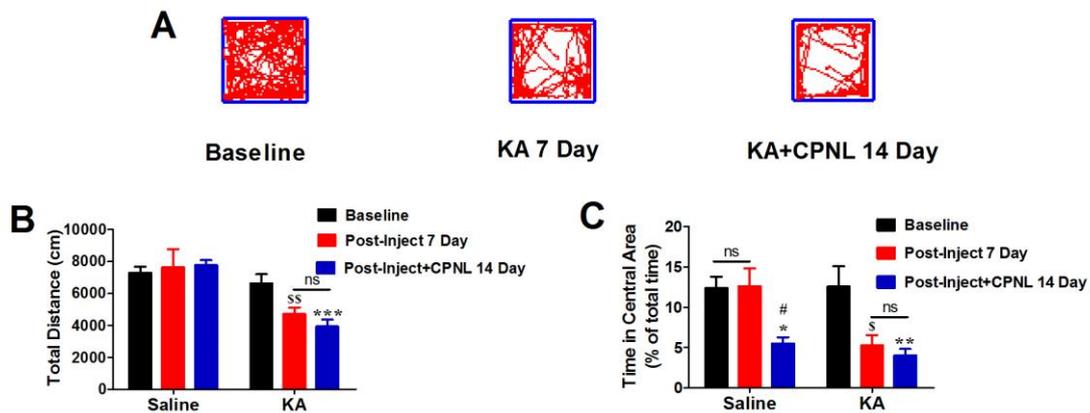


图 2-5 KA 化学毁损双侧 dmPFC 对正常情况及慢性神经病理性痛后小鼠在旷场内行为学的影响

图 A 显示的为注射 KA 前、注射 KA 7 天后 (化学毁损双侧 dmPFC) 及注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天, 小鼠在旷场内的活动轨迹图; 图 B 和 C 分别为对注射生理盐水或 KA 前、注射生理盐水或 KA 7 天后 (化学毁损双侧 dmPFC) 及注射生理盐水或 KA 7 天+CPNL 手术 14 天后小鼠在旷场内的活动总路程和在旷场中央区活动时间百分比的统计图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 为 dmPFC 内注射生理盐水或 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天与注射生理盐水或 KA 前的统计结果, one-way repeated measures ANOVA, Turkey's post hoc 检验, $n=5$; # $P<0.05$, 为 dmPFC

内注射生理盐水或 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天与注射生理盐水或 KA 7 天后的统计结果, one-way repeated measures ANOVA, Turkey's post hoc 检验, $n=5$; $P<0.05$, $P<0.01$ 为 dmPFC 内注射生理盐水或 KA 7 天后与注射生理盐水或 KA 前的统计结果, one-way repeated measures ANOVA, Turkey's post hoc 检验, $n=5$; ns, no significant difference。

接下来, 我们运用高架十字迷宫行为学实验测试了化学毁损双侧 dmPFC 后小鼠的行为学改变。图 2-6 A 所示, 注射 KA 前、注射 KA 7 天后(毁损双侧 dmPFC)及注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天, 分别记录小鼠在高架十字迷宫内的行为学轨迹。可以观察到注射 KA 毁损双侧 dmPFC 后小鼠在开放臂内的活动轨迹明显减少, 相对应的主要是在闭合臂内活动, 进入开放臂内次数也明显减少。用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析, 小鼠在开放臂内活动时间的百分比在 dmPFC 内注射生理盐水各组之间有显著性的差异(图 2-6 B, $F_{(2, 8)}=13.22$, $P<0.01$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, dmPFC 内注射生理盐水后并不会对小鼠在开放臂内活动时间的百分比产生显著的影响($P>0.05$), 但 dmPFC 内注射生理盐水且行 CPNL 手术后 14 天相对与 dmPFC 内注射生理盐水前($P<0.01$)或者单独注射生理盐水($P<0.01$)可显著降低动物在开放臂内活动时间的百分比。结果类似的是, 小鼠进入开放臂内次数的百分比在 dmPFC 内注射生理盐水各组之间有显著性的差异(图 2-6 C, $F_{(2, 8)}=20.28$, $P<0.001$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, dmPFC 内注射生理盐水后并不会对小鼠进入开放臂内次数的百分比产生显著的影响($P>0.05$), 但 dmPFC 内注射生理盐水且行 CPNL 手术后 14 天相对与 dmPFC 内注射生理盐水前($P<0.01$)或者单独注射生理盐水($P<0.01$)可显著降低动物进入开放臂内次数的百分比。小鼠在开放臂内活动时间的百分比在双侧 dmPFC 内注射 KA 化学毁损各组之间有显著性的差异(图 2-6 B, $F_{(2, 8)}=17.34$, $P<0.01$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, 无论是注射 KA 7 天后(毁损双侧 dmPFC)($P<0.01$)还是注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天($P<0.01$)均可显著性的降低小鼠在开放臂内活动时间的百分比, 但注射 KA 7 天后(毁损双侧 dmPFC)和注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天间无明显的差异($P>0.05$)。结果类似的是, 小鼠进入开放臂内次数的百分比在双侧 dmPFC 内注射 KA 化学毁损各组之间也有显著性的差异(图 2-6 C, $F_{(2, 8)}=23.23$, $P<0.001$, one-way repeated

measures ANOVA, $n=5$), 用 Turkey's post hoc 检验, 无论是注射 KA 7 天后 (毁损双侧 dmPFC) ($P<0.01$) 还是注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天 ($P<0.001$) 均可显著性的降低小鼠进入开放臂内次数的百分比, 但注射 KA 7 天后 (毁损双侧 dmPFC) 和注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天间小鼠进入开放臂内次数的百分比无明显的差异 ($P>0.05$)。

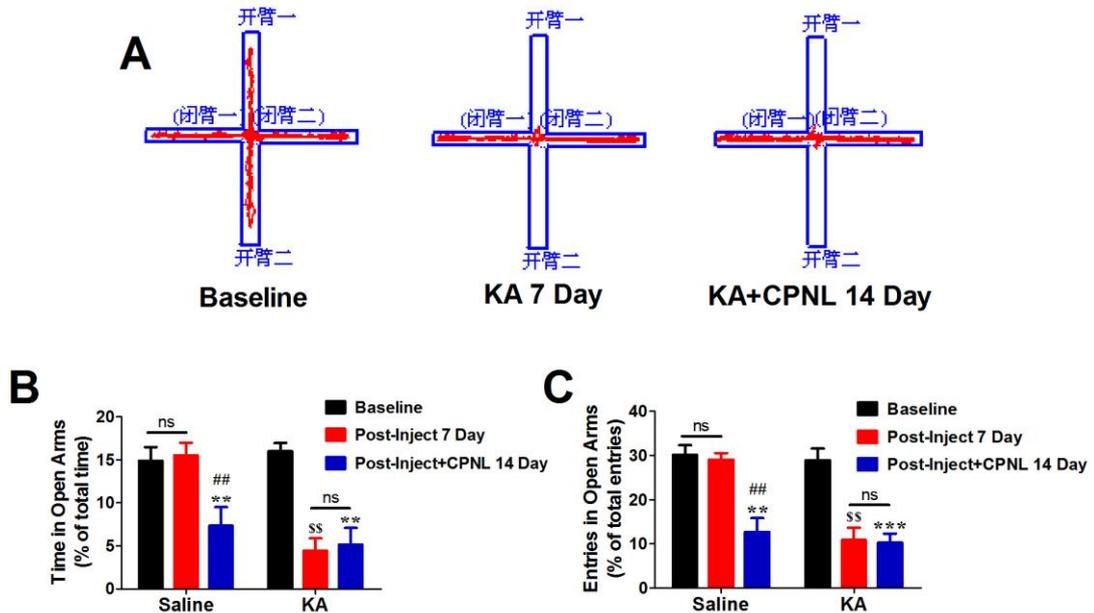


图 2-6 注射 KA 化学毁损双侧 dmPFC 对正常情况及慢性神经病理性痛后小鼠在高架十字迷宫内行为学的影响

图 A 显示的为注射 KA 前、注射 KA 7 天后 (化学毁损双侧 dmPFC) 及注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫内的活动轨迹图; 图 B 和 C 分别为对注射 KA 前、注射 KA 7 天后 (化学毁损双侧 dmPFC) 及注射 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫开放臂内停留时间百分比和进入开放臂次数百分比的统计图。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 为 dmPFC 内注射生理盐水或 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天与注射生理盐水或 KA 前的统计结果, one-way repeated measures ANOVA, Turkey's post hoc 检验, $n=5$; ### $P<0.05$, 为 dmPFC 内注射生理盐水或 KA 7 天+CPNL 手术后 14 天与注射生理盐水或 KA 7 天后的统计结果, one-way repeated measures ANOVA, Turkey's post hoc 检验, $n=5$; \$\$\$ $P<0.05$, 为 dmPFC 内注射生理盐水或 KA 7 天后与注射生理盐水或 KA 前的统计结果, one-way repeated measures ANOVA, Turkey's post hoc 检验, $n=5$; ns, no significant difference。

旷场和高架十字迷宫行为学的结果提示我们，注射 KA 化学毁损双侧 dmPFC 后不仅可以降低小鼠在旷场中央区活动时间的百分比，并且还可降低小鼠在旷场内的活动总路程，同时降低小鼠在高架十字迷宫开放臂中停留时间的百分比和进入开放臂次数的百分比。这一系列的改变证实，毁损双侧 dmPFC 后本身可对动物产生焦虑抑郁样的行为学改变，CPNL 手术后同样可对动物产生焦虑抑郁样的行为学改变。但在毁损双侧 dmPFC 后并未加重 CPNL 手术后的负性情绪。

3.2 光遗传学方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛和负性情绪的影响

为了能够进一步的研究 dmPFC-vIPAG 神经通路在慢性疼痛下行调控和负性情绪调控中的作用，我们运用光遗传学的方法，将以 CaMKII α 为启动子带有 hChR2 的病毒注射到 dmPFC 内后，将光纤埋置于 vIPAG 处蓝光激活表达 hChR2 从 dmPFC 投射来的神经纤维观察对慢性痛的机械性痛敏和慢性痛产生的负性情绪的影响（工作模式见图 2-7 A）。

图 2-7 B 中的流程图可以更清楚的显示光遗传学的方法激活 dmPFC-vIPAG 神经通路来进行疼痛和负性情绪的检测。我们将 dmPFC 内注射区的图片直接进行观察 AAV 对锥体神经元的感染情况，可观察到大量的锥体神经元被感染表达 EYFP（图 2-8 A 和 B）。并且锥体神经元的顶树突也被很好的标记，在高倍镜图像下可观察到顶树突上有大量蘑菇状的树突棘样结构（图 2-8 C 和 D）。

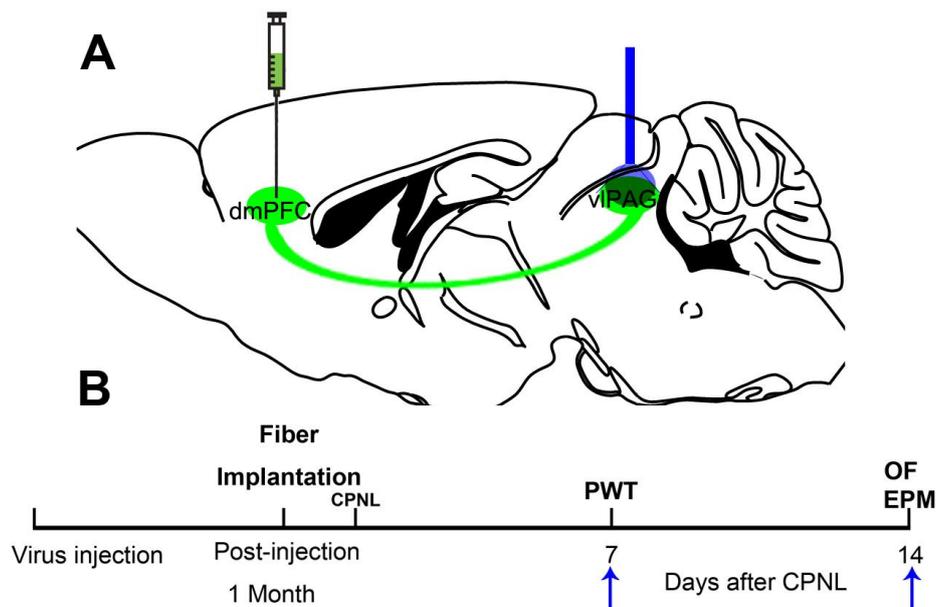


图 2-7 A 光遗传学激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性疼痛调控和负性情绪影响的模式图；图 B

为光遗传学方法测试时，实验过程流程图（缩略词同上）。

图中蓝色的箭头为给予蓝光刺激分别检测不同的行为学。

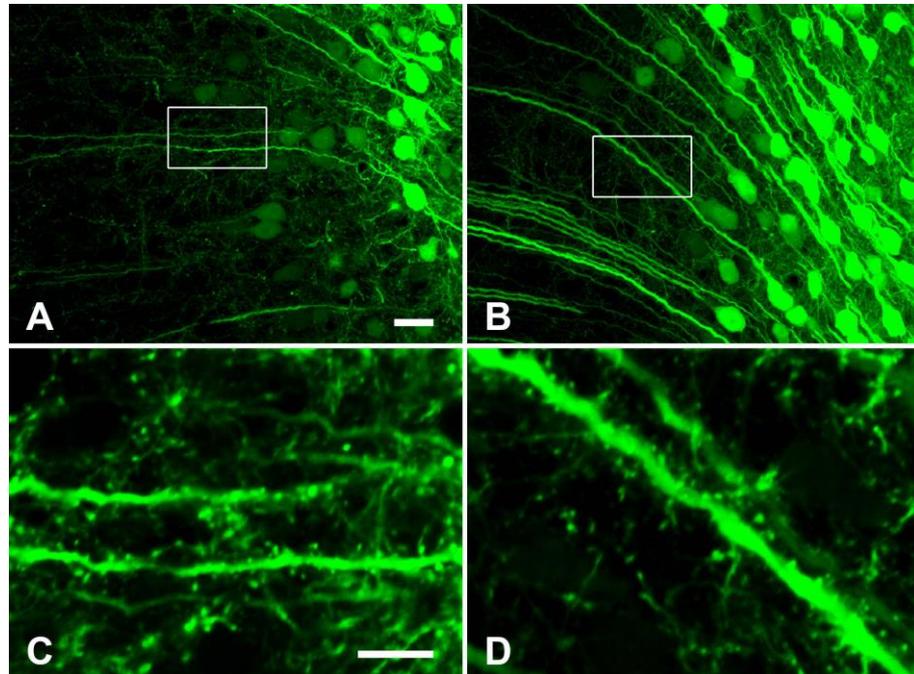


图 2-8 激光共聚焦显微镜观察 AAV 病毒注射到 dmPFC 后对锥体神经元的感染、表达情况

图 A 和 B 分别显示的为 dmPFC 内锥体神经元被 AAV 病毒感染后表达 EYFP 的情况，图 C 和 D 分别显示的为图 A 和 B 中白色方框内的放大图像，可见顶树突上的树突棘样结构。Scale bars=20 μm (图 A, 适用 B), 10 μm (图 C, 适用 D)

完成所有的行为学检测，蓝光刺激 vIPAG 后观察 vIPAG 内 EYFP 标记的从 dmPFC 投射来的纤维终末和 FOS 蛋白的共存情况（图 2-9）。蓝光刺激后在 vIPAG 内可观察到许多 EYFP 标记的纤维终末和大量 FOS 蛋白的表达，且 FOS 阳性的神经元多位于 EYFP 标记神经纤维的附近，说明 vIPAG 内的神经元被激活、活化，间接的证明了 dmPFC-vIPAG 神经通路被激活。

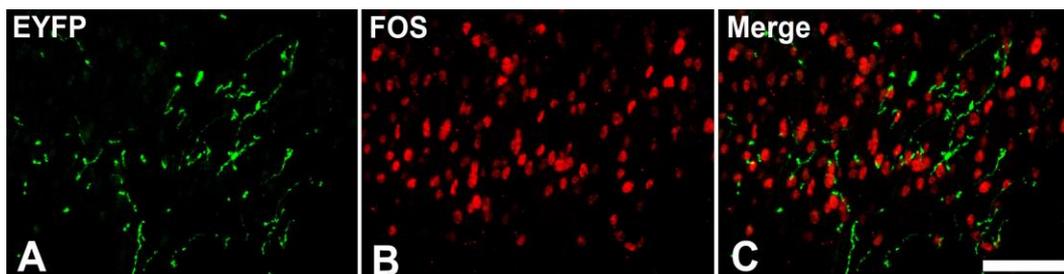


图 2-9 免疫荧光双标染色显示 EYFP 和 FOS 蛋白在蓝光刺激后在 vIPAG 内的表达情况

图 A-C 为免疫荧光组织化学双标染色显示 EYFP 标记的从 dmPFC 投射来的纤维终末(绿色)和神经元被活化的标志物 FOS 蛋白免疫反应阳性(红色)的表达、共存情况。Scale bars=50 μm (图 C, 适用 A、B)

图 2-10 A 和 B 展示了在给予 vIPAG 内 10 mW、20 Hz 的蓝光刺激，2 分钟开-2 分钟关-2 分钟开的刺激模式时对 CPNL 手术后第 7 天小鼠同侧后足和对侧后足的机械性疼痛阈值进行检测，在刺激前和刺激后 1 小时同样对小鼠同侧后足和对侧后足的机械性疼痛阈值进行检测。

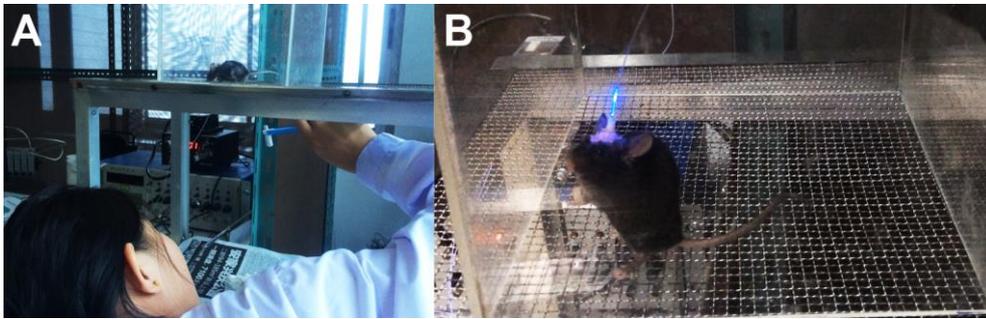


图 2-10 A 和 B 为光遗传学方法测试时，给予光照刺激检测小鼠后足机械性缩足阈值。

在 dmPFC 内注射对照病毒（不带有 hChR2）的小鼠中，CPNL 手术后第 7 天同侧后足和对侧后足均出现了机械性痛敏，光照刺激时对小鼠 CPNL 手术同侧后足（图 2-11, $F_{(2, 8)}=0.29, P=0.75$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$ ）和对侧后足（ $F_{(2, 8)}=0.50, P=0.62$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$ ）机械性痛敏均未观察到明显的改变。在 dmPFC 内注射带有 hChR2 的病毒后，蓝光持续刺激时，可显著的改善甚至逆转 CPNL 手术同侧后足（图 2-11, $F_{(2, 8)}=57.57, P<0.001$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$ ）和对侧后足（ $F_{(2, 8)}=42.79, P<0.001$, one-way repeated measures ANOVA, $n=5$ ）的机械性痛阈值。用 Turkey's post hoc 检验，给予光照前和光照后同侧后足（ $P>0.05$ ）和对侧后足（ $P>0.05$ ）的机械性痛敏无明显的差异。

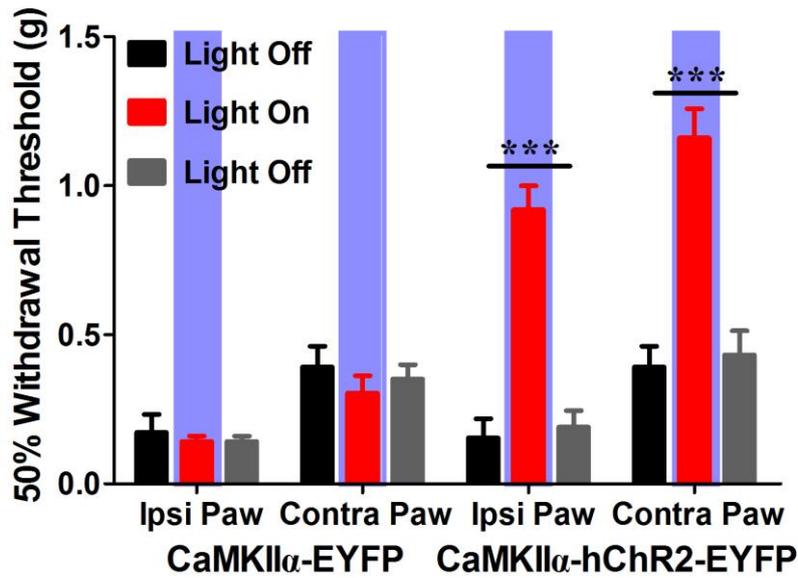


图 2-11 光遗传学方法检测激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对 CPNL 手术后第 7 天小鼠双侧后足机械性痛阈值的影响

分别在蓝光刺激前、后 1 小时及蓝光持续刺激（10 mW, 20 Hz, 2 分钟开-2 分钟关-2 分钟开模式）时用 vonFrey 丝检测小鼠在 CPNL 手术后第 7 天同侧后足和对侧后足的机械性痛阈值。*** $P < 0.001$ ，为光照刺激前、刺激时及刺激后 3 组间的统计学差异，one-way repeated measures ANOVA, $n=5$ 每组。

运用光遗传学的方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对 CPNL 手术后 14 天的小鼠在旷场中行为学的影响（图 2-12）。图 2-13 A 所示为其中一只感染 hChR2 病毒的小鼠放到旷场内后在 9 分钟内的活动轨迹图，蓝光刺激频率和强度同前面所述，刺激参数为 3 分钟关-3 分钟开-3 分钟关，可以观察到给予蓝光刺激前和蓝光刺激时小鼠在旷场内的活动轨迹的总路程无明显的差异，在旷场中央区的活动轨迹有一定的增加。用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析，dmPFC 内注射表达 hChR2 的病毒相对于 dmPFC 内注射对照病毒（不表达 hChR2），在蓝光刺激时对 CPNL 手术后 14 天小鼠的运动总路程并未产生明显的改变作用（图 2-13 B, $F_{(1, 16)}=1.09$, $P=0.33$, two-way repeated measures ANOVA, 后用 Bonferroni posttests, $t=0.70$, $P>0.05$, $n=5$), CPNL 手术后 14 天小鼠的运动总路程在蓝光刺激前 ($t=0.22$, $P>0.05$) 和蓝光刺激后 ($t=0.34$, $P>0.05$) 两组之间也无明显差异。同样，dmPFC 内注射表达 hChR2 的病毒相对于 dmPFC 内注射对照病毒（不表达 hChR2），在蓝光刺激前后对 CPNL 手术后

14 天小鼠在旷场中央活动时间的百分比也未产生明显的改变 (图 2-13 C, $F_{(1, 16)}=0.40$, $P=0.54$, two-way repeated measures ANOVA, 后用 Bonferroni posttests, $t=0.99$, $P>0.05$, $n=5$), CPNL 手术后 14 天小鼠旷场中央活动时间的百分比在蓝光刺激前 ($t=0.08$, $P>0.05$) 和蓝光刺激后 ($t=0.32$, $P>0.05$) 两组之间也无明显差异。

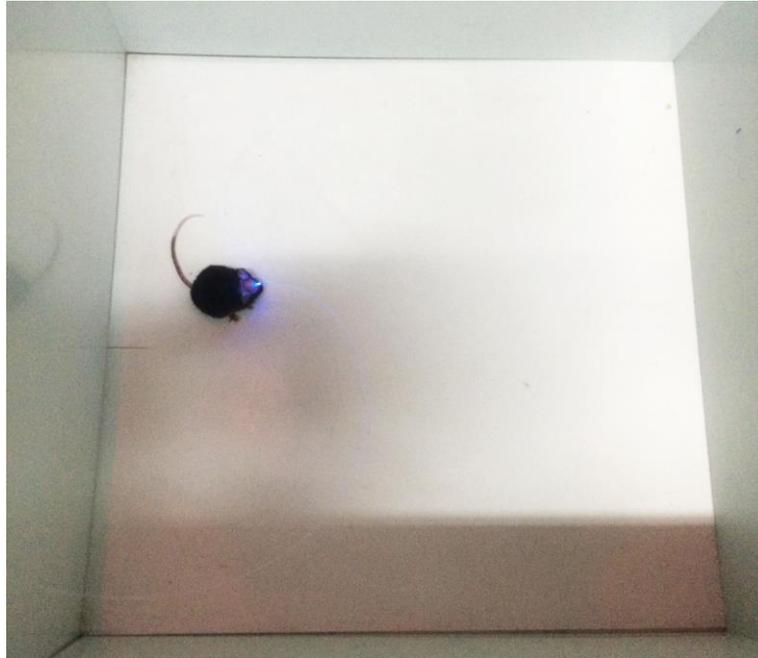


图 2-12 光遗传学方法激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对小鼠在旷场中行为的影响

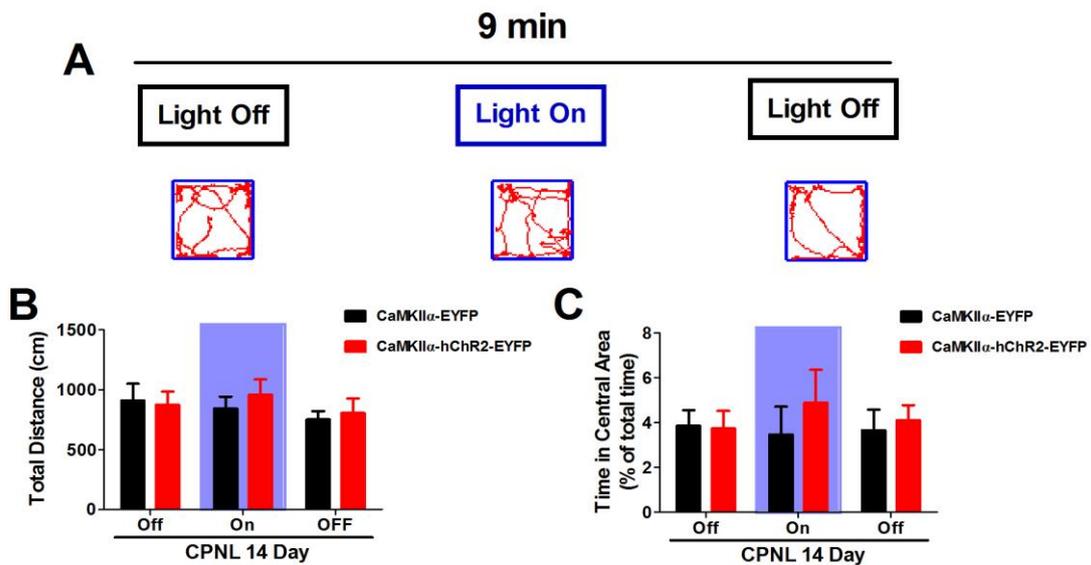


图 2-13 光遗传学方法激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对 CPNL 术后 14 天小鼠在旷场中行为的影

响

图 A 为蓝光刺激前、蓝光刺激、蓝光刺激后 CPNL 术后 14 天小鼠在旷场内的活动轨迹图，3 分钟关-3 分钟开-3 分钟关，总共 9 分钟；图 B 和 C 分别为蓝光刺激前、蓝光刺激、蓝光刺激后 CPNL 术后 14 天小鼠在旷场内的活动总路程和在旷场中央活动时间百分比的统计图。表达光敏通道蛋白病毒和对照病毒的各组之间均无明显的统计学差异，two-way repeated measures ANOVA，后用 Bonferroni posttests， $n=5$ 每组。

与之前相似，我们运用光遗传学方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对 CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫中行为学改变进行了检测。图 2-14 A 所示为其中一只感染 hChR2 病毒的小鼠放到高架十字迷宫内在 9 分钟内的活动轨迹图，蓝光刺激频率和强度同前面所述，刺激参数为 3 分钟关-3 分钟开-3 分钟关，可以观察到给予蓝光刺激时相比较蓝光刺激前及蓝光刺激后小鼠在高架十字迷宫开放臂内的活动轨迹明显增加，相对应的在闭合臂内的活动减少，进入开放臂内次数也明显增加。用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析，dmPFC 内注射表达 hChR2 的病毒相对于 dmPFC 内注射对照病毒（不表达 hChR2），蓝光刺激时对 CPNL 手术后 14 天小鼠在开放臂内活动时间的百分比（图 2-14 B, $F_{(1,16)}=21.12$, $P<0.01$, two-way repeated measures ANOVA，后用 Bonferroni posttests, $t=8.65$, $P<0.001$, $n=5$ ）和进入开放臂内次数的百分比（图 2-14 C, $F_{(1,16)}=47.95$, $P<0.001$, two-way repeated measures ANOVA，后用 Bonferroni posttests, $t=11.37$, $P<0.001$, $n=5$ ）均有显著性的提高。但是 dmPFC 内注射表达 hChR2 的病毒相对于 dmPFC 内注射对照病毒（不表达 hChR2），在蓝光刺激前和蓝光刺激后对 CPNL 手术后 14 天的小鼠在开放臂内活动时间的百分比（蓝光刺激前： $t=0.49$, $P>0.05$ ；蓝光刺激后： $t=0.60$, $P>0.05$ ）和进入开放臂内次数的百分比（蓝光刺激前： $t=0.47$, $P>0.05$ ；蓝光刺激后： $t=0.19$, $P>0.05$ ）均无明显的差异。

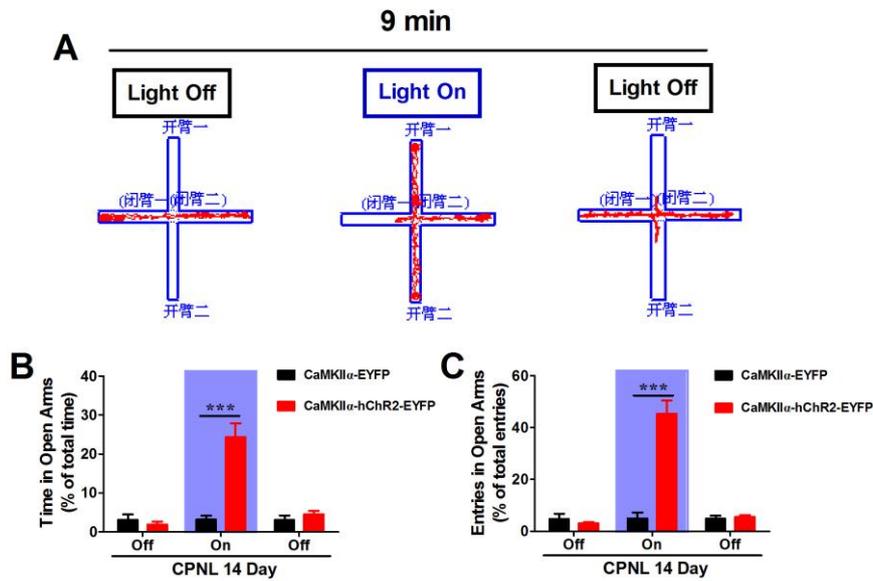


图 2-14 光遗传学方法激活 dmPFC-vIPAG 神经通路对 CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫中行为的影响

图 A 显示的为蓝光刺激前、蓝光刺激、蓝光刺激后 CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫内的活动轨迹图，3 分钟关-3 分钟开-3 分钟关，总共 9 分钟；图 B 和图 C 分别为蓝光刺激前、蓝光刺激、蓝光刺激后 CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫开放臂内停留时间百分比和进入开放臂次数百分比的统计图。two-way repeated measures ANOVA，后用 Bonferroni posttests，*** $P < 0.001$ ，为 dmPFC 内注射 CaMKII α -EYFP 病毒和注射 CaMKII α -hChR2-EYFP 病毒间的统计结果， $n=5$ 每组。

借助光遗传学的方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路后，可改善甚至逆转 CPNL 手术后 7 天小鼠双侧后足的机械性痛敏，虽然对 CPNL 手术后 14 天小鼠在旷场中的行为学无明显的影响改变，但可显著性地增加小鼠在高架十字迷宫内进入开放臂内时间的百分比和进入开放臂内次数的百分比。这些结果提示，特异性的激活 dmPFC-vIPAG 神经通路确实可以产生下行镇痛的作用，并且可在一定程度上改善慢性痛后产生的负性情绪。

3.3 化学遗传学方法特异性激活 dmPFC 内的抑制性中间神经元对慢性痛和负性情绪的影响

为了能够深入的探讨 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性疼痛的下行镇痛作用和改善

慢性痛后负性情绪的机制，我们运用化学遗传学的方法，将可激活神经元活动的病毒选择性的表达于 dmPFC 内的抑制性中间神经元中，用腹腔注射氯氮平（CNO）特异性的激活 dmPFC 内的抑制性神经元进而抑制 dmPFC-vIPAG 神经通路的活动观察对小鼠基础的疼痛阈值、慢性神经病理性痛机械性痛敏及在旷场和高架十字迷宫内的行为学改变 (图 2-15)。

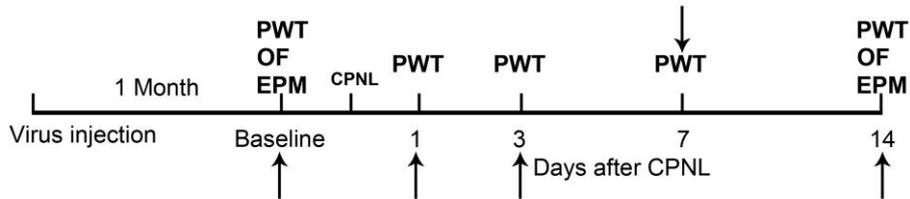


图 2-15 化学遗传学方法测试时，实验过程的流程图。

图中箭头所示为在正常时，CPNL 术后 1 天、3 天、7 天及 14 天分别进行腹腔注射 CNO 溶液。

图 2-16 A 中显示了在双侧 dmPFC 内注射 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrin 后感染 Vgat-Cre 小鼠中抑制性中间神经元的情况。对 mCitrin 进行 GFP 的免疫荧光染色后，高倍镜图像下可观察到在其中一侧的 dmPFC 内有大量的 GFP 免疫阳性的神经元，排列没有明显的规则，神经元的体积较小，发出的树突结构比较短 (图 2-16 B 和 C)。

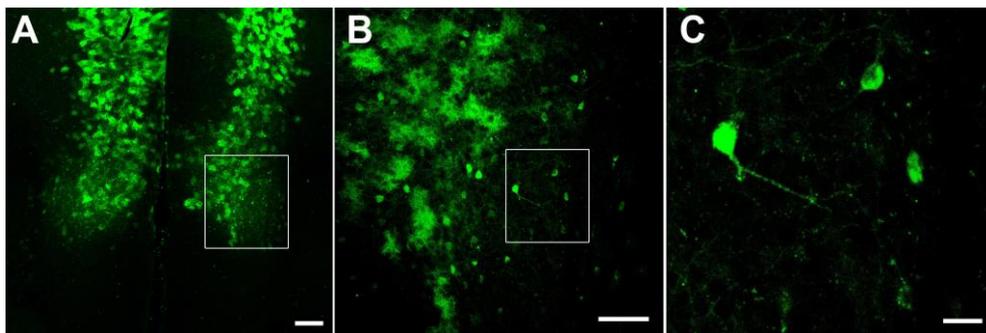


图 2-16 激光共聚焦显微镜观察 AAV 病毒注射到 dmPFC 后对抑制性中间神经元的感染、表达情况

图 A 显示的为 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrin 注射到 Vgat-cre 小鼠双侧 dmPFC 内后，抑制性中间神经元被 AAV 病毒感染后表达 mCitrin，进行 GFP 免疫荧光组织化学染色的情况，图 B 显示的为图 A 中白色方框内的放大图像，图 C 显示的为图 B 中白色方框内的放大图像，神经元体积小，树突短小。Scale bars=200 μm (图 A)，100 μm (图 B)，20 μm (图 C)

在腹腔注射 CNO 1 mg/kg 完成行为学测试后, 将小鼠灌注进行免疫荧光组织化学三标染色。可观察到 GFP 免疫阳性的 mCitrin 标记的神经元可表达抑制性中间神经元的标志物 GAD67, 同时双标的神经元还可表达神经元激活的标志物 FOS 蛋白(图 2-17)。免疫荧光三标的结果提示我们注射病毒后确实特异性的感染了 dmPFC 内的抑制性中间神经元, 并且在腹腔注射 CNO 后也确实可将其特异性的激活。

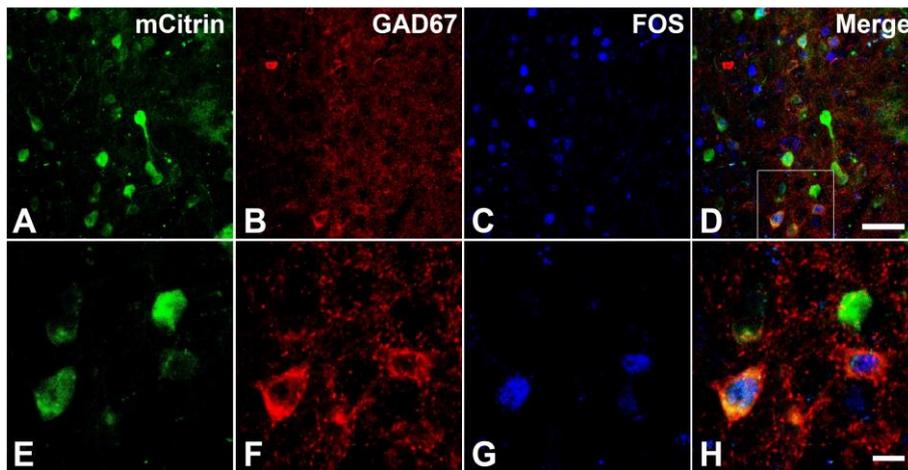


图 2-17 免疫荧光组织化学三标染色显示 dmPFC 内病毒感染的标记物 mCitrin、抑制性神经元的标志物 GAD67 和 FOS 蛋白的共存情况

图 A-D 显示的分别为 AAV2/4-hSyn-DIO-HA-hM3Dq-mCitrin 注射到 Vgat-cre 小鼠双侧 dmPFC 内后病毒感染的标记物 mCitrin (绿色), 抑制性神经元的标志物 GAD67 (红色) 和神经元激活的标志物 FOS 蛋白 (蓝色) 的免疫荧光三标染色情况; 图 E-H 显示的为图 D 中白色方框内的放大图像, 可见 mCitrin 标记的神经元可同时表达 GAD67 和 FOS。Scale bars=40 μm (图 D, 使用 A-C), 10 μm (图 H, 适用 E-G)

运用化学遗传学的方法特异性激活双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元进而抑制 dmPFC-vIPAG 神经通路会对动物的基础痛阈值和慢性神经病理性痛的机械性痛敏产生什么样的作用呢? 待病毒感染 4 周后, 我们首先检测了对小鼠正常疼痛阈值的影响。测试完小鼠双侧后足的基础痛阈值后, 腹腔注射 50 μl 用生理盐水配制的 1 mg/kg 的 CNO 溶液, 30 分钟后再次用 vonFrey 丝进行检测双侧后足的机械性痛阈值。图 2-18 所示, 正常情况下特异性激活双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元后可观察到显著性地降低双侧后足的正常疼痛阈值 (同侧后足: 注射前为 1.10 ± 0.13 g, 注射

后为 0.42 ± 0.06 g, $P < 0.01$, 成对 t 检验, $n=8$; 对侧后足: 注射前为 1.00 ± 0.11 g, 注射后为 0.45 ± 0.05 g, $P < 0.01$, 成对 t 检验, $n=8$), 而双侧注射对照病毒(不带有 hM3Dq 的病毒)的小鼠注射 CNO 溶液后对后足的正常疼痛阈值并无明显的改变(同侧后足: 注射前为 1.00 ± 0.11 g, 注射后为 0.95 ± 0.09 g, $P=0.82$, 成对 t 检验, $n=8$; 对侧后足: 注射前为 1.10 ± 0.10 g, 注射后为 0.95 ± 0.12 g, $P=0.36$, 成对 t 检验, $n=8$)。接下来在完成测试后, 在相同的动物上实施腓总神经结扎, 建立 CPNL 慢性神经病理性痛模型。手术后的第 1、3、7 和 14 天分别监测了 CPNL 手术同侧足和对侧足的机械性痛阈值的改变。腓总神经结扎后无论是同侧足还是对侧足随着时间的迁延均可观察到进行的疼痛改变(图 2-18)。在每次常规测试后间隔 1 小时腹腔注射 CNO 溶液再次检测双侧后足的疼痛阈值。双侧 dmPFC 注射带有 hM3Dq 病毒的小鼠, 腹腔注射 CNO 后可以在 CPNL 术后显著的降低双侧后足机械性疼痛阈值, 即可减弱 dmPFC-vIPAG 神经通路的下行镇痛作用(同侧后足, $F_{(1, 56)}=19.53$, $P < 0.001$, two-way repeated measures ANOVA, $n=8$ 每组; 对侧后足, $F_{(1, 56)}=5.65$, $P < 0.05$, two-way repeated measures ANOVA, $n=8$ 每组), 而后用 Bonferroni posttests, 小鼠注射 CNO 后可显著降低 CPNL 术后第 1 天 ($t=3.04$, $P < 0.05$) 和第 3 天 ($t=2.68$, $P < 0.05$) 同侧后足的机械性疼痛阈值。双侧注射对照病毒(不带有 hM3Dq 的病毒)的小鼠注射 CNO 后对 CPNL 术后双侧后足的机械性疼痛阈值并无明显的改变(同侧后足, $F_{(1, 56)}=1.46$, $P=0.24$, two-way repeated measures ANOVA, $n=8$ 每组; 对侧后足, $F_{(1, 56)}=1.09$, $P=0.31$, two-way repeated measures ANOVA, $n=8$ 每组)。

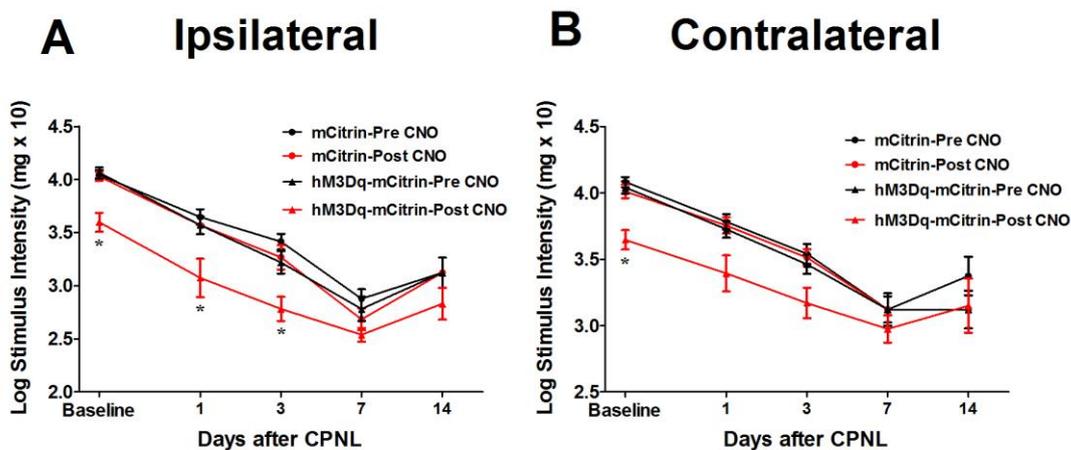


图 2-18 化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性中间神经元后对正常疼痛阈值及慢性

神经病理性痛后疼痛阈值的影响

图 A 显示的为用化学遗传学的方法特异性激活 dmPFC 内的抑制性中间神经元后对小鼠 CPNL 手术同侧后足正常疼痛阈值的影响及 CPNL 手术后第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天机械性疼痛阈值的影响, 同时以 dmPFC 内注射对照病毒(不带有 hM3Dq 的病毒)的小鼠作为对照, 图 B 显示的为特异性激活抑制性神经元后对 CPNL 手术对侧后足的机械性阈值的影响。Two-way repeated measures ANOVA, 后用 Bonferroni posttests, $*P<0.05$, 为 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒后, 腹膜腔注射 CNO 后和注射 CNO 前的统计结果, $n=8$ 每组。

既然化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性神经元后可减弱 dmPFC-vIPAG 神经通路的下行镇痛的作用, 那么特异性激活抑制性神经元后对负性情绪又会有何种影响呢? 首先我们运用旷场行为学实验测试了化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性神经元后小鼠在旷场内行为学的改变。仍如前所述, 在进行行为学测试前 30 分钟, 小鼠腹膜腔内注射 $50 \mu\text{l}$ 1 mg/kg 的 CNO 溶液或者生理盐水。图 2-19 A 和 C 所示, 双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒或 hM3Dq-mCitrin 病毒小鼠在腹膜腔分别注射生理盐水或 CNO 溶液后放入旷场内, 分别记录小鼠在旷场内的行为学轨迹。用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析, 双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠相对于注射 mCitrin 病毒的小鼠腹膜腔注射 1 mg/kg 的 CNO 后可显著降低其在旷场内的运动总路程(图 2-19 A, $F_{(1,12)}=5.13$, $P=0.04$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=3.71$, $P<0.01$, $n=4$ 每组), 而腹膜腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠和注射 mCitrin 病毒的小鼠在旷场内的运动总路程无明显差别 ($t=0.51$, $P>0.05$, $n=4$ 每组)。同时, 双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠相对于双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒的小鼠腹膜腔注射 1 mg/kg 的 CNO 溶液可显著降低小鼠在旷场中央区活动时间的百分比(图 2-19 B, $F_{(1,12)}=6.22$, $P=0.03$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=2.99$, $P<0.05$, $n=4$ 每组), 而腹膜腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠和注射 mCitrin 病毒的小鼠在旷场中央区活动时间的百分比无明显差别 ($t=0.54$, $P>0.05$, $n=4$ 每组)。接下来在完成测试后, 在 CPNL 慢性神经病理性痛模型手术后的第 14 天再次测试化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性神经元后小鼠在旷场内行为学的改变。在 CPNL 手术后 14 天的小鼠中, dmPFC 内表达 hM3Dq-mCitrin 的

小鼠相对于 dmPFC 内表达 mCitrin 的小鼠腹腔注射 CNO 后可显著降低其在旷场内的运动总路程（图 2-19 C, $F_{(1,12)}=12.87$, $P=0.003$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=4.23$, $P<0.01$, $n=4$ 每组），而腹腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒和注射 mCitrin 病毒的 CPNL 手术后 14 天小鼠在旷场内的运动总路程无明显差别（ $t=0.84$, $P>0.05$, $n=4$ 每组）。同样 CPNL 手术后 14 天的小鼠中，dmPFC 内表达 hM3Dq-mCitrin 的小鼠相对于 dmPFC 内表达 mCitrin 的小鼠腹腔注射 CNO 后可显著降低其在旷场中央区活动时间的百分比（图 2-19 D, $F_{(1,12)}=5.92$, $P=0.03$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=2.83$, $P<0.05$, $n=4$ 每组），而腹腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒和注射 mCitrin 病毒的 CPNL 手术后 14 天小鼠在旷场中央区活动时间的百分比无明显差别（ $t=0.61$, $P>0.05$, $n=4$ 每组）。

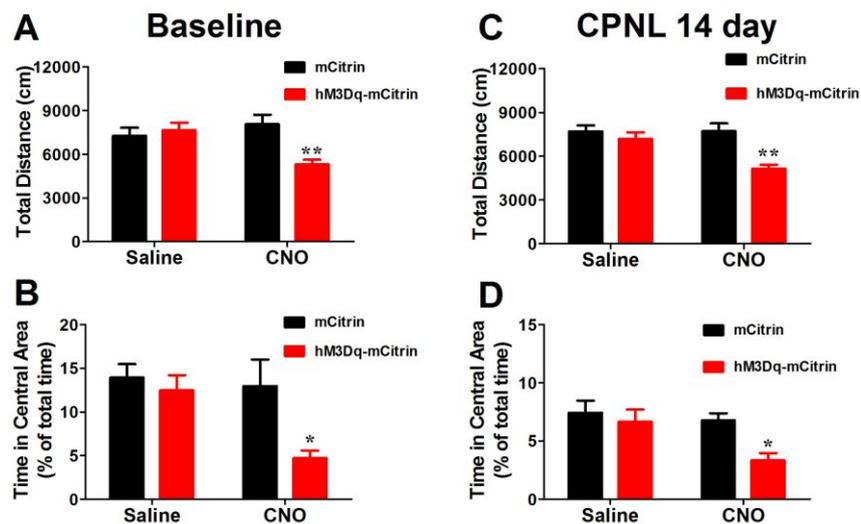


图 2-19 化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性中间神经元对正常情况及慢性神经病理性痛后小鼠在旷场内行为学的影响

图 A 和 B 显示的为正常情况下双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒或 hM3Dq-mCitrin 病毒小鼠，腹腔注射生理盐水或 1 mg/kg 的 CNO 溶液对小鼠在旷场内活动总路程和旷场中央区活动时间百分比的影响；图 C 和 D 显示的为 CPNL 手术后 14 天双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒或 hM3Dq-mCitrin 病毒小鼠，腹腔注射生理盐水或 1 mg/kg 的 CNO 溶液对小鼠在旷场内活动总路程和旷场中央区活动时间百分比的影响。Two-way ANOVA, 后用 Bonferroni posttests, $*P<0.05$, $**P<0.01$, 为 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒小鼠在正常情况或 CPNL 手术后 14 天与 dmPFC

内注射 mCitrin 病毒小鼠间的统计结果, n=4 每组。

接下来, 我们运用高架十字迷宫行为学实验测试了特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性神经元后小鼠在正常情况下和 CPNL 手术后 14 天在高架十字迷宫内行为学改变。在正常情况下, 双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠相对于注射 mCitrin 病毒的小鼠腹腔注射 1 mg/kg 的 CNO 后可显著降低其在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比 (图 2-20 A, $F_{(1,12)}=8.85$, $P=0.009$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=4.22$, $P<0.01$, n=4 每组), 而腹腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠和注射 mCitrin 病毒的小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比无明显差别 ($t=0.02$, $P>0.05$, n=4 每组)。结果类似的是, 双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠相对于 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒的小鼠腹腔注射 1 mg/kg 的 CNO 溶液可显著降低小鼠进入开放臂内活动次数的百分比 (图 2-20 B, $F_{(1,12)}=10.55$, $P=0.007$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=4.22$, $P<0.01$, n=4 每组), 而腹腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠和注射 mCitrin 病毒的小鼠进入开放臂内活动次数的百分比无明显差别 ($t=0.37$, $P>0.05$, n=4 每组)。在 CPNL 慢性神经病理性痛模型手术后的第 14 天同样测试了化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性神经元后小鼠在高架十字迷宫内行为学的改变。CPNL 手术后 14 天的小鼠中, dmPFC 内表达 hM3Dq-mCitrin 的小鼠相对于 dmPFC 内表达 mCitrin 的小鼠腹腔注射 CNO 后可显著降低其在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比 (图 2-20 C, $F_{(1,12)}=5.32$, $P=0.04$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=2.95$, $P<0.05$, n=4 每组), 而腹腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒和注射 mCitrin 病毒的 CPNL 手术后 14 天小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比无明显差别 ($t=0.31$, $P>0.05$, n=4 每组)。同样 CPNL 手术后 14 天的小鼠中, dmPFC 内表达 hM3Dq-mCitrin 的小鼠相对于 dmPFC 内表达 mCitrin 的小鼠腹腔注射 CNO 后可显著降低其进入开放臂内活动次数的百分比 (图 2-20 D, $F_{(1,12)}=5.05$, $P=0.04$, two-way ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=4.14$, $P<0.01$, n=4 每组), 而腹腔注射生理盐水后双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒和注射 mCitrin 病毒的 CPNL 手术后 14 天小鼠进入开放臂内活动次数的百分比无明显差别 ($t=0.96$, $P>0.05$, n=4 每组)。

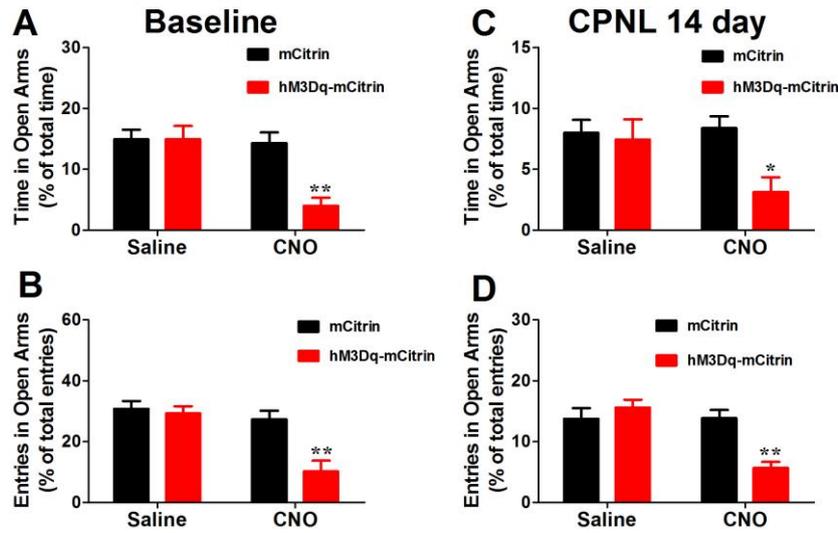


图 2-20 化学遗传学方法特异性激活双侧 dmPFC 内抑制性中间神经元对正常情况及慢性神经病理性痛后小鼠在高架十字迷宫内行为学的影响

图 A 和 B 显示的为正常情况下双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒或 hM3Dq-mCitrin 病毒小鼠，腹腔注射生理盐水或 1 mg/kg 的 CNO 溶液对小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间百分比和进入开放臂内次数百分比的影响；图 C 和 D 显示的为 CPNL 手术后 14 天双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒或 hM3Dq-mCitrin 病毒的小鼠，腹腔注射生理盐水或 1 mg/kg 的 CNO 溶液对小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间百分比和进入开放臂内活动次数百分比的影响。Two-way ANOVA，后用 Bonferroni posttests，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，为双侧 dmPFC 内注射 hM3Dq-mCitrin 病毒小鼠在正常情况或 CPNL 手术后 14 天与双侧 dmPFC 内注射 mCitrin 病毒小鼠间的统计结果， $n=4$ 每组。

借助化学遗传学的方法特异性激活双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元，间接的抑制了 dmPFC-vIPAG 神经通路后，无论是在正常情况下还是 CPNL 神经病理性痛时，均可显著地降低小鼠机械性疼痛的阈值，同时可明显地导致甚至恶化小鼠在旷场内和高架十字迷宫内的焦虑/抑郁样负性情绪。这些结果提示，抑制 dmPFC-vIPAG 神经通路确实可以减弱下行镇痛的作用，并且可在一定程度上恶化慢性疼痛后产生的负性情绪，这一结果与前面的光遗传学兴奋 dmPFC-vIPAG 神经通路结果相契合。

3.4 dmPFC 参与慢性痛下行调控的分子机制研究

dmPFC-vIPAG 神经通路下行镇痛作用的减弱参与了慢性痛的启动和维持，同样

也参与了负性情绪的产生。慢性疼痛时，是如何导致 dmPFC-vIPAG 神经通路被抑制的呢？具体的分子机制是什么？我们运用分子生物学的方法，检测慢性疼痛后 dmPFC 内两种重要的受体（GABA_AR 和 mGluR1）的表达情况，并结合行为药理学的方法在 dmPFC 内分别给予上述两种受体的拮抗剂（bicuculline 和 LY367385）观察对小鼠机械性痛敏和焦虑抑郁样行为的影响。

基于既往的文献报道，dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1 在慢性痛时发挥了非常重要的作用^[67,86]。在 CPNL 手术后 7 天，用 Western blot 的方法检测了对侧 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 的表达情况（图 2-21）。慢性痛后相对于 sham 组，dmPFC 内 GABA_AR ($P<0.001, n=3$) 和 mGluR1 ($P<0.001, n=3$) 表达显著增多。

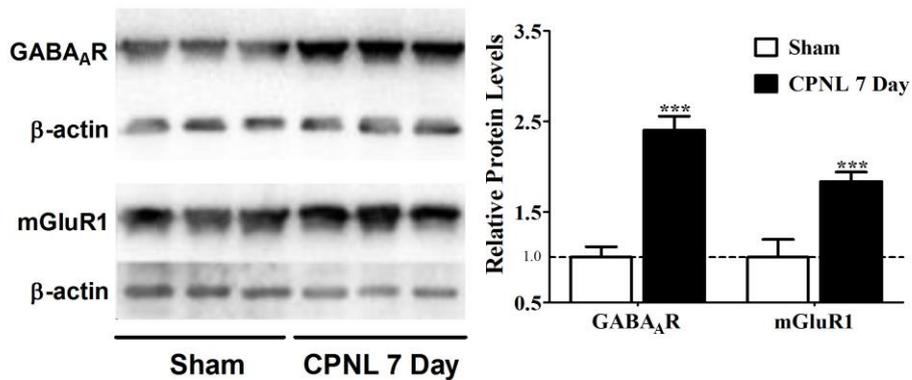


图 2-21 Western blot 方法检测 GABA_AR 和 mGluR1 在 dmPFC 内的表达情况

图 A 显示的为 Western blot 方法检测 sham 组和 CPNL 手术后第 7 天每组各 3 只动物 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 的表达情况，图 B 显示的为图 A 中 GABA_AR 和 mGluR1 表达的统计结果。*** $P<0.001$ ，t 检验， $n=3$ 每组。



图 2-22 行为药理学方法测试时，实验过程的流程图。

图中箭头所示为向 dmPFC 内局部给予生理盐水或受体的拮抗剂。

为了进一步确认 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 在 CPNL 慢性痛中的作用，我

们运用行为药理学的方法将套管置于 dmPFC 内分别给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂 bicuculline 和 LY367385。观察对小鼠正常疼痛阈值和慢性痛时机械性痛敏及焦虑抑郁样行为的影响（图 2-22）。图 2-23 为完成所有行为学检测后免疫荧光染色显示套管在前脑内的位置图，通过 FOS 和 DAPI 的免疫荧光染色可观察到套管位于 dmPFC 的上方，局部给予特异性拮抗剂后 dmPFC 内有大量 FOS 蛋白的表达。

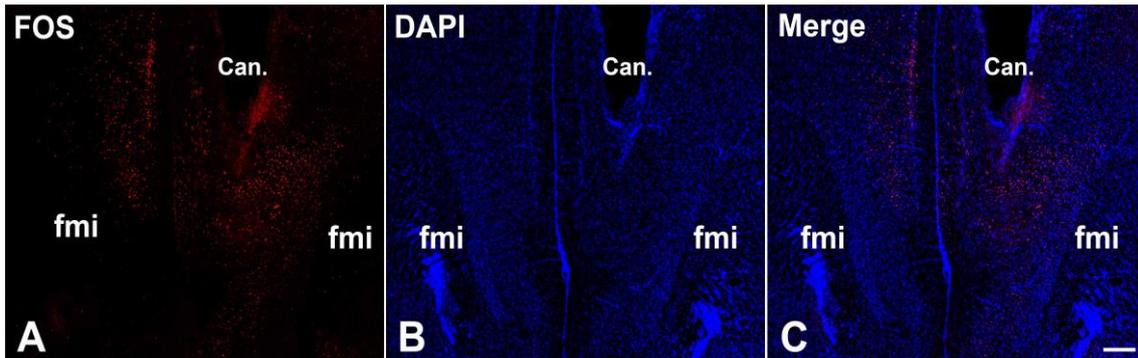


图 2-23 免疫荧光染色显示套管置于 dmPFC 上方

图 A-C 显示的神经元被激活的标记物 FOS 蛋白（红色）和 DAPI（蓝色）的免疫荧光染色，同时显示了套管在 dmPFC 上方的位置。fmi，胼胝体小钳；Can., cannula。Scale bars=200 μ m (图 C, 适用 A、B)

基于上述 Western blot 的结果，慢性神经病理性痛后会显著上调 dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1 的表达。那么抑制 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 会对动物的疼痛阈值产生什么样的作用呢？待套管置于 dmPFC 内 1 周后，我们向 dmPFC 内局部分别给予 0.4 μ l 的生理盐水、GABA_AR 的特异性拮抗剂 bicuculline 0.1 μ g 或 mGluR1 的特异性拮抗剂 LY367385 0.4 nmol，给药 10 分钟后用 vonFrey 丝进行检测。图 2-24 所示，可观察到正常情况下向单侧 dmPFC 内的局部给予 bicuculline 0.1 μ g 相对于给予生理盐水对小鼠双侧后足的正常疼痛阈值无明显改变（图 2-24，同侧后足：1.13 \pm 0.12 g VS 1.00 \pm 0.13 g, $F_{(2, 15)}=6.87$, $P<0.001$, two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=0.51$, $P>0.05$ ；对侧后足：1.07 \pm 0.12 g VS 0.93 \pm 0.12 g, $F_{(2, 15)}=7.56$, $P<0.001$, two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=0.56$, $P>0.05$, n=6 每组)；同样单侧 dmPFC 内局部给予 LY367385 0.4 nmol 相对于给予生理盐水对小鼠双侧后足的正常疼痛阈值无明显改变（图 2-24，同侧后足：0.93 \pm 0.11 g VS 0.93 \pm 0.10 g, 用 Bonferroni posttests, $t=0.14$, $P>0.05$ ；对侧后足：1.07 \pm 0.16 g VS

0.93±0.12 g, 用 Bonferroni posttests, $t=0.31$, $P>0.05$, $n=6$ 每组)。接下来在完成测试后, 在相同的动物上实施腓总神经结扎, 建立 CPNL 慢性神经病理性痛模型。手术后监测了 CPNL 手术同侧后足和对侧后足的机械性痛阈值的改变。在第 7 天时, 可观察到 dmPFC 内局部给予 bicuculline 相对于给予生理盐水显著升高小鼠双侧后足的机械性疼痛阈值 (图 2-24, 同侧后足: 0.35±0.06 g VS 0.16±0.02 g, 用 Bonferroni posttests, $t=4.55$, $P<0.001$; 对侧后足: 0.57±0.10 g VS 0.31±0.07 g, 用 Bonferroni posttests, $t=3.98$, $P<0.001$, $n=6$ 每组), 同样单侧 dmPFC 内局部给予 LY367385 相对于给予生理盐水也可显著升高小鼠双侧后足的机械性疼痛阈值 (图 2-24, 同侧后足: 0.28±0.05 g VS 0.10±0.02 g, 用 Bonferroni posttests, $t=4.55$, $P<0.001$; 对侧后足: 0.53±0.04 g VS 0.31±0.07 g, 用 Bonferroni posttests, $t=3.60$, $P<0.01$, $n=6$ 每组)。而单侧 dmPFC 内局部给予 bicuculline 相对于给予 LY367385 对同侧后足 (用 Bonferroni posttests, $t=0.95$, $P>0.05$, $n=6$ 每组) 和对侧后足 (用 Bonferroni posttests, $t=0.26$, $P>0.05$, $n=6$ 每组) 的机械性痛敏均无显著性的差异。

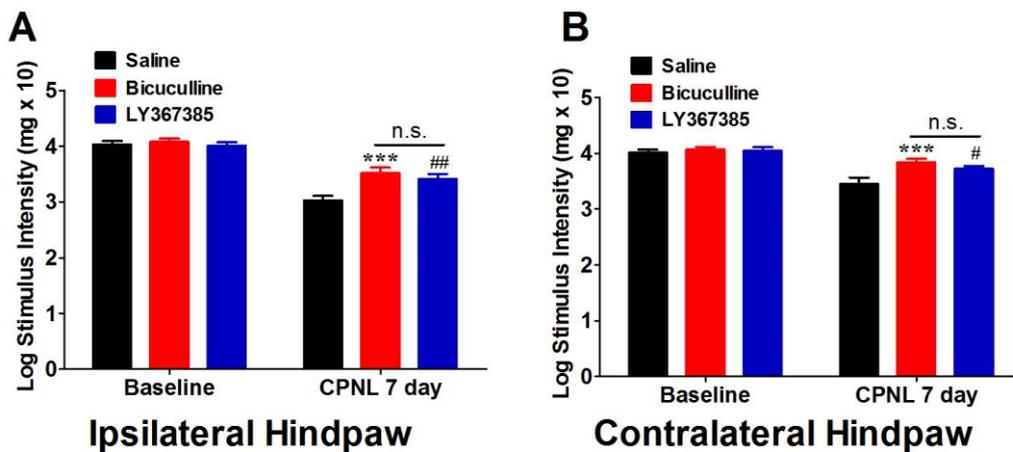


图 2-24 dmPFC 内分别给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂对小鼠正常疼痛阈值和慢性痛后机械性痛敏的影响

图 A 显示的为 dmPFC 内给予生理盐水或 bicuculline 0.1 ug (GABA_AR 的特异性拮抗剂) 或 LY367385 0.4 nmol (mGluR1 的特异性拮抗剂) 后对小鼠同侧后足正常疼痛阈值及 CPNL 手术后第 7 天机械性疼痛阈值的影响, 图 B 显示的为 dmPFC 内给予生理盐水或 bicuculline 0.1 ug 或 LY367385 0.4 nmol 后对小鼠对侧后足正常疼痛阈值及 CPNL 手术后第 7 天机械性疼痛阈值的影响。Two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, *** $P<0.001$, 为 dmPFC 内给予

生理盐水或 bicuculline 两组间的比较; # P <0.05, ## P <0.01, 为 dmPFC 内给予生理盐水或 LY367385 两组间的比较, n.s.=no significant difference, n=6 每组。

既然抑制 dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1 可产生下行镇痛的作用, 那么抑制 GABA_AR 和 mGluR1 后对负性情绪又会有何种影响呢? 首先我们运用旷场行为学实验测试了抑制 dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1 后小鼠在旷场内行为学的改变。仍如前所述, 在进行行为学测试前, 向 dmPFC 内局部分别给予 0.4 μ l 的生理盐水、GABA_AR 的特异性拮抗剂 bicuculline 0.1 μ g 或 mGluR1 的特异性拮抗剂 LY367385 0.4 nmol。图 2-25 所示, dmPFC 内注射生理盐水或 bicuculline 或 LY367385 后分别放入旷场内, 分别记录小鼠在旷场内的行为学轨迹, 用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析。正常情况下, 可观察到 dmPFC 内局部给予 bicuculline 后相对于给予生理盐水可显著增加小鼠在旷场内运动的总路程和旷场中央区活动时间的百分比 (旷场内运动的总路程: $F_{(2, 15)}=10.60$, P <0.01, two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=3.79$, P <0.01, n=6 每组; 旷场中央区活动时间的百分比: $F_{(2, 15)}=6.56$, P <0.01, two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=2.91$, P <0.05, n=6 每组)。而单侧 dmPFC 内局部给予 LY367385 后相对于给予生理盐水小鼠在旷场内运动的总路程和旷场中央区活动时间的百分比并无明显的改变 (旷场内运动的总路程: 用 Bonferroni posttests, $t=0.55$, P >0.05, n=6 每组; 旷场中央区活动时间的百分比: 用 Bonferroni posttests, $t=0.77$, P >0.05, n=6 每组)。并且 dmPFC 内局部给予 bicuculline 相对于给予 LY367385 也可显著增加小鼠在旷场内运动的总路程和旷场中央区活动时间的百分比 (旷场内运动的总路程: 用 Bonferroni posttests, $t=3.23$, P <0.01, n=6 每组; 旷场中央区活动时间的百分比: 用 Bonferroni posttests, $t=3.68$, P <0.01, n=6 每组)。结果类似的是, 在 CPNL 手术后第 14 天时, 可观察到 dmPFC 内局部给予 bicuculline 相对于给予生理盐水可显著增加小鼠在旷场内运动的总路程和旷场中央区活动时间的百分比 (旷场内运动的总路程: 用 Bonferroni posttests, $t=2.85$, P <0.05, n=6 每组; 旷场中央区活动时间的百分比: 用 Bonferroni posttests, $t=2.52$, P <0.05, n=6 每组), 同样单侧 dmPFC 内局部给予 LY367385 相对于给予生理盐水也可观察到显著升高小鼠在旷场中央区活动时间的百分比 (用 Bonferroni posttests, $t=2.80$, P <0.05, n=6 每组), 但对小鼠在旷场内的活动总路程仍无明显影响 (用

Bonferroni posttests, $t=0.38$, $P>0.05$, $n=6$ 每组)。尽管 dmPFC 内局部给予 bicuculline 相对于给予 LY367385 可显著增加 CPNL 手术后 14 天小鼠在旷场内运动的总路程(用 Bonferroni posttests, $t=2.89$, $P<0.05$, $n=6$ 每组), 但小鼠在旷场中央区活动时间的百分比在两组之间无明显差异 (用 Bonferroni posttests, $t=0.05$, $P>0.05$, $n=6$ 每组)。

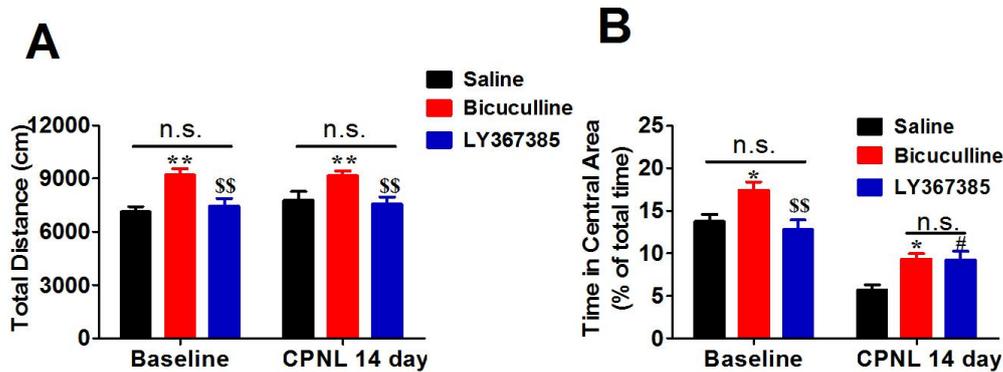


图 2-25 dmPFC 内分别给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂对正常情况下和慢性痛 14 天后小鼠在旷场内行为学的影响

图 A 显示的为 dmPFC 内给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂 bicuculline 0.1 ug 和 LY367385 0.4 nmol 后对小鼠正常情况下和 CPNL 手术后第 14 天在旷场内运动总路程的影响, 图 B 为 dmPFC 内给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂 bicuculline 0.1 ug 和 LY367385 0.4 nmol 后对小鼠正常情况下和 CPNL 手术后第 14 天在旷场中央区活动时间百分比的影响。Two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 为 dmPFC 内给予生理盐水或 bicuculline 两组间的比较; $#P<0.05$, 为 dmPFC 内给予生理盐水或 LY367385 两组间的比较; $$$$P<0.01$ 为 dmPFC 内给予 bicuculline 或 LY367385 两组间的比较; n.s.=no significant difference, $n=6$ 每组。

接下来, 我们运用高架十字迷宫行为学实验测试了抑制 dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1 后小鼠在正常情况下和 CPNL 手术后 14 天在高架十字迷宫内行为学的改变。图 2-26 所示, dmPFC 内注射生理盐水或 bicuculline 或 LY367385 后分别放入高架十字迷宫内, 分别记录小鼠在高架十字迷宫内的行为学轨迹, 用配套的软件对运动轨迹和时间进行分析。正常情况下, 可观察到 dmPFC 内局部给予 bicuculline 0.1 ug 相对于给予生理盐水小鼠在高架十字迷宫开放臂内的活动时间百分比和进入开放臂

内活动次数百分比并无明显的改变（开放臂内活动时间的百分比： $F_{(2, 15)}=2.96$, $P=0.08$, two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=0.43$, $P>0.05$, $n=6$ 每组；进入开放臂内活动次数的百分比： $F_{(2, 15)}=2.35$, $P=0.13$, two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, $t=0.33$, $P>0.05$, $n=6$ 每组)。同样单侧 dmPFC 内局部给予 LY367385 0.4 nmol 相对于给予生理盐水小鼠在高架十字迷宫开放臂内的活动时间百分比和进入开放臂内活动次数百分比也无明显的改变（开放臂内活动时间的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=0.21$, $P>0.05$, $n=6$ 每组；进入开放臂内活动次数的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=0.66$, $P>0.05$, $n=6$ 每组)。在 CPNL 手术后第 14 天时，可观察到 dmPFC 内局部给予 bicuculline 0.1 ug 后相对于给予生理盐水显著增加小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比和进入开放臂内活动次数的百分比（开放臂内活动时间的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=2.86$, $P<0.05$, $n=6$ 每组；进入开放臂内活动次数的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=3.04$, $P<0.01$, $n=6$ 每组），同样可观察到单侧 dmPFC 内局部给予 LY367385 0.4 nmol 后相对于给予生理盐水显著增加小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比和进入开放臂内活动次数的百分比（开放臂内活动时间的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=2.78$, $P<0.05$, $n=6$ 每组；进入开放臂内活动次数的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=2.64$, $P<0.05$, $n=6$ 每组）。而 dmPFC 内局部给予 bicuculline 后相对于给予 LY367385 对小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比和进入开放臂内活动次数的百分比均无明显差别（开放臂内活动时间的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=0.08$, $P>0.05$, $n=6$ 每组；进入开放臂内活动次数的百分比：用 Bonferroni posttests, $t=0.40$, $P>0.05$, $n=6$ 每组）。

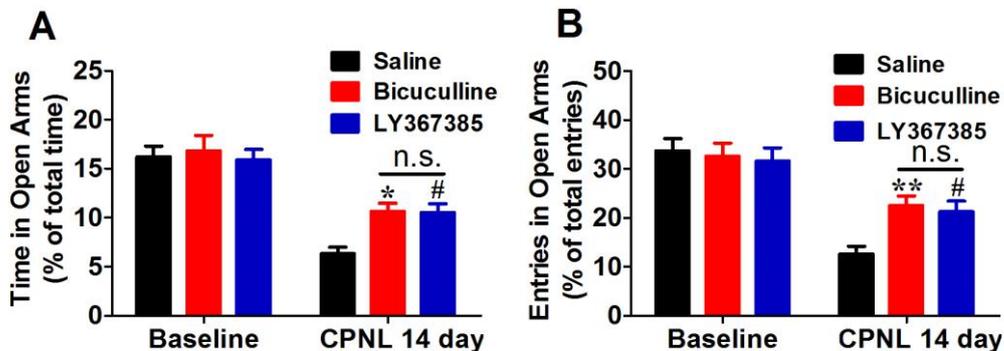


图 2-26 dmPFC 内分别给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂对正常情况下和慢性痛 14 天

后小鼠在高架十字迷宫内行为学的影响

图 A 显示的为 dmPFC 内给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂 bicuculline 0.1 ug 和 LY367385 0.4 nmol 后对小鼠正常情况下和 CPNL 手术后第 14 天在高架十字迷宫开放臂内活动时间百分比的影响, 图 B 为 dmPFC 内给予 GABA_AR 和 mGluR1 的特异性拮抗剂 bicuculline 0.1 ug 和 LY367385 0.4 nmol 后对小鼠正常情况下和 CPNL 手术后第 14 天在高架十字迷宫内进入开放臂活动次数百分比的影响。Two-way repeated measures ANOVA, 用 Bonferroni posttests, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 为 dmPFC 内给予生理盐水或 bicuculline 两组间的比较; # $P < 0.05$, 为 dmPFC 内给予生理盐水或 LY367385 两组间的比较; n.s.=no significant difference, n=6 每组。

以上研究结果表明: 借助行为药理学的方法特异性拮抗 dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1, 可间接的兴奋 dmPFC-vIPAG 神经通路, 在 CPNL 神经病理性痛时, 均可显著性地升高机械性疼痛的阈值, 同时也可明显地减轻小鼠在旷场内和高架十字迷宫内的焦虑/抑郁样负性情绪。这些结果提示, 慢性神经病理性痛时 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 表达的上调间接地抑制了 dmPFC-vIPAG 神经通路, 减弱下行镇痛作用, 并且可在一定程度上恶化慢性疼痛后产生的负性情绪, 这一系列结果导致了慢性痛的发生和发展。

4 讨论

本部分实验在前一部分形态学研究基础之上综合运用多种研究方法干预 dmPFC-vIPAG 神经通路, 深入的研究 dmPFC-vIPAG 神经通路对慢性痛和负性情绪的下行调控作用。化学毁损双侧 dmPFC 后不仅可以降低正常情况下小鼠的疼痛阈值还可加重慢性痛时的机械性痛敏, 并且可直接产生焦虑抑郁样行为; 而特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路可产生明显的下行镇痛作用, 改善慢性痛时的机械性痛敏并可减弱慢性痛产生的负性情绪; 化学遗传学的方法特异性的激活双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元间接地抑制 dmPFC-vIPAG 神经通路, 同样可恶化慢性痛时的机械性痛敏和慢性痛相关的焦虑抑郁样行为; 进一步用行为药理学的方法抑制 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 后, 可减轻慢性痛时的机械性痛敏并改善慢性痛时的负性情绪。这一系列的结果提示, 正常时 dmPFC-vIPAG 神经通路产生的下行镇痛作用参与了维持动物的机械性疼痛阈值, 在慢性痛时因不断传入大量的疼痛及其相关信息通过

mGluR1 兴奋 dmPFC 内的抑制性中间神经元，间接地通过表达在锥体神经元上的 GABA_AR 抑制 dmPFC 内的锥体神经元，减弱了 dmPFC-vIPAG 的下行镇痛作用，参与了慢性痛的发生和发展，同时因 dmPFC 的抑制导致了负性情绪的产生。

4.1 dmPFC-vIPAG 神经通路维持正常情况下的痛阈值

无论是 KA 化学毁损双侧 dmPFC 一周后还是腹腔注射 CNO 特异性激活 dmPFC 内的抑制性中间神经元，在正常情况下均可降低小鼠的疼痛阈值。这说明了在正常动物的体内，dmPFC-vIPAG 神经通路是一条重要的下行镇痛通路，慢性痛时 dmPFC-vIPAG 神经通路的抑制从而减弱了下行镇痛作用。正常时疼痛为我们发出警告信号，让我们远离危险环境，避免受到更多的伤害；下行镇痛系统可以减轻疼痛，消除疼痛给机体带来的不利影响，更好地保护机体免受伤害。机体在面对危险的伤害性刺激时，下行镇痛系统的保护作用可以使机体有更多的时间和机会逃离危险的环境并及时就诊进行治疗。既往的研究已经证明 PAG-RVM 的下行镇痛系统参与了正常情况下疼痛阈值的维持，该通路的减弱参与了慢性痛的形成和维持^[41,84,131,164,176]。尽管 PAG 可以接受包括皮层和下丘脑等高级中枢的信息传入，但对于其传入的高级中枢是否会影响到 PAG-RVM 的疼痛下行调控的研究还知之甚少。用电刺激或者化学药物激活 ACC 内神经元的活动并未观察到下行镇痛作用，但可观察到对甩尾实验明显的易化作用，这一激活 ACC 产生的下行易化作用被认为是 ACC 通过 RVM 的中继从而降低了脊髓背角的疼痛阈值^[19]。我们实验室的一项研究也证实了 ACC 可以直接投射到脊髓背角，在慢性痛时 ACC 内的长时程增强直接兴奋了脊髓背角内的神经元，下行易化伤害性信息的传递从而参与了慢性痛的发生和发展^[25,27]。除此之外，已有大量的文献报道了在慢性痛时，ACC 内神经元的兴奋性明显增强，且抑制 ACC 内神经元的活动可产生明显的镇痛作用^[12,72,78]。而 ACC 和 dmPFC 是彼此相邻的，为什么会产生完全相反的作用呢？这可能与两者的来源不同密切相关^[51,58,71,108]。并且也有许多的文章证实了兴奋 PL 可产生明显的镇痛作用，而兴奋 PL 内的抑制性神经元可易化机械性痛敏^[168]。在形态学研究中，我们也可观察到 ACC 往 vIPAG 内的投射。那么 dmPFC 产生下行镇痛作用的机制和 ACC 产生下行易化的作用机制是否有什么密切联系？还留待以后的研究去探讨两个核团往 vIPAG 投射的异同点。

在慢性痛的发生和发展过程中, 化学毁损双侧 dmPFC 后 7 天或特异性兴奋 dmPFC 内的抑制性中间神经元在早期可降低机械性痛敏恶化了慢性痛的发生和发展过程。这与 dmPFC-vIPAG 神经通路在慢性痛时下行镇痛作用的减弱是密切相契合的。但在 CPNL 术后第 7 天和 14 天, 毁损双侧 dmPFC 和激活双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元并不能再进一步的恶化慢性痛的发展。这可能与除了存在 dmPFC-vIPAG 直接通路外, dmPFC 还可中继于其他神经核团而支配 vIPAG 有关。尽管毁损了双侧的 dmPFC, 但中继核团如伏核或丘脑等仍可下行调控 vIPAG 的功能从而维持一定的机械性痛敏, 不至于痛敏太低^[4,10]。同时, 神经系统内存在的其他下行调控系统代偿性的取代了 dmPFC-vIPAG-RVM 通路的下行镇痛作用也可能参与了这一调节过程。像从蓝斑到脊髓的下行投射和下丘脑室旁核到脊髓的下行投射均可产生明显的下行镇痛作用^[38,95]。

4.2 毁损双侧 dmPFC 对痛行为和焦虑样行为的影响

既往的实验中用喹啉酸化学毁损双侧或是对侧的 PL, 可缓解足底注射完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 引起的慢性痛和负性情绪^[148]。这一系列结果与我们课题中观察到化学毁损双侧 dmPFC 后可降低动物的疼痛阈值, 增加动物对机械性刺激的反应, 产生负性情绪是有所冲突的。我们认为主要有以下几方面的原因: 首先, 尽管都是相同的核团毁损但所毁损神经元的种类不同: 不管是在他们的实验中还是在我们的研究中均观察到特异性的兴奋 PL 内的锥体神经元可产生镇痛作用, 并缓解慢性痛后的负性情绪。说明在他们的研究中注射喹啉酸后对 PL 内的抑制性神经元的毁损更加明显, 而我们的课题中注射 KA 后对锥体神经元的毁损更多一些。其次, 对不同慢性痛模型的影响有所差异, 足底注射 CFA (慢性炎性痛) 后 1 天与我们的研究中 CPNL (慢性神经病理性痛) 后 14 天动物在旷场和高架中的行为学改变是不相同的。化学毁损后, 对不同痛模型的行为学改变也是有所差异的。最后, 实验中 dmPFC 和 PL 所包含区域的不同及动物种类的差异也会对结果产生影响。

在用旷场实验检测动物的行为学改变时, 动物在旷场内的活动总路程反映了动物的运动能力, 在旷场中央区活动时间的百分比反应了动物对环境的好奇与探索意图。既往的研究认为在慢性痛时, 动物并不会因为后足的疼痛而降低动物在旷场内的运动总路程, 仅会因为慢性痛后的负性情绪而减少小鼠在旷场中央区的活动时间

[2,91]。而也有的文献报道，慢性痛后动物因为后足的疼痛不愿在旷场内活动从而减少对后足的机械性刺激^[92,166]。在我们的研究结果中，尽管毁损双侧 dmPFC 或是兴奋双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元后可减少小鼠在旷场内活动的总路程，但这一影响可能并不是因为抑制了 dmPFC-vIPAG 神经通路的活动导致的。小鼠在 CPNL 手术后第 14 天在旷场内的活动总路程并未受到影响，说明在慢性痛时并不会因为疼痛而减弱小鼠在旷场内的活动。同时，用光遗传学的方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路后，小鼠在旷场内的活动总路程也并未得到增强。这些结果提示，dmPFC 内的神经元可能通过投射到其他的核团进而影响小鼠在旷场内的活动总路程。有文献指出，dmPFC 向纹状体可发出大量的纤维投射，而纹状体又是与运动密切相关的神经核团^[66,112]。向 dmPFC 内注射 5-HT_{2A}R 的拮抗剂 Ketanserin 可显著地增加小鼠在旷场内的活动总路程^[61]。另一方面，dmPFC 还可与工作记忆和工作的执行等密切相关^[74,98,121]。但也有研究利用慢性束缚的模型来检测，每天 6 小时连续 21 天后可影响 mPFC 内的多种代谢产物，但大鼠在旷场和高架十字迷宫内的所有焦虑抑郁样行为均不受到影响（包括旷场内运动的总路程，和进入高架十字迷宫开放臂内的次数及停留时间）^[90]。将表达 hM3Dq 的病毒注射到包括 IL 在内的 mPFC 后，特异性的激活 mPFC 内的锥体神经元并未观察到对小鼠在旷场内活动总路程和中央区活动时间的的影响^[154]。这项研究与我们实验最大的不同是他们只检测了小鼠在旷场内 5 分钟的活动轨迹，并进行分析。另一项研究运用光遗传学的方法特异性激活 BLA-mPFC 神经通路，可显著性地抑制小鼠在旷场内中央区的活动时间和高架十字迷宫开放臂内的活动时间，而特异性地沉默该通路可增加小鼠在旷场中央区的活动时间和高架十字迷宫开放臂内的活动时间^[40]。

4.3 特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路增加动物在高架十字迷宫开放臂内的活动

在慢性疼痛时，用光遗传学的方法特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路，对小鼠在高架十字迷宫开放臂内活动时间的百分比和进入开放臂次数的百分比均有明显的改善作用，但对小鼠在旷场内中央区活动时间的百分比无明显作用。这种对高架十字迷宫内的改善作用可能是直接的作用，而不是因为下行镇痛后间接引起的。再次提示了，dmPFC 对慢性疼痛的下行调控和对负性情绪的改善是通过不同的通路来完成的，并不都是 dmPFC-vIPAG 神经通路所介导的。而小鼠在高架十字迷宫内的行为

学改变可能是与 vIPAG 的其他功能相关的。已经证实,特异性的激活 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元或者是抑制其中的抑制性神经元可引起动物防御样的行为,同时特异性的激活 IPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元除了可引起明显的镇痛外还可引起动物的逃逸行为^[140]。另有新近发表的研究指出,同样是特异性的激活 l/vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元参与了小鼠进食时的食物搜寻过程^[57]。这些特异性激活 VGLUT2 阳性神经元所产生的除镇痛以外的行为学改变,有可能导致了特异性激活 dmPFC-vIPAG 神经通路后小鼠在高架十字迷宫内进入开放臂活动时间和进入开放臂内活动次数百分比增加的行为学改变。

4.4 dmPFC 参与慢性痛和负性情绪调控的分子机制

对于 dmPFC 在慢性痛后其内分子和神经元机制的研究也已有不少报道。mPFC 内的 kappa 阿片受体 (KOR) 可以负性调控从 BLA 投射来的兴奋性突触传递进而改善其产生的焦虑样行为,向双侧 mPFC 内注射 KOR 的特异性拮抗剂 nor-BNI 可增加小鼠在旷场中央区的活动时间,产生抗焦虑样的效果^[137]。同时,用负性调控剂 L-655,708 抑制 mPFC 内含 $\alpha 5$ 亚型的 GABA_AR 可对慢性应激后糖水偏好和社交行为缺失抑郁样行为产生快速的抗抑郁作用^[44]。运用光遗传学的方法特异性激活 PL 内的抑制性神经元可进一步降低慢性痛后导致的机械性痛阈值和热痛阈值,而特异性的沉默 PL 内的抑制性神经元后可产生明显的镇痛作用,并且增加动物在黑白箱中的偏好^[168]。用喹啉酸化学毁损 PL 后可缓解足底注射 CFA 引起的慢性痛和负性情绪,同样用光遗传学方法特异性激活 PL 内的兴奋性锥体神经元可在足底注射 CFA 后产生明显的镇痛作用并缓解相应的焦虑抑郁样行为,这些慢性痛和焦虑样行为的改变与慢性痛时 PL 内的周期素依赖性蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5) 的升高密切相关,用干扰 RNA 将对侧 PL 内的 Cdk5 敲低后可改善 CFA 足底注射引起的慢性痛和负性情绪^[148]。但并未深入探讨 PL 是通过哪条通路介导的下行镇痛作用和缓解的负性情绪。用光遗传学的方法特异性激活从 mPFC 向伏隔核的兴奋性投射可产生明显的镇痛作用,缓解 SNI 神经病理性痛后的机械性痛敏和冷痛敏,以及包括条件性位置偏爱和强迫游泳在内的疼痛相关的负性情绪^[83]。并且这一改善作用与 mPFC 内的 AMPA 受体无关,不能被其拮抗剂所阻断。

慢性痛时杏仁核尤其是基底外侧杏仁核的过度兴奋导致了 mPFC 的功能下降,

从而减弱了 dmPFC-vIPAG 的下行镇痛作用。在膝关节炎导致的慢性痛模型中 I 型的 mGluRs 受体介导了慢性痛后 mPFC 内 GABA_AR 的激活从而参与了慢性痛的发生和发展^[67]。在相类似的机制中，mPFC 内是 mGluR1 的兴奋而不是 mGluR5 (I 型的 mGluRs 受体包括 mGluR1 和 mGluR5) 的兴奋导致了 GABA_AR 的激活从而抑制了兴奋性锥体神经元，进而损伤了动物与疼痛相关的认知功能^[134]。同样在足底注射角叉菜胶引起的慢性炎性痛中，mPFC 内的 mGluR1 表达明显升高，而 mGluR5 表达无明显变化进而导致了 mPFC 内的 GABA 含量上升而下调了谷氨酸的含量^[96]。往 BLA 内或者 mPFC 内分别注射 mGluR1 或者 GABA_AR 的特异性拮抗剂可产生明显的镇痛作用，缓解角叉菜胶和蜜蜂毒引起的炎性痛^[50,96]。这一现象与我们研究中观察到的结果是相同的，慢性痛时 dmPFC 内 mGluR1 和 GABA_AR 的表达上调抑制了兴奋性锥体神经元的活性进而抑制了 dmPFC-vIPAG 神经通路，减弱了该通路的下行镇痛作用，同时 dmPFC 内锥体神经元的抑制还参与了慢性痛后负性情绪的产生。本研究中对于向 dmPFC 内注射 bicuculline 或者是 LY367385 的剂量并未做相应的探讨，文献中对于不同核团内所用的剂量也不尽相同，故我们采用了文献中报道的常用剂量 bicuculline 0.1 μg ^[39,73]和 LY367385 0.4 nmol^[56,67,86]进行课题的研究。

总结以上两部分的研究内容如下 (图 2-27): 第一部分的形态学研究运用多种形态学方法，勾勒出一条从皮层到脊髓 (dmPFC-vIPAG-RVM-脊髓背角) Top-Down 的下行调控神经通路 (图 2-27A)，并对通路中关键神经元的化学性质做了深入研究和探讨，为后面的机能学研究提供了理论基础。第二部分的机能学研究通过光遗传学和化学遗传学等方法，证实了慢性痛时大量疼痛信息传入到 dmPFC 内的抑制性中间神经元进而对 dmPFC 内兴奋性的锥体神经元产生强有力地抑制，导致了 dmPFC-vIPAG 神经通路的下行镇痛作用减弱甚至消失。故 dmPFC-vIPAG 神经通路的沉默，参与了慢性痛的发生、发展及负性情绪的形成 (图 2-27B、C)，激活此神经通路可产生明显的镇痛效应并改善慢性痛后的负性情绪，dmPFC 内的 GABA_AR 和 mGluR1 可能参与上述痛行为和负性情绪反应的调控。结合第一部分的形态学研究和第二部分的机能学研究，为 dmPFC 作为慢性痛恶性循环，疼痛和负性情绪交互恶化的关键核团提供了解剖和机能基础。也为提高慢性痛的质量效果，改善慢性痛患者的生活质量找到了关键的干预靶标核团。

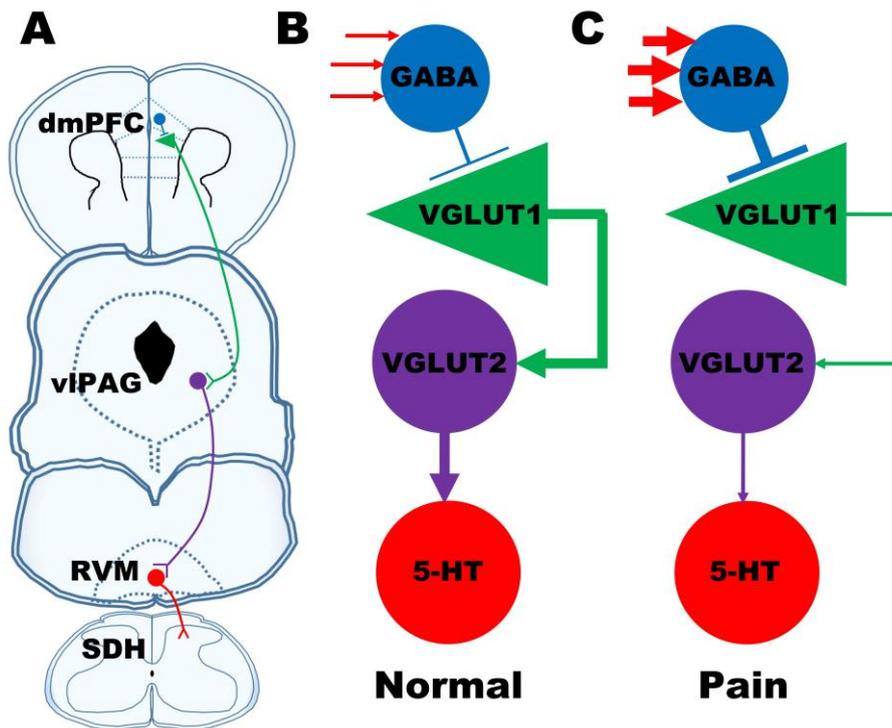


图 2-27 dmPFC 参与疼痛下行调控的神经通路及神经元机制

图 A 显示的为结合本课题和既往经典疼痛下行调控通路的研究勾勒出一条 Top-Down 的下行调控神经通路 (dmPFC-vIPAG-RVM-SDH)。图 B、C 中所有箭头均代表兴奋突触后的神经元，GABA 神经元则可抑制突触后神经元活性，线条越粗说明兴奋或抑制作用越强，线条变细说明兴奋或抑制作用减弱。因 vIPAG 内的 VGLUT2 阳性神经元可产生显著的下行镇痛作用，基于此条 dmPFC-vIPAG 神经通路，正常时 dmPFC 内抑制性神经元对 dmPFC-vIPAG 神经通路的抑制较弱，产生明显下行镇痛效果，在慢性痛时因 dmPFC 内的抑制性神经元接收了大量的兴奋性传入，而导致 dmPFC-vIPAG 的下行镇痛作用减弱参与了慢性痛的发生、发展及负性情绪的形成。

小 结

本课题通过形态学和机能学两个方面研究了 dmPFC 对疼痛的下行调控作用及其神经通路和神经元机制。主要结果小结如下：

(1) 确实存在 dmPFC-vIPAG 神经通路，由 dmPFC 内的 VGLUT1 阳性锥体神经元可以发出投射至 vIPAG 并与其内的 VGLUT2 阳性神经元形成突触联系；vIPAG 内向 RVM 投射的神经元绝大部分含有 VGLUT2，可与 RVM 内 5-HT 阳性神经元形成突触。

(2) dmPFC 内的 PV 阳性中间神经元可接受 mPFC、ACC、IC 和 CLA 等皮层结构，PVA、PVP、MD、CL、Rh、VM 和 Re 等丘脑核团，BLA 以及尾侧海马的纤维投射，而这些核团与疼痛的传递和调控密切相关。

(3) 化学毁损双侧 dmPFC 或兴奋双侧 dmPFC 内的抑制性中间神经元，间接沉默 dmPFC-vIPAG 神经通路，可降低动物正常时和慢性痛时的机械性痛阈值，增加动物对机械性刺激的反应，导致动物在旷场和高架十字迷宫内焦虑样负性情绪的产生，兴奋 dmPFC 内的抑制性神经元还可恶化慢性痛所致的负性情绪。

(4) 兴奋 dmPFC-vIPAG 神经通路可产生镇痛作用，并可改善慢性痛后动物在高架十字迷宫内的负性情绪。

(5) 慢性痛时 dmPFC 内 GABA_AR 和 mGluR1 表达的上调能够抑制 dmPFC-vIPAG 下行镇痛通路，参与了慢性痛的发生、发展及负性情绪的形成。

dmPFC 同时参与了慢性痛和负性情绪的形成，可能就是“慢性痛后的恶性循环”中最关键的一环。慢性痛时特异性地兴奋 dmPFC 内的锥体神经元并再次激活 dmPFC-vIPAG 神经通路便可逆转慢性痛和负性情绪的交互恶化及迁延难愈。

参考文献

- [1] Andrade R. Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 2011;61(3):382-386.
- [2] Bai L, Wang W, Dong YL, Huang J, Wang XY, Wang LY, Li YQ, Wu SX. Attenuation of mouse somatic and emotional inflammatory pain by hydralazine through scavenging acrolein and inhibiting neuronal activation. *Pain Physician* 2012;15(4):311-326.
- [3] Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med* 2003;163(20):2433-2445.
- [4] Baliki MN, Geha PY, Fields HL, Apkarian AV. Predicting value of pain and analgesia: nucleus accumbens response to noxious stimuli changes in the presence of chronic pain. *Neuron* 2010;66(1):149-160.
- [5] Barbas H. Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19(3):499-510.
- [6] Barthas F, Sellmeijer J, Hugel S, Waltisperger E, Barrot M, Yalcin I. The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. *Biol Psychiatry* 2015;77(3):236-245.
- [7] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139(2):267-284.
- [8] Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 1982;7(1):133-159.
- [9] Benedetti F, Mayberg HS, Wager TD, Stohler CS, Zubieta JK. Neurobiological mechanisms of the placebo effect. *J Neurosci* 2005;25(45):10390-10402.
- [10] Bingel U, Tracey I, Wiech K. Neuroimaging as a tool to investigate how cognitive factors influence analgesic drug outcomes. *Neurosci Lett* 2012;520(2):149-155.
- [11] Bingel U, Wanigasekera V, Wiech K, Ni Mhuircheartaigh R, Lee MC, Ploner M, Tracey I. The effect of treatment expectation on drug efficacy: imaging the analgesic benefit of the opioid remifentanyl. *Sci Transl Med* 2011;3(70):70ra14.
- [12] Bliss TV, Collingridge GL, Kaang BK, Zhuo M. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2016;17(8):485-496.
- [13] Bravo-Rivera C, Diehl MM, Roman-Ortiz C, Rodriguez-Romaguera J, Rosas-Vidal LE, Bravo-Rivera H, Quinones-Laracuente K, Do-Monte FH. Long-range GABAergic neurons in the prefrontal cortex modulate behavior. *J Neurophysiol* 2015;114(3):1357-1359.
- [14] Brevet-Aeby C, Brunelin J, Iceta S, Padovan C, Poulet E. Prefrontal cortex and impulsivity: Interest of noninvasive brain stimulation. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;71:112-134.
- [15] Brooks JC, Davies WE, Pickering AE. Resolving the Brainstem Contributions to Attentional Analgesia. *J Neurosci* 2017;37(9):2279-2291.
- [16] Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL, Powell DA. Efferent connections of the medial

- prefrontal cortex in the rabbit. *Exp Brain Res* 1994;100(3):469-483.
- [17] Buchta WC, Mahler SV, Harlan B, Aston-Jones GS, Riegel AC. Dopamine terminals from the ventral tegmental area gate intrinsic inhibition in the prefrontal cortex. *Physiol Rep* 2017;5(6).
- [18] Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2013;14(7):502-511.
- [19] Calejesan AA, Kim SJ, Zhuo M. Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. *European journal of pain* 2000;4(1):83-96.
- [20] Cao X, Mercaldo V, Li P, Wu LJ, Zhuo M. Facilitation of the inhibitory transmission by gastrin-releasing peptide in the anterior cingulate cortex. *Molecular pain* 2010;6:52.
- [21] Carreno FR, Donegan JJ, Boley AM, Shah A, DeGuzman M, Frazer A, Lodge DJ. Activation of a ventral hippocampus-medial prefrontal cortex pathway is both necessary and sufficient for an antidepressant response to ketamine. *Molecular psychiatry* 2016;21(9):1298-1308.
- [22] Challis C, Beck SG, Berton O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci* 2014;8:43.
- [23] Chang PC, Centeno MV, Procissi D, Baria A, Apkarian AV. Brain activity for tactile allodynia: a longitudinal awake rat functional magnetic resonance imaging study tracking emergence of neuropathic pain. *Pain* 2017;158(3):488-497.
- [24] Chen T, Hui R, Wang XL, Zhang T, Dong YX, Li YQ. Origins of endomorphin-immunoreactive fibers and terminals in different columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 2008;509(1):72-87.
- [25] Chen T, Koga K, Descalzi G, Qiu S, Wang J, Zhang LS, Zhang ZJ, He XB, Qin X, Xu FQ, Hu J, Wei F, Hujanir RL, Li YQ, Zhuo M. Postsynaptic potentiation of corticospinal projecting neurons in the anterior cingulate cortex after nerve injury. *Molecular pain* 2014;10:33.
- [26] Chen T, Li J, Feng B, Hui R, Dong YL, Huo FQ, Zhang T, Yin JB, Du JQ, Li YQ. Mechanism Underlying the Analgesic Effect Exerted by Endomorphin-1 in the rat Ventrolateral Periaqueductal Gray. *Mol Neurobiol* 2016;53(3):2036-2053.
- [27] Chen T, Wang W, Dong YL, Zhang MM, Wang J, Koga K, Liao YH, Li JL, Budisantoso T, Shigemoto R, Itakura M, Hujanir RL, Li YQ, Zhuo M. Postsynaptic insertion of AMPA receptor onto cortical pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex after peripheral nerve injury. *Mol Brain* 2014;7:76.
- [28] Chen T, Wang XL, Qu J, Wang W, Zhang T, Yanagawa Y, Wu SX, Li YQ. Neurokinin-1 receptor-expressing neurons that contain serotonin and gamma-aminobutyric acid in the rat rostroventromedial medulla are involved in pain processing. *J Pain* 2013;14(8):778-792.
- [29] Cheriyan J, Kaushik MK, Ferreira AN, Sheets PL. Specific Targeting of the Basolateral Amygdala to Projectionally Defined Pyramidal Neurons in Prelimbic and Infralimbic Cortex. *eNeuro* 2016;3(2).

- [30] Chiba T, Kayahara T, Nakano K. Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res* 2001;888(1):83-101.
- [31] Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol* 1995;352(4):567-593.
- [32] Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TC, Herry C. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature* 2014;505(7481):92-96.
- [33] Czajkowski R. [Nucleotide receptors in learning and neuronal plasticity]. *Postepy Biochem* 2014;60(4):506-513.
- [34] Doleys DM. How neuroimaging studies have challenged us to rethink: is chronic pain a disease? *J Pain* 2010;11(4):399-400.
- [35] Dong YL, Wang W, Li H, Li ZH, Zhang FX, Zhang T, Lu YC, Li JL, Wu SX, Li YQ. Neurochemical properties of the synapses in the pathways of orofacial nociceptive reflexes. *PLoS one* 2012;7(3):e34435.
- [36] Doyle HH, Eidson LN, Sinkiewicz DM, Murphy AZ. Sex Differences in Microglia Activity within the Periaqueductal Gray of the Rat: A Potential Mechanism Driving the Dimorphic Effects of Morphine. *J Neurosci* 2017;37(12):3202-3214.
- [37] Eippert F, Bingel U, Schoell ED, Yacubian J, Klinger R, Lorenz J, Büchel C. Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. *Neuron* 2009;63(4):533-543.
- [38] Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, Ciobanu AC, Triana del Rio R, Roth LC, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demouliere N, Busnelli M, Chini B, Tan LL, Mitre M, Froemke RC, Chao MV, Giese G, Sprengel R, Kuner R, Poisbeau P, Seeburg PH, Stoop R, Charlet A, Grinovich V. A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* 2016;89(6):1291-1304.
- [39] Farahmandfar M, Akbarabadi A, Bakhtazad A, Zarrindast MR. Recovery from ketamine-induced amnesia by blockade of GABA-A receptor in the medial prefrontal cortex of mice. *Neuroscience* 2017;344:48-55.
- [40] Felix-Ortiz AC, Burgos-Robles A, Bhagat ND, Leppla CA, Tye KM. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 2016;321:197-209.
- [41] Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 2004;5(7):565-575.
- [42] Fietta P, Manganelli P. Fibromyalgia and psychiatric disorders. *Acta Biomed* 2007;78(2):88-95.
- [43] Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P. Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. *Brain structure & function* 2017;222(3):1509-1532.
- [44] Fischell J, Van Dyke AM, Kvarita MD, LeGates TA, Thompson SM. Rapid Antidepressant Action and Restoration of Excitatory Synaptic Strength After Chronic Stress by Negative Modulators of Alpha5-Containing GABA Receptors. *Neuropsychopharmacology*

- 2015;40(11):2499-2509.
- [45] Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 2000;422(4):556-578.
- [46] Francois A, Low SA, Sypek EI, Christensen AJ, Sotoudeh C, Beier KT, Ramakrishnan C, Ritola KD, Sharif-Naeini R, Deisseroth K, Delp SL, Malenka RC, Luo L, Hantman AW, Scherrer G. A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron* 2017;93(4):822-839 e826.
- [47] Franssen RA, Rzucidlo AM, Franssen CL, Hampton JE, Benkovic SA, Jr., Bardi M, Kinsley CH, Lambert KG. Reproductive experience facilitates recovery from kainic acid-induced neural insult in female Long-Evans rats. *Brain Res* 2012;1454:80-89.
- [48] Funahashi S. Working Memory in the Prefrontal Cortex. *Brain Sci* 2017;7(5).
- [49] Ge SN, Li ZH, Tang J, Ma Y, Hioki H, Zhang T, Lu YC, Zhang FX, Mizuno N, Kaneko T, Liu YY, Lung MS, Gao GD, Li JL. Differential expression of VGLUT1 or VGLUT2 in the trigeminothalamic or trigeminocerebellar projection neurons in the rat. *Brain structure & function* 2014;219(1):211-229.
- [50] Geng KW, He T, Wang RR, Li CL, Luo WJ, Wu FF, Wang Y, Li Z, Lu YF, Guan SM, Chen J. Ethanol Increases Mechanical Pain Sensitivity in Rats via Activation of GABA_A Receptors in Medial Prefrontal Cortex. *Neurosci Bull* 2016;32(5):433-444.
- [51] George O, Koob GF. Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;35(2):232-247.
- [52] Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 2010;16(11):1248-1257.
- [53] Gu M, Miyoshi K, Dubner R, Guo W, Zou S, Ren K, Noguchi K, Wei F. Spinal 5-HT(3) receptor activation induces behavioral hypersensitivity via a neuronal-glial-neuronal signaling cascade. *J Neurosci* 2011;31(36):12823-12836.
- [54] Guo W, Robbins MT, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K. Spinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *J Neurosci* 2006;26(1):126-137.
- [55] Haanpaa M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira D, Cruccu G, Hansson P, Haythornthwaite JA, Iannetti GD, Jensen TS, Kauppila T, Nurmikko TJ, Rice AS, Rowbotham M, Serra J, Sommer C, Smith BH, Treede RD. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011;152(1):14-27.
- [56] Han JS, Neugebauer V. mGluR1 and mGluR5 antagonists in the amygdala inhibit different components of audible and ultrasonic vocalizations in a model of arthritic pain. *Pain* 2005;113(1-2):211-222.
- [57] Han W, Tellez LA, Rangel MJ, Jr., Motta SC, Zhang X, Perez IO, Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, van den Pol AN, de Araujo IE. Integrated Control of Predatory Hunting by the Central Nucleus of the Amygdala. *Cell* 2017;168(1-2):311-324 e318.
- [58] Hardung S, Epple R, Jackel Z, Eriksson D, Uran C, Senn V, Gibor L, Yizhar O, Diester I. A Functional Gradient in the Rodent Prefrontal Cortex Supports Behavioral Inhibition. *Curr Biol* 2017;27(4):549-555.

- [59] Hardy SG. Analgesia elicited by prefrontal stimulation. *Brain Res* 1985;339(2):281-284.
- [60] Hardy SG, Haigler HJ. Prefrontal influences upon the midbrain: a possible route for pain modulation. *Brain Res* 1985;339(2):285-293.
- [61] Hervig ME, Jensen NC, Rasmussen NB, Rydbirk R, Olesen MV, Hay-Schmidt A, Pakkenberg B, Aznar S. Involvement of serotonin 2A receptor activation in modulating medial prefrontal cortex and amygdala neuronal activation during novelty-exposure. *Behav Brain Res*;326:1-12.
- [62] Higo S, Akashi K, Sakimura K, Tamamaki N. Subtypes of GABAergic neurons project axons in the neocortex. *Front Neuroanat* 2009;3:25.
- [63] Hoover WB, Vertes RP. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain structure & function* 2007;212(2):149-179.
- [64] Huo FQ, Chen T, Lv BC, Wang J, Zhang T, Qu CL, Li YQ, Tang JS. Synaptic connections between GABAergic elements and serotonergic terminals or projecting neurons in the ventrolateral orbital cortex. *Cereb Cortex* 2009;19(6):1263-1272.
- [65] Huo FQ, Qu CL, Li YQ, Tang JS, Jia H. GABAergic modulation is involved in the ventrolateral orbital cortex 5-HT 1A receptor activation-induced antinociception in the rat. *Pain* 2008;139(2):398-405.
- [66] Ishikawa A, Ambroggi F, Nicola SM, Fields HL. Dorsomedial prefrontal cortex contribution to behavioral and nucleus accumbens neuronal responses to incentive cues. *J Neurosci* 2008;28(19):5088-5098.
- [67] Ji G, Neugebauer V. Pain-related deactivation of medial prefrontal cortical neurons involves mGluR1 and GABA(A) receptors. *J Neurophysiol* 2011;106(5):2642-2652.
- [68] Ji G, Sun H, Fu Y, Li Z, Pais-Vieira M, Galhardo V, Neugebauer V. Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. *J Neurosci* 2010;30(15):5451-5464.
- [69] Johannes CB, Le TK, Zhou X, Johnston JA, Dworkin RH. The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. *J Pain* 2010;11(11):1230-1239.
- [70] Jurik A, Auffenberg E, Klein S, Deussing JM, Schmid RM, Wotjak CT, Thoeringer CK. Roles of prefrontal cortex and paraventricular thalamus in affective and mechanical components of visceral nociception. *Pain* 2015;156(12):2479-2491.
- [71] Kalyuzhny AE, Wessendorf MW. Relationship of mu- and delta-opioid receptors to GABAergic neurons in the central nervous system, including antinociceptive brainstem circuits. *J Comp Neurol* 1998;392(4):528-547.
- [72] Kang SJ, Kwak C, Lee J, Sim SE, Shim J, Choi T, Collingridge GL, Zhuo M, Kaang BK. Bidirectional modulation of hyperalgesia via the specific control of excitatory and inhibitory neuronal activity in the ACC. *Mol Brain* 2015;8(1):81.
- [73] Kaushal R, Taylor BK, Jamal AB, Zhang L, Ma F, Donahue R, Westlund KN. GABA-A receptor activity in the noradrenergic locus coeruleus drives trigeminal neuropathic pain in the rat; contribution of NAalpha receptors in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 2016;334:148-159.
- [74] Kim D, Jeong H, Lee J, Ghim JW, Her ES, Lee SH, Jung MW. Distinct Roles of Parvalbumin- and Somatostatin-Expressing Interneurons in Working Memory. *Neuron*

- 2016;92(4):902-915.
- [75] Kim YS, Chu Y, Han L, Li M, Li Z, Lavinka PC, Sun S, Tang Z, Park K, Caterina MJ, Ren K, Dubner R, Wei F, Dong X. Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron* 2014;81(4):873-887.
- [76] Klavir O, Prigge M, Sarel A, Paz R, Yizhar O. Manipulating fear associations via optogenetic modulation of amygdala inputs to prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 2017;Mar 13.
- [77] Koban L, Kross E, Woo CW, Ruzic L, Wager TD. Frontal-Brainstem Pathways Mediating Placebo Effects on Social Rejection. *J Neurosci* 2017;37(13):3621-3631.
- [78] Koga K, Descalzi G, Chen T, Ko HG, Lu J, Li S, Son J, Kim T, Kwak C, Haganir RL, Zhao MG, Kaang BK, Collingridge GL, Zhuo M. Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron* 2015;85(2):377-389.
- [79] Kvitsiani D, Ranade S, Hangya B, Taniguchi H, Huang JZ, Kepecs A. Distinct behavioural and network correlates of two interneuron types in prefrontal cortex. *Nature* 2013;498(7454):363-366.
- [80] Lazarus MS, Krishnan K, Huang ZJ. GAD67 deficiency in parvalbumin interneurons produces deficits in inhibitory transmission and network disinhibition in mouse prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2015;25(5):1290-1296.
- [81] Lee AT, Vogt D, Rubenstein JL, Sohal VS. A class of GABAergic neurons in the prefrontal cortex sends long-range projections to the nucleus accumbens and elicits acute avoidance behavior. *J Neurosci* 2014;34(35):11519-11525.
- [82] Lee D, Rushworth MF, Walton ME, Watanabe M, Sakagami M. Functional specialization of the primate frontal cortex during decision making. *J Neurosci* 2007;27(31):8170-8173.
- [83] Lee M, Manders TR, Eberle SE, Su C, D'Amour J, Yang R, Lin HY, Deisseroth K, Froemke RC, Wang J. Activation of corticostriatal circuitry relieves chronic neuropathic pain. *J Neurosci* 2015;35(13):5247-5259.
- [84] Li C, Sugam JA, Lowery-Gionta EG, McElligott ZA, McCall NM, Lopez AJ, McKlveen JM, Pleil KE, Kash TL. Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. *Neuropsychopharmacology* 2016;41(8):2122-2132.
- [85] Li G, Shao C, Chen Q, Wang Q, Yang K. Accumulated GABA activates presynaptic GABAB receptors and inhibits both excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat midbrain periaqueductal gray. *Neuroreport* 2017;28(6):313-318.
- [86] Li W, Neugebauer V. Differential roles of mGluR1 and mGluR5 in brief and prolonged nociceptive processing in central amygdala neurons. *J Neurophysiol* 2004;91(1):13-24.
- [87] Li YQ, Takada M, Mizuno N. Demonstration of habenular neurons which receive afferent fibers from the nucleus accumbens and send their axons to the midbrain periaqueductal gray. *Neurosci Lett* 1993;158(1):55-58.
- [88] Li Z, Liu M, Lan L, Zeng F, Makris N, Liang Y, Guo T, Wu F, Gao Y, Dong M, Yang J, Li Y, Gong Q, Liang F, Kong J. Altered periaqueductal gray resting state functional connectivity in migraine and the modulation effect of treatment. *Sci Rep*

2016;6:20298.

- [89] Linnman C, Moulton EA, Barmettler G, Becerra L, Borsook D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *Neuroimage*;60(1):505-522.
- [90] Liu L, Zhou X, Zhang Y, Liu Y, Yang L, Pu J, Zhu D, Zhou C, Xie P. The identification of metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the chronic restraint stress rat model of depression. *Behav Brain Res*;305:148-156.
- [91] Liu SB, Tian Z, Guo YY, Zhang N, Feng B, Zhao MG. Activation of GPR30 attenuates chronic pain-related anxiety in ovariectomized mice. *Psychoneuroendocrinology* 2015;53:94-107.
- [92] Liu SB, Zhao R, Li XS, Guo HJ, Tian Z, Zhang N, Gao GD, Zhao MG. Attenuation of reserpine-induced pain/depression dyad by gentiopicroside through downregulation of GluN2B receptors in the amygdala of mice. *Neuromolecular Med* 2014;16(2):350-359.
- [93] Liu W, Ge T, Leng Y, Pan Z, Fan J, Yang W, Cui R. The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. *Neural Plast* 2017;2017:6871089.
- [94] Liu Z, Wang Y, Cai L, Li Y, Chen B, Dong Y, Huang YH. Prefrontal Cortex to Accumbens Projections in Sleep Regulation of Reward. *J Neurosci* 2016;36(30):7897-7910.
- [95] Llorca-Torrallba M, Borges G, Neto F, Mico JA, Berrocoso E. Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience* 2016;338:93-113.
- [96] Luongo L, de Novellis V, Gatta L, Palazzo E, Vita D, Guida F, Giordano C, Siniscalco D, Marabese I, De Chiaro M, Boccella S, Rossi F, Maione S. Role of metabotropic glutamate receptor 1 in the basolateral amygdala-driven prefrontal cortical deactivation in inflammatory pain in the rat. *Neuropharmacology* 2013;66:317-329.
- [97] Madasu MK, Okine BN, Olango WM, Rea K, Lenihan R, Roche M, Finn DP. Genotype-dependent responsivity to inflammatory pain: A role for TRPV1 in the periaqueductal grey. *Pharmacol Res* 2016;113(Pt A):44-54.
- [98] Mathis V, Barbelivien A, Majchrzak M, Mathis C, Cassel JC, Lecourtier L. The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. *Cereb Cortex* 2016:1-11.
- [99] Matsuo Y, Kurata J, Sekiguchi M, Yoshida K, Nikaido T, Konno SI. Attenuation of cortical activity triggering descending pain inhibition in chronic low back pain patients: a functional magnetic resonance imaging study. *Journal of anesthesia* 2017.
- [100] McGarry LM, Carter AG. Inhibitory Gating of Basolateral Amygdala Inputs to the Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 2016;36(36):9391-9406.
- [101] Mehalick ML, Ingram SL, Aicher SA, Morgan MM. Chronic inflammatory pain prevents tolerance to the antinociceptive effect of morphine microinjected into the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *J Pain* 2013;14(12):1601-1610.
- [102] Meller ST, Dennis BJ. Afferent projections to the periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience* 1986;19(3):927-964.
- [103] Metz AE, Yau HJ, Centeno MV, Apkarian AV, Martina M. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(7):2423-2428.
- [104] Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66(6):355-474.
- [105] Miranda-Paez A, Zamudio S, Vazquez-Leon P, Campos-Rodriguez C, Ramirez-San Juan E.

- Involvement of opioid and GABA systems in the ventrolateral periaqueductal gray on analgesia associated with tonic immobility. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2016**;142:72-78.
- [106] Morgan MM, Whittier KL, Hegarty DM, Aicher SA. Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain* **2008**;140(2):376-386.
- [107] Mountney C, Anisman H, Merali Z. In vivo levels of corticotropin-releasing hormone and gastrin-releasing peptide at the basolateral amygdala and medial prefrontal cortex in response to conditioned fear in the rat. *Neuropharmacology* **2011**;60(2-3):410-417.
- [108] Narayanan NS, Laubach M. Inhibitory Control: Mapping Medial Frontal Cortex. *Curr Biol* **2017**;27(4):R148-R150.
- [109] Navratilova E, Porreca F. Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci* **2014**;17(10):1304-1312.
- [110] Oka T, Yokota S, Tsumori T, Niu JG, Yasui Y. Glutamatergic neurons in the lateral periaqueductal gray innervate neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventrolateral medulla of the rat. *Neuroscience research*;74(2):106-115.
- [111] Okubo M, Castro A, Guo W, Zou S, Ren K, Wei F, Keller A, Dubner R. Transition to persistent orofacial pain after nerve injury involves supraspinal serotonin mechanisms. *J Neurosci* **2013**;33(12):5152-5161.
- [112] Otis JM, Namboodiri VM, Matan AM, Voets ES, Mohorn EP, Kosyk O, McHenry JA, Robinson JE, Resendez SL, Rossi MA, Stuber GD. Prefrontal cortex output circuits guide reward seeking through divergent cue encoding. *Nature* **2017**;543(7643):103-107.
- [113] Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, Spellman TJ, Gordon JA. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron* **2016**;89(4):857-866.
- [114] Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhatsky A. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* **2009**;158(1):137-148.
- [115] Penzo MA, Robert V, Li B. Fear conditioning potentiates synaptic transmission onto long-range projection neurons in the lateral subdivision of central amygdala. *J Neurosci*;34(7):2432-2437.
- [116] Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn Mem* **2009**;16(5):279-288.
- [117] Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A. Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature* **2013**;503(7477):521-524.
- [118] Qi J, Chen C, Lu YC, Zhang T, Xu H, Cui YY, Chen YZ, Wang W, Dong YL, Li YQ. Activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in the medial prefrontal cortex contributes to stress-induced hyperalgesia. *Mol Neurobiol* **2014**;50(3):1013-1023.
- [119] Qu C, King T, Okun A, Lai J, Fields HL, Porreca F. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain* **2011**;152(7):1641-1648.
- [120] Qu CL, Huo FQ, Huang FS, Li YQ, Tang JS, Jia H. The role of 5-HT receptor subtypes in the ventrolateral orbital cortex of 5-HT-induced antinociception in the rat.

- Neuroscience 2008;152(2):487-494.
- [121] Radzicki D, Pollema-Mays SL, Sanz-Clemente A, Martina M. Loss of M1 Receptor Dependent Cholinergic Excitation Contributes to mPFC Deactivation in Neuropathic Pain. *J Neurosci* 2017;37(9):2292-2304.
- [122] Robbins TW. From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex. *Prog Brain Res* 2000;126:469-483.
- [123] Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ, Lohman AH. Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *J Comp Neurol* 1985;242(1):40-55.
- [124] Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 2011;71(1):45-61.
- [125] Rushworth MF, Noonan MP, Boorman ED, Walton ME, Behrens TE. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron* 2011;70(6):1054-1069.
- [126] Samineni VK, Grajales-Reyes JG, Copits BA, O'Brien DE, Trigg SL, Gomez AM, Bruchas MR, Gereau RWt. Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. *eNeuro* 2017;4(2).
- [127] Samineni VK, Premkumar LS, Faingold CL. Neuropathic pain induced enhancement of spontaneous and pain evoked neuronal activity in the periaqueductal gray that is attenuated by gabapentin. *Pain* 2017;Mar 21.
- [128] Seamans JK, Lapish CC, Durstewitz D. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity research* 2008;14(2-3):249-262.
- [129] Seo DO, Funderburk SC, Bhatti DL, Motard LE, Newbold D, Girven KS, McCall JG, Krashes M, Sparta DR, Bruchas MR. A GABAergic Projection from the Centromedial Nuclei of the Amygdala to Ventromedial Prefrontal Cortex Modulates Reward Behavior. *J Neurosci* 2016;36(42):10831-10842.
- [130] Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 1989;290(2):213-242.
- [131] Sevel LS, Craggs JG, Price DD, Staud R, Robinson ME. Placebo analgesia enhances descending pain-related effective connectivity: a dynamic causal modeling study of endogenous pain modulation. *J Pain* 2015;16(8):760-768.
- [132] Spellman T, Rigotti M, Ahmari SE, Fusi S, Gogos JA, Gordon JA. Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature* 2015;522(7556):309-314.
- [133] Stefanik MT, Kupchik YM, Kalivas PW. Optogenetic inhibition of cortical afferents in the nucleus accumbens simultaneously prevents cue-induced transient synaptic potentiation and cocaine-seeking behavior. *Brain structure & function*;221(3):1681-1689.
- [134] Sun H, Neugebauer V. mGluR1, but not mGluR5, activates feed-forward inhibition in the medial prefrontal cortex to impair decision making. *J Neurophysiol* 2011;106(2):960-973.
- [135] T. M. Preuss JHK. Human brain evolution. In: FEB M. J. Zigmond, S. C. Landis, J. L. Roberts, L. R. Squire, editor. *Fundamental of neuroscience*. San Diego, CA: Academic Press,

1999. pp. 1283-1311.
- [136] Tang JS, Qu CL, Huo FQ. The thalamic nucleus submedius and ventrolateral orbital cortex are involved in nociceptive modulation: a novel pain modulation pathway. *Prog Neurobiol* 2009;89(4):383-389.
- [137] Tejeda HA, Hanks AN, Scott L, Mejias-Aponte C, Hughes ZA, O'Donnell P. Prefrontal Cortical Kappa Opioid Receptors Attenuate Responses to Amygdala Inputs. *Neuropsychopharmacology* 2015;40(13):2856-2864.
- [138] Thongrong S, Hausott B, Marvaldi L, Agostinho AS, Zangrandi L, Burtscher J, Fogli B, Schwarzer C, Klimaschewski L. Sprouty2 and -4 hypomorphism promotes neuronal survival and astrogliosis in a mouse model of kainic acid induced neuronal damage. *Hippocampus* 2016;26(5):658-667.
- [139] Tian MK, Schmidt EF, Lambe EK. Serotonergic Suppression of Mouse Prefrontal Circuits Implicated in Task Attention. *eNeuro* 2016;3(5).
- [140] Tovote P, Esposito MS, Botta P, Chaudun F, Fadok JP, Markovic M, Wolff SB, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Herry C, Arber S, Luthi A. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 2016;534(7606):206-212.
- [141] Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural brain research* 2003;146(1-2):3-17.
- [142] Vadakkan KI, Jia YH, Zhuo M. A behavioral model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice. *J Pain* 2005;6(11):747-756.
- [143] Van De Werd HJ, Rajkowska G, Evers P, Uylings HB. Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain structure & function* 2010;214(4):339-353.
- [144] Van De Werd HJ, Uylings HB. Comparison of (stereotactic) parcellations in mouse prefrontal cortex. *Brain structure & function* 2014;219(2):433-459.
- [145] Villemure C, Bushnell MC. Mood influences supraspinal pain processing separately from attention. *J Neurosci* 2009;29(3):705-715.
- [146] Wager TD, Atlas LY. The neuroscience of placebo effects: connecting context, learning and health. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(7):403-418.
- [147] Walls AB, Nilsen LH, Eyjolfsson EM, Vestergaard HT, Hansen SL, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. GAD65 is essential for synthesis of GABA destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity. *J Neurochem* 2010;115(6):1398-1408.
- [148] Wang GQ, Cen C, Li C, Cao S, Wang N, Zhou Z, Liu XM, Xu Y, Tian NX, Zhang Y, Wang J, Wang LP, Wang Y. Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat Commun* 2015;6:7660.
- [149] Wang J, Feng DY, Li ZH, Feng B, Zhang H, Zhang T, Chen T, Li YQ. Activation of the Mammalian Target of Rapamycin in the Rostral Ventromedial Medulla Contributes to the Maintenance of Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain in Rat. *Neural Plast* 2015;2015:394820.
- [150] Wang J, Li ZH, Feng B, Zhang T, Zhang H, Li H, Chen T, Cui J, Zang WD, Li YQ. Corticotrigeminal Projections from the Insular Cortex to the Trigeminal Caudal Subnucleus Regulate Orofacial Pain after Nerve Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Insular Cortex Neurons. *Front Cell Neurosci*

- 2015;9:493.
- [151] Wang J, Zhang H, Feng YP, Meng H, Wu LP, Wang W, Li H, Zhang T, Zhang JS, Li YQ. Morphological evidence for a neurotensinergic periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla-spinal dorsal horn descending pathway in rat. *Front Neuroanat* 2014;8:112.
- [152] Wang J, Zhang X, Cao B, Liu J, Li Y. Facilitation of synaptic transmission in the anterior cingulate cortex in viscerally hypersensitive rats. *Cereb Cortex* 2015;25(4):859-868.
- [153] Wang L, Chen IZ, Lin D. Collateral pathways from the ventromedial hypothalamus mediate defensive behaviors. *Neuron* 2015;85(6):1344-1358.
- [154] Warthen DM, Lambeth PS, Ottolini M, Shi Y, Barker BS, Gaykema RP, Newmyer BA, Joy-Gaba J, Ohmura Y, Perez-Reyes E, Guler AD, Patel MK, Scott MM. Activation of Pyramidal Neurons in Mouse Medial Prefrontal Cortex Enhances Food-Seeking Behavior While Reducing Impulsivity in the Absence of an Effect on Food Intake. *Front Behav Neurosci* 2016;10:63.
- [155] Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W. Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *J Neurosci* 2010;30(25):8624-8636.
- [156] Weng ZJ, Wu LY, Zhou CL, Dou CZ, Shi Y, Liu HR, Wu HG. Effect of electroacupuncture on P2X3 receptor regulation in the peripheral and central nervous systems of rats with visceral pain caused by irritable bowel syndrome. *Purinergic Signal* 2015;11(3):321-329.
- [157] Wu GY, Liu SL, Yao J, Sun L, Wu B, Yang Y, Li X, Sun QQ, Feng H, Sui JF. Medial Prefrontal Cortex-Pontine Nuclei Projections Modulate Suboptimal Cue-Induced Associative Motor Learning. *Cereb Cortex* 2017;Jan 10.
- [158] Wu HH, Yin JB, Zhang T, Cui YY, Dong YL, Chen GZ, Wang W. Inhibiting spinal neuron-astrocytic activation correlates with synergistic analgesia of dexmedetomidine and ropivacaine. *PloS one* 2014;9(3):e92374.
- [159] Wu SX, Wang W, Li H, Wang YY, Feng YP, Li YQ. The synaptic connectivity that underlies the noxious transmission and modulation within the superficial dorsal horn of the spinal cord. *Prog Neurobiol* 2010;91(1):38-54.
- [160] Xie Q, Itoh M, Miki T, Dong YY, Takeuchi Y. Occlusion of the femoral artery induced fos-like immunoreactive neurons in the lateral habenular nucleus projecting to the midbrain periaqueductal gray in the rat. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1998;75(4):167-172.
- [161] Xu X, Roby KD, Callaway EM. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 2010;518(3):389-404.
- [162] Yalcin I, Barrot M. The anxiodepressive comorbidity in chronic pain. *Current opinion in anaesthesiology* 2014;27(5):520-527.
- [163] Yin JB, Wu HH, Dong YL, Zhang T, Wang J, Zhang Y, Wei YY, Lu YC, Wu SX, Wang W, Li YQ. Neurochemical properties of BDNF-containing neurons projecting to rostral ventromedial medulla in the ventrolateral periaqueductal gray. *Front Neural Circuits* 2014;8:137.

- [164] Yin JB, Zhou KC, Wu HH, Hu W, Ding T, Zhang T, Wang LY, Kou JP, Kaye AD, Wang W. Analgesic Effects of Danggui-Shaoyao-San on Various "Phenotypes" of Nociception and Inflammation in a Formalin Pain Model. *Mol Neurobiol* 2016;53(10):6835-6848.
- [165] Zhai MZ, Wu HH, Yin JB, Cui YY, Mei XP, Zhang H, Zhu X, Shen XF, Kaye AD, Chen GZ. Dexmedetomidine Dose-Dependently Attenuates Ropivacaine-Induced Seizures and Negative Emotions Via Inhibiting Phosphorylation of Amygdala Extracellular Signal-Regulated Kinase in Mice. *Mol Neurobiol* 2016;53(4):2636-2646.
- [166] Zhang MM, Liu SB, Chen T, Koga K, Zhang T, Li YQ, Zhuo M. Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain. *Mol Brain* 2014;7:47.
- [167] Zhang Y, Zhao S, Rodriguez E, Takatoh J, Han BX, Zhou X, Wang F. Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J Clin Invest* 2015;125(10):3782-3794.
- [168] Zhang Z, Gadotti VM, Chen L, Souza IA, Stenkowski PL, Zamponi GW. Role of Prelimbic GABAergic Circuits in Sensory and Emotional Aspects of Neuropathic Pain. *Cell Rep* 2015;12(5):752-759.
- [169] Zhang Z, Wang X, Wang W, Lu YG, Pan ZZ. Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K⁺-Cl⁻ cotransporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Mol Pharmacol* 2013;84(4):511-520.
- [170] Zhao MG, Ko SW, Wu LJ, Toyoda H, Xu H, Quan J, Li J, Jia Y, Ren M, Xu ZC, Zhuo M. Enhanced presynaptic neurotransmitter release in the anterior cingulate cortex of mice with chronic pain. *J Neurosci* 2006;26(35):8923-8930.
- [171] Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 2005;47(6):859-872.
- [172] Zhou L, Liu MZ, Li Q, Deng J, Mu D, Sun YG. Organization of Functional Long-Range Circuits Controlling the Activity of Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus. *Cell Rep* 2017;18(12):3018-3032.
- [173] Zhuo M. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci* 2008;31(4):199-207.
- [174] Zyloney CE, Jensen K, Polich G, Loiotile RE, Cheetham A, LaViolette PS, Tu P, Kaptchuk TJ, Gollub RL, Kong J. Imaging the functional connectivity of the Periaqueductal Gray during genuine and sham electroacupuncture treatment. *Molecular pain* 2010;6:80.
- [175] 尹俊滨. BDNF 参与中枢痛觉下行调控的形态学研究. 人体解剖学教研室, Vol. 硕士. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [176] 尹俊滨, 王文, 李云庆. 疼痛及其与镇痛的对立和统一. *医学争鸣* 2013;4(3):11-14.

附 录

Gray[J]. *Molecular Neurobiology*. 2016 Apr; 53(3): 2036-2053.

5. Chen YB, Huang FS, Fen B, **Yin JB**, Wang W, Li YQ. Inhibitory effects of endomorphin-2 on excitatory synaptic transmission and the neuronal excitability of sacral parasympathetic preganglionic neurons in young rats[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015 May 28; 9: 206.

6. Ding T, Zhu C, **Yin JB**, Zhang T, Lu YC, Ren J, Li YQ. Slow-releasing rapamycin-coated bionic peripheral nerve scaffold promotes the regeneration of rat sciatic nerve after injury[J]. *Life Science*. 2015 Feb 1; 122: 92-99.

7. Ding T, Zhu C, Kou ZZ, **Yin JB**, Zhang T, Lu YC, Wang LY, Luo ZJ, Li YQ. Neural tissue engineering scaffold with sustained RAPA relieves neuropathic pain in rats[J]. *Life Sciences*. 2014 Sep 1; 112(1-2):22-32.

三、获得资助或参加的科研项目

1、国家留学基金委出国留学资助，201503170405、国家建设高水平大学公派研究生项目、2015/12-2017/03、2.2 万美元。

2、第四军医大学“优秀博士学位论文”资助，2015D06、背内侧前额叶皮层对慢性痛的下行调控作用及其机制、2016/01-2017/12、4 万元、在研、主持。

3、国家自然科学基金国际（地区）合作与交流项目，81620108008、痒觉信息在脊髓以上中枢传递和调控的环路及其机制研究、2017/01-2021/12、240 万元、在研、参与。

致 谢

春天是一个生发的季节，一年之际在于春，植物发芽变绿，春暖花开，沉睡一冬的动物苏醒寻觅食物，农民也开始了一年的耕耘。但对于我们研究生来说却是一个结束的季节，秋季入学，春季毕业，需要有所收获，有所交待。虽然这只不过是又一次普通的毕业，但却可能是最后一次的毕业答辩。回首过去 6 年的科研之路，虽有些记忆已经模糊，已记不清具体的、详细的学习内容，但接受的教导，科研的培训，却潜移默化般地沉淀下来留在了我的身上。这也许就是第四军医大学人体解剖学教研室这个集体对我培养留下的痕迹，这些印记会在我的言行举止中体现出来，陪伴我以后的工作生活。在这个过程中尤其感谢我的导师李云庆教授，是他将我带进了这个集体，我在集体中经历的科研锻炼，教学锻炼都倾注了导师的心血。我有幸硕士三年、博士三年均能跟随导师学习，我学到的不仅是专业知识，更学习了如何做学问，如何做研究和为人处事。导师渊博的学识，深厚的科研功底和高尚的人品，我虽只学得皮毛，但却使我终生受益。

感谢李辉主任在我申请出国留学和留学期间对我科研工作的指导和帮助，辅导老师董玉琳副教授在课题的设计和实施的给予的建议和帮助，仍然记得李金莲教授向我讲授如何做免疫电镜的技巧并指导我们进行实验，感谢王亚云教授和史娟副教授对我教学工作的纠正和鼓励，陈涛教授对课题中所用转基因小鼠的热情帮助，张富兴教授在课题研究中的诚恳建议，张勇讲师在我的整个博士培养过程中的帮助，张婷实验师对课题工作全力支持，鲁亚成讲师对我帮助和电镜技术的指导，黄静讲师的鼓励和帮助，陈晶讲师、张明明讲师和寇珍珍讲师的热情解答和帮助，丁坦博士后的帮助和合作，梁少华博士、吴振宇博士和李飞本科生在我学校博士课题申请答辩中的鼎力相助，陈英标老师，王舰博士、孙毅博士、冯斑博士、万法萍博士、白杨博士在实验、生活中的建议和帮助，还离不开李婷婷、吴晓华、冯小利、高迎颖和张涵对我实验工作的倾力支持。

非常有幸能够得到导师和科室老师们的支持在博士期间去美国圣路易华盛顿大学痒觉研究中心学习和进行实验研究。特别感谢我的联合培养导师陈宙峰教授对我的严格要求和科研培训，感谢 Elisa、于耀清、刘贤宇、孙宇、王娜、杨倩怡、沈开

凤、Admire Munanairi、Devin M Barry、彭嘉航、杨维珊、李波尔、占洁等对我实验研究的指导和帮助，及生活上的热心照顾。

虽然来西安已经 11 年，但我始终有来自家人的牵挂和问候；虽然每年在家的时间只有 1 个月，但我始终可以感受到你们对我的理解、付出和支持；虽然你们对我的专业知识并不在行，但对我的开导和鼓励仍然让我信心满满。我只希望将我的感谢化作对你们的衷心祝愿，希望你们身体健康，工作顺利，事事如意！

感谢这一路走过来的同学和朋友们，是你们的支持和搀扶令我走到现在，是你们带给了我无限的欢乐和莫大的帮助，感谢所有给过我帮助的人。

最后，祝愿第四军医大学人体解剖学教研室这个团结奋进的团体能够发展的越来越好，腾飞的越来越高！