

## 研究论文

## 中缝中核5-羟色胺能神经元调控焦虑和抑郁样行为

李双, 姚文青, 陶冶铮, 马兰, 刘星\*

复旦大学基础医学院药理研究中心, 上海 200032

**摘要:** 中枢神经递质中, 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)作用广泛, 对情绪调节、感觉传输和认知行为等都有重要调节作用。5-HT能神经元数量较少, 主要分布于脑干中线的中缝背核(dorsal raphe nucleus, DR)和中缝中核(median raphe nucleus, MR)。之前的研究主要聚焦于DR核团的功能, 对MR核团5-HT能神经元的功能知之甚少。本研究以Pet1-Cre转基因小鼠作为研究对象, 通过DREADDs技术特异性操控MR核团5-HT能神经元的活动, 进而观察MR核团5-HT能神经元在焦虑和抑郁样行为中的作用。结果显示, 在旷场实验与高架十字迷宫实验中, 抑制小鼠MR核团5-HT能神经元能减轻小鼠焦虑样行为。在蔗糖偏爱实验和强迫游泳实验中, 抑制小鼠MR核团5-HT能神经元能减轻小鼠抑郁样行为, 激活MR核团5-HT能神经元则增强小鼠的抑郁样行为。这些结果提示MR核团5-HT能神经元在调节焦虑和抑郁样行为中发挥关键性作用。

**关键词:** 5-羟色胺; 中缝中核; 焦虑; 抑郁**中图分类号:** R964

## Serotonergic neurons in the median raphe nucleus mediate anxiety- and depression-like behavior

LI Shuang, YAO Wen-Qing, TAO Ye-Zheng, MA Lan, LIU Xing\*

*The Pharmacology Research Center, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China*

**Abstract:** Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT), one of the central neurotransmitters, is the most important modulator for emotion regulation, sensory processing, cognitive control, etc. The serotonergic neurons are limited in amount and mainly distributed in the dorsal raphe nucleus (DR) and the median raphe nucleus (MR) in the midline of the brain stem. Previous studies mainly focused on the function of 5-HT neurons in the DR, but little is known about 5-HT neurons in MR. In the present study, with Pet1-Cre transgenic mice and DREADDs technology, we specifically activated or silenced 5-HT neurons in the MR, and aimed to explore their roles in anxiety- and depressive-like behaviors. The results showed that silencing 5-HT neurons in the MR decreased anxiety-like behaviors in the open field and elevated plus maze tasks. Inhibition of 5-HT neurons in the MR decreased depressive-like behaviors in the sucrose preference and forced swim test, while activation of 5-HT neurons in the MR enhanced depressive-like behaviors in the sucrose preference test. These results suggest that the 5-HT neurons in the MR play a key role in regulating anxiety- and depression-like behaviors.

**Key words:** serotonin; median raphe nucleus; system anxiety; depression

情绪障碍 (mood disorder), 又称情感性精神障碍, 主要包括抑郁症、躁狂症、躁狂-抑郁双相综合征、焦虑症以及各种疾病引起的心境障碍<sup>[1]</sup>。大量临床和实验证据表明, 中枢神经系统 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 神经传递的功能紊乱能

够引起情绪障碍<sup>[2]</sup>。增加 5-HT 释放或抑制 5-HT 重摄取使突触间隙 5-HT 浓度增高可导致焦虑症; 相反, 耗竭脑内 5-HT 或阻断 5-HT 受体具有缓解焦虑的作用<sup>[1]</sup>。5-HT 重摄取抑制剂有较好的抗抑郁作用, 提示 5-HT 重摄取功能降低可能导致抑郁症<sup>[3]</sup>。

Received 2018-03-05 Accepted 2018-05-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91632307, 31771176).

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54237522; E-mail: xingliu@fudan.edu.cn

5-HT<sub>1A</sub>受体、5-HT<sub>1B</sub>受体和5-HT转运蛋白(5-hydroxytryptamine transporter, 5-HTT)基因敲除小鼠在旷场、高架十字迷宫和对抗实验中均显示增强的焦虑样行为<sup>[4, 5]</sup>。5-HT<sub>7</sub>受体基因敲除小鼠在强迫游泳实验中显示出抗抑郁样表现<sup>[6]</sup>。因此,如果能弄清中枢5-HT能系统对于焦虑和抑郁的调控机制,可以更好地理解焦虑和抑郁的发病机理,为今后焦虑和抑郁的治疗提供靶向依据。

哺乳动物神经系统中的5-HT能神经元主要分布在脑干中线上的中缝背核(dorsal raphe nucleus, DR)和中缝中核(median raphe nucleus, MR)<sup>[7, 8]</sup>,并且广泛投射到边缘系统和前脑的感觉区域<sup>[9-11]</sup>。DR的5-HT能神经元主要投射到杏仁核、腹侧海马、纹状体等与恐惧、厌恶、奖赏相关的核团<sup>[12-15]</sup>,而MR核团的5-HT能神经元主要投射到背侧海马以及前额叶皮层等与情感、认知相关的核团<sup>[16]</sup>。以往研究表明DR核团5-HT能神经元对焦虑和抑郁产生起着关键性调节作用<sup>[8, 17, 18]</sup>,但是关于MR核团5-HT能神经元的研究较少。Graeff等的早期研究显示,电刺激MR核团,大鼠表现出僵直不动、竖毛等恐惧行为;电解损伤MR核团能减少大鼠在高架十字迷宫实验中的焦虑样行为<sup>[19]</sup>。神经毒素5,7-DHT可以选择性破坏MR核团5-HT能神经元,降低大鼠在明暗箱实验中的焦虑水平<sup>[19]</sup>。MR核团注射5-HT<sub>1A</sub>受体激动剂8-OH-DPAT能够减少大鼠在高架十字迷宫实验中的焦虑样行为<sup>[20, 21]</sup>。

由于过去的研究多采用MR核团物理或化学毁损的方法,未能集中于MR的5-HT能神经元的功能研究。对于5-HT能神经元的研究也主要采用药理学方法,会产生明显的外周作用,缺乏特异性靶向作用,且不能可逆性地操控神经元的活性,所以具有一定的局限性。而MR的5-HT能神经元是否发挥着和DR的5-HT能神经元相似或者不同的作用,这些问题还尚不清楚。因此,本研究采用选择性化学遗传学操控的方法来探讨MR的5-HT能神经元功能。浆细胞瘤表达转录因子1(plasmacytoma expressed transcription factor 1, Pet1)是5-HT能神经元特异性标记物<sup>[22-25]</sup>。本研究向Pet1-Cre转基因小鼠MR核团显微注射腺相关病毒,使MR核团5-HT能神经元特异性表达人造G蛋白耦联受体(G protein coupled receptor, GPCR),这是一种“只能由设计药物激活的设计受体”(designer receptors exclusively activated by designer drugs, DREADDs),用外源配

体叠氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO)激活DREADDs,从而调节5-HT能神经元活动,同时检测小鼠焦虑和抑郁行为的改变,为全面深入了解MR的5-HT能神经元的功能提供一定依据。

## 1 材料方法

**1.1 实验动物** Pet1-Cre转基因小鼠由同济大学丁玉强教授提供。小鼠经10代以上回交至C57BL/6背景。用于繁殖的小鼠饲养于清洁级动物房小鼠IVC独立通气笼,用于实验的雄性小鼠饲养于普通级动物房层流架,每笼2~4只,自由饮水和采食。动物房控制光照时间模拟小鼠的反向昼夜节律(8:00~20:00夜,20:00~次日8:00昼),光照/黑暗周期为12h/12h,所有操作严格执行实验动物管理条例。

**1.2 主要试剂** 病毒AAV5-DIO-hM3Dq-mCherry和AAV5-DIO-hM4Di-mCherry由OBIO公司包装,滴度约为 $5 \times 10^{12}$  IU/mL;CNO购自Sigma公司,溶于0.9% NaCl,给药剂量为1 mg/kg;10%水合氯醛购自Sangon Biotech公司,粉剂溶解于0.9% NaCl;兔抗5-HT一抗购自Sigma-Aldrich(1:500);羊抗鼠Cy3购自Jackson ImmunoResearch公司(1:50 000);抗淬灭荧光封片剂购自Sigma-Aldrich公司。

**1.3 实验设备** 普通PCR扩增仪(EDC-810,北京东胜创新生物科技有限公司),激光共聚焦(AIR, Nikon),单光子激光共聚焦显微镜(LSM510, Zeiss),普通光显微镜(DP-8, Olympus),冰冻切片机(CM1900, Leica),旷场检测箱(MED-OFA-MS, Med-Associates Inc.),强迫游泳装置(CleverSys Inc.)。

**1.4 免疫组织化学实验** 小鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉,进行左心室体循环灌流,灌流50 mL常温生理盐水后换冰预冷固定液(4%多聚甲醛)50 mL,鼠脑置于固定液(4%多聚甲醛)进行后固定,4 °C过夜,经梯度脱水(20%蔗糖溶液,沉底后换入30%蔗糖溶液),液氮速冻后放入-80 °C冰箱保存。冰冻切片机切取30 μm厚脑片,浸于保护液内-20 °C保存。脑片经1 × PBS缓冲液漂洗,0.5% Triton X-100室温孵育1 h,抗5-HT抗体4 °C孵育24 h,二抗室温孵育1.5 h后使用单光子激光共聚焦显微镜采集图像。

**1.5 小鼠脑立体定位及病毒注射** 将水合氯醛麻醉后的小鼠固定于脑立体定位仪(Stoelting),暴露颅骨后,确定前囟位置。MR核团定位坐标:AP:-4.7 mm;ML:0.0 mm;DV:-4 mm,取0.5 μL

病毒,用微量注射泵(BASI)以0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度匀速注射入小鼠MR核团。留针5 min,匀速退针5 min。小鼠恢复两周,然后开始进行行为学检测,包括旷场实验、高架十字迷宫、蔗糖偏爱实验及强迫游泳实验,结束实验24 h后,取材进行免疫组织化学实验。小鼠随机分为CNO组与生理盐水对照组:CNO组小鼠在行为实验前30 min腹腔注射CNO,生理盐水对照组在行为实验前30 min腹腔注射等体积的生理盐水。

**1.6 旷场实验** 旷场实验利用动物对新环境的探究欲望和对中心开阔区域的恐惧形成矛盾冲突导致焦虑<sup>[26, 27]</sup>,因此小鼠在旷场中心区域停留的总时间可以作为衡量小鼠内在焦虑水平的指标。在实验中,使用边长50 cm、高40 cm箱底均匀铺满木屑的正方形旷场箱,光照强度为15 lux,正上方装有摄像头进行拍摄。检测小鼠的自发性运动性(locomotor)以及在旷场中间部分停留的时间。首先小鼠在实验房间适应环境2 d,每天30 min,整个过程中小鼠始终在自己的饲养笼子中。第3天进行实验,将小鼠放入旷场箱,任其自由运动30 min,同时拍摄录像。使用Clever System software (CleverSys)对小鼠移动轨迹进行分析,统计分析小鼠在开场周围和中央区域的总移动距离和运动速度等。

**1.7 高架十字迷宫实验** 高架十字迷宫实验利用动物对新环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧形成矛盾冲突行为来考察动物的焦虑状态<sup>[28]</sup>,通过记录小鼠在开臂及闭臂的时间来衡量小鼠的焦虑水平。在本实验中,使用的高架十字迷宫呈十字形,包括两个开放臂和闭合臂以及中间区域,正上方有摄像头进行拍摄。平台距离地面50 cm。检测前先小鼠在实验环境中适应3 d。实验时,将小鼠放在中间区域,记录小鼠5 min活动情况。使用Clever System software对小鼠待在开放臂、闭合臂及中间区的时间进行统计分析。

**1.8 强迫游泳实验** 强迫游泳实验是一个检测小鼠抑郁行为的模型,把小鼠放进水里开始到小鼠第一次静止即放弃游泳的时间(latency)和动物放弃游泳的不动性(immobility)作为“行为绝望”的衡量指标。检测前先小鼠在实验环境中适应3 d。实验时将小鼠放入盛满水的容器(直径10 cm,高20 cm)中,水温控制在 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,同时用摄像头进行拍摄,进行6 min测试。使用Forced Swim Scan software (CleverSys)统计分析小鼠静止不动的时间。

**1.9 蔗糖偏爱实验** “快感缺失”和“行为绝望”是抑郁症的核心表型<sup>[29]</sup>。啮齿类动物对蔗糖偏爱的降低与快感缺失密切相关,因此蔗糖偏爱实验经常用于衡量抑郁样行为。小鼠在进行糖水训练后,剥夺饮水能够诱导小鼠以蔗糖偏好降低为特征的抑郁样行为<sup>[30]</sup>。将小鼠单笼饲养,给予两个分别装有水和1%蔗糖的瓶子,左右放置位置随机。适应3 d,每天称量小鼠摄入水和蔗糖的量,并更换水和蔗糖的位置。第四天中午10点钟将两个瓶子撤去,剥夺小鼠饮水12 h,测试前30 min腹腔注射CNO或生理盐水,重新给予小鼠水和1%蔗糖,分别在糖水偏好检测之前、10 min后、1 h后和24 h后称量水和蔗糖的重量,计算蔗糖偏爱百分比:糖水消耗/总液体消耗 $\times 100\%$ 。

**1.10 统计检验方法** 所有数据均使用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。应用SigmaPlot 12进行统计分析。方差齐时采用Student's *t*法对两组间差异进行统计检验, $P < 0.05$ 时认为两者差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 特异性抑制MR核团5-HT能神经元降低焦虑样行为

首先,我们在Pet1-Cre转基因小鼠MR核团注射AAV5-DIO-hM4Di-mCherry,特异性地在MR核团5-HT能神经元中表达抑制性人造GPCR受体hM4Di-mCherry(图1A、B)。

旷场实验结果显示,CNO组小鼠进入旷场中心区域的时间显著高于生理盐水对照组( $P = 0.021$ , Mann-Whitney 秩和检验),并且CNO组及生理盐水对照组在旷场中总的移动距离并没有显著的差异( $P = 0.791$ , Student's *t*检验)(图1C)。

高架十字迷宫实验结果显示,CNO组小鼠在开臂停留的时间较生理盐水对照组显著增加( $P = 0.00585$ , Student's *t*检验),CNO组小鼠在闭臂停留的时间显著小于生理盐水对照组( $P = 0.0019$ , Student's *t*检验),而两组小鼠在中间区域停留的时间没有显著差异( $P = 0.294$ , Student's *t*检验)(图1D)。上述结果表明特异性抑制MR核团5-HT能神经元降低小鼠的焦虑样行为,但不影响小鼠的自主运动能力。

### 2.2 特异性抑制MR核团5-HT能神经元减弱抑郁样行为

在本实验中,我们在Pet1-Cre转基因小鼠MR

核团注射 AAV5-DIO-hM4Di-mCherry。术后两周开始相关行为实验，小鼠进行过三天的糖水训练后，剥夺小鼠饮水 12 h，在糖水偏好检测前 30 min 腹腔注射 CNO 抑制小鼠 MR 核团 5-HT 能神经元活性(图 2A)，随后给予水和 1% 蔗糖溶液。结果显示，CNO 组小鼠在检测 10 min 内的蔗糖偏爱百分比显著高于生理盐水对照组 ( $P < 0.001$ , Student's  $t$  检验); CNO 组小鼠在 1 h 内的蔗糖偏爱百分比仍显著高于生理盐水对照组 ( $P = 0.011$ , Student's  $t$  检验); 24 h 后，两组小鼠对蔗糖的偏好恢复正常，并无显著差异 ( $P = 0.0622$ , Student's  $t$  检验)(图 2B)。

强迫游泳实验结果显示，CNO 组小鼠的 latency 显著高于生理盐水对照组 ( $P = 0.0402$ , Student's  $t$  检验)，CNO 组小鼠的 immobility 平均值低于生理盐水对照组，但是不显著 ( $P = 0.205$ , Student's  $t$  检验)(图 2B)。该结果说明特异性抑制 MR 核团 5-HT 能神经元降低小鼠的抑郁样行为。

### 2.3 特异性激活MR核团5-HT能神经元，小鼠焦虑样行为未见明显改变

在 Pet1-Cre 转基因小鼠的 MR 核团注射 AAV5-

DIO-hM3Dq-mCherry (图 3A)，特异性地在 MR 核团 5-HT 能神经元中表达激活性人造 GPCR 受体 hM3Dq-mCherry (图 3B)。手术后两周进行旷场实验和高架十字迷宫实验。

旷场实验结果显示，CNO 组小鼠进入旷场中心区域的时间与生理盐水对照组没有差异 ( $P = 0.797$ , Student's  $t$  检验)，并且 CNO 组及生理盐水对照组在旷场中总的移动距离也没有显著的差异 ( $P = 0.1$ , Mann-Whitney 秩和检验)(图 3C)。在高架十字迷宫实验中，CNO 组小鼠在迷宫的开臂、闭臂以及中间区域停留的时间较生理盐水对照组没有差异 (Open:  $P = 0.837$ , Mann-Whitney 秩和检验; Closed:  $P = 0.32$ , Student's  $t$  检验; Centre:  $P = 0.305$ , Mann-Whitney 秩和检验)(图 3D)。

### 2.4 特异性激活MR核团5-HT能神经元导致抑郁样行为的增强

我们在 Pet1-Cre 转基因小鼠 MR 核团注射 AAV5-DIO-hM3Dq-mCherry。术后两周开始相关行为实验，在蔗糖偏爱实验中，小鼠在进行三天的糖水训练后，剥夺小鼠饮水 12 h，在糖水偏好检测前

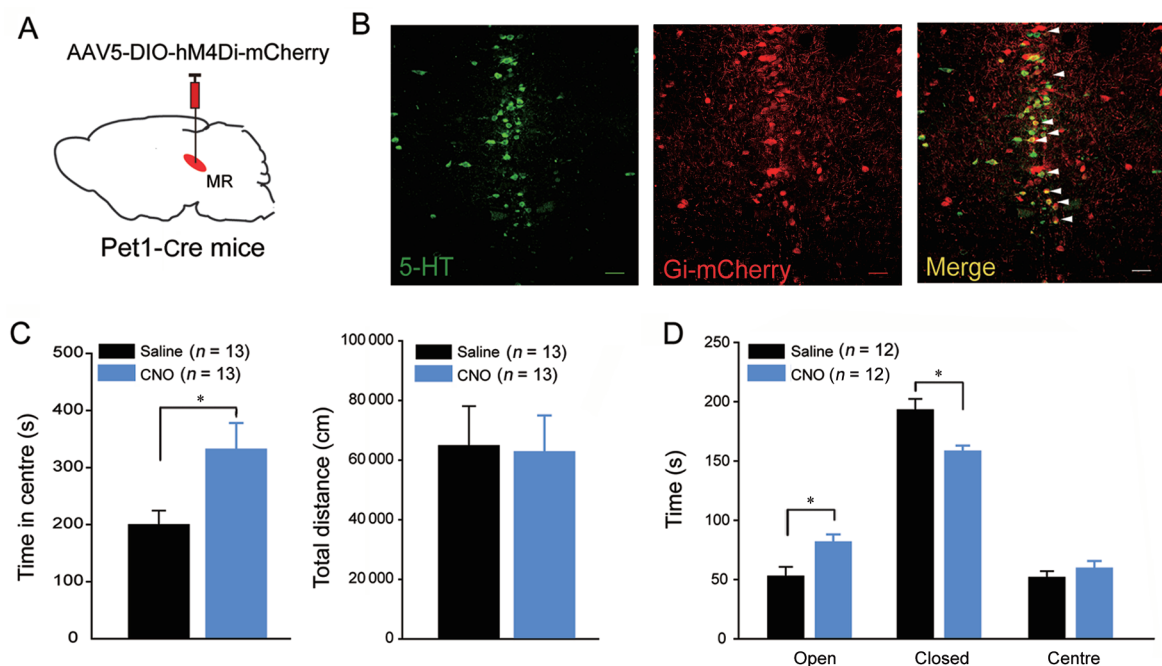


图 1. 特异性抑制MR核团5-HT能神经元减少小鼠的焦虑样行为

Fig. 1. Specific inhibition of serotonergic neurons in the median raphe nucleus (MR) decreased anxiety-like behaviors. A: Injection site. B: Representative image of hM4Di-mCherry in MR 5-HT neurons of Pet1-Cre mice. Scale bar, 10  $\mu$ m. C: The duration in centre and total distance in the open field (Centre:  $*P = 0.021$ ; Total distance:  $P = 0.791$ , Student's  $t$  test). D: The duration in the open arms, closed arms and center area in the elevated plus maze (EPM) test (Open:  $*P = 0.00585$ ; Closed:  $*P = 0.0019$ ; Centre:  $P = 0.294$ ; Student's  $t$  test). Mean  $\pm$  SEM.

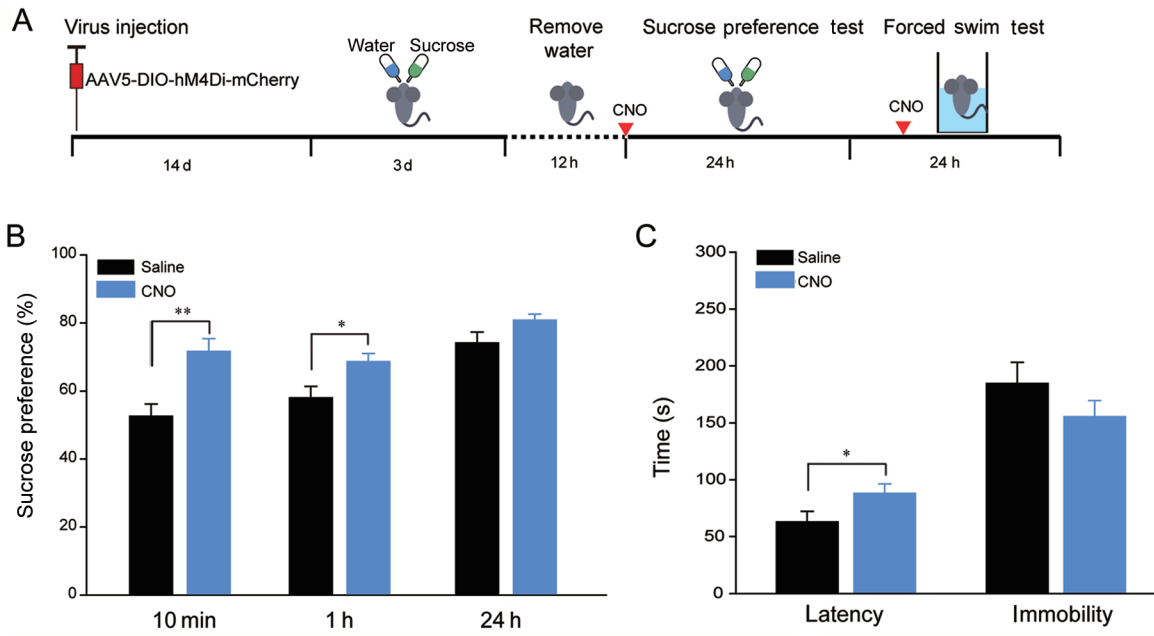


图 2. 特异性抑制MR核团5-HT能神经元减少小鼠的抑郁样行为

Fig. 2. Specific inhibition of serotonergic neurons in the median raphe nucleus (MR) decreased depressive-like behaviors. *A*: Behavioral schedule. Two weeks after virus injection, Pet1-Cre mice received 3-day sucrose training. Sucrose preference test and forced swim test were performed in the subsequent days. *B*: Sucrose preference at 10 min, 1 h and 24 h after water deprivation in the sucrose preference test (10 min:  $**P < 0.001$ ; 1 h:  $*P = 0.011$ ; 24 h:  $P = 0.0622$ , Student's *t* test). *C*: The latency and immobility in the forced swim test (Latency:  $*P = 0.0402$ ; Immobility:  $P = 0.205$ ; Student's *t* test). Mean  $\pm$  SEM,  $n = 11$ .

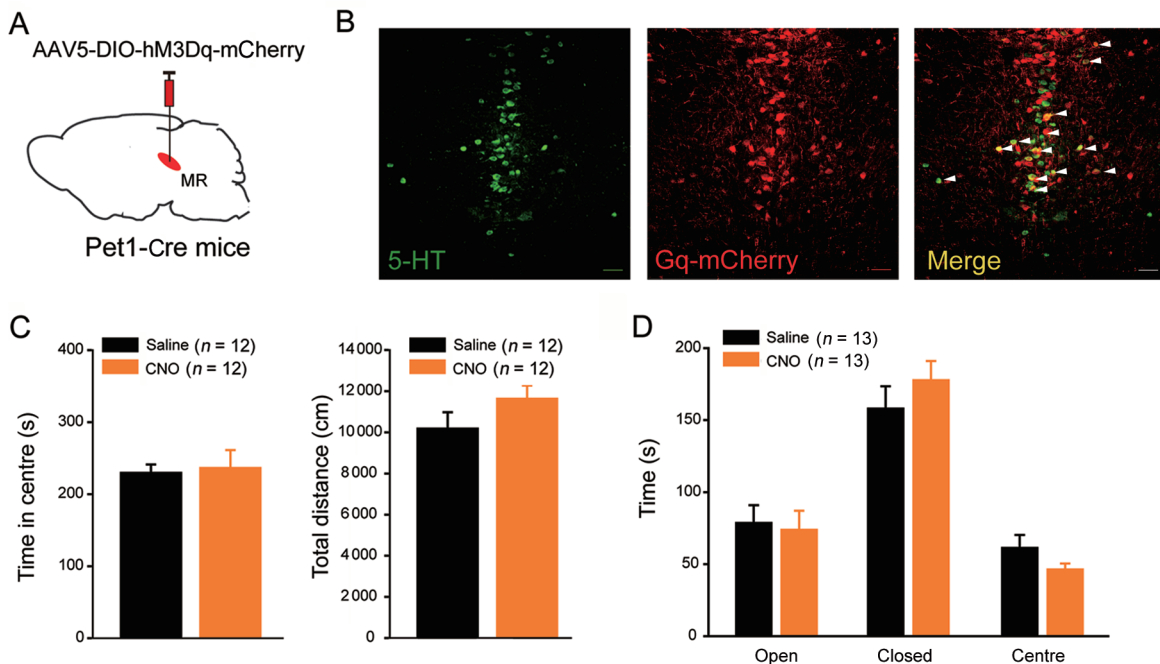


图 3. 特异性激活MR的5-HT能神经元，小鼠的焦虑样行为未见明显改变

Fig. 3. The mice with specific activation of serotonergic neurons in the median raphe nucleus did not show changes in anxiety-like behaviors. *A*: Injection site. *B*: Representative image of hM3Dq-mCherry expression in MR 5-HT neurons of Pet1-Cre mice. Scale bar, 10  $\mu$ m. *C*: The duration in centre and total distance in the open field (Centre:  $P = 0.797$ , Student's *t* test; total distance:  $P = 0.1$ ). *D*: The duration in the open, closed and center arms in the EPM test (Open:  $P = 0.837$ ; Closed:  $P = 0.32$ , Student's *t* test; Centre:  $P = 0.305$ ). Values represent mean  $\pm$  SEM.

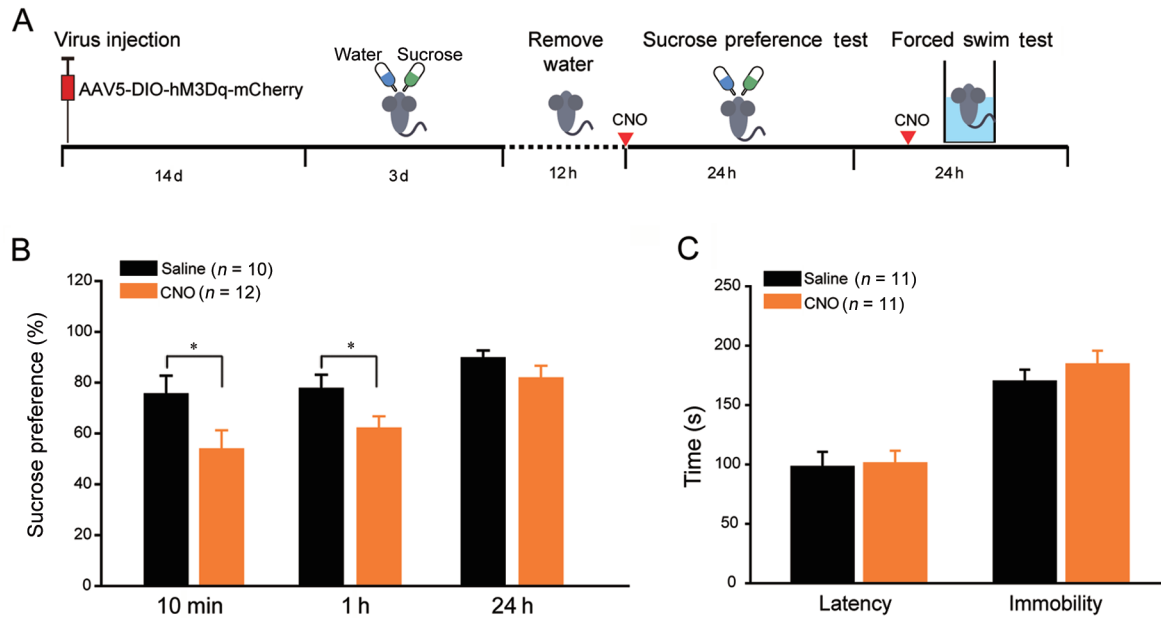


图 4. 特异性激活MR核团5-HT能神经元导致抑郁样行为的增强

Fig. 4. Specific activation of serotonergic neurons in the median raphe nucleus (MR) increased depression-like behaviors. *A*: Behavioral schedule. Two weeks after virus injection, Pet1-Cre mice received 3-day sucrose training. Sucrose preference test and forced swim test were performed in the subsequent days. *B*: Sucrose preference at 10 min, 1 h and 24 h after water deprivation in the sucrose preference test (10 min:  $P = 0.0428$ ; 1 h:  $P = 0.0306$ ; Student's *t* test; 24 h:  $P = 0.199$ ). *C*: The latency and immobility in the forced swim test (Latency:  $P = 0.599$ ; Immobility:  $P = 0.313$ , Student's *t* test). Values represent mean  $\pm$  SEM.

30 min 腹腔注射外源配体 CNO, 使小鼠 MR 核团 5-HT 能神经元处于激活状态 (图 4A)。再次给予水和 1% 蔗糖溶液, CNO 组小鼠的 10 min 蔗糖偏爱百分比显著低于生理盐水对照组 ( $P = 0.0428$ , Student's *t* 检验); CNO 组小鼠的 1 h 蔗糖偏爱百分比仍显著低于生理盐水对照组 ( $P = 0.0306$ , Student's *t* 检验); 24 h 后, 两组并无显著差异 ( $P = 0.199$ , Mann-Whitney 秩和检验) (图 4B)。在强迫游泳实验中, CNO 组小鼠的 latency 和 immobility 与生理盐水对照组相比没有显著差异 (Latency:  $P = 0.599$ , Mann-Whitney 秩和检验; Immobility:  $P = 0.313$ , Student's *t* 检验) (图 4C)。蔗糖偏爱模型可以更敏感地反映小鼠的抑郁样行为, 特异性激活 MR 核团的 5-HT 能神经元, 小鼠对蔗糖的偏好降低, 提示激活 MR 核团的 5-HT 能神经元促进小鼠产生快感缺失的抑郁样行为。

### 3 讨论

MR 是 5-HT 能神经元的主要聚集部位之一, 但其功能尚不清楚。本研究中, 我们使用 DREADDs 化学遗传学技术特异性操控 MR 核团 5-HT 能神经

元的活性。结果显示, 当腹腔注射 CNO 特异性抑制 MR 核团 5-HT 能神经元时, 小鼠表现出减弱的焦虑和抑郁样行为; 而当激活 MR 核团 5-HT 能神经元时, 小鼠表现出增强的抑郁样行为, 焦虑样行为没有显著改变, 说明 MR 核团 5-HT 能神经元的活性可以影响小鼠的焦虑和抑郁样行为。

Pet1 基因敲除小鼠色氨酸羟化酶 Tph 及 5-HT 受体 5-HT<sub>1a</sub> 等基因表达下调, 使得大部分中缝核神经元无法分化为成熟的 5-HT 能神经元<sup>[25]</sup>。因此 Pet1 被认为是特异性于后脑 5-HT 能神经元表达的基因之一。我们使用 Pet1-Cre 转基因小鼠, 结合 AAV5-DIO-hM3Dq-mCherry 或 AAV5-DIO-hM4Di-mCherry 病毒的注射, 在 MR 的 5-HT 能神经元上特异性表达人工构建 GPCRs。本研究结果显示, 大部分感染 hM3Dq-mCherry 或 hM4Di-mCherry 病毒的神经元与 5-HT 共标, 少量 5-HT 阴性细胞表达 mCherry, 提示可能有部分非 5-HT 能神经元被感染。也可能是因为我们所使用的 5-HT 抗体的效率以及特异性不够好, 脑切片层面的问题, 导致某些神经元大部分被切掉, 或者 Pet1-Cre 小鼠的特异性不高。研究显示, MR 核团神经元组成主要是 5-HT 能神

神经元, 其中 5-HT 能神经元的数量远高于其它神经递质类型的神经元<sup>[31]</sup>, 提示激活或抑制 MR 核团感染 hM3Dq-mCherry 或 hM4Di-mCherry 病毒的神经元引起焦虑和抑郁样行为的改变主要是 5-HT 能神经元的作用。MR 核团其它神经递质类型神经元在焦虑和抑郁行为中的作用还有待进一步研究。

有研究报道, 在 MR 核团局部注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 8-OH-DPAT, 能够抑制 5-HT 能神经元的活性, 并且降低大鼠的焦虑和抑郁样行为<sup>[19, 32]</sup>; 注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体拮抗剂 WAY-100635, 能够激活 5-HT 能神经元的活性, 并且增加大鼠的焦虑样行为<sup>[33]</sup>。这些研究结果与本研究结果一致, 但是当腹腔注射 CNO 特异性激活 MR 核团 5-HT 能神经元时, 我们并没有检测到焦虑样行为的改变。这可能是因为本研究采用的高架十字迷宫实验还不够敏感或者有地板效应, 不能检测出增强的焦虑状态。焦虑症包括广泛性焦虑 (generated anxiety disorder, GAD)、恐慌症、惊恐发作、创伤后应激综合症 (post-traumatic stress disorder, PTSD)、以及强迫症 (obsessive-compulsive disorder, OCD) 等亚型<sup>[34]</sup>。有研究显示, 在 T-迷宫模型中 MR 核团局部注射 5-HT<sub>1A</sub> 拮抗剂 WAY-100635 只影响大鼠的抑制性防御行为, 而不改变大鼠的单向逃离行为<sup>[35]</sup>。在 DR 核团局部注射 5-HT<sub>1A</sub> 拮抗剂 WAY-100635 能增加大鼠的抑制性防御行为, 同时降低大鼠的单向逃离行为<sup>[36]</sup>, 提示 DR 核团的 5-HT 能神经元既参与广泛性焦虑的调控, 又参与单向逃离行为相关的恐慌症的调控。本研究结果提示 MR 核团的 5-HT 能神经元可能参与了特定焦虑病理相关的防御行为的调节, 即广泛性焦虑障碍, 对于 MR 核团的 5-HT 能神经元在其他类型的焦虑症中的影响, 还有待进一步探讨。

中缝核 5-HT 能神经元对前脑边缘叶、基底神经节等脑区有大量的神经投射, 且其神经末梢及 5-HT 受体广泛分布在情绪以及行为相关的神经内分泌核团<sup>[37, 39]</sup>。DR 与 MR 核团 5-HT 能神经元功能的差异可能是因为投射脑区的不同。DR 核团的 5-HT 能神经元主要投射到杏仁核、伏隔核、腹侧苍白球、腹侧海马、腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 等脑区; 而 MR 核团的 5-HT 能神经元主要投射到背侧海马 (dorsal hippocampus, DH)、前额叶皮层 (medial prefrontal cortex, mPFC) 等脑区。有假说认为, 5-HT 能神经元通过到前脑的投射介导广泛性焦虑的调控, 到中脑的投射介导恐慌症的

调控<sup>[39]</sup>。有研究显示, MR 核团局部注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体拮抗剂 WAY-100635 能够增加大鼠的焦虑行为, 同时在 DH 脑区注射 WAY-100635 能够拮抗这种作用<sup>[40]</sup>; DH 脑区局部注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 8-OH-DPAT 能够增加大鼠的焦虑行为<sup>[35]</sup>, 提示 MR 核团的 5-HT 能神经元对焦虑和抑郁的调控可能是通过 MR-DH 通路介导的。但是这些研究都是使用药理学方法激活或抑制 5-HT 能神经元, 不仅会产生明显的外周作用, 而且缺乏神经元特异性。最近有研究显示, 光遗传学直接激活 DR 核团 5-HT 能神经元能增加小鼠的奖赏行为, 并且这种奖赏效应是通过 DR-VTA 环路介导的<sup>[41]</sup>。在下一步研究中, 我们将使用化学遗传学或光遗传学的方法, 探讨 MR-DH、MR-mPFC 等神经投射环路对小鼠焦虑和抑郁样行为的调控作用。

综上所述, 本研究采用 Pet1-Cre 转基因小鼠结合 DREADDs 化学遗传学技术, 特异性操控 MR 核团 5-HT 能神经元的活动, 结果显示特异性改变 MR 核团 5-HT 能神经元的活性能调控小鼠的焦虑和抑郁样行为。本研究为 5-HT 能神经元参与调控焦虑和抑郁样行为提供了新的线索与依据, 对今后研究和治疗焦虑和抑郁相关情绪障碍疾病有一定启示作用。

## 参考文献

- 1 Lesch KP, Araragi N, Waider J, Hove DVD, Gutknecht L. Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; 367(1601): 2426–2443.
- 2 Haleem DJ. Behavioral deficits and exaggerated feedback control over raphe-hippocampal serotonin neurotransmission in restrained rats. *Pharmacol Rep* 2011; 63(4): 888–897.
- 3 Dominguez-Lopez S, Howell R, Gobbi G. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. *Rev Neurosci* 2012; 23(4): 429–443.
- 4 Anthony JP, Sexton TJ, Neumaier JF. Antidepressant-induced regulation of 5-HT(1b) mRNA in rat dorsal raphe nucleus reverses rapidly after drug discontinuation. *J Neurosci Res* 2000; 61(1): 82–87.
- 5 Celada P, Puig M, Amargos-Bosch M, Adell A, Artigas F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29(4): 252–265.
- 6 Nikiforuk A. Targeting the serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor in the search for treatments for CNS disorders: Rationale and prog-

- ress to date. *CNS Drugs* 2015; 29(4): 265–275.
- 7 Gaspar P, Lillesaar C. Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; 367(1601): 2382–2394.
  - 8 Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 2012; 76(1): 175–191.
  - 9 Hale MW, Lowry CA. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology (Berl)* 2011; 213(2–3): 243–264.
  - 10 Kiyasova V, Fernandez SP, Laine J, Stankovski L, Muzerelle A, Doly S, Gaspar P. A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J Neurosci* 2011; 31(8): 2756–2768.
  - 11 Puig MV, Gullledge AT. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol* 2011; 44(3): 449–464.
  - 12 Luttgen M, Elvander E, Madjid N, Ogren SO. Analysis of the role of 5-HT1A receptors in spatial and aversive learning in the rat. *Neuropharmacology* 2005; 48(6): 830–852.
  - 13 McKenna JT, Vertes RP. Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res Bull* 2001; 54(6): 619–630.
  - 14 Lechin F, van der Dijs B, Hernández-Adrián G. Dorsal raphe vs. median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30(4): 565–585.
  - 15 Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(5): 695–708.
  - 16 Gray JA, Mcnaughton N. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Function of the Septo-hippocampal System*. 2nd ed. Oxford Press, 2003.
  - 17 Graeff FG, Zangrossi HJ. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010; 10(3): 207–217.
  - 18 Hale MW, Lowry CA. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology* 2011; 213(2–3): 243–264.
  - 19 Andrade TG, Graeff FG. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70(1): 1–14.
  - 20 De Almeida RM, Giovenardi M, Charchat H, Lucion AB. 8-OH-DPAT in the median raphe nucleus decreases while in the medial septal area it may increase anxiety in female rats. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23(2): 259–264.
  - 21 Wauson SE, Sarkodie K, Schuette LM, Currie PJ. Midbrain raphe 5-HT1A receptor activation alters the effects of ghrelin on appetite and performance in the elevated plus maze. *J Psychopharmacol* 2015; 29(7): 836–844.
  - 22 Pattyn A, Simplicio N, van Doorninck JH, Goridis C, Guillemot F, Brunet JF. *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci* 2004; 7(6): 589–595.
  - 23 Daubert EA, Condron BG. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci* 2010; 33(9): 424–434.
  - 24 Gutknecht L, Kriegebaum C, Waider J, Schmitt A, Lesch KP. Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from *Tph2* knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009; 19(4): 266–282.
  - 25 Alenina N, Bashammakh S, Bader M. Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev* 2006; 2(1): 5–10.
  - 26 Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015; (96): e52434.
  - 27 Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, Luna VM, Biane JS, Ordek G, Zhou P, Ong SK, Wright MA, Zweifel L, Paninski L, Hen R, Kheirbek MA. Anxiety cells in a hippocampal-hypothalamic circuit. *Neuron* 2018; 97(3): 670–683. e6.
  - 28 Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2(2): 322–328.
  - 29 Hales CA, Stuart SA, Anderson MH, Robinson ES. Modeling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents. *Br J Pharmacol* 2014; 171(20): 4524–4538.
  - 30 Remus JL, Stewart LT, Camp RM, Novak CM, Johnson JD. Interaction of metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference. *Behav Neurosci* 2015; 129(3): 321–330.
  - 31 Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA, Beck SG. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 2011; 61(3): 524–543.
  - 32 Almeida PV, Trovo MC, Tokumoto AM, Pereira AC, Padovan CM. Role of serotonin 1A receptors in the median raphe nucleus on the behavioral consequences of forced swim stress. *J Psychopharmacol* 2013; 27(12): 1134–1140.
  - 33 Vicente MA, Zangrossi H Jr, dos Santos L, de Macedo



- CE, Andrade TG. Involvement of median raphe nucleus 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the regulation of generalized anxiety-related defensive behaviours in rats. *Neurosci Lett* 2008; 445(3): 204–208.
- 34 Hoge EA, Ivkovic A, Fricchione GL. Generalized anxiety disorder: diagnosis and treatment. *BMJ* 2012; 345: e7500.
- 35 Dos Santos L, de Andrade TG, Zangrossi Junior H. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18(4): 286–294.
- 36 Pobbe RL, Zangrossi HJ. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 183(3): 314–321.
- 37 Andrade TG, Zangrossi HJ, Graeff FG. The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J Psychopharmacol* 2013; 27(12): 1107–1115.
- 38 Almada RC, Borelli KG, Albrechet-Souza L, Brandao ML. Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res* 2009; 203(2): 279–287.
- 39 Deakin JF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. Author's response. *J Psychopharmacol* 1991; 5(4): 339–341.
- 40 Dos Santos L, de Andrade TG, Zangrossi H Jr. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 179(4): 733–741.
- 41 McDevitt RA, Tiran-Cappello A, Shen H, Balderas I, Britt JP, Marino RAM, Chung SL, Richie CT, Harvey BK, Bonci A. Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. *Cell Rep* 2014; 8(6): 1857–1869.