

研究论文

前边缘皮质生长激素抑制素神经元在吗啡引起的行为学改变中的作用

侯伟青, 刘佩佩, 王雪颖, 马兰, 王菲菲*

复旦大学基础医学院医学神经生物学国家重点实验室, 药理研究中心, 上海 200032

摘要: 药物成瘾是一种由药物滥用所引起的慢性、复发性精神疾病, 主要特征是不计后果的强迫性用药。药物成瘾涉及多个脑区的神经可塑性改变。前边缘皮质(prelimbic cortex, PrL)是背内侧前额叶皮质的主要区域, 有大量的锥体神经元, 其兴奋性神经投射可以促进可卡因觅药行为。PrL还存在少量GABA能中间神经元, 对PrL的兴奋性神经元功能、信息整合和传递起到重要的调控作用, 而这一部分神经元在药物成瘾过程中的作用并不清楚。小清蛋白(parvalbumin, PV)和生长激素抑制素(somatostatin, SST)神经元是前额叶皮质中分布广泛的两类主要的抑制性GABA能中间神经元。本研究利用PV-Cre和SST-Cre的转基因小鼠, 结合化学遗传学的方法探究PrL中间神经元在吗啡引起的行为学改变中的作用。结果显示, 特异性抑制PrL脑区SST神经元可以显著增加小鼠的焦虑水平, 但不影响小鼠的运动能力; 抑制PrL脑区SST神经元降低小鼠吗啡诱导的活动性增强及条件位置偏爱; 而抑制PrL脑区PV神经元则对小鼠的运动能力、焦虑水平及吗啡引起的行为学改变均没有显著影响。本研究通过对PrL脑区PV及SST中间神经元在吗啡诱导的行为学改变中作用的研究, 为成瘾药物作用的细胞及神经基础提供了依据。

关键词: 前边缘皮质; PV中间神经元; SST中间神经元; 吗啡; 条件位置偏爱

中图分类号: R964

Somatostatin interneurons of prelimbic cortex in regulating morphine-induced behavior changes

HOU Wei-Qing, LIU Pei-Pei, WANG Xue-Ying, MA Lan, WANG Fei-Fei*

The State Key Laboratory of Medical Neurobiology and Pharmacology Research Center, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Drug addiction is a chronic psychiatric disorder characterized by compulsive drug taking, and involves neuronal plasticity changes in multiple brain regions. The prelimbic cortex (PrL) is a key region of the dorsomedial prefrontal cortex and contains majority of pyramidal neurons. The excitatory projections from PrL play a very important role in the drug seeking behaviors. PrL also contains a small amount of GABAergic interneurons, which regulate the information integration and transmission of the pyramidal neurons. However, the roles of the GABAergic interneurons in PrL in drug-induced behavior changes are not clear. In the PrL, parvalbumin (PV) and somatostatin (SST) interneurons are two major GABAergic interneurons, which have been reported to regulate the activity of glutamatergic input, and form inhibitory synaptic transmission to regulate the output of downstream signals. Here, we used PV-Cre and SST-Cre mice combined with chemical genetics to explore the role of PV and SST interneurons in PrL in morphine-induced behavior changes. Our data showed that specific inhibiting SST interneurons in PrL significantly increased the anxiety level and decreased morphine-induced locomotor activity and the conditioned place preference (CPP) score. Instead, specific inhibiting PV interneurons in PrL had no effect on the anxiety level, morphine induced-locomotor activity and CPP. Our findings provide a new insight into the cellular and neuronal specific mechanism for drug addiction.

Key words: prelimbic cortex; PV interneuron; SST interneuron; morphine; conditioned place preference

Received 2018-05-15 Accepted 2018-08-29

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31671042).

*Corresponding author. Tel: +86-21-54237622; Fax: +86-21-54237621; E-mail: ffwang@fudan.edu.cn

药物成瘾是一种由药物滥用所引起的慢性、复发性精神疾病^[1]，主要表现为成瘾患者不计后果的强迫性用药、撤药后出现强烈的负性情感，如焦虑、抑郁和快感缺失，以及躯体依赖症状，并产生对药物持续的心理渴求^[2,3]。药物成瘾的过程涉及神经可塑性、基因转录、受体信号转导等多种体内外因素的调控，其中神经元结构和功能的适应性改变是药物渴求持续存在以及药物复吸的主要原因^[4]。

前额叶皮质 (prefrontal cortex, PFC) 脑区参与执行^[5]及决策^[6]、情绪和动机^[7]等生理过程。PFC 被认为是药物成瘾相关的行为的关键脑区^[8]。对成瘾人群的研究表明，PFC 脑区的功能缺陷以及由此所引发的控制力缺失对于成瘾性药物的强迫性用药行为至关重要^[9,10]。以往的研究表明，PFC 脑区锥体神经元参与可卡因觅药行为的重建过程、可卡因和安非他明的行为敏化过程以及成瘾性药物诱导的条件位置偏爱 (conditioned place preference, CPP)^[11–15]。研究显示，对大鼠的 PFC 脑区重复给予电刺激可以产生类似可卡因诱导的行为敏化^[12]，PFC 脑区的兴奋毒性损伤可以抑制由可卡因和安非他明诱导的行为敏化以及相关的多巴胺能系统的细胞改变^[11]。

内侧前额叶皮质 (medial prefrontal cortex, mPFC) 脑区的锥体神经元可以投射至成瘾相关的多个脑区，如伏隔核、背侧纹状体及杏仁核^[16–18]，其投射至伏隔核 (nucleus accumbens, NAc) 脑区的谷氨酸能神经元活性对于急性可卡因注射或可卡因相关环境所诱导的重建是必要的^[19]。mPFC 脑区作为谷氨酸的主要来源脑区，可以发出单突触的谷氨酸投射到中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 多巴胺能神经元，调控中脑边缘多巴胺神经元的放电频率和放电模式^[15]，进而调控行为敏化^[14,20]。慢性暴露安非他明的大鼠，由 PFC 脑区调控的 VTA 多巴胺神经元的兴奋性反应增加，提示 mPFC 脑区参与可卡因和安非他明的行为敏化过程^[15]。前边缘皮质 (prelimbic cortex, PrL) 脑区是 mPFC 脑区的主要区域之一，主要参与认知过程，在决策^[21]、学习记忆^[22]等过程中发挥作用。抑制 PrL 脑区的神经元或 PrL 到 NAc 的神经元投射均可以抑制可卡因觅药行为的重建，提示 PrL 脑区参与可卡因觅药行为的重建过程^[13]。

CPP 模型是一种经典的巴甫洛夫范式，个体在伴药侧的偏爱值可用来衡量药物线索的奖赏效应^[23]以及个体对药物渴求的内在动机^[24]。之前的研究表

明，PFC 的去甲肾上腺素能和 5-羟色胺能敲除可降低小鼠对可卡因相关环境的偏好^[25,26]，可卡因 CPP 测试可以诱导 PFC 脑区产生全基因组 DNA 甲基化^[27]，而 mPFC 的多巴胺水平增加可以促进大鼠吗啡 CPP^[28]。此外，利用药理学方法抑制大鼠 mPFC 离子型谷氨酸受体可以增强吗啡诱导的 CPP^[29]。蛋白质组学结合吗啡 CPP 模型分析显示，在吗啡成瘾过程中大鼠 PFC 脑区能量代谢、信号转导、突触传递和细胞骨架形成相关生理过程的一些突触蛋白具有差异性表达^[30]。PrL 脑区损伤可以抑制可卡因引起的 CPP^[31,32]，提示 PrL 脑区在成瘾性药物诱导的 CPP 中起到重要作用。

除了占神经元群的 80%~90% 的兴奋性锥体神经元以外，PFC 脑区还有 10%~20% 的 γ -氨基丁酸 (GABA) 能神经元^[33,34]。皮层微环路的调控功能参与外部和内部信号的功能整合，形成大脑信息处理及高级认知功能的基础。在细胞过程以及神经网络活动中，大脑皮层兴奋性谷氨酸能锥体神经元和抑制性 GABA 能中间神经元活性的相互平衡至关重要。小清蛋白 (parvalbumin, PV) 和生长激素抑制素 (somatostatin, SST) 神经元是 PFC 脑区中分布广泛的两类主要的抑制性 GABA 能中间神经元^[35,36]。以往关于中间神经元对吗啡成瘾过程调控的研究主要集中在 VTA 脑区、中央杏仁核 (central amygdaloid nucleus, CeA) 脑区以及海马脑区^[37–41]。阿片类药物，如吗啡和海洛因，可以诱导 VTA 脑区中间神经元发生超极化，抑制其到多巴胺神经元的 GABA 能神经输入，导致多巴胺能神经元通过去抑制产生兴奋，从而介导成瘾性药物的正性强化过程^[37]。NAc 脑区胆碱能中间神经元 μ 阿片受体上膜在吗啡成瘾中起重要作用，慢性吗啡给药处理可以降低纹状体亚区 μ 阿片受体的膜表达情况^[38]。慢性吗啡暴露过程中，CeA 脑区 PV 中间神经元被激活，光遗传学抑制 CeA 中的 PV 中间神经元可减弱吗啡戒断引起的负性情感状态^[39]。腹腔注射吗啡可以诱导海马中 PV 的表达，PV 中间神经元可以调控海马脑区的主神经元的输出，进而促进记忆的形成^[40]。吗啡腹腔注射可导致背侧海马 CA1 区中间神经元间放电速率立即降低^[41]。而 PrL 脑区 GABA 能中间神经元是否参与了吗啡成瘾及吗啡诱导的行为学改变，以及其如何进行调控仍不清楚。

本文利用中间神经元特异的 PV-Cre 和 SST-Cre 小鼠，在 PrL 脑区注射腺相关病毒，利用 Cre-loxp

系统在中间神经元内表达药物激活的受体 (designer receptors exclusively activated by designer drugs, DRE-ADDs) hM4Di 的化学遗传学方法^[42], 通过腹腔注射 hM4Di 配体氯氮平 -N- 氧化物 (clozapine-N-oxide, CNO), 激活小 G 蛋白 Gi 调节的信号通路, 进而激活 G 蛋白耦联的内向整流钾离子通道, 特异性地沉默 PrL 脑区的 PV 和 SST 中间神经元。本文通过化学遗传学的方法结合 CPP 模型、旷场以及高架十字迷宫等动物学模型, 探究 PrL 脑区 PV 及 SST 中间神经元在吗啡诱导的行为学改变中的作用, 解析吗啡成瘾的神经及细胞生物学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 PV-Cre 小鼠购于 Jackson Lab (#008069), 品系为 C57BL/6J。SST-Cre 小鼠购于 Jackson Lab (#016868), 回交至 C57BL/6 品系。实验所用 PV-Cre 小鼠由 Cre 阳性小鼠自交产生, SST-Cre 纯合子小鼠及杂合子小鼠 (SST-Cre^{+/-}) 由 SST-Cre 杂合子小鼠 (SST-Cre^{+/-}) 自交产生。小鼠饲养于清洁级环境中, 温度维持在 22~25 °C, 湿度维持在 40%~60%。节律昼夜颠倒, 光照/黑暗周期为 12 h/12 h。每笼饲养小鼠 2~4 只, 自由进水进食。所有涉及动物的实验方案均符合国家颁布的《实验动物管理条例》, 并通过复旦大学实验动物伦理委员会的批准。

1.1.2 实验试剂与抗体 盐酸吗啡注射液 (NEPHARM, 1 mL); CNO (Sigma); 抗体封闭液 (0.5% Triton X-100, Sigma-Aldrich, #T9284); 驴血清 (Jackson ImmunoResearch, #005-000-001); 兔抗 PV 抗体 (Sigma-Aldrich, #P3088); 鼠抗 SST 抗体 (Santa Cruz, #sc-7819)。

1.2 方法

1.2.1 脑立体定位手术 脑立体定位注射所用的腺相关病毒为 AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry 和 AAV-EF1 α -Dio-mCherry 购自和元生物技术公司, 滴度约为 5×10^{12} V.G./mL。腹腔注射麻醉药 10% 乌拉坦与 2% 水合氯醛的混合液 (10% 乌拉坦, 1 g/kg; 2% 水合氯醛, 200 mg/kg) 麻醉 SST-Cre 及 PV-Cre 小鼠后, 剪掉其头部毛发, 将小鼠固定于脑立体定位仪上。用碘酒对皮肤进行消毒后, 剪开头部皮肤, 棉球擦拭以暴露头颅骨及前后囟, 并调节脑立体定位仪, 使得头颅骨前后囟处于同一高度。以 33-gauge 的

10 μ L 量程的注射器在 PrL 脑区双侧注射 (0.5 μ L/侧) 的腺相关病毒。注射坐标为: AP + 2.0 mm, ML \pm 0.3 mm, DV -2.0 mm, 14° 倾角指向内侧。术后恢复 14~21 d 后进行行为学实验。

1.2.2 CPP 实验 实验均在两箱 CPP 系统 (Med Associates 公司) 中进行, 采用三次诱导的 CPP 模型。行为实验前将小鼠置于实验环境中进行适应并使之熟悉实验员及其抓取操作。行为实验开始时, 需先将小鼠置于实验环境中适应 30 min。第 1 天进行实验前测试 (pretest), 即将小鼠放入 CPP 箱中, 取出隔板, 使小鼠自由探索 CPP 箱 15 min。软件分析并记录小鼠在 CPP 箱的两侧所处的时间, 计算其基础偏爱值, 并将在单侧停留时间超过 10 min 的小鼠剔除。第 2~4 天, 进行条件性关联训练 (conditioning), 需要插上 CPP 箱的隔板。小鼠腹腔注射 CNO 30 min 后, 小鼠腹腔注射盐酸吗啡后放入与吗啡奖赏刺激相关联的单侧 CPP 箱体中, 并将其定义为吗啡侧。小鼠自由探索该侧环境 30 min 后, 放回原笼内。4~6 h 后, 小鼠腹腔注射生理盐水后放入与生理盐水中性刺激相关联的单侧 CPP 箱体中, 并将其定义为生理盐水侧。小鼠自由探索该侧环境 30 min 后, 放回原笼内。第 5 天进行测试 (test), 取出 CPP 箱中的隔板。使小鼠自由探索 CPP 箱 15 min。记录小鼠在两侧所处的时间, 并用吗啡侧的时间减去生理盐水侧的时间作为吗啡 CPP 评分。

1.2.3 高架十字迷宫实验 实验在高架十字迷宫中进行。行为实验前将小鼠置于实验环境中进行适应并使之熟悉实验员及其抓取操作。实验开始前, 将小鼠置于实验环境中适应 30 min。实验开始时, 将小鼠面对开臂放入高架十字迷宫的中间区域, 并记录 6 min 内小鼠在高架十字迷宫的探索情况, 包括其在中间区域、开臂和闭臂中所处的时间以及小鼠进入开臂和闭臂中的次数。

1.2.4 旷场实验 实验在小鼠旷场检测箱 (Med-OFA-MS) 中进行。吗啡活动敏感性实验用于检测小鼠被动接受吗啡注射后的活动敏感性是否发生改变, 是否出现吗啡诱导的行为敏化。吗啡等成瘾性药物的活动敏感性检测有两种实验方案, 即急性单针给予成瘾性药物后检测该动物的活动性, 或者在一定时间内按照不同的剂量对小鼠进行腹腔给药, 并记录其不同剂量情况下的自主活动性。我们采用单针吗啡诱导的行为敏化模型。行为实验前将小鼠置于实验环境中进行适应并使之熟悉实验员及其

抓取操作。实验开始前,将小鼠置于实验环境中适应 30 min。第一天进行适应训练,腹腔注射 CNO 30 min 之后,将小鼠放入旷场箱中,使其自由探索自主活动箱 30 min,并记录其自主活动情况。第二天进行吗啡活动敏感性测试,腹腔注射 CNO 30 min 之后,腹腔注射盐酸吗啡 (10 mg/kg),并将小鼠置于旷场箱中自由活动,记录小鼠 2 h 内的活动情况。

1.2.5 免疫荧光标记 将小鼠麻醉后,分别用 37°C 的生理盐水和 4°C 的 4% 多聚甲醛溶液进行左心室循环灌注。取出脑组织,并浸于 4% 多聚甲醛中进行后固定。大约 4~6 h 之后分别用 20%、30% 的蔗糖溶液对脑组织进行脱水,当脑组织在 20% 的蔗糖溶液中沉底之后,更换 30% 的蔗糖溶液,再次沉底时即完成脑组织脱水。将大脑用组织包埋剂进行包埋后,放入液氮中约 1 min 进行速冻,再放入 -80°C 冰箱中进行冷冻保存。冷冻保存 24 h 之后,利用冰冻切片对冷冻大脑进行冠状切片 (30 $\mu\text{m}/\text{slice}$)。免疫染色前用 1 \times PBS 溶液将脑片清洗 3 遍,每遍 10 min。一抗用含 0.3% Triton X-100 和 10% 驴血清的 PBS 按比例进行稀释,脑片在室温孵育 1 h 后,4°C 孵育过夜。用 1 \times PBS 溶液将脑片进行洗脱。二抗用 PBS 溶液按 1:1 000 的比例进行稀释,室温孵育 1 h。贴片后用抗淬灭荧光封片剂封片,采用显微镜 20 倍物镜进行图像采集 (DP-80, Olympus)。

1.2.6 数据统计及分析 本研究中数据用 SigmaPlot 进行统计分析,实验结果以 mean \pm SEM 来表示。用 Graphpad 进行作图。数据分析主要采用 Student's *t* 检验和双因素重复测量方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 通过化学遗传学手段特异性干预小鼠 PrL 脑区 PV 和 SST 神经元活性

本文通过脑立体定位手术,将重组酶 Cre 可诱导的 AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry 和 AAV-EF1 α -Dio-mCherry 腺相关病毒载体注射在 PV-Cre 和 SST-Cre 小鼠的 PrL 脑区 (图 1A, B)。通过腹腔注射 hM4Di 配体 CNO,特异性地沉默 PV 及 SST 阳性神经元。实验组为 PrL 脑区注射 AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry 病毒的 PV-Cre 和 SST-Cre 小鼠,对照组为 PrL 脑区注射 AAV-EF1 α -Dio-mCherry 病毒的 PV-Cre 和 SST-Cre 小鼠。AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry 和 AAV-EF1 α -

Dio-mCherry 腺相关病毒载体结构如图 1A 所示。PrL 脑区 hM4Di-mCherry 病毒表达情况如图 1C 所示。

小鼠在脑区注射病毒后恢复 14~21 d,进行相关的行为学测试。实验流程如图 1D 所示,第 1 天进行旷场实验,检测抑制 PrL 脑区 PV/SST 神经元活性对小鼠自主活动的影响。第 2 天进行吗啡引起的活动敏感性测试。第 3 天进行高架十字迷宫实验,检测抑制 PrL 脑区 PV/SST 神经元活性对焦虑行为的影响。第 4~8 天进行吗啡引起的 CPP 测试。第 4 天进行实验前测试;第 5~7 天,进行吗啡条件性关联训练;第 8 天进行测试。

2.2 抑制 PrL 脑区 SST 神经元增强小鼠焦虑水平

我们分别采用旷场实验和高架十字迷宫实验对 PrL 脑区 PV/SST 神经元对小鼠自主活动和焦虑行为的影响进行探究。旷场实验结果如图 2A, B 所示,PrL 注射 AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry 和 AAV-EF1 α -Dio-mCherry 的 PV-Cre/SST-Cre 小鼠自主活动均无显著差异 (注射病毒的 PV-Cre 小鼠与对照组小鼠的运动距离: $P = 0.300$; 注射病毒的 PV-Cre 小鼠与对照组小鼠在中间区域所处的时间: $P = 0.088$; 注射病毒的 PV-Cre 小鼠与对照组小鼠进入中间区域的次数: $P = 0.929$; 注射病毒的 SST-Cre 小鼠与对照组小鼠的运动距离: $P = 0.33$; 注射病毒的 SST-Cre 小鼠与对照组小鼠在中间区域所处的时间: $P = 0.274$; 注射病毒的 SST-Cre 小鼠与对照组小鼠进入中间区域的次数: $P = 0.279$)。结果提示,PrL 脑区 PV/SST 神经元活性不影响小鼠的自主活动水平。高架十字迷宫实验结果如图 2C, D 所示,与对照组相比,特异性抑制 PrL 脑区 SST 神经元可以显著降低小鼠在高架十字迷宫中间区域所处的时间 ($P = 0.029$),以及小鼠进入开臂的次数 ($P = 0.010$); 小鼠在开臂、闭臂区域的时间以及进入闭臂的次数与对照组相比没有显著差异 (注射病毒的 SST-Cre 小鼠与对照组小鼠在开臂区域的时间: $P = 0.243$; 在闭臂区域的时间: $P = 0.077$; 进入闭臂的次数: $P = 0.407$); 而特异性抑制 PrL 脑区 PV 神经元则对进入开臂的时间和次数均没有显著影响 (注射病毒的 PV-Cre 小鼠与对照组小鼠在开臂区域的时间: $P = 0.407$; 在闭臂区域的时间: $P = 0.051$; 在中间区域的时间: $P = 0.057$; 进入开臂的次数: $P = 0.629$; 进入闭臂的次数: $P = 0.374$)。结果提示,特异性抑制 PrL 脑区 SST 神经元可以导致小鼠焦虑水平上升,而 PrL 脑区 PV 中间神经元的活性对小鼠的焦虑水

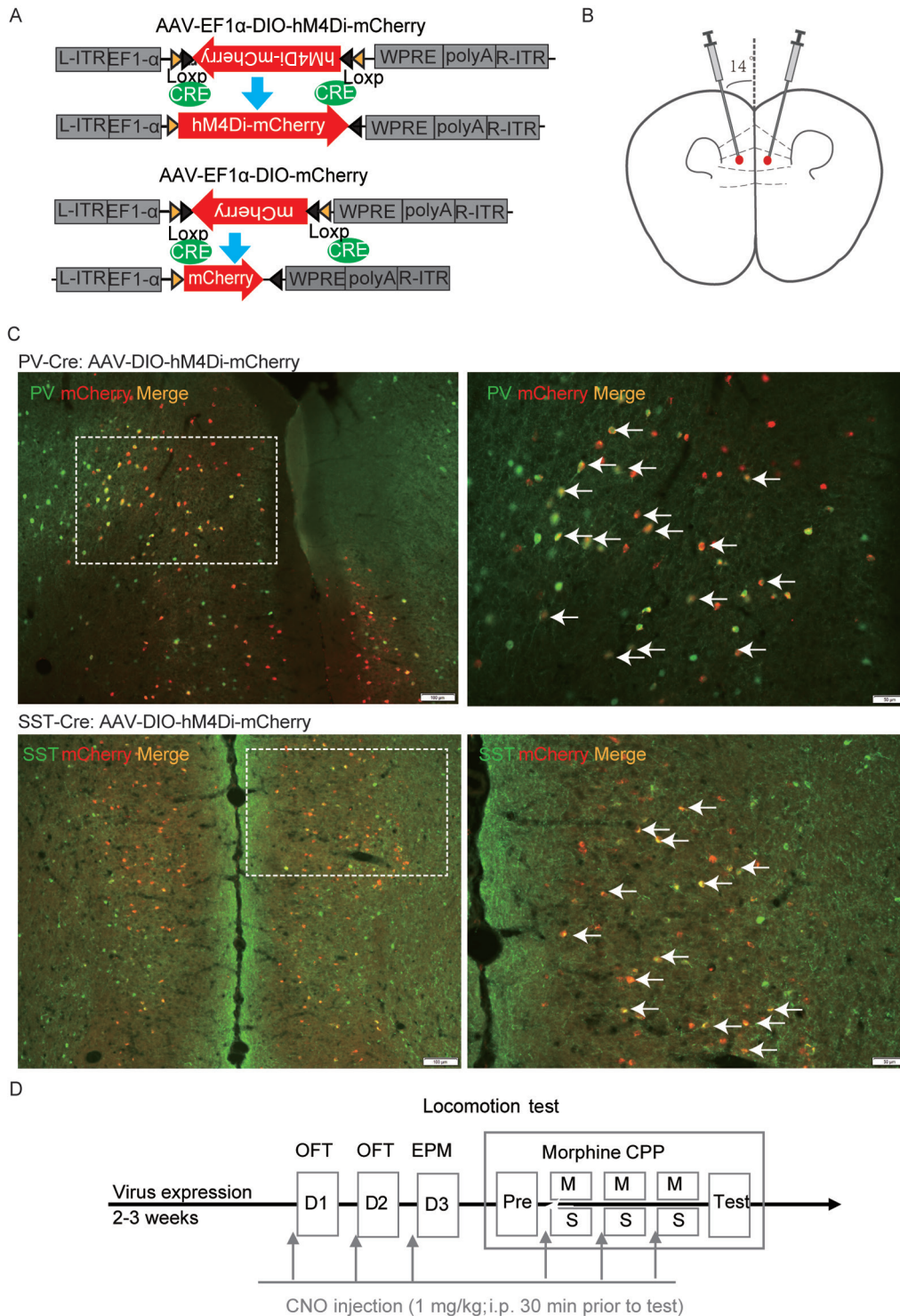


图 1. 通过化学遗传学手段特异性干预小鼠前边缘皮质脑区PV和SST神经元活性

Fig. 1. Specific inhibition of the parvalbumin (PV) and somatostatin (SST) neuron activity in prelimbic cortex (PrL). *A*: Structure diagram of AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry and AAV-EF1 α -Dio-mCherry. Two pairs of heterotypic, antiparallel loxP recombination sites were used to achieve Cre-mediated transgenes inversion, and to induce the virus expression under the control of EF1 α promoter. *B*: Schematic of the virus injection in PrL. *C*: The representative images of PV/SST and mCherry co-containing in the mice following 4 weeks of virus injection. Green: PV/SST; Red: mCherry; Scale bar: 50/100 μ m. Arrows indicate the PV/mCherry or SST/mCherry colocalized cells. *D*: Schematic of the experimental procedure to study the effect of inhibitory interneurons in PrL on the locomotor activity, anxiety level and morphine-induced behavior changes of the mice. OFT: open field test; EPM: elevated plus-maze test; CNO: clozapine-N-oxide; M: morphine; S: saline.

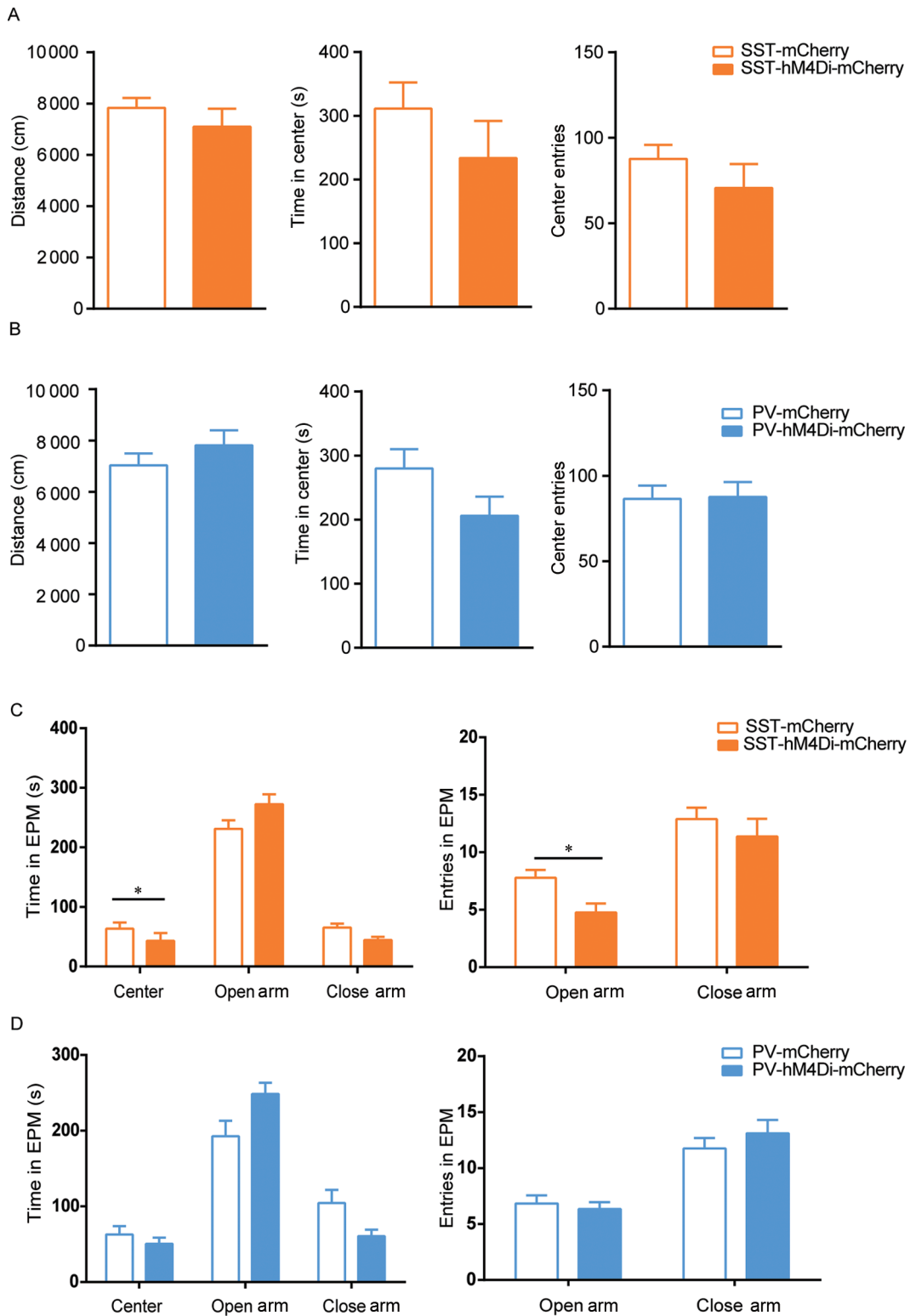


图 2. 干预小鼠PrL脑区PV和SST神经元活性对小鼠自主活动和焦虑水平的影响

Fig. 2. The effect of selective inhibition of PrL PV/SST interneurons on the locomotor activity and the anxiety level of the mice. The SST-Cre/PV-Cre mice were injected with AAV-EF1 α -Dio-mCherry or AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry in PrL, and recovered for 3 weeks. *A–B*: Open field tests: quantification of the total distance travelled, the time in the center and the center entries of SST-Cre (*A*) and PV-Cre (*B*) mice. Selective inhibition of PrL SST/PV interneurons had no effect on the basal locomotion of mice. *C–D*: Elevated plus-maze (EPM) tests: selective inhibition of PrL SST (*C*) and PV (*D*) interneurons on the anxiety level of the mice. Student's *t*-test, **P* < 0.05. Data are presented as mean \pm SEM, *n* = 10–15 per group.

平没有显著影响。

2.3 抑制PrL脑区SST神经元降低吗啡引起的小鼠活动敏感性

为了探究抑制 PrL 脑区 PV/SST 神经元对吗啡引起的活动敏感性的影响，我们采用单针吗啡诱导的活动敏感性实验模型，即急性单针给予成瘾性药物吗啡后检测动物的活动性。在进行吗啡活动敏感性实验前，对小鼠腹腔注射 CNO，30 min 之后，腹腔注射盐酸吗啡 (10 mg/kg)，并将小鼠置于旷场箱中自由活动，记录小鼠 2 h 内的活动情况。综合小鼠两天的活动情况，实验结果如图 3A 所示，特

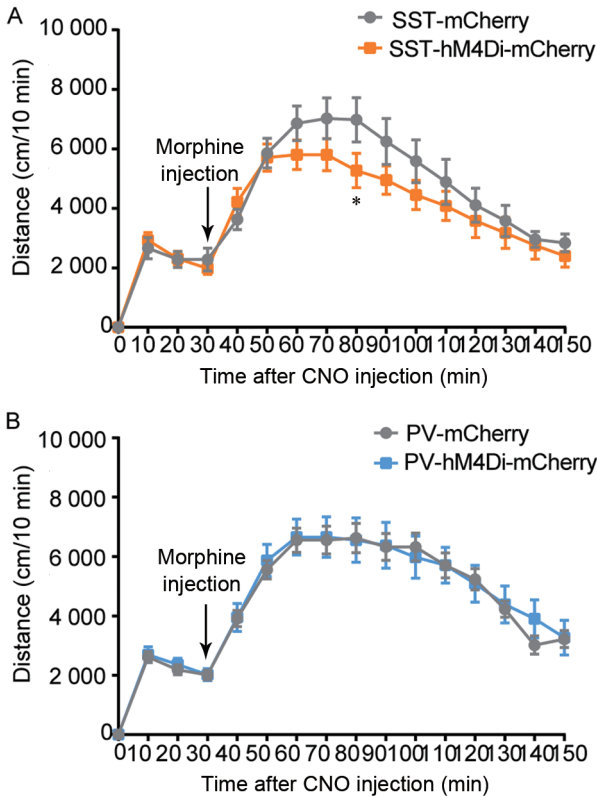


图 3. 干预小鼠PrL脑区PV和SST神经元活性对单针吗啡诱导的活动性增强的影响

Fig. 3. The effect of selective inhibition of PV/SST interneurons in PrL on the morphine-induced locomotor activity. The SST-Cre/PV-Cre mice were injected with AAV-EF1 α -Dio-mCherry or AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry in PrL, and recovered for 3 weeks before the behavior test. *A*: Selective inhibition of SST interneurons in PrL decreased the morphine-induced locomotor activity. *B*: Selective inhibition of PV interneurons in PrL had no effect on the morphine-induced locomotor activity. Two-way RM ANOVA by a Bonferroni *post-hoc* test. * $P < 0.05$ vs control virus group (SST-mCherry). Data are presented as mean \pm SEM, $n = 10-16$ per group.

异性沉默 PrL 的 SST 神经元可使小鼠在 CNO 注射 80 min 时的活动性显著降低 ($P = 0.030$)。而特异性沉默 PrL 的 PV 神经元对小鼠的吗啡引起的活动敏感性在 2 h 各个时间点均没有显著影响 ($F = 0.348$, $P = 0.560$) (图 3B)。提示 PrL 脑区 SST 中间神经元的活性参与调控单针吗啡引起的小鼠活动性的增强。

2.4 抑制PrL脑区SST神经元降低小鼠对吗啡的CPP

我们进一步采用吗啡 CPP 模型结合化学遗传学的方法，探究 PrL 脑区 PV 及 SST 中间神经元对吗啡引起的 CPP 的影响。将做完高架十字迷宫实验的小鼠进行吗啡 CPP 实验。在实验前测试之后，进行为期 3 天的吗啡条件性关联训练，在进行吗啡侧关联训练前 30 min，小鼠腹腔注射 CNO (2 mg/kg)，对 PrL 脑区 PV 或 SST 神经元进行抑制，4~6 h 后

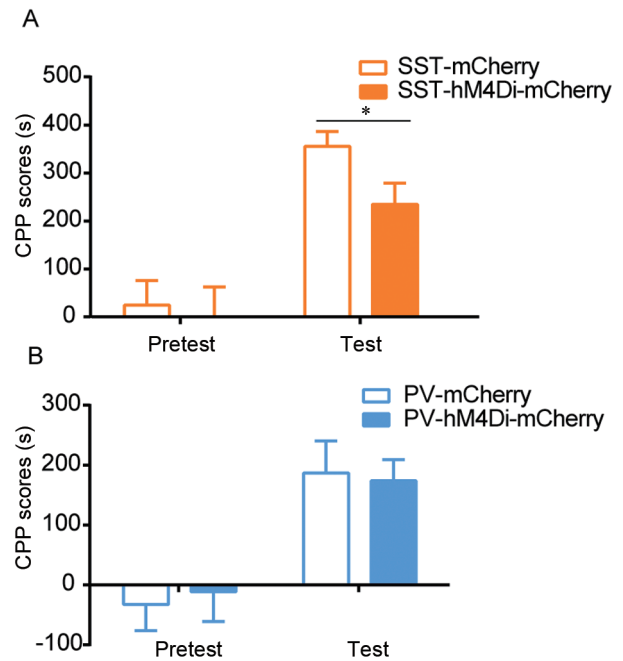


图 4. 干预小鼠PrL脑区PV和SST神经元活性对吗啡诱导的条件位置偏爱的影响

Fig. 4. The effect of selective inhibition of PV/SST interneurons in PrL on morphine-induced conditioned place preference (CPP). The SST-Cre/PV-Cre mice were injected with AAV-EF1 α -Dio-mCherry or AAV-EF1 α -Dio-hM4Di-mCherry in PrL, and recovered for 3 weeks before the CPP test. *A*: Selective inhibition of SST interneurons in PrL decreased morphine-induced CPP score ($F = 0.662$; $P = 0.044$). *B*: Selective inhibition of PV interneurons in PrL had no effect on morphine-induced CPP score ($F = 0.006$; $P = 0.938$). Two-way RM ANOVA by a Bonferroni *post-hoc* test. * $P < 0.05$. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 11-13$ per group.

再进行生理盐水侧关联训练。CPP 评分结果 (图 4A, B) 显示, 在进行吗啡环境关联训练时抑制 PrL 脑区 SST 神经元活性, 降低小鼠吗啡诱导的 CPP, 而在吗啡环境关联训练时抑制 PrL 脑区 PV 神经元活性则对吗啡诱导的 CPP 没有显著影响 (SST: $F = 0.662$; $P = 0.044$; PV: $F = 0.006$; $P = 0.938$)。提示 PrL 脑区 SST 神经元的活性特异性地参与吗啡诱导的 CPP 的形成。

3 讨论

本研究利用化学遗传学的方法在 PrL 脑区特异性抑制 PV 和 SST 中间神经元活性, 研究 PrL 脑区 PV 及 SST 中间神经元在成年小鼠自主活动、焦虑水平以及吗啡诱导的行为学改变中的作用。本研究结果显示, 用化学遗传学的方法特异性抑制 PrL 脑区 SST 神经元可以显著增加小鼠的焦虑水平, 但不影响小鼠的运动能力; 抑制 PrL 脑区 SST 神经元降低小鼠吗啡诱导的活动性增强及 CPP; 而抑制 PrL 脑区 PV 神经元则对小鼠的运动能力、焦虑水平及吗啡引起的行为学改变均没有显著影响。

PV 和 SST 神经元是 PFC 脑区主要的两类中间神经元。本研究显示, PV 和 SST 两种中间神经元对吗啡成瘾过程中的行为调控作用不同。以往有研究显示^[43], 特异性失活 PFC 脑区 PV 中间神经元可对小鼠的工作记忆产生影响, 而特异性失活 PFC 脑区 SST 中间神经元则对工作记忆没有影响。PV 和 SST 功能不同可能是由于 PFC 脑区对下游单胺能通路复杂的突触调控所导致的^[44, 45]。本研究提示, PrL 脑区不同的中间神经元可能通过不同的突触调控, 参与不同的神经微环路, 从而发挥了不同的调控作用。

作为一种常见的成瘾性药物, 吗啡可诱导产生行为敏化。而目前有关 mPFC 在行为敏化中作用的大多数研究, 主要集中于可卡因和安非他明。本研究中急性吗啡注射可以增加小鼠的运动活性, 表明吗啡可以诱导小鼠产生行为敏化, 抑制 PrL 脑区 SST 神经元可以在 CNO 注射 80 min 时显著抑制小鼠的行为敏化。本研究显示, PrL 脑区参与吗啡诱导的行为敏化, 并且其 SST 中间神经元在其中发挥重要的作用。之前的研究表明, mPFC 脑区的兴奋毒性损伤可以抑制吗啡诱导的行为敏化^[46], 而本研究则进一步提示, 该毒性损伤可能是通过抑制 SST 神经元进而抑制吗啡诱导的行为敏化。

大脑 GABA 能信号降低对皮层兴奋抑制的平衡起到关键作用。对严重抑郁症的研究表明, GABA 能的改变可以起到皮层抑制作用^[47], 并且背外侧前额叶和眶额皮质 (orbitofrontal cortex, OFC) 钙结合蛋白阳性 GABA 神经元, 即 SST 神经元的密度降低^[48]。提示 SST 神经元可能参与焦虑抑郁样行为^[49]。之前有研究表明^[50], 抑制 OFC 脑区 SST 神经元能够增加小鼠的焦虑行为。本研究显示, 实验前 30 min 急性腹腔注射 1 mg/kg CNO 抑制 PrL 脑区 SST 中间神经元活性可以增加小鼠的焦虑行为, 首次表明 PrL 脑区 SST 中间神经元在焦虑行为中的调控作用。

SST 中间神经元是 PFC 脑区中分布广泛的一类抑制性 GABA 能中间神经元, 可以通过靶向锥体神经元的树突末端调控谷氨酸能输入, 抑制锥体细胞丛并介导邻近的锥体细胞发生双突触抑制^[31]。一般来讲, 抑制 PrL 脑区 SST 神经元可以导致 PrL 锥体神经元去抑制, 进而诱导兴奋性反应。而我们的研究显示抑制 PrL 脑区 SST 神经元导致吗啡诱导的行为敏化及 CPP 受损, 提示抑制 SST 神经元后, PrL 兴奋性神经元活性可能受损。SST 作为一种抑制性中间神经元, 具有广泛的突触可塑性, 其可能抑制了周围其他 GABA 能神经元的活性, 而周围其他 GABA 能神经元可以直接作用于周围锥体神经元, 进而对锥体神经元起到去抑制的作用。

小鼠吗啡自给药研究表明, 压力应激等情绪可能增加个体对吗啡奖赏效应的敏感性, 并使个体在吗啡自给药过程中踏板数增加, 更易产生药物成瘾^[51]。压力应激的强度和持续时间可以影响吗啡诱导的 CPP^[52]。本文中抑制 PrL 脑区 SST 神经元导致吗啡诱导的 CPP 降低, 可能部分是由于抑制 PrL 脑区 SST 神经元增加了小鼠的焦虑水平, 从而导致吗啡诱导的 CPP 降低。

另一方面, 研究表明, 慢性的药物滥用可以导致 PrL 脑区深层锥体神经元兴奋性降低; 光遗传学激活 PrL 脑区神经元, 补偿由于滥用药物所导致的活动性降低, 可以抑制成瘾行为; 光遗传学抑制 PrL 脑区神经元可以促进个体对成瘾性药物的强迫性觅药行为^[53]。抑制 PrL 脑区 SST 神经元导致吗啡诱导的 CPP 降低, 可能是由于 PrL 兴奋性神经元处于去抑制状态, 补充了由于吗啡注射引起的活动性降低, 从而抑制了多巴胺诱导的 CPP。

综上所述, 本研究显示 PrL 脑区 PV 及 SST 中间神经元在成年小鼠吗啡诱导的行为学改变中的不

同作用以及对焦虑水平的不同影响。具体来说,特异性抑制 PrL 脑区 SST 神经元可以显著增加小鼠的焦虑水平,降低小鼠吗啡诱导的活动性增强及 CPP,但不影响小鼠的运动能力;而抑制 PrL 脑区 PV 神经元均无显著影响。这两类神经元对小鼠行为学的不同调控作用究竟是如何产生的?是否涉及吗啡引起的两类神经元突触可塑性的改变?阿片受体信号转导是否参与其中?两类神经元是否对 PrL 脑区兴奋性神经投射有不同调控作用?这都有待进一步的研究。

参考文献

- 1 Mendelson JH, Mello NK. Management of cocaine abuse and dependence. *N Engl J Med* 1996; 334(15): 965–972.
- 2 Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 565–598.
- 3 Grueter BA, Rothwell PE, Malenka RC. Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. *Curr Opin Neurobiol* 2012; 22(3): 545–551.
- 4 Zhang J, Zhang L, Jiao H, Zhang Q, Zhang D, Lou D, Katz JL, Xu M. c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J Neurosci* 2006; 26(51): 13287–13296.
- 5 Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28(7): 771–784.
- 6 Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 2012; 76(6): 1057–1070.
- 7 Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 167–202.
- 8 Black YD, Maclaren FR, Naydenov AV, Carlezon WJ, Baxter MG, Konradi C. Altered attention and prefrontal cortex gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence. *J Neurosci* 2006; 26(38): 9656–9665.
- 9 Jentsch JD, Taylor JR. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 146(4): 373–390.
- 10 Goldstein RZ, Volkow ND. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12(11): 652–669.
- 11 Li Y, Wolf ME, White FJ. The expression of cocaine sensitization is not prevented by MK-801 or ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 1999; 104(1–2): 119–125.
- 12 Schenk S, Snow S. Sensitization to cocaine's motor activating properties produced by electrical kindling of the medial prefrontal cortex but not of the hippocampus. *Brain Res* 1994; 659(1–2): 17–22.
- 13 Stefanik MT, Moussawi K, Kupchik YM, Smith KC, Miller RL, Huff ML, Deisseroth K, Kalivas PW, LaLumiere RT. Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addict Biol* 2013; 18(1): 50–53.
- 14 Taber MT, Das S, Fibiger HC. Cortical regulation of subcortical dopamine release: mediation via the ventral tegmental area. *J Neurochem* 1995; 65(3): 1407–1410.
- 15 Tong ZY, Overton PG, Clark D. Chronic administration of (+)-amphetamine alters the reactivity of midbrain dopaminergic neurons to prefrontal cortex stimulation in the rat. *Brain Res* 1995; 674(1): 63–74.
- 16 Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn Mem* 2009; 16(5): 279–288.
- 17 Ghazizadeh A, Ambroggi F, Odean N, Fields HL. Prefrontal cortex mediates extinction of responding by two distinct neural mechanisms in accumbens shell. *J Neurosci* 2012; 32(2): 726–737.
- 18 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.
- 19 Shen HW, Gipson CD, Huits M, Kalivas PW. Prelimbic cortex and ventral tegmental area modulate synaptic plasticity differentially in nucleus accumbens during cocaine-reinstated drug seeking. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39(5): 1169–1177.
- 20 Kalivas PW. Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants. *Drug Alcohol Depend* 1995; 37(2): 95–100.
- 21 Jonkman S, Mar AC, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ. The rat prelimbic cortex mediates inhibitory response control but not the consolidation of instrumental learning. *Behav Neurosci* 2009; 123(4): 875–885.
- 22 Sharpe MJ, Killcross S. The prelimbic cortex directs attention toward predictive cues during fear learning. *Learn Mem* 2015; 22(6): 289–293.
- 23 Mucha RF, van der Kooy D, O'Shaughnessy M, Bucenicks P. Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat. *Brain Res* 1982; 243(1): 91–105.
- 24 Muller U. Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zoology (Jena)* 2002; 105(4): 313–320.
- 25 Lin KY, Cherng CG, Yang FR, Lin LC, Lu RB, Yu L. Memantine abolishes the formation of cocaine-induced conditioned place preference possibly via its IL-6-modulating

- effect in medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 2011; 220(1): 126–131.
- 26 Pum ME, Carey RJ, Huston JP, Muller CP. Role of medial prefrontal, entorhinal, and occipital 5-HT in cocaine-induced place preference and hyperlocomotion: evidence for multiple dissociations. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 201(3): 391–403.
- 27 Tian W, Zhao M, Li M, Song T, Zhang M, Quan L, Li S, Sun ZS. Reversal of cocaine-conditioned place preference through methyl supplementation in mice: altering global DNA methylation in the prefrontal cortex. *PLoS One* 2012; 7(3): e33435.
- 28 Narita M, Matsushima Y, Niikura K, Narita M, Takagi S, Nakahara K, Kurahashi K, Abe M, Saeki M, Asato M, Imai S, Ikeda K, Kuzumaki N, Suzuki T. Implication of dopaminergic projection from the ventral tegmental area to the anterior cingulate cortex in mu-opioid-induced place preference. *Addict Biol* 2010; 15(4): 434–447.
- 29 Tan H, Rosen LG, Ng GA, Rushlow WJ, Laviolette SR. NMDA receptor blockade in the prelimbic cortex activates the mesolimbic system and dopamine-dependent opiate reward signaling. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231(24): 4669–4679.
- 30 Yang L, Sun ZS, Zhu YP. Proteomic analysis of rat prefrontal cortex in three phases of morphine-induced conditioned place preference. *J Proteome Res* 2007; 6(6): 2239–2247.
- 31 Tzschentke TM, Schmidt WJ. Discrete quinolinic acid lesions of the rat prelimbic medial prefrontal cortex affect cocaine- and MK-801-, but not morphine- and amphetamine-induced reward and psychomotor activation as measured with the place preference conditioning paradigm. *Behav Brain Res* 1998; 97(1–2): 115–127.
- 32 Tzschentke TM, Schmidt WJ. Functional heterogeneity of the rat medial prefrontal cortex: effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* 1999; 11(11): 4099–4109.
- 33 Aika Y, Ren JQ, Kosaka K, Kosaka T. Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector. *Exp Brain Res* 1994; 99(2): 267–276.
- 34 Halasy K, Somogyi P. Distribution of GABAergic synapses and their targets in the dentate gyrus of rat: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *J Hirnforsch* 1993; 34(3): 299–308.
- 35 Acsady L, Gores TJ, Freund TF. Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 1996; 73(2): 317–334.
- 36 Francavilla R, Luo X, Magnin E, Tyan L, Topolnik L. Coordination of dendritic inhibition through local disinhibitory circuits. *Front Synaptic Neurosci* 2015; 7: 5.
- 37 Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 1992; 12(2): 483–488.
- 38 Leah PM, Heath EM, Balleine BW, Christie MJ. Chronic morphine reduces surface expression of delta-opioid receptors in subregions of rostral striatum. *Neurochem Res* 2016; 41(3): 500–509.
- 39 Wang L, Shen M, Jiang C, Ma L, Wang F. Parvalbumin interneurons of central amygdala regulate the negative affective states and the expression of corticotrophin-releasing hormone during morphine withdrawal. *Int J Neuropsychopharmacol* 2016; 19(11). doi: 10.1093/ijnp/pyw060.
- 40 Guo M, Bryant J, Sultana S, Jones O, Royal W 3rd. Effects of vitamin A deficiency and opioids on parvalbumin + interneurons in the hippocampus of the HIV-1 transgenic rat. *Curr HIV Res* 2012; 10(5): 463–468.
- 41 Zheng F, Khanna S. Hippocampal field CA1 interneuronal nociceptive responses: modulation by medial septal region and morphine. *Neuroscience* 1999; 93(1): 45–55.
- 42 Schurks M, Kurth T, Buring JE, Zee RY. A candidate gene association study of 77 polymorphisms in migraine. *J Pain* 2009; 10(7): 759–766.
- 43 Murray AJ, Woloszynowska-Fraser MU, Ansel-Bollepalli L, Cole KL, Foggetti A, Crouch B, Riedel G, Wulff P. Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. *Sci Rep* 2015; 5: 16778.
- 44 Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 2001; 21(24): 9917–9929.
- 45 Sesack SR, Carr DB. Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav* 2002; 77(4–5): 513–517.
- 46 Li Y, Hu XT, Berney TG, Vartanian AJ, Stine CD, Wolf ME, White FJ. Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations. *Synapse* 1999; 34(3): 169–180.
- 47 Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 2011; 16(4): 383–406.
- 48 Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex

- in major depression. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32(2): 471–482.
- 49 Shen Q, Lal R, Luellen BA, Earnheart JC, Andrews AM, Luscher B. gamma-Aminobutyric acid-type A receptor deficits cause hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and antidepressant drug sensitivity reminiscent of melancholic forms of depression. *Biol Psychiatry* 2010; 68(6): 512–520.
- 50 Soumier A, Sibille E. Opposing effects of acute versus chronic blockade of frontal cortex somatostatin-positive inhibitory neurons on behavioral emotionality in mice. *Neuropsychopharmacology* 2014; 39(9): 2252–2262.
- 51 Kuzmin A, Semenova S, Zvartau EE, Van Ree JM. Enhancement of morphine self-administration in drug naive, inbred strains of mice by acute emotional stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 1996; 6(1): 63–68.
- 52 Bali A, Randhawa PK, Jaggi AS. Stress and opioids: role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 51: 138–150.
- 53 Chen BT, Yau HJ, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho SL, Hopf FW, Bonci A. Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature* 2013; 496(7445): 359–362.