

研究论文

中央杏仁核中促肾上腺皮质激素释放激素神经元调控吗啡戒断诱发的负性情绪

王雪颖¹, 余敏², 马兰¹, 王菲菲¹, 江长优^{1,*}复旦大学基础医学院¹医学神经生物学国家重点实验室, 药理研究中心; ²临床医学八年制, 上海 200032

摘要: 成瘾药物戒断诱发负性情绪并伴有脑内应激系统的激活, 是导致负性强化并使成瘾个体持续觅药和复吸的重要因素。促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin-releasing hormone, CRH)是应激系统发挥生理作用的重要递质, 在介导焦虑、恐惧等负性情绪的重要核团——中央杏仁核(central amygdala, CeA)中广泛分布。然而在CeA中这类表达CRH的神经元在成瘾药物戒断引发的负性情绪中作用还并不清楚。本研究采用*CRH-Cre*转基因小鼠, 通过依赖Cre-LoxP系统的化学遗传学方法特异性激活或抑制小鼠CeA中的CRH神经元, 结合条件性位置厌恶(conditioned place aversion, CPA)、高架十字迷宫、自主活动能力测试等行为学实验, 探究CeA中CRH神经元对小鼠吗啡戒断产生的厌恶、焦虑等负性情绪的影响。结果显示, 抑制CeA中CRH神经元可抑制小鼠吗啡戒断诱导的CPA形成, 并降低小鼠焦虑水平。直接激活CeA中CRH神经元可使未经吗啡暴露的小鼠产生CPA和焦虑。吗啡自然戒断和CRH神经元的活性改变对小鼠的自主活动能力都没有显著影响。以上结果提示, CeA中CRH神经元参与调控小鼠吗啡戒断诱导的负性情绪。本研究为药物成瘾与复吸机制提供了理论依据。

关键词: 中央杏仁核; 促肾上腺皮质激素释放激素; 吗啡戒断; 负性情绪**中图分类号:** R964

Corticotrophin-releasing hormone neurons in the central amygdala mediate morphine withdrawal-induced negative emotions

WANG Xue-Ying¹, YU Min², MA Lan¹, WANG Fei-Fei¹, JIANG Chang-You^{1,*}¹The State Key Laboratory of Medical Neurobiology and Pharmacology Research Center; ²Clinic Medicine, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Drugs of abuse leads to adaptive changes in the brain stress system, and produces negative affective states including aversion and anxiety after drug use is terminated. Corticotrophin-releasing hormone (CRH) is the main transmitter in control of response to stressors and is neuronal enriched in the central amygdala (CeA), a sub-region of the extended amygdala playing an important role in integrating emotional information and modulating stress response. The effect of CRH neurons in CeA on the negative emotions on morphine naïve and withdrawal mice is unclear. Thus, we utilized *CRH-Cre* transgenic mice injected with AAV-mediated Designer Receptors Exclusively Activated By Designer Drugs (DREADDs) to chemogenetically manipulate CRH neurons in CeA. And methods of behavior analysis, including conditioned place aversion (CPA), elevated plus maze and locomotor activity tests, were used to investigate morphine withdrawal-induced negative emotions in mice. The results showed that, inhibiting CRH neurons of CeA decreased the formation of morphine withdrawal-induced CPA, as well as the anxiety level of *CRH-Cre* mice. Furthermore, specifically activating CRH neurons in CeA evoked CPA and anxiety of morphine naïve mice. Neither inhibiting nor activating CRH neurons had effects on their locomotor activity. These results suggest that CRH neurons in CeA are involved in the mediation of morphine withdrawal-

Received 2019-03-03 Accepted 2019-04-23

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31671042, 31871021) and the Innovation Training Project for Undergraduate Students in Fudan University.

*Corresponding authors. Tel: +86-21-54237680; Fax: +86-21-54237621; E-mail: jiangcy@fudan.edu.cn

induced negative emotion in mice, providing a theoretical basis for drug addiction and relapse mechanism.

Key words: central amygdala; corticotrophin-releasing hormone; morphine withdrawal; negative emotion

药物成瘾是一类慢性、复发性脑疾病, 成瘾患者表现出强迫性觅药行为, 撤药后出现强烈的戒断反应。戒断反应主要包含两个方面, 一是躯体症状, 如阿片类药物戒断引发的流感样症状(流泪流涕、恶心呕吐、肌肉酸痛和出汗发热等), 二是负性情感, 如焦虑、抑郁、烦躁不安和快感缺失等。药物成瘾的负性强化理论认为, 对负性情绪的逃避是导致成瘾患者持续性用药及复吸的主要动机^[1]。临床研究也表明, 阿片类药物戒断引起的负性情绪对成瘾者强迫用药和复吸行为有较大影响^[2]。

中央杏仁核(central amygdala, CeA)是大脑边缘神经系统的主要脑区之一, 是参与情绪调控的主要结构。CeA接受来自皮层和基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)的谷氨酸能投射, 同时投射到下游下丘脑、中脑及终纹床核等核团, 在调控疼痛、恐惧、焦虑等应激反应中发挥着重要作用^[3]。例如, 激活BLA到CeA的投射神经末梢能够明显缓解小鼠的焦虑情绪, 而抑制同样的环路投射末梢可诱发小鼠的焦虑症状^[4]。同时, CeA还参与调控药物渴求及复吸^[5,6]。但目前, CeA参与药物渴求及复吸的细胞生物学机制, 以及对药物戒断诱发的负性情绪的调控作用及机制尚不清楚。

下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)是神经内分泌系统中参与控制应激反应的重要部分。成瘾性药物的摄入激活HPA轴, 调控脑内动机、奖赏环路, 从而促使机体产生觅药行为^[7]。促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin-releasing hormone, CRH)是HPA轴中的调节激素, 主要由下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)分泌。当机体出现焦虑等应激反应时, PVN中CRH神经元释放CRH, 与垂体前叶中CRH1受体结合促进促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)的分泌, 调节机体各项活动。除PVN外, 在杏仁核、海马、中脑等脑区也都发现有CRH神经元存在^[8]。研究显示, 压力及焦虑情绪会使杏仁核中CRH神经元数量增多, CRH分泌水平升高^[9,10]。同时, 成瘾性物质戒断可明显上调CeA中CRH和促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin-releasing factor, CRF)的表达水平^[11-13]。

这一系列关联现象提示CeA中CRH神经元在调控成瘾药物戒断及复吸中可能发挥着重要作用。

本研究利用Cre-Loxp系统, 采用能够在CRH神经元中特异性表达Cre重组酶的CRH-Cre转基因小鼠, 通过向CeA脑区注射依赖Cre酶表达的腺相关病毒, 使小鼠CeA中CRH神经元表达能够被特定药物激活(hM3Dq)或抑制(hM4Di)的受体(designer receptors exclusively activated by designer drugs, DREADDs)。通过化学遗传学方法^[14], 给小鼠腹腔注射氯氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO), 特异性激活或抑制小鼠CeA脑区的CRH神经元, 结合条件性位置厌恶(conditioned place aversion, CPA)模型、高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)以及自主活动测试等行为学实验, 观察CeA中CRH神经元对未经吗啡暴露和吗啡戒断小鼠的厌恶和焦虑等负性情绪的调控作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 CRH-Cre小鼠购于Jackson Lab (Jax:012704)。实验用CRH-Cre小鼠皆由Cre阳性小鼠与C57BL/6J品系小鼠交配6代所得。小鼠饲养在清洁环境中, 温度维持在22~25℃, 湿度维持在40%~60%, 光照/黑暗周期为12h/12h。用于交配繁殖的小鼠饲养于清洁级独立通气笼具系统中, 昼夜节律正常(8:00~20:00为昼, 20:00~次日8:00为夜)。实验用小鼠饲养于普通层流架, 昼夜节律颠倒(8:00~20:00为夜, 20:00~次日8:00为昼)。实验用小鼠每笼饲养2~5只, 自由进水进食。所有涉及实验动物操作均符合国家颁布的《实验动物管理条例》, 并通过复旦大学相关伦理委员会的批准。

1.2 实验试剂与抗体 盐酸吗啡注射液(NE-PHARM, 1mL), CNO(#C0832, Sigma-Aldrich), 抗体封闭液(0.5% Triton X-100, #T9284, Sigma-Aldrich), 驴血清(#005-000-001, Jackson Immunoresearch), 兔抗CRH抗体(#ab8901, Abcam, 1:200), 鼠抗HA抗体(#ab49969, Abcam, 1:500), 兔抗c-fos抗体(#sc-52, Santa Cruz, 1:1000), 驴抗小鼠Alexa Fluor 488抗体(#A-21202, Thermo Fisher, 1:500), 羊抗兔Cy3抗体(#115-165-114, Jackson Immuno Research, 1:1000)。

1.3 脑立体定位手术 取 8~12 周小鼠, 用 2% 异氟烷麻醉后, 将小鼠固定于脑立体定位仪上, 剪去小鼠头顶部毛发, 用棉签蘸取碘酒擦拭消毒后, 剪开头皮暴露颅骨前后囟。调节立体定位仪, 使小鼠前后囟处于相同的高度。以 33-gauge 的 10 μ L 量程 Hamilton 注射针在小鼠 CeA 脑区每侧注射 0.5 μ L 腺相关病毒。所用病毒 *AAV-hsyn-Flex-tdTomato*、*AAV-hsyn-Dio-hM4Di-mCitrine-HA* 和 *AAV-hsyn-Dio-hM-3Dq-mCitrine-HA* 皆购于美国 UNC Vector Core, 滴度约为 2×10^{12} V.G./mL。CeA 注射坐标为: AP -1.3 mm, ML \pm 2.6 mm, DV -4.3 mm。手术后小鼠恢复 21 d, 然后进行行为学实验。

1.4 免疫荧光染色 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (1 mg/kg) 麻醉后, 用生理盐水及预冷固定液 (4% 多聚甲醛) 进行左心室体循环灌注。将鼠脑取出放入固定液中, 置于 4 $^{\circ}$ C 过夜进行后固定。之后分别用 20% 和 30% 蔗糖溶液对脑组织进行梯度脱水 (20% 蔗糖溶液中沉底后更换 30% 蔗糖溶液, 沉底后即完成脱水)。将脱水的脑组织用液氮冷冻后放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。24 h 后用冷冻切片 (CM1900, Leica) 进行脑组织冠状切片, 取 30 μ m 厚度脑片放入冷冻保护液中保存。取染色脑片用 PBS 溶液漂 3 次 \times 10 min。一抗用含 0.3% Triton X-100 和 10% 驴血清的 PBS 稀释, 4 $^{\circ}$ C 孵育脑片过夜。二抗用 PBS 溶液按比例稀释, 室温孵育脑片 1.5 h。贴片后, 用荧光显微镜 (DP-80, Olympus) 在 20 倍物镜下进行图像采集。

1.5 吗啡递增剂量给药模型 实验小鼠于饲养笼中腹腔注射吗啡 (10 mg/kg-20 mg/kg-40 mg/kg-60 mg/kg-60 mg/kg), 一天两次, 每两针之间间隔 12 h。具体给药安排见图 1C。

1.6 CPA 实验 CPA 实验在两箱 CPP 系统 (Med Associates 公司) 中进行。实验开始前, 将实验小鼠置于实验环境中适应 3 天。

1.6.1 吗啡戒断诱导的 CPA 第 1 天进行实验前测试 (pretest), 将测试箱中隔板取出, 实验小鼠放入测试箱中使其自由探索 20 min。记录并分析小鼠在测试箱两侧所处时间, 计算基础偏爱值, 并将在单侧停留时间超过 13 min 的小鼠剔除, 之后进行吗啡递增剂量给药。在给药第 6、7 天, 即给予 60 mg/kg 剂量吗啡后 8 h (出现明显戒断症状) 进行吗啡戒断负性情绪诱导的 CPA 训练。在每次训练前 30 min 给实验小鼠腹腔注射 CNO (2 mg/kg), 30

min 后置于测试箱的关联侧 30 min, 连续训练 3 次。训练后小鼠在饲养笼中自然戒断 7 天后, 进行测试 (test)。将小鼠放入与实验前测试相同的已取出隔板的测试箱中, 自由探索 20 min, 记录并分析小鼠在箱子两侧所处的时间, 采用戒断训练关联侧时间减对侧时间计算小鼠的 CPA 值。

1.6.2 激活 CRH 神经元诱导的 CPA 第 1 天进行实验前测试, 计算基础偏爱值, 剔除单侧停留时间超过 13 min 的小鼠, 之后进行 3 天的 CPA 训练。每日上午给小鼠腹腔注射 CNO (2 mg/kg), 30 min 后将小鼠放置于训练箱关联侧 30 min; 6 h 后给小鼠腹腔注射生理盐水, 之后将小鼠放置于对侧 30 min。第 5 天进行测试, 采用关联侧时间减对侧时间计算小鼠的 CPA 值。

1.7 EPM 实验 实验开始前将小鼠置于实验环境中适应 3 d。实验当天, 将小鼠提前置于实验环境中适应 30 min, 腹腔注射 CNO (2 mg/kg), 30 min 后将小鼠放入 EPM 中间区域, 记录 6 min 内小鼠在 EPM 的探索情况, 统计小鼠在开臂中所处时间。

1.8 自主活动能力测试 实验在小鼠旷场检测箱 (Med-OFA-MS) 中进行。实验开始前将小鼠置于实验环境中适应 3 d 使之熟悉实验环境。实验当天, 将小鼠提前置于实验环境中适应 30 min, 腹腔注射 CNO (2 mg/kg), 30 min 后将小鼠放入旷场箱中自由活动 30 min, 统计小鼠总的活动距离。

1.9 数据统计及分析 数据用 mean \pm SEM 表示。采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 用 GraphPad Prism 6.01 软件进行作图。组间差异用 *t* 检验或 Mann-Whitney 秩和检验分析。P < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性抑制 CeA 中 CRH 神经元抑制吗啡戒断后的环境关联性厌恶记忆的形成

向 *CRH-Cre* 小鼠 CeA 脑区注射 *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* 对照病毒和 *AAV-hsyn-Dio-hM4D(Gi)-mCitrine-HA* 抑制型的化学遗传学病毒 (图 1A), 免疫荧光图显示病毒特异性表达在 CeA。将 CeA 脑区共染 HA 和 CRH, 荧光图显示表达 hM4D(Gi)(HA 阳性) 的神经元皆为 CRH 神经元 (图 1B)。小鼠手术恢复三周后进行递增剂量吗啡给药后戒断诱发的 CPA 训练。实验小鼠递增剂量吗啡给药达到 60 mg/kg 后, 在注射吗啡 8 h 后, 腹腔注射给予 CNO, 30

min 后置于条件性位置偏爱箱中一侧使其自由活动 30 min, 将戒断时的厌恶情绪和环境进行关联。连续训练 3 次, 最后一次关联训练后自然戒断 7 天, 测试小鼠的 CPA 值 (图 1C)。结果显示, 注射对照病毒的小鼠相比于吗啡给药前在吗啡戒断关联环境中呆的时间明显减少, 提示形成了吗啡戒断诱发的

CPA (图 1E, $P < 0.001$), 而注射抑制型病毒的小鼠并无明显 CPA 形成 (图 1F, $P = 0.3358$)。该结果表明, 吗啡自然戒断的小鼠能够形成环境关联性厌恶记忆, 利用化学遗传学方式在环境关联训练时抑制 CeA 中 CRH 神经元活性可抑制环境关联性厌恶记忆的形成。

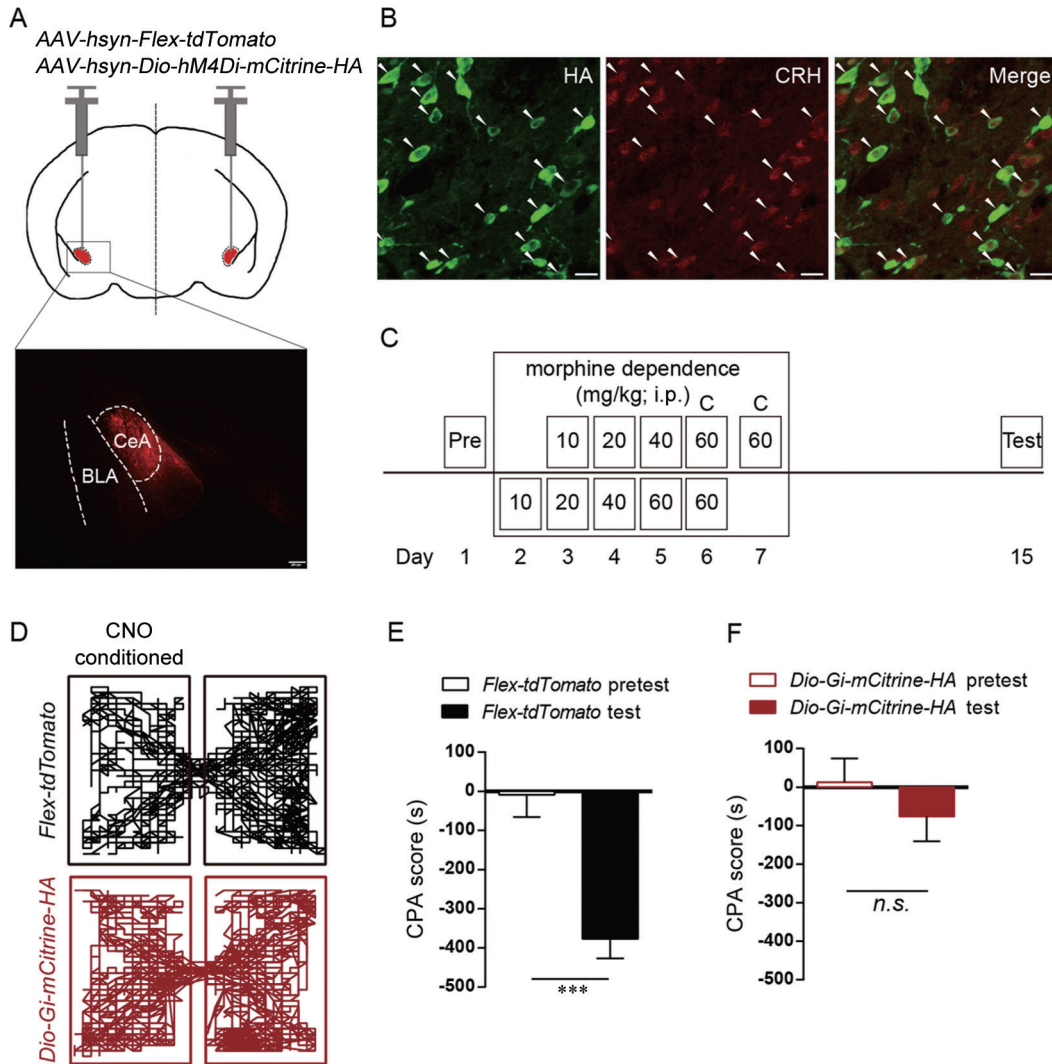


图 1. 特异性抑制CeA中CRH神经元抑制吗啡戒断引起的关联性厌恶记忆形成

Fig. 1. Specifically inhibiting CRH neurons in the CeA suppressed morphine withdrawal-induced conditioned place aversion (CPA). *A*: Top, schematic of the virus injection in CeA. Below, representative image indicates that the virus was specifically expressed in the CeA. Scale bar, 200 μm . *B*: Representative image of CeA from the mice injected with AAV-hsyn-Dio-hM4D(Gi)-mCitrine-HA virus. Green: HA; Red: CRH. Arrows indicate the HA positive neurons co-labelled with CRH. Scale bar, 20 μm . *C*: Schematic of the experimental procedure to establish morphine withdrawal-induced CPA. Eight hours after each of the last 3 morphine injections, mice were confined in one chamber for conditioning. Pre: pretest; C: conditioning; i.p.: intraperitoneal injection. Dose (mg/kg) of morphine was indicated in the box. Mice were injected with CNO 30 min before CPA conditioning. *D*: Representative behavioral trace of the CPA test. *E*, *F*: CPA scores of CRH-Cre mice injected with AAV-hsyn-Flex-tdTomato (*E*) and AAV-hsyn-Dio-hM4D(Gi)-mCitrine-HA viruses (*F*). Data are presented as mean \pm SEM. In *E*, $n = 10$; In *F*, $n = 11$. *** $P < 0.001$; n.s.: no significance. Student's *t*-test was used to compare the means of two groups.

2.2 特异性抑制CeA中CRH神经元缓解吗啡戒断时焦虑水平的上升

为进一步探究抑制 CeA 中 CRH 神经元对小鼠吗啡戒断诱发的负性情绪的影响, 我们在注射了 *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* 对照病毒和 *AAV-hsyn-Dio-hM4D(Gi)-mCitrine-HA* 抑制型病毒的小鼠吗啡给药前以及递增剂量给药后的戒断期分别进行了 EPM 和自主活动能力测试实验, 在实验前 30 min 小鼠腹腔注射 CNO。EPM 结果显示, 注射对照病毒的小鼠吗啡戒断后在开臂停留的时间明显低于吗啡递增剂量给药前 (图 2B, $P = 0.0012$), 而注射抑制型病毒的小鼠吗啡给药前和戒断后在开臂停留的时间没有显著差异 (图 2C, $P = 0.0523$)。活动能力测试实验显示, 两组小鼠在吗啡给药前及吗啡戒断后的总

活动距离没有显著差异 (图 2E, $P = 0.7243$; 图 2F, $P = 0.1448$)。上述结果表明, 吗啡戒断使小鼠焦虑水平上升, 而抑制 CeA 中 CRH 神经元能够缓解小鼠的焦虑状态, 但不影响小鼠的自主活动能力。

2.3 特异性激活CeA中CRH神经元可诱导环境关联性厌恶记忆的形成

药物戒断伴有应激系统的激活和 CRH 表达水平的上升^[11-13]。为探究激活 CeA 中 CRH 神经元对小鼠负性情绪的影响, 我们向 *CRH-Cre* 小鼠的 CeA 脑区注射 *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* 对照病毒和 *AAV-hsyn-Dio-hM3D(Gq)-mCitrine-HA* 激活型的化学遗传学病毒 (图 3A), 免疫荧光图显示表达 hM3D(Gq)(HA 阳性) 的神经元皆为 CRH 神经元 (图 3B)。小鼠手术恢复三周后进行实验。将小鼠注射 CNO, 2 h 后灌

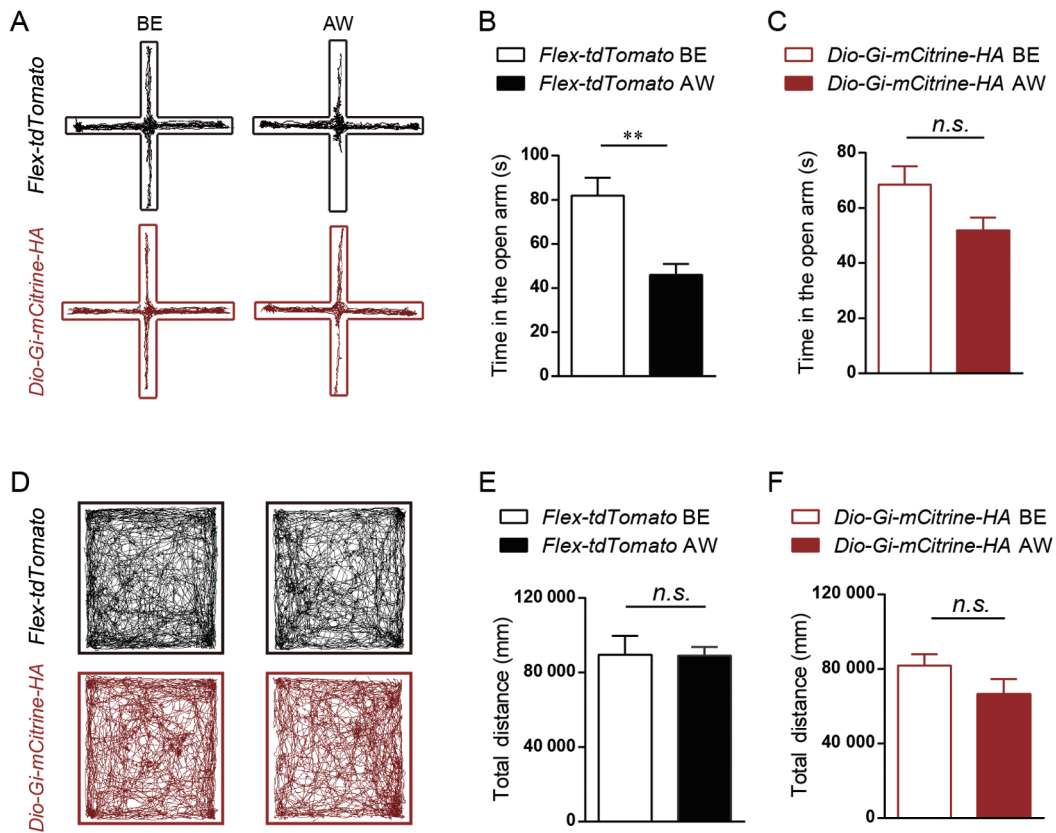


图 2. 特异性抑制CeA中CRH神经元缓解吗啡戒断引起的焦虑水平上升

Fig. 2. Specifically inhibiting CRH neurons in the CeA alleviated morphine withdrawal-induced anxiety. *A*: Representative behavioral trace of elevated plus maze (EPM) test. *B*, *C*: Time spent in the open arms of the *CRH-Cre* mice injected with *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* (*B*) and *AAV-hsyn-Dio-hM4D(Gi)-mCitrine-HA* viruses (*C*) before morphine exposure and after morphine withdrawal. *D*: Representative behavioral trace of locomotor activities. *E*, *F*: Total distance traveled of the *CRH-Cre* mice injected with *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* (*E*) and *AAV-hsyn-Dio-hM4D(Gi)-mCitrine-HA* (*F*) viruses before morphine exposure and after morphine withdrawal. BE: before exposure; AW: after withdrawal. Data are presented as mean \pm SEM. In *B* and *F*, $n = 11$; In *C*, $n = 10$; In *E*, $n = 12$. ** $P < 0.01$, *n.s.*: no significance. Student's *t*-test or Mann-Whitney rank sum test was used to compare the means of two groups.

流取脑，脑片进行免疫荧光染色。小鼠 CeA 脑区表达 hM3D(Gq) 神经元 (HA 阳性) 几乎都与神经元活性标记物 c-fos 共标，表明通过 Cre 依赖的 *hM3D(Gq)-mCitrine-HA* 表达及注射 CNO 的化学遗传学方法可以特异性激活小鼠 CeA 脑区中 CRH 神经元 (图 3D)。

实验前测试 (Pre-test) 结束后，将小鼠注射 CNO，30 min 后放入一侧箱内进行 30 min 环境关联训练。

在进行连续 3 天的 CNO 关联训练后，第 5 天测试小鼠的 CPA 评分 (图 3C)。结果显示，注射对照病毒的小鼠在 CNO 关联侧停留的时间无显著改变，提示并未形成 CPA (图 3F, $P = 0.6715$)，而注射激活型病毒的小鼠在 CNO 关联侧停留的时间低于生理盐水侧，提示形成了明显的 CPA (图 3G, $P = 0.0191$)。该结果表明，环境关联性训练时特异性激活小鼠

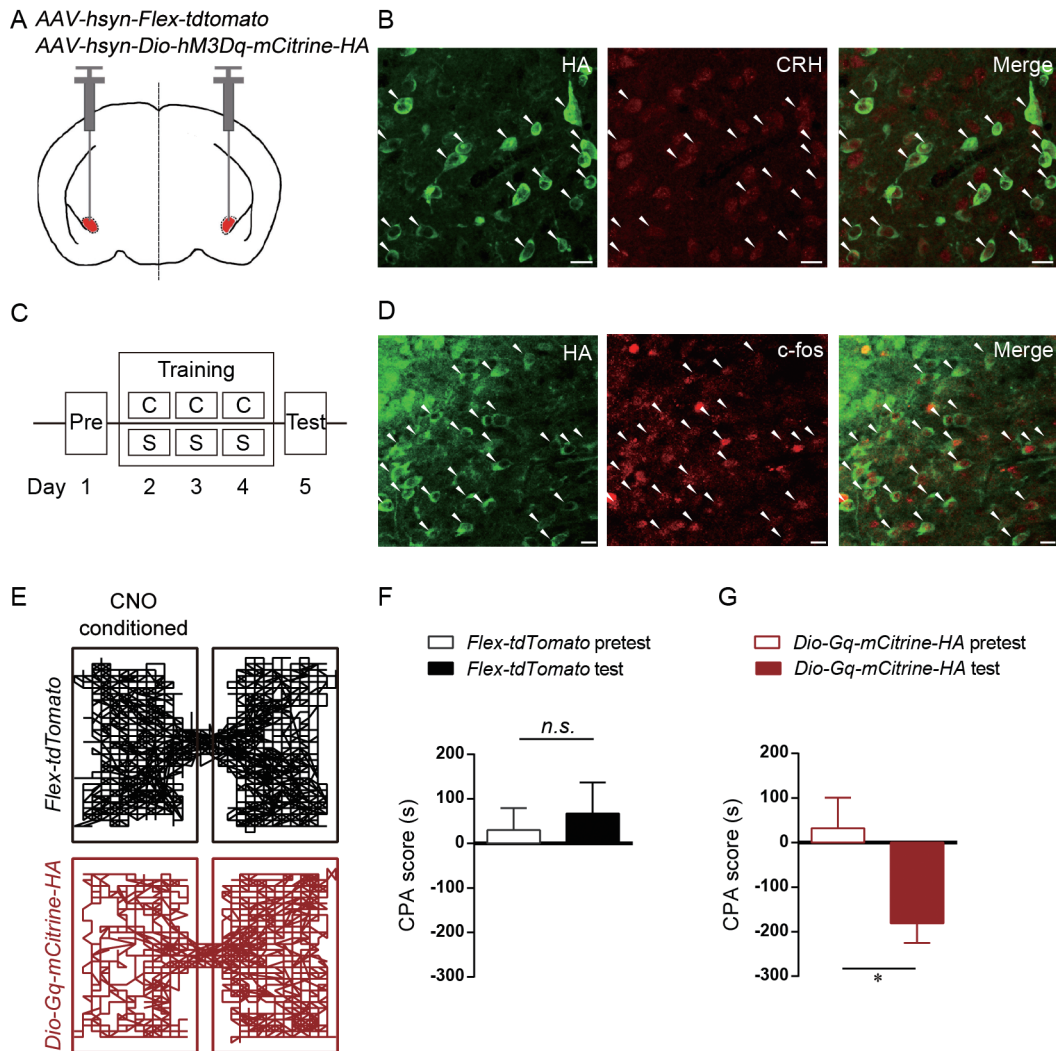


图 3. 特异性激活CeA中CRH神经元可诱导环境关联性厌恶记忆的形成

Fig. 3. Specifically activating CRH neurons in the CeA induced aversive associated memory. *A*: Schematic of the virus injection in CeA. *B*: Representative immunofluorescent images of CeA from the *CRH-Cre* mice injected with *AAV-hsyn-Dio-hM3D(Gq)-mCitrine-HA* virus. Green: HA; Red: CRH. Arrows indicate the HA positive neurons co-labelled with CRH. Scale bar, 20 μm . *C*: Schematic of the experimental procedure to establish CPA. Pre: pretest; C: CNO; S: saline. *D*: Representative immunofluorescent images of CeA from the *AAV-hsyn-Dio-hM3D(Gq)-mCitrine-HA* infected *CRH-Cre* mice after CNO injection. Majority of the CRH neurons were activated (co-labelled with c-fos). Green: HA; Red: c-fos. Scale bar, 20 μm . *E*: Representative behavioral trace of CPA test. *F*, *G*: CPA scores of the *CRH-Cre* mice infected with *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* (*F*) and *AAV-hsyn-Dio-hM3D(Gq)-mCitrine-HA* viruses (*G*). Data are presented as mean \pm SEM. $n = 9$. * $P < 0.05$, *n.s.*: no significance. Student's *t*-test or Mann-Whitney rank sum test was used to compare the means of two groups.

CeA 脑区中 CRH 神经元可诱导小鼠关联性厌恶性记忆的形成。

2.4 特异性激活CeA中CRH神经元可引起小鼠焦虑水平上升

让注射 *AAV-hsyn-Flex-tdTomato* 病毒和 *AAV-hsyn-Dio-hM3D(Gq)-mCitrine-HA* 病毒的 *CRH-Cre* 小鼠进行 EPM 和自主活动能力测试实验, 在实验开始前 30 min 给小鼠腹腔注射 CNO。EPM 结果显示,

相比于注射对照病毒的小鼠, 注射激活型病毒的小鼠在开臂中停留的时间明显减少(图 4B, $P=0.0016$)。而在自主活动能力测试实验中, 两组小鼠注射 CNO 后的总活动距离并没有显著差异(图 4D, $P=0.6413$)。上述结果表明, 特异性激活小鼠 CeA 脑区中 CRH 神经元可上调小鼠的焦虑水平, 而对小鼠的自主活动能力并无显著影响, 提示 CeA 脑区 CRH 神经元活性上调介导了厌恶和焦虑等负性情绪的产生。

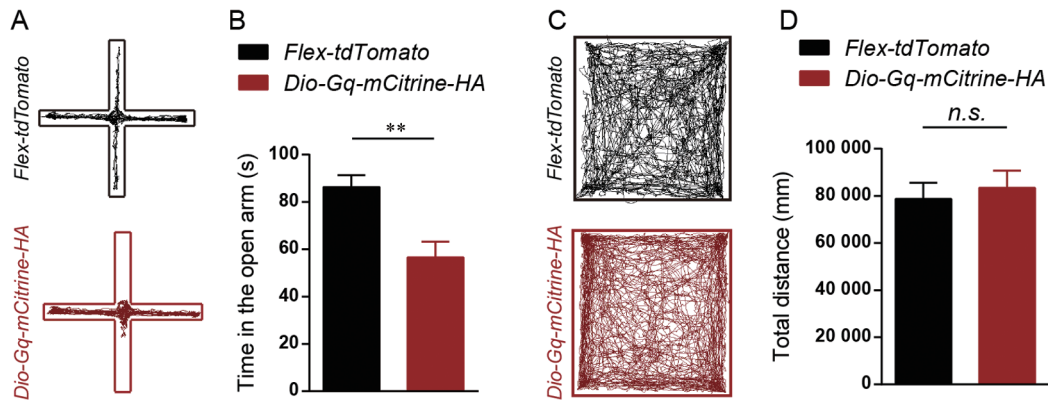


图 4. 特异性激活CeA中CRH神经元可上调小鼠焦虑水平

Fig. 4. Specifically activating CRH neurons in the CeA increased the anxiety level of mice. *A*: Representative behavioral trace in elevated plus maze (EPM) test. *B*: Time spent in the open arms in the EPM test of the *CRH-Cre* mice infected with different viruses. *C*: Representative behavioral trace of locomotor activities. *D*: Total distance traveled of the *CRH-Cre* mice infected with different viruses. Data are presented as mean \pm SEM. In *B*, $n = 12$ or 11 ; In *D* $n = 10$. ** $P < 0.01$, *n.s.*: no significance. Student's *t*-test was used to compare the means of two groups.

3 讨论

对药物带来的正性奖赏作用(欣快感)的趋向以及对停药诱发的负性情绪的逃避, 是导致机体反复用药的两大主要动机^[15, 16]。负性强化机制认为, 成瘾药物戒断会激活大脑内的压力系统, 诱发机体的负性情绪。为了摆脱这种负性情绪, 机会会出现持续性觅药或复吸行为。采用纳洛酮进行吗啡急性戒断的动物会表现出强烈的戒断症状, CPA 实验是检测其戒断负性情绪的最常用的方式, 实验个体通常会形成负性情绪记忆^[17]。本研究结果表明, 小鼠在自然戒断状态下, 同样能够形成负性情绪记忆(图 1E), 同时 EPM 实验显示小鼠的焦虑水平在吗啡自然戒断过程中也明显上升(图 2B)。

CeA 被认为是调节情绪的主要脑结构, CRH 是其中发挥作用的主要激素。许多研究表明, CeA 中的 CRH 系统参与调节成瘾物质戒断引发的负性情

绪。向 CeA 中注射 CRH 受体拮抗剂能够逆转酒精戒断的焦虑反应^[18], 缓解尼古丁戒断的负性情绪^[19], 提示 CRH 的表达水平与负性情绪呈现正相关性。除表达 CRH 受体的神经元, CeA 中还大量存在 CRH 神经元。我们采用 *CRH-Cre* 小鼠, 通过化学遗传学方式, 在其吗啡自发戒断期间特异性抑制 CeA 中的 CRH 神经元, 结果显示, 小鼠的环境关联性厌恶记忆的形成受到抑制(图 1F), 同时吗啡戒断引发的焦虑水平上升也得到缓解(图 2C)。这些结果进一步印证了 CRH 正向调控成瘾药物戒断时负性情绪的形成及表达。为了进一步探究 CeA 中 CRH 神经元对小鼠负性情绪的影响, 我们同样采用化学遗传学方式, 在环境关联时特异性激活 CeA 的 CRH 神经元, 结果显示, 小鼠形成条件关联性厌恶记忆(图 3G), 同时焦虑水平也明显上升(图 4B)。

通过逆向示踪法, 研究者们发现 CeA 中 CRH 神经元大量投射到蓝斑 (locus coeruleus, LC)、臂旁核、终纹床核 (bed nucleus of the stria terminalis, BNST) 和下丘脑等脑区^[20-22]。CeA 中 CRH 神经元对小鼠焦虑状态的调控, 可能是通过作用于 CRH 投射到下游脑区的复杂神经环路实现的。例如: 激活 CeA 到 LC 的神经投射会增强小鼠的焦虑行为^[23], 光抑制 CeA 到 BNST 的 CRH 投射破坏大鼠焦虑情绪紊乱相关的恐惧记忆^[24]。但药物成瘾往往伴随着大脑可塑性的改变^[25], 在正常生理状态下和摄入药物后应激状态下负责调控负性情绪的 CRH 环路功能可能并不相同。CeA 中还存在到中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area of midbrain, VTA) 的 CRH 投射^[26], VTA 是成瘾奖赏环路中的关键脑区, CeA 到 VTA 的 CRH 投射极有可能参与调控吗啡戒断诱导的负性情绪记忆, 而具体的调节作用及环路机制还有待于今后进一步探究。

综上所述, 本研究采用化学遗传学方法, 对 CeA 中 CRH 神经元进行了双向调控, 全面阐述了其对吗啡戒断的厌恶、焦虑等负性情绪的作用, 为应激系统参与调控成瘾药物复吸的机制提供了理论依据。

参考文献

- 1 Koob GF. The dark side of emotion: the addiction perspective. *Eur J Pharmacol* 2015; 753: 73-87.
- 2 Baker TB, Piper ME, McCarthy DE, Majeskie MR, Fiore MC. Addiction motivation reformulated: an affective processing model of negative reinforcement. *Psychol Rev* 2004; 111(1): 33-51.
- 3 Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16(6): 317-331.
- 4 Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* 2011; 471(7338): 358-362.
- 5 Warlow SM, Robinson MJF, Berridge KC. Optogenetic central amygdala stimulation intensifies and narrows motivation for cocaine. *J Neurosci* 2017; 37(35): 8330-8348.
- 6 Venniro M, Caprioli D, Zhang M, Whitaker LR, Zhang S, Warren BL, Cifani C, Marchant NJ, Yizhar O, Bossert JM, Chiamulera C, Morales M, Shaham Y. The anterior insular cortex→central amygdala glutamatergic pathway is critical to relapse after contingency management. *Neuron* 2017; 96(2): 414-427.e8.
- 7 Koob GF. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* 2009; 1314: 3-14.
- 8 De Souza EB, Insel TR, Perrin MH, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J Neurosci* 1985; 5(12): 3189-3203.
- 9 Wang SS, Yan XB, Hofman MA, Swaab DF, Zhou JN. Increased expression level of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and in the hypothalamus in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Neurosci Bull* 2010; 26(4): 297-303.
- 10 Porter K, Hayward LF. Stress-induced changes in c-Fos and corticotropin releasing hormone immunoreactivity in the amygdala of the spontaneously hypertensive rat. *Behav Brain Res* 2011; 216(2): 543-551.
- 11 George O, Ghozland S, Azar MR, Cottone P, Zorrilla EP, Parsons LH, O'Dell LE, Richardson HN, Koob GF. CRF-CRF1 system activation mediates withdrawal-induced increases in nicotine self-administration in nicotine-dependent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(43): 17198-17203.
- 12 Richter RM, Weiss F. *In vivo* CRF release in rat amygdala is increased during cocaine withdrawal in self-administering rats. *Synapse* 1999; 32(4): 254-261.
- 13 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). pii: pyw060. doi: 10.1093/ijnp/pyw060.
- 14 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.
- 15 Hucheson DM, Everitt BJ, Robbins TW, Dickinson A. The role of withdrawal in heroin addiction: enhances reward or promotes avoidance? *Nat Neurosci* 2001; 4(9): 943-947.
- 16 Koob GF. Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 1996; 16(5): 893-896.
- 17 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.
- 18 Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF. Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res* 1993; 605(1): 25-32.
- 19 Marcinkiewicz CA, Prado MM, Isaac SK, Marshall A, Rylkova D, Bruijnzeel AW. Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala and the nucleus accumbens shell mediates the negative affective state of nicotine with-

- drawal in rats. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34(7): 1743–1752.
- 20 Tjounakaris SI, Rudoy C, Peoples J, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Cellular interactions between axon terminals containing endogenous opioid peptides or corticotropin-releasing factor in the rat locus coeruleus and surrounding dorsal pontine tegmentum. *J Comp Neurol* 2003; 466(4): 445–456.
- 21 Moga MM, Gray TS. Evidence for corticotropin-releasing factor, neurotensin, and somatostatin in the neural pathway from the central nucleus of the amygdala to the parabrachial nucleus. *J Comp Neurol* 1985; 241(3): 275–284.
- 22 Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K. Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res* 1986; 382(2): 213–238.
- 23 Paretkar T, Dimitrov E. The central amygdala corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons modulation of anxiety-like behavior and hippocampus-dependent memory in mice. *Neuroscience* 2018; 390: 187–197.
- 24 Asok A, Draper A, Hoffman AF, Schulkin J, Lupica CR, Rosen JB. Optogenetic silencing of a corticotropin-releasing factor pathway from the central amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis disrupts sustained fear. *Mol Psychiatry* 2017; 23(4): 914–922.
- 25 Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 2011; 69(4): 650–663.
- 26 Rodaros D, Caruana DA, Amir S, Stewart J. Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2007; 150(1): 8–13.