· DOI:10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2022. 06. 001　· 杰出校友医学学术论坛 ·

中缝背核在甲基苯丙胺诱导小鼠条件性位置偏爱中的作用*

宋锐恒　沈建宇　韩伟凯　李贵宝　侯海光　岳庆伟　孙晋浩△
(山东大学基础医学院人体解剖与神经生物学系,济南 250012)

孙晋浩,山东大学,教授,博士生导师。1994 年毕业于济宁医学院临床医学专业,获医学学士学位,1997 年于山东医科大学获医学硕士学位,2002 年于山东大学获医学博士学位。曾先后两次赴美国耶鲁大学医学院神经生物学系进行为期两年的学习深造。现任山东大学人体解剖与神经生物学系主任。主要从事神经发育与退行性脑病的研究,在本领域发表中英文研究论文 100 余篇,其中通信作者和第一作者 SCI 论文 40 余篇。主持国家自然科学基金 6 项,其中重点项目 1 项,面上项目 5 项;主持省部级科研课题 10 余项。培养研究生 30 余名。主编人民卫生出版社国家规划教材八年制及“5+3”《系统解剖学》第 4 版;副主编五年制临床医学《系统解剖学》第 8 版和第 9 版。

摘　要　目的　研究中缝背核(dorsal raphe nucleus,DRN)在甲基苯丙胺(methamphetamine,METH)成瘾中的作用。**方法**　将 C57BL/6J 小鼠随机分为 METH 模型组和对照组。通过腹腔注射 METH(2mg/kg)制备条件性位置偏爱(conditioned place preference,CPP)动物模型,对照组注射等量生理盐水。经即刻早基因 c-Fos 免疫组织化学染色、含 Ca^{2+} 指示剂病毒载体脑内注射、化学遗传学和蛋白质谱分析等技术,探究 METH 激活 DRN 脑区情况及蛋白表达变化,并分析抑制 DRN 脑区神经元 CPP 评分的变化。**结果**　CPP 评分显示,METH 模型小鼠在伴药箱产生明显偏好(t=4. 438,P<0. 05)。METH 模型组 DRN 内 c-Fos 阳性细胞数较对照组显著增多(t=4. 065,P<0. 05),而且 DRN 神经元内 Ca^{2+} 荧光信号明显增强(t=20. 50,P<0. 001)。通过叠氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide,CNO)腹腔注射(3mg/kg)诱导 hM4Di 表达抑制 DRN 神经元兴奋性,明显降低了 METH 模型组小鼠 CPP 分数(t=3. 26,P<0. 05)。蛋白质谱分析在 METH 模型组 DRN 脑区筛出了一批差异蛋白,其中突触囊泡蛋白 1(Syt1)和细胞黏附分子 1(Cadm1)表达升高(均 P<0. 05);神经束蛋白(Nfasc)和突触小泡蛋白 2(SV2)的 C 亚型表达降低(均 P<0. 05)。**结论**　DRN 脑区在 METH 诱导小鼠 CPP 行为偏好中起着重要作用,METH 特异性诱导 DRN 内与突触相关的蛋白分子的表达,可能与 DRN 参与的成瘾机制有关。

关键词　中缝背核;甲基苯丙胺;条件性位置偏爱;蛋白分析
中图分类号:R964　**文献标识码**:A　**文章编号**:1000-9760(2022)12-381-05

Role of the dorsal raphe nucleus in methamphetamine-induced conditioned place preference in mice

SONG Ruiheng,*SHEN Jianyu*,*HAN Weikai*,*LI Guibao*,*HOU Haiguang*,*YUE Qingwei*,*SUN Jinhao*△
(*Department of Anatomy and Neurobiology*,*School of Basic Medicine*,*Shandong University*,*Jinan* 250012,*China*)

Abstract:***Objective***　To investigate the role of the dorsal raphe nucleus (DRN) in methamphetamine (METH) addiction. ***Methods***　C57BL/6J mice were randomly divided into the METH model group and the control group. The conditioned place preference (CPP) animal model was prepared with METH intraperitoneal injection at the dosage of 2mg/kg. The activation of DRN neurons was investigated after METH treat-

*[基金项目]国家自然科学基金项目(81871044)
△[通信作者]孙晋浩,E-mail:sunjinhao@ sdu. edu. cn

ment. Moreover, the CPP score was further analyzed after inhibition of DRN neurons with chemogenetic technique. The protein expression changes were also examined through liquid chromatography mass spectrometry. ***Results*** Compared with the control group, METH induced an obvious increasing CPP score compared with the control (t=4.438, P<0.05). In the METH model group, the number of c-Fos positive cells and the Ca^{2+} fluorescence signal in the DRN were both significantly higher than those of the control group (c-Fos: P<0.05; Ca^{2+}: P<0.001). After injection of clozapine-N-oxide to induce hM4Di expression and inactivation DRN neurons, the CPP score in METH model mice was obviously decreased compared with the control (t=3.260, P<0.05). Furthermore, METH significantly upregulated Syt1 and Cadm1expressions and downregulated Nfascand Sv2c expressions in DRN (all P<0.05). ***Conclusion*** DRN exerted an important role in regulating METH induced CPP. METH altered some synapse associated proteins expressions, which possibly participate in METH addiction.

Keywords: Dorsal raphe nucleus; Methamphetamine; Conditioned place preference; Protein analysis

甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)是一种精神活性药,滥用后会导致神经损伤和精神障碍。该药具有强烈的成瘾性。中缝背核(dorsal raphe nucleus, DRN)是中脑导水管腹侧的神经核,可调控情绪和认知功能。在奖励性饮酒行为中,MRI 显示小鼠的 DRN 脑区激活[1]。内源性阿片受体通过 DRN 到伏隔核的神经通路调控小鼠的奖赏行为[2]。激活大鼠 DRN 中促肾上腺皮质激素释放因子受体 1(CRF-R1)明显降低了吗啡诱导的条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP)评分[3]。这些研究说明 DRN 与药物成瘾相关,但 DRN 在 METH 成瘾中的作用和机制还不清楚。

本实验建立小鼠 CPP 动物模型,然后分析了 METH 诱导 DRN 神经元 c-Fos 表达情况,并通过化学遗传学抑制 DRN 神经元活性,检测对 METH 诱导 CPP 行为偏好的影响。最后,进行蛋白质谱分析,寻找差异表达的蛋白分子。本实验有助于揭示 METH 成瘾机制并发现针对性的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,体重 20~25g,购于山东大学实验动物中心,所有动物实验符合山东大学实验动物伦理委员会要求。腺病毒 AAV2/9-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry 和 AAV2/9-hSyn-mCherry 购自上海吉凯基因科技有限公司。兔抗小鼠 C-Fos 单克隆抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 CPP 行为检测 实验动物均进行基线测试(pre-test), METH 模型组分别在第 1、3、5 天给予 METH 腹腔注射(2mg/kg),对照组注射等量生理盐水。两组动物均在白箱中训练,时长 40min。在 2、4、6d 两组动物均给予生理盐水腹腔注射,在黑箱中训练。第 7 天自由探索 15min,进行测试(test)。

1.2.2 脑内定位注射 采用 5%水合氯醛腹腔注射(0.75ml/100g),麻醉小鼠。将含钙指示剂的病毒 AAV2/9-CMV-GCaMP6s-P2A-nls-dTomato 注射至 DRN 脑区,坐标为前囟前 AP:-4.5mm,旁开 L:0mm,硬膜下 D:3.1mm,注射 300nL,3w 后取脑切片检测 Ca^{2+} 信号变化。在化学遗传学实验中,将 AAV2/9-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry 和 AAV2/9-hSyn-mCherry 分别注射到 METH 模型组和对照组小鼠 DRN 脑区,待 3w 后病毒充分表达,CPP 测试前 30min 腹腔注射叠氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO),剂量为 3mg/kg。

1.2.3 免疫组织化学染色 实验动物灌注取脑,固定 6h 后,置入 30%蔗糖溶液内,4℃静置至沉入容器底部,切取含 DRN 脑区的组织块,行冰冻切片,厚度 30μm。经 5%二抗同源血清封闭 1h 后,给予兔抗小鼠 c-Fos(1∶1000)孵育,4℃过夜。然后经羊抗兔二抗(1∶500)室温孵育 2h,在荧光显微镜下观察分析。

1.2.4 蛋白提取及分析 提取 DRN 脑区蛋白,以 Bradford 法测量蛋白浓度,-20℃储存。对蛋白进行还原和烷基化后,使用 100mM Tris-HCl,(pH 8.5)稀释 3 倍,在 1mM $CaCl_2$ 的条件下用胰蛋白酶消化(酶与底物的比例为 1∶50),持续处理 16h(37℃)。经纯化、洗脱、干燥后,重新溶解于 0.1%甲酸,行 LC/MS-MS 分析。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 提取 DRN 区域组织的总 RNA。通过 NanoDrop 检测 RNA 纯度。设计靶分子引物,在以下条件下进行 PCR 扩增:95℃

3min, 95℃ 5s 和 60℃ 30s, 重复 40 个循环。以 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	引物序列
GAPDH	F GAACGGGAAGCTCACTGG
	R GCCTGCTTCACCACCTTCT
SV2C	F GAACCAGGCAGTGGATCGG
	R GTTTCGCCAGGTGGGTAGT
Cadm1	F TCCTGGTTCCTCCACGTAAC
	R TCCTCCACCTCTGATTTGCC
SNCA	F CAGAGGCAGCTGGAAAGACA
	R CACCACTGCTCCTCCAACAT
Nfasc	F CAAGTACCCAGTGCGGGAAA
	R CCTTCGCCATAGTCCACCAG
Syt1	F GTTGCGGTCCTTCTAGTCGT
	R GGCCTGATCCTTCATGGTCT
ATP1b2	F GTTCCTGAATGTGACCCCCA
	R GAACTTGTCCCGCTCATCGT
Stx1a	F AGGGGGAGATGATTGACAGGA
	R TATCCAAAGATGCCCCCGATG

注: F, Forward, 即上游引物; R, Reverse, 即下游引物。

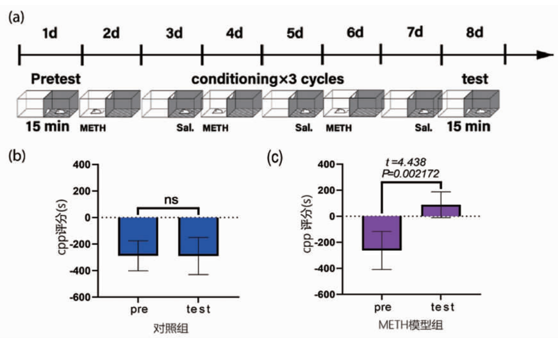
1.3　统计学方法

统计分析使用 GraphPad Prism 9.0 软件。正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 描述, 两组数据的比较采用独立样本 t 检验分析, 组内比较采用配对资料的 t 检验分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　小鼠 CPP 模型的建立

采用 METH 腹腔注射建立小鼠 CPP 模型, 评估 METH 引起的成瘾记忆(图 1a)。METH 模型组小鼠在伴药箱中的运动轨迹较训练前密集, 停留时间明显增加, 较前产生了明显的 CPP 偏好($t=4.438$, $P<0.05$), 而对照组小鼠测试时 CPP 分数与基线水平无明显差异($P>0.05$)(图 1b, c)。这表明成功建立了 METH 诱导的 CPP 动物模型。

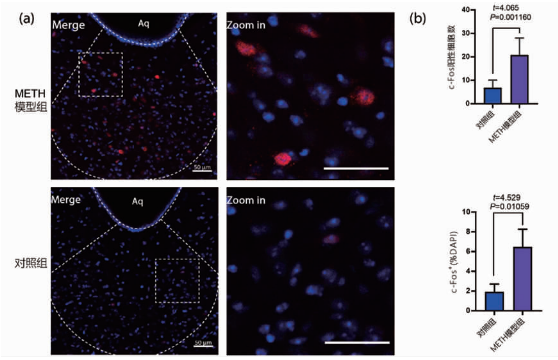


注: a. METH 诱导 CPP 模型建立示意图; b. 对照组小鼠基线和测试的 CPP 评分; c. METH 模型鼠基线和测试的 CPP 评分, 测试时形成明显的 CPP 偏好($t=4.438$, $P<0.05$)。对照组 n=4, METH 模型组 n=5。

图 1　CPP 模型的建立

2.2　METH 诱导 DRN 神经元 c-Fos 表达

METH 模型小鼠 DRN 内大量神经元呈 c-Fos 阳性着色, 这些 c-Fos 阳性细胞多沿 DRN 中线分布; 对照组 DRN 内仅有少量散在的 c-Fos 阳性细胞(图 2a)。METH 处理后 c-Fos 阳性细胞数较对照组明显增多(图 2b, $t=4.065$, $P<0.05$), 而且 c-Fos 阳性细胞比例也明显高于对照组(图 2b, $t=4.529$, $P<0.05$)。

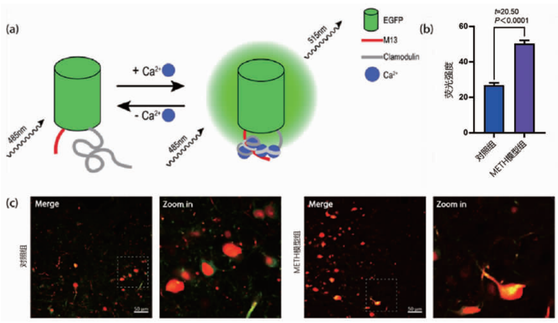


注: a. METH 诱导 DRN c-Fos 表达, 对照组仅有少量阳性细胞分布; b. c-Fos 阳性细胞数和阳性细胞比例统计分析。对照组 n=4, METH 模型组 n=5; 标尺: 50μm。

图 2　c-Fos 免疫组织化学染色结果

2.3　METH 升高 DRN 神经元胞内钙离子水平

将含 Ca^{2+} 指示剂的病毒载体实施脑内注射, 神经元转染后显示红色荧光, 钙离子活动显示为绿色荧光(图 3 a)。对照组 DRN 神经元 Ca^{2+} 信号荧光强度 26.93±0.64, METH 处理后 Ca^{2+} 信号荧光强度为 50.43±1.02, 明显高于对照组($t=20.50$, $P<0.001$)。见图 3b、c。



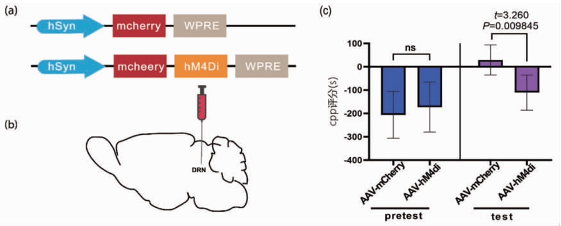
注: a. 示意图显示钙离子与 GCaMP6 结合后, 分子构象改变导致了 515nm 波段发射荧光增加; b. 为钙离子荧光强度统计分析; c. 分别为对照组, METH 组 DRN 神经元钙离子荧光检测图片。对照组 n=3, METH 模型组 n=3; 标尺: 50μm。

图 3 神经元胞内钙离子水平检测结果

2.4　抑制 DRN 神经元活性降低 CPP 评分

本实验采用化学遗传学的方式抑制 DRN 脑区

神经元(图 4 a)。在 METH 模型鼠测试前 30min 腹腔注射 CNO,激活 hM4Di 抑制 DRN 神经元活性,结果显示,抑制后模型鼠的 CPP 分数明显降低(t=3.26,P<0.05)。而对照组,在 CNO 诱导后,仍表现出 CPP 行为偏好(t=4.407,P<0.05)。显示抑制 DRN 可以降低 METH 诱导的 CPP 偏好。



注:a. 化学遗传学病毒载体元件构成;b. 脑区注射示意图;c. CPP 行为分析,抑制 DRN 脑区后,明显降低了 CPP 分数(P<0.05)。对照组 n=5,METH 模型组 n=6;ns:表示比较的两组数据没有差异。

图 4 化学遗传学抑制 DRN 降低 CPP 评分

2.5　蛋白质谱分析

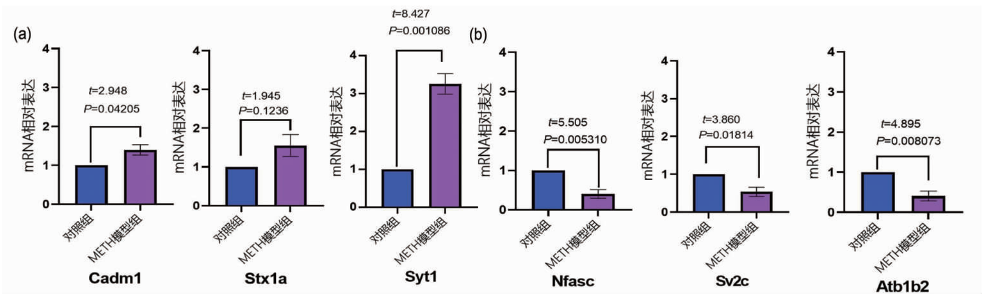
本实验采用 LC/MS-MS 对 DRN 脑区组织进行了蛋白组学的分析。共获得了 583 个蛋白分子,其中 13 个表达上调,17 个表达下调(设定差异倍数≥1.5 倍及 P<0.05)(表 2,表 3)。筛选了部分和神经及突触相关的蛋白分子进行表达验证,其中突触囊泡蛋白 1(Syt1)和细胞黏附分子 1(Cadm1)表达升高(均 P<0.05);神经束蛋白(Nfasc)和突触小泡蛋白 2(SV2)的 C 亚型 Sv2c 表达降低(均 P<0.05)。其中,Syt1 的上调较为明显,上调近 4 倍(图 5)。

表 2　表达上调分子

Uniport-ID	名称	差异倍数	t 值	P 值
P63213	Gng2	1.563253226	5.317424094	0.006016
O35526	Stx1a	1.856152098	4.795282148	0.008678
Q8R5M8	Cadm1	1.668419997	4.400020565	0.011691
Q3UV84	Ncoa3	1.927057006	3.991619408	0.016243
Q8BFZ9	Spfh2	1.729228234	3.786626392	0.019325
Q99L13	Hibadh	1.735844556	3.749946802	0.019948
Q4KMM3	Oxr1	1.536215066	3.450439825	0.026044
P46096	Syt1	1.504899192	3.395646029	0.027387
B2RPY3	Fbxl16	1.777329167	3.390354345	0.027521
Q3UGR5	Hdhd2	2.162166787	3.309295289	0.029674
P28656	Nap1l1	1.960856395	3.271938644	0.030733
O55042	Snca	0.034297	2.817495656	0.04795
P62743	Ap2s1	1.528389639	2.796761286	0.048973

表 3　表达下调分子

Uniport-ID	名称	差异倍数	t 值	P 值
Q810U3	Nfasc	−1.600407316	−3.155138594	0.017172
Q60597	Ogdh	−1.749137855	−4.794020806	0.004343
A2RSH4	Sv2c	−1.828282055	−4.465395801	0.005557
Q9CQ91	Ndufa3	−2.415029137	−4.443652255	0.005651
Q61879	Myh10	−1.74249853	−4.109679879	0.007368
Q3T9J9	Abtb2	−20.8374867	−3.773218154	0.009775
P14231	Atp1b2	−1.976510922	−3.364690857	0.014091
Q9WV55	Vapa	−1.539715904	−3.152173057	0.017221
Q99PB1	Nscme3l	−3.998895734	−3.128682793	0.017615
P97807	Fh1	−1.543466521	−3.036768782	0.019262
Q91VD9	Ndufs1	−2.108540696	−2.740477816	0.02594
P56380	Apah1	−1.580114902	−2.507328166	0.033123
Q9QWI6	Srcin1	−1.525025967	−2.47548703	0.034271
P47754	Capza2	−1.561778108	−2.352257387	0.039161
Q64502	Ptpn4	−1.541712105	−2.304694126	0.041256
P14094	Atp1b1	−1.874602809	−2.467312418	0.034573



注:通过荧光定量 PCR 检测筛选分子的 mRNA 表达变化。a. 检测 Cadm1、ATP1B2、Stx1a 的表达;b. 检测 Nfasc、Sv2c、Syt1 的表达。对照组 n=3,METH 模型组 n=3。

图 5　差异分子的表达验证

3　讨论

3.1　METH 明显激活了 DRN 神经元

本实验发现,给予 METH 处理后,小鼠 DRN 内 c-Fos 阳性细胞明显多于对照组,同时 DRN 内钙离子信号强度增加,说明 METH 激活了 DRN 神经元。c-Fos 作为即早基因,是 Fos 转录因子家族的成员之一,多数成瘾性药物如可卡因、吗啡、苯丙胺等可快速诱导 c-Fos 表达,活化神经元[4]。Ca^{2+} 是通用的第二信使,参与神经元去极化信号的传递并有助于突触活动的发生,所以对于神经元的活化至关重要。在吗啡成瘾中,通过在体多通道的电生理记录

发现,DRN 5-HT 神经元在吗啡作用下被激活[5]。并且,在吗啡诱导的 CPP 测试时,DRN 内神经元活化明显。本项实验中,METH 明显激活 DRN 神经元,提示这个脑区可能和 METH 导致的成瘾行为变化有关。

3.2 抑制 DRN 后显著降低 CPP 评分

本实验通过化学遗传学手段抑制 DRN 脑区,显著降低了 METH 诱导的 CPP 评分。DRN 内含有多种神经元,其中 5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine,5-HT)能神经元最多,占 DRN 神经元总量的 2/3。5-HT 神经元投射广泛,也接受多个脑区的投射[6]。DRN 5-HT 神经元从与奖赏信号密切相关的前脑和边缘系统接收广泛而密集的投射[7]。5-HT 能神经元可控制情绪,学习和认知功能,感觉和运动的控制等[8]。最近研究发现,DRN 的 5-HT 神经元编码奖赏信号[9]。我们推测,抑制 DRN 脑区导致 CPP 的逆转,很可能与 DRN 脑区的 5-HT 神经元有关。

3.3 DRN 脑区蛋白组学分析

本实验对 METH 模型鼠的 DRN 组织进行了蛋白质组学分析,获得了一批差异变化的蛋白分子,其中和突触相关的分子变化显著,如 Syt1 表达明显上调,Nfasc,Sv2c 表达下调。Syt1 属于突触蛋白突触蛋白家族,在突触传递和可塑性的几个阶段起着关键作用。SYT1 可以在参与突触的常规功能之前调节轴突丝状伪足和分支的形成[10]。突触囊泡 2C(SV2C)属于突触囊泡 2(SV2)蛋白超家族的一种新的异构体,是已知的肉毒杆菌神经毒素/A(BoNT/A)的受体,调节多巴胺释放,从而成为治疗精神疾病的潜在目标分子[11]。这说明筛选的分子在调控突触可塑性以及神经递质的释放与转运方面发挥了重要的作用。我们推测在 METH 成瘾中,这些分子在 DRN 脑区的差异表达可能执行着重要的功能。

综上,METH 激活了 DRN 脑区神经元。DRN 在 METH 成瘾中起着重要作用,METH 可通过改变 DRN 内一些与突触相关的蛋白分子的表达,进而调控成瘾行为的变化。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

[1] Sakurai K,Shintani T,Jomura N,et al. Hyper BOLD activation in dorsal raphe nucleus of APP/PS1 Alzheimer′s disease mouse during reward-oriented drinking test under thirsty conditions[J]. Sci Rep,2020,10(1):3915. DOI:10.1038/s41598-020-60894-7.

[2] Castro DC,Oswell CS,Zhang ET,et al. An endogenous opioid circuit determines state-dependent reward consumption[J]. Nature,2021,598(7882):646-651. DOI:10.1038/s41586-021-04013-0.

[3] Li C,McCloskey N,Phillips J,et al. CRF-5-HT interactions in the dorsal raphe nucleus and motivation for stress-induced opioid reinstatement[J]. Psychopharmacology(Berl),2021,238(1):29-40. DOI:10.1007/s00213-020-05652-3.

[4] Nestler EJ,Barrot M,Self DW. DeltaFosB:a sustained molecular switch for addiction[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(20):11042-11046. DOI:10.1073/pnas.191352698.

[5] Fu B,Yao JQ,Lu C,et al. Dorsal raphe nucleus serotoninergic neurons mediate morphine rewarding effect and conditioned place preference[J]. Neuroscience,2022,480:108-116. DOI:10.1016/j.neuroscience.2021.10.031.

[6] Berger M,Gray JA,Roth BL. The expanded biology of serotonin[J]. Annu Rev Med,2009,60:355-366. DOI:10.1146/annurev.med.60.042307.110802.

[7] Pollak Dorocic I,Furth D,Xuan Y,et al. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei[J]. Neuron,2014,83(3):663-678. DOI:10.1016/j.neuron.2014.07.002.

[8] Lesch KP,Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks:implications for neurodevelopmental disorders[J]. Neuron,2012,76(1):175-191. DOI:10.1016/j.neuron.2012.09.013.

[9] Li Y,Zhong W,Wang D,et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals[J]. Nat Commun,2016,7:10503. DOI:10.1038/ncomms10503.

[10] Greif KF,Asabere N,Lutz GJ,et al. Synaptotagmin-1 promotes the formation of axonal filopodia and branches along the developing axons of forebrain neurons[J]. Dev Neurobiol,2013,73(1):27-44. DOI:10.1002/dneu.22033.

[11] Hu YW,Xiao L,Zheng L,et al. Synaptic vesicle 2C and its synaptic-related function[J]. Clin Chim Acta,2017,472:112-117. DOI:10.1016/j.cca.2017.07.029.

(收稿日期 2022-09-11)
(本文编辑:石俊强)