

蓝斑核参与抑郁导致的慢性疼痛行为的调控

袁溪,刘雨晴,孟浅

(安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,
抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032)

摘要 目的 探究蓝斑核(LC)是否参与介导小鼠抑郁伴疼痛行为及可能机制。方法 雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和慢性束缚应激(CRS)组,通过新奇抑制进食、悬尾和强迫游泳等行为学实验检测抑郁样行为的形成,评估小鼠 CRS 模型的建立;使用 Von Frey 毛刷检测小鼠的机械痛阈;通过 c-Fos 免疫荧光染色确定 LC 神经元活性在抑郁伴疼痛小鼠中的改变;利用离体脑片电生理检测 LC 神经元兴奋性变化;通过化学遗传学技术调控 LC 活性,观察小鼠的疼痛及抑郁样行为表现。结果 与对照组相比,CRS 小鼠在束缚第 3 周(CRS 3W)出现明显的抑郁样行为,模型建立成功;CRS 3W 小鼠机械痛阈显著下降,出现机械痛敏;CRS 3W 小鼠 LC 区有大量 c-Fos⁺ 表达,且 90% 为去甲肾上腺素(NE)能神经元;CRS 3W 小鼠 LC 中 NE 能神经元兴奋性降低。而且,化学遗传学激活 LC 可显著缓解 CRS 3W 小鼠的机械痛敏。结论 CRS 3W 小鼠 LC 中 NE 能神经元兴奋性下降,化学遗传学激活 LC 中 NE 能神经元可缓解 CRS 3W 小鼠的机械痛敏。

关键词 蓝斑核;化学遗传学;慢性疼痛;慢性束缚应激;电生理;新奇抑制进食;强迫游泳

中图分类号 R 749.42/06

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1517-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.004

抑郁症是最常见的精神疾病之一,据统计,世界上大约有 2.8 亿人患有抑郁症。目前临床上对抑郁症的治疗仍是以药物治疗为主。慢性疼痛是重症抑郁症的常见临床并发症,流行病学调查显示约 65% 的抑郁症患者伴有躯体疼痛。抑郁症与慢性痛之间的高共病率,提示两者之间可能具有相同的分子、环路机制,以及受到相同核团的调控^[1-2]。目前,对抑郁症与慢性疼痛共病缺乏正确的认识,对其发病的神经机制了解匮乏,这也是临床缺乏有效治疗手段的重要原因。因此,深入研究抑郁伴疼痛的神经机制,寻找有效治疗靶点对新的、个性化的治疗策略至关重要。蓝斑核(locus coeruleus, LC)是大脑内合成去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的主要部位^[3],其在抑郁和疼痛中起到重要的作用^[4-5]。该研究采用慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)模拟压力环境,构建小鼠抑郁伴疼痛模型,并通过免疫荧光

染色、离体电生理及化学遗传学等技术,探讨 LC 在小鼠抑郁伴疼痛中的作用,以期为临床抑郁伴疼痛的治疗提供新的思路和个性化策略。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

1.1.1 主要试剂 4% 多聚甲醛(500 ml, 22291398, 武汉赛维尔公司), c-Fos 抗体(50 μg, 226003, 德国 Synaptic Systems 公司), TH 抗体(100 μl, 22941, 美国 Immunostar 公司), Alexa 488 结合的驴抗鼠 IgG(1.5 mg, 158918, 美国 Jackson ImmunoResearch 公司), 抗荧光衰减封片剂(5 ml, S2100, 北京索莱宝科技有限公司), DAPI(10 ml, C0065, 北京索莱宝科技有限公司), AAV-DBH-EYFP(20 μl, PT3163, 武汉枢密脑科学技术有限公司), AAV-DBH-hM3Dq-EYFP(20 μl, PT3164, 武汉枢密脑科学技术有限公司), 叠氮平-N-氧化物(Clozapine N-oxide, CNO; 1 ml, HY-17366, 美国 MCE 公司)。

1.1.2 主要仪器 小鼠脑立体定位仪(H188701-002, 深圳市瑞沃德生命科技公司), 冰冻切片机(CM1950, 德国 Leica 公司), 激光共聚焦显微镜(Leica SP8, 德国 Leica 公司), Von Frey 测痛包(NC12775-99, 美国 North Coast Medical 公司), 新奇抑制进食行为学装置(63008, 深圳市瑞沃德生命科

2024-05-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82101311);安徽医科大学校科研基金项目(编号:2020xkj014);安徽医科大学临床医学(“5+3”一体化)专业“早期接触科研”训练计划(编号:2021-ZQKY-172)

作者简介:袁溪,女,硕士研究生;

孟浅,女,博士,副教授,通信作者, E-mail: mengqian@ahmu.edu.cn

技公司),悬尾行为学装置(63024,深圳市瑞沃德生命科技公司),强迫游泳行为学装置(63022,深圳市瑞沃德生命科技公司),10 μl 微量进样器(G019105,上海市高鸿工贸有限公司),玻璃微电极(1B100-3,美国 WPI 公司),注射泵(L0107-2A,英国 Longer pump 公司)。

1.2 实验动物 SPF 级雄性 7~8 周龄 C57BL/6J 小鼠,体质量 24~26 g,购于江苏集萃药康生物科技有限公司。实验室饲养动物环境:温度 23~25 $^{\circ}\text{C}$,12 h 光照/12 h 黑暗周期(08:00-20:00 开灯,20:00-08:00 熄灯)。本实验的所有方法与操作均符合安徽医科大学实验动物饲养与使用规定。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠 CRS 模型 将 50 ml 注射针筒进行改造,针筒上钻孔,在束缚小鼠的同时保证其可以透气和呼吸。小鼠慢性束缚应激每天持续 6 h,具体时间为 09:00-15:00,持续 21 天。束缚期间注意观察小鼠状态,以防束缚太紧导致小鼠窒息。对照组小鼠置于笼盒中不限制其自由移动。束缚期间,两组小鼠均不提供水和食物。在每天束缚结束之后,要对束缚的容器进行彻底清洗。

1.3.2 Up-down 测试法检测小鼠机械痛阈^[6] 分别在第 0、21、28、35、42 天检测小鼠机械痛阈。检测小鼠机械痛基础阈值前 3 d,将小鼠置于测痛铁丝架上的测痛盒中,每天适应 1 h。检测小鼠机械痛阈时,首先让小鼠适应测试环境 30 min,然后使用 Von Frey 毛刷对暴露在测痛铁丝架上的小鼠足底进行检测(从最低 0.02 g 开始,刺激克数按升序)。对小鼠足底进行刺激时,保持毛刷弯曲 2 s 左右,如果在此期间小鼠做出回避刺激、撤回检测的后爪等行为,记录此时的克数。一共施加 3 次刺激,每次刺激至少间隔 5 min,取 3 次刺激克数的平均值作为该小鼠的机械痛阈值。

1.3.3 抑郁样行为检测

1.3.3.1 新奇抑制进食 在小鼠造模 21 天结束,于第 22~24 天对小鼠进行新奇抑制进食实验。实验开始前将小鼠禁食 48 h,测试时将单个颗粒的食物放置于旷场中央,再将小鼠面向角落放置于旷场,从小鼠进入旷场开始计时,到小鼠开始进食(定义为小鼠蹲着用前爪咬食食物)时计时结束,这段时间为小鼠的摄食潜伏期。

1.3.3.2 悬尾实验 在小鼠造模 21 d 结束,于第 25 天对小鼠进行悬尾实验。使用医用胶布粘住小鼠尾部并将其悬挂在离地面高约 50 cm 处的位置,

胶带粘于距尾尖约 1 cm 处。每只小鼠悬挂 5 min 并记录小鼠的不动时间作为小鼠抑郁样行为的检测指标。

1.3.3.3 强迫游泳 在小鼠造模 21 d 结束,于第 26 天对小鼠进行强迫游泳实验。将小鼠置于透明的有机玻璃圆筒中(高 30 cm,直径 12 cm),其中装有温度为 24 $^{\circ}\text{C}$ 左右的纯净水,水深 25 cm。将小鼠放入水中,记录小鼠在水中 5 min 的行为,并记录小鼠的不动时间作为小鼠抑郁样行为的检测指标。

1.3.4 免疫荧光染色 行为学实验(第 22~26 天)完成后,使用生理盐水经小鼠心脏灌注,后换 4% 多聚甲醛溶液灌注。小鼠脑组织新鲜取材,置于 4% 多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜固定,然后使用 20% (w/v) 以及 30% (w/v) 蔗糖溶液进行脱水。通过冰冻切片机进行脑冠状面冰冻切片,脑片厚度为 40 μm ,所有切片保存在防冻液中。将小鼠脑片用 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 遍,每次 10 min。0.01 mol/L PBS 溶液配制 5% 牛血清蛋白、0.5% Triton X-100 混合液,将脑片平铺其中,室温封闭通透 1 h;然后以 0.01 mol/L 的 PBS 为母液配制一抗,c-Fos 抗体为 1:1 000 稀释比例,酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)抗体为 1:1 000 稀释比例,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,随后取出脑片,用 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 次,加入荧光二抗(Alexa 488 结合的驴抗鼠 IgG),室温孵育 2 h,再用 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 次。避光条件下,贴片至载玻片上,室温风干,抗荧光衰减封片剂封片。在激光共聚焦显微镜下观察,进行图像采集并保存。

1.3.5 脑立体定位注射 小鼠腹腔注射 2% 的戊巴比妥钠使其麻醉,剔除其头部毛发,将小鼠固定在立体定位仪,使用 75% 乙醇溶液消毒头皮表面,暴露出小鼠颅骨并调平,颅骨钻暴露小鼠 LC 正上方的大脑皮层。使用连接到输液泵上的玻璃微电极(外径 1.0 mm,内径 0.58 mm),吸取溶液,将针缓慢插入到 LC 所在位置。以 30 nl/min 的速度缓慢匀速推注,推注结束后留针静置 5 min,缓慢拔出玻璃微电极,注射完毕后缝合伤口并涂抹红霉素眼膏。本研究脑立体定位 LC 的三维坐标为:来自中线的中外侧(mediolateral,ML): ± 0.88 mm,来自脑的前后侧(anteroposterior,AP): ± 5.40 mm,来自脑表面的背腹侧(dorsoventral,DV): ± 4.25 mm。

1.3.6 脑片膜片钳电生理

1.3.6.1 小鼠脑片制备 小鼠造模 21 d 结束后,用异氟烷麻醉小鼠,首先用 20 ml 冰冷的 N 甲基-D-

葡萄糖胺人工脑脊液 (N-methyl-D-glucamine artificial cerebrospinal fluid, NMDG ACSF) 进行心脏灌注, NMDG ACSF 配方为 (mmol/L): 93N-甲基-D-葡萄糖胺人工脑脊液 (NMDG)、2.5 KCl、1.2 NaH₂PO₄、1.2 NaH₂PO₄、30 NaHCO₃、20 HEPES、25 Glucose、2 Thiourea、5 Na-ascorbate、3 Na-pyruvate、0.5 CaCl₂、10 MgSO₄ 和 3 Glutathione (GSH) (mmol/L, 渗透压: 300 ~ 310 mOsm/kg, pH = 7.3 ~ 7.4)。小鼠快速断头取脑并迅速转移到冷冻好的 NMDG ACSF 中, 脑组织修块之后, 使用振动切片机以 0.18 mm/s 的速度进行冠状切片。将包含 LC 的脑片放置于氧饱和的 (95% O₂ + 5% CO₂) NMDG 脑脊液 (32 °C) 中孵育 10 ~ 12 min, 然后再转移到 N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES) ACSF 溶液 (28 °C) 中孵育至少 1 h。HEPES 脑脊液的配方为 (mmol/L): 92 NaCl、2.5 KCl、1.2 NaH₂PO₄、30 NaHCO₃、20 HEPES、25 Glucose、2 Thiourea、5 Na-ascorbate、3 Na-pyruvate、2 CaCl₂、2 MgSO₄ 和 3 GSH (mmol/L, 渗透压: 300 ~ 310 mOsm/kg, pH = 7.3 ~ 7.4)。

1.3.6.2 电生理实验 脑片孵育完成后, 选择 LC 完整的脑片移入培养记录槽中, 用盖网进行固定, 持续灌注标准 ACSF, 灌注速度为 2.5 ~ 3 ml/min。记录过程中, 使用在线溶液加热器实时检测温度并将温度维持在 32 °C。标准 ACSF 配方为 (mmol/L): 129 NaCl、3 KCl、2.4 CaCl₂、1.3 MgSO₄、1.2 KH₂PO₄、20 NaHCO₃、3 HEPES 和 10 Glucose (mmol/L, 渗透压: 300 ~ 310 mOsm/kg, pH = 7.3 ~ 7.4)。使用配有汞灯的红外微分干涉显微镜下低倍镜观察脑片状态, 将 LC 移入视野中央, 切换镜头, 高倍镜下找到 LC NE 能神经元。利用水平拉制仪将硼酸硅盐玻璃管进行四步拉制, 制备成尖端电阻在 5 ~ 8 MΩ 的记录电极。电极内液的成分为 (mmol/L): 130 K-gluconate、2 MgCl₂、5 KCl、0.6 EGTA、10 HEPES、2 Mg-ATP、0.3 Na-GTP (mmol/L, 渗透压: 290 ~ 300 mOsm/kg), 用 KOH 将 pH 调节至 7.4。将电极内液注射到拉制好的玻璃微电极中, 使用微操装置将电极入液, 观察入液电阻值, 确保电阻在 5 ~ 8 MΩ, 用玻璃电极钳制细胞。用 Multiclamp 700B 放大器和 Clampex10.7 软件在电压钳制模式下记录, 钳制电压 -70 mV。膜电阻 R_m 在 300 ~ 500 MΩ, 串联 R_a 电阻低于 30 MΩ, 数据采集于 10 kHz 及 1 kHz 滤波。采用全细胞电流钳记录模式, 通过刺激器给目标细胞施加电流刺激产生动作电位, 按照设定好的程序, 记录 LC 中 NE 能神经元动作电位

的放电频数的信号变化。

1.3.7 化学遗传学实验 AAV-DBH-EYFP/AAV-DBH-hM3Dq-EYFP 注入小鼠双侧 LC (单侧 200 nl) 中, 1 周后进行慢性束缚应激 3 周 (chronic restraint stress for 3 weeks, CRS 3W) 造模, 造模持续 21 d。造模结束后, 依次进行新奇抑制进食、悬尾和强迫游泳实验。每次实验前 30 min, 小鼠腹腔注射 CNO (5 mg/kg)。在所有的化学遗传实验结束后, 将小鼠灌流取脑并且冰冻切片后观察病毒注射位点和光纤埋置位点, 将位点不正确的小鼠实验数据剔除。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据计算、统计和作图, 实验数据以均数 ± 标准误差表示。采用 *t* 检验比较两组间差异, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠抑郁伴疼痛模型的建立 建立 CRS 的小鼠模型, 检测小鼠抑郁样行为 (第 22 ~ 26 天) 以确定模型是否建立成功, 并在第 0、21、28、35、42 天等不同时间点检测小鼠机械痛阈以确定小鼠疼痛表现 (图 1A)。在 CRS 3W, 小鼠表现出明显的抑郁样行为, CRS 模型建立成功: 与对照组相比, CRS 3W 小鼠在新奇抑制进食实验中进食潜伏期显著增加 (*P* = 0.002 7, *t* = 3.760), 悬尾实验 (*P* = 0.000 6, *t* = 4.606) 和强迫游泳 (*P* = 0.000 2, *t* = 5.206) 中不动时间明显上升 (图 1B-1D)。通过 Von Frey 毛刷检测小鼠左后爪疼痛阈值, 发现相对于对照组小鼠, 在 CRS 后第 21、28、35 天, CRS 3W 组小鼠左后爪机械痛阈出现显著下降 (第 21 天: *P* < 0.000 1, *t* = 12.07; 第 28 天: *P* < 0.000 1, *t* = 6.456; 第 35 天: *P* < 0.000 1, *t* = 9.059) (图 2B)。

2.2 小鼠 LC 区域表达 c-Fos 为了鉴定参与形成抑郁伴疼痛的特定核团, 利用免疫荧光染色在 CRS 造模 21 天的小鼠脑片上进行 c-Fos 染色, 以确定神经元活性是否改变。相较于对照组小鼠, CRS 3W 组小鼠 LC 区域有大量 c-Fos 阳性表达 (*P* = 0.000 6, *t* = 4.606) (图 3A、3B)。说明 LC 神经元活性发生了改变, 提示 LC 脑区可能参与 CRS 3W 组小鼠抑郁伴疼痛的发生。

CRS 3W 组小鼠脑片进行免疫荧光染色, 结果表明, LC 中的 c-Fos 神经元与 TH 抗体大量共标 (图 4A), 共标率为 90% 左右 (图 4B)。

2.3 CRS 3W 组小鼠 LC 的 NE 能神经元兴奋性降低 对 LC 中 NE 能神经元进行全细胞膜片钳记

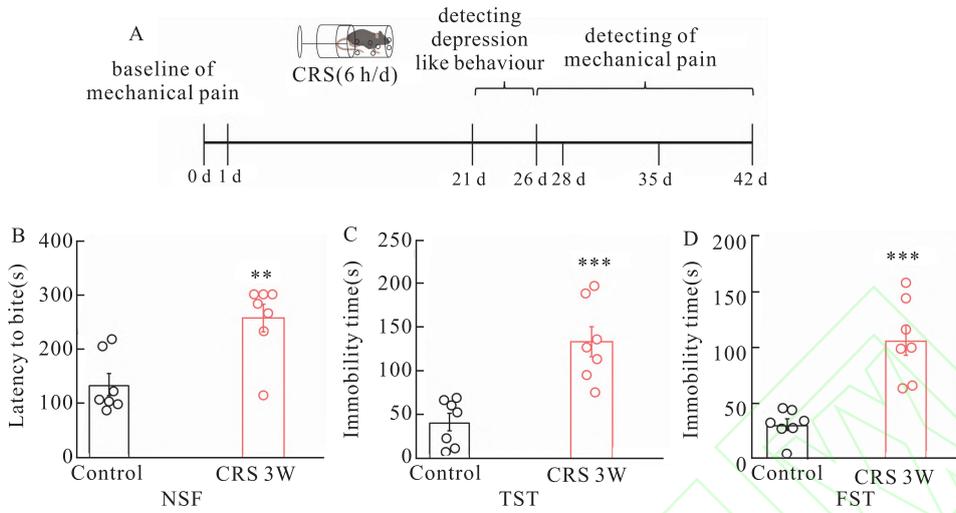


图1 小鼠 CRS 模型建立 ($n=7$)

Fig. 1 The establishment of CRS model ($n=7$)

A: Systematic schedule of the establishment of CRS model; B: Feeding latency time of two groups of mice in novelty-suppressed feeding test; C: Immobility time of two groups of mice in tail suspension test; D: Immobility time of two groups of mice in forced swimming test; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

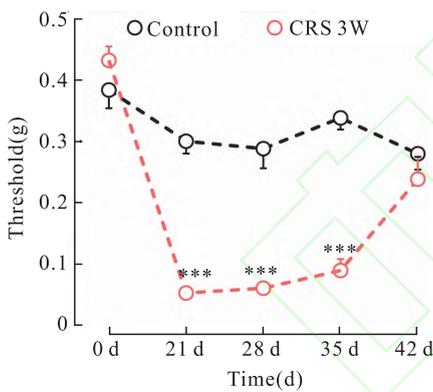


图2 Control 组和 CRS 3W 组小鼠的机械痛阈的变化曲线 ($n=7$)

Fig. 2 Change curves of mechanical pain threshold in control and CRS 3W mice ($n=7$)

*** $P < 0.001$ vs Control group.

录,发现 CRS 3W 组小鼠 LC 中 NE 能神经元 (noradrenergic neurons in the LC, LC^{NE}), 其发放频率相较于对照组明显降低 ($P=0.0115$, 对照组的标准偏差是 5.918, CRS 3W 组的标准偏差是 5.840), 且阈电流明显升高 ($P=0.0208, t=2.272$) (图 5A, 5B)。

2.4 化学遗传学激活 LC^{NE} 缓解 CRS 3W 小鼠机械痛敏 为了进一步探究 LC 在抑郁伴疼痛中的调控作用,在 CRS 3W 小鼠的双侧 LC 中表达多巴胺 β -羟化酶 (dopamine β -hydroxylase, DBH) 启动子的化学遗传学病毒 AAV-DBH-hM3Dq-EYFP (EYFP 组小鼠表达 AAV-DBH-EYFP), 每个行为学实验前 30 min, 小鼠腹腔注射 CNO (5 mg/kg), 后进行新奇抑

制进食、悬尾和强迫游泳实验。结果显示,相较于 EYFP 组小鼠,给予 CNO 时 hM3Dq 组小鼠的痛阈明显升高,CRS 3W 小鼠疼痛明显缓解 ($P < 0.0001, t=14.67$) (图 6C), 而小鼠的抑郁样行为没有变化 (新奇抑制进食: $P=0.8185, t=0.2346$; 悬尾实验: $P=0.6108, t=0.5226$; 强迫游泳: $P=0.8989, t=0.1297$) (图 6D-6F)。提示化学遗传学激活 LC 中 NE 能神经元可以缓解 CRS 3W 小鼠的疼痛,而无法缓解其抑郁样行为。

3 讨论

躯体疼痛是重症抑郁症的常见临床并发症,抑郁伴疼痛患者往往对经典的镇痛和抗抑郁药物疗效微弱或不敏感,导致抑郁和疼痛恶性循环,恶化为难治性抑郁症^[7-8]。文献报道显示,传统的抗抑郁疗法对抑郁伴疼痛的共病患者治疗效果极差,如帕罗西汀可以有效地治疗单一的抑郁症,但是无法缓解共病患者的抑郁症状^[9]。这提示抑郁与疼痛共病的发病机制可能与单一的抑郁或疼痛之间存在很多差异。临床上发现布洛芬、吲哚美辛、加巴喷丁以及利多卡因等镇痛药对于急性炎症痛和神经痛均有治疗效果,但是无法缓解由抑郁导致的疼痛,这些结果提示典型的镇痛药可能不适用于治疗共病患者。Zhou et al^[10] 发现中缝背核-中央杏仁核的 5-羟胺能神经环路特异性调控慢性疼痛导致的抑郁样行为,而不参与单纯抑郁样行为。相较之下,本研究显

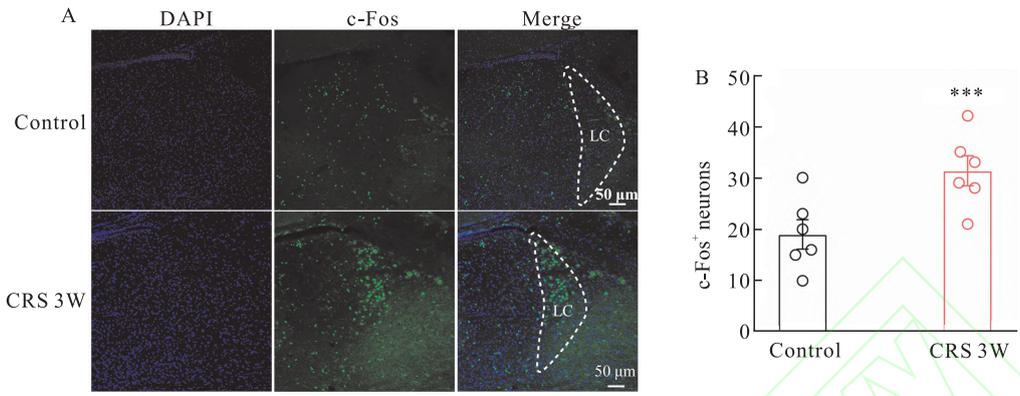


图3 CRS 3W组小鼠LC区域c-Fos表达 ×100

Fig. 3 c-Fos expression in the LC region of mice in the CRS 3W group ×100

A: Immunofluorescence staining to detect c-Fos expression in the LC region of mice in control and CRS 3W groups; B: Statistical graph of c-Fos expression in the LC region; *** $P < 0.001$ vs Control group.

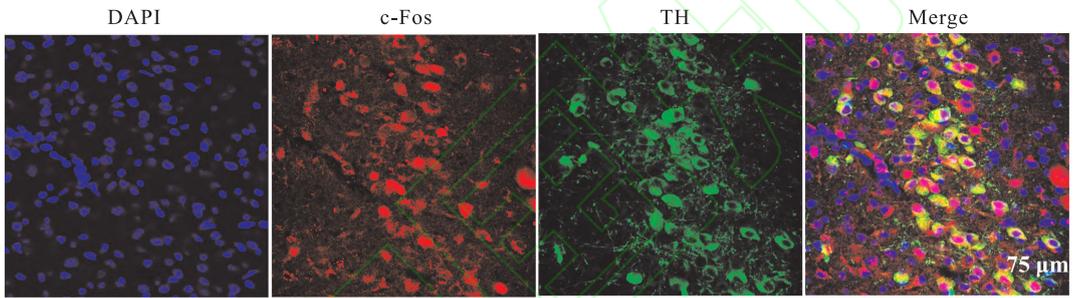


图4 LC中c-Fos信号与TH抗体标记的NE能神经元共定位 ×200

Fig. 4 Co-localisation of c-Fos signals in LC with TH antibody labeled NEergic neurons ×200

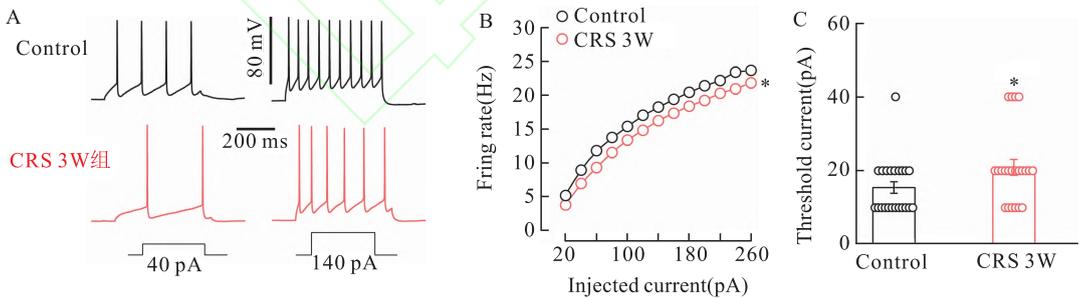


图5 CRS 3W小鼠LC中NE能神经元兴奋性降低 (n=22)

Fig. 5 Reduced excitability of NEergic neurons in the LC of CRS 3W mice (n=22)

A: Schematic diagram of frequency changes of NEergic neurons in mice of control and CRS 3W groups; B: Statistical graph of frequency changes of NEergic neurons in mice of control and CRS 3W groups; C: Statistical graph of changes in threshold currents of NEergic neurons in mice in control and CRS 3W groups; * $P < 0.05$ vs Control group

示化学遗传学激活 LC 中 NE 能神经元能够缓解抑郁导致的机械痛敏, 这表明 LC^{NE} 参与抑郁伴疼痛行为的调控。此外, 在临床上多采用 5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂治疗抑郁共病疼痛, 其潜在机制是抑制 5-羟色胺和 NE 的再摄取, 激活从腹侧延髓和导水管周围灰质到脊髓背角神经元的下行调

节途径, 从而缓解疼痛^[11]。这些结果表明选择性调控大脑核团或者神经环路可能是治疗共病的重要靶点。

目前研究发现 LC 的 NE 能系统在应激相关的神经精神疾病如抑郁症等中起着关键作用, 同时 LC^{NE} 能神经元在疼痛的调节中发挥重要功能^[10]。

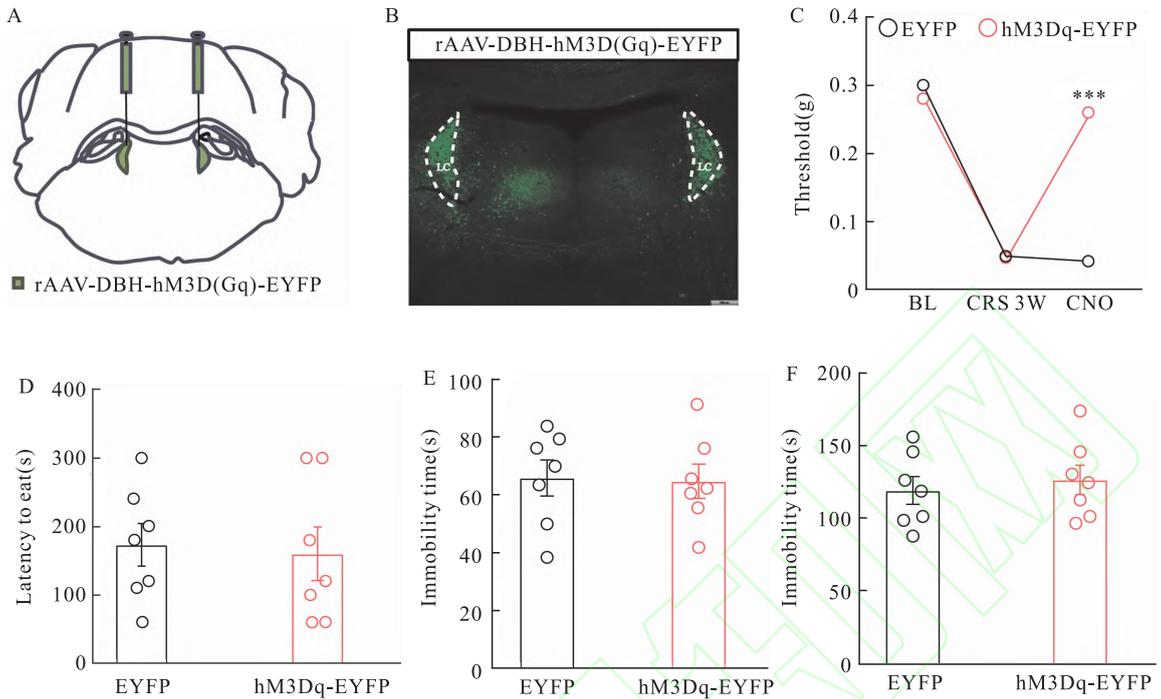


图6 化学遗传学激活 LC 中 NE 能神经元缓解 CRS 3W 小鼠的机械痛敏 ($n=7$)

Fig.6 Chemogenetic activation of NEergic neurons in the LC relieves mechanical pain sensitisation in CRS 3W mice ($n=7$)

A: Schematic representation of chemical genetics modulation of mouse LC-NEergic neurons; B: Schematic illustration of AAV-DBH-hM3Dq-EYFP virus expression in LC of C57BL/6J mice; Scale bar: 100 μm ; C: Up-down test method to detect the mechanical pain threshold of mice; *** $P < 0.001$ vs EYFP group; D: Feeding latency time of two groups of mice in novelty-suppressed feeding test; E: Comparison of immobility time of two groups of mice in the tail suspension test; F: Comparison of immobility time of two groups of mice in the forced swimming test.

研究^[12]发现, LC 内显微注射黑色素聚集激素 (the melanin-concentrating hormone, MCH)-Receptor 1 拮抗剂 SNAP-94847 可以阻断反复皮下注射皮质酮、静脉注射 MCH 和 LC 内显微注射 MCH 产生的大鼠抑郁样行为。在神经病理性疼痛伴抑郁症模型的小鼠中, LC^{NE}能神经元表达 c-Fos 蛋白, 且电生理记录发现其自发放电增多, 提示 LC 参与疼痛及抑郁样行为的调节^[13]。本研究显示抑郁导致小鼠痛敏形成后, LC^{NE}能神经元活性显著降低, 通过化学遗传学特异性地激活 LC^{NE}能神经元, 可以缓解抑郁导致的痛敏。但是本研究中 LC^{NE}能神经元活性降低可能由哪些上游核团导致尚待进一步通过病毒示踪、离体脑片电生理等技术探究。

当外周痛觉神经元感受到疼痛信号, 随后将信号传递到更高的大脑中枢, 以产生适当的感觉知觉, 并调节生理和行为反应。去甲肾上腺素转运蛋白 (norepinephrine transporter, NET) 是一种存在于神经元细胞膜上的蛋白质, 其主要功能是将 NE 从突触间隙重新吸收到神经元内, 以便在神经传递过程中进行再利用。NET 在调节神经递质水平和神经传递过程中起着重要作用。NE 再摄取抑制类抗抑

郁药通过阻断 LC 下行 NE 能纤维末端的 NET 来增加 NE。LC 将下行纤维投射到脊髓背角并释放 NE 以抑制疼痛信号的上行。该途径对生理性疼痛无明显抑制作用, 但在病理条件下, 释放到脊髓背角的 NE 增加, 可显著抑制病理性疼痛的传递^[14]。此外, LC 作为调节疼痛的重要脑区在神经环路水平对疼痛的调控也起到重要作用, Gu et al^[15]发现延髓腹外侧区可通过作用于 LC 下行疼痛通路调控痛觉反应。研究发现, 光遗传激活 LC-前额叶皮层神经环路, 可缓解神经性疼痛大鼠的痛敏表现。

本研究采用慢性束缚应激小鼠模型, 小鼠在经历 21 天慢性束缚应激后, 出现抑郁样行为并伴有机械痛阈的下降。化学遗传学激活 LC^{NE}能神经元能够上调抑郁导致的机械痛阈的下降, 而不能缓解抑郁样行为。但是仅有这一种模型不足以说明 LC^{NE}能神经元在抑郁伴痛行为中的特异性。在其他如坐骨神经分支选择性损伤、完全弗氏佐剂诱导的神经痛病理性、炎性疼痛等疼痛模型中, LC 是否参与疼痛以及疼痛相关的焦虑、抑郁样行为的调控, 还需进行更深入的探究。

综上所述, 本研究以慢性束缚应激为小鼠模型,

围绕 LC^{NE} 系统,探究 LC 特异性调控抑郁伴疼痛的神经机制,为临床治疗抑郁与疼痛共病提供了实验依据,也为非药物的物理干预提供新的潜在靶点。

参考文献

- [1] Bair M J, Robinson R L, Katon W, et al. Depression and pain comorbidity: a literature review[J]. Arch Intern Med, 2003,163(20):2433-45. doi: 10.1001/archinte.163.20.2433.
- [2] Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro R E. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? [J]. J Neuroendocrinol, 2001,13(12):1009-23. doi: 10.1046/j.0007-1331.2001.00727.x.
- [3] McKinney A, Hu M, Hoskins A, et al. Cellular composition and circuit organization of the locus coeruleus of adult mice[J]. Elife, 2023,12:e80100. doi: 10.7554/eLife.80100.
- [4] McCall J G, Al-Hasani R, Siuda E R, et al. CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety[J]. Neuron, 2015,87(3):605-20. doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.002.
- [5] Wei H, Jin C, Viisanen H, et al. Histamine in the locus coeruleus promotes descending noradrenergic inhibition of neuropathic hypersensitivity[J]. Pharmacol Res, 2014,90:58-66. doi: 10.1016/j.phrs.2014.09.007.
- [6] Mogil J S, Ritchie J, Sotocinal S G, et al. Screening for pain phenotypes: analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive assays[J]. Pain, 2006,126(1-3):24-34. doi: 10.1016/j.pain.2006.06.004.
- [7] IsHak W W, Wen R Y, Naghdechi L, et al. Pain and depression: A systematic review[J]. Harv Rev Psychiatry, 2018,26(6):352-63. doi: 10.1097/HRP.000000000000198.
- [8] Kupfer D J, Frank E, Phillips M L. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives [J]. Lancet, 2012,379(9820):1045-55. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60602-8.
- [9] Ferguson J M. SSRI antidepressant medications: Adverse effects and tolerability [J]. Prim Care Companion J Clin Psychiatry, 2001,3(1):22-7. doi: 10.4088/pcc.v03n0105.
- [10] Zhou W, Jin Y, Meng Q, et al. A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain [J]. Nat Neurosci, 2019,22(10):1649-58. doi: 10.1038/s41593-019-0468-2.
- [11] 王威,徐静,万燕杰. 延髓头端腹内侧区参与下行抑制/易化系统的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2016, 37(9):852-5, 864. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2016.09.020.
- Wang W, Xu J, Wan J Y, et al. Advance in the rostral ventromedial medulla involving descending inhibitory/facilitatory system [J]. Int J Anesthesiol Resus, doi:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2016.09.020.
- [12] Ye H, Cui X Y, Ding H, et al. Melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH-R1 in the locus coeruleus may be involved in the regulation of depressive-like behavior[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2018, 21(12):1128-37. doi: 10.1093/ijnp/pyy088.
- [13] Bravo L, Torres-Sanchez S, Alba-Delgado C, et al. Pain exacerbates chronic mild stress-induced changes in noradrenergic transmission in rats [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2014,24(6):996-1003. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.01.011.
- [14] Hayashida K I, Eisenach J C. Descending noradrenergic inhibition: An important mechanism of gabapentin analgesia in neuropathic pain [J]. Adv Exp Med Biol, 2018,1099:93-100. doi: 10.1007/978-981-13-1756-9_8.
- [15] Gu X, Zhang Y Z, O'Malley J J, et al. Neurons in the caudal ventrolateral medulla mediate descending pain control [J]. Nat Neurosci, 2023,26(4):594-605. doi: 10.1038/s41593-023-01268-w.

Involvement of locus coeruleus in the regulation of depression-induced chronic pain behavior

Yuan Xi, Liu Yuqing, Meng Qian

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore whether the locus coeruleus (LC) mediates the pain in mice with depressive-like behaviors and underlying mechanisms. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly divided into two groups, including control and chronic restraint stress (CRS) group. Novelty-suppressed feeding test, tail suspension test and forced swimming test were used to assess the formation of depressive-like behaviors and the establishment of CRS model. The mechanical pain threshold of mice was detected by Von Frey brush test. LC neuronal activity was detected by c-Fos immunofluorescence staining. Neuronal excitability in LC was detected using electrophysiology of isolated brain slices. The influence on pain and depressive-like behaviors was identified by chemogenetics in LC. **Results** Compared with the Control group, CRS mice displayed significant depressive-like behavior after 3 weeks

成像流式细胞术和免疫荧光技术检测成纤维样滑膜细胞 Ahr 入核的比较

程梦¹, 王焱¹, 董伟波¹, 魏伟¹, 常艳^{1,2}

(¹ 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室, 合肥 230032;

² 安徽医科大学实验动物中心, 合肥 230032)

摘要 目的 探究成像流式细胞术和免疫荧光技术检测成纤维样滑膜细胞中 Ahr 入核的差别。**方法** 用 15% 的 DMEM 培养人来源的成纤维样滑膜细胞细胞株 MH7A, 分别用激光共聚焦显微镜和量化成像流式细胞仪 (ImageStreamX Mark II) 检测空白对照组、Kyn 组和 Kyn + CH223191 组对 MH7A 中 Ahr 的入核水平, 并采用非参数检验比较两种检测技术检测结果的相关性。**结果** 与空白对照组相比, 免疫荧光技术和成像流式细胞术测得的 MH7A 细胞中 Kyn 组和 Kyn + CH223191 组 Ahr 入核能力增加 ($P < 0.05$), 两种实验方法测得的三组结果相关性良好, R^2 值分别是 0.863 8、0.928 7 和 0.901 8, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 相较于免疫荧光技术的操作和结果, 成像流式细胞术数据处理比较复杂, 但所得结果精确度高, 避免了实验者的主观性, 减少实验误差。

关键词 免疫荧光技术; 成像流式细胞术; 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 芳香烃受体; 入核; 相关性

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2024)09 - 1524 - 05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.09.005

免疫荧光技术是将免疫学方法(抗原抗体特异

结合)与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法。主要用于研究蛋白定位、蛋白间相互作用, 具有特异性强、敏感性高、速度快的优点。但它对结果判定的客观性不足, 不能精确的量化实验结果^[1-2]。成像流式细胞术将流式细胞术和荧光显微镜成像相结合, 不仅可以提供细胞群的统计数据, 还可以对单一细胞的高分辨率数字化图像进行获取并使其可见, 从而提供细胞形态、细胞结构和亚细胞信号分布。目前已经发现成像流式细胞

2024 - 07 - 15 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2108085MH320); 安徽省留学人员创新项目择优资助计划项目(编号: 2022LCX019)

作者简介: 程梦, 女, 硕士研究生;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail:

wwei@ahmu.edu.cn;

常艳, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:

yychang@ahmu.edu.cn

of CRS (CRS 3W), and the model was successful; CRS 3W mice showed a significant decrease in mechanical pain threshold and developed mechanical pain sensitivity. A lot of c-Fos⁺ cells of LC was observed in CRS 3W mice, 90% of them were noradrenergic neurons. Compared with the Control group, the neuronal excitability of noradrenergic neurons decreased in LC of CRS 3W mice. Compared with the Control group, chemogenetic activation of the LC noradrenergic neurons significantly reduced the LC mechanical pain sensitization in CRS 3W mice. **Conclusion** The excitability of noradrenergic neurons in LC of CRS 3W mice decreases, and chemogenetic activation of noradrenergic neurons in LC can relieve pain sensitization in CRS 3W mice.

Key words locus coeruleus; chemogenetics; chronic pain; chronic restraint stress; electrophysiology *in vitro*; novelty-suppressed feeding test; forced swimming test

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82101311); Scientific Research Fund Project of Anhui Medical University (No. 2020xkj014); 'Early Exposure to Research' Training Programme for Clinical Medicine ('5 + 3' Integration) at Anhui Medical University (No. 2021 - ZQKY - 172).

Corresponding author Meng Qian, E-mail: mengqian@ahmu.edu.cn