

中缝背核五羟色胺能神经元对 PCPA 失眠模型大鼠 睡眠质量及焦虑样行为的影响

李群涛^{1,2,3}, 杜桐宇^{1,2,3}, 贾磊^{1,2,3}, 殷姜文^{2,3}, 李燕^{2,3}

(¹ 石河子大学第一附属医院麻醉科, ² 中亚高发疾病防治中心重点实验室,

³ 新疆地方病和民族病重点实验室, 石河子 832000)

摘要 **目的** 研究通过化学遗传学技术选择性激活对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠模型大鼠中缝背核五羟色胺神经元(DRN5-HT),探讨其对失眠与焦虑共患病是否具有调节作用。**方法** 将32只雄性SD大鼠随机分为Control组、PCPA模型组(PCPA组)、化学激活组(hM3Dq+CNO组)、化学对照组(hM3Dq+Saline组)。通过旷场实验与高架十字迷宫实验评估实验大鼠焦虑水平,在体脑电(EEG)记录丙泊酚诱导睡眠及皮质脑电变化、通过免疫荧光染色观察5-HT神经元c-Fos阳性的蛋白表达量变化。**结果** 行为学结果显示,化学激活组与化学对照组相比,化学激活组焦虑水平明显较低($P<0.05$),睡眠时长明显延长($P<0.05$)。化学激活组DRN5-HT神经元c-Fos阳性的蛋白表达量更多($P<0.05$)。EEG结果显示,化学激活组与化学对照组 δ 波段功率百分比较高($P<0.05$), α 波段功率百分比较低($P<0.05$)。**结论** 化学激活DRN区5-HT神经元可以改善PCPA失眠大鼠的焦虑水平,增加其睡眠时长。

关键词 五羟色胺神经元;中缝背核;化学遗传学;失眠;焦虑;大鼠

中图分类号 R 338

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0697-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.016

失眠是一种常见的睡眠障碍性疾病,以难以入睡、睡眠难以维持或非恢复性睡眠为特征^[1]。长期失眠不仅会对认知、情绪、免疫系统和新陈代谢等产生不利影响,还会增加心血管疾病、肥胖、糖尿病及心理疾病的风险^[2-3]。失眠会导致焦虑和抑郁的发生风险升高,而焦虑能够再次加剧失眠的程度及持续时间,造成失眠-焦虑-失眠加剧的恶性循环^[4]。因此,探究失眠伴焦虑的潜在机制与改善方法是如今治疗睡眠障碍性疾病的关键所在。

失眠相关病因非常复杂,涉及中枢递质障碍、炎症因子、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能紊乱、睡眠神经环路紊乱等因素^[5-6],5-羟色胺系统(5-hydroxytryptamine,5-HT)被认为是参与睡眠觉醒调节的关键神经节点,其中分布于中缝背核(dorsal raphe nucleus, DRN)的五羟色胺神经元在调控和维持慢波睡眠质量,对机体的疲劳恢复中具有不可替代的作用,并且其与焦虑、抑郁等情绪障碍的发生密

切相关^[7-8]。但目前该神经核团对于失眠及失眠性焦虑这类疾病的影响尚不明晰,因此,该研究将对氯苯丙氨酸(p-chlorophenylalanine, PCPA)诱导的失眠大鼠模型为对象,通过免疫共标染色观察失眠期DRN五羟色胺能神经元变化,并利用化学遗传学特异性调控脑内DRN区5-HT神经元,结合行为学和在体脑电(electroencephalography, EEG)记录观察失眠大鼠睡眠质量,通过旷场实验及高架十字迷宫实验观察其对失眠大鼠焦虑水平的作用,进而揭示DRN区五羟色胺能神经元对失眠大鼠睡眠质量及失眠导致的焦虑样行为的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 该实验使用SPF级雄性SD大鼠,体质量250~300 g,所有动物均从河南斯克贝斯生物科技股份有限公司购买,许可证书编号:SCXK(豫)02020-0005。饲养于石河子大学实验动物中心。大鼠活动自由,自由进食和饮水,昼夜周期12 h(08:00—20:00为光照时间),室温23~25℃,湿度53%~55%。动物实验所需程序经石河子大学第一附属医院伦理委员会批准(编号:A2023-196-01)。实验过程严格遵循2006年中国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2024-12-12 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82360242、81860209);石河子大学科研项目(编号:ZZZC2022082)

作者简介:李群涛,男,硕士研究生;

李燕,女,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: 1249623003@qq.com

1.2 实验试剂、药物和病毒 丙泊酚中/长链脂肪乳注射液购自奥地利 Fresenius Kabi 公司,异氟醚购自深圳 RWD Life Science 公司。对氯苯丙氨酸甲酯盐酸盐购自美国 MedChemExpress 公司(CAS 号:14173-40-1)。兔抗 TPH2 抗体、小鼠抗 c-Fos 抗体购自美国 Abcam 公司(批号:ab184505,ab302667)。二级抗体为山羊抗兔 IgG(Alexa Fluor® 488)购自美国 Abcam 公司(批号:ab150077)、山羊抗小鼠 IgG(H+L)(TRITC)购自武汉三鹰技术有限公司(批号:SA00007-1)。Clozapine N-oxide 购自美国 APEX-BIO 公司。化学遗传学激活病毒 rAAV-TPH2-hM3d(Gq)-EGFP-WPREs 购自武汉枢密公司。

1.3 主要仪器 微量注射泵、小动物麻醉机(型号:R500)购自深圳 RWD Life Science 公司;荧光显微镜(型号:E600)购自日本 Nikon 公司;Labmaze V3.0 动物行为视频分析系统、数显脑立体定位仪(型号:ZS-FD)购自北京众实迪创科技发展有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组与模型制备 为观察 DRN5-HT 神经元对 PCPA 失眠大鼠的焦虑及睡眠的影响,将 32 只大鼠随机分为 4 组:Control 组、PCPA 模型组(PCPA 组)、化学激活组(hM3Dq + CNO 组)、化学对照组(hM3Dq + Saline 组),每组 8 只。除 Control 组外,各组大鼠采用腹腔注射 PCPA 造模,每天早上 10—11 点进行,连续 2 d 腹腔注射 PCPA 400 mg/kg(对氯苯丙氨酸甲酯盐酸盐:每 501.33 mg 含 PCPA 400 mg),第一次注射后 28~32 h 后出现昼夜节律消失,白天睡眠减少,表明造模成功。Control 组以同样方法腹腔注射等体积生理盐水。

1.4.2 脑立体定位病毒注射 所有 SD 大鼠均使用 3% 异氟醚麻醉,将大鼠固定在脑立体定位仪。根据第五版《大鼠脑图谱》确定 DRN 坐标(AP: -7.6 mm, ML:0.0 mm, DV: -6.5 mm)位点,用颅骨钻钻孔,使用微量注射针将 rAAV-TPH2-hM3d(Gq)-EGFP-WPREs 病毒 500 nl 注入 DRN 核团,注射速度为 50 nl/min,注射完毕将针尖停留在位点 10 min 后缓慢退针。

1.4.3 EEG 电极置入 使用异氟醚麻醉,固定大鼠头部将带有导丝的 4 个不锈钢螺钉植入硬脑膜外用于监测脑电图。螺钉分布位置:两颗螺钉植于 Bergma 点向前 3.9 mm 并左右旁开 2.0 mm 处;另外两个螺钉植于 Bergma 点向后 4.0 mm 并且间隔 5.0 mm。将脑电电极置于颅骨表面,电极导丝与螺

钉导丝相连接,使用牙科水泥将脑电电极固定于颅骨表面。术后 3 d 每天肌肉注射青霉素 20 U 预防感染。

1.4.4 行为学实验 所有的行为测试都在 10:00—14:00 进行,行为测试前 1 h 将实验动物放置行为学房间适应环境。在每只大鼠实验结束后,使用酒精喷雾对实验装置进行清洁,避免干扰之后实验。

1.4.4.1 旷场实验(open field test, OFT) 于大小 100 cm × 100 cm × 50 cm,中心区域大小为:40 cm × 40 cm 的黑色实验装置内进行,将大鼠置于旷场场地中央区域开始计时,允许其自由探索 10 min,同时通过 Labmaze V3.0 动物行为视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司),跟踪和记录大鼠的运动轨迹。

1.4.4.2 高架十字迷宫(elevated plus-maze, EPM) 将大鼠置于 EPM 中心部位,面向开放臂,自由探索 10 min。同时通过 Labmaze V3.0 动物行为视频分析系统,跟踪和记录大鼠进入开放臂次数(open arm entry, OE)及进入开放臂停留时间(open arm time, OT)。

1.4.4.3 睡眠潜伏期、睡眠时间变化 于 PCPA 造模后第 4 天,各组均尾静脉注射丙泊酚 11 mg/kg 诱导睡眠,丙泊酚 48 mg/(kg · h)持续 30 min,记录大鼠的睡眠潜伏期(丙泊酚诱导翻正反射消失时间)及睡眠时间(停止给予丙泊酚后翻正反射恢复时间)。翻正反射消失定义为药物注射完毕后,将大鼠置于屈膝仰卧位,大鼠不能从仰卧位变为俯卧位。即为丙泊酚静脉注射完毕至大鼠翻正反射消失的时间,称为丙泊酚诱导睡眠潜伏期。翻正反射恢复定义为大鼠在仰卧位时,能够恢复正常的体位,即为丙泊酚注射完毕后待大鼠翻正反射恢复的时间,计为睡眠持续时间。全程记录脑电信号。超过 40 min 后翻正反射未恢复,即排除该只大鼠。

1.4.5 化学遗传学实验 化学遗传学即用 N-氧化氯氮平(clozapine N-oxide, CNO)可以激活由 G 蛋白偶联受体进行改造而来的 DREADDs,进而激活特异性标记的神经元兴奋性。进行行为学测定前 1 h,分别在表达 hM3d(Gq)的化学激活组和化学对照组大鼠腹腔注射 CNO(1 mg/kg)或等剂量生理盐水。

1.4.6 免疫荧光实验 腹腔注射 CNO(1 mg/kg)和等剂量生理盐水注射 1 h 后,行灌注取脑冰冻切片。冰冻切片脑组织平衡室温 30 min,进行 PBS 液漂洗 3 次,结束后滴加提前配制封闭液(15% BSA

与 0.2% Triton X-100) 室温封闭 1 h, 滴加一抗抗体, 置于 4 ℃ 孵育过夜。用 PBS 液漂洗 3 次, 避光滴加相应的荧光标记二抗抗体, 37 ℃ 水浴箱孵育 2 h。PBS 液漂洗 3 次, 避光滴加入 DAPI 染核, 滴加抗荧光衰减封片剂封片, 应用荧光显微镜观察。

1.4.7 EEG 记录及数据分析 在进行整个脑电记录过程中, 用 Pinnacle 8200 (pinnacle technology, USA) 记录系统进行脑电图信号采集, 采样率为 400 Hz, 使用 Lunion Stage 睡眠实验分析系统对脑电数据进行分析 (<https://www.luniondata.com>, 上海)。各波段频率为 δ : 0.25 ~ 4 Hz, θ : 4 ~ 8 Hz, α : 8 ~ 13 Hz, β : 13 ~ 25 Hz, γ : 25 ~ 60 Hz。

1.5 统计学处理 应用 GraphPad Prism 10.0 进行统计分析。实验数据进行正态性检验后, 符合正态分布。各组行为学、入睡潜伏期、睡眠时间 & c-Fos 蛋白共表达占比的统计分析采用 One-way ANOVA 分析。EEG 波段功率百分比采用 Two-way ANOVA 分析合并 Sidak 多重比较。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCPA 失眠模型检测 为检测模型创建是否成功, 于造模给药第 2 天 20:00, 进行 24 h 睡眠检

测, 示意图见图 1, Control 组与 PCPA 组 24 h 脑电结果见图 2。与 Control 组比较, PCPA 组 24 h 清醒占比明显升高 (Control 组 *vs* PCPA 组: $41.400\% \pm 2.091\%$ *vs* $63.530\% \pm 2.640\%$; $P < 0.0001$, $n = 4$), 24 h 非快速眼动睡眠 (non-rapid eye movement, NREM) 占比明显降低 (Control 组 *vs* PCPA 组: $45.630\% \pm 3.351\%$ *vs* $30.280\% \pm 2.865\%$; $P < 0.001$, $n = 4$), 24 h 快速眼动睡眠 (rapid eye movement, REM) 占比明显降低 (Control 组 *vs* PCPA 组: $12.980\% \pm 2.191\%$ *vs* $6.200\% \pm 0.938\%$; $P < 0.01$, $n = 4$)。Control 组大鼠昼夜清醒时间占比差异有统计学意义 (Dark *vs* Light: $52.080\% \pm 1.825\%$ *vs* $30.340\% \pm 2.322\%$; $P < 0.001$, $n = 4$), 符合 SD 大鼠夜间活动多, 白天睡眠为主的 24 h 昼夜节律。PCPA 组大鼠昼夜清醒时间占比差异无统计学意义 (Dark *vs* Light: $65.280\% \pm 3.284\%$ *vs* $61.460\% \pm 1.451\%$; $P = 0.328$, $n = 4$), 表现为昼夜节律消失, 表明 PCPA 失眠模型大鼠造模成功。

2.2 AAV 脑立体注射位置及转染验证 大鼠通过化学遗传学腺相关病毒 (AAV) 注射转染后, 经灌注取脑, 制备冰冻切片, 经 DAPI 进行染色后, 通过荧光显微镜观察可以发现, DRN 区内可见 AAV 病毒显示的绿色荧光, 细胞核为蓝色, 对比第五版《大鼠

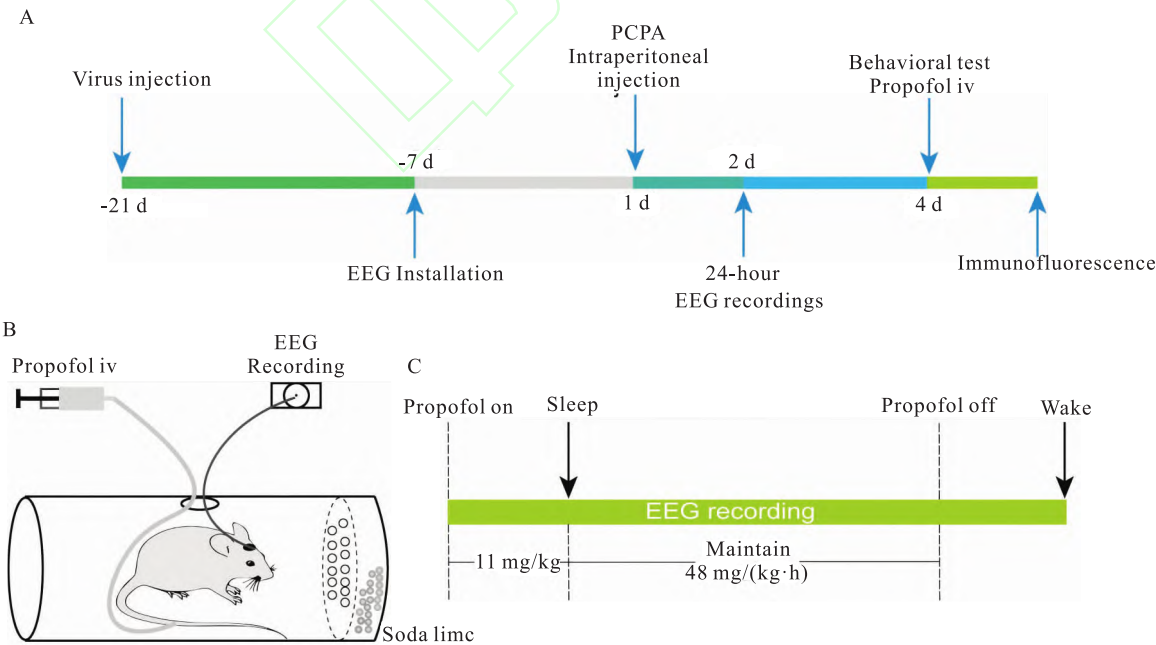


图 1 激活 PCPA 失眠大鼠 DRN 区 5-HT 神经元实验研究
Fig. 1 Experimental study of activation of DRN 5-HT neurons in PCPA insomniac rats
A: Schematic diagram of the experimental process; B: Schematic of propofol-induced sleep *in vivo* EEG recordings; C: Schematic diagram of propofol administration.

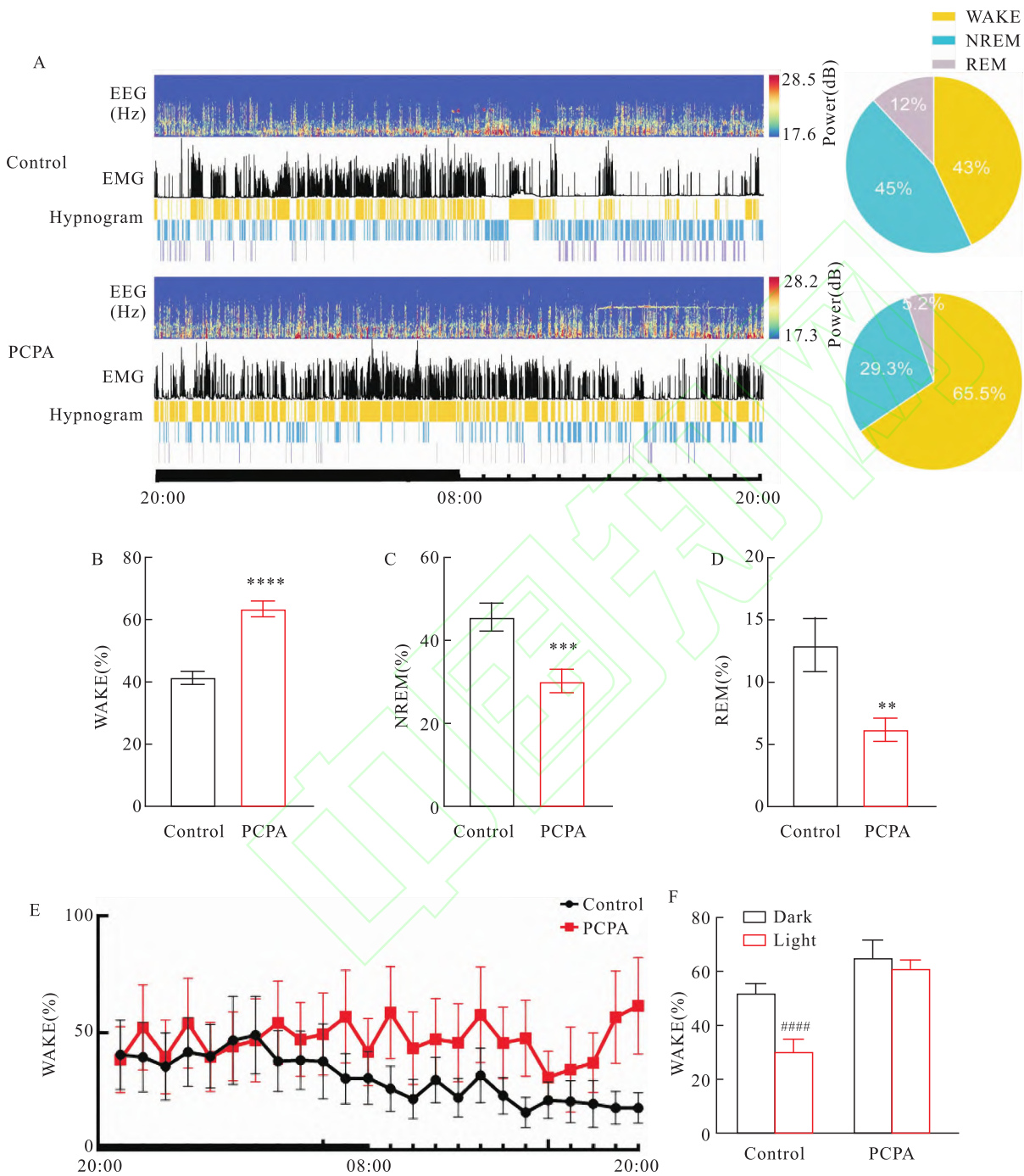


图2 Control组与PCPA组24 h在体脑电记录

Fig.2 24-hour *in vivo* EEG recordings of the Control group and the PCPA group

A: 24-hour *in vivo* EEG, EMG, and wakeful sleep staging, with the black bolded area representing nighttime; B - D: The proportion of WAKE, NREM and REM within 24 hours for each group; E: Circadian variation in the 24-hour wakefulness cycle; F: The proportion of day and night wakefulness time in each group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group; #### $P < 0.0001$ vs Dark group.

脑图谱》确定 DRN 区,绿色荧光部位脑区和脑图谱上 DRN 区域位置一致,表明 AAV 化学遗传学病毒注射位置正确,病毒转染成功。见图 3。

2.3 激活 DRN 区 5-HT 神经元对 PCPA 失眠模型

大鼠焦虑水平的影响 在大鼠旷场实验中,hM3Dq + CNO 组大鼠与 PCPA 组及 hM3Dq + Saline 组相比,进入中心区域次数增加 ($F = 30.97$, $P < 0.0001$, hM3Dq + CNO 组 vs PCPA 组: $5.125 \pm$

2.031 *vs* 1.125 ± 0.353, *P* < 0.01, *n* = 7 或 8; hM3Dq + CNO 组 *vs* hM3Dq + Saline 组: 5.125 ± 2.031 *vs* 1.571 ± 1.512, *P* < 0.05, *n* = 7 或 8); hM3Dq + CNO 组大鼠与 PCPA 组相比,进入中心区域活动时间明显增加 (*F* = 12.66, *P* < 0.000 1, hM3Dq + CNO 组 *vs* PCPA 组: 22.580 ± 11.570 *vs* 3.726 ± 3.048, *P* < 0.05, *n* = 7 或 8), hM3Dq + CNO 组大鼠与 hM3Dq + Saline 组相比,进入中心区域活动时间无明显变化。见图 4 和表 1。

在高架十字迷宫实验中, hM3Dq + CNO 组大鼠与 PCPA 组及 hM3Dq + Saline 组相比,进入开放臂次数明显增加 (*F* = 11.75, *P* < 0.000 1, hM3Dq + CNO 组 *vs* PCPA 组: 6.125 ± 3.227 *vs* 0.750 ± 0.707, *P* < 0.05, *n* = 7 或 8; hM3Dq + CNO 组 *vs* hM3Dq + Saline 组: 6.125 ± 3.227 *vs* 1.143 ± 1.069, *P* = 0.018, *n* = 7 或 8)。hM3Dq + CNO 组与 PCPA 组及 hM3Dq + Saline 组相比,开放闭停留时间无明显差异。相比于 PCPA 组, hM3Dq + CNO 组焦虑水平明显缓解,但 hM3Dq + Saline 组焦虑水平未见缓解。见图 4 和表 1。行为学结果表明化学激活 DRN5-HT 神经元改善 PCPA 失眠大鼠的焦虑水平。

2.4 激活 DRN 区 5-HT 神经元对 PCPA 失眠模型大鼠睡眠质量的影响 通过丙泊酚诱导睡眠,观察大鼠睡眠时长变化,结果如图 5 所示。与 PCPA 组及 hM3Dq + Saline 组相比, hM3Dq + CNO 组入睡潜伏期差异无统计学意义 (*F* = 3.894, *P* = 0.022, hM3Dq + CNO 组 *vs* PCPA 组: 51.290 ± 8.751 *vs* 56.140 ± 7.290, *P* = 0.9; hM3Dq + CNO 组 *vs* hM3Dq + Saline 组: 51.290 ± 8.751 *vs* 58.570 ± 21.350, *P* = 0.731, *n* = 6 或 7), 丙泊酚停药后睡眠时间延长 (*F* = 29.30, *P* < 0.000 1, hM3Dq + CNO 组 *vs* PCPA 组: 865.000 ± 145.500 *vs* 566.100 ± 187.300, *P* < 0.05, hM3Dq + CNO 组 *vs* hM3Dq + Saline 组: 865.000 ± 145.500 *vs* 518.500 ± 157.000, *P* < 0.05, *n* = 6 或 7)。相比于正常组, PCPA 组及 hM3Dq + Saline 组大鼠丙泊酚诱导睡眠入睡潜伏期延长 (*F* = 3.894, *P* = 0.022, Control 组 *vs* PCPA 组: 35.500 ± 9.813 *vs* 56.140 ± 7.290, *P* < 0.05, Control 组 *vs* hM3Dq + Saline 组: 35.500 ± 9.813 *vs* 58.570 ± 21.350, *P* < 0.05, *n* = 6 或 7), 丙泊酚停药后睡眠时间缩短 (*F* = 29.300, *P* < 0.000 1, Control 组 *vs* PCPA 组: 1 217.000 ± 122.900 *vs* 566.100 ± 187.300,

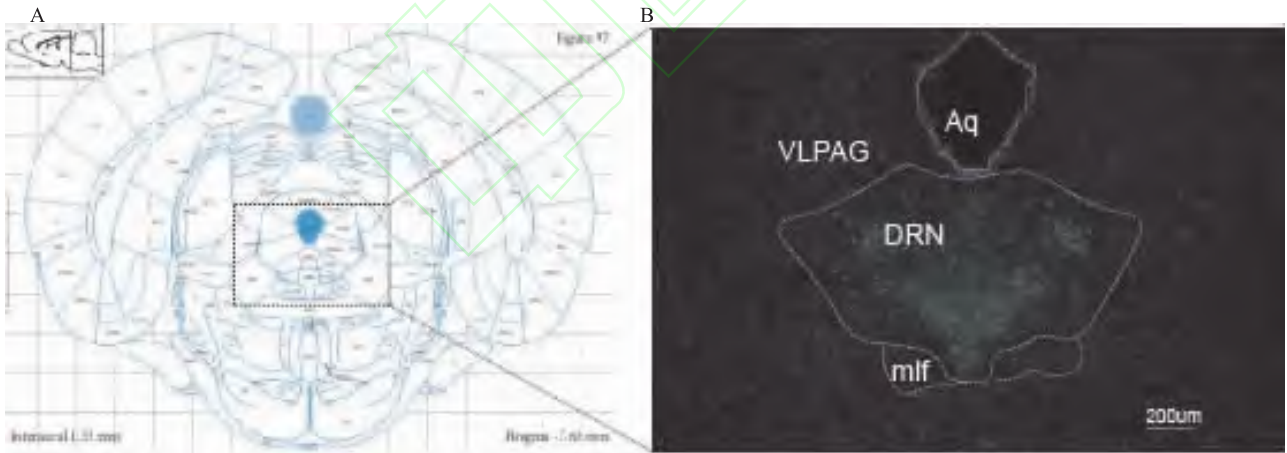


图3 DRN 区化学遗传学病毒转染表达

Fig. 3 Chemical genetics viral expression in DRN region

A: Standard brain atlas of rat DRN region; B: Green fluorescence represents chemogenetic viruses, blue represents DAPI ×200.

表1 激活 DRN 区 5-HT 神经元对 PCPA 失眠模型大鼠焦虑样行为的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of activating 5-HT neurons in the DRN region on anxiety-like behaviors in PCPA insomnia model rats($\bar{x} \pm s$)

Group	n	OFT		EPM	
		Center frequency (number)	Time in center (s)	Open arm entry (number)	Open arm time (s)
Control	8	10.130 ± 3.399 ***	36.750 ± 18.120 ***	8.250 ± 4.833 ***	59.740 ± 32.480 ***
PCPA	7	1.125 ± 0.353	3.726 ± 3.048	0.750 ± 0.707	3.121 ± 6.252
hM3Dq + Saline	7	1.571 ± 1.512	7.663 ± 9.196	1.143 ± 1.069	10.120 ± 16.540
hM3Dq + CNO	8	5.125 ± 2.031 ***	22.580 ± 11.570 *	6.125 ± 3.227 **	24.490 ± 17.430

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001 *vs* PCPA group.

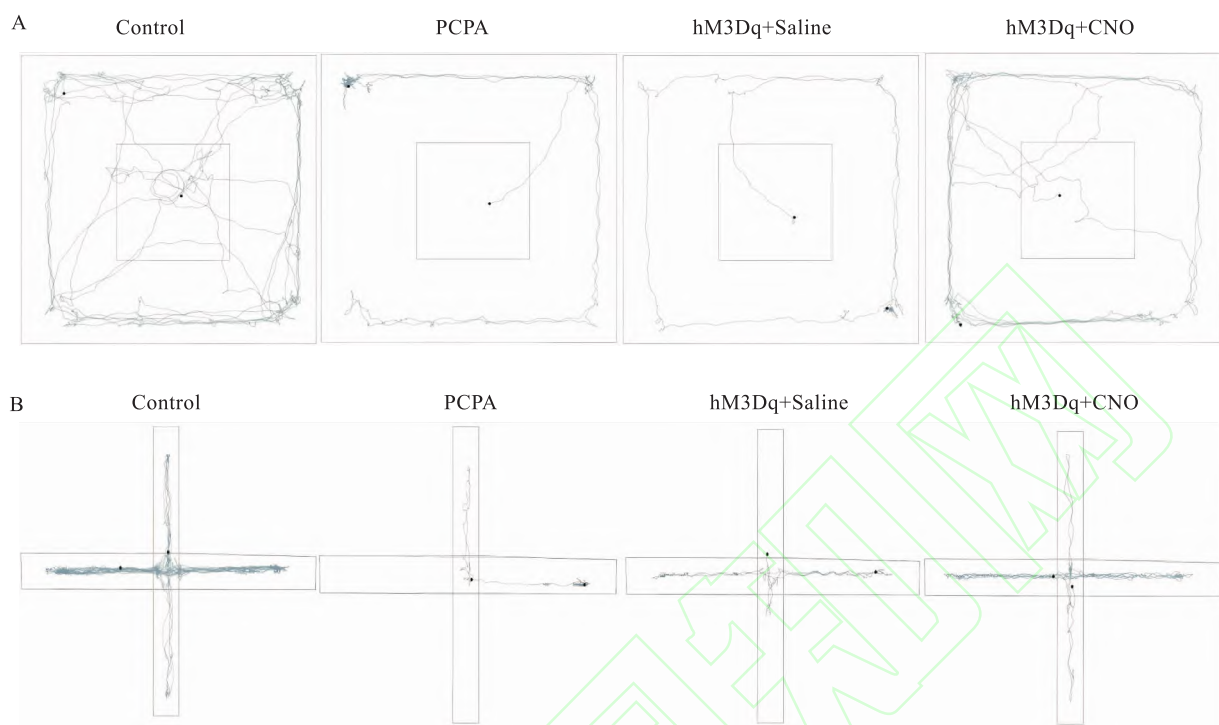


图 4 各组大鼠行为学变化
Fig. 4 Behavioral changes in rats in each group

A: Plot of experimental trajectories for each group of absences; B: Schematic diagram of each group of elevated cross mazes.

$P < 0.0001$, Control 组 vs hM3Dq + Saline 组: $1\,217.000 \pm 122.900$ vs 518.500 ± 157.000 , $P < 0.0001$, $n = 6$ 或 7)。

通过分析停药后睡眠期间 EEG 信号结果显示, hM3Dq + CNO 组与 hM3Dq + Saline 组 δ 波段功率百分比 ($F = 19.160$, $P < 0.0001$, hM3Dq + CNO 组 vs hM3Dq + Saline 组: 0.414 ± 0.044 vs 0.298 ± 0.098 , $P < 0.05$, $n = 5$) 升高。 α 波段功率百分比 ($F = 19.16$, $P < 0.0001$, hM3Dq + CNO 组 vs hM3Dq + Saline 组: 0.208 ± 0.019 vs 0.330 ± 0.101 , $P < 0.05$, $n = 5$) 降低。这表明化学激活 DRN5-HT 神经元通过缓解焦虑后睡眠期间能够对皮质脑电产生影响, 促进睡眠。结果显示激活 DRN5-HT 神经元的 PC-PA 失眠大鼠其焦虑水平的缓解, 具有促进睡眠的作用。

2.5 DRN 区 5-HT 神经元与 c-Fos 蛋白共表达
从图 6 免疫荧光染色 c-Fos 看出, 化学激活病毒特异性标记的 5-HT 神经元相比于 hM3Dq + Saline 组 c-Fos 蛋白表达较高 ($F = 11.130$, $P < 0.01$, hM3Dq + CNO 组 vs hM3Dq + Saline 组: 0.563 ± 0.208 vs 0.141 ± 0.020 , $P < 0.05$, $n = 3$)。c-Fos 蛋白在神经元激活时会快速释放表达, 作为神经元被激活的

标志。该研究通过对免疫荧光 c-Fos 蛋白与 5-HT 神经元共表达数量进行统计, 表明了化学遗传学有效激活 DRN5-HT 神经元。

3 讨论

调查^[9]显示, 失眠发病率逐年上升, 中国失眠患病率达到 29.2%, 失眠问题日益严重。对失眠机制的进一步探究, 有助于推动睡眠科学发展, 解决失眠障碍所导致的健康问题。目前失眠障碍的神经生物学机制研究在睡眠障碍研究领域受到广泛关注, 其中失眠障碍的神经核团及环路的生物学机制为研究的热点与难点。

睡眠的神经生物学说认为: 睡眠和觉醒状态的产生与脑内神经核团及神经元的变化密切相关。研究^[10]表明 DRN 区 5-HT 神经元广泛投射到大脑皮质、杏仁核、基底前脑、丘脑、下丘脑、蓝斑核、脑桥网状结构, 参与调控焦虑、奖赏、睡眠 - 觉醒及药物成瘾等多种神经活动^[11-12]。DRN 区 5-HT 神经元对睡眠的启动和维持至关重要, 基因编辑技术编辑 TPH2 基因缺乏的斑马鱼表现出 5-HT 生成减少, 在睡眠期间对刺激的反应概率明显增高, 睡眠深度明显降低, 表现出更强的觉醒趋势以及睡眠稳态的减

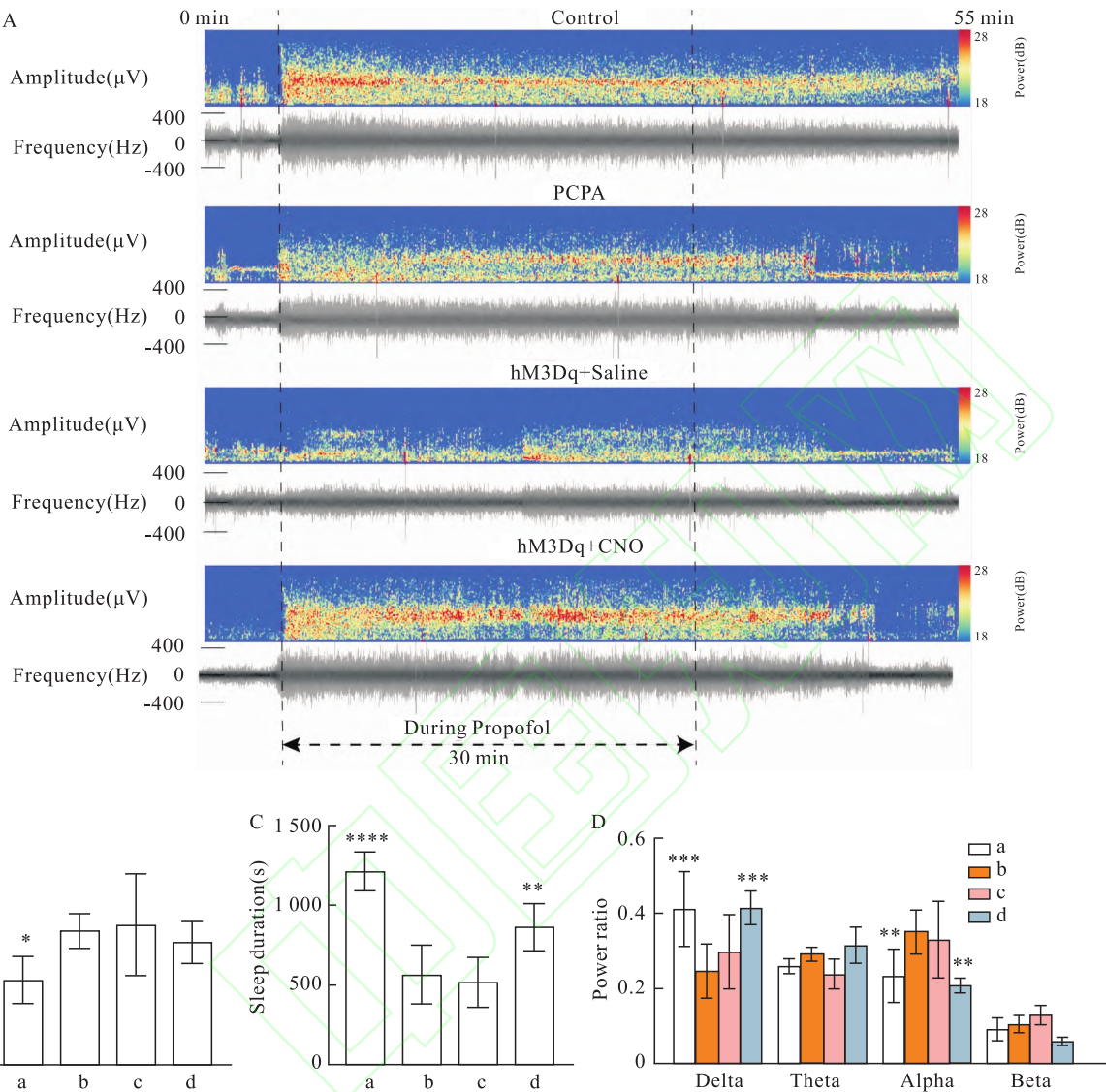


图 5 化学激活 PCPA 失眠模型大鼠 DRN 区 5-HT 神经元促进睡眠

Fig. 5 Chemical activation of DRN 5-HT neurons to promote sleep in PCPA insomniac rats

A: Schematic representation of the time-frequency of each group; B,C: Statistical charts of each group; D: EEG analysis of each group; a: Control group; b: PCPA group; c: hM3Dq + Saline group; d: hM3Dq + CNO group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs PCPA group.

弱^[13]。本研究表明通过化学遗传学激活 DRN 区 5-HT 神经元,可延长 PCPA 模型大鼠丙泊酚诱导的睡眠时间,改善失眠大鼠的睡眠质量。

同时 5-HT 系统异常与焦虑、抑郁等情绪障碍的发生密切相关。有研究^[14]表明激活高度焦虑状态下的 DRN 的 5-HT 神经元,可通过作用于终纹床核(the bed nucleus of the stria terminalis, BNST)的 5-HT1ARs 减少焦虑样行为,表现出抗焦虑效应。失眠患者往往伴随程度不等的焦虑症状,而失眠伴焦虑的患者中,其睡眠障碍会进一步加剧焦虑,同样焦虑也会降低睡眠质量加重失眠,进而引发失眠和焦

虑的恶性循环^[15]。焦虑作为失眠患者常见的共患病,其与失眠存在共同的病理生理机制,在临床上常作为“共病”进行“同治”^[16]。本研究通过旷场实验及高架十字迷宫实验,结果显示,化学遗传学激活 DRN 区 5-HT 神经元增加了 PCPA 失眠模型大鼠进入旷场中心区域和高架十字迷宫开放臂的次数及停留时间,缓解了 PCPA 失眠模型大鼠的焦虑水平。这表明激活 DRN 区 5-HT 能神经元可以同时改善 PCPA 失眠模型大鼠的睡眠状况及其对应的焦虑水平,打破失眠-焦虑-加剧失眠这一恶性循环,能够有效的改善睡眠及心理生理状态,为失眠焦虑共患

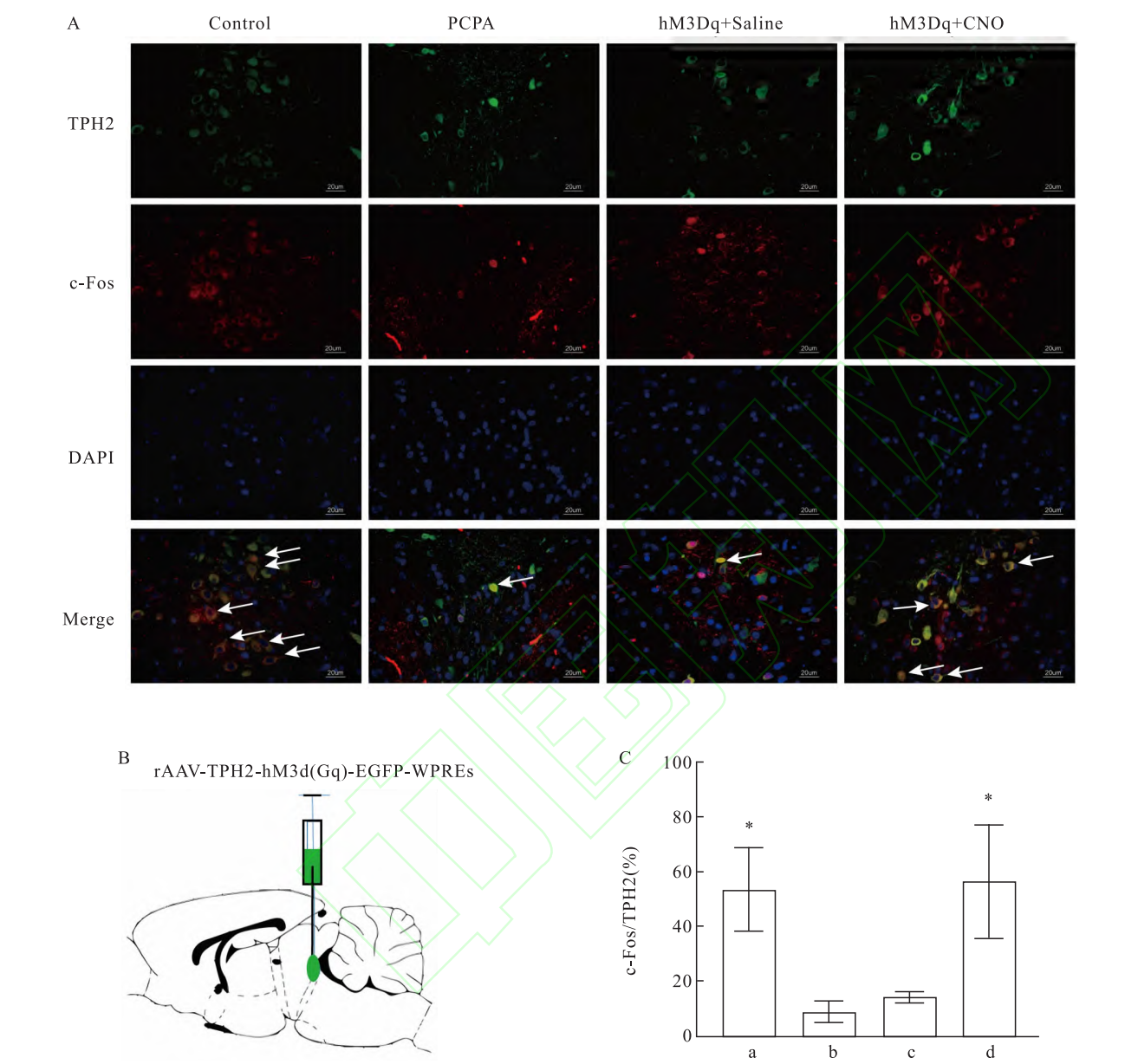


图6 c-Fos 蛋白表达荧光染色
Fig.6 Fluorescence staining of c-Fos protein

A: Immunofluorescence staining images of each group $\times 400$; B: Schematic of chemical genetics virus injection; C: Statistical analysis of c-Fos expression levels; a: Control group; b: PCPA group; c: hM3Dq + Saline group; d: hM3Dq + CNO group; * $P < 0.05$ vs PCPA group.

病的研究提供依据。另外,hM3Dq + CNO 组与 Control 组相比较焦虑水平仍然较高,睡眠时间稍短,这可能与 PCPA 造模后大鼠脑内 5-HT 的含量整体降低有关^[17]。

然而,DRN 区 5-HT 神经元的具体机制与神经递质、神经受体以及神经环路有着错综复杂的联系,尽管该研究从神经生理学特征对单个核团神经元进行调控,但缺乏对上下游神经环路的进一步探索。在后续研究中,将更深入和全面的探究 DRN 区 5-

HT 神经元上下游环路对失眠与焦虑共病的神经调控机制。

综上所述,该研究通过化学遗传学技术结合免疫荧光 c-Fos 和在体脑电技术以及行为学方法,发现化学激活 DRN 区 5-HT 神经元可以改善 PCPA 失眠大鼠的焦虑水平,增加其睡眠时长,表明 DRN 区 5-HT 神经元在焦虑与失眠共患病的治疗中可能发挥重要作用,为今后失眠与焦虑共患病的临床治疗及基础研究提供新思路。

参考文献

- [1] Riemann D, Benz F, Dressle R J, et al. Insomnia disorder: state of the science and challenges for the future[J]. J Sleep Res, 2022, 31(4): e13604. doi:10.1111/jsr.13604.
- [2] 杜宏梅, 崔杨凤, 陈明. 急性睡眠剥夺调控 AMPK-自噬信号致小鼠抑郁样行为机制[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1737–42. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.10.022.
- [2] Du H M, Cui Y F, Chen M. Acute sleep deprivation leads to depression-like behavior by modulating AMPK-autophagy signaling[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(10): 1737–42. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.10.022.
- [3] Schaedel Z, Holloway D, Bruce D, et al. Management of sleep disorders in the menopausal transition[J]. Post Reprod Health, 2021, 27(4): 209–14. doi:10.1177/205336912111039151.
- [4] Yuan X S, Xiang Z, Jiang J B, et al. Leptin receptor neurons in the ventral premammillary nucleus modulate emotion-induced insomnia[J]. Cell Discov, 2024, 10: 59. doi:10.1038/s41421–024–00676–x.
- [5] Borrás S, Martínez-Solís I, Ríos J L. Medicinal plants for insomnia related to anxiety: an updated review[J]. Planta Med, 2021, 87(10–11): 738–53. doi:10.1055/a–1510–9826.
- [6] Venner A, Broadhurst R Y, Sohn L T, et al. Selective activation of serotonergic dorsal raphe neurons facilitates sleep through anxiolysis[J]. Sleep, 2020, 43(2): zsz231. doi:10.1093/sleep/zsz231.
- [7] Yu Q, Wang Y, Gu L, et al. Dorsal raphe nucleus to basolateral amygdala 5-HTergic neural circuit modulates restoration of consciousness during sevoflurane anesthesia[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 176: 116937. doi:10.1016/j.biopha.2024.116937.
- [8] 龙忠芳, 刘程曦, 喻田. 中缝背核 5-羟色胺能神经通路功能研究进展[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(2): 197–200. doi:10.16571/j.cnki.1008–8199.2020.02.018.
- [8] Long Z F, Liu C X, Yu T. The research of serotonergic pathway function of dorsal raphe nucleus[J]. J Med Postgrad, 2020, 33(2): 197–200. doi:10.16571/j.cnki.1008–8199.2020.02.018.
- [9] Shi L, Lu Z A, Que J Y, et al. Prevalence of and risk factors associated with mental health symptoms among the general population in China during the coronavirus disease 2019 pandemic[J]. JAMA Netw Open, 2020, 3(7): e2014053. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.14053.
- [10] Jacobs B L, Azmitia E C. Structure and function of the brain serotonin system[J]. Physiol Rev, 1992, 72(1): 165–229. doi:10.1152/physrev.1992.72.1.165.
- [11] Okaty B W, Commons K G, Dymecki S M. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system[J]. Nat Rev Neurosci, 2019, 20(7): 397–424. doi:10.1038/s41583–019–0151–3.
- [12] Garcia-Garcia A L, Soiza-Reilly M. Serotonin subsystems modulate diverse and opposite behavioral functions[J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(7): 3061–3. doi:10.1021/acchemneuro.8b00534.
- [13] Oikonomou G, Altermatt M, Zhang R W, et al. The serotonergic raphe promote sleep in zebrafish and mice[J]. Neuron, 2019, 103(4): 686–701.e8. doi:10.1016/j.neuron.2019.05.038.
- [14] Garcia-Garcia A L, Canetta S, Stujenske J M, et al. Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT1A receptor-dependent manner[J]. Mol Psychiatry, 2018, 23(10): 1990–7. doi:10.1038/mp.2017.165.
- [15] Chellappa S L, Aeschbach D. Sleep and anxiety: from mechanisms to interventions[J]. Sleep Med Rev, 2022, 61: 101583. doi:10.1016/j.smrv.2021.101583.
- [16] 王玉平, 汪凯, 潘集阳, 等. 中国成人失眠伴抑郁焦虑诊治专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2020, 53(8): 564–74. doi:10.3760/cma.j.cn113694–20190701–00398.
- [16] Wang Y P, Wang K, Pan J Y, et al. Expert consensus on the diagnosis and treatment of insomnia with depression and anxiety in Chinese adults[J]. Chin J Neurol, 2020, 53(8): 564–74. doi:10.3760/cma.j.cn113694–20190701–00398.
- [17] 龙盼, 胡晓霞, 胡琦兰, 等. 天麻素对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠小鼠的镇静催眠作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 33–8. doi:10.13412/j.cnki.zyyl.2021.05.007.
- [17] Long P, Hu X X, Hu Q L, et al. Sedative and hypnotic effects of gastrodin on PCPA-induced insomnia mice[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(5): 33–8. doi:10.13412/j.cnki.zyyl.2021.05.007.

Effects of dorsal raphe 5-hydroxytryptamine neurons on sleep quality and anxiety-like behavior in PCPA insomnia model rats

Li Quntao^{1,2,3}, Du Tongyu^{1,2,3}, Jia Lei^{1,2,3}, Yin Jiangwen^{2,3}, Li Yan^{2,3}

(¹Dept of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University,

²NHC Key Laboratory of Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases,

³Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the selective activation of 5-hydroxytryptamine neurons (DRN5-HT) in the dorsal raphe nucleus of rats with insomnia induced by p-chlorophenylalanine (PCPA) using chemical genetics tech-

niques, and to explore whether it has a regulatory effect on comorbidities of insomnia and anxiety. **Methods** 32 male SD rats were randomly divided into control group, PCPA model group (PCPA group), chemical activation group (hM3Dq + CNO group), and chemical control group (hM3Dq + Saline group). The anxiety level of experimental rats was evaluated through open field experiments and elevated cross maze experiments. *In vivo* electroencephalography (EEG) was used to record propofol induced sleep and cortical EEG changes, and immunofluorescence staining was used to observe changes in c-Fos positive protein expression in 5-HT neurons. **Results** The behavioral results showed that compared with the chemical control group, the anxiety level of the chemical activation group was significantly lower ($P < 0.05$), and sleep duration was significantly prolonged ($P < 0.05$). The expression level of c-Fos positive protein in DRN5-HT neurons in the chemical activation group was higher ($P < 0.05$). The EEG results showed that the percentage of δ -band power between the chemical activation group and the chemical control group was higher ($P < 0.05$), the power percentage in the α -band was relatively low ($P < 0.05$). **Conclusion** Chemical activation of 5-HT neurons in the DRN region can improve anxiety levels and increase sleep duration in PCPA induced insomnia rats.

Key words 5-hydroxytryptamine; dorsal raphe; chemical genetics; insomnia; anxiety; rat

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82360242, 81860209); Scientific Research Project of Shihezi University (No. ZZZC2022082)

Corresponding author Li Yan, E-mail: 1249623003@qq.com

(上接第 696 页)

histone H3 (H3K27me3) axis in the dedifferentiation of thyroid cancer and its clinical value as a potential target for the treatment of anaplastic thyroid cancer (ATC). **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of EZH2, H3K27me3, paired box gene 8 (PAX8), thyroglobulin (TG) and thyroid transcription factor 1 (TTF1) in ATC and papillary thyroid carcinoma (PTC) and their adjacent tissues. The relationship between EZH2 and thyroid differentiation markers (PAX8, TTF1, TG) was further analyzed by gene expression omnibus (GEO) database. ATC cell lines 8305C and BHT-101 were cultured *in vitro*. Real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of thyroid differentiation markers (TTF1, PAX8) mRNA in ATC cell lines treated with EZH2 inhibitor (GSK126), and evaluate the potential therapeutic effect of GSK126 *in vitro*. The effects of GSK126 and BRAF inhibitor vemurafenib on the proliferation of ATC cell lines were observed by cell proliferation assay. **Results** The expression of EZH2 in ATC tissues was significantly higher than that in papillary thyroid carcinoma and adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of H3K37me3 in ATC tissues was significantly lower than that in PTC tissues ($P < 0.05$). EZH2 was negatively correlated with PAX8 and TG expression levels, but not with TTF1 expression level. *In vitro* experiments, GSK126 could reverse the expression of thyroid differentiation markers PAX8 and TTF1 in ATC cell lines. GSK126 combined with BRAF inhibitor vemurafenib could significantly inhibit the growth of ATC cell lines. **Conclusion** The EZH2-H3K27me3 axis plays an important role in regulating thyroid specific markers, and the inhibition of EZH2 by small molecular compounds is a promising target for ATC treatment in the future.

Key words EZH2; H3K27me3; anaplastic thyroid cancer; dedifferentiation; methylation; GSK126

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 81902382)

Corresponding author Chen Dan, E-mail: chendan78@dmu.edu.cn