DOI:10.16016/j.2097-0927.202312020

内侧前额叶皮质谷氨酸能神经元参与 CD1 小鼠攻击行为的机制研究

李加欣[1],黄 露[1],龙宗泓[1],张 敏[1],温惠中[2],熊 鹰[2],李 洪[1],白福海[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):第二附属医院麻醉科[1],基础医学院神经生物教研室[2]

[**摘要**] **目的** 研究 CD1 小鼠发动攻击行为的内在神经机制。**方法** 通过驻地入侵实验筛选出具有攻击行为的 CD1 小鼠,攻击配对偏好进一步验证后使用 c-Fos 标记全脑激活的脑区,通过免疫荧光双标实验分析攻击行为激活了哪种类型的神经元,最后使用光遗传学调控该类神经元的活性,观察其对攻击行为的影响。**结果** 通过 c-Fos 筛选,约 82%的 CD1 小鼠表现出攻击行为;攻击行为发生后主要激活内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex, mPFC),免疫荧光双标结果显示 mPFC 脑区 c-Fos 阳性神经元主要是谷氨酸能神经元;最后,我们通过光遗传激活 mPFC 脑区谷氨酸能神经元,发现其能够抑制 CD1 小鼠的攻击行为;相反,光遗传抑制 mPFC 脑区谷氨酸能神经元,能够促进 CD1 小鼠的攻击行为。**结论** mPFC 脑区谷氨酸能神经元是调控 CD1 小鼠发动攻击行为的重要组成部分。

[**关键词**] mPFC;谷氨酸能神经元;攻击行为

[**中图法分类号**] R338.12; R338.6; R394.1 [**文献标志码**] A

Mechanism of glutaminergic neurons in medial prefrontal cortex involved in aggressive behavior of CD1 mice

LI Jiaxin[1], HUANG Lu[1], LONG Zonghong[1], ZHANG Min[1], WEN Huizhong[2], XIONG Ying[2], LI Hong[1], BAI Fuhai[1]

[1]Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the intrinsic neural mechanism of aggressive behavior in CD1 mice. **Methods** CD1 mice with aggressive behavior were screened out by resident intruder test. After the aggressive conditioned pair preference was further verified, the activated brain regions of the whole brain were labeled with c-Fos, and the types of neurons activated by the aggressive behavior were analyzed by double immunofluorescence labeling. Finally, the effects of activity of these neurons regulated by optogenetics on aggressive behavior were observed. **Results** The c-Fos screening revealed that about 82% of the CD1 mice showed aggressive behavior. After the occurrence of aggressive behavior, the main activation occured in the medial prefrontal cortex (mPFC), and the results of immunofluorescence double labeling showed that the c-Fos positive neurons in the mPFC were mainly glutamatergic neurons. Finally, glutamatergic neurons in the mPFC could be activated by optogenetics, and the activation inhibited the aggressive behavior of CD1 mice. In contrast, optogenetics could inhibit glutamatergic neurons in the mPFC and then promote the aggressive behavior of CD1 mice. **Conclusion** Glutamatergic neurons in the mPFC are an important component in the

[**基金项目**] 国家自然科学基金(82101273,82171265),中国博士后面上项目(2021M693936),重庆市博士后科学基金项目(cstc2021jcyj-bshX0071),陆军军医大学科技创新能力提升专项(2021XQN19),陆军军医大学第二附属医院青年博士人才孵化计划(2023YQB007),重庆市博士后研究项目特别资助(2022CQBSHTB3021)。

[**通信作者**] 白福海,E-mail:bfh@tmmu.edu.cn;

李 洪,E-mail:lh78553@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

regulation of aggressive behavior in CD1 mice.

[**Key words**] medial prefrontal cortex; glutamatergic neurons; aggressive behavior

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82101273, 82171265), the General Project of Postdoctoral Research Foundation of China (2021M693936), the Project of Chongqing Postdoctoral Science Foundation (cstc2021jcyj-bshX0071), the Special Project of Science and Technology Innovation Capacity Promotion of Army Medical University (2021XQN19), the Incubation Project for Young Doctoral Talents of Second Affiliated Hospital of Army Medical University (2023YQB007) and the Special funding for Chongqing Postdoctoral Research Project(2022CQBSHTB3021). Corresponding author: BAI Fuhai, E-mail: bfh@tmmu.edu.cn; LI Hong, E-mail: lh78553@tmmu.edu.cn

攻击行为是一种高度保守的固有行为。尤其在动物界,攻击行为主要用来捕食、获取交配权、保护后代和守卫领地。因此,攻击行为对于生物个体的存活乃至种群的繁衍都至关重要。在人类社会中攻击行为也是无处不在,这种行为一旦失控,例如精神分裂症、间歇性爆发性障碍和自闭症患者,其结果可能给个人、家庭乃至整个社会带来灾难性后果。尽管不同物种之间的攻击方式不同,但是攻击行为的内在调控机制在进化过程中得到高度保守遗传。种种迹象表明,攻击行为是内在神经活动的外在表征,它是基因、特定类型细胞、神经环路以及脑区对外界环境做出反应的综合结果呈现[1]。

前额叶皮质(mPFC)在社会竞争、情绪控制和组织协调等高级脑功能中扮演着非常重要的角色[2-5]。它能够自上而下(top-down)投射到中缝背核、腹侧被盖区和下丘脑等区域,并且能够释放谷氨酸、γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)和五羟色胺等多种神经递质发挥调控作用。“Top-down”是包括攻击行为在内的众多行为发生的重要调控方式[6]。在人类,mPFC 发生病变已被证实会导致冲动和反社会行为的发生[7]。通过脑断层扫描成像发现,控制人类攻击行为的神经环路与控制动物攻击行为的神经网络有一些相同之处[8]。近期有研究表明,攻击小鼠 mPFC 脑区的 GABA 能神经元活性有所下降[6],提示其对周围椎体神经元和下游脑区的控制力减弱。尽管这些结果表明 mPFC 脑区在攻击行为中兴奋性发生了变化,但是其在调控攻击行为中的作用及具体是哪种类型神经元发挥了作用尚不十分清楚。

c-Fos 是反应神经元兴奋性的一个早期标记物[9],前期在大鼠的研究中发现,攻击行为会引起 mPFC 脑区 c-Fos 表达增加,这提示 mPFC 脑区至少在攻击行为中扮演了某种不可忽视的作用。本研究通过全脑筛选,结合免疫荧光双标技术探索 CD1 小鼠在攻击行为发动后主要激活的脑区及神经元类型,继而通过光遗传学技术调控该脑区的特异神经元活性,揭示其在攻击行为中的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 12 周龄,体重为 30~35 g 的雄性 CD1 小鼠和 22~26 g 的雄性 C57BL/6J 小鼠,自由进水食,动物房控制在(21±2) ℃,湿度 60%~70%,每 12 小时昼夜循环(08:00-20:00)。以上动物由北京维通利华实验动物技术有限公司(CD1)和陆军军医大学实验动物中心(C57)提供,符合国家级动物标准。所有操作流程符合陆军军医大学实验动物伦理审查委员会审查标准(伦理号:AMUWEC20234507)。

1.1.2 试剂和仪器 c-Fos(购买于英国 Abcam 公司),Vglut2 和小鼠抗兔 GABA 抗体(购买于美国 sigma 公司),山羊抗兔 488 二抗、山羊抗小鼠 594 二抗以及 DAPI(购买于中国 Abkine 公司),AAV2/9-mCaMKIIa-hChR2(H134R)-mCherry-ER2-WPRE-pA,AAV2/9-mCaMKIIa-eNpHR 3.0-EGFP-WPRE-pA(以上病毒均购买于上海泰尔图生物有限公司),荧光显微镜,全玻片扫描仪,共聚焦显微镜,跳线,陶瓷插芯,473-蓝光激发器,589-黄光激发器。

1.2 实验方法

1.2.1 驻地入侵实验 分别将一只雄性和一只雌性 CD1 小鼠配对饲养一周,使该小鼠建立领地意识。正式实验开始时,拿出雌性 CD1 小鼠,然后将野生型 C57 小鼠作为入侵小鼠放入 CD1 小鼠笼内,实验在上午 9 点到 12 点间进行。将笼顶喂食饮水装置更换为透明有机玻璃,使用摄像头拍摄两只小鼠活动情况,记录时间为 10 min。攻击行为分析采用盲法,即由一名不知情的人员对动物攻击行为进行统计分析。攻击行为定义为驻地小鼠(CD1 小鼠)发起的第一次明显的身体对抗性行为,主要包括:①撕咬:例如咬击对方的背部、侧面或脖子;②身体攻击:使用前爪推挤或拍打对手或使用身体冲撞或推搡对手;③追逐:追赶入侵者或竞争对手,尝试赶走他们,不包括理毛或追逐行为[10-13]。当驻地老鼠在攻击开始后远离入侵者时,攻击行为认定结束。如果驻地小鼠在整个攻击过程中始终朝向入侵小鼠,尽管两只小鼠物理接触略微中断

(小于5 s)仍被定义为一次攻击行为[12-13]。统计分析的数据包括①攻击潜伏期,即C57小鼠放入后,CD1小鼠开始发动攻击的时间;②攻击发生的次数;③攻击持续的时间;④追逐时间;⑤追逐次数。当入侵小鼠出现任何受伤迹象,当立即停止实验。

1.2.2 攻击配对偏好实验 攻击配对偏好实验包括3部分:测量基础值,习得训练和最终测试。在实验开始前,小鼠在测试装置上适应1 h,实验过程均在安静环境和红外光下完成,攻击配对偏好的实验装置由两个独特的小室组成,中间有一个中性区域,允许小鼠在每次试验开始时自由地进入任意小室。在测量基础值阶段,将小鼠放入装置的中间室,并允许自由探索该装置20 min。习得训练阶段由连续3 d组成,每天进行两次训练,总共进行六次习得训练。上午试验(8:00至12:00)和下午试验(14:00至18:00),包括将CD1小鼠单独限制在一个小室10 min,或将CD1与C57BL/6 J关在一个小室内。对入侵者配对和入侵者未配对都进行了3次适应。在测试当天,实验CD1小鼠被放置在中间区域,允许小鼠在装置中自由探索20 min。通过分析小鼠活动轨迹计算2个指标:①标准化攻击配对偏好值:计算测试当日CD1小鼠在配对小室中停留时间除以该小鼠在配对小室中的基线停留时间;②攻击配对偏好差值:测试阶段小鼠在配对室中停留时间减去在非配对室中停留时间[6]。

1.2.3 ELISA实验 据文献报道,攻击行为发生后15 min到24 h,其血清睾酮和皮质酮等激素水平都会发生显著改变[4-7]。为了同时满足采血和获取脑组织样本的实验需求,我们选择在攻击性小鼠筛选后2 h从小鼠颈静脉处取血。根据ELISA试剂盒操作说明,检测血清睾酮(Abnova,大/小鼠睾酮ELISA试剂盒)和皮质酮(Abnova,大/小鼠皮质酮ELISA试剂盒)水平。首先将血液收集在血清分离管中,使其在室温下静置30 min,然后以1 000转/min离心15 min并冷冻(-20 ℃)储存直至分析。睾酮测定最小可检测剂量范围为0.066 ng/mL,血清皮质酮最小可检测剂量范围为6.1 ng/mL,满足本次实验可检测到的范围。

1.2.4 免疫荧光实验 攻击行为发生后2 h进行免疫荧光实验,配置多聚甲醛和生理盐水,4 ℃避光预冷的备用;然后使用5%戊巴比妥钠将小鼠深麻醉后,待小鼠体动反应消失后取仰卧位固定于灌注台上。使用剪刀小心剪开胸腔,充分暴露心脏后,先快速灌注100 mL预冷的生理盐水,然后快速灌注50 mL多聚甲醛,此过程中动物逐渐变得僵硬,表明灌注成功;取材:灌注成功后用剪刀剪下小鼠头颅,剪开颅骨,仔细分离出完整脑子。以上所有操作都在冰上完成;固定:将取出的脑组织放入标记好分组的盛有4%多聚甲醛的10 mL EP管中,进行固定2 h;脱水:使用PBS缓冲液配制20%和30%蔗糖溶液,先将脑组织放入20%、30%蔗糖溶液脱水,待脑组织后沉底后可取出进行切片;包埋:将脑组织小脑和脑干后部分切除,然后垂直放置于冻台上(头端朝上),用包埋剂包埋好组织后放入切片机内冷冻(-22 ℃)30 min;切片:用薄刀片沿脑冠状面,设定切片机切片厚度为40 μm,切下的脑片放到提前配制好的PBS溶液里备用;洗涤:染色前使用PBS洗涤3遍,每遍5 min,目的是去除包埋剂;破膜:将脑片放入0.3% Triton X-100破膜1 h;封闭:使用10%山羊血清室温封闭1 h;孵育一抗:封闭期间配制一抗,多克隆兔抗c-Fos(1∶1 000),多克隆小鼠抗Vglut2(1∶500),多克隆小鼠抗GABA(1∶1 000);封闭完成后将不同分组的脑切片放入配置好的一抗内,4 ℃过夜;孵育二抗:去掉一抗,PBS缓冲液洗涤3次,每次10 min,吸干液体,加入二抗(488山羊抗小鼠lgG,1∶500;594山羊抗兔lgG,1∶500),常温避光孵育2 h;封片:二抗孵育完成后PBS洗涤3次,每次10 min,最后用防荧光淬灭剂进行封片,共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.5 立体定位和病毒注射 使用5%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉动物,待小鼠体动反应消失,使用镊子将动物下颌打开后,将上门齿放置在门齿杆前端的门齿孔内,确保鼠齿放置位置正确后,通气面罩移动罩住动物口鼻将固定螺丝旋紧,术中通气面罩持续给氧。暴露Bregma点:将氯霉素眼膏涂在动物双眼以保护眼睛;测平:检测颅骨是否水平,首先确定Bregma点,然后检测Bregma点左右两侧2 mm,以及Bregma点和Lambda点的颅骨是否处于同一水平面,如果颅骨未放置水平,可以通过立体定位仪下方的旋转底座,在前后、左右两个维度上调节立体定位仪进而将动物颅骨调整水平;mPFC定位:Bregma点+2.3 mm,旁开±0.3 mm,深度为-2 mm;注射:缓慢匀速(100 nL/4 min)注射病毒进入脑组织,共注射100 nL;注射过程观察液体平面是否有下移,确保病毒注入脑内;蓝光激活的病毒为:AAV2/9-mCaMKIIa-hChR2(H134R)-mCherry-ER2-WPRE-pA;黄光激活的病毒为:AAV2/9-mCaMKIIa-eNpHR 3.0-EGFP-WPRE-pA;留针:注射完毕后将玻璃电极留置10 min,然后缓慢匀速退针;缝合:使用棉签将伤口处血迹擦拭干净,颅骨表面敷一层氯霉素软膏,然后将两侧皮肤整齐缝合;苏醒:将动物放入暖箱,等待苏醒后放入动物房饲养。

1.2.6 光遗传学实验 所有实验小鼠在实验前一周,需要带上跳线进行适应,每次适应时间为1 h,适应

期间不打开光源。正式试验时蓝光刺激激活 hChR2,光纤连接通过 FC/PC 接口与 473 nm 波长激光发射器,蓝光刺激参数为脉冲宽度:20 ms,频率:20 Hz,能量:10 mW,10 s 开/5 s 关循环,共持续 3 min。黄光刺激激活 eNpHR 3.0,光纤连接通过 FC/PC 接口与 589 nm 波长激光发射器,黄光刺激参数为脉冲宽度:20 ms,频率:20 Hz,能量:15 mW,10 s 开/5 s 关循环。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.3 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料两样本比较使用独立 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 攻击性 CD1 小鼠筛选及行为验证

总共 45 只 CD1 小鼠,雌雄配对后饲养 1 周,通过驻地入侵实验(图 1A),筛选出有攻击行为的小鼠(aggressors,AGGs)37 只,占 82%;剩余 8 只小鼠没有攻击行为(non-aggressors,NONs)占 18%(图 1B)。AGGs 组小鼠的攻击潜伏期约为 70 秒,显著短于 NONs 组小鼠($P<0.001$,图 1C)。此外,AGGs 小鼠攻击次数、攻击时间、追逐次数和追逐时间都要显著长于 NONs($P<0.001$,图 1D-G)。我们还检测了两组小鼠的皮质酮和睾酮水平,发现 AGGs 组小鼠皮质酮水平显著低于 NONs 组小鼠($P<0.01$,图 1H),而睾酮的水平显著高于 NONs 组小鼠($P<0.01$,图 1I),这个结果说明 AGGs 小鼠在与入侵小鼠共处一室时占据主导地位。

此外,为了进一步佐证 CD1 小鼠的攻击性,我们又采用了攻击配对偏好的行为学范式进行研究(图 1J)。为排除小鼠自身偏好,我们进行了标准化分析,即用测试阶段小鼠在配对小室中停留时间除以该小鼠在配对小室停留的基础值时间,并计算了测试阶段小鼠在配对室中的停留时间与非配对室中停留时间的差值,这些结果都证实 AGGs 小鼠在配对小室停留时间显著长于 NONs($P<0.01$,图 1K、1L)。以上结果都表明,AGGs 小鼠更喜欢待在有外来 C57 小鼠的小室内,而 NONs 小鼠则更偏爱单独待在一个小室内(图 1M)。通过以上实验,筛选出了具有攻击性行为的 CD1 小鼠,以便开展后续的研究。

2.2 AGGs 小鼠的攻击行为主要激活 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元

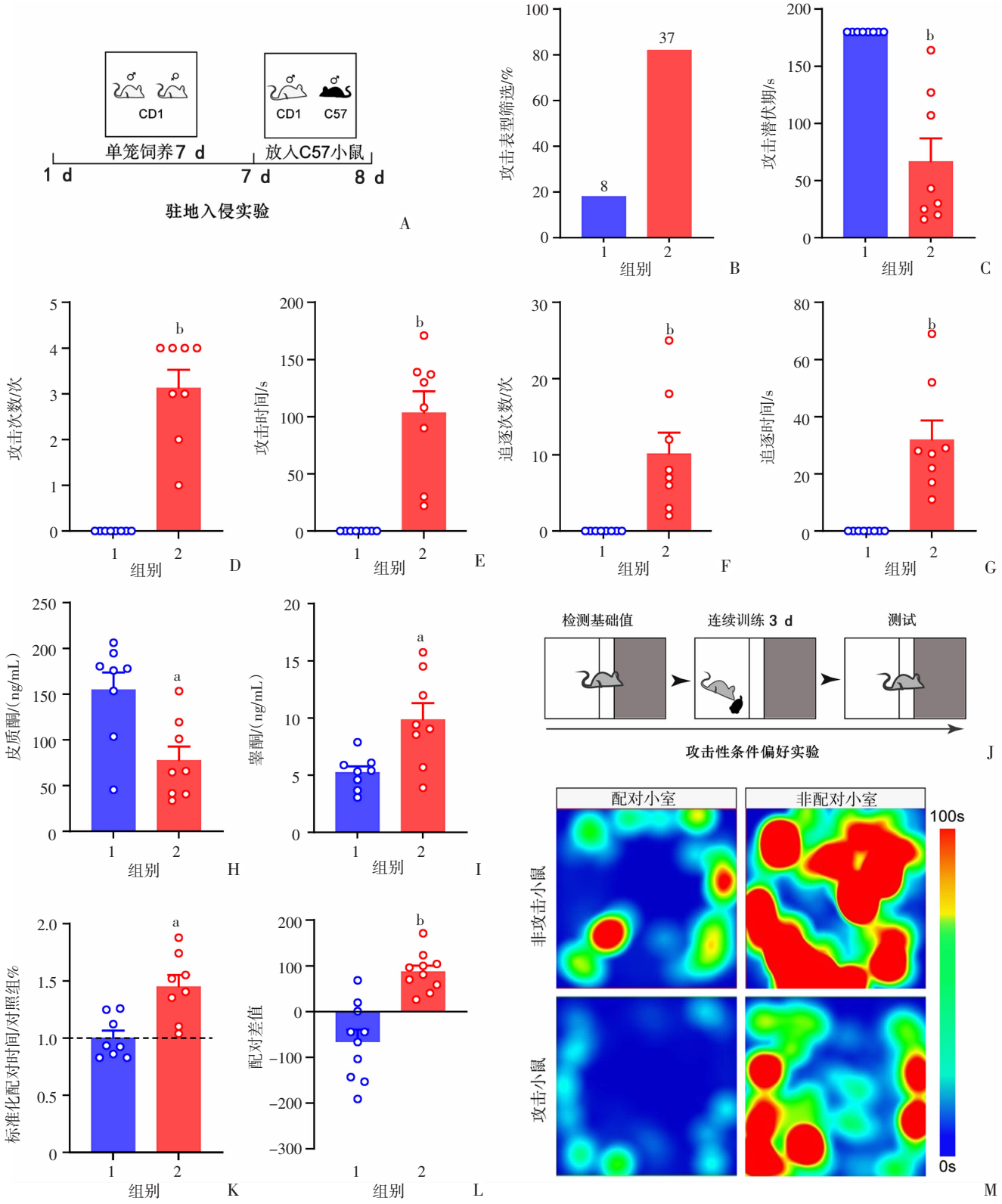
首先,通过全脑筛选,我们发现 AGGs 小鼠的 mPFC 脑区 c-Fos 表达明显增强(图 2A),这说明 CD1 小鼠的攻击行为激活了 mPFC 脑区。接着我们统计了该脑区谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元的数量及占比,发现谷氨酸能神经元约占 86.8%,而 GABA 能神经元约占 13.2%(图 2B)。在攻击行为发生后 2 h 取材,通过免疫荧光双标技术,我们分别标记了激活的(能与 c-Fos 共标)谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元(图 2C),统计结果表明,攻击行为激活的谷氨酸能神经元约占 58%,激活的 GABA 能神经元约占 16%(图 2D)。这些结果表明,攻击行为主要激活 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元,强烈提示 mPFC 脑区谷氨酸能神经元可能在 CD1 小鼠的攻击行为中发挥了某种重要作用。

2.3 mPFC 脑区谷氨酸能神经元影响 AGGs 小鼠的攻击行为

为了明确 mPFC 脑区谷氨酸能神经元是影响 CD1 小鼠攻击行为的关键因素,我们在双侧 mPFC 脑区注射 AAV-mCaMKIIa-ChR2-EGFP,AAV-mCaMKIIa-eNpHR-EGFP 以及空载体对照病毒(图 3A)。根据之前 c-Fos 表达情况,将光纤埋置在 mPFC 脑区位于边缘下区(infralimbic cortex,IL)和边缘前皮层(prelimbic cortex,PL)之间的位置(图 3B)。4 周后分别给予蓝光和黄光刺激,发现蓝光激活 mPFC 脑区谷氨酸能神经元后能显著增加 CD1 小鼠的攻击潜伏期($P<0.05$,图 3C),并缩短了小鼠的攻击时间($P<0.05$,图 3D),而黄光抑制 mPFC 脑区谷氨酸能神经元后明显降低 CD1 小鼠的攻击潜伏期($P<0.05$,图 3E),并延长了小鼠的攻击时间($P<0.05$,图 3F);黄光和蓝光对空载体对照病毒无显著影响。以上结果表明,mPFC 脑区谷氨酸能神经元在攻击行为中起着“刹车”作用。一旦“刹车”失灵,CD1 小鼠就会出现好斗的表型;相反,激活这个脑区的谷氨酸能神经元,则会出现攻击行为受抑的表现。

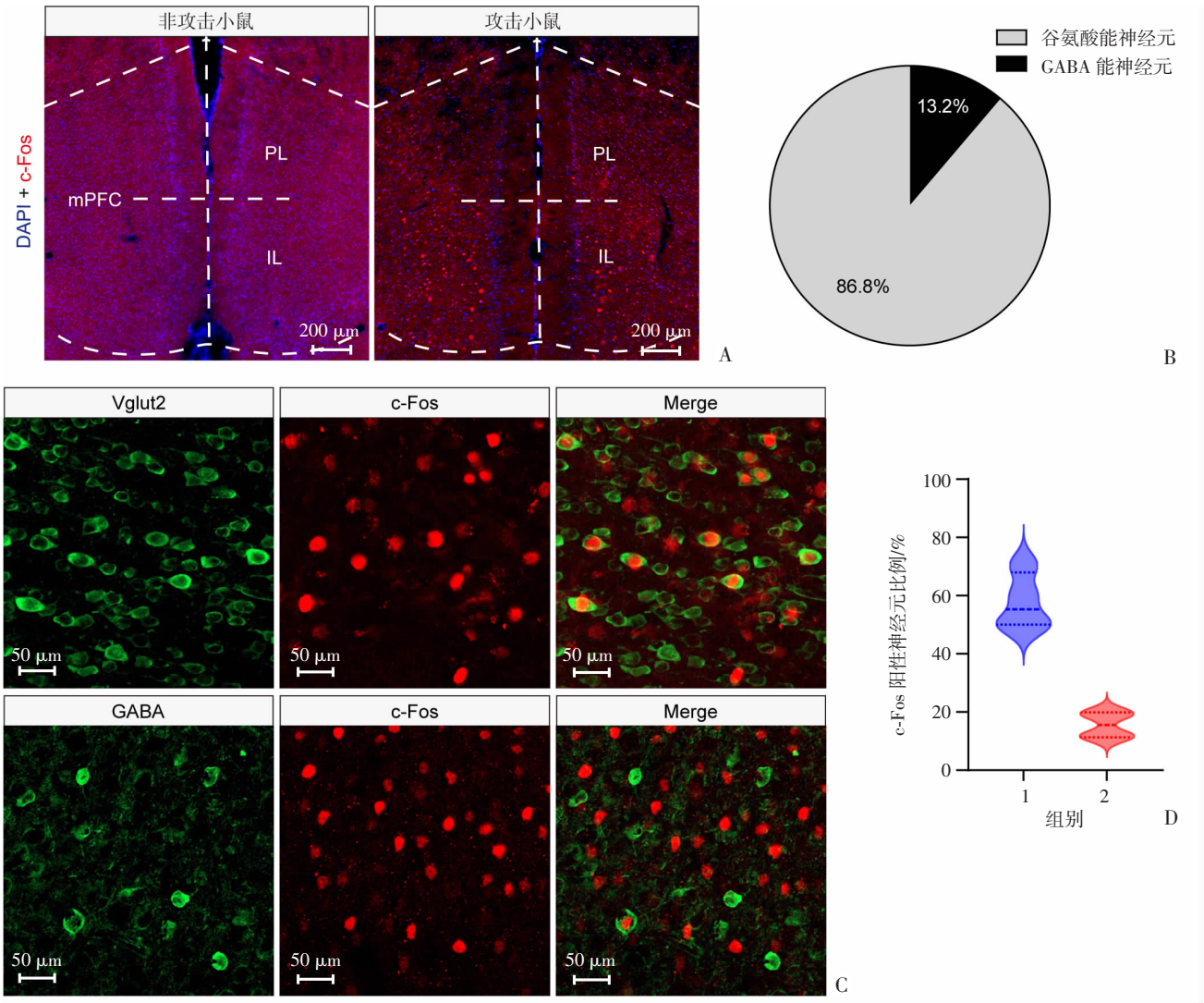
3 讨论

全球每年约有 143 万人死于暴力行为[14]。尽管暴力行为的发生原因复杂且形式多样,但还是以个体的攻击行为为主要表现形式。随着多年的持续深入研究,攻击行为发生的内在神经机制也逐渐浮出水面。以往的研究主要发现外界刺激首先激活丘脑、脑干等低级中枢,低级中枢会将这些信息上传至高级脑区(bottom-up “drive”),例如扣带回、前额叶皮质等脑区,这些驱动攻击行为信息在高级中枢加工整合处理后,通过“top-down”方式将高级脑区的综合“决策”发送至低级中枢(以抑制为主),决定最终的行为,即是否发动攻击行为[2,12,14-21]。以往的研究主要集中在“bottom-up”上行驱动攻击行为的研究,而“top-down”的研究相对较少,因此,就下行控制系统如何影响攻击行为还有待进一步深入探究。



A:驻地入侵实验示意图;B:攻击小鼠表型筛选;C:攻击潜伏期;D:攻击次数;E:攻击时间; F:追逐次数;E:追逐时间;H:血清中皮质酮水平;I:血清中睾酮水平;J:攻击配对偏好示意图;K:校正后小鼠在配对小室内停留时间比值;L:小鼠训练前后在配对小室内停留时间的差值;M:攻击小鼠与非攻击小鼠在配对小室及非配对小室的热图;1:NONs,非攻击小鼠;2:AGGs,攻击小鼠;a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 NONs 组相比较

图 1 攻击性 CD1 小鼠的筛选及验证

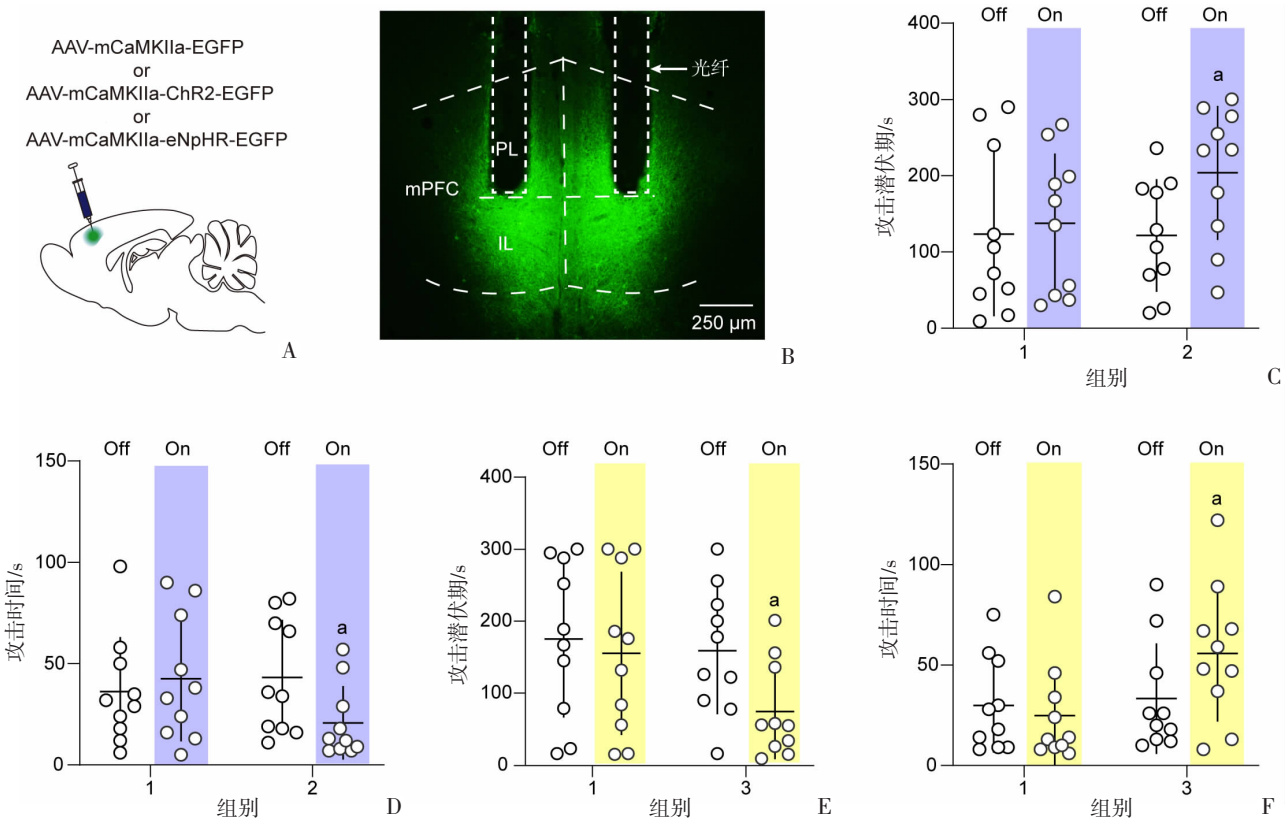


A:攻击行为后 mPFC 脑区 c-Fos 表达情况,红色为 c-Fos,蓝色为 DAPI;B:mPFC 脑区谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元占比;C:AGGs 小鼠 mPFC 脑区谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元与 c-Fos 共标情况;D:C 图的统计图;1:谷氨酸能神经元;2:GABA 能神经元;IL:infralimbic cortex 边缘下区;PL:prelimbic cortex,边缘前皮层;Vglut2: vesicular glutamate transporter 2,囊泡型谷氨酸转运蛋白 2,为谷氨酸能神经元标记物

图 2 AGGs 小鼠 mPFC 脑区谷氨酸能和 GABA 能神经元活性情况

本研究在明确 CD1 小鼠攻击表型的基础上,通过全脑筛选发现攻击行为引起 mPFC 脑区大量神经元激活,进一步分析发现被激活的神经元主要是谷氨酸能神经元。这强烈提示在前额叶皮质中谷氨酸能神经元可能通过“top-down”途径调节控制攻击行为的发生。接着,我们通过光遗传学手段调控 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元,证实激活该脑区的谷氨酸能神经元能够抑制攻击行为的发生;相反,抑制该脑区的谷氨酸能神经元能够促进攻击行为的发生。这些结果表明位于 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元具有“刹车”效应,生理状态下这种“刹车”机制有助于防止个体出现过度的激越行为;相反,病理状态下这种“刹车”机制失灵可能导致过度的攻击行为发生。

前期已有研究表明激活 mPFC 脑区神经元具有抑制攻击行为的作用[22],但该研究前期没有进行脑区筛选,直接聚焦 mPFC 的亚区:边缘前皮层(PL)和眶内皮层(medial orbital cortex,MO)。而我们的研究首先通过全脑 c-Fos 筛选出,发现攻击行为主要激活 mPFC 脑区的边缘下区(IL)(图 2A)。此外,跟这个研究一致的是,我们都关注了谷氨酸能神经元,我们是在鉴定了攻击行为主要激活哪种神经元(谷氨酸 *vs.* GABA)的基础上才开展的后续研究,而不仅仅是由于大脑皮层主要是由兴奋性神经元组成就去直接对其展开研究。综上,尽管我们的结论一致,但是我们研究的亚核团是不同的,且我们的实验设计思路有着显著的区别。



A:病毒注射示意图;B:光纤埋置验证;C:给予蓝光后小鼠的攻击潜伏期;D:给予蓝光后小鼠的攻击时间;E:给予黄光后小鼠的攻击潜伏期;F:给予黄光后小鼠的攻击时间;1:AAV-mCaMKIIa-EGFP;2:AAV-mCaMKIIa-ChR2-EGFP;3:AAV-mCaMKIIa-eNpHR-EGFP;a:$P<0.05$,与 off 组相比较

图 3 调控 mPFC 脑区谷氨酸能神经元影响 AGGs 小鼠的攻击行为

接着的问题是 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元是如何参与攻击行为的发生? mPFC 作为高级中枢,在社会竞争、组织协调、认知、情绪控制等高级功能执行中扮演着重要角色[5,13,23]。mPFC 的谷氨酸能神经元能够投射到导水管周围灰质、屏状核、腹侧被盖区、纹状体和杏仁核[24-25]等多个脑区。而导水管周围灰质、腹侧被盖区和杏仁核等脑区与攻击行为密切相关[26-28],说明攻击行为的发生可能是在 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元的投射调控下完成的。如果 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元功能异常,或者"top-down"途径受阻,导致下行控制系统失灵,可能会出现攻击行为增加的表型。前期本研究团队也发现,mPFC 脑区的 GABA 能神经元活性下降,导致下游外侧下丘脑的 orexin 能神经元去抑制,出现攻击行为增强的现象[6]。因此,我们认为不仅"bottom-up"上行驱动在攻击行为中扮演重要角色,"top-down"决策控制系统在生物个体实际有无发生攻击行为中也起着不可或缺的作用。

综上,我们揭示了 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元在调节 CD1 小鼠攻击性方面发挥着重要作用,其可能是通过"top-down"途径调控下游攻击相关脑区,最终决定是否发动攻击行为发生。未来还需继续探索 mPFC 脑区的谷氨酸能神经元下游投射核团以及与哪类神经元构成神经环路联系,从而进一步阐明攻击行为发生的内在神经机制。

参考文献:

[1] NIEDERKOFLER V, ASHER T E, OKATY B W, *et al*. Identification of serotonergic neuronal modules that affect aggressive behavior[J]. Cell Rep, 2016, 17(8): 1934-1949. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.063.

[2] PADILLA-COREANO N, BATRA K, PATARINO M, *et al*. Cortical ensembles orchestrate social competition through hypothalamic outputs[J]. Nature, 2022, 603(7902): 667-671. DOI: 10.1038/s41586-022-04507-5.

[3] WALL V L, FISCHER E K, BLAND S T. Isolation rearing attenuates social interaction-induced expression of immediate early gene protein products in the medial prefrontal cortex of male and female rats[J]. Physiol Behav, 2012, 107(3): 440-450. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.09.002.

[4] CARLÉN M. What constitutes the prefrontal cortex? [J].

Science, 2017, 358(6362): 478-482. DOI: 10.1126/science.aan8868.

[5] ZHOU T T, ZHU H, FAN Z X, *et al*. History of winning remodels thalamo-PFC circuit to reinforce social dominance [J]. Science, 2017, 357(6347): 162-168. DOI: 10.1126/science.aak9726.

[6] BAI F H, HUANG L, DENG J, *et al*. Prelimbic area to lateral hypothalamus circuit drives social aggression [J]. iScience, 2023, 26(10): 107718. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107718.

[7] ANDERSON S W, BECHARA A, DAMASIO H, *et al*. Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex[J]. Nat Neurosci, 1999, 2(11): 1032-1037. DOI: 10.1038/14833.

[8] NELSON R J, TRAINOR B C. Neural mechanisms of aggression[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(7): 536-546. DOI: 10.1038/nrn2174.

[9] JIANG-XIE L F, YIN L, ZHAO S, *et al*. A common neuroendocrine substrate for diverse general anesthetics and sleep[J]. Neuron, 2019, 102(5): 1053-1065.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.03.033.

[10] MICZEK K A, MAXSON S C, FISH E W, *et al*. Aggressive behavioral phenotypes in mice[J]. Behav Brain Res, 2001, 125(1/2): 167-181. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00298-4.

[11] KOOLHAAS J M, COPPENS C M, DE BOER S F, *et al*. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress[J]. J Vis Exp, 2013(77): e4367. DOI: 10.3791/4367.

[12] FLANIGAN M E, ALEYASIN H, LI L, *et al*. Orexin signaling in GABAergic lateral habenula neurons modulates aggressive behavior in male mice[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(5): 638-650. DOI: 10.1038/s41593-020-0617-7.

[13] GOLDEN S A, HESHMATI M, FLANIGAN M, *et al*. Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward[J]. Nature, 2016, 534(7609): 688-692. DOI: 10.1038/nature18601.

[14] SIEVER L J. Neurobiology of aggression and violence[J]. Am J Psychiatry, 2008, 165(4): 429-442. DOI: 10.1176/appi.ajp.2008.07111774.

[15] ZHU Z G, MA Q Q, MIAO L, *et al*. A substantia innominata-midbrain circuit controls a general aggressive response[J]. Neuron, 2021, 109(9): 1540-1553.e9. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.03.002.

[16] CHEN A X, YAN J J, ZHANG W, *et al*. Specific hypothalamic neurons required for sensing conspecific male cues relevant to inter-male aggression[J]. Neuron, 2020, 108(4): 763-774.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.08.025.

[17] BARBANO M F, WANG H L, ZHANG S L, *et al*. VTA glutamatergic neurons mediate innate defensive behaviors [J]. Neuron, 2020, 107(2): 368-382.e8. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.04.024.

[18] VAN HEUKELUM S, TULVA K, GEERS F E, *et al*. A central role for anterior cingulate cortex in the control of pathological aggression[J]. Curr Biol, 2021, 31(11): 2321-2333.e5. DOI: 10.1016/j.cub.2021.03.062.

[19] DE MOURA OLIVEIRA V E, LUKAS M, WOLF H N, *et al*. Oxytocin and vasopressin within the ventral and dorsal lateral septum modulate aggression in female rats[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2900. DOI: 10.1038/s41467-021-23064-5.

[20] LEE E H, PARK J Y, KWON H J, *et al*. Repeated exposure with short-term behavioral stress resolves pre-existing stress-induced depressive-like behavior in mice[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6682. DOI: 10.1038/s41467-021-26968-4.

[21] KARIGO T, KENNEDY A, YANG B, *et al*. Distinct hypothalamic control of same- and opposite-sex mounting behaviour in mice[J]. Nature, 2021, 589(7841): 258-263. DOI: 10.1038/s41586-020-2995-0.

[22] TAKAHASHI A, NAGAYASU K, NISHITANI N, *et al*. Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94657. DOI: 10.1371/journal.pone.0094657.

[23] SUN Q T, LI X N, REN M, *et al*. A whole-brain map of long-range inputs to GABAergic interneurons in the mouse medial prefrontal cortex[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(8): 1357-1370. DOI: 10.1038/s41593-019-0429-9.

[24] LIU W Z, ZHANG W H, ZHENG Z H, *et al*. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2221. DOI: 10.1038/s41467-020-15920-7.

[25] ANASTASIADES P G, CARTER A G. Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex[J]. Trends Neurosci, 2021, 44(7): 550-563. DOI: 10.1016/j.tins.2021.03.006.

[26] LEFLER Y, CAMPAGNER D, BRANCO T. The role of the periaqueductal gray in escape behavior [J]. Curr Opin Neurobiol, 2020, 60: 115-121. DOI: 10.1016/j.conb.2019.11.014.

[27] YANG B, KARIGO T, ANDERSON D J. Transformations of neural representations in a social behaviour network[J]. Nature, 2022, 608(7924): 741-749. DOI: 10.1038/s41586-022-05057-6.

[28] TAKAHASHI A, DURAND-DE CUTTOLI R, FLANIGAN M E, *et al*. Lateral habenula glutamatergic neurons projecting to the dorsal raphe nucleus promote aggressive arousal in mice[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 4039. DOI: 10.1038/s41467-022-31728-z.

(收稿:2023-12-05;修回:2024-01-18)

(编辑 邓强庭)