

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.11.002

腹侧被盖区多巴胺神经元全脑神经环路示踪*

李 龙¹ 王 丹² 赵广超² 曹淑梅^{1Δ}

(1 西安市第一医院麻醉科 陕西 西安 710002; 2 空军军医大学西京医院麻醉与围术期医学科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究小鼠中脑腹侧被盖区(VTA)多巴胺能神经元接受的全脑输入性上游投射及其输出性下游投射,解析其全脑上下游神经环路连接。**方法:**用立体定位仪将辅助病毒 AAV-EF1a-DIO-GT 和 AAV-EF1a-DIO-G 的混合液(1:1)注射到 DAT-cre 转基因小鼠的 VTA 脑区,2 周后将重组狂犬病毒 (RV)EnVA-RV-mCherry 微注射到 VTA 脑区,1 周后 RV 病毒完成逆向跨突触感染并充分表达荧光蛋白,全脑冰冻切片,用全自动扫描荧光显微镜全脑拍片。用立体定位仪将顺行示踪病毒 AAV-EF1a-DIO-GFP 微注射到 DAT-cre 转基因小鼠的 VTA 脑区,2 周后待病毒及荧光蛋白充分表达后,全脑冰冻切片,VTA 区脑片用 TH 抗体行免疫荧光染色,全自动扫描荧光显微镜全脑拍片。**结果:**狂犬病毒逆向跨单级突触示踪结果显示,全脑许多脑区核团神经元表达 RV 病毒携带的红色荧光蛋白,主要包括前脑皮层、纹状体、伏隔核、下丘脑视前区、外侧下丘脑、下丘脑室旁核、杏仁核、腹侧被盖区、黑质、中缝背核、臂旁核、缰核。顺行示踪病毒结果显示,表达绿色荧光蛋白的纤维投射主要集中在内侧前额叶皮层、纹状体、伏隔核、背外侧隔核、杏仁核、外侧下丘脑几个脑区。**结论:**VTA 多巴胺能神经元的上游输入性投射广泛的分布于全脑,包括前脑皮层、基底神经节区、下丘脑区、边缘系统、中脑的许多核团都向其发出纤维投射。VTA 多巴胺神经元的下游输出性投射主要集中在基底神经节的伏隔核和纹状体,内侧前额叶皮层及下丘脑也有一定投射。

关键词:腹侧被盖区;多巴胺;示踪;小鼠

中图分类号:R-33;Q42;Q593.2;R614.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)11-2008-06

Whole Brain Tracing of Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area*

LI Long¹, WANG Dan², ZHAO Guang-chao², CAO Shu-mei^{1Δ}

(1 Department of Anesthesiology, XI'AN NO.1 hospital, Xi'an, Shaanxi, 710002, China;

2 Department of Anesthesia and Peri-operative Medicine, Xijing hospital, Air Force military University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the whole brain input and output projection of dopamine neuron in the ventral tegmental areal (VTA), analyse the whole brain upstream and downstream neural circuits connections. **Methods:** The mixture of helper viruses AAV-EF1a-DIO-GT and AAV-EF1a-DIO-G (1:1) was injected into the VTA of DAT-cre transgenic mice under stereotaxic apparatus. After two weeks, recombinant rabies virus (RV) EnVA-RV-mCherry was microinjected into VTA, One week later, the RV virus completed retrograde transsynaptic infection and fully expressed the fluorescent protein, prepare whole brain frozen section, scan the sections with an automatic scanning fluorescence microscope. The anterograde tracing virus AAV-EF1a-DIO-GFP was microinjected into the VTA of DAT-cre transgenic mice under stereotaxic apparatus. After two weeks, virus and fluorescent protein were fully expressed, prepare whole brain frozen sections, the sections containing VTA were immunofluorescence stained with (tyrosine hydroxylase)TH antibody, scan the sections with an automatic scanning fluorescence microscope. **Results:** RV retrograde transsynapse tracing results shows, the neurons expressed red fluorescent protein carried by RV virus distributed in many region of whole brain. Mainly includes the anterior cortex, striatum, nucleus accumbens(NAc), preoptic area of hypothalamus(POH), lateral hypothalamus(LH), paraventricular nucleus of hypothalamus(PVN), amygdala, ventral tegmental area(VTA), substantia nigra(SN), dorsal raphe(DR), parabrachial nucleus(PBN) and habenula (HB). Anterograde tracing results shows, the fibers expressing GFP were mainly concentrated in the medial prefrontal cortex (mPFC), striatum, nucleus accumbens(NAc), lateral septal nucleus(LS), amygdala, and lateral hypothalamus(LH). **Conclusion:** The upstream input projections of VTA dopamine neurons were widely distributed in the whole brain, including the anterior cortex, basal ganglia area, hypothalamus area, limbic system, and many nuclear in the midbrain. The downstream output projections of VTA dopamine neurons were mainly concentrated in the nucleus accumbens (NAc) and striatum of the basal ganglia, but also some projection in the medial prefrontal cortex(mPFC) and hypothalamus.

Key words: Ventral tegmental area; Dopamine; Tracing; Mouse

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q42; Q593.2; R614.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)11-2008-06

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(82101343);国家自然科学基金面上项目(82271211)

作者简介:李龙(1988-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:全麻机制,E-mail:dyyyll@126.com

Δ 通讯作者:曹淑梅(1976-),女,主任医师,主要研究方向:全麻药脑保护,E-mail:281494063@qq.com

(收稿日期:2023-02-28 接受日期:2023-03-10)

前言

腹侧背盖区(ventral tegmental area, VTA)是位于中脑的一个脑区,解剖上与黑质(substantia nigra, SN)和红核(red nucleus)临近,该区域主要由三类神经元构成,多巴胺能神经元、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能神经元和谷氨酸(glutamate, Glu)能神经元,多巴胺神经元是该区域的主要神经元,约占60%~65%^[1,2]。VTA是中枢神经系统内多巴胺合成和释放的两个主要区域之一,多巴胺(dopamine, DA)是大脑内古老而重要的单胺类神经递质,在运动、认知、情感、学习记忆、奖赏、觉醒等生理过程或行为方面都发挥着重要作用^[3,4]。多巴胺神经递质系统异常或功能障碍是许多中枢神经系统疾病发生发展的重要病因,像是帕金森、亨廷顿舞蹈病等疾病,都发现脑内多巴胺水平显著异常^[5,6]。

VTA作为脑内多巴胺神经元分布的主要区域,研究发现其参与了奖赏、厌恶、目标导向行为、睡眠觉醒、位置偏好、社交、麻醉觉醒、焦虑、抑郁等众多神经活动^[7,8]。多巴胺神经元众多的功能基础是其与大脑其它脑区广泛的上下游投射连接构成的神经环路。像是经典的VTA多巴胺神经元到伏隔核(NAc)的神经投射环路,是经典的奖赏系统,是发挥奖赏效应的重要通路^[9]。近年来发现的外侧缰核(lateral habenula, LHB)到VTA多巴胺神经元的投射环路在术后认知功能障碍(post operative cognitive dysfunction, POCD)的发生发展中扮演着重要的角色^[10]。而前皮层到VTA再到NAc的神经环路在动机行为中扮演着关键角色。由此看出研究VTA多巴胺神经元功能的基础是解析其输入输出全脑投射。

因此,本研究拟采多巴胺转基因小鼠和顺向和逆向跨突触病毒示踪技术,结合免疫荧光染色,全面解析VTA多巴胺神经元的上游输入性及下游输出性投射,绘制其全脑的神经环路连接,为其后续的研究提供解剖结构基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性DAT-Cre小鼠,8-12周龄,体重20-28 g,购买自上海南方模式生物有限公司,实验动物放置在洁净环境中饲养,保持温度在(22-25)℃,湿度在(40±3)%,维持12小时亮灯,12小时熄灯的循环,调节灯光am 9:00-pm 9:00亮灯,动物可自由进食水和食物并可自由活动。

1.2 实验仪器和试剂

小动物脑立体定位仪、颅骨钻系统购买自深圳瑞沃德公司。病毒显微注射器Nanoject购买自美国Drummond公司。连续冰冻切片机(CM3050S)购买自德国Lecia公司,荧光显微镜购买自日本Olympus,激光共聚焦显微镜购买自日本Nikon公司。兔抗小鼠TH(tyrosine hydroxylase)多克隆抗体购买自美国Invitrogen公司,驴抗兔Alexa Fluor 594荧光二抗购买自美国Jackson公司。本实验所用示踪病毒AAV-EF1a-DIO-GT、AAV-EF1a-DIO-G、EnVA-RV-mCherry和AAV-EF1a-DIO-GFP均购买自武汉枢密科技有限公司。

1.3 逆向示踪病毒注射

成年雄性DAT-Cre小鼠3只,1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹

腔注射麻醉,麻醉成功后剪去头皮毛发,固定于立体定位仪上,碘伏消毒后,眼科剪剪开头皮,钝性分离充分暴露bregma点和lamda点。以bregma为中心前后左右调平颅骨平面,根据第二版Paxinos and Franklin小鼠脑立体定位图谱定位VTA脑区,颅钻磨除颅骨并暴露脑平面,按坐标(AP:-3.3 mm, ML:±0.4 mm, DV:-4.0 mm)注射辅助病毒AAV-EF1a-DIO-GT和AAV-EF1a-DIO-G的混合液(1:1),按50 nl/min的速度将200nl病毒注射到右侧VTA,注射完毕后停留注射针10 min待病毒充分扩散,缝合两针头皮并涂抹红霉素眼膏防止感染。病毒表达2周后,用同样的方法,在同一个部位注射200 nl的重组狂犬病毒(RV)EnVA-RV-mCherry。所有手术步骤都将电热毯放置于小鼠腹部加热维持体温。

1.4 顺向示踪病毒注射

成年雄性DAT-Cre小鼠3只,1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射麻醉,采用与上述逆向示踪病毒注射相同的方法步骤,将200 nl的顺行示踪病毒AAV-EF1a-DIO-GFP微注射到VTA脑区。

1.5 全脑切片

重组狂犬病毒(RV)表达1周后,顺行示踪病毒表达4周后,将所有小鼠用大剂量戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,剪开胸腔暴露心脏,经心脏灌流20 mL-40 mL生理盐水排出血液,然后灌流20 mL冰冷多聚甲醛固定,断头取脑后继续多聚甲醛固定2小时。将固定好的鼠脑用20%和30%的蔗糖溶液梯度脱水沉底,脱水好的鼠脑包埋剂包埋,用冰冻切片机冠状面全脑切片,切片厚度为40 μ m, PBS清洗后,挑选出包含VTA的脑片用于免疫荧光染色,其余脑片按从前到后的顺序贴片封片。

1.6 免疫荧光染色

将挑选出的包含VTA的脑片,用封闭液(含5%小牛血清和0.3%Triton X-100的PBS溶液)常温封闭2小时,封闭结束后,将脑片加入兔抗小鼠TH多克隆抗体(1:1000)一抗液,4℃摇床孵育24小时。一抗孵育完成后, PBS充分漂洗3次,每次10 min,漂洗完成后将脑片加入Alexa Fluor 594标记的驴抗兔荧光二抗液(1:1000)中,室温避光摇床孵育2小时。二抗孵育完成后,避光PBS充分漂洗3次,每次10 min。漂洗完成后贴片封片,避光保存。

1.7 显微镜扫片

本研究中所有顺向、逆向示踪病毒表达的荧光蛋白及免疫荧光染色的脑片,均采用自动连续扫描荧光显微镜(Olympus VS120)进行扫描。调整焦距及曝光时间等参数,在物镜放大20倍下拍摄成像。病毒注射部位脑片采用Nikon A1R激光共聚焦显微镜进行扫描拍片,调整参数在物镜放大40倍下拍摄成像。

1.8 脑片处理分析

扫描拍摄含VTA的共聚焦荧光脑片,用NIS-Elements AR软件进行查看和分析,分别计数表达病毒荧光及TH荧光染色细胞数,统计共标率。选择VTA注射部位病毒荧光表达良好的一组顺向示踪及逆向示踪脑片。全脑挑选神经元胞体表达逆向示踪病毒荧光蛋白的脑片,全脑挑选神经纤维投射表达顺向示踪病毒荧光蛋白的脑片。所有拍摄的荧光脑片用Image J软件处理,添加标尺、调整对比度至最佳并保存为TIFF格式。

1.9 统计分析

采用 SPSS 12.0 软件进行数据统计分析, 所有数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 t 检验或单因素方差分析检验。 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 VTA 逆向及顺向示踪病毒表达良好

逆向跨突触重组狂犬病毒 (RV)EnVA-RV-mCherry 及其

辅助病毒 AAV-EF1a-DIO-GT 和 AAV-EF1a-DIO-G 按时间先后顺序准确的注射到 DAT-cre 小鼠 VTA 脑区(图 1A), 病毒成功转染 VTA 多巴胺神经元, 辅助病毒 AAV-EF1a-DIO-GT 所携带绿色荧光蛋白及重组狂犬病毒(RV)EnVA-RV-mCherry 所携带红色荧光蛋白表达良好(图 1B)。NIS-Elements AR 软件进行细胞计数, 统计共表达两种荧光蛋白的神经元比率为 (74.88 ± 4.32) (图 1C), 结果提示转染辅助病毒的神经元大多数都成功转染了重组狂犬病毒。顺向示踪病毒。

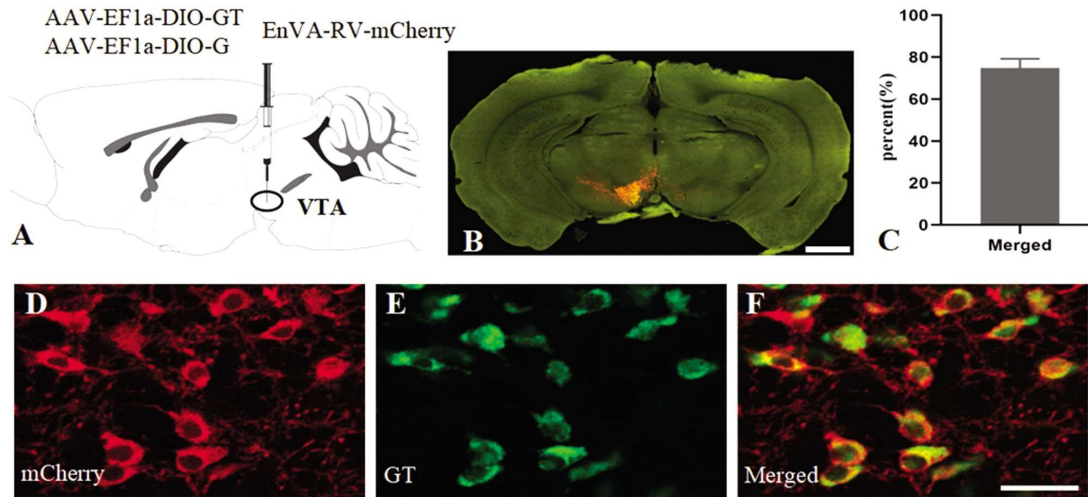


图 1 VTA 多巴胺神经元逆向示踪病毒注射及病毒荧光蛋白表达

A: 病毒注射位置示意图; B: VTA 逆向示踪病毒荧光蛋白表达; C: VTA 双标神经元所占比例; D: RV 病毒表达红色荧光蛋白; E: 辅助病毒表达绿色荧光蛋白; F: 共表达 RV 病毒和辅助病毒的荧光蛋白(标尺: 50 μm)。

Fig.1 Retrograde tracing virus injection and fluorescent protein expression of dopamine neurons in VTA

A: location of the virus injection; B: fluorescent protein expression of retrograde tracing virus in VTA; C: The proportion of merged neuron in VTA; D: The expression of red fluorescent protein of RV virus; E: The expression of green fluorescent protein of helper viruses; F: The fluorescent protein co-expression of RVvirus and helper virus(scale bar: 50 μm).

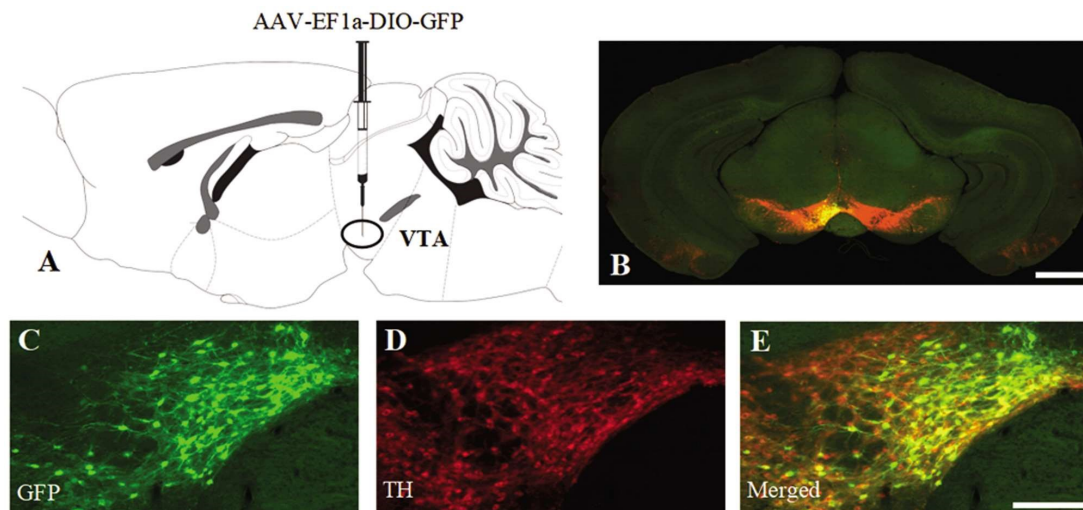


图 2 VTA 多巴胺神经元顺向示踪病毒注射及病毒荧光蛋白表达

A: 病毒注射位置示意图; B: VTA 顺向示踪病毒荧光蛋白表达; C: 顺向示踪病毒表达绿色荧光蛋白; D: TH 免疫荧光染色红色荧光蛋白; E: 共表达顺向示踪病毒和 TH 免疫染色的荧光蛋白(标尺: 50 μm)。

Fig.2 Anterograde tracing virus injection and fluorescent protein expression of dopamine neurons in VTA

A: location of the virus injection; B: fluorescent protein expression of anterograde tracing virus in VTA; C: The expression of green fluorescent protein of anterograde tracing virus; D: TH immunofluorescence staining with red fluorescent protein; E: Fluorescent protein merged expression of anterograde tracing virus and TH immunofluorescence stainin(scale bar: 50 μm).

AAV-EF1a-DIO-GFP 被准确注射到 DAT-cre 小鼠 VTA 脑区(图 2A), 病毒所携带绿色荧光蛋白表达良好, 与抗 TH 免疫

荧光染色(红色)共标良好(图 2B、C、D、E), 表明病毒所转染的细胞都是多巴胺神经元。

2.2 VTA 多巴胺神经元接受前脑皮层、基底神经节、下丘脑、边缘系统、中脑等广泛脑区投射

逆向示踪病毒注射一周后,逆向跨单突触转染 VTA 多巴胺神经元的上游神经元,并表达病毒所携带红色荧光蛋白。鼠脑连续冰冻切片后,用全自动连续扫描荧光显微镜按顺从前到后连续扫描拍片,结果显示全脑许多脑区的大量神经元表达红色荧光蛋白,提示 VTA 多巴胺神经元接受全脑广泛的上游输入性投射。从前往后查看,首先是前脑皮层的许多神经元表达红色荧光蛋白(图 3A),基底神经节的纹状体和伏隔核区域有广泛的病毒荧光蛋白表达,包括纹状体的腹侧、背侧、终纹状

体、苍白球以及伏隔核的中央壳核、边缘壳核、核区等全部区域都有大量的神经元表达红色荧光蛋白(图 3B、C、D)。下丘脑视前区、外侧下丘脑、下丘脑室旁核都有大量神经元表达示踪病毒所携带的红色荧光蛋白,上丘脑的僵核也集中表达示踪病毒荧光蛋白(图 3D、E、F,图 4G)。边缘系统也有许多示踪病毒红色荧光表达,主要集中在杏仁核的延伸区和中央杏仁核区(图 3E)。在中脑腹侧被盖区(VTA)病毒注射点以外的区域也有大量示踪病毒荧光蛋白表达,中脑其它区域包括中脑黑质、中缝背核、臂旁核有集中且数量较多的神经元表达示踪病毒荧光蛋白(图 4H、I、J)。

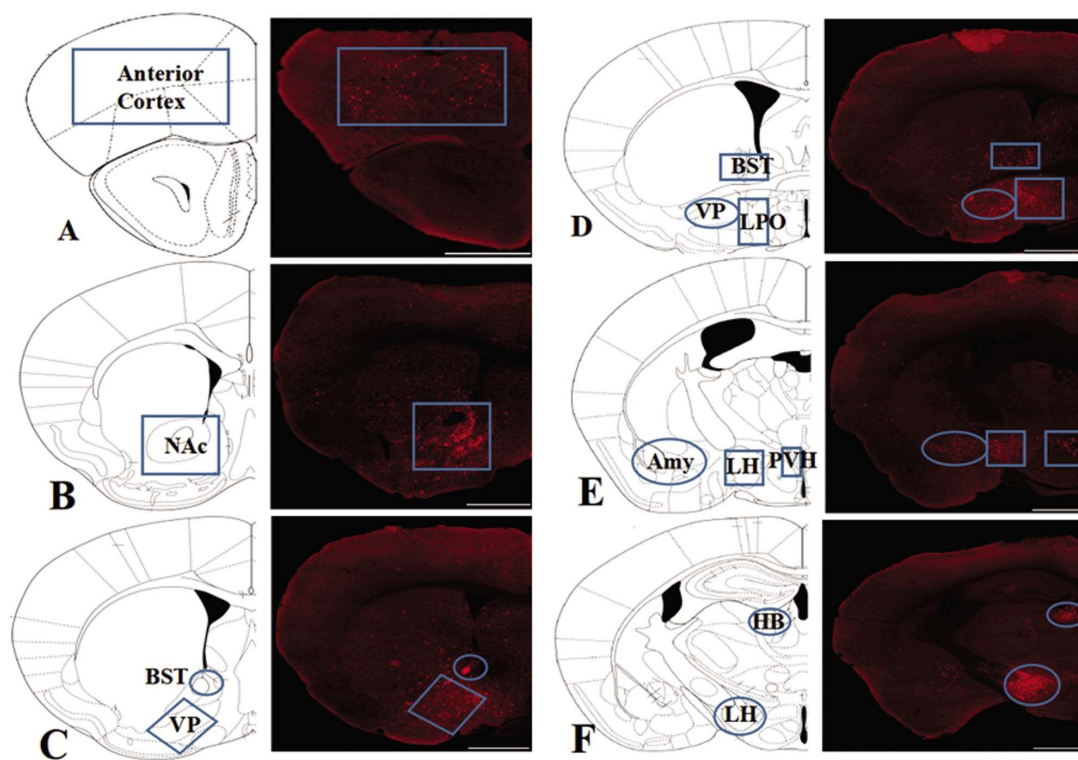


图 3 逆向跨突触示踪病毒揭示 VTA 多巴胺神经元输入性上游投射脑区(一)

A: 前脑皮层神经元示踪病毒荧光蛋白表达;B: 伏隔核神经元示踪病毒荧光蛋白表达;C-D: 终纹状体、腹侧苍白球、下丘脑视前区神经元示踪病毒荧光蛋白表达;E: 杏仁核、外侧下丘脑、下丘脑室旁核神经元示踪病毒荧光蛋白表达;F: 僵核神经元示踪病毒荧光蛋白表达(标尺:1mm)。

Fig.3 Retrograde transsynaptic tracing reveals inputs to VTA dopamine neurons(一)

A: fluorescent protein expression of tracing virus in anterior cortex neurons; B: fluorescent protein expression of tracing virus in NAc neurons;

C-D: fluorescent protein expression of tracing virus in BST neurons, VP neurons, and LPO neurons; E: fluorescent protein expression of tracing virus in amygdala neurons, LH neurons, and PVH neurons; F: fluorescent protein expression of tracing virus in HB neurons(scale bar:1 mm).

2.3 VTA 多巴胺神经元纤维投射主要分布于前额叶皮层、纹状体、伏隔核、背外侧隔核、杏仁核、外侧下丘脑等区域

顺向示踪病毒只转染 TH-cre 小鼠 VTA 多巴胺神经元,不跨突触,病毒沿神经元纤维传递表达,病毒注射四周后所携带绿色荧光蛋白充分表达。取鼠脑全脑冰冻切片,全自动连续扫描荧光显微镜全脑连续扫描拍片,结果显示表达绿色荧光蛋白的神经纤维投射分布较为集中,这与 VTA 多巴胺神经元逆向示踪提示其接受广泛上游投射不同。表达绿色荧光蛋白的纤维投射主要集中位于基底神经节及其周围区域,伏隔核和纹状体的大部分区域都有许多纤维投射(图 5A),其中腹侧苍白球、终纹状体和嗅球有最密集的纤维投射(图 5B)。前额叶皮层有一定纤维投射(图 5A),隔区的背外侧隔核有较多的纤维投射(图 5B),杏仁核部分区域和外侧下丘脑也有一定纤维投射(图 5C)。

3 讨论

多巴胺(Dopamine,DA)是中枢神经系统内主要的儿茶酚胺类神经递质之一,其含量占整个中枢神经系统儿茶酚胺类递质一半以上,由位于脑内的 10 个多巴胺神经元细胞群分泌。70%以上的多巴胺神经元主要集中分布于中脑黑质(Substantia Nigra,SN,A9)致密带和中脑腹侧被盖区(Ventral tegmental area,VTA,A10)^[11]。SN 区多巴胺神经元主要与参与躯体运动调节,异常可导致自主运动功能障碍,比如帕金森病就是中脑黑质多巴胺神经元变性,导致其投射区域多巴胺水平低下所致,而亨廷顿舞蹈病则与中枢系统内多巴胺水平明显增加有关^[12,13]。VTA 脑区多巴胺神经元在精神情绪活动、意识觉醒调控等方面发挥着广泛的作用^[14-16]。神经元的纤维投射连接构成

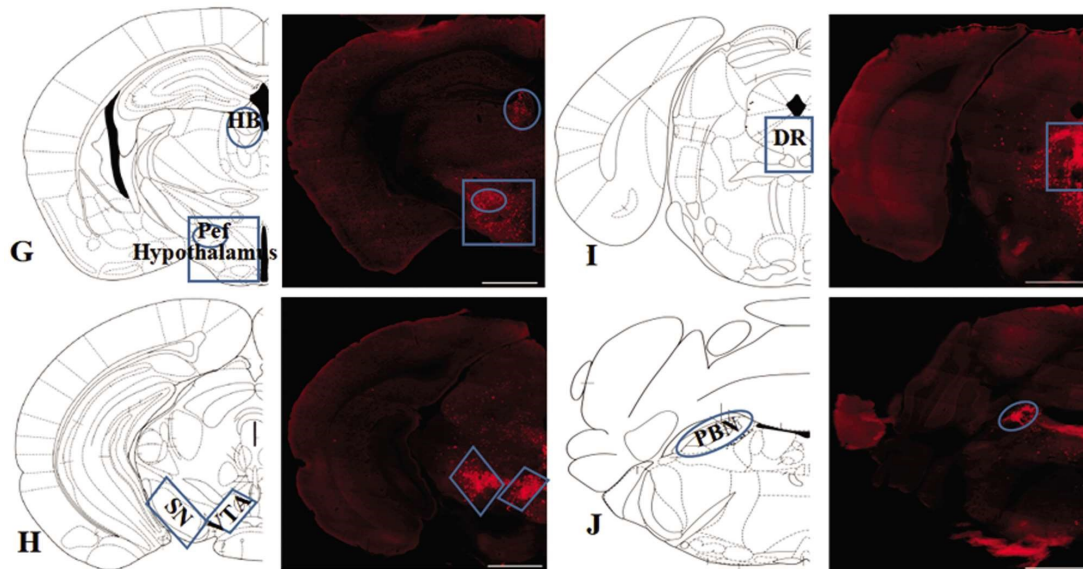


图4 逆向跨突触示踪病毒揭示 VTA 多巴胺神经元输入性上游投射脑区(二)

G: 下丘脑(穹窿周区)神经元示踪病毒荧光蛋白表达; H: 黑质、腹侧背盖区神经元示踪病毒荧光蛋白表达; I: 中缝背核神经元示踪病毒荧光蛋白表达; J: 臂旁核神经元示踪病毒荧光蛋白表达; (标尺: 1 mm)。

Fig.4 Retrograde transsynaptic tracing reveals inputs to VTA dopamine neurons(二)

G: fluorescent protein expression of tracing virus in hypothalamus(Pef) neurons; H: fluorescent protein expression of tracing virus in SN neurons, and VTA neurons; I: fluorescent protein expression of tracing virus in DR neurons; J: fluorescent protein expression of tracing virus in PBN neurons; (scale bar: 1 mm).

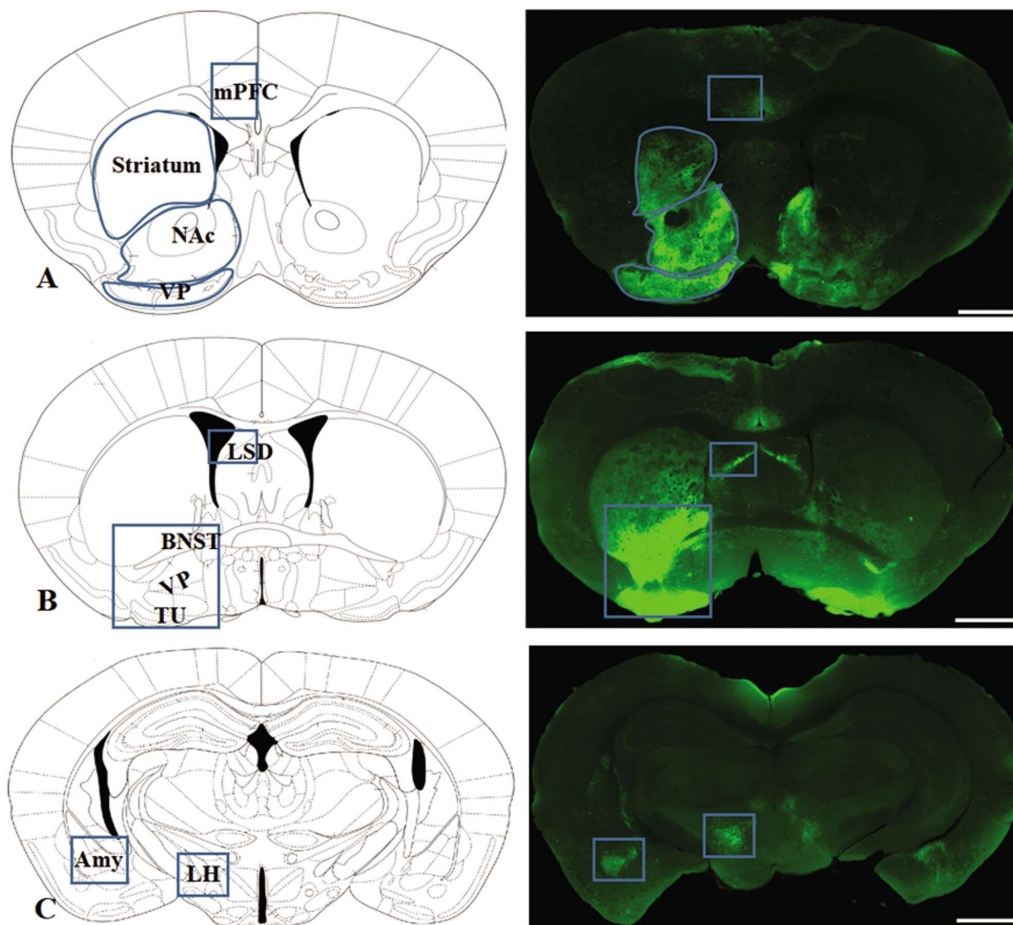


图5 顺向示踪病毒揭示 VTA 多巴胺神经元输出性下游投射脑区

A: 内侧前额叶皮层、纹状体、伏隔核、腹侧苍白球神经纤维投射; B: 外侧隔核、终纹状体、腹侧苍白球、嗅结节神经纤维投射; C: 杏仁核、外侧下丘脑神经纤维投射; (标尺: 1 mm)。

Fig.5 Anterograde tracing reveals outputs of VTA dopamine neurons

A: nerve fiber projection in mPFC, striatum, NAc, and VP; B: nerve fiber projection in LSD, BNST, VP, and TU; C: nerve fiber projection in Amy, and LH; (scale bar: 1 mm).

的神经环路是神经系统功能研究的基础,经典的中脑多巴胺奖赏系统是由 VTA 多巴胺神经元及其下游投射靶区伏隔核(NAc)组成,该神经环路在奖赏、成瘾、厌恶、抑郁等行为的发生中扮演着重要角色^[17-20]。外侧下丘脑(LH)到 VTA 多巴胺神经元的投射连接,在睡眠觉醒、麻醉觉醒、镇痛、进食等过程中发挥着重要作用^[21-24]。VTA 脑区多巴胺神经元越来越多功能的发现和研究,是基于其越来越确切和详细的环路解剖。以往大量运用免疫组化、免疫荧光染色的研究为 VTA 多巴胺神经元的神经环路解剖奠定了基础,随着转基因动物的广泛运用和各种示踪病毒工具的开发,更为准确和详细的全脑投射研究成为现实。

本研究采用 DAT-cre 转基因小鼠,将顺向示踪病毒(AAV-EF1a-DIO-GFP)和逆向示踪病毒(EnVA-RV-mCherry, AAV-EF1a-DIO-GT, AAV-EF1a-DIO-G)分别微注射到 VTA 脑区,特异性的转染多巴胺神经元。顺向示踪病毒转染 VTA 多巴胺神经元后,所携带荧光蛋白基因整合到小鼠多巴胺神经元并大量表达荧光蛋白,可以沿神经轴突分布并标记出神经投射末梢。逆向示踪病毒选用重组狂犬病毒(RV),通过辅助病毒所携带受体转染 VTA 多巴胺神经元,跨单极突触转染多巴胺神经元的上游投射神经元,整合基因并表达所携带荧光蛋白。通过全脑脑片的荧光扫描拍片,逆向示踪发现 VTA 多巴胺神经元的上游输入性投射神经元广泛分布于全脑,伏隔核的全部区域、终纹状体、背侧纹状体、苍白球、中缝背核、中脑黑质脑区都有大量神经元向 VTA 多巴胺神经元发出投射,下丘脑视前区、外侧下丘脑、下丘脑室旁核、杏仁核的中央及延申区、上丘脑的僵核、中脑臂旁核、前脑皮层等区域也有较多的神经元向 VTA 多巴胺神经元投射。与逆向示踪结果不一样的是,VTA 多巴胺神经元的顺向示踪分布相对集中,其大部分的纤维投射主要集中在纹状体和伏隔核区域,前额叶皮层、背外侧隔核、杏仁核及外侧下丘脑区也有一定的纤维投射,其余脑区未见明显纤维投射。我们的示踪结果中包括了许多研究的经典环路,其中的 VTA 多巴胺神经元到伏隔核的投射环路是经典的中脑奖赏环路^[20,25],到前额叶皮层的投射在决策、学习中发挥重要作用^[26-28],与下丘脑的相互投射连接在睡眠-觉醒-麻醉-觉醒过程中扮演者重要角色^[29,30],也有许多的上下投射连接研究较少,对其生理功能还不甚了解,这些示踪结果可以为后续的研究提供思路。当然,进一步更为详细的示踪研究也是必要的,包括 VTA 多巴胺神经元的上下游跨多级突触连接及神经元类型,VTA 核团内三种神经元的相互连接关系等。

综合分析本研究顺向和逆向示踪的结果发现,VTA 多巴胺神经元的上下游投射区域,主要是觉醒、意识、情绪、动机、学习、运动等重要生理功能调控的脑区,提示 VTA 多巴胺神经元可能广泛的参与许多基础而重要的生理功能,这与以前大量的研究结果一致,也为后续的研究提供了证据和方向。

参考文献(References)

- [1] Poulin J F, Caronia G, Hofer C, et al. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(9): 1260-1271
- [2] Morales M, Margolis E B. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(2): 73-85
- [3] Chen W. Neural circuits provide insights into reward and aversion[J]. *Front Neural Circuits*, 2022, 16: 1002485
- [4] Sun H X, Wang D R, Ye C B, et al. Activation of the ventral tegmental area increased wakefulness in mice[J]. *Sleep Biol Rhythms*, 2017, 15(2): 107-115
- [5] Huguet G, Temel Y, Kadar E, et al. Altered expression of dopaminergic cell fate regulating genes prior to manifestation of symptoms in a transgenic rat model of Huntington's disease [J]. *Brain Res*, 2019, 1712: 101-108
- [6] Qi G, Zhang P, Li T, et al. NAc-VTA circuit underlies emotional stress-induced anxiety-like behavior in the three-chamber vicarious social defeat stress mouse model[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 577
- [7] Trutti A C, Mulder M J, Hommel B, et al. Functional neuroanatomical review of the ventral tegmental area [J]. *Neuroimage*, 2019, 191: 258-268
- [8] Oishi Y, Lazarus M. The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems[J]. *Neurosci Res*, 2017, 118: 66-73
- [9] Chen W. Neural circuits provide insights into reward and aversion[J]. *Front Neural Circuits*, 2022, 16: 1002485
- [10] Metzger M, Souza R, Lima L B, et al. Habenular connections with the dopaminergic and serotonergic system and their role in stress-related psychiatric disorders[J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 65-88
- [11] Berke J D. What does dopamine mean? [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(6): 787-793
- [12] Surmeier D J. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease[J]. *FEBS J*, 2018, 285(19): 3657-3668
- [13] Schwab L C, Garas S N, Drouin-Ouellet J, et al. Dopamine and Huntington's disease[J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(4): 445-458
- [14] Bromberg-Martin E S, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting [J]. *Neuron*, 2010, 68(5): 815-834
- [15] Dong H, Chen Z K, Guo H, et al. Striatal neurons expressing dopamine D(1) receptor promote wakefulness in mice[J]. *Curr Biol*, 2022, 32(3): 600-613
- [16] Mahadevia D, Saha R, Manganaro A, et al. Dopamine promotes aggression in mice via ventral tegmental area to lateral septum projections[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6796
- [17] Ungless M A, Argilli E, Bonci A. Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2010, 35(2): 151-156
- [18] Kutlu M G, Zachry J E, Melugin P R, et al. Dopamine release in the nucleus accumbens core signals perceived saliency [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(21): 4748-4761
- [19] Chen X, Voets S, Jenkinson N, et al. Dopamine-Dependent Loss Aversion during Effort-Based Decision-Making[J]. *J Neurosci*, 2020, 40(3): 661-670
- [20] Yang H, de Jong J W, Tak Y, et al. Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations[J]. *Neuron*, 2018, 97(2): 434-449
- [21] Nieh E H, Vander W C, Matthews G A, et al. Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation [J]. *Neuron*, 2016, 90(6): 1286-1298

- Lancet, 2006, 368: 387-403
- [28] Selkoe, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease [J]. Neuron, 1991, 6: 487-498
- [29] Mossman D, Vogtle F N, Taskin A A, et al. Amyloid-beta peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation[J]. Cell Metabolism, 2014, 20(4): 662-669
- [30] Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function[J]. J Biol Chem, 2008, 283(44): 29615-9
- [31] O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease[J]. Annu Rev Neurosci, 2011, 34: 185-204
- [32] Sun L, Zhou R, Yang G, et al. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(4): E476-E485
- [33] Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly[J]. Ann Neurol, 2011, 70(6): 871-880
- [34] Li F, Wu X, Li J, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates hippocampal long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4904-4910
- [35] Li C, Wang X, Cheng F, et al. Geniposide protects against hypoxia/reperfusion-induced blood-brain barrier impairment by increasing tight junction protein expression and decreasing inflammation, oxidative stress, and apoptosis in an in vitro system[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 854: 224-231
- [36] Bennett RE, Robbins AB, Hu M, et al. Tau induces blood vessel abnormalities and angiogenesis-related gene expression in P301L transgenic mice and human Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(6): E1289-E1298
- [37] Arima S, Nishiyama K, Ko T, et al. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement[J]. Development, 2011, 138(21): 4763-4776
- [38] Mackay CP, Kuys SS, Brauer SG. The Effect of Aerobic Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor in People with Neurological Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Neural Plast, 2017, 2017: 4716197
- [39] Boulton ME, Cai J, Grant MB. gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(3):p.781-95
- [40] Cai J, Chen Z, Ruan Q, et al. gamma-Secretase and presenilin mediate cleavage and phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-1[J]. J Biol Chem, 2011, 286(49): 42514-23
- [41] Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, et al. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1 [J]. Mechanisms of Development, 2003, 120(6): 657-667
- [42] Wang DJ, Li QY, Xu SJ, et al. Effect of ginsenoside Rg1 on angiogenesis after neonatal hypoxia ischemia brain damage in rats[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2011, 42 (4): 503-507

(上接第 2013 页)

- [22] Li J, Li H, Wang D, et al. Orexin activated emergence from isoflurane anaesthesia involves excitation of ventral tegmental area dopaminergic neurones in rats [J]. Br J Anaesth, 2019, 123 (4): 497-505
- [23] Perez-Bonilla P, Santiago-Colon K, Leininger G M. Lateral hypothalamic area neuropeptides modulate ventral tegmental area dopamine neurons and feeding[J]. Physiol Behav, 2020, 223: 112986
- [24] 张思敏, 李健楠, 王飒, 等. 小鼠下丘脑外侧区食欲素神经元向中脑腹侧被盖区的投射[J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(04): 374-380
- [25] Nguyen C, Mondoloni S, Le Borgne T, et al. Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety[J]. Neuron, 2021, 109(16): 2604-2615
- [26] Quessy F, Bittar T, Blanchette L J, et al. Stress-induced alterations of mesocortical and mesolimbic dopaminergic pathways [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 11000
- [27] Ferenczi E A, Zalocusky K A, Liston C, et al. Prefrontal cortical regulation of brainwide circuit dynamics and reward-related behavior [J]. Science, 2016, 351(6268): c9698
- [28] Rapanelli M, Frick L R, Miguez F A, et al. Dopamine bioavailability in the mPFC modulates operant learning performance in rats: an experimental study with a computational interpretation[J]. Behav Brain Res, 2015, 280: 92-100
- [29] Taylor N E, Van Dort C J, Kenny J D, et al. Optogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area induces reanimation from general anesthesia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(45): 12826-12831
- [30] Song Y, Chu R, Cao F, et al. Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental-Prelimbic Pathway Promote the Emergence of Rats from Sevoflurane Anesthesia[J]. Neurosci Bull, 2022, 38(4): 417-428