

引文格式:

魏梦霞, 纪树钦, 李子杰, 等. 脑干蓝斑到前庭神经核的神经环路投射及在压力应激下的激活研究 [J]. 集成技术, 2021, 10(5): 12-22.

Wei MX, Ji SQ, Li ZJ, et al. The activation of locus coeruleus under stress and its norepinephrine projection to vestibular nuclei [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(5): 12-22.

脑干蓝斑到前庭神经核的神经环路投射及在压力应激下的激活研究

魏梦霞^{1,2#} 纪树钦^{1#} 李子杰^{1,3} 林子逸¹ MONTARDY Quentin¹

王立平^{1,4,5,6*} 李 蕾^{1,4,5,6*}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

³(香港浸会大学 香港 999077)

⁴(深港脑科学创新研究院 深圳 518055)

⁵(中国科学院脑联结解析与调控重点实验室 深圳 518055)

⁶(广东省脑连接图谱重点实验室 深圳 518055)

摘 要 前庭神经核 (Vestibular Nuclei) 是保持平衡的关键核团, 其功能异常与晕动病、前庭偏头痛、帕金森氏病等多种疾病状态密切相关, 压力应激往往加重以上疾病的症状并伴随着蓝斑 (Locus Coeruleus) 去甲肾上腺素能系统的激活。该研究利用转基因小鼠结合病毒示踪显示从蓝斑到前庭神经核的神经投射, 并利用酪氨酸羟化酶 (Tyrosine Hydroxylase) 抗体免疫荧光染色确定蓝斑-前庭神经核的投射为去甲肾上腺素能。结果显示, 小鼠在睡眠剥夺压力刺激下蓝斑去甲肾上腺素能神经元被强烈激活, 而前庭神经核神经元激活不明显, 提示睡眠剥夺可能通过蓝斑-前庭神经核的去甲肾上腺素能神经调制起作用。该结果可为继续探究蓝斑-前庭神经核神经环路在压力应激与前庭神经核功能调控之间的重要作用提供解剖结构学基础。

关键词 蓝斑; 前庭神经核; 压力应激; 晕动病; 去甲肾上腺素

中图分类号 Q 189 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210324001

收稿日期: 2021-03-24 修回日期: 2021-04-27

基金项目: 国家自然科学基金委员会面上项目 (31971072, 31471109); 广东省国际合作项目 (2019A050510032); 深圳市科技创新委员会项目 (JCYJ20180508152336419); 广东省重点领域研发计划项目 (2018B030331001)

作者简介: 魏梦霞 (共同第一作者), 硕士研究生, 研究方向为前庭神经核; 纪树钦 (共同第一作者), 研究助理, 研究方向为压力应激的生理机制; 李子杰, 硕士研究生, 研究方向为环境污染与压力应激; 林子逸, 学士, 技术员, 研究方向为脑干神经环路; MONTARDY Quentin, 助理研究员, 研究方向为负性情绪神经环路; 王立平 (通讯作者), 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为本能行为神经环路, E-mail: lp.wang@siat.ac.cn; 李蕾 (通讯作者), 副研究员, 博士研究生导师, 研究方向为中枢-外周生殖功能调控神经机制, E-mail: saralilei@siat.ac.cn。

The Activation of Locus Coeruleus Under Stress and Its Norepinephrine Projection to Vestibular Nuclei

WEI Mengxia^{1,2#} JI Shuqin^{1#} LI Zijie^{1,3} LIN Ziyi¹ MONTARDY Quentin¹
WANG Liping^{1,4,5,6*} LI Lei^{1,4,5,6*}

¹(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³(Hong Kong Baptist University, Hong Kong 999077, China)

⁴(Shenzhen-Hong Kong Institute of Brain Science-Shenzhen Fundamental Research Institutions, Shenzhen 518055, China)

⁵(CAS Key Laboratory of Brain Connectome and Manipulation, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

⁶(Guangdong Provincial Key Laboratory of Brain Connectome and Behavior, Shenzhen 518055, China)

*Corresponding Author: lp.wang@siat.ac.cn; saralilei@siat.ac.cn

#Equal Contribution

Abstract Vestibular nuclei (VN) is a sensorimotor structure controlling posture and balance. The anatomy and function of VN is closely related to diseases, such as motion sickness, vestibular migraine, vertigo, postural deficits, and Parkinson's disease. It has been known that stress imposes effects on the function of VN and the progress of these diseases. Since the locus coeruleus-norepinephrine (LC-NE) system is activated by stress, it would be interesting to know whether there is a connection between LC and VN and its possible function. The experiment results showed that LC neurons project to the VN and they are tyrosine hydroxylase (TH)-positive. After subjected to sleep deprivation stress treatment, the mice showed higher cFos activation in the LC-NE neurons compared with the untreated control group, suggesting the important role LC-NE may play in stress-related VN malfunction. This study provides anatomical basis for further neural circuitry studies of LC-VN in balance and then its possible involvement in diseases.

Keywords locus coeruleus; vestibular nuclei; stress; motion sickness; norepinephrine

Funding This work is supported by National Natural Science Foundation of China (31971072, 31471109), Guangdong International Cooperation Grant (2019A050510032), Shenzhen Science Technology and Innovative Commission (JCYJ20180508152336419) and Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (2018B030331001)

Ethical Statement The study was approved by the Scientific Research Ethics Committee of the Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (ID number: SIAT-IACUC-190226-NS-LL-A0648), and written informed consent was obtained from each participant

1 引言

前庭系统几乎是所有哺乳动物平衡系统的重要组成部分。前庭系统内具有特殊的感受器, 在一定的刺激下产生神经冲动, 经前庭神经传入

相应的部位, 其中最主要的是位于脑干的前庭神经核 (Vestibular Nuclei, VN) 与小脑。前庭神经核位于第四脑室底前庭区, 由于细胞构筑与纤维联系的不同, 其可分为内侧核、下核、外侧核和上核。随着对包括前庭神经核在内的前庭系统解

剖学及功能研究的深入,其在姿势、动眼神经反射、空间表征及认知中的功能逐步被证实^[1]。当躯体产生位移时,头部加速度被位于内耳感觉器中的机械敏感性毛细胞检测到并编码为感觉信息电信号,之后通过前庭神经传递至脑干的前庭神经核。该基本感觉信息在前庭神经核内被整合并转换为运动前信号,通过前庭脊髓束和前庭动眼神经通路来执行其功能。前庭神经核内的神经元可通过内侧纵束投射到动眼神经核并在头部运动期间控制视线的稳定。另外,前庭神经核还可通过两个下行途径到达脊髓来影响姿势控制^[2]。前庭信息也通过前庭-丘脑-皮质通路将整合后的信息转移到不同的皮质区域,这些高级脑结构区域提供感知和认知功能^[3-4]。此外,在结构上,前庭神经核与脑干中的多个植物神经中心相互连接^[5-6]。

前庭神经核功能异常与晕动病、前庭偏头疼、焦虑症和帕金森氏病(Parkinson's Disease)等疾病相关^[7-9]。但前庭神经核与上述疾病的关联神经机制尚不清楚,尤其是其上下游神经环路机制仍需要深入的研究^[10-11]。作为保持平衡的核心脑区,前庭神经核接受广泛的神经信息输入和输出^[12]。其中,前庭神经核与脑干另外一个核团——蓝斑(Locus Coeruleus, LC)的结构及功能关联具有特殊及重要的生理学意义。晕动病通常包括恶心、呕吐、冷汗、头痛、困倦、打哈欠、食欲不振和流涎增加等症状。在模拟晕动病相关反应的动物实验中,对大鼠进行逆行向心加速处理后,发现前庭神经核及蓝斑均被该处理激活^[13]。Balaban等^[7]利用猫的前庭神经核电刺激范式研究了与晕动病相关的脑区激活,结果显示,由蓝斑、前庭神经核、外侧孤束核、内侧臂旁核和导水管周围灰质组成的神经网络被激活。前庭偏头痛是一种常见的疾病,遗传、表观遗传和环境因素均可促进其发生、发展,但相应病理生理机制尚不清楚。有研究指出,脑干前庭神经核与调节三叉神经伤害性输入的结构,如延髓吻

侧腹内侧、导水管周围灰质腹外侧、蓝斑和中缝核之间的相互连接对理解前庭偏头痛的病理生理学至关重要^[14]。头晕、眩晕、失衡及广泛性焦虑症在老年人中很常见。尽管已有焦虑症与前庭功能异常的共患报道,但其机制仍不清楚,在临床应用上也还没有关于前庭神经核与焦虑症相关的进一步研究进展^[8]。在帕金森氏病和路易体痴呆中,相关的细胞分子标记物异常,如路易体及路易神经突在蓝斑和前庭神经核中有表达,并且可能与步态和姿势不稳、平衡问题及跌倒等帕金森氏病和路易体痴呆的症状相关^[15]。实际上,在平衡障碍相关疾病、空间与运动体征异常及情绪异常的合并机制方面,有研究提出这些疾病共患的机制可能在于前庭-臂旁核网络、大脑皮层网络、网状核-前庭网络以及蓝斑-前庭神经网络等神经网络的异常^[12]。此外,大量临床证据表明前庭功能障碍和晕动病均具有自主神经表现,如上腹不适、恶心、呕吐等,最终向条件性厌恶或恐惧症发展。但前庭输入在自主神经调节中的重要性尚不清楚^[6]。鉴于蓝斑与自主神经系统的密切联系,深入研究蓝斑与前庭神经核的相互关联可能为这种伴随前庭功能障碍的内脏不适提供新的思路和证据。

作为大脑内合成去甲肾上腺素的主要部位^[16-17],蓝斑介导了压力应激反应,并与注意、唤醒、记忆等生理功能密切相关^[18-22]。诸多神经精神疾病,如焦虑症、恐慌症、抑郁症、创伤后应激障碍、注意缺陷多动障碍和阿尔茨海默病中都存在蓝斑去甲肾上腺素能系统的失调^[19-20, 23-25]。研究证明,蓝斑去甲肾上腺素能神经元的激活导致动物出现焦虑样行为^[22]且对后续动物的行为输出具有神经调制作用^[26]。另有实验证明,间歇性短暂睡眠会导致蓝斑去甲肾上腺素能神经元表现出持续的形态改变和细胞数量的减少^[27];且睡眠剥夺合并线性振荡对晕动病具有加剧的作用^[28]。本文研究利用野生型小鼠及转基因小鼠,通过腺相关

病毒 (Adeno-Associated Virus, AAV) 示踪研究蓝斑到前庭神经核的神经投射, 并利用免疫荧光染色来确定相关神经元的类型; 同时, 在睡眠剥夺的压力模型中检测蓝斑及前庭神经核的激活情况。

2 材料和方法

2.1 材料

实验所用小鼠均饲养在无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 动物饲养间内, 照明周期为 12 h 光照/12 h 黑暗交替循环, 期间保证饲料与饮水充足。动物实验方案经中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审查通过 (SIAT-IACUC-190226-NS-LL-A0648)。实验所用 CD1-TH-cre 转基因小鼠 7 只, 8 周龄; 野生型 C57BL/6J 小鼠 8 只, 14 周龄。其中, CD1-TH-cre 转基因小鼠父本为 TH-cre-C57/6N, 母本为 CD-1 (ICR), 实验所用动物为上述父本与母本交配产生的 F1 代转基因小鼠。野生型 C57BL/6J 小鼠购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。

2.2 小鼠脑内病毒注射

向 CD1-TH-cre 转基因小鼠腹腔注射戊巴比妥溶液 (80 mg/kg) 以对其进行麻醉, 待确认其达到深度麻醉后, 采用剃发器除去头部表面毛发, 随后将其放置并固定在脑立体定位仪 (瑞沃德) 上。用酒精消毒小鼠头部剃发区后, 剪开头皮暴露颅骨骨缝, 以前囟 (Bregma 点) 和后囟 (Lambda 点) 为参考点, 将前囟作为坐标原点, 经过反复调整直至小鼠脑在前、后、左、右均处在水平位置。调节脑立体定位仪, 使用微型手持式颅钻对目标脑区正上方颅骨进行打孔, 再用预先吸好病毒的注射针缓慢下降到目标脑区并用微量注射泵 (Hamilton) 以 100 nL/min 的速度注射病毒。待注射结束后停针 10 min, 接着将针头缓慢上升并移出动物脑部, 使用碘伏擦拭颅骨, 同时用可吸收缝线对小鼠头皮伤口进行缝合并消毒。

本实验的病毒注射位置坐标为蓝斑 (AP: -5.30 mm, ML: 0.80 mm, DV: -4.00 mm)。本实验对 CD1-TH-cre 小鼠注射病毒 AAV2/9-hEF1a-DIO-mCherry-WPRE-pA, 滴度为 1×10^{13} v.g./mL (Vector Genomes per mL), 每只小鼠于目标位点注射 100 nL。

2.3 小鼠睡眠剥夺压力范式

将野生型 C57BL/6J 小鼠分为两组 (对照组 4 只, 实验组 4 只)。实验组小鼠使用睡眠剥夺仪进行 24 h 的睡眠剥夺压力处理 (运行速度为 3.5 r/min, 徕越 SD1900), 实验期间确保粮水供给。对照组小鼠也同时从饲养架转移到行为间, 但不进行睡眠剥夺处理。实验结束后, 对所有小鼠进行麻醉、灌流及牺牲处理, 并进行后续相关脑区免疫荧光染色。

2.4 灌流及脑组织固定

CD1-TH-cre 转基因小鼠脑中的病毒表达 5 周后, 对小鼠进行麻醉处理。待确认进入深度麻醉状态后, 将小鼠腹部朝上, 四肢固定在灌流台上, 使用手术剪剪开小鼠腹腔和胸腔, 在左心室心尖处插入灌注针头, 紧接着剪破右心房, 以 20 mL/min 的速度分别匀速灌注 20 mL 磷酸盐缓冲液和浓度为 4% 的多聚甲醛溶液。完成灌注后, 将脑组织剥出并浸泡在浓度为 4% 的多聚甲醛溶液中, 固定 1 d 后换成浓度为 30% 的蔗糖溶液对其进行脱水处理。最后, 当脑组织沉到蔗糖溶液底部时 (一般为 1~3 d 后), 用冰冻包埋剂 (Opti-mum Cutting Temperature, OCT; Sakura) 对脑组织进行包埋并放置于 -20°C 冰箱中备用。

2.5 切片及免疫荧光染色

将包埋并冷冻好的脑组织进行冰冻切片 (Leica CM1950 冰冻切片机, 切片厚度为 30 μm)。切片完成后, 将目标脑区的脑片收集于预先添加了磷酸盐缓冲液的 24 孔板中, 随后在切片上进行 FBJ 骨肉瘤癌基因 (cFBJ osteosarcoma oncogene, cFos) 及酪氨酸羟化酶 (Tyrosine Hydroxylase, TH) 抗体的免疫

荧光共染, 检验小鼠蓝斑及前庭神经核在压力应激下可能激活的神经元类型。其中, 免疫荧光的染色过程尽可能避光进行。首先, 用磷酸盐缓冲液将脑片漂洗 3 次(室温, 摇床速度为 40 r/min, 10 min), 再将 0.3% 的磷酸盐吐温缓冲液(磷酸盐缓冲液和 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100))与山羊血清按照体积比为 9:1 配制封闭液, 并在室温下避光对脑片进行封闭处理 1 h。然后, 将脑片转移到含有两种一抗的孵育液中(Rabbit anti-c-Fos, 一抗与磷酸盐缓冲液体积比为 1:500, 品牌 CST, 货号 9F6; Chichen anti-TH, 一抗与磷酸盐缓冲液体积比为 1:500, 品牌 Abcam, 货号 ab76442), 4 °C, 摇床速度为 20 r/min, 12 h, 再用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次(室温, 摇床速度为 40 r/min, 10 min)。紧接着将脑片放入包含两种二抗的孵育液中(Goat anti-rabbit 488, 二抗与磷酸盐缓冲液体积比为 1:200, 品牌 Jackson, 货号 11545003; Goat anti-Chichen 594, 二抗与磷酸盐缓冲液体积比为 1:200, 品牌 Abcam, 货号 ab150169), 室温, 摇床速度为 20 r/min, 1 h。二抗孵育完成后, 用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚溶液(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI)(DAPI 原液与磷酸盐缓冲液按体积比 1:5 000 稀释)对脑片进行染核孵育(室温, 摇床速度为 20 r/min, 10 min), 随后用磷酸盐缓冲液将脑片漂洗 3 次(室温, 摇床速度为 40 r/min, 10 min), 再将脑片贴于载玻片上, 并用封片剂封片。最后, 用玻片扫描仪(奥林巴斯 VS120)拍照并进一步研究目标脑区病毒表达情况或 cFos 激活情况。

3 实验结果

3.1 顺行腺相关病毒示踪显示前庭神经核内侧核存在由蓝斑投射过来的神经末梢

鉴于蓝斑与前庭神经核在功能上的相关性, 本研究利用嗜神经病毒示踪的方法来探究蓝斑到前庭神经核的可能神经连接。利用脑立

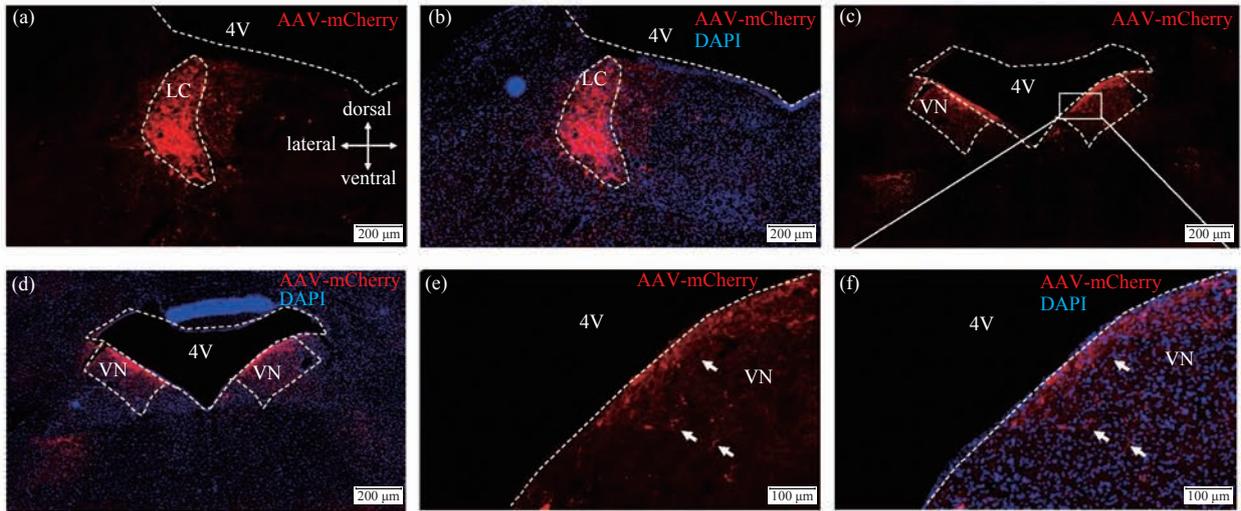
体定位注射技术在 CD1-TH-cre 转基因小鼠的蓝斑注射 AAV2/9-hEF1a-DIO-mCherry-WPRE-pA 病毒, 从而特异性地感染蓝斑的酪氨酸羟化酶阳性神经元。病毒表达 5 周后, 对蓝斑部位胞体及前庭神经核部位神经末梢的表达进行检验。结果显示, 蓝斑的 TH 阳性神经元被病毒感染并在胞体表达(图 1(a~b)), 同时发现前庭神经核具有来自蓝斑的投射, 这些神经末梢主要集中于前庭神经核沿第四脑室的边缘(图 1(c~f))。这一结果用腺相关病毒顺行的特性证明了蓝斑到前庭神经核投射的存在, 并且这种投射应该是 TH 神经元的投射。

3.2 蓝斑-前庭神经核的投射为去甲肾上腺素能

为进一步验证蓝斑到前庭神经核投射的性质, 在上述结果基础上对神经元进行免疫荧光染色。其中, 病毒感染表达的荧光为红色荧光(mCherry), 本研究对 TH 抗体的染色采用绿色的二抗。结果显示, AAV2/9-hEF1a-DIO-mCherry-WPRE-pA 感染的绝大部分蓝斑神经元与 TH 的免疫荧光染色信号有高度的共标(图 2), 表明该病毒的确特异性感染了蓝斑的 TH 阳性神经元。前庭神经核脑区的免疫荧光染色显示, 从蓝斑投射过来的神经纤维(红色荧光)部分也可与 TH 抗体染色(绿色荧光)共标(图 3), 这表明蓝斑到前庭神经核的投射至少部分是 TH 阳性的神经纤维。

3.3 睡眠剥夺压力模型引起蓝斑去甲肾上腺素能神经元激活

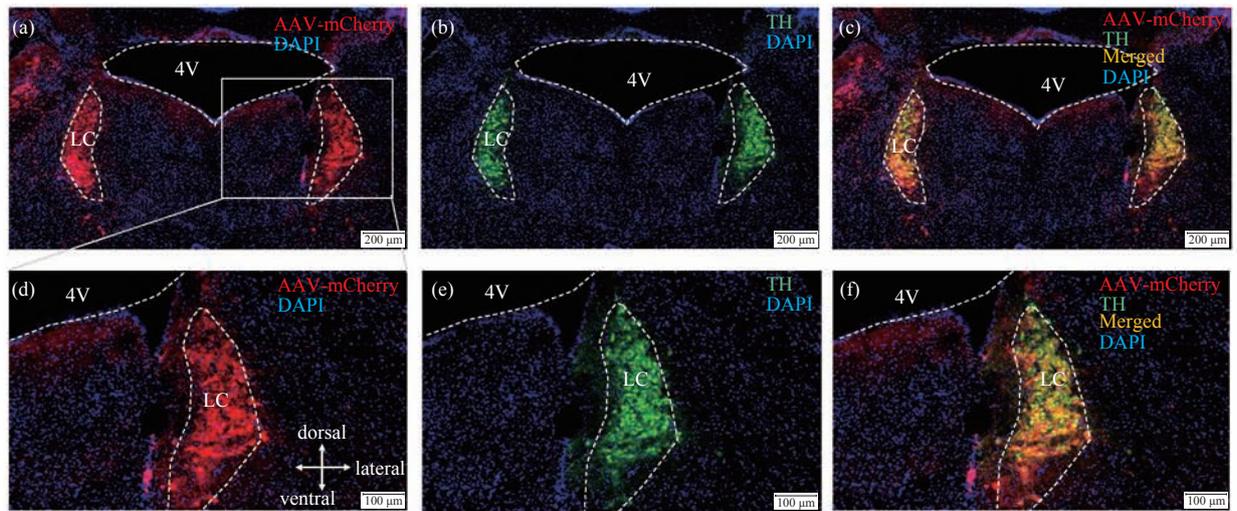
有实验表明, 睡眠剥夺与线性振荡对晕动病有加重的作用^[28], 而间歇性短暂睡眠会导致蓝斑去甲肾上腺素能神经元表现出持续的形态改变和细胞数量的减少^[27]。因此, 本实验对野生型小鼠进行了睡眠剥夺 1 d 的压力处理, 以研究在压力范式下蓝斑去甲肾上腺素能神经元激活及可能的前庭神经核神经元激活情况。实验结果(图 4)表明, 与对照组相比, 睡眠剥夺的压力范式(压力组)表现出更多的蓝斑神经元激活(图 4(n)),



(a~b) 蓝斑(LC)被病毒感染的 TH 阳性神经元的胞体表达; (c~d) 在前庭神经核(VN)脑区由 LC 投射过来的神经末梢; (e~f) 前庭神经核部位神经末梢的放大图(白色箭头示意代表性神经纤维末梢信号; 4V-第四脑室)

图 1 顺行示踪病毒显示前庭神经核具有从蓝斑来的神经投射

Fig. 1 The virus AAV2/9-hEF1a-DIO-mCherry-WPRE-pA showed that the vestibular nuclei has nerve fibers originated from the locus coeruleus



(a~c) 蓝斑(LC)被病毒感染的 TH 阳性神经元的胞体病毒表达及与 TH 抗体染色的高度重合; (d~f) LC 病毒感染神经元中 mCherry 与 TH 抗体染色的共标放大图(4V-第四脑室)

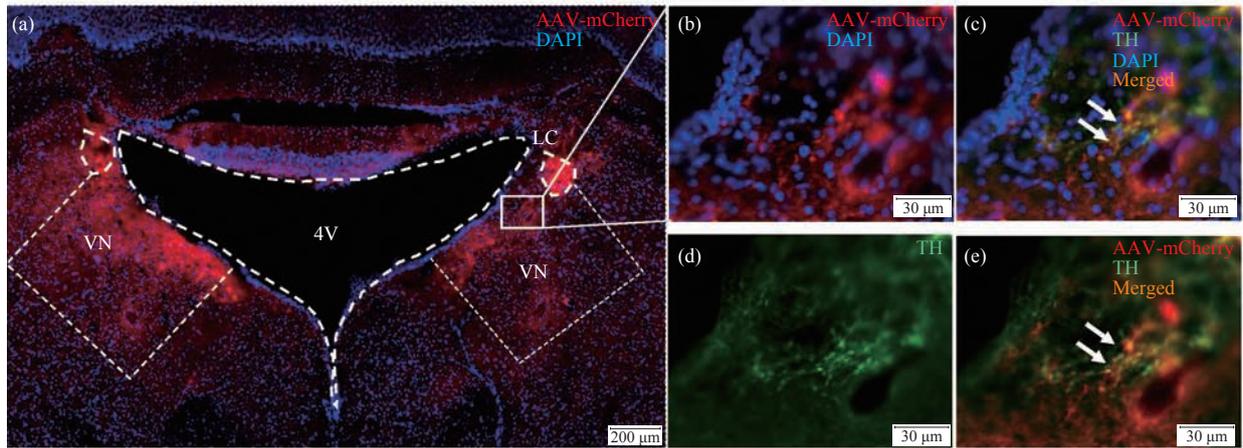
图 2 酪氨酸羟化酶抗体免疫荧光染色验证蓝斑脑区被感染神经元类型

Fig. 2 Tyrosine hydroxylase antibody immunofluorescence staining verified that the locus coeruleus neurons infected were TH-positive

$P < 0.05$); cFos 与 TH 抗体共染结果显示, 绝大部分被激活的蓝斑神经元是 TH 阳性神经元(图 4 (i~m)), 然而该范式并没有引起前庭神经核神经元的激活(图 5)。

4 讨论与分析

前庭神经核是保持平衡的关键核团, 其功能异常与晕动病、前庭偏头痛、帕金森氏病等多种



(a)位于前庭神经核(VN)的来自蓝斑(LC)的TH阳性神经元胞体的神经末梢投射;(b~e)在VN脑区由LC投射过来的神经末梢的放大图及其与TH抗体染色信号的共标(4V-第四脑室;白色箭头示意代表性神经纤维末梢mCherry红色信号与TH抗体染色绿色的共标)

图3 蓝斑去甲肾上腺素能神经元感染病毒后到VN的神经末梢进行酪氨酸羟化酶抗体的免疫荧光染色显示此神经末梢表达TH蛋白

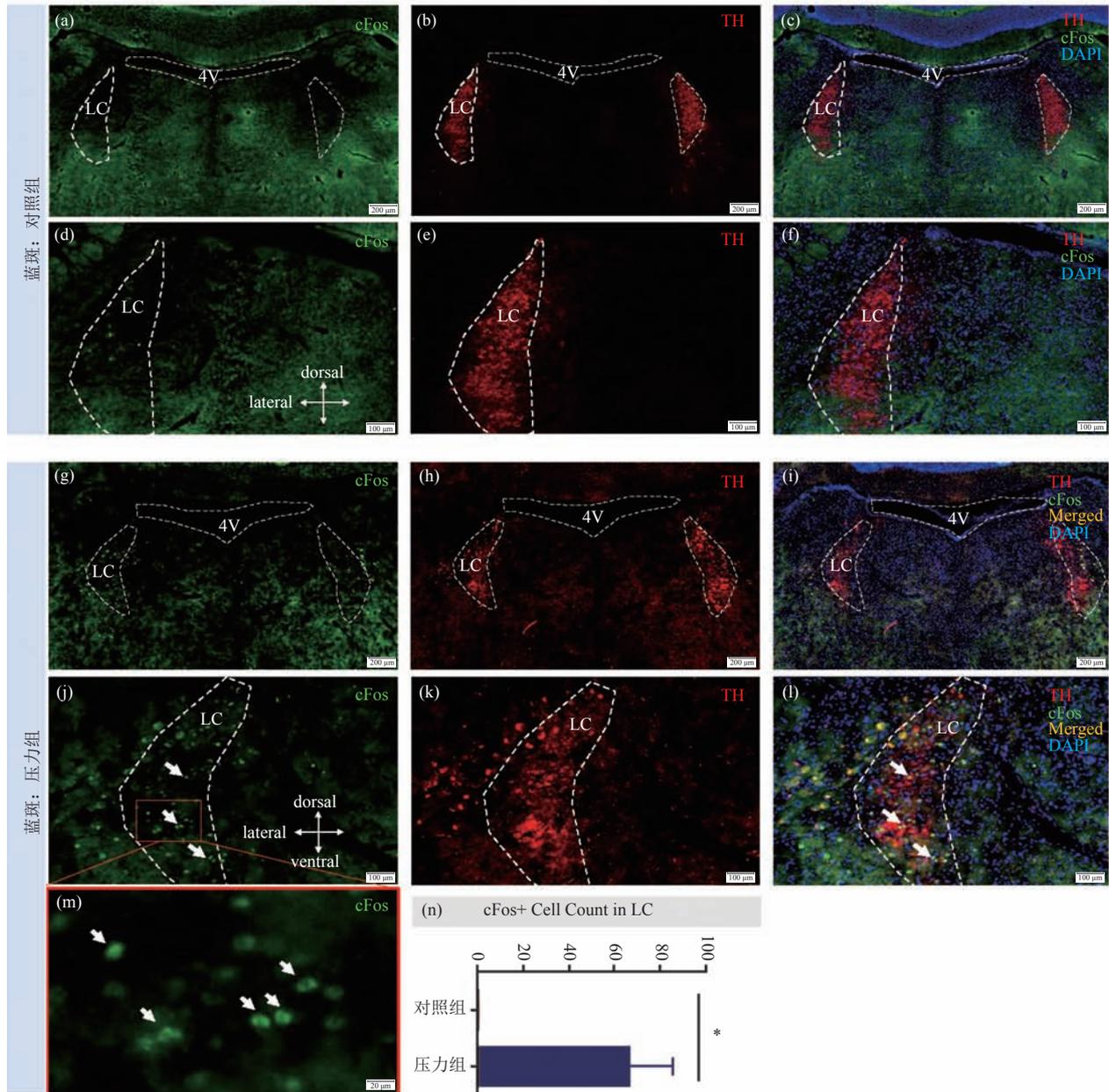
Fig. 3 Tyrosine hydroxylase antibody immunofluorescence staining verified that the LC-VN projections revealed by AAV2/9-hEF1a-DIO-mCherry-WPRE-pA injection into the LC of CD1-TH-cre mice were TH positive

疾病状态密切相关,压力应激往往会加重以上疾病的症状^[7-8,13-15]。蓝斑-去甲肾上腺素能系统在压力应激下激活,但该系统与前庭神经核的神经结构连接及功能关联仍不清楚,且目前大部分的研究集中在前庭神经核到蓝斑的投射上。本文实验利用转基因小鼠蓝斑嗜神经腺相关病毒立体定位注射的方法,研究蓝斑-前庭神经核的神经投射并验证其细胞类型为酪氨酸羟化酶阳性。进一步给予小鼠睡眠剥夺的压力范式,发现该压力强烈激活了蓝斑去甲肾上腺素能神经元,但前庭神经核的神经元未见明显激活,提示文献中提到的睡眠问题导致晕动病的神经机制可能涉及到蓝斑去甲肾上腺素激活元激活及其到前庭神经核的神经投射,而非源于直接激活前庭神经核的神经元。

蓝斑作为脑内去甲肾上腺素的主要来源,存在广泛的下游神经投射,除了蓝斑到前庭神经核的投射外,还发现了蓝斑到其他下游核团,如小脑、室旁丘脑核、海马、下丘脑外侧区、中央杏仁核和导水管周围灰质等的投射,与文献报道一致^[18,29-30]。实际上,在20世纪末,Schuerger和

Balaban^[29,31]将示踪剂荧光金(10% Fluoro-Gold)注射到大鼠前庭神经核,发现蓝斑-前庭神经核的投射关系。本文实验结果与他们的研究结果一致:存在蓝斑到前庭神经核的直接投射。与前面Schuerger和Balaban的研究相比,本实验采用了嗜神经病毒示踪的办法,在确保动物存活和执行正常生理功能的前提下,研究蓝斑-前庭神经核的神经投射关系。此外,本实验采用的Cre转基因小鼠结合AAV-DIO病毒系统,可以精准地只感染蓝斑的去甲肾上腺素能神经元,具有细胞类型的特异性。Shi等^[32]利用荧光显微光学切片断层成像系统(fluorescence Micro-Optical Sectioning Tomography, fMOST)神经示踪全脑成像技术细致地研究了前庭神经核中谷氨酸能神经元的输入和输出。结果显示,前庭神经核谷氨酸能神经元可以直接投射到蓝斑,而且前庭神经核谷氨酸能神经元也接收到来自蓝斑的直接神经投射。但是,该研究并没有对投射到前庭神经核谷氨酸能神经元的上游蓝斑神经元的具体细胞类型进行验证。

为了进一步验证Cre转基因小鼠结合AAV-



(a~f) 两种放大倍数的结果显示对照组中蓝斑(LC)没有明显的 cFos 表达(未被激活); (g~m) 不同放大倍数的压力应激处理组显示 LC 被剧烈激活(g, j, m), 进一步与 TH 抗体共染的结果表明被激活的神经元类型是 TH 阳性神经元(i, l); (n) 经过量化分析后压力组的 cFos 阳性神经元激活数量与对照组相比有显著性差异(4V-第四脑室; 白色箭头示意代表性 cFos 蛋白在神经元核上表达;

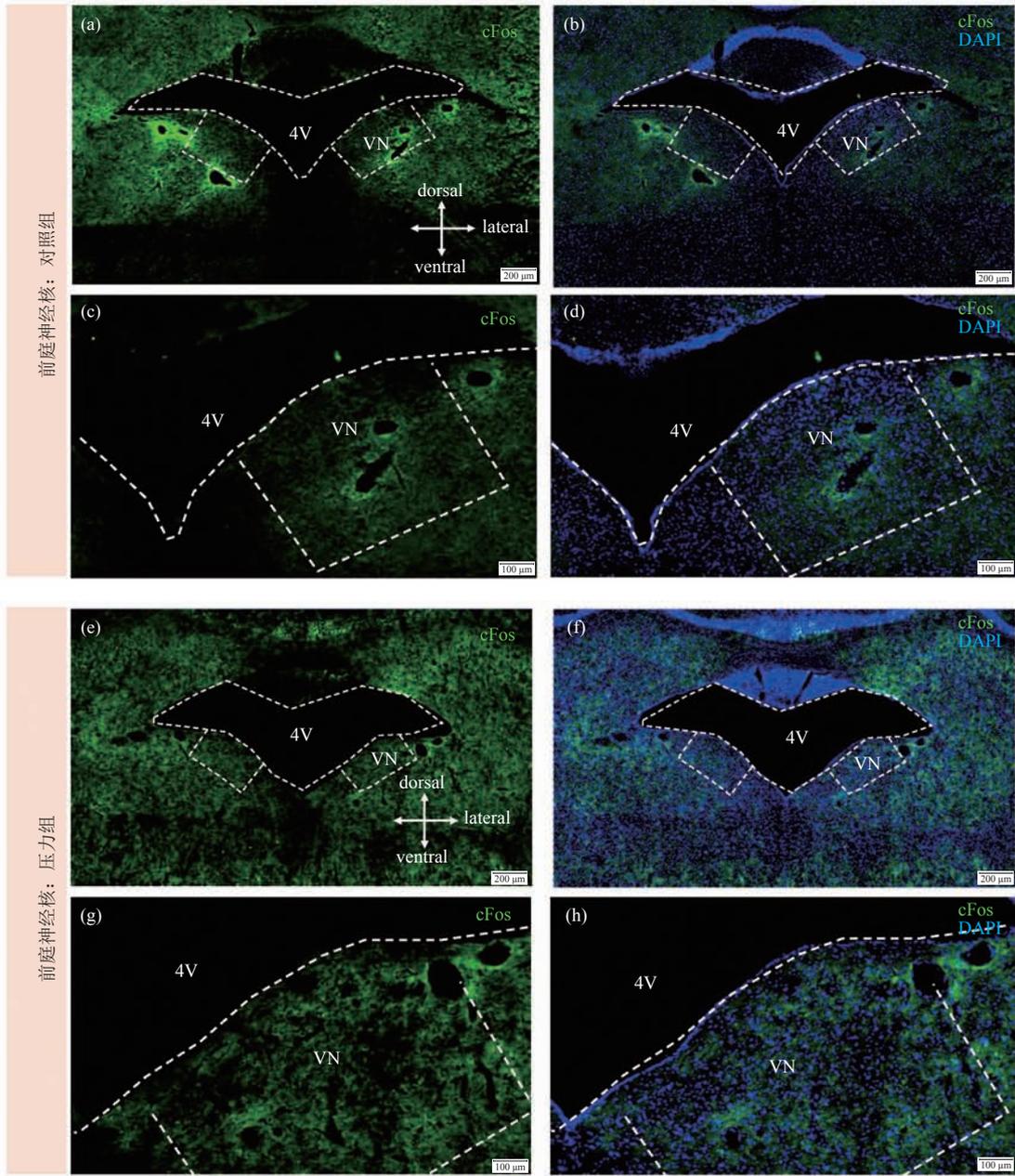
* $P < 0.05$; 每组 4 只动物)

图 4 对照组和睡眠剥夺压力组蓝斑 cFos 与 TH 抗体免疫荧光共染结果

Fig. 4 The co-staining of cFos and TH immunofluorescence in the LC of the control and sleep-deprivation stress group

DIO 病毒系统显示的蓝斑-前庭神经核的细胞特异性神经投射关系, 本实验对蓝斑的胞体神经元和前庭神经核的神经末梢进行了酪氨酸羟化酶抗体的染色鉴定。结果发现, 蓝斑中病毒感染阳性

的神经元的确也能被酪氨酸羟化酶抗体识别, 并且被感染的前庭神经核神经元末梢也能与酪氨酸羟化酶抗体染色阳性信号共标。但并不是所有的蓝斑-前庭神经核的 mCherry 红色荧光神经纤维



(a~d) 两种放大倍数的结果显示对照组中前庭神经核 (VN) 没有明显的 cFos 表达 (未被激活)；(e~h) 两种不同放大倍数的压力应激处理组显示 VN 在 24 h 睡眠剥夺压力下并没有明显 cFos 表达 (4V-第四脑室)

图 5 对照组和睡眠剥夺压力组前庭神经核 cFos 与 TH 抗体免疫荧光共染结果

Fig. 5 The co-staining of cFos and TH immunofluorescence in the VN of the control and sleep-deprivation stress group

都能与酪氨酸羟化酶抗体染色阳性的绿色荧光信号共标，其原因可能是在神经末梢上的酪氨酸羟化酶蛋白表达水平并不高；鉴于抗体染色显示蛋白表达的敏感性限制，可能存在蓝斑-前庭神经

核 mCherry 神经末梢表达该蛋白但没有共标绿色荧光的情况。

已知压力应激、睡眠障碍等对前庭系统功能具有影响，但具体的机制尚不清楚。在本文工作

的功能试验中, 一天的睡眠剥夺压力并没有引起前庭神经核明显的 cFos 激活, 然而蓝斑去甲肾上腺素能神经元的激活非常剧烈。提示该压力更可能通过蓝斑去甲肾上腺素能系统的激活及其投射到前庭神经核的神经末梢起作用, 而不是通过直接激活前庭神经核的神经元起作用。本研究的局限之一在于压力应激范式不够多样化, 只进行了一天的睡眠剥夺压力处理。故本研究结果并不能排除给予更高强度的压力应激后会引发前庭神经核神经元的激活, 如采用 4 d 的睡眠剥夺、慢性轻度不可预知应激、慢性社交压力、母婴分离应激刺激等。本研究的局限之二是未能利用光遗传学、药物遗传学等技术对蓝斑-前庭神经核的去甲肾上腺素能神经投射进行功能操控来验证该神经投射的功能充分性和必要性。

蓝斑去甲肾上腺素能系统的紊乱与多种疾病相关, 蓝斑到前庭神经核的去甲肾上腺素能神经环路的详细解析将为多种压力应激、平衡问题相关的疾病提供理论依据, 并为进一步研究相应的干预策略和治疗靶点提供实验室基础。

5 结 论

前庭神经核是保持平衡的关键核团, 其功能异常与晕动病、前庭偏头痛、帕金森氏症等多种疾病状态密切相关, 压力应激往往会加重以上疾病的症状并伴随蓝斑去甲肾上腺素能系统的激活。本研究利用转基因小鼠结合病毒示踪显示从蓝斑到前庭神经核的去甲肾上腺素能神经投射。蓝斑去甲肾上腺素能神经元在睡眠剥夺压力下被激活, 提示蓝斑到前庭神经核的去甲肾上腺素能神经环路在压力应激与前庭神经核功能调控之间的重要作用。

参 考 文 献

- [1] Angelaki DE, Cullen KE. Vestibular system: the many facets of a multimodal sense [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2008, 31: 125-150.
- [2] Wilson VJ, Jones GM. *Mammalian Vestibular Physiology* [M]. New York: Plenum Press, 1979.
- [3] Lopez C. The vestibular system: balancing more than just the body [J]. *Current Opinion in Neurology*, 2016, 29(1): 74-83.
- [4] Lopez C, Falconer CJ, Deroualle D, et al. In the presence of others: self-location, balance control and vestibular processing [J]. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, 2015, 45(4-5): 241-254.
- [5] Balaban CD, Beryozkin G. Organization of vestibular nucleus projections to the caudal dorsal cap of kooy in rabbits [J]. *Neuroscience*, 1994, 62(4): 1217-1236.
- [6] Balaban CD. Vestibular autonomic regulation (including motion sickness and the mechanism of vomiting) [J]. *Current Opinion in Neurology*, 1999, 12(1): 29-33.
- [7] Balaban CD, Ogburn SW, Warshafsky SG, et al. Identification of neural networks that contribute to motion sickness through principal components analysis of fos labeling induced by galvanic vestibular stimulation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86730.
- [8] Nagaratnam N, Ip J, Bou-Haidar P. The vestibular dysfunction and anxiety disorder interface: a descriptive study with special reference to the elderly [J]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2005, 40(3): 253-264.
- [9] Rajagopalan A, Jinu KV, Sailesh KS, et al. Understanding the links between vestibular and limbic systems regulating emotions [J]. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2017, 8(1): 11-15.
- [10] Highstein SM, Holstein GR. The anatomy of the vestibular nuclei [J]. *Progress in Brain Research*, 2006, 151: 157-203.
- [11] Jang SH, Lee MY, Yeo SS, et al. Structural neural connectivity of the vestibular nuclei in the human brain: a diffusion tensor imaging study [J]. *Neural Regeneration Research*, 2018, 13(4): 727-730.
- [12] Balaban CD, Jacob RG, Furman JM. Neur-

- ologic bases for comorbidity of balance disorders, anxiety disorders and migraine: neurotherapeutic implications [J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2011, 11(3): 379-394.
- [13] Kaufman GD, Anderson JH, Beitz AJ. Fos-defined activity in rat brainstem following centripetal acceleration [J]. *Journal of Neuroscience*, 1992, 12(11): 4489-4500.
- [14] Espinosa-Sanchez JM, Lopez-Escamez JA. New insights into pathophysiology of vestibular migraine [J]. *Frontiers in Neurology*, 2015, 6: Article12.
- [15] Seidel K, Mahlke J, Siswanto S, et al. The brainstem pathologies of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies [J]. *Brain Pathology*, 2015, 25(2): 121-135.
- [16] Du WJ, Hu S, Li X, et al. Neonatal maternal deprivation followed by adult stress enhances adrenergic signaling to advance visceral hypersensitivity [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2019, 35(1): 4-14.
- [17] Hu Y, Shi P, Gao Z. Norepinephrine from the locus coeruleus regulates microglia dynamics during wakefulness [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2020, 36(5): 554-556.
- [18] Schwarz LA, Miyamichi K, Gao XJ, et al. Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenergic circuit [J]. *Nature*, 2015, 524(7563): 88-92.
- [19] Tovote P, Fadok JP, Luthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2015, 16(6): 317-331.
- [20] Calhoun GG, Tye KM. Resolving the neural circuits of anxiety [J]. *Nature Neuroscience*, 2015, 18(10): 1394-1404.
- [21] Takeuchi T, Duzkiewicz AJ, Sonneborn A, et al. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory [J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 357-362.
- [22] McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, et al. CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety [J]. *Neuron*, 2015, 87(3): 605-620.
- [23] Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes [J]. *Brain Research Reviews*, 2003, 42(1): 33-84.
- [24] Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC. Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory [J]. *Brain Research Reviews*, 2004, 45(1): 38-78.
- [25] McCall JG, Siuda ER, Bhatti DL, et al. Locus coeruleus to basolateral amygdala noradrenergic projections promote anxiety-like behavior [J]. *eLife*, 2017, 6: e18247.
- [26] Li L, Feng X, Zhou Z, et al. Stress accelerates defensive responses to looming in mice and involves a locus coeruleus-superior colliculus projection [J]. *Current Biology*, 2018, 28(6): 859-871.
- [27] Zhu Y, Fenik P, Zhan G, et al. Intermittent short sleep results in lasting sleep wake disturbances and degeneration of locus coeruleus and orexinergic neurons [J]. *Sleep*, 2016, 39(8): 1601-1611.
- [28] Kaplan J, Ventura J, Bakshi A, et al. The influence of sleep deprivation and oscillating motion on sleepiness, motion sickness, and cognitive and motor performance [J]. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*, 2017, 202: 86-96.
- [29] Schuerger RJ, Balaban CD. Immunohistochemical demonstration of regionally selective projections from locus coeruleus to the vestibular nuclei in rats [J]. *Experimental Brain Research*, 1993, 92(3): 351-359.
- [30] Beas BS, Wright BJ, Skirzewski M, et al. The locus coeruleus drives disinhibition in the midline thalamus via a dopaminergic mechanism [J]. *Nature Neuroscience*, 2018, 21(7): 963-973.
- [31] Schuerger RJ, Balaban CD. Organization of the coeruleo-vestibular pathway in rats, rabbits, and monkeys [J]. *Brain Research Reviews*, 1999, 30(2): 189-217.
- [32] Shi X, Wei H, Chen Z, et al. Whole-brain monosynaptic inputs and outputs of glutamatergic neurons of the vestibular nuclei complex in mice [J]. *Hearing Research*, 2021, 401: 108159.