

本科毕业论文



论文题目: 前扣带皮层-海马环路在恐惧与焦虑中的作用

- 姓 名: 唐笙愉 学 号: 18307110535
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物科学
- 指导教师: 肖晓 职 称:青年研究员
- 单 位:复旦大学类脑智能科学与技术研究院认知神经科学

中心

完成日期: 2022 年 6 月 24 日

### 论文撰写人承诺书

本毕业论文是本人在导师指导下独立完成的,内容真实、 可靠。本人在撰写毕业论文过程中不存在请人代写、抄袭或者 剽窃他人作品、伪造或者篡改数据以及其他学位论文作假行 为。

本人清楚知道学位论文作假行为将会导致行为人受到不 授予/撤销学位、开除学籍等处理(处分)决定。本人如果被 查证在撰写本毕业论文过程中存在学位论文作假行为,愿意 接受学校依法作出的处理(处分)决定。

承诺人签名:

建塑饰

日期: 2022 年 6 月 24 日

# 前扣带皮层-海马环路在恐惧与焦虑 中的作用

完成人 唐笙愉

# 指导小组成员

肖晓 青年研究员

摘 要
Abstract ······ II
一、综述
1 疼痛与恐惧、焦虑
1.1 介导恐惧与焦虑的环路1
1.2 研究疼痛相关的恐惧和焦虑的意义1
2 前扣带皮层与疼痛和焦虑
2.1 前扣带皮层与疼痛
2.2 前扣带皮层与疼痛相关的焦虑
2.3 前扣带皮层介导疼痛与焦虑的可能机制3
3 海马4
3.1 海马结构4
3.2 海马背侧与腹侧的投射差异4
3.3 海马背侧与腹侧的功能差异
4 前扣带皮层-背侧海马环路与情境性恐惧记忆
4.1 前额叶皮层与海马相互作用
4.2 前扣带皮层与情境恐惧记忆
4.3 前扣带皮层与海马之间存在投射
5 前扣带皮层-腹侧海马环路与焦虑
5.1 前扣带皮层-腹侧海马环路介导情境恐惧泛化

	5.2 前扣带皮层向海马投射
	5.3 内侧前额叶皮层调控焦虑相关活动
6	总结
<u> </u>	材料与方法
1	材料
2	试剂
3	实验仪器
4	实验软件
5	实验方法
	5.1 手术
	5.2 灌流与包埋
	5.3 免疫荧光
	5.3.1 冷冻切片
	5.3.2 NeuN 染色
	5.4 福尔马林测痛
	5.5 双箱行为训练
6	技术路线
三,	研究结果
1	福尔马林疼痛评分
2	构建条件位置回避模型
3	确认投射关系及化学损毁位点

3	.1 投射关系	18
3	.2 化学损毁位点	20
四、	讨 论	21
参考	文献	22
致	谢	25

# 摘要

疼痛以及随之而来的恐惧和焦虑对于人类或者动物的生存至关重要,已经有 大量实验表明前扣带皮层(Anterior Cingulate Cortex, ACC)和海马(Hippocampus, HPC)在这个过程中不可或缺。但较少有研究将两者联系在一起并系统地阐述前 扣带皮层-海马环路相互作用后对疼痛相关的恐惧和焦虑的影响。本课题通过查 找大量文献,发现介导恐惧和焦虑的神经环路存在重叠,这可能包括前扣带皮层 -海马环路。前扣带皮层与情感、记忆和疼痛有关。背侧海马(dHPC)和腹侧海 马(vHPC)有着不同的功能,背侧海马主要执行学习、记忆等认知功能,腹侧 海马则与情绪有关。进一步将两者联系起来的研究表明,前扣带皮-背侧海马环 路与情境性恐惧记忆的产生以及储存有关,前扣带皮层-腹侧海马环路则在情境 性恐惧泛化中有重要作用。基于这些发现本课题还提出了相关的实验方案并进行 了初步尝试。由于疼痛相关的恐惧与焦虑对于人类生存的重要性,目前与之相关 的疾病等已经成为个体甚至社会的沉重负担。希望本课题能对进一步了解疼痛相 关的恐惧和焦虑的产生机制有所帮助并为之后的相关研究、开发新的治疗方案等 提供一些思路。

关键词:前扣带皮层,海马,疼痛,恐惧,焦虑

### Abstract

Pain and its consequently related fear and anxiety are critical to human or animal survival. Accumulated evidence showed that the anterior cingulate cortex (ACC) and the hippocampus (HPC) play important roles in these processes. However, few studies have systematically addressed the effects and interactions of ACC-HPC circuit on painrelated fear and anxiety. In this study, we have identified an overlap interaction in the neural circuits that mediate fear and anxiety, which may include the ACC-HPC circuit. The ACC is associated with emotion, memory and pain. The dorsal hippocampus (dHPC) and the ventral hippocampus (vHPC) have different functions: the dHPC primarily performs cognitive functions such as learning and memory, while the vHPC involves in emotion regulation. Further studies on ACC-HPC circuit have shown that the ACC-dHPC circuit is involved in the induction and storage of contextual fear memories, while the ACC-vHPC circuit plays an important role in contextual fear generalisation. Based on these findings, we have proposed a preliminary experimental protocol to test and confirm the above hypothesis. Due to the importance of pain to human survival, the pain related anxiety and other related disorders have become a heavy burden to individuals and society. This project may contribute to the understanding of the mechanisms underlying pain-related fear and anxiety, providing potential future research directions and therapeutic options.

Key words: anterior cingulate cortex, hippocampus, pain, fear, anxiety



### 1 疼痛与恐惧、焦虑

### 1.1 介导恐惧与焦虑的环路

巴甫洛夫恐惧条件反射,又被称为经典条件反射,是研究联想学习的神经元 基础以及记忆形成机制的典型范式。在这个范式中,通过将初始中性刺激,如可 重复的音调、信号灯等,和能够产生条件反应的条件刺激相关联,让中性刺激成 为一个条件刺激,从而引起条件反射。利用该范式可以将中性刺激与厌恶事件的 发生(如电刺激)联系在一起从而唤起恐惧,有关研究表明,大脑有一个分布式 的区域网络,参与学习和表达恐惧反应。这个区域网络包括但不限于海马 (Hippocampus, HPC)、杏仁核(Amygdala)和内侧前额叶皮层(Medial Prefrontal Cortex, mPFC)<sup>[1]</sup>。

在巴甫洛夫恐惧条件反射中,恐惧产生的前提是疼痛,疼痛的体验包括痛的 感觉辨别和痛的情绪反应。疼痛的感觉成分已被广泛研究,而关于疼痛的负性情 绪成分的数据则较为有限。一般而言,这种负性情绪指恐惧与焦虑。概念上而言, 恐惧和焦虑可以被视为由外部或内部刺激引起的大脑状态,这种状态由一组特定 的、可测量的行为、生理、激素和自主反应构成<sup>[1]</sup>。这两者的区别在于恐惧是由 离散的具严重威胁性的刺激引起的,而焦虑可以作为对模糊的潜在威胁的情绪反 应。焦虑的特点是持续的唤醒、警惕和恐惧,它会根据威胁的性质和情境情况导 致特定的防御行为模式和随之而来的自主反应。大量证据表明,人类和动物的恐 惧和焦虑状态背后的核心机制相似,介导两者的神经环路存在部分重叠<sup>[1]</sup>。本课 题接下来将围绕神经环路可能的重叠部分,前扣带皮层-海马环路进行探讨。

### 1.2 研究疼痛相关的恐惧和焦虑的意义

疼痛对人以及动物的生存至关重要,并在许多方面产生重要影响。比如慢性 疼痛,慢性疼痛影响着全世界约20%的人口<sup>[2]</sup>。虽然慢性疼痛状况不会直接导致 死亡,但它可能给患者带去残疾和痛苦。全球疾病负担研究(The Global Burden of Disease Study)表明,慢性腰痛是导致多年残疾的最大原因,其他几种慢性疼 痛也是多年残疾的主要原因,包括颈部疼痛、偏头痛、骨关节炎、其他肌肉骨骼 疾病等<sup>[3]</sup>。此外,对于患者来说,与日常生活中痛苦和痛苦的前景相关的情感负 担可能导致精神障碍甚至自杀。事实上,慢性疼痛既被认为是一种症状,也被认 为是导致抑郁症等其他疾病的主要疾病<sup>[2]</sup>。由于这一巨大的医疗、经济和社会负 担,更好地了解疼痛以开发有针对性的、新颖的、安全和有效的治疗方法已成为 全球优先事项。

此外,恐惧和焦虑会引发防御性行为反应,这些反应使生物体能够避免或减 少受到的伤害,从而确保其生存<sup>[1]</sup>。然而,在人类中,过度恐惧和慢性焦虑成为 影响个人的主要负担,也是整个社会的主要负担。为了开发减轻这些负担的新策 略,神经科学家正在研究正常和疾病动物模型中恐惧和焦虑背后的神经底物和机 制<sup>[1]</sup>。基于以上两点,本课题围绕前扣带皮层-背侧海马环路和前扣带皮层-腹侧 海马环路,探究它们在疼痛以及随之而来的恐惧和焦虑中的作用、功能,希望为 大脑相关功能提供一些见解,进一步了解疼痛和恐惧、焦虑的机制,为开发新的 治疗手段提供一个思路。

### 2 前扣带皮层与疼痛和焦虑

### 2.1 前扣带皮层与疼痛

大量的研究发现,前扣带皮层与情感、记忆和疼痛有关<sup>[4]</sup>。电生理学研究表 明,前扣带皮层内的一些神经元对有害刺激本身或预测痛苦刺激的环境线索有反 应<sup>[5]</sup>。正电子发射断层扫描(PET)研究显示,有毒刺激和疼痛引起的不愉快也 激活了前扣带皮层<sup>[6]</sup>。在临床上,前扣带皮层和周围皮质组织的手术消融明显减 少了与疼痛有关的不愉快或焦虑,但不影响病人对有毒刺激的强度或定位的辨别 能力<sup>[7]</sup>。另外,前扣带皮层神经元的光遗传调节显示其对急性疼痛的反转反应有 双向控制,而慢性疼痛会损害前扣带皮层对急性疼痛的双向调节,以增加解剖学 无关部位对有毒刺激的厌恶反应。因此,慢性疼痛可以扰乱皮层环路,以广义的 解剖学非特异性方式增强反转体验<sup>[8]</sup>。这些研究表明,前扣带皮层参与了对疼痛 感觉和疼痛情绪的处理。

前扣带皮层被认为是情绪反应的关键神经基底。有研究利用福尔马林诱导的 条件位置回避(Formalin-Induced Conditioned Place Avoidance, F-CPA)和电击诱 导的条件位置回避(Foot-Shock Conditioned Place Avoidance, S-CPA)模型,观察

了前扣带皮层的双侧兴奋性毒性病变对疼痛和恐惧引起的消极情绪的影响,以及 疼痛的感觉成分。研究结果表明,前扣带皮层可能在与疼痛有关的负性情绪的表 达中起关键作用<sup>[5]</sup>。

### 2.2 前扣带皮层与疼痛相关的焦虑

正如上文所提到,前扣带皮层也与疼痛相关的焦虑有关。这种关联可能是由 于疼痛与焦虑共病, Borsook 等人提出了一种称为联合奖励缺陷反奖励模型 (Combined Reward Deficiency Antireward Model)的慢性疼痛模型<sup>[9]</sup>。在这个模 型中,持续的疼痛会抑制大脑的奖励和动机中枢伏隔核(Nucleus Accumbens, NAc),降低自然强化物的动机显著性(奖励缺乏)。为了应对这种状态,反奖励 系统中心——外侧缰核(Lateral Habenular Nucleus, LHb)过度兴奋,释放与压力 相关的化学物质,包括去甲肾上腺素、促肾上腺皮质激素释放因子和强啡肽。这 导致过度的多巴胺能运输,包括多巴胺受体减少、多巴胺合成减少、多巴胺转运 体增加,从而导致疼痛和焦虑调节系统功能障碍(疼痛慢性化)。因此,慢性疼 痛患者的疼痛和焦虑症状是调节系统功能失调的结果[10]。有几个神经环路可以 支持这一点。首先,前扣带皮层神经元与杏仁核形成双向神经支配,包括直接连 接的前扣带皮层-杏仁核环路和间接连接的前扣带皮层-丘脑-杏仁核环路,而杏仁 核是焦虑调节的中心区域[4]。在眶下神经慢性收缩损伤模型中,对前扣带皮层进 行光学抑制降低了异常的丘脑腹侧内后的活动,从而增加了疼痛反应[11]。其次, 被称为下行疼痛调节系统的前扣带皮层-中脑导水管灰质-吻侧延髓腹内侧区-脊 髓背角通路(ACC-PAG-RVM-SDH)和前扣带皮层-脊髓背角通路(ACC-SDH) 互补地调节了痛觉传递[12]。传统的疼痛相关环路有可能在共病条件下转化为焦 虑相关环路,也有可能由于实验方法的限制而产生一些尚未被发现的焦虑调节作 用。因此,需要做更多的工作来探索这些环路在疼痛-焦虑共病中的可能作用。

### 2.3 前扣带皮层介导疼痛与焦虑的可能机制

前扣带皮层是如何介导疼痛与焦虑的呢?有研究在前扣带皮层中发现了两种形式的长时程增强效应(Long Term Potentiation, LTP),一种是需要红藻氨酸(Kainate)受体的突触前形式(pre-LTP),另一种是需要 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的突触后形式(post-LTP)。一些实验表明,在慢性疼痛模型中药物抑制 pre-LTP 具有抗焦虑和镇痛作用<sup>[13]</sup>,而药物抑制 post-LTP 仅具有镇痛作

用<sup>[14]</sup>。因此,有人提出,pre-LTP 是前扣带皮层介导疼痛诱导焦虑的主要机制。 然而,考虑到前扣带皮层神经元的输出和输入不同,并考虑到药理学方法的局限 性,尽管 pre-LTP 对疼痛诱导的焦虑至关重要,但一些前扣带皮层神经元可能不 依赖于 pre-LTP 形式,并可能对特定神经连接的疼痛诱导焦虑仍然很重要<sup>[10]</sup>。

### 3 海马

### 3.1 海马结构

根据艾伦脑图谱(Allen Brain Atlas, atlas.brain-map.org),海马的主要结构包括 CA(Ammon's horn)、齿状回(Dentate Gyrus, DG)、束状回(Fasciola Cinerea, FC)和灰被(Induseum Griseum, IG),此外,内嗅皮层(Entorhinal Area, ENT)、下托(Subiculum, SUB)等区域也与海马紧密联系。其中,CA 区又可以划分为CA1和 CA3(CA2常与 CA3合并讨论)。经典的三突触通路理论认为,内嗅皮层接收其他区域输入的信息后可以直接投射到 CA1,还可以先投射到齿状回经其投射到 CA3,最后投射到 CA1。之后,CA1 还可以继续向下托输出。在此基础上,结合细胞类型、结构和基因表达分析,海马的主要区域(CA1、CA3和齿状回)还可以分为两个部分:背侧海马(dHPC)和腹侧海马(vHPC)<sup>[15]</sup>,它们之间存在功能异质性。背侧海马主要执行学习、记忆等认知功能,腹侧海马则与压力、情感等有关。接下来将对海马疼痛、恐惧和焦虑相关功能的解剖学分离进行详细阐述。

### 3.2 海马背侧与腹侧的投射差异

结构上,海马的背侧通过内侧内嗅皮层(Medial Entorhinal Cortex, EC)接收 来自初级和次级感觉皮质的视觉、听觉和体感觉信息<sup>[16]</sup>。海马背侧 CA1 含有编 码空间位置的位置细胞,向海马下托、前下托和后下托的背侧发出大量连续的、 多突触的、可能是前馈的兴奋投射<sup>[15]</sup>。海马背侧 CA1 和海马背侧下托复合体最 突出的皮质投射是到压后皮质和前扣带皮层,这两个皮层区域主要参与视觉空间 信息认知处理和记忆处理以及环境探索<sup>[17]</sup>。也就是说海马背侧-下托复合体与压 后皮质和前扣带皮层区形成了一个关键的皮质网络,介导了学习、记忆、导航和 探索等认知过程。

海马腹侧 CA1 和海马腹侧下托与杏仁核共享大量的双向连接,这些杏仁核

接受主要的和附属的嗅觉输入,包括杏仁皮质后内侧核、后杏仁核、后内侧基底 核和内侧杏仁核等。海马腹侧/下托-杏仁核-内侧前额叶皮质结构形成一系列平行 的下行投射,直接或间接通过杏仁核内侧和中央支配下丘脑的脑室周围和内侧区, 这里参与控制神经内分泌、自主神经和躯体运动活动,这些活动与具有强烈情感 成分的三类基本动机行为有关,包括摄食、繁殖和防御<sup>[15]</sup>。

#### 3.3 海马背侧与腹侧的功能差异

功能上,大量的数据将海马与人类、其他灵长类动物、大鼠和小鼠的多种类型的记忆联系起来,其中包括情境恐惧记忆。在一项评估啮齿类动物海马功能的环境恐惧测试中,对背侧海马的遗传、药理和病理操作都会使小鼠产生对环境的恐惧,但不会产生对环境关联的线索的恐惧。这种对情境的选择性表明,情境恐惧的缺陷是由情境处理的失败引起的,而不是由一般的情感缺陷引起的<sup>[15]</sup>,也就是说这可能与背侧海马处理空间相关信息有关。

在人类中,海马积减少和海马功能障碍与具有强烈情感成分的心理障碍有关,如创伤后应激障碍、双相情感障碍和抑郁症<sup>[18]</sup>。这些疾病的有效药物治疗也是以海马功能和生理学为目标。因此,海马与情绪和情感的联系十分紧密,与控制焦虑等情绪有关。长期以来,研究认为海马监测环境,并向海马中部发送有关冲突和新事物的情境相关信息以控制焦虑<sup>[19]</sup>。慢性疼痛导致记忆衰退以及海马 CA1 锥体神经元萎缩,并且在观察到神经损伤后,海马齿状回亚区的树突树复杂性增加<sup>[20]</sup>。神经成像证实,海马连接减少与急性疼痛向慢性疼痛转变有关<sup>[21]</sup>,另一项研究表明,外周炎症诱导的自发性疼痛会破坏腹侧海马 CA1-内侧前额叶皮层亚 区缘下皮层(vCA1-IL)连接,而光遗传激活 vCA1-IL 可以缓解疼痛<sup>[22]</sup>。因此, 慢性疼痛对腹侧海马的损伤会导致海马中与焦虑相关的调节系统的失效<sup>[10]</sup>。

### 4 前扣带皮层-背侧海马环路与情境性恐惧记忆

### 4.1 前额叶皮层与海马相互作用

早期的研究观察到在人类和动物的海马病变后发生的逆行遗忘症通常是时间分级的,即近期记忆(Recent Memory)受损并没有影响到远期记忆(Remote Memory)<sup>[23-26]</sup>。于是研究人员假设并证明了远期记忆存储背后的神经环路存在时间依赖性重组,并且在这个过程中前额叶皮层是必需的<sup>[27,28]</sup>。之后进一步的研

究表明,依赖海马的记忆经历了系统巩固过程,即近期记忆存储在海马中,而远期记忆独立于海马,依赖于前额叶皮层、前扣带皮层等皮层区域。具体来说,经验最初是在海马和皮层网络中并行编码的,随后海马网络的重新激活恢复了皮层网络不同区域的活动。这种在海马和皮层网络上的协调重放(Replay)导致皮质间的连接逐渐加强,最终使新的记忆独立于海马,并逐渐与原有的皮质记忆整合在一起<sup>[29]</sup>。在回忆远期记忆期间,前额叶皮层可能具有双重作用。首先,前额叶皮层对于整合来自许多皮层模块的信息可能很重要。其次,在成功召回的情况下,前额叶皮层可能会对海马功能进行自上而下的抑制控制,以尽量减少冗余信息的重新编码<sup>[29]</sup>。

### 4.2 前扣带皮层与情境恐惧记忆

许多研究表明,多个大脑区域共同调节小鼠记忆的形成与巩固,海马、杏仁 核和前扣带皮层是该过程的关键区域<sup>[30-33]</sup>。并且有研究证明,巩固记忆的过程中 内侧前额叶皮层与前扣带皮层以及海马与前扣带皮层的功能性连接会增加<sup>[34]</sup>。 前扣带皮层在恐惧记忆形成过程中是否与海马相互作用具有相关功能?最近一 些实验研究了这一点。首先,在髓鞘层面上,有假设认为髓鞘的形成依赖经验并 且可以塑造神经环路功能和随后的行为输出。利用小鼠的情境恐惧记忆任务,有 实验发现恐惧学习诱导少突胶质细胞前体细胞增殖并分化为内侧前额叶皮层和 前扣带皮层的髓鞘少突胶质细胞。无法形成新髓鞘的转基因动物表现出远期恐惧 记忆记忆缺陷,但近期记忆没有受到影响。通过光纤光度法(Fiber Photometry) 记录群体钙动态,实验观察到神经元对条件性情境线索的反应在前扣带皮层中随 着时间的推移而演变,但在无法形成新髓鞘的动物中则不会变化。此外,利用富 马酸氯马斯汀诱导新髓鞘形成可以改善远期记忆并且促进恐惧的泛化。这些结果 表明恐惧学习期间的神经活动影响新髓鞘的形成,而这又反过来支持远期恐惧记

在环路层面上, mTOR 信号通路的活性被认为是控制蛋白质翻译的重要因素,这对初始学习后的记忆巩固和检索后的记忆再巩固都是必要的。一项研究通过测试 p70s6 激酶 (p70s6K), mTOR 信号通路的关键组成部分,在情境恐惧条件反射后的磷酸化情况发现,检索最近形成的记忆是精确的,涉及背侧海马。随着时间的推移,记忆的细节丢失,独立于背侧海马,并依赖于前扣带皮层<sup>[36]</sup>。

另一项莫里斯水迷宫任务中对空间记忆的研究也佐证了这一观点:即早期基因(Immediate-Early Gene, IEG) c-fos和 Arc等的表达被广泛认为是识别因学习或记忆检索而激活的大脑区域的标记<sup>[28,37-39]</sup>。短时间(1天)内小鼠再次探索水迷宫时前扣带皮层中即早期基因 c-fos的表达较少;一段时间(1个月)后 c-fos表达增加。与基因表达数据一致,钠通道阻滞剂利多卡因对前扣带皮层的靶向药理失活阻断了远程空间记忆的表达,但保留了近期空间记忆<sup>[40]</sup>。相比之下,无论年龄大小,背侧海马的失活都会扰乱空间记忆的表达。这些数据支持空间记忆的环路以时间依赖的方式重组的理论,并确立了前扣带回内固有神经元的活动对处理远期空间记忆至关重要。

### 4.3 前扣带皮层与海马之间存在投射

通过向前扣带皮层或背侧海马微注射逆行示踪腺相关病毒(rAAV-hSyn-EGFP)进行示踪时发现,当病毒注入前扣带皮层时,在背侧海马中发现了一些 EGFP<sup>+</sup>神经元;当病毒注入背侧海马时,在前扣带皮层中发现了许多 EGFP<sup>+</sup>神经 元。而将顺行示踪剂(AAV9-hSyn-HA-hM4Di-IRES-mCitrine)注入背侧海马进行 顺行示踪时,在前扣带皮层中观察到大量 HA 标记的投影纤维。这些发现表明, 前扣带皮层和背侧海马之间存在双向投射<sup>[41]</sup>。再基于上述研究,我们可以合理推 测,情境记忆通过自下而上的路径从背侧海马传输到到前扣带皮层并在那里储存。 而通过前扣带皮层到背侧海马路径,前扣带皮层在背侧海马中检索精确的情境记 忆。

### 5 前扣带皮层-腹侧海马环路与焦虑

### 5.1 前扣带皮层-腹侧海马环路介导情境恐惧泛化

正常情况下,生物的各种防御性行为对生存至关重要,比如记忆泛化使动物 能够快速地应对类似于以前经历的新刺激从而更好地适应环境。然而防御性行为 病理表达导致的过度焦虑也会给个体造成沉重的负担。这种病理性表达主要是由 于情境性恐惧记忆的泛化:情境恐惧记忆随着时间的推移变得不那么特定于某一 情境。创伤后应激障碍(PTSD)等焦虑相关障碍的一个核心症状便是情境性恐 惧记忆的过度泛化,这类障碍的特征是无法区分威胁与安全。有研究证明前扣带 皮层-腹侧海马环路介导情境恐惧泛化<sup>[41]</sup>。实验中,小鼠处于新环境时,前扣带 皮层和腹侧海马中即早基因 c-fos<sup>+</sup>细胞显著增加,这说明两者参与了恐惧记忆的 远期泛化。接着通过化学以及光遗传学方法抑制前扣带皮层和腹侧海马的神经元 活性,发现恐惧记忆的泛化减少,而刺激前扣带皮层和腹侧海马的神经元活性则 会促进这种泛化。同样的方法用于背侧海马则发现,抑制其对恐惧记忆泛化并无 明显影响,但是会显著抑制小鼠情境性恐惧记忆的巩固<sup>[41]</sup>,这也与上文的结论相 符合。

### 5.2 前扣带皮层向海马投射

结构连接上,有实验向前扣带皮层或腹侧海马注射逆行示踪腺相关病毒 (rAAV-hSyn-EGFP),当病毒注入前扣带皮层时,腹侧海马中没有观察到 EGFP<sup>+</sup> 神经元;而病毒注入腹侧海马时,观察到前扣带皮层中的 EGFP<sup>+</sup>神经元。而向腹 侧海马注射 AAV9-hSyn-HA-hM4Di-IRES-mCitrine 进行顺行示踪时,并没有在前 扣带皮层中观察到 HA 标记的投影纤维。这暗示了可能存在前扣带皮层到腹侧海 马的单向投射<sup>[41]</sup>。关于这个环路如何影响恐惧泛化,有研究认为或许杏仁核在其 中起到重要作用<sup>[42]</sup>。

### 5.3 内侧前额叶皮层调控焦虑相关活动

一些研究发现,腹侧海马会直接投射到内侧前额叶皮层,这种投射与啮齿动物防御行为的调节和表达有关<sup>[41]</sup>。内侧前额叶和腹侧海马中的θ频率(4-12Hz)活动在暴露于焦虑情境期间会同步和增加<sup>[43]</sup>。内侧前额叶皮层与腹侧海马中同步的单个细胞参与高架十字迷宫(Elevated Plus Maze, EPM)中的焦虑相关行为<sup>[44]</sup>,而投射到内侧前额叶的腹侧海马 CA1 神经元亚群在焦虑加剧的条件下改变了它们的放电模式<sup>[45]</sup>。此外,对腹侧海马-内侧前额叶皮层环路的光遗传抑制减少了内侧前额叶皮层中神经元的焦虑样行为及表征<sup>[44]</sup>。这些观察表明,腹侧海马向内侧前额叶皮层传递信息,然后内侧前额叶皮层调节与焦虑相关的活动,从而指导动物在 EPM 中焦虑相关行为<sup>[10]</sup>,并且对腹侧海马神经元的不同调节足以持续减少或增加焦虑。虽然这些实验没有解决焦虑通常是否需要这些神经元的活动的问题,也缺少对前扣带皮层的深入研究,但结合上文前扣带皮层参与情境恐惧泛化以及内侧前额叶皮层与前扣带皮层间存在功能性连接,我们有理由推测前扣带皮层在调控焦虑相关的活动中通过某种方式起到了作用。

6 总结

基于上述的研究与思考,本文认为虽然疼痛相关的恐惧与焦虑的原理、机制 不同,但是介导两者的神经环路存在部分重叠,并且重叠的部分可能包括前扣带 皮层-海马环路。由于海马的功能异质性,该环路可以进一步分为前扣带皮层-背 侧海马环路和前扣带皮层-腹侧海马环路。对于前扣带皮层-背侧海马环路,与恐 惧相关的情境记忆短时间内首先会形成并存储在背侧海马,一段时间后,这些记 忆会转移到前扣带皮层中;当有需要的时候,前扣带皮层也可以通过背侧海马检 索精确的情景恐惧记忆。而前扣带皮层-腹侧海马环路则在情境性恐惧泛化中起 到重要作用,并且这种恐惧泛化与焦虑的产生有关。

为了验证这个观点,本课题计划建立 F-CPA 模型和 S-CPA 模型。希望通过 化学损毁海马背侧和腹侧的小鼠并观察到小鼠对 F-CPA 模型和 S-CPA 模型的反 应减小,证明海马与疼痛和恐惧有关。并计划损毁小鼠的前扣带皮层-背侧海马 环路或前扣带皮层-腹侧海马环路,观察其在两类条件位置回避模型中的表现是 否与上述理论相符。因为疫情原因本课题未能完成所有实验,仅仅初步验证了 F-CPA 模型的可行性并初步确认小鼠大脑进行化学损毁的具体位点。详细的实验 方案在接下来讨论。

# 二、材料与方法

### 1 材料

野生型小鼠 C57BL/6, 雄性, 年龄约 11 周。小鼠在标准环境下饲养: 饲养笼 架采用气压控制通换气系统, 在 20~25℃的恒温环境下饲养。实验小鼠的饲养与 使用均遵守复旦大学上海医学院相关的动物保护和使用操作规范, 相关实验使用 小鼠均获得复旦大学实验动物中心动物伦理委员会批准。

### 2 试剂

本课题所用的主要试剂如表1所示。

试剂名称	品牌
	solarbio
乙酸(冰醋酸)	沪试
Triton X-100	sigma
OCT 包埋剂	樱花 SAKURA
通用型抗体稀释液	雅酶
封片剂/中性树胶	biosharp
多聚甲醛	sigma
10%福尔马林固定液	Solarbio
0.9% 无菌生理盐水	格美研
红霉素眼膏	白敬宇制药
Anti-Ibal 抗体 (一抗)	abcam
Anti-NeuN Antibody, clone A60 (一抗)	Millipore
Donkey anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 647 (二抗)	Invitrogen
Donkey anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 546 (二抗)	Invitrogen
鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid, ibo)	MCE

表1 课题所用主要试剂及品牌

### 3 实验仪器

本课题所用的主要实验仪器及其型号、厂家如表2所示。

仪器名称	型号	厂家
立体定位仪	68028	RWD
小动物麻醉机-通用型	R500IP	RWD
麻醉机空气泵	R510-29	RWD
微型手持式颅钻	78001	RWD
冰冻切片机	CM1950	Leica
全玻片扫描系统	VS200	Olympus
测痛箱		
条件反射性位置回避实验箱		

表 2 课题所用主要实验仪器及厂家

### 4 实验软件

Olympus VS200、Etho Vision XT 15

### 5 实验方法

#### 5.1 手术

术前准备:选取合适小鼠,标记并称重记录。将手术器械消毒摆好。

麻醉小鼠:对小鼠使用异氟烷进行气麻,麻醉机为 Chamber 模式,浓度 4%, 流速 0.4-0.5 rpm,麻醉 3 min,观察到小鼠心跳起伏较缓慢即为麻醉完成。

暴露头骨:迅速剃去小鼠脑部区域的毛发,用镊子扒出小鼠的舌头,将小鼠 门牙固定于立体定向仪台上,气麻调至 Mask 模式,异氟烷浓度 1.5%,上耳杆。 用棉签涂抹红霉素眼膏于小鼠眼睛处起保护作用,涂抹碘伏于小鼠头皮处进行消 毒。剪开头皮,用棉签涂抹双氧水便于看清脑部结构。用生理盐水来保持头骨与 创面的湿润。

定位:调整小鼠大脑位置,确定 Bregma 点(前囟),使前后左右误差均在 0.1 mm 内。标记目标位点,用手持式颅钻钻孔。

注射:准备好注射器设备,使注射器依次回抽台盼蓝 0.5 µL、空气 0.7 µL、

ibo 0.2 μL,回抽速度 0.2 μL/min。将立体定位仪上定位用针更换为注射用针,根据 Bregma 点重新调零。将针移动至目标位点(见表 3),下针,下至比目标深度 深 0.1 mm 的位置再回升,注射,注射速度 0.2 μL/min,完毕后留针 7 min。

缝合:缝合小鼠伤口,并收拾手术器械,关闭麻醉机电源。

位点	AP (mm)	ML (mm)	DV (mm)	Ibo $(\mu L)$
dHPC	-1.6	±2.0	-1.7	0.07
ACC	+1.0	+0.3	-1.4	0.07

表3 注射位点及药物用量

### 5.2 灌流与包埋

准备:实验前先准备 3.8%的 PFA 和 1× PBS 放置于冰上待用。

麻醉与固定:使用 4% 水合氯醛对小鼠进行麻醉,将小鼠腹部朝上固定,剪 开皮毛和胸廓暴露心脏。水合氯醛用量根据小鼠体重决定。

灌入 PBS: 将吸有 PBS 的针管刺进小鼠的左心室,剪开右心耳,以较快的流速(35-40 rpm)开始灌流。

灌入 PFA: 等到肝、肺、爪子等器官发白,血管内的血液基本被冲净时,将 PBS 更换成 PFA。仍以原先的流速先灌流 5-10 mL PFA,再换成 28 rpm 的流速 灌流 20-25 mL PFA, PFA 的总量在 30 mL 左右,期间小鼠心脏变硬,脚可能会跳动,灌流完毕。

后固定: 取脑。将取出的小鼠大脑先用 PFA 后固定至少 6 小时,再用 20 %的蔗糖浸泡 15-18 小时,直至大脑在蔗糖溶液中沉底,最后用 30 %的蔗糖浸泡 18-20 小时,至大脑沉底。

### 5.3 免疫荧光

### 5.3.1 冷冻切片

包埋:切片前先将小鼠大脑包埋,在-80℃冰箱中保存过夜。

样品固定:将包埋好的脑从铝箔盒中取出,用 OCT 固定在圆形底座上(嗅球朝上,基底核朝下)。将载玻片用铅笔做好标记(老鼠品种、性别、编号等),提前放入冰冻切片机中。

组织切片:刚开始切片时每片厚度 40-50µm,切去不需要的部分,并在这个 过程中进行调平。切至所需脑区时,盖上防卷盖,每片厚度改为 25µm。用毛笔 将切好的脑片转移到载玻片上,展平,用指尖的温度从脑片边缘逐渐融化 OCT, 方便其固定在载玻片上。切片过程中用刀片修去多余的 OCT。

样品保存:切片样本保存在-20°C冰箱。

### 5.3.2 NeuN 染色

洗片:用 PBS 洗脑片 3 次,每次 5 min,洗去 OCT。

封闭与一抗:将脑片放置于湿盒中,用 0.5% Triton 处理脑片 30 min,增加细胞膜通透性,方便抗体进入。再用通用型抗体稀释液处理脑片 30 min,降低荧光背景。最后于-4 °C 冰箱中用一抗孵育脑片,过夜。

二抗与 DAPI: 次日将脑片置于室温 40 min, 复温, 用 PBS 洗脑片 3 次, 每次 5 min。室温下用二抗孵化脑片 2h。DAPI 孵化脑片 10min。所用染色液及用量见表 4。

洗片与封片:用 PBS 洗脑片 3 次,每次 5min,封片。

试剂	体积 (µL)	
0.5% Triton	200	
通用型抗体稀释液	200	
一抗	200	
(Iba1+NeuN,通用型抗体稀释液 1:1000 稀释)	200	
二抗	250	
(通用型抗体稀释液 1:1000 稀释)	250	
DAPI	250	

表4 每张脑片所需染色液及用量

### 5.4 福尔马林测痛

小鼠提前在测痛房间中适应一个小时。捏取小鼠左脚向其中注射 10 µL 5%福 尔马林,留针 30s。将小鼠放入测痛箱中观察,用计时器分别记录小鼠舔舐注射 了福尔马林的左脚的时长和抬左脚的时长。每只小鼠做测痛的间隔需要对测痛箱 用酒精进行消毒以及消灭气味。总计对六只小鼠进行测痛。

### 5.5 双箱行为训练

小鼠提前三天在饲养房中倒日夜时差,并且每次训练都提前一小时在行为训 练室中适应。为使两个箱体具有辨识度,一侧箱体底部为蓝色,壁侧为横条纹并 在角落滴加了醋酸;另一侧箱体底部为白色,壁侧为竖条纹并且不滴加任何液体 (图 1)。行为训练共三天。第一天预处理。在开始时,每个箱体的入口被打开。 小鼠被放置在初始箱体。在它进入任何一个箱体后,通向初始箱体的两扇门被关 闭,小鼠在两个箱体中自由探索 15min。在每个箱体里花费的时间由计时器自动 记录。表现出任何偏好偏差的小鼠被排除在实验之外。第二天是训练日,在这段 时间内,所有的门都关闭。首先将小鼠放在一侧箱体中45min不做任何处理,进 行环境匹配。接着让小鼠回到笼子中休息 2h,然后将脚部注射了福尔马林的小 鼠(注射方式和测痛一样)放在另一侧箱体中进行条件匹配,对照组则脚部注射 生理盐水,其他处理方法相同。第三天是测试日。其过程与第一天相同,记录小 鼠在每个箱体所待的时间。所待时间越短证明小鼠对该模型的反应越大。获得 CPA 评分(处理前在与处理配对的箱体所待时间与处理后在同一箱体所待时间 的差值)。



图1 小鼠训练所用回避实验箱

### 6 技术路线

本课题的技术路线如图2所示。



图 2 技术路线

# 三、研究结果

1 福尔马林疼痛评分



图 3 福尔马林疼痛评分曲线

如图 3 为对六只小鼠进行测痛后得到的福尔马林疼痛评分曲线。右边为小鼠 编号 1-6,不同小鼠的测痛结果以不同颜色展示。纵坐标分数由时间(min)转换, 横坐标表示注射后时长,单位横坐标为 5min。可以看见前 5min(第一段时间) 小鼠舔脚和抬脚的动作较为频繁,此时处于急性疼痛期。5-10min(第二段时间) 时小鼠的动作较少,此时急性疼痛已缓解。此后(第三段时间后)小鼠的舔脚和 抬脚行为又开始增加并持续一段时间,此时小鼠处于慢性疼痛期。一段时间后(约 45min),小鼠的舔脚及抬脚行为减少并趋近为零,此时小鼠疼痛已经缓解。整体 而言,该福尔马林疼痛评分曲线证明实验者注射福尔马林等操作以及福尔马林对 小鼠的行为影响是有效的。



图 4 构建福尔马林诱导的位置回避模型

a 小鼠未处理前(day1)在两个箱体(zone1, zone2)所待时间没有显著差异(t 检验, p=0.15, ns); b 小鼠处理后(day3)的 CPA 评分(CPA 评分=处理前在与处理配 对的箱体所待时间-处理后在同一箱体所待时间),对照组与实验组小鼠 CPA 评分具 有显著差异(t 检验, p<0.05)

如图,第一天预处理时小鼠对两个箱体没有位置偏好。第三天进行测试时, 福尔马林组小鼠表现出对环境匹配箱体的偏好;而生理盐水组小鼠表现出对条件 匹配箱体(注射生理盐水时放入的箱体)的偏好。两组小鼠对箱体的偏好在统计 学上是明显的。这初步说明小鼠对注射了福尔马林后所在的箱子有回避行为,福 尔马林回避模型是可靠的。但是本组实验只用了6只小鼠,需要更多的小鼠进行 训练来验证,使结果更为可靠。

3 确认投射关系及化学损毁位点

3.1 投射关系



图 5 前扣带皮层向 CA 区投射

a 为小鼠大脑冠状位图谱的某一横切面; b 为该横切面的双光子串行扫描图, 箭头 所示为 EGFP 在前扣带皮层的信号, 投射信号密度(Projection Density) 0.014, 所 用示踪类型为 EGFP, 小鼠类型 C57BL/6, 投射信号密度=投射信号体积/结构体积, Allen Mouse Brain Connectivity Atlas, contunestinion.brain-map.org/projection/expe riment/127649005



图 6 前扣带皮层向内嗅皮层投射

a 为小鼠大脑俯视图,绿色圆点表示注射位点(主要注射区域为内嗅皮层,次要注射区域为 CA1 或下托),绿线表示示踪剂投射路径; b 为小鼠大脑侧视图,绿色圆

点表示注射位点(主要注射区域为内嗅皮层,次要注射区域为 CA1 或下托),绿 线表示示踪剂投射路径; c 为小鼠大脑冠状位图谱的某一横切面; d 为该横切面的 双光子串行扫描图,箭头所示为 EGFP 在前扣带皮层的信号,投射信号密度 0.04 7,所用示踪类型为 EGFP,小鼠类型 C57BL/6, Allen Mouse Brain Connectivity Atlas, contunestinion.brain-map.org/projection/experiment/114472145



图 7 海马 CA3 向前扣带皮层投射

a 为小鼠大脑冠状位图谱的某一横切面; b 为该横切面的双光子串行扫描图, 箭头所示为 EGFP 在 CA3 的信号, 投射信号密度为 0.001, 信号较弱, 所用示 踪类型为 EGFP, 小鼠类型 C57BL/6, Allen Mouse Brain Connectivity Atlas, contunestinion.brain-map.org/projection/experiment/146593590

通过在 Allen institute 上查询,本课题初步确定海马和前扣带皮层间存在投射 关系。具体而言,向海马,包括 CA1、齿状回、下托、内嗅皮层等区域注射逆行 示踪剂 rAVV 后在前扣带皮层的腹侧及背侧均发现大量 EGFP 信号,如图 5 为向 海马 CA 区(主要是 CA3)注射逆行示踪剂后在前扣带皮层发现的 EGFP 信号, 信号主要集中在前扣带皮层腹侧,投射信号密度 0.014。此外,向内嗅皮层注射 逆行示踪剂(次要注射区域为 CA1 或下托)发现了较为明确的投射路径(图 6)。 这些结果表明,存在前扣带皮层向海马投射的关系。

向前扣带皮层注射逆行示踪剂后在海马 CA 区、齿状回、内嗅皮层、下托和 灰被等均仅发现信号,其中灰被处信号最强,投射信号密度为 0.090, CA 区投射 集中在 CA3,投射信号密度为 0.001,较弱(图 7)。虽然在海马发现 EGFP 信号, 但是并没有发现明确的投射路径,这与综述部分的论述相符。通过上述查找本课 题初步确认前扣带皮层和海马间存在投射关系,但具体的前扣带皮层对海马腹侧 或背侧的投射还需要进一步实验探索。

### 3.2 化学损毁位点



#### 图 7 化学损毁背侧海马

a 箭头所示为化学损毁位点(AP:-1.4 mm, ML:+1.0 mm, DV:-1.0 mm), 与目标位点背侧海马(AP:-1.6 mm, ML:+2.0 mm, DV:-1.7 mm)有偏离, 蓝色信号为 DAPI标记的细胞核; b 为该位置放大图,箭头所示为 NeuN标记的细胞形态; c 与 b 为同一位置,箭头所示为 Iba1标记的小胶质细胞

对小鼠背侧海马进行化学损毁后的切片、染色结果如图 7,紫色信号 NeuN标记细胞形态,蓝色信号 DAPI标记细胞核,红色信号 Ibal标记胶质细胞。NeuN与 Ibal 共标说明该位点的细胞成功被化学损毁。本实验初步确认了使用 ibo 进行化学损毁的可行性,并尝试确认小鼠大脑需要进行化学损毁的具体位点,但该损毁位点与目标损毁位点相比出现偏离,这可能是因为定位时未寻找到准确的Bregma点,也可能是因为注射过程中给药管出现漏液导致 ibo 未到目标位点就泄露,需要更多的实验进行调整与完善。

# 四、讨 论

本课题的实验首先通过福尔马林测痛证明了福尔马林使小鼠感到疼痛并且 有明显的可以被观察到的行为(舔脚和抬脚),并初步建立了F-CPA模型,初步 确认了前扣带皮层与海马间的投射关系以及小鼠大脑化学损毁的位点。之后的研 究与实验中需要用更多的小鼠进行重复实验,使 F-CPA模型的数据更为可靠并 且增设 S-CPA 实验。此外还需要损毁小鼠的海马腹侧或背侧以及前扣带皮层-背 侧海马和前扣带皮层-腹侧海马两个环路来观察小鼠在条件位置回避模型中的表 现。虽然本课题的实验未完成,但本课题通过实验设计阐述了一种研究前扣带皮 层-海马环路的实验思路,希望对之后的研究有所帮助。此外,本课题通过综述 论述了前扣带皮层-海马环路可能同时介导疼痛相关的恐惧和焦虑。并且前扣带 皮层-背侧海马环路与恐惧情境记忆的产生以及储存有关,而前扣带皮层-腹侧海 马则在恐惧的泛化中至关重要。

总之,疼痛、恐惧和焦虑对人的生存至关重要。更好地了解它们以开发有针 对性的、新颖的、安全和有效的治疗方法已成为全球优先事项。本课题探究前扣 带皮层与海马的联系,可以进一步了解疼痛和恐惧的机制,为开发新的治疗手段 提供一个思路。

# 参考文献

- Tovote P, Fadok J P, Luethi A. Neuronal circuits for fear and anxiety (vol 16, pg 317, 2015)
   [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2015, 16(7).
- [2] Lindsay N M, Chen C, Gilam G, Mackey S, Scherrer G. Brain circuits for pain and its treatment [J]. Science Translational Medicine, 2021, 13(619).
- [3] Rice A S C, Smith B H, Blyth F M. Pain and the global burden of disease [J]. Pain, 2016, 157(4): 791-6.
- [4] Zhuo M. Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions [J]. Trends in Neurosciences, 2016, 39(3): 136-45.
- [5] Gao Y J, Ren W H, Zhang Y Q, Zhao Z Q. Contributions of the anterior cingulate cortex and amygdala to pain- and fear-conditioned place avoidance in rats [J]. Pain, 2004, 110(1-2): 343-53.
- [6] Bornhovd K, Quante M, Glauche V, Bromm B, Weiller C, Buchel C. Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study [J]. Brain, 2002, 125: 1326-36.
- [7] Foltz E L, White L E. PAIN RELIEF BY FRONTAL CINGULUMOTOMY [J]. Journal of Neurosurgery, 1962, 19(2): 89-+.
- [8] Zhang Q, Manders T, Ai Phuong T, Yang R, Garg A, Martinez E, et al. Chronic pain induces generalized enhancement of aversion [J]. Elife, 2017, 6.
- [9] Borsook D, Linnman C, Faria V, Strassman A M, Becerra L, Elman I. Reward deficiency and anti-reward in pain chronification [J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2016, 68: 282-97.
- [10] Chen T, Wang J, Wang Y-Q, Chu Y-X. Current Understanding of the Neural Circuitry in the Comorbidity of Chronic Pain and Anxiety [J]. Neural Plasticity, 2022, 2022.
- [11] Moon H C, Heo W I, Kim Y J, Lee D, Won S Y, Kim H R, et al. Optical inactivation of the anterior cingulate cortex modulate descending pain pathway in a rat model of trigeminal neuropathic pain created via chronic constriction injury of the infraorbital nerve [J]. Journal of Pain Research, 2017, 10: 2355-64.
- [12] Tsuda M, Koga K, Chen T, Zhuo M. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex [J]. Journal of Neurochemistry, 2017, 141(4): 486-98.
- [13] Koga K, Descalzi G, Chen T, Ko H-G, Lu J, Li S, et al. Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain (vol 85, pg 377, 2015) [J]. Neuron, 2015, 86(4): 1109-.
- [14] Li X-Y, Ko H-G, Chen T, Collingridge G L, Kaang B-K, Zhuo M. Erasing injury-related cortical synaptic potentiation as a new treatment for chronic pain [J]. Journal of Molecular Medicine-Jmm, 2011, 89(9): 847-55.
- [15] Fanselow M S, Dong H-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? [J]. Neuron, 2010, 65(1): 7-19.
- [16] Czerniawski J, Yoon T, Otto T. Dissociating Space and Trace in Dorsal and Ventral Hippocampus [J]. Hippocampus, 2009, 19(1): 20-32.
- [17] Lavenex P B, Amaral D G, Lavenex P. Hippocampal lesion prevents spatial relational

learning in adult macaque monkeys [J]. Journal of Neuroscience, 2006, 26(17): 4546-58.

- [18] Bonne O, Vythilingam M, Inagaki M, Wood S, Neumeister A, Nugent A C, et al. Reduced posterior hippocampal volume in posttraumatic stress disorder [J]. Journal of Clinical Psychiatry, 2008, 69(7): 1087-91.
- [19] Mcnaughton N, Gray J A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety [J]. Journal of Affective Disorders, 2000, 61(3): 161-76.
- [20] Tyrtyshnaia A, Manzhulo I. Neuropathic Pain Causes Memory Deficits and Dendrite Tree Morphology Changes in Mouse Hippocampus [J]. Journal of Pain Research, 2020, 13: 345-54.
- [21] Bilbao A, Falfan-Melgoza C, Leixner S, Becker R, Singaravelu S K, Sack M, et al. Longitudinal Structural and Functional Brain Network Alterations in a Mouse Model of Neuropathic Pain [J]. Neuroscience, 2018, 387: 104-15.
- [22] Ma L, Yue L, Zhang Y, Wang Y, Han B, Cui S, et al. Spontaneous Pain Disrupts Ventral Hippocampal CA1-Infralimbic Cortex Connectivity and Modulates Pain Progression in Rats with Peripheral Inflammation [J]. Cell Reports, 2019, 29(6): 1579-+.
- [23] Scoville W B, Milner B. LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS [J]. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 1957, 20(1): 11-21.
- [24] Penfield W, Milner B. MEMORY DEFICIT PRODUCED BY BILATERAL LESIONS IN THE HIPPOCAMPAL ZONE [J]. Archives of Neurology and Psychiatry, 1958, 79(5): 475-97.
- [25] Salmon D P, Lasker B R, Butters N, Beatty W W. REMOTE MEMORY IN A PATIENT WITH CIRCUMSCRIBED AMNESIA [J]. Brain and Cognition, 1988, 7(2): 201-11.
- [26] Rempelclower N L, Zola S M, Squire L R, Amaral D G. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation [J]. Journal of Neuroscience, 1996, 16(16): 5233-55.
- [27] Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage [J]. Nature, 1999, 400(6745): 671-5.
- [28] Frankland P W, Bontempi B, Talton L E, Kaczmarek L, Silva A J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory [J]. Science, 2004, 304(5672): 881-3.
- [29] Frankland P W, Bontempi B. The organization of recent and remote memories [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2005, 6(2): 119-30.
- [30] Kogan J H, Frankland P W, Silva A J. Long-term memory underlying hippocampusdependent social recognition in mice [J]. Society for Neuroscience Abstracts, 1999, 25(1-2): 642-.
- [31] Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, Toyoda H, Wu L-J, Zhao M-G, et al. Upregulation of CREB-Mediated Transcription Enhances Both Short- and Long-Term Memory [J]. Journal of Neuroscience, 2011, 31(24): 8786-802.
- [32] Hitti F L, Siegelbaum S A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory [J]. Nature, 2014, 508(7494): 88-+.
- [33] Zinn C G, Clairis N, Silva Cavalcante L E, Guerino Furini C R, Myskiw J D C, Izquierdo I. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(33): E4914-E9.

- [34] Tanimizu T, Kenney J W, Okano E, Kadoma K, Frankland P W, Kida S. Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory [J]. The Journal of Neuroscience, 2017, 37(15): 4103-16.
- [35] Pan S, Mayoral S R, Choi H S, Chan J R, Kheirbek M A. Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation [J]. Nature Neuroscience, 2020, 23(4): 487-+.
- [36] Gafford G M, Parsons R G, Helmstetter F J. Memory accuracy predicts hippocampal mTOR pathway activation following retrieval of contextual fear memory [J]. Hippocampus, 2013, 23(9): 842-7.
- [37] Guzowski J F, Setlow B, Wagner E K, Mcgaugh J L. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268 [J]. Journal of Neuroscience, 2001, 21(14): 5089-98.
- [38] Frankland P W, Ding H-K, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva A J. Stability of recent and remote contextual fear memory [J]. Learning & Memory, 2006, 13(4): 451-7.
- [39] Fukushima H, Zhang Y, Archbold G, Ishikawa R, Nader K, Kida S. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation [J]. Elife, 2014, 3.
- [40] Teixeira C M, Pomedli S R, Maei H R, Kee N, Frankland P W. Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory [J]. Journal of Neuroscience, 2006, 26(29): 7555-64.
- [41] Bian X-L, Qin C, Cai C-Y, Zhou Y, Tao Y, Lin Y-H, et al. Anterior Cingulate Cortex to Ventral Hippocampus Circuit Mediates Contextual Fear Generalization [J]. Journal of Neuroscience, 2019, 39(29): 5728-39.
- [42] Ortiz S, Latsko M S, Fouty J L, Dutta S, Adkins J M, Jasnow A M. Anterior Cingulate Cortex and Ventral Hippocampal Inputs to the Basolateral Amygdala Selectively Control Generalized Fear [J]. Journal of Neuroscience, 2019, 39(33): 6526-39.
- [43] Adhikari A, Topiwala M A, Gordon J A. Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety [J]. Neuron, 2010, 65(2): 257-69.
- [44] Padilla-Coreano N, Bolkan S S, Pierce G M, Blackman D R, Hardin W D, Garcia-Garcia A L, et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior [J]. Neuron, 2016, 89(4): 857-66.
- [45] Ciocchi S, Passecker J, Malagon-Vina H, Mikus N, Klausberger T. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons [J]. Science, 2015, 348(6234): 560-3.

### 致 谢

因为疫情,本科生涯的最后一个学期以一个意想不到的方式结束了,来不及 做完原计划进行的实验;来不及和朋友、老师好好道别;也来不及完成毕业前把 美食列表上每一家店都尝一遍的目标……因为疫情,本科四年走完中国大江南北 的计划停留在了 20 年到达的湖南;许多想去现场的演唱会也遥遥无期……疫情 给我带来了太多的影响。但是,大学四年我并没有留下什么遗憾,就像做不完的 实验可以通过文献补充,吃不完的店可以之后再吃,总有一条路可以继续前行。 这四年我尝试了许多事,有些成功了,有些不了了之,但就像我很喜欢的一句话 "人类的伟大是勇气的伟大",或许重要的并不是这些事成功与否,而是心怀好 奇不断探索的勇气。在此我想感谢这一路上给予了我勇气的人。

首先感谢我的父母,他们永远是我最坚实的后盾。

感谢我的导师肖晓老师,肖老师是一位认真负责的老师,我也十分尊敬她严 谨治学、不断探索的态度。进入肖老师的实验室后,无论是学术视野还是实验技 术等方面我的能力都有了提高,也是在这里,我开始从实践中而非书本上了解神 经科学领域,这对我意义重大。

我还需要感谢蔡师姐,感谢师姐抽出时间为我提供论文写作方面的帮助。也 感谢实验室包括蔡师姐在内的各位前辈,感谢他们在我进行实验室学习的过程中 提供的各种帮助。

当然,我还要感谢我的朋友以及室友们。很高兴与她们一起在大学创造了许 多难忘的回忆。因为有她们,即使在最艰难的封闭时期我也并不感到我是独自一 人。

最后,我要感谢万叶、胡桃、阿贝多、魈、钟离以及每一个我喜欢的纸片人, 虽然他们是虚拟的,但他们带给我的快乐是真实且无可替代的,感谢他们陪伴我 度过了最为焦虑的一段时期。

大学本科四年的生活就此结束,但新的旅途即将开始,希望我能不忘初心, 永远怀揣着热情与勇气走下去。

指导教师对 <b>论文学术规范的</b> 审查 <b>意见:</b>			
√ 本人经过尽职审查,未发现毕业论文有学术不端行为。			
□ 本人经过尽职审查,发现毕业论文有如下	F学术不端行为:		
指导教师签名:	日期: 2022 年 6 月 29 日		
指导教师评语:	答辩委员会(小组)评语:		
唐笙愉同学毕业论文原定于通过小鼠疼痛 和恐惧条件下的位置回避探究前扣带皮层 和杏仁核与海马的联系,需要通过使用课题 组自主设计的三箱行为模型以及经典的双 箱条件位置模型,以小鼠作为研究对象,检 测生理性疼痛与心理性恐惧诱导的两种情 绪类型,验证此两种情绪类型的神经环路差 异和神经机制,借由化学损毁的手段验证海 马脑区在与外界形成环路后在负面情绪中 的作用。但由于疫情影响,无法完成原实验 设计和操作,在前期实验基础上,改为综述 前扣带皮层-海马环路在恐惧与焦虑中的作 用。论文综述了前扣带皮层-背侧海马环路 与恐惧情境记忆的产生以及储存有关,而前 扣带皮层-腹侧海马则在恐惧的泛化中至关 重要。并结合相应假说,利用实验验证了在 双箱条件下疼痛诱发负面情绪的行为学指 标,以及前扣带皮层和海马的投射关系。			
<ul><li> 签名: 2022 年 6 月 29 日</li></ul>	签名: 20 年 月 日		
学分	成绩		

备	注	:
Ħ	1工	÷

### 教务处制