



• 特约综述 •

慢性疼痛的中枢记忆印迹细胞机制

齐雪涛 西珂 万有[△]

(北京大学神经科学研究所, 北京大学基础医学院医学神经生物学系, 教育部/国家卫生健康委员会神经科学重点实验室, 北京 100191)

摘要 慢性疼痛的症状主要包括自发疼痛、痛觉敏化和超敏, 往往伴随有抑郁和焦虑、记忆及认知功能损害等病症。在疼痛慢性化过程中, 大脑作为将伤害性刺激整合为疼痛体验的最高中枢在结构和功能上都发生了复杂的变化, 而在疼痛慢性化的中枢机制研究中, 近年来越来越多地开始关注中枢神经系统中疼痛相关的记忆印迹细胞。本文在简要介绍印迹细胞研究的理论基础与技术方法基础上, 介绍了中枢印迹细胞参与慢性疼痛的记忆机制。

关键词 慢性疼痛; 疼痛慢性化; 印迹细胞

Research progress on cerebral engram cells in chronic pain *

QI Xuetao, XI Ke, WAN You [△]

(Neuroscience Research Institute, Department of Neurobiology School of Basic Medical Sciences, Key Lab for Neuroscience Ministry of Education/National Health Commission of China, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Chronic pain patients suffer from spontaneous pain, allodynia, hyperalgesia and even emotional or cognitive impairments. The brain transforms nociception into pain, shows complicated changes in constructions and functions in the process of pain chronicity. In past few years, more researchers tried to investigate pain chronicity through memory engram, namely pain related engram cells. Here we introduce the theoretical basis and technical approaches of engram cells, and summarize the latest progress on pain engram cells in the development of chronic pain.

Keywords chronic pain; pain chronicity; engram cell

疼痛是一种与实际或潜在的组织损伤相关的不愉快的感觉和情绪情感体验, 或与此相似的经历^[1]。生理性疼痛原本是机体的正常保护机制, 但慢性化的疼痛(慢性疼痛)却成为一种疾病, 给医疗系统和社会经济带来严重的负担。慢性疼痛发生与维持的机制研究主要集中在三个方面: 外周敏化(外周神经纤维及背根神经节的敏化)、脊髓层面的中枢敏化和大脑中枢层面的结构功能重塑。其中, 疼痛慢性化在大脑层面的中枢机制受到越来越多的关注。原因在于, 一方面伤害性刺激信息需要在大脑中进行整合才能形成疼痛; 另一方面, 慢性疼痛通常伴有情绪以及认知障碍的共病, 例如焦虑、抑郁、认知障碍等^[2], 而这些涉及情绪和认知的高级功能

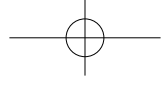
都需要在大脑层面进行整合, 都提示慢性疼痛会导致中枢层面大脑的改变和重构。

研究表明, 既往有过慢性疼痛经历且已经完全恢复后的病人或者大鼠, 再次遭遇急性伤害性刺激会表现出更强的反应和更低的痛觉阈值, 前边缘皮质部分神经元的激活在这一过程中是必要的^[3,4]。显然, 过往的疼痛记忆显著地改变了动物对相似刺激的反应模式, 那么这些疼痛记忆是否在疼痛慢性化中发挥了相似的作用?

领域内学者很早就提出相关理论, 即慢性疼痛本质是初始疼痛记忆在大脑内的持续复现, 或者是对初始疼痛记忆遗忘失能的一种疾病^[5]。与此同时, 还存在着另一个同样重要的问题, 即这些疼痛相关

* 基金项目: 国家自然科学基金(81974166, 91732107); 北京市自然科学基金(7202083)

[△] 通信作者 万有 ywan@hsc.pku.edu.cn



的记忆以何种形式, 存储在大脑中的什么位置? 记忆印迹 (engram) 的概念由德国心理学家 Richard Semon 于 1921 年为解释记忆的物质基础所提出, 初始时定义为由刺激产生的持久但潜在的实质改变^[6]。而近些年来, 随着分子生物学和多种成像记录技术的发展, 研究者发现海马齿状回存在编码恐惧记忆的神经元群, 且激活这群神经元可以复现动物的恐惧记忆, 由此记忆的印迹细胞 (engram cell) 概念被提出^[7]。随后定位在不同脑区, 编码不同记忆的印迹细胞被学者们广泛发现, 领域内对于记忆编码的物质基础有了更多更为深刻的认识。由于国内目前尚无关于印迹细胞在疼痛慢性化中机制的综述文章, 本文总结了印迹细胞研究的理论基础与技术方法, 同时结合国内外最新研究进展对印迹细胞在慢性疼痛中的功能进行了梳理。

一、中枢不同脑区参与疼痛慢性化

慢性疼痛在大脑中枢层面的研究始于采用功能磁共振成像方法对慢性疼痛病人大脑结构以及功能连接的研究。影像学研究发现, 在结构上, 慢性疼痛病人的前额叶皮质、躯体感觉皮质、岛叶、杏仁核、脑干和丘脑灰质密度显著降低^[8-10]。在脑区功能上, 当慢性疼痛病人出现自发痛时, 其大脑内侧前额叶皮质、岛叶、丘脑、伏隔核和杏仁核的活动都明显的升高^[10-12], 且慢性疼痛病人的内侧前额叶活动性与自发疼痛的强度与反复发作都存在显著的正相关^[13,14]。在脑区功能连接度上, 在疼痛慢性化转化过程中, 海马与皮质之间的功能连接度下降^[15]; 慢性疼痛病人出现自发痛时, 前额叶皮质与纹状体之间的功能连接显著增强; 而在慢性复杂区域性疼痛病人中, 腹内侧前额叶和岛叶间的功能连接度增强, 而与基底神经节之间的连接减弱^[16]。

动物研究发现, 慢性神经病理性疼痛模型小鼠中, 躯体感觉皮质的锥体神经元兴奋性升高, 通过化学遗传学的方法, 激活躯体感觉皮质的生长激素抑制素 (somatostatin) 阳性中间神经元、进而抑制躯体感觉皮质锥体神经元的活动, 可以阻止疼痛的慢性化^[17]。Metz 等^[18] 则发现, 慢性神经病理性疼痛模型大鼠的内侧前额叶 2/3 层锥体神经元树突棘大小和密度显著升高, 且其锥体神经元兴奋性传递水平显著升高。然而在慢性神经病理性疼痛模型小鼠中, Huang 等^[19] 却发现内侧前额叶前边缘皮质 5 层锥体神经元的兴奋性水平下降, 并证明这一过程是由于来自基底外侧杏仁核的投射所介导的内侧前额叶中间能神经元调控导致的。

慢性神经病理性疼痛也会引起动物杏仁核的树

突结构复杂性增加, 谷氨酸能神经元的兴奋性提高, 而且基底外侧杏仁核内存在有一群编码疼痛相关负性情绪的神经元, 在慢性神经病理性疼痛中抑制这群神经元可以缓解疼痛的负性情绪^[20,21]。Jiang 等^[22] 发现在慢性炎症痛小鼠中, 化学遗传学方法抑制或激活内侧隔核的胆碱能神经元都可以缓解痛感觉与痛情绪, 并证明这一功能是通过分别影响内侧隔核到喙侧前扣带回皮质和内侧隔核到腹侧海马 CA1 区的两条投射通路来实现的。

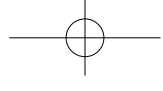
以上动物的研究提供了与人类脑成像研究大体相似的结论, 即慢性疼痛引起的中枢神经系统内多个脑区的结构和功能两方面的改变, 同时痛矩阵相关脑区的环路也发生了重构。此外, 啮齿类动物研究也提示, 疼痛慢性化过程中边缘系统各个脑区内部神经元存在明显的功能异质性。

二、印迹细胞及其研究策略

1. 印迹细胞的定义

如前文所述, 记忆印迹的理论早在一个世纪以前就被提出, 但受限于当时的知识框架和技术水平, 学者并无法解释记忆印迹的生物学基础。而随着接下来近百年时间里, 分子生物学、细胞生物学、基因组学以及复杂成像和电生理记录分析的快速发展, 使学者们对神经元、神经突触和神经环路都有了更为深刻的认识。而在这一过程中, Reijmers 等^[23] 首先发现了在听觉匹配的条件恐惧学习中, 外侧杏仁核中通过即刻早期基因 (immediate early genes, IEGs) 的表达标记的神经元与三天后再次暴露于同一恐惧环境的激活的神经元高度一致, 提示了在这一过程中动物学习记忆存储的细胞基础。紧随其后, Han 等^[24] 利用环磷腺苷效应元件结合蛋白 (Ca^{2+} /cyclic AMP-responsive element-binding protein, CREB) 标记后消融的方法, 在小鼠的外侧杏仁核特定敲除了参与到听觉匹配的条件恐惧学习中的神经元, 证实存在一群神经元对于听觉恐惧记忆是必要的。最终, Liu 等^[7] 通过 IEGs 表达标记结合光遗传学操控, 第一次证明了激活小鼠海马齿状回部分特定神经元就可以复现其恐惧记忆的表达, 这也是领域内第一次证明存在激活一群特定神经元对于特定记忆的表达是充分的。由此, 印迹细胞作为记忆存储可能的生物学基础之一被提出, 定位于大脑不同脑区的、编码不同记忆的细胞如雨后春笋般被世界各地的研究者所报道。

在 2015 年, 作为当代印迹细胞理论研究先驱的 Tonegawa 也在综述文章中对印迹细胞进行了如下定义: “印迹细胞是一群编码了特定记忆印迹的



关键神经元群,但并不代表这群只参与这一种记忆印迹的编码。印迹细胞有如下三个特征:①在学习过程中被激活;②在学习过程中出现物理或者化学层面的改变;③在再次暴露在之前学习过程的环境或者刺激中时印迹细胞会被再激活^[25]。”

以上研究提供了一定的证据,支持记忆印迹细胞的存在。在此基础上,一些学者基于赫布理论(Hebbian theory)的框架认为,记忆并不是存储在单独的细胞中,记忆的存储是通过神经元之间的连接进行调整来实现的,因而记忆的存储与提取都是通过改变大脑中部分神经网络的连接和活动模式实现的^[26]。也有学者认为记忆编码于神经元之间的连接,即突触变化编码记忆,与印迹细胞理论本质上并不冲突,相关理论仍有待进一步的研究支持^[27]。

2. 印迹细胞的标记策略

当动物经历特定行为事件时,大脑中与此行为相关的脑区中部分与此行为相关的神经元会被激活,同时会伴随有(如 c-fos、Arc 等) IEGs 的表达^[28,29]。以此为基础,研究者们先后开发了基于 IEGs 启动子驱动相关标记或调控元件的多种神经元活性激活标记系统,包括四环素转录调控系统(tetracycline on/off, Tet-on/off)、激活神经元内重组酶系统(targeted recombination in active populations, TRAP)和激活神经元捕获系统(capturing activated neuronal ensembles, CANE)等^[23,30,31]。另一方面,当相关神经元被激活时,细胞内 Ca^{2+} 浓度会迅速升高,于是另一些学者基于 Ca^{2+} 浓度变化、结合光学控制开发了例如钙离子和光学门控的神经元控制(Cal-light),快速光学和钙离子调节表达技术(fast light- and activity-regulated expression, FLARE)等多种标记时间窗更为精确的神经元活性激活标记系统^[32,33]。

下文将依次介绍以上几种神经元活性激活标记系统的实现策略以及结合相应工作分析其优势及不足。

(1) Tet-on/off 系统

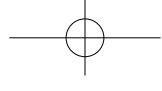
四环素系统来源于大肠杆菌获得抗药性分子操纵系统,系统可以分为四环素阻遏蛋白(Tet repressor protein, TetR)与四环素操纵子(Tet operator, TetO),两者能够特异性结合。当细胞内无四环素存在时,TetR 会与 TetO 结合,从而阻断下游抗性基因表达;当有四环素存在时,四环素使 TetR 构象发生改变,导致 TetR 与 TetO 分离,使下游抗性基因得以表达,细菌从而获得耐药性^[34]。

从 20 世纪末起该系统就被广泛被用于实现体外细胞系特定时间表达目的蛋白,而 Reijmers 等^[23]

在 2007 年创造性地将 c-fos 启动子与四环素转录调控系统相结合,创造了用于神经系统内标记时间窗内激活神经元的 cfos-htTA 转基因小鼠。这套系统本质上是一套四环素关闭系统。它由携带有 c-fos 启动子和四环素控制的激活因子(tetracycline-controlled transactivator, tTA; 等同于 TetR)的 cfos-htTA 转基因小鼠,与携带有 Tet 操纵元件(tetracycline-responsive element, TRE; 等同于 TetO)元件及后续目标元件转基因动物或病毒共同组成(见图 1A)。其中,cfos-htTA 转基因小鼠在经历一些特定事件诱导相关神经元激活时,其神经元内 c-fos 启动子序列被激活,进而使下游 tTA 序列进行转录翻译,从而表达 tTA 蛋白。随后, tTA 蛋白结合于 TetO 或 TRE 序列,并驱动连接于 TetO 或 TRE 序列后的目标原件进行表达。最重要是,当多西环素(doxycycline, Dox)存在时, Dox 会与 tTA 蛋白紧密结合,从而使 tTA 无法与 TetO 或 TRE 序列结合来驱动下游目标元件表达。因此,通过控制 Dox 在小鼠大脑内的存在与否,可以精确地实现标记特定时间窗内激活的神经元,从而精确地标记特定行为事件相关的神经元。

迄今为止,这套转基因小鼠 Tet-off 系统已经广泛运用于神经科学领域的研究中,尤其集中在学习记忆相关领域^[7,25,35,36]。cfos-htTA 转基因小鼠的活性激活标记系统存在繁育便利、标记充分等优点,而且 cfos-htTA 转基因小鼠当初被设计为双转基因动物,除用了 Tet-off 系统相关的 c-fos 启动子驱动的 tTA 元件外,还有一个 c-fos 启动子驱动的 2 小时半衰期的核定位的绿色荧光蛋白(2-h half-life enhanced green fluorescent protein, shEGFP)元件,这个 shEGFP 被设计与 c-fos 蛋白的代谢半衰期相似,可以很好地作为事件相关激活神经元的荧光报告蛋白(见图 1A)。

当然这套系统也存在其明显地局限性,例如基于其 Dox 时间窗控制的机制,导致标记时间窗无法精确到小时级别,也导致可能存在大量的背景标记^[30]。同时受限于四环素操纵系统的机制,这套系统无法用于激活神经元的永久标记。最初这套系统基于 cfos-htTA 转基因小鼠,因此限制了物种使用范围。而 2016 年 Sorensen 等^[37]发表的研究中,将基于 c-fos 的 IEGs 启动子增强改造为 PRAM 启动子,随后他们将整套的 Tet-off 系统包装于同一个质粒中(见图 1B),且证明了该套系统可以通过病毒表达在猕猴、啮齿类动物和果蝇上,并较好地进行活性激活标记,为这套系统在多物种间广泛使用提供了更多可能。



(2) TRAP 系统

TRAP 系统设计则基于 IEGs 启动子驱动的诱导型重组酶 (cyclization recombination enzyme estrogen receptor, CreER), 而 CreER 只有在结合他莫昔芬 (tamoxifen, TM) 或四羟基他莫昔芬 (4-hydroxy-tamoxifen, 4-TM) 构型发生变化后, 才可以通过核孔, 进入细胞核发挥重组酶功能。当通过病毒注射或转基因杂交使 TRAP 系统转基因小鼠神经元内存在 Cre 重组酶识别位点, 如 LSP (LoxP-STOP-LoxP) 或 DIO (double-floxed inverse open reading frame) 时, 给予动物 TM 或 4-TM 注射后的一定时间窗内, 特定行为事件激活的神经元就会表达目标元件 (见图 1C)。

该系统发表以来, 有多篇研究在不同行为模式, 不同脑区证实了该系统在活性激活标记中的有效性^[39-42]。由于使用半衰期更短的药物 tamoxifen 或 4-hydroxytamoxifen 来诱导重组酶系统入核, TRAP 系统相较于 Tet-on/off 系统具有标记时间窗更精确、背景标记更少的优点, 但同时由于 CreER 的诱导效率相对较低, 也存在激活神经元标记不够充分的问题, 且有研究发现由于 CreER 的敲入, 内源性 c-fos 和 Arc 的表达受到了影响^[30]。

(3) CANE 系统

CANE 系统则设计创建了携带有 c-fos 启动子驱动的、基因改造过的瞬时表达禽类受体 (transiently express the avian receptor, TVA) 的 FosTVA 转基因小鼠, 而 TVA 只能识别特定包膜蛋白的假病毒颗粒 (envelope glycoprotein of subgroup A coated virus, EnvA-coated virus)。因此, 当给予 FosTVA 转基因小鼠经历特定行为事件后, 激活的神经元将表达 TVA, 之后在一定时间窗内, 给予小鼠特定脑区 EnvA-coated virus 注射即可以使假病毒颗粒进入 TVA 阳性神经元内 (见图 1D), 从而达到活性激活标记的目的^[30]。随后, 开发 CANE 系统的实验室, 通过此系统标记并操作了中央杏仁核一群被异氟烷麻醉激活的神经元, 进一步证明了该系统的稳定性^[43]。此系统由于引入了改造后的禽类受体 TVA, 因此在标记特异性上效果较好, 但由于需要在行为后短期内对动物进行立体定位脑区注射, 存在对动物行为情绪影响的可能性, 需要进一步观察其他使用此系统的研究成果。

(4) Cal-light 与 FLARE 系统

随着基于 IEGs 启动子的活性激活标记系统在领域内被广泛使用, 其局限性受到越来越多研究者的关注, 如无法精确到小时以内的标记时间窗分辨率, 以及受限于 IEGs 启动子的活动模式而无法很

好标记中间神经元等。于是在 2017 年, 基于光学精确时间门控和钙离子活动依赖的两个研究, 为活性激活标记领域带来了更多的选择。Cal-light 和 FLARE 有着近似的工作原理 (见图 1E, F), 他们的设计都不约而同地基于蛋白互作系统 Tango 的模块式基因表达组构、基因编辑钙指示剂 (genetically encoded calcium indicators, GECIs) 的钙检测以及燕麦向光素光氧电压结构域 (avena sativa phototropin 1 light-oxygen-voltage domains, LOVs) 的光反应特性这三个模块^[32,38]。

其中蛋白互作系统 Tango 起源于 Notch 信号转导酶切片转位入核调控转录的机制, 开发者以此为灵感引入了烟草蚀刻病毒蛋白酶体 (tobacco etch virus protease, TEVp) 和对应地识别序列 (TEVseq)^[44]。设计者将 tTA 转录因子经由含 TEVp 酶切位点的序列连接在一个 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR) 的胞内段, 当配体结合于 GPCR 激活信号转导时, 磷酸化的受体会募集胞内的遏制蛋白 (arrestin) 对自己的活化进行负反馈的自调节遏制。而 Tango 设计中的 arrestin 融合了 TEVp, 当此融合蛋白接近 GPCR 时, TEVp 会识别并酶切掉 TEVseq, tTA 进而从膜上释放下来, 入核启动目的基因表达。而 Cal-Light 和 FLARE 以 Tango 模块的思路引入了 GECIs 来检测胞内钙离子以实现细胞激活水平的探测。GECIs 包括含有 Ca^{2+} 结合结构域的钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 和钙调蛋白结合肽 M13 或 M2。当 Ca^{2+} 结合与 CaM 会使其构象发生改变, 进而 CaM 则可以与 M13 或 M2 结合, 引发嵌合荧光蛋白构象变化而使之可以被激发光激发^[45]。Cal-Light 和 FLARE 的开发者巧妙地使用 CaM 和 M13 或 M2 替换了 Tango 系统中的 GPCR 和 arrestin, 使 Ca^{2+} 的浓度成为模块结合与否的关键。

FLARE 中研究者将 M2 与 tTA 通过 TEVp 酶切序列连接在一起, 并最终通过一段跨膜区域将上述模块固定在细胞膜内侧。而 CaM 则融合了 TEVp, 这样胞内 Ca^{2+} 浓度上升作为了激活整个系统的配体, 进而实现了 Ca^{2+} 依赖的基因表达。紧接着为了引入特定时间窗从而实现系统对特定刺激的标记, 他们在 M2 与 tTA 元件之间再次引入了光控元件 LOVs 来实现对 TEVseq 位点的隐藏, 使整个系统只有在蓝光照射时引发 LOV 构象变化的情况下, TEVp 酶切位点才会暴露出来, 可以被 TEVp 识别酶切, 使 tTA 元件入核完成精确时间窗内激活神经元的标记 (见图 1E)^[32]。Cal-light 的设计也与 FLARE 基本相同, 设计者只是将 TEVp 割裂成 N 末

端和 C 末端两个片段分别置入到 CaM 和 M13 所在的两个模, 以实现 Ca^{2+} 依赖的基因表达 (见图 1F) [38]。

2017 年这两篇独立工作同时发表在同一期杂志上, 立刻引起了整个学术界的广泛关注。因为依赖于光敏感门控的时间窗可以精确到秒级, 而钙离子依赖的活动性标记也显然契合更多种类神经元的活动模式。然而随后使用的学者们也注意到这两个系统的一些局限性, 例如相对较高的背景标记, 需要三个不同结构的病毒才能实现系统功能等。值得一提的是, FLARE 的开发者 Alice Ting 团队在 2020 年分别推出了 FLARE 系统的两个优化版本

FliCRE (fast light and calcium-regulated expression) 和 scFLARE (single-chain FLARE), 分别改善了背景噪音较大的问题和降低了该系统实现的复杂度 [46,47]。

3. 印迹细胞的调控及环路研究应用

上述活性激活标记工具的出现, 结合本世纪初突飞猛进的神经活动操纵工具 (如光遗传和化学遗传等), 为实现记忆印迹细胞的调控提供了可能。2012 年开发出 *cfos*-*htTA* 转基因鼠的 Mayford 实验室利用 Tet-off 系统结合化学遗传调控, 发现在新环境中激活电击环境中标记的小鼠激活神经元会导致小鼠对新旧环境形成复杂的合成记忆 [35]。而同年如前文

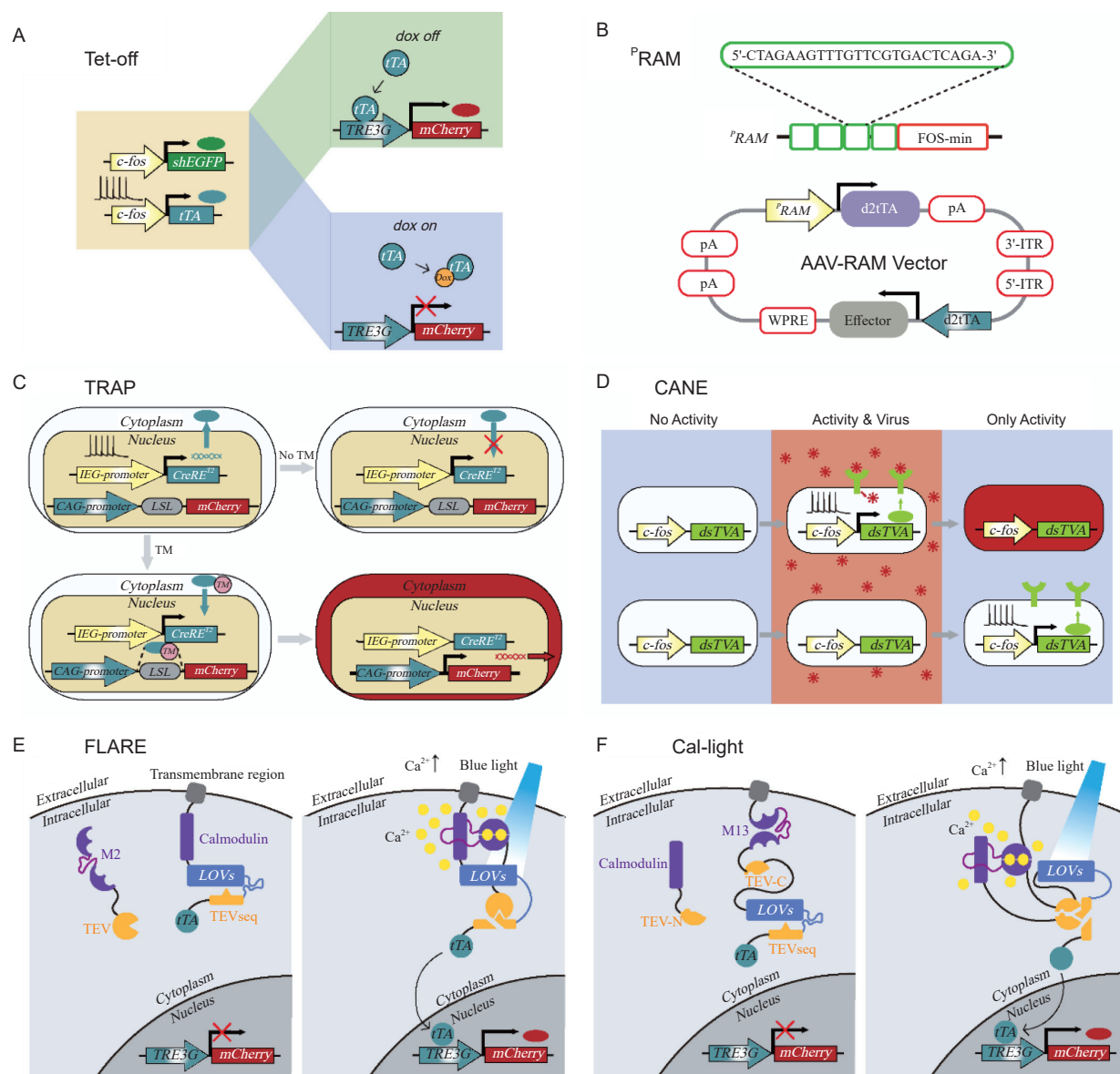
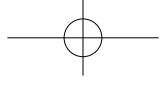


图 1 印迹细胞标记策略的机制

(A) Tet-off 系统; (B) PRAM 系统; (C) TRAP 系统; (D) CANE 系统; (E) FLARE 系统; (F) Cal-light 系统。其中 Tet-off 系统、PRAM 系统、TRAP 系统和 CANE 系统是基于 IEGs 启动子激活机制为基础设计的, 而 FLARE 系统和 Cal-light 系统则依赖于 GECIs 对于 Ca^{2+} 浓度响应的机制。以上配图改编自以下引文 [23,30-32,37,38]。



所述, 来自 MIT 的 Tonegawa 实验室则通过 Tet-off 系统标记结合光遗传学操控, 发现在完全不同的新环境中激活在电击环境中标记的小鼠海马齿状回部分特定神经元就可以提取对应的恐惧记忆^[7]。一石激起千层浪, 学习记忆领域内的学者在随后的几年里纷纷投入到记忆印迹细胞的研究当中, 先后在小鼠后压皮质 (retrosplenial cortex, RSC)、基底外侧杏仁核 (basolateral amygdala, BLA) 中发现了编码条件恐惧记忆范式中的环境记忆和与非条件性电极刺激的印迹细胞^[48,49]。而 Tonegawa 实验室更是证实了通过对印迹细胞的调控, 可以为小鼠制造出虚假的恐惧记忆, 甚至通过激活正向情绪标记的印迹细胞就可以缓解动物的抑郁情绪^[50,51]。此后关于发现编码特定记忆印迹细胞的工作不一而足, 此处不一一赘述, 但基于印迹细胞的记忆理论, 在得到大量工作支持后在领域内越来越受到重视。

大脑的复杂性基础并不是基于数量惊人的神经元本身, 而是在此基础上数量级倍的神经连接。此处就不得不提及学习记忆领域内著名的、作为记忆机制理论基石的赫布定律, 即突触前神经元向突触后神经元的持续重复的刺激 (fire together), 可以导致突触传递效能的增加, 突出前神经元和突触后神经元连接在一起 (wire together)。因此, 在很多工作都更多关注于发掘单脑区内的记忆印迹细胞时, Tonegawa 等^[27,36]已经呼吁大家关注印迹细胞在多脑区之间投射连接的功能研究。他们实验室首先发现, 在恐惧记忆从短期记忆向长期记忆转化的过程中, 海马的情景记忆印迹细胞会通过投射, 逐渐促进前额叶皮质的印迹细胞成熟, 这与学习记忆领域内基于场电位活动耦合的记忆系统巩固的理论不谋而合^[52]。随后, 有研究通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术结合上下游病毒耦合, 敲除这条通路上的乙酰化转移酶影响这条印迹细胞环路的功能, 就可以明显地损伤动物的远期恐惧记忆的形成, 进一步支持了这条印迹细胞通路对于记忆存储转化的功能^[53]。与此同时, 在声音匹配的条件恐惧范式中, 听觉皮质到外侧杏仁核印迹细胞功能环路被发现。而在环境匹配的可卡因成瘾范式中, 编码环境记忆的海马印迹细胞与编码成瘾的伏核印迹细胞的功能环路也被证实^[54,55]。

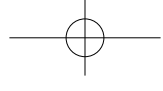
迄今为止, 印迹细胞功能环路的研究仍然处在高潮。基于印迹细胞环路的思路, 发现这些在经典实验中表现出参与特定功能的脑区, 可能由于不同的印迹类型, 参与了更多甚至相反的功能和行为, 而印迹细胞环路也为印迹细胞理论与经典的神经网络

编码记忆理论搭建了可能的桥梁。

三、印迹细胞及其神经环路参与慢性疼痛

尽管巴甫洛夫早在 20 世纪初的论述中就点明, 疼痛可以作为条件性刺激训练实验狗学会匹配的流涎行为, 但疼痛作为如此明确的学习记忆信号却一直没有引起足够的关注^[56]。相较于从学习记忆的角度理解疼痛及其慢性化, 领域内研究者们更习惯于从一种外周感受、中枢处理响应的、转瞬即逝的神经传导信号这一角度来理解疼痛。然而, 2019 年发表于 Science 上的研究, 通过在体钙信号记录结合活性激活标记操纵技术, 第一次证明了小鼠基底外侧杏仁核 (BLA) 脑区存在一群编码疼痛负性情绪的印迹细胞, 在生理情况或慢性神经病理性疼痛中抑制这群细胞都可以降低动物对伤害性刺激的情绪反应。该工作首次将编码疼痛印迹细胞的思路引入研究, 在观察行为学实验的基础上通过标记后调制, 证明了这群印迹细胞作为伤害性刺激产生负性疼痛情绪的必要条件^[20]。然而, 这篇研究并没有关注到疼痛印迹细胞在疼痛慢性化中的作用, 其研究结果也并未证明疼痛印迹细胞与疼痛慢性化的充要关系。

随后, 本课题组在 2022 年的研究工作中, 采用相似的在体钙信号记录结合活性激活标记操纵技术, 发现背内侧前额叶 (dorsomedial prefrontal cortex, dmPFC) 存在一群编码了急性疼痛的印迹细胞, 通过化学遗传学方法在 CFA 慢性炎症痛小鼠模型中抑制这群神经元的活动, 可以有效缓解慢性炎症痛小鼠的痛觉敏化和焦虑情绪。值得一提的是, 通过化学遗传学来长时程激活这群神经元时, 可以诱导小鼠出现慢性疼痛样行为, 包括痛觉超敏、痛觉过敏以及疼痛慢性化伴随的焦虑情绪, 首次证实了编码疼痛基因的印迹细胞与疼痛慢性化的充要关系^[57]。此外, 通过腺相关病毒顺行及逆行示踪、以及在体光纤记录等技术, 我们还发现长时程激活 dmPFC 这群印迹细胞是通过提高了下游的基底外侧杏仁核和外侧臂旁核脑区神经元的活动性, 上调了这两个下游脑区对外周伤害性刺激的响应性, 来调控疼痛慢性化的过程, 从印迹细胞环路上进一步解释了这群细胞功能实现的机制^[57]。另外值得一提的是由斯坦福大学的 Malenka 团队研究发现当小鼠观察同类承受慢性疼痛折磨时会出现由共情所介导的痛阈下降, 而前扣带回皮质存在一群在此过程中被激活的神经元, 且前扣带回皮质至伏核的通路介导了这一共情的行为^[58]。该研究仅将活性激活标记系统作为脑区活动的筛选工具, 在此后的原位和环路调控中仍然采用了完整脑区的遗传学调控, 但其结



果很大可能提示了前扣带回皮质存在由共情过程编码的记忆印迹细胞。

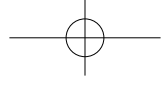
四、总结

慢性疼痛及疼痛慢性化的中枢机制多年来已有很大的进展,近年来印迹细胞理论在学习记忆领域的巨大进步,为疼痛慢性化的学习记忆机制研究带来了新的机遇。许多的问题等待回答,例如已有研究工作试图从以印迹细胞为基础的学习记忆角度去阐明疼痛及其慢性化的中枢机制。仍需要阐明印迹细胞在疼痛环路中的作用,如 dmPFC 中急性疼痛印迹细胞与 BLA 中编码疼痛负性情绪的印迹细胞间的功能联系如何,已被广泛证实参与到疼痛及其慢性化的其他高级脑区,如岛叶皮质是否存在相关的印迹细胞等。期待随着越来越多这样的机制得以阐明,加深对于慢性疼痛机制的理解,最终有助于慢性疼痛的治疗。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 宋学军,樊碧发,万有,等. 国际疼痛学会新版疼痛定义修订简析[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(9): 641-644.
- [2] Tsui P, Deptula A, Yuan DY. Conversion disorder, functional neurological symptom disorder, and chronic pain: comorbidity, assessment, and treatment[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2017, 21(6):29.
- [3] Bachiooco V, Scesi M, Morselli Am, *et al*. Individual pain history and familial pain tolerance models: relationships to post-surgical pain[J]. *Clin J Pain*, 1993, 9(4):266-271.
- [4] Fan XC, Fu S, Liu FY, *et al*. Hypersensitivity of pre-limbic cortex neurons contributes to aggravated nociceptive responses in rats with experience of chronic inflammatory pain[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11:85.
- [5] Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain[J]. *Prog Neurobiol*, 2009, 87(2):81-97.
- [6] Semon R. The Mneme[M]. London: Allen & Unwin (Original work published 1904). 1921:12.
- [7] Liu X, Ramirez S, Pang PT, *et al*. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall[J]. *Nature*, 2012, 484(7394):381-385.
- [8] Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, *et al*. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(46):10410-10415.
- [9] Schmidt-Wilcke T, Leinisch E, Ganssbauer S, *et al*. Affective components and intensity of pain correlate with structural differences in gray matter in chronic back pain patients[J]. *Pain*, 2006, 125(1-2):89-97.
- [10] Baliki MN, Petre B, Torbey S, *et al*. Corticostriatal functional connectivity predicts transition to chronic back pain[J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(8):1117-1119.
- [11] Seminowicz DA, Wideman TH, Naso L, *et al*. Effective treatment of chronic low back pain in humans reverses abnormal brain anatomy and function[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(20):7540-7550.
- [12] Obermann M, Nebel K, Schumann C, *et al*. Gray matter changes related to chronic posttraumatic headache[J]. *Neurology*, 2009, 73(4):978-983.
- [13] Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, *et al*. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease[J]. *Eur J Pain*, 2005, 9(12):463-484.
- [14] Apkarian VA, Hashmi JA, Baliki MN, *et al*. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain[J]. *Pain*, 2011, 152(3 Suppl):S49-S64.
- [15] Mutso AA, Petre B, Huang L, *et al*. Reorganization of hippocampal functional connectivity with transition to chronic back pain[J]. *J Neurophysiol*, 2014, 111(5):1065-1076.
- [16] Geha PY, Baliki MN, Harden RN, *et al*. The brain in chronic CRPS pain: abnormal gray-white matter interactions in emotional and autonomic regions[J]. *Neuron*, 2008, 60(4):570-581.
- [17] Cichon J, Blanck TJJ, Gan WB, *et al*. Activation of cortical somatostatin interneurons prevents the development of neuropathic pain[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(8):1122-1132.
- [18] Metz AE, Yau HJ, Centeno MV, *et al*. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(7):2423-2428.
- [19] Huang J, Gadotti VM, Chen L, *et al*. A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(10):1659-1668.
- [20] Corder G, Ahanonu B, Grewe BF, *et al*. An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain[J]. *Science*, 2019, 363(6424):276-281.
- [21] Tajerian M, Leu D, Zou Y, *et al*. Brain neuroplastic changes accompany anxiety and memory deficits in a model of complex regional pain syndrome[J]. *Anesthesiology*, 2014, 121(4):852-865.
- [22] Jiang YY, Shao S, Zhang Y, *et al*. Neural pathways in medial septal cholinergic modulation of chronic pain: distinct contribution of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus[J]. *Pain*, 2018, 159(8):1550-1561.
- [23] Reijmers LG, Perkins BL, Matsuo N, *et al*. Localization of a stable neural correlate of associative memory[J]. *Science*, 2007, 317(5842):1230-1233.
- [24] Han JH, Kushner SA, Yiu AP, *et al*. Selective erasure of a fear memory[J]. *Science*, 2009, 323(5920):1492-1496.
- [25] Tonegawa S, Pignatelli M, Roy DS, *et al*. Memory engram storage and retrieval[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2015, 35:101-109.



- [26] Caporale N, Dan Y. Spike timing-dependent plasticity: a hebbian learning rule[J]. *Ann Rev Neurosci*, 2008, 31: 25-46.
- [27] Josselyn SA, Tonegawa S. Memory engrams: recalling the past and imagining the future[J]. *Science*, 2020, 367(6473):eaaw4325.
- [28] Mello CV, Vicario DS, Clayton DF. Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(5):6818-6822.
- [29] Bisler S, Schleicher A, Gass P, *et al*. Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment[J]. *J Chem Neuroanat*, 2002, 23(3):187-198.
- [30] Sakurai K, Zhao S, Takatoh J, *et al*. Capturing and manipulating activated neuronal ensembles with CANE delineates a hypothalamic social-fear circuit[J]. *Neuron*, 2016, 92(4):739-753.
- [31] Guenther CJ, Miyamichi K, Yang HH, *et al*. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations[J]. *Neuron*, 2013, 78(5):773-784.
- [32] Wang W, Wildes CP, Pattarabanjird T, *et al*. A light- and calcium-gated transcription factor for imaging and manipulating activated neurons[J]. *Nature Biotechnol*, 2017, 35(9):864-871.
- [33] Lee D, Hyun JH, Jung K, *et al*. A calcium- and light-gated switch to induce gene expression in activated neurons[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(9):858-863.
- [34] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(12):5547-5551.
- [35] Garner AR, Rowland DC, Hwang SY, *et al*. Generation of a synthetic memory trace[J]. *Science*, 2012, 335(6075):1513-1516.
- [36] Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, *et al*. Memory engram cells have come of age[J]. *Neuron*, 2015, 87(5):918-931.
- [37] Sorensen AT, Cooper YA, Baratta MV, *et al*. A robust activity marking system for exploring active neuronal ensembles[J]. *Elife*, 2016, 5:e13918.
- [38] Lee D, Hyun JH, Jung K, *et al*. A calcium- and light-gated switch to induce gene expression in activated neurons[J]. *Nature Biotechnol*, 2017, 35(9):858-863.
- [39] Shang C, Liu A, Li D, *et al*. A subcortical excitatory circuit for sensory-triggered predatory hunting in mice[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(6):909-920.
- [40] Allen WE, DeNardo LA, Chen MZ, *et al*. Thirst-associated preoptic neurons encode an aversive motivational drive[J]. *Science*, 2017, 357(6356):1149-1155.
- [41] DeNardo LA, Liu CD, Allen WE, *et al*. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3):460-469.
- [42] Kim WB, Cho JH. Encoding of contextual fear memory in hippocampal-amygdala circuit[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1382.
- [43] Hua T, Chen B, Lu D, *et al*. General anesthetics activate a potent central pain-suppression circuit in the amygdala[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(7):854-868.
- [44] Barnea G, Strapps W, Herrada G, *et al*. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(1):64-69.
- [45] Tian L, Hires SA, Looger LL. Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012, 2012(6):647-656.
- [46] Sanchez MI, Nguyen QA, Wang W, *et al*. Transcriptional readout of neuronal activity via an engineered Ca^{2+} -activated protease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(52):33186-33196.
- [47] Kim CK, Sanchez MI, Hoerbelt P, *et al*. A molecular calcium integrator reveals a striatal cell type driving aversion[J]. *Cell*, 2020, 183(7):2003-2019. e16.
- [48] Cowansage KK, Shuman T, Dillingham BC, *et al*. Direct reactivation of a coherent neocortical memory of context[J]. *Neuron*, 2014, 84(2):432-441.
- [49] Gore F, Schwartz EC, Brangers BC, *et al*. Neural representations of unconditioned stimuli in basolateral amygdala mediate innate and learned responses[J]. *Cell*, 2015, 162(1):134-145.
- [50] Ramirez S, Liu X, Lin PA, *et al*. Creating a false memory in the hippocampus[J]. *Science*, 2013, 341(6144):387-391.
- [51] Ramirez S, Liu X, MacDonald CJ, *et al*. Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour[J]. *Nature*, 2015, 522(7556):335-339.
- [52] Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, *et al*. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory[J]. *Science*, 2017, 356(6333):73-78.
- [53] Sun H, Fu S, Cui S, *et al*. Development of a CRISPR-Cas9 system for projection- and function-specific gene editing in the rat brain[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(12):eaay6687.
- [54] Kim WB, Cho JH. Encoding of discriminative fear memory by input-specific LTP in the amygdala[J]. *Neuron*, 2017, 95(5):1129-1146. e5.
- [55] Zhou Y, Zhu H, Liu Z. A ventral CA1 to nucleus accumbens core engram circuit mediates conditioned place preference for cocaine[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(12):1986-1999.
- [56] Baliki MN, Apkarian AV. Nociception, pain, negative moods, and behavior selection[J]. *Neuron*, 2015, 87(3):474-491.
- [57] Qi X, Cui K, Zhang Y, *et al*. A nociceptive neuronal ensemble in the dorsomedial prefrontal cortex underlies pain chronicity[J]. *Cell Rep*, 2022, 41(11):111833.
- [58] Smith ML, Asada N, Malenka RC. Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia[J]. *Science*, 2021, 371(6525):153-159.