

参赛学生姓名：苑思源、沈若水

中学：北京市第一〇一中学

省份：北京市

国家/地区：中国/北部

指导老师姓名：李坤、贾婧婧

指导老师单位：清华大学、北京市第一〇一中学

论文题目：抑制疼痛，专注任务：小鼠 SPFM-PDYN+神经元调控防御行为的研究



北京一零一中
BEIJING 101 HIGH SCHOOL

研究报告

抑制疼痛，专注任务：

小鼠 SPFm-PDYN+神经元调控防御行为的研究

苑思源 沈若水

北京市第一〇一中学

摘要

人们常说，疼痛是提醒我们“停下来”的信号，但有时为了完成重要任务，我们会暂时忽略疼痛。比如，我在障碍马术比赛中观察到，马在它的腿踢到障碍杆后仍然能动作标准地完成比赛，赛后我溜它的时候才发现它在跛行。马的这种表现让我联想起自己在运动会 400 米比赛中的经历，当时虽然崴了脚，但一心只想着往前冲，直到冲过终点才感到脚踝很疼，一瘸一拐地走下场。

这种为了优先完成任务而暂时忽略疼痛的现象不只存在于比赛中，在生命攸关的情况下更为明显：动物在受到捕食者威胁的时候，会先逃生，忽略受伤带来的疼痛。这在动物中似乎是普遍存在的，那动物究竟是如何做到这一点的呢？大脑是动物行为的决策者，所以问题的答案一定藏在大脑里。

为了找到答案，我和我的队友在实验中给小鼠同时施加了模拟天敌“从天而降”的视觉威胁信号和脚底疼痛刺激，发现小鼠会表现出优先应对威胁、忽略疼痛的行为。在进一步的研究中，我们重点关注了小鼠大脑中一个叫作丘脑束旁下核巨细胞部（subparafascicular nucleus, magnocellular part, SPFm）的地方，它是大脑枢纽-丘脑中的一个核团。通过光遗传学调控和突触传递阻断的方法，我们发现它里面一类特别的、表达前强啡肽原（prodynorphin）的神经元（PDYN+神经元）能在抑制疼痛的同时，促进小鼠防御（“抑痛促防”）。有意思的是，我们还发现这种作用似乎只在视觉威胁下有效，对听觉威胁无效。此外，我们通过病毒示踪发现，这群神经元几乎只投射到一个叫 Astr（杏仁核-纹状体过渡区）的脑区，而之前的研究已经表明，这个脑区在本能防御行为中有重要作用。

我们的研究揭示了 SPFm-PDYN+神经元抑制疼痛、促进防御的功能特点和它们对感官信息的选择性处理，为理解动物在关键任务中如何协调疼痛和行为提供了新的线索。

关键词：SPFm-PDYN+神经元，抑制疼痛，促进防御，视觉选择性，神经投射

Abstract

People always say that pain is a signal to “stop”, but we tend to ignore pain temporarily when we are striving toward important tasks. For example, I found that during show jumping competitions, even after a horse hits a barrier with its legs, it could still finish the competition without loss of form. But when I walked her after the competition, I found that she was walking with a limp. This reminds me of my experience in the 400-meter race in school. I rushed toward the finish line, without noticing the hurt of my ankle. After the race, I had to walk out of the field with aching legs.

This phenomenon of “prioritizing task while ignoring pain” can be observed not only in competitions but also, even more obviously, in life-or-death situations: when threatened by predators, animals tend to flee for life first, instead of paying attention to pains. This seems to be common across different kind of animals, but how do animal do this? Brain is the decision maker for animals, so the answer must be in the brain.

In order to find the answer, my teammate and I presented visual threatening signal and painful stimulus simultaneously to the mice during experiments, and we found out that mice showed behavior of prioritizing responding to threat, while ignoring pain. In further investigation, we paid more attention to a brain region called SPFm (subparafascicular nucleus, magnocellular part), which is located in the “hub” of the brain, the thalamus. Utilizing methods such as optogenetic modulation and synaptic transmission blockade, we found a special group of neuron expressing prodynorphin (PDYN+) could promote defense while inhibiting pain. What’s more interesting is that we found this seems to only work under visual threats, instead of auditory threats. In addition, through viral tracing, we found that this group of neurons only projects to Astr (amygdalostratial transition zone), which is known in previous studies to play an important role in defensive behaviors.

Our findings reveal the functional properties of SPFm-PDYN+ neurons in suppressing pain and enhancing defense, as well as their tendency of processing selectivity in sensory modality. This provides new insights into how animals coordinate pain modulation and behavior during critical tasks.

Keywords: SPFm-PDYN+ neurons, pain suppression, defense promotion, visual selectivity, neural projections

目录

摘要	3
第 1 章 引言	7
1.1 研究背景	7
1.2 研究目的	8
1.3 技术路线	8
第 2 章 材料与方法	9
2.1 实验动物	9
2.2 实验仪器、软件及试剂	9
2.2.1 实验仪器	9
2.2.2 实验用软件	9
2.2.3 实验试剂、药品、耗材	9
2.2.4 实验用病毒载体	9
2.3.1 病毒注射针的制作	10
2.3.2 病毒注射手术	10
2.3.3 细胞类型特异性的顺向示踪	11
2.4 行为学实验	12
2.4.1 光遗传学操控	12
2.4.2 突触传递阻断操控	13
2.4.3 行为学范式	13
2.5 组织学处理	15
2.5.1 灌流固定	15
2.5.2 组织处理	16
2.5.3 冰冻切片	16
2.5.4 封片	17
2.6 荧光成像、荧光信号识别和处理	17
2.6.1 全自动宽场荧光成像	17
2.6.2 荧光信号的识别和处理	17
2.7 统计分析	17
第 3 章 实验结果	19
3.1 先看正常小鼠的行为：疼痛和“天敌”同时出现的时候，它们怎么选？	19
3.1.1 小鼠如何应对“猛禽俯冲”的威胁？	19
3.1.2 小鼠在疼痛模型中的行为会不会改变？	20
3.1.3 疼痛和“猛禽”同时到来时，小鼠会优先做什么？	21
3.2 调控 SPFM-PDYN+神经元活动水平对小鼠疼痛敏感性的影响	22
3.2.1 激活 SPFM-PDYN+神经元后，小鼠对疼痛的敏感性降低	22
3.2.2 “静音”SPFM-PDYN+神经元后，小鼠对疼痛变敏感	23
3.3 SPFM-PDYN+神经元活动对防御行为的影响	24
3.3.1 激活 SPFM-PDYN+神经元会改变对“猛禽俯冲”的防御策略	25
3.3.2 “静音”SPFM-PDYN+神经元会削弱对“猛禽俯冲”的防御能力	26
3.3.3 激活 SPFM-PDYN+神经元不改变对危险听觉信号的防御行为	27
3.4 SPFM-PDYN+神经元的下游连接	29
3.4.1 PDYN+荧光轴突纤维只在一个脑区聚集	29
3.4.2 确认 PDYN+轴突纤维是真的“到了”而不只是“路过”	30
第 4 章 结论与创新点	32
4.1 结论	32

4.2 创新点	32
第 5 章 讨论	33
5.1 阴性结果的意义：模态选择性	33
5.2 ASTR 同时介导疼痛抑制和逃跑促进的可能机制	33
5.3 局限性与未来方向	34
参考文献	35
心得体会	37

2026 S.-T. Yau High School Science Award
 仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示

第 1 章 引言

1.1 研究背景

疼痛是一种再熟悉不过的感觉了。碰到滚烫的热水我们会立刻缩回手，踩到尖锐的石子会马上抬起脚，这些快速的本能反应可以帮我们避开危险，让身体免于遭受进一步的伤害。但是，有时候我们也会看到一些相反的现象：我在障碍马术比赛中发现，马的腿不小心磕到障碍杆后，毫无疑问肯定很疼，但马却不会因此停止比赛，而是继续奔跑和跳跃，甚至动作都不会变形，把比赛任务完成。还有一次，我在学校运动会 400 米比赛中不小心崴了脚，但当时只想着赢得比赛，根本不知道脚踝受了伤。直到冲过终点之后，疼痛感才一下子涌上来，连路都走不稳了。

其实，这种现象不仅仅发生在比赛场上。在关乎性命的生存场景中，比如遭遇天敌追赶的时候，动物也会做出类似的反应：忽略疼痛，全力逃跑。这让我产生了一个疑问：在同时面对疼痛和紧急任务的时候，大脑是如何决定要优先完成任务而不是去处理疼痛的呢？这下意识的行为，是如何发生的？

我想起之前看过的一个科普视频，讲的是为什么下意识的动作能这么快。视频里提到，这是因为大脑里的一个叫丘脑的“调度中心”。它能快速接收从身体和外界传来的各种感觉信号，然后快速判断哪些信号更重要，再传递到大脑的其他地方进行处理。那“忽略疼痛，全力逃跑”，这个下意识的决定是不是也发生在丘脑？我在学校个人发展课《Brain Bee》的课后问了谢老师，刚好贾婧婧老师也在，我们就一起简单做了交流并约定进一步讨论。后来，贾老师和我一起把《Brain Facts》和《Campbell Biology》中关于丘脑的内容又认真读了一遍，我发现丘脑几乎和每一种感觉都有关，比如疼痛、光和声音，只有嗅觉不用经过它。在与贾老师进一步讨论后，我感觉丘脑可能是解答这个问题非常重要的地方，我们决定一起设计实验。

想法是一回事，现实又是另外一回事。简单设计实验以后，我们发现想完成这个实验还是有很多困难。首先，我们学校没有动物实验条件，贾老师之前也没做过动物行为学实验。幸运的是贾老师联系到了清华大学生命科学学院从事脑科学研究的李坤老师，而动物本能行为背后的神经机制是李老师实验室的一个重要研究方向。李老师建议我围绕丘脑的 SPF 脑区开展一些探索性研究，并为我提供科研指导和必要的实验资源支持。

李老师发给我好几篇文献，读完以后，我进一步确认了丘脑的确是大脑的信息枢纽【1】，而其中 SPF（丘脑束旁核）脑区可以接收包括来自脊髓的疼痛信号在内的多

种感觉信息，而且还能把这些信息传递到脑干【2】，也就是说它本身就位于多条感觉信息交汇的地方。而在 SPF 中，有一个更小的脑区叫 SPFm（丘脑束旁下核巨细胞部），里面有一类表达 PDYN 基因的神经元（PDYN+神经元）【3】。PDYN 是一种重要的基因，能够产生强啡肽【4】，而强啡肽是一种类似天然止痛药的分子，对疼痛的调控有着非常重要的作用【5,6】。

既然 SPFm-PDYN+神经元既位于疼痛和任务信号的交汇处，又有调控疼痛的能力，它们会不会是大脑中一个专门的控制开关呢？比如，当动物面临紧急任务而疼痛会影响它行动的时候，这些神经元可能会让它优先抑制疼痛，确保先完成任务。

1.2 研究目的

我希望解答“动物是如何做到忽略疼痛、专注任务”的问题，同时搞清楚 SPFm-PDYN+神经元在这里面起了什么具体作用。

1.3 技术路线

我在李老师和贾老师的共同指导下设计了一系列实验：

- 1) 计划用小鼠作为研究对象，给它们同时施加模拟猛禽俯冲的威胁信号和脚底疼痛刺激，观察它们是否会暂时忽略疼痛，优先躲避威胁。
- 2) 接下来，选择两组小鼠分别使用光遗传学和突触传递阻断的方法，分别激活和“消声”SPFm 内部的 PDYN+神经元，看看这群神经元的活动是否以及如何影响小鼠行为。
- 3) 最后，计划用病毒示踪的方法追踪这些神经元的投射目标，想知道它们究竟会把信号传递到哪些脑区，以及与小鼠的防御行为是否相关。

李老师提醒我实验工作量很大，如果想坚持完成整个实验，最好找个队友，因此我邀请了好朋友沈若水加入，与我一起开展这项研究。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验动物

动物实验操作已经通过中国北京清华大学实验动物管理委员会（IACUC）审批（清华大学实验动物研究及使用计划【Animal Protocol】：19-LK1.G26-2，PI 姓名：李坤，见附件）。实验小鼠年龄在 2-4 月龄，品系是 C57BL/6（Pdyn-IRES-Cre），饲养在 12 小时:12 小时光照/黑暗循环环境中，其中 10:00–22:00 为光照期，其余为黑暗期，小鼠可以自由获取食物和饮水。

2.2 实验仪器、软件及试剂

2.2.1 实验仪器

瑞沃德脑立体定位仪、瑞沃德双目体视显微镜、瑞沃德 LED 冷光源、WPI 微量注射泵、WPI 微量注射控制器、徠卡 CM1900 冰冻切片机、艾本德移液枪、瑞沃德小动物手术器械、Sutter Instrument 电极拉制仪、计时器、奥林巴斯 VS200 全自动玻片扫描仪、TDT RZ10X/RZ6-A、TDT MF-1 扬声器、红外高清摄像头、473nm 蓝色激光器、ThorLabs 激光功率能量计。

2.2.2 实验用软件

Synapse（TDT）、Rhino8.0（Rhinoceros）、OlyVIA（OLYMPUS）、Python（SciPy、pandas）、Imaris 9.3（Oxford Instruments）。

2.2.3 实验试剂、药品、耗材

碘伏消毒液、75%乙醇、过氧化氢溶液、OCT 冰冻切片包埋剂、生理盐水、PBS、DAPI、牙科模型树脂、蔗糖、矿物油、福尔马林、刀片、陶瓷插芯、氯氮平-N-氧化物、粘附型载玻片、盖玻片、光固化胶、甘油、阿佛丁（清华大学动物房）。

2.2.4 实验用病毒载体

突触阻断（TeNT）：AAV2/9-hEF1a-DIO-EGFP-P2A-TetTox-WPRE-pA（泰儿图，使用滴度 5×10^{12} ）；

光遗传学激活：AAV2/9-hEF1a-DIO-hChR2(H134R)-EGFP-WPRE-pA（泰儿图，使用滴度 5×10^{12} ）；

顺向示踪：AAV2/9-hSyn-flex-Synaptophysin-mRuby（泰儿图，使用滴度 5×10^{12} ）；2.3 解剖学实验

2.3.1 病毒注射针的制作

脑组织是很脆弱的，为了能在最大程度地保护小鼠的大脑组织的同时，实现病毒载体的精准、微量递送，就需要使用尖端非常细的玻璃注射针。所以在病毒注射手术前，我们会先用拉针仪把毛细玻璃管拉制成玻璃注射针（附件视频 1）。随后，用 1ml 注射器抽取少量矿物油从其尾部注入注射针中。然后，将微量注射泵 (4878, WPI, USA) 的金属针插入玻璃注射针的尾部，在插入过程中操作一定要缓慢，避免把空气带入注射针。最后，擦干注射针周围的矿物油，用热熔胶把注射针固定在微量注射泵上（附件视频 2）。



把矿物油从尾部注入注射针

用热熔胶把注射针固定在微量注射泵上

2.3.2 病毒注射手术

先对小鼠用 1% 的异氟烷进行诱导麻醉，然后腹腔注射三溴乙醇 (300mg/kg)，进行深度麻醉（附件视频 3）。由于麻醉会使小鼠眼部肌肉松弛，导致小鼠可能眼睛睁着或半睁，所以我们会用红霉素眼膏涂抹在小鼠的眼睛上，避免角膜干燥损伤。用小动物剃毛器把小鼠头部的毛发剪掉，再用碘伏对小鼠头皮皮肤消毒（附件视频 4）。

把小鼠腹部朝下，身体放在恒温加热垫上，头部固定在立体定位仪（瑞沃德，68001，深圳，中国）上。剪开小鼠头皮，将颅骨暴露出来，这样就能清晰的看到前后囟（附件视频 5）。对小鼠头部进行调平，使小鼠颅骨前后囟高度及左右同一坐标高度相差不超过 0.05mm。根据小鼠标准脑图谱（Paxinos and Franklin, 1997）提供的脑区坐标，把前囟作为原点定位目标脑区，定位后在颅骨表面用颅钻打一个小孔。用带有病毒注射针的微量注射泵从小孔里将病毒缓慢注射到目标脑区（附件视频 6，详细病毒

名称和注射量见 3.3)。待注射完毕后，停针 5 分钟以上，然后拔出病毒注射针，缝合创口（附件视频 7），并对创口进行消毒，等动物苏醒后送回动物房，继续饲养。



动物手术培训

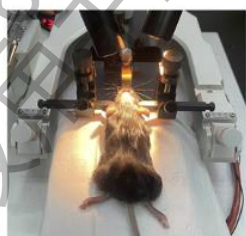


正式实验

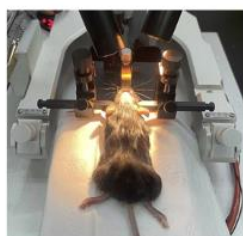
2.3.3 细胞类型特异性的顺向示踪

将 30nl、滴度为 5×10^{12} 的 AAV2/9-hSyn-flex-Synaptophysin-mRuby（泰儿图）病毒注射到 Pdyn-IRES-Cre 小鼠的 SPFm 中，顺向示踪 SPFm 中 PDYN+神经元的下游连接，SPFm 脑立体定位坐标：前囟后 2.07mm，旁开 0.78mm，深度 -4.17 mm，为避免损伤中央大血管，要保持注射针与竖直方向大约 8° 倾斜角。

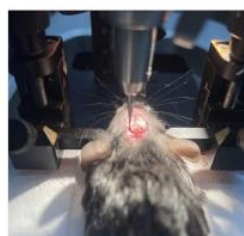
头部固定



颅骨调平



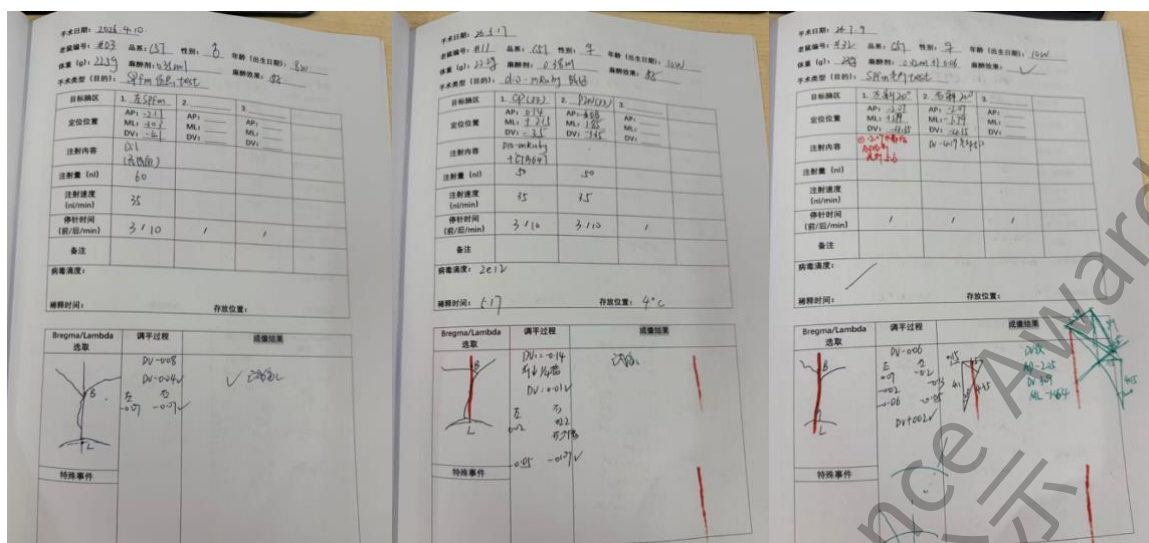
颅骨钻孔



病毒注射



立体定位病毒注射流程



部分实验记录

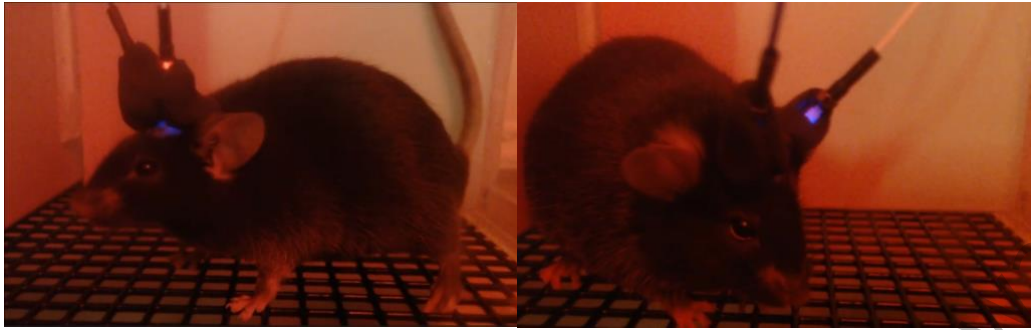
2.4 行为学实验

2.4.1 光遗传学操控

在病毒注射前，对小鼠痛阈、防御行为进行测试（具体行为学范式见 2.4.3），这样就可以作为基线，进行光遗传激活前后的对照。

完成基线值测量后，采用立体定位病毒注射的操作流程将光遗传激活病毒：AAV2/9-hEF1a-DIO-hChR2(H134R)-EGFP-WPRE-pA（泰儿图，使用滴度 5×10^{12} ）注射在 Pdyn-IRES-Cre 小鼠的双侧 SPFM（病毒注射流程详见 3.2）。病毒注射完毕以后，将带有陶瓷插芯的光纤植入目标脑区，用牙科水泥将自制小鼠头部固定片和光纤固定于小鼠颅骨。把小鼠送回动物房继续饲养，等病毒表达 3 周后，就可以进行光纤记录实验。光纤记录时，光纤跳线一端（1.25 mm 陶瓷插芯，纤芯直径 $200 \mu\text{m}$ ，Inper）连接到小鼠脑内植入的光纤，另一端（FC/PC 接头）连接至光纤旋转连接器（Inper），以保证小鼠在实验过程中可自由活动。与旋转连接器相连的光纤跳线进一步接入蓝光激光器（MLL-FN-473 nm/150 mW，长春新兴产业光电技术有限公司，中国长春），激光输出由 Arduino 控制。激光功率使用光功率计（PM100D，Thorlabs）进行校准。光纤尖端输出功率设定为 2 mW。

在光激活组的 Von Frey 实验中，用 20Hz、10ms 的 473 nm 激光脉冲持续 5 分钟，以激活目标 ChR2 表达神经元，并在测试期间持续给光。在模拟“天敌”的威胁逼近测试中，则是在刺激前 15 秒开始给同样的激光，持续到刺激结束（行为学范式见 4.3）。



脑内植入了光纤、头上连着光纤跳线的小鼠

2.4.2 突触传递阻断操控

在病毒注射前对小鼠痛阈、防御行为进行测试（具体行为学范式见 2.4.3）。和光遗传学操控实验一样，也是为了作为基线，进行前后的对照比较。

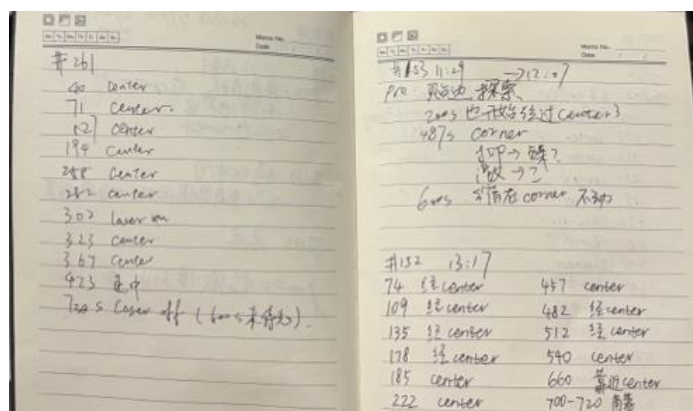
完成基线值测量后，采用立体定位注射的操作流程把 TeNT: AAV2/9-hEF1a-DIO-EGFP-P2A-TetTox-WPRE-pA（泰儿图，使用滴度 5×10^{12} ）注射到 Pdyn-IRES-Cre 小鼠的双侧 SPfm（病毒注射流程详见 3.2）。头皮缝合后把小鼠送回动物房继续饲养，等病毒表达 3 周后，就可以进行行为学实验。

2.4.3 行为学范式

2.4.3.1 迅速扩大阴影诱导的防御行为

在视觉信号诱导的躲避行为测试中，把小鼠放在白色敞箱（ $35 \text{ cm} \times 35 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$ ）内，箱体的一角放置了一个安全小屋（ $20 \text{ cm} \times 12 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ ）。测试前，让小鼠在没有干扰的条件下，充分探索敞箱。小鼠很快会将安全屋当作“家”，并且在探索过程中经常返回这里。

测试期间，一旦小鼠进入中央区域，就通过箱体上方的显示器播放三次迅速扩大的黑色圆盘阴影，把这记为一个试次。通常，小鼠在这样模拟天敌的视觉刺激下会立即表现出躲避行为，并在避难所内隐藏一段时间。两个相邻侧面放置的摄像机，会记录小鼠的所有运动，后续会对这些运动数据（僵直时间、逃回安全屋用时、在安全屋中的停留时间等）进行分析。



视觉威胁实验记录

2.4.3.2 听觉刺激诱导的防御行为

同样是视觉防御测试的环境，将箱体上方的显示器改为扬声器，使用 TDT 系统（Tucker-Davis Technologies, Alachua, USA）控制，播放白噪声（75 dB SPL，持续 10 s），记为一个试次。

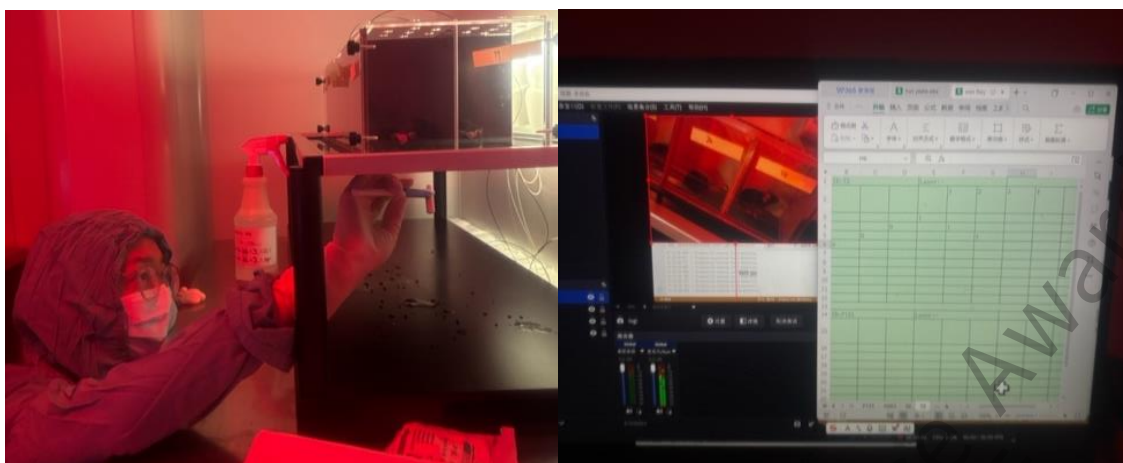
2.4.3.3 Von Frey 痛阈测试

Von Frey 痛觉测试使用一套纤维丝（Aesthesio® 20 根单丝套装，Ugo Basile, ITALY）。在行为测试之前，所有动物都被放置在铁丝网网格上的有机玻璃箱（6.5x6.5x6 厘米）内至少 1 小时，让小鼠习惯这个环境，进入安静状态。测试时，把单根纤维丝从网格的下边垂直施加到后足的跖面，直至纤维丝弯曲，从而施加一个恒定的预设力，持续约 3 秒。

如果在刺激施加过程中或纤维丝移除后立即出现任何伤害性防御行为，比如快速缩足、舔足或甩足，则判定为阳性反应。如果小鼠在纤维丝弯曲前或 0.2 秒内就出现上述行为，则视为试次无效。两试次之间间隔至少 2 分钟，以避免习惯化效应对实验结果的影响。

我们使用基于 LD50 统计学公式的“上下法”测定诱发 50% 动物产生缩足反应所需的机械力。“上下法”的意思就是，在实验开始时，先选用预估接近 50% 缩足阈值的纤维丝进行测试，然后在这个预估数值的上下反复测试：如果没有反应，就换上更高力值的纤维丝；如果有反应，就换上更低力值的纤维丝。一直反复，直到在首次反应方向转变后至少获得 4 次读数，并记录完整的反应顺序。50% 阈值的计算公式为：50% 阈值

(g) = $\frac{10^{X+k\delta}}{10^4}$ 。其中，X 为最终所用纤维丝的力值对数值；k 为对应反应模式的查表值；δ 为相邻纤维丝力值对数间距的平均值。

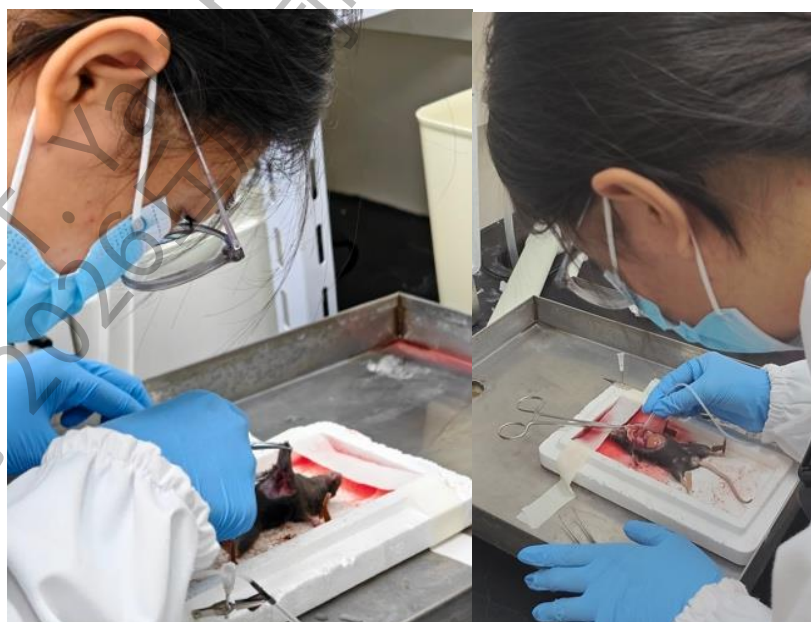


Von Frey 痛阈测试实验

2.5 组织学处理

2.5.1 灌流固定

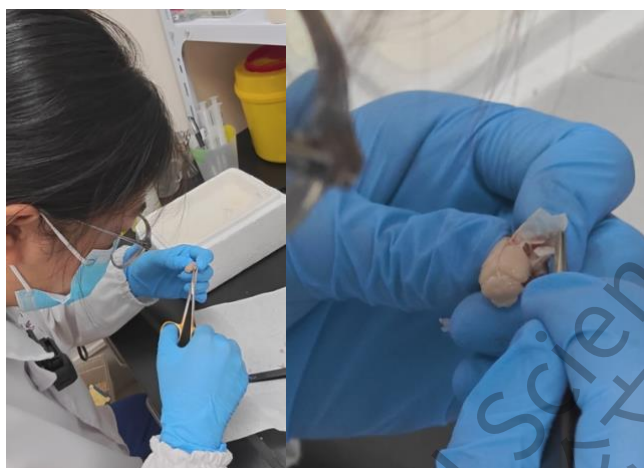
在前述实验完成后，给小鼠腹腔注射三溴乙醇（330mg/kg）进行深度麻醉，确认小鼠失去反射活动以后，把小鼠固定在灌流板上。用手术剪剪开小鼠胸腔皮肤和两侧肋骨，把小鼠的心脏和肝脏暴露出来。把灌流针插进小鼠左心室，用止血钳固定住灌流针头。用 0.9% 的生理盐水注入小鼠心脏，同时剪开右心耳，大概 3 秒左右，小鼠肝脏就开始变白，说明灌流的液体进入了小鼠的体循环。生理盐水灌流 2 分钟后，换用 4% 的多聚甲醛（paraformaldehyde, PFA）继续灌注，等小鼠出现抽搐后降低灌流速度，等小鼠身体变硬后，结束灌流（附件视频 8）。



灌流固定

2.5.2 组织处理

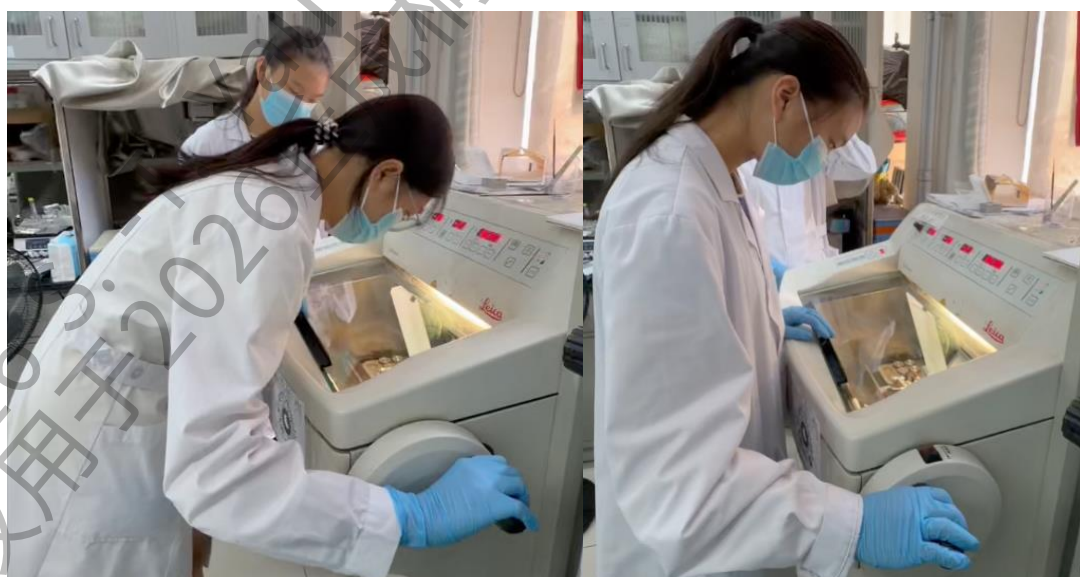
用剪刀在小鼠的脖子处把头剪断，用眼科剪和平头镊子小心地把小鼠大脑取出，确保大脑完整无损（附件视频 9）。放在 4% 的 PFA 中过夜。等小鼠脑被固定后，将鼠脑放进 30% 的蔗糖溶液中进行脱水，直到鼠脑沉底。



断头取脑

2.5.3 冰冻切片

将沉糖后的鼠脑取出来，用吸水纸吸干鼠脑上的水分。用刀片将小脑后部削平，用包埋剂（OCT, Sakura Tokyo, Japan）将切平的小脑底部固定在切片机底座上，放在-20℃切片机中冷冻 10 分钟。等到鼠脑牢固的粘在底座上以后，用 OCT 包埋剂把整个鼠脑都包埋，放在-20℃切片机冷冻，直到包埋剂变硬。用冰冻切片机将鼠脑进行冠状切片，厚度为 50um，每隔一张收取在载玻片上，用于封片。



冰冻切片

2.5.4 封片

等放在载玻片上的脑片晾干以后，用配置好的封片液（25ml 甘油+25mIPBS+20 μ l DAPI）滴到放有脑片的载玻片上，用显微镜盖玻片慢慢覆盖在鼠脑上，注意封片过程要很缓慢得操作，避免气体进入。用光固化胶把盖玻片的四周都封紧。等光固化胶凝固以后，将脑片避光保存，用于后续成像。

2.6 荧光成像、荧光信号识别和处理

2.6.1 全自动宽场荧光成像

用奥林巴斯全自动玻片扫描仪（VS200）进行 10 倍镜荧光成像，具体操作步骤如下：（1）把封片后的脑片依次放进扫描仪的卡槽中。（2）使用 10 倍镜成像，选定成像区域及对焦位点，进行自动对焦。（3）根据脑片的荧光信号的波长和强度，进行荧光信号的选择和设置。（4）得到二维的原始图像。

2.6.2 荧光信号的识别和处理

顺向示踪及行为学操控后的扫片数据，需要对注射位点感染的神经元的位置、下游突触末梢中的突触素蛋白的位置和数量都进行识别，具体流程如下：（1）将全自动玻片扫描仪获得的原始脑片对照标准脑图谱从前到后进行编号；（2）打开 Imaris 9.3 软件，用点识别功能对突触素蛋白进行识别，对于突触结构的识别大小选用 0.5-2 μ m；（3）将识别后的点坐标（x, y）导出；（4）将点坐标导入 Rhinoceros 软件中，将导入的点与原始识别图像进行匹配并组合，调整图像大小与 Rhinoceros 中构建好的脑图谱匹配；（5）用 Rhinoceros 软件中的 Grasshopper 插件对点位置和数量进行读取和统计。

2.7 统计分析

Von Frey 痛觉测试所有统计检验均采用双侧检验，显著性水平设定为 $\alpha = 0.05$ 。同一实验组操控前后的机械痛阈比较采用配对样本 t 检验；实验组与对照组之间的比较采用独立样本 t 检验（Student's t-test，假设方差齐性）。数据以均值 $\pm$ 标准误（SEM）表示，图中叠加散点展示各只小鼠个体值。

防御行为是指僵直、逃窜、返回安全屋等，观察每个试次（trial）的行为，并按照发生和未发生进行记录和评分，发生记作 1 分，未发生记为 0 分。组间行为发生概率的差异采用 Fisher 精确检验（双侧）进行分析：将各组所有小鼠的试次数据汇总后构建 2 $\times$ 2 列联表（组别 $\times$ 行为发生与否），进行组间比较。潜伏期及安全屋停留时长等连续变量因样本量较小且不满足正态分布假设，采用 Mann-Whitney U 检验（双侧）进

行比较，且仅纳入实际发生该行为的个体数据。图中柱状图表示每组每只小鼠行为概率的均值，误差线为标准误（SEM），黑色散点为各只小鼠的个体值。

显著性标注标准： $p < 0.05$ ， $p < 0.01$ ， $p < 0.001$ ；ns 表示 $p \geq 0.05$ （无统计学显著性）。所有数据计算与统计分析均使用 Python（SciPy、pandas）完成。

实验类型及小鼠分组情况表					
	对照组	脚底注射福尔马林组（持续疼痛模型）	光激活组（在 SFPm 脑区注射病毒工具，选择性地在 PDYN+ 神经元中表达光激活蛋白 ChR2）	突触传递阻断组（在 SFPm 脑区注射病毒工具，选择性地在 PDYN+ 神经元中表达突触传递阻断蛋白 TeNT）	突触连接显示组（在 SFPm 脑区注射病毒工具，选择性地对 PDYN+ 神经元的突触末端进行荧光标记）
小鼠数量（只）	3	3	3	3	1
Von Frey 痛阈测试	√		√	√	
安全小屋行为实验+视觉危险信号	√	√	√	√	
安全小屋行为实验+听觉危险信号	√		√	√	
灌流、取脑、包埋、切片、封片、荧光成像			√	√	√

第 3 章 实验结果

3.1 先看正常小鼠的行为：疼痛和“天敌”同时出现的时候，它们怎么选？

我们之前猜测，大脑在面临当前重要任务时可能会主动抑制疼痛。要验证这个想法，得先用动物做实验看一看，比如当小鼠同时面对疼痛和“天敌”威胁的时候，大脑会不会优先处理威胁、暂时不管疼痛？

但我们一开始就遇到一个问题：怎么让小鼠持续地疼？如果只是用针扎一下，疼一下就过去了，没法模拟那种“带着伤还得继续跑”的状态。文献中有一个很经典的方法：给小鼠脚底注射一点点福尔马林，它能造成持续一段时间的疼痛[2]。

不过做这个实验有个前提：小鼠得先熟悉环境才行。不然的话，它到一个陌生的地方本来就紧张，小鼠的行为可能是出于疼痛，也可能是出于对新环境的恐惧，我们不能主观得把行为全都归因于疼痛。所以我们先把对照组小鼠（共 3 只）放进一个行为箱里，箱子的一个角落里放了一个有顶棚的“安全小屋”（图 1）。小鼠刚进去的时候很小心，到处闻、用胡子碰一碰，连那个小屋也要反复检查好几遍。等它觉得没什么危险了，才放心地到处溜达。而且等到它完全放松之后，它并不会特别偏爱那个“安全小屋”——因为它觉得整个箱子都是安全的。



图 1 行为箱的正视与侧视视角；行为箱的顶部为显示器屏幕

3.1.1 小鼠如何应对“猛禽俯冲”的威胁？

小鼠的天敌之一是猛禽，比如老鹰。文献里说，如果在小鼠头顶播放一个快速放大的圆盘阴影（图 2，左），小鼠会以为是老鹰俯冲下来了，立刻逃跑躲藏【8】。

我们想试试我们这个行为箱能不能做出这个效果。于是小鼠正在箱子里自由探索的时候（图 2，中），我们在箱子上方的电脑屏幕上播放了这个阴影（图 2，右）。结果我们真的看到小鼠唰地一下冲进了角落的“安全小屋”（在阴影出现后平均 2.09 秒时小鼠进入了安全屋。共 3 只小鼠，每只 3 个试次），在里面待了很久才敢出来（平均停留

161.38 秒)。这说明小鼠很清楚：整个箱子里，那个有顶棚的地方是最安全的，遇到天敌，抓紧时间躲到这个小屋内（附件视频 10）。



图 2 模拟“俯冲猛禽”视觉行为范式

3.1.2 小鼠在疼痛模型中的行为会不会改变？

接下来，我们在另外一组小鼠（共 3 只）的左后侧脚皮下注射了 25 微升（浓度 2%）福尔马林【7】，整个注射过程控制在 30 秒以内。注射后约 20 到 30 分钟，注射药物的左后侧脚就变得很肿胀（图 3），小鼠表现出典型的疼痛反应，包括频繁地停下来、抬那只肿起来的脚并不时地舔它。但有意思的是，尽管脚疼，小鼠并没有在“安全小屋”中长时间停留。也就是说，疼痛并没有让它怀疑这个环境不安全（附件视频 11）。

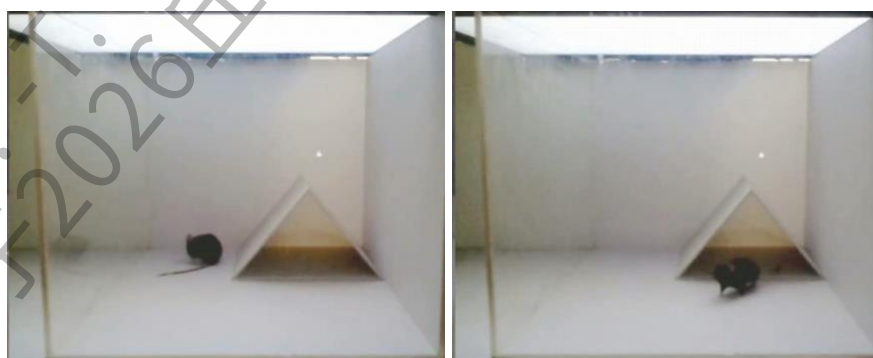


图 3 上：左为注射了福尔马林后肿起的后足，右为没有注射福尔马林的后足
左下：小鼠表现出疼痛反应，频繁地停下来、抬那只肿起来的脚并不时地舔它
右下：小鼠并没有因为疼痛而在“安全小屋”中长时间停留

3.1.3 疼痛和“猛兽”同时到来时，小鼠会优先做什么？

等小鼠的疼痛行为稳定下来以后（注射后约 25 分钟），我们又播放了那个放大的圆盘阴影，小鼠的表现让我们印象非常深刻。播放阴影前，小鼠正在行为箱里四处探索并不时地抬脚、舔脚；阴影一出现，它立刻像是不疼了一样，也不抬脚了，也不舔脚了，瞬间就冲进了“安全小屋”里长时间躲着（附件视频 12，图 4，从阴影出现到小鼠进入安全屋的平均时长 1.49 秒，在安全屋中平均停留了 99.31 秒）。

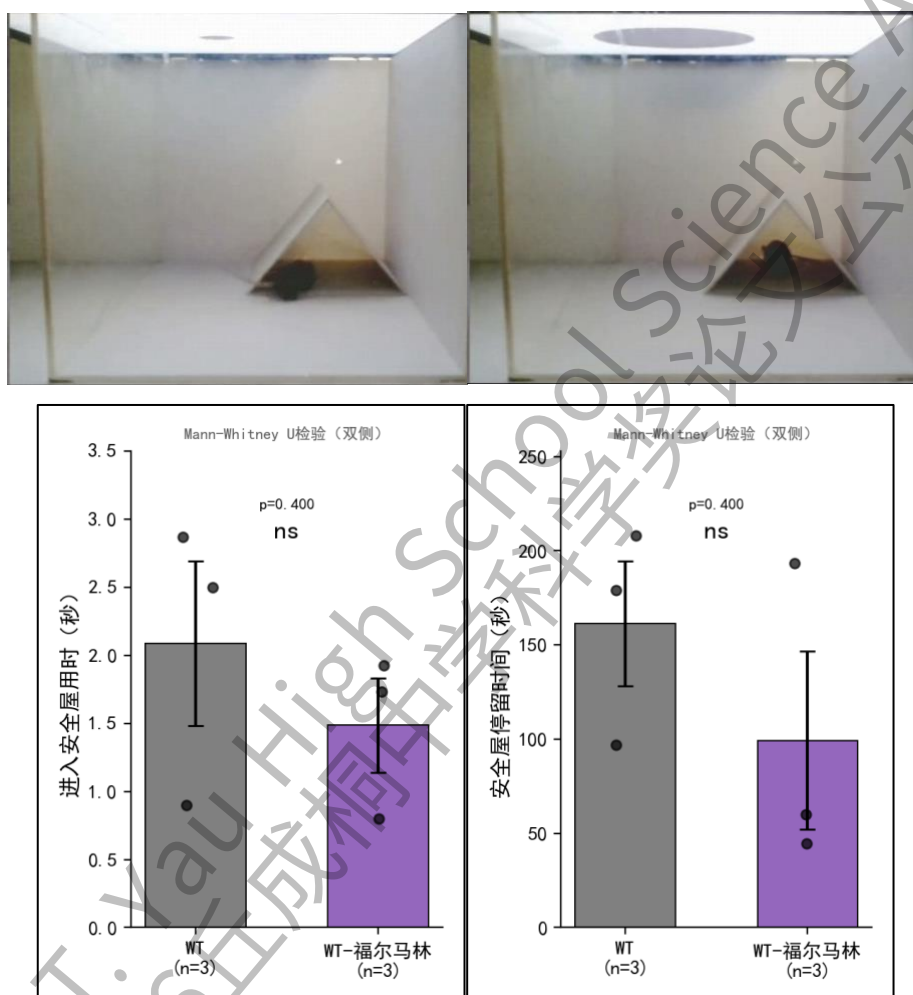


图 4 上：阴影刚一出现小鼠就冲进了“安全小屋”里（左）并长时间躲着（右）

下：脚痛小鼠进入安全屋用时（左）和停留时间（右）与对照组没有显著差异

也就是说，当身体在疼，但同时有一个视觉“天敌”出现的时候，小鼠的大脑快速做出了决策：先不管疼，保命要紧。这个结果让我们挺高兴的，因为这说明那个“疼的时候能忍住、先干正事”的行为，不光是人类和马有，小鼠也有，也就是说，我们选择小鼠作为实验动物是完全可行的。

3.2 调控 SPFm-PDYN+神经元活动水平对小鼠疼痛敏感性的影响

不过光用福尔马林做疼痛造模有一个局限：它能看出小鼠有没有疼，但看不出它对疼痛有多敏感，也就是说，小鼠对什么程度的疼痛有反应。比如，用多轻的针刺它才会觉得疼？这个临界点，就是“疼痛阈值”。

为了精确测量这个阈值，我们用了一套叫 Von Frey 的系统（附件视频 13，图 5）。这套系统的工作原理是使用一套经过校准的纤维丝，当其弯曲时可以施加恒定且已知的力。实验的时候，我们依次用不同粗细的针刺小鼠的脚底，观察它会不会抬脚，然后记录下来【9】。每两次针刺之间至少间隔 2 分钟，以避免习惯化效应对实验结果的影响，使用“上下法”（见 2.4.3.3 Von Frey 痛阈测试），也就是先预测一个可能的值，然后围绕这个值的上下进行测试。如果小鼠对当前力度的纤维丝没有响应，就换更高一级力度，反之就测试更低一级力度，通过计算就可以得出有 50% 概率引起小鼠抬脚的反应阈值【10】。对照组（3.1.1 中的 3 只小鼠）的痛阈平均值是 1.22 克。



图 5 Von Frey 痛阈检测器械（左）和检查方法（中、右）示意图（图片源自网络）

3.2.1 激活 SPFm-PDYN+神经元后，小鼠对疼痛的敏感性降低

文献上早就说强啡肽能抑制疼痛，而 SPFm 里的 PDYN+神经元是能分泌强啡肽的，所以我们决定先做 1 只小鼠进行验证。

这只小鼠是 PDYN-Cre 转基因小鼠，是在强啡肽原基因（PDYN）位点插入了 Cre 重组酶基因。简单说，就是把“Cre 重组酶”这个基因开关，精准地装到了 PDYN 基因的“启动子”区域，所以这种小鼠体内，凡是表达 PDYN 的细胞，都会同时产生 Cre 酶。我们在它的 SPFm 脑区注射了一种病毒（AAV2/9-hSyn-DIO-hChR2(H134R)-EGFP-ER2-WPRE-pA，滴度：5e12，注射量：50 nl，注射位点：AP：2.07，ML：±0.78，DV：-4.19，注射针倾斜角度：8°），这种病毒只有在有 Cre 的细胞里才能表达一种对蓝光敏感的蛋白 ChR2【11】，并且同时表达一种能发出绿色荧光的蛋白 EGFP。所以在 SPFm

里，只有 PDYN+神经元会带上这个“光控开关”，并且被绿色荧光标记。我们还在这只小鼠的 SPFm 区域植入了光纤，这样只要照蓝光，就能精准地激活这群细胞。我们使用的光刺激参数为：波长 470 nm，光强 2 mW，频率 20 Hz，每脉冲持续 10 ms 【12】。为了确保实验的准确性，我们后面专门把这只小鼠的脑制作成了切片，对脑片进行了荧光成像，确认了病毒表达范围和光纤位置都正确（图 6）。

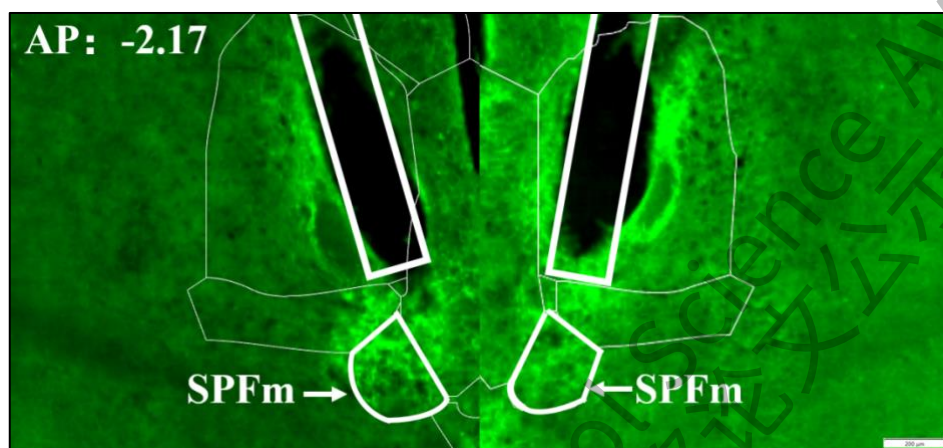


图 6 显示 ChR2 病毒表达和光纤植入位置的脑组织切片

然后我们对这只小鼠做了 Von Frey 测试。跟对照组不同的是，这次一边用针刺脚底，一边用蓝光激活它的 SPFm-PDYN+神经元。结果跟我们预想的一样：激活前，这只小鼠的痛阈为 0.86 克；激活之后，痛阈升高至 1.45 克，提升了 69%，较对照组（1.22 克）也提升了 18%，说明它对疼痛的敏感性降低了。

3.2.2 “消音” SPFm-PDYN+神经元后，小鼠对疼痛变敏感

但是李老师提醒了我们一件事：激活型实验有一个缺陷，那就是你刺激一个脑区的时候，可能引发周围网络里一堆神经元都跟着一起活动，从而产生一些跟这个脑区本身功能没有直接关系的行为。换句话说，看到的现象不一定是因为你激活的那些神经元本身的功能，有可能只是个假象。所以要想做出更加科学严谨的实验数据，就必须加上一个相反的操作：把目标神经元“关掉”，看看行为会不会朝向反的方向改变，也就是失活型实验。

为了把 PDYN+神经元“关掉”，我们使用了另一种病毒（AAV2/9-hEF1a-DIO-EGFP-P2A-TetTox-WPRE-pA，滴度：5e12，注射量：50 nl，注射位点：AP: 2.07, ML: ± 0.78 , DV: -4.19，注射针倾斜角度：8°）（图 7）。TeNT（TetTox,破伤风毒素轻链）会切断神经元突触里负责释放递质的 SNARE 蛋白，阻断突触传递，让神经元没法把自己的信号传给下游 【13】。它在 PDYN+神经元里表达之后，这些细胞就被“消音”了。

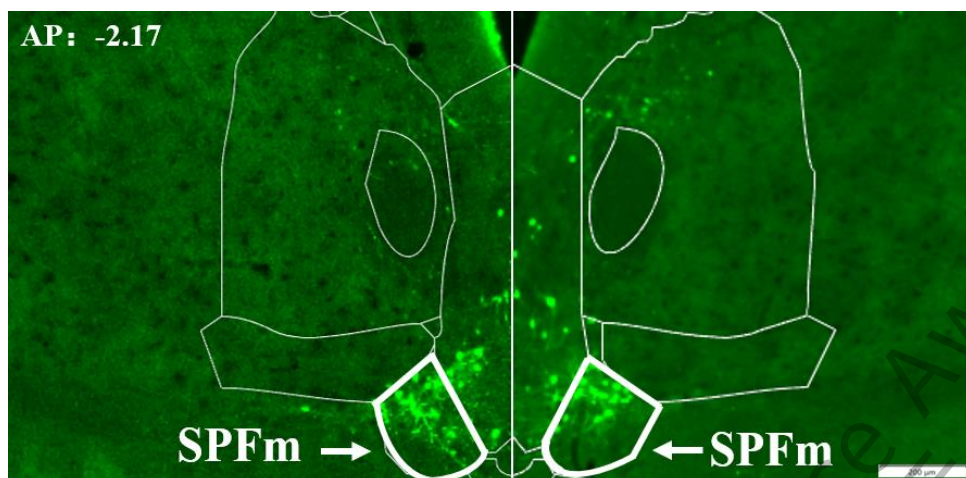


图 7 显示 TeNT 病毒在 SPFM 中表达的脑组织切片

由于这种病毒的效果是不可逆的，我们在注射病毒前对 3 只小鼠分别进行了一次 Von Frey 测试；等病毒表达三周后，我们再次对这同一批小鼠做了 Von Frey 测试。结果是这样的：想要让 TeNT 小鼠抬脚，只需要比之前更小克数的针就够了。TeNT 沉默组的痛阈降低到了 0.42 克，比注射前（1.38 克）下降了 69.3% ($p < 0.05$)，较对照组（1.22 克）下降了 65.4% ($p < 0.01$)（图 8）。也就是说，它们变得更敏感了，跟光激活时的效果正好相反。这个结果表明，SPFM 里的 PDYN+神经元确实能在特定情境下抑制疼痛信号、降低疼痛敏感性。

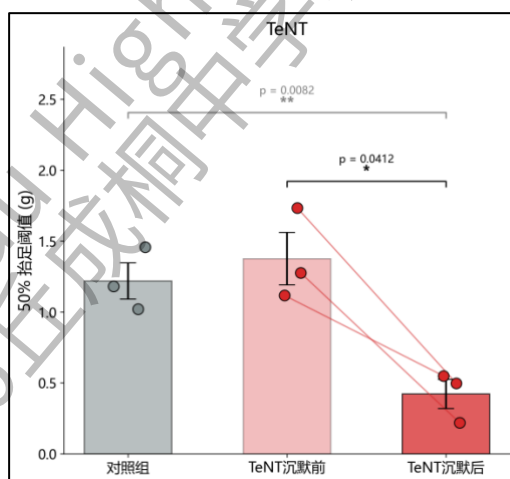


图 8 突触传递阻断组小鼠对疼痛刺激的敏感性增强

3.3 SPFM-PDYN+神经元活动对防御行为的影响

前面的实验告诉我们：SPFM 中的 PDYN+神经元被激活的时候，小鼠对疼痛的敏感度降低了。但问题是，在面对真正危险的时候，小鼠的表现会怎样？如果这时候天上有一只“老鹰”冲下来，小鼠是会正常逃跑，还是会因为激活而变得迟钝？

3.3.1 激活 SPFm-PDYN+神经元会改变对“猛禽俯冲”的防御策略

为了回答这个问题，我们又做了一次视觉“天敌”实验，在行为箱上方播放快速放大的圆盘阴影。但这一次，我们在播放阴影的同时对小鼠的 SPFm-PDYN+神经元进行了光遗传学激活（共 3 只，其中 1 只是在 3.2.1 中使用的那只小鼠）。

结果很有意思。激活之后，小鼠并没有变得迟钝。恰恰相反，它不仅注意到了高处正在逼近的危险，停下了原来正在进行的动作比如舔毛和嗅探，还采取了一种好像更有策略的防御模式：它先是“僵直”（freezing），保持原来的姿势一动不动（89%的试次），似乎想避免被捕食者发现；然后再选择时机逃回安全屋（67%的试次）（附件视频 14、15，图 9）。

这种“僵直”的模式在对照组（3.1.1 中的 3 只小鼠）中没有观察到。

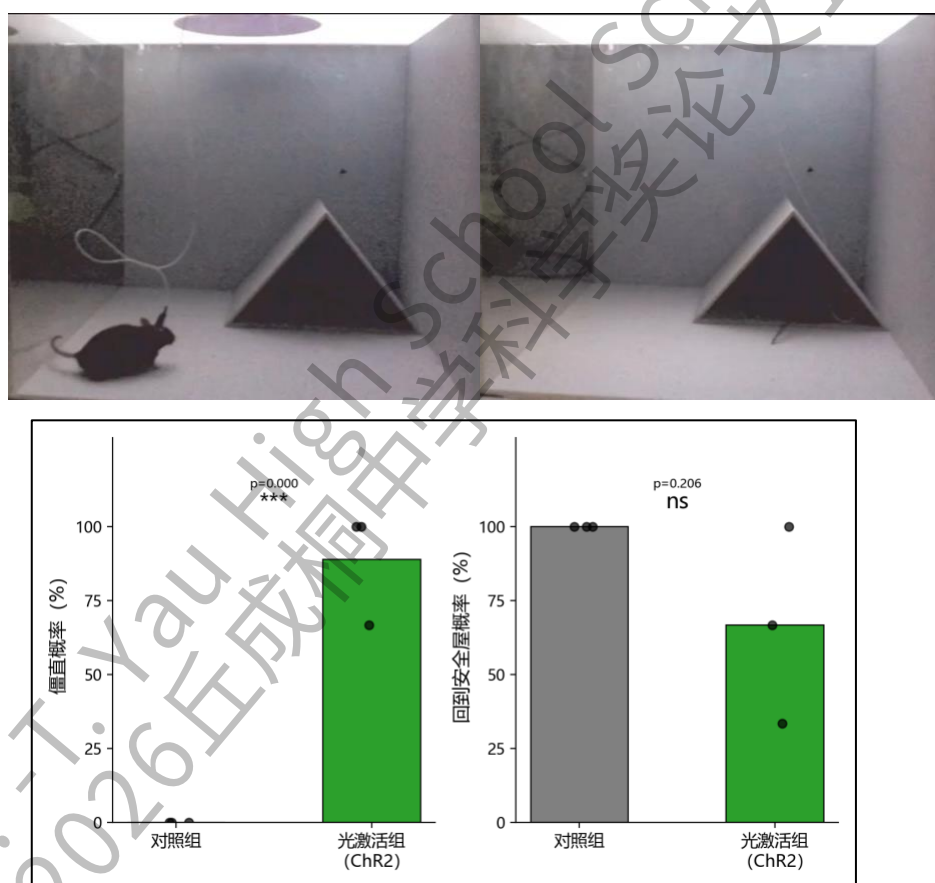


图 9 上：激活 SPFm-PDYN+神经元使小鼠先僵直（左），后逃回安全屋（右）

下：激活 SPFm-PDYN+神经元提升了僵直概率（左），但没有改变逃回概率（右）

这个结果让我们觉得特别有意思。同样是“保护自己”的行为，疼痛刺激引发的抬脚被 PDYN+神经元的激活给抑制了；但视觉“天敌”出现时，PDYN+神经元的激活让小鼠采取了似乎是更优的防御策略，先避免被发现，再择机逃跑。这说明 SPFm-PDYN+神经元并不是简单地抑制所有的防御行为，它好像能分清哪个更重要：疼可以

忍，但“天敌”来了必须灵活应对。这跟我们一开始从骑马和人类带伤逃生中猜想的“大脑通过暂时抑制疼痛来确保执行重要任务”非常吻合。

3.3.2 “消音”SPFm-PDYN+神经元会削弱对“猛禽俯冲”的防御能力

兴奋归兴奋，我们没忘记李坤老师的提醒：激活型实验容易产生假象。所以我们需要再做一个相反的实验，把 PDYN+神经元“消音”，看看小鼠面对视觉“天敌”的时候会怎样。我们用 3.2.2 中的那 3 只 TeNT 组小鼠做了这个实验。

我们把 TeNT 小鼠放进了行为箱，播放了那个放大的圆盘阴影。结果是这样：与激活实验中的“有策略”相比，小鼠看到阴影后，1 只虽然会逃窜、僵直，但是没有逃回“安全小屋”（附件视频 16），另外 2 只则显得更慌乱，先是会慌不择路地乱窜几步（56%的试次逃窜），然后跑到角落上僵直（附件视频 17），但它们没有在任何一次中逃回“安全小屋”（图 10）。

这个结果说明，SPFm-PDYN+神经元的活动对于小鼠在遇到视觉“天敌”时选择逃回“安全小屋”来说是必要的。如果这些神经元被“消音”了，小鼠虽然还能感知到危险，但就是做不出那个果断逃跑的决定。

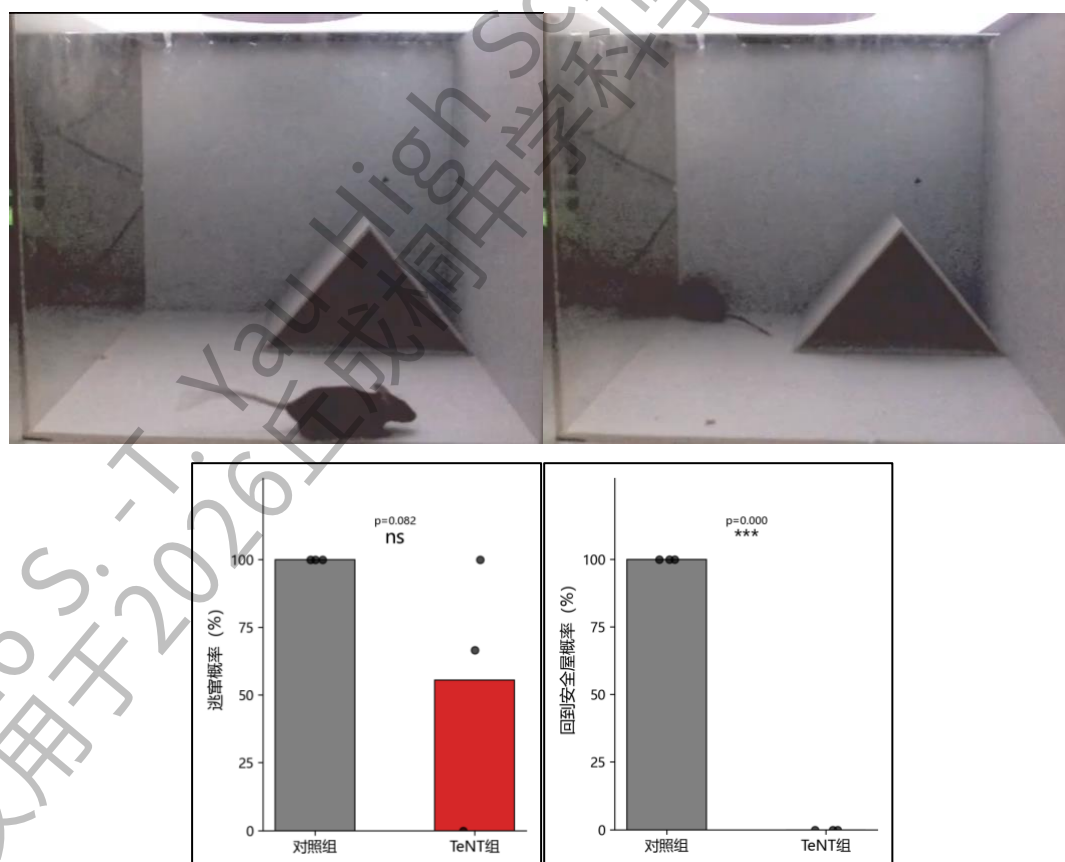


图 10 上：突触传递阻断组小鼠没有明显的防御反应（左）或仅是乱窜（右）
下：整体上对“俯冲猛禽”的防御反应变弱，不再逃回安全屋

3.3.3 激活 SPFm-PDYN+神经元不改变对危险听觉信号的防御行为

在去做视觉“天敌”实验之前，李老师专门嘱咐我们做实验期间尽量不要出声，避免声音对实验结果产生干扰，因为 SPF 这个脑区能接收各种模态的感觉输入，包括听觉。这个提示非常有意思，动物感知天敌不止是通过视觉，也会通过听觉，在自然界中，有的动物根本没看到天敌，只是听到天敌的叫声，就已经快速躲起来了。测试视觉很重要，但听觉也同样重要。那 SPFm-PDYN+神经元会不会也调控听觉危险信号引发的逃跑呢？我们查阅了文献，SPF 这个脑区的确也接收和处理听觉信号，于是，我们决定对之前做过视觉危险信号测试的小鼠，进行听觉危险信号的测试。

我们先做了声音筛选。同样在带有“安全小屋”的行为箱里，我们对小鼠（3.3.1 中的那 3 只小鼠）播放了四种不同类型的中等强度声音：猫叫声、音乐、钥匙碰撞的声音和白噪声。当小鼠在“安全小屋”外自在地探索时，我们播放声音并观察它的反应。结果让我们有点意外：除了白噪声能相对稳定地让小鼠逃回“安全小屋”之外（72% 试次，低于视觉危险信号诱发的逃回概率），其它三种声音大部分时候只让小鼠变得警觉，比如抬头四处张望，（猫叫声：81%，音乐：86%，钥匙碰撞声：78%），但并没有逃跑，也就是说，只有白噪声被小鼠视作“听觉天敌”。

所以我们选择了白噪声作为危险听觉信号，然后重复了之前的激活实验（共 2 只），也就是在播放白噪声的同时用光遗传学激活 SPFm-PDYN+神经元。由于听觉“天敌”实验是研究开始以后才决定增加的，所以我们在项目开始前并没有对这些实验小鼠进行听觉的测试。实验过程中我们发现第 3 只小鼠在基线测试中对声音刺激没有任何反应，怀疑存在听力障碍，所以后续数据分析的时候没有使用这只小鼠的数据。

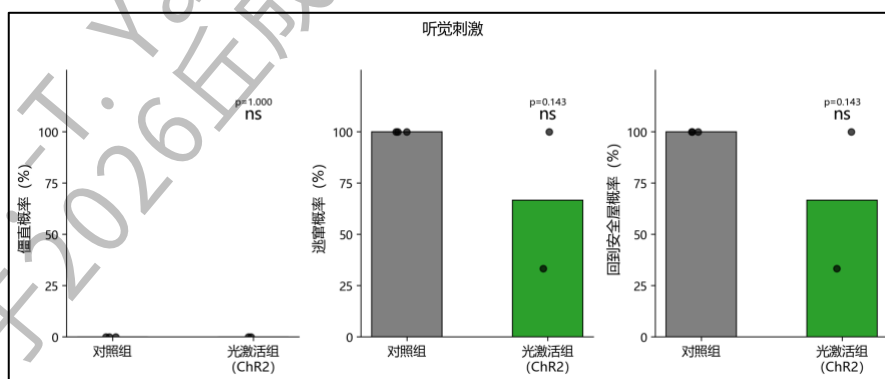


图 11 激活 SPFm-PDYN+神经元未改变小鼠应对白噪声的策略
僵直（左），逃窜（中），回安全屋（右）

结果发现，激活这些神经元并没有让小鼠采取僵直的应对策略（没有任何试次小鼠有该表现），而是也逃窜回了安全屋（67%的试次有逃窜、回到安全屋）（图 11）。这跟我们在视觉“天敌”实验中看到的效应明显不同。

接着我们又用 TeNT 组小鼠（3.2.2 和 3.3.2 中使用的那 3 只）做了相反的实验，也就是把 PDYN+神经元“消音”，看小鼠对白噪声的反应会不会受影响。我们发现阻断 PDYN+神经元的信息传递对白噪声引发的逃回安全屋行为并没有显著影响，小鼠仍然会回到安全屋（67%的试次），这和激活实验的结果比较一致，只是逃回过程似乎有些犹豫（仅 33%的试次有快速逃窜）（附件视频 18，图 12）。

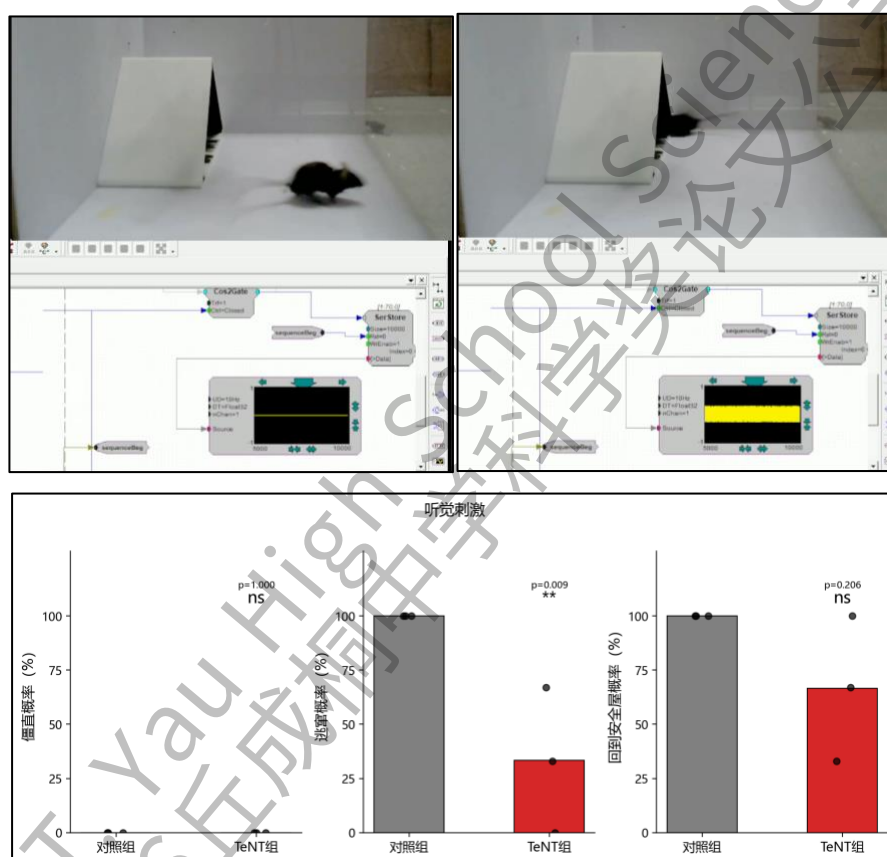


图 12 上：自由探索（左）的突触传递阻断组小鼠听到白噪声后会逃回安全屋（右）
下：突触传递阻断组小鼠听到白噪声后没有僵直（左），逃窜率显著降低了（中），但是仍然会逃回安全屋（右）

通过以上一系列实验，我们一方面初步验证了最初的猜想，也就是大脑中的确存在一种神经机制，能够在暂时抑制疼痛的同时促进重要任务的完成；另一方面，我们发现 SPFM-PDYN+神经元很可能在其中扮演重要角色。除此之外，我们还发现 SPFM-PDYN+神经元的功能似乎有感觉模态选择性，也就是只调控视觉信号诱发的防御行为。也许大脑中还有其它功能类似的脑区，只是负责不同的感觉模态。

3.4 SPFm-PDYN+神经元的下游连接

在做完以上行为实验之后，我们提出了一个新的问题：SPFm-PDYN+神经元到底是怎么做到这件事的？

我们知道任何一个脑区的功能不可能孤立存在，因为它要接收来自其他脑区的信息输入，才能知道外面发生了什么；它也要把处理完的信号发送到其他脑区，才能影响行为。就像一匹马要完成障碍赛，既需要有眼睛告诉它前面有栏杆（输入），也需要有肌肉帮它起跳落地（输出）。文献中早就报道过 SPF 这个脑区能接收感觉输入[2]，但我们更想知道的是另一件事：SPFm 中这群 PDYN+神经元把信号送到了哪里？它们是通过连接谁，才同时实现了“抑制疼痛”和“促进防御”的？

3.4.1 PDYN+荧光轴突纤维只在一个脑区聚集

前面做操控实验的时候，我们用的病毒工具除了能让神经元表达 ChR2 和 TeNT 这两种功能性蛋白之外，还会同时表达荧光蛋白。也就是说，被病毒感染的神经元胞体和轴突纤维都会带上荧光，这让我们有机会确认这些注射的位置是否准确。

每次扫片的时候，我们都会把所有脑片从头到尾仔细看一遍。然后我们发现了一件很有意思的事：有一团密密麻麻的荧光纤维，总是出现在和 SPFm 中 PDYN+神经元胞体相同的几张脑切片上。在其他更靠前或更靠后的脑切片上，几乎看不到这些纤维。李老师告诉我们这些发出荧光的纤维其实是 PDYN+神经元的轴突。

我们对照了一下小鼠脑图谱，发现这个脑区叫 Astr，全称是 amygdalostriatal transition zone（杏仁核-纹状体过渡区）。这个脑区的位置确实很特殊——它正好卡在杏仁核和尾部纹状体之间，就像它的名字说的一样，是个“过渡区”【14】（图 13）。

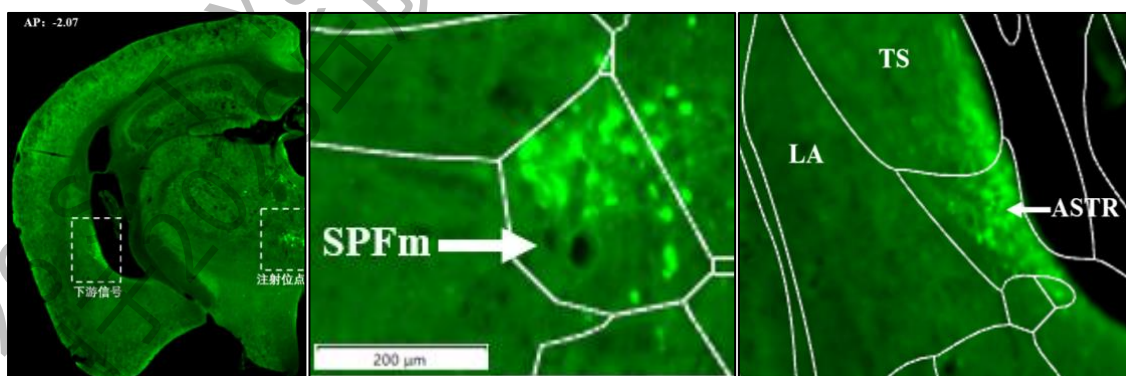


图 13 同一张脑片（左）的 SPFm-PDYN+神经元（中）与 Astr 中的荧光纤维（右）

我们查阅了文献，发现 Astr 是大脑里一个整合情绪与行动的关键节点。过往研究表明，Astr 专门负责处理感觉信号所携带的负面情绪，然后快速启动相应的防御行为

【15】。这让我们很兴奋，因为如果 SPFm-PDYN+神经元把信号送给了 Astr，那正好可以解释我们前面看到的“促进防御”这个行为。

但就在这时，李老师又提醒了我们一个问题：我们用的普通 AAV 病毒虽然能把轴突纤维标记上荧光，但有两个局限。第一，荧光信号本身比较弱，有些下游脑区如果纤维不那么密集，我们可能会漏掉。第二，也是更关键的一点，光看到纤维在一个脑区聚集，并不能说明它们在那里形成了突触连接。纤维可能只是路过这个脑区，真正的目的地还在前面。如果我们想确认 SPFm-PDYN+神经元到底有没有支配 Astr，需要换一种病毒工具。

3.4.2 确认 PDYN+轴突纤维是真的“到了”而不只是“路过”

李老师推荐了一种叫 AAV-DIO-Synaptophysin 的病毒工具。Synaptophysin（突触素）是突触末端的天然标记物【16】。李老师推荐的病毒工具能够在 PDYN+神经元中表达突触素和荧光蛋白的融合蛋白，这群神经元轴突末端的突触结构会被荧光直接“点亮”。我们可以据此判断那些纤维到底只是“路过”，还是真的在那里形成了突触连接【17】。

于是我们用了 1 只 PDYN-Cre 小鼠，在 SPFm 注射了 AAV2/9-hSyn-flex-Synaptophysin-mRuby 病毒（滴度：5e12，注射量：40 nl，注射位点：AP：2.07，ML：+0.78，DV：-4.19，注射针倾斜角度：8°），等待 2-3 周后灌流取脑、切片，用奥林巴斯高通量全自动玻片扫描仪（VS200）进行扫片成像。

结果让我们非常高兴。我们在 Astr 脑区再次看到了荧光信号。而且这次看到的荧光形态和之前很不一样，因为不再是线状或絮状的纤维，而是点状的、颗粒状的信号，这是突触末端的典型形态【17】（图 14）。这说明 SPFm-PDYN+神经元的轴突确实在 Astr 内部形成了突触连接，不只是路过。

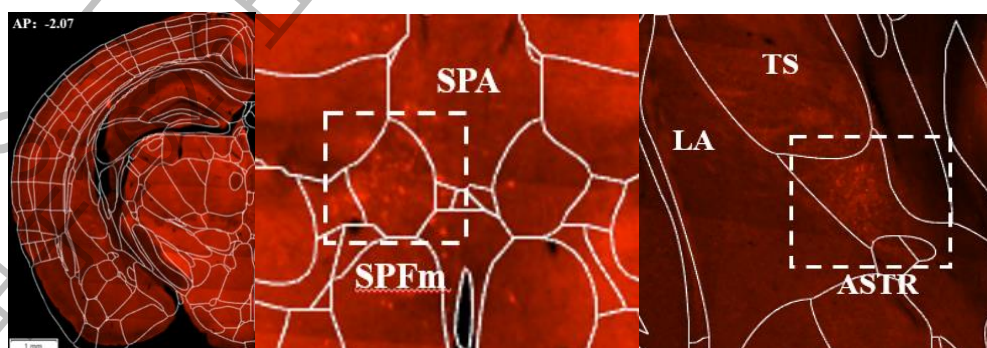


图 14 同一张脑片（左）的 SPFm-PDYN+神经元（中）与 Astr 中的点状信号（右）

更重要的是，我们仔仔细细地检查了与 Astr 同一张切片上的其他脑区，也检查了比 Astr 更靠前和更靠后的很多脑片（一共检查了 132 张），再也没有看到类似的点状荧光信号。这说明 SPFm 中 PDYN+神经元的下游非常单一，只有 Astr 这一个地方。

所以，SPFm-PDYN+神经元只通过 Astr 这一个下游脑区，就同时实现了对疼痛的抑制和对逃跑的促进。我们查阅文献后发现，Astr 参与逃跑相关的行为决策是早有报道的[15]，但 Astr 是否参与痛觉调控，目前还没有报道。也就是说，我们的实验不仅找到了 SPFm-PDYN+的下游靶点，还表明 Astr 可能也参与到疼痛调控中，这为后续更深入的研究打开了一个新的方向。

第4章 结论与创新点

4.1 结论

通过这次研究，我们探索了小鼠大脑 SPFm-PDYN+神经元的功能，并得出了以下结论：

- 1) 这群神经元具有帮助小鼠抑制疼痛、优先应对威胁的功能。在“天敌信号”（比如模拟俯冲猛禽的快速放大阴影）出现时，这些神经元会使小鼠暂时不关注疼痛，确保小鼠以正确的方式躲避危险。
- 2) 这群神经元对视觉威胁信号诱发的防御反应有调控作用，但是对听觉危险信号诱发的防御反应的调控作用不明显。
- 3) 这群神经元的下游只有 Astr 这一个脑区（杏仁核-纹状体过渡区），提示 Astr 可能是“抑痛促防”功能的直接执行者。

4.2 创新点

- 1) 首次研究了 SPFm-PDYN+神经元的功能。虽然 SPF 区域作为丘脑的一部分早有研究，但是 SPFm 区域 PDYN+神经元的功能没有被公开报道过。
- 2) 首次发现大脑里的神经元不仅能抑制疼痛，还能促进小鼠的防御行为，也就是说它们的“抑痛”和“促防”功能是协同的。也许这种同一群神经元的多功能协同在大脑里是一种普遍存在的现象，能让动物行为的表达更加准确和高效。
- 3) 发现 SPFm-PDYN+神经元可能只在视觉场景下对防御行为有调控作用，在听觉场景下没有调控作用。这种感觉模态选择性和以往研究做出的 SPF 能够整合多种模态感觉信号的结论是不同的，说明 SPF 的不同亚区或者不同细胞类型可能有不同的感觉模态选择性。
- 4) 虽然过去已经有文献提到 Astr 在防御行为中的作用，但我们首次发现 Astr 脑区可能也参与了疼痛调控，这为后续探索 Astr 的疼痛调控机制提供了新线索。

第 5 章 讨论

5.1 阴性结果的意义：模态选择性

在听觉相关的实验中，我们的实验结果和预期是不符的，严谨一点来说，我们的结果是阴性的。也就是说，我们没有看到 SPFm-PDYN+神经元对听觉危险信号诱发的逃跑行为有明显的调控作用，但我们认为这很有意义。

因为它告诉我们一件事，SPFm-PDYN+神经元对逃跑行为的调控作用不是通用的。它们很可能只负责视觉危险信号，不负责听觉危险信号。李老师说，在神经科学里，这种特性被称为感觉模态选择性，意思是同一群神经元只对特定感觉通道的输入进行调控。所以，这群 PDYN+神经元不是小鼠大脑里一个泛泛的危险警报器，它们就像烟雾报警器，只在烟雾危险出现的时候才发出警报。当小鼠“看”到危险信号的时候（比如猛禽的阴影），它们负责促进逃跑；而当小鼠“听”到危险信号的时候，它们好像压根没起作用，而是由别的脑区在负责。

5.2 Astr 同时介导疼痛抑制和逃跑促进的可能机制

Astr 参与促进防御行为是早有报道的，但 Astr 是否参与痛觉调控，目前还没有人研究过。我们的实验首次提示 Astr 可能在疼痛调控中也扮演着某种角色，因为它是 SPFm 中 PDYN+神经元的唯一下游靶点。

那么 Astr 是如何能够同时做到既抑制疼痛、又促进防御的呢？结合 SPFm 中 PDYN+神经元既释放谷氨酸又释放强啡肽的特点，以及 Astr 中已知的细胞类型多样性 [15]，我们推测在 Astr 中可能存在着两类与 SPFm-PDYN+相关的神经元。一类是已知的表达 D2 受体的神经元，这种神经元对负性刺激反应很强，可能接收来自 PDYN+神经元释放的谷氨酸信号，负责在视觉危险信号出现时促进防御。另一类可能是表达阿片受体的神经元，接收 PDYN+神经元释放的强啡肽信号，负责抑制疼痛。

也就是说，当小鼠看到“天敌”的时候，SPFm-PDYN+神经元同时释放谷氨酸和强啡肽，分别作用于 Astr 中不同类型的神经元：谷氨酸启动防御程序，强啡肽抑制疼痛信号。同一个上游脑区，通过两种不同的神经递质，作用于同一个下游脑区中的两类不同神经元，实现了两个协同的功能。

当然，这目前还只是一个基于现有文献和我们实验数据的推测，未来还需要通过更精细的实验来直接验证。

5.3 局限性与未来方向

首先，我们的行为学实验一共只使用了 12 只小鼠，数量比较少。其中一个原因是这是我们在李坤老师实验室开展的一项探索性研究项目，不便占据实验室过多实验资源。但是随着一些有科学价值的实验结果出来，李老师有计划继续深入这项研究，我们可能有机会参与。还有一个原因是我们平时只能是利用下午放学后、周末和节假日的时间做动物实验，而病毒表达和动物行为学实验都需要比较长的时间，在有限的时间里我们只能做到这些。增加实验动物的数量应该可以帮助我们得出更可靠的结论。

其次，我们的实验靠的是光遗传学和突触阻断技术来控制神经元的活动，但这些方法只能间接地告诉我们这群神经元起了作用。为了进一步确认它们的真实性，我们需要直接记录神经元的活动，比如用一种叫 GCaMP 的技术，能在神经元被激活时发出荧光，从而让我们看到它们是否真的对疼痛和威胁信号做出了反应。这也是我们后续实验需要努力方向的一部分。

参考文献

- [1] Cudeiro-Mazaira FJ, et al. The thalamus: a dynamic door to perception. *Rev Neurol*. 2002;34(2):121-130. PMID: 11988906.
- [2] Yasui Y, Nakano K, Mizuno N. Descending projections from the subparafascicular thalamic nucleus to the lower brain stem in the rat. *Exp Brain Res*. 1992;90(3):508-518. doi:10.1007/BF00230933. PMID: 1385199.
- [3] Wang H, Flores RJ, Yarur HE, Limoges A, Bravo-Rivera H, Casello SM, Loomba N, Enriquez-Traba J, Arenivar M, Wang Q, Ganley R, Ramakrishnan C, Fenno LE, Kim Y, Deisseroth K, Or G, Dong C, Hoon MA, Tian L, Tejeda HA. Prefrontal cortical dynorphin peptidergic transmission constrains threat-driven behavioral and network states. *Neuron*. 2024 Jun 19;112(12):2062-2078.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2024.03.015. Epub 2024 Apr 12. PMID: 38614102; PMCID: PMC11250624.
- [4] Rojewska E, et al. Alterations in the Activity of Spinal and Thalamic Opioid Systems in a Mice Neuropathic Pain Model. *Neuroscience*. 2018;390:293-302. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.08.013. PMID: 30176293.
- [5] Corder G, Castro DC, Bruchas MR, Scherrer G. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu Rev Neurosci*. 2018;41:453-473. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061522. PMID: 29852083.
- [6] Higginbotham JA, et al. Endogenous opioid systems alterations in pain and opioid use disorder. *Front Syst Neurosci*. 2022;16:1014768. doi:10.3389/fnsys.2022.1014768. PMID: 36341476.
- [7] Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51(1):5-17. doi:10.1016/0304-3959(92)90003-T. PMID: 1404409.
- [8] Shang C, Liu Z, Chen Z, et al. Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. *Nat Commun*. 2018;9(1):1232. doi:10.1038/s41467-018-03580-7. PMID: 29581503.

- [9] Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:284. doi:10.3389/fnmol.2017.00284. PMID: 28928634.
- [10] Bonin RP, Bories C, De Koninck Y. A simplified up-down method for the von Frey filament test. *J Neurosci Methods*. 2014;232:119-123. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.011. PMID: 24858600.
- [11] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 2005;8(9):1263-1268. doi:10.1038/nn1525. PMID: 16116447.
- [12] Sparta DR, Stamatakis AM, Phillips JL, et al. Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nat Protoc*. 2012;7(1):12-23. doi:10.1038/nprot.2011.413. PMID: 22157973.
- [13] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*. 1992;359(6398):832-835. doi:10.1038/359832a0. PMID: 1331807.
- [14] Hintiryan H, Foster NN, Bowman I, et al. The mouse cortico-striatal projectome. *Nat Neurosci*. 2016;19(8):1100-1114. doi:10.1038/nn.4332. PMID: 27322419.
- [15] Lee J, Wang W, Sabatini BL. Amygdalostriatal transition zone neurons encode sustained valence to direct conditioned behaviors. *bioRxiv*. 2022. doi:10.1101/2022.10.28.514263. (In revision at *Nat Neurosci*). PMID: 36380758.
- [16] Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*. 1985;41(3):1017-1028. doi:10.1016/S0092-8674(85)80082-9. PMID: 3924408.
- [17] Xu W, Südhof TC. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science*. 2013;339(6125):1290-1295. doi:10.1126/science.1229534. PMID: 23493706.

心得体会

1) 我们认识到任何实验方法都有局限性

在研究过程中，好几次当我们因为看到预期的实验结果而欢呼雀跃的时候，都被李老师泼了冷水：光遗传学激活虽然有行为学表型但有可能是假象，神经轴突纤维虽然在 Astr 里聚集但有可能只是路过。这种冷静严谨的提示，让我们不得不又用其它方法把实验再做一遍。

这让我们认识到，各种实验方法都有它的优势和局限性。只有通过广泛阅读文献加上自己的实践，才能有充分的认识，才能用不同的实验方法打出一套组合拳，从而得出科学可靠的结论。

客观来说，我们的实验环境（把小鼠放进有“安全小屋”的行为箱）是我们不得不承认的局限。也许换一种实验环境，我们看到的现象就消失了呢？这也是有可能的。如果真的是那样，说明我们还没有真正在原理水平上理解这些神经元的工作机制，我们看到的还只是表象，还需要更多探索。

2) 我们认识到对待阴性实验结果的态度很重要

在实验过程中，我们曾经一度为没有看到 SPFm 中 PDYN+神经元对由噪声诱发的逃跑行为的调控作用而感到沮丧。这是因为我们查阅的文献里说 SPF 这个脑区能接收到各种模态的感觉，包括听觉，而我们的实验结果却提示 SPFm 中的 PDYN+神经元不接收听觉输入。我们怀疑自己的实验操作出了问题，仔细检查了所有的实验环节，包括电脑里的声音播放软件和行为箱上的喇叭，最后确认实验操作没有问题。

在与李老师分析原因的过程中，我们逐渐认识到有两种可能性。第一，虽然 SPFm 中的 PDYN+神经元不对听觉输入起作用，但不代表其他细胞类型不起作用，也就是说 SPFm 接收听觉输入，只是没有传到 PDYN+神经元而已。第二，可能 SPFm 真的不接收听觉输入，而是 SPF 的其他亚区接收，因为以前的研究方法比较粗糙，很难精确到亚区。

虽然听觉实验的结果是阴性的，却让我们意识到 SPFm 中 PDYN+神经元发挥调控作用很可能有感觉模态选择性，这其实可以算是一个小惊喜。这让我们认识到，即使实验结果是阴性的，只要实验设计和操作是可靠的，也不能因为结果与预期不符而随意忽视，更不能篡改，否则可能会错过有重要发现的机会。

3) 我们认识到从好奇心到科学发现有很长的路要走

老师告诉我们好奇心非常重要，因为它是科学发现的源动力之一。但是好奇心还是局限在对现象的观察上，比如我在练习马术的过程中注意到，障碍马在执行紧急任务时就能暂时不管疼痛，然后就对这个现象产生了兴趣。这可以看成是科学发现的起始点。

科学发现是要通过严谨的实验设计、实验过程、数据分析和总结来努力揭示现象背后的原因。比如在我观察到的马在不同场景下对腿疼有不同控制力的现象基础上，提出科学假设，选择实验动物、脑区、研究工具，然后在实验过程中注意每一个操作环节，当出现阴性结果的时候不能因为不符合自己的假设就随便忽视，最后才能得出相对可靠的结论。

4) 女性在各个领域都可以有非常出色的表现

虽然这和课题不直接相关，所以我把这一条放在了最后，但这是我感受非常深刻的一点。我们整个课题研究团队都是女性。我和我的队友都是北京市第一〇一中学高二女生，我们的两位指导老师都是女性，带教我们实验技术的博士生也主要是女性。这个社会对女性仍然存在一定的偏见和歧视，认为只有某些领域和岗位适合女性，但这个研究不仅让我在科研上有了更深刻的理解，也让我对女性力量有了进一步的觉醒。我们可以帅气得练习障碍马术，可以优雅得跳芭蕾舞，也可以果断利索得拿手术刀做动物手术，更加可以做出出色的科学研究成果。