# 厌恶性条件反射与脑中 c-fos 的表达\*

## 杨 杰 林文娟

中国科学院心理研究所脑-行为研究中心(北京 100101)

摘 要 Fos免疫组织化学法作为一种神经功能活动形态定位法,已在大鼠厌恶性条件反射的神经机制的研究中得到应用。无论是在味觉厌恶性条件反射的研究中,还是在听觉刺激与电击相结合的厌恶性条件反射的研究中,都证明了条件反射建立后,条件刺激能诱导出与非条件刺激相似的c-fos表达的分布,这提示条件反射学习沟通了条件刺激和非条件刺激这两种不同刺激在大脑中的传导通路。

关键词 c-fos, 厌恶性条件反射, 桥脑臂旁核, 孤束核分类号 B845

C-fos是一种原癌基因,可在数分钟内对外界刺激作出反应,并进行表达,所以被称为即刻早期基因。它编码一种核磷酸蛋白,作为转录因子激活特定的DNA位点,从而启动相关基因的表达,这样它就把外界刺激所诱发的短暂的细胞内信息与由基因改变所产生的长时程反应藕联起来了。在缺乏新异或强烈的刺激时,神经元中的c-fos基因转录水平很低,但当神经元兴奋或状态变化时,c-fos表达迅速增加,加之它在5-6小时后又快速消退,因而免疫组化法检测出的高水平的Fos蛋白就被用作神经元活动变化的标志[1]。事实表明c-Fos免疫组化方法能够标记多突触神经通路中的兴奋神经元[2],从而被广泛用于功能性神经解剖及神经通路的研究[3]。本文对近年来c-Fos免疫组化法在厌恶性条件反射研究中的运用以及所取得的成果做一综述。

## 1 味觉厌恶性条件反射与脑中c-fos表达

经典条件反射的建立过程是给动物呈现条件刺激(CS, conditioned stimuli)后、紧接着施加非条件刺激(UCS, unconditioned stimuli),这种操作重复几次后,当只呈现CS时,动物也出现了UCS所诱发的反应。味觉厌恶性条件反射(CTA, conditioned taste aversion)是以新异味觉刺激作为CS,以药物注射、X射线辐射等引起的身体不适作为UCS,被训练的大鼠对这种新异液体的再次饮用量明显下降,这种行为表明新异液体的味道使大鼠产生了厌恶反应。这种条件反射与经典条件反射的区别在于:一是只需进行一次训练;二是CS与UCS之间的时间延迟可长达几小时。关于这种条件反射脑机制的研究开始于60年代,主要采用

本文初稿于1999-03-17收到,修改稿于1999-06-21收到。

<sup>\*</sup>本义由中国科学院重点基础研究基金国家自然科学基金(39830130)资助。

损毁和电生理的方法<sup>[4]</sup>,确定了一些与CTA相关的脑区,但这两种方法有两个局限性,一是没有保持大脑的正常功能状态,二是研究的脑区范围有限。而c-fos免疫组织化学法保证了动物是处于正常的生理状态下,并且通过全脑切片可以看到整个大脑的活动情况。

根据神经通路理论,CS与UCS在大脑中都有它们各自的传导通路,外周信息由各自的传导通路传到脑中,在学习过程中这两种信息可能在脑中的某些区域发生相互联系,从而使动物对条件刺激的反应发生改变。对于CTA的研究,fos免疫组织化学法可以回答三个问题:一是学习前味觉刺激所引起的大脑活动;二是学习前单独的内脏刺激所引起的大脑活动;三是学习后味觉刺激所引起的大脑活动的条件化改变。这样就可以发现大脑中哪些核团的神经元活动在学习后发生了变化,从而为揭示条件反射的脑机制提供更多、更全面的信息。1.1 味觉刺激、内脏刺激与脑中的c-fos表达

大鼠的味觉传导通路研究得已较为清楚,味觉信息经面神经、舌咽神经和迷走神经到达孤束核(NTS, the nucleus of the solitary tract)前外侧部的味觉神经元,换元后的神经纤维投射到同侧的桥脑臂旁核(PBN, the parabrachial nucleus),PBN中的味觉神经元经两条途径把味觉信息传向前脑:一条是腹侧前脑系统,另一条是丘脑皮层通路。第一条通路属于单突触同侧投射,与杏仁中央核、终纹床核、下丘脑外侧区、无名质及味觉皮层发生交互联系;第二条通路是味觉信息通过双侧上行到达丘脑味觉区,而丘脑味觉区与定位于岛无颗粒皮质、岛乱颗粒皮质的味觉皮质有交互联系。这两个系统在丘脑水平有相互作用,有报道发现从丘脑味觉区到杏仁中央及外侧核存在少量的投射[5]。

用fos免疫组化法发现, 味觉刺激在NTS中只能引起低水平的c-fos表达 $^{[6]}$ ; 但不同的味觉刺激可在PBN的不同部位诱导出明显的c-fos表达 $^{[7]}$ , 例如糖精水(大鼠喜好的液体)在PBN 外侧亚核的背部(DLS, the doral lateral subnucleus)和外侧亚核的中部(CLS, the central lateral subnucleus),清水在DLS, NaCl溶液在DLS和内侧亚核的中部(CMS, the central part of the medial subnucleus)中诱导出大量的c-fos表达,因为糖精水、清水、NaCl溶液都在PBN的DLS中诱导出c-fos表达,因此推测PBN的DLS与味觉快感、饮用行为有关,CLS可能与糖溶液的味觉信息有关,CMS可能与NaCl溶液的味觉信息有关。HCl溶液和奎宁溶液(一种令大鼠天生厌恶的溶液)都能在PBN外侧亚核的外部(ELS, the external lateral subnucleus)和内侧亚核的外部(EMS, the external medial subnucleus)中诱导出大量的c-fos表达,由此可推测ELS和EMS与苦、HCl等味觉信息有关。从PBN发出的上行味觉纤维被破坏后,糖精水和奎宁仍能在上述部位诱发大量的c-fos表达,这提示在味觉刺激下,PBN中大量的c-fos表达是由上行投射纤维激活而不受前脑高级中枢的影响。从这看出味觉刺激可在某些脑区中诱发c-fos表达,并且不同性质的味觉刺激可激活核团的不同区域,这些c-Fos阳性免疫反应(c-FLI,c-Fos-like immureactivity)区可能在CTA学习中发挥一定的作用。

另外, Fos免疫组化法研究发现, 腹腔注射3%的LiCl(建立CTA的有效剂量)可在杏仁核、NTS、下丘脑室旁核(PVH, paraventricular nucleus hypothalamus)、视上核(SON, supraoptic nucleus)、PBN中诱导出大量的c-fos表达。为了排除渗透压的影响,对照组注

射了同等渗透压的NaC1溶液却只能在上述部位诱导出少量的c-fos表达,说明这些部位的c-fos表达主要与LiC1的药理作用有关<sup>[8]</sup>。更为精细的观察发现LiC1所引起的c-fos表达主要出现在杏仁中央核、PBN的ELS、NTS的尾侧和中间联络部、最后区(AP, area postrema),并且迷走神经切除术表明NTS能由两侧的迷走神经激活,激活的NTS, AP主要投射到PBN的ELS<sup>[9]</sup>。损毁实验表明AP的损毁能阻断LiC1所介导的CTA的建立,并且这种CTA学习的失败是因为阻断了LiC1所引起的一些生理变化而造成的<sup>[10]</sup>,这提示LiC1在AP中所诱发的c-fos表达可能与LiC1对中枢活动的影响有关。在Swank的实验中,苯丙胺(无催吐作用),另一种建立CTA的有效药物,也能在AP、NTS尾部及中间联合部、PBN的外侧部诱发出c-fos表达,只是强度比LiC1(有催吐作用)弱一些<sup>[11]</sup>。Sakai等人分别用13种CTA的有效UCS处理大鼠后,发现在NTS、AP及PBN的ELS中出现了大量的c-fos表达<sup>[12]</sup>。这些结果提示NTS、AP及PBN的ELS可能是CTA有效UCS的公共激活区,它们可能在CTA的建立或表达中发挥一定的作用。

从以上的实验表明,Fos免疫组化法可以清晰的揭示出味觉及内脏刺激所激活的脑区,有些脑区既能被味觉刺激激活又能被内脏刺激激活(如PBN),这些部位可能在学习时两种信息的相互联系中发挥重要作用。从总体上来看UCS所激活的脑区多于CS,而各种UCS所激活的脑区又有一些重叠之处(如NTS, PBN等),这些重叠区反应了CTA有效UCS对大脑作用的公共特点。这些信息为进一步探索CTA的中枢机制提供了入手点,并且为揭示CTA建立及表达时核团之间的功能联系提供功能性神经解剖的基础。

#### 1. 2 条件刺激与脑中c-fos的表达

味觉刺激与内脏刺激单独作用时,能在脑中的一定部位引起c-fos表达的增加,而建立条件反射后,作为条件刺激的味觉刺激在中枢所产生的效应有哪些变化呢?在正常情况下,NaCl溶液不能在PBN的ELS中诱发出c-fos表达,但用NaCl溶液作为CS建立CTA后,口中灌注NaCl溶液能在尾部PBN的ELS中诱发大量的c-fos表达<sup>[7]</sup>。另外在正常大鼠中,糖精水引起PBN外侧亚核的中间部(CLS,the central lateral subnucleus)产生c-FLI反应;建立CTA后,Fos 阳性神经元转移到了PBN外侧亚核的腹部(VLS,the ventral lateral subnucleus)(VLS包括ELS区)<sup>[13]</sup>。从这两个实验可看出,条件训练改变了味觉刺激在PBN的激活区域,并且趋向UCS反应区——ELS区,有实验表明双侧损毁PBN后,不能建立CTA<sup>[4]</sup>,这提示味觉和内脏感觉的联系可能发生在PBN中,另外因为厌恶性溶液(如:HCL溶液,奎宁)也能在PBN的ELS中诱导出密集的c-FLI,所以这一区域可能又与大鼠对味觉的厌恶反应有关。

Houpt发现杏仁中央核神经元的C-FLI只有在CTA形成后才能出现<sup>[15]</sup>,电生理的实验结果表明,正常大鼠中,糖精水的刺激不能在杏仁基底外侧核引起高频率的电发放,但建立CTA后,糖精水却能引起杏仁基底外侧核的高频电发放<sup>[4]</sup>,这说明杏仁核神经元的活动在学习中发生了条件化的改变。有实验表明<sup>[16]</sup>,损毁杏仁中央核(CEA, the central amygdaloid nucleus)不影响CTA的建立,但损毁杏仁基底外侧核却能阻断CTA的建立,这提示神经元活动的条件化改变并不一定与糖精水饮用量下降的行为表现相平行。

许多实验都已经证实[6,11],糖水与腹腔注射LiCl溶液配对建立CTA后,糖水的味觉刺激

就能在NTS的中间联络部(iNTS, intermediate nucleus of the solitary tract)引起c-fos 表达的条件化增加,而对照组却没有发现明显的c-fos表达。进一步的实验证实,iNTS中出现的C-FLI随着CTA的消退而消失<sup>[6]</sup>。这些都有力地说明iNTS中的C-FLI反应是条件反射训练的产物。但损毁实验表明,双侧损毁NTS后,CTA的行为反射仍能建立<sup>[17]</sup>,这说明NTS与CTA表达中糖精水饮用量的下降无关。

为了进一步探讨NTS中C-FLI与CTA的关系,Swank等用苯丙胺代替LiCl,发现苯丙胺单独注射时只能在iNTS中诱导产生少量的C-FLI,但与糖精水配对建立CTA后,糖精水却可以在iNTS中诱发出多于单独注射苯丙胺时的c-fos表达,而且与LiCl组的糖精水所引起的c-fos表达数量基本相同<sup>[11]</sup>。另外奎宁(quinine)是一种令大鼠天生厌恶的液体,它的灌注不能在iNTS中诱发C-FLI,但与腹腔注射LiCl配对后却可以在iNTS中诱发C-FLI<sup>[18]</sup>,这说明iNTS中的C-FLI与厌恶反应无关,这一事实也揭示出是味觉与内脏输入在时间上的联系改变了iNTS中神经元的活动。

iNTS中被CTA所诱导出的c-fos表达是被哪来的投射所激活的呢? Schafe用糖精水与腹腔注射LiCl配对建立CTA后,在上丘水平切断一侧的前后脑联系,发现单独注射LiCl时iNTS中的C-FLI无变化,但是建立CTA后,糖精水所诱发的C-FLI却只出现在保持联系的一侧脑干的iNTS中[19],从而说明CTA在iNTS中所诱发的C-FLI是由前脑的输入引起的。

Schafe没有停留于此,他把Fos免疫组化法与损毁法相结合,在下面的实验中对前脑与iNTS的功能性神经解剖联系进行了研究。他发现双侧电损毁杏仁核后<sup>[20]</sup>,不能在一次性训练中建立CTA,并且在iNTS中不能诱发出c-fos表达。双侧电损毁味觉皮层后<sup>[21]</sup>,也不能在一次性训练中建立CTA,但iNTS中仍能诱发出相当数量的c-fos表达,虽然比训练过的完整大鼠显著降低,但与没有训练的组相比有显著增加。这提示iNTS中的c-fos表达主要受杏仁核的影响,而岛皮质对iNTS中的c-fos表达也有作用,岛皮质向iNTS的投射纤维可能在杏仁核中换元或者在它附近通过。而单侧电损毁岛皮质或杏仁核都不能影响CTA的建立,同时c-fos表达只出现在没有损毁一侧的iNTS中,并且在上述两种损毁中,无损毁侧的c-fos表达数量与损毁前很相似,这提示iNTS中的c-fos表达是被同侧输入所激活的。

CTA的外在行为表现是对新异液体饮用量的下降;而c-fos表达揭示了CTA所引起的大脑神经元活动的变化。C-FLI核团不仅仅出现在与CTA的行为反射有关的核团(如PBN),同时也揭示出与CTA行为反射无关的一些脑区(如NTS、CEA)。Fos免疫组化法所揭示的C-FLI核团无论与CTA的行为反射有无关系,但它们确实反映出CTA的建立使大脑中某些区域的神经元活动发生了条件化的改变,这也提示条件反射对动物或人的作用可能是复杂而深远的。

### 2 其它厌恶性条件反射与脑中c-fos的表达

Pezzone等<sup>[22]</sup>用听觉刺激作为CS,以电击脚部为UCS建立厌恶性条件反射后,单纯的听觉刺激可以和电击刺激一样在PVH(用免疫双标法发现,其中一些神经元含有促肾上腺皮质激素释放激素),隔核的腹外侧核(LSV, the ventral lateral septal nuclei),杏仁内侧核(MEA, the medial amygdaloid nuclei),感觉运动皮层(the sensorimotor cortex),

基底神经节(the basal ganglia)和丘脑核团引起c-fos表达的增加,但其数量明显少于非条件刺激组;而控制组在上述部位没有或只有少量的c-fos表达。另外在脑干的研究中发现条件反射建立后,CS与UCS一样能在下列一些区域产生C-FLI,它们是蓝斑(A6)的去甲肾上腺能神经元,孤束核(A2/C1),延髓的腹外侧部(A1/C1, the ventral lateral medulla),A5, A7,导水管周围灰质(PAG,periaqueductal gay)背部与腹部的一些神经元,中缝背核中含5-羟色胺的神经元;而未进行厌恶条件反射学习训练的组中听觉刺激除了在PAG中有基础表达外,几乎没有C-FLI<sup>[23]</sup>。虽然两种厌恶性条件反射所诱导的c-fos表达区域各有不同,但它们都能在孤束核中诱发出C-FLI。孤束核在调节内脏功能方面有着广泛的作用,在正常情况下孤束核接受迷走神经的输入,向上投射到下丘脑和海马从而影响神经内分泌活动「<sup>[24]</sup>;而当大鼠学习后,信号刺激所激活的高级脑中枢把信息向下传递至孤束核,然后再影响神经内分泌活动,所以孤束核可能在心理应激及条件应激对机体生理状态的调节方面起着重要的枢纽作用。

另外,Smith等人用c-fos mRNA原位杂交法研究大鼠的听觉刺激条件反射发现,条件反射训练之后,声音刺激与电击脚部刺激一样能在隔区、扣带回和梨状内核中诱发出大量的 c-fos表达;并且条件刺激与非条件刺激都能在蓝斑中诱发出高水平的c-fos表达,这一区域的c-fos表达与刺激所引起的血浆皮质酮浓度的升高有着密切的关系。非条件电击刺激能在PVH中诱发大量的c-fos表达,但条件刺激或经历过电击后的非条件电击都不能在PVH中诱发c-fos表达<sup>[25]</sup>。而上文中用FOS免疫组化法发现,条件刺激可在PVH神经元的细胞核中诱发出少量的c-FLI反应,这些FOS蛋白可能不是由核内的DNA转录而来,只是细胞浆中已有的FOS蛋白进入到细胞核中。条件刺激在下丘脑及脑干中与自主神经有关的核团中诱发的c-FLI,很可能与心理应激所引起的生理变化有关。

在以听觉刺激为条件刺激的厌恶性条件反射的研究中,条件刺激在大脑中的广泛区域诱发出C-FLI,这些区域与Sandner等的实验结果有相当大的重叠<sup>[26]</sup>。Sandner通过电击自由运动的大鼠,或向与厌恶行为有关的某些脑区(如PAG,下丘脑内侧核团)注射微量的 Y-氨基丁酸阻断剂或兴奋性氨基酸的方法来诱导脑中的c-fos表达,结果发现无论是化学刺激还是电刺激,它们在大脑的C-FLI区域有很大的重叠,这些区域是杏仁核、终纹、乳头体下区、下丘脑、导水管周围灰质、上丘、楔形核和蓝斑。这同其它方法如痛觉或应激作比较,有非常相似的模式。根据这些结果我们可以看到厌恶反射所涉及的核团是非常多,而且分布也是非常广泛的,关于这些核团的功用及它们之间的相互联系还有待进一步的研究。

### 3 总结

Fos免疫组化法在厌恶性条件反射研究中揭示出许多与条件反射学习有关的神经核团及大脑功能活动的改变。这种变化大致可分为两种:一种是随着条件反射的建立,核团中的 c-fos表达从无到有或由少至多,如杏仁核、PVH、NTS;另一种是随着条件反射的建立,核团中c-fos表达的位置发生了变化,如PBN。更为重要的特点是,条件反射建立后,CS能诱

发出与UCS相似的c-fos表达分布,这提示条件反射建立的神经机制可能是在高级中枢调节下,两种刺激在大脑中传导通路的沟通。

### 参考文献

- [1] Herrera D G, Robertson H A. Activation of c-fos in the brain. Progress in Neurobiology, 1996, 50:83-107.
- [2] Sagar S M, Sharp F R, urran E. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science, 1988,240:1328-1331.
- [3] Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. The Journal of Neuroscience Methods, 1989,29:261-265.
- [4] Yamamoto T. Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. Brain Research Bulletin, 1991, 27:403-406.
- [5] Reilly S. The role of the gustatory thalamus in taste-guided behavior. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1998,22:883-901.
- [6] Houpt T A, Philopena J M, et al. Increased c-fos expression in nucleus of the solitary tract correlated with conditioned taste aversion to sucrose in rats. Neuroscience Letter, 1994,172:1-5.
- [7] Yamamoto T. Representation of hedonies and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. Physiology & Behavior, 1994,56:1197-1202.
- [8] Yin Gu, Gonzalez M F, et al. Expression of c-fos in brain subcortical structures in response to nauseant lithium chloride and osmotic pressure in rats. Neuroscience Letter, 1993,157:149-152.
- [9] Yamamoto T, Shimura T. c-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride. Neuroreport, 1992,3:1049-1052
- [10] Bernstein I L, Chavez M. Allen D,et al. Area postrema mediation of physiological and behavioral effects of lithium chloride in the rat. Brain Research, 1992,575:132-137.
- [11] Swank M W, Schafe G E, Bernstein I L c-Fos induction in respone to taste stimuli previously paired with amphetamine or LiCl during taste aversion learning. Brain Research, 1995, 673 (2):251-261.
- [12] Sakai N, Yamamoto T. Conditioned taste aversion and c-fos expression in the rat brainstem after administration of various USs. Neuroreport, 1997, 8:2215-2220.
- [13] Yamamoto T. Neural mechanisms of taste aversion learning. Neuroscience Research, 1993, 16:181-185.
- [14] Yamamoto T, Shimura T. Neural substrate for conditioned taste aversion in the rat. Behavioural Brain Research, 1994,65(2): 123-137.
- [15] Houpt T A, Berlin R A, Smith G P. Altered induction of c-Fos in the central nucleus of the amygdala correlated with conditioned taste aversion expression. Neuroscience, 1995.21: 1682 -1686.
- [16] Yamamoto T, et al. Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain-lesions. Neuroscience Research, 1995,22:31-49.
- [17] Grigson P S, Shimura T, Norgren R. Brainstem lesions and gustatory function: III. the role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats. Behavioral Neuroscience, 1997,111:180-187.
- [18] Houpt T A c-Fos induction in the rat nucleus of the solitary tract by interaoral quinine infucsion depends on prior contingent pairing if quinine and lithium chloride. Physiology & Behavior, 1996,60:1535-1541.
- [19] Schafe G E, Seeley R J. Forebrain contribution to the induction of a cellular of conditioned taste aversion in the nucleus of the solitary tract, the Journal of Neuroscience, 1995,15:6789-6796.
- [20] Schafe G E, Bernstein I L. Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. Brain Research, 1996,741:109-116.
- [21] Schafe G E, Bernstein I L. Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion [II. Insular (gustatory) cortex. Brain Research, 1998,800:40-47.
- [22] Pezzone M A, Lee W S, et al. Induction of c-fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. Brain Research, 1992597:41-50.
- [23] Pezzone M A, Lee W S, et al. Activation of brainstem catecholaminergic neurons by conditioned and unconditioned aversive stimuli as revealed by c-Fos immunoreactivity. Brain Research, 1993, 608:310-318.
- [24] Maier S F, Watkins L R. Cytokines for psychologists. implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. Psychological Review, 1998, 105:83-107.
- [25] Smith M A, et al. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. Brain Research, 1992, 578:135-141
- [26] Sandner G. Oberling P What brain structure are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. Behavioural Brain Research, 1993. 58:9-18