

吉春燕,汪澳哲,吕媛媛,等. 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1023-1033.

Ji CY, Wang AZ, Lyu YY, et al. Effects of aerobic exercise on inhibitory synaptic transmission in ventral tegmental area dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1023-1033.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.002

有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能的影响

吉春燕¹,汪澳哲¹,吕媛媛^{2,3},赵丽^{1,2},李岩^{1,2*}

(1. 北京体育大学运动人体科学学院,北京 100084;2. 北京体育大学运动与体质健康教育重点实验室,北京 100084;3. 北京体育大学中国运动与健康研究院,北京 100084)

【摘要】 目的 探究中等强度有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元抑制性突触可塑性的影响, 以期为运动减少尼古丁复吸提供一定的实验依据。方法 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为生理盐水安静组 (SS 组)、生理盐水运动组 (SE 组)、尼古丁安静戒断组 (NS 组)、尼古丁运动戒断组 (NE 组), 采用条件性位置偏爱实验建立小鼠尼古丁成瘾模型。之后停止给药, SE 组和 NE 组小鼠进行连续 2 周的中等强度有氧运动干预, SS 组和 NS 组小鼠自由饮食及进水。采用条件性位置偏爱实验检测小鼠尼古丁复吸行为。使用全细胞膜片钳技术记录 VTA 多巴胺神经元的自发抑制性突触后电流 (sIPSC)、微小抑制性突触后电流 (mIPSC) 和抑制性突触后电流配对脉冲比 (IPSC PPR)。使用免疫荧光染色检测 VTA γ -氨基丁酸限速酶 GAD67 的表达。结果 (1) NS 组 CPP 得分高于 SS 组, NE 组 CPP 得分低于 NS 组; (2) NS 组 sIPSC 的平均频率和平均幅度高于 SS 组, NE 组 sIPSC 的平均频率和平均幅度低于 NS 组; (3) NS 组 mIPSC 的平均频率和平均幅度高于 SS 组, NE 组 mIPSC 的平均频率和平均幅度低于 NS 组; (4) 20 ms 和 50 ms 刺激间隔时, NS 组的 IPSC PPR 小于 SS 组, NE 组的 IPSC PPR 大于 NS 组; (5) NS 组 VTA GAD67 蛋白表达低于 SS 组, NE 组 VTA GAD67 蛋白表达高于 NS 组。结论 2 周的中等强度有氧运动减少尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放, 下调突触后 GABA_A 受体的数量和/或功能, 减弱抑制性突触传递效能, 这可能是有氧运动减少尼古丁复吸的机制之一。

【关键词】 有氧运动; 戒断; 多巴胺; 突触可塑性; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 08-1023-11

Effects of aerobic exercise on inhibitory synaptic transmission in ventral tegmental area dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal

Ji Chunyan¹, Wang Aozhe¹, Lyu Yuanyuan^{2,3}, Zhao Li^{1,2}, Li Yan^{1,2*}

(1. College of Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100084, China. 2. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084. 3. China Institute of Sport and Health Science, Beijing Sport University, Beijing 100084)

Corresponding author: LI Yan. E-mail: bsuliyuan@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of aerobic exercise on the inhibitory synaptic plasticity of the ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons of mice with nicotine withdrawal. **Methods** Eight-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into a saline sedentary (SS) group, saline exercise (SE) group, nicotine sedentary (NS)

【基金项目】 国家自然科学基金 (32000838), 中国博士后科学基金 (2019T120067), 中央高校基本科研业务费专项资金 (校 2020038)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32000838), China Postdoctoral Science Foundation (2019T120067), Chinese Universities Scientific Fund (BSU2020038).

【作者简介】 吉春燕 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 运动生理学。Email: m18813073517@163.com

【通信作者】 李岩 (1988—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 运动与神经可塑性, 运动与健康促进。Email: bsuliyuan@bsu.edu.cn

group, and nicotine exercise (NE) group following the conditioned place preference (CPP) paradigm. During abstinence, SE and NE group mice were subjected to a moderate-intensity treadmill running protocol for 2 weeks. The CPP paradigm was used to test nicotine-seeking behavior of mice after nicotine withdrawal. The whole-cell patch clamp was used to record the spontaneous inhibitory postsynaptic current (sIPSC), the miniature IPSC (mIPSC), and the IPSC paired-pulse ratio (PPR) of dopamine neurons in the VTA. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of GAD67 in the VTA. **Results** (1) The CPP score was higher in the NS than SS group and lower in the NE than NS group. (2) The mean frequency and amplitude of the sIPSC were higher in the NS than SS group and lower in the NE than NS group. (3) The mean frequency and amplitude of the mIPSC were higher in the NS than SS group and lower in the NE than NS group. (4) At the 20 ms and 50 ms interstimulus intervals, the IPSC PPR was lower in the NS than SS group and higher in the NE than NS group. (5) The fluorescence intensity of GAD67 was lower in the NS than SS group and higher in the NE than NS group. **Conclusions** 2 weeks moderate intensity aerobic exercise reduces presynaptic GABA release, down-regulates the number and/or function of postsynaptic GABA_A receptors in VTA dopamine neurons, and these decreased inhibitory synaptic transmission may represent a potential mechanism by which aerobic exercise attenuates nicotine seeking during abstinence.

【Keywords】 aerobic exercise; withdrawal; dopamine; synaptic plasticity; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

吸烟会增加罹患心脑血管疾病、呼吸系统疾病、精神障碍、恶性肿瘤等多种疾病的发病率,每年导致全球 800 多万人死亡,给全世界造成巨大的经济压力和社会负担^[1]。烟草依赖的主要原因是尼古丁成瘾,其主要特征有:用药后的欣快感、撤药后的戒断症状以及对药物持续性的强烈渴求^[2]。复吸是治疗成瘾最大的难题。目前国际平均药物复吸率近 91%,我国药物复吸率为 90%^[3]。戒断过程中患者会因为突然缺失药物出现戒断症状,包括食欲增加、心率降低等躯体症状和焦虑、快感缺失、认知障碍和工作记忆障碍等情感症状^[4]。戒断症状引起的强烈渴求是导致戒烟者复吸率居高不下的主要原因,探究戒断期中枢神经系统的变化,寻找引发强烈药物渴求的中枢机制进而降低复吸率,是治疗和控制成瘾性疾病的重要策略^[5]。

由中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA) 的多巴胺 (dopamine, DA) 神经元投射至伏隔核 (nucleus accumbens, NAc) 的奖赏环路的结构异常和功能紊乱是导致成瘾形成和戒断后复吸的重要原因^[6]。在成瘾形成过程中,各类成瘾性药物直接或者间接地增强 VTA 的多巴胺神经元在其下游脑区的多巴胺释放,使机体产生强烈的欣快感和正性强化作用从而启动成瘾^[7]。在戒断过程中,VTA-NAc 的多巴胺投射会发生相反的变化。戒除各种成瘾药物会导致 NAc 基础多巴胺的减少^[8],从而引起快感缺失等负性情绪反应并激发药物渴求。多巴胺的释放受到神经元兴奋水平的影响,吗啡、尼古丁戒断后 VTA 多巴胺神经元放电频率均出现降

低^[9],从而使 NAc 多巴胺末梢释放的递质减少。多巴胺神经元放电的频率和模式受到 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能抑制性突触传入的严格调控^[9]。VTA 多巴胺神经元接受来自局部 GABA 能中间神经元和外部 NAc、腹侧苍白球和腹侧盖区尾侧 (the tail of the VTA, tVTA) 脑区的 GABA 能输入。关于抑制性输入在戒断期多巴胺神经元兴奋性变化中的作用机制,有以下 3 个方面证据^[10-12]:第一,药物戒断期,VTA 局部兴奋性和抑制性神经递质失衡,表现为 GABA 增多而谷氨酸减少;第二,电生理学研究表明药物戒断导致 VTA 区多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强;第三,通过光遗传等方法减弱 VTA 区多巴胺神经元的抑制性突触传递效能可以改善成瘾模型的戒断症状、减少复吸。以上诸多证据表明,药物戒断会导致 VTA 区多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强,从而降低多巴胺神经元的兴奋性,减少 NAc 多巴胺的释放,触发觅药行为。由此可见,靶向干预 VTA 区多巴胺神经元相关抑制性投射环路的传递效能是改善戒断症状、减少复吸的重要策略。

流行病学及临床研究证实,运动在药物成瘾的各个阶段都具有保护作用。研究表明,戒断阶段进行运动干预能减轻焦虑、情绪低落、抑郁等负面情绪反应,缓解戒断症状并减少复吸^[13]。动物研究发现,持续 60 min 的运动 2 h 后,海马的多巴胺释放增加 2 倍^[14]。相关研究表明,运动缓解负性情绪、改善戒断症状、减少复吸可能与运动促进多巴胺代谢有关^[15]。但是,目前关于运动促进成瘾戒断期多巴

胺释放的神经生物学机制尚不明确,尤其是从功能学的角度探究运动对成瘾戒断期 VTA 区多巴胺神经元接受的抑制性输入的影响更未见报道。因此,本研究观察有氧运动对尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元 GABA 能输入的调节作用,以期从突触可塑性的角度为运动减少尼古丁复吸提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验以 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠为研究对象,共 40 只,体重约为 22 g,实验动物由北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】提供。动物房内的光照时间由人工控制,白天时间为 6:00 ~ 18:00,环境温度为 22 ~ 24℃,相对湿度维持 50% ~ 65%,饲养于北京体育大学动物房【SYXK(京)2021-0053】。饲养期间,所有小鼠自由摄食及饮水,维持饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。本研究实验方案已获得北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(2019031A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

尼古丁酒石酸盐(Tocris Bioscience, 美国), CNQX(Sigma, 美国),河豚毒素(Sigma, 美国),小鼠单克隆谷氨酸脱羧酶 67(glutamic acid decarboxylase 67, GAD67)抗体(Millipore, G5419, 美国),荧光素 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗小鼠 IgG(Invitrogen, A-11032, 美国)。

条件性位置偏爱行为学系统(泰盟, CPP-100, 中国),动物跑台(杭州段氏 DSPT-215, 中国),振动切片机(LEICA, VT1200S, 德国),膜片钳放大器(Axon, 700B, 美国),数模模数转换器(Axon, 1440A, 美国),膜片钳数据采集分析软件(Axon, pClamp 10.7, 美国),冰冻切片机(LEICA, CM3050S, 德国),激光共聚焦显微镜(LEICA, SP8, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 成瘾模型建立与运动方案

在适应环境 1 周后,将小鼠随机分为生理盐水+安静组(saline sedentary 组, SS 组)、生理盐水+运动组(saline exercise 组, SE 组)、尼古丁+安静戒断组(nicotine sedentary 组, NS 组)、尼古丁+运动戒断组(nicotine exercise 组, NE 组)。采用条件性位置偏爱实验(conditioned position preference, CPP)建立小鼠尼古丁成瘾模型。CPP 实验由以下环节组成^[16]:(1)预测试(第 1 天):小鼠被允许自由探索黑箱与黑白条纹箱 20 min 并记录其在两侧箱体所停留时间,剔除单侧停留时间 > 65% 的小鼠。(2)条件化训练(第 2 ~ 9 天):小鼠接受生理盐水或尼古丁给药。在第 2、4、6、8 天 NS、NE 组小鼠腹腔注射尼古丁(0.5 mg/kg),放入黑箱 20 min;在第 3、5、7、9 天小鼠腹腔注射等量生理盐水并放入黑白条纹箱 20 min。SS、SE 组小鼠每天腹腔注射生理盐水并放入对侧箱体训练。(3)测试(第 10 天):允许各组小鼠在两侧箱体自由探索 20 min,记录小鼠在两个箱体中的停留时间。之后停止给药,SE 组和 NE 组小鼠进行连续 2 周的运动干预,SS 组和 NS 组小鼠自由进食及饮水不进行运动干预。(4)后测:2 周戒断后,各组小鼠再次进行 CPP 测试,方法如测试期,记录小鼠在两侧箱体停留时间。CPP 得分(s)为小鼠在注射尼古丁训练箱的停留时间减去注射生理盐水训练箱的停留时间。实验流程如图 1。

实验的运动方案:使用跑台进行运动干预,小鼠运动强度为 60% ~ 75% 最大摄氧量,训练前 10 min 跑速为 12 m/min,后 50 min 跑速为 15 m/min,跑台坡度为 0°,60 min/d,每周 5 d。课题组前期研究发现该运动强度具有调节突触可塑性的作用^[17],前期研究也发现 65% ~ 70% 最大心率的中等强度运动可以有效降低成瘾患者的主观渴求度^[18]。

1.2.2 脑片膜片钳实验

小鼠麻醉(吸入异氟烷),取脑后振动切片,保留含有 VTA 的脑片,脑片厚度为 250 μm。胆碱切

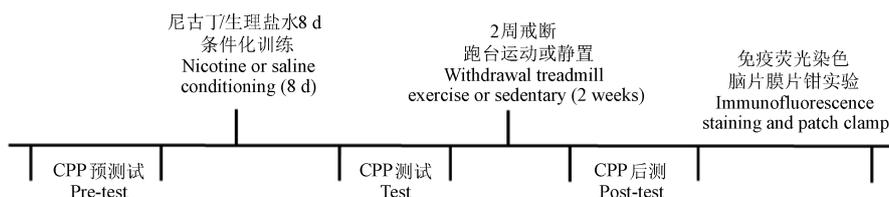


图 1 实验流程图

Figure 1 Timeline of the experiments

片液配方为:23 mmol/L NaHCO₃, 2.5 mmol/L KCl, 1.25 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5 mmol/L CaCl₂, 7 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L 葡萄糖, 11.6 mmol/L 抗坏血酸钠, 3.1 mmol/L 丙酮酸钠, 110 mmol/L 氯化胆碱, 20 mmol/L 阿托品。脑片在人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中室温孵育 1 h 以上, ACSF 配方为:2.5 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 1.25 mmol/L MgCl₂, 1.25 mmol/L NaH₂PO₄, 119 mmol/L NaCl, 23 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L 葡萄糖, 之后进行脑片膜片钳记录。

采用全细胞电压钳技术记录以下指标:自发性抑制性突触后电流 (spontaneous inhibitory postsynaptic current, sIPSC)、微小抑制性突触后电流 (miniature inhibitory postsynaptic current, mIPSC) 和抑制性突触后电流 (inhibitory postsynaptic current, IPSC) 配对脉冲刺激比值 (paired-pulse ratio, PPR)。记录用玻璃微电极内充灌电极内液, 配方为:100 mmol/L K-gluconate, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, 0.2 mmol/L EGTA, 2 mmol/L Mg-ATP, 0.3 mmol/L Na₂GTP, 10 mmol/L 磷酸肌酸钠;使用 KOH 调节 pH = 7.2 ~ 7.4。记录诱发指标时, 刺激电极置于多巴胺神经元突触前 150 μm 左右位置, 用两个连续刺激诱发 PPR (刺激间隔时间:20, 50, 100, 200, 400 ms)。整个记录过程, 将膜电位钳制在 -70 mV, 灌流液中加入 AMPA 受体拮抗剂 CNQX (20 μmol/L) 阻断兴奋性突触活动。记录 mIPSC 时, 灌流液中加入河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX, 1 μmol/L) 阻断动作电位。

1.2.3 免疫荧光染色

小鼠经异氟烷吸入麻醉, 灌注 4% 多聚甲醛进行前固定, 取脑置于 4℃ 多聚甲醛后固定 24 h, 蔗糖脱水后, 使用冰冻切片机进行冠状切片, 脑片厚度 40 μm。切片经封闭后加入 GAD67 抗体 (1:200), 4℃ 孵育 48 h, 室温孵育 Alexa Fluor 594 标记的二抗 (1:600) 1 h。使用荧光封片剂 (DAPI) 封片, 激光共聚焦显微镜拍照。免疫荧光图片处理使用 Image J 软件进行半定量分析。

1.3 统计学分析

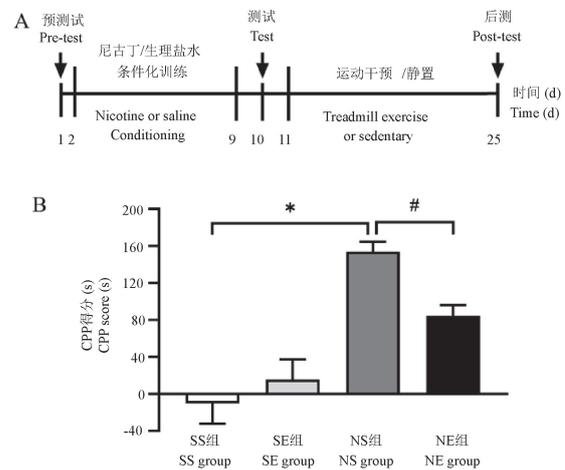
采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, 实验结果以平均值 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。使用 Clampfit 软件导出 sIPSC 和 mIPSC, 再使用 Mini-analysis 软件分析平均频率和平均幅度。使用 pClamp 10.7 软件采集并分析诱发的突触后电流数

据 IPSC PPR。使用 Image J 软件分析免疫荧光图片的荧光强度。本研究数据在满足方差齐性检验的条件下, 进行双因素方差分析 (Two-way ANOVA), 采用 Holm-Sidak 法进行多重比较。统计学显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 有氧运动对尼古丁戒断小鼠复吸行为的影响

CPP 得分的双因素方差分析结果 (见图 2) 显示尼古丁戒断和有氧运动对 CPP 得分有显著交互效应 ($P < 0.05$)。与 SS 组相比, NS 组得分显著升高 ($P < 0.05$); 与 NS 组相比, NE 组得分显著降低 ($P < 0.05$)。以上结果提示, 有氧运动改善尼古丁戒断小鼠的条件性位置偏爱, 即有氧运动减少尼古丁成瘾小鼠戒断期的复吸行为。



注: A: 小鼠 CPP 行为学实验时程图; B: 各组 CPP 得分统计图; 与 SS 组相比, * $P < 0.05$; 与 NS 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 2 各组小鼠 CPP 得分

Note. A. Timeline of CPP paradigm. B. CPP scores of mice in each group. Compared with the SS group, * $P < 0.05$. Compared with the NS group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 CPP score of mice in each group

2.2 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元 sIPSC 的影响

各组小鼠 sIPSC 记录原始图见图 3A。对 sIPSC 的平均频率和平均幅度进行双因素方差分析 (图 3B, 3C), 结果显示尼古丁戒断和有氧运动的交互效应显著 (平均频率, $P < 0.05$; 平均幅度, $P < 0.05$)。多重比较结果显示, 与 SS 组相比, NS 组 sIPSC 的平均频率 ($P < 0.001$) 和平均幅度 ($P < 0.01$) 显著升

高;与 NS 组相比, NE 组 sIPSC 的平均频率($P < 0.01$)和平均幅度($P < 0.001$)显著降低。以上结果提示,尼古丁戒断增强 VTA 多巴胺神经元接受的 GABA 能输入;有氧运动使尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元接受的 GABA 能输入降低。

2.3 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元 mIPSC 的影响

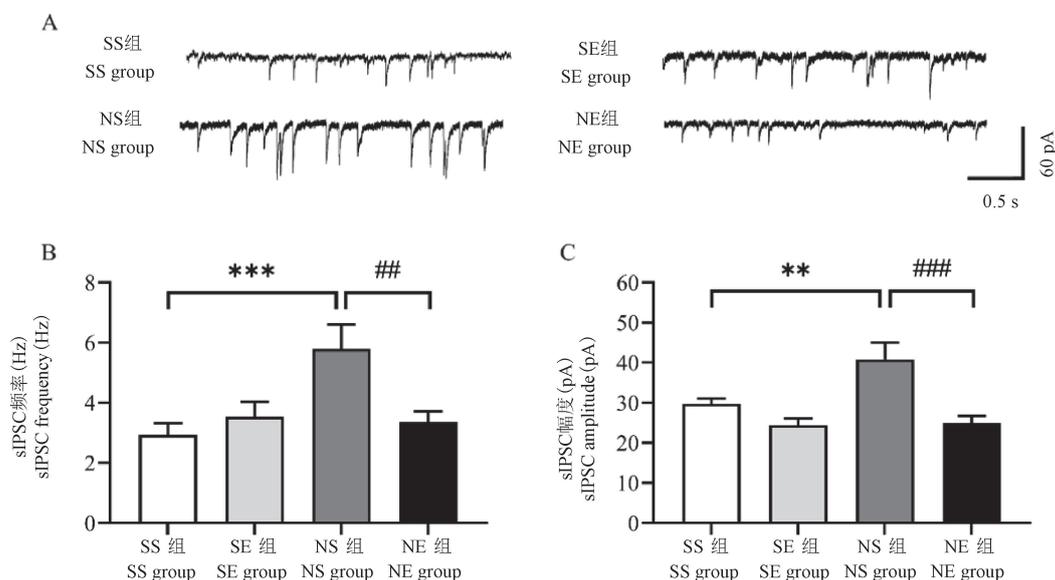
GABA 能输入的变化可能由动作电位驱动突触前 GABA 释放增加和/或突触前囊泡随机释放增加所致。本研究为探究其可能机制,在人工脑脊液中加入 TTX,阻断动作电位,记录由突触前囊泡随机自发地释放 GABA 所产生的抑制性突触后电流。各组小鼠 mIPSC 记录原始图见图 4A。对 mIPSC 的平均频率和平均幅度进行双因素方差分析(图 4B, 4C),结果显示尼古丁戒断和有氧运动的交互效应显著(平均频率, $P < 0.05$;平均幅度, $P < 0.05$)。多重比较结果显示,与 SS 组相比,NS 组 mIPSC 的平均频率($P < 0.05$)和平均幅度($P < 0.05$)显著升高;与 NS 组相比,NE 组 mIPSC 的平均频率($P < 0.05$)和平均幅度($P < 0.05$)显著降低。

sIPSC 和 mIPSC 的结果提示,尼古丁戒断导致

VTA 多巴胺神经元突触前的 GABA 以动作电位触发和随机自发的机制释放增加,突触后 GABA_A 受体数量增多和/或功能增强,从而增强抑制性突触传递效能;有氧运动减少尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元突触前动作电位驱动的 GABA 释放和随机自发的 GABA 释放,下调突触后 GABA_A 受体数量和/或功能,从而减弱抑制性突触传递效能。

2.4 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA 多巴胺神经元 IPSC PPR 的影响

由于 sIPSC 和 mIPSC 幅度的变化可能导致频率变化,因此单纯通过 sIPSC 和 mIPSC 的频率与幅度判断抑制性传递突触前和突触后机制的变化具有一定局限性^[19]。为了进一步区分抑制性突触传递效能的变化是突触前还是突触后的效应,本研究检测了 VTA 多巴胺神经元的抑制性突触后电流(IPSC)配对脉冲比($PPR = IPSC_2/IPSC_1$),以此反映多巴胺神经元的突触前抑制性递质释放概率。各组小鼠诱发的 IPSC 记录原始图见图 5A。对在 20 ms、50 ms、100 ms 和 200 ms 刺激间隔记录的 IPSC PPR 分别进行双因素方差分析,结果显示在 20 ms(图 5B)和 50 ms(图 5C)刺激间隔时,尼古丁

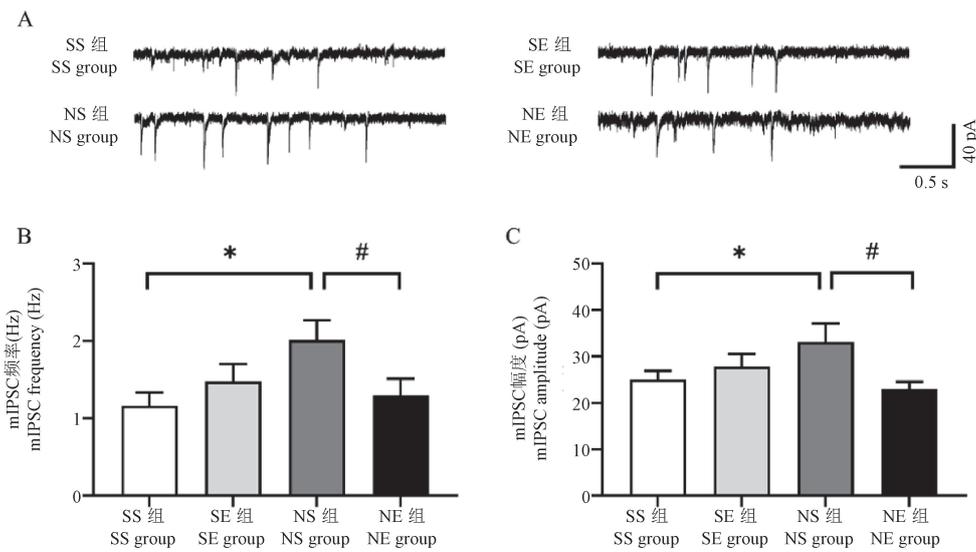


注:A:脑片膜片钳全细胞记录的自发性抑制性突触后电流(sIPSC)图;B:各组 sIPSC 频率统计图;C:各组 sIPSC 幅度统计图;与 SS 组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与 NS 组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 3 各组小鼠 VTA 多巴胺神经元 sIPSC

Note. A. Representative sIPSC traces recorded by patch clamp. B. The mean frequency of sIPSC in these four groups. C. The mean amplitude of sIPSC in these four groups. Compared with the SS group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the NS group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3 sIPSC from VTA dopamine neurons of mice in each group

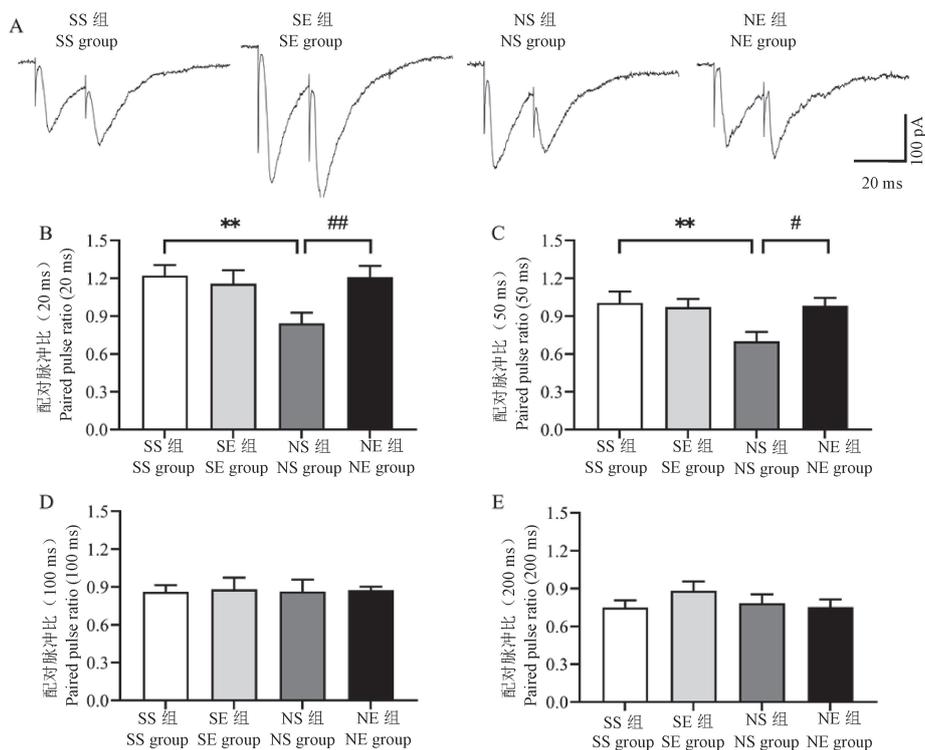


注: A: 脑片膜片钳全细胞记录的微小抑制性突触后电流(mIPSC)图; B: 各组 mIPSC 频率统计图; C: 各组 mIPSC 幅度统计图。

图 4 各组小鼠 VTA 多巴胺神经元 mIPSC

Note. A. Representative mIPSC traces recorded by patch clamp. B. The mean frequency of mIPSC in these four groups. C. The mean amplitude of mIPSC in these four groups.

Figure 4 mIPSC from VTA dopamine neurons of mice in each group



注: A: 脑片膜片钳全细胞记录的 IPSC 配对脉冲刺激电流图; B: 20 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图; C: 50 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图; D: 100 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图; E: 200 ms 刺激间隔时各组 IPSC PPR 统计图。

图 5 各组小鼠 VTA 多巴胺神经元 IPSC PPR

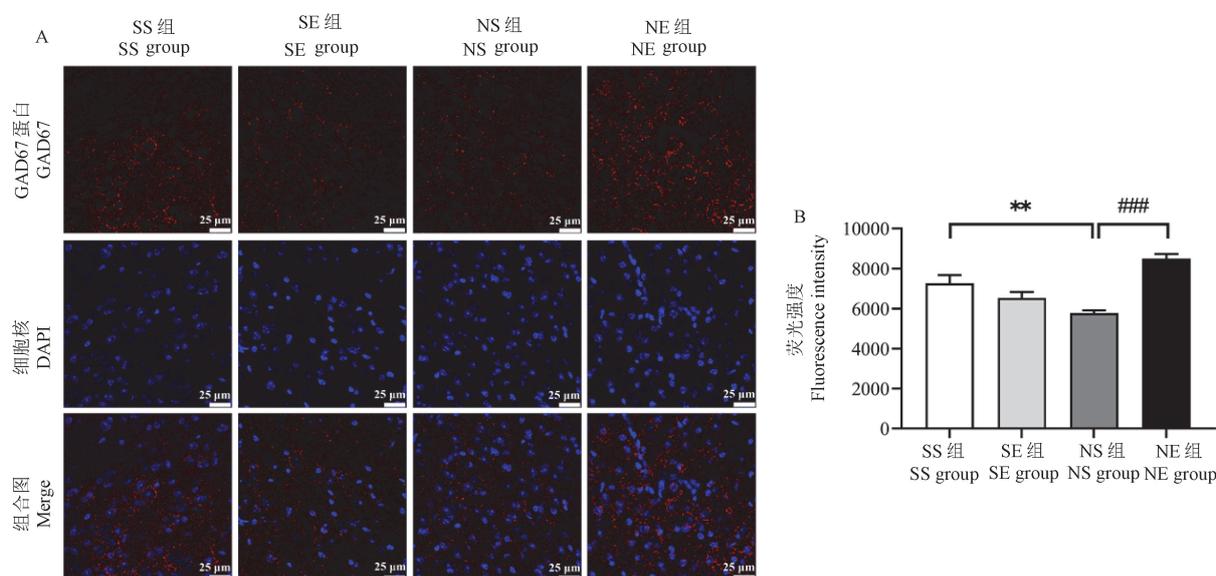
Note. A. Representative IPSC traces at 20 ms interstimulus intervals recorded by patch clamp. B. IPSC PPR at 20 ms interstimulus intervals in these four groups. C. IPSC PPR at 50 ms interstimulus intervals in these four groups. D. IPSC PPR at 100 ms interstimulus intervals in these four groups. E. IPSC PPR at 200 ms interstimulus intervals in these four groups.

Figure 5 IPSC PPR from VTA dopamine neurons of mice in each group

戒断和有氧运动的交互效应显著(20 ms, $P < 0.05$; 50 ms, $P < 0.05$);在 100 ms 和 200 ms 刺激间隔时,尼古丁戒断和有氧运动的交互效应不显著($P > 0.05$)。多重比较结果显示,在 20 ms 和 50 ms 刺激间隔时,同 SS 组相比,NS 组 IPSC PPR 显著降低(20 ms, $P < 0.01$;50 ms, $P < 0.01$);同 NS 组相比,NE 组 IPSC PPR 显著升高(20 ms, $P < 0.01$;50 ms, $P < 0.05$)。其它刺激间隔时各组间 IPSC PPR 均无显著性差异($P > 0.05$,图 5D,5E)。以上结果提示,尼古丁戒断增强 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放概率;有氧运动降低尼古丁戒断诱导的 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放概率。

2.5 有氧运动对尼古丁戒断小鼠 VTA GAD67 表达的影响

VTA GAD67 免疫荧光染色的效果图见图 6A,图中红色荧光为 GAD67 阳性染色,蓝色荧光为细胞核染色。对 VTA 中 GAD67 的荧光强度进行双因素方差分析(图 6B),结果显示尼古丁戒断和有氧运动的交互效应显著($P < 0.001$)。多重比较结果显示,同 SS 组相比,NS 组的荧光强度显著降低($P < 0.01$);同 NS 组相比,NE 组的荧光强度显著升高($P < 0.001$)。以上结果提示,尼古丁戒断下调 VTA GAD67 蛋白表达;有氧运动上调尼古丁戒断小鼠 VTA GAD67 蛋白表达。



注:A:各组小鼠 VTA GAD67 免疫荧光染色图;B:各组小鼠 VTA GAD-67 荧光强度统计图。

图 6 各组小鼠 VTA GAD-67 的表达

Note. A. Immunostaining of GAD67 in VTA. B. Fluorescence intensity of GAD67 in VTA in these four groups.

Figure 6 Expression of GAD67 in VTA of mice in each group

3 讨论

运动干预是一种潜在的治疗和控制成瘾性疾病的新策略,可能发展成为控制成瘾性疾病或毒瘾戒断的独立干预措施或重要辅助方法^[20-21],但运动促进成瘾记忆消除、减少复吸的中枢机制远未明了。本研究发现,有氧运动可以减少成瘾模型在戒断期对尼古丁的复吸;有氧运动对尼古丁戒断诱导的 VTA 多巴胺神经元 GABA 能抑制性输入异常具有改善作用,即减少突触前 GABA 释放,下调突触后 GABA_A 受体的数量和/或功能,从而减弱多巴胺神经元接受的抑制性突触传递效能。本研究为运动干预改善成瘾、减少复吸提供了一定的实验依据。

从神经生物学角度来看,成瘾性疾病是一种慢性、高复发性的脑部疾病。戒断后再次复吸是导致成瘾性疾病戒断失败的重要原因,因此减少复吸是治疗成瘾的关键。本研究所使用的 CPP 模型是一种巴甫洛夫条件反射形式,被认为是评价药物精神依赖的简单有效的方法之一^[22]。CPP 实验过程中,控制给药与不给药时训练环境的不同,最后在不给药的情况下测试动物是否对给药箱产生偏爱,其对环境的偏爱程度代表动物对药物的渴求与依赖程度。已有文献对不同运动强度和运动方式对药物成瘾复吸渴求度的影响进行了研究。赵琦等^[18]的研究发现,中等强度(65% ~ 70%最大心率)和高强度(80% ~ 85%最大心率)运动均能有效降低成瘾

患者的主观渴求度。周跃辉等^[23]发现中等强度运动通过上调前额叶皮层 $\alpha 7$ nAChRs 蛋白表达增强尼古丁成瘾大鼠的抑制能力,进而降低尼古丁大鼠的依赖性。Jung 等^[24]也发现 2 周中等强度有氧运动改善成瘾模型的行为学变化,其机制与纹状体谷氨酸能突触传递的信号分子表达变化有关。但是信号分子的变化与突触传递的变化并不完全一致,因此以上机制研究并未在功能学层面提供证据。本研究实验结果显示,戒断期 2 周有氧运动可以减少小鼠对尼古丁箱体的条件性位置偏爱,表明 2 周有氧运动可以减少成瘾模型戒断期对尼古丁的复吸,这一结果与前人的研究一致^[25-26]。本研究的结果一方面再次证实运动具有减少复吸、改善成瘾的作用;另一方面也说明 CPP 是研究运动改善成瘾的可靠模型。

GABA 能抑制性输入对 VTA 多巴胺神经元的兴奋性起到重要调控作用^[27]。研究发现,VTA 多巴胺神经元接受的 GABA 能突触传递在成瘾形成期和戒断期的变化特征不同。在成瘾的形成期,成瘾物质的暴露以直接或间接的形式减弱 GABA 能输入,从而使多巴胺神经元“去抑制”,表现为兴奋性过度增强。如吗啡通过与阿片受体结合抑制 VTA GABA 能神经元兴奋性,从而增加多巴胺水平^[28]。而在戒断期间多巴胺神经元接受的抑制性突触传递又表现为相反的效果,即戒断导致 GABA 能传递增强,从而使得多巴胺分泌减少,最终导致戒断期的负性情绪,触发复吸行为,但这一假设尚缺少充分的功能学证据。Jiang 等^[29]最新的研究发现,吗啡戒断导致的负性情绪与奖赏环路功能下调有关;使用电生理学手段发现吗啡戒断使得中央杏仁核 (CeA) 促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 神经元向 VTA 吗啡奖赏神经元集群的抑制性突触连接增强,而光遗传抑制该神经通路可以缓解戒断模型的药物复吸。本研究发现,尼古丁戒断使 VTA 多巴胺神经元 sIPSC 和 mIPSC 的频率及幅度增加,IPSC PPR 降低,表明尼古丁戒断导致 VTA 多巴胺神经元接受的抑制性传递增强,这种改变涉及突触前与突触后机制,即突触前 GABA 递质释放概率增加、突触后 GABA_A 受体的数量增加和/或功能增强,本研究结果与前人研究结果一致,从功能学的角度再一次证实 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强是导致戒断症状的重要机制。

对戒烟人群的研究发现,运动可以减轻戒烟者

戒断期间的焦虑等负性情绪,从而减少复吸^[20]。动物实验也发现吗啡戒断期进行运动干预可以减轻戒断模型的焦虑程度和压力状态,缓解戒断症状^[30]。已有文献表明,运动可以增加多巴胺释放以弥补药物戒断导致的快感缺失,有利于减轻戒断症状^[31]。Kami 等^[32]的研究发现运动可以增强病理性疼痛大鼠背外侧被盖区和下丘脑外侧区至 VTA 的投射,增强 VTA 多巴胺神经元的兴奋性。Medrano 等^[33]的研究发现运动上调 VTA 多巴胺神经元 AMPA/NMDA ratio,增强兴奋性传递效能。但是运动对 VTA 抑制性环路的调节作用目前研究较少。本研究发现,有氧运动降低了由尼古丁戒断引起的小鼠 VTA 多巴胺神经元 GABA 能输入增强;有氧运动导致成瘾模型戒断期 VTA 多巴胺神经元 sIPSC 和 mIPSC 的频率下降、IPSC PPR 比值升高,表明有氧运动降低了突触前动作电位驱动的 GABA 释放 (sIPSC 频率降低) 和 GABA 随机自发的释放概率 (mIPSC 频率降低);同时,有氧运动使 sIPSC 和 mIPSC 的幅度显著下降,表明有氧运动下调了突触后 GABA_A 受体的数量和/或减弱了 GABA_A 受体功能。结合本研究行为学的结果,提示有氧运动降低尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能可能是有氧运动减少尼古丁复吸的中枢机制之一。但本研究对有氧运动改善 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能只有电生理学的证据,并未阐释运动减少突触前 GABA 释放的分子机制,也未阐明突触后 GABA_A 受体的蛋白表达和亚基组成特征的变化,这是本研究的不足,将在后期研究中进行此方面研究。VTA 多巴胺神经元同时接受来自 VTA 局部 GABA 能输入和外部脑区 (伏隔核、腹侧苍白球、吻内侧被盖核等) 的 GABA 能输入,不同的 GABA 能投射在药物成瘾形成、戒断等不同阶段的作用机制可能不同,那么运动对多巴胺神经元接受的局部 GABA 输入和外部 GABA 输入是否具有不同调节作用?

GAD67 是 GABA 合成的限速酶,主要位于胞浆中,能反应 VTA 局部 GABA 能神经元 GABA 的合成情况,从而间接反应 VTA 局部的 GABA 能传递情况。本研究发现,尼古丁戒断使 VTA 的 GAD67 表达降低,提示 VTA 局部 GABA 能神经元 GABA 合成减少。结合本研究电生理结果,即尼古丁戒断期间 VTA 多巴胺神经元抑制性突触传递效能增强,我们推测戒断期 VTA 多巴胺神经元接受的来自外部脑

区的 GABA 输入增强而 VTA 局部的 GABA 输入减弱。尼古丁戒断导致 VTA 局部 GABA 能传递减弱可能和以下两方面原因有关:第一,内源性大麻素介导的负反馈调节。前期研究表明,成瘾物质暴露诱导 VTA 多巴胺神经元过度激活,释放内源性大麻素,与突触前 GABA 神经元上的 CB1 受体结合,激活钾离子通道,直接或间接阻滞钙通道,从而抑制突触前神经元 GABA 的释放^[34],推测这种调节递质释放的突触前机制一直持续至戒断期。第二,神经环路之间的调控。VTA 接受的外部脑区的抑制性输入,如 NAc 和喙内侧被盖核(rostromedial tegmental nucleus, RMTg)等,也和 VTA 局部 GABA 能神经元形成投射关系。戒断使外部脑区的抑制性输入增强,从而抑制 VTA 局部的 GABA 能神经元的递质释放。VTA 局部的 GABA 能神经元兴奋性降低,从而减弱对外侧缰核(lateral habenula, LHb)谷氨酸能神经元的抑制作用,使 LHb 的谷氨酸能神经元兴奋性增强^[35],再通过 LHb→RMTg(tVTA) 投射增强 RMTg 的 GABA 能神经元的兴奋性,进而通过 RMTg→VTA 环路抑制 VTA 多巴胺神经元兴奋性^[36],减少多巴胺释放,触发复吸,因此推测 VTA 局部 GABA 能神经元在通过 VTA GABA 神经元→LHb→RMTg→VTA 多巴胺神经元环路降低多巴胺神经元兴奋性过程中起到“正反馈”(图 7),形成恶性循环。Meye 等^[37]发现成瘾物质导致 LHb 谷氨酸能神经元兴奋性增强,LHb→RMTg 的兴奋性传递增强。Lyu 等^[38]发现使用药理学手段增加 LHb 的 GABA 浓度可以改善帕金森大鼠的抑郁样行为,提示投射至 LHb 的抑制性输入是导致负性情绪的机制之一。以上研究一定程度上支持本文的推测。本研究发现,有氧运动改善尼古丁戒断导致的 VTA GAD67 表达降低,提示有氧运动对上述抑制 VTA 多巴胺神经元的环路具有改善作用。Herrera 等^[39]研究发现运动增强大鼠 NAc 的 FosB 表达,提示运动可能增强 NAc 的激活程度,进而增强 NAc 至 VTA GABA 能神经元的传递效能,因此推测本研究中运动增强 VTA GAD67 表达是由于增强了 NAc 等脑区对 VTA GABA 能神经元的抑制性输入所致。结合电生理学的实验结果,我们推测 VTA GABA 合成增加,通过 VTA-LHb-RMTg-VTA 环路增强多巴胺神经元兴奋性,增加多巴胺释放。Kim 等^[40]的研究发现应激增强 LHb 的 c-fos 表达,但中等强度的运动并未增强 LHb 的 c-fos 表达,该研究也佐证了本研究

的推测,即运动可能抑制 LHb 谷氨酸能神经元的兴奋性,从而缓解负性情绪。综上所述,本研究的结果提示 VTA 多巴胺神经元接受的外部脑区抑制性输入和 VTA 局部的抑制性输入在尼古丁戒断期间变化特征不同,最终共同作用使多巴胺神经元的抑制性传递增强,而运动对此具有改善作用。但本研究使用免疫荧光技术间接反应 VTA 局部 GABA 能传递效能,具有一定局限性,这是本研究的不足,后期将会综合使用神经环路示踪技术、光遗传和电生理技术深入研究运动对戒断模型不同神经环路的调控机制。

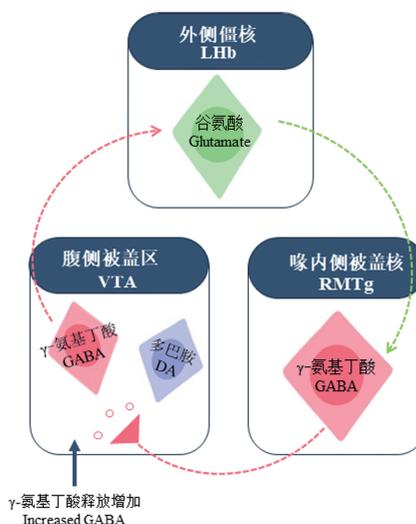


图 7 尼古丁戒断神经环路调控机制假说图

Figure 7 Hypothesis of neural circuits in nicotine withdrawal

4 结论

2 周的中等强度有氧运动减少尼古丁戒断模型 VTA 多巴胺神经元突触前 GABA 释放,下调突触后 GABA_A 受体的数量和/或功能,减弱抑制性突触传递效能,这可能是有氧运动减少复吸的重要机制之一。

参 考 文 献(References)

- [1] Gowing LR, Ali RL, Allsop S, et al. Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report [J]. *Addiction*, 2015, 110(6): 904-919.
- [2] Picciotto MR, Kenny PJ. Mechanisms of nicotine addiction [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2021, 11(5): a039610.
- [3] 欧阳一毅, 罗炯, 王坤, 等. 身体活动对艾滋病强制戒毒人员复吸倾向的影响——内在抑制力、用药渴求的链式中介分析 [J]. *上海体育学院学报*, 2020, 44(10): 48-57, 67. Ouyang YY, Luo J, Wang K, et al. Impact of physical activity on relapse tendency of AIDS patients undergoing compulsory detoxification: a chain mediation analysis of intrinsic restraint and

- yearning for drugs [J]. *J Shanghai Univ Sport*, 2020, 44(10): 48-57, 67.
- [4] Wesnes KA, Edgar CJ, Kezic I, et al. Effects of nicotine withdrawal on cognition in a clinical trial setting [J]. *Psychopharmacology*, 2013, 229(1): 133-140.
- [5] Prochaska JJ, Benowitz NL. Current advances in research in treatment and recovery: Nicotine addiction [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(10): eaay9763.
- [6] Dong Y, Taylor JR, Wolf ME, et al. Circuit and synaptic plasticity mechanisms of drug relapse [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(45): 10867-10876.
- [7] Wise RA, Robble MA. Dopamine and addiction [J]. *Annu Rev Psychol*, 2020, 71: 79-106.
- [8] Zhang L, Dong Y, Doyon WM, et al. Withdrawal from chronic nicotine exposure alters dopamine signaling dynamics in the nucleus accumbens [J]. *Biol Psychiatry*, 2012, 71(3): 184-191.
- [9] Matsui A, Jarvie BC, Robinson BG, et al. Separate GABA afferents to dopamine neurons mediate acute action of opioids, development of tolerance, and expression of withdrawal [J]. *Neuron*, 2014, 82(6): 1346-1356.
- [10] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(1): 217-238.
- [11] D'souza MS, Markou A. The stop and go of nicotine dependence: role of GABA and glutamate [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(6): a012146.
- [12] Barrot M. Ineffective VTA disinhibition in protracted opiate withdrawal [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(11): 672-673.
- [13] Zhang L, Yuan TF. Exercise and substance abuse [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2019, 147: 269-280.
- [14] Goekint M, Bos I, Heyman E, et al. Acute running stimulates hippocampal dopaminergic neurotransmission in rats, but has no influence on brain-derived neurotrophic factor [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2012, 112(4): 535-541.
- [15] 鲁春霞, 东伟新, 郑澜, 等. 运动干预激活免疫应激和多巴胺水平对苯丙胺类药物成瘾强制隔离戒毒人员心理健康的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2019, 38(9): 762-770.
- Lu CX, Dong WX, Zheng L, et al. Effects of activation of immune stress and dopamine level by exercise intervention on the mental health of amphetamines addicts compulsively isolated for rehabilitation [J]. *Chin J Sports Med*, 2019, 38(9): 762-770.
- [16] Henderson BJ, Wall TR, Henley BM, et al. Menthol enhances nicotine reward-related behavior by potentiating nicotine-induced changes in nAChR function, nAChR upregulation, and DA neuron excitability [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(12): 2285-2291.
- [17] 李翠, 李岩, 赵丽. 有氧运动对 APP/PS1/tau 小鼠海马 gamma 振荡的影响 [J]. *北京体育大学学报*, 2018, 41(11): 62-68.
- Li C, Li Y, Zhao L. Effect of aerobic exercise on gamma oscillation in APP/PS1/tau mice [J]. *J Beijing Sport Univ*, 2018, 41(11): 62-68.
- [18] 赵琦, 刘佳宁, 陆颖之, 等. 长期有氧运动改善甲基苯丙胺成瘾者对毒品的渴求——来自 alpha 波的证据 [J]. *中国运动医学杂志*, 2020, 39(10): 804-809.
- Zhao Q, Liu JN, Lu YZ, et al. Effects of long-term aerobic exercise on drug craving of methamphetamine addicts-evidence from alpha wave [J]. *Chin J Sports Med*, 2020, 39(10): 804-809.
- [19] Liu X, Liu Y, Zhong P, et al. CaMKII activity in the ventral tegmental area gates cocaine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2014, 39(4): 989-999.
- [20] 冯俊鹏, 严翊, 路瑛丽, 等. 运动戒毒研究进展 [J]. *中国体育科技*, 2019, 55(11): 3-11.
- Feng JP, Yan Y, Lu YL, et al. Progress in research of exercise intervention for drug detoxification [J]. *Chin Sport Sci Technol*, 2019, 55(11): 3-11.
- [21] 冯连世, 张雷, 冯俊鹏. 运动戒毒的中国经验: 实践与理论 [J]. *中国体育科技*, 2021, 57(6): 3-7.
- Feng LS, Zhang L, Feng JP. Chinese experience in exercise intervention for drug detoxification: practice and theory [J]. *Chin Sport Sci Technol*, 2021, 57(6): 3-7.
- [22] Sjulson L, Peyrache A, Cumpelik A, et al. Cocaine place conditioning strengthens location-specific hippocampal coupling to the nucleus accumbens [J]. *Neuron*, 2018, 98(5): 926-934.
- [23] 周跃辉, 周成林, 李翠翠. 运动对尼古丁戒断大鼠抑制能力的影响及机制 [J]. *体育科学*, 2016, 36(2): 58-65, 71.
- Zhou YH, Zhou CL, Li CC. Effect of exercise on inhibition ability during nicotine abstinence period in rat and its mechanism [J]. *Chin Sport Sci*, 2016, 36(2): 58-65, 71.
- [24] Jung S, Kim Y, Kim M, et al. Exercise pills for drug addiction: forced moderate endurance exercise inhibits methamphetamine-induced hyperactivity through the striatal glutamatergic signaling pathway in male sprague dawley rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8203.
- [25] Sanchez V, Moore CF, Brunzell DH, et al. Effect of wheel-running during abstinence on subsequent nicotine-seeking in rats [J]. *Psychopharmacology*, 2013, 227(3): 403-411.
- [26] Lynch WJ, Piehl KB, Acosta G, et al. Aerobic exercise attenuates reinstatement of cocaine-seeking behavior and associated neuroadaptations in the prefrontal cortex [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(8): 774-777.
- [27] van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, et al. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption [J]. *Neuron*, 2012, 73(6): 1184-1194.
- [28] Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, et al. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(39): 16446-16450.
- [29] Jiang C, Yang X, He G, et al. CRH^{CeA-VTA} inputs inhibit the positive ensembles to induce negative effect of opiate withdrawal [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(11): 6170-6186.
- [30] Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y. Anxiety profile

- in morphine-dependent and withdrawn rats: effect of voluntary exercise [J]. *Physiol Behav*, 2012, 105(2): 195-202.
- [31] Costa KG, Cabral DA, Hohl R, et al. Rewiring the addicted brain through a psychobiological model of physical exercise [J]. *Front Psychiatry*, 2019, 10: 600.
- [32] Kami K, Tajima F, Senba E. Activation of mesolimbic reward system via laterodorsal tegmental nucleus and hypothalamus in exercise-induced hypoalgesia [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11540.
- [33] Medrano MC, Hurel I, Mesguich E, et al. Exercise craving potentiates excitatory inputs to ventral tegmental area dopaminergic neurons [J]. *Addict Biol*, 2021, 26(3): e12967.
- [34] Fattore L, Melis M, Fadda P, et al. The endocannabinoid system and nondrug rewarding behaviours [J]. *Exp Neurol*, 2010, 224(1): 23-36.
- [35] Taylor SR, Badurek S, Dileone RJ, et al. GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area [J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522(14): 3308-3334.
- [36] Yetnikoff L, Cheng AY, Lavezzi HN, et al. Sources of input to the rostromedial tegmental nucleus, ventral tegmental area, and lateral habenula compared: a study in rat [J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(16): 2426-2456.
- [37] Meye FJ, Valentinova K, Lecca S, et al. Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(3): 376-378.
- [38] Lyu S, Guo Y, Zhang L, et al. Blockade of GABA transporter-1 and GABA transporter-3 in the lateral habenula improves depressive-like behaviors in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 181: 108369.
- [39] Herrera JJ, Fedynska S, Ghasem PR, et al. Neurochemical and behavioural indices of exercise reward are independent of exercise controllability [J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43(9): 1190-1202.
- [40] Kim TK, Han PL. Chronic stress and moderate physical exercise prompt widespread common activation and limited differential activation in specific brain regions [J]. *Neurochem Int*, 2016, 99: 252-261.

[收稿日期] 2022-02-15

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgsydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!