

创伤后应激障碍大鼠模型的情景恐惧记忆神经机制的研究

陶嵘¹, 张亚林², 王芙蓉*, 向慧²

(1.华中师范大学心理学院, 湖北 武汉 430079; 2.中南大学湘雅二医院精神卫生研究所, 湖南 长沙 410011)

【摘要】 目的: 研究恐惧记忆时动物杏仁核胃泌素释放肽 (gastrin- releasing peptide, GRP) 的变化, 以及地西洋对其的影响。方法: 雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只。条件恐惧训练后, 分别于 1h、1d 后测定给予或不给予地西洋鼠的情景恐惧记忆水平和杏仁核 GRP 水平。结果: 训练组大鼠对恐惧情景的记忆水平明显高于对照组。条件恐惧训练后 GRP mRNA 和蛋白水平显著升高, 同时 GRP 与僵立行为之间存在显著负相关关系。地西洋作用时 GRP 水平显著下降。结论: GRP 及其与 GABA 的作用可能是一种恐惧记忆的负反馈调节因子, 是一种值得探索的治疗 PTSD 新途径。地西洋对恐惧记忆的复杂作用可能与 GRP 有关。

【关键词】 生物精神病学; PTSD; 杏仁核; 胃泌素释放肽; 条件恐惧

中图分类号: R395.1 文献标识码: A 文章编号: 1005- 3611(2007)03- 0314- 04

Neurological Mechanism of Contextual Fear Memory of Rat Model of Post-traumatic Stress Disorder

TAO Rong, ZHANG Ya-lin, WANG Fu-rong, XIANG Hui

School of Psychology, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China

【Abstract】 Objective: To explore: The change of gastrin- releasing peptide mRNA and protein during fear conditioning, and the correlation between this change and fear memory. The interaction between GRP and Diazepam during fear memory. Methods: 30 male SD rats were randomly assigned to 5 groups. After fear- conditioning training, retention tests were conducted to rats treated with or without diazepam either 30 minutes or 24 hours after training. Then the amygdala of the animals were isolated, semi- quantified RT- PCR were applied to measure GRP mRNA level, and semi- quantified western- bolt were applied to determine GRP protein level. Results: Fear conditioning training could significantly increase the memory of conditioning context both in the 30 min and 24h groups. Fear conditioning training could significantly increase the level of GRP mRNA and protein both in the 30 min and 24h groups, and there were significant correlation between freezing and GRP mRNA and protein. GRP level decreased significantly when treated with diazepam. Conclusion: GRP may be a feedback factor of fear memory, it may be valuable in treating PTSD. Diazepam's complicated role for fear memory may have something to do with GRP.

【Key words】 Biological psychiatry; PTSD; Amygdala; Gastrin- releasing peptide; Fear conditioning

创伤后应激障碍 (Post- traumatic stress disorder, PTSD) 是对异乎寻常的威胁性、灾难性事件的延迟和(或)持久的反应, 其症状的核心特点是病理性记忆增强, 对于其神经机制人们所知尚少。

动物研究表明杏仁核是恐惧形成和表达的关键中枢^[1], 人类研究证实和深化了杏仁核在恐惧中的作用机制^[2]。杏仁核是恐惧学习和记忆中重要的外界感觉输入和中枢运动输出的中间结构。其中杏仁基底外侧复核和中央核被认为是恐惧学习和记忆中重要的中枢^[3]: 杏仁基底外侧复核司感觉信息输入和处理, 而杏仁中央核司恐惧行为的表达^[4]。条件恐惧的细胞分子生物学机制, 集中于杏仁核中兴奋性谷氨酸通路和抑制性 - 氨基丁酸 (GABA) 通路的相互作用, 其中涉及细胞电生理的改变、基因的表达和蛋白质的合成^[5]。

条件刺激和非条件刺激输入信息的汇集, 激活了杏仁外侧核神经元细胞突触并增加了突触的效能。研究者认为在条件信号和非条件信号发生联系过程中, GABA 能系统的调节起着关键性的同步性调节两种信号联系的作用^[6]。

胃泌素释放肽 (gastrin- releasing peptide, GRP) 是被一些研究者认为的与恐惧记忆高度相关的肽类神经递质^[7], 它含 29 个氨基酸, 是蛙皮素 (bombesin, BB,) 在哺乳类动物的对应多肽中的两个之一。GRP 受体 (GRPR) 大量表达于杏仁外侧核中, 同时与杏仁外侧核有感觉传入神经联系的脑区中表达。已有的关于 GRP、GABA 系统与恐惧记忆这三者之间的研究提示 GRP 在恐惧记忆的形成过程中具有某种特异性作用。

为此本研究采用一种被研究者接受的 PTSD 动物模型^[8], 研究该动物模型的情景恐惧记忆水平, 着

* 国防科学技术大学军事心理学研究室

眼于条件性情景恐惧记忆提取时,杏仁核中 GRP mRNA 和蛋白表达水平的变化及地西洋对其的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

雄性 SD 大鼠(250-300 克),中南大学湘雅二医院实验动物中心(国家二级标准)提供。随机分为对照组、30min 组、24h 组、30min+地西洋组、24h+地西洋组共 5 组,每组 6 只。自由进食及饮水,光周期(8AM—8PM);动物房温度(24℃)、湿度(60%)、照度 2201ux。动物在进行实验前先适应 6 天,期间实验者每天抚摸大鼠 5 分钟以使动物适应。所有的行为实验均在 8:30AM-10:30AM 间进行。

1.2 实验方法

1.2.1 行为学实验设备 自制反射箱(30.5×24×24cm)底部由 19 根钢栅栏构成(钢筋直径 5mm,间隔 15mm)。箱体的左右、后及顶壁由木板制成,前壁由玻璃构成,木板表面压覆一层树脂膜以防潮。每鼠实验结束后,90%酒精彻底清洁该箱。电刺激发生器自行设计,可提供 1.0mA 的恒流刺激。

1.2.2 行为学实验程序 实验流程:实验前一天将动物置于反射箱中熟悉 30 分钟。第一天:腹腔注射地西洋(30min+地西洋组、24h+地西洋组,2mg/kg)或生理盐水(对照组、30min 组、24h 组,体积同地西洋)。30 分钟后将动物置于反射箱中马上给予电击,(总时间 30 分钟,随机给予 60 个不可逃避足底电击,每个持续 15 秒,1mA。动物总共会受到 15 分钟电击)。对照组同样放于笼中 30 分钟,但不予电击。电击结束 24h 组和 24h+地西洋组则仍放在原笼饲养。30 分钟后,对照组、30min 组、30min+地西洋组进行行为测试及组织样本提取。第二天:24h 组和 24h+地西洋组则进行僵立行为测试及组织样本提取。恐惧记忆的行为测定及组织样本提取程序:

僵立行为测定:将经训练过的大鼠放入反射箱,测 4 分钟僵立行为(僵立行为是一种普遍见于啮齿类的防御行为,表现为刻板式的蹲伏姿势,可以有一定程度的摇摆,大鼠外观除呼吸运动以外其余的肌肉运动均消失,是大鼠恐惧表达的行为方式)^[9]。记录僵立时间百分比。取组织样本:戊巴比妥钠(60mg/kg)深度麻醉动物,断头处死,冰上取双侧杏仁核,一侧置液氮冻存。另一侧约加入 1ml TRIZOL,充分匀浆,-70℃保存。

1.2.3 RNA 表达水平测定 按 TRIZOL(Invitro-

gen)试剂说明进行总 RNA 提取。按逆转录试剂盒(Promega)说明逆转录合成 cDNA。半定量聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)扩增:PCR 总反应体积 20ul, cDNA 2ul, 引物 1.5 μmol/l-2.4 μmol/l, MgCl₂ 1.25mM, dNTP 0.2mM, DNA Taq 酶 1.5u-2.5u。PCR 条件:预变性 94℃、5min;变性 94℃、1min。退火:Beta-actin 50℃, GRP 49℃, 时间均为 1min。延伸 72℃、1.5min。GRP 和 beta-actin 的循环次数分别为 28、30 个循环,再延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD Gel Doc 2000 影象分析仪测各条带的 OD 值,用 OD_{GRP}/OD_{beta-actin}×100%比值代表表达量。

1.2.4 蛋白提取和 Western-Blot 检测 组织加细胞裂解液约 0.2ml,4℃ 13,000 转离心 45 分钟。裂解上清各取等量蛋白 60ug,加等体积 2x 蛋白电泳缓冲液,100℃,5 分钟。10,000 转 1 分钟。10% SDS-PAGE 胶,按总蛋白 60ug 进行上样电泳,200V 约 45 分钟。PVDF 膜转膜,50mA 恒流转移过夜。

3%non-fat milk TTBS 37℃ 轻摇 1h。同上 TTBS 稀释一抗(santa cruz 公司)室温轻摇 4h。同上 TTBS 洗膜。同上 TTBS 稀释二抗,加入膜室温轻摇 1h。同上洗膜。DAB 显色。BIO-RAD Gel Doc 2000 影象分析仪分析,用 OD/OD_{beta-actin}×100%比值代表蛋白表达量。

1.3 统计学方法

采用 Origin7.5 和 SPSS11.5 进行单因素、两因素方差分析、相关分析。

2 结果

2.1 条件恐惧训练对大鼠僵立行为的影响

条件恐惧组和对照组大鼠在重新置入电击箱中后,条件恐惧组大鼠表现为明显僵立行为。对照组大鼠表现出探究、理毛等行为。单因素方差分析显示三组间僵立行为水平存在显著差异,两两比较显示,与对照组相比,30min 组和 24h 组僵立行为百分比明显升高,差异具统计学意义。见表 1。

2.2 情景恐惧训练对 GRP mRNA 和蛋白表达水平的影响

单因素方差分析显示三组间 GRP mRNA 和蛋白表达水平整体存在显著差异,两两比较显示:与对照组相比,条件恐惧 30min 组和 24h 组 GRP mRNA 表达显著性升高;30min 组 GRP 蛋白水平明显升高,差异具有统计学意义;而 24h 组蛋白水平与对照组差异则未达显著性水平。见表 1。

2.3 地西洋对情景恐惧训练后不同时间 GRP

mRNA 和蛋白表达水平的影响

两因素方差分析显示: 30min 或 24h 地西洋组 GRP mRNA 表达与相同时间注射生理盐水组相比

有明显的降低, 差异具统计学意义。见表 2。同样 GRP 蛋白水平与注射生理盐水组相比有具统计学意义之降低。见表 3。

表 1 条件恐惧训练后 30min 或 24h 大鼠杏仁核 GRP mRNA 表达比较

	对照组 (%)	30min 组		24h 组		P
		(%)	P	(%)	P	
僵立行为	6.88 ± 4.26	84.72 ± 11.61	<0.001	77.08 ± 11.93	<0.001	<0.001
GRP mRNA	41.90 ± 16.89	69.73 ± 15.65	0.019	72.83 ± 22.04	0.011	0.02
GRP 蛋白	34.46 ± 8.96	55.29 ± 13.41	0.006	47.74 ± 10.86	0.058	0.018

表 2 地西洋对大鼠杏仁核 GRP mRNA 表达影响

组别	药物		F
	生理盐水(n=6)	地西洋(n=6)	
30min 组	69.73 ± 15.65	47.75 ± 8.63	F=0.08
24h 组	72.83 ± 22.04	41.20 ± 6.70	P=0.77
	F=20.63	P=0.002	

表 3 地西洋对大鼠杏仁核 GRP 蛋白表达影响

组别	药物		F
	生理盐水(n=6)	地西洋(n=6)	
30min 组	55.29 ± 13.41	39.39 ± 8.74	F=2.16
24h 组	47.74 ± 10.86	34.67 ± 7.89	P=0.16
	F=12.06	P=0.002	

2.4 GRP mRNA 和蛋白表达水平与僵立行为水平间的相关分析

将 30min 组和 24h 组合并为条件恐惧组, 将 30min+地西洋组和 24h+地西洋组合并为条件恐惧+地西洋组。相关分析发现: 在僵立行为与 GRP mRNA 和蛋白表达水平之间存在着具统计学意义的相关关系, 条件恐惧组 GRP mRNA 和蛋白表达水平与僵立行为水平间的相关系数分别为 -0.681、-0.714, P=0.015 和 0.009, 而条件恐惧+地西洋组两者相关系数分别为 -0.573、-0.632, P=0.051 和 0.028。

3 讨 论

3.1 PTSD 动物模型恐惧记忆发生中 GRP 的作用、GRP 与 GABA 系统的相互作用

动物研究证明杏仁核是一个在情绪相关记忆中起重要作用的中枢系统边缘结构。在杏仁核中, GRPRmRNA 表达于杏仁外侧核中的 GABA 能中间神经元中^[9], 这些神经元被认为在兴奋性神经元间起着有力的协调同步性抑制作用。同时 GABA 能中间神经元还起着支持抑制性突触后电位的作用, 这些突触后电位在受到刺激后起着有力的前馈和反馈作用。

已有的关于 GRP、GABA 系统与恐惧记忆之间关系的研究结果还不多, 其结果有如下一些: 活体研究表明逆透析 GRP 入海马腹侧可提高活体大鼠海

马细胞外 GABA 水平 40%^[10]。体外研究发现 GRPR 基因敲除小鼠的杏仁核切片中同步性抑制水平大大降低, 并且 LTP 增强^[7]。对自发性癫痫易患小鼠脑室内注射 GRP 可使癫痫发作的潜伏期提高、痉挛和死亡的小鼠数目减少。在此同时使用 GRP 受体拮抗剂则可以拮抗以上的作用^[10]; 体外实验发现 GRP 可导致海马 GABA 能中间神经元去极化, 而该作用可被 GRP 受体拮抗剂所阻断。同时还发现 GRP 可使 GABA 中间神经元的抑制性突触后电位的数量和幅度大幅增加^[11]。

GRP 受体基因缺陷小鼠的空间记忆不会受到损害, 但这些小鼠表现出对巴甫洛夫经典条件恐惧中长期恐惧记忆的加强和延长, 同时表现出与恐惧记忆有关的神经回路皮层 LTP 效应加强^[12,13]。本研究发现: 大鼠在经条件恐惧训练后 30min 或 24h 后再次面临恐惧情景时, 表现出明显的 GRP mRNA 和 GRP 蛋白表达水平的一致升高。这与前人研究结果有所类似: 如发现限制应激可使杏仁中央核 GRP 和 CRH 水平升高, 负性刺激和可口的食物均可刺激杏仁中央核分泌 CRH 和 BB 样肽^[14]。本研究中对僵立行为和 GRP 表达水平的相关分析显示, 在僵立行为与 GRP mRNA 和蛋白表达水平之间均存在着具统计学意义的负相关关系。两个发现相结合, 表明当条件恐惧发生时抑制性环路同时也被激活, 而起反馈和抑制作用, 而 GRP 是通过对 GABA 系统的激活, 从而对恐惧记忆形成起抑制作用的。本研究中发现条件恐惧刺激时杏仁核中 GRP 水平升高与之相符。而 GRP 升高引起 GABA 水平升高在恐惧记忆形成中起的是负反馈和抑制作用, 这与本研究相关分析所显示的 GRP 水平与僵立行为负相关相符: GRP 水平升高后, 机体负反馈和抑制作用增强, 使得 GRP 水平高的动物其僵立行为水平低些, 这也符合前人关于 GRPR 敲除后恐惧记忆大为增强的研究。

3.2 地西洋对 PTSD 动物模型恐惧记忆发生中 GRP 的影响

苯二氮卓类药物是通过在中枢内与 GABA A 受体的 BZ 位点结合, 以增强 GABA 介导的神经抑制过程而起作用的^[15]。本研究发现大鼠在经条件恐惧训练前 30 分钟腹腔注射地西洋后, 其 GRP mRNA 和蛋白表达水平明显降低。已知地西洋是 GABA A 受体的正性变构调制物, 地西洋作用下 GRP mRNA 和蛋白表达水平下降, 其作用机制及意义似乎有待于进一步研究, BDZ 类降低了 GRP 水平, 似乎能使其对恐惧记忆的负反馈作用减弱。有一项研究结果与本结果有一定的呼应: 一种仓鼠恐惧习得模型—条件性挫败 (Conditioned Defeat) 中, 发现大剂量地西洋作用下恐惧记忆增强, 小剂量则记忆减弱^[16]。地西洋这种作用的机制尚不明确, 是否可能与 GRP 的下降有关似乎是个值得研究的方向。同时这也提示苯二氮卓类药物对恐惧记忆的作用可能比较复杂, 这一结果与临床中地西洋治疗 PTSD 的效果是否一致尚待进一步验证。

参 考 文 献

- Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, 1992, 15: 353- 375
- Rauch SL, Shin LM, Wright CI. Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 985: 389- 410
- Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE. Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron*, 1997, 19: 613- 624
- Gallagher M, Holland PC. The amygdala complex: Multiple roles in associative learning and attention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91: 11771- 11776
- 陶嵘, 张亚林. 杏仁核在条件恐惧中的神经生物学机制研究进展. *中华精神科杂志*, 2006, 39(1): 58- 60
- M van nobelen, L kokkinidis. Amygdaloid GABA, not glutamate neurotransmission or mRNA transcription controls footshock-associated fear arousal in the acoustic startle paradigm. *Neuroscience*, 2006, 137: 707- 716
- Yadin Dudai. Fear thou not. *Nature*, 2003, 421: 325- 327
- Takehito S, Kunio S, Masashi N, et al. Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neuroscience Letters*, 2004, 357: 37- 40
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*, 1969, 67: 370- 375
- Nick A, Ben DM, Isabel G, et al. Effect of gastrin-releasing peptide on rat hippocampal extracellular GABA levels and seizures in the audiogenic seizure-prone DBA/2 mouse. *Brain Research*, 2000, 859: 386- 389
- K Lee, AK Dixon, I Gonzalez, et al. Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *Journal of Physiology*, 1999, 518(3): 791- 802
- Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: Distribution and behavioral implications. *Peptides*, 2004, 25(3): 511- 20
- Ali RP, Mohammad ER. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. *Brain Research*, 1998, 814: 127- 132
- Merali Z, McIntosh J, Kent P, et al. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci*, 1998, 18: 4758- 66
- Adolphs R, Tranel D, Damasio AR. The human amygdala in social judgment. *Nature*, 1998, 393: 470- 474
- MA Hebert, M Potegal, T Moore, et al. Diazepam Enhances Conditioned Defeat in Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1996, 55(3): 405- 113
- Lin CN, Tsai SJ, Hong CJ. Association analysis of a functional G protein beta3 subunit gene polymorphism(C825T) in mood disorders. *Neuropsychobiology*, 2001, 44: 118- 121
- Reutens S, Sachdev P. Homocysteine in neuropsychiatric disorders of the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2002, 17: 859- 864
- Christopher B, Anne P, Timothy G, et al. The MTHFR C677T polymorphism is associated with depressive episodes in patients from Northern Ireland. *Journal of Psychopharmacology*, 2004, 18: 567- 571

(收稿日期:2006- 10- 24)

(上接第 320 页)

- Lesch KP, Bengel D, Heils A, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene: Possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry*, 1996, 1(6): 4563- 4560
- Sifferts W, Roskopf D, Moritz A, et al. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest*, 1995, 96: 759- 766
- Zill P, Baghai TC, Zwanzerger P, et al. Evidence for an association between a G-protein beta3-gene variant with depression and response to antidepressant treatment. *Neuroreport*, 2000, 11: 1893- 1897

(收稿日期:2006- 11- 25)