

网络出版时间: 2019-3-22 16:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.004.html>

情景记忆及恐惧记忆消退与再次建立的关联性

姚慧慧¹, 张平平², 王烈成²

摘要 目的 探究短时间在给自由活动小鼠建立、抹除和再次建立恐惧记忆的过程,从而观测情景记忆在恐惧记忆抹除中的作用,以期恐惧障碍实验心理学心理教学提供实验方法和实验证据。方法 选用昆明小鼠,筛选最佳实验刺激条件后,将小鼠放入方形鼠笼中,给予30 s条件刺激,非条件刺激紧随其后;一半小鼠在恐惧记忆形成稳固后,同样环境中仅给予小鼠条件刺激不伴有非条件刺激;另一半小鼠在恐惧记忆形成稳固后,放入圆形鼠笼中,也仅给予小鼠条件刺激不伴有非条件刺激;在小鼠恐惧记忆抹除后,形成恐惧记忆的方形环境中再次给予条件刺激和随后的非条件刺激。结果 ① 恐惧记忆的形成过程中,与第1次相比,在第6次声音刺激之后僵立次数明显增多且时间明显延长($t =$

2.728, $t = 2.918$, $P < 0.05$),表明恐惧记忆形成并巩固。② 不改变周边环境,恐惧记忆的抹除,与第1次相比,在第4次声音刺激之后的僵立次数和时间均明显减少($t = 5.824$, $t = 2.695$, $P < 0.05$),恐惧记忆成功抹除。③ 改变周边环境,恐惧记忆的抹除,在第3次声音刺激之后的僵立次数与第1次相比显著减少($t = 3.273$, $P < 0.05$),而僵立时间在第4次声音刺激之后与第1次相比显著减少($t = 4.827$, $P < 0.05$),恐惧记忆成功抹除。④ 不改变周边环境,恐惧记忆的再次建立,与第1次相比,在第3次声音刺激之后的僵立次数和时间均显著减少($t = 2.480$, $t = 1.404$, $P < 0.05$),恐惧再次成功建立和巩固。结论 实验设计方法易于短时间内形成恐惧记忆与抹除。当环境改变后,消除小鼠的情景记忆,一定程度上弱化了条件刺激的作用,使恐惧记忆更容易抹除。恐惧记忆的再次建立过程相当于对初次建立的一种强化,所需要的次数明显减少。

关键词 恐惧记忆; 条件反射建立与消退; 情景记忆

中图分类号 R 332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)03-0353-06

doi 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.004

2019-01-02 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:81571293);安徽省自然科学基金青年项目(编号:1808085QH277)

作者单位 安徽医科大学¹ 第二临床医学院、² 基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介 姚慧慧,女,本科生;

张平平,女,副教授,博士,责任作者,E-mail: 791663310@qq.com;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wanglic-heng@ahmu.edu.cn

学习记忆是中枢神经系统的一项重要的高级生命活动。巴甫洛夫经典条件反射模型以及在此基础

microRNA expression profile in colon cancer

Zheng Junjun¹, Mao Yudi², Wang Chaoliang² et al

(¹ Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Dept of Geratology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001)

Abstract Objective To analyze the microRNA expression profile in Colon cancer. **Methods** 5 human colon cancer tissues and 5 peritumor normal tissues were collected for examining the microRNA expression changes by Affymetrix miRNA 4.0 microarray. Bioinformatics analysis was used to predict target genes of the deregulated microRNAs, identify the enriched pathways and biological processes of target gene. **Results** Gene expression profile analysis showed that 73 deregulated microRNA in colon cancer, the top 13 up-regulated and the top 13 down-regulated microRNAs were selected for a brief summary, including some novel colon cancer related genes, such as hsa-miR-183-3p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-99a-5p. Moreover, bioinformatics analysis showed the physiological significance of predicted target genes of microRNA, such as protein modification process, Wnt signaling pathway, post translational protein modification, ras signaling pathway, pathways in cancer and TP53 transcriptional regulation. **Conclusion** Detection of changes in miRNA expression profiles in colon cancer tissues, providing new insights into the pathogenesis of colon cancer, finding early diagnostic and prognostic markers, and expanding treatment strategies. **Key words** colon cancer; mircoRNA; deregulated; gene expression profile; target gene

上发展出来的情景条件反射是最常用来研究动物恐惧记忆的动物模型。将声、光等中性刺激与厌恶性足部电击非条件化刺激(unconditioned stimulus, US)配对呈现。两种刺激重复配对,使条件化刺激获得抑价,条件化个体形成联合性记忆,称为条件化刺激(conditioned stimulus, CS),使有着对US的厌恶性恐惧的个体对后续呈现的CS或者训练场景产生恐惧反应。按照CS的来源不同,可以分为线索性恐惧条件化(声、光、气味等引起)和场景性恐惧条件化(情景引起)^[1-3]。条件化恐惧消退是指条件化恐惧情绪建立之后,仅重复呈现CS而无US,则已建立的恐惧情绪逐渐减弱甚至消失,该过程简称恐惧消退^[4]。该研究的实验设计方法可以短时间内进行恐惧记忆的建立与抹除,同时可以观测到情景记忆在此期间的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年昆明正常小鼠20只,雄性,体质量18~22 g,月龄、体质量等差异无统计学意义。由安徽医科大学实验动物中心提供。实验动物实行单笼饲养,饮食自由,饲养温度在25℃左右,保持环境干燥通风。

1.2 方法

1.2.1 非条件刺激的最佳刺激持续时间与刺激强度探索 非条件刺激由连续两次相同的足底电击组成,两次电击的间隔时间为2 s。探索条件:0.04 mA,持续8 s;0.05 mA,持续6 s;0.06 mA,持续4 s。通过ZH-KJ型场景恐惧实验系统(安徽正华生物仪器设备有限公司)检测小鼠在不同刺激强度与时间组合下的木僵行为,从而确定最佳刺激强度与时间。然后探索最佳条件刺激:使用三种频率(1、1.5、2 kHz)的铃声(声压为75 dB,时长30 s)分别与非条件刺激配对,重复5次(每组条件刺激与非条件刺激的间隔时间为3 s),观测条件刺激建立的难易程度,从而选择一种最佳铃声作为条件刺激。实验前先将小鼠放入实验环境中让其自由活动以适应环境10 min,小鼠被放进去之前要用70%乙醇进行消毒以消除前一只小鼠气味的影响。

1.2.2 恐惧记忆的建立 将小鼠放入方形笼中,给予其30 s由最佳背景铃声作为条件刺激,非条件刺激紧随其后(间隔3 s的重复5次刺激,每次刺激持续时间3 s)。该联合刺激每隔5 min给予1次,共给予10次。小鼠出现的木僵反应通过红外光探测系统进行监测,当小鼠在2 s内没有发生移动则被

认定为出现了木僵行为,用木僵时间来量化。统计分析每次刺激过程中小鼠的木僵时间。

1.2.3 不改变周边环境条件下恐惧记忆的抹除 在方形笼中小鼠建立恐惧记忆后,只给予条件刺激30 s,不伴有非条件刺激,条件刺激的间隔时间为60 s,总共进行10~20次的条件刺激。观察记录每次条件刺激中小鼠出现的木僵时间,统计分析木僵时间变化规律,直至小鼠的木僵现象消失。

1.2.4 改变周边环境条件下恐惧记忆的抹除 将在方形笼中建立恐惧记忆的小鼠放入圆柱体笼中,只给予条件刺激30 s,不伴有非条件刺激,条件刺激的间隔时间为60 s,总共进行10~20次的条件刺激。观察记录每次条件刺激中小鼠出现的木僵时间,统计分析木僵时间变化规律,直至小鼠的木僵现象消失。

1.2.5 不改变周边环境条件下恐惧记忆的再次建立 将1.2.3不改变周边环境条件下恐惧记忆的抹除中已抹除恐惧记忆的小鼠再次按照1.2.2恐惧记忆建立的条件进行实验观察,记录统计分析每次刺激过程中小鼠的木僵时间。

1.2.6 实验流程图 见图1。

1.3 统计学处理 采用SPSS 13.0和Prism 6.0软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本组间均数比较采用 t 检验,多组间均数差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差分析后各组均数间两两比较采用 q 检验(SNK法)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 恐惧记忆最佳实验条件的确定 首先探索最佳非条件刺激,主要是通过不断调整足底电击的强度与电击时间的组合。本实验中主要涉及三种组合:非条件刺激(0.04 mA,持续8 s;0.05 mA,持续6 s;0.06 mA,持续4 s)。统计结果(图2A)可以看出经第二种非条件刺激(0.05 mA,持续6 s)的小鼠在第三次刺激以后,小鼠僵立次数明显高于其他组合,且随着电刺激次数的增加这种差别越明显。以非条件刺激(0.05 mA,持续6 s)为基础与条件刺激进行配对,此时主要通过改变条件刺激中的声音频率(1、1.5、2 kHz)来确定最佳条件刺激。统计结果(图2B)可以看出,当声音频率为1.5 kHz时,小鼠的恐惧记忆更容易形成。因此,最终本实验采取的最佳实验刺激条件,其中非条件刺激为0.05 mA足底电击和持续时间6 s;条件刺激为75 dB铃声,频率1.5

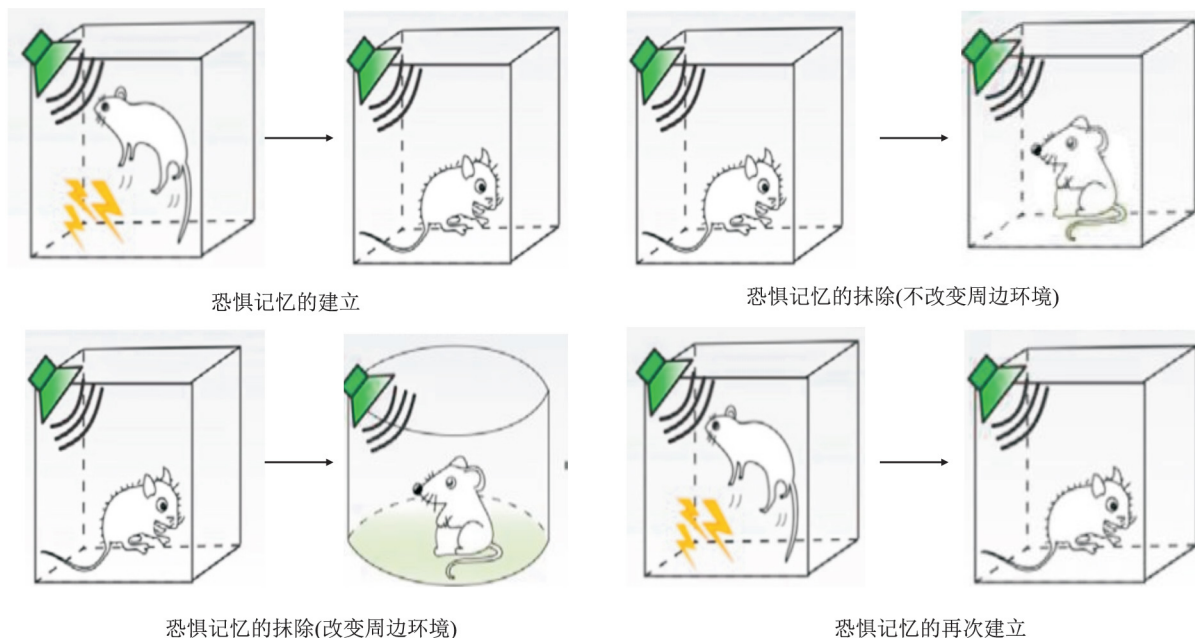


图1 实验流程图

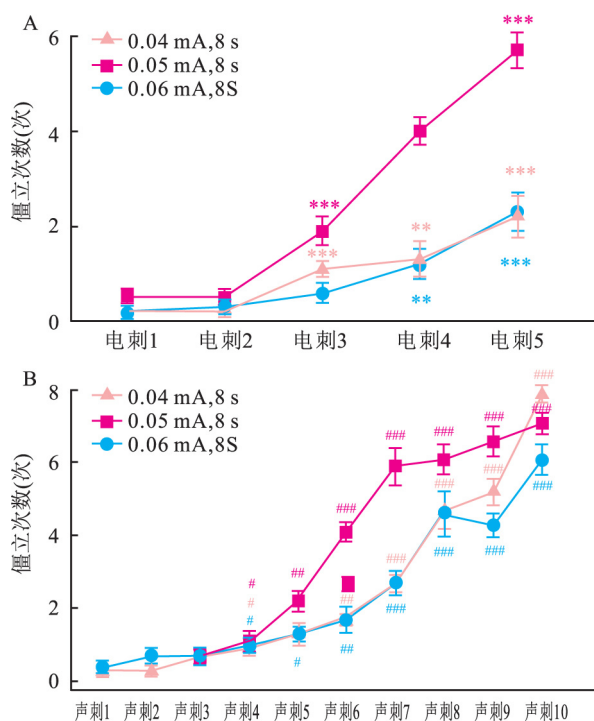


图2 最佳非条件刺激和条件刺激参数的实验统计结果

A: 最佳非条件刺激参数实验统计结果 ($n=10$); B: 最佳条件刺激参数实验统计结果 ($n=10$); 与电刺1比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与声刺1比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$

kHz 持续时间 30 s。

2.2 恐惧记忆的形成与巩固 给予小鼠条件刺激与非条件刺激的联合 这些小鼠第1次声音刺激僵立的时间和次数分别为 (0.29 ± 0.25) s 和 $(0.25$

$\pm 0.22)$ 次,并随训练次数增加而逐步递增,至第6次分别为 (8.90 ± 2.54) s 和 (2.00 ± 0.50) 次,明显高于第1次条件刺激 ($P<0.05$),说明恐惧记忆形成,同时随着第3次以后的训练此种恐惧记忆逐渐被巩固。见图3。

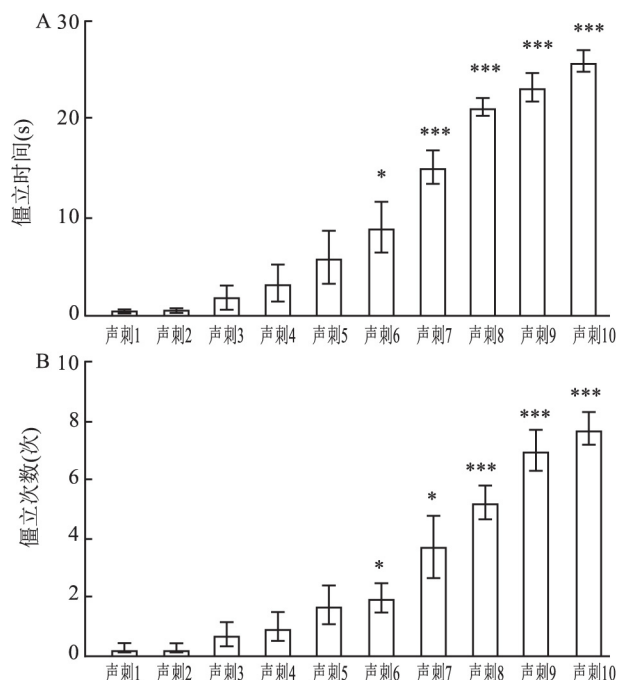


图3 恐惧记忆的形成与巩固的实验统计结果

A: 联合非条件刺激(足底刺激)的不同次数条件刺激(声音刺激)引起的僵立时间统计结果 ($n=4$); B: 联合非条件刺激(足底刺激)的不同次数条件刺激(声音刺激)引起的僵立次数统计结果 ($n=4$); 与声刺1比较: * $P<0.05$, *** $P<0.001$

2.3 不改变周边环境 恐惧记忆的抹除过程 在已形成恐惧记忆的小鼠,不改变周边环境,仅给予条件性声音刺激,第1次声音刺激僵立的时间和次数分别为 (27.94 ± 1.16) s和 (8.75 ± 0.22) 次,并随消退训练次数增加而逐步递减,至第3和第4次分别为 (20.05 ± 2.26) s和 (3.5 ± 0.75) 次,显著性低于第1次条件刺激($P < 0.05$),说明恐惧记忆逐渐被抹除。见图4。

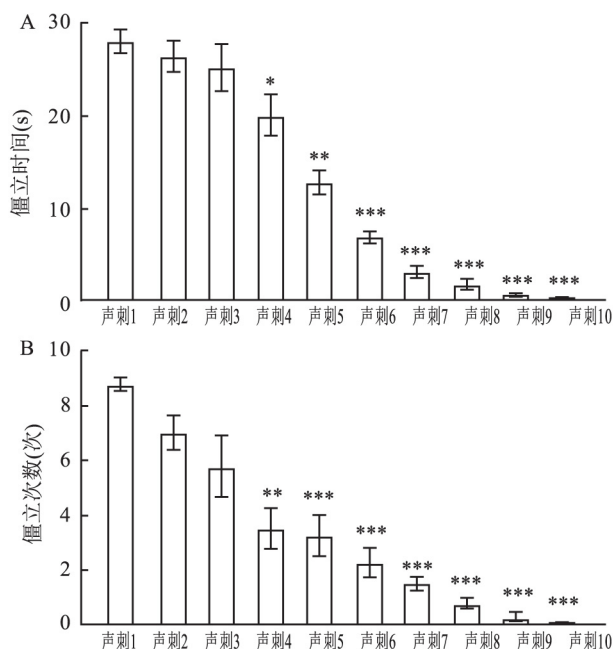


图4 不改变周边环境下恐惧记忆的抹除的实验统计结果

A: 不改变周边环境,仅给予条件刺激(声音刺激)引起的僵立时间统计结果($n=4$); B: 不改变周边环境,仅给予条件刺激(声音刺激)引起的僵立次数统计结果($n=4$);与声刺激1比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 改变周边环境 恐惧记忆的抹除过程 在已形成恐惧记忆的小鼠,改变周边环境,仅给予条件性声音刺激,第1次声音刺激僵立的时间和次数分别为 (24.55 ± 4.03) s和 (6.75 ± 0.74) 次,并随消退训练次数增加而逐步递减,至第3和第4次分别为 (12.85 ± 2.44) s和 (4.00 ± 0.61) 次,明显低于第1次条件刺激($P < 0.05$),说明恐惧记忆逐渐被抹除。见图5。

2.5 不改变周边环境下恐惧记忆的再次建立过程

小鼠在已形成恐惧记忆后,并如结果2.2抹除其恐惧记忆。在相同的环境下在给予小鼠条件刺激与非条件刺激的联合,这些小鼠第1次声音刺激僵立的时间和次数分别为 (0.28 ± 0.24) s和 (0.25 ± 0.22) 次,并随训练次数增加而逐步递增,至第3次分别为 (2.59 ± 0.46) s和 (1.5 ± 0.25) 次,明显

高于第1次条件刺激($P < 0.05$),说明恐惧记忆再次形成。见图6。

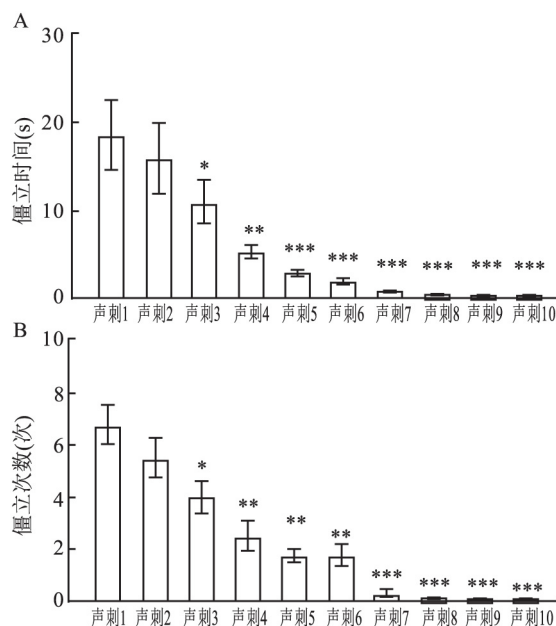


图5 改变周边环境下恐惧记忆抹除的实验统计结果

A: 改变周边环境,仅给予条件刺激(声音刺激)引起的僵立时间统计结果($n=4$); B: 改变周边环境,仅给予条件刺激(声音刺激)引起的僵立次数统计结果($n=4$);与声刺激1比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

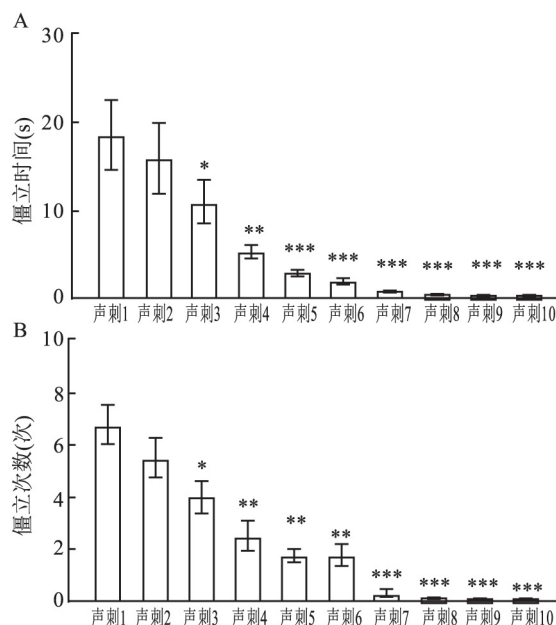


图6 不改变周边环境下恐惧记忆再次形成与巩固的实验统计结果

A: 对于已抹除恐惧记忆的小鼠,在原先的环境中再联合非条件刺激(足底刺激)的不同次数条件刺激(声音刺激)引起的僵立时间统计结果($n=4$); B: 对于已抹除恐惧记忆的小鼠,在原先的环境中再联合非条件刺激(足底刺激)的不同次数条件刺激(声音刺激)引起的僵立次数统计结果($n=4$);与声刺激1比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

3.1 对于恐惧记忆条件反射的建立与消除所需时间相对较短 作为经典式条件反射行为,眨眼条件反射、恐惧条件反射都是常用的联合型学习记忆模型。联合学习指个体对不同时间发生的事件进行联系并从行为上表达出来。但是一般经典的条件反射过程建立的时间比较长,例如眨眼条件反射。然而作为条件反射的恐惧记忆的建立所需时间相对短得多。通过本实验的探究方法,小鼠在配对给予 CS 与 US 的第 6 次声音刺激即可成功进行初次恐惧记忆的建立,而不改变周边环境再次进行恐惧记忆的建立仅需 3 次声音刺激。至于恐惧记忆的抹除,不改变周边环境需要 4 次声音刺激,改变周边环境在第 3 次声音刺激时就可以成功抹除。同时,通过小鼠不同的实验阶段的僵立时间的比较也与僵立次数的变化规律相同。

3.2 实验方法便于学生教学,但仍需进一步完善 由于学生实验时间的限制,需短时间内形成条件反射的建立与消退以及观测情景记忆与条件反射抹除的关联性,本研究的整个实验时间可以控制在 3 h 之内,通过此实验便于学生理解和解释临床中治疗患者心理恐惧疾病的原理。但是此实验探究方法的难点在于:在较短的时间内形成条件反射和条件反射抹除;区分条件反射抹除与情景记忆的关联性;统计分析实验中再次建立的条件反射和正常形成条件反射的时间及其差异。

3.3 探究情景记忆与恐惧记忆抹除的关联性 行为学研究^[5-7]表明,在联结式学习中情景确实扮演了一定的角色。情景可以作为一个由内部和外部感觉输入结合的复杂线索,它直接影响到结果的正负性,例如在恐惧条件反射的形成过程。情景不仅有调节作用,而且可以推动线索与结果关联的检索,就像以前已经抹除的恐惧反应可以再次更新^[5,8]。情景记忆在条件反射中所起到的作用已有报道,但是对于短时间内采用具体的行为学实验来观测其在条件反射的建立与抹除过程中的作用未见具体报道。本研究的结果提示,情景记忆在条件反射的抹除过程中起一定的促进作用,即改变生活的周边环境下,对已经形成的恐惧记忆抹除更加容易。

3.4 情景记忆在临床中对于恐惧记忆抹除的作用 通过对情景记忆在恐惧记忆抹除关联性的认识,有助于理解在临床治疗恐惧记忆或心灵创伤时,医生经常采取改变患者产生恐惧记忆或心灵创伤的情

景,以便更快地帮助患者抹除痛苦的记忆。如学生在校期间受到很严重的心灵创伤后的转学,丧偶后暂时离开居住地以减弱丧偶之痛等。

3.5 对于内在的神经机制有待于进一步深入研究

对于恐惧记忆的听觉 CSs 和情景的获取和表达,杏仁核起到了重要的作用^[9]。从解剖学上讲,杏仁核可以分为基底外侧杏仁核(BLA),包括外侧(LA)、基底(BA)和副基底(BMA)核,以及中央杏仁核(CEA),由外侧(CEl)和内侧(CEm)组成。BLA 接收到直接的皮质和丘脑感觉输入并与许多前脑结构相连接包括内侧额叶皮质(mPFC)和海马体^[9]。CEA 投射出下丘脑和中脑结构关于条件恐惧反应的表达^[10-11]。海马不仅可以对情景化信息进行加工,而且对于情景化的恐惧条件反射的行程以及恐惧记忆的线索检索有着重要意义^[12-13]。正是由于中枢神经系统对恐惧记忆有很大的影响,使得恐惧记忆虽然可以短时间内被抹除,但是再次建立很容易。本研究结果表明不改变周边环境,条件反射的再次建立过程中第 3 次声音刺激便能再次建立,与初次建立需要的第 6 次缩短一半时间。不难看出小鼠的恐惧记忆再次建立非常迅速。这说明条件反射一旦建立,即使由于长时间不加强而遗忘后,再次强化要比首次建立要容易得多,对于此神经机制值得深入研究。

参考文献

- [1] Claes N, Vlaeyen J W, Crombez G. Pain in context: cues predicting a reward decrease fear of movement related pain and avoidance behavior[J]. *Behav Res Ther*, 2016, 84: 35-44.
- [2] Titus D J, Wilson N M, Freund J E, et al. Chronic cognitive dysfunction after traumatic brain injury is improved with a phosphodiesterase 4B inhibitor[J]. *Neurosci*, 2016, 36(27): 7095-108.
- [3] Crabbe J C, Schlumbohm J P. Fear conditioning in mouse lines genetically selected for binge-like ethanol drinking [J]. *Alcohol*, 2016, 52: 25-32.
- [4] Dunning J P, Hajcak G. Gradients of fear potentiated startle during generalization, extinction, and extinction recall and their relations with worry[J]. *Behav Ther* 2015, 46(5): 640-51.
- [5] Bouton M E. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction [J]. *Biol Psychiatry*, 2002, 52(10): 976-86.
- [6] Bouton M E. Context and behavioral processes in extinction [J]. *Learn Mem* 2004, 11(5): 485-94.
- [7] Urcelay G P, Miller R R. Two roles of the context in pavlovian fear conditioning [J]. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 2010, 36(2): 268-80.
- [8] Bouton M E, Westbrook R F, Corcoran K A, et al. Contextual

- and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms[J]. *Biol Psychiatry* 2006 ,60(4):352–60.
- [9] Pitkänen A ,Pikkarainen M ,Nurminen N ,et al. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation , perirhinal cortex , and postrhinal cortex in rat. A review[J]. *Ann N Y Acad Sci* 2000 ,911:369–91.
- [10] Gross C T ,Canteras N S. The many paths to fear[J]. *Nat Rev Neurosci* 2012 ,13(9):651–8.
- [11] Petrovich G D ,Canteras N S ,Swanson L W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems[J]. *Brain Res Brain Res Rev* ,2001 ,38(1–2):247–89.
- [12] Hobin J A ,Ji J ,Maren S. Ventral hippocampal muscimol disrupts context-specific fear memory retrieval after extinction in rats [J]. *Hippocampus* 2006 ,16(2):174–82.
- [13] Ji J ,Maren S. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction[J]. *Hippocampus* 2007 ,17(9):749–58.

Relationship between context memory and fear memory extinguishment and reestablishment

Yao Huihui¹ ,Zhang Pingping² ,Wang Liecheng²

(¹Dept of Second Clinical Medical College ,²Dept of Physiology of
Basic Medical College ,Anhui Medical University ,Hefei 230032)

Abstract Objective To establish ,extinguish and reestablish fear memory on free-moving mice in a short period and explore the role of context memory in extinguishing fear memory so as to provide experimental methods and experimental evidences for psychological teaching. **Methods** Kunming mice were selected to screen for optimal experimental stimulation conditions. Then the mice were placed into a square cage and given conditional stimulation (CS) about 30 s , followed by non-conditional stimulation (US) . After a solid fear memory has been formed , part of the mice were put into in the same context and given only CS without US. And the other part of mice were put into a round cage and given only CS without US too. After the fear memory of the mice in the square cage was extinguished , the CS and the subsequent US were given again. **Results** ① During the formation of fear memory , there was a significant difference in the times and holding time of stiff standing of the mice after the 6th sound stimulation compared with the 1st sound stimulation ($t = 2.728$, $t = 2.918$, $P < 0.05$) , indicating that the fear memory had been established and consolidated. ② In the process of extinguishing fear memory in the same context , the times and holding time of stiff standing of the mice after the 4th sound stimulation were significantly different from the 1st ($t = 5.824$, $t = 2.695$, $P < 0.05$) , indicating that the fear memory had been extinguished successfully. ③ When the context was changed to round , in the process of extinguishing the fear memory , the stiff standing of the mice in the times after the 3rd sound stimulation was significantly different from the 1st , meanwhile in the holding time after the 4th sound stimulation also had a significant difference compared with 1st ($P < 0.05$) , indicating that the fear memory had been extinguished. ④ During the course of reestablishing the fear memory in the same context , the times and lasting time of stiff standing after the 3rd sound stimulation were significantly different from the 1st ($t = 2.480$, $t = 1.404$, $P < 0.05$) , indicating that the fear memory had been reestablished and consolidated. **Conclusion** The experimental design method is easy to form fear memory and erase in a short time. When the environment changes , eliminating the episodic memory of the mouse , to a certain extent , weakens the role of conditional stimulation , making the fear memory easier to erase. The process of re-establishing fear memory is equivalent to an enhancement of the initial establishment , and the number of times required is significantly reduced.

Key words fear memory; conditioned reflex establishment and extinction; context memory