

足底电击诱导树鼩条件恐惧记忆模型的建立及抹除

郭呈斌¹, 张晨^{1,2}, 王烈成¹

摘要 目的 探索足底电击诱导树鼩条件恐惧记忆模型的建立及抹除方法。方法 测定在无刺激条件下, 树鼩在明暗箱中的活动规律; 然后用梯度刺激实验测定合适的足底电击电压; 最后用合适的电压通过足底电击诱导并建立实验组树鼩条件恐惧记忆模型并抹除其记忆。结果 正常条件下, 树鼩($n=4$) 在暗箱中的停留时间明显多于明箱中的停留时间($P<0.01$); 在两明箱中, 足底电压梯度刺激实验显示, 随着刺激电压的增加, 树鼩($n=6$) 在有刺激的隔间中的停留时间逐渐减少。12 V 以后树鼩在有刺激隔间与无刺激隔间的停留时间差异有统计学意义[12 V($P<0.05$)、16 V($P<0.01$)、20 V($P<0.01$)]; 实验组($n=4$) 暗箱用 16 V 刺激电压足底电击能够形成明显的恐惧记忆($P<0.001$)。在形成明显的恐惧记忆后, 在明箱中给予相应的足底电击 4 d, 实验组($n=4$) 树鼩在明箱中停留的时间逐渐减少, 与对照组比较差异无统计学意义。结论 树鼩更趋于停留在暗箱中; 16 V 为较为适合的足底电击电压; 条件恐惧记忆能够被诱导并且被新的刺激完全抹除。

关键词 树鼩; 足底电击; 条件恐惧记忆形成和抹除; 明暗箱
中图分类号 R 338.2+7; R 33-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1426-05

树鼩(*Tupaia belangeri*) 是一种小型哺乳动物, 属于哺乳纲, 攀鼯目(*Scandentia*)^[1]。主要分布在热带和亚热带地区^[2-3]。树鼩身体内的分子、细胞及解剖结构较猫、犬、鼠等动物更接近于人类^[3]。研究^[4-5]显示, 在猕猴和树鼩中均能形成人类阿尔兹海默症病理样的老年斑, 这在小鼠中是不能形成的。生物信息学分析^[2]显示, 人类与树鼩在阿尔兹海默病有关基因具有较高的同源性, 这些结论为人类研究阿尔兹海默病提供了良好的实验对象。该研究旨在探索树鼩在足底电击刺激下形成条件恐惧记忆, 以及该恐惧记忆的抹除方法, 建立树鼩条件恐惧记

忆动物模型, 为进一步研究树鼩动物模型提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性成年中缅树鼩, 体重 120 ~ 180 g。购自昆明实验动物研究所, 饲养室温度 22 ~ 25 °C, 相对湿度 55% ~ 75%, 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜循环。动物在进行此实验前没有进行过其他的实验。实验操作均在实验动物操作及福利规范范围内进行。

1.1.2 实验装置 实验装置见图 1, 有 2 个一样的隔室。动物逐个进行测试, 在每只动物测试结束后, 用 75% 的酒精进行清洗以消除不同动物之间气味等相互影响。录像用的摄像机固定在天花板上。在实验装置的底部有数列铜质电极, 电极之间间隔 1.5 cm, 电刺激的电压由稳压电源(0 ~ 30 V) 提供。装置的四面由聚丙烯注塑材料制成, 装置的上部由一层不锈钢网制成, 以防止树鼩逃跑及方便录像。每个隔室的内径尺寸为 40 cm × 40 cm × 40 cm, 在每个隔室的背面都装有发光二极管(light emitting diode, LED), 能够在需要的时候为每个隔室提供照明。整个实验装置处于黑暗的环境中, LED 开的隔室称为明箱, LED 关的隔室称为暗箱。

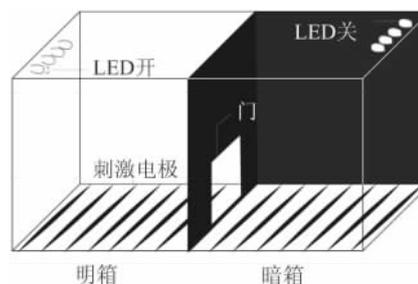


图 1 实验装置明暗箱

1.2 实验方法

1.2.1 树鼩在明暗箱中的活动规律探索(实验 1)

实验包含 3 个阶段: 训练阶段、适应阶段和实验阶段。在训练阶段, 所有的动物在无电刺激的情况下每天允许在明暗箱中自由活动 30 min; 在适应阶段,

2015-03-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81071075); 生物膜与膜生物工程国家重点实验室开放课题

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院生理学教研室, 合肥 230032

²北京大学生命科学学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100871

作者简介: 郭呈斌, 男, 硕士研究生;

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

动物被允许进行环境及实验节奏的适应,共持续 3 d;在实验阶段,每只动物进行 10 min 的测试(每次测试记录前有 3 min 的适应时间以消除应激反应带来的误差)。训练阶段和适应阶段的数据不做统计。实验中随机使用 1 个隔室作为暗箱以消除系统误差。每次实验结束后每只树鼩有 1 小块糖果(约 5 g)作为奖励。

1.2.2 树鼩足底电击不同电压的测定(实验 2)

该实验 2 个隔室皆为明室(即都用 LED 提供照明)。这个实验由 2 个阶段组成:适应阶段和测试阶段。适应阶段的实验和实验 1 相应的阶段一致。3 d 适应性训练之后进行测试阶段的实验。在测试阶段,动物有 10 min 的测试时间,在这 10 min 内,随机选择 1 个隔室给予电刺激。电刺激的程序为:每隔 30 s 给 10 s 的电刺激,电压从 0 V 递增至 20 V,增幅为 4 V(图 2 A),通过箱底部的电极电击动物的足底。所有实验动物在测试完 1 个电压水平后再进行下一水平电压的测试。

1.2.3 树鼩条件恐惧记忆的建立(实验 3)

该实验由 4 个阶段组成:适应阶段、刺激前记录阶段、给予一刺激形成恐惧记忆阶段、恐惧记忆维持阶段。适应阶段的处理和实验 2 适应阶段一致。在恐惧记忆形成阶段,将一适合的刺激电压电击动物足底以形成条件恐惧,该阶段共持续 5 d(图 3, 0 ~ 4 d),每天每只动物记录 1 次。该阶段结束后刺激即移除,记录继续即过渡到恐惧记忆维持阶段。在所有实验中,明暗箱的选择是随机的。刺激程序为:10 min 内每隔 30 s 给予 10 s 一合适恒压电刺激。对照组不给刺激。

1.2.4 树鼩条件恐惧记忆的抹除(实验 4)

在实验组动物形成条件恐惧 7 周后,启动记忆抹除实验。该实验包括 3 个阶段即条件恐惧记忆维持阶段、恐惧记忆抹除阶段和记忆抹除后维持阶段。在恐惧记忆抹除阶段,在明箱中给予一适合刺激电击动物的足底,观察条件恐惧消退情况。该阶段共持续 4 d(图 4, 0 ~ 3 d),每只动物每天记录 1 次,该阶段结束后则过渡到下一阶段即记忆抹除后维持阶段。在所有实验中,明暗箱的选择是随机的。刺激程序为:10 min 内每隔 30 s 给予 10 s 一合适恒压电刺激。对照组不给刺激。

1.2.5 数据收集

实验均在 14:00 ~ 18:00 之间进行的。在测试阶段的 10 min 内,动物在每个隔间内的活动情况由摄像机记录,通过行为学分析软件 EthoVision XT 9(荷兰瓦赫宁根大学 Noldus 公

司)进行分析,统计出动物在每个间隔内的停留时间、移动速度、移动距离等。当树鼩通过两隔室间隔板时,规定以动物的中心为参考点进行统计处理。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据的计算及统计图表由 Graph Pad Prism 5.0 软件生成。实验 1 和实验 2 中的数据采用配对 t 检验,实验 3 和 4 中的数据采用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 树鼩明暗箱活动规律探索

在没有任何刺激情况下,让树鼩($n=4$)在明暗箱中自由活动。结果表明,树鼩在暗箱中停留时间为(476.773 ± 26.965) s,而明箱中只有(117.075 ± 31.176) s。在暗箱中的停留时间是明箱中的 4 倍多,这表明,日常生活中,树鼩更喜欢在暗箱中停留($t=6.281, P<0.01$)。

2.2 树鼩足底电击合适电压的探究

在两相同的明室中,一室内给予不同电压足底电击,树鼩($n=6$)表现出不同的活动特征。0、4、8 V 电压下,树鼩在 2 个隔室中的停留时间差异均无统计学意义($P>0.05$)。当电压增大到 12 V 时,树鼩在有电刺激的隔间停留时间与 0 V 时的停留时间比较开始明显缩短($t=3.429, P<0.05$)。随着刺激电压的加大,树鼩在有电刺激的隔间停留时间越来越少[16 V($t=5.763, P<0.01$)、20 V($t=7.117, P<0.001$)],见图 2B。树鼩的其他活动指标如移动距离在 6 个电压梯度下差异无统计学意义($P>0.05$)。移动速度在 16 V 前差异无统计学意义($P>0.05$),20 V 时移动速度差异有统计学意义($t=3.176, P<0.05$)。为了获得显著差异结果并且对树鼩动物福利的保护,在接下来的实验中选用 16 V 电压进行刺激。

2.3 树鼩条件恐惧记忆的形成

动物随机分为实验组($n=4$,暗箱中给予足底电刺激)和对照组($n=4$,无电刺激)。结果显示,在刺激前,实验组树鼩在明箱中停留时间所占比例约为 16.67%,而对照组的约为 23.44%,两者比较无统计学意义($P>0.05$);在记忆形成阶段,实验组树鼩在没有电刺激的明箱中的停留时间逐渐增加,与对照组比较前 2 d(0 ~ 1 d)差异无统计学意义($P>0.05$),第 3 天以后差异有统计学意义,而对照组无变化。随着刺激的继续,实验组树鼩在明箱中停留的时间逐渐增加,稳定后实验组树鼩在明箱中的停留时间随天数的变化与对照组比较有统计学意义 [$F(22, 132) =$

7.690, $P < 0.001$], 表明恐惧记忆已形成。见图 3。

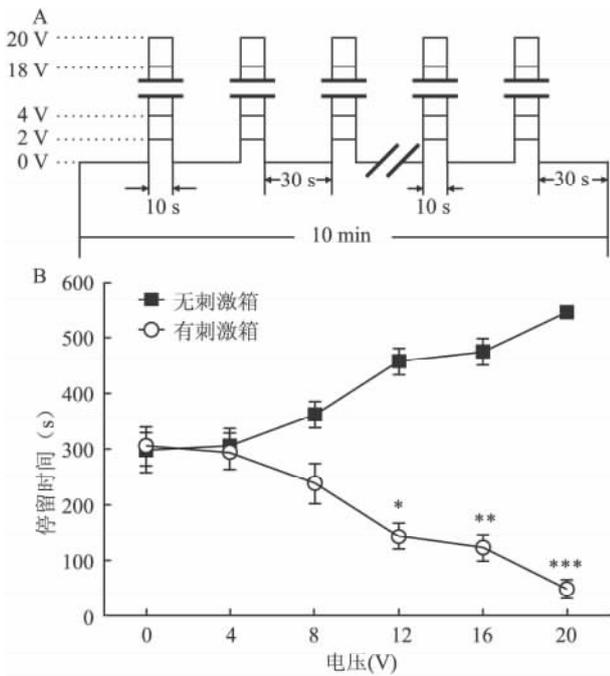


图 2 树鼯最适电压实验

A: 足底电击刺激程序; B: 不同电压下树鼯在两个明箱中的停留时间; 与无刺激(0 V)时在同一箱内停留时间比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

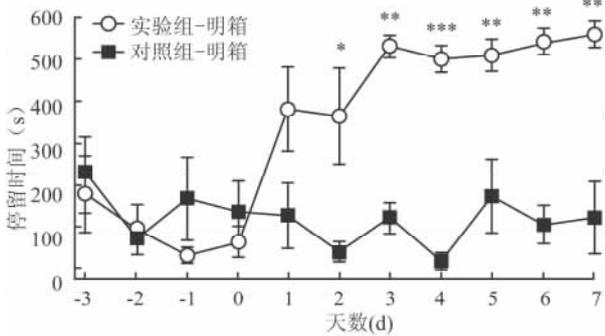


图 3 树鼯条件恐惧记忆形成过程

与同一时间点对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 树鼯条件恐惧记忆的抹除 在结束恐惧记忆维持阶段后,启动记忆抹除实验。实验动物分组不变,但与恐惧记忆形成实验不同的是实验组是在明箱中给予 16 V 的足底电击。结果显示,在抹除刺激施加前,实验组树鼯在明箱中停留时间所占比例约为 83.8 % 而对照组约为 20.19 %,两者比较有统计学意义 ($P < 0.05$); 在恐惧记忆抹除阶段,实验组树鼯在有电刺激的明箱中的停留时间逐渐减少,而对照组无变化。最后稳定在与对照组无差别水平,两组树鼯在明箱中停留时间随天数的变化无统计学意

义 [$F(11, 66) = 1.641, P > 0.05$], 表明抹除阶段过后,实验组动物的条件恐惧记忆被完全抹除,树鼯条件恐惧记忆的抹除过程见图 4。

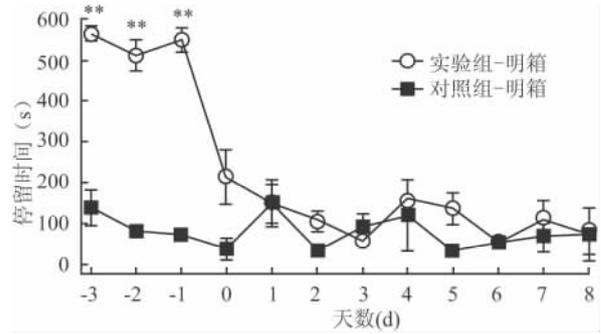


图 4 树鼯条件恐惧记忆抹除过程
与同一时间点对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

研究^[6]表明,树鼯是一种昼行性动物。但实验 1 结果表明,树鼯更喜欢呆在暗箱中而不是停留在明箱中。可能是因为树鼯胆子比较小,在暗箱中停留较多时间符合树鼯的活动特征。

学习记忆是一种高级的神经活动^[3, 7]。动物等级越高,其学习记忆功能就越复杂。痛觉和恐惧是通过不同的方式进行编码的,但是有些地方是有交集的。比如痛觉刺激对恐惧记忆的形成有深远的影响^[8-9]。因此,足底电击是进行恐惧记忆研究最常用的手段^[10]。对树鼯学习记忆方面的研究如水迷宫实验^[11],或食物诱导^[12-13],但这些实验都只能从某些方面测试树鼯的学习记忆能力,对条件恐惧的痛觉记忆目前还没有很好的实验方法来检测。树鼯作为灵长类的近亲,脑部的发育比啮齿类更接近于人类^[2]。本研究进行了足底电击诱导条件恐惧记忆的形成及抹除实验。实验 2 探讨树鼯足底电击的合适电压。结果表明,树鼯对 12 V 的电压就有一定的反应,但速度的明显变化是在 16 V 以上。综合各方面的因素及动物福利,将诱导条件恐惧的足底电击电压定在 16 V。

巴普洛夫恐惧记忆理论认为,恐惧记忆的形成经历 3 个阶段:诱导与建立、强化和维持、消退^[14]。本实验采用足底电击刺激树鼯诱导其建立对暗箱的条件恐惧记忆,结果显示树鼯的这种条件恐惧记忆存在时间超过 8 周而未消退。研究^[8]表明新的重大刺激能够使人或动物忘记原有的恐惧记忆,因此在记忆抹除阶段,在相反的箱子给予树鼯刺激,以期树

鼯能够抹除其恐惧记忆。结果显示,在相反的箱子给予刺激后,树鼯选择性地抹除原来对暗箱的恐惧记忆,在随后的维持阶段并不是新旧两种记忆共存,而是彻底地抹除了恐惧记忆。本实验显示,新的重大环境变化可以抹除某些恐惧记忆,这就为将来治疗恐惧症提供了一个方向。

由于实验规模的限制,本实验未能对恐惧记忆形成的分子机制进行研究。在将来的研究中,将着重对恐惧记忆形成及抹除的分子机制展开探索,为将来临床上治疗恐惧症提供理论指导。

参考文献

- [1] Janecka J E, Miller W, Pringle T H, et al. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates [J]. *Science*, 2007, 318(5851): 792-4.
- [2] Fan Y, Huang Z Y, Cao C C, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1426.
- [3] Ni R J, Shu Y M, Luo P H, et al. Immunohistochemical mapping of neuropeptide Y in the tree shrew brain [J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(3): 495-529.
- [4] Yamashita A, Fuchs E, Taira M, et al. Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques [J]. *J Med Primatol*, 2012, 41(3): 147-57.
- [5] Pawlik M, Fuchs E, Walker L C, et al. Primate-like amyloid-beta sequence but no cerebral amyloidosis in aged tree shrews [J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(1): 47-51.
- [6] Coolen A, Hoffmann K, Barf R P, et al. Telemetric study of sleep architecture and sleep homeostasis in the day-active tree shrew *Tupaia belangeri* [J]. *Sleep*, 2012, 35(6): 879-88.
- [7] Nair J, Topka M, Khani A, et al. Tree shrews (*Tupaia belangeri*) exhibit novelty preference in the novel location memory task with 24-h retention periods [J]. *Front Psychol*, 2014, 5: 303.
- [8] Joels G, Lamprecht R. Fear memory formation can affect a different memory: fear conditioning affects the extinction, but not retrieval, of conditioned taste aversion (CTA) memory [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8: 324.
- [9] Maxcey A M, Woodman G F. Can we throw information out of visual working memory and does this leave informational residue in long-term memory? [J]. *Front Psychol*, 2014, 5: 294.
- [10] Toth I, Neumann I D. Animal models of social avoidance and social fear [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 354(1): 107-18.
- [11] 陆彩霞, 罕园园, 全品芬, 等. 水迷宫实验中不同性别树鼯学习记忆能力的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(5): 74-9.
- [12] Wang J, Zhou Q X, Tian M, et al. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory [J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2011, 32(1): 24-30.
- [13] Wang J, Chai A, Zhou Q, et al. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate tree shrews [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80980.
- [14] Sandkühler J, Lee J. How to erase memory traces of pain and fear [J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(6): 343-52.

A novel fear conditioning memory model formation and erasing by foot-shock in tree shrew

Guo Chengbin¹, Zhang Chen^{1,2}, Wang Liecheng¹

(¹Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²State Key Laboratory of Biological Membrane and Membrane Biological Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Objective To investigate the way of fear conditioning memory model evoked and erased by foot-shock in tree shrew. **Methods** First, detect the tree shrew activities regularly in light/dark box. Second, test a suitable voltage degree of foot shock on tree shrew. Third, investigate the memory formation and erasing of fear conditioning on tree shrew of trial group. **Results** The duration of tree shrew ($n=4$) stay in the dark-box was significantly longer than that of in the light box ($P<0.01$) in normal condition. In the same environment of two light boxes, given different voltage degrees, the durations of tree shrew ($n=6$) stay in the stimulating chamber gradually reduced and the durations of tree shrew stay had significant difference between stimulus chamber and no stimulus chamber when the stimulus voltage up to 12 V ($P<0.05$), 16 V ($P<0.01$) and 20 V ($P<0.01$). The animal of trial group ($n=4$) could build up the fear conditioning memory of the dark box with the stimulus of 16 V foot-shock in the dark box ($P<0.001$). After formation of the fear conditioning memory, the same stimulus in light box appeared for 4 days. The durations of tree shrew stay in trial group ($n=4$) decreased in light box, and there was no

早期脓毒症大鼠心脏变化特点及卡维地洛 预先干预作用的实验研究

陈军喜^{1,2}, 孙 坚¹, 管细红³, 贾宝辉¹, 夏芝辉¹, 闫智杰¹, 吴丽丽¹

摘要 目的 明确早期脓毒症大鼠心脏变化特点及卡维地洛的预先干预作用。方法 40 只 SD 大鼠随机分为脓毒症组(S 组)、脓毒症卡维地洛预先干预组(CS 组)、卡维地洛对照组(C 组)和生理盐水对照组(N 组),CS 组和 C 组给予卡维地洛 10 mg/(kg·d) 灌胃,4 周后 S 组和 CS 组大鼠尾静脉注射脂多糖(LPS) 20 mg/kg 制备脓毒症模型,C 组和 N 组注射等容量生理盐水,24 h 后检测各组大鼠心率、血压、血清磷酸激酶(CK)、磷酸激酶同工酶(CK-MB)、N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP) 浓度,心肌中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA) 和三磷酸腺苷(ATP) 的含量,观察心肌形态学改变。结果 卡维地洛可使正常大鼠心率减慢,心肌 MDA 含量下降、SOD 含量升高。LPS 可使大鼠心率增快,血清 CK、CK-MB、NT-proBNP 浓度和心肌 MDA 含量升高,心肌 SOD 和 ATP 含量降低;卡维地洛预先干预可减轻 LPS 所致大鼠的这些变化。4 组大鼠血压和心肌形态学变化差异无统计学意义。结论 早期脓毒症大鼠心率增快,心肌氧化应激,心脏功能受损,心肌能量生成减少。卡维地洛可增强大鼠抗氧化应激能力,卡维地洛预先干预可改善脓毒症心肌能量代谢和心脏功能,可能与其抗氧化应激作用有关。

关键词 卡维地洛; 脓毒症; 氧化应激; 心脏功能

中图分类号 R-33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1430-04

脓毒症(sepsis) 是感染与感染引起的全身炎症反应^[1],进一步发展可导致感染性休克和多器官功

能障碍综合征,是当前危重病患者死亡的主要原因之一。心脏是脓毒症易损的靶器官之一。现已知炎症反应和交感神经兴奋、氧化应激等参与了脓毒症的病理生理过程。心血管疾病的常用药物卡维地洛作为第 3 代的 β 受体阻滞剂,兼有 α 受体阻滞剂、抗氧化、抗心律失常、抑制中性粒细胞浸润等特性,经过临床观察,长期服用过卡维地洛的患者在发生脓毒症时,治疗效果多较其他未曾服用过此药物的患者好,目前关于卡维地洛对脓毒症心脏的影响研究也不多见,该研究旨在明确卡维地洛预先干预对早期脓毒症大鼠心脏的影响。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 卡维地洛粉剂(美国 Sigma 公司);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(上海纪宁实业有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 测试盒(南京建成生物工程研究所);solar3000 多功能心电监护仪(美国 GE 公司);罗氏 2010 电化学发光仪(北京英博科贸有限公司);LG10-2.4A 离心机(北京医用离心机厂);低温高速离心机(D-37520,德国 Sigma 公司);紫外分光光度计(美国 HP 公司);电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司);液相色谱仪(郑州国达仪器设备有限公司);Olympus 光学显微镜(BX51,日本奥林巴斯公司);7170 全自动生化分析仪、JEM-1230 透射电镜(日本日立分司)。

1.2 动物分组及处理 40 只雄性 Wistar 大鼠(南昌大学医学院实验动物科学部提供),体重 250 ~ 300 g,随机分为脓毒症组(S 组)、脓毒症卡维地洛预先干预组(CS 组)、生理盐水对照组(N 组)和卡维地洛对照组(C 组),每组 10 只。① CS 组大鼠给予卡维地洛 10 mg/(kg·d) 灌胃,1 次/d;4 周后尾

2015-04-30 接收

基金项目:江西省卫生厅科技计划课题(编号:20133083);南昌市指导性科技计划项目(编号:洪科发计字[2012]171 号第 15 项)

作者单位:¹南昌大学第四附属医院重症医学科,南昌 330003

²南昌大学医学院研究生院,南昌 330031

³江西省人民医院护理部,南昌 330006

作者简介:陈军喜,女,博士研究生,副主任医师;

孙 坚,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: cdsfysj@163.com

significant difference between the trial group and the control group. **Conclusion** Tree shrew prefers to stay in the dark box. The suitable voltage for foot-shock on tree shrew is 16 V. The fear conditioning memory can be evoked and erased by foot-shock.

Key words tree shrew; foot-shock; fear conditioning memory formation and erasing; light/dark box