论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0220-04

条件性恐惧消退早期大鼠边缘下区 NR2B 的动态变化

韦 美[1,2],李 敏[1],李培培[1],张丽丽[1],汪 涛[1] (400038 重庆,第三军医大学护理系心理学教研室[1];050800 河北 正定,白求恩国际和平医院 256 临床部[2])

[摘要] **目的** 探讨条件性恐惧消退早期(1 周内),记忆保持成绩与内侧前额叶皮层边缘下区(infra-limbic cortex,IL)NMDA 受体 2B 亚基(NR2B)免疫反应阳性物质的动态变化。**方法** 将 70 只成年雄性 SD 大鼠随机分成:正常对照组、恐惧消退组和恐惧对照组,其中恐惧对照组(条件恐惧建立后不进行消退训练),恐惧消退组(条件恐惧建立 24 h 后进行消退训练),采用以声音为提示的足底电击建立大鼠恐惧记忆,然后仅给予声音信号进行恐惧消退训练。在恐惧消退后第 1、3、7 天分别进行消退保持测试,并在各时间点取边缘下区标本进行 NR2B 的免疫组化实验。**结果** 在消退保持过程中:①恐惧对照组和恐惧消退组大鼠消退成绩整体呈上升趋势,但均低于正常对照组,恐惧消退组消退成绩好于恐惧对照组($P<0.01$);②恐惧对照组和恐惧消退组大鼠边缘下区 NR2B 免疫反应阳性物质逐渐增加,但均低于正常对照组,第 1 天无明显差异,第 3、7 天差异明显,恐惧消退组 NR2B 免疫反应阳性物质高于恐惧对照组($P<0.05$)。**结论** 恐惧消退训练后 3~7 d,边缘下区 NR2B 水平与消退记忆保持成绩一致。

[关键词] 恐惧消退;NR2B;前额叶;边缘下区

[中图法分类号] R395.1; R338.26; R392.1 **[文献标志码]** A

Changes of NR2B in infra-limbic cortex after fear extinction

Wei Mei[1,2], Li Min[1], Li Peipei[1], Zhang Lili[1], Wang Tao[1] ([1]Department of Psychology, School of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, [2]No. 256 Department of Clinical Medicine, Norman Bethune International Peace Hospital, Zhengding, Hebei Province, 050800, China)

[Abstract] **Objective** To observe the changes of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor 2B, an immune positive reaction substance, in infra-limbic (IL) cortex of medial prefrontal cortex (mPFC) in adult rats after fear extinction. **Methods** Twenty-four hours after Pavlovian fear conditioning, 70 rats were randomly divided into fear extinction group ($n=30$), natural extinction group ($n=30$) and naive group ($n=10$). Extinction memory was established by electric shock at the sole with tone as a prompt. Then, fear extinction training was carried out by giving the rats only tone signals. NR2B was tested by immunohistochemistry 1, 3 and 7 d after fear extinction. **Results** The NR2B expression level increased gradually in fear and natural extinction groups and was lower than that in normal control group. The fear extinction was better in natural extinction group than in normal control group ($P<0.05$). The NR2b level increased gradually in IL cortex of fear and natural extinction groups, and was lower than that in normal control group. A significant difference was found on day 1 but not on days 3 – 7. **Conclusion** NR2B level in IL cortex is consistent with the extinction memory 3 – 7 d after fear extinction training.

[Key words] fear extinction; NR2B; medial prefrontal cortex; infra-limbic cortex

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670712) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5014).
Corresponding author: Li Min, Tel: 86-23-68752267, E-mail: lmxl@mail.tmmu.com.cn

由于各种突发性事件(地震、洪水、恐怖袭击等)的频繁发生,精神应激与健康和疾病的关系越来越受到人们的重视。创伤后应激障碍(post-traumatic stress disorder,PTSD)是在强烈的精神创伤后发生的一系列生理、心理应激所表现出来的临床综合征。创伤记忆一旦形成,就很难消退,给患者带来很大痛苦,增加了社会的负担[1]。大量研究[2,3]表明内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex,mPFC)的边缘下区(infra-limbic cortex,IL)区域参与了条件化恐惧消退的过程,如

[基金项目] 国家自然科学基金(30670712);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5014)

[通信作者] 李 敏,电话:(023)68752267, E-mail:lmxl@mail.tmmu.com.cn

果 mPFC 功能不足,则对杏仁体的抑制不足,从而使恐惧记忆持续存在。目前对 PTSD 的心理治疗主要致力于消退患者的创伤记忆,但临床上约有 40% 的患者在采用的基于消退原理的暴露疗法治疗后,疗效不能维持,表现为已经消退的恐惧反应很快再现。因此,促进患者创伤记忆的消退成为 PTSD 治疗的重点和难点。

以往的研究表明:N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)依赖的长时程增强效应(long term potentiation, LTP)是学习记忆的重要分子机制,消退保持与消退训练后早期(1 周内)海马-mPFC 通路 LTP 有关[4]。其中 NR2B 是其重要的结构和功能性亚单位,在皮层的表达量最大,主要分布在突触后膜,其表达水平直接影响 LTP 和突触可塑性[5-9]。因此了解 NR2B 在消退保持中的作用,对探索促进消退保持的方法、寻找治疗 PTSD 的有效靶点、提高基于消退原理的行为治疗的效果有重要意义。本研究探讨条件性恐惧消退早期(1 周内)IL 区 NR2B 亚基的变化,为深入研究恐惧消退的神经机制以及为临床防治 PTSD、焦虑症等情绪相关疾病打开新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 70 只,体质量 200 ~ 250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。将大鼠随机分成恐惧消退组、恐惧对照组和正常对照组,恐惧消退组与恐惧对照组每组 30 只,各组每个测试时间点 10 只,正常对照组 10 只。其中恐惧消退组在建立条件性恐惧 24 h 后进行消退训练。恐惧对照组在条件性恐惧建立 24 h 后仅将动物放在训练箱中,但不进行消退训练。正常对照组在各个时间点仅被放在训练箱中同样长的时间,但不给予任何处理因素。

1.2 方法

1.2.1 模型的制备[10] 先将大鼠放在动物饲养室内适应 1 周。(1)条件性恐惧建模:将大鼠分别放入斯金纳箱(箱子底部为可通电的铜条栅栏)内,适应 2 min,给予 10 次以声音信号为提示的不可逃避足底电击(1 mA,5 s),声音与电击同时结束,2 次声音间隔为 1 ~ 4 min,共 28 min。实验结束后让动物继续停留 2 min 后放回饲养笼。每次实验结束后用 90% 酒精擦拭箱底,用湿布擦拭箱壁,以避免残留气味对后续实验大鼠的影响。若动物在听到训练声音时出现僵立行为(除呼吸外无其他运动行为),就能判定建成恐惧动物模型(以下简称建模)。(2)恐惧消退训练:24 h 后将已经建模动物再次放入斯金纳箱内,仅给予声音信号 16 次,两次声音间隔为 1 ~ 2 min,共 24 min。恐惧对照组在对应的时间点放进斯金纳箱内 24 min,不进行声音提示的消退训练。(3)条件性恐惧消退保持测试:恐惧对照组和恐惧消退组动物分别在恐惧消退训练后的第 1、3、7 天将大鼠放在训练箱内,给予 5 次声音信号,时间间隔为 30 s,记录 3 min 内的不僵立时间,以 3 min 内不僵立时间百分比作为消退保持成绩。百分比越高,表明消退保持成绩越好。

1.2.2 脑区取材以及切片制备 上述实验过程结束后按照常规方法灌注固定大鼠,留取脑组织,放入 4% 多聚甲醛溶液 4 ℃ 过夜。石蜡包埋,参照大鼠脑立体定位图谱取 mPFC 的 IL 区,在丘脑水平连续冠状切片,片厚 3 ~ 5 μm。

1.2.3 免疫反应阳性产物测定 主要试剂为兔抗 NR2B 抗体(美国 Millipore 公司)、兔二步法检测试剂盒(PV-6001,北京中杉金桥生物技术有限公司),采用 DAB(北京中杉金桥生物技术有限公司)显色,方法按试剂说明书。应用 Image Pro Plus 6.0 软件分析系统,测定 IL 区域免疫反应阳性产物积分吸光度(IOD)。为了减少人为的误差,本实验选取平均光密度(MOD)=积分光密度(IOD)/图片总面积(SUM AREA)指标。为避免非特异性染色影响,在相同光学条件下摄像。每个标本取 3 张切片,每张切片随机取 IL 区 5 个不同位置进行测定。部分切片一抗用 PBS 代替作为阴性对照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 恐惧消退过程中不同时间点消退保持成绩

在消退过程中,2 组建模大鼠在消退后的第 1、3、7 天各自的消退保持成绩均呈上升趋势,有统计学意义($P < 0.01$);2 组建模大鼠间比较,恐惧消退组在第 3、7 天消退保持成绩好于恐惧对照组($P < 0.01$),见表 1。

2.2 大鼠 IL 区 NR2B 免疫反应阳性物质 MOD 的比较

恐惧对照组和恐惧消退组两组大鼠 IL 区 NR2B 含量均逐渐增加,第 1、3 天增加迅速,第 7 天最高,但均低于正常对照组,差异显著($P < 0.01$);恐惧对照组和恐惧消退组相比较:第 3、7 天两组差异显著,且恐惧消退组显著高于恐惧对照组($P < 0.05$),见表 1。

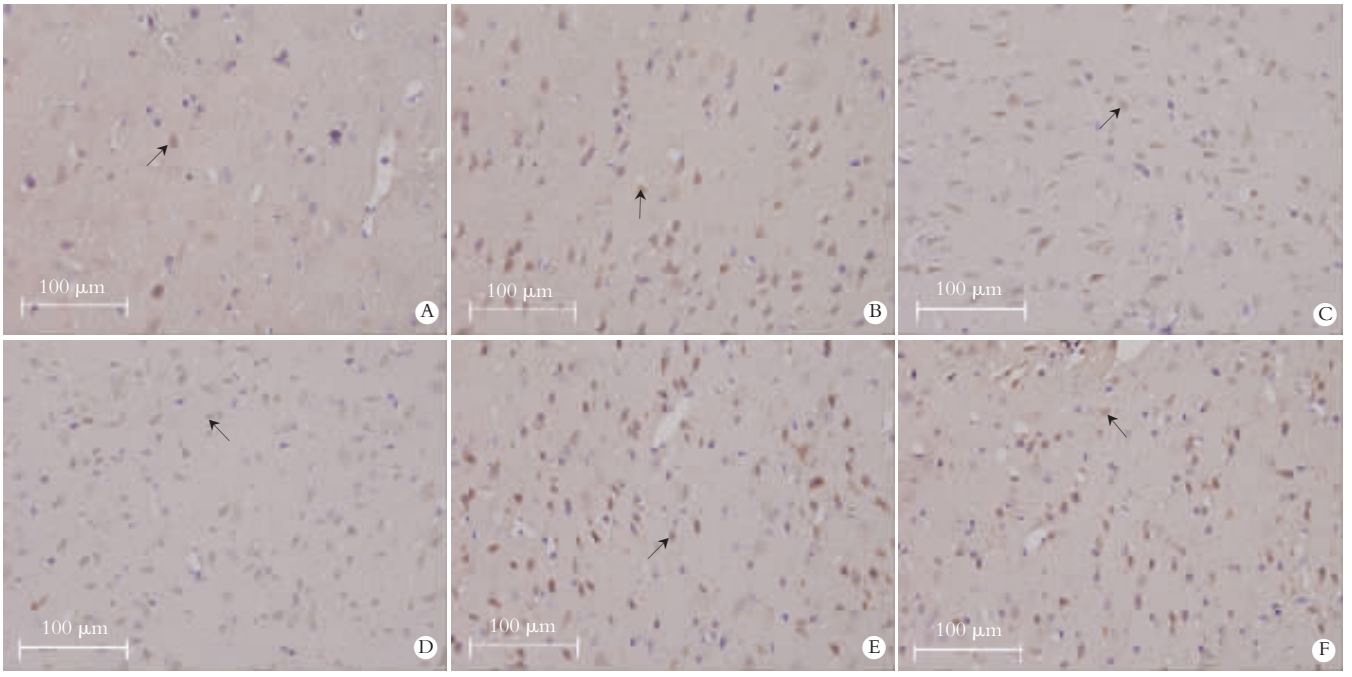
表 1 大鼠消退保持成绩及 IL 区 NR2B 免疫反应阳性物质平均吸光度($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	消退保持成绩(%)	吸光度(MOD)
正常对照组	75 ± 7	1.85 ± 1.30
恐惧对照组		
1 d	20 ± 11[a]	0.19 ± 0.15[a]
3 d	22 ± 9	0.50 ± 0.36
7 d	29 ± 18	0.93 ± 0.65
恐惧消退组		
1 d	21 ± 12[a]	0.18 ± 0.20[a]
3 d	25 ± 18[b]	0.70 ± 0.25[c]
7 d	56 ± 10[b]	1.65 ± 1.28[c]

a:$P < 0.01$,同组内不同时间点比较;b:$P < 0.01$,c:$P < 0.05$,与恐惧对照组同一时间点比较

2.3 不同时间点各组大鼠 IL 区 NR2B 的阳性表达

从图 1 中可以看出在恐惧对照组和恐惧消退组两组大鼠在消退后第 1、3、7 天大鼠 IL 区 NR2B 阳性表达呈逐渐增加趋势,其第 1、3 天增加迅速,恐惧消退组第 7 天基本恢复正常。恐惧对照组各时间点 NR2B 的阳性表达显著低于恐惧消退组和正常对照组。



A：恐惧对照组1 d；B：恐惧消退组1 d；C：恐惧对照组3 d；D：恐惧消退组3 d；E：恐惧对照组7 d；F：恐惧消退组7 d 箭头所指褐色颗粒为免疫反应阳性产物

图1 不同消退方式和不同时间点大鼠IL区NR2B神经元的表达 （×100）

3 讨论

PTSD是一种焦虑障碍，与创伤记忆相联结的症状（重现或闪回、回避等）即联想性恐惧条件化是其典型症状。条件性恐惧模型是PTSD的典型动物模型，此模型模拟了PTSD患者的防御性回避行为。模型程序为巴甫洛夫经典的条件反射，模型建立后动物重新暴露于恐惧建立时的条件线索下，表现出对条件线索的恐惧性反应。条件性恐惧形成后的消退训练是在动物模型中模拟对人类PTSD患者的暴露治疗。消退是指重复呈现条件性恐惧记忆的条件线索CS而不伴随非条件线索US的强化，促进条件性恐惧反应减少的过程。目前认为消退并不是消除了已获得的恐惧记忆，而是抑制了先前习得的恐惧记忆的表达。消退学习使原来的CS-US联结更新，而使CS不再预示US的到来，即形成了CS-no US的新联结。

目前认为：PTSD主要与mPFC、海马和杏仁核有关，而mPFC消退中起作用，是消退记忆长时保存的关键位点[1,7,11]。记忆的长时保持（长时记忆）与NMDA受体依赖的长时程增强有关，而NR2B是NMDA受体的重要结构和功能单位，其表达水平直接影响长时程增强和突触可塑性[5-7]。恐惧消退也是一种学习，在消退训练过程中，必然伴随有相应脑区蛋白质形成和突触重塑性变化。训练前若在杏仁体应用NR2B选择性拮抗剂可以损害条件性恐惧的习得和后续的消退，这就提示我们在恐惧消退中需要NR2B的参与[12]。但是NR2B在消退记忆长时保持中以及突触可塑性变化中的作用如何，尚不清楚。本研究结果显示：IL区NR2B的含量随着消退时间增长逐渐增加，第7天达到最高。Hugues等[4]发现在恐惧消退过程中伴随有突触可塑性的变化，在消退训练后（2 h至3 d）伴有腹侧海马-mPFC通路突触传递长时程增强，消退后7 d消失；在消退训练后3～7 d，背中部丘脑-mPFC通路记录到LTP，以第7天最强。张燕等[13]也发现IL区突触囊泡蛋白在恐惧消退训练后1～7 d逐渐增加，第7天最高；IL区神经细胞黏附分子在消退训练后第3～7 d较高。这与本研究结果相一致。提示在恐惧消退后早期（3～7 d），IL区突触的发生、重塑等可塑性变化可能是消退记忆长期保持的基础，在恐惧消退中可能需要NR2B的参与。

Milad等[14]电生理研究发现：消退保持过程中伴有IL区NR2B依赖的簇状放电，而且消退后IL区NR2B依赖的簇状放电越显著则消退保持成绩越高。提示mPFC区NR2B是消退记忆保持相关的重要物质，消退早期mPFC区NR2B水平可能决定消退保持成绩。我们的结果显示恐惧消退训练后早期，IL区NR2B水平逐渐增加，且NR2B水平的增加与消退保持成的逐渐增加相一致。这支持了消退早期IL区NR2B水平与消退保持成绩正相关这一观点，进一步说明NR2B可能参与恐惧消退过程长时记忆保持过程。

目前消退恐惧记忆是PTSD治疗的关键点和难

点,临床上主要采用药物治疗和基于消退原理的暴露疗法。对NR2B的进一步研究不仅可以增加对学习记忆过程的理解,而且可能提供PTSD、焦虑症等情感疾病防治的新思路,如:通过增加PTSD患者暴露治疗后mPFC区NR2B的水平来提高前额叶的皮层的功能来促进消退。

参考文献:

[1] Milad M R, Rauch S L, Pitman R K, *et al*. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders[J]. Biol Psychol, 2006, 73(1): 61-71.
[2] Santini E, Ge H, Ren K, *et al*. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex[J]. J Neurosci, 2004, 24(25): 5704-5710.
[3] Milad M R, Wright C I, Orr S P, *et al*. Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert[J]. Biol Psychiatry, 2007, 62(5): 446-454.
[4] Hugues S, Garcia R. Reorganization of learning-associated prefrontal synaptic plasticity between the recall of recent and remote fear extinction memory[J]. Learn Mem, 2007, 14(8): 520-524.
[5] Quirk G J, Beer J S. Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies[J]. Curr Opin Neurobiol, 2006, 16(6): 723-727.
[6] Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, *et al*. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex[J]. Neuron, 2007, 53(6): 871-880.
[7] Mao Y, Zang S, Zhang J, *et al*. Early chronic blockade of NR2B subunits and transient activation of NMDA receptors modulate LTP in mouse auditory cortex[J]. Brain Res, 2006, 1073-1074: 131-138.
[8] Rothbaum B O, Davis M. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions[J]. Ann NY Acad Sci, 2003, 1008: 112-121.
[9] Maren S, Chang C H. Recent fear is resistant to extinction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(47): 18020-18025.
[10] Stevenson C W, Meredith J P, Spicer C H, *et al*. Early life programming of innate fear and fear learning in adult female rats[J]. Behav Brain Res, 2009, 198(1): 51-57.
[11] Kim J J, Jung M W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2006, 30(2): 188-202.
[12] Sotres-Bayon F, Bush D A, LeDoux J E. Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala[J]. Neuropsychopharmacology, 2007, 32(9): 1929-1940.
[13] 张燕, 田玉娥, 李敏, 等. 条件性恐惧消退过程中大鼠边缘下区突触素和神经细胞黏附分子的变化[J]. 中华精神科杂志, 2009, 42(1): 43-46.
[14] Milad M R, Quirk G J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction[J]. Nature, 2002, 420(6911): 70-74.

(**收稿**:2009-09-14;**修回**:2009-11-16)

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2010)03-0223-01

个案与短篇

巨大毛发胃石症1例

刘 建,祝东强,刘 恒,张 勇,赵 伟 (611130 成都,成都市第五人民医院普外科)

[关键词] 胃肠结石;毛发
[中图法分类号] R573.8 **[文献标志码]** B

胃石是患者进食植物纤维、某些矿物质或异物后,在胃内积聚并与胃黏液结成的固体硬块,形状多为圆形或椭圆形,大小不一[1]。本科收治1例罕见的巨大毛发性胃石,现报告如下。

1 临床资料

患者,女性,15岁,因"食欲不振10余年,上腹胀痛20 d"于2009年5月28日入院。自诉10余年前出现纳差,嗜食自己头发,近20 d,出现上腹胀痛,以剑下为主,进食后加剧,症状逐渐加重,无黑便、便血。体检:生命体征平稳,体型消瘦,营养差,心肺查体无特殊上腹膨隆隆,剑下可扪及10 cm×20 cm的胃型包块,压痛明显,肝脾未及,肠鸣音正常。由于患者拒绝胃镜检查,故查腹部CT示:胃呈充盈状态,胃内见不均质团块状影,大小20 cm×10 cm×5 cm,边缘见环形密度较高影,CT值约10 Hu;中心为混杂密度影,CT值约7 Hu,与胃壁分离,边缘有造影液包绕,符合胃石症影像。患者于入院后第2天行开腹手术取出20 cm×10 cm×6.5 cm胃型头发样组织,质量650 g(图1),病理检查结果示:头发上见弥漫无结构的胃黏液组织。患者术后第5天出院。



图1 巨大毛发胃石大体观察

[通信作者] 刘 建,E-mail:525309456@qq.com

(下转228页)