文章编号:1000-5404(2011)12-1207-04

论著

# 普萘洛尔对条件性恐惧大鼠恐惧记忆保持与海马CA3区神经元形态的影响

田玉娥[1,2,3],刘江杰[1,2],张 燕[1],李 敏[1],张永亮[3] (400038 重庆,第三军医大学护理系心理学教研室[1];830063 乌鲁木齐,武警新疆兵团指挥部医院[2];300162 天津,武警天津医学院病理学教研室[3])

**【摘要】** **目的** 研究不同时间给予普萘洛尔对条件性恐惧大鼠恐惧记忆保持及海马CA3区神经元形态的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠24只,采用声音结合强烈足底电击建立大鼠条件性恐惧模型。大鼠建模成功后分为对照组(不给药,只在相应时间点进行恐惧水平测验)、立即给药组(15 min内给予普萘洛尔)和24 h后给药组(24 h后给予普萘洛尔),每组8只。给药组在建模后前3 d每天恐惧测试前给予普萘洛尔后再检测各组大鼠条件性恐惧记忆水平,于第20天完成恐惧记忆测试后处死大鼠,用高尔基染色法检测大鼠海马神经元形态和数量,电镜观察海马超微结构的变化。**结果** ①条件性恐惧建模后,第1天3组大鼠恐惧水平差异无统计学意义($P>0.05$);第2、3、20天时,两给药组大鼠恐惧水平逐渐降低,且3组大鼠在同一时间点恐惧水平差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),立即给药组恐惧水平最低,对照组恐惧水平最高。建模后第20天,对照组大鼠恐惧水平仍然较高。②建模后第20天,两给药组海马神经元CA3区锥体细胞数量[立即给药组(4.94±2.67)个,24 h后给药组(4.65±1.98)个]均大于对照组[(3.58±2.03)个],其中立即给药组明显大于对照组($P<0.05$)。③电镜显示对照组海马CA3区超微结构出现异常改变,而两给药组超微结构变化不明显。**结论** 条件性恐惧水平与海马结构发生的形态学异常变化有关,而早期应用β受体阻断剂普萘洛尔阻断β受体抑制去甲肾上腺能神经系统活性,可以在一定程度上降低条件性恐惧、减轻海马神经元结构功能损害。

**【关键词】** 条件性恐惧记忆;普萘洛尔;海马;神经元
**【中图法分类号】** R338.26;R338.64;R971.94 **【文献标志码】** A

# Effect of propranolol on retention of fear memory and morphology of neurons in hippocampal CA3 area of rats with conditioned fear

Tian Yu'e[1,2,3], Liu Jiangjie[1,2], Zhang Yan[1], Li Min[1], Zhang Yongliang[3] ([1] Department of Psychology, School of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2] Hospital of Xinjiang Armed Police Corps Command, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830063; [3] Department of Pathology, Tianjin Armed Police Medical College, Tianjin, 300162, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of propranolol on retention of fear memory and morphology of neurons in hippocampal CA3 area of rats with conditioned fear. **Methods** A rat model of conditioned fear was established. Twenty-four male adult SD rats were randomly divided into control group (which received no drug treatment with their fear level measured at the corresponding time points), immediate drug treatment group (which received propranolol treatment 15 min after the model was established), and 24 h drug treatment group (which received propranolol treatment 24 h after the model was established), 8 rats in each group. Conditioned fear memory levels in rats of drug treatment groups were measured daily for 3 d before the model was established and after propranolol was given. The rats were killed on day 20 after measurement of their fear memory levels. Morphology, number and ultra-structure of neurons in hippocampi were observed under a transmission electron microscope. **Results** No significant difference was observed in fear memory levels among the 3 groups 1 d after the model was established. The fear memory levels decreased gradually in two drug treatment groups 2, 3 and 20 d after the model was established and were significantly different among the 3 groups at the same time point ($P<0.05$ or $P<0.01$). The fear memory level was the lowest in immediate drug treatment group and the

**【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,E-mail:limin52267@tmmu.edu.cn

highest in control group, was still rather high 20 d after the model was established, and decreased gradually in two drug treatment groups 2, 3, and 20 d after the model was established. The number of pyramidal cells in hippocampal CA3 area was significantly higher in two drug treatment groups than in control group (4.94 ± 2.67 and 4.65 ± 1.98 *vs* 3.58 ± 2.03, $P < 0.05$). Abnormal changes of ultra-structure were observed in hippocampal CA3 area of control group under a transmission electron microscope after the model was established, but no significant difference was seen between the two drug treatment groups. **Conclusion** Conditioned fear memory level is related with the abnormal morphology of hippocampus. Early use of propranolol, a β-receptor blocker, can inhibit the activity of noradrenergic nervous system, decrease the conditioned fear memory level, and improve the impaired function of neurons in hippocampus.

**[Key words]** conditioned fear memory; propranolol; hippocampus; neurons

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670712) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5014). Corresponding author: Li Min, E-mail: limin52267@tmmu.edu.cn

创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder, PTSD)是应激相关的障碍,主要表现为创伤记忆的闪回、重现和再体验等。海马是应激激素作用的主要靶区,是介导应激反应的重要中枢。目前认为,应激引起的海马神经元萎缩和丢失参与了PTSD的病理生理过程[1]。条件性恐惧模型是研究PTSD常用的动物模型[2],条件性恐惧记忆的形成和再巩固有赖于海马β肾上腺素能受体,条件性恐惧记忆的每一次闪回都是一次应激,都会伴随大量应激激素的释放,加重海马损害[3-6]。

若在创伤后早期应用药物阻断条件性恐惧记忆的形成和再巩固,则有可能从根本上预防PTSD发生。有报道在严重创伤后6 h之内给外伤急诊患者连续服用β肾上腺素能受体阻断剂普萘洛尔(40 mg,4次/d,连续10 d),创伤后几个月患者很少出现PTSD症状[3,7],具体机制不清楚。因此,我们推测普萘洛尔可能是通过抑制海马β肾上腺素能受体功能而降低条件性恐惧记忆的形成和再巩固、抑制创伤性记忆的闪回而发挥对应激所致海马损害的保护作用。因此,本研究拟探讨不同时间给予普萘洛尔对大鼠条件性恐惧水平以及海马CA3区锥体细胞形态学的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和分组

健康成年雄性SD大鼠24只,体质量200~250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。由重庆市实验动物检测中心认证,证书号为SCXK-(军)2007015。大鼠分为3组:条件恐惧对照组(条件性恐惧建立后不给药,只在相应时间点进行恐惧水平测验)、立即给药组(15 min内给予普萘洛尔)和24 h给药组(24 h后给予普萘洛尔),每组8只。动物在进行实验前1周购入,放在专用动物房由专人饲养,在光/暗周期为12/12 h(光照时间7:00-19:00)的条件下每只大鼠单独饲养于铁丝笼中,自由觅食和饮水。动物房安装有相应的设备以保持适宜的温度(24 ℃)、湿度(60%)。先让大鼠在动物饲养室内适应1周,期间实验者每天抚摸动物5 min以使动物适应。

### 1.2 模型制备

采用声音信号(4.5 kHz,80 dB,30 s)提示的不可逃避的足底电击(45 V,10 s)配对呈现10次使大鼠产生条件性恐惧,2次间隔1~4 min。电刺激结束后动物继续在该箱中停留4 min然后放回日常饲养笼。每只大鼠实验结束后均及时清理其排泄物,并用90%酒精擦拭电击箱。参照文献[3]选择药物剂量及给药方法略作改进:普萘洛尔片剂(天津力生制药股份有限公司,又名心得安,5 mg/片),研磨成粉,溶于双蒸水中,配制成0.2 mg/ml的灌胃液。两组给药大鼠分别在条件性恐惧建立后15 min、24 h给予普萘洛尔2 mg/kg灌胃,容积为10 ml/kg。对照组给予相应体积的双蒸水灌胃。给药组在建模后前3 d每次恐惧测试前均给予普萘洛尔2 mg/kg灌胃。恐惧记忆测试:在建模后第1、2、3、20天将各组大鼠置于条件性恐惧箱中,仅给予5次建模时同样的声音信号,2次间隔30 s,记录大鼠3 min内僵立的时间百分比。

### 1.3 取材

在建模后第20天恐惧记忆测试完毕,将大鼠予戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)深麻醉,迅速开胸经左心室至升主动脉插管(右心耳切开),快速灌注200 ml左右生理盐水冲洗血液,随后用4%多聚甲醛200 ml灌流固定,取出大脑,沿矢状缝分离左右大脑。

### 1.4 海马CA3区锥体细胞形态和数量观察

取材同1.3,将右侧大脑置于4%多聚甲醛液于4 ℃冰箱中后固定48 h,以矢状缝为界,旁开1 mm为基面,修成5 mm厚的组织块。采用高尔基(Golgi)染色法,具体步骤为:自来水冲洗20 min后置于37 ℃温箱内用3%重铬酸钾溶液媒染3 d,每天换液1次;取出后用蒸馏水洗1 min,置于37 ℃温箱内用

1.5% 的硝酸银溶液浸染 3 d，每天换液 1 次；取出后蒸馏水洗 7 min，制作矢状面的石蜡切片，片厚 25 μm；经二甲苯脱蜡后，直接封片观察。每一样本选取 6 张切片，光镜下（40 × 10 倍）对海马 CA3 区锥体细胞进行计数，图像处理利用 Olympus 显微镜、电脑和图像分析软件进行图像采集和处理，计数每个视野神经元数量，每只大鼠测 6 个视野，取平均值统计。

### 1.5 海马 CA3 区锥体细胞超微结构的观察

取材同 1.3，将左侧大脑快速剥离海马组织，取海马 CA3 区脑组织，将其切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的薄片，2.5% 戊二醛溶液 4 ℃ 固定 2 h，用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次，10 min/次，1% 锇酸后固定 2 h，梯度酒精脱水，入丙酮-环氧树脂（体积比为 1∶1）中包埋 3 ~ 4 h，再行超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅双染后，在 TEM22000EX 型透射电镜 60 kV 下观察并摄像。

### 1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件行单因素方差分析（配对 $t$ 检验），并将结果进行 Pearson 相关分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠条件性恐惧水平测试

条件性恐惧建立后第 1 天，3 组大鼠恐惧水平无显著差异（$P > 0.05$）；建模后第 2、3、20 天时，两给药组大鼠恐惧水平逐渐降低，且 3 组大鼠在同一时间点恐惧水平相差显著，立即给药组恐惧水平最低，对照组恐惧水平最高。第 20 天，对照组恐惧水平仍然较高。见表 1。

### 2.2 大鼠海马 CA3 区锥体细胞计数的测量

高尔基染色显示：大鼠条件性恐惧建立后，两给药组海马神经元 CA3 区锥体细胞数量[立即给药组（4.94 ± 2.67）个，24 h 后给药组（4.65 ± 1.98）个] 均大于对照组（3.58 ± 2.03）个，对照组大鼠神经元数量较少、树突分支较少、树突长度较短，密度低。两给药组大鼠海马神经元较多、树突分支丰富、树突较长，密度高；比较条件性恐惧后第 20 天时大鼠海马 CA3 区锥体细胞可见：两给药组锥体细胞数量高于对照组，并且立即给药组显著高于对照组（$P < 0.05$）。进一步分析显示，建模后第 20 天大鼠条件性恐惧水平与其海马 CA3 区锥体细胞数存在显著负相关（$r = -0.78$，$P < 0.05$）。见图 1。

**表 1 各组大鼠不同时间条件恐惧记忆保持率（%，$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）**

| | 1 d | 2 d | 3 d | 20 d |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 63.06 ± 27.57 | 82.25 ± 9.38 | 74.80 ± 18.89 | 46.76 ± 10.01 |
| 立即给药组 | 50.81 ± 23.62 | 27.75 ± 19.10$^{bc}$ | 12.32 ± 11.46$^{bc}$ | 12.15 ± 10.32$^{bc}$ |
| 24 h 后给药组 | 73.92 ± 23.31 | 51.30 ± 35.15$^{a}$ | 41.72 ± 37.45$^{a}$ | 20.13 ± 18.69$^{a}$ |

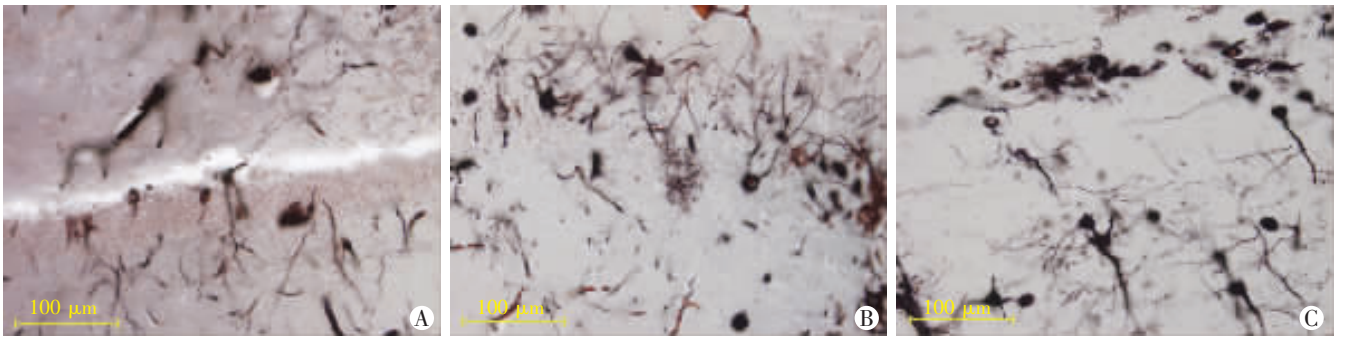
a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较；c：$P < 0.05$，与 24 h 后给药组比较

### 2.3 海马 CA3 区锥体细胞及其突触超微结构的变化

透射电镜下，对照组大鼠海马内可见到部分神经元细胞核肿胀、染色质浓缩边集，线粒体肿胀及空泡变，内质网脱颗粒，高尔基体扩张，并且可见突触前膜囊泡较多、突触后膜囊泡较少、突触间隙窄、突触间隙不清楚、有突触断裂现象。两给药组海马神经元细胞核与细胞器形态接近正常，核膜光滑，均匀一致，线粒体、核糖体均多，并且突触囊泡多、后膜增厚、突触后膜致密物质多（图 2）。

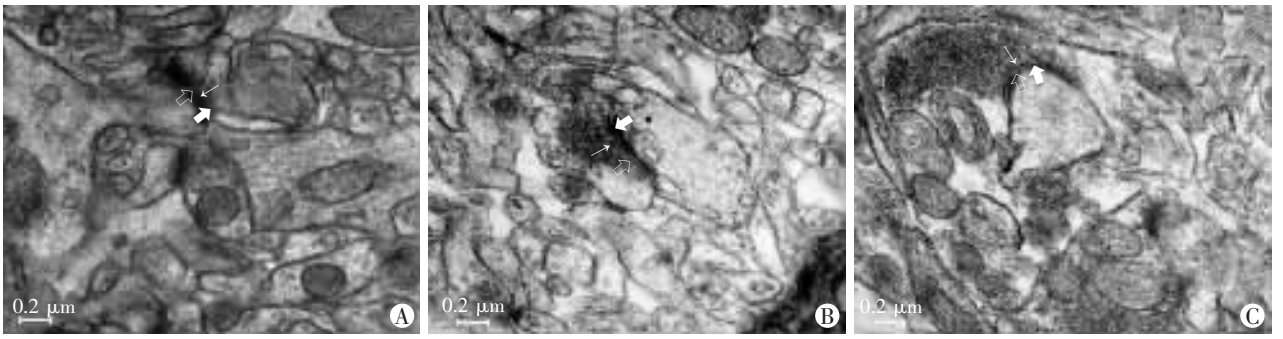
## 3 讨论

PTSD 的核心是创伤性记忆的形成和反复重现。目前认为记忆的形成要经过两个阶段，首先在海马形成短时记忆（这个阶段持续不到 1 h）。短时记忆不需要合成新的记忆相关蛋白。第 2 个阶段是由短时记忆转化为长期记忆的过程，持续的时间较长，并需要合成一些新的记忆相关蛋白。突触长时程增强（long-term potentiation，LTP）被认为是学习记忆的分子基础。海马含有丰富的 β 肾上腺素能受体，大鼠海马区微注射异丙肾上腺素（β 肾上腺素能受体激动剂）可促进其 LTP 形成，说明海马 β 受体在长时程记忆形成中具有重要




A：对照组；B：立即给药组；C：24 h 后给药组

**图 1 高尔基染色观察各组大鼠海马 CA3 区锥体细胞形态**




↑：突触前膜；⇧：突触后膜；⬆：突触后致密物质

A：对照组；B：立即给药组；C：24 h后给药组

**图2 各组海马CA3区锥体细胞及其突触超微结构观察**

作用[6-10]。严重创伤应激后去甲肾上腺素大量释放，通过海马β受体促进创伤性记忆的形成。而创伤性记忆的每一次重现也都是一次强烈的情绪应激，都会引起去甲肾上腺素的再次大量释放，促进创伤性记忆的再巩固。因此，对于普萘洛尔组，本实验采用条件性恐惧建立后前3 d每次恐惧测试前均给予普萘洛尔的方法，以便抑制条件性恐惧记忆的再巩固，促进恐惧消退。

有研究[7-9]表明，在经历了战争的退伍军人PTSD患者中，24 h尿中的肾上腺素分泌与闯入性记忆呈正相关。应激后大鼠血浆肾上腺皮质酮、NE水平及全脑组织中NE水平在30 min内显著增高。大鼠条件恐惧建模后过早进行消退训练反而促进恐惧记忆的固着[10-11]。本研究观察到：条件性恐惧建立后第2、3、20天，立即给药组恐惧水平最低，而对照组恐惧水平最高。条件性恐惧对照组大鼠海马CA3区超微结构也发生病理性改变（细胞数量减少、线粒体肿胀及空泡变等），而系统性给予普萘洛尔则在一定程度上减轻了海马CA3区超微结构的病理性改变，而且建模后第20天大鼠条件性恐惧水平与其海马CA3区神经元细胞数存在显著负相关，进一步说明大鼠条件性恐惧水平与海马结构与功能的损害密切相关，减轻海马结构与功能损害则降低条件性恐惧水平。条件恐惧建立后立即或24 h后给予普萘洛尔阻断β受体，则大鼠恐惧水平及海马神经元的超微结构损害改变均有明显改善，并且越早给药保护效果越好。

综上所述，大鼠条件恐惧建立后给予普萘洛尔阻断β受体，不仅可以降低条件性恐惧水平，而且对应激所致的海马损害有保护作用，越早使用保护效果越好。

## 参考文献：

[1] Kitayama N, Vaccarino V, Kutner M, *et al*. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis[J]. J Affect Disord, 2005, 88(1): 79-86.

[2] 韦美，李敏，李培培，等. 条件性恐惧消退早期大鼠边缘下区NR2B的动态变化[J]. 第三军医大学学报，2010，32(3)：220-223.

[3] Hurlemann R, Walter H, Rehme A K, *et al*. Human amygdala reactivity is diminished by the β-noradrenergic antagonist propranolol[J]. Psychol Med, 2010, 40(11): 1839-1848.

[4] Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D, *et al*. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction[J]. Biol Psychiatry, 2009, 65(10): 887-892.

[5] Brunet A, Orr S P, Tremblay J, *et al*. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder[J]. J Psychiatr Res, 2008, 42(6): 503-506.

[6] Muravieva E V, Alberini C M. Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories[J]. Learn Mem, 2010, 17(6): 306-313.

[7] O'Donnell T, Hegadoren K M, Coupland N C. Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder[J]. Neuropsychobiology, 2004, 50(4): 273-283.

[8] 季今朝，张雪寒，李葆明. 大鼠海马CA1区β受体参与长时程增强和空间学习[J]. 中国科学：C辑，2003，33(4)：354-361.

[9] 郑刚，陈耀明，张雪平，等. 急性恐惧应激对大鼠行为、激素水平及脑Erk1/2活化表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志，2007，23(3)：270-274.

[10] Adamec R, Muir C, Grimes M, *et al*. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress[J]. Behav Brain Res, 2007, 179(2): 192-207.

[11] 李培培，李敏，张丽丽，等. 条件性恐惧消退保持早期边缘下区细胞周期素依赖性蛋白激酶5的动态变化[J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2010，19(3)：228-230.

（收稿：2011-01-06 修回：2011-02-28）

（编辑 王小宴）