文章编号:1000-5404(2011)09-0951-03

论著

D-环丝氨酸促进大鼠条件性恐惧消退记忆的长期保持

张 钰,李 敏 (400038 重庆,第三军医大学护理系心理学教研室)

【摘要】 **目的** 研究D-环丝氨酸(D-serine,DCS)对条件性恐惧消退记忆的长时保持的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠40只,采用完全随机方法分为空白对照组、消退对照组、消退训练组、消退训练前DCS干预组、消退训练后DCS干预组,每组8只。在消退训练后3 d时进行僵立行为测试与旷场行为测试。**结果** ①消退训练组的僵立时间百分比[(39.77±22.69)%]显著低于消退对照组[(61.46±11.10)%](*P*<0.05),但仍高于空白对照组[(2.82±1.27)%](*P*<0.01);旷场测试中消退训练组的中央路程百分比及直立次数[(2.82±2.89)%,(7±4)]显著高于消退对照组[(0.50±0.84)%,(3±4)],但低于空白对照组[(19.29±6.08)%,(20±6)](*P*<0.05);②消退训练后DCS干预组的僵立时间百分比与旷场行为测试成绩与其他组比较均有统计学差异(*P*<0.05)。**结论** 消退训练后给予D-环丝氨酸能够促进条件化恐惧消退记忆的长时保持。

【关键词】 条件性恐惧;恐惧消退;D-环丝氨酸;NMDA受体
【中图法分类号】 R749.05;R749.5;R977.4 【文献标志码】 A

Promotion effect of D-cycloserine on long-term retention of rat extinction memory of conditioned fear

Zhang Yu, Li Min (Department of Psychology, School of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the influence of D-cycloserine (DCS) on the long-term retention of rat extinction memory of conditioned fear. **Methods** Forty healthy male adult SD rats were randomly divided into five groups ($n=8$): a blank control group, an extinction control group, an extinction training group, a group with DCS treatment before extinction training, and a group with DCS treatment after extinction training. Following fear conditioning, which includes auditory conditioned stimulus (CS) paired with foot-shock unconditioned stimulus (US), rats received non-reinforced exposure to CS for extinction training. CS-elicited freezing test for fear assessment and open-field test were conducted 3 d after extinction training. **Results** The percentage of freezing time of the extinction training group [(39.77±22.69)%] was significantly lower than that of the extinction control group [(61.46±11.10)%] ($P<0.05$), but significantly higher than that of the blank control group [(2.82±1.27)%] ($P<0.01$). The percentage of central distance and standing frequency of the extinction training group [(2.82±2.89)% and 7±4] in the open-field test were both significantly higher than those of the extinction control group [(0.50±0.84)% and 3±4], but lower than those of the blank control group [(19.29±6.08)% and 20±6] ($P<0.05$). The percentage of freezing time and open-field test score of the group with DCS treatment after extinction training were significantly different from those of other four groups ($P<0.05$). **Conclusion** DCS administration after extinction training promotes long-term retention of extinction memory of conditioned fear.

【**Key words**】 D-cycloserine; extinction memory; conditioned fear; N-methyl-D-aspartate

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

【基金项目】 国家自然科学基金(30670712);重庆市自然科学基金(CSTC 2009BB5014)
【通信作者】 李 敏,电话:(023)68752267,E-mail:lmxl@mail.tmmu.com.cn

创伤后应激障碍(posttraumatic stress disorder,PTSD)是由于个体经历对生命具有威胁性的事件或严重的创伤(地震、洪水、恐怖袭击等),导致的延迟出现

并长期持续的心理障碍。暴露疗法是治疗 PTSD 常用的心理治疗方法[1]。然而在临床治疗中,30%～40%的患者暴露治疗效果不好。巴甫洛夫恐惧条件反射一直是研究创伤后应激障碍的一种最重要的动物模型[2],PTSD 的暴露疗法是基于条件性恐惧的消退原理[3]。研究认为条件性恐惧消退记忆的长期保持障碍是 PTSD 治疗困难的关键。研究表明,N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体参与记忆的巩固过程[4-5],作为 NMDA 受体的部分激动剂,D-环丝氨酸(D-serine,DCS)能够促进条件性恐惧记忆的消退[5-7]。以往研究主要观察了 D-环丝氨酸对大鼠条件性恐惧消退训练后早期(24 h)消退记忆保持的影响[6-8],但对条件性恐惧消退记忆的长期保持的影响仍不完全清楚。本研究探讨 DCS 对条件性恐惧消退记忆长期保持的影响,旨在为临床防治 PTSD、焦虑症等情绪相关疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 180～220 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。采用完全随机方法分为空白对照组、消退对照组、消退训练组、消退训练前 DCS 干预组、消退训练后 DCS 干预组,每组 8 只。动物房内光/暗周期为 12 h/12 h,温度(22±2) ℃,湿度 60%,饲料饮水供应充足。适应 1 周后开始实验。

1.2 主要试剂

DCS(Sigma 公司),实验前将 DCS 溶于 0.9% 的生理盐水(15 mg/ml),腹腔注射量为 1 ml/kg[6],每只动物 200 g 注射 0.20 ml。

1.3 主要实验器材

条件恐惧箱与旷场购自上海移数信息科技有限公司。条件恐惧箱箱壁由灰色不透明有机玻璃制成(24 cm×24 cm×30 cm),底部为直径 0.5 cm 的铜棒,铜棒间隔 1.5 cm,铜棒与电击发生器相连。旷场包括一个空旷的方形明场,围以四壁(50 cm×50 cm×40 cm),由白色不透明材料制成,底面为黑色。条件恐惧箱与旷场上方均安置红外线摄像头,通过与之相连的电脑记录实验录像。

1.4 实验方法

1.4.1 各组实验操作　空白对照组大鼠在连续 3 d 适应训练后直接进行测试;消退对照组在 3 d 适应训练后进行条件性恐惧建模与测试;消退训练组依次进行连续 3 d 适应、条件性恐惧建模、条件性恐惧消退建模与测试;消退训练前 DCS 干预组与消退训练后 DCS 干预组分别于条件性恐惧消退建模前、后 10 min 内对大鼠进行腹腔注射 DCS,其余操作同消退训练组。

1.4.2 动物模型制备　实验前连续 3 d 每天将大鼠放入条件恐惧箱内 10 min。①条件性恐惧建模:将大鼠放入条件恐惧箱内适应 2 min,然后给予 9 次声音信号(4.5 kHz, 80 db, 10 s),2 次声音间隔时间为 2 min,从第 4 次声音信号开始与不可逃避的足底电击(0.8 mA,5 s)配对呈现,配对连续呈现 6 次。大鼠出现僵立行为(表现为只有呼吸、四肢僵立)即为条件性恐惧建立,共需 19.5 min。②条件性恐惧的消退建模:在条件性恐惧建立 24 h 后,将已建立条件性恐惧的大鼠再次放入实验箱,适应 2 min 后给予与条件性恐惧建立时相同的声音信号(不给予足底电击),声音信号连续呈现 30 次,2 次声音间隔 1 min,共需 36 min。

1.4.3 测试

1.4.3.1 僵立行为测试　消退训练 3 d 后,将大鼠置于实验箱中,2 min 后给予与条件性恐惧建立时相同的声音信号,连续呈现 10 次,2 次声音间隔 10 s,共需 5.2 min。记录大鼠在5 min 内的僵立时间,以僵立时间占总时间的百分比作为对大鼠恐惧水平测量的指标,百分比越小,恐惧水平越低,消退保持成绩越好。每次实验结束后及时清理大鼠在实验箱中的排泄物,并用 95% 酒精擦拭实验箱,以避免残留气味对后续实验大鼠的影响。

1.4.3.2 旷场行为测试　僵立行为测试后立即将大鼠轻柔放入旷场中央,启动记录系统,记录大鼠进入旷场后 5 min 内的行为表现。每实验完 1 只大鼠,用 75% 酒精清除实验区域内大鼠粪便、尿液,彻底去除遗留气味,再进行下 1 只大鼠实验。数据分析利用鼠博士动物行为分析系统(上海移数信息科技有限公司开发)。旷场行为测试采集大鼠在旷场内的水平活动总距离、中央区域活动距离与直立次数。大鼠两前爪同时腾空或攀附 4 壁作为 1 次直立,直立次数由实验者根据录像分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 消退训练对条件性恐惧大鼠行为的影响

与空白对照组[(2.82±1.27)%]相比,消退对照组[(61.46±11.10)%]和消退训练组[(39.77±22.69)%]的僵立时间百分比均显著增加($P<0.01$),且消退训练组显著低于消退对照组($P<0.05$);消退对照组的旷场测试总路程与空白对照组相比无显著差异,消退对照组与消退训练组的旷场中央路程百分比及直立次数与空白对照组相比显著减少,且消退训练组显著高于消退对照组($P<0.05$)。见表 1。

表 1　空白对照组、消退对照组与消退训练组的旷场测试成绩($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	总路程(cm)	中央路程百分比(%)	直立次数
空白对照组	790.27±314.33	19.29±6.08	20±6
消退对照组	506.76±401.23	0.50±0.84[a]	3±4[a]
消退训练组	1 146.76±714.00[b]	2.82±2.89[ab]	7±4[a]

a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与消退对照组比较

2.2 DCS 对条件性恐惧消退训练大鼠行为的影响

消退训练前 DCS 干预组大鼠的僵立时间百分比[(37.57±16.53)%]与消退训练组间无显著差异,消退训练后 DCS 干预组的僵立时间百分比[(18.47±6.38)%]显著低于消退训练组($P<0.05$)。旷场行为测试中,消退训练组、消退训练前 DCS

干预组与消退训练后DCS干预组的总路程无显著差异($P>0.05$)；消退训练前DCS干预组的中央路程百分比及直立次数与消退训练组相比均无显著差异($P>0.05$)；消退训练后DCS干预组的中央路程百分比与直立次数均显著高于消退训练组($P<0.05$，表2)。

表2 DCS对条件性恐惧消退训练大鼠旷场行为的影响($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

组别	总路程(cm)	中央路程百分比(%)	直立次数
消退训练组	1 146.76±714.00	2.82±2.89	7±4
消退训练前DCS干预组	1 172.98±294.98	2.67±1.79	10±5
消退训练后DCS干预组	526.35±390.26	6.84±2.66[a]	14±3[a]

a：$P<0.05$，与消退训练组比较

3 讨论

PTSD是个体经历严重应激后形成的一种焦虑相关障碍，对其治疗的关键是消退由创伤应激导致的条件性恐惧记忆。而临床治疗中一部分PTSD患者表现出消退困难。应用暴露疗法对PTSD的治疗过程即为对已建立的条件性恐惧记忆的消退过程，而消退又是一个主动的、新的抑制性学习过程[9-10]。因此，研究促进条件性恐惧消退及消退长期保持的方法对提高PTSD的治疗效果具有十分重要的意义。

本研究中消退训练组大鼠在消退训练后3 d时的僵立时间百分比虽显著低于消退对照组，但仍显著高于空白对照组，表明即使给予消退训练，消退训练后3 d时大鼠的条件性恐惧仍维持在较高水平。提示条件性恐惧建立后，单纯给予行为训练来消退已建立的恐惧反应，其消退的效果不佳。故需辅以必要的措施来增强消退训练的效果。

Lin等[11]在消退训练前向条件性恐惧大鼠腹腔注射DCS，发现DCS注射组大鼠消退训练后24 h时的消退记忆好于对照组。提示DCS可能促进条件性恐惧消退记忆的形成过程。本研究中消退训练前对条件性恐惧大鼠腹腔注射DCS，消退训练后3 d时大鼠的僵立时间百分比与消退训练组比较则无显著差异，由此可以看出，促进条件性恐惧消退记忆的形成并不能增加其长期保持效果；而消退训练后给予DCS，条件性恐惧消退大鼠在消退训练后3 d时的僵立时间百分比则显著低于消退训练组($P<0.05$)，表明DCS能够促进条件性恐惧消退记忆的巩固过程。这与Liu等[4]的研究结果相似。

DCS作为NMDA受体的部分激动剂，促进消退记忆巩固的机制可能与NMDA受体活性的增强有关。研究发现，NMDAR-AC-PKA-cAMP-pCREB-BDNF途径能够促进条件性恐惧消退记忆的长期保持。研究[5,12]报道DCS可通过增强NMDA受体的活性而增加ERK1/2的磷酸化，从而促进条件性恐惧消退记忆的保持。

旷场实验可了解大鼠在新环境中的探究行为和紧张程度，其总路程、中央活动路程百分比及直立次数则反映大鼠的运动性及紧张程度等[13]。本研究中，消退对照组与空白对照组之间总路程无显著差异，消退训练前DCS干预组与消退训练后DCS干预组的总路程与消退训练组相比均无显著差异($P>0.05$)，表明实验建模未对大鼠的运动性造成影响；消退对照组与消退训练组的中央路程百分比及直立次数与空白对照组相比显著减少($P<0.05$)，表明实验建模后大鼠的紧张程度升高，由此可以看出大鼠的僵立行为是由实验建模导致恐惧情绪引起的。

本研究DCS仅用了一种剂量，不同剂量的DCS对条件性恐惧消退记忆的长期保持效果的影响仍需要进一步研究。

参考文献：

[1] Bradley R, Greene J, Russ E, *et al*. A multidimensional meta-analysis of psychotherapy for PTSD[J]. Am J Psychiatry, 2005, 162(2): 214-227.
[2] Charney D S. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress[J]. Am J Psychiatry, 2004, 161(2): 195-216.
[3] Rothbaum B O, Davis M. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1008: 112-121.
[4] Liu J L, Li M, Dang X R, *et al*. A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model[J]. PLoS ONE, 2009, 4(10): e7548.
[5] Matsuda S, Matsuzawa D, Nakazawa K, *et al*. D-serine enhances extinction of auditory cued fear conditioning *via* ERK1/2 phosphorylation in mice[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34(6): 895-902.
[6] McCallum J, Kim J H, Richardson R. Impaired extinction retention in adolescent rats: effects of D-cycloserine[J]. Neuropsychopharmacology, 2010, 35(10): 2134-2142.
[7] Vervliet B. Learning and memory in conditioned fear extinction: effects of D-cycloserine[J]. Acta Psychol (Amst), 2008, 127(3): 601-613.
[8] 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.
[9] Quirk G J, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval[J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(1): 56-72.
[10] Sotres-Bayon F, Quirk G J. Prefrontal control of fear: more than just extinction[J]. Curr Opin Neurobiol, 2010, 20(2): 231-235.
[11] Lin H C, Mao S C, Su C L, *et al*. Alterations of excitatory transmission in the lateral amygdala during expression and extinction of fear memory[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2010, 13(3): 335-345.
[12] Monfils M H, Cowansage K K, LeDoux J E. Brain-derived neurotrophic factor: linking fear learning to memory consolidation[J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(2): 235-237.
[13] 林晓春，李云鹏，卞艳芳，等. 大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J]. 毒理学杂志，2010，24(3)：224-225.

(收稿：2010-12-27 修回：2011-02-21)
(编辑 邓强庭)