文章编号:1000-5404(2012)03-0271-03

短篇论著

条件恐惧刺激对大鼠杏仁核区神经细胞增殖的影响

蒋丽珠[1],刘 晨[2],陈 旦[2],王 慧[2],黄菊芳[2] (671000 云南 大理,大理学院临床医学院神经精神教研室[1];410013 长沙,中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系[2])

[摘要] **目的** 探讨条件恐惧性刺激对大鼠杏仁核区神经细胞增殖的影响,分析杏仁核区新生神经细胞与恐惧记忆的关系。**方法** 72 只实验大鼠按随机数字表法分成条件恐惧刺激组和对照组,每组 36 只,条件恐惧刺激前 3 d 动物腹腔内注射 BrdU 标记新生神经细胞,条件恐惧刺激组大鼠采用单调声配对足底电击造成条件恐惧刺激模型,对照组大鼠仅给予单调声刺激。条件恐惧刺激后 1、7、14、21、30、60 d 行动物行为学检测,后处死动物行 BrdU 的免疫组织化学染色。**结果** 条件恐惧刺激后各时间点条件恐惧刺激组大鼠静止不动时间均明显高于相应时间点的对照组($P<0.01$),且条件恐惧刺激组动物杏仁核区 BrdU 免疫阳性细胞数明显少于同时间点的对照组($P<0.05$)。**结论** 条件恐惧刺激对大鼠杏仁核区新生神经细胞增殖产生负向影响,这可能与大鼠恐惧记忆的长期保持有关。

[关键词] 条件恐惧性刺激;新生神经细胞;杏仁核;大鼠
[中图法分类号] R322.81; R329.28; R338.6 [文献标志码] A

恐惧是一种在动物进化过程中保存下来的基本情感,它可以使动物在面临威胁时激发一系列防御反应并生存下来。而病理性恐惧的习得及恐惧的延迟或不能消退在人类的创伤后应激障碍、焦虑和恐怖症中发挥着重要作用。大量研究表明应激可使海马齿状回新生神经细胞增殖减少[1-2]。杏仁核为脑内参与恐惧学习、记忆的主要核团,特别是外侧杏仁核(lateral amygdala,LA),为条件恐惧记忆储存的可塑性位点,恐惧记忆的形成伴随着杏仁核的背外侧核可塑性的改变[3],LA 及其邻近区域的损害或功能可逆失活可阻止大鼠恐惧记忆的获得和先前所获得的恐惧记忆的表达[4]。但关于条件恐惧刺激对杏仁核区新生神经细胞的影响仍未知,本实验采用条件恐惧刺激动物模型,结合行为学、免疫组织化学方法观察条件恐惧刺激后大鼠的静止不动时间及其杏仁核区新生神经细胞数目的变化,以期探讨恐惧记忆得以保持的神经生物学机制,为缓解恐惧刺激导致的精神障碍的治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

72 只成年健康雄性 SD 大鼠(体质量 200~250 g),购自湖南农业大学实验动物学部,按随机数字表法分为条件恐惧刺激组和对照组,每组 36 只,每个时间点 6 只。动物自由进食及饮水,在进行实验前先予动物适应 6 d,在这期间实验者每天抚摸大鼠 5 min 以使之适应。所有的行为学检测在 8:30-10:30 间进行。

1.2 条件恐惧模型的制备

大鼠腹腔注射 BrdU(200 mg/kg,每 12 小时 1 次,共注射 2 次)标记增殖的神经干细胞,3 d 后动物放入自制的条件恐惧刺激箱内,条件恐惧刺激箱规格为 15 cm 宽×15 cm 长×50 cm 高,四壁由木板做成,其"地板部分"由平行的不锈钢柱(直径 5 mm,相邻 2 个不锈钢柱的圆心之间的距离为 1 cm)组成,这些不锈钢柱通过一电阻与 220 V 电源相连,保证电流为 0.75 mA;并有一手控装置,能随时中断或接通电源。在条件恐惧刺激箱其中一个角的上部装一个扬声器可产生 2 000 Hz 的单调音。大鼠给予 0.75 mA 的电流通过 5 s,通电前及通电过程中给予持续 10 s 2 000 Hz 的单调声刺激;这一配对刺激间隔 90 s 给予 1 次,每天给予 30 min 的刺激,连续 2 d。对照组动物放入条件恐惧刺激箱内不予电击,但仍给予单调声刺激。所有动物在放入条件恐惧刺激箱后给予条件恐惧刺激前观察 1 min 内的静止不动时间,以求其静止不动时间的基线。

1.3 动物恐惧记忆行为学观察

动物在完成以上刺激后的 1、7、14、21、30、60 d 进行以下实验:动物放回条件恐惧刺激箱内,不予通电,仍给予单调声刺激,8 min 内观察动物静止不动的时间。

1.4 组织制备

动物表现出恐惧记忆的行为学反应后,在麻醉状况下用 4% 多聚甲醛经左心室灌注固定,取脑并将脑组织置于相同固定液中后固定,4 ℃冰箱过夜,用梯度蔗糖浸泡沉底,-20 ℃三顿恒低温切片机切片,片厚 40 μm。留取含杏仁核区的脑组织切片备用。

1.5 免疫组织化学染色

每只动物脑组织从距前囟 -3.48~-1.92 mm,取 6 张杏仁核区结构完整的脑片每隔 6 张选取 1 张切片,以保证所观察的部位大体接近,用于 BrdU 免疫组织化学染色。取脑组织冰冻切片用 0.01 mol/L PBS 缓冲液清洗后,置于 95 ℃的枸橼酸钠溶液中 30 min(pH 值 6.0),清洗后,再置于 2 mol/L 盐酸中 30 min(为使核变性),清洗后用 3% 双氧水溶液中处理15 min,以去除内源性过氧化物酶,用 5% 的 BSA 室温下封闭1 h,按 ABC 法行免疫组织化学染色。一抗为小鼠抗 BrdU 单克隆抗体

[基金项目] 国家自然科学基金(30860089)
[通信作者] 黄菊芳,E-mail:Huangjufang@yahoo.com.cn

(Sigma,1∶1 000),4 ℃冰箱过夜,二抗为生物素化兔抗小鼠IgG(Sigma,1∶200)37 ℃孵育2 h,ABC复合物(Vector,1∶200)37 ℃孵育1 h,0.05%的氯化镍加强染色,在0.05% DAB(Sigma)和0.03% H_2O_2反应液中显色。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.6 数据收集和处理

每张切片采用Nikon Coolpix950数码相机在Motic显微镜10倍物镜下定位杏仁核,20倍物镜下摄片,双盲记数左右两侧整个杏仁核区BrdU阳性细胞数,并以6张切片内BrdU阳性细胞总数乘以6代表每只大鼠杏仁核区BrdU阳性细胞数值。数据通过SPSS10.0统计软件对各组间均数进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 条件恐惧刺激对大鼠僵立行为的影响

行为学结果显示条件恐惧刺激前条件恐惧刺激组和对照组大鼠在条件恐惧刺激箱内的基线静止不动时间分别为(2.14±1.92)、(4.25±2.95)s,差异无统计学意义($P>0.05$);条件恐惧刺激组和对照组大鼠在条件恐惧刺激后重新置入条件恐惧刺激箱中仅给予单调声刺激,条件恐惧刺激组大鼠表现为明显的僵立行为,各时间点条件恐惧刺激组大鼠静止不动时间均显著长于同时间点的对照组($P<0.01$)。见表1。

2.2 条件恐惧刺激对大鼠杏仁核区新生神经细胞增殖的影响

BrdU的免疫组织化学结果显示BrdU阳性细胞分布于杏仁核区的外侧核、基底核、内侧核、皮质,BrdU免疫染色表达于细胞核,呈点状(图1)。条件恐惧刺激刺后1 d,条件恐惧刺激组大鼠杏仁核区的BrdU阳性细胞数少于同时间点的对照组($P<0.05$),7、14、21、30、60 d条件恐惧刺激组的BrdU阳性细胞数与1 d类似:均少于同时间点的对照组($P<0.05$)。条件恐惧刺激组、对照组BrdU阳性细胞数都在条件恐惧刺激后7 d达峰值,后随着存活时间的延长两组动物杏仁核区BrdU阳性细胞呈进行性减少。见表2,图1。

表1 2组大鼠条件恐惧刺激后静止不动时间的变化(s, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

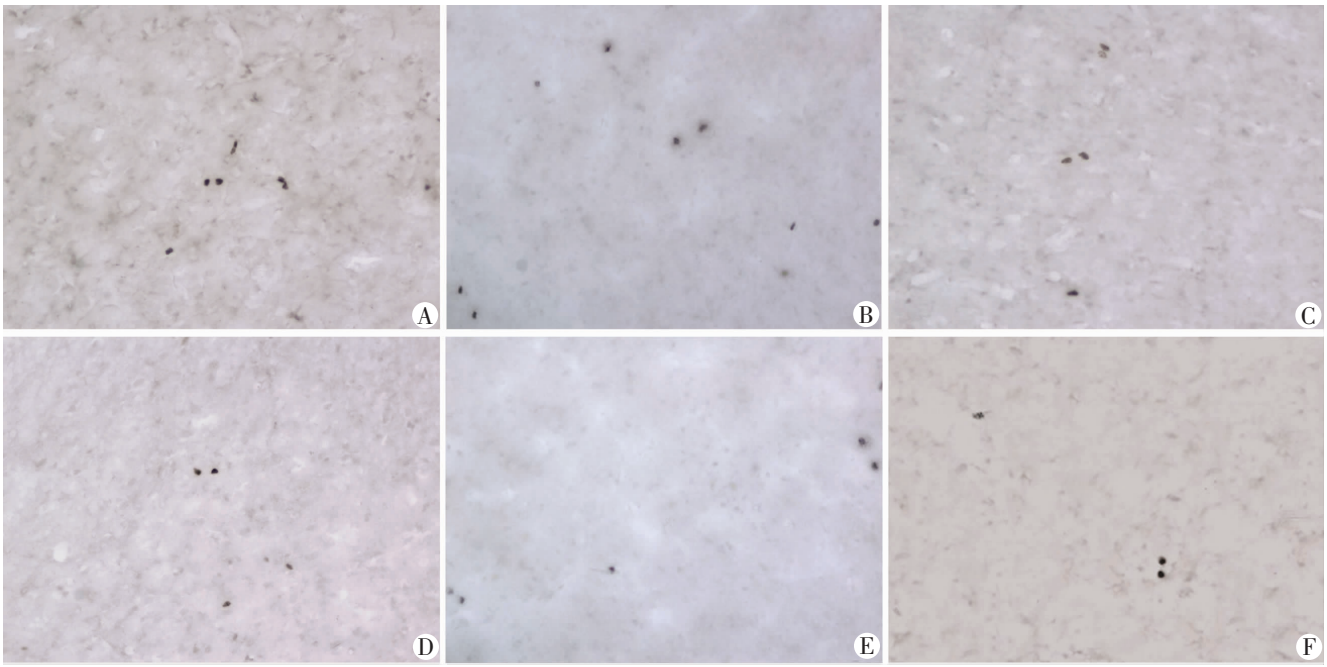
组别	1 d	7 d	14 d	21 d	30 d	60 d
对照组	48.33±10.74	63.00±9.85	55.00±7.37	51.67±8.95	88.33±16.87	47.33±6.61
条件恐惧刺激组	455.00±6.35[a]	443.00±7.23[a]	445.00±10.15[a]	409.33±20.61[a]	458.33±7.17[a]	275.67±9.70[a]

a: $P<0.01$,与同时间点的对照组比较

表2 条件恐惧刺激后2组大鼠杏仁核区BrdU阳性细胞数($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	30 d	60 d
对照组	1 904.00±81.68	2 608.00±110.49	2 288.00±100.24	1 296.00±62.35	708.00±84.29	402.00±58.89
条件恐惧刺激组	696.00±52.31[a]	1 356.00±119.84[a]	930.00±98.22[a]	352.00±72.77[a]	246.00±24.25[a]	216.00±13.86[a]

a: $P<0.05$,与同时间点的对照组比较



A~C:1、7、14 d对照组;D~F:1、7、14 d条件恐惧刺激组

图1 条件恐惧刺激后大鼠杏仁核区BrdU免疫组织化学染色 (×200)

3 讨论

BrdU为胸腺嘧啶脱氧核苷的类似物,在细胞周期的S期DNA合成时可整合到细胞核中,为常用的新生神经细胞标记物。在成年哺乳动物脑内能持续产生具有功能新神经元的神经干细胞主要位于沿着侧脑室分布的室管膜下区和海马的齿状回,近来研究发现杏仁核、皮质也有新生神经细胞[5]。室管膜下区的神经干细胞通过分裂增殖后沿着嘴侧迁移流迁移到嗅球分化为嗅球的颗粒细胞与小球周细胞,与嗅觉的辨别和嗅觉的记忆研有关[6-7];齿状回的神经干细胞通过增殖、迁移后,分化为齿状回的颗粒细胞,参与动物情绪行为的调节,与依赖海马的学习记忆有关[8]。但关于杏仁核区新神经细胞的功能尚不清楚。

本实验行为学检测结果显示条件恐惧刺激后1 d条件恐惧刺激组大鼠静止不动时间显著高于同时间点的对照组($P<0.01$),7、14、21、30 d条件恐惧刺激组大鼠静止不动时间类似1 d,这说明条件恐惧刺激组大鼠成功地对声音和足底配对刺激形成了条件反射联系,记住了足底电击这一恐惧事件。BrdU免疫组织化学结果显示条件恐惧刺激组、对照组大鼠杏仁核区BrdU阳性细胞数都在条件恐惧刺激后7 d达峰值,后随时间的推移呈进行性减少;各时间点条件恐惧刺激组大鼠杏仁核区BrdU免疫阳性细胞数均明显少于相应时间点的对照组。Biebl等[9]研究发现脑内新生神经干细胞在出生后短时间内增殖增加,后出现死亡高峰,特别是出生后1~3周,且用BrdU标记神经干细胞时随着动物存活时间的延长神经干细胞的不断增殖BrdU阳性信号会出现逐渐衰减。本实验中两组动物BrdU阳性细胞数在条件恐惧刺激后7 d达峰值,后呈逐渐减少的变化趋势可能与此有关。我们的实验结果还提示条件恐惧刺激对大鼠杏仁核区新生神经细胞的增殖产生了负向影响并持续较长时间(60 d),Kawamura等[10]研究发现孕期应激可导致胚胎杏仁核区BrdU阳性细胞减少,我们的实验结果显示与之类似。Ehninger等[11]研究发现富集环境可促进小鼠杏仁核区新生神经细胞的增殖,结合本实验结果说明杏仁核区新生神经细胞的增殖受社会环境因素的影响。Okuda等[12]研究发现杏仁核区新生神经细胞可分化为成熟神经元,在海马新生神经元对情景恐惧记忆的形成及其随时间延长而衰减有重要作用,因此我们推测杏仁核区新生神经细胞对听觉条件恐惧记忆随时间延长而衰减也有重要作用,但需进一步研究。

本实验结果说明听觉条件恐惧刺激对大鼠杏仁核区新生神经细胞的增殖产生长时间的负向影响,这种负向影响可能是大鼠恐惧记忆难以消退的主要原因。

参考文献:

[1] Mirescu C, Peters J D, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress[J]. Nat Neurosci, 2004, 7(8): 841-846.

[2] 蒋丽珠,刘晨,李云. 条件恐惧刺激对成年大鼠海马齿状回新生神经细胞的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011,20(7): 621-623.

[3] Schroeder B W, Shinnick Gallagher P. Fear memories induce a switch in stimulus response and signaling mechanisms for long-term potentiation in the lateral amygdala[J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(2): 549-556.

[4] Amorapanth P, LeDoux J E, Nader K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus [J]. Nat Neurosci, 2000, 3(1): 74-79.

[5] Landgren H, Curtis MA. Locating and labeling neural stem cells in the brain[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(1): 1-7.

[6] Shingo T, Gregg C, Enwere E, *et al*. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin[J]. Science, 2003, 299(5603): 117-120.

[7] Rochefort C, Gheusi G, Vincent J D, *et al*. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory[J]. J Neurosci. 2002, 22(7): 2679:2689.

[8] Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, *et al*. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory[J]. Cell, 2009,139(4): 814-827.

[9] Biebl M, Cooper C M, Winkler J, *et al*. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain[J]. Neurosci Lett, 2000, 291(1): 17-20.

[10] Kawamura T, Chen J, Takahashi T, *et al*. Prenatal stress suppresses cell proliferation in the early developing brain [J]. Neuroreport, 2006, 17(14): 1515-1518.

[11] Ehninger D, Wang LP, Klempin F, *et al*. Enriched environment and physical activity reduce microglia and influence the fate of NG2 cells in the amygdala of adult mice[J]. Cell Tissue Res, 2011, 345(1): 69-86.

[12] Okuda H, Tatsumi K, Makinodan M, *et al*. Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(16): 3546-3553.

(**收稿**:2011-10-13;**修回**:2011-11-15)

(编辑 王小宴)