



上海欣软信息科技有限公司

急性恐惧应激对大鼠激素水平、空间学习记忆行为的影响

【Keywords】 fear stress; hormones; learning; memory; rats

【摘要】 目的：观察急性应激对大鼠激素水平、空间学习记忆行为的影响，探讨恐惧应激对机体学习记忆能力的影响及其机制。方法：成年雄性 SpragueDawley 大鼠 32 只，体质量 180~220 g。随机分成对照组 (n=16) 和应激组 (n=16)。用足电击+白噪声刺激方式建立急性恐惧应激大鼠模型，并进行空间觅向能力测试，以判断动物记忆储存及提取再现能力。放射免疫法及荧光分光光度法检测血浆和脑组织激素水平。结果：血浆及脑组织去甲肾上腺素、5 羟色胺、皮质醇水平增高，而肾上腺髓质素水平降低 ($P<0.01$)；水迷宫实验结果显示急性恐惧应激后大鼠训练潜伏期 (LP) 与对照组相比延长 ($P<0.05$)，在限定时间内穿过平台原位置的次数显著减少 ($P<0.01$)。结论：急性恐惧应激可以显著影响大鼠的激素水平，对学习记忆能力造成损伤。

【关键词】 恐惧应激；激素类；学习；记忆；大鼠

0 引言

研究发现，当人或动物处于强烈的急性应激或长期慢性应激的状况时，其学习记忆能力可受到明显的影响。如今，应激对脑功能，尤其对学习记忆能力的影响引起了人们极大的关注，成为神经科学和心理学领域研究的热点问题。为研究急性恐惧应激对机体学习记忆能力的影响，本实验在建立急性恐惧应激大鼠模型的基础上，分别观察应激后大鼠空间学习记忆行为和激素水平的变化，探讨恐惧应激对机体学习记忆能力的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料成年雄性 SpragueDawley 大鼠 32 只，体质量 180~220 g，由第四军医大学实验动物中心提供。首先将大鼠在动物饲养室中适应 1 wk，室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，自然光照，通风良好，自由进食水。将动物随机分成对照组 (n=16) 和应激组 (n=16)。

1.2 方法将大鼠放入电击笼 (40 cm×30 cm×20 cm) 中，由电刺激发生装置 (由上海欣软信息科技有限公司提供) 输出为 48 V，持续 1 s，间隔 5 s，电流经笼底金属栅刺激大鼠足底，刺激时间为 30 min。同时由 DF1681 型噪声信号发生器经扬声器输出 95 dB，20 Hz~20 kHz 的白噪声作用于大鼠。对照组不受应激原影响。大鼠空间学习记忆能力的观察，采用 morris 水迷宫法。第 1~4 日为空间定向条件反射训练 (spatial bias)。4 次/d，每次 2 min，记录大鼠从不同象限入水至发现并爬上平台的时间为训练潜伏期，每 3 次的均值作为一个观察单位，比较所得的各观察单位训练潜伏期变化以分析动物获取空间信息的能力；第 5 日应激组大鼠首先接受 30 min 的足电击+噪声刺激，然后重复测试潜伏期 (latency period)，并进行空间觅向能力测试 (probe trial)，即先将平台移去，再将动物放入水中 2 min，记录它穿过原平台位置的次数 (以平台 2 倍直径计算)，以判断动物记忆储存及提取再现能力。应激后，8 只大鼠分别于 0 min 和 30 min 两个时间点断头处死大鼠，取血，并迅速在冰上分离全脑组织，分别检测血浆中和脑组织中的激素水平：去甲肾上腺素 (NE) 和 5 羟色胺 (5HT) 水平检测采用荧光分光光度法 [1]；样品测定：脑组织加 10 倍脑体积分量冷酸性正丁醇在玻璃试管中，置于冰水浴中，内切式匀浆机匀浆，匀浆液用 2000 r/min 离心 5 min，取上清液 2.5 mL 置于内含 0.1 mol/L HCL 1.0 mL 和正庚烷 5.0 mL 的具塞离心管中，充分振荡 5 min，2500 r/min 离心 5 min，从下面水相中分别取 0.5 mL 和 0.4 mL。前者用于测定 NA，后者用于测定 5HT。NA 测定：于 0.5 mL 上述水相提取液中，加入 1/15 mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液 1.5 mL 和 EDTA 试剂 0.4 mL，混合；加入碱性亚硫酸钠溶液 0.4 mL 混合，3 min 后，加入 5 mol/L 冰醋酸 0.4 mL，混合，具塞避光置于 80°C 水浴 5 min，取出迅速冷却后立即在 380/490 nm 波长进行 NA 荧光强度测定。5HT 测定：取水相提取液 0.4 mL，加 2.5 g/L 半光氨酸 0.1 mL。混合后加 0.01 g/L OPT 和 8 mol/L HCL 混合液 3 mL，混合后置于沸水浴中 10 min，取出后立即冷却，用 360/480 nm 波长进行 5HT 荧光强度测定。同时作空白管测定，将各样品剩余之水相提取液混合，取其中 0.4 mL，加 8 mol/L HCL 3.0 mL 置于沸水浴中 10 min，加 1 g/L OPT 和 8 mol/L HCL 混合液 30 μL 和 2.5 g/L 半光氨酸 0.1 mL，然后在 360/480 nm 波长下测定荧光强度。肾上腺皮质醇 (CORT)、肾上腺髓质素 (ADM) 水平的检测按照放射免疫分析试剂盒的说明进行。

地址：上海市闵行区光华路 18 号晶森大厦
608 室
邮编：201199

电话：021-60830374
传真：021-34317989
网址：www.softmaze.com



上海欣软信息科技有限公司

统计学处理：实验数据以 $x \pm s$ 表示，使用 SPSS 12.0 软件进行处理，统计学分析方法为方差分析及 Dunnett 检验。

2 结果

2.1 行为学观察水迷宫实验结果显示急性恐惧应激后大鼠训练潜伏期(LP)与对照组相比延长($P < 0.05$)，在限定时间内穿过平台原位置的次数显著减少 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 急性恐惧应激对大鼠空间学习记忆能力的影响 (略)

a $P < 0.05$, b $P < 0.01$ vs 对照.

2.2 激素水平改变大鼠应激后即刻与 30 min 时血浆 NE、CORT 水平均显著增高，5HT 即刻水平降低，30 min 时升高，且显著高于对照组水平，ADM 水平在两个时间点均显著降低 ($P < 0.01$, 表 2)。脑组织中 NE 和 5HT (仅 30 min 时, $P < 0.05$) 水平比对照组显著增高 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 2 急性恐惧应激对大鼠激素水平的影响 (略)

a $P < 0.05$, b $P < 0.01$ vs 对照.

3 讨论

应激的主要非特异性反应之一是下丘脑垂体肾上腺(HPA)轴的激活，引起儿茶酚胺能神经元兴奋，去甲肾上腺素、肾上腺素、肾上腺糖皮质激素(GC)等分泌增多。从而引起全身性代谢效应、生理变化(尤其是脑功能变化)乃至行为改变和疾病发生。病理应激危害的主要原因之一，是由较高水平的激素作用造成的。高浓度的激素不但危害机体的免疫系统和心血管系统等，而且可能对中枢神经系统也造成危害。在心理应激状态下，CORT, NE 的浓度呈上升趋势 [2]，一方面可以帮助机体缓冲和适应应激刺激，但另一方面也是导致机体发生应激疾病的重要因素。认知功能与糖皮质激素的关系呈倒 U 型，损伤效应与糖皮质激素的不足和过多有关 [3]。正常水平的糖皮质激素参与学习记忆的过程，低水平的糖皮质激素活化糖皮质激素受体 (GR) 不够，使得 GR 核转位的数量减少，GR 与激素反应元件的结合数减少，影响 GR 基因组效应的发挥。高水平的糖皮质激素过度活化 GR 损伤学习记忆过程 [4-5]。另外，应激时动物脑内可出现 5HT 更新加速的现象，同时 5HT 还被认为参与应激性焦虑的重要递质。ADM 在内分泌系统中有着明显的调节作用，可影响人和大鼠肾上腺皮质的分泌活性。本实验结果表明，应激后，大鼠血浆 CORT, NE 水平在 0 min 和 30 min 时均显著增高；5HT 即刻水平降低，而 30 min 时水平增高，且显著高于对照组水平；ADM 水平在两个时间点均显著降低。全脑组织中 NE 水平在 0 min 和 30 min 时均显著增高；而 5HT 水平在 30 min 时也比对照组显著增高。上述结果提示急性恐惧应激可以显著影响机体神经内分泌系统，并可能进一步对大脑功能和情感行为产生影响。

突触传递的长时程增强(long term potentiation, LTP)是衡量神经突触可塑性和学习记忆能力的重要指标。实验证实 [6-7]，应激可以使 LTP 产生受到抑制，改变神经突触可塑性，从而造成学习记忆能力的下降。LTP 的抑制与脑内过高的 GC 有一定的因果关系，激活糖皮质激素受体 (GR) 则抑制 LTP。应激或大量补充 GC 还可以增大谷氨酸 (Glu) 对海马的损伤程度。过量的 GC 会同时抑制海马神经细胞和胶质细胞的能量代谢，使胞内 ATP 缺乏，同时导致大量 Glu 在胞外堆积，对神经元产生神经毒性。另外，应激水平 GC 长期的作用下，海马神经细胞发生死亡的主要机制可能是凋亡。本实验结果表明，急性恐惧应激可以造成大鼠血浆 GC 皮质酮，NE，5HT 水平的升高，同时 Morris 水迷宫实验结果表明大鼠学习记忆能力受损，不但妨碍学习过程(记忆的获得和巩固)，而且影响记忆的重现。上述结果提示高水平的激素可能对学习记忆能力造成损伤。