

郭冷秋,郭壮丽,朱霄,等. 利用正交试验优化建立大鼠条件恐惧记忆模型[J].中国实验动物学报,2019,27(4):516-520.
Guo LQ, Guo ZL, Zhu X, et al. Optimization of a rat model of conditioned fear memory using an orthogonal design [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):516-520.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.014

利用正交试验优化建立大鼠条件恐惧记忆模型

郭冷秋^{1*}, 郭壮丽², 朱霄¹, 周蕾¹, 王梦楠¹, 张立光¹, 周扬¹

(1. 苏州卫生职业技术学院药学院, 苏州 215009; 2. 青岛大学附属医院康复医学科, 青岛 266003)

【摘要】目的 利用正交试验,优化建立大鼠条件恐惧记忆模型的最佳实验参数,寻找最佳试验条件。**方法** 利用巴普洛夫条件恐惧原理,建立大鼠条件恐惧记忆模型;采用3因素3水平的正交试验设计,以模型建立24 h后大鼠木僵反应时间为指标,观察不同参数条件下恐惧记忆的表达情况,确定最佳试验条件。以优选的实验条件建立条件恐惧记忆模型,并于24 h、1周、2周、4周和8周后进行恐惧记忆保持检测。**结果** 直观分析结果表明,各因素影响能力依次为声音强度=循环次数>电击强度;方差分析结果表明,循环次数对实验结果有显著影响($P < 0.05$),声音强度和电击强度影响不显著($P > 0.05$)。确定最优实验条件为:声音75 dB,电击0.8 mA,循环15次。在模型建立24 h和1周时,大鼠恐惧记忆保持良好,与对照组比较差异有显著性($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$);第2周后恐惧记忆逐渐消退,与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 本实验明确了大鼠条件恐惧记忆模型影响因素的主次,优化了实验条件,为模型的标准化、规范化及后续研究提供了可借鉴的实验的依据。

【关键词】 条件恐惧记忆;动物模型;正交试验;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0516-05

Optimization of a rat model of conditioned fear memory using an orthogonal design

GUO Lengqiu^{1*}, GUO Zhuangli², ZHU Xiao¹, ZHOU Lei¹, WANG Mengnan¹, ZHANG Liguang¹, ZHOU Yang¹

(1. Department of Pharmacy, Suzhou Vocational Health College, Suzhou 215009, China.

2. Department of Rehabilitation, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003)

Corresponding author: GUO Lengqiu. E-mail: glq3@sina.com

【Abstract】 Objective An orthogonal design was used to optimize the experimental parameters for the establishment of a rat model of conditioned fear memory and to identify the optimal experimental conditions. **Methods** The model of conditioned fear memory in rats was established based on pavlovian conditioned fear theory. Three factors, namely sound intensity, cycle times and electric shock intensity, were adopted, and each factor was set at 3 levels. Orthogonal test was carried out, and the freezing time ratio of rat was taken as the index to observe the changes in different parameters of expression of fear memory and determine the best experimental conditions. The conditioned fear memory model was established again under the optimal conditions of the previous experiment, and the fear memory retention test was conducted 24 h, 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks later. The rats without fear training were used as the control group. **Results** The intuitive analysis results showed that the effects of various factors on the duration of fear memory of rats was sound intensity=cycle times > electric shock intensity in turn. The ANOVA test showed that the cycle times had a significant impact on freezing time ratio ($P < 0.05$), but the sound intensity and electric shock intensity had no significant impact (P

【基金项目】江苏省高校自然科学研究面上项目(17KJB360013);江苏省卫生职业技术教育研究项目(JZ201701);苏州高职高专院校优秀科技创新服务团队(SZGZTD201704);江苏省‘青蓝工程’资助。

Funded by Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions (17KJB360013), Jiangsu Province Teaching and Research Section Funds (JZ201701), Suzhou Science and Technology Innovation Team (SZGZTD201704), Qing Lan Project of Jiangsu Province.

【通信作者】郭冷秋(1975—)女,副教授,博士。研究方向:中药神经药理学。Email:glq3@sina.com

> 0.05). The optimal experimental conditions were as follows: 75 dB sound, 0.8 mA electric shock, and 15 cycles. Fear memory was maintained at 24 h and 1 week after the establishment of the model, which was significantly different from that of the control group ($P < 0.001$ and $P < 0.05$). Fear memory had faded 2 weeks later, at which point there was no significant difference in freezing time ratio between the model and control groups ($P > 0.05$). **Conclusions** This experiment clarifies the primary and secondary factors that influence the establishment of a rat model of conditioned fear memory. The optimal experimental method for model establishment are identified. This study lays a foundation for the standardization and normalization of fear memory model.

【Keywords】 conditioned fear memory; animal model; orthogonal experiment; rats

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着经济的发展和社会的进步,情绪障碍性疾病(如焦虑、失眠、创伤后应激障碍等)的发病率呈现日益增高的趋势。负性情绪(尤其是恐惧)记忆消除障碍是本类疾病发生发展的关键^[1],探讨如何有效消退由创伤经历引起的恐惧记忆、消除和降低病人的恐惧反应,具有重要的意义^[2]。恐惧记忆动物模型的建立是本类疾病发病机制研究和药物研发的关键。基于巴甫洛夫条件反射原理的条件恐惧(fear conditioning)模型是目前公认的和应用最为广泛的恐惧记忆动物模型^[3]。该模型将条件刺激(中性刺激,CS,如:声音)与非条件刺激(恐惧刺激,US,如:电击)进行多次匹配联结(CS-US)训练后,即使单独呈现CS也可引发动物的恐惧反应^[4]。CS-US 联结训练是形成动物恐惧反应和建立恐惧记忆的关键。然而目前缺乏统一可循的标准和参考,不同的研究者往往采用不同的参数条件,导致模型的重复性和可借鉴性差,进而影响实验结果的可靠性。本研究利用正交实验设计,优选建立条件恐惧记忆模型的最佳实验参数;并对所建立的模型进行恐惧记忆保持的短期(24 h)和长期(1周、2周、4周和8周)水平检测,以考察优选条件下建立的模型的可靠性和稳定性,为相关研究提供可借鉴的实验的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

6~8 周龄清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 160~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-2002】,饲养在苏州大学实验动物中心的 SPF 级实验室【SYXK(苏)2016-0049】。明暗周期为 12 h/12 h(光照时间 7:00~19:00)、室温 22~26℃ 条件,自由摄食和饮水。适应 7 d,期间每天由实验者抚摸大鼠 3 min,并放入条件恐惧箱适应 5

min,取出后用 75%酒精擦拭箱体以去除遗留气味。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:SWAE201902)。

分组:(1)正交试验:大鼠随机分为 9 组,每组 7~8 只,按照正交试验表 $L_9(3^4)$ 安排实验,三个因素分别为声音强度(因素 A)、电击强度(因素 B)和 CS-US 配对循环次数(因素 C),每个因素各取三个水平,因素水平见表 1,9 个实验组具体参数安排见表 2。(2)恐惧记忆保持测试:大鼠随机分为模型组和对照组,每组 9 只,模型组以实验(1)所确定的试验参数进行训练,对照组不进行条件恐惧训练,其他条件同实验组。

1.1.2 仪器设备

Panlab 条件恐惧与惊跳结合系统(Startle and Fear Combined System,美国 Harvard 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠正常行为模式检测

实验大鼠在条件恐惧箱内适应 3 min 后,记录 20 min 内的活动情况,计算木僵反应时间占总测试时间的百分比(freezing time ratio)。连续记录 3 d,取 3 d 的平均值进行统计分析。

1.2.2 大鼠对声音(CS)的基础反应

实验大鼠在条件恐惧箱内适应 3 min 后,不同组别大鼠按照正交试验设计表(见表 2)分别给予相应强度的 CS,每次持续 10 s,共 10 次,间隔 90~150 s(平均 120 s,随机出现)。记录大鼠在 CS 持续时间内的 freezing time ratio。

1.2.3 条件恐惧记忆模型的建立

实验大鼠在条件恐惧箱适应 3 min 后,按照正交试验设计表(见表 2),进行 CS-US 配对训练(CS 持续 10 s,结束之前 0.5 s 给予电击(US),声音电击同时结束),此为一个循环(trial);此后每间隔 90~150 s(平均 120 s,随机出现)1 个 trial。统计大鼠在 10 个 trial 中的 freezing time ratio。

表1 实验因素与水平

Table 1 Experimental factors and levels

水平 Levels	因素 Factors		
	A 声音强度	B 电击强度	C 循环次数
	Sound intensity (dB)	Electric shock intensity (mA)	Cycle times
1	70 (A1)	0.5 (B1)	5 (C1)
2	75 (A2)	0.8 (B2)	10 (C2)
3	80 (A3)	1.0 (B3)	15 (C3)

1.2.4 恐惧记忆表达检测

条件恐惧记忆建立 24 h 后,再次将大鼠放入条件恐惧箱,3 min 后给予训练时的 CS(不给予 US),共 10 次,每次持续 10 s,间隔时间为 120 s。统计大鼠在 CS 持续时间内的 freezing time ratio。对实验结果进行直观分析和方差分析,明确影响恐惧记忆形成的因素主次,确定最优试验条件。

1.2.5 恐惧记忆保持检测

利用上述实验确定的最优试验条件,建立大鼠恐惧记忆模型,并对大鼠进行短时(24 h)和长时(1周、2周、4周和8周)恐惧记忆的保持检测。方法同 1.2.4。

1.3 统计学方法

实验结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。正交试验数据使用 Minitab17 进行方差分析;其他行为学数据计算及统计图由 GraphPad Prism 5.0 软件生成。

2 结果

2.1 大鼠正常活动模式

各组大鼠在条件恐惧建立前正常活动的 freezing time ratio 见图 1,单因素方差分析结果表明,各组之间差异无显著性($P = 0.9996$, $F = 0.07885$)。

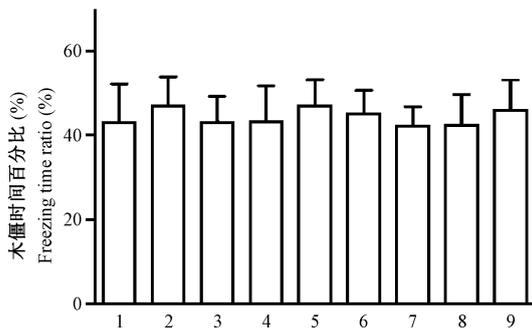


图1 各组大鼠正常活动时木僵反应时间百分比
Figure 1 Freezing time ratio of the rats in each group during normal activities

2.2 大鼠对 CS 的基础反应

各组大鼠在 CS 持续时间内 freezing time ratio 见图 2,单因素方差分析结果表明,各组之间差异无显著性($P = 0.9998$, $F = 0.06774$)。

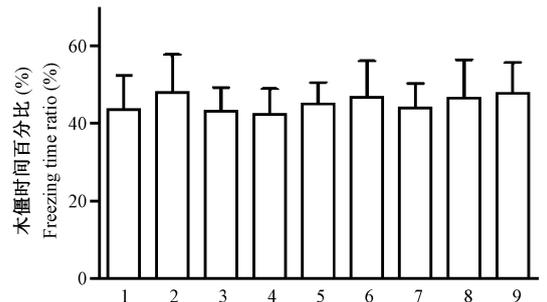


图2 各组大鼠对 CS 的基础反应

Figure 2 Basic response of the rats to CS in each group

2.3 恐惧记忆的表达

条件恐惧记忆建立后 24 h 各组大鼠 freezing time ratio 见表 2。比较各因素的极差 R,发现各因素影响能力排序为 $A = C > B$ 。其中 5 号实验($A_2B_2C_3$)结果最好,木僵时间达到 82%,故建立大鼠条件恐惧模型最佳条件为 $A_2B_2C_3$,即声音 75 dB,电击强度 0.8 mA,循环 15 次;方差分析结果(表 3)表明,因素 C 对实验结果有显著影响($P < 0.05$),因素 A,B 对实验结果影响不显著($P > 0.05$)。因此 C 为主要因素,A、B 为次要因素。按照方差分析观点,只需对有显著影响的因素选择最佳水平,而其他对试验结果影响较小的因素,可按实际需要选择适当的水平。因此实验中最优条件是 $A_2B_2C_3$,与直观分析结果一致。

2.4 恐惧记忆的保持

利用优化后的实验参数建立条件恐惧记忆模型,在建模后的第 24 h 和 1 周时,模型组大鼠 freezing time ratio 与对照组比较差异具有显著性($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$)。第 2 周后,恐惧记忆逐渐消退,与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。实验结果见图 3。

表 2 正交试验设计及直观分析结果

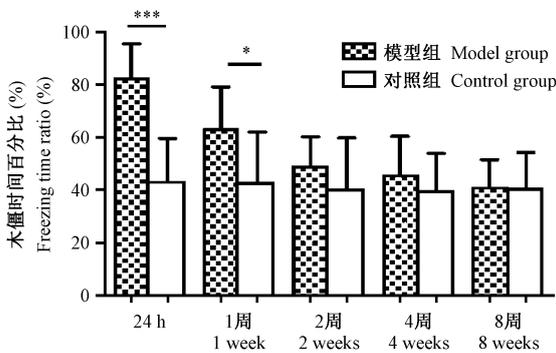
Table 2 Design of the orthogonal test and results of intuitive analysis

试验号 Test No.	动物数(n) Number of animals	声音强度(A) Sound intensity	电击强度(B) Electric shock intensity	循环次数(C) Cycle times	木僵时间(%) Freezing time ratio
1	8	70	0.5	5	63
2	7	70	0.8	10	75
3	7	70	1.0	15	77
4	8	75	0.5	10	77
5	8	75	0.8	15	82
6	8	75	1.0	5	75
7	8	80	0.5	15	69
8	8	80	0.8	5	59
9	8	80	1.0	10	75
K ₁		215	209	197	
K ₂		234	216	227	
K ₃		203	227	228	
K ₁		72	70	66	
K ₂		78	72	76	
K ₃		68	76	76	
R		10	6	10	
因素主次			A=C>B		

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Variance	偏差平方和 SS	自由度 df	F	P
声音(A)	0.0162889	2	17.05	> 0.05
电击(B)	0.0054889	2	5.74	> 0.05
循环次数(C)	0.0206889	2	21.65	< 0.05



注:恐惧记忆建立后不同时间点检测,与对照组比较, *P< 0.05, *** P< 0.001。

图 3 恐惧记忆保持测试结果

Note. Compared with the control group at different times after fear memories built up, *P< 0.05, *** P< 0.001.

Figure 3 Results of the fear memory retention test

3 讨论

建立具有较好的稳定性和可重复性的动物模型是研究疾病发病机制和治疗药物的前提和基础。基于巴普洛夫条件反射原理的条件恐惧记忆动物

模型,广泛用于恐惧症、PTSD 等恐惧相关性疾病的研究^[5]。然而模型建立的成功与否受到诸多因素的影响,如电击(US)的强度、声音刺激(CS)强度及CS-US 配对训练次数等。成功的模型以既能引起动物产生明确的恐惧反应,且又不对动物造成生理性的伤害为目标^[6]。目前各研究室采用的实验条件不尽相同,虽然都能在一定程度上反映动物的恐惧记忆,但是不同条件建立的模型的稳定性和持续性往往存在差异,因而难以保证实验结果的一致性和可靠性。宋海滨等^[7]曾比较和评价了 KM 和 C57BL/6 小鼠在用不同电击强度进行训练时恐惧性记忆建立的差异;郭呈斌等^[8]报道了足底电击诱导树鼯条件恐惧记忆模型的建立及抹除方法。但目前关于大鼠恐惧记忆建立的方法学评价,尚未见报道。本研究在文献研究的基础上^[9-12],利用正交试验,考察和评价了电击(US)强度、声音(CS)强度和CS-US 配对训练次数3个因素在3个不同水平上对实验结果影响的。正交试验直观分析表明,各因素影响能力依次为声音强度=循环次数>电击强度(表2);方差分析表明,循环次数对实验结果有显著

性影响($P < 0.05$),声音强度和电击强度影响不显著($P > 0.05$) (表 3)。因此确定最优实验条件为:声音 75 dB,电击强度 0.8 mA,CS-US 配对循环训练 15 次。模型稳定性测试结果表明,大鼠在 1 周内恐惧记忆保持良好,与对照组比较差异显著;2 周后,恐惧记忆逐渐消退,与对照组比较差异不显著(图 3)。

因 CS-US 配对训练次数是影响实验结果的显著因素,提示我们,若要建立稳定表达的恐惧记忆动物模型,可以适当增加训练的次数或训练周期。表 3 可见,电击强度为 1 mA 时 freezing time ratio 最高为 77%,而 0.8 mA 的结果为 82%,提示并非电击强度越大恐惧记忆表达越好,这种现象可能反映了应激反应的程度对记忆固化过程的影响,此结果与 Anagnostaras 等^[13]的研究一致。此外,模型建立前我们还检测了大鼠正常的活动模式以及对 CS 的基础恐惧反应,考察模型的可靠性。结果可见,大鼠在条件恐惧建立后的 freezing time ratio(表 2)与正常活动模式(图 1)相比较有明显提高;大鼠对 CS 的基础反应(图 2)与正常活动模式(图 1)比,无明显变化。这些结果表明,CS-US 配对训练后 freezing time ratio 的增加并非是对声音的恐惧所导致的,而是条件恐惧记忆建立的结果。

综上所述,本研究明确了建立大鼠条件恐惧记忆模型影响因素的主次,优化了实验条件,并考察和评价了模型的稳定性和可靠性,为条件恐惧记忆模型的标准化、规范化及后续研究提供了可借鉴的实验依据。

参 考 文 献(References)

[1] Yue J, Shi L, Lin X, et al. Behavioral interventions to eliminate fear responses [J]. Life Sciences, 2018, 61(6): 625-632.

[2] Young MB, Andero R, Ressler KJ, et al. 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine facilitates fear extinction learning [J]. Trans Psychiatry, 2015, 5: e634.

[3] VanElzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, et al. From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and in anxiety disorders [J]. Neurobiol Learn Mem, 2014, 113: 3-18.

[4] Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning [J]. Annu

Rev Neurosci, 2001, 24: 897-931.

[5] Pace-Schott EF, Germain A, Milad MR. Effects of sleep on memory for conditioned fear and fear extinction [J]. Psychol Bull, 2015, 141(4): 835-857.

[6] Orsini CA, Maren S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2012, 36(7): 1773-1802.

[7] 宋海滨,李春林,金毅,等.两种小鼠恐惧记忆模型建立的比较研究 [J]. 中国行为医学科学, 2006, 15(12): 1076-1077. Song HB, Li CL, Jin Y, et al. Strain-dependent difference in fear conditioning mouse model [J]. Chin J Behav Med Sci, 2006, 15(12): 1076-1077.

[8] 郭呈斌,张晨,王烈成.足底电击诱导树鼠句条件恐惧记忆模型的建立及抹除 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(10): 1426-1430. Guo CB, Zhang C, Wang LC. A novel fear conditioning memory model formation and erasing by foot-shock in tree shrew [J]. Acta Univ Med Anhui, 2015, 50(10): 1426-1430.

[9] 刘佳佳,潘霄,严进,等.大鼠恐惧应激模型的建立及指标筛选 [J]. 实用医药杂志, 2011, 28(5): 447-450. Liu JJ, Pan X, Yan J, et al. Fear stress model in rats and index selection [J]. Pract J Med Pharm, 2011, 28(5): 447-450.

[10] 张钰,李敏. D-环丝氨酸促进大鼠条件性恐惧消退记忆的长期保持 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 951-953. Zhang Y, Li M. Promotion effect of D-cycloserine on long-term retention of rat extinction memory of conditioned fear [J]. Acta Acad Med Mil Tert, 2011, 33(9): 951-953.

[11] 韩要武,赵乐章,刘巧琼,等.条件恐惧训练对 F344 大鼠行为活动的影响 [J]. 中国行为医学科学, 2004, 13(6): 26-27. Han YW, Zhao LZ, Liu QQ, et al. Effect of conditioned fear training on behavioral activity in F344 rats [J]. Chin J Behav Med Sci, 2004, 13(6): 26-27.

[12] 杨娇娇,孙晓茹,张慧,等.右美托咪定对创伤后应激障碍大鼠焦虑状态和认知功能的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2015, 31(8): 797-800. Yang JJ, Sun XR, Zhang H, et al. Influence of dexmedetomidine on the state of anxiety and cognitive function in rats with PTSD [J]. J Clin Anesthesiol, 2015, 31(8): 797-800.

[13] Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination [J]. J Neurosci, 1999, 19(3): 1106-1114.

[收稿日期] 2019-01-05