

奖赏记忆改善焦虑行为的小鼠模型及机制初探*

雷卓凡^{1, 2)} 王晋辉^{1, 2)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101; (²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 焦虑是当今社会最普遍的精神障碍之一。药物疗法和心理疗法是焦虑症的主要治疗手段, 后者因无副作用且不易反复而倍受重视。在焦虑症的心理行为疗法中, 奖赏记忆缓解焦虑的模型及机制是一个重要的科学问题。对这一问题的研究将有助于理解其内在机制并开发更好的治疗焦虑症的方法。基于经典的小鼠焦虑行为评测工具——高架十字迷宫, 我们首先考查了焦虑评测结合行为训练的可行性, 发现小鼠在高架十字迷宫上反复评测后行为达到稳态, 则可通过在开放臂末端设置食物奖赏来研究奖赏记忆对焦虑行为的影响; 然后通过实验证明短期奖赏训练和无奖赏的强制开放臂暴露不能改善焦虑行为; 进而确定并验证了奖赏训练改善焦虑行为的正确方式; 最后在此行为模型中应用有致遗忘效应的蛋白激酶 C 的抑制剂白屈菜赤碱(chelerythrine), 发现奖赏记忆形成被抑制伴随着焦虑行为改善的削弱。初步揭示了此行为模型涉及的细胞分子机制。

关键词 高架十字迷宫, 奖赏记忆, 焦虑行为, 蛋白激酶 C

学科分类号 Q189, Q31, R741.02

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0330

焦虑症, 源于对未来事件或所处情境的一种泛化不可控的过度忧惧, 是当今社会最为普遍的一种心理障碍^[1-2]。前额叶皮层、杏仁核和海马及其相互作用被认为是焦虑症病理的主要源头^[3-9], 同时这些脑区也是负责信息存储的主要环节^[10-14]。基于其重叠的神经回路基础, 焦虑和记忆被认为存在相互作用。已有研究表明海马突触可塑性、空间记忆和焦虑状态密切相关^[15-16]; 焦虑和记忆在很多过程中都或多或少地受胞内蛋白激酶共同调控^[17-18]。大量的研究都表明焦虑和记忆存在紧密的相互作用。

目前针对焦虑症的药物大都基于某些对焦虑有特异影响的神经递质受体, 比如谷氨酸盐受体^[19-22]、5-羟色胺受体^[23]或氨基丁酸受体^[24]的激动剂或抑制剂用于治疗焦虑症。然而, 这些药物的临床应用中表现出的起效延迟和副作用^[25]让大家不得不寻求其他更好的治疗手段, 例如心理行为疗法。相关研究发现, 焦虑症患者会把即将发生的事与负面的记忆联系起来而做出不合常理、过度担心的负面评估而导致焦虑的行为^[26-28]。既然负面的记忆会导致负面的行为而引发甚至加重焦虑的行为, 那么加强正面的记忆是否能够缓解焦虑状态呢? 近来对焦虑症的心理行为疗法的研究表明, 记忆是其病源核心之

一, 基于学习而创造的新记忆能够重塑并改善旧的不良记忆而达到最终缓解焦虑状态并改善焦虑行为的目的^[29], 而这一过程的内在机制还有待发掘。这个问题的研究对于治疗焦虑症的理论机制和临床应用都有重要的科学意义。

高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)是考查大鼠或小鼠焦虑水平的成熟行为模型^[30-31], 大量的研究用它来筛选抗焦虑或致焦虑的药物。特别地, 高架十字迷宫还被用作评估记忆的有效手段^[32-33], 例如 Silva 等^[34]在 1997 年提出了一种在 EPM 上的识别规避模型, Godinho 等^[35]在其基础上发展出识别偏好 EPM 行为模型。海马及相关结构被证明是空间学习记忆的关键脑区^[36]。以 CaMKII、PKA 和 PKC 为代表的蛋白激酶^[37-38]相关的神经可塑性是联合式学习记忆的重要因素, 在海马及相关脑区, 这些蛋白激酶都能调控 NMDA 和 AMPA 等

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2013CB531304, 2011CB504405)和国家自然科学基金(30990261, 81171033, 81471123)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888472, E-mail: jhw@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2014-11-06, 接受日期: 2015-05-25

受体的表达、分布或活性, 进而影响突触传递效率^[39-41]。其中, 蛋白激酶 C(PKC)特别富集于神经组织, 是突触后内容物的主要成分^[37], 其各种亚型蛋白参与多种神经功能活动^[42-45], 尤其是突触可塑性的修饰过程^[46-47]。例如 Li 等^[48]在 2014 年报道了 PKC- γ 的一种亚型在海马中的表达水平和小鼠在水迷宫中学习记忆的行为水平呈高度正相关。近年来对海马及相关结构的进一步研究表明, 海马不仅仅和空间学习记忆紧密相关, 还影响着焦虑情绪反应^[46]。基于这些研究, 我们以小鼠为实验对象, 建立结合焦虑行为和奖赏记忆的行为模型, 并着眼于蛋白激酶 C 相关的生化过程来试图了解奖赏记忆改善焦虑行为的细胞分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物操作严格遵守《北京市实验动物管理条例》, 实验操作人员具备《北京市实验动物从业人员岗位证书》并得到北京实验动物管理中心实验动物管理委员会(IACUC)的许可(ID#B10831)。

DBA/2 小鼠: DBA/2 小鼠购买于北京维通利华实验动物技术有限公司, 是一种具有高焦虑行为的遗传背景的实验动物, 饲养于中国科学院生物物理研究所动物房并在出生后约 25 天取回饲养于实验室动物房。取回当天将相同遗传背景的小鼠随机分配到不同鼠笼, 每笼 4 只并分别作标记。动物房中设置为 12 h/12 h 的昼夜循环, 7:00~19:00 关灯, 其余时间开灯。实验开始前, 小鼠可自由获取鼠粮和饮水并给予约 5 天的时间适应实验环境及人为操作。实验开始后, 饲养条件变为每日重复的“鼠粮剥夺-鼠粮供给-鼠粮剥夺”循环。从 21:00 到第二天 18:00 鼠笼中的鼠粮被完全清除, 所有的实验均在 9:00~18:00 之间进行; 18:00~21:00 鼠笼中供给适量鼠粮, 鼠粮供给的标准是保证小鼠健康(每日体重波动幅度不超过 5%)且在翌日实验开始时处于饥饿状态, 饮水可自由获取。

1.2 实验装置

所有的行为训练及检测均在高架十字迷宫上完成。高架十字迷宫——水平正交的“十”字迷宫, 包含两个正对的闭合臂和两个正对的开放臂, 是测定小鼠焦虑行为的有效可靠方法^[30]。其中: 闭合臂长 30 cm、宽 5 cm, 墙高 15.25 cm; 开放臂长 30 cm、宽 5 cm, 墙高 0.2 cm; 整体离地高度 40 cm。迷宫底部为白色塑料, 闭合臂墙为灰色不

透明塑料。闭合臂和开放臂相交的中间平台正上方配有 CCD 摄像头可记录小鼠的活动。整个装置置于一间静音的密闭房间中; 房间内环境温度设置为 25℃, 光线强度设置为 100 lux, 其空间背景保持不变以确保小鼠能够根据特定参照物识别高架十字迷宫不同的臂。

实验使用鼠粮作为食物奖赏。在两个开放臂的末端底平面各安装有直径为 5 cm、厚度 1 mm 的半圆形透明塑料薄板, 为奖赏训练中食物奖赏放置位置。薄板低于迷宫平面使得奖赏训练中小鼠在到达开放臂末端前无法直接看见置于其上的鼠粮。在本系列实验中选定一侧开放臂为奖赏臂(reward open arm, ROA), 在进行奖赏训练时会在此臂末端透明薄板上放置鼠粮, 另一开放臂则为无食物的空白臂(neutral open arm, NOA)。空白训练中也对应分为 ROA 和 NOA, 但都不放置食物。在实验房间中, 两开放臂在各自一侧配有不同的参照物以保证实验小鼠能通过空间记忆来正确区分两开放臂并与食物奖赏信息建立关联。每一批次的实验开始后高架十字迷宫及其所在实验房间的所有参照物及环境条件(温度 25℃、湿度 60%及光照强度 100 lux)均保持固定不变。

1.3 实验试剂

氯化钠注射液(NaCl saline, 0.9%, 500 ml: 4.9 g)购于山东齐都药业有限公司。二甲基亚砜(DMSO, 0.8%, 99.2 ml saline: 0.8ml)购于 Ameresco 公司, 白屈菜赤碱(chelerythrine chloride, 溶液储存液: 10 g/L in DMSO; 工作液: 0.8 g/L in saline)购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.4 行为范式

高架十字迷宫上的行为评测实验和空白训练与传统 EPM 实验^[30]相同: 检测开始前 30 min, 将鼠笼转移到高架十字迷宫所在实验房间以使其适应实验环境; 实验开始, 将小鼠头朝向闭合臂平稳放置在中央区, 任其自由活动 5 min 并记录其行为轨迹以备分析; 实验结束后将小鼠放回原鼠笼。在奖赏训练实验中, 小鼠进入迷宫前奖赏臂上放置一片鼠粮; 将小鼠头朝向闭合臂放置在中央区, 任其自由活动 5 min 并记录; 在实验过程中每次小鼠到达食物奖赏臂末端并取走鼠粮后, 在小鼠完全离开此开放臂时立即补充一片鼠粮; 放置鼠粮的标准是每次一小片约 0.05 g。每次实验后使用 5%的乙醇溶液将高架十字迷宫擦拭干净并待其完全干燥方能进行下一次实验。

1.5 实验流程

1.5.1 高架十字迷宫反复评测实验

出生后 28~32 天的雄性 DBA/2 小鼠 8 只, 每天 9:00~18:00 在高架十字迷宫上进行焦虑行为评测实验, 每天 1 次, 连续进行 15 天.

1.5.2 强制开放臂暴露单次奖赏训练

出生后 28~32 天的雄性 DBA/2 小鼠, 分为奖赏(Reward)组 8 只和空白(Neutral)组 8 只. 第 1 天, 两组小鼠在高架十字迷宫上做焦虑行为评测; 第 2 天, 在封闭高架十字迷宫闭合臂的条件下分别进行奖赏训练和空白训练; 第 3 天, 两组小鼠在 EPM 上做焦虑行为评测. 实验在每天 9:00~18:00 进行.

1.5.3 强制开放臂暴露多次空白训练

出生后 28~32 天的雄性 DBA/2 小鼠 8 只. 第 1 天, 小鼠在高架十字迷宫上做焦虑行为评测; 第 2~6 天, 在封闭高架十字迷宫闭合臂的条件下分别进行空白训练, 每只小鼠训练 3 次, 每次间隔 2~3 h; 第 7 天, 小鼠在 EPM 上做焦虑行为评测. 实验在每天 9:00~18:00 进行.

1.5.4 奖赏训练改善焦虑行为模型

出生后 28~32 天的 DBA/2 雄性小鼠, 分为奖赏(Reward)组 8 只和空白(Neutral)组 8 只. 第 1 天, 两组小鼠在高架十字迷宫上进行焦虑行为评测; 第 2~6 天, 奖赏组小鼠接受奖赏训练, 空白组接受空白训练, 每只小鼠训练 3 次, 每次间隔 2~3 h; 第 7 天, 两组小鼠在高架十字迷宫上进行焦虑行为评测.

1.5.5 蛋白激酶 C 药理抑制的奖赏训练

出生后 28~32 天的 DBA/2 雄性小鼠, 分为注射 PKC 抑制剂(PKCi)组 8 只和对照(DMSO)组 8 只. 第 1 天, 两组小鼠在高架十字迷宫上进行焦虑行为评测; 第 2~6 天, PKCi 组每只小鼠每天第一次上高架十字迷宫训练前 30 min, 腹腔注射 chelerythrine 工作液, 剂量为 2~3 mg/kg, DMSO 组小鼠接受同剂量比例的 DMSO 注射, 所有小鼠均接受奖赏训练, 每只小鼠训练 3 次, 每次间隔 2~3 h; 第 7 天, 两组小鼠在高架十字迷宫上进行焦虑行为评测.

1.5.6 蛋白激酶 C 药理抑制的空白训练

动物分组与评测方法与 1.5.5 相同, 仅当注射后, 所有小鼠接受空白训练, 并评测.

1.6 数据分析

小鼠在高架十字迷宫上行为实验视频由 WinFastPVR 软件在 Windows XP 系统下实时采集, 以 Windows Media Video 9 编码储存为 avi 格式文件. 视频宽度 320 像素, 高度 240 像素, 帧率 25, 像素灰度 8 位, 压缩失真率 0.7%. 视频通过实验者编写的 Matlab (MathWorks, Inc.USA.Version: 2013b)程序分析各项参数并得到初步的实验结果. 原始参数包括: 在四个臂分别停留的时间、分别进入四个臂的次数、总时间和总出入次数、实验对象每一时间采样点在高架十字迷宫上的覆盖面积和中心位置坐标等.

衡量焦虑水平的参数包括: 在两侧开放臂活动时间占总时间的百分比(percentage of time in open arms, PTOA); 进入两侧开放臂总次数占总进臂次数的百分比(percentage of entry times in open arms, PETOA); PTOA 或者 PETOA 的增加代表焦虑行为的改善. 衡量记忆水平的参数包括: 在奖赏开放臂的活动时间与空白开放臂的对比(time in ROA versus time in NOA); 首次到达奖赏开放臂末端的时长(latency to the end of ROA, latency)与对侧开放臂的对比; 前者对比变大且偏向奖赏开放臂增多或者后者对比变大且偏向奖赏开放臂减少代表记忆效应的增强.

实验数据表示为平均值和标准误(mean $\pm$ SEM) ($\bar{x}\pm$ SD), 在 SPSS(IBM SPSS Statistics, Version 20)中进行统计分析. 特别地, 对于实验中不同分组在训练前后的行为学指标, 比如衡量焦虑水平的参数 PTOA 和 PETOA, 进行重复测量的方差分析(repeated measure ANOVA, RMANOVA), 以比较组内因素(训练前后造成差异)和组间因素(不同分组造成差异)是否存在交互效应. 对于实验中不同分组在不同开放臂的行为学指标, 比如衡量记忆水平的参数 Time in ROA/NOA 和 Latency to ROA/NOA end, 进行 RMANOVA 分析, 以比较组内因素(ROA 和 NOA 的不同空间背景造成差异)和组间因素(不同分组造成差异)是否存在交互效应. 然后, 根据 RMANOVA 的结果, 在交互效应显著的情况下对主效应显著的因素做简单效应分析; 在交互效应不显著的情况下直接分析主效应显著的因素; 若交互效应和主效应均不显著, 则判定该因素对实验结果无明显影响. 分析结果柱状图中, 存在统计差异时显著程度分为三种: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

*** $P < 0.001$.

2 结 果

在实验结果中, 各有两个指标用于衡量记忆强度和焦虑水平. a. 记忆指标, 即小鼠在奖赏臂和空白臂活动的时间对比以及初次到达奖赏臂末端和空白臂末端的耗时对比. 其中, 前者包含了实验的整个过程, 而后者是单次短时的行为结果, 前者比后者更有代表性^[34-35]. b. 焦虑指标, 即小鼠在开放臂活动的时间比例以及进入开放臂的次数比例. 其中, 前者是经典的描述焦虑水平的参数^[30-31], 后

者可能因为小鼠在迷宫中央和开放臂之间快速变换的选择行为而造成较大波动, 前者比后者更加可靠. 因此, 在考查记忆强度和焦虑水平时, 分析各自相关的两个指标, 均以前者为主, 后者为辅.

2.1 利用高架十字迷宫建立小鼠行为模型

为了考查在高架十字迷宫上进行长期行为训练的可行性, 我们让小鼠连续多天经历高架十字迷宫评测实验. 如图 1 所示, 小鼠在 EPM 上的基本行为参数在 15 天连续评测实验后达到稳态. 其中, 图 1a 和图 1b 是小鼠进入一侧闭合臂的次数及在此侧闭合臂的活动时间, 图 1c 和图 1d 是小鼠进入另

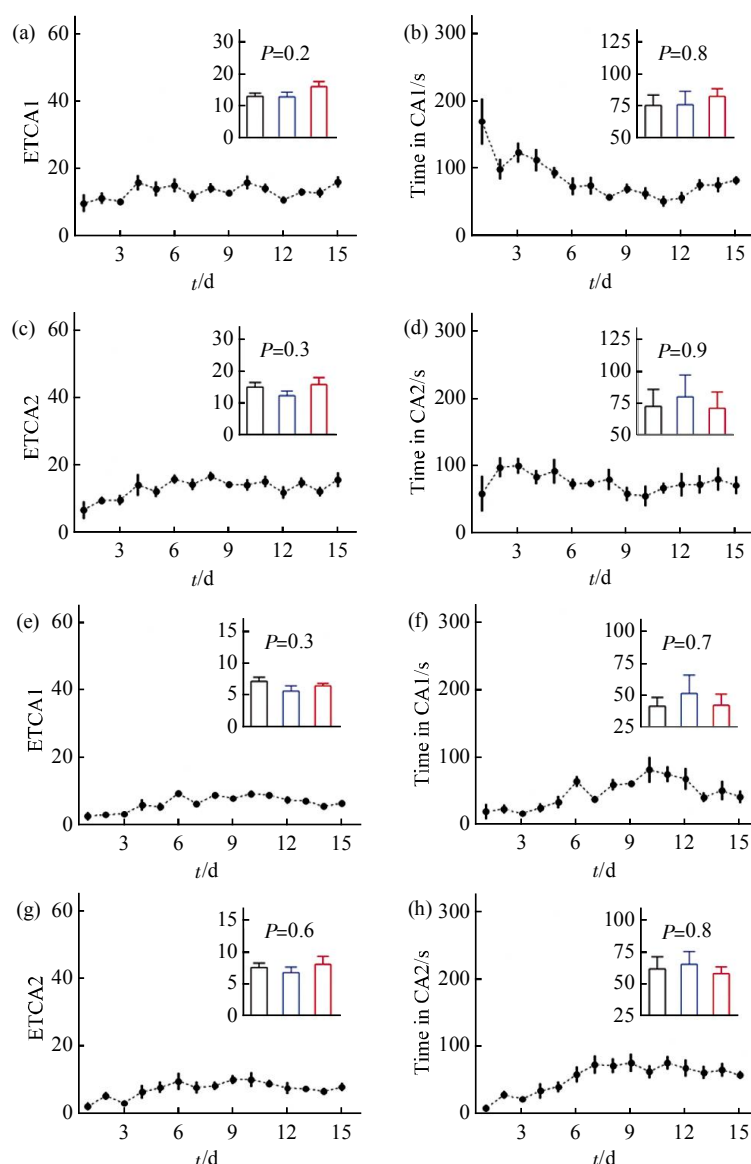


Fig. 1 Consecutive experiences on EPM lead to a steady behavioral state

(a) The entries to close arm 1 (ETCA1) tend to be stable with repeated evaluation of anxiety-related behavior daily on EPM. (b) The time in close arm 1 tend to be stable with repeated evaluation of anxiety-related behavior daily on EPM. (c) Entries to close arm 2, ETCA2. (d) Time in close arm 2. (e) Entries to open arm 1, ETOA1. (f) Time in open arm 1. (g) Entries to open arm 2, ETOA2. (h) Time in open arm 2. Results of the last three days for each parameter are not statistically different (see bar graphs, one-way ANOVA, all $P > 0.05$). $n=8$.

一侧闭合臂的次数及在此侧闭合臂的活动时间, 图 1e 和图 1f 是小鼠进入一侧开放臂的次数及在此侧开放臂的活动时间, 图 1g 和图 1h 是小鼠进入另一侧开放臂的次数及在此侧开放臂的活动时间. 小鼠在经历多次反复评测后, 在 EPM 上行为学的基本参数趋于稳定, 每幅图中右上角的柱状图表示最后 3 天的结果, 使用 one-way ANOVA 做统计分析, 均无显著差异.

接下来考查在 EPM 上短期单次的奖赏训练能否改善焦虑行为. 如图 2 所示, 图 2a 奖赏组在奖赏臂活动时间为 (30.28 ± 5.57) s, 在空白臂活动时间为 (15.39 ± 0.86) s; 空白组在奖赏臂活动时间为 (36.44 ± 11.12) s, 在空白臂活动时间为 (31.11 ± 4.89) s. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应 ($F=0.63$, $P=0.45$), 组内因素 ($F=2.82$, $P=0.12$) 和组间因素 ($F=2.24$, $P=0.16$) 均无显著作用.

图 2b 奖赏组首次到达奖赏臂末端的时长为 (67.44 ± 20.34) s, 首次到达空白臂末端的时长为 (123.89 ± 40.98) s; 空白组首次到达奖赏臂末端的时长为 (78.67 ± 39.62) s, 到达空白臂末端的时长为

(86.39 ± 44.07) s. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应 ($F=1.92$, $P=0.20$), 组内因素 ($F=3.33$, $P=0.10$) 和组间因素 ($F=0.07$, $P=0.80$) 均无显著作用.

图 2c 奖赏组 PTOA 为训练前 $(10.57 \pm 5.44)\%$, 训练后 $(15.22 \pm 1.84)\%$; 空白组 PTOA 为训练前 $(14.04 \pm 4.54)\%$, 训练后 $(19.19 \pm 6.19)\%$. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应 ($F=0.007$, $P=0.93$), 组内因素 ($F=2.78$, $P=0.13$) 和组间因素 ($F=0.37$, $P=0.56$) 均无显著作用.

图 2d 奖赏组 PETOA 为训练前 $(17.06 \pm 4.94)\%$, 训练后 $(22.55 \pm 1.24)\%$; 空白组 PETOA 为训练前 $(39.28 \pm 3.89)\%$, 训练后 $(27.48 \pm 1.81)\%$. RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应 ($F=5.403$, $P=0.042$), 组内因素无显著作用 ($F=0.72$, $P=0.42$), 组间因素存在显著作用 ($F=22.04$, $P<0.001$). 分析组间因素的简单效应, 结果为训练前 ($F=12.47$, $P=0.0054$) 和训练后 ($F=5.04$, $P=0.049$) 组间均存在显著差异.

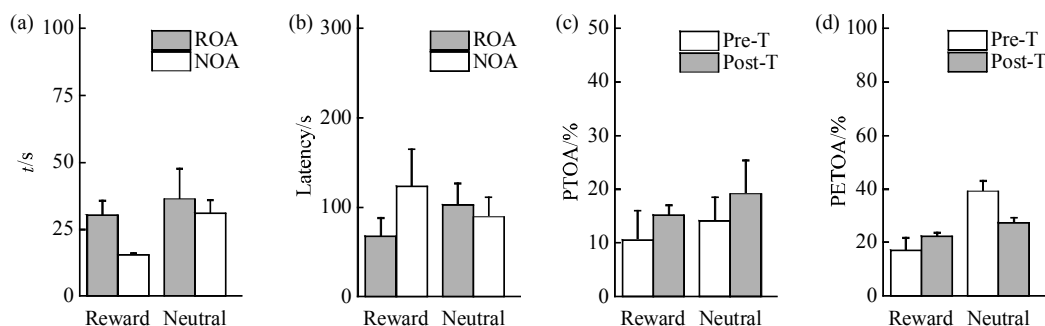


Fig. 2 There is no anxiety relief after short-term reward training on EPM

(a) The time spent by the mice in ROA versus NOA after short-term reward/neutral training on EPM. (b) The latency to ROA end versus NOA end after short-term reward/neutral training on EPM. (c) The percentage of time in open arms (PTOA) after short-term reward/neutral training versus that before training. (d) The percentage of entries to open arms after short-term reward/neutral training versus that before training. $n=8/8$. Abbreviations: ROA, reward open arm, NOA, neutral open arm; Pre-T: pre-training; Post-T: post training.

综上所述, 图 2a, b 表示奖赏组和空白组的记忆行为评测结果, 小鼠在奖赏臂和空白臂的活动无显著差异, 未形成明显的奖赏记忆; 图 2c, d 表示奖赏组和空白组的焦虑行为评测结果, 其 PTOA 和 PETOA 值在训练后无显著提高, 焦虑行为无明显改善.

然后, 参照心理行为疗法中的强制暴露疗法^[49-52], 在没有食物奖赏的条件下, 训练时封闭闭合臂使小

鼠暴露于焦虑行为的诱因——EPM 开放臂, 考查小鼠经过长期反复多次的暴露后能否适应开放高台的环境从而改善其焦虑行为. 如图 3 所示, 图 3a 小鼠在奖赏臂活动时间为 (28.56 ± 2.74) s, 在空白臂活动时间为 (28.39 ± 6.03) s (配对 t 检验, $t=0.03$, $P=0.92$). 图 3b 小鼠首次到达奖赏臂末端的时长为 (102.56 ± 24.13) s, 到达空白臂末端的时长为 (89.11 ± 22.18) s (配对 t 检验, $t=0.49$, $P=0.64$).

图 3c 小鼠 PTOA 为训练前($14.04 \pm 4.54\%$), 训练后($18.98 \pm 2.45\%$) (配对 t 检验, $t=1.38$, $P=0.23$).

图 3d 小鼠 PETOA 为训练前($39.28 \pm 3.89\%$), 训练后($21.42 \pm 2.69\%$) (配对 t 检验, $t=6.69$, $P=0.0011$).

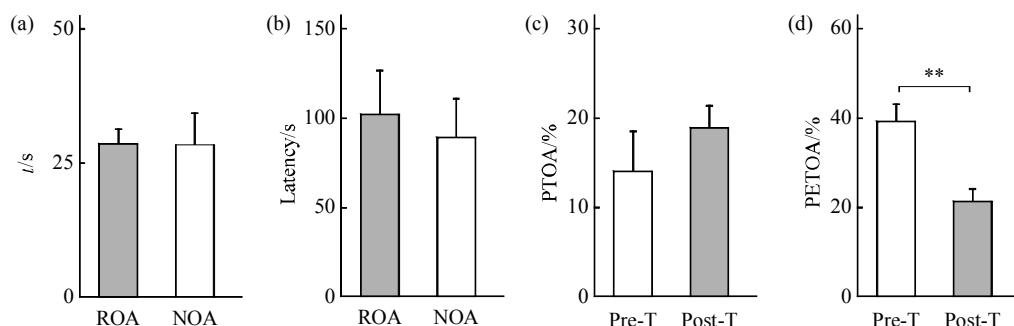


Fig. 3 There is no anxiety relief after long-term repeated exposure to open arms without reward on EMP

(a) The time spent by the mice in ROA versus NOA after long-term repeated forced open-arm exposure on EMP. (b) The latency to ROA end versus NOA end after long-term repeated forced open-arm exposure on EMP. (c) The percentage of time in open arms (PTOA) after long-term repeated forced open-arm exposure versus that before training. (d) The percentage of entries to open arms after long-term repeated forced open-arm exposure versus that before training. $n=8$. Abbreviations: ROA, reward open arm; NOA, neutral open arm; Pre-T, pre-training; Post-T, post-training.

根据上述结果, 不结合食物奖赏, 反复多次将小鼠暴露在高架十字迷宫的开放臂, 不能改善其焦虑行为。图 3d 中 PETOA 作为衡量焦虑行为的指标在训练前后是存在显著差异的, 并且是训练后明显低于训练前——据此衡量的焦虑行为反而恶化。可见在此模型中类似的强制暴露疗法并不适合用于改善小鼠的焦虑行为。

结合上面 3 个实验的结果, 我们推测: 要实现奖赏训练改善焦虑行为, 需要在开放臂末端设置食物奖赏以驱动小鼠在建立奖赏记忆的同时淡化对开放高台的恐惧, 并且这种奖赏训练必须持续重复一定时间才能改善焦虑行为。

2.2 长期奖赏训练能够改善焦虑行为

根据前面的实验结果, 我们制定了奖赏训练改善焦虑行为的范式(参见 1.5.4)。如图 4 所示, 图 4a 奖赏组在奖赏臂活动时间为(75.71 ± 10.24) s, 在空白臂活动时间为(24.45 ± 3.06) s; 空白组在奖赏臂活动时间为(27.70 ± 6.49) s, 在空白臂活动时间为(21.63 ± 6.94) s。RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应($F=14.18$, $P<0.001$), 组内因素($F=22.83$, $P<0.001$)和组间因素($F=9.12$, $P=0.0045$)均存在显著影响。分析组内因素的简单效应, 结果为奖赏组($F=40.55$, $P<0.001$)奖赏臂和空白臂活动时间差异显著, 空白组($F=0.47$, $P=0.50$)无显著差异。分析组间因素的简单效应, 结果为在奖赏臂($F=14.14$, $P<0.001$)组间差异显著, 在空白臂($F=$

0.16 , $P=0.69$)组间无显著差异。

图 4b 奖赏组首次到达奖赏臂末端的时长为(11.64 ± 3.52) s, 到达空白臂末端的时长为(84.82 ± 18.27) s; 空白组首次到达奖赏臂末端的时长为(103.91 ± 24.68) s, 到达空白臂末端的时长为(119.33 ± 24.68) s。RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应($F=5.42$, $P=0.025$), 组内因素($F=12.77$, $P<0.001$)和组间因素($F=7.25$, $P=0.010$)均存在显著影响。分析组内因素的简单效应, 结果为奖赏组($F=19.35$, $P<0.001$)首次到达奖赏臂或空白臂末端历时差异显著, 空白组($F=0.70$, $P=0.41$)无显著差异。分析组间因素的简单效应, 结果为对于奖赏臂($F=16.67$, $P<0.001$)组间差异显著, 对于空白臂($F=1.32$, $P=0.26$)组间无显著差异。

图 4c 奖赏组 PTOA 为训练前($9.52 \pm 2.66\%$), 训练后($33.39 \pm 3.74\%$); 空白组 PTOA 为训练前($8.52 \pm 2.01\%$), 训练后($16.44 \pm 4.20\%$)。RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应($F=6.71$, $P=0.014$), 组内因素($F=26.86$, $P<0.001$)和组间因素($F=6.58$, $P=0.014$)均存在显著影响。分析组内因素的简单效应, 结果为奖赏组($F=33.56$, $P<0.001$)训练前后差异显著, 空白组($F=3.06$, $P=0.089$)训练前后无显著差异。分析组间因素的简单效应, 结果为训练前($F=0.09$, $P=0.77$)组间无显著差异, 训练后($F=9.12$, $P=0.0045$)组间差异显著。

图 4d 奖赏组 PETOA 为训练前($27.91 \pm 3.78\%$),

训练后($42.04 \pm 1.61\%$); 空白组 PETOA 为训练前($22.37 \pm 3.83\%$), 训练后($33.64 \pm 3.44\%$). RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应($F=0.24$, $P=0.63$), 组内因素存在显著影响($F=18.63$, $P<0.001$), 组间因素无显著影响($F=3.90$, $P=0.055$)但

存在明显的差异趋势. 分析组内因素的主效应, 结果为奖赏组($F=12.82$, $P<0.001$)和空白组($F=6.67$, $P=0.014$)训练前后均存在显著差异. 分析组间因素的主效应, 结果为训练前($F=1.04$, $P=0.31$)组间无显著差异, 训练后($F=5.51$, $P=0.024$)组间差异显著.

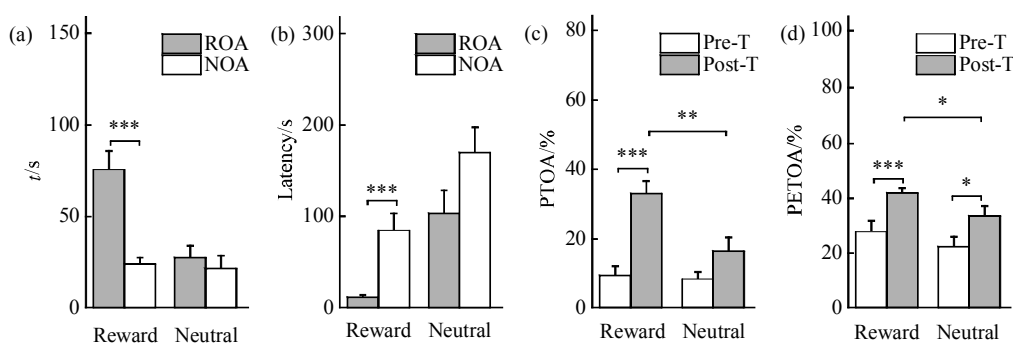


Fig. 4 Reward training relieves anxiety-related behavior

(a) The time spent by the mice in ROA versus NOA after long-term reward/neutral training on EPM. (b) The latency to ROA end versus NOA end after long-term reward/neutral training on EPM. (c) The percentage of time in open arms (PTOA) after long-term reward/neutral training versus that before training. (d) The percentage of entries to open arms after long-term reward/neutral training versus that before training. $n=8/8$.

总结上述结果可知, 奖赏组在高架十字迷宫上接受 5 天的奖赏训练后, 与空白组对比, 形成了和奖赏开放臂空间背景关联的奖赏记忆, 行为上表现为在奖赏臂活动时间比在空白臂长, 进入迷宫后更快地到达奖赏臂末端. 伴随这种奖赏记忆的形成, 奖赏组在高架十字迷宫上的焦虑行为也得到了改善, 即在开放臂活动的时间百分比显著提高, 进入开放臂次数的比例也显著更高. 另外可以看到空白组的 PETOA 在训练前后也存在明显提高, 但在训练后奖赏组的 PETOA 显著高于空白组. 综上所述, 在此基于高架十字迷宫的行为模型中, 长时间的奖赏训练能够让小鼠形成与空间位置相关的奖赏记忆并改善焦虑行为.

行为建模成功以后, 我们的下一步目标是探究奖赏记忆的形成和焦虑行为改善之间的关系以及其中涉及到的细胞分子机制. 假设奖赏记忆的形成是因, 焦虑行为的改善是果. 如果在训练过程中抑制奖赏记忆的形成, 那么焦虑行为的改善也会受到负向的影响. 于是我们使用了致遗忘的药物——蛋白激酶 C 的特异抑制剂 chelerythrine^[53-54]来检验这个假设.

2.3 蛋白激酶 C 对奖赏训练改善焦虑行为是必要的

蛋白激酶 C 的抑制剂 chelerythrine 对奖赏记忆

改善焦虑行为模型产生的影响, 如图 5 所示. 图 5a DMSO 组在奖赏臂活动时间为(107.71 ± 10.06) s, 在空白臂活动时间为(45.93 ± 6.56) s; PKCi 组在奖赏臂活动时间为(30.04 ± 6.05) s, 在空白臂活动时间为(27.32 ± 5.54) s. RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应($F=20.34$, $P<0.001$), 组内因素($F=24.26$, $P<0.001$)和组间因素($F=41.05$, $P<0.001$)均存在显著影响. 对组内因素做简单效应分析, 结果为 DMSO 组($F=39.84$, $P<0.001$)在奖赏臂和空白臂活动时间差异显著, PKCi 组($F=0.098$, $P=0.76$)无显著差异. 对组间因素做简单效应分析, 结果为在奖赏臂($F=47.95$, $P<0.001$)和在空白臂($F=4.76$, $P=0.037$)组间均差异显著.

图 5b DMSO 组首次到达奖赏臂末端的时长为(12.04 ± 2.43) s, 到达空白臂末端的时长为(50.38 ± 14.96) s; PKCi 组首次到达奖赏臂末端的时长为(184.77 ± 24.73) s, 到达空白臂末端的时长为(197.74 ± 26.59) s. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应($F=2.18$, $P=0.15$), 组内因素($F=8.91$, $P=0.0054$)和组间因素($F=29.90$, $P<0.001$)均存在显著影响. 分析组内因素的主效应, 结果为 DMSO 组($F=8.90$, $P=0.0054$)在奖赏臂和空白臂活动时间差异显著, PKCi 组($F=1.29$, $P=0.26$)无显著

差异. 分析组间因素的主效应, 结果为在奖赏臂 ($F=38.03$, $P < 0.001$)和在空白臂 ($F=20.17$, $P < 0.001$)组间均差异显著.

图 5c DMSO 组 PTOA 为训练前(4.05 ± 1.13)%, 训练后(51.21 ± 2.86)%; PKCi 组 PTOA 为训练前(3.25 ± 1.03)%, 训练后(19.12 ± 3.80)%. RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应($F=32.97$, $P < 0.001$), 组内因素($F=133.73$, $P < 0.001$)和组间因素($F=43.94$, $P < 0.001$)均存在显著影响. 对组内因素做简单效应分析, 结果为 DMSO 组($F=133.99$, $P < 0.001$)训练前后差异显著, PKCi 组($F=19.21$, $P < 0.001$)训练前后差异显著. 对组间因素做简单效应分析, 结果为训练前($F=0.27$, $P=0.61$)组间无显著

差异, 训练后($F=41.51$, $P < 0.001$)组间差异显著.

图 5d DMSO 组 PETOA 为训练前(13.88 ± 3.95)%, 训练后(50.65 ± 2.38)%; PKCi 组 PETOA 为训练前(14.51 ± 3.42)%, 训练后(36.34 ± 3.67)%. RMANOVA 分析结果为, 存在显著的交互效应($F=4.43$, $P=0.043$), 组内因素存在显著影响($F=68.14$, $P < 0.001$), 组间因素无显著影响($F=3.97$, $P=0.055$)但有明显差异趋势. 对组内因素做简单效应分析, 结果为 DMSO 组($F=48.01$, $P < 0.001$)训练前后差异显著, PKCi 组($F=21.44$, $P < 0.001$)训练前后差异显著. 对组间因素做简单效应分析, 结果为训练前($F=0.015$, $P=0.90$)组间无显著差异, 训练后($F=9.47$, $P=0.0043$)组间差异显著.

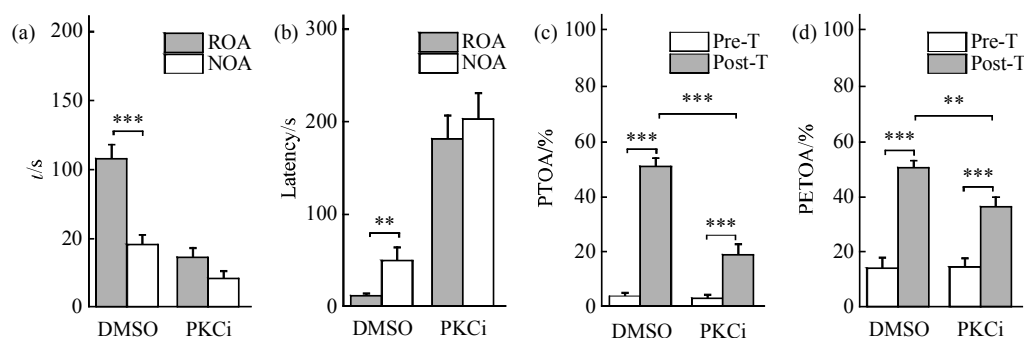


Fig. 5 Chelerythrine inhibits reward memory formation and weakens anxiety relief

(a) The time spent by the mice in ROA versus NOA after long-term reward training with DMSO/PKCi injection on EPM. (b) The latency to ROA end versus NOA end after long-term reward training with DMSO/PKCi injection on EPM. (c) The percentage of time in open arms (PTOA) after long-term reward training with DMSO/PKCi injection versus that before training. (d) The percentage of entries to open arms after long-term reward training with DMSO/PKCi injection versus that before training. $n=8/8$.

概括上述结果为, 在奖赏训练改善焦虑行为的模型中使用蛋白激酶 C 的抑制剂 chelerythrine 后, 抑制剂注射组相比对照组, 其奖赏记忆的形成被抑制, 焦虑行为的改善也被削弱.

因为腹腔注射的给药方式是全身范围的, 为了初步确认 chelerythrine 的药理学功能靶点是奖赏记忆的形成而不是对小鼠行为的直接影响, 我们把此行为模型中奖赏训练改为空白训练以考查其作用, 如图 6 所示. 图 6a DMSO 组在奖赏臂活动时间为(22.76 ± 5.40) s, 在空白臂活动时间为(26.38 ± 8.59) s; PKCi 组在奖赏臂活动时间为(27.33 ± 11.58) s, 在空白臂活动时间为(24.75 ± 6.75) s. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应($F=0.32$, $P=0.59$), 组内因素($F=0.0089$, $P=0.93$)和组间因素($F=0.019$,

$P=0.89$)均无显著影响.

图 6b DMSO 组首次到达奖赏臂末端的时长为(114.00 ± 36.39) s, 首次到达空白臂末端的时长为(117.62 ± 35.34) s; PKCi 组首次到达奖赏臂末端的时长为(126 ± 18.36) s, 到达空白臂末端的时长为(112.58 ± 11.52) s. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应($F=0.18$, $P=0.68$), 组内因素($F=0.059$, $P=0.81$)和组间因素($F=0.0058$, $P=0.94$)均无显著影响.

图 6c DMSO 组 PTOA 为训练前(15.75 ± 3.11)%, 训练后(16.38 ± 4.05)%; PKCi 组 PTOA 为训练前(13.06 ± 2.44)%, 训练后(17.36 ± 6.09)%. RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应($F=0.32$, $P=0.58$), 组内因素($F=0.59$, $P=0.46$)和组间因素($F=$

0.03, $P=0.87$)均无显著影响。

图 6d DMSO 组 PETOA 为训练前(23.91 ± 2.13)%, 训练后(33.68 ± 4.49)%; PKCi 组 PETOA 为训练前(22.59 ± 1.91)%, 训练后(36.36 ± 7.07)%。RMANOVA 分析结果为, 不存在显著的交互效应($F=0.29$, $P=$

0.60), 组内因素存在显著影响($F=10.11$, $P=0.011$), 组间因素无显著影响($F=0.021$, $P=0.89$)。分析组内因素的主效应, 结果为 DMSO 组($F=4.79$, $P=0.056$)训练前后无显著差异但差异趋势明显, PKCi 组($F=5.44$, $P=0.045$)训练前后差异显著。

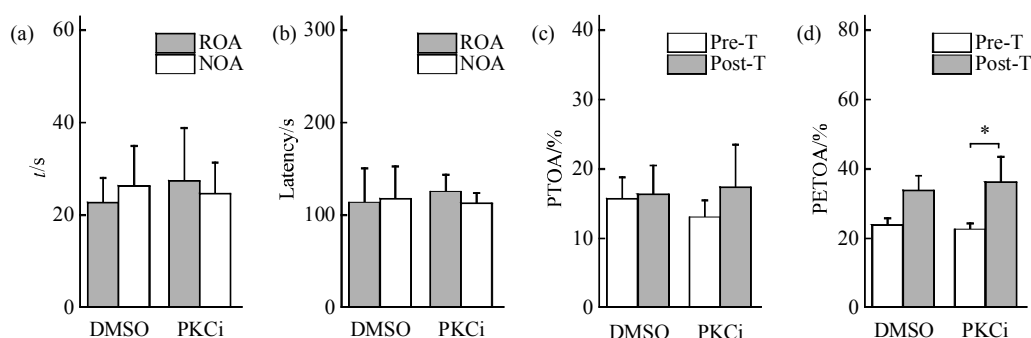


Fig. 6 Chelerythrine does not affect the behavior of neutral-trained mice

(a) The time spent by the mice in NOA1 versus NOA2 after long-term neutral training with DMSO/PKCi injection on EPM. (b) The latency to NOA1 end versus NOA2 end after long-term neutral training with DMSO/PKCi injection on EPM. (c) The percentage of time in open arms (PTOA) after long-term neutral training with DMSO/PKCi injection versus that before training. (d) The percentage of entries to open arms after long-term neutral training with DMSO/PKCi injection versus that before training. $n=8/8$.

上面的分析结果表明, 在没有食物奖赏的情况下, chelerythrine 注射组在空白训练中与对照组相比对小鼠的记忆或焦虑相关的行为无显著影响。此结果进一步证明 chelerythrine 是通过抑制 PKC 来阻断奖赏记忆的形成并削弱焦虑行为的改善, 也证明了蛋白激酶 C 对于奖赏训练改善焦虑行为的必要性。Chelerythrine 相关的药理学行为实验提示了此模型中细胞分子机制的研究方向。

3 讨 论

我们的研究表明, 在高架十字迷宫上奖赏训练能诱导小鼠形成奖赏记忆并改善焦虑行为。如果使用有致遗忘效果的蛋白激酶 C 的抑制剂 chelerythrine, 则会阻断奖赏记忆的形成并削弱焦虑行为的改善。这些研究结果为心理行为疗法中正向积极的记忆缓解焦虑提供了动物模型并初步指出了相关机制的研究方向。

前人的研究暗示焦虑症的病灶可能位于前额叶皮层、杏仁核和海马及其间的神经环路^[1, 55]。这些脑区同时也是大脑信息存储的关键区域, 例如前额叶皮层负责背景情境记忆, 海马和空间记忆密切相关, 杏仁核则主控恐惧情绪记忆^[12-14, 56-57]。另外, 焦虑还会严重影响记忆, 比如重度焦虑症病人会对

周遭环境产生脱离现实的记忆认知^[26-28]。因此, 焦虑和记忆在结构及功能上都存在高度的重叠。我们的研究正是基于这一点展开的, 初步的结果表明奖赏记忆能够驱动小鼠克服对开放高台的恐惧进而弱化其焦虑行为, 这一行为受到蛋白激酶 C 的抑制剂 chelerythrine 的抑制。

进一步探讨此模型涉及的细胞分子机制, 我们依然聚焦于前额叶皮层、海马和杏仁核的神经功能环路。在脑区水平, 根据在模型中偏重于和奖赏关联的空间记忆的形成, 我们的目标定位于海马。因为最新的相关综述^[11, 16]总结了过去的研究并指出, 海马是影响记忆和焦虑的关键脑区。当然, 其他脑区比如前额叶和杏仁核也会对记忆和焦虑施加影响^[1, 58], 因为这些脑区彼此间存在神经功能投射, 组成了功能上互相影响的神经环路^[59-61], 它们的相互作用共同编码了记忆和情绪。因此, 对其中一个环节的研究结果在某一方面代表了整个神经环路的变化, 其细胞分子机制在很大程度上是共通的。

在细胞水平, 海马中存在两种主要的神经元, 即兴奋性椎体神经元和抑制性中间神经元, 前者典型的神经递质为谷氨酸, 后者为 γ 氨基丁酸。在学习记忆的神经网络中, 这两类神经元往往共同参与调控相关的神经生理过程, 以达到功能平衡^[21]。衡

量神经网络学习记忆功能的主要指标是其中神经元的突触可塑性, 即神经元彼此间信息传递与整合的调控能力。在行为模型中, 短期的奖赏训练虽然能留下记忆痕迹, 却不能改善焦虑行为。从奖赏记忆形成到焦虑行为改善是一个长期的过程, 我们推测这涉及到整个神经网络的突触功能上调, 可能包括了现有突触在形态和功能上的增强以及新的突触生成。因此对奖赏记忆改善焦虑行为进行研究的下一个潜在目标就是其学习记忆网络中兴奋性神经元和抑制性神经元的突触可塑性, 包括结构上的可塑性——突触形态学分析, 以及功能上的可塑性——突触传递的长时程增强^[62], 等等。

在分子水平, 我们研究的着手点是蛋白激酶 C^[41]。蛋白激酶 C 是一个蛋白激酶家族, 是从细胞生长分化到突触可塑性变化尤其是 LTP 诱导表达等多个神经细胞活动的必需环节^[41, 45, 63-64]。在哺乳动物的几种关联学习行为中, PKC 在大脑海马中的表达及分布伴随着动物的学习记忆进程, PKC 被抑制时海马突触传递强度及动物行为都被削弱, 提示了 PKC 在学习记忆中的重要作用^[44, 48]。我们的实验结果在一定程度上证明了蛋白激酶 C 对于奖赏记忆改善焦虑行为是非常重要且必要的, 下一步还可以利用更先进的实验方法将 PKC 抑制剂特异作用于某一脑区, 或者以分子手段增强 PKC 表达来全面考查其作用机制。

参 考 文 献

- [1] Bishop S J. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends Cogn Sci*, 2007, **11**(7): 307-316
- [2] Anand A, Shekhar A. Brain imaging studies in mood and anxiety disorders: special emphasis on the amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, **985**: 370-388
- [3] Bremner J D. Brain imaging in anxiety disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2004, **4**(2): 275-284
- [4] Damsa C, Kosel M, Moussally J. Current status of brain imaging in anxiety disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 2009, **22** (1): 96-110
- [5] Davidson R J. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. *Biological Psychiatry*, 2002, **51**(1): 68-80
- [6] Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004, **5**(7): 545-552
- [7] Myers-Schulz B, Koenigs M. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Mol Psychiatry*, 2012, **17**(2): 132-141
- [8] Roozendaal B, McEwen B S, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, **10**(6): 423-433
- [9] Rauch S L, Shin L M, Wright C I. Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, **985**: 389-410
- [10] Spanis C W, Bianchin M M, Izquierdo I, *et al.* Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Research*, 1999, **816**(2): 329-336
- [11] Byrne P, Becker S, Burgess N. Remembering the past and imagining the future: a neural model of spatial memory and imagery. *Psychological Review*, 2007, **114**(2): 340-375
- [12] Lansner A. Associative memory models: from the cell-assembly theory to biophysically detailed cortex simulations. *Trends in Neurosciences*, 2009, **32**(3): 178-186
- [13] Mayes A, Montaldi D, Migo E. Associative memory and the medial temporal lobes. *Trends Cogn Sci*, 2007, **11**(3): 126-135
- [14] Kennerley S W, Wallis J D. Reward-dependent modulation of working memory in lateral prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2009, **29**(10): 3259-3270
- [15] Bannerman D M, Rawlins J N P, Mchugh S B, *et al.* Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Biobehav R*, 2004, **28**(3): 273-283
- [16] Bannerman D M, Sprengel R, Sanderson D J, *et al.* Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 2014, **15**(3): 181-192
- [17] Kaluff A V. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural Plasticity*, 2007, **2007**: 78171
- [18] Hoffman E J, Mathew S J. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 2008, **75**(3): 248-262
- [19] Cortese B M, Phan K L. The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr*, 2005, **10**(10): 820-830
- [20] Simon A B, Gorman J M. Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. *NeuroRx*, 2006, **3**(1): 57-68
- [21] Zhang F, Liu B, Lei Z, *et al.* mGluR(1), 5 activation improves network asynchrony and GABAergic synapse attenuation in the amygdala: implication for anxiety-like behavior in DBA/2 mice. *Mol Brain*, 2012, **5**: 20
- [22] Amiel J M, Mathew S J. Glutamate and anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep*, 2007, **9**(4): 278-283
- [23] Dell'osso B, Buoli M, Baldwin D S, *et al.* Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. *Hum Psychopharmacol*, 2010, **25**(1): 17-29
- [24] Crestani F, Lorez M, Baer K, *et al.* Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci*, 1999, **2**(9): 833-839
- [25] Ravindran L N, Stein M B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2010, **71**(7): 839-854
- [26] Becker E S, Roth W T, Andrich M, *et al.* Explicit memory in anxiety disorders. *J Abnorm Psychol*, 1999, **108**(1): 153-163
- [27] Coles M E, Heimberg R G. Memory biases in the anxiety disorders:

- current status. *Clin Psychol Rev*, 2002, **22**(4): 587–627
- [28] McNally R J. Memory and anxiety disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1997, **352**(1362): 1755–1759
- [29] Tryon W W, McKay D. Memory modification as an outcome variable in anxiety disorder treatment. *J Anxiety Disord*, 2009, **23**(4): 546–556
- [30] Pellow S, Chopin P, File S E, *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 1985, **14**(3): 149–167
- [31] Lister R G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, **92**(2): 180–185
- [32] Frussa-Filho R, Otoboni J R, Uema F T, *et al.* Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze: effects of age and isolation. *Braz J Med Biol Res*, 1991, **24**(7): 725–728
- [33] Graeff F G, Viana M B, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res*, 1993, **26**(1): 67–70
- [34] Silva R H, Bellot R G, Vital M a B F, *et al.* Effects of long-term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice. *Psychopharmacology*, 1997, **129**(4): 322–328
- [35] Godinho M, Ribeiro A M, Fernandes V S, *et al.* A rodent model of appetitive discrimination with concomitant evaluation of anxiety-like behavior. *J Neurosci Methods*, 2009, **185**(1): 82–88
- [36] Neves G, Cooke S F, Bliss T V P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 2008, **9**(1): 65–75
- [37] Okamoto K, Bosch M, Hayashi Y. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag?. *Physiology (Bethesda)*, 2009, **24**: 357–366
- [38] Peng J, Kim M J, Cheng D, *et al.* Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem*, 2004, **279**(20): 21003–21011
- [39] Wang J H, Kelly P T. Postsynaptic injection of Ca^{2+} /CaM induces synaptic potentiation requiring CaMKII and PKC activity. *Neuron*, 1995, **15**(2): 443–452
- [40] Kandel E R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain*, 2012, **5**: 14
- [41] Wang J H, Feng D P. Postsynaptic protein kinase C essential to induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(7): 2576–2580
- [42] Dash P K, Moore A N, Kobori N, *et al.* Molecular activity underlying working memory. *Learning & Memory*, 2007, **14**(8): 554–563
- [43] Keenan C, Goode N, Pears C. Isoform specificity of activators and inhibitors of protein kinase C gamma and delta. *FEBS Letters*, 1997, **415**(1): 101–108
- [44] Liu B, Feng J, Wang J H. Protein kinase C is essential for kainate-induced anxiety-related behavior and glutamatergic synapse upregulation in prelimbic cortex. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2014, **20**(11): 982–990
- [45] Van Kolen K, Pullan S, Neefs J M, *et al.* Nociceptive and behavioural sensitisation by protein kinase Cepsilon signalling in the CNS. *Journal of Neurochemistry*, 2008, **104**(1): 1–13
- [46] Malinow R, Schulman H, Tsien R W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 1989, **245**(4920): 862–866
- [47] Malenka R C, Madison D V, Nicoll R A. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*, 1986, **321**(6066): 175–177
- [48] Li L, You L, Sunyer B, *et al.* Hippocampal protein kinase C family members in spatial memory retrieval in the mouse. *Behav Brain Res*, **258**: 202–207
- [49] Sakano Y. Cognitive behavior therapy for anxiety disorders: clinical tips for introducing exposure treatment. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, 2013, **115**(4): 421–428
- [50] Irgens A. Exposure therapy for anxiety disorders in a psychiatric ward. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2000, **120**(18): 2118–2121
- [51] McNally R J. Mechanisms of exposure therapy: how neuroscience can improve psychological treatments for anxiety disorders. *Clinical Psychology Review*, 2007, **27**(6): 750–759
- [52] Hofmann S G. Cognitive processes during fear acquisition and extinction in animals and humans: implications for exposure therapy of anxiety disorders. *Clinical Psychology Review*, 2008, **28**(2): 199–210
- [53] Serrano P A, Rodriguez W A, Pope B, *et al.* Protein kinase C inhibitor chelerythrine disrupts memory formation in chicks. *Behavioral Neuroscience*, 1995, **109**(2): 278–284
- [54] Sacchetti B, Bielavska E. Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat. *Brain Res*, 1998, **799**(1): 84–90
- [55] Rickels K, Rynn M. Overview and clinical presentation of generalized anxiety disorder. *The Psychiatric Clinics of North America*, 2001, **24**(1): 1–17
- [56] Bianchin M, Mello E Souza T, Medina J H, *et al.* The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 1999, **71**(2): 127–131
- [57] Wasserman E A, Miller R R. What's elementary about associative learning? *Annual Review of Psychology*, 1997, **48**: 573–607
- [58] Kennerley S W, Walton M E. Decision making and reward in frontal cortex: complementary evidence from neurophysiological and neuropsychological studies. *Behavioral Neuroscience*, 2011, **125**(3): 297–317
- [59] Del Arco A, Mora F. Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders. *Journal of Neural Transmission*, 2009, **116**(8): 941–952
- [60] Mega M S, Cummings J L, Salloway S, *et al.* The limbic system: an anatomic, phylogenetic, and clinical perspective. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 1997, **9**(3): 315–330
- [61] Stathis P, Panourias I G, Themistocleous M S, *et al.* Connections of

- the basal ganglia with the limbic system: implications for neuromodulation therapies of anxiety and affective disorders. *Acta Neurochirurgica Supplement*, 2007, **97**(Pt 2): 575–586
- [62] Wang J H, Ko G Y, Kelly P T. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 1997, **14**(4): 264–293
- [63] Govoni S, Amadio M, Battaini F, *et al.* Senescence of the brain: focus on cognitive kinases. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, **16**(6): 660–671
- [64] Sun M K, Alkon D L. Protein kinase C pharmacology: perspectives on therapeutic potentials as antidementic and cognitive agents. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 2006, **1**(2): 147–156

A Rodent Model of Reward Memory Relieving Anxiety-related Behavior on Elevated Plus Maze*

LEI Zhuo-Fan^{1,2)}, WANG Jin-Hui^{1,2)**}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Anxiety disorders, including some of the most prevalent mental disorders in our society, are generally treated by drugs and psychological therapies. The latter is preferred for better effectiveness and less side-effects and is believed to relieve anxiety status by the beneficial effects of positive memory. However, the corresponding animal model is absent and related mechanisms underlying psychological therapies remain elusive. Based on the elevated plus maze for evaluation of rodent anxiety-related behavior, we used food reward at one open arm to train the mice to form reward memory and to challenge the open arms. The reward-trained mice preferred the reward open arm than the neutral one and stayed longer in open arms than those neutral-trained mice even in the final test without reward. Chelerythrine, a protein kinase C inhibitor, was proven to impair the formation of reward memory and the relief of anxiety-related behavior. Our studies confirm the efficacy of psychological therapy against anxiety disorders and shed light on its cellular mechanism.

Key words elevated plus maze, reward memory, anxiety-related behavior, protein kinase C

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0330

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program (2013CB531304, 2011CB504405) and The National Natural Science Foundation of China (30990261, 81171033, 81471123).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888472, E-mail: jhw@sun5.ibp.ac.cn

Received: November 6, 2014 Accepted: May 25, 2015