

《心理学报》审稿意见与作者回应

题目：普萘洛尔修复即刻消退产生的二次创伤

作者：王红波 邢小莉 王慧颖

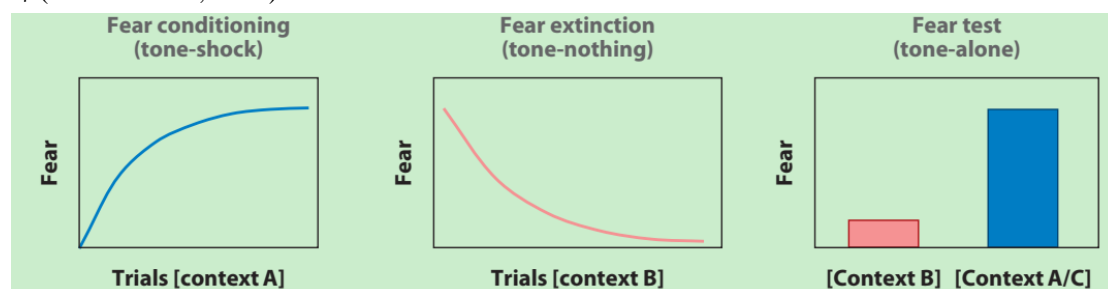
第一轮

审稿人 1 意见：

意见 1：在审稿人看来，传统的消退方法是在同一环境中实现恐惧获得、消退和再检测，而本研究中恐惧获得与消退、再检测是不同的环境。作者需要对这种实验设计的目的和依据做出解释；并且，再检测的环境与获得的环境不一致，那么再检测的结果为何能说明它代表了恐惧消退呢（从流程图上可以看出，动物在环境 B 并没有接受电击）？审稿人也见到国外学者有采用类似于这种实验设计的，但与本文的研究目的并不相同。

回应：感谢专家的意见。依据作者查阅的文献来看，在哪个环境中消退，依据研究目的而定。审稿人说的在同一环境中实现恐惧获得、消退和再检测这一情况见于情境条件性恐惧（contextual fear conditioning）。在情境条件性恐惧范式中，消退就只能在恐惧获得环境下进行，否则就无法发生消退过程，而要评估消退记忆保持的效果，测试就必须在消退训练发生的环境中进行。所以，恐惧获得、消退和再检测都发生在同一环境中。

事实上，在线索条件性恐惧（文献中多用声音作为线索，fear conditioning to a tone）范式中，传统的消退方法更多是在一个不同于恐惧获得的环境中进行，这是因为考虑到生态效度，患 PTSD 的个体都是去治疗师的治疗室里进行暴露治疗（即消退）并在治疗室评估治疗的效果，所以多采用 ABB 模式（即 A 环境获得，B 环境消退和 B 环境测试），见综述类文章(Vervliet et al., 2013)。



图片来源于(Vervliet et al., 2013)

相同的实验设计可以用于研究不同的内容，条件性恐惧只是一种实验范式，服务于不同的研究目的。

意见 2：关键的实验步骤或设计需要补充参考文献，例如，作者在不足之处提到的药物剂量，既然知道使用一个剂量有些不完整，为何还要这样实验呢？在分析与他人结果不同时提到“实验参数设置不同”，那么本实验的参数为何这样设置呢？

回应：感谢专家的意见。关于实验参数的设置：

纵观做条件性恐惧的动物实验的文献，本文作者发现除了出自同一个实验室或同一作者的文献，其他文献的恐惧获得、消退和测试的参数几乎都不相同。即使是同一实验室或同一作者的文献，参数也未必相同。这些文献只报告了实验参数，鲜有作者解释为什么选

取这样的实验参数。其实，实验参数的设置往往是根据前人的文献和作者本人或作者所在实验室的前期实验结果，以及根据研究目的而设定。

不过有些文献在药物剂量的选取上会提到参考依据，所以作者在正文中添加了参考依据，见正文“剂量的选取是基于以往采用单一剂量(10mg/kg)普萘洛尔的行为学研究(Fan et al., 2011; Fitzgerald et al., 2015; Khan et al., 2018; Muravieva & Alberini, 2010; Przybyslawski et al., 1999; Robinson & Franklin, 2010; Rodriguez-Romaguera et al., 2009; Taherian et al., 2014), 显示这一剂量能显著降低恐惧水平而不影响消退的获得、巩固和提取(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)。”

意见 3: 建议讨论部分增加所使用的药物作用机制。

回应: 感谢专家的建议。使用的药物为 β -肾上腺素受体阻断剂普萘洛尔(propranolol)，用于降低去甲肾上腺素(norepinephrine)水平，在引言部分第四段讲述了不同水平的 NE 对恐惧和消退学习的影响。根据审稿人的建议，在讨论部分增加，见第 6 段“其机制可能是普萘洛尔稳定了 mPFC 的神经活动，避免了 mPFC 的功能被即刻消退进一步损害(Fitzgerald et al., 2015)，阻止了应激诱导的 BLA 神经元放电的增加(Giustino et al., 2020)，即使此时呈现 CS，也不会引起 BLA 对 CS 的过度敏感化，所以第二天重消退产生的消退记忆可以正常获得和巩固，导致消退后测试中恐惧反应降低。”

意见 4: 建议有些语言表述更严谨一些。例如，“给我近十万人带来严重生命威胁，被感染的患者及其密切接触的人群都有可能患上 PTSD”，有夸大之嫌；“有必要探讨严重创伤后的即刻消退只是单纯的记忆巩固受到应激的破坏而出现效果缺损，还是即刻消退本身是二次创伤事件，会持续地损害消退学习能力，反而增加 PTSD 发生的可能性。”审稿人认为，无论是本研究假设还是结果，很难与“增加 PTSD 发生的可能性”建立直接联系。

回应: 感谢专家的建议和意见。已修改为“2020 年新冠肺炎爆发，我国数万人感到生命受到威胁，其中一些人可能会因此事件而患上 PTSD。”

消退学习是学习之前预示危险或威胁的刺激不再跟随危险或威胁，从而降低对该刺激的恐惧。如果个体的消退学习能力受到损害，那么 ta 将在安全环境下对刺激表现出恐惧。缺乏恐惧消退能力被认为是焦虑和创伤相关障碍的一种稳健的临床内表型(Wicking et al., 2016)，在当前的 RDoC(研究领域标准)中具有特殊意义(Singewald & Holmes, 2019)。所以消退能力受到损害会增加 PTSD 发生的可能性。

本研究采用的条件性恐惧范式是公认的研究 PTSD 的重要范式之一。Norrholm 和 Jovanovic(2018)描述了恐惧习得和消退的转化研究，以及它们与 PTSD 和 PTSD 治疗的相关性。

本研究的假设是基于即刻消退本身已出现效果缺损现象，探究的是即刻消退是否会引起之后的消退继续出现缺损，即，即刻消退是否会损害消退能力。研究结果显示，即刻消退不但本身出现效果缺损，还会引起第二天的重消退出现效果缺损，但如果之前没有发生即刻消退，那么第二天的重消退就可以显著降低恐惧反应。这表明即刻消退损害了消退学习的能力，消退能力受损确实会增加 PTSD 发生的可能性。

.....

审稿人 2 意见:

作者考察了“普萘洛尔修复即刻消退产生的二次创伤”；总体而言，研究问题及研究结论有意义；但是从实验设计，到结果意义的解释等方面，依然有很多问题需要作者澄清：

意见 1: 本实验为 A（恐惧获得）-B（恐惧消退，及消退记忆提取）模式，根本不涉及到“续新”模式；作者在实验程序部分提及“续新”是错误的（section 2.3, line 5）。

回应: 感谢专家指正，已修改。

意见 2: 作者在文中提及，消退中 10-15CS 之后，消退的动物会出现大量的“休息”行为，休息行为与 freezing 行为出现混淆，并因此只呈现了 10 个 CS 的消退结果，并只统计了前 4 个 CS 的“消退记忆提取”的结果；未来研究中，最好能通过计算机 freezing 编码与人工编码相互接合的方式，以确认真实的 freezing 行为，更为适当。

回应: 感谢专家的建议。好的。事实上，作者和实验室同事试过计算机 freezing 编码与人工编码相结合的方式，但在某些 trial 上，特别是当大鼠尾部对着人，头部对着某个角落这一姿势似动不动时，实难区分是休息行为还是 freezing 行为，往往都是根据大鼠前一刻的表现而判断。在本研究中，重点是测试消退记忆的保持。以往的动物研究也是用 4~5 个 CS 来测试消退记忆的保持，本研究中的前 4 个 CS 计算机编码的 freezing 值是经人工编码再确认过的。

意见 3: 关于实验 1：在审稿人看来，目前结果只能证明即刻消退无法引发动物的消退记忆巩固，以及“即刻消退缺损”现象的存在；但是无法确认即刻消退“引起了二次创伤”。需要作者给出进一步解释。

回应: 感谢专家的意见。消退 2 前 4 个 CS 是测试消退 1 的效果，消退后测试主要测试消退 2 的效果。从图 1D 来看，即刻消退组的测试阶段与消退 1 和 2 都没有显著差异($p=0.19$)，表明消退 2 也没有消退效果。从图 1C 来看，在测试阶段，即刻消退组和即刻不消退组无显著差异，也表明不但即刻消退没有效果，在即刻消退后第二天进行的消退 2 也没有起到消退的效果。即刻消退组的消退 2 是发生在恐惧获得后的第二天，如同延迟消退组的消退 1，已不再是即刻消退了。从图 1D 可以看出，延迟消退组的消退 1 显著降低了恐惧反应，而即刻消退组的消退 2 并没有显著降低恐惧反应。如果没有发生即刻消退，那么第二天的消退（延迟消退组的消退 1）将可以显著降低恐惧反应。综上，即刻消退组的消退 2 没有消退效果表明即刻消退不但自身效果缺损，还会引起之后再消退的效果缺损，暗示即刻消退是二次创伤事件。

意见 4: 关于实验 2，在恐惧训练后 1 小时给予药物处理，确实可以修复“即刻消退缺损”效应，但是药物到底“影响了哪一个阶段的恐惧及消退记忆”依然不够清楚；可以考虑增加给药的实验组，增加在消退 2 前 1 小时，与最后一个测试前 1 小时给与药物，将有助于结果意义的澄清。

回应: 感谢专家的意见和建议。记忆的四个阶段：获得（编码）、巩固（储存）、提取和再巩固。本研究中普萘洛尔是在恐惧记忆获得后和消退训练之前注射，根据实验设计，本研究涉及恐惧记忆巩固和提取阶段，以及消退记忆的获得、巩固和提取阶段。

在恐惧获得后立即给普萘洛尔，1 小时后进行消退 1，从消退 1 可以得知普萘洛尔没有影响恐惧的表达，而第二天消退 2 前 4 个 CS 的均值和消退 1 前 4 个 CS 的均值没有显著性差异（图 2C），都呈现较高的 freezing 水平，表明普萘洛尔也没有影响恐惧记忆的巩固和提取，所以消退后测试中恐惧反应的降低，不能解释为普萘洛尔损害了恐惧记忆的巩固和提取。

在恐惧获得后立即给普萘洛尔, 1 小时后进行消退 1, 第二天消退 2 前 4 个 CS 的均值与消退 1 前 4 个 CS 的均值以及盐水组均没有显著性差异(图 2C), 即出现即刻消退缺损, 表明普萘洛尔并没有挽救即刻消退受损的巩固过程(在盐水组, 即刻消退产生的消退记忆的巩固过程本来就受到了应激的破坏, 所以不能认为普萘洛尔破坏了消退记忆的巩固)。但消退后测试的恐惧水平显著低于消退 2 和盐水组, 表明普萘洛尔挽救了即刻消退引发的重消退缺损。其机制可能是普萘洛尔稳定了 mPFC 的神经活动, 避免了 mPFC 的功能被即刻消退进一步损害(Fitzgerald et al., 2015), 阻止了应激诱导的 BLA 神经元放电的增加(Giustino et al., 2020), 即使此时呈现 CS, 也不会引起 BLA 对 CS 的过度敏感化, 所以第二天重消退产生的消退记忆可以正常获得和巩固, 导致消退后测试中的恐惧反应降低。

普萘洛尔之所以没有挽救即刻消退受损的巩固过程, 可能是因为恐惧记忆和消退记忆的巩固过程在时间上太过接近, 消退记忆的巩固会受到恐惧记忆的前摄干扰。以及恐惧获得训练和消退训练在时间上接近, 但仍有一段时间间隔且发生在不同的环境里, 所以两者之间存在事件边界, 根据 Dunsmoor 等人(2018)的理论, 事件边界引导选择性巩固, 优先巩固记忆中的情绪信息(恐惧记忆)——以牺牲不久后经历的相关但冲突的信息(消退记忆)为代价。

综上所述, 条件性恐惧获得后系统注射的 10mg/kg 普萘洛尔不影响恐惧记忆的巩固和提取, 也没有挽救即刻消退受损的巩固过程, 但避免了参与消退记忆巩固的前额叶的功能被即刻消退进一步损害, 从而使第二天重消退产生的消退记忆可以正常巩固和提取。

本研究的题目是“普萘洛尔修复即刻消退产生的二次创伤”, 前文已解释了根据实验 1 显示即刻消退会引起第二天重消退的效果缺损, 而提出即刻消退是二次创伤事件, 而普萘洛尔确实修复了即刻消退引起的消退能力缺损。也解释了普萘洛尔对恐惧记忆和消退记忆各阶段的影响。所以研究内容和结果是符合题目的。

审稿人建议补做实验组(在消退 2 和测试前 1 小时给普萘洛尔), 已有研究发现, 在(恐惧获得后第二天进行)消退(相当于消退 2)前 20 分钟系统注射普萘洛尔(10mg/kg)会显著降低消退过程中大鼠的恐惧水平但不影响消退记忆的获得、巩固和第二天的提取, 也不能阻止第四天恐惧重建(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)。这表明消退前给普萘洛尔只是急性降低了消退过程中的恐惧水平(或许是暂时地抑制了恐惧记忆的提取), 对消退记忆各阶段没有影响。这一结论也得到了人类研究的支持(Chalkia et al., 2019)。所以, 根据前人的研究结果, 在消退 2 前 1 小时给普萘洛尔的实验组可能会在消退 2 过程中表现出较低的恐惧水平, 然后在测试中也表现出较低的恐惧水平, 而测试中较低的恐惧水平一种可能是由于恐惧记忆被消退记忆抑制(这同本研究中的普萘洛尔组), 另一种可能是因为普萘洛尔继续抑制了恐惧记忆的提取, 这样反而使结果解释更复杂。同样, 在测试前 1 小时给普萘洛尔的实验组, 会在测试中表现出较低的恐惧水平, 只能说明普萘洛尔降低了恐惧水平或抑制了恐惧记忆的提取, 仍然没有帮助解释恐惧获得后立即给的普萘洛尔为什么能修复即刻消退引起的重消退的缺损。综上所述, 补做消退 2 和测试前 1 小时给普萘洛尔的实验组不能有助于对本结果意义的进一步解释。

不过, 审稿人“在消退 2 前给普萘洛尔”的建议有助于考察即刻消退后, 当消退能力已受损时, 在之后的重消退前给普萘洛尔是否能使消退记忆正常的获得、巩固和提取, 我们将接下来进行研究(在文中的不足部分增加了“第四, 没有探究即刻消退后, 当消退能力已受损时, 重消退前给普萘洛尔是否也能使消退记忆正常的获得、巩固和提取。我们将在未来探究这些内容。”), 在此感谢审稿人的建议。

第二轮

审稿人 1 意见:

修改稿基本回答了审稿人提出的问题，但仍有几处建议进一步修改：

意见 1：审稿人第一次意见中提到“有必要探讨严重创伤后的即刻消退只是单纯的记忆巩固受到应激的破坏而出现效果缺损，还是即刻消退本身是二次创伤事件，会持续地损害消退学习能力，反而增加 PTSD 发生的可能性”，这句话无论是本研究假设还是结果，很难与“增加 PTSD 发生的可能性”建立直接联系”，是指这是作者的推论，而这一推论本实验并不能证明或者得到检验。因此，把它作为立论依据有些不妥。

回应：感谢专家的建议。已修改，删除了“反而增加 PTSD 发生的可能性”，并修改了之前句子的顺序，修改为：有必要探讨严重创伤后的即刻消退只是单纯的记忆巩固受到应激的破坏而出现效果缺损，还是即刻消退本身是二次创伤事件，会持续地损害消退学习能力。由于消退学习能力缺损与 PTSD 症状有关，被认为是一种稳健的 PTSD 临床内表型(Giustino et al., 2016; Wicking et al., 2016)，在当今“研究领域标准(research domain criteria, RDoC)”时代下具有特殊的意义(Singewald & Holmes, 2019)。

意见 2：重要的实验参数应该是有一定依据的：要么是根据文献梳理，就像作者补充的所选择的药物剂量一样（常规做法还应该通过预实验进行检验）；要么是在一定的理论依据支持下提出新的实验设置参数。这部分内容仍然建议作者补充，从而使实验设计更为严谨，尤其是作者在讨论中提到的“可能是因为给药的时间点和消退训练的时间点都与前人的研究不同”。那么，这种不同于前人的参数设置依据和原因是什么呢？

回应：感谢专家的建议。已给出依据和原因，见 2.3 部分的红色字体。

之所以说“给药的时间点和消退训练发生的时间点与前人的研究不同”是因为前人研究的是普萘洛尔对延迟消退（恐惧获得后第二天）的影响(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)，而本研究考察普萘洛尔能否修复即刻消退引起的重消退缺损。前人关注延迟消退，本研究关注即刻消退，所以消退训练发生的时间点不同。

本研究的给药时间点和剂量都同 Fitzgerald 等人（2015）的研究，都是在恐惧获得后立即系统注射，都是单一剂量 10mg/kg。但 Fitzgerald 等人（2015）的研究是在即刻消退前 30min 给药。之所以选择在即刻消退前 1 小时给药，是因为前人关于普萘洛尔对消退记忆影响的研究结果并不一致。例如，有研究报道延迟消退前 20 分钟系统注射普萘洛尔（10mg/kg）会降低消退过程中的恐惧水平但不影响消退记忆的获得、巩固和提取(Rodriguez-Romaguera et al., 2009)。而 Cain 等人(2004)报道延迟消退前 20 分钟皮下注射普萘洛尔（10mg/kg）增加了消退过程中的恐惧水平，以及 Fitzgerald 等人(2015)报道即刻消退前 30 分钟系统注射普萘洛尔（10mg/kg）降低恐惧水平促进消退，延迟消退前 30 分钟注射增加恐惧水平并损害第二天消退记忆的提取。本研究旨在用普萘洛尔降低因恐惧获得训练而升高的 NE 水平，并不希望对即刻消退过程有影响，所以选择在恐惧获得后立即注射普萘洛尔(Fitzgerald et al., 2015)，但在间隔较长的 1 小时后进行即刻消退(Chang & Maren, 2009, 2011)。目前文献中即刻消退发生的时间为恐惧获得后的 15 分钟~6 小时内（见引言第二段“即刻消退组(创伤后 15 分钟~6 小时进行的消退)”），本研究的即刻消退发生在恐惧获得后的 1 小时，文献依据为(Chang & Maren, 2009, 2011)。

本研究的每个消退训练包含 30 个 CS，是因为本研究原本还有第 4 阶段考察恐惧续新，预实验显示消退训练中 CS 试次太多和太少都不能建立恐惧续新模型。30 个 CS 试次既可以

显著降低恐惧水平（见实验 1 的延迟消退组），又可以很好地建立恐惧续新模型。本研究的续新结果是实验 1 的延迟消退组出现续新，即刻消退组因为消退效果缺损，没有出现消退，无从谈续新。同样，实验 2 也是普萘洛尔组出现续新，盐水组因为没有消退，谈续新没有意义。总之，文章没呈现续新结果是基于以下两点：一是即刻消退没有消退效果，无从谈续新，二是普萘洛尔组出现恐惧续新并没有拓展现有结果的意义，也没有影响对目前结果的解释。

审稿人 2 意见：本文作者针对初审意见，对相关问题给与了较有说服力的说明，补充与讨论。同意发表。

回应：感谢专家。