

断乳前丰富环境对即刻早期基因 Arc 的表达及长时记忆的影响

陆澄秋, 钟乐, 田英, 颜崇淮, 沈晓明

(上海交通大学医学院附属新华医院上海市儿科医学研究所上海市环境与儿童健康重点实验室, 上海 200092)

〔摘要〕 **目的** 探讨断乳前丰富环境对大鼠海马即刻早期基因—活性调节的细胞骨架蛋白(activity-regulated cytoskeletal protein, Arc)的表达,以及对长时记忆的影响。**方法** 4窝共40只新生SD大鼠,每窝随机分为对照组($n=20$)和实验组($n=20$),实验组大鼠生后10日龄至24日龄每天予以丰富环境暴露20 min,对照组大鼠除不予以丰富环境暴露外,其余处理均与实验组相同。生后28 d,两组大鼠予以旷场行为测试其自发活动,新物体识别测试评估其长时记忆能力,采用免疫印迹方法检测断乳前丰富环境对海马即刻早期基因 Arc 表达量的影响,并且通过免疫荧光的方法观察两组间 Arc 在海马 CA1 和 DG 区的表达差异。**结果** 两组大鼠在旷场行为测试中,穿行方格的次数差异没有显著性($t=0.632, P>0.05$),而在新物体识别测试中,实验组大鼠的1 h 和 24 h 的成绩差异有显著性($t=-2.37, P<0.05; t=-2.13, P<0.05$),实验组大鼠的偏好系数($59.61\pm9.61\%$), ($62.72\pm14.12\%$)显著高于对照组的($50.46\pm9.34\%$), ($52.39\pm9.16\%$)。同时,实验组大鼠海马即刻早期基因 Arc 的表达也高于对照组($t=-5.77, P<0.01$)。免疫荧光结果显示在海马的 DG 区, CA1 区,丰富环境组的表达均高于对照组。**结论** 断乳前丰富环境能增加海马即刻早期基因 Arc 的表达,并且促进大鼠长时记忆。

〔中国当代儿科杂志,2008,10(2):179-182〕

〔关键词〕 丰富环境;断奶前;记忆;海马;细胞骨架蛋白;大鼠
〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2008)02-179-04

Effects of preweaning enrichment on activity-regulated cytoskeletal protein expression and long-term memory in rats

LU Cheng-Qiu, ZHONG Le, TIAN Ying, YAN Chong-Huai, SHEN Xiao-Ming. Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Shen X-M, Email: xmshen@shsmu.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the effects of preweaning enrichment on the expression of activity-regulated cytoskeletal protein (Arc), an immediate early gene, and on the long-term memory in rats. **Methods** Forty neonatal Sprague-Dawley rats were randomly assigned to control group (standard environment, $n=20$) and experimental group (enriched environment, $n=20$). The experimental group received enriched environment exposure from postnatal day 10 until weaning (2 weeks, 20 minutes per day). The open field and novel object recognition tests were performed at postnatal day 28. Arc expression was detected by Western blotting and immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference in the open field test between the two groups. However, in the novel object recognition test, the experimental group rats performed significantly better than the control rats after 1 and 24-hr retention. The preference index in the experimental group after 1-hr ($59.61\pm9.61\%$ vs $50.46\pm9.34\%$; $P<0.05$) and 24-hr retention ($62.72\pm14.12\%$ vs $52.39\pm9.16\%$; $P<0.05$) was significantly higher than that in the control group. Arc expression in both areas CA1 and DG of hippocampus in the experimental group increased significantly compared with that in the control group ($P<0.01$). **Conclusions** Preweaning enrichment can up-regulate the expression of immediate early gene, Arc, in the hippocampus of the rats, and promote their long-term memory. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):179-182]

Key words: Enrichment; Preweaning; Memory; Hippocampus; Cytoskeletal protein; Rats

丰富环境可促进动物的学习记忆能力^[1~3],研究显示^[4,5],神经可塑性相关基因表达的改变,可能是丰富环境促进脑认知功能的机制之一。但是,目前研究主要集中在成年期,关于断乳前丰富作用机

〔收稿日期〕2007-12-28;〔修回日期〕2008-01-10
〔基金项目〕上海市科委重大基础研究项目基金资助(05DJ14007)。
〔作者简介〕陆澄秋,女,硕士研究生。主攻方向:环境与儿童生长发育。
〔通讯作者〕沈晓明,教授,博士生导师,上海交通大学医学院新华医院,邮编 200092。

制的报道甚少。即刻早期基因—活性调节的细胞骨架蛋白 (activity-regulated cytoskeletal protein, Arc) 是神经元突触可塑性和记忆巩固的关键分子^[6], 其表达受神经元兴奋性的调节^[7]。本课题组前期的基因芯片研究结果也提示^[8], 丰富环境暴露的幼鼠海马 Arc 的表达上调。因此, 本文在前期的工作基础上, 进一步从蛋白水平上研究断乳前丰富环境对海马 Arc 表达的影响, 以及对大鼠长时记忆的影响, 为探索生命早期丰富环境对学习记忆作用的分子神经生物学机制提供前期实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 8 只 (由中国科学院上海实验动物中心提供), 雌雄交配。取 4 只孕鼠单笼饲养, 仔鼠出生后, 每窝留 10 只。各窝随机分为对照组和丰富环境组, 整体上雌雄对半。新生鼠于 10 日龄至 24 日龄予以每日 20 min 的丰富环境暴露^[9], 暴露时, 为保证对照组与实验组的可比性, 将母鼠取出, 对照组幼鼠仍置于鼠笼内, 并且通过将对照组幼鼠同样也拿起、放下两次, 排除人为搬动的干扰。丰富环境暴露的方式简述如下: 将幼鼠置于 62 cm × 50 cm × 40 cm 的塑料笼内, 其中放有沙盘、转轮、斜梯和不同颜色、形状和质地 (木、塑料、纸、绒布) 的小玩具。这些物品每日更换位置, 每周将全部物品更换 2 次, 与此同时用 MP3 播放器外接音箱播放 D 大调钢琴奏鸣曲 20 min, 音量为 40 ~ 50 dB。所有新生鼠均由母鼠喂养, 至 24 日龄时, 每组各取 4 只, 用于免疫印迹。此外, 每组再各取 4 只, 用于免疫荧光实验。其余幼鼠予以断乳, 雌雄分笼, 用于行为学检测。动物饲养于恒温环境中 22 ± 2 °C, 12 h 光照与黑暗交替, 予以自由饮水及进食。

1.2 行为学测试

行为学检测均采用双盲法进行, 即测试者不知道动物的分组。

1.2.1 旷场行为检测 (open field test) 28 日龄时, 丰富环境暴露组 ($n = 12$) 和对照组 ($n = 12$) 用于旷场行为检测。装置为一黑色无顶的实验箱 (40 cm × 40 cm × 40 cm)。实验前 3 d, 每天抚摸每只大鼠 5 min, 随后使之在实验箱中适应 5 min。第 4 天时, 把大鼠放在实验箱内, 记录 5 min 内动物穿行方格的次数 (3 爪以上进入邻格)。

1.2.2 新物体识别 (novel object recognition test)

做完旷场行为的动物用于新物体识别测试, 实验过程参考文献报道的方法^[1]。实验分训练阶段和检测阶段。在训练阶段, 两个物体 (形状和颜色不同, 但大小相似) 对称地放在实验箱的对角线位置, 每只大鼠放在箱中探索物体 5 min, 记录大鼠的活动。当大鼠的头部朝向物体并且在距离物体 1 cm 范围内时, 被认为在探索物体, 统计大鼠探索每一物体的时间。更换动物时, 用 75% 酒精仔细擦拭实验箱底部, 特别是物体, 以避免气味干扰。训练后 1 h 和 24 h 分别进行检测。检测时, 大鼠放回同样的实验箱中, 但是其中的一个物体被一形状和颜色完全不同但大小相似的新物体代替, 大鼠在箱中探索 5 min, 分别记录大鼠探索每一物体的时间。探索物体总时间少于 20 s 的不计入统计。用偏好指数 (preference index), 即大鼠在训练阶段用于探索其中一个物体或检测阶段探索新物体的时间与探索两物体总时间的比值作为指标, 以评价大鼠的记忆能力。

1.3 免疫印迹

1.3.1 组织蛋白的提取 24 日龄时, 丰富环境暴露组 ($n = 4$) 和对照组 ($n = 4$) 幼鼠, 迅速冰上断头, 取海马组织, 立刻加入到裂解液 (7.5 M urea, 2.5 M thiourea, 12.5% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl, 2.5% n-octylglucoside, 1.25 mM protease inhibitor) 中, 在冰上用超声波处理破碎细胞。充分裂解后, 12 000 r/min, 离心 5 min, 取上清, -20 °C 保存。

1.3.2 免疫印迹 制备 5% 浓缩胶和 10% 分离胶, 上样前蛋白样品加入 1 × 蛋白上样缓冲液, 100 °C 沸水浴中加热 5 min 变性。每孔上样 60 μg 蛋白质, SDS-PAGE 电泳; 100 V 恒压湿转 60 min; 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h, 用 TBST 洗脱 3 次 × 15 min; 加入 anti-Arc (santa cruz, 1:300) 和 anti-GAPDH (1:10 000, 康成生物), 4 °C 孵育过夜; 用 TBST 洗脱 3 次 × 15 min; 过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 45 min; 用 TBST 洗脱 3 次 × 15 min, 加 ECL 液于膜上, 反应 1 min 后, 暗室中显影、定影。使用 Image pro plus 软件测量各条带的光密度值, 分别计算两组 Arc 与 GAPDH 的相对值。

1.4 免疫组织化学染色

1.4.1 组织切片制作 24 日龄时, 丰富环境暴露组 ($n = 4$) 和对照组 ($n = 4$) 幼鼠给予 1% 戊巴比妥钠过量麻醉, 4% 多聚甲醛左心灌注固定取脑, 梯度蔗糖脱水, 在海马部位做冠状冰冻切片, 切片厚度 30 μm, 取前囟后 3.6 mm 处的连续 5 张脑片, 用于免疫荧光。

1.4.2 免疫组织化学染色 切片于0.5% Triton-X 100 破膜15 min, PBS 漂洗2次×10 min; 5% BSA 封闭非特异性反应20 min, 与 anti-Arc (santa cruz, 1:50), 4℃孵育过夜; PBS 漂洗2次×10 min; 与 cy3 标记的羊抗鼠二抗 (Jackson Immuno Research Laboratories, 1:50) 室温孵育1 h; PBS 漂洗2次×10 min 后封片, 荧光显微镜观察。

1.5 统计方法

全部资料用 SPSS11.0 软件包统计软件处理。计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 行为学测试

2.1.1 旷场行为 在旷场行为的实验中, 丰富环境组幼鼠穿行方格的次数为 48.5 ± 19.8 次, 对照组为 43.8 ± 16.9 次, 两组差异无显著性 ($t = 0.632$, $P > 0.05$), 表明短暂的丰富环境暴露对两组动物的自发活动没有影响。

2.1.2 新物体识别测试 新物体识别方法检测结果见图1。在训练过程中, 两组幼鼠对物体都没有明显偏好 ($t = -0.32$, $P > 0.05$), 偏好系数约等于50%。但在1 h 和 24 h 后, 丰富环境暴露组明显地偏好新的物体, 偏好系数分别为 $(59.61 \pm 9.61)\%$, $(62.72 \pm 14.12)\%$, 而对照组则几乎没有表现出偏好 $(50.46 \pm 9.34)\%$, $(52.39 \pm 9.16)\%$, 两组的偏好系数之间存在明显差异 ($t = -2.37$, $P < 0.05$; $t = -2.13$, $P < 0.05$)。结果提示, 丰富环境组比对照组幼鼠表现出更好的长时记忆能力。

2.2 免疫印迹检测 Arc 的表达变化

以 GAPDH 为内参, 用免疫印迹技术分别检测了丰富环境组和对照组海马 Arc 蛋白的表达水平, 结果显示, 在 GAPDH 表达水平基本一致的情况

下, 丰富环境组海马的 Arc 蛋白表达明显高于对照组, 差异具有显著性 ($t = -5.77$, $P < 0.01$)。见图2。

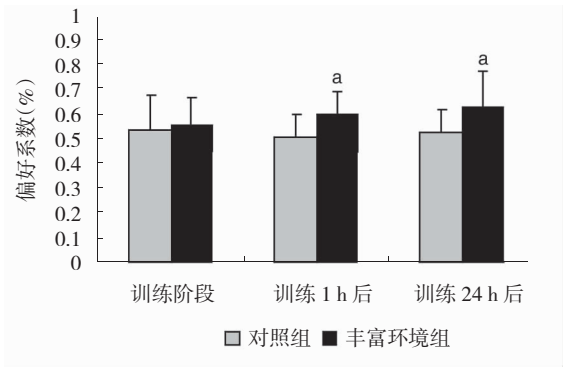


图1 新物体识别测试。训练1 h 和 24 h 后, 丰富环境组的偏好系数明显高于对照组, a: $P < 0.05$ 。

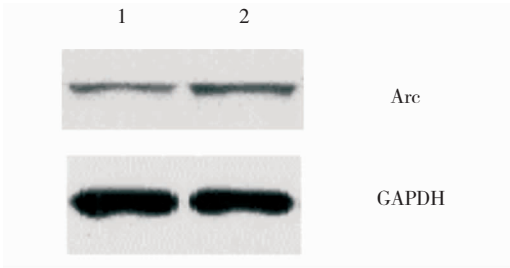


图2 大鼠海马组织 Arc 蛋白表达结果。1: 代表对照组; 2: 代表丰富环境组。用 GAPDH 抗体检测同一张膜作内对照, 显示丰富环境组 Arc 的密度明显高于对照组。

2.3 免疫组织化学染色检测 Arc 的表达部位

免疫荧光观察了海马 CA1 和 DG 区的 Arc 表达情况, 发现在 CA1 和 DG 区都有 Arc 的表达, DG 区的表达要高于 CA1 区。幼鼠经历丰富环境后, CA1 和 DG 区的 Arc 表达比在标准环境中的幼鼠高。此结果与免疫印迹对 Arc 蛋白的定量分析一致(图3)。

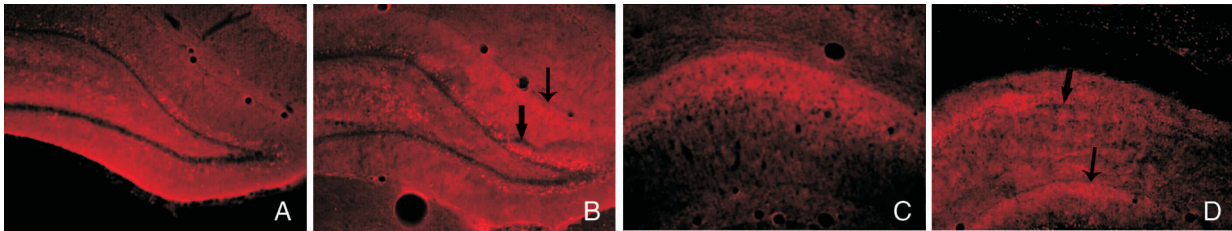


图3 丰富环境对海马 DG 区和 CA1 区 Arc 蛋白表达的影响 ($\times 100$) A: 对照组 DG 区; B: 丰富环境组 DG 区; C: 对照组 CA1 区; D: 丰富环境组 CA1 区。免疫荧光显示丰富环境暴露的大鼠海马 DG 区和 CA1 区 Arc 蛋白的荧光强度和密度均比对照组高。↓标示细胞层; ↓标示分子层。

3 讨论

本实验发现断乳前丰富环境对大鼠的自发活动没有影响,但是短暂暴露于丰富环境的大鼠在新物体识别测试中表现出比对照组更好的长时记忆。断乳前与成年时的丰富环境存在一定的差别^[10]。表现在:①断乳前丰富环境发生在生长发育期,该期大脑的结构和功能还没有完善,处于对环境的敏感期;②断乳前丰富环境还包括了母仔关系,母鼠的哺育行为。有实验证实成年动物的丰富环境可促进其学习记忆能力^[1],本实验发现断乳前的丰富环境也能促进长时记忆。以往研究断乳前丰富环境,都是将母鼠与仔鼠置于同一丰富环境中^[11],而实际上,母鼠的行为也会影响到仔代,因而本研究在实验设计中避免了这一干扰,并且排除了短暂的母仔分离,操作者的搬动以及相互交往这三个因素的影响。由于新生动物的特殊性,主动运动的能力比成年动物小,在断乳前丰富环境中的幼鼠并不能完全利用增加的运动机会,其运动能力的提高并不明显,而动物的自发活动与其本身的运动能力相关,这可能是丰富环境暴露与对照组大鼠之间自发活动没有差异的原因。

周围环境的刺激能改善脑结构,提高脑功能^[12],而增加的神经营养因子,神经递质受体的改变和即刻早期基因的表达均是可能的机制。本研究中免疫印迹实验发现暴露于丰富环境的大鼠海马表达的 Arc 蛋白明显高于对照组;免疫荧光实验也证实,在与学习记忆密切相关的海马 CA1 区、DG 区,丰富环境组表达的 Arc 要明显高于标准环境组。兴奋性刺激使海马 NMDA 受体活化,Arc mRNA 转录增加,并翻译为蛋白,在活化的突触部位起作用^[6]。Arc 蛋白影响微管相关蛋白复合体聚合^[13],通过与神经元骨架相互作用,影响神经元突触的结构可塑性,改变神经元对信息的获取和巩固功能。抑制海马 Arc 的表达则损伤长时程增强的维持和长时记忆的巩固^[6],提示 Arc 蛋白与突触功能可塑性和长时记忆有关。本实验观察到断乳前丰富环境暴露组和对对照组大鼠,Arc 蛋白的表达具有差异。Arc 蛋白表达量的增加,增强了神经元的突触可塑性,提高了神经元处理信息的能力,巩固了长时记忆。当然,要证实 Arc 蛋白是断乳前丰富环境促进长时记忆的分子机制还需进一步实验验证。

目前,对断乳前丰富环境的研究仍停留在行为学水平,对于其分子机制的研究还没有完全展开。事实上,哺乳动物的断乳前是脑发育的关键时期,对此期脑的研究有助于我们探讨认知发育的关键因素,为提供促进脑发育和恢复脑损伤后脑功能的方案开辟新的路径。

[参 考 文 献]

- [1] Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(2): 513-521.
- [2] Woodcock EA, Richardson R. Effects of multisensory environmental stimulation on contextual conditioning in the developing rat[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2000, 74(2): 89-104.
- [3] Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, et al. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity[J]. *Physiol Behav*, 2001, 73(4): 649-658.
- [4] 韩太真,吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 162.
- [5] Gobbo OL, O'Mara SM. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia[J]. *Behav Brain Res*, 2004, 152(2): 231-241.
- [6] Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McLaugh JL, Worley PF, et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 3993-4001.
- [7] Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 78(3): 508-527.
- [8] 钟乐,颜崇淮,黄华,陆澄秋,徐健,沈晓明. 断乳前丰富环境促进大鼠空间记忆及基于基因芯片研究的机制探讨[J]. *中华儿科杂志*, 2007, 45(10): 781-783.
- [9] 钟乐,颜崇淮,黄华,陆澄秋,徐健,余晓刚,等. 断乳前丰富环境暴露促进海马神经发生及其机制研究[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(22): 1559-1563.
- [10] Kohl Z, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kempermann G. Prewaning enrichment has no lasting effects on adult hippocampal neurogenesis in four-month-old mice[J]. *Genes Brain Behav*, 2002, 1(1): 46-54.
- [11] Cancedda L, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, Maffei L. Acceleration of visual system development by environmental enrichment[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(20): 4840-4848.
- [12] van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2000, 1(3): 191-198.
- [13] Fujimoto T, Tanaka H, Kumamaru E, Okamura K, Miki N. Arc interacts with microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the dendrites[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 76(1): 51-63.

(本文编辑:吉耕中)