

光照对小鸡脑内神经细胞粘附分子表达的影响*

高杨¹ 管兴志² 匡培梓¹

(¹ 中国科学院心理研究所, 北京 100101)

(² 解放军总医院神经介质实验室, 北京 100853)

摘要 胚胎发育晚期光照条件的不同,对小鸡后天的学习记忆能力有显著的影响,暗孵化小鸡表现出明显的长时记忆障碍。实验利用免疫组化的方法,分别对光孵化、正常孵化和暗孵化条件下,胚胎发育的第17、18、19、20、21天,小鸡脑内上纹体腹核(HV)中神经细胞粘附分子(NCAMs)的表达进行了观察。结果表明:暗孵化条件下孵出的小鸡,在一次性被动回避学习中,记忆保持水平显著低于光孵化组和正常孵化组;在胚胎发育的第20天 NCAM 的表达,在光孵化组和正常孵化组中显著增高,到胚胎发育的第21天,这种升高在正常孵化组中显著下降;而暗孵化组在整个观察过程中,NCAM 表达水平一直非常低。这一结果提示,不同光照条件在孵化过程中,对 NCAM 表达的影响,参与了光照对小鸡后天学习记忆行为改变的过程。

关键词 小鸡,胚胎发育,神经细胞粘附分子,被动回避学习。

分类号 B845

1 前言

神经细胞粘附分子(Neural cell adhesion molecules, NCAM)是细胞表面的一种糖蛋白,隶属于免疫球蛋白超家族。在胚胎发育期,NCAM 在内、中、外三个胚层中都有广泛的表达,在成年动物中 NCAM 的表达主要集中在神经组织中^[1,2]。NCAM 在神经细胞的发生、形成、修复、再生等方面都起着重要作用。神经细胞的正确迁徙,神经突起的伸展形成突触联系进而构成神经网络,具有相同功能的神经细胞的粘着、辨认从而聚集成神经核团,神经纤维束,在神经细胞的分化诱导,神经髓鞘的形成等过程中 NCAM 都发挥着重要的作用^[3]。研究发现大鼠齿状回中 LTP 的产生,伴随着 NCAM 表达的增多^[4];NCAM 抗体加入大鼠海马脑片后导致海马 CA1 区 LTP 的减弱和消失^[5]。不少研究还证实 NCAM 参与学习记忆过程。大鼠经被动回避训练后,海马部位在 12 到 24 小时之间表现出 NCAM 表达的显著升高^[6,7]。在阿朴吗啡(apomorphine)和东莨菪碱(scopolamine)引起的大鼠被动回避学习障碍中同时也观察到了 NCAMs 表达的减少^[8]。心室或脑室注射 NCAM 抗体,导致大鼠和小鸡被动回避学

习中长时间记忆的缺失^[9]。灭活小鼠的 NCAM 基因导致小鼠脑重减少 10%,并使得小鼠的特殊学习能力丧失^[10]。

大量实验证实,在小鸡的印记学习和被动回避学习中,上纹体腹核(hyperstriatum ventrale HV)是一个至关重要的脑区,它在记忆信息的储存和巩固过程中所起的作用是无法取代的。学习后该脑区会出现一系列生物化学变化,例如 NMDA(N-methyl-D-aspartate)受体增多,蛋白激酶 C 的底物(MARCKS)水平升高,即刻早基因 c-fos、c-jun 的表达显著增加。同时在学习后 HV 还表现出显著的形态学变化,比如突触后致密带(postsynaptic densities)的长度增加,突触前小结(presynaptic bouton)密度升高等^[11,12]。

本实验通过控制小鸡胚胎发育晚期的光照条件,用免疫组化的方法观察,在不同孵化条件下,小鸡脑 HV 部位 NCAM 的表达情况。探讨胚胎发育环境与中枢神经系统中分子生物学变化的关系。

2 材料和方法

2.1 实验动物及孵化条件

16 日龄鸡胚(京白 939),由北京市华都种禽

收稿日期:2000-10-25。

*国家自然科学基金(No. 39900044)资助项目。

公司孵化厂提供。鸡胚购回后,迅速放入孵化箱中继续孵化,温度保持在 37.8—38,湿度保持在 50%—70%,每两小时翻蛋一次。在整个孵化期中,即从孵化的第 17 天一直到孵化的第 21 天,光孵化组保持每天连续光照 24 小时,正常孵化组保持每天光照 12 小时,暗孵化组保持每天 24 小时黑暗。

2.2 标本的制作

将小鸡迅速开胸暴露心脏,灌流针经心脏插入升主动脉后先用 20 毫升生理盐水快速冲洗,随后缓慢灌注 4%多聚甲醛磷酸缓冲液(4, pH=7.4) 20 毫升。灌注完毕立即取脑浸入 4%多聚甲醛,4 保存 24 小时。标本经酒精梯度脱水,透明,浸蜡,包埋后,在石蜡切片机上,对照脑图谱进行 5 μ m 厚的连续冠状切片。对切好的脑片进行展片、烤片,脱水,脱蜡,消除内源性抗原和抗原修复后,切片浸入 10%的封闭血清中过夜。脑片转入兔抗 NCAM 单克隆抗体(1:50),4 孵育 48 小时。经血清蛋白磷酸缓冲液(PBS)洗后,切片浸入生物素结合羊抗鼠 IgG(1:300 Zymed,美国)孵育 2 小时(室温)。再经 PBS 洗后,切片浸入链卵白素-生物素结合辣根过氧化物酶(1:300 Zymed,美国)孵育 2 小时(室温)。用 PBS 充分洗后,加入呈色剂二氨基联苯胺(DAB)呈色,酒精梯度脱水,透明,中性树胶封片。

2.3 被动回避行为实验程序

预训练:将蘸有清水的金属小珠(直径 2.5cm),呈现给小鸡 20 秒钟,共 3 次,每次间隔 5 分钟。训练:将蘸有 MeA 的红色玻璃小珠(直径 5cm)呈现给小鸡 10 秒钟。小鸡啄珠后会出现摇头、闭眼、惊叫后退等明显的厌恶反应。没有厌恶反应的小鸡将被淘汰掉。测试:将干燥的、与训练中所用大小、形状和颜色相同的红珠和大小、形状相同的蓝珠分别给小鸡呈现 10 秒钟。

2.4 结果处理

在 400 倍光镜下,每个标本取 3 张切片,每张切片取 5 个视野(100 目/1cm²),记录阳性反应区域的辉度。根据阳性反应区域辉度的不同,分为 3 个等级:- 没有阳性反应,+ 有明显的阳性反应,++ 有较强的阳性反应,如图版 I 所示。

记忆保持水平以测试时小鸡对红珠的回避率(avoidance rate, AR)为指标,回避率越高表明记忆保持越好;而小鸡对蓝珠的回避率则作为药物是否影响啄行为的重要指标,回避率越低表明对啄行为的影响越小。回避率 = 测试时回避红珠(或蓝珠)的小鸡数 \div 训练时啄红珠(或蓝珠)的小鸡数 $\times 100\%$ 。

组间差异采用 χ^2 检验进行分析。

3 结 果

3.1 不同孵化条件下 NCAM 的阳性反应结果

光照组、正常孵化组和暗孵化组,分别在孵化的第 17 (E17)、18 (E18)、19 (E19)、20 (E20) 和 21 (E21) 天,各灌流 5 只动物,进行免疫组化观察,观察结果如表 1。从表中可以看出,光照组和正常孵化组在 E20 天均表现出 NCAM 的强阳性反应,而且光照组从 E17 天开始已经出现 NCAM 的表达,这种表达一直持续到孵化的最后一天;在 E21 天 NCAM 在正常孵化组中的表达迅速下降;暗孵化组在整个连续观察过程中未见有 NCAM 的阳性表达。

表 1 小鸡 HV 中 NCAM 的阳性反应辉度

组别	N	NCAM 阳性反应辉度				
		E17	E18	E19	E20	E21
光照组	5	+	+	+	++	+
正常组	5	-	+	+	++	-
暗孵化组	5	-	-	-	-	-

3.2 光照对小鸡被动回避反应的影响

光孵化组、正常孵化组和暗孵化组,每组各 40 只动物,在孵出后按被动回避行为训练程序分别进行实验,训练后 3 小时进行测试,结果见图 1。

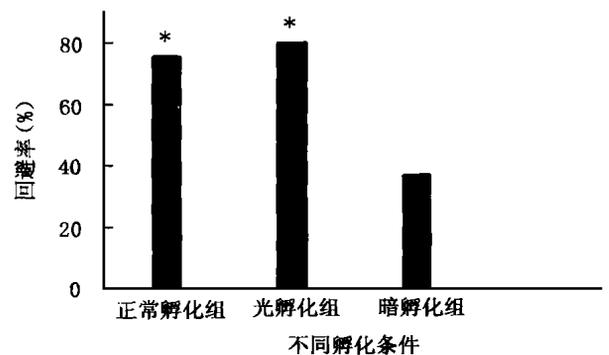


图 1 光照对小鸡被动回避反应的影响

注: *暗孵化组相比差异显著 $p < 0.01$

从实验结果中可以清楚的看出,光照对小鸡的被动回避反应有显著的影响,暗孵化小鸡的回避率显著低于光孵化组和正常孵化组($\chi^2 = 15.7$, $\chi^2 = 14.2$, $p < 0.01$)。表明孵化过程中光照条件对于小鸡后天学习记忆能力,起着至关重要的作用。

4 讨 论

小鸡胚胎发育过程中,光照作为环境因素显著的影响小鸡后天的学习记忆行为,并且研究发现这种影响的关键期在胚胎发育的第 19 和 20 天。暗孵化小鸡在一次性被动回避学习中表现出记忆障碍,改变孵化期第 19、20 天的光照条件或注射皮质酮能逆转小鸡由于暗孵化所造成的记忆障碍^[13]。NCAM 大量、广泛的存在于胚胎形态发生活跃期,对于鸡视网膜的研究表明,在发育过程中神经上皮细胞终足上 NCAM 预先形成的通路,决定着视网膜神经节细胞轴突向顶盖生长的途径^[3]。在小鸡胚胎发育的第 17 天已经能够记录到视网膜上的电活动,到了第 18 天胚胎开始对光有行为反应,表现为开闭眼睑和发出声音^[14]。所有这些研究都表明,光照和 NCAM 在小鸡胚胎发育过程中起着十分重要的作用,同时胚胎本身在发育的晚期也已经具备了环境中光刺激进行应答的生物学基础。

我们的研究表明,孵化环境中光照条件与小鸡 HV 中 NCAM 的表达水平密切相关。光照剥夺(暗孵化)导致小鸡 HV 中 NCAM 的表达明显低于正常组,而光孵化使得 NCAM 的表达出现和降低的都比正常组要早、要慢。这一结果进一步提示 NCAM 参与光照改善小鸡后天学习记忆行为的过程^[13,17],可能与 NCAM 对视网膜神经节细胞轴突的调控有关。同时也表明,光照刺激对 NCAM 表达水平的调节可能导致了 HV 区神经细胞的可塑性的变化,从而使得小鸡出现了学习行为上的改变。已有的研究证实,小鸡胚胎在发育晚期的孵化姿势,使得右眼朝上能接受更多的光照刺激,从而导致了孵化后一系列学习行为以右眼系统为主的现象。对胚胎期光照的进一步研究还表明,光照与糖皮质激素的水平和 NCAM 的多聚唾液酸化过程密切相关,在胚胎发育的第 20 天,颅内注射破坏 NCAM 多聚唾液酸的内切酶会导致小鸡被动回避学习的严重损伤^[17]。光照刺激作为一种非特异的环境影响因素,在小鸡胚胎发育过程中引起多种复杂的生物化学过程、甚至永久性的神经可塑性变化。NCAM 作为细胞表面的一种糖蛋白介导细胞的粘附、识别以及突触的伸张和延伸,并能促进突触的可塑性发展。我们的实验研究也只是对光刺激和 NCAM 表达之间关系的一个初步探讨,它们二者之间的诱导过程,对学习记忆行为的改善过程以及是否有其他神经递质参与介导,还需要进一步的深入研究。

参 考 文 献

- 1 Edelman G M and Crossin K L. Cell adhesion molecules: Implications for a molecular histology. *Annual Review of Biochemistry*, 1991, 60:155—190
- 2 Walsh F S and Doherty P. Structure and function of the gene for neural cell adhesion molecule. *Seminars in the Neuroscience*, 1991, 3:271—284
- 3 蔡文琴,李海标. 发育神经生物学. 科学出版社,1999,52—76
- 4 Fazeli M S, Breen K, Errington M L, Bliss T V P. Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetised rats. *Neuroscience*, 1994, 169:77—80
- 5 Ronn L C B, Bock E, Linnemann D, Jahnsen H. NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Research*, 1995, 677:145—151
- 6 Doyle E, Nolan P M, Bell R, Regan C M. Hippocampal NCAM 180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive-avoidance response in the adult rat. *Journal of Neuroscience Research*, 1992, 31:513—523
- 7 Regan C M, Fox G B. Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochemical research*, 1995, 20:593—598
- 8 Doyle E, Regan C M. Cholinergic and dopaminergic agents which inhibit a passive-avoidance response attenuate the paradigm-specific increases in NCAM sialylation state. *Journal of Neural Transmission-General Section*, 1993, 92:33—49
- 9 Doyle E, Nolan P M, Bell R, Regan C M. Intraventricular infusions of antineural cell-adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive-avoidance response in the rat. *Journal of Neurochemistry*, 1992, 59:1570—1573
- 10 Cremer H, Lange R, Christoph A, Plommann M, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, 1994, 367:455—457
- 11 Horn G, Bradley P, McCabe B J. Changes in the structure of synapses associated with learning. *Journal of Neuroscience*, 1985, 5:3161—3168
- 12 Sheu F S, McCabe B J, Horn G, Routtenberg A. Learning selectively increases protein kinase C substrate phosphorylation in specific regions of the chick brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1993, 90:2705—2709
- 13 Sui N, Sandi C, Rose S P R. Interactions of corticosterone and embryonic light deprivation on memory retention in day-old chicks. *Developmental Brain Research*, 1997, 101:269—272
- 14 Freeman B M, Vince M A. *Development of the avian embryo*. London, 1974, Chapman and Hall
- 15 Rogers L J. Light input and the reversal of functional lateralization in chicken brain. *Behavioural Brain Research*, 1990, 38:211—221
- 16 Rogers L J, Bolden S W. Light-dependent development and asymmetry of visual projections. *Neuroscience Letters*, 1991, 121:63—67

EFFECT OF LIGHT EXPOSURE ON THE EXPRESS OF NCAM IN LATE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF CHICK

Gao Yang Guan Xingzhi* Kuang Peizi

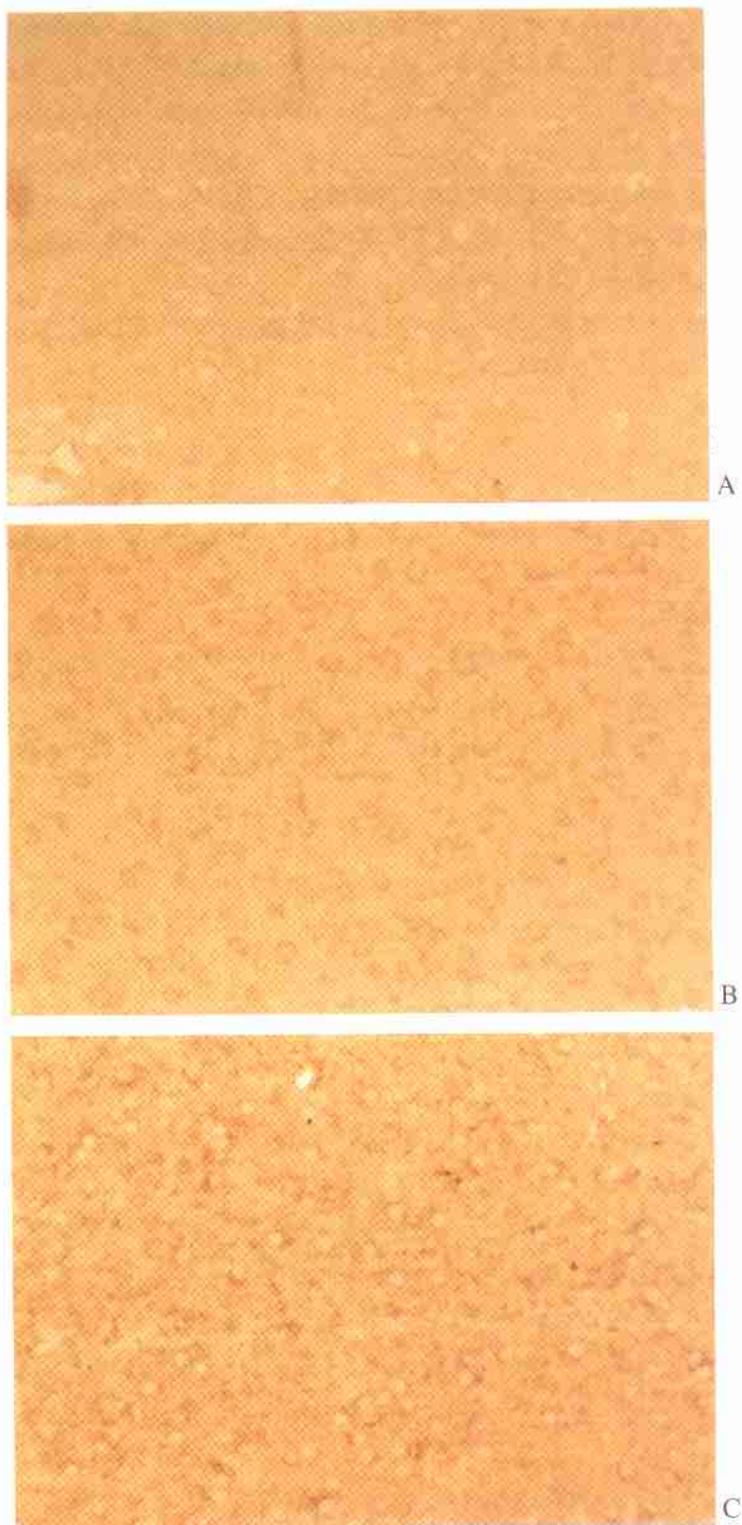
(*Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

(* *Neurotransmitter Research Laboratory, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853*)

Abstract

Light exposure during later embryonic development has much effect on the postnatal ability of learning and memory. In the present study, Immunohistochemical technique was used to detect and compare NCAM express in HV of embryonic days E17 to E21 eggs, which was dark-reared, light-reared or normal-reared. The NCAM express significant high in light-reared and normal-reared eggs at embryonic day E20. During all the embryonic days E17 to E21, the NCAM level was very low in dark-reared eggs. All this suggested that the NCAM, which regulated by light exposure, might be involved in post-hatch learning and memory behaviour.

Key words chick, embryonic development, neural cell adhesion molecules.



小鸡脑 HV 部位 NCAM 免疫阳性反应结果

A. 无阳性反应；B. 有明显的阳性反应；C. 有较强的阳性反应