

神经细胞粘附分子的唾液酸化作用对小鸡 记忆的影响*

胡家芬 隋 南 匡培梓 管林初

(中国科学院心理研究所, 北京 100101)

摘 要 神经细胞粘附分子的多聚唾液酸化不仅影响发育阶段神经元之间的相互作用, 而且在学习记忆过程中也起着重要的作用。实验中将特异切割神经细胞粘附分子和多聚唾液酸之间 α -2, 8 键的内神经氨酸苷酶 endoneuraminidase NE 定位注射到一日龄小鸡脑 IMHV 内, 此酶明显破坏小鸡对一次性被动回避反应的记忆保持。这种破坏作用与酶的剂量有关, 小于 4 μ g 的内神经氨酸苷酶对小鸡的记忆没有明显的影响。对胚胎第 20 天的暗孵化小鸡同时注射内神经氨酸苷酶和皮质酮, 发现内神经氨酸苷酶能明显阻断皮质酮对这些小鸡记忆的促进作用。这些结果说明, 多聚唾液酸可能参与了小鸡的记忆和胚胎期脑的发育过程。

关键词 小鸡, 多聚唾液酸, 胚胎期, 记忆保持。

分类号 B845

1 前 言

神经细胞粘附分子 (Neural cell adhesion molecules, NCAMs) 是细胞表面糖蛋白大家族的成员之一^[1]。NCAMs 除了以分泌状态存在外, 还可与锚定蛋白 GPI (glycosylphosphatidylinositol) 结合连接到细胞膜上或直接穿越膜结构。NCAMs 在合成之后常常会经历一种翻译后修饰作用, 即连接上唾液酸多聚体 (polymers of α -2, 8 linked sialic acid, PSA) 的多糖链^[2,3]。NCAMs 也是少数能在细胞表面表达并携带以 α -2, 8 键连接糖链的糖蛋白之一。PSA 可在 NCAMs 周围形成负电荷的水化空间, 从而对神经元生长起促进作用, 并可能参与了信号的转导机制。去除 PSA 可增加 NCAMs 的粘附特性但降低依赖 NCAMs 的轴突生长作用; 与之相反, PSA 的增加则导致 NCAMs 粘附特性降低但促进依赖 NCAMs 的轴突生长作用^[4]。

已有大量的实验证实, 学习可诱导 NCAM 分子和 PSA 表达的增加^[5,6,7]。这种变化在不同种类的动物中也得到了验证。目前, 研究者主要采用三类方法研究 NCAMs 及其 PSA 对学习记忆的作用。第一

类是运用同源重组的方法得到不表达 NCAMs 基因的突变大鼠, 这种大鼠在 Morris 水迷宫中表现出空间认知学习的障碍^[4]; 第二类是对动物脑内注射 NCAM 抗体, 分别观察这些抗体动物学习和记忆保持的影响; 并结合生化分析的方法, 检测这些分子在学习记忆过程中表达的增强与否。结果发现注射抗 NCAMs 抗体的动物表现出学习和记忆能力的降低^[8,9]。通过生化分析和抗体阻断相互印证, Rose 发现在小鸡对一次性被动回避任务的长时记忆形成过程中, 有两次糖蛋白合成的高峰期。第一次发生于训练后 1 小时内; 第二次发生于训练后 5.5—8 小时。在合成的糖蛋白中包括两类神经粘附分子: L1 和 NCAM。阻断这两个时间段的糖蛋白合成皆可导致小鸡对任务的遗忘。Rose 认为第二时间段内重新合成 NCAMs 对形成永久记忆痕迹是必需的^[6,7]; 第三类方法是针对 PSA 与记忆的关系, 采用特异切割 PSA 的内神经氨酸苷酶 endoneuraminidase NE (endo-N) 观察其对学习记忆的影响, 同时进行 PSA 免疫组化检测。Fox 和 Becker 的研究表明, 在大鼠获得被动回避行为 12—24 小时后, 可检测到其海马神经元中 NCAM180 的 PSA 增加。在 Morris 迷宫

本文初稿收到日期: 1999-01-18, 修改稿收到日期: 1999-03-18。

* 国家自然科学基金 (No. 39570257), 中国科学院留学回国择优基金, 中国科学院生物与技术特别支持费资助项目。

中, 去除 PSA 的大鼠的空间记忆受阻^[10,11]。

以上的实验均从不同角度证实 NCAMs 和 PSA 在记忆中起着重要的作用。目前, PSA 对小鸡记忆的影响还未见报道。为了观察 PSA 是否参与了小鸡的记忆和胚胎期皮质酮改善小鸡记忆的作用, 本实验采用特异切割 NCAMs 与 PSA 之间连接的酶 endo-N 对 PSA 的作用进行探讨。

2 材料和方法

2.1 实验动物

一日龄小鸡和 16 日龄鸡胚(京白 939)均购于北京种禽公司孵化厂。鸡胚放置于孵化箱内, 保持光照 12hr 亮 / 12hr 暗, 温度 $37.97 \pm 0.01^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%—80%, 每 2 小时翻蛋一次。孵化到第 18 天时将鸡胚移至出雏盘, 停止翻蛋。孵化到第 20 天时(E20), 关闭灯光 24 小时(暗孵化)。随后按正常条件孵化直到 E22 小鸡全部出壳。

2.2 药物配制和注射

用无菌生理盐水将 endo-N (由德国 Rita Gerardy-Schahn 教授赠送) 配制成为所需的浓度。对一日龄小鸡进行脑内 IMHV 定位注射, 左右脑各 $10\mu\text{l}$ 。对 E20 鸡胚进行胎盘注射, 进针约 5mm, 每枚胚注射 $2\mu\text{g}/0.1\text{ml}$, 注射完用石蜡封口。

用无水乙醇将皮质酮(购于 Sigma 公司)配成贮存液 ($5\text{mg}/\text{ml}$), -20°C 保存。使用时用无菌生理盐水配制成为相应的浓度。对 E20 鸡胚进行胎盘注射, 每枚胚注射 $60\text{ng}/0.1\text{ml}$, 注射完用石蜡封口。

2.3 一次性被动回避反应实验程序

按照国际上通用的小鸡训练程序^[12], 将小鸡成对放入试验盒内 ($20\text{cm} \times 20\text{cm} \times 25\text{cm}$)。对其中一只小鸡头部进行标记, 便于区分。盒顶部悬挂 25W 的灯泡照明, 使盒内温度保持在 $28-30^\circ\text{C}$ 。让小鸡在盒内适应 1 小时左右, 开始预训练: 将蘸有清水的金属小珠(直径为 3mm)轻轻呈现在小鸡面前约 20 秒, 共进行 3 次, 间隔 5 分钟。小鸡一般会积极去啄珠子。预训练结束后, 开始训练: 将蘸有氨基苯甲酸甲脂 (methyl anthranilate, MeA) 的红色玻璃圆珠(直径为 4mm)呈现给小鸡约 10 秒, 小鸡啄食后大部分会表现出摇头、闭眼或后退等厌恶反应。没有上述反应的小鸡被淘汰掉。测试在训练者选定的时间进行, 方法是将干燥的与训练相同大小的红色和蓝色玻璃圆珠分别呈现给小鸡, 此时回避红珠子的小鸡记录为记忆良好者, 啄红珠子的记录为遗忘者。小鸡一般不拒绝蓝色玻璃圆珠。每只小鸡只测试一

次。

评价小鸡记忆保持的指标为回避率 (avoidance rate, AR), 它是用测试时回避红珠子的小鸡数占训练时啄红珠小鸡的百分数来表示的。测试时回避红珠的比率愈高, 表明小鸡的记忆保持愈好。用回避蓝珠小鸡的比率来测试药物注射是否对小鸡的啄食行为发生影响。回避蓝珠的比率愈低, 表明药物对小鸡记忆作用的特异性愈好。组间数据的差异用卡方 (χ^2) 检验法进行分析。

3 结果

3.1 endo-N 对小鸡记忆作用的剂量效应

将一日龄小鸡分成 5 组, 每组小鸡 21—23 只, 采用强强化训练(用蘸有 100%MeA 的红色玻璃珠训练小鸡)。训练后立即对每组小鸡的两侧 IMHV 区分别注射生理盐水 (sal) 和浓度为 $0.5\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、 $2\mu\text{g}$ 和 $4\mu\text{g}$ 的 endo-N。由于小鸡的脑壳非常薄, 而且这种注射一般不会对小鸡产生影响, 因此实验中常使用 Hamilton 注射器进行徒手操作。每只鸡脑内共注射 $20\mu\text{l}$ (每侧 $10\mu\text{l}$)。测试在训练后 24 小时进行。

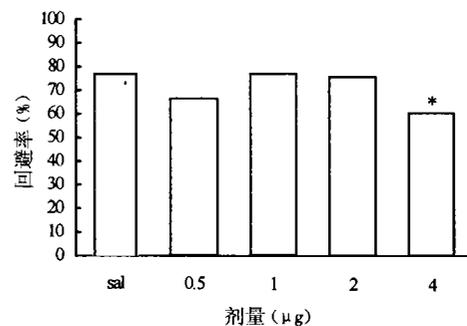


图 1 不同剂量的 endo-N 对一日龄小鸡记忆保持的影响
注: *与生理盐水 sal 组相比, $P < 0.05$ ($n = 21-23$)

从图 1 中可以看出, 浓度为 $4\mu\text{g}$ 的 Endo-N 对小鸡记忆有显著的抑制作用(与生理盐水组相比 $\chi^2 = 4.30$, $P < 0.05$); 而 $0.5\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、 $2\mu\text{g}$ 的 endo-N 也产生了一定抑制作用, 但没有统计上的差异(与生理盐水组比分别为 $\chi^2 = 2.72$, $\chi^2 = 0.79$, $\chi^2 = 0.91$, $P > 0.05$)。

3.2 endo-N 对胚胎期注射皮质酮促进小鸡记忆作用的影响

将 E20 暗孵化的鸡胚随机分成 4 组 ($n = 13-18$), 分别注射等体积的皮质酮 + 生理盐水 (cs + sal)、皮质酮 + endo-N (cs + enN)、enN + sal 和 sal + sal。endo-N 在注射皮质酮 1 小时后注射。皮质酮剂量为每只鸡 $60\text{ng}/0.1\text{ml}$, endo-N 剂量为每只

鸡 2 μ g/0.1ml,生理盐水用量为 0.1ml/每只鸡。小鸡孵出后按照一次性被动回避行为模型进行训练和测试。训练采用弱强化训练(用蘸有 10%MeA 的红色玻璃圆珠训练,用无水乙醇稀释 MeA),训练后 24 小时进行测试。结果见图 2。

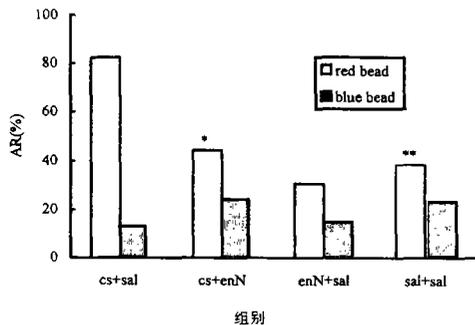


图2 endo-N对皮质酮促进日龄小鸡记忆保持的抑制作用

注: *与cs+sal组相比, $P < 0.05$, **与cs+sal组相比, $P < 0.02$ ($n = 13-18$)

从图2中可以看出,cs对小鸡记忆有明显的促进作用(cs+sal组与sal+sal组相比, $\chi^2 = 6.16$, $P < 0.02$); endo-N显著抑制了cs促进小鸡记忆的作用(cs+sal组与cs+enN组相比, $\chi^2 = 5.19$, $P < 0.05$); 此浓度的 endo-N对暗孵化小鸡的记忆没有产生明显的抑制作用(enN+sal和sal+sal组相比, $\chi^2 = 0.00$, $P > 0.05$, n.s.)。各组小鸡对蓝珠的回避率相近,与cs+sal组相比,皆没有显著性差异($\chi^2 = 1.25$, $\chi^2 = 0.10$, $\chi^2 = 0.14$, $P > 0.05$)。

4 讨 论

已有的动物实验表明,NCAMs在学习记忆中起着重要的调节作用^[7,9,11],而它的PSA化作用是NCAMs功能的关键调节因子^[10,13]。

为了观察PSA对小鸡记忆的影响,我们采用了特异切割 α -2,8键的endoneuraminidase NE(endo-N)酶作用于与小鸡记忆相关的脑区IMHV,发现小鸡的记忆保持受到破坏。因而进一步提供了PSA参与记忆的证据。同时我们也发现此酶的作用是剂量相关的。在低剂量的情况下,酶不能完全破坏记忆;只有达到一定剂量时,endo-N酶才能对小鸡记忆产生影响。

鸡胚发育的第19和20天是光照影响小鸡对一次性回避行为记忆的关键期^[14]。Rogers的研究证实,胚胎期光照对小鸡出生后行为的影响可能与它们在蛋壳内的姿势有关。胚胎第17天的鸡胚以右

眼朝向壳膜,左眼遮盖在身体之下。外界光线可透过蛋壳和透明的眼睑照射到小鸡右眼。这种光线的刺激促进了与右眼投射相连的左脑的发育,从而导致了小鸡脑和行为发育的一侧化^[15]。左脑特别是其IMHV区域已被证实为各类早期学习重要的核团。由于光照和皮质酮皆能改善暗孵化小鸡的记忆^[16],它们的作用可能是通过促进小鸡脑的发育来实现的。我们之前的实验还揭示胚胎期糖皮质激素受体阻断剂可以破坏光孵化小鸡的记忆,表明糖皮质激素受体系统参与了光照对小鸡记忆的作用过程。

去除PSA可以阻断小鸡的记忆,胚胎期PSA是否参与了皮质酮对小鸡记忆的改善作用?此阶段小鸡的胚胎期血脑屏障发育还不完全,所以我们采用了胎盘注射法。为了避免高剂量的酶可能对小鸡发育产生的不良影响,我们选择了2 μ g这个剂量,结果表明endo-N对皮质酮改善记忆的作用产生了明显的抑制。显然胚胎期皮质酮与PSA之间存在一定的相互作用。这可能与它们在胚胎发育过程中类似的变化规律有关。在胚胎发育晚期,许多激素水平达到峰值,糖皮质激素也达到较高水平。这种变化有着重要的生理意义,它可能与小鸡的出壳有着重要的关系。到成年时,糖皮质激素降到较低水平。与糖皮质激素水平的变化相似,PSA在小鸡脑的发育中也经历着从低水平 \rightarrow 高水平 \rightarrow 低水平的转变过程。也就是说在胚胎发生初期,PSA的水平较低,此时NCAMs对神经元之间的识别和附着有着更重要的作用;出生前后阶段PSA水平较高,此时神经系统的许多神经元仍处于活跃状态,神经元高度可塑性有赖于NCAMs的信号传导和促进突触生长作用;成年阶段PSA水平又降低,此时脑内神经元可塑性降低,NCAMs从高PSA状态转向低PSA状态^[7]。因此胚胎期皮质酮对小鸡记忆的改善作用可能与它促进了PSA的表达有关。但它是通过什么途径来相互影响的仍有待于进一步的研究。另外,胚胎期使用的酶浓度并没有对暗孵化小鸡的记忆产生影响,这可能是一种floor effect。表明这两种药物的注射对小鸡啄食行为没有产生影响,因而皮质酮和PSA对记忆的影响具有特异性。由于胚胎期的皮质酮对小鸡记忆的影响经过了较长的时间(>24小时),这种作用可能与它们对小鸡脑神经的发育的影响有一定的关系。下一步的研究将对这种作用机制进行探讨。

* 胡家芬,隋南,匡培梓,管林初。胚胎期光照和皮质酮处理对日龄小鸡记忆的作用。动物学报,已接受。

参 考 文 献

- 1 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
- 2 Doherty P, Fazeli M S. The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J. Neurobiol.*, 1995, 26(3):437—446
- 3 Doherty P, Walsh F S. CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol. and Cell. Neurosci.*, 1996, 8: 99—111
- 4 Fields R D and Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *TINS*, 1996, 19(11):473—480
- 5 Barber A J, Gilbert D B and Rose S P R. Glycoprotein synthesis is necessary for memory of sickness-induced learning in chicks. *European Journal of Neuroscience.*, 1989, 1:673—677
- 6 Rose S P R. Glycoprotein and memory formation. *Behav. Brain Res.*, 1995, 66(1):73—78
- 7 Mileusnic R, Rose S P R, Lancashire C et al. Characterization of antibodies specific for chick brain neural cell adhesion molecules which cause amnesia for a passive avoidance task. *J. Neurochem.*, 1995, 64:2598—2606
- 8 Ronn L C, Bock E. NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1. *Brain Res.*, 1995, 677(1):145—151
- 9 Scholey A B, Mileusnic R, Schachner M et al. A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task in the chick. *Learning & Memory*, 1995, 2:17—25
- 10 Fox G B, O'Connell A W, Murphy K J et al. Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J. Neurochem.*, 1995, 65(6):2796—2799
- 11 Becker C G, Artola A, Gerardy-Schahn R et al. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.*, 1996, 45:143—152
- 12 管林初, 陈双双. 利用小鸡建立学习和记忆模型的方法介绍. *心理学报*, 1991, 23:319—324
- 13 Abrous D N, Montraon M. Decrease in highly polysialylated neuronal cell adhesion molecules and in spatial learning during aging are not correlated. *Brain Res.*, 1997, 744(2):285—292
- 14 Sui N and Rose S P R. Effects of dark rearing and light exposure on memory for a passive avoidance task in day-old chicks. *Neurobiology of learning and memory*, 1997b, 68: 230—238
- 15 Rogers L J and Bolden S W. Light-dependent development and asymmetry of visual projections. *Neurosci. Lett.*, 1991, 121:63—67
- 16 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.*, 1997a, 101: 269—272
- 17 胡家芬, 隋南, 匡培梓, 管林初. 神经细胞粘附分子和记忆. *生物化学和生物物理进展*, 1999, 26(3):197—199

THE POLYSIALIC ACID MODIFICATION OF THE NEURAL CELL ADHESION MOLECULES INVOLVED IN MEMORY RETENTION OF CHICKS

Hu Jiafen Sui Nan Kuang Peizi Guan Linchu

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

Abstract

The polysialic acid (PSA) modification of neural cell adhesion molecules (NCAMs) not only modulates cell interaction of neural development but also plays an important role in learning and memory. The endoneuraminidase NE (endo-N) which specifically removes α -2, 8 linked polysialic acid from NCAM was used to assay the functional role of PSA in the chicks memory retention. The memory retention of day-old chicks was significantly impaired after a localized injection of endo-N into IMHV. The dose lower than 4 μ g had no significant effect. The improvement effect of prenatal corticosterone on memory retention of dark hatched chicks was retarded with endo-N administration intraplacentally on the embryonic day 20. All these suggested that PSA of NCAM might be involved in memory retention of chicks and synaptic plasticity during brain development.

Key words chicks, polysialic acid, embryonic period, memory retention.