

海马 CA3 区突触结构在记忆中的变化

肖鹏 何胜昔 许世彤 区英琦

【摘要】 目的 探讨突触结构的可塑性变化与记忆保持的关系。方法 昆明品系 1 月龄小白鼠 60 只,进行一次被动回避反应学习,在记忆形成前与后的不同时期取脑海马 CA3 区,用电子透镜检测其突触结构的变化。结果 在学习后 24h、记忆保持良好(步入潜伏期 > 300s)时,穿孔突触由学习前占突触总数的 6.3% 增加到 40.8% ($P < 0.01$, 其中轴棘穿孔突触为 31.2%, 轴树穿孔突触为 9.6%); 突触活性区长度 (> 320nm) 由学习前占 6.2% 增至 30.8% ($P < 0.05$)。记忆减退(学习后 6d)、消退(学习后 12d)变化均逐渐减至接近学习前的水平。结论 海马 CA3 区突触结构在一次性被动回避反应的记忆保持中有可塑性变化。

【关键词】 记忆保持; 电镜; 海马 CA3 区; 突触结构; 可塑性

Alterations of the synaptic structure in hippocampal CA₃ during the retention of memory XIAO Peng, HE Sheng-xi, XU Shi-tong, et al. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between synaptic structure plasticity and memory retention. **Methods** One-trial passive avoidance response was used in young mice aged 30 days. Hippocampal CA3 area was taken before or after the memory formation at different phase, and the changes of synaptic structure were examined under the electron microscope. **Results** 24 hours after animal learning with the good memory retention (Step Through Latency, STL > 300sec), the number of perforated synapses (perforated axospinous synapses 31.2%, axodendritic synapses 9.6%) significantly increased to 40.8% compared with the number before learning (6.3%, $P < 0.01$). The length of synaptic active zone also increased 30.8% compared with the number before learning (6.2%, $P < 0.05$). These changes gradually decreased to the level of before learning with the memory decay (6 days after learning) or extinction (12 days after learning). **Conclusions** The synaptic structure plasticity of hippocampal CA3 was found in the retention of one-trial passive avoidance response.

【Key words】 Memory retention; Electron microscope; CA3 area of hippocampus; Synaptic structure; Plasticity

突触部位的结构可塑性变化可能是学习和记忆的形态学基础,有认为突触界面曲度的变化可能是学习记忆的一个突触机制^[1],也有认为穿孔突触可能是突触重建和转换的中间过程^[2]。然而,对这些问题目前尚未能完全阐明,尤其是有关它们与记忆保持的关系研究甚少涉及。因此,本工作应用一次性被动回避反应模型,探讨记忆保持中海马 CA3 区突触结构的变化,以探讨突触结构的可塑性变化与记忆保持的关系问题。

材料与amp;方法

一、实验动物

实验用昆明品系 1 月龄雄性小白鼠 60 只,体质量 20 ~ 25g。每天定时采用相同饲养条件饲养。

二、记忆模型

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39300039)

作者单位:510631 广州,华南师范大学生命科学学院(肖鹏、许世彤、区英琦),中国科学院心理研究所(何胜昔)

通信作者:肖鹏,510631 广州,华南师范大学生命科学学院 (Email: xiaopeng@senu.edu.cn)

采用一次性被动回避反应。小鼠被动回避反应箱参考 Ader^[3] 和 McGaugh^[4] 的方法改制,为 25cm × 20cm × 25cm 的不透明塑料板箱,箱底用直径 3mm,间距 9mm 的铜质栅条组成,可用来电击动物足部。箱的前壁有一 10cm × 7cm 的方形门洞,门前是一块 10cm × 7cm 的通道。动物在通道上可自由进入箱内。实验时反应箱放在实验桌的边缘,通道离地面高约 1 米,三面悬空。正上方 40cm 处设 40W 的白炽灯以照亮通道。

训练步骤:①适应性训练:第 1 天将小鼠尾对门洞放在通道上,让其自由进入箱内并停留 10s,重复四次,并记录其进入暗箱的潜伏期;②一次性被动回避反应训练:第 2 天同上方法进行两次,两次的间隔时间为 15 ~ 20min,半小时后将小鼠放上通道待其进入箱内后即给予电击(电流 0.3mA,刺激时间 5s),然后取出动物放回饲养箱;③检测:24h 后检测小鼠进入暗箱前在通道上停留的时间,即步入潜伏期(step through latency, STL);④记忆指标:以 STL 的长短代表记忆的强弱,检测时间以 300s 为限,即动物在通道上停留 300s 仍不进入暗箱者均为记忆完好,以后每隔 24h 检测一次,用以评价动物记忆的保持和消退。

三、样品制备

1. 取样时间: ①一次性被动回避反应学习前; ②一次性被动回避反应学习后 24h; ③记忆消退至 STL 为 150s 时; ④记忆消退至 STL 为 60s 时。

2. 定位和取材: 活体断头处死, 迅速取脑。在戊二醛固定液里, 参照边缘系统解剖图取海马 CA3 区。按透射电镜常规制样方法处理组织块。用 EPON812 包埋, LKB 超薄切片机切片。柠檬酸铅和醋酸铀双染色。在日立 H-300 透射电镜下观察切片。

四、观测指标

在电镜下选择 Gray-I 型兴奋突触拍片。每样品随机选取 10~20 张电镜照片进行测量和统计。

1. 测量: 突触活性区 (synaptic active zone, SAZ) 的长度和突触后膜致密物质 (postsynaptic density, PSD) 厚度, 参考 Gildner 方法用圆规和测微尺测量, 数据用 t 检验方法进行统计学处理。

2. 突触分类统计: ①按 PETIT. TI 分类法, 依据突触界面曲度分别统计笑型突触 (负向面型), 愁型突触 (下向弯曲型), 直型突触的百分数。②根据突触连接分类, 分别统计轴棘突触, 轴树突触, 以及其中穿孔突触和非穿孔突触的百分数。所得百分数用 U 检验方法进行统计学处理。③统计突触数量, 并计算出突触密度。

结 果

一、一次性被动回避反应学习后海马 CA3 区突触结构的变化

1. 突触密度: 在学习后 24h (STL > 300s), 6d (STL = 150s) 和 12d (STL < 60s) 时, CA3 突触密度的变化 (个/10 μ m²) 分别为 5.4 \pm 2.4 (n = 52), 6.2 \pm 1.2 (n = 64) 和 6.5 \pm 1.7 (n = 53), 与学习前 (5.9 \pm 1.9; n = 48) 相比, 均没有显著变化 (P > 0.05)。

2. 突触的活性区长度: 学习后 4h 有增加的趋势 (表 1), 其中突触活性区达到 320nm 以上的突触占总数的 30.8%, 与学习前的 6.2% 相比, 有显著增加, 而学习后 6d, 突触活性区的长度降低, 接近学习前的水平。突触后膜致密物质的厚度在几种情况下均没有显著性变化。

表 1 学习后 CA3 区突触活性区长度的变化 (n, %)

检测时间	L > 320nm	220nm < L < 320nm	L < 220nm
学习前 (STL < 10s; n = 48)	3(6.3)	34(70.8)	11(22.9)
学习后 24h (STL > 300s; n = 52)	16(30.8) *	27(51.9)	9(17.3)
学习后 6d (STL = 150s; n = 64)	7(10.9)	45(70.3)	12(18.8)
学习后 12d (STL < 60s; n = 53)	6(11.3)	39(73.6)	8(15.1)

注: 与学习前相比 * P < 0.05

3. 突触界面曲度: 愁型、笑型和直型突触在学习后 24h 所占的比例 (%) 分别为 48.1、9.6 和 42.3, 学习后 6d 所占的比例分别为 48.5、10.9 和 40.6, 学习后 12d

所占的比例分别为 45.3、11.3 和 43.4, 与学习前 (45.8、6.3 和 47.9) 相比未见显著变化 (P > 0.05)。

4. 轴棘穿孔突触与轴树穿孔突触: 学习后 24h 轴棘穿孔突触大量增加 (表 2), 与学习前相比有极显著差异, 轴树突触也有所增加, 占突触总量的 34.6%, 且轴树穿孔突触也有增加的趋势。学习后 6d, 轴棘穿孔突触接近学习前水平, 而轴树穿孔突触比学习前仍有增加。

表 2 学习后轴棘和轴树突触以及其中穿孔和非穿孔突触的百分数 (%)

检测时间	轴棘突触			轴树突触		
	轴棘总量	穿孔	非穿孔	轴树总量	穿孔	非穿孔
学习前 (STL < 10s; n = 48)	75	4.2	70.8	25	2.1	22.9
学习后 24h (STL > 300s; n = 52)	65.4	31.2 **	34.2	34.6 *	9.6 **	25.0
学习后 6d (STL = 150s; n = 64)	82.8	6.2	76.6	17.2	5.7 **	11.5
学习后 12d (STL < 60s; n = 53)	81.1	5.7	75.4	18.9	3.8	16.1

注: 与学习前、学习后 6d 及学习后 12d 相比 ** P < 0.01

讨 论

本实验采用一次性被动回避反应, 观察记忆保持及消退中突触结构的变化。结果表明在学习后 24 小时其记忆保持良好时, 穿孔突触、突触活性区长度 (> 320nm) 有明显增加, 而突触的密度和界面曲度均未见明显变化。在记忆减退 (学习后 6 天) 或消退 (学习后 12 天), 上述变化均逐渐减少至接近学习前的水平。这提示在记忆的保持中存在着结构的可塑性变化, 推测可能是穿孔突触增加的作用, 并一定程度上反映突触功能的一种特性。有认为^[5,6], PSD 穿孔是一种突触效能增强的表现, 由于 PSD 边缘数量的增加, 而使突触传递的功能增强。因为 PSD 边缘可能是递质释放最活跃的位点, 或者由于 PSD 的表面积增大, 神经传递的功能增加。突触转换理论者认为突触结构的可塑性表现为突触结构和 PSD 形态的有规律的转变, PSD 穿孔是突触转换的多种过程中的一种表现形式^[2]。突触分裂理论者分析认为^[7], PSD 穿孔的突触 PSD 表面积大, 可能是相对大的突触连接分裂为连续的 PSD 的较小的突触的一种中间介导的结构。从轴棘非穿孔突触到轴棘穿孔突触, 再经过一定的步骤, 轴棘突触缩回到母树突而成轴树穿孔突触, 而轴树穿孔突触又可以转变成轴棘穿孔突触和非穿孔突触, 从而形成一个突触转换的循环, 维持了突触功能的活力。本实验观察到记忆保持中, 穿孔突触的活性区长度增加, PSD 的厚度没有增加, 而活性区长度的增加则表现为突触前囊泡网格和突触后致密物表面积的增加。由于 PSD 是突触后神经递质受体和离子通道最集中的区域, 我们推测穿孔突触由于其活性区长度增加, 使 PSD 的表面积增大, 从而导致突触传递的功能增强, 乃至参与记忆的保持。

此外,本实验还观察到记忆保持一天时,轴棘突触和轴树突触在突触总量中所占的百分数分别为65.4%和34.6%,与学习前的75%和25%比较,轴棘突触总量有减少而轴树突触总量有增加的倾向。推测这或许提示着两者转变的可能。近期已有工作指出,在海马齿状回诱导 LTP 后观察到分段 PSD 突触的增加,可能伴随着一些原本存在的非穿孔的、中心穿孔的或马蹄形的 PSD 的轴棘突触转变成分段 PSDs 的突触,这种 LTP 诱导的分段 PSDs 的突触的数量的增加为 LTP 诱导的突触转变而促进的一种表现^[5],而在 LTP 维持期间,还见到突触的继续转变与产生轴树突触的增加,从而维持了突触功能的增强^[8]。诚然,有关这一突触结构的变化与突触传递功能的增强,以及与记忆的保持问题,仍有待进一步阐明。

参 考 文 献

1 Petit TL, LeBontillier JC. Quantifying synaptic number and structure: effects of stain and post-mortem delay. Brain Res, 1990, 517:269-275.

2 Geinisman Y, Morrell F, DeToledo-Morrell L. Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal Long-term potentiation. J Comp Neural, 1996, 386:413-423.
 3 Ader R. Retention of a passive avoidance response as a function of the intensity and duration of electric shock. Behav Monit, 1992, 26:125.
 4 McGaughton BL, Barnes CA, Rao G, et al. Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. J Neurosci, 1986, 6:563-517.
 5 Geinisman Y, DeToledo-Morrell L, Morrell F. Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. J Neurosci, 2001, 21(15): 5568-5573.
 6 Geinisman Y and Morrell D. Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. Neuroscience, 2004, 125(3):615-623.
 7 Brandon JG, Coss RG. Rapid dendritic spine stem origins during one trial learning the honeybee's first orientation flight. Brain Res, 1982, 252:51-61.
 8 Geinisman Y. Remodeling of hippocampal synapses after hippocampus-dependent associative learning. J Comp Neurol, 2000, 417(1):49-59.

(收稿日期:2004-11-05)

(本文编辑:冯学泉)

· 卫生预防 ·

机车司机职业紧张对神经内分泌功能的影响

马良庆

我们于2003年6月~2003年10月对郑州铁路分局客运机车司机尿中肾上腺素代谢物(EMP)和去甲肾上腺素代谢物(NEMP)班前和班后浓度进行了测定,并对机车司机的职业紧张程度进行了分析讨论。

对象 从1100名有两年以上作业工龄的现职司机(机车正、副司机)中随机抽取54人作为研究对象,全部为男性,年龄21~54岁,平均年龄(36±3)岁。

方法 分别采集班前、班后半小时的尿(150ml),低温(-18℃)保存样本。测定前取100ml尿样氧化铝吸附富集后进样,water高效液相色谱测定其浓度,同时平行测定样品中肌酐浓度以校正EMP、NEMP的浓度值。资料处理:由于样品贮存和样品前处理等因素,最终获得去甲肾上腺素代谢物有效数据36个,肾上腺素代谢物有效数据43个。组间差异分析采用配对资料t检验。

结果 1.对所获得的43对EMP检测结果和36对NEMP检测结果进行班前、班后比较,结果显示差异无显著性;正司机和副司机分组,结果差异无显著性;现工种工龄时间分为>5年和≤5年分组,组间差异亦无显著性意义。2.结果明显表现出部分受试者班前EM和NEM值高于班后值,另一部分受试者班前EM和NEM值低于班后值。正、负值部分分组进行处理,结果显示组间班前班后差异均有显著性。

讨论 有研究认为心理社会因素能够引起交感—肾上腺

髓质活动增强,肾上腺素分泌的程度与情绪紧张的程度呈正相关^[1,2]。紧张引起的机体反应除与强度有关外,还因持续时间不同而不同,长时间紧张状态时既可先出现交感神经系统的警觉反应,也可以先出现副交感神经系统反应,以后交感和副交感系统的反应交替反复出现。哪种反应先产生,除取决于刺激的强度外,还与机体的基本状态有关^[3]。本组实验人群的结果分析表明,不同个体可能由于紧张刺激强度不够高,对刺激作用反映出的个体特异性较为突出,一部分反映出班后尿中肾上腺素和去甲肾上腺素代谢物浓度升高,而另一部分结果相反,两种代谢物同时升高或降低的一致性也比较高为75%,群体刺激特异性反应较弱(组间差异较小)。不同工龄、正副司机组间差异无显著性意义,也可能是由于这种双向性反应之掩盖所造成。另一方面,这个结果可能表明机车司机所承受的紧张程度是中等或偏上,其导致机体内稳态机制紊乱的程度,可能还在机体能够应付的范围内,但个体特异性反应及群体特异性反应的同时存在又说明紧张确实存在。因此,我们认为职业紧张其刺激强度不太高时机体反应呈双向性。

参 考 文 献

1 徐俊冕. 医学心理学. 上海:上海医科大学出版社,1988. 33-43.
 2 周金黄. 神经免疫调节研究的新进展. 生理科学进展, 1987, 18(3): 199-202.
 3 张明岛. 医学心理学. 上海:上海医科大学出版社,1998. 48-56.

(收稿日期:2004-07-26)

(本文编辑:林立)

作者单位:450052 郑州,河南省职业病防治研究所劳动卫生科