

# 慢性冷水游泳应激对大鼠海马、前脑皮层神经颗粒素含量的影响

李欢欢 林文娟

**【摘要】**目的 探讨慢性应激对大鼠海马和前脑皮层神经颗粒素 (NG)含量的影响。方法 将雄性 SD大鼠随机分为应激组 (予 10 冷水游泳应激,共 2周)、装置对照组和正常对照组,每组 10 只。于应激前后测量三组大鼠的体质量变化情况,并记录每天应激过程中应激组和装置对照组的排便量以考察应激的强度,应激后以 Western blotting方法测定海马和前脑皮层中的 NG含量 (以 NG含量与  $\beta$ -Actin含量的比值表示)。结果 (1)应激前后,三组大鼠的体质量比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),但应激组的体质量增长相对缓慢;(2)应激第 4—14天应激组的排便量多于装置对照组 ( $P < 0.01$ );(3)应激组和装置对照组海马的 NG含量 [分别为  $(0.66 \pm 0.13)$ 和  $(0.94 \pm 0.26)$ ] 低于正常对照组 [ $(1.93 \pm 0.53)$ ],差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );(4)应激组前脑皮层的 NG含量 [ $(0.45 \pm 0.00)$ ] 低于装置对照组和正常对照组 [分别为  $(2.76 \pm 1.74)$ 和  $(2.87 \pm 1.63)$ ],差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );(5)应激组海马 NG含量高于前脑皮层 ( $P < 0.01$ );装置对照组海马 NG含量低于前脑皮层 ( $P < 0.01$ );正常对照组海马与前脑皮层 NG含量的差异无统计学意义。结论 慢性应激导致海马和前脑皮层 NG含量显著下降;对于时程长、程度严重、适应不良的冷水游泳应激,前脑皮层受损比海马更为严重;而对于时程长、程度微弱的装置应激,海马则比前脑皮层更为敏感。

**【关键词】** 应激; 海马; 前脑; 大脑皮质; 神经颗粒素

**The changes of neurogranin level in rat hippocampus and forebrain after chronic cold water swimming stress** LI Huan-huan, LIN Wen-juan. Brain-Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of chronic cold water swimming stress on protein levels of neurogranin in rat hippocampus and forebrain, and to understand the central mechanisms of stress from the molecular level. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into handled-controls, apparatus-controls and stressed groups, with ten in each group. Forced 10 min cold water swimming was used as a stressor. The defecation numbers of both stressed rats and apparatus controls were recorded during 5 min trial on each day. Furthermore, the weight of rats was monitored during the periods of stress as an index reflecting degree of stress. The neurogranin level in the hippocampus and forebrain after stress was measured with the Western blotting. **Results** (1) Although there was no significant difference in final body weight among the three groups, less weight gain was in stressed rats than in controls. (2) In comparison with the apparatus controls, the stressed group had significantly more numbers of defecation during a 5 min trial on the 4th to 14th experiment day ( $P < 0.01$ ), and no significant differences were found between two groups on the experiment day 1 to 3 ( $P > 0.05$ ). (3) The hippocampal protein levels of neurogranin in stressed group ( $0.66 \pm 0.13$ ) and apparatus-controls ( $0.94 \pm 0.26$ ) were significantly lower than that in handled-controls ( $1.93 \pm 0.53$ ) ( $P < 0.01$ ). (4) The forebrain protein levels of neurogranin in stressed group ( $0.45 \pm 0.00$ ) were significantly lower than that in apparatus-controls ( $2.76 \pm 1.74$ ) and handled-controls ( $2.87 \pm 1.63$ ) ( $P < 0.01$ ). (5) The protein levels of neurogranin in hippocampus were significantly higher than that in forebrain ( $P < 0.01$ ) in stressed group. However, the protein levels of neurogranin in apparatus-controls was significantly higher in forebrain than in hippocampus ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between forebrain and hippocampal neurogranin levels in handled-controls. **Conclusion** Chronic swimming stress can significantly decrease the protein levels of neurogranin in hippocampus and forebrain,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370482);中国科学院创新工程资助项目(KSCX2-2-03)

作者单位:100101北京,中国科学院心理研究所脑-行为研究中心

with more severe changes in the forebrain than in the hippocampus. However, hippocampus seems to be more sensitive than forebrain in response to chronic mild apparatus stress.

【Key words】 Stress; Hippocampus; Proencephalon; Cerebral cortex; Neurogranin

以往研究表明,海马是介导应激反应最重要的脑区之一。在应激过程中,海马参与整合感知的信息、解释环境信息的意义以及调控生物体的行为和神经内分泌反应;慢性应激可导致海马神经元形态改变或细胞缺失,影响海马的突触传递效能<sup>[1-3]</sup>。新近的研究显示,海马并非调节机体应激反应的惟一重要的脑结构,大脑皮层尤其是前额皮质也与应激反应密切相关<sup>[1,4]</sup>。目前,从脑特异性蛋白质的角度来探讨应激反应的脑过程,是应激的脑机制研究的一个新方向。而神经颗粒素(Neurogranin, NG)是一种神经元特异性蛋白质,是突触后蛋白激酶C的底物,主要分布于啮齿类动物的前脑和海马等区域的神经元胞体和树突<sup>[5-7]</sup>。我们将NG作为一项新指标,通过观察大鼠海马、前脑皮层NG在慢性强迫冷水游泳应激前后的变化,探讨慢性应激对海马、前脑皮层的影响是否存在差异;同时,进一步了解在应激反应时,与应激相关的重要脑结构中物质分子所发生的变化。

## 材料和方法

### 一、实验动物及分组

选用健康、雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,购自维通利华实验动物中心,体质量 250 g 以上,单笼喂养。在实验室中经过适应期 7 d,光/暗周期分别为 12 h (其中光照时间 8:00—12:00 h),室温 (22.0 ± 0.5),自由摄食和饮水。适应期内每天接受 3 min 抚摸。

将动物随机分为游泳应激组、装置对照组和正常对照组,每组各 10 只。

1. 应激组:每天上午 8:00 将大鼠置于水温 10,水深为 20 cm 的水池中强迫游泳,每次 5 min,每天 1 次,持续 2 周。

2. 装置对照组:将大鼠放入空水池中,每天 1 次,每次 5 min,之后放回笼中饲养,持续 2 周。

每天分别记录应激组在游泳过程中、装置对照组在水池中的排便量 1 次。

3. 正常对照组:不进行任何处理,在笼中饲养。

对各组大鼠在应激前 1 天和应激第 7, 14 天的体质量变化进行监测。

## 二、方法

1. 仪器和试剂:第一抗体抗 NG 总蛋白多克隆抗体、抗  $\beta$ -Actin 单克隆抗体、第二抗体辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体、BCA (bicinchoninic acid) 蛋白检测试剂盒、0.45  $\mu$ m 硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose filter, NC) 和全细胞裂解液 (buffer) 均购于美国 Sigma 公司;增强型化学发光系统 (ECL) 试剂盒购自美国 Pierce 公司;凝胶色谱半定量分析仪和 GelDoc 分析软件购自美国 Bio-Rad 公司。

2. 海马、前脑皮层 NG 含量的测定:应激实验结束立即断头处死所有大鼠,迅速剥离大脑,取出相同体积的海马和前脑皮层,将标本迅速用液氮冷却。

采用 Western blotting 技术测定大鼠海马和皮层区域 NG 的含量。分别将海马和前脑皮层组织加入全细胞 buffer 匀浆。匀浆中加入 BCA 液摇匀,在 37  $^{\circ}$ C 水浴箱中温育 30 min,通过蛋白质分光光度计进行样品海马和皮层总蛋白质的初步定量,根据样品总蛋白含量计算出每一样品电泳所需加入的缓冲液量。匀浆中加入样品缓冲液,行 15% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 NC 膜,NC 膜以封闭液 [10% 脱脂奶粉, 1% 牛血清白蛋白,溶于 Tween/Tris 缓冲盐水 (Tris-Buffered tween-20 Saline, TBS)] 室温封闭 1 h,用 TBS 洗膜, 10 min, 3 次。加入抗 NG 总蛋白多克隆抗体室温孵育 3 h,再用 TBS 洗膜, 10 min, 3 次。TBS 液稀释山羊抗兔 IgG 抗体 (1:4 000) 孵育,室温,振荡 1 h,同样洗膜 3 次。加入 ECL 荧光标记,以胶片曝光显迹。对同一张 NC 膜上的内参照蛋白  $\beta$ -Actin 进行杂交。通过凝胶成像半定量分析系统对胶片上的 NG 蛋白和  $\beta$ -Actin 蛋白条带进行定量。海马和前脑皮层 NG 含量以同一张 NC 膜上的 NG 含量与  $\beta$ -Actin 含量的比值来表示。

3. 统计学方法:本研究采用成组设计和自身配对设计,数据用 SPSS 10.0 软件处理,结果以平均值  $\pm$  标准差来表示。应激前后三组大鼠体质量的比较、应激后三组大鼠海马、前脑皮层 NG 含量总体的比较和两两比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和事后分析 (LSD);应激过程中应激组与装置对照组排便量的比较采用独立样本  $t$  检验;应激后各组大鼠自身海马、前脑皮层 NG 含量的比较

采用配对样本 *t* 检验。

## 结 果

### 一、三组大鼠应激前后体质量的比较

应激开始前,三组大鼠体质量比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。应激第 7天和应激第 14天时,三组动物的体质量比较,差异仍无统计学意义,但应激组体质量的增长相对缓慢(表 1)。

表 1 三组大鼠应激前后体质量的比较 ( $g, \bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	应激前 1天	应激	
			第 7天	第 14天
应激组	10	314 ±19	358 ±26	386 ±35
装置对照组	10	310 ±15	361 ±21	394 ±35
正常对照组	10	315 ±17	381 ±18	418 ±26
F值		0.32	3.19	2.69
P值		0.73	0.06	0.09

### 二、应激组与装置对照组排便量的比较

在应激第 1—3天,应激组与装置对照组的排便量比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。应激第 4—14天,应激组大鼠的排便量多于装置对照组 ( $P < 0.01$ )。应激组与装置对照组排便量的比较见表 2。

表 2 应激期内应激组与装置对照组排便量的比较  
(粪便颗粒数,  $\bar{x} \pm s$ )

应激时间 (天)	应激组 ( $n=10$ )	装置对照组 ( $n=10$ )	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
1	4.5 ±2.0	5.0 ±1.8	-0.59	0.56
2	4.5 ±1.7	3.3 ±2.6	1.22	0.24
3	5.7 ±2.2	4.1 ±3.7	1.18	0.26
4	8.0 ±1.3	2.9 ±2.6	5.52	0.00
5	5.1 ±2.1	1.6 ±2.3	3.51	0.00
6	6.8 ±1.7	1.4 ±2.5	5.66	0.00
7	6.2 ±2.2	1.4 ±2.3	4.85	0.00
8	5.8 ±2.0	1.2 ±2.0	5.10	0.00
9	6.1 ±2.4	1.5 ±2.1	4.57	0.00
10	6.9 ±2.4	2.0 ±3.4	3.71	0.00
11	6.8 ±1.8	1.5 ±2.5	5.55	0.00
12	6.6 ±1.9	1.0 ±2.1	6.24	0.00
13	7.8 ±1.8	0.7 ±1.5	9.55	0.00
14	5.2 ±2.0	1.1 ±1.8	4.77	0.00

三、应激后三组大鼠海马、前脑皮层 NG含量的比较(表 3)

1. 海马 NG含量:三组大鼠海马的 NG含量总体比较,差异有统计学意义。两两比较,应激组和装置对照组的 NG含量均低于正常对照组 ( $P < 0.01$ );

表 3 三组大鼠海马、前脑皮层区域 NG含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数 (只)	神经颗粒素含量	
		海马	前脑皮层
应激组	10	0.66 ±0.13*	0.45 ±0.00*#
装置对照组	10	0.94 ±0.26*	2.76 ±1.74
正常对照组	10	1.93 ±0.53	2.87 ±1.63
F值		35.71	9.76
P值		0.00	0.00

注:与正常对照组相比,\*  $P < 0.01$ ;与装置对照组相比,#  $P < 0.01$

而应激组与装置对照组间的差异无统计学意义。

2. 前脑皮层 NG含量:三组大鼠前脑皮层的 NG含量总体比较,差异有统计学意义。两两比较,应激组低于装置对照组和正常对照组 ( $P < 0.01$ );装置对照组与正常对照组 NG含量的差异无统计学意义。

四、应激后三组海马与前脑皮层 NG含量的比较

应激组海马 NG含量高于前脑皮层 NG含量 ( $t=4.23, P < 0.01$ );装置对照组海马 NG含量低于前脑皮层 NG含量 ( $t=-3.28, P < 0.01$ );正常对照组自身海马与前脑皮层 NG含量的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

急性应激能导致大鼠前脑皮层的 NG含量降低,而海马的 NG含量则无明显变化<sup>[8]</sup>。提示 NG可作为反映应激对不同脑结构影响程度差异的指标。但是,目前关于 NG与应激关系的研究并不多,尤其是在慢性应激过程中的变化尚未见报道(经检索以下数据库:www. sciencedirect com、www. ncbi.nlm.nih.gov、www. leammem.org、www. elsevier.com、www. scirus.com,检索年代未予限定)。

慢性应激导致应激敏感脑区结构和功能的改变,可能是应激相关性精神障碍发生的重要脑机制,而海马和前脑皮层是涉及应激反应的重要脑结构<sup>[9]</sup>。由于 NG在海马和前脑皮层的含量丰富<sup>[5,7,8]</sup>,并且主要定位于神经元的树突棘上,因而可能成为海马和前脑皮层在应激后发生形态学改变的指征蛋白。慢性强迫性冷水游泳应激是最常用的动物抑郁模型之一<sup>[10]</sup>,本研究采用该应激模型,结果显示,冷水游泳应激导致大鼠海马、前脑皮层 NG含量显著下降,提示该应激对海马和前脑皮层结构

均可产生显著影响。NG含量下降的原因,可能是树突棘数量的减少和细胞缺失。这一观点获得不少研究证据的支持<sup>[2,11]</sup>。我们在研究中进一步发现,游泳应激组动物前脑皮层的NG含量下降程度比海马更为显著,这一结果也与国外相关研究结果一致<sup>[8]</sup>。提示在长时程、高强度、适应不良(表现为游泳应激组大鼠在每天的应激过程中,均表现出明显的排便反应,体质量持续下降)的应激作用下,前脑皮层结构受损较海马更为严重。这可能是由于树突发达的海马锥形神经元是可塑性较强的神经元,可以通过神经抽芽,形成突触更新和重排等突触结构的代偿性改变<sup>[12]</sup>;而前脑皮层神经元的突触形态可塑性相对较弱,在应激后的代偿能力差所致。McEwen<sup>[13]</sup>和 Conrad等<sup>[14]</sup>也提出类似观点。

本研究还显示,装置对照组大鼠海马NG含量显著低于正常对照组,而前脑皮层NG含量与正常对照组相比差异无统计学意义。表明装置对照组大鼠每天接受的也是一种新异环境的应激,该应激程度相对较弱,这可以体现在装置对照组大鼠在新异环境中的第4天开始,已无明显的排便反应,并且体质量增加程度与正常对照组一致,表现出行为上的适应。但是,即使是这种轻微的应激,也可能对海马的形态结构产生影响。提示在长时程、强度弱且大鼠易产生适应的应激条件下,海马对应激反应较前脑皮层更为敏感。这是由于在脑内神经环路中,神经元的树突和侧棘是对环境因素影响较为敏感的结构<sup>[12]</sup>。海马的锥形神经元树突十分发达。在轻微的应激条件下,海马即可表现出树突棘结构的可塑性变化,如分布在海马锥形神经元树突棘上的NG含量减少,正是该脑区神经元形态学发生改变的一种反映;而前脑皮层神经元不具有发达的树突和侧棘结构,因而不易受到这种应激条件的影响。

综上所述,慢性严重应激能引起海马和前脑皮层的NG含量显著下降,其中前脑皮层的NG含量下降较海马更为明显,提示除海马外,前脑皮层是涉

及应激反应的另一重要脑结构。在慢性轻微应激时,海马则比前脑皮层更为敏感。NG作为一种定位于树突棘的神经元特异性蛋白质,是反映海马、前脑皮层对应激源的性质和严重程度较为敏感的指标。

#### 参 考 文 献

- 1 Lupien SJ, Lepage M. Stress, memory, and the hippocampus: can t live with it, can t live without it. *Behav Brain Res*, 2001, 127: 137-158.
- 2 张艳美,杨权,许崇涛,等.慢性应激对大鼠海马CA3区锥体细胞形态结构的效应. *中华精神科杂志*, 2002, 35: 22-24.
- 3 马强,王静,杨志华,等.慢性应激对大鼠学习记忆能力和海马LTP的影响. *中国应用生理学杂志*, 2001, 16: 318-320.
- 4 McEwen BS. Stress, sex, hippocampal plasticity: relevance to psychiatric disorders. *Clin Neurosci Res*, 2001, 1: 19-34.
- 5 Watson JB, Sutcliffe JG, Fisher RS. Localization of the protein kinase C phosphorylation/calmodulin-binding substrate RC3 in dendritic spines of neostriatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 8581-8585.
- 6 Wu J, Li J, Huang KP, et al. Attenuation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase signal transduction in the neurogranin knockout mouse. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19498-19505.
- 7 Houben MP, Lankhorst AJ, van Dalen JJ, et al. Pre- and postsynaptic localization of RC3/neurogranin in the adult rat spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci Res*, 2000, 59: 750-759.
- 8 Neuner-Jehle M, Rhyner TA, Borbely AA. Sleep deprivation differentially alters the mRNA and protein levels of neurogranin in rat brain. *Brain Res*, 1995, 685: 143-153.
- 9 McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*, 2000, 886: 172-189.
- 10 Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25: 219-233.
- 11 Chen CC. Alterations of protein kinase C isozyme and substrate proteins in mouse brain after electroconvulsive seizures. *Brain Res*, 1994, 648: 65-72.
- 12 韩太真,吴馥梅.学习与记忆的神经生物学.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998: 208-209.
- 13 McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry*, 2000, 48: 721-731.
- 14 Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, et al. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*, 1999, 113: 902-913.

(收稿日期:2005-03-23)

(本文编辑:刘宏林)