

急性生理应激对大鼠的行为及 脑神经颗粒素磷酸化水平的影响^{*}

李欢欢¹ 林文娟¹ 李俊发²

(¹中国科学院心理研究所脑-行为中心, 北京 100101) (²首都医科大学神经生物学教研室, 北京 100054)

摘要 突触特异性蛋白质在应激所致行为效应的中枢机制中的可能角色日益受到关注。神经颗粒素 (Neurogranin, NG) 是一种新发现的突触特异性蛋白质, 主要分布在前额叶、杏仁核和海马区域, 参与突触结构和功能可塑性机制, 可能涉及到应激所致行为效应中枢机制。但是, 关于 NG 应激和行为之间的关系国内外尚缺乏系统的研究报告。本研究主要是探讨急性生理应激对大鼠行为和 NG 的作用, 以及 NG 的变化与应激性行为效应之间的相互关系。以急性强迫性冷水游泳应激, 建立生理应激动物模型。将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为游泳应激组 1 (SS1, 接受游泳应激和行为测试)、游泳应激组 2 (SS2, 接受游泳应激而不接受行为测试)、正常对照组 1 (C1, 接受行为测试) 和正常对照组 (C2, 不予任何处理) ($n=10$)。以旷场行为和高架十字迷宫任务来评定大鼠应激后的行为变化, Western blotting 方法测定海马和前脑皮层中的 NG 含量和磷酸化水平。结果表明: 应激后 SS1 组的呆滞行为增加, 与 C1 组比较, 差异有显著性, $p < 0.01$; SS1 组海马的 NG 含量和 NG 磷酸化水平增高, 与 C1 和 C2 组相比, 差异有显著性, 均为 $p < 0.05$; SS1 组皮层的 NG 含量增高, 与 C1 和 C2 组相比, 差异有显著性, 均为 $p < 0.01$; SS1 组皮层的 NG 磷酸化水平增高, 与 C1 组相比, 差异具有显著性, $p < 0.01$; 前脑皮层的 NG 磷酸化水平与呆滞行为之间的相关达显著水平。提示该应激源能诱发动物明显的恐惧反应, 呆滞行为是反映急性生理应激导致行为障碍的敏感的行为学指标, 海马和前脑皮层均是对急性生理应激反应敏感的脑区。NG 的磷酸化水平可能是反映急性生理应激所致行为障碍的一项新的生物学指标。

关键词 生理应激, 海马, 前脑, 行为, 神经颗粒素。

分类号 B845

1 前言

对应激所致行为效应的脑机制研究成为目前生物心理学的热点领域, 以期为临床上的应激相关性疾病 (如创伤后应激障碍, 广泛性焦虑障碍和抑郁症) 等的治疗途径提供新的线索。目前研究表明, 中枢神经系统的变化是应激反应, 尤其是应激所致行为效应的关键所在。但是对于应激反应的中枢机制仍知之甚少。

国内外许多学者认为突触结构和功能可塑性的改变就是应激在中枢神经系统留下的生物学“痕迹”, 它会引起脑功能和行为活动的改变。由于突触特异性蛋白质对维持突触结构, 包括突触的生长、发育和代偿性变化具有十分重要的作用。蛋白质的磷酸化反应则是细胞外的信息传入细胞的跨膜信息

传递机理中的重要部分, 蛋白质磷酸化水平的变化可通过调节神经递质受体的活性, 来引起突触传递效能的改变^[1,2]。因此可以假设, 应激导致某些突触特异性蛋白质的数量和磷酸化水平发生的变化, 可能通过影响突触结构和功能可塑性机制, 参与应激所致行为效应的中枢机制。近年来, 关于这一假设获得了不少研究证据的支持, 即某些表达于中枢神经元的特异性蛋白质如热休克蛋白 70 (Heat Shock protein - 70, HSP - 70)、脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、膜生长相关蛋白 (the presynaptic 43 - kDa growth - associated protein, GAP - 43) 等与应激和某些精神障碍发生密切相关^[3,4]。使得研究者们开始关注突触特异性蛋白质在应激反应的中枢机制中的可能角色。

神经颗粒素 (Neurogranin, NG) 是一种神经元特

收稿日期: 2006 - 03 - 29

^{*}中国科学院创新工程 (KSCX2 - 2 - 03) 和国家自然科学基金 (NO. 30370482) 资助。

通讯作者: 林文娟, E-mail: Linwj@psych.ac.cn

异性、Ca²⁺敏感性的CaM结合蛋白,是突触后蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)的底物。自NG发现以来,它的生物学作用一直受到研究者的关注。相关研究表明,由于PKC是催化底物蛋白磷酸化的重要激酶,能通过介导突触强度的改变来调节神经功能。所以,NG作为PKC的底物,并含有与CaM结合和G_β蛋白活化的共同序列,其在大脑中可能是将突触后Ca²⁺/CaM信号途径和PKC介导的第二信使系统连接起来,调节PKC介导的信号传递途径而发挥功能^[5]。突触后NG含量的减少会导致Ca²⁺钙调蛋白信号途径和突触可塑性的区域特异性损害^[7]。此外,NG作为中枢N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NR)依赖性LTP途径的下游分子,NG磷酸化水平的增高可促进突触后膜上的NR增敏,增强突触间的信号传导^[6,8]。近年来,关于NG与行为和健康关系的研究也发现,NG能影响突触发育和重塑过程,NG的缺乏可以导致大鼠空间学习能力的缺陷,在老龄化和某些中枢神经系统退行性疾病的发生过程中也伴有NG的缺失^[7,9-12]。这些研究结果提示NG在突触的可塑性机制中扮演重要的角色,可能涉及行为和健康的中枢机制。此外,NG主要分布于前额叶皮质、海马和杏仁核区域锥形神经元的胞体和树突棘,而这些脑区是涉及应激、情绪和行为的重要脑结构。那么,NG是否在应激所致行为改变的脑机制中起作用?或者是应激本身能否引起大脑中NG分布和磷酸化水平的变化等问题值得探索。目前,关于NG、应激和行为之间的关系国内外尚缺乏系统的研究报道。

本实验室以往采用经典的慢性强迫性冷水游泳应激模型,同时建立行为学观察指标,考察慢性生理应激源对大鼠行为和脑NG的影响,以及NG的变化与异常行为之间的关系。结果发现,慢性强迫性冷水游泳应激导致大鼠明显的行为异常,海马和前额叶皮层的NG含量显著下降,NG的磷酸化水平检测不出。并且NG的变化与异常行为之间相关显著^[15,16]。采用慢性不确定性空瓶应激模型,也获得了较为一致的实验结果^[17]。提示慢性应激后,NG含量的下降可能导致上述脑区突触可塑性机制的损害,从而出现相应的行为障碍。NG有可能涉及慢性生理和情绪应激所致行为障碍的中枢机制。为此,本研究拟进一步建立急性生理应激动物模型,应激范式仍选用强迫性冷水游泳,来系统的考察NG与不同性质、不同时间程应激源所致行为效应之间的

关系。并尝试将NG的含量和磷酸化水平的变化作为反映急、慢性应激源所致行为效应涉及不同的中枢机制一项新的生物学指标。

2 材料与方法

2.1 实验动物及分组

实验选用雄性Sprague-Dawley大鼠40只,购自维通利华实验动物中心,体重250g以上,单笼喂养。在实验室中经过适应期7天,光暗周期为12h/12h(光照时间08:00~20:00h),室内温度为(22±0.5),湿度为50%左右。适应期内所有动物自由摄食和饮水,每天接受3min抚摸。

大鼠随机分为四组:游泳应激组1(Swimming Stress group 1, SS1)、游泳应激组2(Swimming Stress group 2, SS2)、正常对照组1(Control group 1, C1)和正常对照组2(Control group 2, C2),每组为10只。SS1接受游泳应激和两次行为测试,SS2接受游泳应激而不接受行为测试,C1接受两次行为测试,C2不给予任何处理,在笼中饲养。SS2组和C2组的设置是为了控制行为测试所产生的影响。

2.2 应激程序

适应期结束后,SS1和SS2于次日上午8点被置于水温10,水深为20cm的水池中强迫游泳,持续5min,应激一次。

2.3 仪器和试剂

第一抗体抗NG总蛋白多克隆抗体、 β -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、山羊抗鼠IgG抗体、BCA(Bicinchoninic acid)蛋白检测试剂盒、buffer(全细胞裂解液)、硝酸纤维素膜(Nitrocellulose filter, NC)均为Sigma公司产品,增强型化学发光系统(Electrochemiluminescence, ECL)试剂盒购自美国Pierce公司。Gel Doc凝胶成像半定量分析系统购自Bio-Rad公司。

2.4 行为测试

采用旷场测试和高架十字迷宫任务程序,SS1组和C1组动物在适应期末和应激期末共进行两次行为测试。

2.4.1 旷场测试 将动物置于高50cm、直径180cm、周边和底面均为黑色的圆形旷场中,光照度为60lux,室内隔音。观察者在行为实验室内用摄像系统记录动物在旷场内5min的行为表现,包括水平活动距离、直立、修饰、探究、呆滞和排便量。其中水平活动距离和探究通过行为跟踪分析系统获得数据,直立、呆滞、修饰行为是根据行为摄像仪统计发

生的次数。每只动物的排便量是以旷场试验结束后排便的颗粒数来表示。

2.4.2 高架十字迷宫任务 装置高 50cm,开放吊臂为 110cm ×10cm ×10cm(长 ×高 ×宽),闭合吊臂为 110cm ×50cm ×10cm(长 ×高 ×宽)。测试于每天 10:00 ~ 14:00h进行。在测试开始时,大鼠被放至迷宫的中间平台上,面对迷宫的同一个开放吊臂。测试时间为 5min,记录 4个行为指标。(1)进入迷宫开放吊臂总次数,(2)在迷宫开放吊臂中停留时间(3)进入迷宫闭合吊臂总次数(4)在迷宫闭合吊臂中停留时间。

2.5 海马和前脑皮层 NG含量和磷酸化水平的测定 应激实验结束后次日,对 SS1组和 C1组大鼠进行行为测试后,立即快速断头处死所有大鼠,剥离海马和相同体积的前脑皮层组织,前脑皮层组织是根据大鼠脑图谱确定的正中中线靠近前外侧的前额叶皮层组织(如图 1所示 M1和 M2区域)。并将组织迅速用液氮冷却。

2.5.1 海马、前脑皮层组织细胞总蛋白质的制备 将每只大鼠的海马和前脑皮层组织分别加入 250ul 预冷的蛋白质提取缓冲液(50mM Tris - Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 50mM OKA,

1%蛋白酶抑制剂混合物)匀浆,冰上超声裂解 5min,4 离心 30min,去除细胞碎片,吸取上清液。每一样品组织取 2ul上清液加入 1ml BCA液摇匀(1:500),在 37 水浴箱中温育 30min使蛋白质变性,通过紫外分光光度计测定每一样品组织的总蛋白浓度,海马组织总蛋白的浓度范围在 15.75 ~ 19.85ug/ul,前额叶组织总蛋白的浓度范围在 17.4 ~ 20.55ug/ul。之后,将每只大鼠的海马和前脑皮层组织均制备成总蛋白浓度为 3μg/μl,体积为 150ul的样品用于电泳分离。具体方法是:根据紫外分光光度计测出的每一样品组织各自的总蛋白浓度,以 [样品上清液 +电泳缓冲液(Running buffer)]:蛋白上样缓冲液(Loadng buffer) =4:1的体积比例,计算出要将每一样品组织制备成体积为 150ul,总蛋白质含量为 450ug的电泳样品,需分别加入的每一样品原液、Running buffer和 Loadng buffer的体积。其中,Loadng buffer体积为:150 ul ×1/5 =30ul;样品原液体积为:450ug/样品总蛋白浓度,Running buffer的体积为:120 ul -样品原液体积。将每一样品组织的总蛋白浓度配齐为 3μg/μl,目的是确保每一电泳样品进行电泳的总蛋白含量一致。

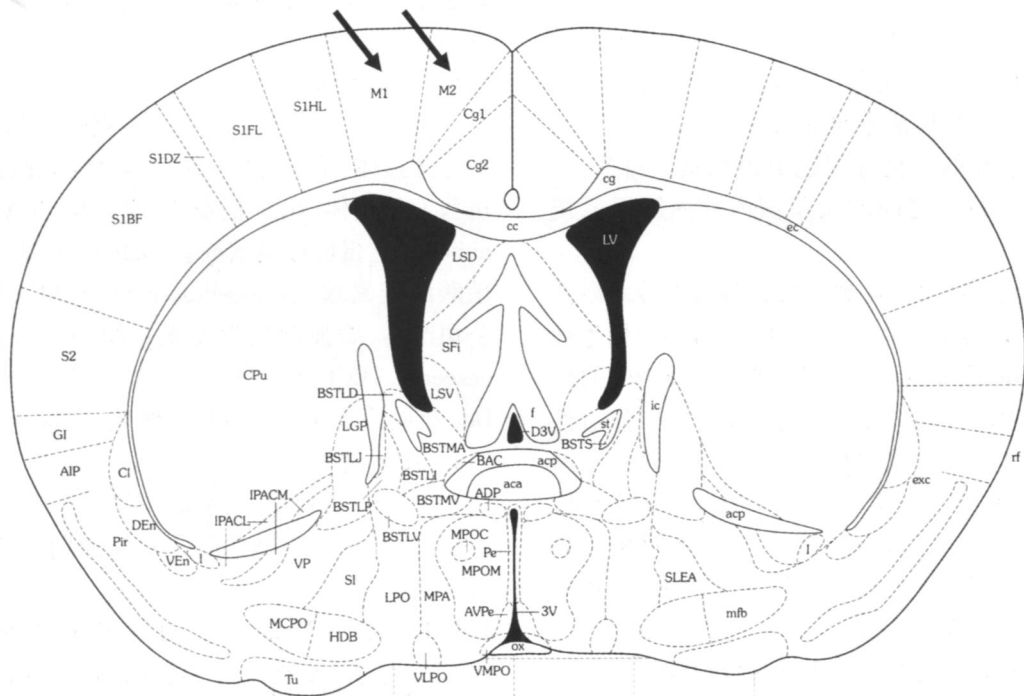


图 1 大鼠脑组织图谱 (Paxinos, 1986)

2.5.2 蛋白质印迹分析(Western blotting) 采用 Western blotting技术测定大鼠海马区域 NG蛋白含

量和磷酸化水平^[15-18]。30μg蛋白质(每一样品 10ul)在 15%的聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转

移至 NC膜,NC膜以封闭液(10%脱脂奶粉,1%牛血清白蛋白,溶于 TBS)室温封闭 1h,用 TBS洗膜,10min \times 3次。在抗 NG₂ - Actin和 Phospho NG₂的一抗溶液(抗体用 TBS缓冲液 1:1000稀释)中室温孵育 3小时,再用 TBS洗膜,10min \times 3次。在 HRP标记的 TBS液稀释羊抗兔(NG, Phospho NG)和羊抗小鼠(β -Actin)的二抗溶液(抗体用 TBS缓冲液 1:4000稀释)孵育,室温振荡 1h,同样洗膜 3次。加入 ECL 荧光标记,以胶片曝光显迹。之后,通过 Gel Doc 凝胶成像半定量分析系统对同一张 NC膜上胶片上的 NG蛋白、磷酸化 NG和 β -Actin 蛋白条带进行定量。四组大鼠的 NG含量和 NG磷酸化水平的指标是以同一张 NC膜上的 NG含量、磷酸化 NG与 β -Actin含量的比值来表示^[19-22],NG和磷酸化 NG的蛋白质条带密度单位为光密度单位(Optical Density unit,ODu)。

2.6 统计方法

SS1组和 C1组行为指标的比较采用独立样本 t 检验。四组大鼠海马、前脑皮层 NG含量和 NG磷

酸化水平的总体和两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和事后检验(Post-hoc test, LSD)。旷场行为指标与脑 NG水平之间的相关分析采用 Pearson积差相关和 Spearman等级相关。

3 实验结果

3.1 旷场行为

应激前,两组动物在旷场行为测试中的各项指标均无显著差异($p > 0.05$)。

应激后,与 C1相比,SS1动物在旷场测试中的呆滞行为发生次数与时间均显著增加(均为 $p < 0.01$),而在其余行为指标上无统计学显著差异。结果见表 1。

3.2 高架十字迷宫任务

应激前后,四组大鼠在开臂探索次数、开臂停留时间、闭臂探索次数和闭臂停留时间四项指标的总比较差异均无显著性($p > 0.05$)。结果见表 2、表 3。

表 1 应激后,SS1组与 C1组大鼠旷场行为比较的差异($M \pm SD$)

组别	水平活动(cm)	直立(次数)	修饰(次数)	排便量(颗粒数)	呆滞行为(次数)	呆滞时间(s)
SS1组	1952.30 \pm 1463.47	8.40 \pm 7.69	1.10 \pm 1.10	3.60 \pm 2.91	1.00 \pm 1.05	70.30 \pm 80.26
C1组	1287.00 \pm 732.36	8.70 \pm 7.80	1.60 \pm 1.27	2.40 \pm 2.37	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
t	1.65	0.01	0.89	1.02	9.00	7.67
p	0.22	0.93	0.36	0.33	0.01	0.01

表 2 应激前 SS1与 C1组大鼠十字迷宫任务中的行为比较差异($M \pm SD$)

组别	鼠数	开臂时间(s)	开臂次数	闭臂时间(s)	闭臂次数
SS1组	10	182.50 \pm 86.68	5.60 \pm 3.37	117.50 \pm 86.68	4.50 \pm 2.17
C1组	10	227.90 \pm 39.11	7.60 \pm 2.88	72.10 \pm 39.11	4.60 \pm 2.63
t		2.28	2.04	2.28	0.01
p		0.15	0.17	0.15	0.93

表 3 应激后 SS1与 C1组大鼠十字迷宫任务中的行为比较差异($M \pm SD$)

组别	鼠数	开臂时间(s)	开臂次数	闭臂时间(s)	闭臂次数
SS1组	10	194.80 \pm 97.60	4.70 \pm 2.31	105.20 \pm 97.60	3.10 \pm 1.73
C1组	10	191.90 \pm 85.79	5.20 \pm 2.94	108.10 \pm 85.79	3.50 \pm 1.90
t		0.01	0.18	0.01	0.24
p		0.95	0.68	0.95	0.63

3.3 应激后各组动物海马、前脑皮层 NG蛋白含量和磷酸化水平

通过 Western-blotting分析发现,SS1组、SS2组海马和前脑皮层区域的 NG磷酸化 NG的蛋白质条带密度表达高于正常对照组,而 β -Actin蛋白质

条带在四组大鼠中表达均一。

方差分析结果显示:在海马和前脑皮层区域,四组大鼠 NG含量和磷酸化水平总体比较差异显著(分别为 $F(3,36) = 3.91, p < 0.05$; $F(3,36) = 2.89, p < 0.05$; $F(3,36) = 6.87, p < 0.01$; $F(3,36)$

=3.34, $p < 0.05$)。两两比较发现,在海马区域,SS1组的 NG含量和磷酸化水平均显著高于 SS2组(分别为 $p < 0.01$; $p < 0.01$)、C1(分别为 $p < 0.05$; $p < 0.05$)和 C2组(分别为 $p < 0.05$; $p < 0.05$)。在皮层区域,SS1的 NG含量也显著高于其余三组(分别

为 $p < 0.01$; $p < 0.01$; $p < 0.01$);而 SS1组的 NG磷酸化水平显著高于 C1组($p < 0.01$);与 C1和 C2组相比,SS1组和 SS2组的磷酸化水平均有增高的趋势。结果见表 4。

表 4 四组大鼠海马、前脑皮层 NG含量和磷酸化水平的差异比较 (ODu, $M \pm SD$)

组别	脑区 NG含量		脑区 NG磷酸化水平	
	海马	前脑皮层	海马	前脑皮层
SS1组	2.44 \pm 1.56*	2.55 \pm 1.02**	0.64 \pm 0.32*	0.70 \pm 0.28**
SS2组	1.08 \pm 0.47	1.60 \pm 0.35	0.40 \pm 0.01	0.58 \pm 0.20
C1组	1.67 \pm 0.44	1.72 \pm 0.47	0.47 \pm 0.12	0.41 \pm 0.14
C2组	1.48 \pm 0.70	1.37 \pm 0.36	0.46 \pm 0.17	0.57 \pm 0.11
F	3.91	6.87	2.89	3.34
p	0.02	0.01	0.05	0.03

注: *表示与 C1组相比, $p < 0.05$; **表示与 C1组相比, $p < 0.01$; 表示与 C2组相比, $p < 0.05$; 表示与 C2组相比, $p < 0.01$

3.4 旷场行为与脑 NG含量变化的相关分析

相关分析结果显示:旷场测试中的水平活动与直立行为之间呈显著正相关,呆滞行为与水平活动、直立行为呈显著负相关,修饰行为与其余旷场行为

指标之间相关无显著性;前脑皮层的 NG磷酸化水平与呆滞行为呈显著正相关,海马 NG含量、NG磷酸化水平与各项旷场行为指标之间的相关均未达到统计学上的显著意义。结果见表 5。

表 5 各旷场行为指标之间及旷场行为指标与 NG含量和磷酸化水平之间的相关系数矩阵

变量	直立	水平活动	呆滞次数	呆滞时间	修饰	排便量	海马 NG含量	皮层 NG含量	海马 NG磷酸化水平
水平活动	0.82**								
呆滞次数	-0.45*	-0.33							
呆滞时间	-0.49*	-0.45*	0.68**						
修饰	-0.18	-0.35	0.14	0.13					
排便量	-0.27	-0.27	0.27	0.37	-0.16				
海马 NG含量	-0.11	-0.06	0.29	0.36	-0.04	0.08			
皮层 NG含量	0.07	0.33	0.33	0.07	-0.14	-0.29	-0.28		
海马 NG磷酸化水平	-0.16	-0.12	0.38	0.16	0.43	0.06	0.63**	-0.08	
皮层 NG磷酸化水平	0.11	0.32	0.50*	0.17	-0.27	-0.35	0.01	0.79**	0.13

注: ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

4 讨论

本研究发现,SS1组大鼠在旷场中出现明显的呆滞行为,表明急性冷水游泳应激引起了大鼠明显的焦虑和恐惧反应。这与 Pijman等的研究结果一致^[18,23],他们发现急性足电击能导致大鼠在旷场中的活动量显著下降,以及木僵(immobility)现象。而 SS1组与 C1组大鼠在高架十字迷宫任务中的四项行为指标未表现出显著差异。提示在测量急性应激源所导致的大鼠行为障碍表现方面,旷场测试比高架十字迷宫任务敏感。

由于 NG主要分布在海马和前脑皮层锥体神经元的树突棘和胞体。NG的磷酸化增加有助于 LTP的生理表达,可增强突触传递的效能^[5,8,24]。提示应激后,脑区 NG含量的变化可作为反映神经元数量和棘突发生形态学改变的指标,NG的磷酸化水平的改变可作为反映中枢神经元功能变化的指标。本研究发现,与正常对照组相比,SS1组的海马、前脑皮层 NG含量和磷酸化水平显著增高。提示在急性应激的作用下,SS1组可能出现了中枢神经元功能的一过性激活,以及神经元结构上的代偿性变化,如树突棘数量的增加。这与国内外的相关研究结果一

致。如 Shen 等的研究^[25]发现急性游泳应激引起脑内广泛区域包括海马、前脑皮质、杏仁核和纹状体等的丝裂原活化蛋白激酶系统 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 的活性增强和磷酸化水平增高。Uysal 和 Dwivedi 等的研究^[26,27]也表明,急性足电击可引起大鼠海马和前脑皮层的超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化谷胱甘肽化酶 (glutathione peroxidase, GP) 和脑内重要信号传导途径 - 磷脂酰肌醇途径中的关键酶磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 的活性增强。表明短期的、适度应激能促进机体的生理功能,有利于机体对外界刺激做出快速反应。本研究还发现,与 C2 组相比,SS2 组和 C1 组的脑 NG 含量和磷酸化水平均无明显变化。结合本实验室以往的研究以及预实验结果,15 分钟的行为测试不能引起大鼠脑内 NG 含量的显著变化^[15],而急性力竭游泳却可引起 NG 含量的显著增高 (数据未列出)。提示对大鼠而言,行为测试虽然也是一种急性应激源,但它的强度微弱,只有与游泳应激产生协同效应的情况下,才能导致海马和前脑皮质 NG 含量和 NG 磷酸化水平的增高。由于游泳应激的强度要明显大于行为测试应激,所以,游泳应激是导致 NG 含量变化的主要应激源。脑内 NG 的变化与应激的强度密切相关。SS2 组接受单一的冷水游泳应激,未能观察到该组大鼠海马和前脑皮层的 NG 含量和磷酸化水平的显著改变。可能的原因是:5 分钟的游泳应激尽管没有引起大鼠中枢神经元功能和结构上可观察到的明显变化,但却使得中枢神经元的功能和结构对外界刺激反应的易感性显著增加。

Pijman 等提出^[18,23],急性足电击后动物出现的木僵和活动量减少等焦虑行为,可能是中枢多巴胺 (dopamine, DA) 的分泌增加所致,因为应激诱导的中央前额叶 DA 分泌具有焦虑源性作用。提示应激后中枢神经系统变化的可能是行为障碍差异发生的基础。本研究结果显示,在急性游泳应激过程中,前脑皮层的 NG 磷酸化水平与呆滞行为之间呈显著正相关。提示前脑皮层的 NG 磷酸化水平可能是预测急性生理应激所致焦虑行为的一项较为敏感的生物学指标,它可能涉及到急性生理应激所致行为改变的中枢机制。可能的原因是:急性应激过程中,NG 磷酸化水平的增高促进 NR 依赖性 LTP 的表达,使得突触传递效能增强,一方面有助于情绪性记忆的形成和巩固,另一方面使动物行为存在持续维持的中枢机制。动物表现出活动增多,兴奋焦虑。这一

假设尚需进一步研究证实。

综合本实验室以往的研究结果,慢性冷水游泳应激和慢性情绪应激导致海马和前脑皮层的 NG 含量显著下降,NG 的磷酸化水平检测不出^[15-17],急性情绪应激则引起上述脑区 NG 含量和磷酸化水平增高^[28]。本研究中,急性游泳应激亦引起 NG 含量和磷酸化水平的增高。并且在急慢性生理应激和情绪应激模型中,NG 的变化与异常行为之间的两两相关均达显著水平^[15-17,28]。提示脑内 NG 的变化与应激源的强度和时程密切相关,而无明显的应激源特异性。NG 的含量和磷酸化水平的不同变化趋势可作为反映急慢性应激所致行为障碍可能涉及不同的中枢机制的一项指标。由此,本研究假设,不同性质的应激源引起的行为障碍表现存在差异,其涉及的中枢机制可能存在共同和特异性成分。在应激时程相同的条件下,情绪应激和生理应激导致的行为障碍表现虽然存在差异,但是海马和前脑皮层的 NG 含量和磷酸化水平却存在共同的变化趋势。提示脑内 NG 水平的变化可能是涉及到应激所致行为障碍的共同中枢机制的一部分。这一假设还有待进一步研究证实,但获得了不少研究证据的间接支持。如 Pizaro 等的研究^[29]表明,急性社会应激能导致大鼠出现长时程的行为障碍,包括过度的恐惧反应,争夺领地行为的抑制,而急性限制应激则没有导致大鼠类似的行为反应。但是这两种不同性质的急性应激均引起大鼠海马 CA1 - CA3 区域、杏仁核和前脑皮层的 BDNF mRNA 的表达显著减少。并且他们认为,这些脑区的 BDNF mRNA 表达减少可能是涉及应激后大脑的突触可塑性改变和行为障碍发生的共同中枢机制。此外,Roman 等的研究^[30]也提出,神经内分泌反应的增强是急性抚摸应激和急性新异环境应激诱发大鼠行为改变的共同机制。

本研究的局限性有以下两点:一是由于本研究只考察了海马和前额叶脑区 NG 含量的变化,而没有涉及其他的脑区如杏仁核区域。虽然得到了有意义的结果,但未能确定急性冷水游泳应激引起海马和前额叶 NG 含量的增加是否具有特异性,而对其他脑区的 NG 含量无影响。为此,在预实验中已初步采用免疫组化的方法,对急性游泳应激后大鼠的杏仁核区域 NG 表达阳性的细胞数进行计数分析,发现应激组与对照组相比无显著差异 (数据未列出),但需在该实验技术和方法上进一步加强。二是没有设置急性冷水应激的不同强度,来考察应激强度与 NG 含量变化之间的剂效关系。拟在后续实

验中加以补充和完善。

参 考 文 献

- 1 Pasinelli P, Ramakers GM, Urban IJ, et al Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behavioural Brain Research*, 1995, 66: 53 ~ 59
- 2 Li B, Chen N, Luo T, et al Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, 2002, 5(9): 833 ~ 834
- 3 Filipovic D, Gavrilovic L, Dronjak S, Radojic M B. Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress. *Neuropsychobiology*, 2005, 51(2): 107 ~ 114
- 4 Aydemir O, Deveci A, Taneli F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 2005, 29(2): 261 ~ 265
- 5 Angenstein F, Hirschfelder M, Staak S. Activation of metabotropic glutamate receptors increases endogenous protein kinase C substrate phosphorylation in adult hippocampal slices. *Brain Research*, 1997, 16: 44 ~ 54
- 6 Rodriguez-Sanchez P, Tejero-Diez P, Diez-Guerra F J. Glutamate stimulates neurogranin phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, 1997, 221(2-3): 137 ~ 140
- 7 Mons N, Enderlin V, Jaffard R, Huguere P. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 2001, 79(4): 859 ~ 867
- 8 Ramakers GM, Gerendasy D D, de Graan P N. Substrate phosphorylation in the protein kinase C gamma knockout mouse. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(4): 1873 ~ 1874
- 9 Angenstein F, Buchner K, Staak S. Age-dependent differences in glutamate-induced phosphorylation systems in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, 1999, 9(2): 173 ~ 185
- 10 Chang J W, Schumacher E, Coulter P M 2nd, Vinters H V, Watson J B. Dendritic translocation of RC3/neurogranin mRNA in normal aging, Alzheimer disease and fronto-temporal dementia. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 1997, 56(10): 1105 ~ 1118
- 11 Ciccarelli F D, Acciarito A, Alberti S. Large and diverse numbers of human diseases with H I K E mutations. *Human Molecular Genetics*, 2000, 9(6): 1001 ~ 1007
- 12 Enderlin V, Pallet V, Alfes S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Huguere P. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neuroscience Letters*, 1997, 229(2): 125 ~ 129
- 13 Davidsson P, Blennow K. Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *International psychogeriatrics*, 1998, 10(1): 11 ~ 23
- 14 Watson J B, Khorasani H, Persson A, et al Age-related deficits in long-term potentiation are insensitive to hydrogen peroxide: Coincidence with enhanced autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Neuroscience Research*, 2002, 70(3): 298 ~ 308
- 15 Li Huanhuan, Lin Wenjuan, Li Junfa. The effect of forced cold-water swimming stress on behavior and neurogranin level of brain in rats (in Chinese). *Acta Psychologica Sinica*, 2005, 37(3): 366 ~ 372
(李欢欢, 林文娟, 李俊发. 强迫性冷水游泳应激对大鼠行为和海马神经颗粒素的影响. *心理学报*, 2005, 37(3): 366 ~ 372)
- 16 Li Huanhuan, Lin Wenjuan, Li Junfa. The changes of neurogranin level in rat hippocampus and forebrain after chronic cold water swimming stress (in Chinese). *Chinese Journal of Psychiatry*, 2005, 38(3): 174 ~ 177
(李欢欢, 林文娟. 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. *中华精神科杂志*, 2005, 38(3): 174 ~ 177)
- 17 Li Huanhuan, Lin Wenjuan, Li Junfa. The effects of different stressors on behavior and protein levels of neurogranin in rats (in Chinese). *Acta Psychologica Sinica*, 2005, 37(6): 839 ~ 844
(李欢欢, 林文娟, 李俊发. 不同应激范式对大鼠行为和脑神经颗粒素含量的影响. *心理学报*, 2005, 37(6): 839 ~ 844)
- 18 Pijman F T A, van Ree J M. Physical but not emotional stress induces a delay in behavioral coping responses in rats. *Behavioural Brain Research*, 2002, 136: 365 ~ 373
- 19 Shukla P K, Tang L, Wang Z J. Phosphorylation of neurogranin, protein kinase C, and Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II in opioid tolerance and dependence. *Neuroscience Letters*, 2006, 404: 266 ~ 269
- 20 Neuner-Jehle M, Rhyner T A, Borbely A A. Sleep deprivation differentially alters the mRNA and protein levels of neurogranin in rat brain. *Brain Research*, 1995, 685(1-2): 143 ~ 153
- 21 Ramakers GM, Pasinelli P, Beest M, et al. Activation of pre- and postsynaptic protein kinase C during tetraethylammonium-induced long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *Neuroscience letters*, 2000, 286: 53 ~ 56
- 22 Li J F, Pak J H, Huang F L, et al. N-Methyl-D-aspartate induces neurogranin/RC3 oxidation in rat brain slices. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(3): 1294 ~ 1300
- 23 Pijman F T A, Herremans A H J, Kieft J. Behavioural changes after different stress paradigms: prepulse inhibition increased after physical, but not emotional stress. *European Neuropsychopharmacology*, 2003, 13: 369 ~ 380
- 24 Slemmon J R, Feng B, Erhardt J A. Small proteins that modulate calmodulin-dependent signal transduction: effects of PEP-19, neuromodulin, and neurogranin on enzyme activation and cellular homeostasis. *Molecular Neurobiology*, 2000, 22(1-3): 99 ~ 113
- 25 Shen C P, Tsimberg Y, Salvadore C, et al. Activation of Erk and JNK/MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neuroscience*, 2004, 205(1): 36
- 26 Uysal N, Acikgoz O, Gonenc S, et al. Effects of acute footshock stress on antioxidant enzyme activities in the adolescent rat brain. *Physiological Research*, 2004, 9: [Epub ahead of print]

- 27 Dwivedi Y, Mondal A C, Rizavi H S, et al Single and repeated stress - induced modulation of phospholipase C catalytic activity and expression: role in LH behavior *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30 (3): 473 ~ 483
- 28 Li Huanhuan, Lin Wenjuan, Li Junfa The effects of acute emotional stressor on behavior and phosphorylation levels of neurogranin in rats (in Chinese). *Acta Psychologica Sinica*, 2006, 38 (4): 576 ~ 582
(李欢欢,林文娟,李俊发. 急性情绪应激对大鼠行为和神经颗粒素磷酸化水平的影响. *心理学报*, 2006, 38 (4): 576 ~ 582)
- 29 Pizarro JM, Lumley L A, Medina W, et al Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice *Brain Research*, 2004, 29, 1025 (1 - 2): 10 ~ 20
- 30 Roman O, Seres J, Pometlova M, et al Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats *Endocrine Regulations*, 2004, 38 (4): 151 ~ 155

The Effects of An Acute Physiological Stressor on Behaviors, Protein Levels and Phosphorylation of Neurogranin in Rats

Li Huanhuan¹, Lin Wenjuan¹, Li Junfa²

⁽¹⁾Brain - Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

⁽²⁾Department of neurobiology, Capital University of Medical Sciences, Beijing, 10005, China)

Abstract

The possible role of brain - specific protein in mediating stress - induced behavioral disorder has gained more and more attention. Neurogranin is a brain - specific protein newly found, which is Ca^{2+} sensitive/calmodulin - binding protein kinase C substrate, and is involved in the process of signaling conduction and long - term potentiation. It is mainly distributed in the frontal cortex, hippocampus and amygdala of rodents that are considered essential components of neural circuitry mediating stress responses. NG knockout animals exhibited deficits in learning and memory. These results implied that NG might be a mediator between stress and behavior. Studies concerning the relations between neurogranin, stress and behavior can provide further information about the mechanisms underlying the effects of stress on behavior.

The aim of the present study was to investigate the effects of acute physiological stress on behavior and protein levels of neurogranin in brain, and the correlation between protein levels of neurogranin and stress - induced behavioral changes. Forty rats were randomly divided into swimming stressed group 1 (SS1), swimming stressed group 2 (SS2), handled - control 1 (C1) and handled - control 2 (C2), with ten in each. The forced cold - water swimming was used as a physiological stressor. Behavioral changes in rats after stress were observed by open - field test and elevated plus maze task, and protein levels and phosphorylation of neurogranin of hippocampus and forebrain were determined by Western blotting.

The results showed that freezing in open - field test in SS1 was more increased than that in C1 group ($p < 0.01$). Protein levels and phosphorylation of neurogranin of hippocampus in SS1 were significantly higher than that in C1 ($p < 0.05$, $p < 0.05$) and C2 ($p < 0.05$, $p < 0.05$). Protein levels of neurogranin of forebrain in SS1 were significantly higher than that in C1 ($p < 0.01$) and C2 ($p < 0.01$). Phosphorylation of neurogranin of forebrain in SS1 was significantly higher than that in C1 ($p < 0.01$). Correlation is significant at $p < 0.05$ level between freezing and phosphorylation of neurogranin in forebrain.

These results suggest that acute swimming stress can induce anxiety. Freezing may be a sensitive behavioral index, and phosphorylation of neurogranin in forebrain may be an effective biological predictor for anxiety and/or depression induced by acute physiological stress.

Key words acute stress, physiological stress, hippocampus, frontal cortex, behavior, neurogranin