

急性情绪应激对大鼠行为和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 为探讨急性情绪应激对大鼠旷场行为的影响,以及脑神经颗粒素 (Neurogranin, NG)变化与应激性行为效应之间的相互关系。以急性不确定性空瓶刺激,建立情绪应激动物模型。将 40只雄性 SD大鼠随机分为情绪应激组 1 (ES1,接受情绪应激和旷场测试)、情绪应激组 2 (ES2,只接受情绪应激)、正常对照组 1 (C1,无情绪应激,但接受旷场测试)和正常对照组 (C2,无情绪应激,也无旷场测试) ($n=10$)。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印迹杂交法 (Western blotting)测定海马和前脑皮层中的 NG含量和磷酸化水平。结果表明:(1)应激后 ES1组的水平活动增加,与 C1组比较,差异有显著性, $p<0.01$; (2) ES1组海马和前脑皮层的 NG磷酸化水平高于 C1和 C2组,差异有显著性,均为 $p<0.05$; ES2组的前脑皮层 NG的磷酸化水平高于 C1组,差异有显著性,为 $p<0.05$; (3)海马的 NG磷酸化水平与水平活动之间的相关达显著水平。提示急性情绪应激能导致动物明显的行为改变如焦虑,这种行为改变可能与脑内 NG磷酸化水平的变化有关。水平活动可能是反映急性情绪应激的较敏感行为指标,海马 NG磷酸化水平可能是预测急性情绪应激所致焦虑或抑郁行为的较敏感生物学指标。

关键词 急性应激,情绪应激,海马,前脑皮层,行为,神经颗粒素。

分类号 B845

1 前言

迄今有关应激引起行为改变的脑机制,包括所涉及物质分子、作用途径和信号传导方式所知甚少。以往的研究主要集中在神经递质和调质及功能的变化,也有用 *c-fos*为探针进行相关脑区的探索,但在应激改变行为的脑机制的认识上仍有许多谜团。近年来,国内外许多学者认为突触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^[1-3]。应激过程中,中枢突触可塑性机制的变化是涉及情绪和行为障碍发生的重要中枢机制,包括突触结构可塑性和突触功能可塑性机制的变化。前者是指相关脑区的神经元的数量减少和细胞缺失、树突棘萎缩等形态结构的器质性损害,其中海马和前脑皮层是涉及应激的最为重要的脑结构。后者则是指蛋白信号传导途径缺陷、突触传递效能障碍等,以中枢 NR

依赖性 LTP的改变最受关注^[1,4,5]。

由于中枢神经元特异性蛋白质及其磷酸化反应对维持突触结构和功能,包括突触的生长、发育、代偿性变化和功能传递均具有十分重要的作用。所以,应激后某些中枢神经元特异性蛋白质的含量和磷酸化水平变化,可能通过参与突触结构和功能可塑性机制的改变,涉及到应激所致行为效应的中枢机制。近期研究表明,某些表达于中枢神经元的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),与应激和某些精神障碍发生密切相关^[6,7],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)是一种神经元特异性蛋白质,在与应激、情绪和行为密切相关的脑

收稿日期: 2005 - 11 - 09

^{*}中国科学院创新工程 (KSCX2 - 2 - 03)和国家自然科学基金 (30370482)资助项目。

通讯作者:林文娟, E-mail: Linwj@psych.ac.cn, 电话: 010 - 64863723

结构如皮质、海马和杏仁核中高表达,是突触后 PKC的重要底物蛋白。研究发现,NG参与中枢 NR 依赖性 LTP,PKC、PKA 和 CaMK 等多种重要的蛋白信号传导途径,通过介导突触强度的改变,构成诱发突触可塑性表达的共同途径的一部分^[8,9],在突触可塑性中具有关键作用。此外,NG能通过磷酸化水平的变化对中枢 NR 依赖性 LTP过程产生明显的影响,对某些应激源的反应敏感,并且与学习记忆密切相关^[10~16]。因此,它可能涉及到应激所致行为障碍的突触结构和功能可塑性机制。李欢欢和林文娟等^[17,18]研究发现,慢性生理应激和情绪应激能导致动物行为异常以及 NG含量的显著下降,并且异常行为与 NG含量的相关达显著水平。表明慢性应激后,NG含量下降是预测行为障碍发生的比较敏感的生物学指标,可能涉及慢性应激所致行为障碍的中枢机制。上述研究结果提示,NG可能作为一种中介物质,在脑、行为与健康关系中起作用。但是,关于急性情绪应激、行为与 NG关系的研究尚未见报道。为此,本研究拟采用本实验室建立的不确定性空瓶饮水应激模型^[19]。通过短期的不确定性空瓶饮水刺激诱发大鼠情绪应激,进而考察急性情绪应激源对海马和前脑皮层的 NG影响以及应激后大鼠的旷场行为与 NG变化关系,以期对不同应激源诱发行行为效应的相关脑机制差异做一些探索。

2 材料和方法

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:情绪应激组 1 (Emotional Stress 1, ES1)、情绪应激组 2 (Emotional Stress 2, ES2),正常对照组 1 (C1)和正常对照组 2 (C2),每组为 10只。ES1接受情绪应激和两次旷场行为测试,ES2只接受情绪应激、不接受旷场行为测试,C1接受两次旷场行为测试,C2不给予任何处理,在笼中饲养。ES2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

经 1周适应期后,对 ES1组、ES2组进行定时喂水训练 10d。定时喂水训练为每日 2次,即每天早

9:00~9:10和晚 21:00~21:10给动物饮水,之后撤掉水瓶,其余时间不给水。定时喂水期结束后开始应激实验,ES组动物在定时喂水时间内给予的空瓶刺激诱发其情绪应激,刺激的给予是无规律的,但维持一天一次;应激共持续 3天。C1和 C2组不接受任何处理,在笼中饲养,自由饮水和摄食。所有动物在适应期开始、适应期末、定时喂水期末、应激第 3天共称四次体重以考察应激的程度。实验程序见表 1。

表 1 实验程序 (天)

Group	Time	0	1	2	3	4
ES1	9:00 - 9:10	N	N	ES	N	ES
	21:00 - 21:10	ES	ES	N	ES	
ES2	9:00 - 9:10	N	N	ES	N	ES
	21:00 - 21:10	ES	ES	N	ES	
C1	9:00 - 9:10	N	N	N	N	N
	21:00 - 21:10	N	N	N	N	
C2	9:00 - 9:10	N	N	N	N	N
	21:00 - 21:10	N	N	N	N	

2.3 仪器和试剂

第一抗体抗 NG总蛋白单克隆抗体、磷酸化 NG多克隆抗体、 α -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、全细胞裂解液 (buffer)、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 (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 行为学测试

采用旷场测试和高架十字迷宫任务程序,ES1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 的测定

应激实验结束后次日,对 ES1 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线上靠近前外侧的前额叶皮层组织(如图 1 所示 M1 和 M2 区域)。之后将组织迅速用液氮冷却。

采用 Western 印迹杂交法(Western blotting)测定大鼠海马和前脑皮层的 NG 含量和磷酸化水平。将组织加入 buffer 匀浆。匀浆后加入 BCA 液摇匀,在 37℃ 水浴箱中温育 30 分钟,通过蛋白质分光光度计进行样品海马和前脑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跑电泳所需加入的缓冲液量。匀浆中加入样品缓冲液,走 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,溶于 TBS)室温封闭 1h,用 Tris/Tween 缓冲液(Tris buffered Tween - 20 saline, TBS)洗膜,10min (3 次)。加入抗 NG 总蛋白单克隆抗体室温孵育 3h,再用 TBS 洗膜,10min (3 次)。TBS 液稀释山羊抗兔 IgG 抗体(1: 4000)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,对同一张 NC 膜上的内参蛋白 β -Actin 和磷酸化 NG 进行杂交。通过 Gel Doc 凝胶成像半定量分析系统对胶片上的 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。

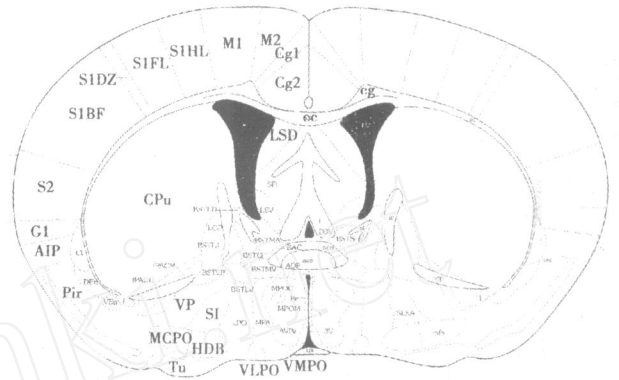


图 1 大鼠脑组织图谱(Paxinos, 1986)

2.6 统计方法

本研究采用成组设计,用 SPSS 10.0 软件分析,结果用平均数 \pm 标准差 ($M \pm SD$) 表示。四组大鼠的体重、海马和前脑皮层 NG 含量以及旷场行为指标之间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 结果

3.1 体重

适应期开始、适应期末、定时喂水期末和应激期末,四组动物的体重总体比较差异无显著性($p > 0.05$)。但在应激期内(从定时喂水期末到应激期末),ES1 和 ES2 组动物体重增长非常缓慢。结果见表 2。

表 2 应激前后四组大鼠体重变化差异的比较 ($g, M \pm SD$)

组别	适应期第 1 天	适应期第 7 天	定时喂水期末	应激期末
ES1 组	244.22 \pm 4.93	268.79 \pm 18.79	313.55 \pm 27.01	314.39 \pm 39.67
ES2 组	251.38 \pm 20.59	271.24 \pm 24.13	323.85 \pm 33.85	326.30 \pm 40.03
C1 组	243.24 \pm 11.34	268.97 \pm 30.20	308.54 \pm 41.83	330.69 \pm 35.27
C2 组	246.44 \pm 19.24	284.61 \pm 28.68	328.71 \pm 32.58	357.08 \pm 40.11
F	0.46	0.86	0.73	2.15
p	0.71	0.47	0.54	0.11

3.2 旷场行为测试

应激前,两组动物在旷场测试中水平活动距离、直立次数、修饰行为、呆滞行为和排便量的比较差异无显著性($p > 0.05$)。

应激后,ES1 组表现出水平活动增加,与 C1 组比较,差异有显著性($p < 0.01$)。其余行为指标的比较差异无显著性。结果见表 3。

表 3 应激后 ES1 与 C1 两组大鼠旷场行为比较的差异 ($M \pm SD$)

组别	探究 (次数)	水平活动 (cm)	直立 (次数)	修饰 (次数)	排便量 (颗粒数)	呆滞 (次数)	呆滞时间 (s)
ES1 组	0.20 ± 0.42	2770.30 ± 1564.79	10.00 ± 6.09	1.40 ± 1.58	2.00 ± 2.11	0.20 ± 0.42	33.00 ± 88.20
C1 组	0.00 ± 0.00	1287.00 ± 732.36	8.70 ± 7.80	1.60 ± 1.27	2.40 ± 2.37	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>t</i>	1.50	2.72	0.42	-0.31	-0.10	1.50	1.18
<i>p</i>	0.15	0.01	0.68	0.76	0.70	0.15	0.25

3.3 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 4、表 5。

表 4 应激前两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
ES1 组	10	166.10 ± 88.92	6.20 ± 3.58	133.90 ± 88.92	4.50 ± 2.17
C1 组	10	227.90 ± 39.11	7.60 ± 2.88	72.10 ± 39.11	4.60 ± 2.63
<i>t</i>		-2.01	-0.96	-2.01	-0.09
<i>p</i>		0.06	0.35	0.06	0.93

表 5 应激后两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
ES1 组	10	210.40 ± 64.05	4.40 ± 1.78	89.60 ± 64.05	3.30 ± 1.42
C1 组	10	191.90 ± 85.79	5.20 ± 2.94	108.10 ± 85.79	3.50 ± 1.90
<i>t</i>		0.55	-0.74	-0.55	-0.27
<i>p</i>		0.59	0.47	0.59	0.79

3.4 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,ES1 组、ES2 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与正常对照组相比存在差异,而 Actin 蛋白质条带在四组大鼠中表达均一。

方差分析结果显示:四组大鼠前脑皮层的 NG 含量、海马和前脑皮层的 NG 磷酸化水平总体比较

差异具有显著性 (分别为 $F(3, 36) = 3.13, p < 0.05$; $F(3, 36) = 5.80, p < 0.01$; $F(3, 36) = 7.14, p < 0.001$)。两两比较发现,在海马区域,ES1 组的 NG 磷酸化水平均显著高于 C1 和 C2 组 (分别为 $p < 0.05$; $p < 0.05$)。在皮层区域,ES1 组 NG 磷酸化水平显著高于 C1 和 C2 组 (分别为 $p < 0.05$; $p < 0.05$); ES2 组 NG 磷酸化水平显著高于 C1 组 ($p < 0.05$)。结果详见表 6。

表 6 应激后四组大鼠海马、前脑皮层 NG 含量和磷酸化水平的差异比较 ($M \pm SD$)

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
ES1 组	1.23 ± 0.49	1.40 ± 0.47	1.00 ± 0.39 [*]	1.23 ± 0.71 [*]
ES2 组	1.14 ± 0.23	1.07 ± 0.56 [*]	0.56 ± 0.50	0.83 ± 0.38 [*]
C1 组	1.67 ± 0.44	1.72 ± 0.47	0.47 ± 0.12	0.41 ± 0.14
C2 组	1.48 ± 0.70	1.37 ± 0.36	0.46 ± 0.17	0.57 ± 0.11
<i>F</i>	2.40	3.13	5.80	7.14
<i>p</i>	0.08	0.04	0.002	0.001

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

3.5 旷场行为与脑 NG 含量变化的相关分析

相关分析结果显示:旷场测试中的探究、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

为指标之间的相关无显著性;海马的 NG 磷酸化水平与水平活动呈显著正相关,海马 NG 含量、前脑皮层 NG 含量和 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 7。

表 7 各旷场行为指标之间及行为与 NG含量和磷酸化水平之间的相关系数矩阵

变量	探究	直立	水平活动	呆滞次数	呆滞时间	修饰	排便量	海马 NG含量	前脑皮层 NG含量	海马 NG磷酸化水平
直立	0.39**									
水平活动	0.36*	0.65**								
呆滞次数	0.04	-0.46**	-0.43**							
呆滞时间	0.02	-0.46**	-0.45**	0.99**						
修饰	0.18	-0.05	-0.13	-0.01	0.01					
排便量	-0.03	-0.14	-0.18	0.07	0.11	-0.15				
海马 NG含量	-0.41	0.02	-0.10	-0.04	-0.05	0.22	0.02			
前脑皮层 NG含量	-0.25	-0.004	0.03	-0.22	-0.22	0.08	-0.23	0.15		
海马 NG磷酸化水平	0.13	0.25	0.53*	0.00	-0.01	-0.20	-0.34	-0.37	-0.32	
前脑皮层 NG磷酸化水平	0.34	0.32	0.33	0.12	0.12	-0.29	-0.22	-0.64**	-0.09	0.48*

4 讨论

在情绪应激动物模型中,动物的恐惧和焦虑反应能模拟人类遭受精神创伤时的情绪和行为障碍表现。因而,该模型具有良好的生态效度,常用于应激性行为效应的脑机制研究。本研究中,与 C1和 C2组相比,应激期内(从定时喂水期末到应激期末)ES1组和 ES2组的大鼠体重增长均十分缓慢,表明两组大鼠处于应激状态。此外,ES1组大鼠在旷场中的水平活动显著增加,这与 Pijman等^[20,21]的研究结果一致。提示该应激源引起大鼠明显的焦虑行为。而 ES1组与 C1组大鼠在高架十字迷宫任务中的四项行为指标均无显著差异,表明在测量该应激源所导致的大鼠行为异常表现方面,旷场测试可能比高架十字迷宫任务敏感。

大量研究表明,急性应激对海马的形态结构没有明显影响,慢性应激时,海马结构存在器质性改变^[22~25]。提示急性应激所致行为改变的中枢机制可能只涉及到突触传递效能的可塑性变化,而非中枢神经系统结构本身器质性改变所致。本研究也发现,ES1组大鼠海马和前脑皮层的 NG磷酸化水平均显著高于 C1和 C2组,ES2组前脑皮层的 NG磷酸化水平显著高于 C1组。由于 NG主要分布在海马和前脑皮层锥形神经元的树突棘上和胞体。NG的磷酸化水平增高有助于长时程增强(Long-term potentiation, LTP)的生理表达、N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NR)的活化以及突触蛋白信号传导途径的激活和维持^[26,27]。促进突触传递效能的增强^[28~30]。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则可作为反映中枢神经元之间突触传递效能的

变化,即中枢 NR 依赖性 LTP过程的改变的指标。因此,本研究结果提示,急性空瓶应激可能导致了中枢神经元功能的改变,如突触传递效能增强,与 Shen等^[31]的研究结果一致。他们发现急性游泳应激和急性限制应激均能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。但 Chen^[32]等的研究发现急性电惊厥导致大鼠脑内的 NG磷酸化水平下降,与本研究结果存在差异。考虑可能的原因是:两项研究中所采用的应激源性质不同。电惊厥后,大鼠脑内出现较严重的缺血和缺氧,导致中枢神经细胞坏死,造成 NG的含量下降,磷酸化 NG水平降低。本研究还发现,尽管 ES1组和 ES2组的 NG磷酸化水平无显著差异。但是与对照组相比,ES1组大鼠的 NG磷酸化水平增加的程度高于 ES2组。可能的原因是:对大鼠而言,短时间的行为测试本身也带有急性应激的成分,从而促进了 NG磷酸化水平的增高。此外,ES组的 NG含量无显著下降则表明该急性应激源可能未造成大鼠海马和前脑皮层的中枢神经元形态结构明显的器质性损害。

本研究还进一步发现,在急性情绪应激过程中,海马 NG的磷酸化水平与水平活动距离之间呈显著正相关。提示海马的 NG磷酸化水平可能是预测急性应激所致焦虑或抑郁行为的一项较为敏感的生物指标,它可能涉及到急性情绪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。

本研究首次建立了急性情绪应激、行为异常与神经元特异性蛋白质 NG 之间的研究思路,获得了一些有意义的发现。综合以往的研究结果,慢性冷水游泳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^[8,9]。急性情绪应激则主要是引起 NG 含量和磷酸化水平的增高。并且在急慢性应激模型中,NG 的变化与异常行为之间两两相关达显著水平。提示 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异常可能涉及不同的中枢机制的一项指标。

参 考 文 献

- Li B, Chen N, Luo T, et al Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors Nature Neuroscience, 2002, 5 (9): 833 ~ 834
- Li J F, Jhang Ho Pak, Freesia L, et al N-Methyl-D-aspartate induces Neurogranin/RC3 oxidation in rat brain slices Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (3): 1294 ~ 1330
- Li Y F, Zhang Y Z, Liu Y Q, et al Moclobemide up-regulates proliferation of hippocampal progenitor cells in chronically stressed mice. Acta Pharmacologica Sinica, 2004, 25 (11): 1408 ~ 1412
- Lupien S J, Lepage M. Stress, memory and the hippocampus: can't live with it, can't live without it Behavioural Brain Research, 2001, 127: 137 ~ 158
- Millan M J. The neurobiology and control of anxious states Progress in neurobiology, 2003, 70: 83 ~ 224
- 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
- Filipovic D, Gavrilovic L, Dronjak S, et al Brain glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 levels in rats exposed to acute, chronic or combined stress Neuropsychobiology, 2005, 51 (2): 107 ~ 114
- Chakravarthy B, Morley P, Whitfield J. Ca^{2+} -calmodulin and protein kinase C: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains Trends Neurosci, 1999, 22: 12 ~ 16
- Van Dam E J, Ruiters B, Kamal A, et al N-methyl-D-aspartate-induced long-term depression is associated with a decrease in postsynaptic protein kinase C substrate phosphorylation in rat hippocampus slices Neurosci Lett, 2002, 320: 129 ~ 132
- Mons N, Enderlin V, Jaffard R, et al Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain Journal of Neurochemistry, 2001, 79 (4): 859 ~ 867
- Angenstein F, Buchner K, Staak S Age-dependent differences in glutamate-induced phosphorylation systems in rat hippocampal slices Hippocampus, 1999, 9 (2): 173 ~ 185
- Chang J W, Schumacher E, Coulter P M, et al 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
- Ciccarelli F D, Acciarito A, Alberti S Large and diverse numbers of human diseases with H1KE mutations Human Molecular Genetics, 2000, 9 (6): 1001 ~ 1007
- Enderlin V, Pallet V, Alfös S, et al 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
- Davidsson P, Blennow K Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease International Psychogeriatrics, 1998, 10 (1): 11 ~ 23
- 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 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II Journal of Neuroscience Research, 2002, 70 (3): 298 ~ 308
- Li H H, Lin W J, Li J F. 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)
- Li H H, Lin W J. Alteration of neurogranin level in several brain regions after chronic cold-swimming stress in rats (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)
- Lin W J, Wang W W, Shao F. New animal model of emotional stress: behavioral, neuroendocrine and immunological consequences Chinese Science Bulletin, 2003, 48 (15): 1565 ~ 1568.
- 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
- 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
- McEwen B S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain Metabolism, 2005, 54 (5 Supplement 2): 20 ~ 23
- McEwen B S. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders Annals of the New York Academy of Sciences, 2004, 1032: 1 ~ 7
- Metz G A. S, Schwab M E, Welzl H. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats Physiology & Behavior, 2001, 72: 29 ~ 35
- Rosa M L, Guimaraes F S, de Oliveira R M, et al Restraint stress induces beta-amyloid precursor protein mRNA expression in the rat basolateral amygdala Brain Research Bulletin, 2005, 65 (1): 69 ~ 75

- 26 Ramakers GM, De Graan PN, Urban IJ, et al Temporal differences in the phosphorylation state of pre- and postsynaptic protein kinase C substrates B - 50/GAP - 43 and neurogranin during long-term potentiation. *The Journal of biological chemistry*, 1995, 270 (23): 13892 ~ 13898
- 27 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
- 28 Ramakers GM, Gerendasy D D, de Graan PN. Substrate phosphorylation in the protein kinase C gamma knockout mouse. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (4): 1873 ~ 1874
- 29 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
- 30 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
- 31 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, 20, 5 (1): 36
- 32 Chen C C. Alterations of protein kinase C isozyme and substrate proteins in mouse brain after electroconvulsive seizures. *Brain Research*, 1994, 648 (1): 65 ~ 72

The Effects of Acute Emotional Stressor on Behavior and Phosphorylation Levels of Neurogranin in Rats

Li Huanhuan¹, Lin Wenjuan¹, Li Junfa²

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

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

Abstract

Neurogranin (NG) is a brain-specific, postsynaptically located protein kinase C (PKC) substrate found by Watson and his colleagues in 1990. It is mainly distributed in the frontal cortex, hippocampus and amygdala of rodents that are considered as essential components of neural circuitry mediating stress responses. Numerous animal studies have demonstrated that NG is involved in several pathways of protein signal transduction in brain, long-term potentiation and long-term depression. NG-knockout animals exhibited deficits in learning and memory. These results implied that NG may be a mediator between stress and behavior. However, until recently, the cellular role of NG has not been clearly established. To understand more molecular events underlying central mechanisms of stress-induced behavioral changes, the purpose of the present study was to investigate the effects of acute emotional 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 emotional stressed group 1 (emotional stress followed by behavioral test, ES1), emotional stressed group 2 (only emotional stress, ES2), handled-control 1 (only behavioral test, C1) and handled-control 2 (home cage, C2), with ten in each. Randomly giving empty water bottles at set times was used as an emotional 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 locomotor activity in open-field test in ES1 was increased more than that in C1 group ($p < 0.05$). Protein levels and phosphorylation of Neurogranin of hippocampus and forebrain in ES1 were significantly higher than that in C1 ($p < 0.05$, $p < 0.05$) and C2 ($p < 0.05$, $p < 0.05$). Phosphorylation of Neurogranin level of forebrain in ES2 was significantly higher than that in C1 ($p < 0.05$). The correlation was significant at 0.05 levels between locomotor activity and phosphorylation of neurogranin in the hippocampus. These results suggested that neurogranin is one of the stress-related substances in brain. Acute emotional stress can induce anxiety. Locomotor activity may be a sensitive behavioral index, and phosphorylation of neurogranin in the hippocampus may be an effective biological predictor for anxiety and/or depression induced by acute emotional stress. In summary, acute emotional stress induces behavioral changes and phosphorylation levels of neurogranin in frontal cortex of rats. Underlying mechanisms explaining the behavioral changes in stress effects are discussed, including the role of neurogranin in the hippocampus and frontal cortex.

Key words acute stress, emotional stress, hippocampus, frontal cortex, behavior, neurogranin.