

胚胎期光照和皮质酮处理对 日龄小鸡记忆的作用*

胡家芬 隋南 匡培梓 管林初 D. B. Joyce

(中国科学院心理研究所, 北京 100101)

(密执根大学化学系, 美国)

摘 要 该实验对胚胎发育后期的鸡胚进行光孵化、暗孵化以及药物注射处理后, 采用一次性味觉被动回避行为模式观察它们对出生后小鸡记忆保持的影响并对其作用机制进行了初步探讨。结果表明胚胎期光照可增强小鸡记忆的保持, 使用糖皮质激素受体拮抗剂可阻断光照对小鸡记忆的增强作用, 对暗孵化鸡胚注射皮质酮可以促进出生后小鸡记忆的保持, 因此皮质酮可能参与了光照对小鸡记忆的增强过程; 蛋白合成抑制剂在一定程度上阻断了皮质酮对小鸡记忆的增强作用, 表明包括蛋白质合成在内的一些机制参与了这个过程。

关键词 日龄小鸡 光照 皮质酮 胚胎期 记忆保持

小鸡胚胎发育的晚期是其视神经发育的关键期。17 日胚龄的小鸡在蛋壳内保持右眼面向壳膜, 左眼靠近身体部位的姿势。因此右眼视神经比左眼接受较多透过卵壳的光线刺激。同时由于小鸡视交叉比较完全, 使其左脑接受更多的视觉信息, 致使左脑的发育早于右脑 (Rogers, 1990; Rogers and Bolden, 1991)。在小鸡出生后很短时间内, 小鸡的许多行为包括一次性被动回避反应学习行为与左脑的功能有着密切的关系。由于胚胎后期其丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, HPA) 已基本发育成熟, 外界刺激如光照可能导致其糖皮质激素及其受体水平的变化, 并最终对出生后的行为产生重要影响。本实验对 20 日胚龄的暗孵化鸡胚, 分别进行光照及注射皮质酮处理, 观察这些处理对出生后小鸡记忆保持的影响, 并对其作用机制进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 小鸡的孵化

从北京市种禽公司取回 16 日龄鸡胚 (京白 939), 置于孵化箱内, 孵化温度保持在 $37.97 \pm 0.01^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%~80%, 每 2 小时翻蛋一次。18 日龄时转入出雏盘中直到 22 日龄, 小鸡孵出。取出小鸡, 准备行为实验。

1.2 试剂配制及注射

皮质酮 (corticosterone) 和蛋白合成抑制剂 Anisomycin 均为 Sigma 公司产品。糖皮质激素受体拮抗剂 RU-486 (mifepristone) 为美国 Biomol 公司产品。母液的配制: 称取皮质酮 5mg, 溶于 1ml 无水

1998-08-10 收稿, 1999-05-11 修回

* 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

第一作者简介 胡家芬, 女, 31 岁, 博士。研究方向: 学习记忆的神经生理机制。E-mail: Hujf@psych.ac.cn

乙醇中,置于-20℃保存,实验前用无菌的0.9%生理盐水配成所需浓度,即每只鸡注射60 ng/0.1 ml (Sui, Sandi and Rose, 1997);按照说明书建议的方法称取2 mg RU-486溶解于0.1 ml 二甲亚砜(DMSO)中,置于-20℃保存,使用前用1 mol/L的醋酸溶液进行10倍稀释,再用无菌生理盐水配成所需要的浓度,每只鸡注射1 ng/0.1 ml; Anisomycin在实验前用无菌的生理盐水配成相应浓度,每只鸡注射8 μg/0.1 ml。使用剂量参照大鼠和小鸡实验中所用浓度(Sandi and Rose, 1994a)。药物皆在鸡胚20日龄(E20)时进行胎盘注射,石蜡封口。

1.3 一次性味觉被动回避反应

按照国际上通用的小鸡训练程序,在训练前半小时将小鸡从孵化箱中取出,成对放入试验盒内(20cm×20cm×25cm),将其中一只头部进行标记,便于区分。盒内温度保持在28~30℃,盒顶部悬挂25W的灯泡照明。让小鸡在盒内适应1小时左右,开始预训练:用手指轻轻敲击盒壁,引起小鸡注意。然后将蘸有清水的金属小珠(直径为2.5 mm)轻轻呈现在小鸡面前约10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:将蘸有用无水乙醇稀释的浓度为10%氨基苯甲酸甲脂(methyl anthranilate, MeA)的红色玻璃圆珠(直径为4 mm)呈现给小鸡约20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所用的相同大小的红色玻璃圆珠呈现给小鸡,此时回避红珠子的小鸡为记忆良好者,啄红珠子的为遗忘者。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色珠子的小鸡数占训练时啄红珠小鸡的百分数来表示的。回避率愈高,表明小鸡的记忆保持愈好。组间数据的差异用卡方(χ^2)检验法进行分析。

2 实验结果

2.1 胚胎期光照对小鸡记忆的影响

将E20天的鸡胚随机分成两组,对其中一组鸡胚进行光照(100~300 lx)约24小时(光孵化组),对另一组鸡胚控制在黑暗环境下孵化(暗孵化组),其余的条件完全一致。E22天时取出小鸡,按照上述行为实验程序进行,分别用清水(对照组)和10% MeA训练小鸡,并于训练后3小时进行测试。实验结果见表1。

从表1中数据可看出,无论光孵化还是暗孵化小鸡对清水的回避率都很低,而且两组之间没有统计学差异($\chi^2=1.32, P>0.05$),表明光照对小鸡的啄食特性并未产生影响。但是光孵化的小鸡记忆保持高于暗孵化小鸡,且差异显著($\chi^2=5.8, P<0.05$)。表明光照对小鸡记忆的保持有一定的促进作用。

2.2 胚胎期光照对小鸡记忆获得的影响

为了弄清光照对小鸡记忆的影响与记忆的获得还是贮存有关,我们将光孵化和暗孵化小鸡各分成两组,分别在训练后30分钟和3小时两个时间段进行测试,结果见表2。

表1 光孵化和暗孵化小鸡在不同训练条件下的回避率(%)比较
Table 1 The comparison of avoidance rate(%) between light-hatched and Dark-hatched chicks under different training conditions

组别 Group	回避率(%) (n) Avoidance Rate	
	清水 Water	氨基苯甲酸甲脂 10% MeA
光孵化 Light-hatched	26.7(15)	80.0(20)*
暗孵化 Dark-hatched	13.0(14)	36.8(19)

* $P<0.05$ 与暗孵化组相比(vs. dark-hatched chicks)
n 是小鸡的数目(n is the number of chicks tested)

表 2 光孵化和暗孵化小鸡在训练后不同时间回避率(%)

Table 2 Avoidance rate (%) of light-hatched and dark-hatched chicks in different time after training

组别 Group	回避率(%) (n) Avoidance Rate	
	30 分钟 30 minutes	3 小时 3 hours
光孵化 Light-hatched	70(20)	80*(20)
暗孵化 Dark-hatched	72(18)	39(18)

* $P < 0.05$ 与暗孵化组相比 (vs. dark-hatched chicks)
n 是小鸡的数目 (n is the number of chicks tested)

与 HPA 轴的活动有关, 以下实验对糖皮质激素影响小鸡记忆的作用进行了探讨。

将 50 枚鸡胚随机分成两组 ($n=25$), 在黑暗环境下孵化。E20 天时, 对第一组鸡胚注射皮质酮, 第二组注射生理盐水 (含 1% 的无水乙醇) 0.1 ml。行为训练采用 10% MeA, 并于训练后 3 小时进行测试。

图 1 的结果表明, 皮质酮能显著增进暗孵化小鸡记忆的保持 ($\chi^2=4.75$, $P < 0.05$)。

2.4 糖皮质激素受体拮抗剂 RU-486 对光孵化小鸡记忆的影响

实验 3 已证实皮质酮能增进暗孵化小鸡的记忆, 光孵化的作用是否受其受体拮抗剂的作用? 以下实验对此问题进行了探讨。

将 E20 鸡胚分成两组: 第一组在光照的同时对每只鸡注射 RU-486 (1 ng/0.1 ml), 第二组光照同时注射等体积的生理盐水。E22 小鸡孵出, 对小鸡进行一次性回避行为实验, 采用 10% MeA 进行训练, 训练后 3 小时测试。结果见图 2。

从图 2 可看出, RU-486 对光孵化小鸡的记忆保持有明显的阻碍作用 ($\chi^2=5.16$, $P < 0.05$)。说明光照对小鸡记忆的促进作用与皮质酮及其受体系统的作用是密切相关的。

从表 2 可看出, 训练后 30 分钟测试时光孵化和暗孵化组小鸡回避率相当 ($\chi^2=0.13$, $P > 0.05$), 因此光照对小鸡短时记忆的获得并没有影响; 而在训练后 3 小时进行测试的两组小鸡之间其回避率有显著的差异 ($\chi^2=5.09$, $P < 0.05$), 表明光照对小鸡的记忆的保持有促进作用。

2.3 皮质酮对暗孵化小鸡记忆的作用

在胚胎发育晚期, 小鸡的 HPA 轴对外界刺激非常敏感, 通过分泌皮质激素来调整机体的状态以最终达到稳态。由于光照对暗孵化鸡胚的胚胎发育可能

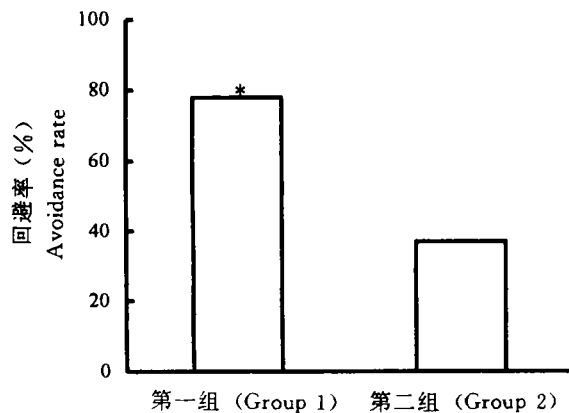


图 1 皮质酮对暗孵化小鸡回避率(%)的影响

Fig. 1 Effect of corticosterone administration on avoidance rate in dark-hatched chicks

* $P < 0.05$ 与第二组相比 (vs. group 2)

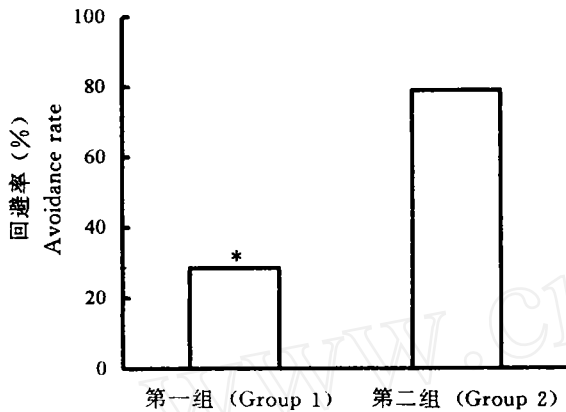


图 2 RU-486 对光孵化小鸡回避率(%)的影响

Fig. 2 Effect of RU-486 administration on the avoidance rate in light-hatched chicks

* $P < 0.05$ 与第二组相比(vs. group 2)

化,直至 E22 天小鸡出壳。对小鸡采用 10% MeA 进行训练,并于训练后 3 小时进行测试。实验结果见表 3。

表 3 蛋白合成抑制剂对皮质酮增进小鸡回避率(%)的影响

Table 3 The influence of protein synthesis inhibitor on avoidance rate improved by corticosterone administration (%) in dark-hatched chicks

组别 Group	回避率(%) (n) Avoidance Rate
cort+sal	80.8(26)*
cort+ani	58.3(24)
sal+ani	52.2(23)
sal+sal	48.0(25)

* $P < 0.05$ 与 sal+sal 组相比(vs. sal+sal group)
n 是小鸡的数目(n is the number of chicks tested)

2.5 蛋白合成抑制剂对皮质酮增进小鸡记忆的影响

由于皮质酮主要对小鸡的长时记忆有促进作用,而长时记忆的形成与蛋白质的合成是密不可分的。因此抑制蛋白合成的药物可能会对皮质酮的这种作用产生影响。

将 100 枚 E20 鸡胚随机分成 4 组:皮质酮(cort)组, Anisomycin(ani)组, ani+cort 组,生理盐水(sal)对照组。皮质酮在 Anisomycin 注射后 1 小时注射,所有的注射均在暗光(< 5 lx)下进行。对照组注射同等体积的无菌生理盐水(含 1% 的无水乙醇),鸡胚保持在暗孵化条件下解

从表 3 的结果可以看出, cort 对暗孵化小鸡的记忆有明显的增强作用(cort+sal 组与 sal+sal 组相比, $\chi^2 = 4.64$, $P < 0.05$);在这种实验处理情况下, ani 对小鸡记忆保持并没有产生破坏作用(ani+sal 组与 sal+sal 组相比, $\chi^2 = 0.00$, $P > 0.05$)。蛋白合成抑制剂对皮质酮促进记忆保持的作用产生了抑制,因为 cort+ani 介于 cort+sal 和 sal+sal 两组之间,但与两组均未产生统计学上的差异(与 cort+sal 组相比, $\chi^2 = 2.01$, $P > 0.05$;与 sal+sal 组相比, $\chi^2 = 0.19$, $P > 0.05$)。

3 讨论

胚胎期光照以及使用皮质酮对小鸡记忆保持的影响已有报道(Sui and Rose, 1997),我们用京白 939 小鸡也得到同样的结果,表明光照和皮质酮在胚胎发育后期的确对小鸡对一次性被动回避学习的保持产生了重要影响。目前对其机制仍然缺乏足够的实验研究。鸡胚发育后期的光线刺激导致小鸡脑半球的发育不对称性,并最终对其小鸡出生后的行为产生影响(Rogers, 1990)。大量的实验证实,小鸡脑的中间内侧上纹体腹核

(the intermediate medial hyperstriatum ventrale, IMHV) 和旁嗅叶球 (the lobus parolfactorius, LPO) 是与小鸡记忆密切相关的区域。在小鸡孵化的晚期, 由于左侧 IMHV 可以接受从右眼通过视觉投射传递的信息, 因此胚胎后期的光线刺激可能促进了左侧脑神经元的发育, 从而使小鸡的记忆得以增进。以往的实验结果还表明, 左侧 IMHV 主要对小鸡记忆的获得起作用 (Rose, 1995)。本实验发现, 光照对小鸡记忆的影响主要作用于贮存过程, 因此光照可能对与记忆的巩固和贮存相关的脑区 (比如 LPO) 的神经元发育产生了影响。这有待于进一步实验证实。

在胚胎发育期糖皮质激素对脑的作用主要表现在对神经系统发育的影响方面 (McEwen, 1992; McEwen and Sapolsky, 1995; Schumacher and Robel, 1996)。在神经系统发育过程中的糖皮质激素不仅对一些递质及其通路发生作用比如引起纹状体多巴胺通路长久的改变, 还调节着神经营养因子 (neurotrophic factors, NTFs) 的水平和脑中血管活性肠肽 (VIP) 和生长抑制素 (SS) 的浓度, 这些物质对哺乳动物海马神经元的生存也有着深远的影响。糖皮质激素对记忆的作用也有大量文献报道 (Armstrong and McIntyre, 1993; Sandi and Rose, 1994a, 1994b; Oitzl, Sutanto and De Kloet, 1992; Sui, Sandi and Rose, 1997)。但对其作用机制仍有不少疑问 (Sonia and McEwen, 1997)。

小鸡在 14 日胚龄便形成了下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPAA)。从这个阶段起, 鸡胚对各种应激源开始反应并分泌激素。将 18 日龄胚置于 42~43℃ 约 3 小时或 17~19℃ 1 小时, 便可检测到糖皮质激素浓度的升高, 小鸡的肾上腺活性显著升高。因此光照对鸡胚神经元的作用可能与 HPAA 的活动相关。由于小鸡脑的 IMHV 区域是小鸡记忆的重要部位, 而该部位同哺乳动物的海马一样有高密度的皮质酮结合位点。因此皮质酮进入小鸡脑内可能与 IMHV 区神经元中相应的受体结合, 激发了神经递质 (e. g. 5-HT) 的释放和第三信使 (e. g. c-fos) 的表达, 导致了相应靶基因转录的改变。神经元的可塑性改变的最终结果是小鸡的长时记忆的保持受到影响。本实验的结果证实了光照是通过糖皮质激素及其受体系统作用, 从而对小鸡记忆行为产生影响的。

糖皮质激素的作用方式一般是通过与糖皮质激素受体结合而激发神经元活动的。其作用可分为三个阶段: 快速期、中间期和延迟期。在快反应期, 神经元可在 5 分钟内激活, 糖皮质激素与细胞膜上受体结合, 介导快速突触传递作用; 中间期和延迟期糖皮质激素是以基因机制而作用的。糖皮质激素扩散到胞浆内与其受体结合, 其结果对各种递质酶系产生广泛的影响, 增强腺苷酸环化酶的活力和磷蛋白-突触素 I 的含量, 从而调节靶基因的转录。同时也伴随着糖蛋白 NCAMs 的合成以及其它蛋白质合成的增加, 最终引起神经元形态上的改变以及神经元的自然凋亡过程 (Doupe and Patterson, 1991)。在我们实验中糖皮质激素的作用可能与上述三个阶段都有一定的关系, 但由于对小鸡的记忆测试远远在糖皮质激素注射之后 (48 小时), 我们推测阻断蛋白质的合成可能阻碍皮质酮对记忆的增强作用。实验中我们采用了蛋白合成抑制剂, 发现它对皮质酮促进记忆的作用有一定的抑制作用, 但没有统计上的差异。这个结果与 Sandi 在小鸡上得到的结果相似 (Sandi and Rose, 1994a)。由于对皮质酮作用机制目前并不十分清楚, 我们认为可能有另外的一些因子参与了此过程。皮质酮的作用会引起原癌基因 c-fos 和 c-jun 表达的升

高以及蛋白磷酸化作用的增强。同时皮质酮对神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecules, NCAMs) 的多聚唾液酸 (polysialic acid, PSA) 化作用在神经发育过程中也起着非常重要的作用, 这些分子在记忆形成的过程中也有表达的增加 (Becker and Artoia, 1996; Rose, 1995)。对这些过程的揭示将有助于我们对皮质酮对神经元发育的作用及记忆机制有更进一步的理解。

参 考 文 献 (References)

- Armstrong, J. N. and D. C. McIntyre 1993 Learning and memory after adrenalectomy-induced hippocampal dentate granule cell degeneration in the rat. *Hippocampus* 3: 1~13.
- Becker, C. G. and A. Artoia 1996 The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 45(2): 143~152.
- Doupe, A. J. and P. Patterson 1991 Glucocorticoids and the developing nervous system. *Curr. Top. Neuroendocrinol.* 12: 95~164.
- McEwen, B. S. 1992 Steroid hormones: effect on brain development and function. *Horm. Res.* 37: 1~10.
- McEwen, B. S. and R. M. Sapolsky 1995 Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 205~216.
- Oitzl, M. S., W. Sutanto and E. R. De Kloet 1992 Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav. Neurosci.* 106: 62~71.
- Rogers, L. J. 1990 Light input and the reversal of functional lateralization in chicken brain. *Behav. Brain Res.* 38: 211~221.
- Rogers, L. J. and S. W. Bolden 1991 Light-dependent development and asymmetry of visual projections. *Neurosci. Lett.* 121: 63~67.
- Rose, S. P. R. 1995 Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends Neurosci.* 18(11): 502~506.
- Sandi, C. and S. P. R. Rose 1994a Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res.* 647: 106~112.
- Sandi, C. and S. P. R. Rose 1994b Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *European J. Neurosci.* 6: 1 292~1 297.
- Schumacher, M., P. Robel and E. E. Baulieu 1996 Development and regeneration of the nervous system; a role for neurosteroids. *Dev. Neurosci.* 18: 6~21.
- Sonia, J. L. and B. S. McEwen 1997 The acute effects of corticosteroids on cognition; integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.* 24: 1~27.
- Sui, N., C. Sandi and S. P. R. Rose 1997 Interactions of corticosterone and embryonic light deprivation on memory retention in day-old chicks. *Dev. Brain Res.* 101: 269~272.

外 文 摘 要 (Abstract)

**EFFECT OF PRENATAL LIGHT AND CORTICOSTERONE
EXPOSURE ON MEMORY RETENTION OF DAY-OLD-CHICK ***

HU Jia-Fen SUI Nan KUANG Pei-Zi GUAN Lin-Chu

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

D. B. Joyce

(Department of Chemistry, Michigan University, USA)

Light hatching, dark hatching and drugs were administrated to the 20-day-old embryos (E20). One-trial passive avoidance task has been used in this experiment to detect the effects of different treatments on memory retention of chicks and also the mechanism involved. Light exposure or corticosterone administration improved the memory retention of the chicks; the antagonist of glucocorticoid receptor RU-486 significantly retarded the memory retention of light-hatched chicks. Therefore, glucocorticoid and its receptor might be involved in the process of light exposure. The protein inhibitor anisomycin partly inhibited the effect of corticosterone. The data implicated that some mechanisms including synthesis of protein might be involved in this effect.

Key words Day-old-chicks, Light exposure, Corticosterone, Embryonic period, Memory retention

* The work was supported by National Natural Science Foundation of China, Fund for Excellent Researchers Coming Back from Studying Aboard of Academic Sinica, and Life Science Special Fund of CAS supported by the Ministry of Finance.