

剥夺左眼和单眼学习与雏鸡脑内 Jun 样蛋白表达的相关性研究¹⁾*

高 杨 管林初 匡培梓

(中国科学院心理研究所, 北京, 100012)

刘 军 吴卫平

(中国人民解放军总医院神经介质实验室, 北京, 100853)

摘 要 利用免疫组化技术, 观察并比较剥夺一侧视觉及单眼一次性味觉厌恶回避学习后 Jun 样蛋白在雏鸡 HV 和 LPO 的表达, 结果表明正常雏鸡 HV、LPO Jun 表达几乎没有, 剥夺左眼和单眼视觉学习后均可使 Jun 样蛋白增高。根据阳性神经元记数结果表明: 1. 视剥夺 2.5、4、24 小时后可使 Jun 样蛋白的表达逐渐增高, 而且它们之间的差异显著; 2. 剥夺左眼 2 小时和 24 小时后训练, 并分别于 10 分钟、70 分钟记忆保持测验后可看到 Jun 样蛋白表达继续增多; 3. 无论单纯视剥夺组还是单眼视觉学习组, 各组 LPO Jun 样蛋白的表达均明显高于 HV 的 Jun 样蛋白表达, 它们之间差异显著。

关键词 雏鸡, Jun 样蛋白, 免疫组化技术, HV, LPO, 一次性味觉厌恶回避学习。

1 前 言

鸡的前脑结构主要由新纹状体、不发达的海马以及旁嗅球叶等组成。已有资料表明, 雏鸡具有两条视觉通路: 一条称作离顶盖投射, 视觉信息由顶盖向外纹状体投射; 另一条称作离丘脑投射, 视觉信息由丘脑向上纹体投射^[1]。利用雏鸡一次性味觉厌恶条件反射的实验证明, 内侧上纹体腹核 (MHV) 参与记忆的巩固过程; 旁嗅球叶 (LPO) 对长时记忆的贮存起更重要的作用^[2~4]。近年来, 大量的研究表明, 外部施加的很多因素都可以诱发原癌基因 c-fos、c-Jun 蛋白在神经元的表达, 因此, 被广泛地用作神经元活动的一个标志物^[5]。同时 Fos 和 Jun 蛋白可以转为细胞核内第三信使诱导靶基因的表达。它对神经元功能的变化特别是长时变化方面具有十分重要的作用^[6]。本实验目的是利用 Jun 蛋白的免疫组化技术, 观察剥夺左眼和单眼学习在 HV 和 LPO 的 Jun 样蛋白的表达, 并进行比较。

1) 本文初稿于1997年3月21日收到, 修改稿于1997年5月9日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。本文作者还有陈双双, 姜树军, 匡培根。

2 材料和方法

本实验选用雄性京白 904 二日龄雏鸡 24 只,由北京种禽公司孵化场供应。雏分为八个组,每组三只。第 1、2、3 组(G_1 、 G_2 、 G_3)分别剥夺左眼 2.5、4、24 小时;第 4、5 组(G_4 、 G_5)剥夺左眼 2 小时后进行一次味觉厌恶回避训练,分别于学习后 10 分钟和 70 分钟进行记忆保持测试;第 6、7 组(G_6 、 G_7)剥夺左眼 24 小时后进行训练,记忆保持测试时间与 4、5 组相同。第 8 组(G_8)为空白对照组。学习训练方法同以往实验^[7]。

剥夺左眼训练组分别于记忆保持测试后以及剥夺左眼组在相应时间内,用 10% 水合氯醛深麻醉(800mg/kg),之后迅速开胸暴露心脏,经心脏插入升主动脉后先用 20 毫升生理盐水快速冲洗,随后用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(4℃)pH7.4 灌注约 5 分钟。灌注完毕立即取脑先后浸入上述固定液及 20% 蔗糖溶液中各 2 天。于是从额极开始在冰冻切片机上行 50 μ m 厚的连续冠状切片,第 25 张切片经 Jun 免疫组化染色。切片在 0.2% Triton x-100 液中孵育 40 分钟后(室温),将切片放入兔抗 HSP70 单克隆抗体(1:100)孵育 48 小时(4℃),抗体用 1% 血清蛋白磷酸缓冲液(PBS)配置。经 PBS 洗约 10 分钟后,切片浸入生物素结合抗兔抗鼠 IgG(1:300 Zymed,美国)孵育 2 小时(室温)。再经 PBS 洗后,切片浸入链卵白素-生物素结合辣根过氧化物酶(1:300 Zymed, 美国)孵育 2 小时(室温)。用 PBS 充分洗后,采用二氨基联苯胺(DAB)——镍法呈色,呈色液由 0.05% DAB, 2.5% 硫酸镍胺和 0.01% 过氧化氢在 0.05M Tris-HCl 中配置,pH7.4。呈色后贴片,空气干燥,酒精梯度脱水,透明,D. P. X. 封片。

结果处理: 第 25 张切片包含 HV 和 LPO,经 c-Jun 免疫组化染色后,在 400 倍光镜下,每张切片取 5 个视野(100mm² / 视野)行 c-Jun 免疫阳性细胞计数,每组取三张。数据经方差分析和 t 检验处理。

3 结 果

经免疫组化染色后,免疫阳性反应的神经元核为深染的蓝黑色,呈圆形或卵圆形、胞膜不着色(如图版 I)。对于染色较浅的细胞不作为阳性反应计算。

根据观察及计数免疫阳性细胞所做的统计结果显示如表 1、2。

表 1 剥夺左眼不同时间后在雏鸡 HV 和 LPO 内的 Jun 蛋白表达的比较

	剥夺左眼 (M \pm SD)		
	(阳性反应细胞数)		
	2.5小时	4小时	24小时
	(G_1)	(G_2)	(G_3)
HV	19.47 \pm 1.60	27.60 \pm 3.18	30.73 \pm 2.69
LPO	22.87 \pm 1.92	32.67 \pm 2.92	34.20 \pm 2.60

从图版 I 和表 1 可看到: 1) 剥夺左眼,无论 HV 还是 LPO 部位的阳性反应都随视剥夺时程的增加而急剧上升,视剥夺 4 小时上升幅度最快,到了视剥夺 24 小时这种上升虽然还在继续,但幅度已经开始变慢,尤其是在 LPO 这种变慢更为明显。方差检验和 t 检

验 2.5 小时、4 小时、24 小时各组 HV、LPO 的组间差异均显著 ($P < 0.05$)。2) LPO 的阳性反应显著多于 HV 的阳性反映。方差检验和 t 检验 2.5 小时、4 小时、24 小时各组 HV、LPO 的组内差异显著 ($P < 0.05$)。

表2 单眼学习后不同记忆阶段
Jun样蛋白在雏鸡HV和LPO内表达的比较

	剥夺左眼 ($M \pm SD$) (阳性反应细胞数)					
	2小时			24小时		
	对照组 (G ₁)	学习后10分钟 (G ₄)	学习后70分钟 (G ₅)	对照组 (G ₃)	学习后10分钟 (G ₆)	学习后70分钟 (G ₇)
HV	19.47±1.60	24.60±2.47	37.47±3.52	30.73±2.69	37.67±3.39	44.33±3.33
LPO	22.87±1.92	31.47±2.67	41.47±2.67	34.20±2.60	42.20±2.81	50.27±4.99

图版 I、图版 II 和表 2 显示: 1) 单眼学习组 HV、LPO 的阳性反应在学习后都均显著升高, 而且 LPO 的这种升高明显高于 HV, 方差检验和 t 检验各组组内差异显著 ($P < 0.05$)。2) 各学习组学习后 70 分钟 HV、LPO 的阳性反应都显著高于学习后 10 分钟 HV、LPO 的阳性反应 ($P < 0.05$)。

空白对照组 (G_8) 即正常雏鸡 HV 和 LPO Jun 样蛋白的表达几乎没有。

4 讨论

上述实验结果表明, 单眼视剥夺作为一种刺激因素也能导致雏鸡脑内 HV、LPO c-Jun 蛋白的大量表达, 这种表达随剥夺时间的增加而增加, 这种增加到何时才达到一个稳定水平、到何时才开始下降还有待于进一步的实验来证实。

单眼视剥夺作为一种应激刺激, 必将引起雏鸡脑内一系列应激反应, 上述结果表明 c-Jun 蛋白在这种反应中起重要作用, 通过 c-Jun 蛋白的活动调节了雏鸡脑内神经元的功能, 从而调动神经系统应付应激刺激。LPO c-Jun 蛋白表达显著高于 HV 提示可能 LPO 在应激反应中起更为重要的作用。

我们的实验还表明, 学习能促使单眼视剥夺雏鸡 c-Jun 蛋白表达在 HV、LPO 进一步显著增加, 长时记忆阶段 (学习后 70 分钟) 明显高于短时记忆阶段 (学习后 10 分钟); 学习后 LPO 的 c-Jun 蛋白表达显著高于 HV。雏鸡不同记忆阶段 c-Jun 蛋白表达的差异更进一步证实了 Gibbs 和 Ng 的记忆三阶段理论^[8], 表明长时记忆阶段与蛋白质的表达、合成关系更为密切。同时表明 c-Jun 的表达与新的行为经验的获得、与神经元功能的长时变化密切相关^[9]。Rose 等人所作的一系列实验表明中间内侧上纹状腹核 (IMHV) 参与雏鸡记忆的巩固过程, LPO 对长时记忆的贮存起非常重要的作用, 而且还通过损毁实验证明记忆信息是由左 IMHV 经右 IMHV 向双侧半球的 LPO 传递的^[2~4], LPO 与 HVc-Jun 蛋白表达的差异提示 c-Jun 蛋白更多的参与长时记忆的贮存过程, 同时长时记忆阶段 HVc-Jun 蛋白表达的显著升高暗示 HV 除了 IMHV 以外的其它区域可能在长时记忆的贮存过程中也发挥作用。

参 考 文 献

- 1 Ö. Gunturkum. The functional organization of the avian visual system. *Neural and Behavioural Plasticity*, Oxford University Press, 1991: 92—108.
- 2 Patterson T A, Gilbert D B, Rose S P R. Pre-and-training lesion of the intermediate medial hyperstriatum ventrale and passive avoidance learning in the chick. *Experimental Brain Research*, 1990, 80: 189—195.
- 3 Sandi C, Patterson T A, Rose S P R. Visual input and lateralization of brain function in the chick. *Neuroscience*, 1993, 52(2): 393—401.
- 4 Gilbert D B, Patterson T A, Rose S P R. Dissociation of brain sites necessary for registration and storage of memory for a one-trial passive avoidance task in the chick. *Behavioral Neuroscience*, 1991, 105(4): 553—561.
- 5 Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 1990, 296: 517—530.
- 6 Kouzarides T, Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-Jun interaction. *Nature*, 1988, 336: 646—651.
- 7 管林初, 陈双双. 利用小鸡建立学习和记忆模型的方法介绍. *心理学报*, 1991, 23: 319—324.
- 8 Gibbs M E, Ng K T. Psychology of memory: Towards a model of memory formation. *Biobehavioral Reviews*, 1977, 1: 113—126.
- 9 张均田等. 学习记忆与原癌基因 c-fos. *中国药理学通报*, 1995, 11(1): 1—4.

EXPRESSION OF JUN-LIKE PROTEIN IN MONOVISUAL DEPRIVED CHICK FOLLOWING ONE-TRIAL PASSIVE AVOIDANCE TASK

Gao Yang Guan Linchu Kuang Peizi

(Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences Beijing, 100012)

Liu Jun Wu Weiping et al.

(Neurotransmitter Research Laboratory, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853)

Abstract

The Medial Hyperstriatum Ventrale (MHV) and Lobus Parolfactorius (LPO) have been known to be the crucial part in the memory formation process in chick, the former is more important in the stability of memory, the latter is necessary for the store of long-term memory in the chick. The Jun protein derived from c-fos proto-oncogene has been known to form a heterodimer with Fos protein, which functions as a third messenger to induce the expression of target gene. Immunohistochemical technique was used in the present study to detect and compare Jun expressed in HV and LPO of monovisual deprived chick following one-trial passive avoidance task. It was shown that the expression of Jun was scatty in the

normal chick; monovisual deprived 2.5 hours, 4 hours or 24 hours induced Jun expression definitely increased in HV and LPO; monovisual deprived hours and 24 hours following one-trail passive avoidance task and memory retention test at 10 minutes and 70 minutes after learning induced Jun expression continue to increase in HV and LPO; Jun expression in LPO was higher than that in HV.

Key words chick, Jun-like protein, Immunohistochemical, HV, LPO, one-trail passive avoidance task.

图版 I 说明:

- G₁LPO、G₁HV: 剥夺左眼 2.5 小时后在雏鸡 HV 和 LPO 内 Jun 样蛋白的表达
- G₂LPO、G₂HV: 剥夺左眼 4 小时后在雏鸡 HV 和 LPO 内 Jun 样蛋白的表达
- G₃LPO、G₃HV: 剥夺左眼 24 小时后在雏鸡 HV 和 LPO 内 Jun 样蛋白的表达
- G₄LPO、G₄HV: 视剥夺 2 小时后单眼学习 10 分钟后 Jun 样蛋白的表达

图版 II 说明:

- G₅LPO、G₅HV: 视剥夺 2 小时单眼学习 70 分钟后 Jun 样蛋白的表达
- G₆LPO、G₆HV: 视剥夺 24 小时单眼学习 10 分钟后 Jun 样蛋白的表达
- G₇LPO、G₇HV: 视剥夺 24 小时单眼学习 70 分钟后 Jun 样蛋白的表达