

# 雏鸡左眼视剥夺不同时期后记忆形成过程与脑内 Jun 样蛋白表达差异的研究

高 杨 管林初 陈双双 匡培梓

(中国科学院心理研究所,北京,100012)

刘 军 吴卫平 姜树军 匡培梓

(中国人民解放军总医院神经介质实验室,北京,100853)

**摘 要** 本实验采用一次性味觉厌恶回避学习,研究 2 日龄雏鸡左眼视剥夺 24 小时后的记忆形成过程,并与左眼视剥夺 2 小时后的记忆形成过程进行比较,同时利用免疫组化技术,观察并比较单眼视剥夺不同时期及单眼学习后 Jun 样蛋白在雏鸡脑内不同区域(HV 和 LPO)的表达。结果表明:1. 视剥夺左眼 24 小时对雏鸡的短时记忆、中时记忆和长时记忆均无明显影响,但中时记忆保持水平略低于双眼学习条件下的中时记忆保持水平。这与视剥夺 2 小时后的记忆形成过程有明显不同;2. 视剥夺左眼 2 小时、24 小时可使 Jun 样蛋白的表达随剥夺时间变长而显著增高;3. 视剥夺左眼 2 小时、24 小时后进行学习,雏鸡脑内分别于学习后 10 分钟和 70 分钟观察到 Jun 样蛋白表达的明显增多。

**关键词:** 雏鸡 Jun 样蛋白 免疫组化技术 HV LPO 一次性被动回避学习

## 1 引言

已有研究从药理学及行为学上证实了雏鸡经一次性被动回避学习后的记忆形成包括三个阶段,即:短时记忆、中时记忆和长时记忆,并且探明了这三个记忆阶段所涉及的生物化学过程各不相同<sup>[1]</sup>。不少研究还表明,不同的药物能相应地抑制雏鸡记忆的不同阶段,造成这些阶段的记忆缺失<sup>[2-3]</sup>。另外刺激物的强度、种类、学习后是否遭受电击以及接受电击时间的长短等都影响雏鸡的记忆形成阶段<sup>[4-5]</sup>。雏鸡的内侧上纹体腹核(MHV)和旁嗅球叶(LPO)在记忆形成过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。

一次性味觉厌恶回避学习对于雏鸡来讲,主要进行的是一种视觉学习,这种学习与其视学系统关系密切,因此,单眼视剥夺可能会对雏鸡的记忆形成产生影响。我们以前的实验结果也表明,视剥夺左眼 2 小时后明显干扰雏鸡的中时记忆和长时记忆<sup>[7]</sup>。大量研究表明,很多外部因素都能诱发即刻早基因 c-fos、c-Jun 蛋白的表达,因此它对神经元功能的变化,特别是长时变化方面具有重要作用<sup>[8]</sup>。本实验目的是观察左眼视剥夺不同时期对雏鸡记忆形成过程中 Jun 样蛋白表达的差异,探讨在不同的视剥夺条件下 Jun 样蛋白在雏鸡记忆形成过程中的作用及可能的机制。

## 2 实验方法

### 2.1 实验动物

2 日龄雄性雏鸡,由北京种禽总公司提供。

### 2.2 实验程序

一次性厌恶回避反应训练方法分为预训练、训练和测试三个阶段。预训练时给雏鸡呈现沾有水的金属小珠,目的是激发雏鸡啄食行为和熟悉环境;训练阶段给雏鸡呈现沾有苦味剂(MeA)的红色小珠,雏鸡啄后出现一系列厌恶回避反应;测试阶段,雏鸡啄食具有苦味的 MeA 后间隔一定时间用不沾有 MeA 的红色小珠呈现给雏鸡,以雏鸡回避红色小珠为记忆保持良好的指标。

Jun 样蛋白免疫组化染色过程: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5 $\mu$ 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Jun-D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0.5%DAB,2.5%硫酸镍胺和0.01%过氧化氢在0.05MTris-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(100mm<sup>2</sup>/视野)进行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 实验结果

#### 3.1 实验一

选用雏鸡200只,实验前24小时用不透明胶纸封贴左侧眼睛,共分10个组,每一组20只雏鸡。学习后各组测试时间分别为训练后5、15、20、30、40、50、55、60、65、70分钟。

根据各组雏鸡回避率的高低得到的雏鸡左眼视剥夺24小时后的学习记忆曲线如图1(图中实线为双眼条件下雏鸡的记忆形成曲线)。图2为雏鸡左眼视剥夺24小时与左眼视剥夺2小时的记忆形成曲线的比较。

从图1可以看到,左眼视剥夺24小时后,雏鸡在一次性被动回避学习后所得的记忆保持曲线与双眼学习条件下所得的记忆保持曲线很一致:学习后15分钟和55分钟出现了明显的记忆保持低谷,低谷处的回避率均小于35%。统计结果表明,右眼学习与双眼学习相比,辨别率仅在学习后20分钟存在着显著性差异( $F(2,42) = 3.77 P < 0.05$ ),其余各时间点上的记忆保持差异均不显著( $P > 0.05$ )。

图2清楚地表明,1)左眼视剥夺2小时以后,雏鸡仅形成了良好的短时记忆,中时记忆波动大、保持水平低,长时记忆没有形成;2)左眼视剥夺24小时以后,形成了良好的短时记忆、中时记忆和

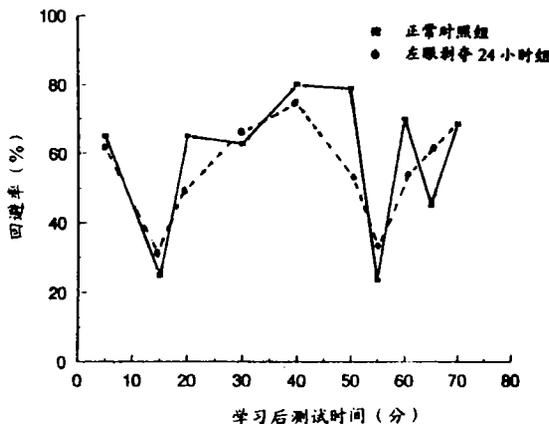


图1 左眼视剥夺24小时组与正常对照组记忆保持曲线的比较

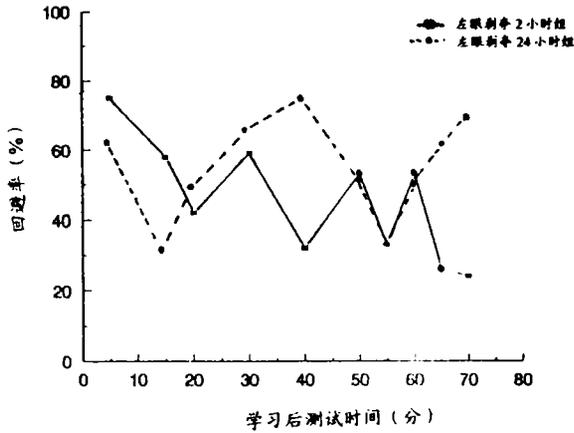


图2 左眼视剥夺24小时组和2小时组记忆保持曲线的比较

长时记忆;中时记忆稳定无大幅度波动,但中时记忆的保持水平却略低于双眼学习条件下的中时记忆保持水平;长时记忆稳定保持水平较高。

### 3.2 实验二

雏鸡分为八个组,每组三只。第1、2组(G1、G2)分别剥夺左眼2小时和24小时;第3、4组(G3、G4)剥夺左眼2小时后进行一次性味觉厌恶回避训练,分别于学习后10和70分钟进行记忆保持测试;第5、6组(G5、G6)剥夺左眼24小时后进行训练,记忆保持测试时间与3、4组相同。第7组为空白对照组。

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、胞质不着色。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。

表1 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( $\bar{X} \pm s$ )					
	2小时			24小时		
	对照组 (G1)	学习后10分钟 (G3)	学习后70分钟 (G4)	对照组 (G2)	学习后10分钟 (G5)	学习后70分钟 (G6)
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***

注:表中单位为阳性细胞反应个数

\* 与视剥夺2小时的对应组比较差异显著

\*\* 与本组对照组比较差异显著

上表显示,1)视剥夺24小时后无论对照组还是学习组的阳性反应细胞数均相应地显著高于视剥夺2小时后的各组的阳性反应细胞数( $P < 0.05$ );2)单眼学习不论HV还是LPO的阳性反应在学习后都显著升高,而且LPO的阳性反应明显高于HV( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

上述二部分实验结果说明,单眼视剥夺作为一种刺激因素影响雏鸡的记忆形成过程,但随着视剥夺时程长短的不同对雏鸡影响的强弱也各不相同。我们以前的实验结果表明视剥夺2小时导致雏鸡中时记忆不稳定波动且保持水平低,长时记忆难以形成。而本实验结果表明视剥夺24小时后雏鸡的整个记忆形成过程趋于正常,中时记忆稳定,形成了长时记忆,但中时记忆的保持水平略低

于正常条件下中时记忆保持水平;同时单眼视剥夺也导致了雏鸡脑内 Jun 样蛋白的表达在各组雏鸡的不同脑区进一步显著增加,LPO 的 Jun 样蛋白表达又显著高于 HV。

这一结果提示,造成不同视剥夺时程对雏鸡记忆形成过程影响不同的原因,可能与经历较长时间的视剥夺后雏鸡脑内 Jun 样蛋白的表达显著高于经历较短时间视剥夺雏鸡脑内 Jun 样蛋白的表达有关。雏鸡正是在这种 Jun 样蛋白高水平表达的基础上才改善了由视剥夺导致的记忆缺陷或缺失,但 Jun 样蛋白表达的升高是如何对视剥夺后雏鸡的记忆形成起作用的还有待深入研究,因为 Jun 样蛋白可以转化为细胞核内的第三信使诱导靶基因的表达,能把短时程作用的细胞外信号和细胞功能的长时程改变偶联起来<sup>[9]</sup>。

有研究认为,c-fos 的表达可促使突触前。B-50 蛋白磷酸化,继而引起突触糖蛋白合成、树突棘的密度以及突触和突触囊泡的数量增加,神经元放电时间延长,从而引起突触可塑性变化<sup>[10]</sup>,而 C-Jun 与 c-fos 同属即刻早基因,二者有极类似的功能。也有研究表明,蛋白激酶、LTP 与 c-Jun 的表达有关<sup>[11]</sup>。因此,Jun 样蛋白在长时程视剥夺后是如何参与学习、记忆过程的,中间通过了哪些环节还有待研究。

我们实验室已有的工作表明,单眼视剥夺导致雏鸡脑内加压素(AVP)、生长抑素(SS)含量的明显升高,并且学习后这两种物质的含量均发生明显变化<sup>[12]</sup>。本实验进一步说明单眼视剥夺还导致了雏鸡脑内 Jun 样蛋白表达的明显增加,那么 Jun 样蛋白的表达与 AVP、SS 之间有什么样的关系?它们是如何参与记忆形成过程的,是同步平行参与的呢,还是形成了链式或其它什么关系参与的呢?还需要进一步的探讨。

另外,我们的实验还表明并非仅应激刺激能引起 Jun 样蛋白的表达升高,学习记忆过程本身也能特异地引起 Jun 样蛋白表达的显著增加,但是否能形成稳定的中时记忆和长时记忆还与视剥夺后 Jun 样蛋白表达水平的高低有关。

## 5 参考文献

- Gibbs ME,Ng KT. Psychobiology of memory:Towards a model of memory formation. *Biobehavioral Reviews*, 1977;1:113-126
- Gibbs ME,Ng KT,Growe S. Hormones and the timing of phases of memory formation. *Neural and Behavioural Plasticity*,Oxford University press,1991;441-445
- Holscher C,Rose SPR. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents formation in the chick. *Neuroscience Letters*,1992;145:165-167
- Crowe SF,Ng KT,Gibbs ME. Memory formation processes in weakly reinforced learning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*,1989;33:881-887
- Rose SPR. Biochemical mechanisms involved in memory formation in the chick. *Neural and Behavioural Plasticity*,Oxford University press,1991;277-304
- Sandi C,Patterson TA,Rose SPR. Visual input and lateralization of brain function in the chick. *Neuroscience*, 1993;52(2):393-401
- 高杨,匡培梓,陈双双等. 单眼视剥夺 2 小时对雏鸡记忆保持的影响. *心理科学*,1997;20(3):202-205
- Kouzarides T,Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-Jun interaction. *Nature*,1988;336:646-651
- 熊鹰,张长城. 基因与学习记忆调控. *生理科学进展*,1995;26(4):293-298
- Rose SP. How chicks make memories:the cellular cascade from c-fos to clenritic remodelling. *TINS*,1991;14:390-397
- Nikolave,Tischmeyer W,Krug M,et al. C-fos protooncogene expression in rat hippocampus and entorhinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path. *Brain Res*,1991;560:346-349
- 匡培梓,陈双双,管林初等. 雏鸡单眼学习与脑内加压素和生长抑素含量的相关性研究. *心理学报*,1997;29(增刊):49-52

# ENGLISH ABSTRACTS

## THE PSYCHOLOGICAL STRUCTURE OF PAST TIME

*Huang Xiting, Sun Chenghui, Hu Weifang*

(Southwest China Normal University, Chongqing)

By using seven kinds of time (i. e. second, minute, hour, day, week, month and year) and fuzzy statistical tests, 408 subjects of college students evaluated 40 indefinite temporal qualifiers. The result showed: 1) The mental time of past and future was symmetric in mental structure, and could be divided into 3 periods, that is, with second and minute as "nearer past" and "nearer future", and with hour, day and month as "near past" and "near future", and with year as "far past" and "far future". 2) If the semantic meaning of temporal qualifiers got near the present time, their fuzziness—grade would become small, and the number of assurance—score of evaluation would become large, and vice versa. 3) Only a few subjects evaluated the temporal qualifiers by the unit of week.

Key words: past time, temporal qualifier, fuzzy statistical test, past time perspective.

## THE PROCESSING OF COLOR AND SHAPE UNDER SMOOTH MOVING CONDITIONS

*Ding Jinhong, Wang Donghui, Lin Zhongxi-an*

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

The identification of moving pictures is a basic procedure of motion information processing. An experiment was conducted to identify the characteristics of the processing of pictures of different shapes and colors under smooth moving conditions. The results showed that: 1) Shape and color were processed at different time course and the matching of colors was easier than that of shapes; 2) The dimension of motion affected the comparison of two pictures; 3) The distance (or the time interval) between two pictures was another factor which affected the processing of moving pictures: the comparison time increased as the distance decreased.

Key words: visual motion, color, shape, matching of picture.

## THE PROCESS OF CHICK'S MEMORY FORMATION AND EXPRESSION OF JUN—

## LIKE PROTEIN IN CHICK BRAINS AFTER DIFFERENT TIME OF VISUAL DEPRIVATION

*Gao Yang, Guang Linchu, Chen Shuangshuang, Kuang Peizi*

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

*Liu Jun, Wu Weiping, Jiang Shujun, Kuang Peigen*

(Neurotransmitter Research Laboratory, General Hospital of the PLA, Beijing)

2—day—old chicks were trained to learn the one—trial passive avoidance task after being deprived of left—eye vision for 24 hours. Their process of memory formation was compared with that of chicks deprived of left—eye vision for 2 hours. The immunohistochemical technique was used in the present study to detect and compare Jun expressed in HV and LOP after different time of visual deprivation. It was shown that the 24—hour deprivation of left—eye vision did not have obvious effects on the stages of memory formation, and after 24 hours of visual deprivation, the expression of Jun—like protein was greatly higher than that of 2—hour visual deprivation, and the learning induced the expression of Jun—like protein at a high level especially in LPO after visual deprivation.

Key words: chick, Jun, one trail passive avoidance task, visual deprivation.

## THE DEVELOPMENT OF HYPOTHESES—TESTING STRATEGIES

*Zhang Qinglin, Yang Chunyan*

(Department of Psychology, Southwest Normal University, Chongqing)

Using a computer program designed by ourselves, we studied how primary school, secondary school and college students solved the problem about scientific rule discovery. We concentrated on thinking strategies in the process of hypothesis formation, experiment design and experiment performance. The results showed that pupils had difficulties using hypotheses—testing strategies and solving the problem, and secondary school students and college students could solve the problem successfully with the hypotheses—testing method.

Key words: thinking strategies, hypotheses—