

一日龄小鸡的不同记忆阶段中 Jun 样蛋白在脑内 HV 和 LPO 的表达

胡家芬 管林初 匡培梓

(中国科学院心理研究所脑—行为研究中心, 北京, 100012)

姜树军 匡培根

(中国人民解放军总医院神经介质实验室, 北京, 100853)

摘 要 以一日龄小鸡为研究对象, 采用一次性被动回避反应试验和免疫组化方法, 选用六个时间点(10、30、70 分钟及 4、8 和 24 小时)对 Jun 样蛋白在 HV 和 LPO 两部位的表达进行了探讨。结果表明 Jun 样蛋白在小鸡学习过程表达存在部位上的差异, 即在 LPO 区的表达明显高于 HV 区。由于 c-jun 表达水平的变化与小鸡记忆痕迹的迁移有着相似的趋势, 说明 Jun 样蛋白参与了记忆的形成和贮存过程。

关键词 一日龄小鸡, 记忆, Jun 样蛋白, HV, LPO。

1 前 言

小鸡一次性被动回避反应模型是国际上广泛采用的研究小鸡学习记忆模型。在小鸡一次性被动回避反应中, 原癌基因 c-jun 和 c-fos 被激活, 其表达水平在回避反应后迅速达到峰值。其表达产物 Jun 和 Fos 样蛋白作为核内第三信使对下游靶基因的表达进行调节, 从而参与记忆的形成和贮存过程[1]。本实验以小鸡为研究对象,

将一日龄的雄性小鸡(京白 939)分组,成对放入实验盒。共分七组,分别为学习后 10、30、70 分钟和 4、8 及 24 小时进行测试组;第七组。适应半小时后,学习组的小鸡按下列程序进行实验(1)预训练:将玻璃圆珠伸入实验箱内,绝大部分小鸡会积极主动地啄食小圆珠。然后分别蘸清水呈现给小鸡,以训练其啄食行为。(2)训练:将蘸有 100% MeA 的红色玻璃圆珠呈现给小鸡(10 秒),大部分小鸡啄食后会发出叫声,不啄的小鸡被淘汰。(3)测试:分别于训练后 10、30、70 分钟进行测试。此时分别用与训练中同样大小干燥的红珠和蓝珠依次呈现给小鸡,蓝珠为记忆良好者。每组有 3—5 只小鸡进入下面的实验。以下步

2.2 免疫组化分析

将测试完毕的小鸡迅速用乙醚麻醉,剪开胸部,露出心脏。在胸腔内插入灌流针。先快速灌入 10ml 左右生理盐水,再缓慢灌入 4% 多聚甲醛。将右脑分开,分别置于盛有 4% 多聚甲醛的小瓶中。将小瓶放入 4℃ 冰箱过夜。20% 蔗糖溶液,再置于冰箱过夜。冰冻连续冠状切片,每片厚 50 μ m。将切片于 0.2% Triton X-100 中孵育 40 分钟(室温),转入抗 Jun 抗体(1:100)孵育 48 小时(4℃)。抗体用 1% 的血清蛋白的磷酸缓冲液(PBS)漂洗约 10 分钟后,切片浸入生物素结合的抗兔抗鼠的 IgG(1:100)孵育 2 小时。PBS 漂洗后,再浸入链卵白素-生物素结合辣根过氧化物酶(HRP)室温孵育 2 小时。PBS 充分漂洗后,采用二氨基联苯胺(DAB) 0.05% DAB, 2.5% 硫酸镍胺和 0.01% 过氧化氢于 0.05M Tris-HCl(pH 7.4)中孵育 10 分钟,空气干燥,酒精梯度脱水、透明、D.P.X.封片。

2.3 结果处理

光镜($\times 400$)观察,记录阳性细胞的数目。每组选用相应于 HV 区左右各 3 张,每张切片取五个视野(100 目 / 1cm²),分别计数。所得数据进行分析。

3 实验结果

在左右脑没有差异($P > 0.05$)。

4 讨 论

原癌基因是原核和真核生物基因组结构内高度保守的一类基因。其中能被第二信号系统激活的原癌基因称为即刻早期基因(IEGs)。c-jun 和 c-fos是 IEGs 的主要成员,其表达产物 Jun 和 Fos 蛋白作为核内第三信使作用于靶基因,调节其转录水平。学习行为能激活小鸡脑内 c-fos 和 c-jun 基因的表达, LPO 和包含 IMHV 的 HV 两个脑区是与小鸡学习记忆密切相关的部位。本实验结果表明小鸡学习一次性被动回避任务导致了这两个脑区 Jun 样蛋白特异的表达,而且

LPO 区的表达明显高于 HV 区,因此 c-jun 基因的表达存在部位上的差别,这与他们前一个实验结果相一致^[5]。Rose 对 c-fos 基因的研究表明 Fos 蛋白在 IMHV 区有高水平的表达,但他们没有对两个区域之间的表达差异进行对比,可能存在但未被揭示;若它们两者之间确实存在这种差异,也可从它们的表达产物的作用方式上的差异去理解。目前,对 c-fos 基因的诱导机制尚不清楚。c-fos 基因含有几类可被诱导的成分:血清反应序列(SRE)、cAMP 反应元件(CRE)和 AP-1 序列。因此外界各类刺激可通过第二信号系统(蛋白激酶 C、cAMP、cGMP)作用于 c-fos 基因的相应部位诱导其表达。c-jun 基因中缺乏上述结构,其诱导机制仍不太清楚。这两类基因的表达产物 Fos 和 Jun 样蛋白在核内是通通过 AP-1 位点结合而影响其转录水平,从而将外界信号与基因表达型联系起来。Jun 样蛋白既可与 Fos 也可与自身形成二聚体,因此它是一个具有相当活性的蛋白质。

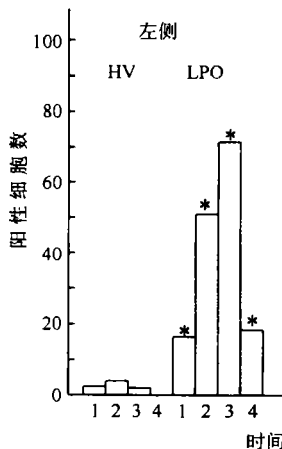


图2 同侧HV和LPO区Jun样蛋白阳性细胞数(图中1,2,3,4分别代表10、30、70、100min)

习记忆中的作用进行了一些探讨。Anokhin 在对小鸡记忆过程中脑内研究中,发现在训练后 30 分钟测试时,小鸡脑内 c-fosmRNA 的表达可达 mRNA 表达发生于蛋白质合成之前,所以 Fos 样蛋白的表达高峰应在实验也发现 Jun 样蛋白表达的结果与之有相似的趋势,因此可推测 Fos 一样主要参与了记忆的巩固和贮存过程。

小鸡记忆从中时阶段转变到长时阶段的过程中发生了许多生理蛋白质的磷酸化是非常重要的一个过程。另外本实验室也报道了 γ -氨基胆碱能受体系统与小鸡中时记忆相关^[9,10]。中时记忆作为从短时记忆的重要阶段在研究记忆的形成中有举足轻重的地位。由于 Jun 样蛋白在中时记忆阶段内,表明 c-jun 基因的表达可能触发了某种与蛋白磷酸化相关的内在机制,对这些机制的探讨将有利于更进一步认清小鸡记忆

本实验检测的 HV 是包括 IMHV 在内的一个比较大的结构,c-jun 是否发生于 HV 内的 IMHV 部位仍有待于更深入的探讨。在左侧 HV 蛋白的表达升高,这可能与环境的影响有一定关系,有待于进一步证实。

参 考 文 献

- 1 Gibbs M E, Ng K T. Psychology of memory: Towards a model of memory Reviews, 1977, 1:113—126
- 2 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:
- 3 韩济生. 神经科学纲要, 北京: 北京医科大学, 协和医科大学联合出版社, 1993:277
- 4 Sandi C, Patterson T A, Rose S P R. Visual input and lateralization of brain Neuroscience, 1993, 52(2):393—401
- 5 高 杨, 管林初等. 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. 409—413
- 6 Patterson T A, Gilbert D B, Rose S P R. Pre-and training lesion of the intermed ventrale and passive avoidance learning in the chick. Experimental Brain Research,
- 7 Gilbert D B, Patterson T A, Rose S P R. Dissociation of brain sites necessary for of memory for a one-trial passive avoidance task in the chick. Behavioral Neurosc

EXPRESSION OF JUN-LIKE PROTEIN IN HV AND LPO OF ONE-DAY-OLD CHICKS' BRAINS DURING DIFFERENT MEMORY PHASES

Hu Jiafen Guan Linchu Kuang Peizi

(Brain-Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences)

Jiang Shujun Kuang Peigen

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

Abstract

One-day-old chicks were trained with 100% concentration of a learning chemical, methyl anthranilate (MeA), and tested for memory retention at different time points (10, 30 and 70minutes; 4, 8 and 24hours) after training. Brain sections were examined with immunohistochemistry method. The number of cells which expressed Jun-like protein was counted under the microscope. The data were analyzed by ANOVA statistical system. The results showed that Jun-like protein was specifically activated by the learning course in one-day-old chicks. There were significant differences among different areas in the brain, that is to say, more Jun-like protein in LPO than that in HV on the whole. Because Jun-like protein expression has a strong tendency with the memory trace in chicks, it could be deduced that Jun-like protein may play an important role in the consolidation and retention of the chicks' memory.

Key words one-day-chicks; memory; Jun-like protein; HV; LPO