

慢性皮质酮处理对小鼠学习记忆和突触相关蛋白的影响

孙秀萍¹, 杨久山², 张楠¹, 宋铭晶¹, 秦川^{1*}

(1. 北京协和医学院比较医学中心 中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类动物模型三级实验室, 北京 100021;
2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

【摘要】 目的 建立饮入方式, 慢性给予皮质酮, 观察皮质酮对学习记忆和突触相关蛋白的影响。**方法** C57BL/6J 雄性小鼠随机分为正常组和皮质酮组, 每组 10 只。皮质酮组饮用含皮质酮的 0.45% 羟丙基- β -环糊精溶液, 5 mg/(kg·d)。正常组动物给予 0.45% 羟丙基- β -环糊精溶液。造模 35 d 后, 进行社会识别实验和水迷宫实验。行为学实验结束后, 动物断头取海马, 应用 western blot 进行突触相关蛋白测定。**结果** 社会识别实验显示, 正常组和皮质酮组对刺激鼠笼的嗅闻时间均比空鼠笼长 ($P < 0.05$)。对照组对刺激鼠 2 的嗅闻时间比刺激鼠 1 长 ($P < 0.05$)。皮质酮组对刺激鼠 2 的嗅闻时间与对刺激鼠 1 的嗅闻时间差异无显著性。水迷宫实验定位航行结果显示, 皮质酮组学习能力下降, 寻台潜伏期延长 ($P < 0.05$)。空间探索结果显示, 皮质酮组穿台次数、进入实台象限的次数和实台象限路程均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 皮质酮组突触后致密物质 (postsynaptic density, PSD-95)、突触素 (synapsin-1, Syn-1) 和磷酸化细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 表达明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 通过饮入方式, 慢性给予皮质酮, 动物出现社会记忆和空间学习记忆障碍, 可能与海马突触相关蛋白表达下降, 突触功能受损有关。

【关键词】 皮质酮; 学习记忆; 突触蛋白; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0253-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.007

Effect of chronic corticosterone administration on the learning and memory and expression of synapse-related proteins in mice

SUN Xiu-ping¹, YANG Jiu-shan², ZHANG Nan¹, SONG Ming-jing¹, QIN Chuan^{1*}

(1. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, and Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of chronic corticosterone administration on learning and memory and expression of synapse-related proteins in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control and corticosterone (CORT) groups (10 mice per group). CORT was dissolved in the vehicle (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin, β -CD). Corticosterone (5 mg/kg/day) was orally administered in drinking water for 35 days. The control mice received vehicle (β -CD) in drinking water during the entire experiment. Social discrimination test and Morris water test were applied to evaluate the learning and memory impairment of the model mice. **Results** Both the mice of control and CORT groups were more interested in social (stranger cage) than the non-social (empty cage) experience. The control

【基金项目】 北京市自然科学基金资助项目 (资助编号: 7142105); 国家自然科学基金 (资助编号: 31301890)。

【作者简介】 孙秀萍 (1974 -), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 神经精神疾病药理及方法学

【通讯作者】 秦川, 博士生导师, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

group increased the time spent with an unfamiliar mouse (stranger 2 cage). The mice of CORT group were not able to discriminate between an unfamiliar (stranger 2) and the familiar mouse (stranger 1). In the Morris water maze test, in contrast to the first 3 days, an increase in latency to reach the hidden platform ($P < 0.05$) was observed on day 4 in the CORT group compared with the mice of control group. CORT-treated mice showed a statistically significant decrease in the frequency in the platform, frequency in the target quadrant and distance in the target quadrant ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$) compared with the control group. The western blot analysis showed a notably decreased expression of PSD95, Syn-1 and p-erk in hippocampus in the mice of CORT group compared with the control group. **Conclusions** Chronic administration of corticosterone induces learning and memory impairment and decreases the expression of synapse-related proteins.

【Key words】 Corticosterone; Learning; Memory; Synapse-related protein; Mice

Corresponding author: QIN Chuan, Email: qinchuan@pumc.edu.cn

研究表明,慢性应激影响人的学习记忆功能^[1]。长期应激引起下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)负反馈失调,促使体内糖皮质激素释放。糖皮质激素受体在海马高密度表达^[2]。长期、高水平的糖皮质激素激活海马糖皮质激素受体,通过一系列神经生化机制,导致海马受损,出现空间学习记忆障碍。物理应激方式如束缚、强迫游泳等被广泛应用于慢性应激致学习记忆障碍的研究。但物理应激容易引起动物的适应性,表现为糖皮质激素在应激初期升高,而中后期趋于降低的趋势,从而不能恰当反应应激因素对学习记忆的影响^[3]。啮齿类动物的糖皮质激素称为皮质酮(corticosterone, CORT)。通过皮下注射、饮入皮质酮等人为方式,增加动物体内的皮质酮水平,可以模拟应激引起海马功能和结构受损,用于应激致学习记忆障碍的研究^[4]。该模型操作简单,并且避免了物理应激的适应性现象。近年来,神经突触功能失调和结构受损成为学习记忆障碍病理基础的研究热点^[5]。分子生物学的研究揭示学习记忆障碍与突触相关蛋白表达紊乱有关。本研究通过饮入方式,给予小鼠皮质酮,观察皮质酮对小鼠学习记忆行为及海马突触相关蛋白的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级C57BL/6J雄性小鼠,20只,2月龄,体重22~25 g。由北京华阜康生物科技股份有限公司提供【SCXK(京)2014-0004】。动物自由进食进水,室内温度:23~25℃,相对湿度:(55±10)%。维持12 h光照/12 h黑暗的昼夜节律。动物适应环境一周进行实验。

1.2 仪器

动物行为学视频跟踪系统(Noldus Information

Technology, EthoVision XT, The Netherlands))

1.3 药物

皮质酮(Sigma, 27840),羟丙基-β-环糊精溶液(山东滨州智源生物科技有限公司)。

1.4 实验方法

动物随机分为正常组和皮质酮组,每组10只,5只/笼。皮质酮组参照文献^[6],将皮质酮溶于0.45%羟丙基-β-环糊精溶液中,每日35 μg/mL(相当于5 mg/kg),避光,动物在造模和行为学检测期间连续饮用。正常组动物给予0.45%羟丙基-β-环糊精溶液。造模35 d后,进行社会识别实验和水迷宫实验。行为学实验结束后,每组取3只动物,断头取海马,应用western blot进行突触相关蛋白测定。

1.4.1 社会识别实验

动物在测试房间适应1 h后,进行社会识别实验。实验在中国医学科学院医学实验动物所进行【SYXK(京)2014-0029】。分为适应阶段、社交实验阶段和社会新奇实验阶段。根据文献^[6],首先将动物置于50 cm × 50 cm × 50 cm的方形敞箱中,自由适应5 min。社交实验阶段,在敞箱的一个角落放置一空鼠笼,其对角角落放置一相同鼠笼,鼠笼内放置一只刺激鼠1(stranger 1)。将实验鼠放入敞箱,应用EthoVision XT行为轨迹跟踪系统,记录10 min内实验鼠接触空鼠笼和刺激鼠笼的时间。实验结束,将实验鼠取出。社会新奇实验:在空鼠笼放入另外一只新的刺激鼠2(stranger 2),重新放入实验鼠,记录10 min内实验鼠接触刺激鼠1和刺激鼠2的时间。鼠笼上有圆孔,实验鼠和刺激鼠可以通过嗅觉接触。接触行为表现为主动嗅闻(sniffing),定义为实验鼠的鼻尖距离鼠笼2 cm以内范围。实验结束,将实验鼠取出,归笼。

1.4.2 水迷宫实验

水迷宫实验装置为一个圆形不锈钢水池,直径

为 100 cm,高 50 cm,将水池等分为 4 个象限,平台象限的中央放置直径为 9 cm,高 27 cm 的圆形平台,整个实验期间其位置保持不变。水中加入奶粉,水温 25℃。动物在测试房间适应 1 h 后,进行水迷宫实验。根据文献^[7],水迷宫实验过程分为可视平台实验、定位航行(隐藏平台)实验和空间探索实验三个阶段。第 1 天,进行可视平台实验,平台露出水面 1 cm,每只动物从三个象限(平台象限除外),面壁放入水中,游泳 1 min。定位航行实验:第 2~5 天进行定位航行实验。平台位于水面以下约 1 cm。动物从三个象限(平台象限除外)入水,共游泳 3 次。每次 1 min。动物找到平台并停留 5 s,或测试时间到,实验自动停止。不论动物是否找到平台,一次游泳结束,均将动物引导至平台,停留 10 s。空间探索实验:定位航行实验结束 24 h 后,撤除平台。将动物从对角象限(与实台象限相对应的象限)放入水中,观察 1 min 内动物在实台象限的停留时间、穿台次数、游泳路程等。

1.4.3 突触相关蛋白测定

应用 western blot 方法,每 10 mg 组织加 100 μL 预冷的裂解液,冰上裂解 30 min。12 000 r/min,4℃

离心,20 min。取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜(300 mA,2 h)。5%小牛血清封闭 1 h。一抗孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗。GADPH 稀释浓度为 1:1000。ECL 试剂盒显色。应用 Image J 软件进行统计分析。

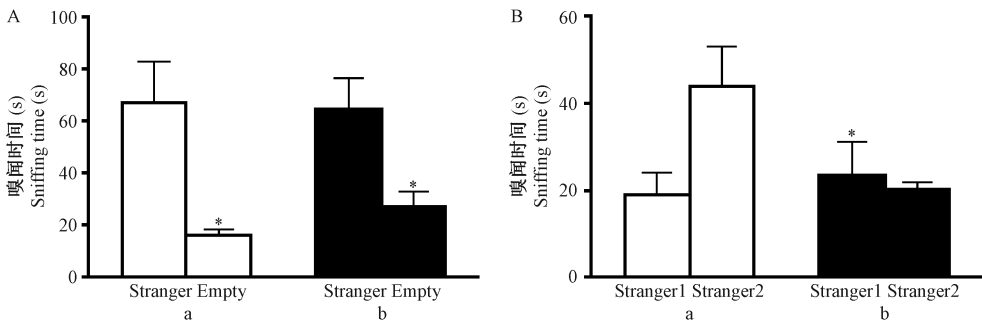
1.5 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准误(mean ± SEM)表示。采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。采用单样本 K-S 检验进行正态分布检验,正态分布数据采用独立样本 T 检。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 皮质酮模型对社会识别实验的影响

如图 1A 所示,社交实验中,正常组和皮质酮组对刺激鼠笼的嗅闻时间均比空鼠笼长,并具有显著性差异($P < 0.05$)。如图 1B 所示,社会新奇实验中,对照组对刺激鼠 2 的嗅闻时间长,与刺激鼠 1 相比,差异具有显著性。皮质酮组对刺激鼠 2 的嗅闻时间与对刺激鼠 1 的嗅闻时间差异无显著性。



注:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组。

图 1 皮质酮模型对社会识别实验的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$ 。a. Control group;b. CORT group.

Fig. 1 Effect of corticosterone on social discrimination in the mice

2.2 皮质酮模型对水迷宫实验的影响

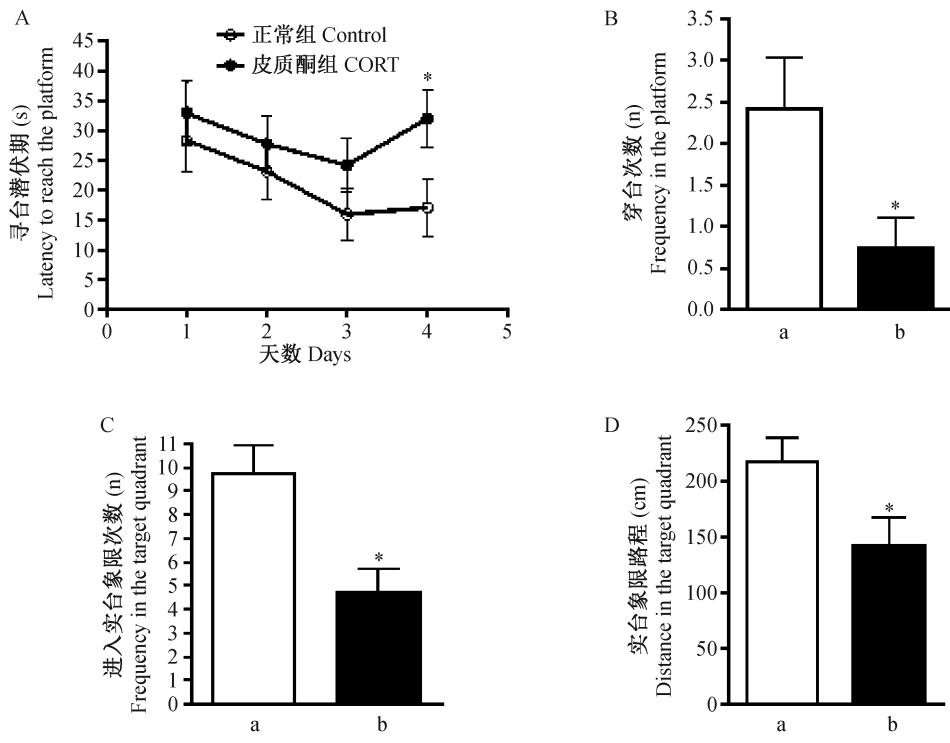
定位航行实验结果(图 2A)显示,随着训练时间的延长,正常组和皮质酮组寻台潜伏期均逐渐缩短,正常组缩短更明显,至第 4 天时,皮质酮组学习能力进一步下降,寻台潜伏期延长,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.05$)。空间探索实验结果(图 2B、C、D)所示,皮质酮组穿台次数明显下降,与正常组比较,差异具有显著性($P < 0.05$)。同时,进入实台象限的次数和在实台象限的路程均明显减少,与正常组比较,差异具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.05$)。

2.3 皮质酮模型对突触素及 PSD95 蛋白表达影响

如图 3 所示,皮质酮组 PSD95、Syn-1 蛋白和 p-ERK 表达明显下降,与正常组比较,差异具有显著性($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3 讨论

慢性给予动物皮质酮,既模拟物理应激引起的 HPA 轴负反馈失调等病理过程,又避免了物理应激引起的适应性现象,是近年来研究应激所致神经精神障碍的常用模型。本研究将皮质酮溶于羟丙基-

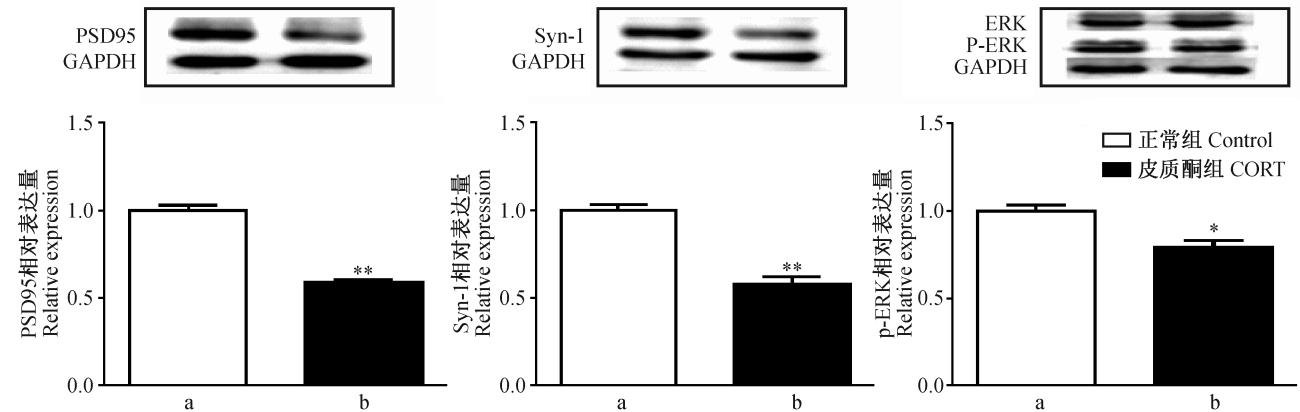


注:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组。

图 2 皮质酮模型对水迷宫实验的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. a. Control group;b. CORT group.

Fig. 2 Effect of corticosterone on the Morris water maze test of the mice



注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。a. 正常组;b. 模型组。

图 3 皮质酮模型对突触相关蛋白表达的影响 (mean $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常组比较)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. a. Control group;b. CORT group.

Fig. 3 Effect of corticosterone on the expression of synapse-related proteins. (mean $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group)

β -环糊精溶液,增加皮质酮的溶解度。通过饮入方式造模,与皮下注射方式比较,操作简单,同时避免了皮下注射导致局部皮肤溃烂等现象。与皮下注射可精确控制每只动物皮质酮用量不同,本研究基于动物饮水状况正常,皮质酮应用剂量为每日 35 $\mu\text{g}/$

mL,折合动物的摄入量约为每日 5 mg/kg。
社会识别实验分为适应、社交实验 (sociability test) 和社会新奇实验 (social novelty test) 三个阶段,主要用于动物社会记忆 (social memory) 的检测^[8]。该实验基于动物的社交能力,因此,动物适应实验环

境后,进行社交实验。正常动物可以区分空笼和刺激鼠笼(社会刺激, stranger 1),对刺激鼠笼探索更多。本研究结果表明,正常组和皮质酮组均可以区分空笼和刺激鼠笼,表现为对刺激鼠笼嗅闻时间更长,提示皮质酮并未损伤小鼠的社交能力。社会新奇实验阶段,将另外一只动物(stranger 2)放入空鼠笼。正常动物可以区分 stranger 1 和 stranger 2,而对新的刺激鼠(stranger 2)探索更多,提示动物具有完善的社会记忆功能。皮质酮是否损害动物的社会记忆功能,目前尚未见报道。本研究表明,正常组动物对 stranger 2 嗅闻时间更长,表现出完善的社会记忆功能,而皮质酮组对 stranger 1 和 stranger 2 的嗅闻时间没有明显差异,提示皮质酮可能损伤了动物的社会记忆功能。水迷宫实验主要用于考察动物海马依赖的空间学习记忆能力^[9]。本研究可视平台实验显示,正常组和皮质酮组寻台潜伏期和到达平台的路程无显著性差异(数据未公示),提示两组动物寻找平台动机相同。定位航行阶段,皮质酮组寻台潜伏期比正常组长,并在第四天时出现显著性差异,提示皮质酮损伤了动物的学习能力。空间探索实验结果显示,皮质酮组穿台次数明显降低,在实台象限的路程和进入实台象限的次数少于正常组,提示皮质酮损伤了动物的空间学习记忆能力,与文献报道结果一致^[4]。

突触是脑内神经信息传递的关键结构,与学习记忆等过程紧密相关^[10]。在应激条件下,皮质酮水平升高,可导致海马神经元突触形态结构发生变化,突触密度减少,树突棘和树突分支减少,从而导致学习记忆障碍^[11]。突触前和突触后的特异性蛋白如突触素、突触后致密物质(postsynaptic density, PSD-95)等的表达水平可反应突触的状态,已成为研究海马突触可塑性的标志性蛋白^[12]。本研究表明,皮质酮组突触素和 PSD-95 表达显著降低,提示在皮质酮的作用下,海马突触功能下降,可能是其学习记忆功能障碍的病理基础之一。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂素活化蛋白激酶家族的重要成员,调节海马突触可塑性,与学习记忆过程密切相关。本研究表明,皮质酮组磷酸化 ERK 水平显著降低,提示皮质酮所致学习记忆障碍可能与 ERK 信号转导通路活化受到抑

制,海马突触受损有关。

通过饮入方式,慢性给予皮质酮,动物表现为社会记忆和空间学习记忆障碍,其病理基础可能与 ERK 信号转导通路活化受到抑制,突触素和 PSD-95 表达水平降低,海马突触结构和功能受损有关。

参 考 文 献

- [1] 李亚,孔宏,宋倩,等. 慢性应激对大鼠空间学习记忆及海马和前脑皮层突触体膜流动性的影响[J]. 心理学报. 2010, 35(2): 235-240.
- [2] 马强,王福庄,赵彤,等. 皮质酮对大鼠海马脑片 ca1 区长时程增强效应的影响[J]. 中国应用生理学杂志. 2003, 19(1): 97-98.
- [3] Naert G, Ixart G, Maurice T, et al. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress[J]. Mol Cell Neurosci. 2011, 46(1): 55-66.
- [4] Darcet F, Mendez-David I, Tritschler L, et al. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression[J]. Front Behav Neurosci. 2014, 8(136): 1-13.
- [5] 陈伟恒,陶长路,时美玉,等. 突触可塑性与脑疾病的神经发育基础[J]. 生命科学. 2014, 26(6): 583-592.
- [6] Ter Horst J P, van der Mark M, Kentrop J, et al. Deletion of the forebrain mineralocorticoid receptor impairs social discrimination and decision-making in male, but not in female mice[J]. Front Behav Neurosci. 2014, 8(26): 1-11.
- [7] Cuadrado-Tejedor Mar, Ricobaraza A, Del Río J, et al. Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and Cdk5-dependent tau hyperphosphorylation[J]. Behav Brain Res. 2011, 220(2): 338-343.
- [8] Faizi M, Bader PL, Saw N, et al. Thy1-Happ(Lond/Swe+) mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function[J]. Brain Behav. 2012, 2(2): 142-154.
- [9] Bromley-Brits K, Deng Y, Song WH, et al. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer disease model mice[J]. J Vis Exp, 2011, (53): e2920.
- [10] 李莹超. 应激影响海马依赖的学习记忆的分子机制研究[D]. 中国科学技术大学, 2014.
- [11] 陈琳,杜力军,赵玉男. 糖皮质激素与海马结构可塑性[J]. 神经药理学. 2011, 1(2): 58-64.
- [12] 洪乐鹏,龙大宏,冷小龙. 痴呆模型鼠海马突触素改变及其与学习记忆的关系[J]. 广州医学院学报. 2003, 31(4): 43-46.

[收稿日期] 2015-10-15