

Arc 基因与幼龄鼠和成年鼠记忆能力关系的研究

叶保国¹, 李新白¹, 宋雪松¹, 韩伟¹, 朱庆三^{2*}

摘要 :目的 研究 Arc 基因与不同月龄大鼠记忆形成的关系,以探讨认知功能障碍的机制。方法 应用 Morris 水迷宫对 2 月龄幼龄鼠和 6 月龄成年鼠进行定位航行训练和空间探索能力检测以判断其记忆形成情况,用 RT-PCR 检测海马 Arc mRNA 的表达量。结果 幼龄鼠和成年鼠平均逃避潜伏期逐渐降低,第 3d 显著低于第 1d($P<0.05$),尤其是幼龄鼠,表明其学习、记忆能力强,但其平均逃避潜伏期仍高于成年鼠,虽无显著性,但记忆能力已接近成年鼠,只是不稳定。幼龄鼠的穿越次数少于成年鼠,在目标象限的停留时间也短于成年鼠,虽然差异不显著,但可说明其空间探索能力低,也进一步说明其记忆能力接近成年鼠。RT-PCR 结果显示定位航行训练组海马 Arc mRNA 的表达量明显高于对照组,且成年鼠高于幼龄鼠。结论 幼龄鼠瞬时记忆能力接近成年鼠,但形成稳定记忆的能力弱于成年鼠。Arc 基因在幼龄鼠和成年鼠静息状态时无明显差别,但行为训练后在成年鼠海马的表达量高于幼龄鼠。

关键词 :Arc 基因;定位航行训练;空间探索;记忆

中图分类号 :R-332 文献标识码 :A 文章编号 :1009-9727(2013)3-276-03

Correlation of Arc gene expression level with memory ability of young and adult rats. YE Bao-guo LI Xin-bai, SONG Xue-song et al. (Department of Anesthesiology, the First Hospital of Jilin University, Changchun130031, Jilin P. R. China; Corresponding author :ZHU Qing-san, drzqs@yahoo.com.cn)

Abstract :Objective To investigate the correlation of Arc gene expression level with the memory formation of different month-old rats. Methods Morris maze was applied to detect place navigation test and space exploration abilities of 2-month old young rats and 6-month old adult rats, to test the memory formation. Arc mRNA expression level in hippocampus was tested by RT-PCR. Results The average escape latency of young rats and adult rats gradually decreased in third day significantly lower than the first day ($P<0.05$), especially in young rats, showing that learning and memory abilities of young rats was fine, but their average escaping latency was still higher than adult rats and their memory ability was closed to adult rats but unstable. The times of young rats crossing the platform were fewer than adult rats, the duration in the target quadrant were shorter than adult rats, although the difference was not significant, showing that their space exploration abilities were lower than adult rats, further illustrating the memory ability was closed to adult rats. The results of RT-PCR showed Arc mRNA expression level in hippocampus of place navigation test groups was significantly higher than that of the control group. Conclusions The immediate memory of young rats is close to adult rats, but the formation of stable memory abilities is weaker than adult rats. Arc gene was no significant difference in the young rats and adult rats atb silent state, but after behavioral training, the expression level in the adult rats' hippocampus was higher than young rats.

Key words :Arc gene; Place navigation test; Space exploration M memory

学习是获得新知识或新机能的过程,记忆是将这种知识或技能编码、储存及读出的过程。记忆的形成和维护依靠快速和持续的突触修饰,使突触连续增强或减弱,从而储存大量的信息。研究报道,即刻早期基因(Immediate-early genes, IEGs)参与与学习记忆相关的突触可塑性的变化,研究较多的是 c-fos 和 Egr1 基因,而 Arc(激活调节细胞骨架相关蛋白^[1],也称为 Arg3.1,激活调节基因 3.1^[2])是记忆巩固所必需的^[3,4],在海马主要细胞和其他大脑区域被激活相关的特异性神经活动选择性诱导^[5]。Arc mRNA 被突触活动诱

导后,迅速转运至树突,在突触活动部位积累、翻译^[6]。无疑,年龄涉及到记忆功能的变化。因此本研究应用水迷宫实验对大鼠进行定位航行训练后,检测大脑海马 Arc 基因的表达,拟探讨 Arc 基因与幼龄鼠和成年鼠记忆形成的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物和水迷宫 雄性 SD 大鼠 2 个月龄 18 只,6 个月龄 18 只,SPF 级,由吉林大学实验动物中心提供。水迷宫为圆形水槽,直径 130cm,高 50cm,池水

作者单位 :1.吉林大学第一医院麻醉科,吉林 长春 130021; 2.吉林大学第一医院脊柱外科,吉林 长春 130021

作者简介 :叶保国(1979~),男,湖北武汉市,硕士,主治医师,研究方向:神经损伤与保护。

* 通讯作者 Email :drzqs@yahoo.com.cn

深32cm,加入黑色食用色素,测试过程中使水温保持在 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$,测试过程中室温保持在 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。房间光照恒定。在水槽壁上按方位等距离地、以不同形状的剪纸标记四个点S、N、E、W,并依此顺序作为放入鼠的位点。N和W点形成的区域内距离槽壁28cm处放置一平台,直径11cm高30cm,使其位于水面下2cm,并用3层白色纱布包裹缚牢,修剪整齐。在水槽正上方安置连接显示器的摄像头,同步记录大鼠的移动轨迹。

1.1.2 主要试剂 组织基因组提取试剂盒,北京博迈德生物技术有限公司;TaKaRa LA Taq Hot Start Version DL2,000 DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司;M-MLV反转录酶,Promega;TRIzol,Invitrogen公司。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 Morris水迷宫实验 取2月龄和6月龄大鼠各12只作为实验组,其余设为对照组,进行水迷宫训练。将鼠放到平台上适应10s,取下,将大鼠随机从不同象限面壁放入水中,观察其能否找到平台。若在水中转一圈仍找不到,则引导其找到,待鼠登上平台后10s。取下,重复上述过程一次。训练实验结束,4h后,进行定位航行实验。取受训过的鼠从规定的第一点面壁放入水中,计时鼠登上平台的时间,为逃避潜伏期。最长记录时间为90s,若大鼠在90s内不能登上平台,其逃避潜伏期记为90s。顺次从标记的4个点分别完成该过程,2次的时间间隔为15~20min。每次实验结束时将鼠放入保温箱内吹干,放回鼠笼。每天如此进行定位航行实验,共3d。定位航行实验结束第2d进行空间探索实验。拆除平台,将鼠平台实验的置入点放入面壁放入水中,记录大鼠穿过原平台位置的次数及大鼠在平台所在区域内的停留时间。大鼠若在90s内还未找到平台则记为90s。整理数据,分析评估大鼠的空间记忆能力。

1.2.2 RT-PCR检测大鼠海马Arc mRNA的表达 实验结束当天即处死大鼠,取海马,应用TRIzol提取组织RNA,反转录后用引物AF1: 5'-ACTGGGTGGAGT TCAAGAAG-3'和AR1: 5'-CAGGGTCTTGGAAGT GG-3'(扩增片段248bp)检测Arc mRNA的表达量。反转录反应体系:10×RT Buffer 1μl, dNTPs (各10mM)1μl, RNase Inhibitor (40U/μl)0.5μl, M-MLV 1μl, Random 9 mers (10pM)1μl, RNA 1μg, RNase Free dH2O补足至20μl。反应条件 37℃1h。PCR反

应体系:10×buffer 2.5μl, dNTPs 1.0μl, cDNA 1.0μl, 上、下游引物(10pM)各0.5μl, LA Taq Hot Start 0.2μl, ddH2O 补足25μl。反应条件:94℃预变性2min;94℃30s,58℃30s,72℃30s,共30个循环,72℃延伸5min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检验扩增产物。

2 结果

2.1 幼龄鼠和成年鼠定位航行训练平均逃避潜伏期分析 由表1可知随着定位航行训练天数的增加,幼龄鼠和成年鼠平均逃避潜伏期逐渐降低,第3d显著低于第1d,尤其是幼龄鼠,表明其学习、记忆能力强,但其平均逃避潜伏期仍高于成年鼠,虽差异不显著,但可表明其记忆能力已接近成年鼠,只是不稳定。

表1 幼龄鼠和成年鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期分析

Table 1 Results of Morris maze game for young and adult rats

组别 Group	第1d Day 1	第2d Day 2	第3d Day 3
幼龄鼠 Young rat	27.62 ± 11.96	21.46 ± 13.09	12.03 ± 3.53**
成年鼠 adult rat	24.53 ± 15.91	14.83 ± 12.42	10.04 ± 7.3*

注 vs 第1d, *P<0.05, **P<0.01 vs 第2d #P<0.05

2.2 幼龄鼠和成年鼠 Morris 水迷宫实验空间探索能力的比较分析 与成年鼠对比,幼龄鼠的穿越次数少于成年鼠,在目标象限的停留时间也短于成年鼠(表2),表明其空间探索能力低,但进一步说明其记忆能力接近成年鼠。

表2 幼龄鼠和成年鼠空间探索能力的分析

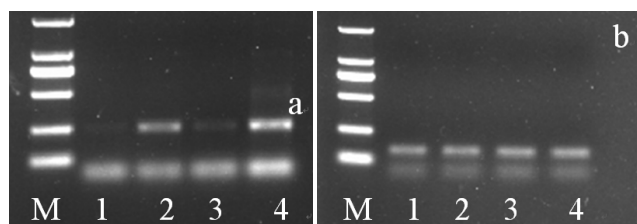
Table 2 Ability of young and adult rats walking on the rope in the air

组别 Group	穿越次数 Times past	目标象限停留时间 Stay the rope
幼龄鼠 Young rat	4.5 ± 1.72	32.14 ± 7.03
成年鼠 Adult rat	3.5 ± 2.28	30.61 ± 5.85

2.3 幼龄鼠和成年鼠定位航行试验后海马 Arc mRNA 表达量的分析 RT-PCR 结果显示,分析在静息状态时 Arc mRNA 在幼龄鼠和成年鼠海马的表达无明显差别;经定位航行训练后,其海马 Arc mRNA 的表达量明显高于对照组,且成年鼠高于幼龄鼠,如图1。表明 Arc 与大鼠空间认知相关。

3 讨论

大脑提取有关世界的信息,塑造个体的行为,最终影响个体。研究者认为记忆存储在哺乳动物中枢神经系统的能力和特异性取决于突触连接的可变性或可塑性。功能障碍的突触可塑性包括阿尔茨海默氏病、精神发育迟滞及进行性慢性疼痛等^[7-9]。即刻早期基因 Arc 以其多能的、精细的调谐系统,能够连接神经活动的变化模式和突触可塑性,从而优化神经系



(a) M DNA marker(DL2000) ;1 :幼龄鼠正常对照组 2 :幼龄鼠定位航行训练组 3 :成年鼠正常对照组 4 :成年鼠定位航行训练组。(b)看家基因。

(a) DNA marker (DL2000) ;1 Normal control of young rats 2 Place navigation training of young rats;3 Normal adult control rats;4. Place navigation training of adult rats (b) House-keeping gene

图 1 RT-PCR 检测幼龄鼠和成年鼠海马 Arc mRNA 的表达

Fig 1 Detecting the expression of Arc mRNA in hippocampus of young and adult rats by RT-PCR

统的信息存储。研究表明,Arc 的表达在老年鼠 CA1 区和齿状回减少,可能引起正常衰老的记忆功能下降^[10]。但 Arc 的表达与幼龄鼠和成年鼠记忆形成的关系未见报道,研究该问题可探讨认知功能障碍的机制。

研究发现大脑海马是帮助人类处理长期学习与记忆声光、味觉等事件(即叙述性记忆)的主要区域。大脑海马不仅制造记忆,也存储记忆。由于海马受损可导致记忆缺失症即会丧失记忆,又会使患者失去设想未来的能力^[11]。McIntyre C^[12]等将 Arc 拮抗剂 AOD 注射鼠海马,可阻断其 mRNA 或蛋白在高频刺激后的快速表达,破坏 LTP 的维持,不能巩固长期记忆。Arc mRNA 敲除鼠表现出记忆损伤,对长时间的空间、恐惧和味觉不能形成记忆。表明 Arc 调节 LTP 的后期阶段,对维持 LTP 具有重要作用。海马神经元激活后,Arc mRNA 在 30min 内可转运至树突,并在突触活动部位积累、翻译^[13]。在本研究中,随着定位航行训练天数的增加,幼龄鼠和成年鼠平均逃避潜伏期逐渐降低,第 3d 显著低于第 1d,尤其是幼龄鼠,表明其学习、记忆能力强,但其平均逃避潜伏期仍高于成年鼠,虽差异不显著,可表明其记忆能力已接近成年鼠,只是不稳定。与成年鼠对比,幼龄鼠的穿越次数少于成年鼠,在目标象限的停留时间也短于成年鼠,表明其空间探索能力低,但进一步说明其记忆能力接近成年鼠。在静息状态时 Arc mRNA 在幼龄鼠和成年鼠海马的表达无明显差别,经定位航行训练后,其海马 Arc mRNA 的表达量明显高于对照组,且成年鼠高于幼龄鼠,表明 Arc 与大鼠空间认知相关,且与年龄相

关。至于 Arc mRNA 在不同月龄大鼠记忆形成过程中表达量的差异有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE et al. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites[J]. *Neuron*, 1995, 14(2): 433-445.
- [2] Link W, Konietzko U, Kauselmann G et al. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(12): 5734-5738.
- [3] Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 3993-4001.
- [4] Plath N, Ohana O, Dammermann B et al. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories[J]. *Neuron*, 2006, 52(3): 437-444.
- [5] Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G et al. Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 89(3): 269-284.
- [6] Rodriguez JJ, Davies HA, Silva AT et al. Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(9): 2384-2396.
- [7] Bliss T, Collingridge G, Morris R. Synaptic plasticity in the hippocampus. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (eds). *The hippocampus book*[M]. Oxford University Press, 2007, pp 343-474.
- [8] Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms[J]. *Neuropsychopharmacol*, 2008, 33(1): 18-41.
- [9] Nelson SB, Turrigiano GG. Strength through diversity[J]. *Neuron*, 2008, 60(3): 477-482.
- [10] Penner MR, Roth TL, Chawla MK et al. Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus[J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(12): 2198-2210.
- [11] Hassabis D, Kumaran D, Yann SD et al. Patients with hippocampal amnesia cannot imagine new experiences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1726-1731.
- [12] McIntyre C, Miyashita T, Setlow B et al. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(30): 10718-10723.
- [13] Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA et al. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles[J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(12): 1120-1124.

收稿日期 2013-01-04 编辑 吴中菲