

昆明小鼠学习记忆能力的年龄效应及其与海马突触囊泡蛋白的相关性

王龙海^{①②} 陈贵海^{①*} 江伟^① 张琼^① 王超^①

(^① 安徽医科大学第一附属医院神经内科 合肥 230022; ^② 安徽中医学院解剖学教研室 合肥 230038)

摘要:为了探讨昆明小鼠 (*Mus musculus*) 年龄相关性空间学习记忆能力改变及其与海马突触前囊泡蛋白 1 (synaptotagmin 1, Syt I) 含量之间的关系。选取 3 个年龄段的昆明小鼠, ^①青年组:6 月龄 28 只; ^②中年组:11 月龄 22 只; ^③老年组:22 月龄, 17 只。利用六臂辐射状水迷宫 (RAWM) 任务检测其空间学习记忆能力; 制作组织微阵列, 采用免疫组化技术检测 Syt I 在海马中的表达; 采用方差分析方法对六臂辐射状水迷宫实验参数和 Syt I 的相对含量进行统计学分析, 使用 Spearman 秩相关检测二者之间的相关性。结果发现, 老年组昆明小鼠在学习期及记忆期的平均错误数及潜伏期均高于中年和青年鼠 ($P < 0.05$), 中年昆明小鼠与青年鼠之间的差异不显著 ($P > 0.05$); 老年组昆明小鼠在海马 CA3 区及齿状回 (dentate gyrus, DG 区) 中 Syt I 的相对含量显著高于中年鼠和青年鼠 ($P < 0.05$); 昆明小鼠海马 CA3、DG 区 Syt I 的相对含量与学习期和记忆期的错误数及潜伏期均成正相关 ($P < 0.05$)。由此推断, 昆明小鼠可出现年龄相关性空间学习记忆能力降低, 其海马 CA3 和 DG 的 Syt I 相对含量出现年龄相关性升高, 海马 Syt I 升高可能与昆明小鼠年龄相关性空间学习记忆能力减退有关。

关键词: 衰老; 小鼠; 学习和记忆; 海马突触囊泡蛋白; 组织微阵列

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)03-30-07

Correlation of Learning and Memory Capability with Age and the Syt I Amount in Hippocampus in Kunming Mice

WANG Long-Hai^{①②} CHEN Gui-Hai^{①*} JIANG Wei^① ZHANG Qiong^① WANG Chao^①

(^①Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

^②Department of Anatomy of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Abstract: In order to explore the correlation of spatial learning and memory functions with aging and Syt I level in hippocampus, three groups of Kunming mice (*Mus musculus*) at different ages (22 months, 11 months and 6 months, respectively) were used. The ability of spatial learning and memory was evaluated by six-arm radial water maze (RAWM), the expression of Syt I was detected by the immunohistochemistry method (S-P method), and the data of RAWM and Syt I relative content were analysed. It is showed that the average number of errors and latency during learning and memory phase was higher in the 22-month-old group than that in the middle-aged or young group ($P < 0.05$), and that there was no significant difference between the middle-aged mice and young mice ($P > 0.05$). Meantime, the relative Syt I amount in the DG and CA3 of

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30872730) 和安徽省高校省级自然科学研究重大项目 (No. ZD2008 007. 1);

* 通讯作者, E-mail: chenguihai1964@163.com;

第一作者介绍 王龙海, 男, 硕士研究生; 研究方向: 行为学与神经解剖学; E-mail: longhai89@126.com。

收稿日期: 2009-12-10, 修回日期: 2010-03-01

hippocampus in the 22-month-old mice was significantly higher than that in the middle-aged or young mice ($P < 0.05$). The positive correlation was confirmed between the relative level of Syt I in the DG and CA3 of hippocampus and the number of errors and latency during learning and memory phase ($P < 0.05$). Therefore, the results indicate that age-related impairment of spatial learning and memory exists, and the amount of Syt I in hippocampus significantly increases with aging in Kunming mice, and that the amount of Syt I in hippocampus may be involved in the age-related spatial cognitive impairment.

Key words: Aging; Mouse; Learning and memory; Synaptotagmin I; Tissue microarray

年龄相关性学习和记忆能力减退是哺乳动物中普遍存在的现象,且通常伴随海马机能减退。但是,衰老期间海马神经元的形态学变化在不同种属间很不一致。通常,老年人海马神经元缺失、容积减小^[1],而小鼠、大鼠以及猴的海马齿状回(dentate gyrus, DG区)颗粒细胞及CA3、CA1亚区锥体细胞却呈现相对稳定性^[2]。这种不一致性使海马及其亚区回路结构的完整性受到关注,特别是影响突触联系的参数,如突触蛋白。synaptotagmin(Syt) I即为突触前囊泡蛋白,有研究表明,其与学习和记忆能力减退有关,如阿尔茨海默病患者脑内 Syt I明显降低等^[3-4],但对正常衰老动物脑内 Syt I水平是否改变的认识目前尚未统一:免疫印迹未发现大鼠整个海马的 Syt I含量随年龄增加而改变^[5];但在 SAMP8 小鼠背侧海马 Syt I的含量却随年龄增加而呈环路特异性升高,且与空间学习记忆功能相关^[6],由此,我们假设 Syt I的含量在海马内的表达改变可能局限于海马某些亚区,并与学习记忆减退有关。为此,以老年、中年和青年昆明鼠为研究对象,以行为学实验检测不同年龄昆明小鼠的空间学习记忆能力;制作组织微阵列,用免疫组织化学方法检测昆明小鼠海马 DG 和 CA3 区的 Syt I 含量,并探讨空间学习记忆能力与海马 DG 和 CA3 区 Syt I 含量的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 昆明小鼠购自安徽省医学实验动物中心(普通级),常规条件下喂养。小鼠分为 3 个年龄组 ①青年组:6 月龄,28 只;②中年组:11 月龄,22 只;③老年组:22 月龄,17 只。

在实验开始前对小鼠进行筛选,有运动障碍、白内障、脱毛及体表可见明显肿块的小鼠被排除。实验开始前 4 周,将小鼠饲养于检测室里,每天接触一次(拎尾、抚摸)。整个实验期间,动物可得到足够的食物和水。喂养环境的明暗周期为 12 h(07:00 时开灯,19:00 时关灯),室温(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度 $55\% \pm 5\%$ 。行为学实验在 08:00 ~ 15:00 时完成。

1.2 主要实验仪器装置及试剂 六臂辐射状水迷宫根据文献制作^[7-8];组织芯片点样仪及配套点样针(直径 1.0 mm);组织芯片制作平台;切片机(德国 Leica 公司, RM2235 型);光学显微镜(日本, Nikon);抗 Syt I 蛋白多克隆抗体(美国 Sigma 公司);生物素标记羊抗兔 IgG S-P 超敏试剂盒(SP-9001, 美国 ZYMED 公司)。

1.3 脑标本制备 在完成行为学测试后 15 d 将小鼠引颈脱臼处死,冰上迅速分离脑,置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定,修块,常规石蜡包埋,二次包埋制作组织芯片,连续冠状切片,片厚 4 μm 。

1.4 六臂辐射状水迷宫测试 实验程序:每天进行 4 次连续的记忆获得测试(学习期)和 1 次记忆保留测试(记忆期)。整个实验期间,逃避平台的位置固定不变。在第 1 天实验开始前,小鼠先在平台上停留 30 s。在每天的学习期中,小鼠按当天的抽签顺序从 4 个泳道入水(平台所在泳道及其对面泳道除外,以避免固有的方向性偏倚)。入水后小鼠可在 60 s 内寻找平台。如果在 10 s 内进入错误的泳道或未选择任何泳道,即被拽回起始泳道并记录一次错误。各测试间隔 30 s,小鼠停留于逃生平台上。第 4 次测试结束后,擦干小鼠,返回饲养笼。

中,并置于 150 W 的白炽灯下烘干皮毛 30 min 后完成记忆测试,入水顺序与最后一次学习测试相同。记录每次测试的错误数和发现平台的潜伏期。

1.5 免疫组织化学染色 采用超敏 S-P 法进行免疫组化检测。光学显微镜拍摄海马 CA3 和 DG 区图像,以 TIFF 格式保存图像,用图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 对 CA3 和 DG 区 Syt I 的免疫反应产物进行光密度值分析、量化。由于分析框选取区域的大小不同,故以平均光密度值 (average optical, AO) 作为分析指标。并以此平均光密度值作为 Syt I 的相对含量指标。

1.6 统计学处理 实验资料采用平均值 ± 标

准差表示。用单因素方差分析检测 Syt I 相对含量的年龄效应,六臂辐射状水迷宫实验结果采用重复测定方差分析进行不同年龄组间差异检验。将不同年龄组小鼠作为一个总体,使用 Spearman 秩相关检测六臂辐射状水迷宫实验数据与海马 Syt I 相对含量之间的相关性。显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。所有分析由 SPSS 13.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 六臂辐射状水迷宫

2.1.1 昆明小鼠学习期 错误数随天数的增加而下降 [$F_{(9, 576)} = 42.605, P < 0.01$; 图 1A],重复测量方差分析显示:22 月龄鼠错误数

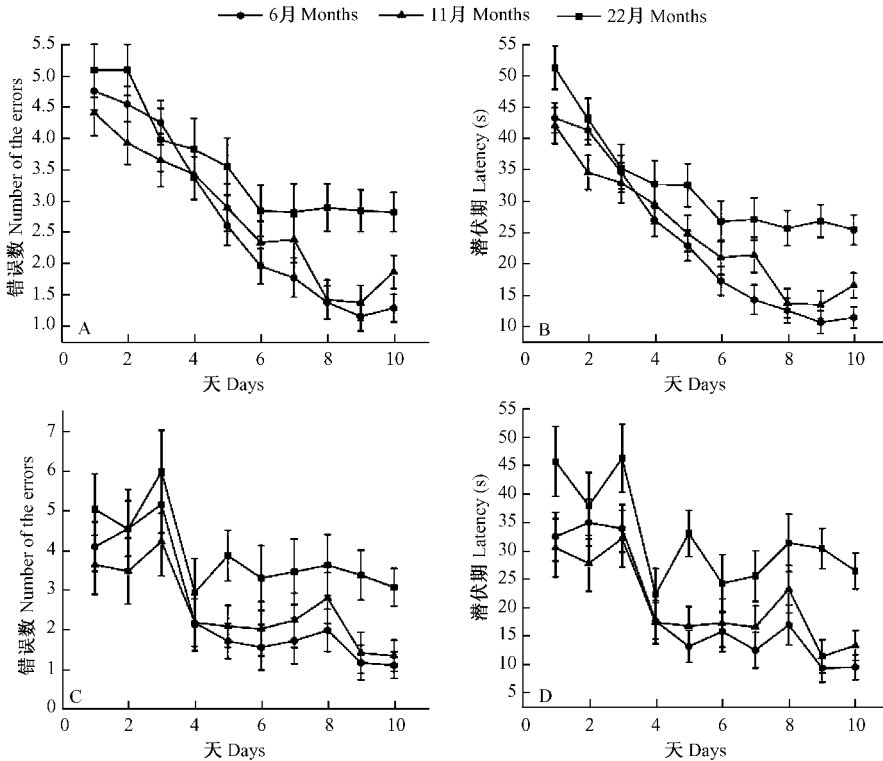


图 1 昆明鼠在六臂辐射状水迷宫任务中的空间学习记忆能力评估曲线

Fig. 1 Curve of spatial learning and memory ability assessed by radial six-arm water maze task in Kunming mice

(A) 和 (B) 分别代表不同年龄的小鼠在学习期 (实验 1~4) 的错误数和潜伏期;

(C) 和 (D) 分别代表不同年龄的小鼠在记忆期 (实验 5) 的错误数和潜伏期。

(A) number of the errors and (B) latency for different-age mice during the learning phase (trials 1-4); and (C) number of the errors and (D) latency for different-age mice during the memory phase (trial 5).

多于 6 月龄 [$F_{(1,43)} = 13.443, P < 0.01$] 和 11 月龄鼠 [$F_{(1,37)} = 10.047, P < 0.01$], 11 月龄鼠与 6 月龄鼠之间的差异无统计学意义 [$F_{(1,48)} = 0.025, P > 0.05$]; 就小鼠学习期的潜伏期而言, 也随天数的增加而缩短 [$F_{(9,576)} = 62.110, P < 0.01$]; 图 1B] 22 月龄鼠潜伏期长于 6 月龄鼠 [$F_{(1,43)} = 20.510, P < 0.01$] 和 11 月龄鼠 [$F_{(1,37)} = 11.077, P < 0.01$], 11 月龄鼠与 6 月龄鼠潜伏期之间的差异无统计学意义 [$F_{(1,48)} = 0.282, P > 0.05$]。

2.1.2 昆明小鼠记忆期 错误数随天数的增加而下降 [$F_{(9,576)} = 9.899, P < 0.01$]; 图 1C], 重复测量方差分析显示: 22 月龄鼠错误数多于 6 月龄 [$F_{(1,43)} = 11.929, P < 0.01$] 和 11 月龄鼠 [$F_{(1,37)} = 17.134, P < 0.01$], 11 月龄鼠与 6 月龄鼠之间的差异无统计学意义 [$F_{(1,48)} = 0.005, P > 0.05$]; 就记忆期潜伏期而言, 也随天数的增加而缩短 [$F_{(9,576)} = 14.985, P < 0.01$]; 图 1D] 22 月龄鼠潜伏期长于 6 月龄鼠 [$F_{(1,43)} = 27.415, P < 0.01$] 和 11 月龄鼠 [$F_{(1,37)} = 28.299, P < 0.01$], 11 月龄鼠与 6 月龄鼠之间的差异无统计学意义 [$F_{(1,48)} = 0.117, P > 0.05$]。

2.2 海马 Syt I 的表达 光镜下观察海马区结构(图 2), 可见 Syt I 在不同年龄组小鼠海马的 DG 区颗粒细胞和 CA3 区锥体细胞中均有表达, 老年组小鼠 DG 及 CA3 区 Syt I 较青年组和中年组小鼠呈高表达。量化分析, 即以图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 对 DG 和 CA3 区 Syt I 的免疫反应产物进行平均光密度值分析, 结果为: ① 22 月龄昆明小鼠在海马 DG 和 CA3 区 Syt I 的相对含量显著高于 6 月龄鼠组 (P 分别为 0.009 0 和 0.043 32) 及 11 月龄鼠 (P 分别为 0.014 2 和 0.029 22)。② 11 月龄鼠与 6 月龄鼠之间各脑区 Syt I 相对含量的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 空间学习记忆能力与海马 Syt I 的关系

由于在六臂辐射状水迷宫程序开始的几天内, 小鼠对实验环境还不能很好地适应, 出现成绩不稳定, 因此, 我们选取小鼠实验成绩稳定开始出现的实验天数(第 6 天)直至实验结束, 以这些天实验的平均成绩与海马 DG 和 CA3 区 Syt I 蛋白作相关性分析。从表 1 看出, 昆明小鼠海马 DG 和 CA3 区 Syt I 的相对含量与学习期的错误数、潜伏期和记忆期的错误数、潜伏期成正相关 ($P < 0.05$), 相关系数 r 见表 1。

表 1 昆明小鼠空间学习记忆功能与海马不同亚区 Syt I 的相关性

Table 1 The correlation between spatial learning and memory function and Syt I level in different subregion of hippocampus

		学习期 Learning period(6 ~ 10 d)				记忆期 Memory period(6 ~ 10 d)			
		错误数 Number of errors		潜伏期 Latency		错误数 Number of errors		潜伏期 Latency	
		r	P	r	P	r	P	r	P
Syt I 水平	CG	0.334	0.046	0.352	0.039	0.407	0.010	0.426	0.006
Syt I level	CA3	0.382	0.031	0.360	0.038	0.384	0.022	0.415	0.009

3 讨论

Syt I 是影响学习与记忆的突触前囊泡蛋白。Syt I 作为神经元突触囊泡膜表面含量最丰富的钙敏感性蛋白, 是一种含有两个结合 Ca^{2+} 的 C2 结构域的突触囊泡整合膜蛋白, 介导快速同步神经递质释放, 参与调节突触囊泡循环的锚定、融合和再利用^[9], Hui 等利用小囊

泡不同曲率进一步证实了 Syt I 通过介导膜弯曲度是膜融合过程中的关键步骤^[10]。小鼠、果蝇属和新线杆小虫属的遗传学研究及乌贼巨大突触的微注射研究都显示 Syt I 在快速 Ca^{2+} 触发的突触囊泡胞吐过程中发挥重要作用^[11-12]。因此, 突触囊泡蛋白 Syt I 被认为可能是调控快速突触传递过程重要的 Ca^{2+} 感受器, 是影响海马特异环路突触联系的候选蛋白之一。

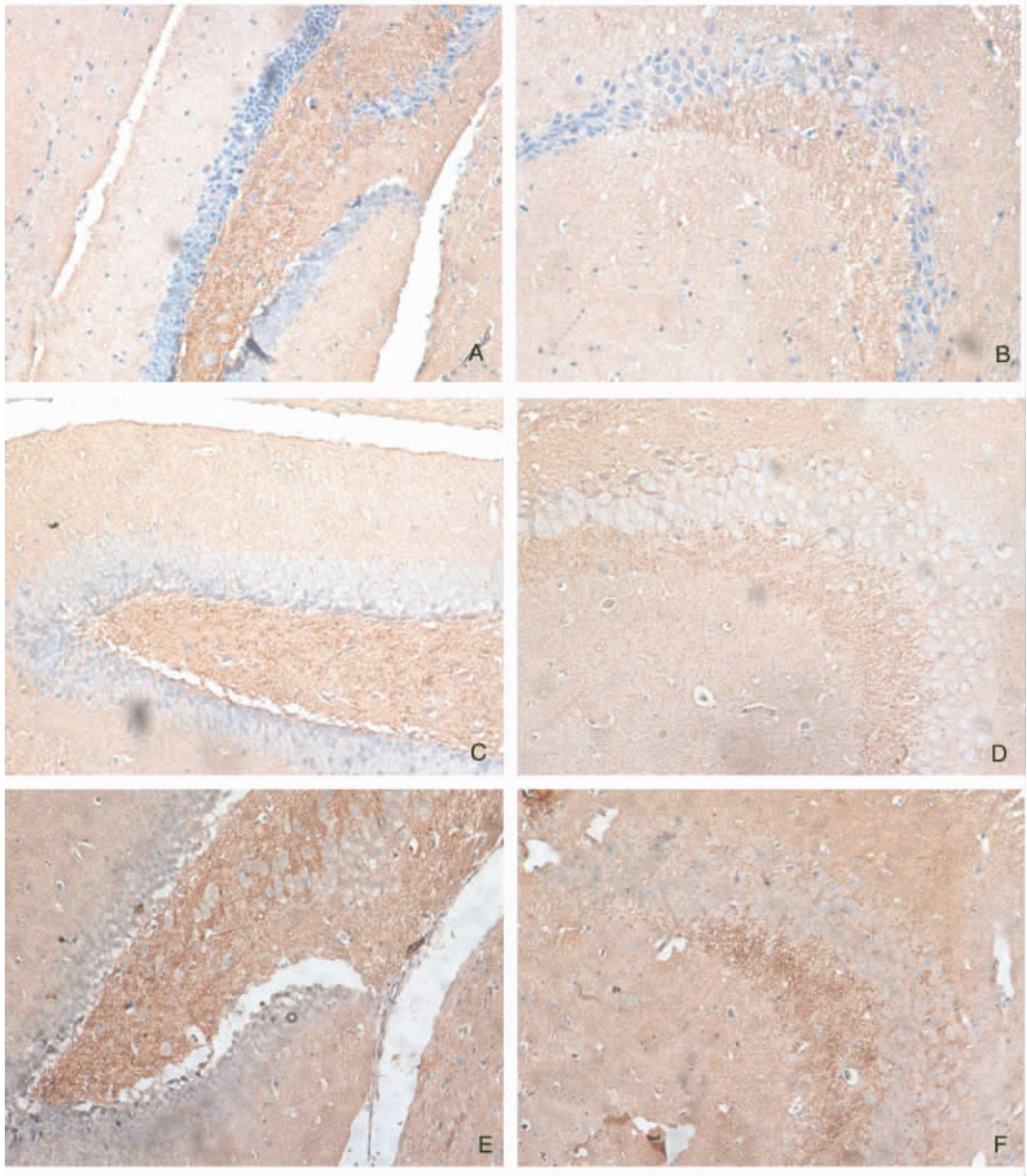


图2 Syt I 在不同年龄小鼠海马 DG 和 CA3 区的免疫组化表达 (×200)

Fig.2 The immunohistochemical staining of Syt I in the DG and CA3 of hippocampus in mice at different ages

A、B:6 月龄小鼠 DG 和 CA3 区的 Syt I 表达; C、D:11 月龄小鼠 DG 和 CA3 区的 Syt I 表达; E、F:22 月龄小鼠 DG 和 CA3 区的 Syt I 表达。

A and B: Syt I in the DG and CA3 for 6-month-old mice; C and D: Syt I in the DG and CA3 for 11-month-old mice; E and F: Syt I in the DG and CA3 for 22-month-old mice.

本实验发现老年昆明小鼠海马 DG、CA3 区 Syt I 的相对含量均可出现年龄相关性显著升高。究其原因,可能与小鼠海马神经元内

Ca²⁺ 水平升高有关,也可能与轴突运输,特别是轴突的逆向运输减弱有关^[13-14],还可能对某种病理刺激的反应或 Syts 某些亚型表达的减

少,而呈代偿性增加^[13,15];另外,有研究发现 Syt 的寡聚化作用可加速神经递质的释放,而干扰 Ca^{2+} 触发的 C2B 区构象改变,会引起 Ca^{2+} 触发的 Syt 寡聚作用减弱,导致锚定后的囊泡融合功能障碍,从而抑制胞吐过程^[15-16],使 Syt I 的相对含量升高。

本实验发现昆明小鼠海马 DG 和 CA3 区 Syt I 的相对含量与学习期的错误数和潜伏期,以及记忆期的错误数和潜伏期存在正相关关系,但相关性并不高,可能因为小鼠个体间衰老的进程差异较大,而本实验的样本量较小,存在抽样误差;也可能因为六臂放射状水迷宫实验的局限性;也可能因为本实验所采用的小鼠海马 DG 和 CA3 区 Syt I 的平均相对含量参数,掩盖了更细小亚区的较大分布差异。这些有待于进一步证实。

组织微阵列又称组织芯片,是继基因芯片、蛋白芯片之后出现的又一种重要的生物芯片技术。这一技术由美国国立癌症研究院的 Kenonen 等人^[17]于 1998 年在 Nature Medicine 上首次报道。应用该技术,可以在一张组织切片上同时对数十个乃至成百上千个样本进行免疫组化、原位杂交等组织原位的分子生物学研究。组织微阵列技术,不仅具有高通量节约时间、实验条件均一化、节省试剂等优点,而且有利于实验的标准化和实现结果分析的自动化。

本实验采用放射状水迷宫检测小鼠空间学习记忆功能,具有较高的灵敏度。人类,早在 40~50 岁即可出现多种形式的记忆功能障碍。利用动物模型来研究记忆衰老时,必须确定动物出现空间认知功能损害发生的起始年龄,但是不同种属乃至不同品系的动物间差异很大。早期的研究发现 NMRI 雌鼠和 C57BL/6 雄鼠出现学习记忆损害的始发年龄早至 9~11 月^[18]。本实验结果表明,11 月龄昆明小鼠与青年鼠相比并未出现空间学习记忆损害,最近有研究指出 12.5 月龄昆明小鼠可出现空间学习记忆损害,且这种损害只在六臂放射状水迷宫才能体现, Morris 水迷宫任务不足以检测出^[19],可见 12.5 月龄很可能是昆明小鼠发生

空间认知功能损害的起始年龄。

总之,昆明小鼠可出现年龄相关性空间学习记忆功能减退;昆明小鼠海马 DG 和 CA3 区 Syt I 的相对含量均可出现年龄相关性显著升高;昆明小鼠年龄相关性空间学习记忆功能损害可能与海马 Syt I 含量升高有关。

参 考 文 献

- [1] Schuff N, Amend D L, Knowlton R, et al. Age-related metabolite changes and volume loss in the hippocampus by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Neurobiol Aging*, 1999, 20: 279-285.
- [2] Small S A, Chawla M K, Buonocore M, et al. Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *PNAS*, 2004, 101:7181-7186.
- [3] Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 2001, 56:127-129.
- [4] Sze C I, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters B K, et al. Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains. *Neurol Sci*, 2000, 175:81-90.
- [5] Nicolle M M, Gallagher M, McKinney M. No loss of synaptic proteins in the hippocampus of aged, behaviorally impaired rats. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(3): 343-348.
- [6] Chen G H, Wang Y J, Qin S, et al. Age-related spatial cognitive impairment is correlated with increase of synaptophysin 1 in dorsal hippocampus in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(4): 611-618.
- [7] Arendash G W, King D L, Gordon M N, et al. Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res*, 2001, 891:42-53.
- [8] Andrade C, Alwarshetty M, Sudha S, et al. Effect of innate direction bias on T-maze learning in rats: implications for research. *Neuro Sci*, 2001, 110:31-35.
- [9] Gregory D, Linda V, Harvey R, et al. Biochemistry, genetics, behavior, and possible links to human psychiatric disease. *Molecular Neurobiology*, 2001, 23(2/3):173-185.
- [10] Hui E, Johnson C P, Yao J, et al. Synaptotagmin-mediated bending of the target membrane is a critical step

- in Ca^{2+} -regulated fusion. *Cell*, 2009, 138 (4): 709 – 721.
- [11] Li L, Chin L S. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60: 942 – 960.
- [12] Adolfsen B, Littleton J T. Genetic and molecular analysis of the synaptophysin family CMLS. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58:393 – 402.
- [13] Tucker W C, Chapman E R. Role of synaptotagmin in Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Biochem*, 2002, 366:1 – 13.
- [14] Südhof T C. Synaptotagmins: Why So Many? *Biol Chem*, 2002, 277(10):7629 – 7632.
- [15] Littleton J T, Bai J H, Vyas B, et al. synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B Domain in Ca^{2+} -triggered fusion and recycling of synaptic vesicles *in vivo*. *Neurosci*, 2001, 21:1421 – 1433.
- [16] Wu Y, He Y, Bai J, et al. Visualization of synaptotagmin I oligomers assembled onto lipid monolayers. *PNAS*, 2003, 100: 2082 – 2087.
- [17] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughout molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, 4:844 – 847.
- [18] Gower A J, Lamberty Y. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behav Brain Res*, 1993, 57:163 – 173.
- [19] 黄兴圣, 陈贵海. 昆明小鼠早期空间认知功能损害具有任务特异性. *安徽农业大学学报*, 2008, 35(1):17 – 20.