

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.002

α - 突触核蛋白对小鼠空间学习记忆能力的影响 *

侍相君¹ 王振福^{1Δ} 陈 月² 王 洁¹ 陆轩跃³

(1 解放军总医院南楼临床部神经内科 北京 100853; 2 北京大学人民医院药剂科 北京 100044;

3 解放军 95961 部队航医室 北京 100195)

摘要 目的:观察 α - 突触核蛋白(α -Synuclein, α -Syn)对小鼠空间学习记忆能力的影响。方法:以 C57/B6 野生型小鼠(Wild Type, WT)及 α -Syn 过表达转基因小鼠(Tg- α -Syn)为研究对象,采用 Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)中定位航行实验、空间探索实验以及可视平台实验,按照训练要求,记录两组小鼠游泳路径和完成任务的时间。结果:在定位航行试验中,随着训练时间的增加,两组小鼠的寻台潜伏期均缩短。同时,在训练第五天时,与 WT 组小鼠相比,Tg- α -Syn 小鼠的寻台潜伏期明显延长(58.77 ± 1.32 versus 17.34 ± 6.44 , $*P < 0.05$)。在空间探索实验中,与 WT 组小鼠相比,Tg- α -Syn 小鼠在目标象限停留时间更短(17.91 ± 2.14 versus 5.59 ± 4.98 , $*P < 0.05$)。为了进一步证明 Tg- α -Syn 小鼠的空间记忆与学习能力下降是与海马相关,采用了可视平台实验,结果显示:两组小鼠的寻台潜伏期无显著性差异($P > 0.05$),即 Tg- α -Syn 小鼠不存在运动障碍和视觉障碍。结论: α -Syn 过表达可导致海马相关的空间记忆、学习能力受损。

关键词: α - 突触核蛋白;海马;水迷宫;空间记忆学习

中图分类号: R-33; Q593.2; R741.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)15-2805-03

Effect of α -Synuclein on the Spatial Memory and Learning of Mice*

SHI Xiang-jun¹, WANG Zhen-fu^{1Δ}, CHEN Yue², WANG Jie¹, LU Xuan-yue³

(1 Department of Neurology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100853, China; 2 Department of Pharmacy, People's Hospital, Peking University, Beijing, 100044, China; 3 Aviation Medical Room, 95961 forces of Chinese PLA, Beijing, 100195, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of α -Synuclein on the spatial learning and memory of mice. **Methods:** The transgenic mice over-expressed α -Syn were used as models to observe the swimming path and the time to complete the task in the Morris water maze which included the navigation test, spatial probe test and visual platform experiment. **Results:** In the navigation test, the time to search for the two groups of mice was shortened with the training time prolonged. Compared with the wild type mice, the escaped latency of transgenic mice over-expressed α -Syn was prolonged in the navigation test (58.77 ± 1.32 versus 17.34 ± 6.44 , $*P < 0.05$) and the target quadrant shortened (17.91 ± 2.14 versus 5.59 ± 4.98 , $*P < 0.05$). Meanwhile, in order to further prove that the spatial memory and learning ability of Tg- α -Syn mice are related to hippocampus. There was no significant difference between the two groups of mice in the search latency of visual platform experiments ($P > 0.05$). **Conclusion:** The over-expression of α -Syn could impair the spatial memory and learning depended hippocampus.

Key words: α -Synuclein; Hippocampus; Morris water maze; Spatial memory and learning

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; R741.02 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2805-03

前言

在帕金森病(Parkinson's disease, PD)、路易体痴呆(Dementia with lewy body, DLB)等神经变性疾病患者常出现学习、记忆能力减退,尸体解剖发现这些患者的海马组织中有大量聚集的 α -Syn^[1-3]。 α -Syn 是一种在神经组织中丰富表达的小分子蛋白,主要存在于神经元的突触前神经末梢。虽然 PD 和 DLB 临床症状各有不同,然而这些疾病均表现出与海马相关的记忆功能的异常和认知功能障碍。这些疾病均存在海马脑区 α -Syn 表达

的异常增高。同时,研究已证实^[9] α -Syn 可引起海马神经元细胞膜表面 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体内在化,并抑制其介导的钙内流和跨膜电流,而海马部位的 NMDA 受体在海马相关的空间学习、记忆过程中起重要作用。但目前尚无研究报告 α -Syn 含量变化对动物行为的影响。本实验将通过研究 α -Syn 过表达转基因小鼠(Tg- α -Syn)观察 α -Syn 对海马相关的学习、记忆功能的影响。

1 材料与方法

* 基金项目:国家重点研究发展计划项目(2016YFC1306600);北京市科技计划项目(Z151100004015206)

作者简介:侍相君(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:帕金森病及相关运动障碍,E-mail: 119435581@qq.com

Δ 通讯作者:王振福(1964-),男,硕士生导师,教授,主要研究方向:帕金森病及相关运动障碍,

E-mail: zhenfuw@sina.com,电话:13661326693

(收稿日期:2016-11-30 接受日期:2016-12-22)

1.1 材料

野生型 C57/B6 雄性小鼠,共 10 只,体质量 18-22 g,由中国军事医学科学院动物中心提供(实验动物许可证号:SCXK-2014-004), α -Syn 过表达转基因 C57/B6 雄性小鼠,共 10 只,体质量 18-22 g,由中国医学科学院动物中心提供(实验动物许可证号:SYXK;2014-0039)。全脂奶粉(Sigma-Aldrich 公司,美国)。ZH-3000 型迷宫圆形水池(张家港市青松生物医学仪器有限公司,中国)。Morris 视频分析系统(张家港市青松生物医学仪器有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 定位航行试验 啮齿类动物如小鼠首次游泳时,很难发现藏于水面下的不可见的站台。如果小鼠在入水游泳 60 至 90 秒之内仍然未能找到水池中的站台或者未能爬上站台时,实验人员可将小鼠引导置于站台上站立 10 至 30 秒,使小鼠体会到站在站台上的感觉,这样从第二次开始,小鼠的学习成绩就能迅速提高。小鼠爬上站台后,让其在站台上站立 5 至 10 秒。然后将小鼠从站台上拿下来,休息 30 至 60 秒之后再进行一次训练。一般情况下,正常的小鼠在经过 3 至 5 日的训练后,很快就能学会以最快最佳的轨迹搜索到站台的准确位置。试验共历时 5 天,每天于固定时间训练,共计 4 次。训练开始时,将平台放置于第二象限,从四个起始点的任意一点将小鼠面向池壁放入水池之中。自由录像记录系统全程记录小鼠找到平台的时间以及游泳路径,4 次训练是指将小鼠分别从四个不同的起始点(不同象限)放入水池之中。小鼠找到平台后或者 60 秒内找不到平台(潜伏期则记为 60 秒),则由试验者将其引导至平台,在平台上休息 10 秒,然后进行下一次试验。每日以小鼠 4 次训练潜伏期的平均值做为这只小鼠当日的学习成绩。有时小鼠有可能会在 10 至 30 秒间隔时间到达前从站台上掉下或跳入池水中继续游泳。一旦这种情况发生,则需要将小鼠重新放回站台,并重新开始计时,使小鼠在站台上站立时间间隔到达 10 至 30 秒。这样可以确保每只小鼠在每次试验之后有基本相同的时间来观察和获取空间信息。

1.2.2 将动物移开并擦干 统一将动物放在 120 瓦的白炽灯下晒 5 分钟,放回小鼠笼内。每只小鼠每天训练 4 次,2 次训练

之间间隔为 15 至 20 分钟,连续训练时间为 5 天。

1.2.3 空间探索试验 在定位航行试验结束 24 小时之后,撤除站台。然后任选一个相同入水点将小鼠放入水池中,记录小鼠在 60 秒内的游泳路径,记录小鼠在目标象限(Target quadrant TQ)的停留时间,观察受试小鼠的空间定位能力以及其在空间探索过程中的变化规律。

1.2.4 可视平台试验 将平台完全露出水面以使小鼠能够看见平台。小鼠放入泳池后如毫无困难地直接游向平台,说明小鼠的游泳能力和视觉能力均正常。小鼠在完成空间探索试验 4 天后在同一个水池里进行可视平台实验(平台高出水面 1.5 厘米)。动物在一天内完成 6 次训练,每次训练时随机摆放平台的位置,记录动物找到平台的时间。每只动物有 90 秒的时间寻找平台,找到平台后在台上停留 15 秒。每次实验间隔 5 至 8 分钟。

注意事项:试验用肉眼观察,试验者始终坐在同一位置,距离水池最近边缘约 50 厘米,每天坚持在固定时间测试,试验过程中,动作要轻柔,尽量避免不必要的应激刺激;游泳对小鼠来说是一个较大的应激刺激,将会引起小鼠的神经内分泌变化,这些变化可能对试验结果造成干扰;必要时可将小鼠多次放入池中或适当延长其游泳时间以增加小鼠对游泳的适应能力;用奶粉去搅浑泳池的水,但一定要定期换水来避免水腐败变质。

1.3 数据统计学分析

数据均以均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,组间比较用独立样本的 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

为了观察过表达 Tg- α -Syn 小鼠的空间学习与记忆能力的变化,我们应用了 Morris 水迷宫实验。如图 1 所示,实验结果显示:在定位航行试验中,随着训练时间的增加,两组小鼠的寻台潜伏期均缩短。同时,在训练第五天时,与 WT 组小鼠相比,Tg- α -Syn 小鼠的寻台潜伏期明显延长(58.77 ± 1.32 versus 17.34 ± 6.44 , $*P<0.05$)。在空间探索实验中,与 WT 组小鼠相比,Tg- α -Syn 小鼠在目标象限停留时间更短(17.91 ± 2.14 versus 5.59 ± 4.98 , $*P<0.05$)。

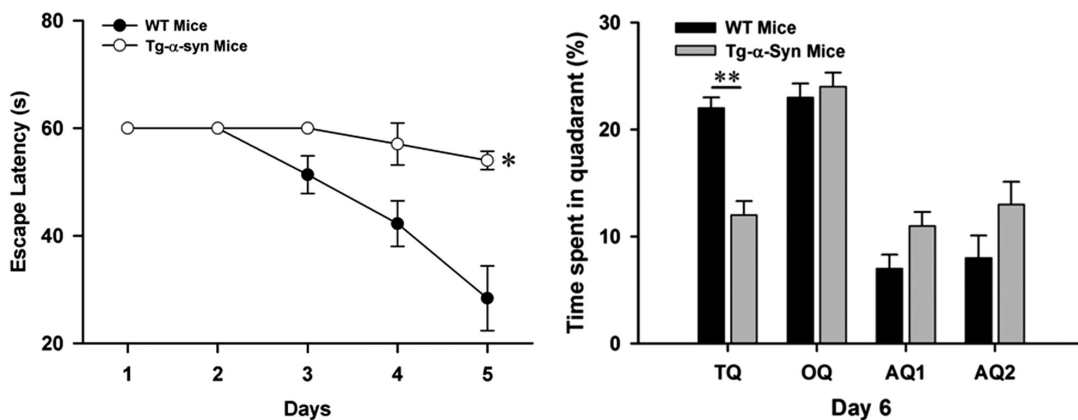


图 1 Tg- α -Syn 小鼠及 WT 小鼠定位航行和空间探索实验测试结果。定位航行实验中,小鼠连续训练 5 天,分别记录两组小鼠的寻台潜伏期。第 6 天时撤去浮台,记录空间探索实验中两组小鼠在不同象限停留时间。数据以均数 $\pm$ 标准误表示。TQ:目标象限;OQ:对对象限;AQ:临近象限。

Fig. 1 The results of Tg- α -Syn and WT mice group in probe trials and hidden platform test. The escape latency of MWM tests during the whole training trial sessions. Mice were trained for five consecutive days. The time spent in quadrant of MWM analysis during the probe trial session (last test trial). Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=10 in each group. $**P<0.01$, $*P<0.05$, versus WT group). TQ: Target quadrant; OQ: Opposite quadrant; AQ: Adjacent quadrant.

为了进一步证明 Tg- α -Syn 小鼠的空间记忆与学习能力下降是与海马相关,我们采用了可视平台实验。结果显示:两组小鼠的寻台潜伏期无显著性差异,即 Tg- α -Syn 小鼠不存在运动障碍和视觉障碍。因此,Tg- α -Syn 小鼠海马相关的空间记忆、学习能力受损。

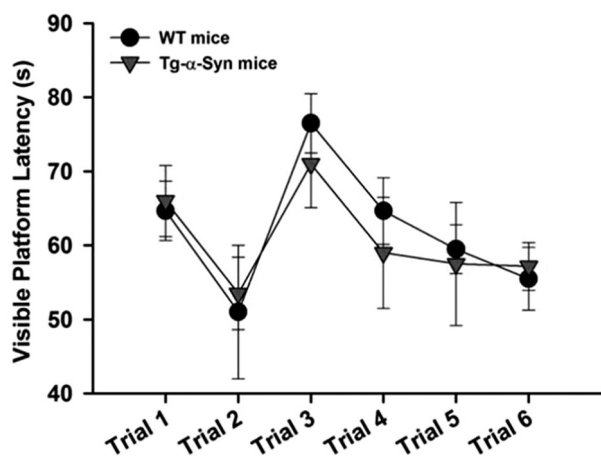


图2 Tg- α -Syn 小鼠及 WT 小鼠可视平台实验结果。可视平台实验是用来进一步验证小鼠的空间记忆与学习能力是否与除了海马以外的其他脑区相关。分别记录两组小鼠的寻台潜伏期。

Fig. 2 The results of the visible platform task. Visible platform test was used to further verify that spatial memory and learning disability is related to the other regions beyond hippocampus, the latency of reaching the platform of each group was recorded. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

3 讨论

水迷宫实验于 1981 年由英国心理学家 Richard G Morris 设计,目前已在国内外得到普遍认可,成为评价空间记忆、学习能力最常用有效的工具,尤其是评价海马功能^[4,5]。如发现定位航行能力和空间探索能力受损而可视平台实验结果正常,则作为海马相关空间记忆学习功能失调的有力证据^[6-8]。值得一提的是在运用水迷宫实验过程中,由于游泳是对小鼠体力要求很高的运动,所以尽量选择年富力强的鼠,同时,尽量保持水温维持在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$,防止过冷,小鼠消耗太大,或者过热,变成了小鼠的“浴池”。一定要尽可能地减少各种外界因素的影响,如实验设备、动物种类,实验环境等。

本研究结果显示:在定位航行实验中,随着训练时间的延长,过表达 α -Syn 转基因小鼠的寻台潜伏期与野生型小鼠相比下降缓慢,这说明过表达 α -Syn 转基因小鼠的空间学习能力明显降低;同时,过表达 α -Syn 转基因小鼠在空间探索实验的目的象限停留时间减少,表明该小鼠的空间记忆能力亦降低。两组小鼠在可视平台实验的寻台潜伏期无显著差别表明小鼠均不存在肢体运动障碍和视觉障碍。由此,我们推测过表达 α -Syn 转基因小鼠可能海马相关的空间记忆、学习能力受损。本研究在动物行为学水平证实 α -Syn 引起小鼠海马相关空间记忆、学习功能障碍,在国内外鲜有报道,且本研究结果与由 α -Syn 引起的海马神经元膜表面 NMDA 受体含量减少伴随 NMDA 受体介导的 Ca^{2+} 内流和内向膜电流的降低^[9-14]的结果一致。

由于海马神经元 NMDA 受体在学习和记忆中起重要作用,所以因 α -Syn 异常积聚所引起的神经元膜表面 NMDA 表达减少及功能减弱可能会影响动物的学习和记忆功能^[15-21],所以下一步,将进行深入的组织学研究,并将水迷宫实验与先进的神经电生理技术或脑成像技术等有机的结合起来应用,作为这一推测的证据。本论文的研究结果为探讨 PD、DLB 等与 α -Syn 相关的神经退行性疾病的认知功能障碍的机制提供了新的线索。然而,为了阐明 α -Syn 在神经元内的异常积聚与上述神经退行性疾病的认知功能障碍的相关性和作用机制仍需要更多的实验证据的支持。

参考文献 (References)

- [1] Forder JP, Tymianski M. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules[J]. Neuroscience, 2009, 158(1): 293-300
- [2] Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(6): 657-668
- [3] Kauppinen TM, Swanson RA. The role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. Neuroscience, 2007, 145 (4):1267-1272. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1147: 233-241
- [4] Redish AD, Touretzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze[J]. Neural Comput, 1998, 10(1): 73-111
- [5] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2001, 36 (1): 60-90
- [6] Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. Nature, 1982, 297(5868):681-683
- [7] Ziemińska E, Stafiej A, Strużyńska L. The role of the glutamatergic NMDA receptor in nanosilver-evoked neurotoxicity in primary cultures of cerebellar granule cells[J]. Toxicology, 2014, 6(315): 38-48
- [8] Pearce JM, Roberts AD, Good M. Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors [J]. Nature, 1998, 396(6706): 75-77
- [9] Chen Y, Yang W, Li X, et al. α -Synuclein-induced internalization of NMDA receptors in hippocampal neurons is associated with reduced inward current and Ca^{2+} influx upon NMDA stimulation[J]. Neuroscience, 2015, 300: 297-306
- [10] Kristina Magnusson, Anders H nell, Igor Bazov, et al. Nandrolone decanoate administration elevates hippocampal prodynorphin mRNA expression and impairs Morris water maze performance in male rats[J]. Neurosci Lett, 2009, 467(3): 189-193
- [11] Lisa AFeldman, Matthew LShapiro, Josephine Nalbantoglu. A novel rapidly acquired and persistent spatial memory task that induces immediate early gene expression [J]. Behav Brain Funct, 2010, 6: 35. 2010, 6: 35
- [12] Hitomi Yamamoto, Koichi Kokame, Tomohiko Okuda, et al. NDRG4 protein-deficient mice exhibit spatial learning deficits and vulnerabilities to cerebral ischemia [J]. Biol Chem, 2011, 286 (29): 26158-26165

(下转第 2820 页)

- netic stimulation (rTMS) at high and low frequency: an efficacious therapy for major drug-resistant depression [J]. Clin Neurophysiol, 2005, 116(5): 1062-1071
- [3] Kim SW, Chung YC, Lee YH, et al. Paliperidone ER versus risperidone for neurocognitive function in patients with schizophrenia: a randomized, open-label, controlled trial[J]. Int Clin Psychopharmacol, 2012, 27(5): 267-274
- [4] Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation[J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(5): 619-631
- [5] Wang H, Cheng H, Shao Q, et al. Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling [J]. Biol Reprod, 2014, 90(4): 78
- [6] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(6): 828-834
- [7] Liu Z, Teng L, Bailey SK, et al. Epithelial transformation by KLF4 requires Notch1 but not canonical Notch1 signaling [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(19): 1840-1851
- [8] Xu P, Qiu M, Zhang Z, et al. The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas in vitro and in vivo [J]. J Neurooncol, 2010, 97(1): 41-51
- [9] 刘文学, 张广芬, 王菁, 等. 星形胶质细胞功能障碍在抑郁症发病中的作用研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(6): 1187-1190
Liu Wen-xue, Zhang Guang-fen, Wang Jing, et al. Progress in Roles of Astrocyte Dysfunction in the Onset of Depression [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(6): 1187-1190
- [10] McEvoy JP, Byerly M, Hamer RM, et al. Effectiveness of paliperidone palmitate vs haloperidol decanoate for maintenance treatment of schizophrenia: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2014, 311(19): 1978-1987
- [11] Xiao X, Ning L, Chen H. Notch1 mediates growth suppression of papillary and follicular thyroid cancer cells by histone deacetylase inhibitors[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(2): 350-356
- [12] Han B, Liu SH, Guo WD, et al. Notch1 downregulation combined with interleukin-24 inhibits invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(33): 9727-9735
- [13] 孙楷, 孙凡, 朱亮. 单胺氧化酶抑制剂在临床方面的应用 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(6): 1180-1182
Sun Kai, Sun Fan, Zhu Liang. The Applications of Monoamine Oxidase Inhibitors in Clinical[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(6): 1180-1182
- [14] Shen S, Sun C'Y, Du XJ, et al. Co-delivery of platinum drug and siNotch1 with micelleplex for enhanced hepatocellular carcinoma therapy[J]. Biomaterials, 2015, 70: 71-83
- [15] Yang Z, Qi Y, Lu C, et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of Notch1 suppresses tumor growth and enhances the effect of IL-2 immunotherapy in malignant melanoma [J]. J BUON, 2015, 20(6): 1553-1564
- [16] Su Y, Yu L, Liu N, et al. PSMA specific single chain antibody-mediated targeted knockdown of Notch1 inhibits human prostate cancer cell proliferation and tumor growth [J]. Cancer Lett, 2013, 338(2): 282-291
- (上接第 2807 页)
- [13] Ysselstein D, Joshi M, Mishra V, et al. Effects of impaired membrane interactions on α -synuclein aggregation and neurotoxicity [J]. Neurobiol Dis, 2015, pii:S0969-9961(15)00154-0
- [14] Blaabjerg M, Fang L, Zimmer J, et al. Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents [J]. Exp Neurol, 2003, 183(2): 573-580
- [15] Hashimoto M, Masliah E. Alpha-Synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease[J]. Brain Pathol, 1999, 9(4): 707-720
- [16] Wu LY, Bao XQ, Pang HY, et al. FLZ attenuates learning and memory deficits via suppressing neuroinflammation induced by LPS in mice [J]. J Asian Nat Prod Res, 2015, 17(3): 306-317
- [17] Reisine TD, Yamamura HI, Bird ED, et al. Pre-and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 1978, 159(2): 477-481
- [18] Perry EK, Irving D, Kerwin JM, et al. Cholinergic transmitter and neurotrophic activities in Lewy body dementia: similarity to Parkinson's and distinction from Alzheimer disease[J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1993, 7(2): 69-79
- [19] Cui Z, Feng R, Jacobs S, et al. Increased NR2A: NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1036
- [20] Hanson JE, Pare JF, Deng L, et al. Altered GluN2B NMDA receptor function and synaptic plasticity during early pathology in the PS2APP mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2015, 74: 254-262
- [21] Wang Q, Li J, Wei X, et al. Alterations of NMDA receptor binding in various brain regions among 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats[J]. Int J Neurosci, 2014, 124(6): 457-465