文章编号:1000-5404(2009)06-0477-03

论著

经典眨眼条件反射建立后豚鼠小脑齿状-中位核突触超微结构的变化

黄率帅[1],林 曦[1],胡 波[2],李 蕊[3],杨 丽[1],隋建峰[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室,[2]西南医院神经外科,[3]西南医院康复科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察经典眨眼条件反射建立后豚鼠小脑齿状-中位核(D-I nuclei)突触超微结构的变化,探讨联合型学习和突触超微结构变化的关系。**方法** 实验动物分为配对组($n=4$)和非配对组($n=4$)。采用500 ms正弦波纯音和100 ms束状氧气流进行配对刺激训练配对组动物,而非配对组动物则接受声音和气流的非配对刺激。训练6 d后,电镜下观察各组动物小脑齿状-中位核突触超微结构,应用图像分析软件比较突触超微结构相关参数的差异。**结果** 配对组动物在6 d的条件反射训练后均可获得90%以上的条件反应率,而非配对组动物6 d内条件反应率均低于10%;相对于非配对组,配对组动物小脑齿状-中位核突触密度无显著增加($P>0.05$),但突触后膜致密区厚度增厚($P<0.05$),突触活性区域增多($P<0.05$)。**结论** 经典眨眼条件反射建立可能与小脑齿状-中位核突触超微结构的变化有关。

关键词: 小脑;齿状-中位核;眨眼条件反射;突触;超微结构
中图法分类号: R322.81;R329.27;R338.61 **文献标识码:** A

Synaptic ultrastructural changes of cerebellar dentate-interpositus nuclei after acquisition of classically conditioned eyeblink responses in guinea pigs

HUANG Lu-shuai[1], LIN Xi[1], HU Bo[2], LI Rui[3], YANG Li[1], SUI Jian-feng[1] ([1]Department of Physiology, College of Basic Medical sciences, [2]Department of Neurosurgery, [3]Department of Rehabilitation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the synaptic ultrastructural changes of cerebellar dentate-interpositus (D-I) nuclei after acquisition of classically eyeblink conditioned responses (CR) in guinea pigs, and to investigate the relationship between synaptic ultrastructural changes and associative learning. **Methods** Eight albino guinea pigs were used as subjects and randomly assigned into 2 groups: paired ($n=4$) and unpaired ($n=4$). A 500-ms tone conditioned stimulus (CS) was paired with a 100 ms corneal oxygen-puff unconditioned stimulus (US) in a standard delay paradigm. The synaptic ultrastructure of D-I nuclei was observed by electron microscopy after 6 consecutive daily training sessions, and the relevant parameters were analyzed with software designed for imaging analysis. **Results** The paired animals reached the CR criteria after the 6 consecutive daily sessions, while the unpaired animals exhibited no appreciable number of CR during the 6 consecutive daily sessions; In comparison with those of the unpaired animals, the paired animals showed no significant increases of the synaptic density ($P>0.05$), but produced the longer synaptic active zone ($P<0.05$) and the thicker post-synaptic density ($P<0.05$). **Conclusion** The acquisition of classically conditioned eyeblink responses is related to synaptic ultrastructural changes of cerebellar D-I nuclei.

Key words: cerebellum; dentate-interpositus nuclei; eyeblink conditioning; synapse; ultrastructure

经典眨眼条件反射(classically eyeblink conditioned responses, CR)是研究联合型学习的重要模型[1]。电生理研究显示,经典眨眼条件反射建立过程中啮齿类动物小脑齿状-中位核(dentate-interpositus nuclei)神经元发生了学习相关的放电活动[2]。此外,损毁或失活小脑齿状-中位核可以抑制这类反射的建立[3,4]。这些结果提示小脑齿状-中位核是经典眨眼条件反射建立所需神经环路的关键组成部分。

目前,小脑齿状-中位核参与经典眨眼反射建立已经得到证实,但是对于其参与机制的研究仍十分有限。既往的研究认为,眨眼条件反射建立的机制在于小脑齿状-中位核神经元兴奋性增高以及小脑皮层对该核

基金项目: 国家自然科学基金(30672255)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672255)
作者简介: 黄率帅,男,湖北省武汉市人,硕士研究生,主要从事学习和记忆的神经生物学方面的研究。E-mail: huanglv-82@163.com
通信作者: 隋建峰,电话:(023)68753704
收稿日期: 2008-07-01;**修回日期:** 2008-07-25

团的抑制作用减弱[5]。近期对神经元突触传递相关蛋白的研究表明,抑制某些特定突触传递蛋白的合成可显著抑制经典眨眼条件反射的建立,提示经典眨眼条件反射的建立可能更多地需要细胞特定结构的永久性改变[6]。本课题组近年来已成功建立了豚鼠经典眨眼条件反射模型[7]。在此基础上,本研究运用透射电镜技术分析豚鼠小脑齿状-中位核突触超微结构在经典眨眼条件反射建立前后的变化情况,为揭示联合型学习的细胞机制提供有意义的实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~10周龄健康雄性豚鼠8只(重庆医科大学实验动物中心),体质量400~500 g。实验动物按随机抽签法分为配对组(n=4)和非配对组(n=4),饲养于温度为20~25 ℃的动物室内,24 h循环灯照、自由进食、饮水,并适当给予维生素C补充。在饲养笼内铺以木屑,以保持环境干燥。实验前12 h禁食,自由饮水。

1.2 条件反射行为训练

实验前1周,给实验动物手术安装颅骨固定支架,手术方法及步骤详见文献[7]。术后恢复6 d后开始行为训练。行为训练在隔光、隔音的屏蔽柜内进行。完整的训练周期包括2 d适应期和6 d训练期。适应期内,豚鼠被放置于有机玻璃制成的长方体固定盒(20 cm×8 cm×5 cm)中,通过固定盒前端孔洞将其头颈部露在盒外。使用4根耳杆顶住头颅固定支架,将豚鼠头部固定在脑立体定位仪(SN-1,Narishige,日本)上。适应时间约30 min,在此期间不给动物施予任何刺激。训练期在适应期结束后次日开始,连续进行6 d。训练时,豚鼠固定方法同适应期。将气流喷嘴放置于正对豚鼠左侧眼角膜正中的位置,距离为1.0 cm。非条件刺激(unconditioned stimulus, US)为1个持续100 ms、压强为20 kPa束状医用氧气流。条件刺激(conditioned stimulus, CS)为持续500 ms的2 kHz正弦波纯音(声压强度:80~90 dB,升降时间:5 ms),由静电扬声器播放,并可触发视听分辨行为自动训练系统按照设定的参数释放医用氧气流[8]。配对训练时,CS开始400 ms后,对左眼角膜施与US,CS和US同时结束。动物每天连续进行5组CS和US结合的配对训练,每组10次,每次配对训练间隔时间在20~40 s内随机变化(平均30 s)。非配对训练时,CS与US各自随机出现,训练时间与训练间隔时间同配对组。训练同时对眨眼进行测量,测量方法详见文献[7]。

1.3 标本的采集与制备

行为训练结束后,用1%戊巴比妥钠40~50 mg/kg腹腔注射深度麻醉后,切开动物腹腔暴露心脏,在心尖部用12号针头从左心室剪开小口处穿入主动脉,同时在右心耳处剪小口放血,用生理盐水250 ml灌注去除血细胞,4 ℃ 4%多聚甲醛加2.5%戊二醛250 ml灌注固定后断头分离出小脑,根据坐标于小脑皮层下白质中定位小脑齿状-中位核,取1 mm大小组织放入3%磷酸缓冲的2.5% 戊二醛中固定,0.1 mmol/L PBS漂洗2次,1%锇酸中固定2 h,丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋,半薄切片定位,超薄切片(片厚50 nm),铀染和铅染,荷兰飞利浦TECNAI10电镜下观察。

1.4 突触结构参数的测量

每例标本在神经毡内随机选取视野,拍摄6张突触结构照片,将照片扫描至计算机以BMP格式保存。确认突触的标准:①可见突触的前后膜;②可见致密带;③突触前膨大内可见3个以上突触小泡;④可见突触间隙。使用图像分析软件对突触进行计数和结构参数测量。测量如下的突触结构参数:突触数密度(Nv) =Na/(S×T)(Na:随机视野内突触的数量,S:随机选取视野的面积,T:超薄切片的厚度);突触后致密物(postsynaptic density, PSD)的厚度及活性区域的长度。

1.5 统计学分析

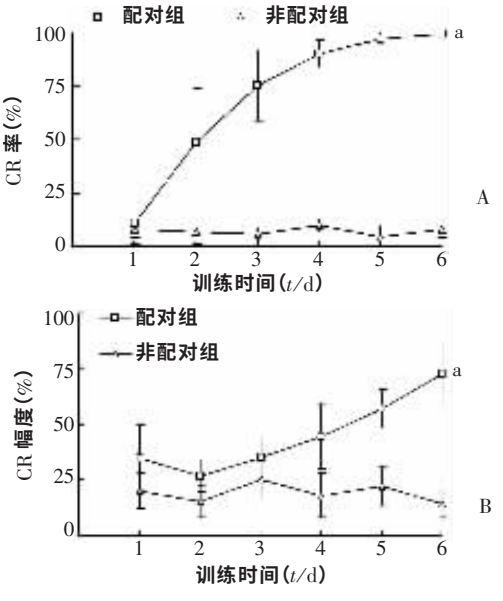
实验所得计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0软件进行统计学分析,结果采用方差分析和t检验。

2 结果

2.1 行为学结果

4只配对组豚鼠通过训练后均能习得CR,其中3只豚鼠首日CR率均在10%以下,1只豚鼠首日CR率超过20%。训练第6天,配对组CR率为(99.2±1.8)%,显著高于训练第1天的CR率[(11.2±10.1)%,$P<0.05$],其中3只豚鼠CR率为100%(图1A)。4只配对组动物中有3只动物配对训练首日CR幅度约为30%[CR幅度等于绝对CR幅度与非条件反射幅度(unconditioned responses, UR)的百分比,即CR幅度/UR幅度],1只动物CR幅度超过50%。配对训练第6天,CR幅度为(73.0±11.8)%,显著高于训练第1天的幅度[(34.4±15.2)%,$P<0.05$,图1B]。

4只非配对组动物CR率持续低于10%。非配对组动物CR幅度持续低于25%(图1)。



a:$P<0.05$,与非配对组比较

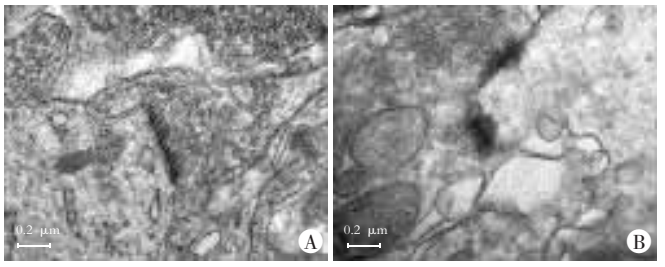
A:CR率变化;B:CR幅度变化

图1 配对组与非配对组CR率和CR幅度变化

2.2 条件反射建立后小脑齿状-中位核神经元突触的超微结构变化

非配对组动物小脑齿状-中位核神经元核膜完整光滑,细

胞核内染色质均匀,细胞质粗面内质网、核糖体及高尔基体、线粒体等细胞器完整、丰富,突触前膜、后膜结构清晰,突触多为平直型(即前后膜近于直线平行),少数突触的前后膜轻度弯曲形成微凹型或微凸型,突触间隙清楚,突触前终末有较多清亮的圆形递质囊泡且均匀分布,突触后致密物质不明显。与非配对组比较,配对组动物的小脑齿状-中位核突触超微结构特征表现为凹型或凸型突触有增加的趋势,突触间隙模糊,递质小泡聚集成堆且靠近突触前膜,PSD 厚度明显增厚,突触活性区域增多,总长度增加。提示突触传递效能增加。



A:非配对组;B:配对组

图 2　豚鼠小脑齿状-中位核突触超微结构观察　(TEM)

2.3　突触密度及结构参数的定量分析

经过 6 d 的行为训练,配对组豚鼠小脑齿状中位核神经元 Nv 为(4.3 ±0.4) μm^{-3},与非配对组突触密度[(4.4 ±0.30) μm^{-3}]比较无统计学差异($P>0.05$);配对组齿状-中位核神经元活性区长度(L)为(325.9 ± 84.3) nm,与非配对组活性区长度[(216.9 ±76.5) nm]比较有统计学差异($P<0.05$);配对组 PSD 厚度(T)为(70.3 ± 10.5) nm,与非配对组 PSD 厚度[(32.4 ±11.5) nm]比较有统计学差异($P<0.05$)。

3　讨论

大量研究表明 ,中枢神经系统突触结构和功能的可塑性是学习记忆的神经基础[9]。本实验采用经典眨眼条件反射模式对豚鼠进行行为训练,经过 6 d 训练,当经典眨眼条件反射基本建立后,观察豚鼠同侧小脑深部齿状-中位核团神经元突触超微结构的改变。结果显示:经典眨眼条件反射建立后,豚鼠小脑齿状-中位核神经元突触密度并没有发生明显的改变。但对于一些超微的结构指标,如 PSD 厚度和活性区域的长度,经典眨眼条件反射训练建立后出现明显变化,主要表现为 PSD 厚度和活性区域长度的显著增加。另外,训练后可见明显的突触小泡聚集和前移现象。

突触密度的改变是突触可塑性的一个形态学特征。有报道在对海马 LTP 的研究中发现,LTP 形成对整个分子层中的突触总数影响不大,但使此区凹型突触密度明显增加,他们认为凹型突触可能与 LTP 的维持有关[10]。本实验在经典眨眼条件反射建立后并没有观察到小脑齿状-中位核神经元的突触密度显著增加,其原因可能是由于训练时间较短,并没有新的突触的形成,而只是部分突触效能的改变引起学习和记忆形成。实验中观察到凹形突触有增加的趋势,研究表明凹形突触可使递质能更有效作用于靶受体,提高信息传递的有效性。

PSD 由细胞骨架蛋白和调节蛋白组成,其中有些蛋白与突触后膜的受体通道有联系,并且 PSD 的位置恰好处于神经递质引发的突触区离子流及第二信使级联反应的"关口"途径,它作为中介者将信号分子、调节分子和靶分子联系起来,起着突触后信号传导的组建作用,对突触的整合功能与调节作用具有关键性意义。PSD 的厚度和长度(即活性区域的长度)在一定程度上代表了突触后致密物质的多少。环境因素的刺激,如药物、训练等可引起脑不同区域的 PSD 厚度及长度的变化。研究表明 PSD 的厚度和长度与学习记忆的训练和记忆的保持能力密切相关,PSD 在突触后的发育及功能活动依赖区的可塑性(包括 LTP 和 LPD)中都有重要意义[11]。

本研究结果显示经典眨眼条件反射训练使配对训练组豚鼠小脑齿状-中位核神经元突触 PSD 厚度及活性区域长度增加,这可能影响了突触的传递功能。提示小脑齿状-中位核是经典条件反射建立的特定脑区,其突触超微结构的改变是经典眨眼条件反射建立的结构基础。PSD 增加、活性区域增多以及突触小泡聚集和前移的深层次机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Christian K M, Thompson R F. Neural substrates of eyeblink conditioning: acquisition and retention[J]. Learn Mem, 2003, 10(6): 427 -455.

[2] Green J T, Arenos J D. Hippocampal and cerebellar single-unit activity during delay and trace eyeblink conditioning in the rat[J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 87(2): 269 -284.

[3] Lavond D G, Hembree T L, Thompson R F. Effect of kainic acid lesions of the cerebellar interpositus nucleus on eyelid conditioning in the rabbit[J]. Brain Res, 1985, 326(1): 179 -182.

[4] Krupa D J, Thompson J K, Thompson R F. Localization of a memory trace in the mammalian brain[J]. Science, 1993, 260(5110): 989 -991.

[5] Medina J F, Garcia K S, Mauk M D. A mechanism for savings in the cerebellum[J]. J Neurosci, 2001, 21(11): 4081 -4089.

[6] Bouton M E, Moody E W. Memory processes in classical conditioning [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2004, 28(7): 663 -674.

[7] 林　曦, 胡　波, 杨　丽, 等. 蝇蕈醇小脑齿状-中位核微注射对豚鼠经典眨眼条件反射建立的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 499 -502.

[8] 隋建峰, 高　洁, 罗　峻, 等. 适用于低等哺乳动物的视听分辨行为自动训练系统[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(1): 89.

[9] Krakauer J W, Shadmehr R. Consolidation of motor memory [J]. Trends Neurosci, 2006, 29(1): 58 -64.

[10] Becker S, Wojtowicz J M. A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders[J]. Trends Cogn Sci, 2007, 11(2): 70 -76.

[11] Kleim J A, Freeman J H Jr., Bruneau R, *et al*. Synapse formation is associated with memory storage in the cerebellum[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (20): 13228 -13231.

(编辑　张　维)