DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.002

文章编号:1000-5404(2003)03-0187-03

论著

反义 c-jun 寡核苷酸对大鼠学习记忆和 LTP 的影响

熊 鹰[1],姚小红[1],万子冰[1],隋建峰[1],李希成[1],蔡文琴[2] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察反义 c-jun 寡核苷酸对大鼠学习记忆和长时程增强(Long-term potentiation, LTP)的影响。方法 采用脑内微量注射、主动回避反应训练(AAR)、LTP 记录等技术。结果 反义 c-jun 寡核苷酸双侧海马(5 mol/L)或脑室注射(8 mol/L),大鼠 AAR 的习得均明显低于对照组;反义 c-jun S-ODN 使大鼠 LTP 诱出率明显减少,串刺激后 PS 幅度和 fEPSP 斜率的增幅降低。结论 反义 c-jun 寡核苷酸显著损害大鼠学习记忆和 LTP 能力。

关键词:反义 c-jun;学习;记忆;长时程增强
中图法分类号:R338.64;R342.4 文献标识码:A

Effect of c-jun antisense oligonucleotide on learning, memory and LTP in rats

XIONG Ying, YAO Xiao-hong, WAN Zi-bing, SUI Jian-feng, LI Xi-cheng, CAI Wen-qin (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of c-jun antisense oligonucleotide on learning, memory and LTP in rats. Methods Techniques such as intrahippocampal microinjection, active avoidance reaction (AAR), long-term potentiation (LTP) recording, *etc*. were used. Results Repeated intrahippocampal (5 mol/L) or intracerebroventricular (8 mol/L) injection of antisense c-jun S-ODN for three days impaired the learning and memory in active avoidance reaction in young rats. Antisense c-jun S-ODN injected intrahippocampally (5 mol/L) reduced the probability of the induction of hippocampal LTP *in vivo* in young rats. The amplitude of population spike (PS) and the slope of field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) also decreased following tetanic stimulation. Conclusion c-jun antisense oligonucleotide may play an important role in learning, memory and LTP in rats.

Key words: c-jun; antisense oligonucleotides; learning; memory; long-term potentiation

c-jun 是广泛分布于体内组织包括神经系统的一种快反应基因,具有把短时程作用的细胞外信号和细胞功能的长时程改变偶联起来的作用。在哺乳动物中枢神经系统,c-jun 可被长时程增强(Long-term potentiation, LTP)以及行为训练诱导表达,如 Y 迷宫训练后,大脑皮层 c-jun mRNA 表达明显增多;Anokhin 的实验表明小鸡 c-jun 的表达在辨别学习和被动回避学习以后增多;Heurteaux 则证实小鼠海马 c-jun mRNA 在食物压杆操作学习后表达增强;随 LTP 的诱导,包括 c-jun 在内的很多快反应基因在脑内的表达明显增加[1~3]。本实验采用脑内微量注射反义 c-jun 寡核苷酸的方法,研究 c-jun 在学习记忆和 LTP 中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 大鼠 35 只,体重 200~250 g,自由饮水和进食,由本校实验动物中心提供。

1.2 主动回避反应(Active avoidance reaction, AAR)

采用爬杆(Pole-jump)主动回避反应箱[4]。箱底由不锈钢棒组成,可通交流电产生 footshock,以灯光为条件刺激,电击为非条件刺激。爬杆反应的习得:第 1 次训练时,先将大鼠置于箱内适应 1~2 min,然后灯亮,5 s 后给予电击,在头 3 次训练时,如果电击后 5~10 s 内大鼠不爬到杆上,则轻轻将鼠放置杆上,使大鼠学会爬杆。在随后的训练中,如果电击 5 s 内大鼠不爬杆,则持续电击 30 s,30 s 内大鼠都不爬杆则由实验者放到杆上。每次训练的间隔时间为 30~60 s。以灯亮 5 s 后大鼠自动爬杆为主动回避反应(AAR)。如果大鼠爬到杆上 30 s 仍然不下来,实验者轻轻将大鼠拿下来。每天训练 20 次。以正确反应率连续 3 d 都在 80%以上为习得标准。爬杆反应的消退:只给予灯光信号(5 s),不给电击,观察习得以后不同时间 AAR 正确率的变化。以"假条件反射"(Pseudoconditioning, PC)训练作为对照组,动物分别接受同样强度的灯光和电刺激,但两种刺激之间没有配对。

1.3 脑内注射

以戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔麻醉大鼠后,固定于脑立体定位仪上,根据图谱,于双侧背海马(P:3.0, LR:2.0, H:3.5)及侧脑室(A:1.0, L:1.5, H:3.0)分别埋置不锈钢导管,以牙托粉固定于颅骨上。术后恢复 3 d 开始实验。进行脑内注射时,将清醒大鼠固定于敞式装置上,注射时间不少于 2 min。实验结束

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670249)
作者简介:熊 鹰(1966—),男,湖南省湘潭县人,博士,副教授,主要从事学习记忆以及听觉神经机制方面的研究,发表论文 30 篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后，注入2%傍胺天蓝(Pontamine skyblue)，核对给药部位。

1.4 在体LTP记录方法[5]

以25%乌拉坦和1%氯醛糖混合液(3 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠，固定于脑立体定位仪上，刺激电极为同心圆电极，推置于CA3区辐射层(P: 3.2, LR: 2.3, H: 3.0)，刺激Schaffer侧枝。记录电极采用金属绝缘电极，用微电极推进器推置于CA1区锥体细胞层(P: 4.0, LR: 2.3, H: 2.0)。记录锥体细胞层的突触反应和细胞放电。以刺激器和隔离器输出频率0.5 Hz，波宽0.1 ms的方波进行单刺激，其刺激强度相当于引起突触反应和峰电位最大振幅50%的强度。以此作为测试刺激。将刺激所诱发的场兴奋性突触后电位(Field excitatory postsynaptic potential，fEPSP)和群体峰电位(Population spike，PS)经前置放大器输至双线示波器和Dantec-2000C型神经肌电记录仪。开始记录时，调节刺激强度使PS振幅和fEPSP斜率分别为其最大值的50%～60%。在诱发LTP时，先至少记录15 min的CA1区锥体细胞对单个脉冲刺激Schaffer侧枝的反应，待电位反应平稳后施予串刺激或称条件刺激，频率100 Hz，串长1 s，强度，波宽与测试刺激相同。15 min后，用测试刺激进行检测，连续观察60 min，如果串刺激后PS振幅增大30%以上，并持续超过30 min，即可认为该动物的海马Schaffer侧枝与CA1区锥体细胞的突触部位产生了LTP现象。计算方法见文献[5]。

1.5 药物

反义硫代c-jun ODN(S-DON)：TGCAGTCATAGAAC，与c-jun mRNA的翻译起始部位相互补；无义硫代ODN：TGCACTGATACAAC，均根据文献[6]设计，由上海细胞所合成。c-jun抗体(Sigma)。其它试剂为国产分析纯。

1.6 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用双样本 t 检验。

2 结果

2.1 反义c-jun S-ODN对大鼠AAR的影响

反义c-jun S-ODN双侧海马(5 mol/L)或脑室注射(8 mol/L)，对照组注射无义c-jun。注射时间：每天训练前1 h，连续注射3 d。观察反义c-jun S-ODN对大鼠AAR习得的影响，见图1、图2。结果，无论是海马或脑室注射反义c-jun S-ODN，大鼠AAR的习得均明显低于对照组($P<0.05$)。

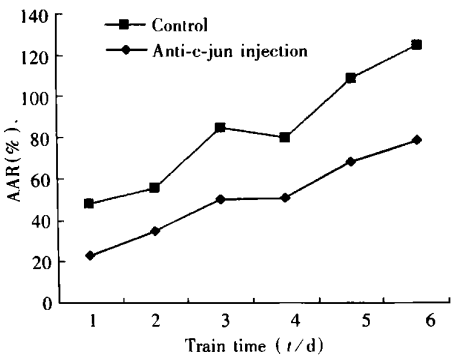


图1 海马内注射反义c-jun S-ODN对大鼠主动回避反应的影响

Fig 1 Effect of intrahippocampal injection of anti-c-jun S-ODN on AAR in rats

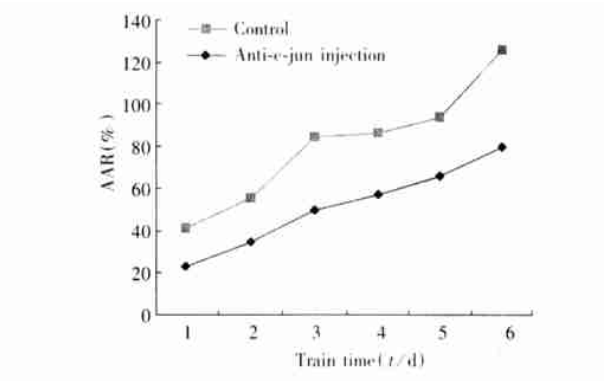


图2 脑室内注射反义c-jun S-ODN对大鼠主动回避反应的影响

Fig 2 Effect of icv injection of anti-c-jun S-ODN on AAR in early development and adult rats

2.2 反义c-jun S-ODN对海马CA1区LTP的影响

海马内注射反义c-jun S-ODN(5 mol/L)，30 min后开始记录。串刺激前记录的fEPSP和PS明显低于对照组，见图3。给予Schaffer侧枝以频率100 Hz，串长1 s的串刺激后，8只大鼠中只有1只PS增幅超过30%，持续时间超过30 min，其余6只大鼠PS也出现不同程度的增大，但PS增幅的百分率均低于20%，而且持续时间很短，在10 min左右即恢复到刺激前的水平，表明LTP的诱出明显减少。

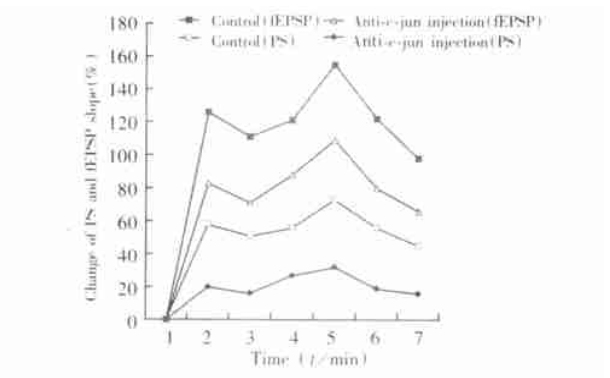


图3 反义c-jun S-ODN对大鼠LTP诱导的影响

Fig 3 Effect of anti-c-jun S-ODN on the probability of the induction of LTP in rats

3 讨论

反义寡核苷酸的设计主要从特异性、长度、化学修饰、亲和性、对照等几方面考虑。其长度以12～25个碱基较为合适。在本实验中，为了增加反义c-jun ODN或无义ODN对核酸酶水解作用的抵抗性，延长ODN的半衰期，采用了磷酸硫酸对ODN进行修饰，合成了S-ODN。由于GC之间的亲和力比AU之间的亲和力大，因此，增加针对GC的靶序列的碱基在ODN的比例，可增加其杂交亲和性，而适当减少ODN的长度[7]。

本实验将反义c-jun S-ODN于AAR训练前在脑室

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和海马内注射，连续 3 d。结果，无论是脑室或海马内注射反义 c-jun S-ODN，大鼠 AAR 的习得均明显低于对照组。表明反义 c-jun S-ODN 损害 AAR。Tischmeyer[6] 曾报道反义 c-jun S-ODN 损害明暗辨别学习，而反义 junB S-ODN 无影响。本结果进一步证明反义 c-jun S-ODN 对其它类型的学习记忆也有阻碍作用。c-jun 作为快反应基因的一种，其自身由胞浆中的第二信使等物质激活，进入胞核后，诱导另一些在细胞功能活动中更重要的基因表达，生成一些对细胞结构和功能有较长远影响的蛋白质。这样，外来刺激通过第二信使在胞浆中引起某些即时反应，再通过快反应基因引起细胞功能和结构的适应性改变。反义 c-jun S-ODN 阻断了这一通路的某些环节，因而使学习记忆能力受损。

本实验在海马内注射反义 c-jun S-ODN（5 mol/L）后，大鼠 LTP 发生抑制，诱出率明显减少，即使已发生 LTP 的大鼠，PS 幅度的增幅和 fEPSP 斜率的增幅也明显小于对照组。表明 c-jun 在海马 CA1 区 LTP 的形成中有重要作用。在体 LTP 产生以后，有的动物可以维持数周甚至数月，这显然要依靠合成新的蛋白质。外界信息通过第二信使作用于 IEGs，IEGs 编码转录因子，进而调节慢反应基因的表达来控制很多细胞类型的生长和分化。因此，IEGs 是 LTP 形成中的关键环节，其表达直接调控蛋白的形成。在众多 IEGs 中，我们以 c-jun 为研究对象，结果表明它参与了 LTP 的形成。迄今，以反义技术结合 LTP 记录进行研究的报道很少，Matthies[8] 报道反义 NMDA/R1 注入大鼠脑室，使 PS 增幅明显减小，而且海马细胞膜上 NMDA 受体的特异性结合减少 63%，表明反义 NMDA/R1 脑室应用后能够达到目标区，并且抑制 NMDA/R1 mRNA 的翻译。因此，反义 ODN 技术和电生理技术的有效结合为解决某些复杂生理过程如学习记忆的细胞和分子机制提供了一个新的研究手段。

参考文献：

[1] Grimm R, Tischmeyer W. Complex patterns of immediate early gene induction in rat brain following brightness discrimination training and pseudotraining[J]. Behav Brain Res, 1997, 84(1-2): 109—116.
[2] Rose S P. God's organism? The chick as a model system for memory studies[J]. Learn Mem, 2000, 7(1): 1—17.
[3] Freeman F M, Rose S P. Expression of Fos and Jun proteins following passive avoidance training in the day-old chick[J]. Learn Mem, 1999, 6(4): 389—397.
[4] 熊 鹰，蔡文琴，李希成，等. 大鼠不同类型学习记忆的发育变化研究[J]. 中国行为医学科学杂志，1998, 7(4): 243—245
[5] 熊 鹰，李希成，蔡文琴，等. 大鼠海马 CA1 区 LTP 发育变化的在体研究[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(5): 322—334.
[6] Tischmeyer W, Grimm R, Schicknick H, *et al*. Sequence-specific impairment of learning by c-jun antisense oligonucleotides[J]. Neuroreport, 1994, 5(12): 1501—1504.
[7] Wahlestedt C. Antisense oligonucleotide strategies in neuropharmacology[J]. TIPS, 1994, 15(1): 42—46.
[8] Matthies H, Schroder H, Wagner M. NMDA/R1-antisense olionucleotide influences the early stage of long-term potentiation in the CA1-region of rat hippocampus[J]. Neurosci Lett, 1995, 202(1-2): 113—116.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2003)03-0189-01

个案与短篇

颌下巨大型囊性肌上皮瘤 1 例

A case report of submandibular giant myoepithelioma

杨彦春，杨 军，史文进 （第三军医大学附属西南医院口腔科，重庆 400038）

患者，女，20 岁，因左颌下软性无痛性、逐渐增大包块 1 个月入院。入院前 1 个月发现左颌下区出现一包块，质地较软，不随进饮食及随体位改变而增大、缩小，无明显疼痛等不适，近 1 月来包块逐渐增大。发病以来，患者无发热、盗汗、体重减轻、头昏等，大小便正常。入院查体：T 36.8℃，BP 14/9 kPa，心、肺、肝、脾、肾等无异常。左颌下区膨隆明显，可扪及 6.0 cm×3.0 cm×2.0 cm 大小包块。囊性感，边界清晰，不活动，无压痛，表面皮肤色泽正常，皮温不高，无瘘管。口内见左口底舌下皱襞明显隆起，表面粘膜无溃烂，呈浅蓝色，扪之呈囊性感。左侧舌体抬高。术前诊断考虑为左舌下腺囊肿。治疗方法为手术切除。在全麻下行“左舌下腺囊肿切除术”。术中见包块为囊性包块，约 6.0 cm×3.0 cm×2.0 cm 大小，囊壁较厚，与舌下腺及颌下腺有纤维粘连，腺体明显萎缩。将包块与舌下腺及颌下腺一并完整切除。术后病理诊断为左颌下囊性肌上皮瘤。手术经过顺利，术后愈合良好。

讨论

囊性肌上皮瘤临床罕见。肌上皮瘤属于良性肿瘤，关于肌上皮瘤的系统报道较少，肌上皮瘤约占所有涎腺肿瘤的 1%，发生部位以腮腺居多，颌下腺次之，小涎腺以腭部居多[1]。有学

（下转 192 页）

作者简介：杨彦春（1974—），男，河北省保定市人，医师，主要从事口腔颌面外科方面的研究。电话：(023)68754000—73143

收稿日期：2002-03-02；修回日期：2002-06-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net