

## Morris 水迷宫训练诱导大鼠海马轴突重塑

梁荫基, 宿宝贵, 潘三强, 韩辉, 湛湘丽, 吴盾

(暨南大学医学院 人体解剖学教研室, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 观察 Morris 水迷宫训练后大鼠海马苔藓纤维分布的变化, 探讨海马神经元轴突的可塑性。方法: 2月龄雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为水迷宫训练模型组 20 只, 游水对照组 20 只。用 Neo-Timm 染色观察海马苔藓纤维的分布; 免疫荧光组织化学方法检测海马微管相关蛋白 tau-1 的定位; Western blotting 方法检测 tau-1 表达。结果: SD 大鼠经 6 d 学习训练, 其逃避潜伏期逐日缩短。与对照组大鼠相比, Neo-Timm 染色显示模型组大鼠海马 CA3 区苔藓纤维延伸至锥体细胞层和起始层, tau-1 免疫表达阳性产物除分布在透明层以外, 锥体细胞层或起始层内有明显颗粒分布。Western blotting 显示 tau-1 表达量增加。结论: 结果表明 Morris 水迷宫训练可以诱导大鼠海马 CA3 区轴突的重塑, 提示苔藓纤维系统可作为一个研究轴突重塑和认知关系的理想区域。

**[关键词]** 记忆; 轴突可塑性; Morris 水迷宫; tau-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0157-05

## Hippocampal axons remodeling was induced by Morris water maze in rats

LIANG Yin-ji, SU Bao-gui, PAN San-qiang, HAN Hui, ZHAN Xiang-li, WU Dun

(Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Aim:** To explore the plasticity of hippocampal neuronal axons, we investigated the remodeling of hippocampal mossy fiber by Morris water maze training in rats. **Methods:** Male SpragueDawley rats, 2 months were randomly divided into the model group ( $n=20$ ) and the control group ( $n=20$ ). The distribution of mossy fiber was study by Neo-Timm stain. The distribution of microtubule-associated protein tau-1 in the hippocampus CA3 region was observed by immunofluorescence stain between two groups. Expression of tau-1 was identified by Western blotting. **Results:** We demonstrated latency of platform becomes gradually shorter after six-day learning. Compared to the control group, mossy fiber terminals were significant increased in the CA3 stratum oriens region in model group. Distribution of tau-1 was obviously observed in stratum pyramidale and stratum oriens region. The expression of tau-1 in the model group was highly up-regulated compare to the control group. **Conclusion:** The results established learning and memory induced axonal remodeling of the hippocampal mossy fiber system in rat. Mossy fiber system could be an ideal region for researching the relationship between axonal remodeling and learning.

**[Key words]** memory; axonal plasticity; Morris water maze; tau-1

**[收稿日期]** 2008-09-16

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(05006067)

**[作者简介]** 梁荫基(1979-), 男, 讲师, 在职硕士研究生, 研究方向: 中枢神经可塑性研究

通讯作者: 宿宝贵, 男, 教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220251; E-mail: tlyj77@gmail.com

神经可塑性包括结构可塑性和功能可塑性,其中结构可塑性是功能可塑性的基础。海马是学习记忆的关键部位,特别在获得空间辨别性学习中起到一个非常重要的作用<sup>[1]</sup>。海马的结构可塑性表现在成年脑内发生结构改变,包括突触形成和神经纤维发芽。本研究小组发现空间辨别性学习记忆活动可致大鼠海马 CA3 区突触可塑性变化<sup>[2]</sup>。为探索突触可塑性过程,本研究采用 Neo-Timm 染色观察 Morris 水迷宫训练后大鼠海马 CA3 区苔藓纤维的分布,用免疫荧光组织化学方法检测 CA3 区微管相关蛋白 tau-1 的表达差异,Western Blotting 方法检测 tau-1 表达,对海马 CA3 区神经元轴突的可塑性进行研究,并进一步探讨 tau-1 在神经元轴突可塑性中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

南方医科大学实验动物中心购入 2 月龄雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为水迷宫训练模型组 20 只,游水对照组 20 只。大鼠笼每笼饲养 5 只,实验前所有动物作适应性普通饲料喂养 1 周,12~12 h 明暗交替。

### 1.2 行为训练

Morris 水迷宫水池直径 160 cm,站台(直径×高度):12×30 cm<sup>2</sup>,水池高度:50 cm,水中加入适量墨汁,使大鼠看不到平台及池底。水池温度维持在 20~26℃,房间面积 4×4 m<sup>2</sup>,四周除对称安装白炽灯外无任何标志物,有隔音、隔光效果。大鼠随机分成 2 组:水迷宫训练模型组,学习训练前 24 h 将大鼠放入水迷宫中适应性自由游泳 2 min。随后进入历时 6 d 的学习训练阶段,每天 12 次,每次观察训练时,将大鼠面向池壁,随机从 4 个不同象限中点入水。记录大鼠从入水至爬上隐匿性逃逸平台的时间(s),即逃逸潜伏期。以 60 s 为每次观察时间上限,大于 60 s 仍未找到逃逸平台,终止观察并以 60 s 计;帮助大鼠找到平台,让其在平台上停留 30 s 后撤离,休息 60 s 后重复上述训练。游水对照组大鼠每次游水 60 s,休息 60 s,每天重复 12 次,共 6 d,其游水环境除没有平台以外,其它条件与模型组大鼠一致。利用上海吉量软件科技有限公司 DigBehv 动物行为分析系统和 Morris 水迷宫视频分析系统进行图象和数据分析。

### 1.3 Neo-Timm 染色

最后 1 d 训练后 24 h 取 2 组动物各 20 只,在体积分数为 3.5% 水合氯醛腹腔麻醉后,接着灌注冷

生理盐水,迅速取脑,对半切开。左半球准备做 Neo-Timm 染色,室温下置于质量分数为 1% 硫化钠中 30 min,然后转移到质量分数为 3% 戊二醛/质量分数为 4% 多聚甲醛/0.15 mol/L PB。第 2 天依次置于体积分数为 20%、30% 蔗糖/0.15 mol/L PB 溶液,每一侧半球置于 Leica 冰冻切片机,OCT 包埋剂包埋,以 40 μm 作冠状切片。制备显色剂,体积分数为 50% 阿拉伯胶 90 mL 加入含 7.65 g 柠檬酸和 7.05 g 柠檬酸钠缓冲液 22 mL,含 5.3 g 对苯二酚 90 mL,最后加入质量分数为 17% 硝酸银 1.5 mL。置于恒温 26℃ 摇床中染色 80 min,充分水洗。最后经常规脱水透明,中性树胶封片保存。结果按照海马 CA3 区苔藓纤维出芽评分标准进行分析,0 分:锥体细胞层或起始层内无颗粒;1 分:锥体细胞层或起始层内偶见散在颗粒;2 分:锥体细胞层或起始层内少量至中等程度颗粒;3 分:锥体细胞层或起始层内有明显颗粒;4 分:锥体细胞层或起始层内有明显颗粒,沿 CA3 区接近连续分布;5 分:锥体细胞层或起始层内浓密的层带状颗粒沿 CA3 区连续或接近连续分布<sup>[3-4]</sup>。

### 1.4 免疫荧光组织化学染色

右半球准备做免疫荧光组织化学,置于质量分数为 3% 戊二醛/质量分数为 4% 多聚甲醛/0.15 mol/L PB,4℃ 保存过夜。第 2 天依次置于体积分数为 20%、30% 蔗糖/0.15 mol/L PB 溶液,每一侧半球置于 Leica 冰冻切片机,OCT 包埋剂包埋,以 12 μm 作冠状切片。加入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液内(pH 6.0)微波抗原修复 5 min,自然冷却。体积分数为 10% 羊血清孵育 30 min(37℃),用小鼠抗 tau-1 单克隆抗体(1:250 Chemicon 公司)孵育 16 h(4℃)。PBS 冲洗,用 Cy3 标记的抗小鼠 IgG(1:500 碧云天公司)避光孵育 1 h。PBS 冲洗,用荧光染料(DAPI)复染 5 min。冲洗,封片,摄像。用 PBS 代替一抗做阴性对照。

### 1.5 Western blotting 检测 tau-1 表达

取 2 组动物各 5 只,用体积分数为 3.5% 水合氯醛麻醉腹腔注射麻醉后立即冰上断头取右侧海马放于 -80℃ 冰箱内备用。取出标本加入 RIPA 细胞裂解液,超声裂解,15 000×g 离心 10 min,取上清,以 BCA 法测定样品蛋白含量。等量蛋白样本经过体积分数为 10% SDS-PAGE 电泳后,用 Bio-Rad 的电转仪恒流 350 mA 40 min 转印至 PVDF 膜,体积分数为 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 tau-1 单抗(1:250 Chemicon 公司)4℃ 摇晃孵育过夜,TBST 洗膜 10 min×3 次。再加 HRP 标记二抗摇晃孵育,室温

1 h,TBST 洗膜 10 min × 3 次,ECL 化学发光试剂盒 (Pierce 公司)显影,GAPDH 单抗(1:2 000 Chemicon 公司)作内参照。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫训练对大鼠空间学习记忆能力的影响

大鼠连续接受 6 d 训练,第 1~3 天隐匿性平台逃逸潜伏期迅速下降,第 4~6 天降势趋缓(图 1)。

2.2 Neo-Timm 染色结果示苔藓纤维分布有明显改变

模型组中海马 CA3 区 3 个冠状切面都有明显苔藓纤维出芽(图 2),两组海马 CA3 区苔藓纤维

出芽评分(图 3),模型组 CA3 区苔藓纤维出芽评分与对照组比较,差异均有显著性( $P < 0.01$ )。

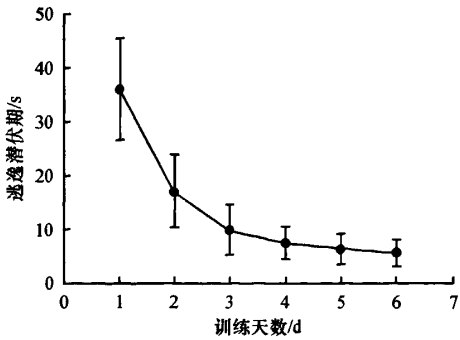
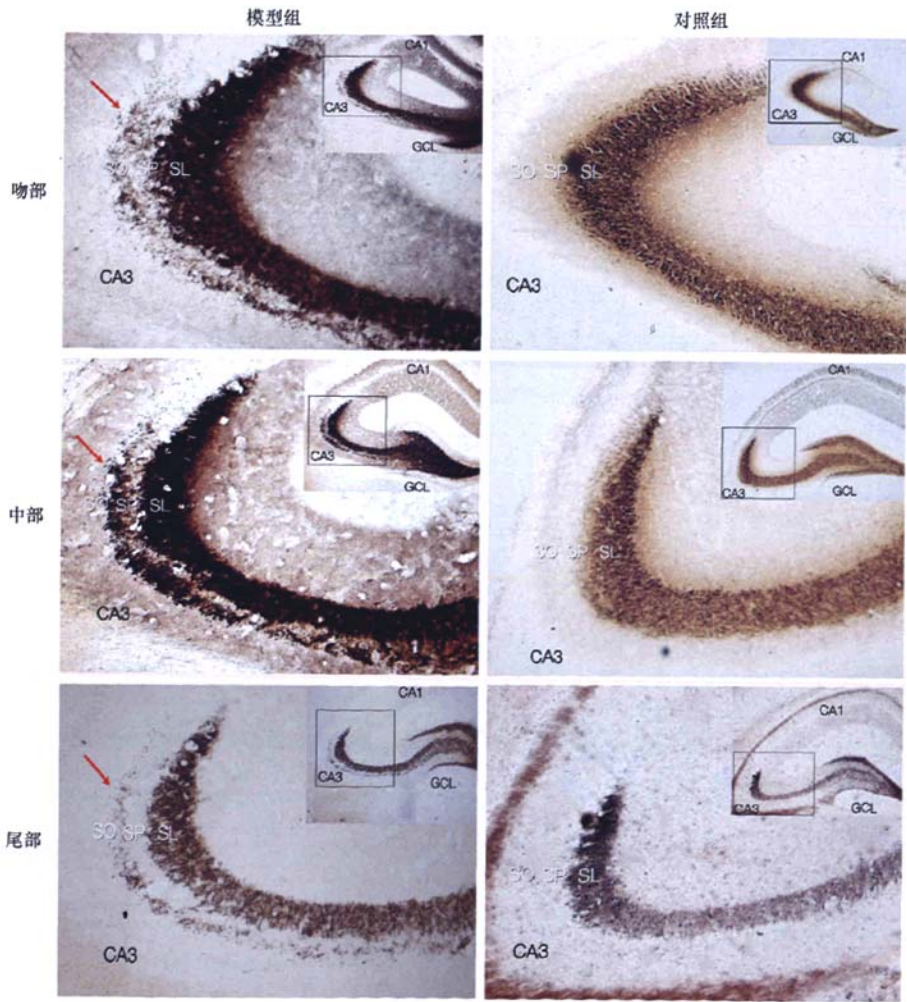
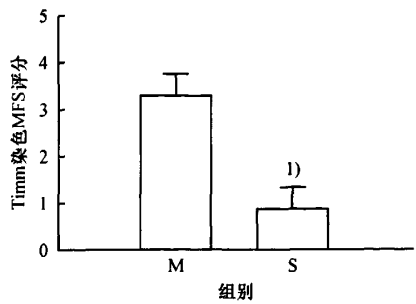


图 1 模型组大鼠不同时间段平均逃避潜伏期



SL:透明层;SP:锥体细胞层;SO:起始层;对照组大鼠海马 CA3 区苔藓纤维分布局限在透明层,模型组除分布在透明层以外,锥体细胞层和起始层都有分布;红箭头所示为起始层内浓密的层带状颗粒沿 CA3 区接近连续分布

图 2 模型组和对照组 CA3 区 Neo-Timm 染色(×100)



M: 模型组; S: 对照组; 1) 模型组 CA3 区苔藓纤维出芽评分与对照组比较明显增高, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ )

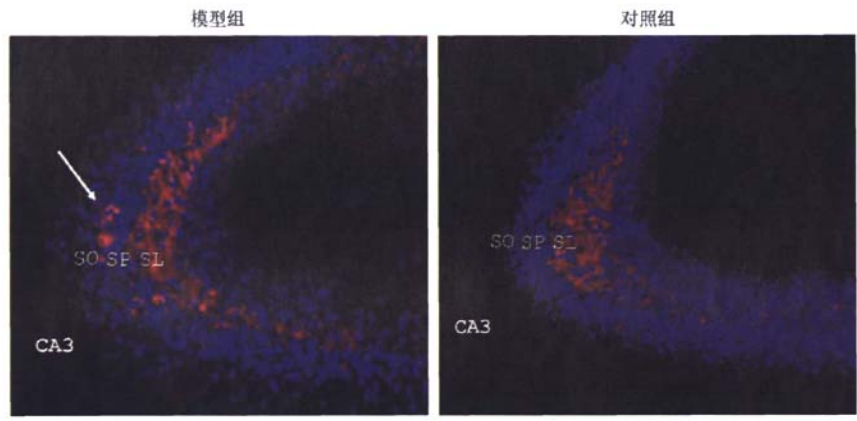
图 3 海马 CA3 区苔藓纤维出芽评分

2.3 大鼠海马 CA3 区 tau-1 蛋白阳性颗粒的分布

对照组大鼠海马 CA3 区 tau-1 蛋白阳性产物主要分布在透明层,呈点状沿透明层长轴分布,模型组大鼠海马 CA3 区 tau-1 蛋白阳性产物除分布在透明层以外,锥体细胞层或起始层内有明显颗粒分布(图 4)。

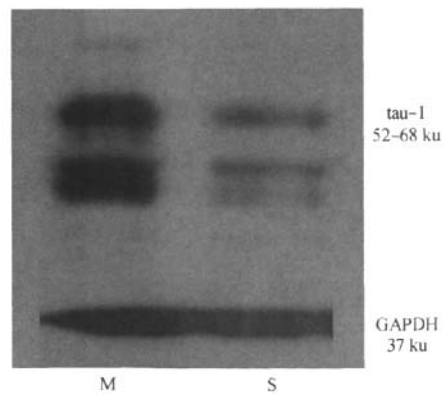
2.4 Western blotting 结果

模型组大鼠海马结构 tau-1 蛋白表达比对照组明显增加(图 5)。



SL:透明层; SP:锥体细胞层; SO:起始层;红色为轴突特异性微管相关蛋白 tau-1;蓝色为 DAPI 染料复染 DNA 以显示锥体细胞层;白箭头所示为 tau-1 蛋白在锥体细胞层内有明显颗粒分布

图 4 模型组和对照组大鼠海马 CA3 区 tau-1 免疫荧光染色 ( $\times 100$ )



M:模型组 S:对照组

图 5 Western blotting 检测 tau-1 蛋白的表达

3 讨论

海马内部神经元环路的最大特征是具有三突触回路。三突触回路中多个部位均可出现突触结构和

功能的重组,突触重建中最有代表性的是苔藓纤维系统。齿状回颗粒细胞的轴突即苔藓纤维,主要投射到 CA3 区透明层,终止于锥体细胞顶树突基部。所谓“出芽”是指苔藓纤维异位投射,既可以穿越 CA3 区透明层,在锥体细胞层和起始层与锥体细胞的顶树突形成新的突触,也可以折返至齿状回内分子层(也即颗粒细胞上区),与颗粒细胞树突建立新的突触联系<sup>[5-6]</sup>。在本研究小组以前实验中已证实 Wista 大鼠经水迷宫训练后,发现空间辨别性学习记忆活动可引致大鼠海马 CA3 区起始层内有纤维出芽。然而与 Wista 大鼠相比,C57 野生型小鼠经 Morris 水迷宫训练后 CA3 区苔藓纤维并没有发生改变<sup>[7]</sup>。同样经过 Morris 水迷宫训练,苔藓纤维形态变化却不尽相同,可能是物种不同所致<sup>[8]</sup>。本研究 SD 大鼠经 Morris 水迷宫训练后,海马 CA3 区苔藓纤维分布发生变化,结果与本研究小组先前的实验基本一致,建立空间辨别性学习记忆的 SD 大鼠,

海马CA3区出现轴突重塑,苔藓纤维穿透透明层,延伸至锥体细胞层和起始层。经Morris水迷宫训练后,成年大鼠海马CA3区苔藓纤维在起始层出现可能的再分布现象,将有助于通过海马神经网络加强信号的传播。因此,海马CA3区起始层轴突重塑和认知的关系提示苔藓纤维系统可作为一个研究经验因素理想区域,对研究遗传、发育及调节信息储存的形态学改变有重要意义。

正常的tau蛋白是一种含磷的蛋白质,主要分布于人类大脑的额叶、颞叶、海马及内嗅区,躯体感觉及运动区的皮质均有分布,外周神经系统含量也较丰富,而小脑中较少。人tau蛋白主要定位于神经元轴突内。大量研究证明,在Alzheimer病患者脑中异常过度磷酸化的tau蛋白含量显著增高,可能是Alzheimer病重要的发病机制之一。单克隆抗体tau-1作为神经细胞轴突特异性标志物,识别tau蛋白非磷酸化Ser198/199/202位点,在活体中只染轴突,胞体和树突不着色<sup>[9]</sup>。本研究结果显示tau-1蛋白的表达主要是在CA3区的透明层,尤其在模型组大鼠海马的锥体细胞层和起始层表达更明显,提示在模型组大鼠海马结构内tau-1表达在部位和表达量均有差异,是否训练改变的结果,抑或存在某些生长因子如BDNF和蛋白激酶改变tau蛋白磷酸化状态<sup>[10-11]</sup>、轴突可塑性是否与tau蛋白的磷酸化状态有关,尚需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] NADEL, EICHENBAUM. Introduction to the special issue on place cells[J]. *Hippocampus*, 1999, 9(4): 341-345.
- [2] 宿宝贵,许鹿希. 大鼠海马结构在空间辨别性学习记忆时的突触形态学观察[J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(1): 35-39.
- [3] HOLMES G L, CHAVASSUS-AU-LOUIS N, SARKISIAN M, et al. Mossy fiber sprouting following recurrent seizures during early development in rats [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 4049(4): 537-553.
- [4] HOLMES G L, GAIARSA J L, CHAVASSUS-AU-LOUIS N, et al. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects [J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(6): 845-857.
- [5] SWANSON L W, WYSS J M, COWAN W M. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat[J]. *Comp Neurol*, 1978(4), 181: 681-715.
- [6] COULTER D A. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system [J]. *Epilepsia*, 1999, 40 (suppl 1): S23-33.
- [7] REKART J L, SANDOVAL C J, ROUTTENBERG A. Learning-induced axonal remodeling: Evolutionary divergence and conservation of two components of the mossy fiber system within Rodentia [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2007, 87(2): 225-235.
- [8] FRICK, STILLNER, BERGER-SWEENEY. Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task [J]. *Neuroreport*, 2000, 11(16): 3461-3465.
- [9] BINDER L I, FRANKFURTER A, REBHUN L I. The distribution of tau in the mammalian central nervous system [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(4): 1371-1378.
- [10] HOLAHAN M R, REKART J L, SANDOVAL J, et al. Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains [J]. *Hippocampus*, 2006, 16(6): 560-570.
- [11] BERGAN J F, RO P, RO D, et al. Hunting increases adaptive auditory map plasticity in adult barn owls [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(42): 9816-9820.

[责任编辑:朱颖娜]