

## · 论著 ·

## 条件恐惧记忆形成中大鼠海马 CA1 区钙调蛋白激酶 II 和蛋白磷酸酶 1 蛋白表达及活性变化

王兵, 廖勇仕, 梁日初, 石巧玲, 段永红, 崔晟华, 蒋园丁

南华大学附属第二医院神经外科, 湖南省衡阳市 421001

**摘要:** 目的 探讨大鼠恐惧记忆形成过程中海马 CA1 区钙调蛋白激酶 II (CAMK II) 和蛋白磷酸酶 1 (PP1) 表达的变化。方法 将大鼠随机分成电击组 ( $n = 9$ ) 和对照组 ( $n = 9$ ) , 24 h 后处死动物, 提取海马 CA1 区蛋白, 用 anti-CAMK II 、 anti-p-CAMK II (T286) 和 anti-PP1 、 anti-PP1 $\alpha$  (T320) 抗体作蛋白印迹, 检测电击对 CAMK II 和 PP1 蛋白表达及活性的影响。结果 电击组的大鼠在 1 h 和 24 h 海马 CA1 区 CAMK II 蛋白表达较对照组增加了  $4.4 \pm 1.2$  倍, 并且其 286 位的苏氨酸磷酸化的 CAMK II 蛋白表达较对照组增加了  $3.3 \pm 0.8$  倍 ( $P < 0.05$ )。电击组 PP1 蛋白表达较对照组增加了  $3.6 \pm 1.1$  倍, 并且 PP1 $\alpha$  320 位的苏氨酸磷酸化信号较对照组增加  $2.3 \pm 0.6$  倍 ( $P < 0.05$ )。结论 大鼠条件恐惧记忆形成过程中海马 CA1 区 CAMK II 和 PP1 蛋白的表达增加, 活性增强。CAMK II 和 PP1 介导的磷酸化信号参与了条件恐惧长时记忆的形成。

**关键词:** 条件性恐惧; 海马; CA1 区; 钙调蛋白激酶 II; 蛋白磷酸酶 1

### **Expression of $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II and protein phosphatase 1 in the hippocampus CA1 area of rats during the formation of fear memory**

WANG Bing, LIAO Yong-Shi, LIANG Ri-Chu, SHI Qiao-Ling, DUAN Yong-Hong, CUI Sheng-Hua, JIANG Yuan-Ding. Department of Neurosurgery, Second Affiliated hospital, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and activity of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII) and protein phosphatase 1 (PP1) in the hippocampus CA1 area of rats with conditioned fear. **Methods** Rats were randomly divided into two groups ( $n = 9$  each): conditioned fear model and control. 24 hrs after rat model of conditioned fear was established, rats were sacrificed and expression of CAMKII, phosphorylated CAMKII (T286), PP1 and phosphorylated PP1 $\alpha$  (T320) in the hippocampus CA1 area were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, expression of CAMKII increased by  $4.4 \pm 1.2$  times ( $P < 0.05$ ), phosphorylated CAMKII (T286) increased by  $3.3 \pm 0.8$  times ( $P < 0.05$ ), expression of PP1 increased  $3.6 \pm 1.1$  times ( $P < 0.05$ ), and phosphorylated PP1 $\alpha$  (T320) expression increased by  $2.3 \pm 0.6$  times ( $P < 0.05$ ) in the model group.

**Conclusions** The expression and activity of PP1 and CAMKII increase significantly in the hippocampus CA1 area of rats with conditioned fear. PP1 and CAMKII may play important roles in the formation of long-term memory of conditioned fear.

**Key words:** conditioned fear; hippocampus; CA1 area;  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II; protein phosphatase 1

创伤后压力心理障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD) 指人在遭遇或对抗重大压力后, 出现反复重现创伤性体验, 持续的警觉性增高, 对与刺激相似或有关的情境的回避等心理障碍。近年来随着突发灾难性事件如地震、核泄露、恐怖袭击等不断发生, PTSD 发病率不断升高, 已构成重大的公

共健康问题<sup>[1]</sup>。条件性恐惧动物模型是 PTSD 对病理性重现症状的模拟, 是研究 PTSD 形成的生物学机制的常用工具<sup>[2]</sup>。目前对 PTSD 的发生和形成的神经生物学机制尚未明确。近年来大量研究表明, 蛋白激酶和蛋白磷酸酶介导的磷酸化和去磷酸化信号在突触的可塑性和学习记忆的形成和巩固起

收稿日期: 2012-10-24; 修回日期: 2012-12-07

作者简介: 王兵(1983-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事颅脑创伤基础及临床研究。Email: xjtuwb@163.com。

通讯作者: 廖勇仕(1963-), 男, 学士, 教授, 硕士生导师, 主要从事脑溢血及脑胶质瘤研究。Email: liaoy66@163.com。

重要作用<sup>[3]</sup>。本实验采用条件性恐惧大鼠模型,研究条件性恐惧长时记忆形成后,大鼠海马 CA1 区钙调蛋白激酶 II (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, CAMK II) 和蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 的表达及活性变化,对 CAMK II 和 PP1 在条件性恐惧记忆形成中的作用进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重 220~280 g,由南华大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器 条件恐惧反射训练装置及刺激装置为美国 Coulbourn Instruments 公司产品。

1.1.3 试剂 anti-CAMK II、anti-p-CAMK II (T286)、anti-PP1 和 anti-PP1 $\alpha$  (T320) 抗体为 Cell signaling technology (CST) 公司产品; RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天公司。

### 1.2 方法

1.2.1 分组 将大鼠随机分成两组,空白对照组和电击组(即环境条件性恐惧实验组),每组 9 只。

1.2.2 场景性条件性恐惧实验 将实验分为训练和检测两部分。每次训练前用 70% 乙醇擦拭训练箱。将大鼠置于测试笼中,适应 2 min 后,记录基础活动水平。然后给大鼠总共 3 次 0.8 mA,时长 2 s 的足部电击(非条件刺激,US),每次电击间隔 60 s,最后让大鼠在测试笼中继续停留 120 s,然后将其送回饲养笼。对照组为在训练时间内同样将大鼠放入大鼠测试笼中,但不给予任何刺激。训练结束后 1 h、24 h,进行记忆形成及保持能力的测试。训练结束后 1 h 检测大鼠短时记忆能力,训练结束后 24 h 检测大鼠长时记忆能力。将各组大鼠轻轻放回同一电击箱,不给予任何刺激记录大鼠 5 min 内僵住反应(Freezing)的时间。在这一行为任务中,僵住反应时间的长短反映大鼠对电击箱这一场景的恐惧记忆程度。

1.2.3 海马 CA1 区蛋白提取 大鼠训练结束 24 h(长时记忆检测结束)后,立即牺牲大鼠,迅速取出大脑,用生理盐水洗去血渍,迅速剥离出海马,分离 CA1 区组织,分别置预冷的 RIPA 裂解液中进行组织匀浆。

1.2.4 Western Blot 检测蛋白表达 用碧云天 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,调整蛋白上样量,使各组上样量一致,进行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜。用 PBST 洗脱 10 min。室温下用

5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 PBST 洗脱 3 次,加入一抗(稀释倍数为 1:300)室温温育 2 h。用 PBST 洗脱 3 次,加入相应的二抗(稀释倍数为 1:1000),温育 1 h。用 PBST 洗脱 3 次。曝光显影后用薄层扫描分析仪分析结果。

### 1.3 统计学分析

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,运用两组样本的 t 检验作统计分析,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动物行为学结果

电击组的大鼠在训练后 1 h 检测僵住反应(Freezing)时间百分比为  $(47.6 \pm 16.9)\%$ , 明显高于对照组僵住反应时间百分比  $(14.5 \pm 4.8)\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示电击刺激在大鼠成功地形成短时记忆; 电击组的大鼠在训练后 24 h 的僵住反应时间百分比为  $(77.1 \pm 14.9)\%$ , 明显高于对照组  $(34.1 \pm 15.2)\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示电击刺激在大鼠成功地形成长时记忆(见图 1)。电击组的大鼠在 1 h 和 24 h 的僵住反应较对照组有明显地增加,提示电击对大鼠的短期恐惧记忆和长期恐惧记忆的形成模型建造成功。

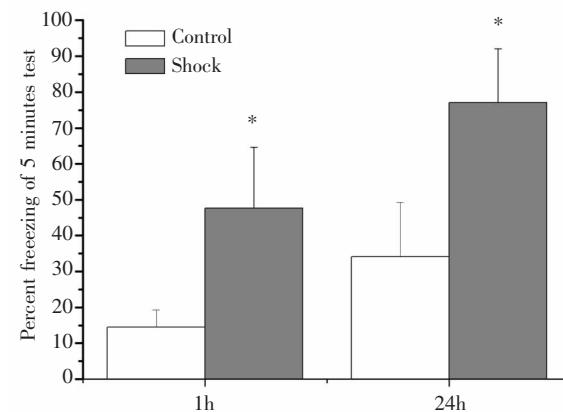


图 1 电击组(Shock)及对照组(Control)大鼠在 1 h 和 24 h 的僵住行为时间百分比。

### 2.2 CAMK II 蛋白表达检测结果

24 h 后,电击组的大鼠海马 CA1 区 CAMK II 蛋白的表达明显增加,平均灰度值较对照组增加了  $4.4 \pm 1.2$  倍,并且其 286 位的苏氨酸磷酸化信号也显著增强,286 位的苏氨酸磷酸化的 CAMK II 蛋白表达平均灰度值较对照组增加  $3.3 \pm 0.8$  倍,差

异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示电击刺激在大鼠形成长时恐惧记忆后,海马 CA1 区 CAMK II 蛋白

表达增加,活性增强。

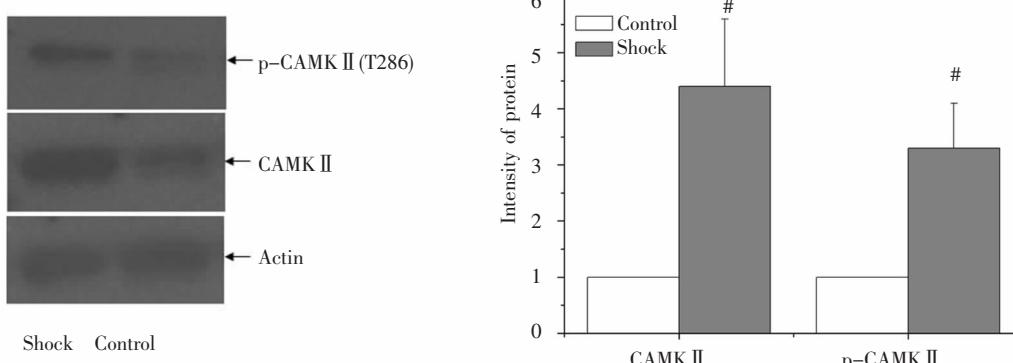


图 2 电击对海马 CA1 区 CAMK II 及磷酸化 CAMK II 蛋白表达的影响。Shock : 电击组 ; Control : 对照组。

### 2.3 PP1 $\alpha$ 蛋白表达检测结果

电击组的大鼠在 24 h 海马 CA1 区 PP1 和磷酸化 PP1 $\alpha$  蛋白表达明显增加,平均灰度值较对照组增加了  $3.6 \pm 1.1$  倍,并且 PP1 $\alpha$ 320 位的苏氨酸磷

酸化信号也增强,平均灰度值较对照组增加  $2.3 \pm 0.6$  倍,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示电击刺激在大鼠形成长时恐惧记忆后,海马 CA1 区 PP1 蛋白表达增加,活性增强。

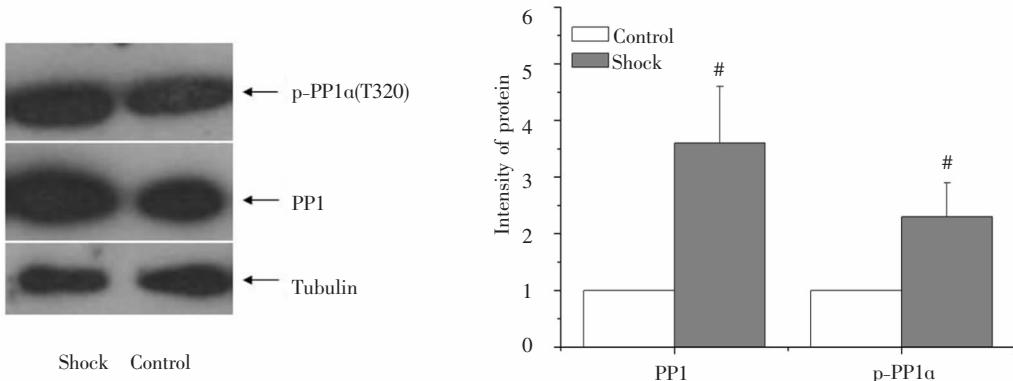


图 3 电击对海马 CA1 区 PP1 及磷酸化 PP1 $\alpha$  表达的影响。Shock : 电击组 ; Control : 对照组。

### 3 讨论

条件性恐惧 (conditioned fear) 的形成既是一种学习和记忆的过程,也是一种情绪的形成过程,研究显示恐惧情感的产生需要前额叶皮层、海马和杏仁核 3 个脑区共同激活,而环境恐惧 (contextual fear) 则更多依赖于海马区,因为直接损毁海马能够破坏条件性恐惧的获得与巩固过程<sup>[4]</sup>。本实验的条件恐惧大鼠模型,形成的是环境恐惧记忆。对学习记忆的大脑神经生物学机制的研究一直是神经科学的研究热点和难点。研究表明记忆的获得依赖于大脑神经组织的蛋白合成<sup>[4]</sup>。实验室研究

发现,海马组织 Reelin 蛋白的合成和分泌参与了条件性恐惧记忆的形成和巩固<sup>[5]</sup>。近年来,神经组织的蛋白激酶和蛋白磷酸酶参与学习记忆过程受到研究者的关注。蛋白激酶和蛋白磷酸酶一方面能够快速可逆地调节细胞内多种蛋白的磷酸化信号的强弱,包括调节对学习记忆有重要作用的 AMPA 受体 (a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxa-zolep-propionate receptor) 和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA) 受体的磷酸化和去磷酸化,从而调节突触的信号传递,对短时学习记忆起作用;另一方面,蛋白激酶和蛋白磷酸酶可以作用

于一些转录因子如 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB Protein), 对基因转录和蛋白表达进行调节, 影响突触的可塑性, 对长时学习记忆起作用<sup>[3]</sup>。

本实验发现, 大鼠条件恐惧长时记忆形成后, 海马区 CA1 区 CAMK II 蛋白表达显著升高, 并且其 286 位的酪氨酸磷酸化信号也增强, 提示 CAMK II 活性增强。CAMK II 在神经组织中有丰富的表达, 广泛分布于大脑皮质和海马等对学习记忆有重要作用的脑区组织的突触后致密物质中。研究表明, CAMK II 可以被基于 NMDA 受体的  $\text{Ca}^{2+}$  信号激活, 使 CAMK II 自我磷酸化 286 位苏氨酸后, CAMK II 即处于  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖地持续激活状态, 从而诱导长时程增强 (LTP) 信号, 在诱导突触可塑性和记忆形成过程中具有重要作用<sup>[6]</sup>。张英等<sup>[7]</sup> 研究发现 CAMK II 蛋白激酶的表达及其活性在空间学习过程中均增加, 而巨细胞病毒感染使海马神经细胞内膜蛋白 CAMK II 表达的下降, 导致学习记忆障碍。CAMK II 蛋白激酶活性受到蛋白磷酸酶 PP1 的调节, 研究发现, PP1 可以调控 CAMK II 286 位苏氨酸的磷酸化状态<sup>[8]</sup>。PP1 是一种丝/苏氨酸蛋白磷酸酶, 有  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三种亚型, 研究显示 PP1 可抑制神经突触可塑性和学习记忆, 其机制与 PP1 调控许多与突触可塑性有关的蛋白激酶如 CAMKII 的活性有关<sup>[9]</sup>。我们实验室先前的研究发现, 母爱剥夺可以影响大鼠的神经发育, 其机制可能与 PP1 $\gamma$  的表达变化有关<sup>[10]</sup>。本实验研究发现, 大鼠条件恐惧长时记忆形成后, 海马区 CA1 区 PP1 蛋白表达显著升高, 并且 PP1 $\alpha$ 320 位的酪氨酸磷酸化信号也增强。目前没有检测 PP1 磷酸化的商品化抗体, 只有针对 PP1 $\alpha$ T320 磷酸化抗体, 由于同源性的关系, CST 公司抗体说明书提示该抗体亦可检测其它亚型的磷酸化信号。说明条件性恐惧长时记忆形成后, CAMK II 和 PP1 介导的磷酸化和去磷酸化信号并不是简单的此消彼长的状态, 即不是我们实验之初设想的, 单纯地只是 CAMK II 激酶活性增强, PP1 活性减弱, 从而使神经细胞内的磷酸化信号增强; 而是在原有基础上, 两种激酶的表达和活性都

增加到一个新的水平。在这个新的水平上, 究竟是哪种激酶活性占相对优势, 神经细胞的信号转导是偏向磷酸化还是去磷酸化的一方, 其在学习记忆过程中起怎样的作用, 具体机制如何, 还需进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Rubacka JM, Schmeidler J, Nomura Y, et al. The relationship between PTSD arousal symptoms and depression among mothers exposed to the World Trade Center attacks. *J Nerv Ment Dis*, 2008, 196(6): 504-507.
- [2] Siegmund A, Wotjak CT. A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *J Psychiatr Res*, 2007, 41(10): 848-860.
- [3] Mayford M. Protein kinase signaling in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17(3): 313-317.
- [4] Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, et al. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 2011, 147(3): 509-524.
- [5] Qin L, Tu W, Sun X, et al. Retardation of neurobehavioral development and reelin down-regulation regulated by further DNA methylation in the hippocampus of the rat pups are associated with maternal deprivation. *Behav Brain Res*, 2011, 217(1): 142-147.
- [6] Yasuda M, Mayford MR. CaMKII activation in the entorhinal cortex disrupts previously encoded spatial memory. *Neuron*, 2006, 50(2): 309-318.
- [7] 张英, 曹云霞, 程蕊恒, 等. 巨细胞病毒感染小鼠学习记忆与 CaMK II 表达的变化. 实用医学杂志, 2008, 24(13): 2202-2204.
- [8] Makinson M, Chotiner JK, Watson JB, et al. Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II auto-phosphorylation. *J Neurosci*, 1999, 19(7): 2500-2510.
- [9] Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, et al. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 2002, 418(6901): 970-975.
- [10] 涂文强, 孙秀敏, 秦丽娜, 等. 母爱剥夺对大鼠海马 PP1 $\gamma$  表达与神经发育的影响. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20(3): 218-221.