

强迫性冷水游泳应激对大鼠行为和海马神经颗粒素的影响^{*}

李欢欢¹ 林文娟¹ 李俊发²

(¹中国科学院心理研究所脑-行为研究中心,北京 100101) (²首都医科大学神经生物学教研室,北京 100054)

摘要 为考察应激对海马神经颗粒素含量和磷酸化水平的影响,以及神经颗粒素是否涉及应激所致行为效应的脑机制,采用强迫性冷水游泳应激模型,选取 40只 Sprague-Dawley大鼠,随机分为应激组、装置对照组和正常对照组 1和正常对照组 2。以旷场试验法测定应激前后大鼠行为的变化,以 Western blotting技术测定大鼠海马区域神经颗粒素的总含量和磷酸化水平,并分析两者之间的相互关系。结果表明:应激组动物活动增加,表现出焦虑行为;而海马区域神经颗粒素含量降低,与对照组相比差异具有显著性;且多项行为指标的变化与海马神经颗粒素含量的改变呈显著相关。这些结果提示神经颗粒素有可能在应激所致焦虑行为中起作用,可作为预测应激所致焦虑行为的较为敏感的指标之一。慢性应激过程中海马区域没有发现神经颗粒素的磷酸化反应。

关键词 应激,行为,神经颗粒素,海马。

分类号 B845

1 前言

有关应激所致行为改变的脑机制这一问题,是近来神经科学关注的热点。大量研究表明,海马是在应激所致行为变化过程中起重要作用的脑结构。应激主要是通过影响海马区域的突触可塑性机制,包括导致海马神经元形态改变或细胞丢失以及影响该区域的突触传递效能(如长时程增强,LTP)来引起动物行为方面的障碍,但在多种形式的突触可塑性之下发生的细胞和分子事件目前仍未弄清。在应激过程中,大量分子可以通过某些途径介导或调节多个脑区不同形式的突触可塑性,因而可能在应激所致行为变化中起作用。然而,直到现在,仍有许多涉及应激过程的脑内物质分子以及它们可能影响行为的机制尚待查明。神经颗粒素(Neurogranin, NG)作为一种新近发现的脑特异性蛋白质,主要分布在前脑和海马^[1~5]。相关研究表明它参与了几种脑内蛋白质信号传导途径、LTP和长时程抑制(Long-term depression, LTD)等多种形式的突触可塑性机制,与学习记忆关系密切^[6~12],并且在某些应激情况下(睡眠剥夺、电惊厥),部分脑区的NG蛋白含

量和磷酸化水平下降^[13,14]。这提示在应激过程中,NG可能作为信号传导途径的中介物质之一,通过介导或调节突触可塑性,在应激致动物行为改变过程中发挥作用;也可能只是应激过程中大脑发生改变的物质基础之一,而与应激所致的行为改变无明显关系。由此,本研究采用强迫冷水游泳应激模型,同时建立动物行为学观测指标。考察应激所致行为改变时,大鼠与行为有重要关系的脑区海马NG含量和磷酸化作用的变化。以探讨应激、行为改变和NG之间的关系,旨在对脑与行为关系的理解及有关的脑机制的研究提供一个新的观点。

2 材料与方法

2.1 实验动物及分组

实验选用雄性 Sprague-Dawley大鼠 40只,购自维通利华实验动物中心,体重 250g以上,单笼喂养。饲养大鼠的实验室内光暗周期为 12h/12h(光照时间 08:00~20:00),室内温度为 22±0.5,湿度为 50%左右。自大鼠进入实验室饲养开始计算,给予 7天的适应期。适应期内所有动物自由摄食和饮水,每天接受 3分钟抚摸,不施予其他任何处理。

收稿日期:2004-05-27

^{*}中国科学院创新工程(KSCX2-2-03)和国家自然科学基金(NO.30370482)资助。

通讯作者:林文娟, E-mail: Linwj@psych.ac.cn

7天适应期结束后开始进入应激期,应激期为两周。大鼠随机分为四组:应激组、装置对照组和正常对照组1和正常对照组2,每组为10只。应激期内,应激组每天上午8点开始被置于水温10℃,水深为20cm的水池(150cm×40cm×90cm,长×宽×高)中强迫游泳,每次5min,持续两周,同时,对应激组每只大鼠在每天5min应激过程中的排便量进行记录。装置对照组被放入不注水的水池中,每天1次,每次5min,之后放回笼中饲养,也持续两周时间,同样也对该组的每只大鼠每天在水池中的排便量进行记录。正常对照组1只接受两次旷场行为测试,正常对照组2不进行任何处理,在笼中饲养。所有动物在适应期开始、适应期末、应激第7天和应激第14天共称四次体重,以考察动物的适应情况和应激的强度。

2.2 仪器和试剂

离心机、紫外分光光度计为Beckman公司的产品。Gel Doc凝胶成像半定量分析系统构自Bio-Rad公司。

第一抗体抗NG蛋白多克隆抗体、抗磷酸化NG多克隆抗体、 β -Actin单克隆抗体、第二抗体辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体、山羊抗鼠IgG抗体、BCA(bicinchoninic acid)蛋白检测试剂盒、buffer(全细胞裂解液)、硝酸纤维素膜(Nitrocellulose filter, NC)均为Sigma公司产品,增强型化学发光系统(ECL)试剂盒购自美国Pierce公司。

2.3 行为学测试

采用旷场实验程序,对应激组、装置对照组和正常对照组1的每只动物在应激前后共进行两次行为测试。将动物置于高50cm、直径180cm、周边和底面均为黑色的圆形旷场中,光照度为60lux,室内隔音。观察者在行为实验室内用摄像系统记录动物在旷场内前5min和总共15min的行为表现,包括水平活动距离、直立的次数(Rearing)、修饰、探究、呆滞和排便量。其中水平活动距离和探究通过行为跟踪分析系统获得数据,直立、修饰行为是根据行为摄像仪统计发生的次数。每只动物的排便量是以旷场试验结束后排便的颗粒数来表示。

2.4 海马NG蛋白含量和磷酸化水平的测定

应激实验结束次日,对三组大鼠进行行为测试后,立即快速断头处死所有大鼠,剥离海马组织并迅速用液氮冷却。

2.4.1 海马细胞总蛋白质的制备 三组大鼠的海马组织在预冷的蛋白质提取缓冲液(50mM Tris - Cl

pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 50mM OKA, 1%蛋白酶抑制剂混合物)中匀浆,冰上超声裂解5min,4℃离心30min,去除细胞碎片,吸取上清液,即为细胞总蛋白质。上清液中加入BCA液摇匀,在37℃水浴箱中温育30min,通过蛋白质分光光度计对样品的海马总蛋白质浓度进行测定,立即用于蛋白质印迹分析。测定每一样品的海马组织的总蛋白浓度,目的是根据样品海马总蛋白含量计算出每一样品跑电泳所需加入的缓冲液量,将所有样品海马的总蛋白浓度配齐为 $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$,以确保每一样品进行电泳的总蛋白含量一致。

2.4.2 蛋白质印迹分析(Western blotting) 采用Western blotting技术测定大鼠海马区域NG蛋白含量和磷酸化水平^[15-18]。30 μg 蛋白质在15%的聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转移至NC膜,NC膜以封闭液(10%脱脂奶粉,1%牛血清白蛋白,溶于TBS)室温封闭1h,用TBS洗膜,10min×3次。在抗NG、 β -Actin和Phospho NG的一抗溶液(抗体用TBS缓冲液1:1000稀释)中室温孵育3小时,再用TBS洗膜,10min×3次。在HRP标记的TBS液稀释羊抗兔(NG, Phospho NG)和羊抗小鼠(β -Actin)的二抗溶液(抗体用TBS缓冲液1:4000稀释)孵育,室温振荡1h,同样洗膜3次。加入ECL荧光标记,对NC膜上的NG蛋白、 β -Actin和Phospho NG条带以胶片曝光显迹。X光片上的信号用图像分析仪(Bio-Rad)进行光密度扫描分析。三组大鼠的海马NG含量的指标均是以同一张NC膜上的NG含量与 β -Actin含量的比值来表示。

2.5 统计方法

应激组和对照组大鼠海马区域NG含量以及旷场行为指标之间的比较采用one-way ANOVA。旷场行为指标与海马的NG水平的相关分析采用Pearson积差相关和Spearman等级相关。应激过程中,应激组和装置对照组排便量的比较采用独立样本t检验。

3 结果

3.1 应激前后各组动物的行为测试

3.1.1 旷场行为 应激前,三组动物在旷场行为测试中水平活动距离、直立次数、修饰行为、呆滞行为和排便量均无显著差异($p>0.05$)。

经过两周的持续冷水游泳应激后,三组大鼠的15min内直立次数和探究行为、以及前5min和总15min内的修饰行为总体比较差异显著($F=6.04, p$

=0.01; $F = 18.81, p < 0.01$; $F = 13.91, p < 0.01$; $F = 16.85, p < 0.01$ 。与正常对照组 1 相比, 应激组动物在旷场测试中的多项指标, 包括前 5min 和总 15min 时间内修饰行为, 15min 内直立次数和探究行为均显著增加 ($p < 0.01$); 与装置对照组相比, 应激

组动物的前 5min 和总 15min 时间内修饰行为显著增加 ($p < 0.01$), 而在其余行为指标上无统计学显著差异。三组动物在旷场测试中的排便量总体比较无显著差异。结果见表 1。

表 1 应激前、后三组大鼠旷场行为指标的比较 ($M \pm SD$)

	适应期末					应激期末				
	应激组	装置对照组	正常对照组 1	F	p	应激组	装置对照组	正常对照组 1	F	p
水平活动 (cm)										
前 5分钟	6255.27 ± 1920.56	7034.55 ± 1442.40	5470.18 ± 184.46	2.56	0.10	7255.27 ± 2099.04	7051.46 ± 2139.67	6786.91 ± 2227.40	0.12	0.89
15分钟	17498.91 ± 3120.51	16590.36 ± 4335.39	16006.18 ± 3202.74	0.44	0.65	19294.18 ± 5785.14	18768.00 ± 4566.16	14301.82 ± 3912.18	3.24	0.06
垂直活动 (次数)										
前 5分钟	13.00 ± 6.00	16.30 ± 6.83	12.60 ± 4.88	1.16	0.33	16.40 ± 6.26	15.10 ± 4.48	10.44 ± 6.09	2.87	0.08
15分钟	33.10 ± 10.75	44.70 ± 13.84	36.00 ± 12.50	2.36	0.11	51.50 ± 20.82**	46.40 ± 14.21**	26.33 ± 13.19	6.04	0.01
修饰行为 (次数)										
前 5分钟	0.90 ± 0.88	1.30 ± 1.34	1.10 ± 0.57	0.42	0.66	2.50 ± 1.18*	1.00 ± 1.05	0.22 ± 0.44	13.91	<0.001
15分钟	3.20 ± 1.75	4.10 ± 1.45	3.60 ± 1.17	0.93	0.41	6.10 ± 2.13*	3.00 ± 1.63	1.67 ± 1.23	16.85	<0.001
探究行为 (次数)										
前 5分钟	0.90 ± 1.45	0.30 ± 0.48	0.10 ± 0.32	2.14	0.14	2.40 ± 2.32	1.60 ± 1.51	0.70 ± 1.49	2.20	0.13
15分钟	4.30 ± 2.79	3.10 ± 3.35	1.60 ± 2.12	2.34	0.12	12.40 ± 5.84**	9.20 ± 3.71**	1.20 ± 2.30	18.81	<0.001
排便量	5.40 ± 3.13	3.50 ± 1.65	3.40 ± 3.34	1.61	0.22	2.00 ± 3.30	2.60 ± 2.63	4.60 ± 3.31	1.93	0.16

注: ** $p < 0.01$, 与正常对照组相比; * $p < 0.01$, 相邻两组比较

3.1.2 体重 适应期开始、适应期末和应激第 7 天, 四组动物的体重总体差异显著。适应期前后, 正常对照组 2 体重均显著低于应激组、装置对照组和正常对照组 1。至应激第 7 天, 应激组和装置对照组体重则显著低于正常对照组 1 和正常对照组 2,

正常对照组之间的体重比较差异无显著性。至应激第 14 天, 四组动物的体重总体比较差异无显著性 ($p > 0.05$)。应激过程中, 应激组和装置对照组的体重增长趋势相对缓慢。见表 2。

表 2 不同时间段三组大鼠的体重差异比较 ($g, M \pm SD$)

日期	应激组	装置对照组	正常对照组 1	正常对照组 2	F	p
适应期第 1 天	259.00 ± 14.02**	253.91 ± 14.32**	256.91 ± 10.99**	232.27 ± 16.8	7.58	<0.001
适应期第 7 天	314.03 ± 18.78**	309.54 ± 15.16**	315.35 ± 16.64**	273.55 ± 27.84	9.66	<0.001
应激期第 7 天	358.23 ± 26.38**	361.41 ± 21.18**	381.40 ± 18.47	394.79 ± 34.26	4.48	0.01
应激期第 14 天	386.09 ± 35.06	394.10 ± 34.85	418.22 ± 26.10	419.57 ± 37.15	2.55	0.07

注: ** $p < 0.01$, 与正常对照组 2 相比

3.1.3 排便反应 本研究对应激过程中, 应激组和装置对照组每天的排便量进行比较, 结果显示: 从应激第 4 天直到应激第 14 天, 应激组和装置对照组的排便量均表现出显著差异, 应激组的排便量显著高于装置对照组 ($p < 0.001$)。而应激第 1 天到应激第 3 天, 两组动物的排便量没有显著差异 ($p > 0.05$)。见表 3。

3.2 应激前后各组动物海马 NG 蛋白含量和磷酸化水平

通过 Western-blotting 分析发现, 应激组和装

置对照组海马区域的 NG 蛋白质条带密度表达显著低于正常对照组 1 和正常对照组 2, 而 -Actin 蛋白质条带在四组大鼠中表达均一 (见图 1)。方差分析显示: 四组大鼠海马区域 NG 含量之间的总体差异显著, $F(3, 36) = 19.64, p < 0.001$ 。两两比较结果显示: 应激组、装置对照组与正常对照组 1、2 相比均有显著下降 ($p < 0.01$), 装置对照组的海马 NG 含量介于应激组和正常对照组之间 (见表 4), 两组正常对照组之间的海马 NG 含量无显著差异。四组大鼠海马区域均未检测到磷酸化的 NG。

表 3 应激期应激组和装置对照组排便量差异的比较 (粪便颗粒数, $M \pm SD$)

时间	应激组	装置对照组	<i>t</i>	<i>p</i>
应激第 1 天	4.50 ± 0.01	5.00 ± 1.76	-0.59	0.56
应激第 2 天	4.50 ± 1.72	3.30 ± 2.58	1.22	0.24
应激第 3 天	5.70 ± 2.21	4.10 ± 3.70	1.18	0.26
应激第 4 天	8.00 ± 1.25	2.90 ± 2.64	5.52	<0.001
应激第 5 天	5.10 ± 2.13	1.60 ± 2.32	3.51	<0.001
应激第 6 天	6.80 ± 1.69	1.40 ± 2.50	5.66	<0.001
应激第 7 天	6.20 ± 2.15	1.40 ± 2.27	4.85	<0.001
应激第 8 天	5.80 ± 2.04	1.20 ± 1.99	5.10	<0.001
应激第 9 天	6.10 ± 2.42	1.50 ± 2.07	4.57	<0.001
应激第 10 天	6.90 ± 2.42	2.00 ± 3.40	3.71	<0.001
应激第 11 天	6.80 ± 1.75	1.50 ± 2.46	5.55	<0.001
应激第 12 天	6.60 ± 1.90	1.00 ± 2.11	6.24	<0.001
应激第 13 天	7.80 ± 1.81	0.70 ± 1.49	9.55	<0.001
应激第 14 天	5.20 ± 2.04	1.10 ± 1.79	4.77	<0.001

3.3 各组动物行为改变与海马区域 NG 蛋白含量变化的相关分析

相关分析结果显示:旷场行为中的探究行为与水平活动、直立次数之间的相关显著,修饰行为与其余旷场行为指标之间无显著相关;动物海马 NG 含量与应激后旷场行为各项指标均呈负相关,其中与探究行为(15 分钟)、修饰行为(前 5 分钟、15 分钟)、水平活动距离和直立次数(前 5 分钟)之间的相关具有统计学上的显著意义。结果见表 5。

4 讨论

4.1 强迫性冷水游泳应激对大鼠旷场行为的影响

强迫性冷水游泳应激是目前最为常用的考察抗抑郁剂效应的一种行为绝望范式,它是一种生理性、能造成潜在痛苦感受的应激源^[17]。也有研究者认为,强迫性冷水游泳虽然是一种生理性的应激源,但

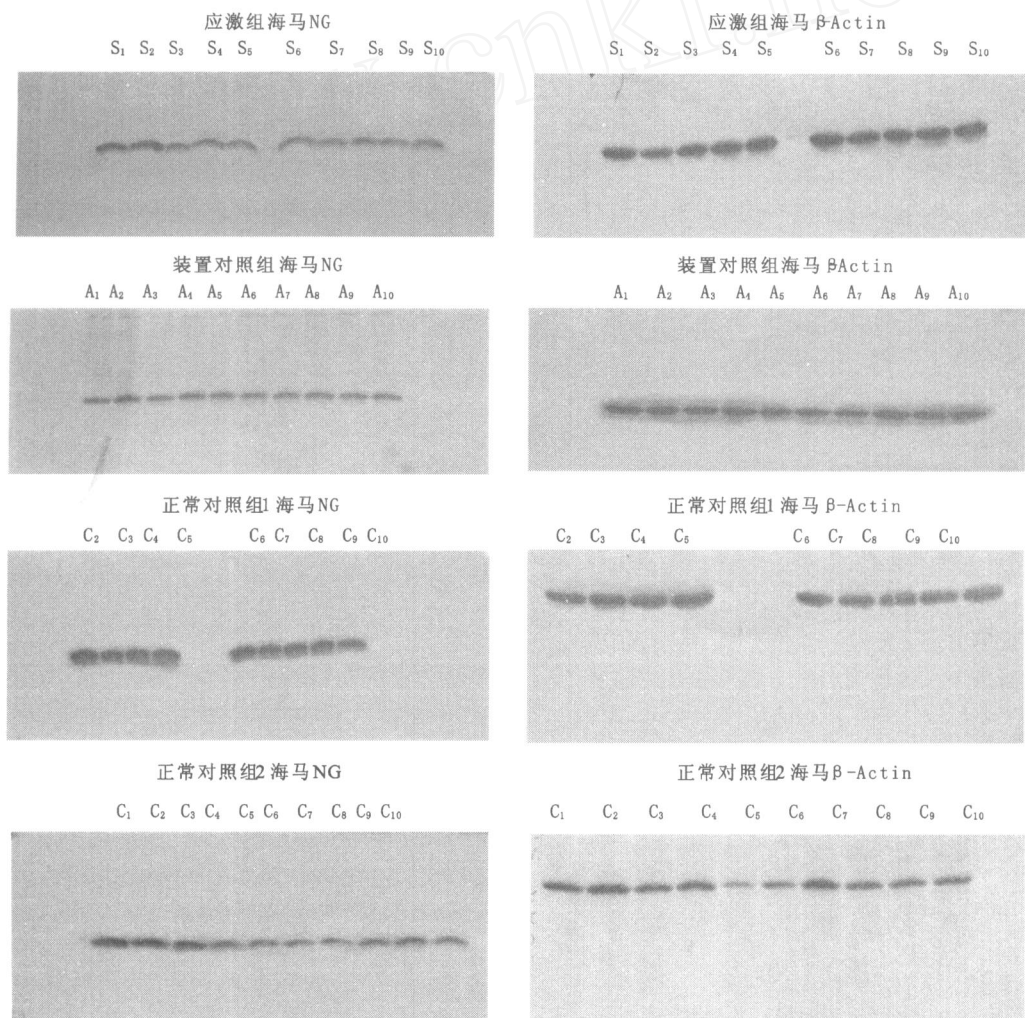


图 1 四组大鼠海马 NG - Actin 蛋白质条带表达图

表 4 三组大鼠海马区域 NG 蛋白含量的比较 (Odu, $M \pm SD$)

应激组	装置对照组	正常对照组 1	正常对照组 2	F	p
0.66 ± 0.13 ^{**}	0.94 ± 0.26 ^{**}	1.93 ± 0.53	1.46 ± 0.51	19.64	< 0.001

注: ** $p < 0.01$, 与正常对照组 1 相比

$p < 0.05$, 与正常对照组 2 相比; $p < 0.01$, 与正常对照组 2 相比

表 5 各旷场行为指标之间及旷场行为指标与海马 NG 含量之间的相关分析 (r)

	前 5 分钟 探究行为	15 分钟 探究行为	前 5 分钟 水平活动	15 分钟 水平活动	前 5 分钟 修饰行为	15 分钟 修饰行为	前 5 分钟 直立次数	15 分钟 直立次数
15 分钟探究行为	0.640 ^{**}							
前 5 分钟水平活动距离	0.439 [*]	0.284						
15 分钟水平活动距离	0.231	0.626 ^{**}	0.571 ^{**}					
前 5 分钟修饰行为	0.091	0.224	- 0.193	- 0.093				
15 分钟修饰行为	0.102	0.312	- 0.175	- 0.110	0.834 ^{**}			
前 5 分钟直立次数	0.520 ^{**}	0.629 ^{**}	0.234	0.391 [*]	0.308	0.360		
15 分钟直立次数	0.421 [*]	0.564 ^{**}	0.288	0.394 [*]	0.222	0.274	0.847 ^{**}	
海马 NG 含量	- 0.234	- 0.665 ^{**}	- 0.407 [*]	- 0.029	- 0.636 ^{**}	- 0.770 ^{**}	- 0.414 [*]	- 0.386

注: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

是也掺杂了较多的心理因素^[18,19],可看作一种生理心理性应激源。有研究表明,生理应激源所引起的大鼠行为改变主要表现为活动和探究行为减少^[17,20],因而能诱发抑郁。本研究结果显示,在游泳应激结束后,应激组大鼠在旷场任务中的行为表现为总 15 分钟内活动明显增加,包括水平活动距离,探究行为、修饰行为和直立的频率。而在前 5 分钟内除水平活动距离之外,其余的行为频率也有显著的增加。动物并没有出现明显的呆滞,活动减少等抑郁表现。提示本研究所施予的慢性应激源产生了一种类焦虑效应。众所周知,应激、焦虑和抑郁是相关现象。临床研究也提示,抑郁的症状群中常伴随焦虑,焦虑还可能是某些类型抑郁症的前驱症状^[21]。因而在本研究中,强迫性冷水游泳应激所致的焦虑效应有可能是抑郁的前驱表现。也可能是冷水游泳应激本身的复杂性质所致,因为该应激源除了具有生理应激的特征(寒冷),还带有很强的心理成分(如新异性、恐惧),因而产生了类似情绪应激的效应,导致大鼠在旷场测试中出现类焦虑的行为(Anxiety-like behavior, ALB)。此外,本研究还发现,旷场行为指标中的水平活动、直立次数和探究行为之间相关显著,表明这些指标共同反映了动物旷场行为中量的变化。修饰行为与这些行为指标无显著相关,但与海马 NG 含量相关达显著水平,提示该指标与上述行为指标不同,它所反映的并不是活动量的变化,而可能是反映动物情绪,如焦虑的敏感性

为指标。

4.2 强迫性冷水游泳应激对大鼠海马的 NG 蛋白含量和磷酸化作用的影响

本研究发现,应激组和装置对照组海马的 NG 蛋白含量显著下降。这与 Neuner - Jehle 等考察睡眠剥夺对大鼠脑 NG 蛋白质水平影响的研究发现一致^[13]。由于 NG 在海马区域含量丰富,并且主要定位于神经元的树突棘上。而海马是最易受应激累及的脑区,慢性应激过程中,由于中枢糖皮质激素和兴奋性氨基酸水平的持续增加,产生兴奋毒性作用可导致海马神经元数量减少和缺失^[22]。因此,本研究中应激组和装置对照组海马区域 NG 蛋白含量减少的现象可能是海马区域神经元形态学发生改变的指征,反映了神经元突起数量的减少。相对而言,游泳应激程度较强,动物难于适应,表现在游泳组动物体重增长最为缓慢,并且每天的应激过程中均有显著的排便反应,因而该组动物海马神经元损伤程度可能最重,NG 含量下降最为明显。此外,装置对照组的体重增长也较对照组缓慢,表明装置对照组动物每天接受的是单一的新异环境的应激(在无水的游泳容器中),虽然从应激第 4 天起,动物在装置中已无明显的排便反应,表现出了行为上的适应,但是该组动物海马 NG 蛋白水平仍显著低于对照组,说明海马对应激十分敏感,即使是慢性轻微的应激也能导致该区域神经元的不可逆损伤。本研究中,在应激组和装置对照组海马区域均未检测出磷酸化的

NG₂可能是由于蛋白质磷酸化调节的速度较快,主要是有利于细胞对外界的快速反应。因而在急性严重应激时容易观察到脑内蛋白质磷酸化水平的变化,而慢性应激后则不易观察到这种现象。此外,也可能是由于机体的适应,或是磷酸酯酶活性增高,或是海马NG数量减少等多种原因导致NG磷酸化水平下降和快速去磷酸化,从而在实验中检测不到海马区域磷酸化的NG₂。这需要在以后的研究中进一步证实。

4.3 强迫性冷水游泳应激引起大鼠的行为改变与海马NG蛋白含量变化的相互关系

应激能够影响中枢神经系统的形态结构和相关的物质分子,这是应激产生行为效应的中枢物质基础。海马是一方面易受应激累及的敏感脑区,另一方面与行为功能、学习、记忆和情绪密切相关。因而在应激所致行为效应的脑机制研究中具有重要的意义。本研究发现,海马区域NG水平的下降与应激后旷场行为的多项指标,尤其是修饰行为呈显著负相关,提示海马NG蛋白水平可能是预测应激所致焦虑行为的一项较为敏感的生物学指标,它可能是涉及到应激所致行为改变的重要物质分子之一。

参 考 文 献

- 1 Watson J B, Sutcliffe J G, Fisher R S. Localization of the protein kinase C phosphorylation/calmodulin-binding substrate RC3 in dendritic spines of neostriatal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89 (18): 8581 ~ 8585
- 2 Houben M P, Lankhorst A J, van Dalen J J, et al. Pre- and postsynaptic localization of RC3/neurogranin in the adult rat spinal cord: an immunohistochemical study. *The Journal of Neuroscience Research*, 2000, 59(6): 750 ~ 759
- 3 Pak J H, Huang F L, Li J, et al. Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(21): 11232 ~ 11237
- 4 Miyakawa T, Yared E, Pak J H, et al. Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components. *Hippocampus*, 2001, 11 (6): 763 ~ 775
- 5 Neuner - Jehle M, Denizot J P, Mallet J. Neurogranin is locally concentrated in rat cortical and hippocampal neurons. *Brain Research*, 1996, 733(1): 149 ~ 154
- 6 Gerendasy D. Homeostatic tuning of Ca²⁺ signal transduction by members of the calpain protein family. *Journal of neuroscience research*, 1999, 58(1): 107 ~ 119
- 7 Ramakers G M, Heinen K, Gispen W H, et al. Long term depression in the CA1 field is associated with a transient decrease in pre- and postsynaptic PKC substrate phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275(37): 28682 ~ 28687
- 8 Slemmon J R, Feng B, Erhardt J A. Small proteins that modulate calmodulin-dependent signal transduction: effects of PEP-19, neuromodulin, and neurogranin on enzyme activation and cellular homeostasis. *Molecular neurobiology*, 2000, 22(1-3): 99 ~ 113
- 9 Ramakers G M, De Graan P N, Urban I J, et al. Temporal differences in the phosphorylation state of pre- and postsynaptic protein kinase C substrates B-50/GAP-43 and neurogranin during long-term potentiation. *The Journal of biological chemistry*, 1995, 270(23): 13892 ~ 13898
- 10 Ramakers G M, Pasinelli P, van Beest M, et al. Activation of pre- and postsynaptic protein kinase C during tetraethylammonium-induced long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 2000, 286(1): 53 ~ 56
- 11 Mons N, Enderlin V, Jaffard R, et al. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *Journal of neurochemistry*, 2001, 79(4): 859 ~ 867
- 12 Fedorov N B, Pasinelli P, Oestreicher A B, et al. Antibodies to postsynaptic PKC substrate neurogranin prevent long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *The European journal of neuroscience*, 1995, 7(4): 819 ~ 822
- 13 Neuner - Jehle M, Rhyner T A, Borbely A A. Sleep deprivation differentially alters the mRNA and protein levels of neurogranin in rat brain. *Brain Research*, 1995, 685(1-2): 143 ~ 153
- 14 Chen C C. Alterations of protein kinase C isozyme and substrate proteins in mouse brain after electroconvulsive seizures. *Brain Research*, 1994, 648(1): 65 ~ 72
- 15 Wu J F, Li J F, Huang K P, et al. Attenuation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase signal transduction in the neurogranin knockout mouse. *The journal of biological chemistry*, 2002, 277(22): 19498 ~ 19505
- 16 Chen S J, Sweatt J D, Klann E. Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Research*, 1997, 749: 181 ~ 187
- 17 Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are female different? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2001, 25: 219 ~ 223
- 18 Dal - Zotto S, Marti O, Amario A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, 2000, 114: 175 ~ 181
- 19 Bilang - Bleue A, Rech J, De Carli S, et al. Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structure in the rat. *The European journal of neuroscience*, 2002, 15(6): 1048 ~ 1060
- 20 Pijman F T A, Herremans A H J, Kieft J. Behavioural changes after different stress paradigms: prepulse inhibition increased after

- physical, but not emotional stress European
neuropsychopharmacology, 2003, 13: 369 ~ 380
- 21 Paul S M. Anxiety and depression: a common neurobiological
substrate? The Journal of clinical psychiatry, 1988, 49: 13 ~ 16
- 22 Metz G A S, Schwab M E, Welzl H. The effects of acute and
chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats
Physiology & Behavior, 2001, 72: 29 ~ 35

THE EFFECT OF FORCED COLD - WATER SWIMMING STRESS ON BEHAVIOR AND NEUROGRANIN LEVEL OF BRAIN IN RATS

Li Huanhuan¹, Lin Wenjuan¹, Li Junfa²

(¹Brain - Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(²Department of neurobiology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

Abstract

To explore the effects of stress on the hippocampal protein and phosphorylation levels of neurogranin, and the possible role of neurogranin involving in the brain mechanisms underlying stress-induced behavioral changes, in this present study, forced cold-water swimming was used as a stressor, and 40 male Sprague-Dawley rats were randomly distributed into four groups: swimming group, apparatus controls and two cage control groups in the present study. Behavioral changes in rats after stress were observed by open-field test, and neurogranin level of hippocampus was determined by Western blotting. The results showed that neurogranin level of hippocampus in swimming rats was significantly lower than that in apparatus controls or cage controls although changes in phosphorylation of neurogranin on hippocampus was not detected. Moreover, activity of the swimming group also significantly increased. Almost all of the behaviors observed were negatively correlated with the level of neurogranin of hippocampus. These results suggested that neurogranin may play a role in stress-induced anxious behaviors, and could be a sensitive predictor of anxiogenic effect of stress.

Key words stress, behavior, neurogranin, hippocampus