

慢性应激对大鼠空间学习记忆及海马和前脑皮层突触体膜流动性的影响^{*}

李 亚¹ 孔 宏¹ 宋 倩¹ 蔡景霞²

(¹曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜 273165) (²中国科学院昆明动物研究所脑与行为研究室, 昆明 650223)

摘 要 慢性应激对学习记忆功能的影响是神经科学的热点问题, 在脑内, 海马和前额叶是与学习记忆功能密切相关的重要脑区, 也是应激易累及损伤的主要靶区。膜流动性的改变在神经细胞功能活动中起重要作用。为探讨慢性应激对大鼠空间学习记忆功能的影响及前脑皮层和海马突触体膜流动性的作用。采用多因素慢性应激动物模型, 通过开场试验和 Morris 水迷宫测试大鼠行为及空间学习记忆能力; 并且测定大鼠前脑皮层和海马突触体膜流动性和突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的变化。研究结果显示, 与对照组相比, 应激组大鼠在应激后即刻, 在新异环境中的自发活动和探究行为显著降低($p < 0.05$, $p < 0.01$), 空间学习记忆能力明显下降($p < 0.05$, $p < 0.01$); 并且应激组大鼠前脑皮层和海马突触体膜流动性显著降低($p < 0.05$, $p < 0.01$); 而突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的显著增加 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。停止应激后一周, 应激大鼠的各项指标有所恢复, 但仍未达到正常水平。研究结果提示, 慢性应激引起大鼠明显的开场行为改变和空间学习记忆功能障碍, 这些变化可能与突触体膜流动性和突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的变化密切相关。

关键词 慢性应激; 空间学习记忆; 膜流动性; 海马; 前脑皮层

分类号 B845;Q427

应激是机体受到外界刺激后产生的非特异性适应反应。适度应激刺激有助于学习记忆功能的提高, 当人或动物处于强烈的急性应激或长期慢性应激状态时, 其学习记忆能力会受到明显的影响(Quervain, Roozendaal & Gaugh, 1998; Coburn-Litvak, Pothakos, Tata, McCloskey & Anderson, 2003)。慢性躯体性、心理性或复合应激均可损伤动物的空间学习记忆功能(Ohl & Fuchs, 1999; Buwalda, et al., 2005)。在脑内, 海马和前额叶是与学习记忆功能密切相关的重要脑区, 也是应激易累及损伤的主要靶区(McEwen, 2006)。研究报道, 慢性应激或长期外源性应激激素(糖皮质激素)处理后, 海马依赖的空间学习记忆能力明显受损, 这可能与应激导致突触体结构的改变(Kole, Costoli, Koolhaas & Fuchs, 2004)、神经细胞发生的消失(Karten, Olariu & Cameron, 2005)有密切关系。慢性

应激亦可引起机体神经精神系统功能失调, 导致衰老过程加速、痴呆、抑郁等疾病(Lupien, McEwen, Gunnar & Heim, 2009), 而这多与前额叶的功能密切相关。在应激后, 前额叶依赖的工作记忆能力受到显著损伤(Arnsten, 2004; Mizoguchi, Ishige, Takeda, Aburada & Tabira, 2004)。

细胞膜流动性一般是指膜脂质的流动性, 适宜的膜脂流动性是维持生物膜正常功能的必须条件。膜流动性的改变将影响各种膜功能, 膜功能一旦紊乱, 会导致膜电位、离子通透性、跨膜物质运输、信号转导等一系列生理障碍。而钙浓度、膜蛋白含量、膜脂质过氧化、膜脂质成分的改变均可引起神经细胞膜流动性的变化。因此膜流动性是反映细胞功能的一个重要而敏感的指标(林克椿, 聂松青, 1985); 脑的许多疾病的病理发生发展过程中, 膜流动性也显示相应的改变。许多药物则可以通过改

收稿日期: 2009-03-16

^{*} 国家自然科学基金项目(30070251); 曲阜师范大学“十一五”计划省级重点建设项目和博士科研项目(Bsqd200515)。

通讯作者: 蔡景霞, E-mail: caijxia@mail.kiz.ac.cn

变膜流动性而发挥治疗作用。本研究采用多因素慢性应激动物模型,检测大鼠开场行为和 Morris 水迷宫空间学习记忆能力,并且测定大鼠前脑皮层和海马突触体膜流动性、突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的变化,以探讨慢性应激对空间学习记忆功能的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

雄性健康 Sprague-Dawley 大鼠,2 月龄,体重 100~120g,由中国医学科学院医学生物研究所提供。实验用大鼠在实验室饲养间适应 1 周。饲养间 12h 明亮/黑暗交替,室内温度为 $21\pm 1^\circ\text{C}$,动物可以随意采食和饮水。每周称量体重一次。将动物随机分为对照组和慢性应激组,每组 18 只,应激组大鼠共接受 21d 不同的应激,采用四种应激方式:足底电击(电压 36V,每隔 1min 刺激一次,每次持续 10s,共 15 次)、噪音(80~90dB,每次 3min,每隔 2min 一次,共 5 次)、束缚(1h/d)、束缚+热刺激(1h/d, 30°C)。每天随机选择一种应激方式作用于应激组动物。对照组动物不接受实验应激源,以同样的条件饲养。分别在应激后即刻及停止应激后一周对应激组和对对照组动物进行开场行为测试和 Morris 水迷宫试验,大鼠前脑皮层和海马突触体膜流动性及游离 Ca^{2+} 浓度检测。

1.2 开场(Open field)行为测试

开场行为测试箱为 $40\text{cm}\times 40\text{cm}\times 30\text{cm}$,底部分成 $5\times 5=25$ 个方格,测试箱上方放置一个 60W 的灯光,距离测试箱顶 60 cm。实验时,将动物放在中央格内,记录 5min 内动物跑动穿越的格数、直立次数、梳理次数和中央格停留时间。

1.3 Morris 水迷宫学习记忆能力检测

Morris 水迷宫测试程序包括定位航行和空间搜索两部分。水迷宫被人为划分为四个象限,平台置于第 I 象限(目标象限),在水池周边的布帘上做明显标志物。水温 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 。定位航行试验历时 2 d,每只动物每天接受 8 次找平台训练,分两个训练周期(上午和下午),每个训练周期 4 次,每次对应一个象限将动物头朝水池壁轻轻放入水中,每次训练 2min。记录大鼠寻找到隐藏在水下平台的时间即逃避潜伏期(escape latency)。空间搜索试验是在定位航行试验后进行,第 3 天撤除平台,从第 III 象限将大鼠放入水中,记录 120s 内动物在四个象限的游泳(停留)时间,检测大鼠对原平台(目标象限)的记

忆保持能力。

在先前预实验中,对所有动物在 Morris 水迷宫中进行寻找平台训练,平台上放置明显标示物,并且每次平台在水迷宫中的位置随机变换,检测动物跟踪平台的能力,以判断动物的视觉和运动功能(运动速度),结果显示,应激组大鼠的视觉和运动速度与对照组大鼠比较没有显著性差异。因此本研究中,定位航行试验记录动物的逃避潜伏期,检测大鼠的空间学习能力。

1.4 大鼠前脑皮层和海马突触体的制备

将大鼠断头处死,迅速分离两侧前脑皮层(frontal cortex)和海马(hippocampus)并称重,以 0.25M 蔗糖溶液包含 10mM Tris-HCl 和 1mM EDTA (pH7.4)为匀浆介质匀浆,匀浆液浓度为 10% (W/V)。按差速蔗糖梯度离心法分离突触体(Hajos, 1975; Dodd et al., 1981),略有改动,匀浆液以 $1000\times g$ 离心 10min 取上清液再于 $20000\times g$ 离心 20min,将沉淀用人工脑脊液(ACSF)缓慢悬浮,得到突触体悬液。以上各步均在 4°C 条件下进行。用 Lowry 法测定悬液蛋白浓度。

1.5 大鼠前脑皮层和海马突触体膜流动性和突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的测定

取突触体悬液,与等体积的荧光探针 DPH (Fluka 公司产品,终浓度 $2\times 10^{-6}\text{M}$) 稀释液,混合均匀,于 37°C 恒温孵育 30 min。用 LS 50B 荧光分光光度计(Perkin-Elmer Co. USA),测定各样品的 4 个荧光强度,检测突触体膜的荧光偏振度(P),测定条件为:激发波长 360nm,发射波长 430nm,激发狭缝 5nm,发射狭缝 5nm。用膜的各向异性(anisotropy) r 值表示突触体膜的流动性, r 值越小,膜流动性越大。 $r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2 GI_{VH}) = 2P / (3 - P)$ G(校正因子) = I_{HV} / I_{HH}

取突触体悬液,用 ACSF 调整蛋白浓度为 1.5~2.5mg/ml,加入 Fura 2-AM(Sigma 公司产品,终浓度: $5\mu\text{M}$), 37°C 恒温孵育 30min 后,于 $11000\times g$ 离心 10min,取沉淀,用 ACSF 悬浮,于 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 下保存直至荧光测定。突触体负载后于 2 小时内测定完毕。LS 50B 荧光分光光度计(Perkin-Elmer Co. USA),选择 Fura-2 与 Ca^{2+} 结合和游离的激发波长 340nm 和 380nm,发射波长为 509nm。在 37°C 恒温条件下,测定其荧光强度及荧光比值。按下式计算突触体内钙离子浓度(Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985): $[\text{Ca}^{2+}]_i(\text{nM}) = K_d \times [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] \times (F_D / F_S)$ 。其中 K_d 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数,生理条件下

为 224 nM; FD 和 FS 分别为无钙和钙饱和状态下 380 nm 处的荧光强度; R 为需要测定的 340/380nm 的荧光比值(F_{340}/F_{380}); Rmax 和 Rmin 分别为饱和钙和无钙时 340/380nm 的比值, 分别为加入 Triton-X-100 及 EGTA 后 340/380nm 处的荧光强度比值。在没有负载 Fura-2 时测定突触体的自发荧光, 计算 $[Ca^{2+}]_i$ 前须减去自发荧光。

1.6 统计学分析

实验数据以平均数 $\pm$ 标准误($M \pm SE$)表示, 水迷宫定位航行试验中的逃避潜伏期采用双因素重复测量方差分析; 空间搜索试验中的各象限游泳时间采用单因素方差分析, 组间差异比较采用 Dunnett's t 检验或非配对 t 检验。以 $p < 0.05$ 表示统

计学具有显著性差异。

2 结果

2.1 慢性应激对大鼠开场行为的影响

在开场行为检测中, 与对照组比较, 应激组大鼠跑动穿越的格数明显减少($p < 0.01$, 表 1); 直立次数、梳理次数和中央格停留时间亦显著降低($p < 0.05$, $p < 0.01$); 结果表明, 慢性应激可以导致大鼠在新异环境中的自发活动和探究行为的降低。停止应激一周后, 应激组大鼠跑动穿越的格数、直立次数和中央格停留时间, 与对照组比较有显著性差异($p < 0.05$)。结果表明, 停止应激后大鼠的开场行为有部分恢复。

表 1 慢性应激后即刻及停止应激后一周大鼠开场行为的变化

组别	格数	直立次数	梳理次数	中央格停留时间 (s)
应激后即刻	对照组	112.5 $\pm$ 5.7	28.6 $\pm$ 4.2	17.3 $\pm$ 5.6
	应激组	66.8 $\pm$ 6.2**	20.2 $\pm$ 4.8*	11.2 $\pm$ 6.5*
应激后 1 周	对照组	116.8 $\pm$ 6.5	30.3 $\pm$ 3.5	16.2 $\pm$ 4.8
	应激组	87.9 $\pm$ 9.8*	24.1 $\pm$ 5.6*	13.2 $\pm$ 6.8

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与对照组比较(unpaired- t test)。* $p < 0.05$, 与对照组比较(unpaired- t test); $n = 9$, $M \pm SE$ 。

2.2 慢性应激对大鼠定位航行学习的影响

在 2 天的定位航行学习中, 对照组和应激组大鼠寻找水下平台所需的逃避潜伏期均迅速降低; 对照组和应激组在应激后即刻 [$F(1, 16) = 16.43$, $p < 0.01$] 和停止应激后一周 [$F(1, 16) = 5.68$, $p < 0.05$] 的逃避潜伏期均有显著性差异(图 1)。在应激后即刻, 与对照组比较, 应激组大鼠第 1 天和第 2 天的逃避潜伏期有显著性差异($p < 0.01$); 而在停止应激后一周, 应激组大鼠的逃避潜伏期, 与对照组大鼠比较无显著性差异。结果表明, 慢性应激可导致大鼠的空间学习能力下降, 停止应激后一周, 应激大鼠的空间学习能力有一定的恢复。

2.3 慢性应激对大鼠空间搜索能力的影响

在第 3 天撤除水下平台, 进行空间搜索试验。结果显示, 对照组和应激组大鼠均在第 I 象限(目标象限)停留时间最长(表 2)。在应激后即刻, 对照组大鼠在目标象限停留的时间显著长于在其它三个象限的时间, $F(3, 32) = 5.86$, $p < 0.01$; 与对照组大鼠比较, 应激组大鼠在目标象限停留的时间显著缩短($p < 0.01$), 结果说明, 慢性应激导致大鼠空间记忆保持能力降低。在停止应激后一周, 对照组大鼠在目标象限的停留时间与其它三个象限比较差异

有显著性意义, $F(3, 32) = 8.78$, $p < 0.01$; 与对照组比较, 应激组大鼠在目标象限的停留时间虽然缩短, 但无显著性差异。在应激组大鼠, 无论是应激后即刻还是停止应激后一周目标象限停留的时间与其它三个象限比较均无显著性差异, $F(3, 32) = 2.13$, $F(3, 32) = 3.16$, $p > 0.05$ 。

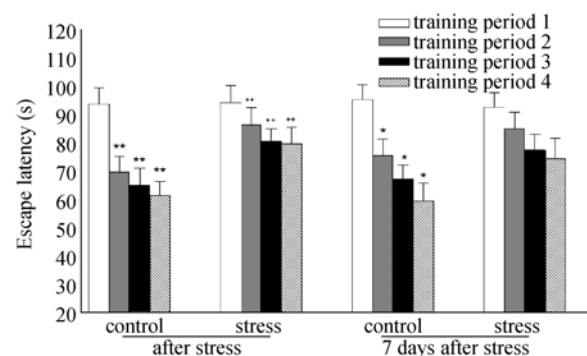


图 1 慢性应激后即刻及停止应激后一周大鼠的逃避潜伏期

注: control (对照组); stress (应激组); training period(训练周期)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与训练周期 1 比较(Repeated-measures ANOVA, Dunnett's t 检验)。** $p < 0.01$, 与对照组比较(非配对 t 检验); $n = 9$, $M \pm SE$ (sec)。

2.4 慢性应激对突触体膜流动性和突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

应激组大鼠在应激后即刻, 其前脑皮层和海马突触体膜的 r 值显著增加($p < 0.01$, 表 3), 表明其膜流动性显著降低; 在停止应激后 1 周, 与对照组比较, 应激组大鼠前脑皮层和海马突触体膜的 r 值无显著性差异。结果表明, 慢性应激引起前脑皮层和海马突触体膜流动性降低, 而应激后 1 周, 其突触

体膜流动性有部分恢复。

对突触体内游离 Ca^{2+} 浓度, 在应激后即刻(表 3), 应激组大鼠前脑皮层和海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高($p < 0.05$, $p < 0.01$); 在停止应激后 1 周, 应激组大鼠前脑皮层和海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度与对照组大鼠比较无显著性差异。结果表明, 慢性应激导致前脑皮层和海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高。

表 2 慢性应激后即刻及停止应激后一周大鼠在各象限的停留时间

组别		第 I 象限	第 II 象限	第 III 象限	第 IV 象限	F 值
应激后即刻	对照组	38.3±3.1	26.4±3.3	25.6±3.5	28.6±3.5	5.86**
	应激组	33.6±2.7**	28.4±3.5	28.6±3.2	29.4±3.2	2.13
应激后一周	对照组	38.1±3.6	26.2±2.6	21.7±3.6	32.6±2.4	8.78*
	应激组	35.6±3.7	28.2±2.4	26.5±2.1	29.6±2.2	3.16

注: ** $p < 0.01$, 与目标象限 I 比较(one-way ANOVA, Dunnett's t 检验); ** $p < 0.01$, 与对照组比较(unpaired- t test)。 $n = 9$, $M \pm SE$ (sec)。

表 3 慢性应激对突触体膜流动性和突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

组别		r 值		$[\text{Ca}^{2+}]_i$	
		前脑皮层	海马	前脑皮层	海马
应激后即刻	对照组	0.1568±0.0012	0.1660±0.0023	1.000±0.055	1.000±0.043
	应激组	0.1683±0.0009**	0.1732±0.0011**	1.413±0.065*	1.836±0.163**
应激后一周	对照组	0.1576±0.0011	0.1673±0.0016	1.000±0.032	1.000±0.066
	应激组	0.1608±0.0021	0.1696±0.0018	1.195±0.046	1.264±0.168

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与对照组比较(unpaired- t test); 以对照组大鼠的突触体内游离 Ca^{2+} 浓度为 100 %。 $n = 9$, $M \pm SE$ 。

3 讨论

本研究采用足底电击、噪音刺激、束缚和束缚+热刺激 4 种应激源, 每天随机选择一种应激方式作用于应激组大鼠 21 天制作慢性复合应激动物模型。许多研究多采用单一形式应激源, 即捆绑、电击、束缚、冷刺激、剥夺睡眠或噪音等。采用单因素急性或重复建立模型, 有利于应激产生机制的分析, 但在研究中常出现正性或负性效应。相对于急性建模, 慢性过程更具有实际意义。有许多报道, 综合运用不同类型的应激源来构建模型。多因素慢性建模可以更好地反映有机体的整体性, 但同时也给机制分析带来了困难。有研究报道, 急性应激导致大鼠开场行为活动减少(李欢欢, 林文娟, 李俊发, 2007), 而在慢性应激条件下其影响更明显。慢性应激损伤动物学习记忆功能(Lupien, et al. 1998; Lupien & McEwen, 1997), 但也有部分研究结果显示慢性应激对学习记忆功能有增强作用或者没有

损伤作用(Bowman, Zrull & Luine, 2001; Bowman, Beck & Luine, 2003; Conrad, LeDoux & Magarinos, 1999)。这可能与应激源的种类、持续时间等不同有密切关系。本研究结果表明, 多因素慢性应激导致大鼠在新异环境中的活动减少、空间学习记忆力明显受损; 前脑皮层和海马突触体膜流动性显著降低, 而突触体内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高。

研究报道, 慢性应激可导致海马兴奋性氨基酸含量显著增高(严进, 王春安, 叶荷莉, 陈宜张, 1995), 过量的谷氨酸等兴奋性氨基酸作用于 NMDA 受体, 引起大量 Ca^{2+} 内流, 导致胞内 Ca^{2+} 浓度异常增高, 并由此激活细胞内超氧化自由基产生过程。慢性应激亦可引起海马神经元萎缩、变性和大量丢失, 海马容量缩小(Zhang, Yang & Xu, 2003), 从而导致海马神经细胞受损。慢性应激或应激作用停止后的一定时间内, 可引起脑组织的脂质过氧化活动显著增强, 且持续时间较长。海马是学习记忆的重要脑区, 也是调节应激反应并受应激影

响的最重要的脑部结构之一。慢性应激对海马介导的记忆有持久性损伤作用(Ohl & Fuchs, 1999; Hill, Hunter & McEwen, 2009), 而不依赖海马的记忆类型对慢性应激不敏感, 记忆保持不受损伤。有研究报道, 应激可以通过改变海马突触的可塑性(Kim, Foy & Thompson, 1996)而影响动物的学习记忆过程。在脑内, 应激因素除对海马有影响外, 对其它脑区, 如前额叶、杏仁核等也有作用(Beck & Luine, 1999; Mizoguchi, et al., 2000; Roozendaal, McEwen & Chattarji, 2009)。研究报道, 应激可以引起机体产生许多与前额叶功能紊乱的神经精神疾病(Birnbaum, Gobeske, Auerbach, Taylor & Arnsten, 1999); 应激也可明显损害大鼠、猴依赖前额叶的工作记忆能力(Arnsten, 2000)。随着脑的老化, 神经细胞膜脂质过氧化反应增强, 细胞内钙增加与膜流动性降低密切相关。已经明确, 突触体膜是与神经元信号转导通路联系在一起的, 膜流动性的降低已被认为导致了許多信号转导的膜结合机制(比如酶活性, 受体数量和受体功能)的功能缺失或紊乱(Eckert, Wood & Muller, 2001), 从而引起脑功能的减退或障碍。

本研究结果表明, 慢性应激可显著损害大鼠的空间学习记忆能力; 引起大鼠前脑皮层和海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高, 突触体膜流动性显著降低; 显示前脑皮层和海马组织脂质过氧化反应增强, 突触传递效能降低, 导致前脑皮层和海马神经元功能受损。我们的结果提示, 突触体膜流动性和突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的变化可能是引起应激性学习记忆功能障碍的脑机制之一。

参 考 文 献

- Arnsten, A. F. (2000). Stress impairs prefrontal cortical function in rats and monkeys: role of dopamine D1 and norepinephrine alpha-1 receptor mechanisms. *Progress in Brain Research*, 126, 183–192.
- Arnsten, A. F. (2004). Adrenergic targets for the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology(Berl)* 174, 25–31.
- Beck, K. D., & Luine, V. N. (1999). Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids. *Brain Research*, 830, 56–71.
- Birnbaum, S., Gobeske, K. T., Auerbach, J., Taylor, J. R., & Arnsten, A. F. (1999). A role for norepinephrine in stress-induced cognitive deficits: alpha-1-adrenoceptor mediation in the prefrontal cortex. *Biological Psychiatry*, 46, 1266–1274.
- Bowman, R. E., Zrull, M. C., & Luine, V. N. (2001). Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Research*, 904, 279–289.
- Bowman, R. E., Beck, K. D., & Luine, V. N. (2003). Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Hormones and Behavior*, 43, 48–59.
- Buwalda, B., Kole, M. H., Veenema, A. H., Huininga, M., de Boer, S. F., Korte, S. M., & Koolhaas, J. M. (2005). Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 83–87.
- Coburn-Litvak, P. S., Pothakos, K., Tata, D. A., McCloskey, D. P., & Anderson, B. J. (2003). Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 11–23.
- Conrad, C. D., LeDoux, J. E., & Magarinos, A. M. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*, 113, 902–913.
- Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K., & Delaunoy, J. P. (1981). A rapid method for preparing synaptosome: comparison, with alternative procedures. *Brain Research*, 226, 107–118.
- Eckert, G. P., Wood, W. G., & Muller, W. E. (2001). Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *Journal of Neural Transmission*, 108, 1051–1064.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 3440–3450.
- Hajos, F. (1975). A improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Research*, 93, 485–489.
- Hill, M. N., Hunter, R. G., & McEwen, B. S. (2009). Chronic stress differentially regulates cannabinoid CB1 receptor binding in distinct hippocampal subfields. *European Journal of Pharmacology*, 614, 66–69.
- Karten, Y. J., Olariu, A., & Cameron, H. A. (2005). Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. *Trends in Neurosciences*, 28, 171–172.
- Kim, J. J., Foy, M. R., & Thompson, R. F. (1996). Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A.*, 93, 4750–4753.
- Kole, M. H., Costoli, T., Koolhaas, J. M., & Fuchs, E. (2004). Bidirectional shift in the cornu ammonis 3 pyramidal dendritic organization following brief stress. *Neuroscience*, 125, 337–347.
- Li, H. H., Lin, W. J., & Li, J. F. (2007). The Effects of an acute physiological stressor on behaviors, protein levels and phosphorylation of neurogranin in rats. *Acta Psychologica Sinica.*, 39, 648–655.
- [李欢欢, 林文娟, 李俊发. (2007). 急性生理应激对大鼠的行为及脑神经颗粒素磷酸化水平的影响. *心理学报*, 39, 648–655.]
- Lin, K. C., & Nie, S. Q. (1985). Cell membrane fluidity. *Progress in Physiological Sciences*, 16, 83–89.
- [林克椿, 聂松青. (1985). 细胞膜的流动性. *生理科学进展*, 16, 83–89.]
- Lupien, S. J., & McEwen, B. S. (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and

- human model studies. *Brain Research Reviews*, 24, 1–27.
- Lupien, S. J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N. P., et al. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*, 1, 69–73.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 434–445.
- McEwen, B. S. (2006). Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues in clinical neuroscience*, 8, 367–381.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D. H., & Tabira, T. (2000). Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *Journal of Neuroscience*, 20, 1568–1574.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Takeda, S., Aburada, M., & Tabira, T. (2004). Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *Journal of Neuroscience*, 24, 5492–5499.
- Ohl, F., & Fuchs, E. (1999). Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Cognitive Brain Research*, 7, 379–387.
- Quervain, D. J., Roozendaal, B., & Gaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long - term spatial memory. *Nature*, 394, 787–790.
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 423–433.
- Yan, J., Wang, C. A., Ye, A., & Chen, Y. Z. (1995). The effect of stress on behaviors and glutamate levels of four brain regions. *Acta Psychologica Sinica*, 27, 422–427.
- [严进, 王春安, 叶荷莉, 陈宜张. (1995). 应激对大鼠行为和部分脑区谷氨酸含量的影响. *心理学报*, 27, 422–427.]
- Zhang, Y. M., Yang, Q., & Xu, C. T. (2003). Effects of phenytoin on morphology and structure of hippocampal CA3 pyramidal neurons of rats in chronic stress. *Acta Pharmacological Sinica*, 24, 403

Chronic Stress Impairs Learning and Memory and Changes Frontal and Hippocampal Synaptosomal Membrane Fluidity in Rats

LI Ya¹, KONG Hong¹, SONG Qian¹, CAI Jing-Xia²

(¹ College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

(² Section of Brain and Behavior, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract

The effect of chronic stress on learning and memory functions has been one of hot topics in neuroscience. Hippocampus (HP) and frontal cortex (FC) are key brain regions mediating learning and memory, as well as potential targets of stress reactions. Reduced membrane fluidity may represent an important mechanism underlying a variety of structural and functional alterations of the brain. The aim of the present study was to investigate the effects of chronic stress on spatial learning and memory, as well as membrane fluidity of frontal and hippocampal synaptosomes in rats.

A 21-day chronic stress procedure with multiple stressors (footshock, noise, bondage, bondage plus thermal stimulus) was conducted. After that spontaneous behavior and spatial learning and memory performance were tested using open field and Morris water maze tasks. Frontal and hippocampal synaptosomal membrane fluidity and free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) were also examined. The results demonstrated that spontaneous locomotor activities and exploratory behaviors were significantly decreased in stressed animals. Their spatial learning and memory performance were significantly impaired as well. Furthermore, in chronic stressed animals, the frontal and hippocampal synaptosomal membrane fluidity were markedly reduced whereas the $[Ca^{2+}]_i$ were significantly increased as compared to control group.

Current findings suggest that chronic stress results in behavioral changes and impairment of spatial learning and memory, which could be mediated by the changes of synaptosomal membrane fluidity and free calcium concentrations.

Key words chronic stress; learning and memory; membrane fluidity; hippocampus; frontal cortex, synaptosome