

Effects of Different Stress Forms on Novel Object Recognition Memory Retrieval

Kai Liang, Xudong Yu*, Fen Feng*

Basic Medical School, Shaoyang University, Shaoyang Hunan
Email: *1805159968@qq.com, *276430073@qq.com

Received: Jun. 3rd, 2020; accepted: Jun. 16th, 2020; published: Jun. 23rd, 2020

Abstract

Objective: To study the effects of different stress forms on novel object recognition and memory in mice. **Methods:** Mice were randomly divided into control group, restraint stress group and forced swimming stress group. Thirty minutes after the end of stress, three groups of mice were tested for novel object recognition. **Results:** The discrimination index of the restraint stress group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The discrimination index of the forced swimming stress group was not significantly different from that of the control group. There was no significant difference in the total exploration time and activity of the mice in each group. **Conclusion:** Acute restraint stress damages novel object recognition and memory in mice, while forced swimming stress has no effect on novel object recognition memory.

Keywords

Stress, Memory Disorders, Novel Object Recognition

不同应激形式对新颖物体识别记忆提取的影响

梁 凯, 于旭东*, 封 芬*

邵阳学院, 基础医学院, 湖南 邵阳
Email: *1805159968@qq.com, *276430073@qq.com

收稿日期: 2020年6月3日; 录用日期: 2020年6月16日; 发布日期: 2020年6月23日

摘 要

目的: 研究不同的应激形式对小鼠新颖物体识别记忆的影响。 **方法:** 将小鼠随机分成对照组, 束缚应激

*通讯作者。

组以及强迫游泳应激组, 应激结束后30 min, 3组小鼠进行新颖物体识别测试。结果: 束缚应激组辨别指数显著低于对照组($p < 0.05$), 强迫游泳应激组辨别指数与对照组无显著性差异, 各组小鼠总探索时间、活动度均无显著性差异。结论: 急性束缚应激损伤小鼠新颖物体识别记忆, 而强迫游泳应激对新颖物体识别记忆没有影响。

关键词

应激, 记忆障碍, 新颖物体识别

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

应激广泛参与机体多种生理功能[1]。其中适度的应激对多种生理功能具有促进作用, 然而慢性应激和急性应激可损害机体功能, 其中包括学习记忆[2] [3]。随着社会压力越来越大, 应激性记忆障碍发病率逐年升高[4]。然而不同的应激形式对记忆的不同阶段影响不尽相同。

新颖物体识别记忆是一种广泛应用的啮齿类记忆范式, 它利用啮齿类对新物体的偏好性测试其学习记忆[5], 并且对动物几乎不产生应激作用。当前研究基于新颖物体识别范式, 旨在探索强迫游泳应激和急性束缚应激对记忆提取的影响。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物及分组

健康 ICR 雄性小鼠(由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 体重 30~35 g)先进行一周的适应性饲养, 控制室温在(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度(50 ± 5)%, 12 小时光照昼夜循环(上午 8:00 开灯), 实验在 10:00~17:00 进行, 小鼠可自由摄食饮水, 实验前 3 天实验者每天抚摸小鼠 5 分钟。所有实验程序均遵循美国国立卫生研究院的《实验室动物的护理和使用指南》。

实验将小鼠随机分为对照组, 急性束缚应激组和强迫游泳应激组, 每组 10 只, 在 NOR 采样阶段结束后 24 h 进行测试阶段, 在测试阶段前 30 min, 急性束缚应激组小鼠束缚 60 min, 强迫游泳应激组自由游泳 10 min。在采样阶段, 观察并记录小鼠对两物体的总探索时间; 在测试阶段, 观察并记录小鼠分别对新旧物体的探索时间, 并计算出总探索时间和辨别指数; 观察并记录小鼠在两阶段的活动度(见图 1)。



Figure 1. Schematic of the experimental design

图 1. 实验流程图

2.2. 新颖物体识别实验(Novel Object Recognition NOR)

实验在黑色木方盒子(30 cm × 30 cm × 50 cm)中进行。实验由三个阶段组成：习惯化阶段、熟悉阶段和测试阶段[6]。在习惯化阶段，让小鼠在空旷的实验箱中自由探索 10 分钟，以适应环境；24 小时后进行熟悉阶段的实验，两个相同的物体(A+A)被放置在实验箱内对称的位置，距离墙壁 8 厘米，将小鼠在距两物体等距离处放入盒子中，任其自由探索 5 分钟；24 小时后进行测试实验，一个物体不变，另一个熟悉的物体被替换成一个新颖的(A+B)，将小鼠再次在距两物体等距离处放入盒子中，自由探索 5 分钟[7]。每只小鼠测试结束后，箱内四壁、底面和物体均用 75% 的酒精擦拭，避免留下气味影响下一只小鼠。记录小鼠对熟悉物体的探索时间(F)和对新物体的探索时间(N)，计算辨别指数(discrimination index, DI) [$DI = (N - F) / (N + F) \times 100\%$] [8]。探索定义为小鼠鼻子近距离指向物体，鼻子与该物体距离 ≤ 1 厘米。

2.3. 急性应激程序

1) 急性束缚应激(acute restraint stress ARS)装置为 50 ml 的塑料管，管身分散小孔，用于通气，小鼠在塑料管内被限制自由活动，但不会造成躯体伤害。于实验前束缚 1 小时，束缚期间禁食禁水直至应激完成。

2) 强迫游泳应激(forced swimming stress FSS)装置是一个高 25 cm，直径 20 cm 的透明玻璃圆桶，水深 22 cm，水温维持在($22 \pm 1^\circ\text{C}$)，将桶放置于隔音箱内。实验前将小鼠放入桶内，自由游泳 10 分钟。

2.4. 统计学分析

数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法和 T 检验进行统计分析(sigma stat 3.5)，所有结果均以均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示， $P \leq 0.05$ 时有统计学意义。

3. 结果

3.1. 三组小鼠具有相同的探索水平

在新颖物体识别采样阶段(图 2(A))，One-way ANOVA 分析表明，三组小鼠对两物体总探索时间没有显著性差异($F = 0.453, P > 0.05$)。同时，One-way ANOVA 分析表明，三组小鼠的活动度没有显著性差异($F = 0.128, P > 0.05$) (图 2(B))。上述结果表明三组小鼠具有相同的探索水平。

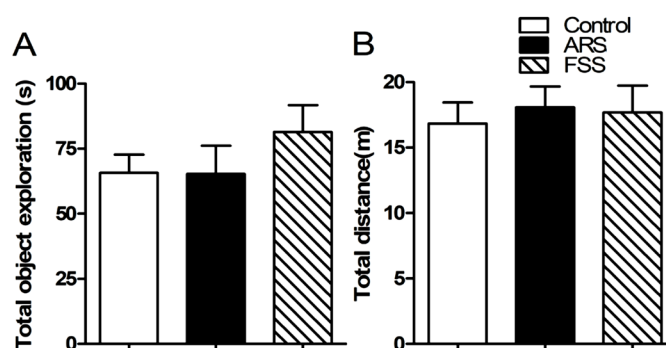


Figure 2. The effects of acute stress on total object exploration and total distance in NOR sample phase
图 2. 各组小鼠采样阶段探索水平相同

3.2. 急性束缚应激损害小鼠的新颖物体识别记忆

在新颖物体测试阶段(图 3(C))，One-way ANOVA 分析表明，急性束缚应激组小鼠的辨别指数显著低于对照组($F = 3.548, P < 0.05$)，强迫游泳组小鼠的辨别指数与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。同时，

One-way ANOVA 分析表明,三组小鼠对两物体总探索时间没有显著性差异($F = 0.621, P > 0.05$) (图 3(A)),三组小鼠的活动度没有显著性差异($F = 0.121, P > 0.05$) (图 3(B))。上述结果表明,强迫游泳应激对小鼠新颖物体识别记忆没有影响,急性束缚应激损伤小鼠新颖物体识别记忆而对活动度没有影响。

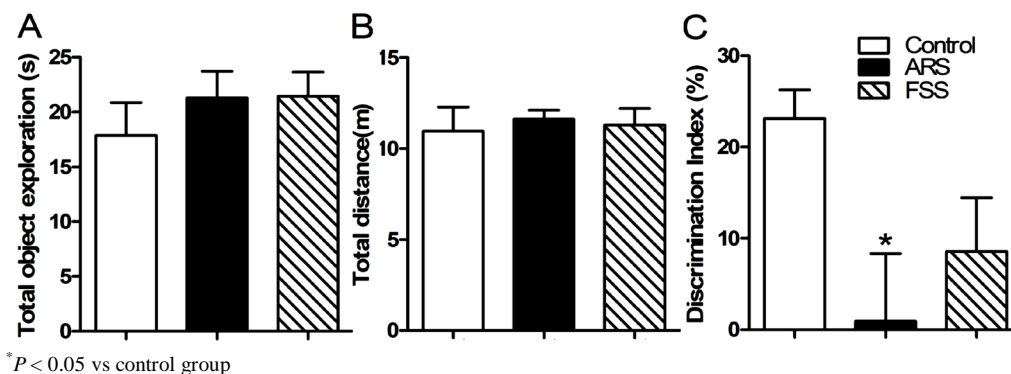


Figure 3. The effects of acute stress on total object exploration, total distance and DI in NOR test phase
图 3. 各组小鼠在新颖物体识别测试阶段的影响

4. 讨论

当前研究表明,急性束缚应激可导致小鼠的新颖物体识别记忆障碍,为了排除非特异性因素的影响,测试了小鼠的活动度和总探索时间,与之前的研究一致,应激不影响小鼠的活动水平和探索水平。

应激对学习记忆具有复杂的作用,这种作用呈一种倒 U 型关系。之前结果表明应激提高小鼠的记忆,如短暂低血压低氧性应激可导致幼年大鼠 Morris 水迷宫测试中的记忆增加[9],此外,慢性复合应激处理也导致大鼠 Morris 水迷宫和 Y 迷宫测试中记忆提高[10]。相反的是,部分研究结果表明慢性不可预测的间歇性束缚应激可导致雄性小鼠的空间记忆降低[11],此外,足底电击应激处理也导致大鼠新颖物体测试中记忆降低[12]。与此一致的,当前研究表明,1 h 急性束缚应激显著损害小鼠新颖物体识别测试中记忆提取。进一步支持了急性应激对小鼠记忆的损害作用。应激对记忆影响的双向性可能与应激的形式、时间、小鼠的品系、实验的范式有关。

考虑到活动度可能对小鼠学习记忆的影响,我们检测了采样和测试阶段小鼠的活动水平。结果显示,小鼠在采样阶段具有相同的活动水平,这排除了活动水平对小鼠的采样阶段小鼠“获得”的影响。此外,实验检测了应激后小鼠测试阶段的活动度。结果显示,1 h 急性束缚应激不影响小鼠的活动水平。与此一致的是慢性束缚应激也不影响小鼠的活动度。然而,之前研究表明应激可降低小鼠的活动水平,如慢性轻度不可预知性应激可导致小鼠的活动度降低[13],此外,急性创伤应激处理也导致小鼠旷场测试中活动度降低[14]。应激对活动度的影响是复杂的。当前造成这种不同的原因可能是应激的形式、时间、小鼠的品系、实验的范式等。考虑到总探索时间可能对小鼠学习记忆的影响,我们检测了采样和测试阶段小鼠的总探索时间。结果显示,小鼠在采样阶段的总探索时间没有显著性差异,这排除了探索水平对小鼠的采样阶段小鼠“获得”的影响。此外,实验检测了应激后小鼠测试阶段的总探索时间。结果显示,1 h 急性束缚应激不影响小鼠的探索水平。

急性束缚应激导致的学习记忆障碍不是通过影响小鼠的活动水平和探索水平,其机制可能与降低 PKA 信号活性有关,可通过激活 PKA 受体[15]来治疗应激诱导的学习记忆障碍。在中枢系统中,AMPA 受体是离子型的谷氨酸受体[16],而调控 AMPA 受体的跨膜转运可能诱导 LTP [17]。AMPA 受体跨膜转运与其磷酸化位点有关,谷氨酸的亚基 GluA1 第 845 位丝氨酸(Ser-845)磷酸化是 AMPA 受体胞吐到突触外膜的关键。GluA1 亚基 Ser-845 的磷酸化是靠蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)催化的[18],而应激可

能导致 PKA 信号活性降低, 从而导致 AMPA 受体的磷酸化降低, 膜表达降低, 并导致学习记忆障碍。

然而, 本研究尚缺乏生化指标的证据, 在将来的研究中, 我们将检测记忆相关蛋白以明确应激诱导记忆提取障碍的机制。

参考文献

- [1] Lupien, S.J., McEwen, B.S. and Gunnar, M.R. (2009) Effects of Stress throughout the Lifespan on the Brain, Behaviour and Cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*, **10**, 434-445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- [2] Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., et al. (2004) A Facilitative Role for Corticosterone in the Acquisition of a Spatial Task under Moderate Stress. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, **11**, 188-195. <https://doi.org/10.1101/lm.61704>
- [3] Son, H., Yang, J.H. and Kim, H.J. (2019) A Chronic Immobilization Stress Protocol for Inducing Depression-Like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, No. 147, e59546. <https://doi.org/10.3791/59546>
- [4] Li, H.B., Mao, R.R., Zhang, J.C., et al. (2008) Antistress Effect of TRPV1 Channel on Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *Biological Psychiatry*, **64**, 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.020>
- [5] Lueptow, L.M. (2017) Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, No. 126, e55718. <https://doi.org/10.3791/55718>
- [6] Scott, G.A. and Mtetwa, M. (2013) Novel Odour Recognition Memory Is Independent of the Hippocampus in Rats. *Experimental Brain Research*, **224**, 199-209. <https://doi.org/10.1007/s00221-012-3304-4>
- [7] Bevins, R.A. (2006) Object Recognition in Rats and Mice: A One-Trial Non-Matching-to-Sample Learning Task to Study "Recognition Memory". *Nature Protocols*, **1**, 1306-1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
- [8] Pezze, M.A., Marshall, H.J. and Fone, K.C. (2015) Dopamine D1 Receptor Stimulation Modulates the Formation and Retrieval of Novel Object Recognition Memory: Role of the Prelimbic Cortex. *European Neuropsychopharmacology*, **25**, 2145-2156. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.07.018>
- [9] Wittner, M. (2005) Transient Hypobaric Hypoxia Improves Spatial Orientation in Young Rats. *Physiological Research*, **54**, 335-340.
- [10] 刘能保, 李辉, 刘向前, 孙臣友, 陈少容, 张敏海, 刘少纯, 汪薇曦. 慢性复合应激增强大鼠空间学习和记忆能力[J]. 生理学报, 2004(5): 615-619.
- [11] Peay, D.N., Saribekyan, H.M., Parada, P.A., et al. (2020) Chronic Unpredictable Intermittent Restraint Stress Disrupts Spatial Memory in Male, But Not Female Rats. *Behavioural Brain Research*, **383**, Article ID: 112519. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112519>
- [12] 谭尹娜. Apelin-13 改善慢性应激诱导大鼠识别记忆损伤和海马神经发生障碍[D]: [硕士学位论文]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [13] 信欣, 韦彩川, 毕文鹏, 于海玲. 慢性应激刺激对抑郁模型小鼠构建的行为学研究[J]. 延边大学医学学报, 2017, 40(2): 92-96.
- [14] 邵艳霞, 孙航, 周小萍, 孙激. 急性创伤应激对小鼠行为变化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(11): 1130-1136.
- [15] 黄秀清, 赵晓华, 许健, 周纯, 毛福荣. 越鞠丸醇提物调控 PKA 信号改善强迫游泳应激小鼠学习记忆障碍及抑郁样行为[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 751-755.
- [16] Man, H.Y. and Sekine-Aizawa, Y. (2007) Regulation of {Alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor Trafficking through PKA Phosphorylation of the Glu Receptor 1 Subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 3579-3584. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611698104>
- [17] Lee, H.K. (2011) AMPA Receptor Regulation during Synaptic Plasticity in Hippocampus and Neocortex. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **22**, 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.06.007>
- [18] Chen, K.T., Tsai, M.H., Wu, C.H., et al. (2015) AMPA Receptor-mTOR Activation Is Required for the Antidepressant-Like Effects of Sarcosine during the Forced Swim Test in Rats: Insertion of AMPA Receptor May Play a Role. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **9**, 162. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00162>