

491-480

大白鼠長期增益作用與 sgk mRNA 關係之探討

研究者: 蔣佳君

指導者: 李小媛 教授 潘彥宏 老師

壹、緒論

一、研究動機

每個人都希望自己的學習記憶能力又快又好，神經科學也一直是一門神秘又吸引人的領域，我對於這方面的研究相當有興趣。因此希望能透過專題研究對於這個神秘的領域有更深一層的了解，並學習更多相關的知識及實驗技巧。

在指導教授先前的研究中發現一種稱為 sgk 的基因在空間學習和記憶上扮演了很重要的角色，他們利用 Morris water maze learning(水迷津學習實驗)作為老鼠學習行為的研究模式，並以基因檢測、轉染野生型及變種型 sgk 基因等方式證明了 sgk 是影響學習記憶的關鍵基因。仔細研讀生物課本後，我發現在高中生物下冊第九章”神經系統與行為”中對於神經元、神經衝動、腦部組織、學習行為及學習記憶有加以介紹、其中提到長期增益作用(long-term potentiation, LTP)和記憶儲存有直接相關性。在閱讀過相關文獻後我發現長期增益作用是研究長期記憶的重要細胞電生理模式，而課本第十三章”主宰生命奧秘的分子”中也讓我了解基因的表現、DNA、mRNA 與蛋白質間的關係、及 PCR 等生物技術。這引起了我極大的興趣想探討長期增益作用和 sgk mRNA 之間的關係。

二、研究目的

探討長期增益作用和 sgk mRNA 之間的關係。

三、研究問題

記憶可簡單的分為短期記憶和長期記憶，本實驗所研究的記憶是屬於空間學習的長期記憶。在教授先前的研究中已知

- (一) 學得快的老鼠海馬迴中的 sgk (serum and glucocorticoid-inducible kinase,血清及糖皮質素誘導激酶) mRNA 比學得慢的老鼠多，且提高 sgk 的表現有利於在空間學習模式中記憶的形成，是故 sgk 是老鼠記憶形成的一個關鍵基因。
- (二) 長期增益作用 (long-term potentiation, 簡稱 LTP)所引發的細胞長期興奮現象與細胞機轉和長期記憶極為類似，因此長期增益作用是長期記憶 (long-term memory)的重要細胞電生理模式之一。

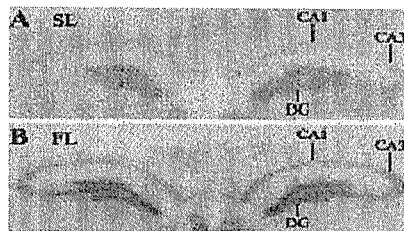
因此我希望能證明以下推論：

引發老鼠的長期增益作用應該會導致老鼠海馬迴的 sgk mRNA 表現量增加。

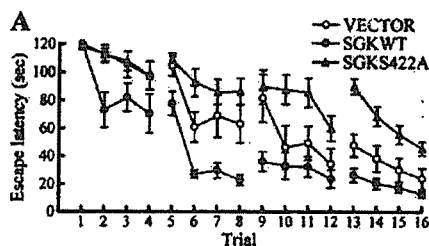
貳、文獻探討

一 sgk

李教授的研究團隊發現一種稱為 sgk 的基因在空間學習和記憶上扮演了很重要的角色。sgk 基因最初被辨識為 serine/threonine kinase family 的一員。它可以被醣皮質素和血漿誘發，在某些人體細胞內也可以啟動誘發醣皮質素的基因。這種 sgk 基因，科學界已知之多年，但以往的研究多半只知它與腎臟的功能和鈉離子的調控有關，而這種基因與腦部功能、尤其是與主管記憶、學習的海馬迴的關係，則是科學界的首次發現。在 Morris water maze learning 實驗中，發現有些老鼠學得較快，總能領先其它老鼠，很快學會找到上岸的踏板，在做基因表現量檢測時，發現學得快的老鼠(Fast Learner)的 sgk 基因表現量比正常老鼠高四倍左右。於是教授的研究團隊利用 sgk 變種基因，使這種酵素失去功能，再植回老鼠腦部的海馬迴，結果 Fast Learner 記憶力顯著變差；反之，若使 sgk 的野生型基因過度表現，則老鼠的記憶力明顯進步。由於大白鼠和人類的 sgk 基因有 96% 的相似性，這些研究結果指出一個新方向：若能開發促進腦部 sgk 基因和蛋白表現的藥物，就可能改善記憶、甚至治療失智症。(Kuen J. Tsai, et al.2002)



老鼠海馬迴區域的 sgk mRNA 表現量比較圖。圖為海馬迴之切片，顏色愈深表示 sgk mRNA 表現量愈多。可從此圖發現學得快的老鼠海馬迴中的 sgk mRNA 表現量遠較學得慢的老鼠多



隨著游泳訓練次數的增加(橫軸)，三組的老鼠找到平台所花的時間均漸減(縱軸)。但轉染野生型 sgk(SGKWT)的老鼠在和別組相同的次數經驗下明顯能較快學會找到平台的位置。相對的，轉染突變型(SGKS422A)基因的老鼠卻要花許多時間才能找到平台。

由此推論：

變種的 sgk 基因：降低大白鼠記憶

野生型的 sgk 基因：促進大白鼠記憶

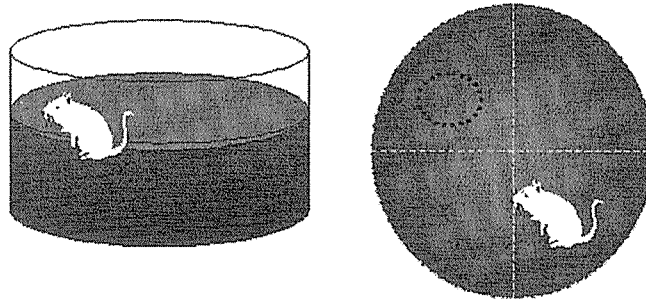
因此 sgk 是影響學習記憶的重要基因

二、海馬迴

在高等動物裡，海馬迴是學習新事物與記憶的中心。它接受各種感官傳來的訊息。這些訊息由鼻內皮質(entorhinal cortex)進入海馬迴，然後經過海馬迴的齒迴(dentate gyrus)、CA3，最後由 CA1 送到腦內其他部位。海馬迴是利用 NMDA 離子通道執行學習與記憶，新的記憶在此形成後，停留一段相當的時間再轉送到大腦皮質。在海馬迴形成記憶的過程中會引起基因的表現，製造出新的蛋白質，修飾神經網路的连接，因而形成長期記憶。若海馬迴受損，新記憶便無法形成，但已有的長期記憶則不受影響。

三、水迷宮學習試驗(Water Maze Learning)

使用直徑 2 公尺，高 0.6 公尺的塑膠製圓形水池，池中注入 20 公分高的水，水溫控制在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，在水池邊緣約 30 公分的固定處放一透明壓克力平台(直徑 8 公分)水池內的水另外加入漂白粉使其為白色不透明混濁狀，水池所在之房間有充足的光線照明，在其四周牆壁張貼一個星狀且顏色鮮豔之圖案即依方形吊櫃，以作為空間學習的空間參考線索(spatial cues)；利用此水迷宮學習試驗可以挑選出學習快(fast learner)與學習慢(slow learner)的大白鼠，此為實驗室所採用的學習行為模式。



四、LTP (long-term potentiation)

當兩個神經細胞同時被激發時，界於兩細胞之間的神經突觸(synapse)的反應強度會受到強化。將海馬迴中興奮性的突觸(synapse)施予短暫、重複的高頻電刺激會導致突觸強度穩定的增加，它可以維持幾小時甚至數天之久。這種現象稱為長期增益作用(long-term potentiation 或 LTP)，是突觸後神經細胞對動作電位所產生的強化反應。LTP 普遍被發現在腦中數個特定部位，特別是海馬迴(hippocampus)區域—可以把經驗轉化為長期記憶的地方，在哺乳動物腦中，LTP 是最令人注目和人們最廣為研究的學習記憶模式(施河等。2002)(Madison DV et al. 1991)。

五、記憶

記憶是一切學習的基礎，除了儲存資料外，記憶具有憶起先前經驗的能力，大腦越發達的動物記憶及學習的能力愈強。人類的記憶依其所能維持時間的長短，可分為短期記憶及長期記憶。短期記憶是在數秒鐘回憶事務的能力，亦即在影像儲存前，對一個物體或意念短暫的感覺及知覺。短期記憶需經過複誦等程序才能形成長期記憶。(施河等。2002)

六、mRNA 及 PCR

mRNA 是以細胞核中 DNA 的一股為鑄模，以三磷酸核甘為原料的過程轉錄合成而來。mRNA 經剪接後會通過核孔而至細胞質中進行轉譯工作合成蛋白質。而聚合酉每連鎖反應連鎖反應(PCR)可快速、大量地進行基因放大，可協助檢測基因含量。(施河等。2002)

參、研究設備器材

一、實驗動物

本研究使用雄性成年 Sprague-Dawley 品系大白鼠，體重介於 220 克與 300 克間，由生醫所動物室繁殖、飼養與管理。

二、研究工具與材料

(一)LTP 部分：立體腦部定位儀、LTP 機器、麻醉劑 urethane、保溫器、解剖器具、電鑽、玻璃 pipette 電極、0.9% NaCl 等。

(二)PCR 部分：

1.RNA extraction: Ultraspect RNA homogenizing reagent, homogenizer, tube, tip, chloroform, isopropanol, ethanol, DEPC-H₂O, centrifuge machine.

2.RT reaction: RNA sample, Oligo-dT, DEPC-H₂O, buffer, DTT, dNTP, RNasin, Superscript II RT

3.Real-time quantitative PCR analysis: forward primer and reverse primer for sgk and HPRT, probe, 2dH₂O

肆、研究過程或方法

一、LTP 實驗部分：

(一)先以麻醉劑 urethane 將大白鼠做腹腔注射麻醉。

(二)麻醉後，固定於立體腦部定位儀(stereotaxic instrument)上，門牙固定桿標高為-2.4 mm，切開頭皮，使頭骨露出，定出前窗(bregma)位置。

(三)依據大白鼠腦部定位圖譜(Paxinos and Watson, 1988)，選擇海馬迴 CA1 區域的座標，即以前窗為原點，在其後方 3.5 mm，兩側各 2.5 mm 的位置，以電鑽鑽開頭骨，分別將紀錄電極及刺激電極插入 CA1 位置，

- (四)適度移動電極以找尋適切的電位訊號，並使用高頻電刺激 (400 Hz)，刺激老鼠的海馬迴輸入神經纖維，以激發其 LTP，並在海馬迴細胞紀錄 LTP。
- (五)刺激強度—興奮性突觸後膜電位反應曲線：先做 30 min baseline (基準線)的膜電位反應曲線；然後再給予高頻率電刺激 (10 pulses at 400Hz×5/set, 4 sets)，並記錄連續三小時的膜電位反應。

二、組織分析部份

- (一)白鼠在做完電生理膜電位測定後，即予取腦。將取出的腦先浸泡於生理鹽水 3-5 分鐘，然後在冰台上進行解剖，取出雙側的海馬迴 CA1 組織，並保存在-80°C 的冷凍櫃中
- (二)抽取 RNA：採取 Ultraspec 核糖核酸抽取溶液(Biotecx Lab., TA, USA)：
- 1.取 0.5 ml Ultraspec 溶液，放入有海馬迴組織(約 100 mg)的試管 (tube)中，將組織完全磨碎，在冰上靜置 5 分鐘。
 - 2.加入 0.1ml 氯仿(chloroform)，震盪混和 15 秒，再靜置於冰上 5 分鐘(達 4°C)，以桌上型離心機，在 14,500 rpm 轉速下離心 15 分鐘。
 - 3.取出上清液(約 300 μ l)，加入等體積異丙醇(isopropanol)搖勻後，使其在冰上沉澱 10 分鐘，再以離心機在 14,500 rpm 轉速下離心 15 分鐘(4°C)，取得核糖核酸沉澱物，以 0.6ml 75%酒精清洗核糖核酸沉澱物，並以同樣轉速離心 5 分鐘共洗兩次。
 - 4.真空下抽取 3 分鐘使酒精蒸散，再將核糖核酸沉澱物溶於 30 μ l DEPC H₂O 中，此即為抽取所得的總核糖核酸。
- (三)反轉錄-即時聚合酶連鎖反應(RT-real-time-PCR)：
- 1.反轉錄反應(RT reaction)：以 Ultraspec II RNA isolation system 分離出 RNA，加入 RNase-free RQ1 保護 RNA 及 DNase 去除其中的 DNA。取 1 μ g RNA 及 1 μ l Superscript II MMLV 反轉錄酶(200 units/ μ l)(GibcoBRL, USA)加入 20 μ l 溶液中以進行反轉錄反應。
 - 2.即時聚合酶連鎖反應定量分析(Real-time quantitative PCR analysis)：
我們以型號 PRISM 7700 的 PCR 機器來偵測 DNA 的含量。所用的引子和探針(probe)是根據 sgk 及 HPRT 基因設計出來的。由於 HPRT 基因的表現不會受實驗處理而改變，因而選用作為內在控制(internal control)的基因，並由 sgk 相對應 HPRT 含量的比值來分析 sgk 含量之變化。

sgk 的合成引子如下：

上股(forward primer)為 5' -GGT GCT AGC TCT AAA GGA GCT TGA-3'

下股(reverse primer)為 5' -CCT GCA TCT TCC TTC TCA CTG A-3'

探針(Probe)為 5' -6FAM TGC CGC CTG AGA CGC ACC TTG TAMRA-3'，包含了 73 個 sgk cDNA 的鹼基片段。

HPRT 的合成引子如下：

上股(forward primer)為 5' -GCC GAC CGG TTC TGT CAT-3'

下股(reverse primer)為 5' -TCA TAA CCT GGT TCA TCA CTA ATC-3'

探針(Probe)為 5' -VIC TCG ACC CTC AGT CCC AGC GTC G TAMRA-3'，包含了 69 個 HPRT cDNA 的鹼基片段。

同一個 sample 中 sgk 與 HPRT 的量是在不同的試管中同時進行分析，且每個試樣須重複成兩次來進行測定。每管混合液中包含：1 μ l RT product、兩種 primer 各 200 nM、250 nM 的 probe 及 PCR master mix，總共 25 μ l。

Real-time PCR 的過程為：

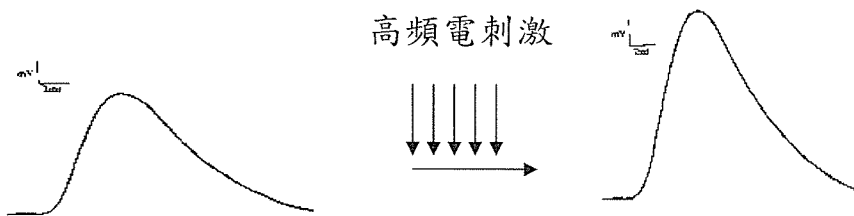
55°C，2 分鐘 → 95°C，10 分鐘後，再以 95°C，15 秒 → 60°C，1 分鐘進行 40 個週期 (cycle) 的反應。

3. mRNA 定量分析

以對照組的 RT product 做不同倍數(1x、5x、10x、25x)的稀釋建立標準連續稀釋曲線(standard serial dilution curve)，實驗試樣可經由內插法的方式標定每個 sample 的 mRNA 含量，再利用 sgk 與 HPRT 含量的比值比較 sgk mRNA 的含量多寡。

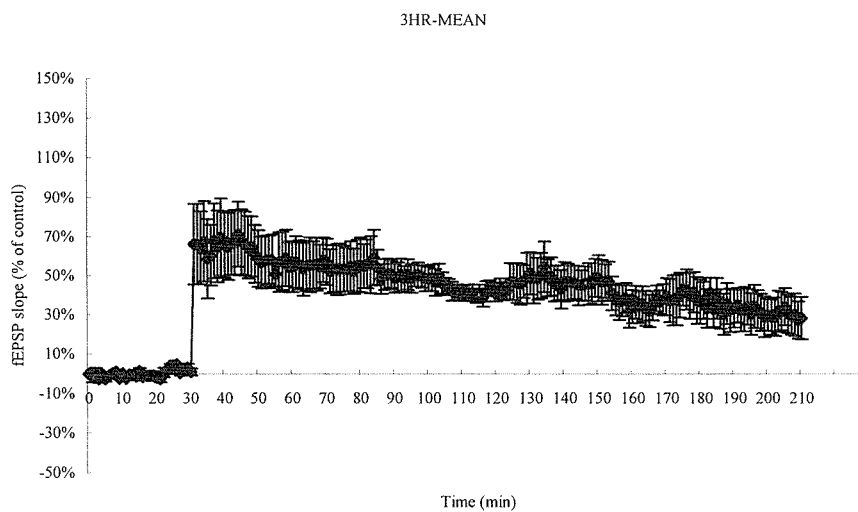
伍、研究結果

- 一、在”引發老鼠的 LTP 並觀察紀錄其膜電位變化”的部份中，我們共做了 15 隻老鼠，分成三組（每組各 5 隻老鼠）進行實驗：第一組為紀錄 30 分鐘的 baseline (基準線)膜電位反應，第二組為紀錄完 30 分鐘的 baseline (基準線)膜電位反應後引發其 LTP 並紀錄引發後十分鐘的膜電位反應，第三組則紀錄直至引發 LTP 後三小時之膜電位反應。在利用 excel 繪成圖表後，發現平均上來說，引發老鼠的 LTP 會使牠的膜電位反應明顯增加，並可以持續長達三小時之久。

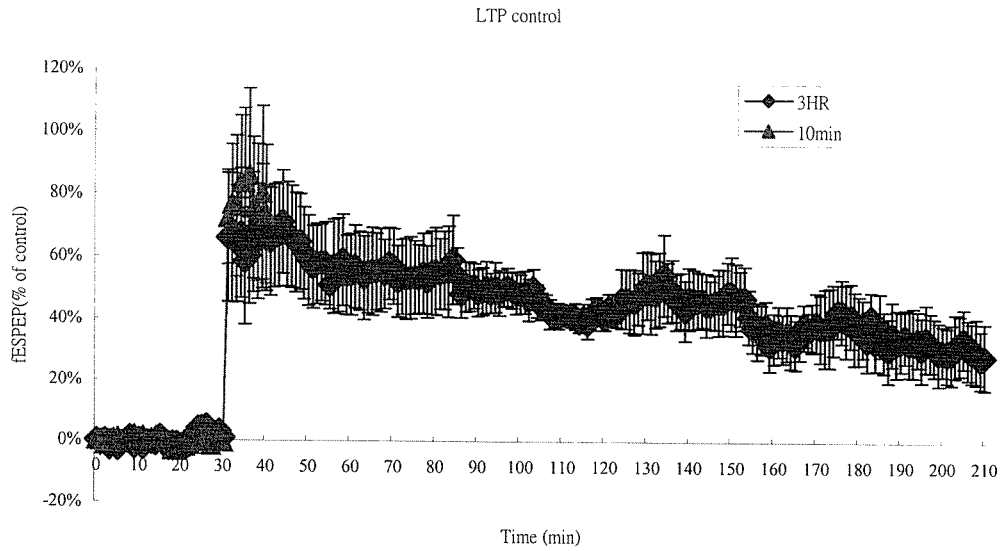


圖一：引發 LTP 前後之細胞膜電位反應曲線

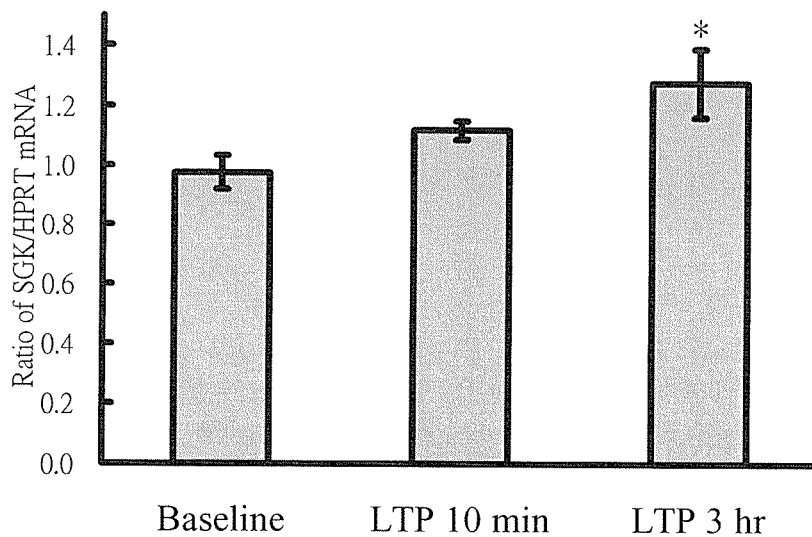
由圖中可以發現給予短暫高頻電刺激能引發老鼠海馬迴的 LTP 會使其細胞膜電位反應明顯增加。



圖二：引發老鼠 LTP 並記錄三小時之膜電位變化圖。可發現高頻電刺激後細胞膜電位明顯增大並可持續很久。雖然圖中顯示雖然隨著記錄時間的增加，膜電位有下降的現象，但仍然較原來未引發 LTP 之前大許多並可持續三小時。



圖三：引發 LTP 前，引發 LTP 後 10 min 及引發 LTP 後 3 hour 的情形
 二、我們以 real-time PCR 的方式比較引發 LTP 前和引發 LTP 後 10 分鐘、3 小時之 *sgk* mRNA 表現量，發現引發產生 LTP 後 3 小時的老鼠海馬迴區域中的 *sgk* mRNA 含量較對照組 (baseline) 有增加的現象，經杜耐特氏統計方法算出其 *tD* 值為 2.51，達到統計學上 0.05 的顯著性差異，而引發產生 LTP 後 10 分鐘的老鼠 *tD* 值為 1.02，並未達到顯著差異值。



圖四：引發 LTP 前和引發 LTP 後 10 分鐘、3 小時之 *sgk* mRNA 表現量比較圖 (各組 $n=6$ ，值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。*表示 $p < 0.05$)

(各組 n= 6，值以 mean±SEM 表示。*表示 p<0.05)

陸、討論

- 一、傳統 PCR 是在整個聚合酶連鎖反應結束後藉由偵測所標定上的放射性物質含量的方式來代表總產物的含量，因此有可能會因 primer 或 dNTP 用盡而造成結果不準確的情形。我們所使用的 real-time PCR 會在每個複製的 cycle 即時偵測出當時 cDNA 的含量，並在產物量於一線性關係內來計算正確的 cDNA 含量，有助於增進實驗的精準度。
- 二、由實驗結果可以發現引發 LTP 三小時的老鼠海馬迴區域中的 *sgk* mRNA 含量相對於對照組 (baseline) 有增加的現象，且達到統計學上 0.05 的顯著性差異。而引發產生 LTP 後 10 分鐘的老鼠則未達到顯著性差異值。對照文獻發現 LTP 分為早期和晚期 (early phase, late phase) 兩個階段，相當於記憶的長期記憶和短期記憶，機制不同且各自獨立。由實驗數據可以發現 *sgk* mRNA 表現量在 LTP 晚期才有顯著的增加，由此可知 *sgk* 主要是參與長期記憶的形成，而非短期記憶。
- 三、引發老鼠的長期增益作用可使其膜電位增加並可維持許久，目前在一篇閱讀文獻中發現最長可持續至 100 天之久 (The Journal of Neuroscience, November 1, 2002, 22)，而在另一篇文獻中也有證實其膜電位可持續至四小時 (Cell, Vol 108, 689-703, March, 8.)。從實驗結果發現引發老鼠的長期增益作用其膜電位強度在三小時後仍持續存在，確認了 LTP 可作為研究長期記憶的電生理模式。

柒、結論

- 一、長期增益作用 (long-term potentiation, 簡稱 LTP) 是長期記憶 (long-term memory) 的重要電生理模式之一，從本實驗可證實以電刺激老鼠腦部海馬迴區域會引發其長期增益作用，且其強度在三小時後仍持續存在。
- 二、本實驗成功的以電生理模式連結了 *sgk*、LTP 與長期記憶的關係，證明了“引發老鼠的 LTP 應該會使 *sgk* mRNA 表現量增加”的推論，且 *sgk* 是影響長期記憶形成的關鍵基因。

捌、參考資料及其他

- 一、施河等。高中生物下冊。2002 初版。台南。南一書局。p.87。2002

- 二、Angel Barce, Juan M Alarcon, and Eric R. Kandal. 2002 Expression of Constitutively Active CREB Protein Facilitates the Late Phase of Long-term Potentiation by Enhancing Synaptic Capture. *Cell*, Vol 108, 689-703, March, 8
- 三、Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- 四、Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA. 1991. Mechanisms underlying long-term potentiation for synaptic transmission. *Annu Rev Neurosci* 14:379-97.
- 五、MacNaughton BL, Barnes CA, O'Keefe J. 1983. The contribution of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp Brain Res* 52:41-49.
- 六、Moser E, Moser MB, Andersen P. 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916-3925.
- 七、Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, Hsu WL, Lee EHY. *sgk*, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *PNAS* 99:3990-3995, 2002.

玖、謝誌

- 一、感謝李小媛教授和中研院生醫所 R308 的所有學長姊給我的指導、幫助與照顧。
- 二、感謝潘彥宏老師的指導及孫組長、于組長在行政方面的協助。
- 三、感謝父母的支持與接送(往返中研院)。
- 四、感謝所有因實驗而犧牲的大白鼠。
- 五、感謝導師及同學們的精神支持。