

微型述评

鸣禽发声学习记忆与即刻早期基因*

赵 静^{1,2)}** 李东风²⁾⁽¹⁾中国科学院生物物理研究所脑与认知科学研究中心, 中国科学院视觉信息加工重点实验室, 北京 100101;⁽²⁾东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

摘要 鸣禽受到声音信号的刺激或自身表现出发声行为时, 脑内即刻早期基因 (immediate early gene, IEG) 能迅速被激活而表达. 其中 *zenk*、*c-fos* 和 *c-jun* 表达的脑区及水平与鸟在鸣唱时神经元的活动区域及活动程度相一致, 暗示 IEG 在鸣禽发声学习记忆中起重要作用.

关键词 发声, 学习记忆, 即刻早期基因, 鸣禽

学科分类号 Q344

鸣禽被认为是除人类以外具有最复杂发声行为的动物. 幼鸟通过模仿亲鸟的鸣声来学习发声, 成鸟的鸣声交流在求偶、繁殖、育雏及占区等行为中发挥至关重要的作用^[1], 而且雌鸟、雄鸟在鸣唱能力、行为反应中也有显著的差异. 因鸟类鸣声的发展与人类语言学习有很大的相似性, 这就提示对鸟鸣的研究有助于对人类语言及中枢调控机制的理解. 近年来, 随着分子生物学对神经科学的渗透和交叉, 大量研究表明, 在鸟类的中枢神经系统中同样广泛存在着能被第二信使诱导的快速反应基因, 也称即刻早期基因. IEG 是原癌基因 (proto-oncogene) 的一种, 包括 *fos*、*jun*、*myc* 和 *egr* (early growth response) 等家族在内的近百个基因, 编码作为“第三信使”的核蛋白. 当鸟类鸣唱或听到鸣曲时, 可快速地诱发 IEG 的转录, 说明 *zenk* (*egr* 家族)、*c-fos* 和 *c-jun* 等基因与鸟类发声学习记忆的形成相关.

1 *zenk* 与发声行为

Mello 等^[2]从金丝雀的 cDNA 文库中, 筛选出了 IEG 家族中的 *zenk* (*zif*-268、*egr*-1、*NGF*-A 和 *krox*-24 的缩写) 基因, 它与声音诱导相关而且编码具有锌指结构的转录调节子. *zenk* 能够迅速被鸟语激活, 其 mRNA 的转录在 30 min 达到高峰, 1 h 左右回复到激活前的水平. 若再次给予鸟语刺激, *zenk* 可被重新激活, 提示 *zenk* 可能与长期记忆有关并参与感知觉信号的选择与存储.

鸣禽发声及学习记忆的神经基础研究已经取得

了较大的进展(图 1). 对于鸣禽不同的发声行为,

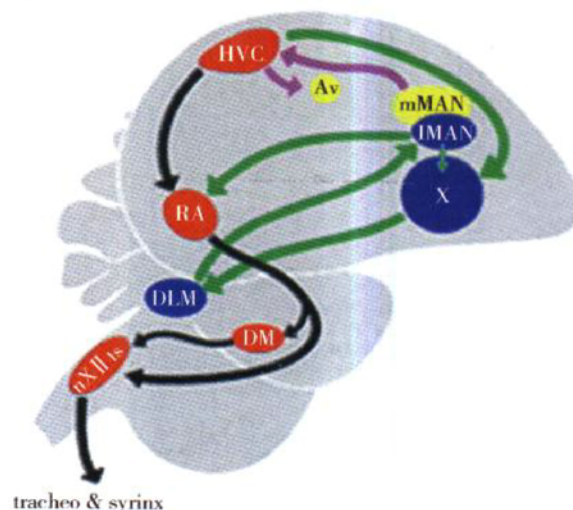


Fig. 1 Vocal control pathway and auditory loop in songbird brain^[3]

图 1 鸣禽发声控制通路及学习神经环路^[3]

鸣禽控制发声学习的神经通路由两条通路组成. 鸣啭控制核团 (红色) 由高级发声中枢 (high vocal center, HVC)、古纹状体粗核 (nucleus robust archistriatalis, RA)、中脑丘间复合体背内侧核 (nucleus dorsalis medialis of ICo, DM) 和舌下神经气管鸣管亚核 (nucleus hypoglossi pars tracheosyringalis, nXII ts) 组成. 另外还有一条发声学习环路 (绿色箭头): HVC → 前脑旁嗅叶 X 区 (X area) → 丘脑背外侧核 (nucleus dorsolateralis anterior thalamus, DLM) → 新纹状体前部巨细胞核外侧部 (nucleus lateral magnocellular of the anterior neostriatum, IMAN) → RA.

* 中国科学院视觉信息加工重点实验室基金 (891705) 项目和教育部 2001 年重点项目.

** 通讯联系人. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-09-20, 接受日期: 2001-11-23

zenk 在脑内表达的区域具有明显差异. 鸟鸣时, 能在 HVC、RA、IMAN、DM 核团及 X 区检测到 *Zenk* 的高水平表达, 其表达量相当于安静时的 30 ~ 60 倍. 在 X 区外侧部表达量最高, 其次是 HVC 和 RA, 而 IMAN 最低, 并且 *Zenk* 的表达量与单位时间内的鸣啭音节的数目呈正相关. 当人为回放同种类鸣曲时, 30 min 后, 发现在 *zenk* 转录的 mRNA 主要在新纹状体 (neostriatum) 中表达, 另外在端脑尾部内侧区, 临近初级听觉结构的六个区域中也检测到. 这些区域包括: 听区 L 区的两个亚区 (L1、L3)、新纹状体尾部内侧区 (caudomedial neostriatum, NCM)、上纹状体腹部尾内侧区 (caudomedial hyperstriatum ventral, cHV)、古纹状体尾部 (caudal paleostium, CP)、中脑背外侧核 (nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis, MLD) 以及 HVC 的“壳” (shelf) 和 RA “杯” (cup) 中^[2] (图 2). 可以总结出 *Zenk* 的表达发生在听觉环路及控制发声核团周围的结构中, 后者主要与旁听觉神经通路相联系; 相反, 在鸣啭控制核团中却没有检测到 *Zenk* 的表达. 这是十分有趣的现象, 因为回放同种鸣曲可导致这些鸣

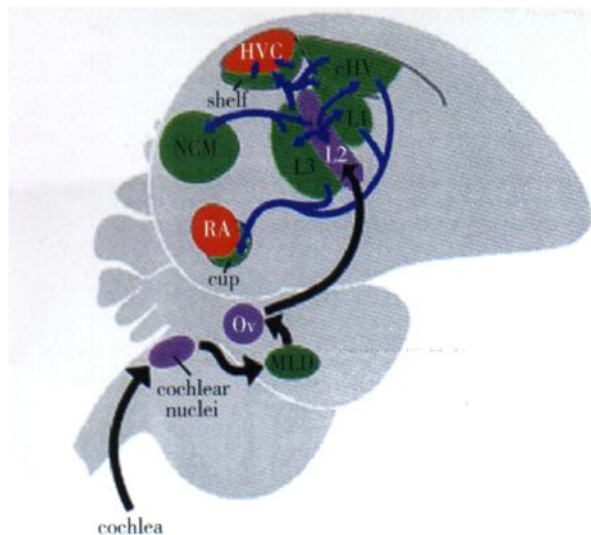


Fig. 2 Areas of ZENK expression^[3]

图 2 ZENK 在脑中表达的区域^[3]

由听觉刺激诱发的 *ZENK* 的表达 (绿色区域), 上行听觉通路 (黑色粗箭头) 包括耳蜗 (cochlea)、耳蜗核 (cochlear nuclei)、中脑背侧核 (nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis, MLD) 和卵圆核 (nucleus ovoidalis, Ov), 终止于 L2 区; 蓝色细箭头显示前脑听觉区之间的通路及传入 HVC 的纤维联系.

啭控制核团神经元膜的去极化; 同时, 诱导 *Zenk* 的表达也观察到膜的去极化, 这是值得进一步研究的现象. 对哑鸟回放同种鸣曲时, 当哑鸟做出鸣唱的动作时, 经检测发现, 鸣唱控制核团中 *Zenk* 的表达水平与正常鸟一样有明显增高的现象. 因此, 无论产生鸣唱与否, 运动行为都可导致 *Zenk* 在鸣唱控制核团的表达, 暗示 *Zenk* 的表达可能由运动行为所驱动.

zenk 对同种类鸣曲的反应要远强于异种类鸣曲的现象, 也证明了鸣啭学习依赖于听觉反馈^[4], 这就产生一个假设: *Zenk* 所表达的部位可能就是鸣唱感知反应关键神经元所分布的区域, 或许也是与鸣唱相联系长期记忆的调节区域. 作为即刻早期基因, *Zenk* 在鸟脑内的表达可能通过调节特定蛋白质的合成, 来影响学习记忆. 在鸣啭过程中, 一些半衰期较短的蛋白质被消耗, 而 *Zenk* 的高效表达可能通过某种途径补充这些蛋白质的消耗.

2 *cfos* 对不同鸣曲的反应

cfos 与神经细胞生长、分化及神经可塑性相关. 最近研究表明, 该基因还在动物发声学习记忆中起重要作用. 在外界刺激下, *cfos* 所转录的 mRNA 及合成的 Fos 蛋白迅速增加, 并且在很短的时间被降解; 同时将外界刺激信号转换为基因的表达, 具有信号传递特征, 因此被称为第三信使.

在聋鸟鸣唱的研究中发现, 与 *zenk* 相似, 鸣唱运动行为可在两个鸣啭感知运动核团 (HVC 和 RA) 中诱导出 Fos 的表达. 该现象提示, 这种诱导独立于听觉反馈之外. 运动驱动 Fos 的表达, 可能在功能上确定了神经通路中某些环节对维持鸣啭可塑性是必需的. 对斑胸草雀的实验也表明, 鸟类对包括自鸣曲 (bird's own song) 在内的听觉刺激, 都不能诱发鸣唱控制系统中的 Fos 表达^[5].

若将新生幼鸟与亲鸟隔离, 在成长过程中回放亲鸟鸣声的录音, 进行发声学习的训练. 在成年之后, 重新回到有亲鸟鸣声的环境中, 发现在与鸣唱学习相关的两个核团 NCM 和 cHV 中, Fos 的表达明显增高; 而在鸣唱控制核团 HVC 和 X 区中, 基本检测不到 Fos 的表达. 同时还发现, Fos 在 NCM 中的表达水平与从亲鸟磁带中所学到的鸣曲音素 (element) 的数目呈正相关; 暗示鸟脑内局部神经元对亲鸟鸣声的活动性反应取决于鸣啭学习时鸣曲因素的数目.

3 *c-jun* 与 *c-fos* 的协同作用

c-jun 编码的 Jun 可与 Fos 形成异源二聚体, 共同调控靶基因转录. Mello 等^[6]用回放鸣曲及注射 γ -氨基丁酸 (γ -GABA) 的拮抗剂环戊并四唑 (metrzolet) 的方法, 来探测 *c-jun* 在鸣禽脑中的表达模式. 发现在刺激后, 在端脑的广泛区域检测到了 *c-jun* 的表达; 但在 X 区的表达水平较低, 这一点与 *zenk* 不同. 这也提示不同的 IEG 具有不同的调节方式和不同的作用脑区. *Zenk* 的特殊锌指环结构能直接结合病毒, 而 Jun 通过亮氨酸拉链, 形成二聚体从而被激活. 但是, *c-jun* 和 *zenk* 在含有雄激素受体的脑核团和初级听觉丘脑接受区基本都没有表达, 却在端脑的绝大部分区域能观察到表达的存在. *zenk*、*fos* 和 *jun* 的表达为保持长期记忆所必需, 这可能是通过信号转导、诱导突触重建、合成及传递所需蛋白质等途径来发挥作用.

4 研究前景

鸣禽发声学习记忆的分子机制可为研究人类语言提供很好的模型. 断层摄影技术表明, 当人类听到语言时, 皮层的 Broca 区 (运动区) 和 Wernicker 区 (听觉区) 中神经元的活动性都有一定提高, 特别是 Broca 区在发声中显现出较高的活动性. 从神经生理学的角度来看, 人类同鸟类感知和产生语言的过程具有相似性. 但是在基因水平, 有关人类学习记忆的过程在脑中的表达还所知甚少, 鸣禽为我们提供了一种理想的动物模型来进一步研究学习记忆的机理. 可以从分子水平上认识基因的作用机理, 并筛选与智力相关的基因. 最近, 有报道表明, 鸟类 POU-box 基因与耳泡的早期发育有关, 提示听觉系统的形成可能由多种基因调控^[7~9], 这与视觉发育相似^[10, 11]. 而且中枢神经系统兴奋

性神经递质 (谷氨酸、乙酰胆碱等) 及性激素受体的分布区往往也是 IEG 表达丰富区^[3], 由于这些受体与学习记忆密切相关, 我们可通过 IEG 作为探针来研究学习记忆过程在脑内所涉及的解剖部位, 深化对学习记忆具体过程及机理的认识. 因此, IEG 与学习关系的研究可能对人类智力的开发提供重要的实验资料.

致谢 导师赫荣乔博士对此文进行悉心审校, 特此感谢!

参 考 文 献

- 1 Jarvis E D, Ribeiro S, Silva M L, *et al.* Behaviorally driven gene expression reveals song nuclei in hummingbird brain. *Nature*, 2000, **406** (10): 628~ 632
- 2 Mello C V, Ribeiro S. *Zenk* protein regulation by song in the brain of songbirds. *J Comp Neurol*, 1998, **393** (4): 426~ 438
- 3 Jarvis E D, Nottebohm F. Motor-driven gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (4): 4097~ 4102
- 4 李东风. 鸣禽发声学习记忆的神经机制. *自然科学进展*, 2001, **11** (3): 225~ 231
- 5 Li D F. *Nat Sci Prog*, 2001, **11** (3): 225~ 231
- 6 Kimpel R R, Doupe A J. Fos is induced by singing in distinct neuronal population in a motor network. *Neuron*, 1997, **18** (18): 315~ 325
- 7 Nastiuk K L, Mello C V, George J M, *et al.* Immediate-early gene responses in the avian song control system: cloning and expression analysis of the canary *c-jun* cDNA. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, **27** (2): 299~ 309
- 8 Liu W, He R Q, Xue Z G. Developmental expression of POU transcription factor qBrrr-2 during somitic myogenesis in quail. *Int J Dev Biol*, 2001, **45**: 415~ 520
- 9 Liu W, Xue J X, He R Q, *et al.* qBrrr-2, a POU III gene in quail: Distinct developmental expression revealed by a specific antibody. *Mechanism of Development*, 2001, **100**: 349~ 352
- 10 Liu Y, J Xue J X, He R Q, *et al.* qBrrr-2, a Pou domain gene expressed in quail embryos. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1491**: 27~ 36
- 11 殷咏仪. 视网膜发育与形成的“镶嵌模型”. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **28** (2): 137~ 139
- 12 Yin Y Y. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **28** (2): 137~ 139
- 13 刘 阳. Vax 基因与视觉神经系统的早期发育. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (4): 345~ 347
- 14 Liu Y. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (4): 345~ 347

Vocal Learning and Memory in Songbird are Related to Immediate Early Genes*

ZHAO Jing^{1,2)}**, LI Dong-Feng²⁾

⁽¹⁾ Laboratory Visual Information Processing, Center for Brain and Cognition Sciences, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract On the basis of the recent reports, immediate early gene (IEG) can be rapidly induced and expressed when a songbird is either stimulated by bird-song or in its vocal-behavior. The expression area and level in brain of IEG, such as *zenk*, *c-fos* and *c-jun*, are corresponding to where the neurons are related, as a songbird is

stimulated, suggesting that IEG plays an important role in vocal learning and memory.

Key words vocalization, learning and memory, immediate early gene, songbird

* This work was supported by grants from the Foundation of Laboratory Visual Information Processing of CAS (891705) and Education Ministry Important Project in 2001.

** Corresponding author. School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

Received: September 20, 2001 Accepted: November 23, 2001

碳纳米管原子力显微镜探针的生物学应用

赵铁强¹⁾ 国立秋²⁾ 董 申²⁾

(¹⁾哈尔滨医科大学第一临床医学院心内科, 哈尔滨 150001; ²⁾哈尔滨工业大学精密工程研究所, 哈尔滨 150001)

原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 是一种具有原子级分辨率的超微结构研究工具, 由 Binnig 等于 1986 年发明. 探针是决定 AFM 分辨率的核心部件. 近几年来, 碳纳米管成为制备 AFM 探针的新材料.

碳纳米管于 1991 年首次被发现, 是由碳六元环构成的石墨烯按一定方式卷曲形成的无缝、中空、纳米级管状结构, 它具有很高的强度, 杨氏模量约 1.0 TPa, 还具有很好的弹性, 受较大负荷时既不破裂也不发生塑性变形. 单壁碳纳米管半径可达 0.2~2.5 nm. 碳纳米管的结构和性质符合高分辨率 AFM 探针的要求. 碳纳米管探针的制备主要是用化学气相沉积法, 即利用 Fe, Co, Ni 等金属作为催化剂, 从碳氢化合物中裂解出自由碳原子沉积在加工过的 AFM 硅探针上, 直接生长出碳纳米管针尖.

以下略举几例说明碳纳米管探针在生物领域的应用.

免疫球蛋白: 传统的 AFM 研究看不到 IgG 的 Y 形结构, 碳纳米管探针则可以在室温下重复获得清楚的 Y 型结构. 对目前还不能用 X 射线衍射分析的 IgM, 碳纳米管探针清楚地显示了其对称的五邻体结构, 包括 5 对 Fab 片段和 5 个 Fc 片段.

GroES 蛋白: 单壁碳纳米管探针清楚地显示了 GroES 对称的七聚体结构, 发现它呈两种形态, 一种为指环状结构, 另一种呈圆屋顶状.

核小体重构: 生化方面的证据表明 SWI/SNF 复合物能使核小体结构发生变化, 对 DNA 裂解酶和限制性内切酶的敏感性增加, 推测其重构状态是单个核小体的“二聚体”

形式. 碳纳米管探针研究从形态学证实了此种推测.

RecA-DNA 复合物: 碳纳米管探针所获的 DNA 分子、RecA 单体、RecA 六聚体、RecA-DNA 丝状复合物的形貌图较传统的 AFM 图象更清楚, 分辨率更高; 通过测量推测在复合物形成开始是由 RecA 单体而非六聚体与 DNA 结合的.

DNA 序列分析: Woolley 报道用碳纳米管探针在质粒中进行特定序列的位置判断. 方法是用链霉抗生物素标记寡核苷酸探针 GGGCGCG, 使之与 DNA 片段上的靶序列进行特异性杂交, 沿探针合成 DNA 双链, 用 AFM 观察标记的空间位置以分析特定序列在质粒中的位置. 结果表明 GGGCGCG 位点在 3 390 bp 处, 与已知的 3 405 bp 处吻合. 由于高分辨率的碳纳米管探针能区分不同的标记, 可以用上述方法检测 2 个或多个位点.

鉴定单元型: UDP-葡萄糖苷酰基转移酶基因有 2 种多态位点, 决定 4 个等位基因. 其 (* 1/* 3) 和 (* 2/* 4) 单元型用传统方法不能区别. Woolley 以 IRD800 和链霉抗生物素分别标记 2 个多态位点, 用碳纳米管探针确切地将它们区分开来: (* 1/* 3) 型只在 DNA 分子末端有一个标记——IRD800 或链霉抗生物素; (* 2/* 4) 型在 DNA 分子上有二个标记——IRD800 和链霉抗生物素.

细胞: 碳纳米管探针用于观察疟原虫感染的红细胞, 比传统探针记录到的图象细节更丰富, 分辨率更高.

总之, 碳纳米管以其固有的性质成为 AFM 的理想探针, 它必将在生物学领域发挥越来越重要的作用.