

恐惧记忆相关蛋白的蛋白质组学研究

郑君芳, 刘 华, 熊 英, 王小柱, 贺俊崎
(首都医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100069)

摘要 应用双向凝胶电泳结合质谱鉴定和数据库检索, 分析比较了 CD1 和 C57BL/6J 小鼠经条件性恐惧实验后海马蛋白表达的差异, 探讨了与恐惧记忆相关的蛋白质. CD1 和 C57BL/6J 小鼠经条件性恐惧实验后, 海马蛋白表达存在明显差异, 29 种蛋白(31 个蛋白点)与恐惧记忆的形成显著相关. 其中 24 个蛋白点表达显著上调, 7 个蛋白点显著下调. 与恐惧记忆相关的蛋白按功能可分为如下 6 类: (1) 能量代谢或线粒体功能相关蛋白; (2) 神经发育相关蛋白; (3) 信号转导相关蛋白; (4) 细胞骨架相关蛋白; (5) 氨基酸代谢和蛋白分解相关蛋白; (6) 伴侣蛋白. 这些恐惧记忆形成的相关蛋白深化了对恐惧记忆脑机制的认识, 为研究和治疗认知相关疾病提供了新靶标.

关键词 条件性恐惧; 海马; 蛋白质组学; 质谱

中图分类号 O629; Q51 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2010)04-0736-06

学习与记忆是生物体生存的必要能力. 记忆力下降是认知损害疾病(如阿尔茨海默病及精神分裂症等)的早期症状^[1]. 在学习和记忆的实验研究中, 条件性恐惧记忆是常供选择的一种记忆类型, 而且在其它记忆类型的实验研究中, 也常涉及应激事件的影响^[2], 如在 Morris 水迷宫中的训练就是对受试动物的应激事件^[3]. 条件性恐惧的形成既是一种学习和记忆的过程, 也是一种情绪的形成过程. 恐惧情感的产生可能是前额叶皮层、海马和杏仁核 3 个脑区共同激活的结果, 而环境恐惧(Contextual fear)则更多依赖于海马区, 因为直接损毁海马或使其失活能够破坏条件性恐惧的获得^[4]与巩固过程^[5]. 记忆的获得依赖于蛋白合成^[6,7], 但目前关于记忆蛋白的系统研究相对较少, 而与条件性恐惧相关的记忆蛋白的研究更为有限. 不同小鼠品系的突触可塑性和认知功能存在差异^[8-10], 或在执行不同任务时^[9]认知功能不同. 本研究组以往研究结果表明^[10], 封闭群 CD1 小鼠和近交系 C57BL/6J 小鼠在空间记忆任务中的表现不同, 提示它们在恐惧记忆任务中的表现也存在差异. 虽然对导致这种差异的原因有一些分子水平的解释(如有可能是由于记忆相关蛋白的表达水平有差异所致), 实验结果也表明各种记忆相关的膜蛋白表现出品系依赖性的表达^[11], 但是缺乏系统解释. 因此有必要系统地搜索记忆形成相关的蛋白级联途径的成分. 蛋白质组学技术可同时调查蛋白通路和级联途径, 是分析学习记忆复杂机制的理想工具. C57BL/6J 近交系小鼠在条件性恐惧实验中表现较好且一致性强^[12], 因此是良好的依赖海马的学习和记忆小鼠模型, 常被用作空间记忆能力多株比较的标准表现株. CD1 小鼠品系是在各种记忆任务中表现较好的封闭群^[13], 与其它封闭群相比, CD1 小鼠空间记忆能力更强^[14]. 因此本文利用蛋白质组学方法分析比较 C57BL/6J 小鼠和 CD1 小鼠经过条件性恐惧(Fear conditioning)实验后海马蛋白表达水平的差异, 以系统地研究与恐惧和情感记忆相关的蛋白质及其品系依赖性.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验动物为健康 CD1 和 C57BL/6J 小鼠(每组 20 只), 由维也纳医科大学动物中心提供. 选用鼠龄

收稿日期: 2009-07-01.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30772573, 30900247)、北京市科技新星计划 B 类项目(批准号: 2008B58)、教育部新世纪优秀人才项目(批准号: NCET-06-0184)、北京市优秀人才培养项目(批准号: 20071D0501800253)和首都医科大学科研基金(批准号: 2008ZR01)资助.

联系人简介: 贺俊崎, 男, 博士, 教授, 主要从事蛋白-蛋白相互作用及蛋白质组学研究. E-mail: jq_he@cmmu.edu.cn

10~14 周的雄性鼠, 并分笼饲养, 自由饮用饲料和水, 动物室昼夜交替自然采光。

Ultrafree-4 离心管购自 Millipore 公司; 胶体考染试剂盒购自 Bio-Rad 公司; 蛋白酶抑制剂购于 Roche 公司; 磷酸酶抑制剂购于 Calbiochem 公司; 其余大部分试剂购于 Sigma 公司. Ultimate 3000 液相色谱仪购自 Dionex 公司; HCT ultra PTM 质谱测定仪发现系统购自 Bruker 公司. 恐惧条件反射训练装置及条件刺激装置参见文献[15].

1.2 方 法

1.2.1 环境条件性恐惧实验 参照文献[16]方法, 将实验分为训练和检测两部分. 每次训练前用 70% 乙醇擦拭训练箱. 将小鼠置于训练箱电极板的中央, 适应 2 min 后, 记录基础活动水平. 给予 120 s 条件信号即音频刺激(2000~3000 Hz, 75~80 dB), 2 min 后, 再次给予持续时间 30 s 的音频刺激, 最后的 2 s 同时施加强度为 0.7 mA 的足底电击. 间隔 2 min 重复上述过程 3 次完成训练. 最后一次电击后, 停留 30 s, 将训练小鼠放回饲养笼中. 训练的效果于 24 h 后检测. 小鼠在训练箱中适应 3 min 后, 单独给予 1 次声音信号刺激, 观察到 5 min 内每 5 s 有 2 s 僵直反应(freezing)的情况. 僵直是指动物接受声音信号后, 除呼吸运动外, 全身其他躯体运动全部停止的状态. 48 h 后, 在训练箱中进一步检测两组小鼠再学习及记忆巩固的情况.

1.2.2 海马蛋白提取及定量 训练结束 6 h 后, 将小鼠用颈椎脱位法快速处死, 迅速取出大脑, 用生理盐水洗去血渍, 迅速剥离出海马组织, 并立即将其置于液氮中冷冻, 保存于 -80 °C. 将小鼠海马在 1 mL 样品缓冲液{20 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS), 10 mmol/L 二硫苏糖醇, 1 mmol/L 乙三胺四乙酸, 1 mmol/L 苯甲磺酰氟, 1 片蛋白酶抑制剂和 0.2% 磷酸酶抑制剂}中匀浆, 补加样品缓冲液至 1.2 mL. 冰浴超声 30 s, 5 次, 室温静置 60 min, 在 12 °C 离心(15000g)60 min, 用 Ultrafree-4 离心管于 12 °C 离心(3000g)脱盐直至洗脱体积达 4 mL, 样品体积至 100~200 μ L, 用 Bradford 法测定蛋白浓度.

1.2.3 双向凝胶电泳 将 700 μ g 蛋白样品用 18 cm (pH=3~10) 的 NL IPG 胶条进行等电聚焦(聚焦始于 200 V, 电压梯度上升至 8000 V, 然后维持在 8000 V, 3 h)和垂直 10%~16% 梯度 SDS-PAGE 电泳. 用固定液固定蛋白 12 h, 用胶体考染试剂盒染色 8 h.

1.2.4 凝胶图像分析 用图像扫描仪透射扫描凝胶, 所得图谱以 Proteomweaver 软件进行图像分析, 比较蛋白斑点差异.

1.2.5 质谱测定 切割凝胶中表达差异的蛋白点, 脱色, 胶内酶切, 用 nano-LC-ESI-(CID/ETD)-MS/MS(High capacity ion trap, HCT)检测.

1.2.6 数据库检索鉴定蛋白质 选择欲查询物种, 输入串联质谱数据及其它参数, 在数据库中查询与其相匹配的蛋白质^[17]. 检索数据库为 Mascot(<http://www.matrixscience.com>).

1.3 统计处理

实验数值用平均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS11.5 软件进行数据处理. 以 $P < 0.001$ 为统计学显著差异的标准.

2 结果与讨论

2.1 CD1 和 C57BL/6J 小鼠僵直反应

C57BL/6J 小鼠表现出良好的学习和巩固能力, 24 h 内僵直反应比 CD1 小鼠明显增强, 而 48 h 后比 CD1 小鼠明显减少.

2.2 双向电泳图谱及凝胶图像分析

CD1 和 C57BL/6J 小鼠海马双向电泳图谱经 Proteomweaver 软件分析, 共分析 474 个蛋白点, 得到 31 个表达有明显差异的蛋白点. 其中, CD1 小鼠海马中有 7 个蛋白点表达显著上调, 24 个蛋白点表达显著下调, C57BL/6J 小鼠海马中有 24 个蛋白点表达显著上调(其中 2 个蛋白点是另一种蛋白的同分异构体 isoform, 故 24 个蛋白点代表 22 种蛋白), 7 个蛋白点表达显著下调(表 1).

Table 1 Identification of differentially expressed proteins

No.	Acc. No.	Protein name	Expression level	M_w (Theor.)	pI (Theor.)
1	P17751	Triosephosphate isomerase	↑	27038	6.90
2	Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit α , mitochondrial	↑	40069	6.27
3	Q8BMF4	Dihydropolyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	↑	68469	8.81
4	P62814	V-Type proton ATPase subunit B, brain isoform	↑	56857	5.57
5	Q91ZA3	Propionyl-CoA carboxylase α chain, mitochondrial	↑	80498	6.83
6	P97807	Fumarate hydratase, mitochondrial	↑	54564	9.12
7	Q8K3J1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	↑	24479	5.89
8	Q9WUR9	Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	↓	25160	7.02
9	P45376	Aldose reductase	↑	36052	6.71
10	Q8BXX1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	↓	59428	9.10
11	P16330	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	↓	47493	9.08
12	P51859	Hepatoma-derived growth factor	↓	26367	4.80
13	Q9CPU0	Lactoylglutathione lyase	↓	20967	5.24
14	Q9CPV4	Glyoxalase domain-containing protein 4	↓	33581	5.28
15	Q61411	GTPase HRas	↑	21677	5.16
16	P54227	Stathmin	↑	17264	5.76
17	Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	↑	18636	6.30
18	Q9CWS0	N(G), N(G)-Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	↑	31760	5.64
19	P42669	Transcriptional activator protein Pur- α	↑	34976	6.07
20	Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	↑	32340	7.44
21	P47757	F-actin-capping protein subunit β	↑	31611	5.47
22	Q61553	Fascin	↑	55215	6.44
23	Q8C1B7	Septin-11	↑	50005	6.24
24	P05213	Tubulin α -1B chain	↑	50804	4.94
25	Q61753	D-3-Phosphoglycerate dehydrogenase	↑	57347	6.12
26	P15105	Glutamine synthetase	↓	42834	6.64
27	Q9ROP9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	↑	25165	5.14
28	P17742	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase A	↑	18131	7.74
29	P23927	α -Crystallin B chain	↑	20056	6.76

2.3 差异蛋白点的质谱鉴定

对 CD1 和 C57BL/6J 小鼠海马表达有明显变化的 31 个蛋白点进行串联质谱检测及数据库检索, 共鉴定出 29 种蛋白, 这些蛋白的双向电泳图谱如图 1 所示, 结果见表 1.

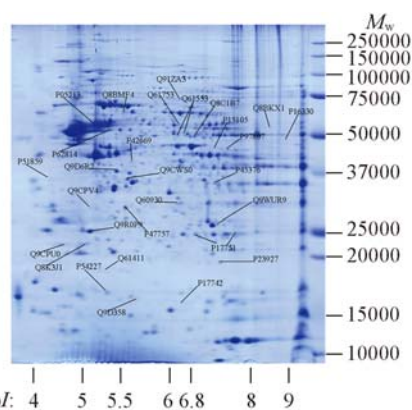


Fig. 1 Representative 2D-gel electrophoresis image

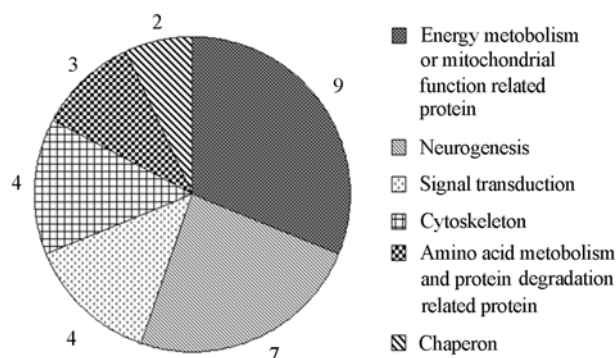


Fig. 2 Category of differentially expressed proteins

The digit around the pie chart is the number of proteins identified with mass spectrometry.

2.4 差异蛋白质的功能范畴

实验结果表明, CD1 和 C57BL/6J 小鼠恐惧记忆能力有明显差别. C57BL/6J 小鼠表现出较好的恐惧记忆能力, 而 CD1 小鼠恐惧记忆能力较弱. 其海马蛋白表达水平也存在显著差异. 在恐惧记忆期间,

C57BL/6J 小鼠多种功能范畴的蛋白表达上调, 而 CD1 小鼠涉及的蛋白功能范畴也相对较少. 表明其记忆能力的差异可能是由不同的海马蛋白表达水平所引起的. 依据直系基因同源群(COGs)分类, 可将这些蛋白依据功能归为 6 类(图 2).

(1) 能量代谢或线粒体功能相关蛋白. 此类功能范畴的蛋白有 8 种在 C57BL/6J 小鼠中高表达, 1 种低表达. 而在 CD1 小鼠中有 1 种高表达, 8 种低表达. 在磷酸丙糖异构酶(Triosephosphate isomerase)、异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase)和丙酮酸脱氢酶(Pyruvate dehydrogenase)中, 前者是糖酵解的关键酶, 重度磷酸丙糖异构酶缺陷可导致神经退行性变^[18,19], 后两者是糖有氧氧化的关键酶, 其活性下调可引起糖代谢障碍并与记忆能力增强有关^[20]. ATP 合酶(ATP synthase)对线粒体功能正常运转及记忆维持起重要作用. 另外, 在糖、脂及氨基酸氧化分解中起重要作用的丙酰辅酶 A 羧化酶 a 链(Propionyl-CoA carboxylase)和延胡索酸酶(Fumarate hydratase)、线粒体呼吸链膜蛋白复合体成分 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8(铁硫蛋白)、参与磷酸转移的腺苷酸激酶(Adenylate kinase isoenzyme 4)和醛糖还原酶(Aldose reductase)也表现出差异. 其中腺苷酸激酶的表达可改善 CD1 小鼠的恐惧记忆能力. 这些蛋白表达水平的不同表明能量代谢是学习记忆的重要保证.

(2) 神经发育相关蛋白. 此类功能范畴的蛋白有 2 种在 C57BL/6J 小鼠中高表达, 5 种低表达. 而在 CD1 小鼠中有 5 种高表达, 2 种低表达. 脑特异的血管生成抑制剂 1 相关蛋白 2(Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2)和 2',3'-环核苷酸磷酸二酯酶(2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNP)在轴突、少突胶质细胞及髓鞘形成中起关键作用^[21-23], CNP 还可以促进微管形成及调节胞浆微管分布^[23]. 肝癌衍生生长因子(Hepatoma-derived growth factor, HDGF)是运动神经元的营养因子^[24], 在神经退行性变发生前, 其在脊椎神经中的表达会上调^[25], HDGF 相关蛋白 3 与微管相互作用, 可促进小鼠皮层神经元神经轴的生长^[26]. 错误的恐惧经验往往会造成焦虑等负面的结果. 丙酮酰谷胱甘肽裂解酶(Lactoyl glutathione lyase, 别名 Glyoxalase I)是特质性焦虑小鼠模型的蛋白标记^[27]. 而醛酮变位酶(Glyoxalase domain-containing protein 4)属于 Glyoxalase I 家族. 上述 5 种蛋白表达水平的上调对 CD1 小鼠的恐惧记忆能力有增强作用. GTPase Hras 突变小鼠神经元发育和突触可塑性异常, 表明其可调节长时程神经元的突触可塑性^[28]. Stathmin 促进微管解聚, 其在 16 位丝氨酸的磷酸化是神经发育期间轴突形成所必需的^[29], 参与习得性和天然恐惧的控制. 若其表达缺失, 会引起小鼠长时程增强(LTP)缺陷, 恐惧记忆能力下降, 无法识别恶劣环境的危险性^[30].

(3) 信号转导相关蛋白. 此类功能范畴的蛋白有 4 种在 C57BL/6J 小鼠中高表达. 低分子量磷酸酶(LMP-PTP)对信息正常传递、跨膜信号转导和突触可塑性起重要作用^[31]. 二甲基精氨酸二甲氨水解酶[N(G), N(G)-Dimethylarginine dimethylaminohydrolase, DDAH]能够通过上调一氧化氮合酶(NOS)活性^[32-34]来调节一氧化氮(NO)的生成. NO 参与学习和记忆过程, 对维持 LTP 效应起易化作用^[35]. 转录因子 PURA(Transcriptional activator protein Pur- α)在锻炼后海马突触可塑性中起作用^[36], 本文研究表明此转录因子在恐惧记忆中也起作用. 电压依赖的阴离子选择通道蛋白 2(Voltage-dependent anion-selective channel protein 2, VDACC2)是突触相关蛋白^[37], 以往研究报道表明其与空间记忆有关^[38], 在本研究中表现出恐惧记忆的品系依赖性. 上述信号蛋白是调节海马功能的主要成分, 同时参与了恐惧记忆的形成.

(4) 细胞骨架相关蛋白. 此类功能范畴的蛋白有 4 种在 C57BL/6J 小鼠中高表达. F 肌动蛋白戴帽蛋白复合体(F-Actin-capping protein subunit β)可参与脊柱和突触形成及囊泡运输, 它也通过蛋白-蛋白相互作用在空间记忆的突触形成和记忆巩固期生长锥的重组中起重要作用^[38-40]. Fascin 蛋白的主要功能是与肌动蛋白结合, 并将其捆绑成平行的肌动蛋白束, 使细胞形成线状或片足的突起, 从而调节肌动蛋白细胞骨架组织形成. Septin 细胞骨架蛋白的正常表达对于脊柱形态发生、树突细胞发育及神经递质分泌起重要作用^[41]. 其功能失调有可能影响神经系统疾病的发生发展. 本研究发现, Septin-11 和微管的主要组成成分 Tubulin α -1B chain 对记忆也起重要作用.

(5) 氨基酸代谢和蛋白分解相关蛋白. 此类功能范畴的蛋白有 2 种在 C57BL/6J 小鼠中高表达, 1 种低表达. 而在 CD1 小鼠中有 1 种高表达, 2 种低表达. 磷酸甘油酸脱氢酶(D-3-Phosphoglycerate dehy-

drogenase)对丝氨酸合成和神经发育起重要作用^[42]. *L*-谷氨酸(*L*-Glutamate, Glu)是人类中枢神经系统中最主要的兴奋性神经递质之一. 谷氨酰胺(Gln)作为脑内Glu代谢的前体物质,具有调节神经系统功能的作用,可用来治疗神经衰弱,改善脑出血后遗症所致记忆障碍,促进智力不全儿童的智力发育以及治疗帕金森氏综合征等. 本研究发现,谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)在CD1小鼠恐惧记忆形成中起作用. 泛素C末端水解酶(Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme, UCH)家族成员包括UCHL1-6, UCHL1对维持正常的突触功能和学习记忆能力十分重要^[43,44]. 本研究进一步证实了此蛋白在记忆中的重要性.

(6) 伴侣蛋白. 此类功能范畴的蛋白有2种在C57BL/6J小鼠中高表达,而在CD1小鼠中有2种低表达. 肽脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A, PPI)属于分子伴侣,可帮助蛋白质折叠. 分子伴侣在生命活动的各个层次都具有重要作用,它的突变和损伤也必定会引起疾病的发生. 以往研究^[38]报道其与空间记忆有关,在此研究中表现出恐惧记忆的品系依赖性. Crystallin, α B(α B2晶体蛋白)属于小热休克蛋白(HSP20)家族,在以往的认知相关疾病模型的海马中, α B2晶体蛋白表达上调^[45],表明此蛋白的正常表达对记忆的维持也起重要作用.

综上,通过蛋白质组学方法研究发现,29种蛋白经恐惧实验后在小鼠海马中表达有差异. 其中,6种功能范畴的蛋白,包括8种能量代谢或线粒体功能相关蛋白,2种神经发育相关蛋白,4种信号转导相关蛋白,4种细胞骨架相关蛋白,2种氨基酸代谢和蛋白分解相关蛋白和2种伴侣蛋白在C57BL/6J小鼠中高表达,其余7种蛋白低表达;而3种功能范畴的蛋白,包括1种线粒体功能相关蛋白,5种神经发育相关蛋白和1种氨基酸代谢相关蛋白在CD1小鼠中高表达,其余22种蛋白低表达. 根据以往研究报道,这些蛋白中有13种蛋白与记忆功能有关. 除了这13个蛋白外,我们还观察到在经过条件性恐惧实验的两种不同品系的小鼠中,16种海马蛋白有差异,这16种蛋白中有10种蛋白上调,6种蛋白下调. 提示这些蛋白有可能是恐惧记忆特异的蛋白,正是这些蛋白导致这两种小鼠记忆能力的差异. 还有一种解释是基因背景不同导致,或者是其它原因导致的差异蛋白,尚有待于进一步的实验验证. 另外,不同品系的小鼠用不同的蛋白进行记忆,其记忆能力存在差别. 表明在进行药理学测试或基因打靶实验中,以及研究上述记忆相关蛋白或相应的通路时,必需考虑品系因素. 由于恐惧记忆是一种情绪性记忆,本研究丰富了恐惧和情感记忆相关蛋白的知识,对研究和治疗认知相关疾病提供了进一步的线索.

参 考 文 献

- [1] Young J. W., Kerr L. E., Kelly J. S., *et al.*. *Neuropharmacology*[J], 2007, **52**(2): 634—645
- [2] Frick K. M., Gresack J. E.. *Behav. Neurosci.* [J], 2003, **117**(6): 1283—1291
- [3] Li Ai-Ping(李爱萍), ZHAO Hui(赵慧), LI Shao(李韶), *et al.*. *Chin. J. Behavioral Med. Sci.* (中国行为医学科学)[J], 2005, **14**(1): 29—31
- [4] LeDoux J. E.. *Annu. Rev. Neurosci.* [J], 2000, **23**: 155—184
- [5] Bangasser D. A., Shors T. J.. *Nat. Neurosci.* [J], 2007, **10**(11): 1401—1403
- [6] Davis H. P., Squire L. R.. *Psychol. Bull.* [J], 1984, **96**(3): 518—559
- [7] Govindarajan A., Kelleher R. J., Tonegawa S.. *Nat. Rev. Neurosci.* [J], 2006, **7**(7): 575—583
- [8] Wahlsten D., Cooper S. F., Crabbe J. C.. *Behav. Brain Res.* [J], 2005, **165**(1): 36—51
- [9] Yoshida M., Goto K., Watanabe S.. *Physiol. Behav.* [J], 2001, **73**(1/2): 37—42
- [10] Patil S. S., Sunyer B., Hoyer H., *et al.*. *Behav. Brain Res.* [J], 2009, **198**(1): 58—68
- [11] Sunyer B., An G., Kang S. U., *et al.*. *Neurochem. Int.* [J], 2009, **55**(4): 253—256
- [12] Nguyen P. V., Duffy S. N., Young J. Z.. *J. Neurophysiol.* [J], 2000, **84**(5): 2484—2493
- [13] Lange-Asschenfeldt C., Lohmann P., Riepe M. W.. *Exp. Neurol.* [J], 2007, **203**(2): 481—485
- [14] Sunyer B., Patil S., Frischer C., *et al.*. *Behav. Brain Res.* [J], 2007, **181**(1): 64—75
- [15] Milad M. R., Quirk G. J.. *Nature*[J], 2002, **420**(6911): 70—74
- [16] Angelo M., Plattner F., Irvine E. E., *et al.*. *Eur. J. Neurosci.* [J], 2003, **18**(2): 423—431
- [17] HUANG Lin(黄琳), CHEN Dong-Shi(陈东仕), YAN Li(颜利), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2009, **30**(2): 314—319

- [18] Hollan S. , Vecsei L. , Karg E. , *et al.* . C. R. Seances Soc. Biol. Fil. [J] , 1998 , **192**(5) : 929—945
- [19] DONG Lei(董雷) , JIANG Ning(蒋宁) , ZHOU Wen-Xia(周文霞) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2007 , **28**(2) : 274—277
- [20] Sunyer B. , Diao W. F. , Kang S. U. , *et al.* . J. Proteome. Res. [J] , 2008 , **7**(12) : 5237—5253
- [21] Koh J. T. , Lee Z. H. , Ahn K. Y. , *et al.* . Mol. Brain Res. [J] , 2001 , **87**(2) : 223—237
- [22] Hinman J. D. , Chen C. D. , Oh S. Y. , *et al.* . Glia[J] , 2008 , **56**(1) : 118—133
- [23] Bifulco M. , Laezza C. , Stingo S. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J] , 2002 , **99**(4) : 1807—1812
- [24] Gallitzendoerfer R. , Abouzied M. M. , Hartmann D. , *et al.* . Dev. Dyn. [J] , 2008 , **237**(7) : 1875—1885
- [25] Marubuchi S. , Okuda T. , Tagawa K. , *et al.* . J. Neurochem. [J] , 2006 , **99**(1) : 70—83
- [26] El-Tahir H. M. , Abouzied M. M. , Gallitzendoerfer R. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 2009 , **284**(17) : 11637—11651
- [27] Kromer S. A. , Kessler M. S. , Milfay D. , *et al.* . J. Neurosci. [J] , 2005 , **25**(17) : 4375—4384
- [28] Kim J. H. , Lee H. K. , Takamiya K. , *et al.* . J. Neurosci. [J] , 2003 , **23**(4) : 1119—1124
- [29] Jin K. L. , Mao X. O. , Cottrell B. , *et al.* . Faseb. J. [J] , 2004 , **18**(2) : 287—299
- [30] Shumyatsky G. P. , Malleret G. , Shin R. M. , *et al.* . Cell[J] , 2005 , **123**(4) : 697—709
- [31] Pandey S. K. , Yu X. X. , Watts L. M. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 2007 , **282**(19) : 14291—14299
- [32] Diao W. F. , Hoger H. , Chen W. Q. , *et al.* . Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics[J] , 2007 , **1774**(8) : 1044—1051
- [33] Koylu E. O. , Kanit L. , Taskiran D. , *et al.* . Pharmacol. Biochem. Behav. [J] , 2005 , **81**(1) : 32—40
- [34] Weitzdoerfer R. , Hoeger H. , Engidawork E. , *et al.* . Nitric. Oxide; Biol. Chem. [J] , 2004 , **10**(3) : 130—140
- [35] Estall L. B. , Grant S. J. , Cicala G. A. . Pharmacol. Biochem. Behav. [J] , 1993 , **46**(4) : 959—962
- [36] Ding Q. , Vaynman S. , Souda P. , *et al.* . Eur. J. Neurosci. [J] , 2006 , **24**(5) : 1265—1276
- [37] Witzmann F. A. , Arnold R. J. , Bai F. , *et al.* . Proteomi. [J] , 2005 , **5**(8) : 2177—2201
- [38] Zheng J. , Patil S. S. , Chen W. Q. , *et al.* . J. Proteome Res. [J] , 2009 , **8**(10) : 4479—4486
- [39] Wegner A. M. , Nebhan C. A. , Hu L. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 2008 , **283**(23) : 15912—15920
- [40] Nelson T. J. , Backlund P. S. Jr. , Alkon D. L. . Hippocampus[J] , 2004 , **14**(1) : 46—57
- [41] Tada T. , Simonetta A. , Batterton M. , *et al.* . Curr. Biol. [J] , 2007 , **17**(20) : 1752—1758
- [42] Yoshida K. , Furuya S. , Osuka S. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 2004 , **279**(5) : 3573—3577
- [43] Gong B. , Cao Z. X. , Zheng P. , *et al.* . Cell[J] , 2006 , **126**(4) : 775—788
- [44] Lansbury P. T. . Cell[J] , 2006 , **126**(4) : 655—657
- [45] Poon H. F. , Hensley K. , Thongboonkerd V. , *et al.* . Free Radical Biol. Med. [J] , 2005 , **39**(4) : 453—462

Proteomic Analysis of Fear Memory Related Proteins in Mice

ZHENG Jun-Fang, LIU Hua, XIONG Ying, WANG Xiao-Zhu, HE Jun-Qi*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract To investigate proteins related with fear and emotional memory, hippocampal proteins from CD1 and C57BL/6J mice after fear conditioning experiment were extracted and subjected to 2D gel electrophoresis. Protein quantification was analyzed and the differentially expressed spots were identified using mass spectrometry and MASCOT database searching. Hippocampal proteins from CD1 and C57BL/6J mice after fear conditioning experiment were significantly different. Twenty-nine proteins(Thirty-one spots) are closely related with fear memory formation. Expression levels of 7 spots downregulated significantly; expression levels of 24 spots increased significantly. These identified proteins could be divided into six categories according to their functions: (1) energy metabolism and mitochondrion function; (2) neurogenesis; (3) signal transduction; (4) cytoskeleton; (5) amino acid metabolism and protein degradation; (6) chaperone. These proteins improved insights into the fear mechanism and provided new targets for the study and treatment of cognitive diseases.

Keywords Fear conditioning; Hippocampus; Proteomics; Mass spectrometry

(Ed. : H, J, Z)