

文章编号: 1000-5641(2012)04-0075-08

# 前脑特异性过表达 NR2B 基因对小鼠 社会互动能力的影响

张宁<sup>1</sup>, 李春霞<sup>1,2</sup>

(1. 华东师范大学 脑功能基因组学教育部重点实验室、上海市脑功能基因组学重点实验室, 上海 200062;  
2. 华东师范大学 认知神经科学研究所, 上海 200062)

**摘要:** 将 2~3 月龄实验小鼠分为前脑 NR2B 过表达的转基因雌性和雄性小鼠以及同窝野生对照雌性和雄性小鼠, 进行社会互动能力测试, 包括新环境中的社会互动能力测试、社会交往能力和社会新奇偏好测试。结果显示, 前脑 NR2B 表达量的提高, 对 NR2B 转基因小鼠在新环境中的社会互动能力和社会新奇偏好无影响。但是却使得雌性 NR2B 转基因小鼠的社会交往能力提高, 但是对雄性 NR2B 转基因小鼠却无明显影响。这表明, NR2B 在前脑过量表达会提高雌性小鼠的社会交往能力, 但对于雄性小鼠社会行为没有明显影响。

**关键词:** NR2B; 转基因小鼠; 社会互动; 社会交往能力; 社会新奇偏好

**中图分类号:** Q189 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2012.04.010

## Effect of forebrain NR2B overexpression on social interactions in transgenic mice

ZHANG Ning<sup>1</sup>, LI Chun-xia<sup>1,2</sup>

(1. *Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education, Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, East China Normal University, Shanghai 200062, China;*  
2. *Institute of Cognitive Neuroscience, East China Normal University, Shanghai 200062, China*)

**Abstract:** Male and female NR2B transgenic mice and their littermate controls were subjected to the social interaction test in a novel environment, sociability test and social novelty test. There was no significant difference in social interaction test in a novel environment and social novelty test among these four groups. However, compared with wild type mice, female but not male NR2B transgenic mice exhibited improvement in sociability. These results suggest that NR2B overexpression in the forebrain can improve sociability of female mice, while having no significant effect on social behaviors in male mice.

**Key words:** NR2B; transgenic mice; social interaction; sociability; social novelty

收稿日期: 2011-04

基金项目: 国家自然科学基金 (30800312); 高等学校博士学科点专项科研基金 (新教师基金) (20070269026); 中央高校基本科研业务费专项资金 (78210020)

第一作者: 张宁, 男, 硕士研究生. E-mail: zhangning19840412@gmail.com.

通讯作者: 李春霞, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为学习记忆与脑疾病相关的分子机制.

E-mail: cxli@brain.ecnu.edu.cn.

## 0 引言

N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体是重要的神经递质受体,在兴奋性刺激传递过程中发挥着关键的作用.它是一种离子通道型谷氨酸受体,由 NR1 亚基和 NR2A、NR2B、NR2C 以及 NR2D 4 种亚基中的一种以某种比例形成异寡聚体<sup>[1,2]</sup>.研究表明,NR1 亚基或者 NR2 亚基缺失的转基因小鼠刚出生即死亡,而低水平表达 NR1 亚基的转基因小鼠可存活至成年,但表现出类似精神分裂症的行为学异常,并且这些异常症状可以被氯氮平等药物所减轻<sup>[3,4]</sup>.另外,研究还发现低水平表达 NR1 的转基因小鼠与野生型小鼠相比在对陌生小鼠的社交探索时间上有着显著的降低,而且表现出明显的社交退缩行为<sup>[3,4]</sup>.此外,最近的研究发现,一种类似自闭症小鼠模型除了表现出社会互动能力障碍以外,也伴随着纹状体部位的 NR2A 和 NR2B 表达的下降<sup>[5]</sup>.这表明 NR1、NR2A 和 NR2B 亚基的低表达以及由此带来的 NMDA 受体的功能异常很可能对小鼠的社会互动能力产生负面影响.

钱卓等人通过特异地在小鼠前脑过表达 NR2B 亚基获得了 NR2B 转基因小鼠,并通过一系列行为学实验证明此种小鼠在学习与记忆能力上比野生型小鼠有着明显的提高<sup>[6]</sup>.但是 NR2B 亚基在前脑过量表达是否会对小鼠社会互动能力产生影响,目前还不清楚.因此,本研究选取新环境中的社会互动能力测试、社会交往能力和社会新奇偏好测试这两种行为学方法,利用 NR2B 转基因小鼠研究 NR2B 在前脑过量表达对社会互动能力的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

本研究所用 NR2B 转基因小鼠由华东师范大学脑功能基因组学重点实验室模式动物研究中心提供,与 C57BL/6 小鼠进行交配繁育.经 PCR 方法鉴定,NR2B 转基因阳性者视为转基因小鼠(Tg),分别选取 2~3 月龄年龄及性别比例相同的 NR2B 转基因阴性的同窝小鼠为对照组小鼠(Wt)进行实验.所有小鼠生长条件为 12 h/12 h 光照周期,温度(22 ± 3) °C,相对湿度(70 ± 4)%,SPF 级净化空间,自由进食、饮水.

### 1.2 PCR 鉴定转基因小鼠基因型

按文献所述方法<sup>[7]</sup>,取鼠尾组织提取 DNA 进行 PCR,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成,引物序列为:forward 5'-GCTAGAGGATCTTTGTGAAGGAACC-3',reverse 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTACCT-3',产物大小为 318 bp,反应结束后以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测产物.Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司.

### 1.3 行为学实验

#### 1.3.1 新环境中的社会互动能力测试

按文献所述方法<sup>[8]</sup>,两只饲养在不同笼盒的基因型相同的小鼠(以前从未见过面)同时放入一个盒子(40 cm × 40 cm × 30 cm),允许其互相自由探索 10 min,并记录两只小鼠接触交流(包括嗅小鼠嘴部、身体和肛门、互相理毛以及追逐)总时间.20 只 NR2B 转基因小鼠(10 组)和 24 只对照组小鼠(12 组)用于实验,雌雄数目各半.

#### 1.3.2 社会交往能力和社会新奇偏好测试

社会交往能力和社会新奇偏好测试改自 Moy 和 Nadler 等人的检测方法<sup>[9,10]</sup>.选取 2~3 月龄雄性 NR2B 转基因小鼠( $n = 12$ )与雄性对照小鼠( $n = 12$ ),雌性 NR2B 转基因小鼠

( $n = 9$ )与雌性对照小鼠( $n = 8$ )共 4 组小鼠进行行为学检测. 实验所用装置如图 1 所示:

用于社会交往能力与社会新奇偏好测试的器材为一聚乙烯材质的矩形笼盒,由非固定的树脂隔板分成 3 个隔间. 正式测试前一天,被测小鼠被放入矩形笼盒中 10 min,使其习惯笼盒中的环境(见图 1a). 滚筒下半部有数个直径 1 cm 的圆孔以便于待测小鼠与陌生小鼠之间的气味沟通. 陌生小鼠在测试前被放入隔间中的滚筒里 10 min 以使其习惯(见图 1b),每天一次,共 5 d. 图 1c 为行为学检测装置的尺寸.

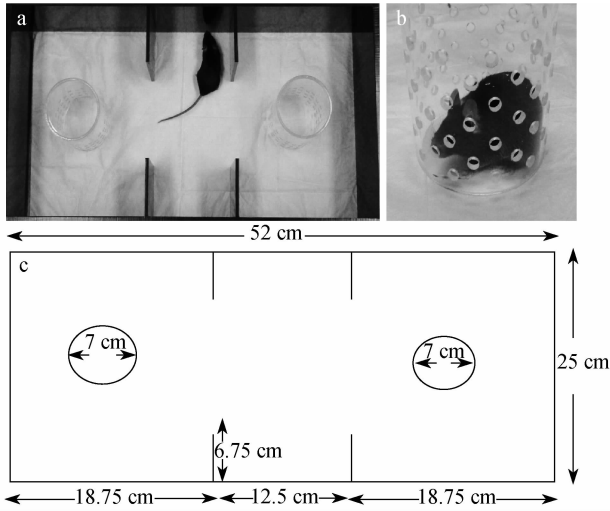


图 1 检测 NR2B 转基因小鼠和对照小鼠社会行为(社会交往能力和社会新奇偏好)所用的装置  
Fig. 1 Device for detection of social behaviors (social interaction and social novelty preference)  
in NR2B transgenic and control mice

测试过程如图 2 所示.

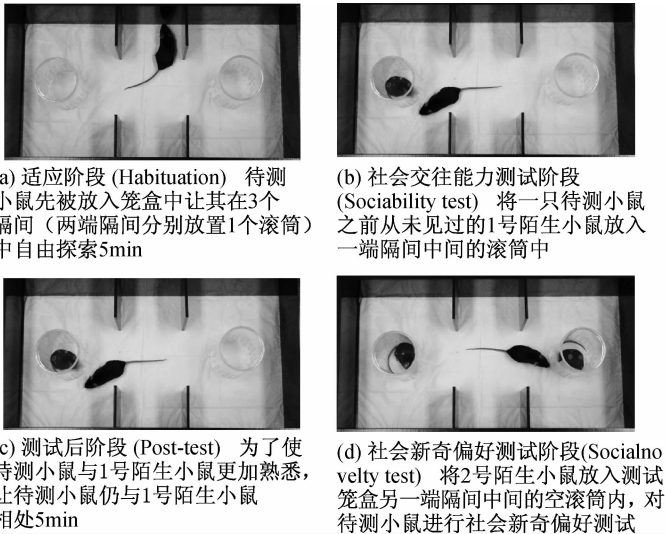


图 2 实验流程图  
Fig. 2 Test procedures

实验详细过程 进行社会交往能力测试(Sociability test)时,待测小鼠先被放入笼盒中让其在 3 个隔间(两端隔间分别放置 1 个滚筒)中自由探索 5 min,然后,将一只待测小鼠之前从未见过的 1 号陌生小鼠放入一端隔间中间的滚筒中.在陌生小鼠被放入一端隔间的滚筒后的 5 min 内,记录待测小鼠对 1 号陌生小鼠及另一隔间内的空滚筒的嗅闻及探索时间、待测小鼠分别在两端隔间内所处的时间、待测小鼠分别进入两端隔间的次数,考察待测小鼠的社会交往能力.之后,进入测试后阶段(Post-test),使待测小鼠与 1 号陌生小鼠继续熟悉 5 min.进行社会新奇偏好测试(Social Novelty test)时,第二只陌生小鼠——2 号陌生小鼠被放入测试笼盒另一端隔间中间的空滚筒内,对待测小鼠进行社会新奇偏好测试.在之后的 5 min 内记录待测小鼠分别对 1 号、2 号陌生小鼠的嗅探时间、分别在两端隔间内所处的时间和分别进入两端隔间的次数.1 号、2 号陌生小鼠所处的隔间随机变化.

#### 1.4 数据分析

所有实验数据采用 Mean  $\pm$  SEM 表示, $t$ -test 检验组间差异, $p < 0.05$ , $p < 0.01$  视为有显著差异.

## 2 实验结果

### 2.1 PCR 检测小鼠基因型

如图 3 所示,可以用 SV40 引物在约 300 bp 处检测出条带的为转入外源 NR2B 基因的转基因小鼠,没有条带的为对照组小鼠.

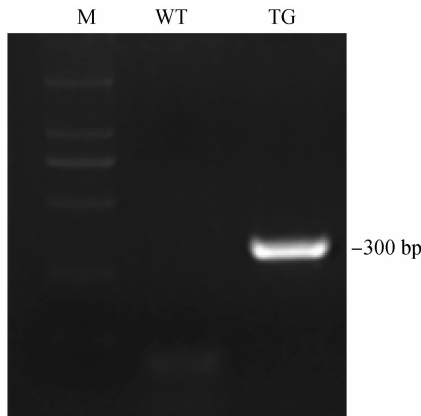


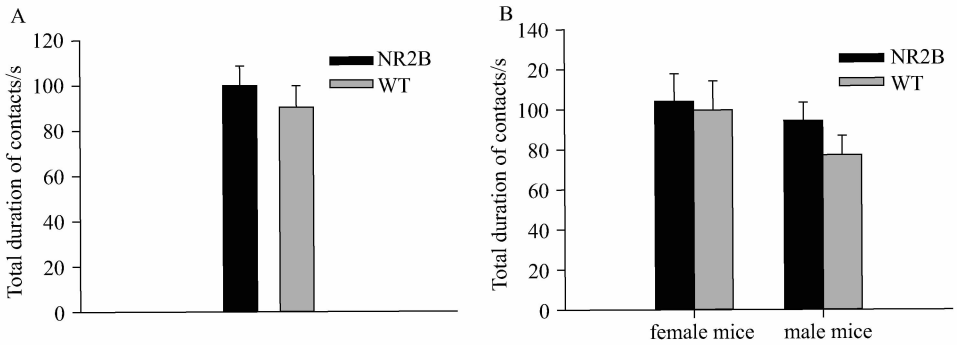
图 3 转基因小鼠后代的基因型鉴定

Fig. 3 Genotyping of transgenic mice offsprings

### 2.2 行为学实验结果

#### 2.2.1 新环境中的社会互动能力测试

在新环境中的社会互动能力测试中,通过比较两只小鼠接触交流总时间发现, NR2B 转基因小鼠和对照组小鼠间没有明显差异(见图 4A),对雌性小鼠和雄性小鼠分别比较发现, NR2B 转基因雌性小鼠间的接触交流总时间与对照组小鼠相比无差异,而 NR2B 转基因雄性小鼠间的接触交流总时间虽然略高于对照组小鼠,但是没有统计学差异(见图 4B).



注: A 雌雄一起统计的结果; B 雌雄分开统计的结果

图4 2~3月龄 NR2B 转基因小鼠在新环境中的社会互动能力

Fig. 4 Social interaction of 2~3 months old NR2B transgenic mice in the novel environment

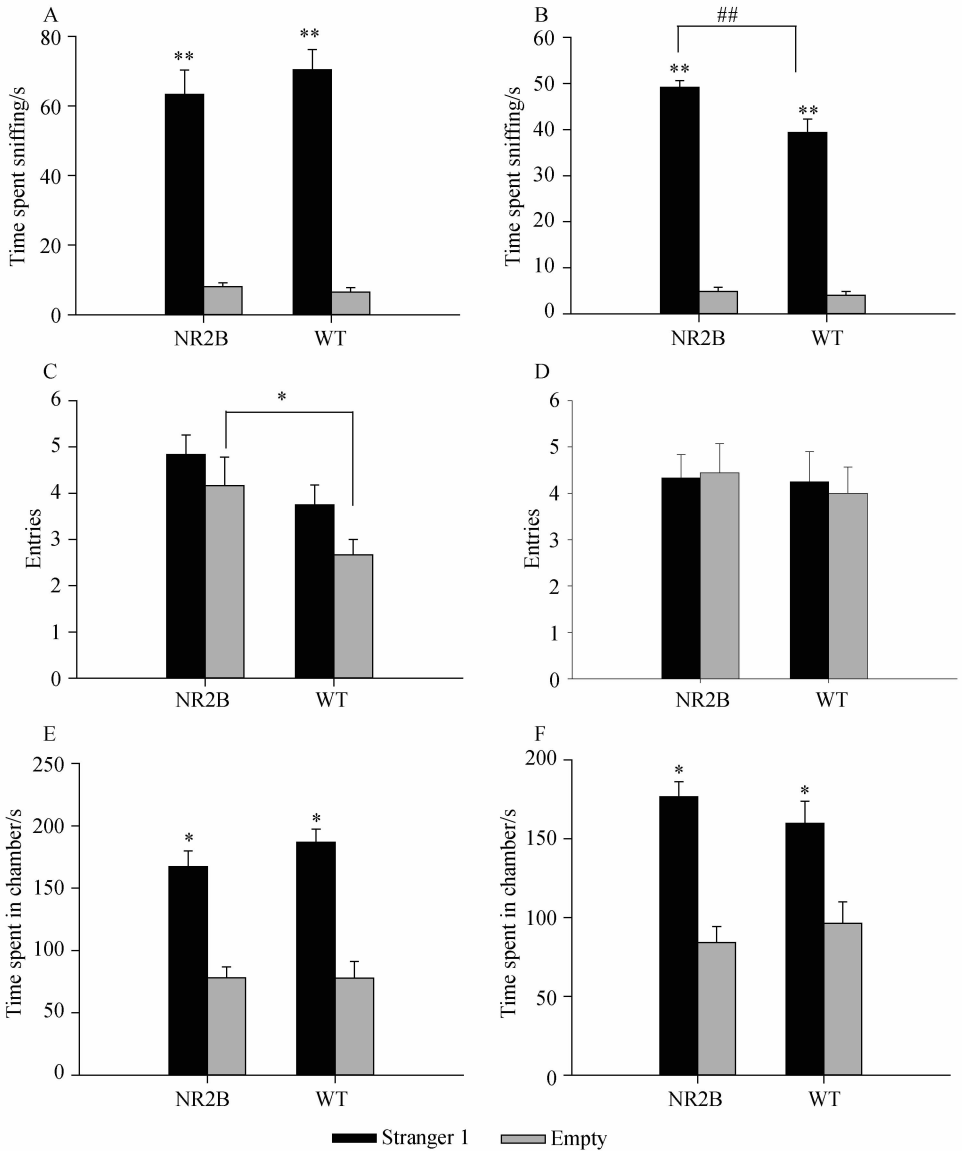
### 2.2.2 社会交往能力及社会新奇偏好检测

对社会交往能力的测试结果如图5所示. 雄性 NR2B 转基因小鼠和对照组小鼠均对陌生小鼠1号更感兴趣, 对陌生小鼠1号的嗅探时间显著性地高于对空滚筒的嗅探时间 ( $**p < 0.01$ ) (见图5A), 同时在有陌生小鼠1号的隔间所处的时间均显著性地高于在空滚筒的隔间里所停留的时间 ( $*p < 0.05$ ) (见图5E), 但是在进入两个隔间的次数上却没有差异 (见图5C). 但是, 比较雄性 NR2B 转基因小鼠和对照组小鼠发现, NR2B 转基因小鼠进入两个隔间的次数都比对照组小鼠多些, 尤其对空滚筒所在隔间进入次数要明显多于对照组小鼠 ( $*p < 0.05$ ). 但总体来看, 两者的社会交往能力各指标均无明显差异. 而对于雌性 NR2B 转基因小鼠来说, 在进入两个隔间的次数 (见图5D) 以及两隔间所停留的时间 (见图5E) 上均和对照组小鼠无差异. 但是对陌生小鼠1号的嗅探时间 (见图5B) 上雌性 NR2B 转基因小鼠显著地高于对照组小鼠 ( $^{##}p < 0.01$ ), 表明 NR2B 基因在前脑过表达后, 使得雌性小鼠社会交往能力提高.

在社会新奇偏好测试中, 雌性和雄性 NR2B 转基因小鼠与对照组小鼠均表现出对2号陌生小鼠比对1号陌生小鼠更大的兴趣, 对2号陌生小鼠嗅探时间明显高于对1号陌生小鼠的嗅探时间 ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) (见图6A, B). 在两侧隔间内所处时间的比较中, 除雄性 NR2B 小鼠在两端隔间所处时间无显著性差异外, 其余各组小鼠均表现出在有2号陌生小鼠的隔间内所处的时间明显长于在有1号陌生小鼠的隔间内所处的时间 ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ) (见图6E, F). 而在进入两侧隔间的次数上, 各组小鼠均无显著差异 (见图6C, D). 综合来看, 在社会新奇偏好方面, 无论是雌性还是雄性 NR2B 转基因小鼠, 均和相应对照组小鼠无明显差异.

## 3 讨论

本研究采用两种行为学实验来检测 NR2B 转基因小鼠的社会互动能力. 结果显示, 仅有雌性 NR2B 转基因小鼠的社会交往能力和对照组小鼠相比有提高, 但雄性 NR2B 转基因小鼠和对照组小鼠却无差异. 本研究所采用的社会交往能力和社会新奇偏好测试方法, 近来已在多个模式动物如精神分裂症和自闭症小鼠模型中应用<sup>[4,5]</sup>, 具有比较好的灵敏性. 至于 NR2B 过表达对社会交往能力及社会新奇偏好的作用不明显, 原因可能是因为 NR2B 基因



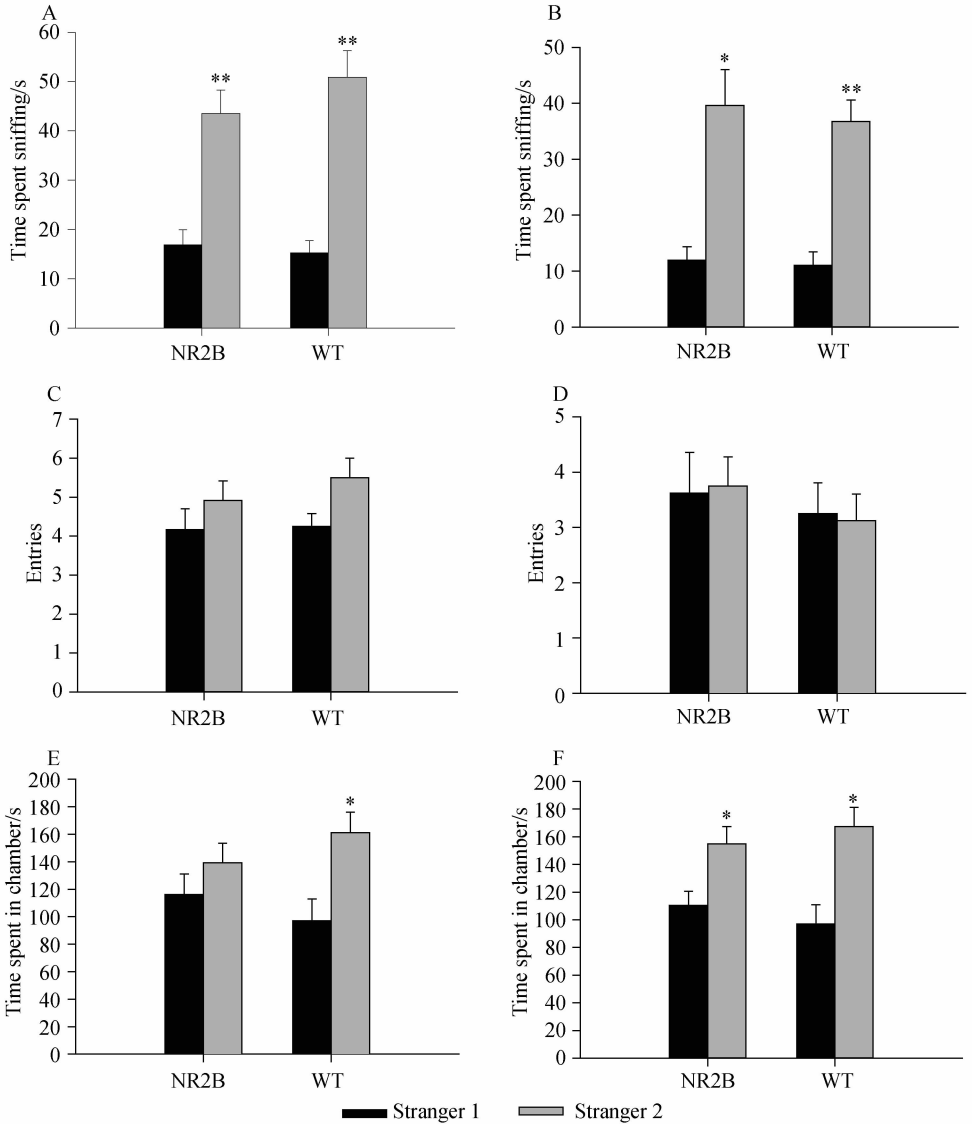
注:A, C, E 为雄性小鼠;B, D, F 为雌性小鼠. A, B 对装有 1 号陌生小鼠的滚筒和空滚筒的嗅探时间;  
C, D 对两个隔间的穿梭次数;E, F 在两个隔间停留的时间; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ##  $p < 0.01$

图 5 2~3 月龄 NR2B 转基因小鼠的社会交往能力

Fig. 5 Sociability of 2~3 months old NR2B transgenic mice

在正常小鼠中的表达是随着发育的进行逐渐降低的,而 NR2B 转基因小鼠由于是在启动子 CaMKII 的控制下使得 NR2B 基因在前脑过表达的, CaMKII 启动子在小鼠出生约 1 个月后逐渐开始表达,所以, 2~3 月龄的转基因小鼠的 NR2B 基因表达量虽然比野生型高,但是由于野生型小鼠中 NR2B 的依然存在一定的表达量,因此外源过量表达的 NR2B 所起的作用可能还不是很明显. 而另一方面,实验中所用的 NR2B 转基因小鼠是杂合子,这也可能是其表型不明显的一个重要原因. 因此,在今后的实验中还有待于进一步分析不同年龄、杂合和纯合的 NR2B 转基因小鼠间的社会互动能力的区别,而且将来也可以利用条件性敲除

NR2B 基因的小鼠来研究 NR2B 在社会互动能力方面的作用。而在本研究中雌性小鼠表现出不同的差异,可能与雌性小鼠具有生理周期有关。研究表明,外源注射雌激素会提高小鼠的社会再认记忆能力<sup>[11]</sup>,并且小鼠社会再认记忆的形成依赖于不同亚型雌激素受体的表达<sup>[12]</sup>。而 NR2B 过表达是否会改变雌性小鼠的雌激素水平,是否会对其他各种雌激素受体的表达产生影响还有待于在今后的实验中进一步研究。



注: A, C, E 为雄性小鼠; B, D, F 为雌性小鼠; A, B 为对装有 1 号、2 号陌生小鼠的滚筒的嗅探时间;

C, D 为对两个隔间的穿梭次数; E, F 为在两个隔间停留的时间; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

图 6 2~3 月龄 NR2B 转基因小鼠的社会新奇偏好

Fig. 6 Social novelty preference of 2~3 months old NR2B transgenic mice

## [参 考 文 献]

- [ 1 ] KUTSUWADA T, KASHIWABUCHI N, MORI H, et al. Molecular diversity of the NMDA receptor channel [J]. *Nature*, 1992, 358(6381): 36-41.
- [ 2 ] MONYER H, SPRENGEL R, SCHOEPFER R, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes[J]. *Science*, 1992, 256(5060): 1217-1221.
- [ 3 ] MOHN A R, GAINETDINOV R R, CARON M G, et al. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia[J]. *Cell*, 1999, 98(4): 427-436.
- [ 4 ] HALENE T B, EHRLICHMAN R S, LIANG Y, et al. Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia[J]. *Genes, brain, and behavior*, 2009, 8(7): 661-675.
- [ 5 ] PECA J, FELICIANO C, TING J T, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 437-442.
- [ 6 ] TANG Y P, SHIMIZU E, DUBE G R, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice[J]. *Nature*, 1999, 401(6748): 63-69.
- [ 7 ] CAO X, CUI Z, FENG R, et al. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing[J]. *The European journal of neuroscience*, 2007, 25(6): 1815-1822.
- [ 8 ] MATSUO N, TANDA K, NAKANISHI K, et al. Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type 3 (RyR3) knockout mice: decreased social contact duration in two social interaction tests[J]. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 2009(3): 3.
- [ 9 ] MOY S S, NADLER J J, PEREZ A, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice[J]. *Genes Brain Behav*, 2004, 3(5): 287-302.
- [10] NADLER J J, MOY S S, DOLD G, et al. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice[J]. *Genes Brain Behav*, 2004, 3(5): 303-314.
- [11] TANG A C, NAKAZAWA M, ROMEO R D, et al. Effects of long-term estrogen replacement on social investigation and social memory in ovariectomized C57BL/6 mice[J]. *Hormones and behavior*, 2005, 47(3): 350-357.
- [12] SANCHEZ-ANDRADE G, KENDRICK K M. Roles of alpha- and beta-estrogen receptors in mouse social recognition memory: effects of gender and the estrous cycle[J]. *Hormones and behavior*, 2011, 59(1): 114-122.