

综述与专论

果蝇学习记忆行为的分子机制

温 艾 刘 力*

(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)

摘要 分子遗传学技术的应用一方面发展了新的神经组织学方法, 使果蝇脑中的细微结构得以展示; 另一方面, 对记忆从形成到提取过程中信息处理的研究, 表明蘑菇体可能在形成长时程记忆方面起重要作用, 而一对背内侧核团 (dorsal paired medial cells) 与蘑菇体之间的信息传递对于记忆的“提取 (retrieval)”是至关重要的。行为功能检测为视觉信号整和的研究提供了新的实验依据, 从而使果蝇蘑菇体的高级脑中枢功能逐渐被揭示出来。

关键词 果蝇, 学习与记忆, 分子神经生物学

学科分类号 Q42

丰富的遗传学信息及基因组测序工作的完成, 使脑结构相对简单的果蝇成为研究学习记忆分子机制的理想动物模型。在果蝇学习记忆研究中, 存在着三个需要解决的基本问题: a. 感觉信息的传递通路及感觉中枢在脑中的定位; b. 感觉信息以何种形式贮存于脑中, 又是如何进行整合的; c. 与学习记忆有关的基因调控。可以说, 这三个问题普遍存在于所有动物的学习记忆研究中。分子生物学突飞猛进的发展突破了传统神经组织学方法对低等动物神经结构研究的限制, 果蝇脑的精细结构正在逐渐被人们认识^[1]; 不同学习范式的功能检测为研究特定脑结构在信号整和中的功能提供了新的实验依据; 利用基因的超表达 (over-expression) 和 DNA 片段微注射 (micro-injection) 技术, 构建了各种转基因果蝇, 通过行为检测推知相应基因的功能, 学习记忆的分子基础正在一步步被阐明。

1 分子神经组织学揭示果蝇脑的精细结构

神经元是神经系统的基本单位, 也是学习、记忆等所有神经活动产生的基础。所以, 精确的神经元染色和示踪法是神经生物学产生以来人们一直在研究的课题。20 世纪末, 对果蝇 P 因子 (P-element) 的研究发现, P 因子作为载体被注入果蝇的胚胎 (embryo) 中, 可以在辅助因子的帮助下将特定的基因片段, 如酵母特有的 Gal4 或 UAS_{Gal4}-lacZ (upstream activator sequence-lacZ), 随机地插入到果蝇基因组中的增强子 (enhancer) 后面, 这就是“增强子随机打靶”技术 (enhancer-trap)。通过这种

转基因技术, 人们已经筛选到了一系列在特定组织表达的果蝇 Gal4 品系和标记品系 (如 UAS_{Gal4}-lacZ, UAS_{Gal4}-tau 等)。当上述两种品系的果蝇杂交后, 在其子代中产生的 Gal4 蛋白与 UAS_{Gal4} 特异性结合, 引发 UAS_{Gal4} 下游的标记基因在特定的脑组织, 甚至是某一种神经细胞中表达, 通过免疫组化等方法就可以观察到该神经结构的组成及在发育中的变化。如果将标记基因用其他功能基因 (如 amnesiac 或 shibire^{hs1} 等基因) 替代, 并与特定 Gal4 品系进行杂交, 就可以在特定的脑区中表达该功能基因, 从而可以研究基因、脑结构以及功能之间的相互关系。

目前, 以 UAS_{Gal4}-tau 作为标记可能是研究果蝇神经发育过程最理想的一种手段。TAU 蛋白分子质量小, 作为一种微管结合蛋白可以从胞体被缓慢运输到轴突末端。因此, 它可以均匀分布于神经元的胞体和轴突中, 而不像 UAS_{Gal4}-lacZ 的表达产物 β 半乳糖苷酶, 会对细胞膜或细胞骨架造成影响。Ito 等^[2]结合免疫组化法显示了从果蝇胚后期到成虫过程中特定神经细胞的发育过程, 包括胞体的转移和纤维投射的改变。以前曾有人用辣根过氧化物 (HRP) 示踪法追踪果蝇胚胎期单个神经元的发育, 可是由于发育过程中 HRP 被逐渐稀释, 他们的研究只能局限于果蝇的某一个发育阶段。现在应用 UAS_{Gal4}-tau 作为标记, 可以追溯果蝇成虫脑

* 通讯联系人。

Tel: 010-64888550, E-mail: liuli@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2002-02-27, 接受日期: 2002-03-28

中特定神经细胞的起源,有助于形态和功能方面的研究。

Crittenden 等^[3]以果蝇自身的生理、生化特征为基础,用免疫组化法展示了果蝇蘑菇体 (mushroom body) 的精细三维结构。蘑菇体是果蝇脑中一对对称的结构,被认为是与嗅觉学习记忆密切相关的核团。在此以前,人们对蘑菇体只有一个形态上的了解,认为单侧蘑菇体由脑后上方的萼状体 (calyx, 由 Kenyon 细胞胞体组成), 向前伸出的 α 、 α' 、 β 、 γ 四个小叶 (lobe, Kenyon 细胞轴突末端) 以及一个“足跟” (heel) 结构构成。这些小叶彼此紧密相连,甚至相互缠绕、包围,用普通方法很难区分。因此, Crittenden 挑选了 8 种在蘑菇体中选择性表达的基因产物作为标记对象。这些基因分别有不同的生理、生化作用,在不同的神经细胞中表达产物的浓度不同。如果蘑菇体中的 Kenyon 细胞存在生理差别而不是均一的,这些基因在不同的区域中应有不同水平的表达。实验结果证实了这种猜想。其中有 6 种基因表达产物的免疫染色结果存在明显的区域性,颜色的深浅反应了产物浓度的高低。其中 α 和 β 两叶深浅程度相同, α' 和 β' (在此次实验中第一次证实存在) γ 和 heel 也分别有相同的深浅度。不仅如此,这种区域性同样存在于萼状体中,说明胞体中也存在基因表达水平的差异,也就是说,蘑菇体至少存在三种不同的 Kenyon 细胞,它们的轴突有三种投射方式,分别伸向 α/β , α'/β' , 以及 $\gamma/heel$ 三个区域。曾经证实蜜蜂的蘑菇体中存在三个解剖学区域,分别接受来自不同感觉器官的信号^[4], 现在果蝇的蘑菇体也被证明存在形态和生理上的区域化,为蘑菇体中信号整合的研究提供了解剖学证据。

2 分子水平的学习记忆研究

果蝇的基因测序完成后,究竟是否存在一些对学习记忆起关键作用的基因成为人们关注的焦点。近几年 Waddell 等^[5]对 *amnesiac* (*amn*) 基因突变体进行的研究尤其具有启示作用。*amn* 突变体是通过嗅觉联想学习筛选出来记忆突变体,虽然对学习和短时程记忆影响不大,但是却不能形成长时程记忆。*amn* 基因的表达产物是一种调节腺苷酸环化酶的神经多肽前体。他们用这种神经多肽前体的抗体证明了 *amn* 基因只在果蝇脑中一对背内侧核团 (DPM cells) 中表达。然后从“增强子随机打靶”获得的大量 P-Gal4 品系中,筛选出一种只在

DPM 核团中有特异表达的果蝇品系——c316。免疫组化的结果显示: DPM 核团的神经元轴突特地投射到蘑菇体的 α 、 β 和 γ 三个小叶上,即蘑菇体神经元的轴突末端,而与萼状体中的神经元胞体没有纤维联系。

首先,他们构建了转基因果蝇 UAS_{Gal4}-*amn* 品系,用于在 *amn* 突变体的 DPM 核团中人为地表达 *amn* 产物,来“恢复 (rescue)” *amn* 突变体的基因缺陷。这种基因恢复果蝇的长时程记忆明显高于 *amn* 突变体,说明了转入 *amn* 的表达产物在 *amn* 突变体中发挥了补偿作用。而如果将 *amn* 基因在 *amn* 突变体的其他脑区,甚至在蘑菇体中表达,都没有明显的补偿作用。这一结果说明了 *amn* 的基因产物作为一种神经调质可能参与了长时程记忆的形成。

进一步,为了证明 DPM 核团在学习记忆中的作用,他们通过选择 c316 与 UAS_{Gal4}-*shibire*^{hs1} 杂交,在子代野生型果蝇的 DPM 核团中表达 SHIBIRE 蛋白。*Shibire*^{hs1} 的表达产物是一种类似于高等生物中 dynamin 的动力蛋白,对突触小泡的释放起关键作用。在热激状态下, *shi*^{hs1} 的表达阻断了 DPM 核团中神经元之间的信息传递。实验结果是相当惊人的:如果在训练过程中进行热激,在检测前恢复到正常温度,果蝇的学习和短、长时程记忆都与野生型没有显著差别;如果在正常温度下训练,在热激环境中进行检测,或者训练和检测都在热激环境中进行,果蝇的学习和短时程记忆不受影响,但长时程记忆 (60 min) 却几乎为零。这一实验证明 DPM 内部的神经元之间以及 DPM 与蘑菇体之间的递质传递对于记忆的“获得 (acquire)”和“储存 (storage)”是可有可无的,但对记忆的“提取 (retrieval)”来说是不可缺少的^[6]。必须指出的是这个实验结果只能说明 DPM 核团中神经信号的阻断对记忆提取的影响,不能等同于 *amn* 表达产物的作用。虽然 DPM 核团中突触小泡的释放受到了阻碍,可能还存在某种未知的因素使记忆的“获得”和“储存”保持正常。

以前的实验只证明了蘑菇体是果蝇脑中嗅觉信号的主要加工、整合区域,而现在找到了蘑菇体的一个重要调节核团——DPM 核团。Davis^[7]根据以上实验结果提出了 DPM 核团对蘑菇体突触末端调节的模型。他认为蘑菇体末端可能存在一个 DPM 核团分泌物 (AMN 等) 的受体,开启下游与长时程记忆有关的第二信号系统的一系列反应。这样,

结合以前的实验结果, 一个嗅觉信号的传递和整合回路便初步确立了. 嗅觉信号作为条件刺激, 经嗅球传入蘑菇体的 Kenyon 神经元胞体, 与振动或热刺激等非条件刺激信号进行整合(非条件刺激的传入通路目前尚不清楚), 整合信号由蘑菇体的轴突传出到相应的运动神经元, 使果蝇产生躲避行为. 同时, 在 Kenyon 细胞中产生形成短时程记忆所需的一系列生理生化反应^[8], 蘑菇体在 DPM 核团的调节作用下产生长时程记忆, 并储存在某个未知区域. 以上关于记忆产生的分子机制都是针对嗅觉进行的研究, 如果在视觉信号学习记忆范式中可证明这些突变体存在相同的学习记忆缺陷, 则不失为视觉记忆研究的一条捷径.

另外一种与记忆有关的基因研究使我们看到了将果蝇的研究成果用于药物开发的可能^[9]. Tully 等发现 CREB 蛋白(cAMP-responsive element-binding protein)的一种潜在药物作用. CREB 是一种基因表达调控蛋白, 它的结合对象 CRE 是一种增强子, 特异性增强 cAMP 效应因子(cAMP-responsive element)的转录和表达. 实验证明, 如果在果蝇脑内表达一种 CREB 的异构蛋白 dCREB2-b, 影响 CREB 的正常功能, 果蝇的长时程记忆受到明显影响. 这说明 CREB 可能对提高动物的长时程记忆有所帮助. 进一步实验表明, CREB 并不增加单位时间内的记忆, 但却缩短了将短时程记忆转变为长时程记忆的时间. Tully 指出, CREB 的表达在动物记忆过程中的某一时段被启动, 调控其他基因的表达. 现在, 将 CREB 作为药物是否能提高人类的记忆能力是 Tully 等正在继续研究的课题.

3 果蝇飞行模拟器应用于脑区功能定位及学习记忆研究

对果蝇的视觉学习记忆研究主要是在飞行模拟器上进行的, 它的原理和方法在以前的许多文献中都有介绍^[10]. 20 世纪末, 在原来的飞行模拟实验基础上发展了新的实验内容. 其中, 背景改变对学习记忆影响的实验给了人们许多新的启示^[11]. 先前的实验结果已证明蘑菇体是果蝇嗅觉学习记忆的关键结构, 而蘑菇体完全缺失的果蝇在飞行模拟器上的实验结果与野生型没有显著差异, 因而认为蘑菇体不是视觉通路上的关键结构^[12]. 但是如果改变学习和检测的背景光颜色, 使其分别在白色光与单色光下进行, 发现蘑菇体缺陷的果蝇的记忆指数显著低于野生型. 基于这种实验结果, Liu 等认

为, 蘑菇体未直接参与视觉通路的信息传递, 而在对各种刺激进行归纳的基本认知过程起着重要的作用.

近几年一些飞行模拟与传统的扭矩(yaw torque)实验相结合的研究方法, 使我们对果蝇的联想记忆能力有了更广泛和深入的了解. 在果蝇飞行模拟器中, 飞行模拟实验是果蝇将不同的飞行方向与非条件刺激联系起来; 而扭矩实验是果蝇将其扭转力矩的大小与非条件刺激联系起来. 这两种实验方法都是可操作式条件化(operant conditioning). 在扭矩实验中, Brembs 等^[13]首先训练果蝇将扭矩大小与两种背景颜色建立对应关系, 在随后的检验过程中去掉背景颜色, 果蝇的记忆指数近乎于零, 说明果蝇在没有背景颜色刺激的条件下不体现对扭矩大小的记忆; 但如果在检测时将学习过程中扭矩与背景颜色的对应关系完全对调, 果蝇只表现出对扭矩大小学习的记忆, 也就是说果蝇一直飞行在学习过程中与热刺激相关联的背景颜色区域内. 这又说明两种信号的作用不是处于同等级地位的. 接下来, 如果在学习后立刻将果蝇转入飞行模拟器, 果蝇却又表现出对正确背景颜色的选择. 这种复杂的实验结果指出, 果蝇脑中关于色觉和本体感觉的储存区域有相互联系, 但本体感觉的记忆似乎又是一种比视觉记忆更强烈的信号. 目前我们仍不知各种信号在脑中是否有单独的储存区域, 至少我们从以上实验可得知果蝇并没有在本体感觉与视觉之间建立某种联想, 否则, 当进行背景颜色与扭矩关联完全相反的检测时, 大多数果蝇应表现出不知所措的无目的飞行, 或者是一部分体现对视觉信号的记忆, 一部分体现对扭矩大小的记忆, 而群体水平的记忆统计值应接近零. 由此可知, 由不同感觉作为条件刺激而产生的学习记忆只在一定程度上有所整合, 而果蝇有更高级的机制对其进行区别, 甚至在不同的测验条件下能提取不同的记忆. 更有意思的是如果将扭矩信号转换为视觉图案, 训练果蝇将两种不同的视觉图案分别与不同的颜色建立联系, 则发现果蝇脑中具有一种“决策”机制, 当颜色对比度高时, 依靠颜色记忆, 反之, 依靠图案进行记忆^[14]. 而这种功能与果蝇脑中的蘑菇体结构密切相关. 可以认为这不是一种低级的视觉信号-飞行方式之间产生的条件反射, 而体现了脑的高级机能, 并且有蘑菇体的参与. 蘑菇体在果蝇脑中的其他功能仍在进一步研究中.

目前, 针对各种蘑菇体缺失个体进行的飞行模

拟实验较多,而中央复合体缺陷对视觉学习记忆影响的研究较少.通常的理论认为中央复合体是果蝇脑中协调运动的结构,联络左右半脑发出的运动指令. Weidtmann 发现中央复合体 *nob*^{KS49} 突变体在飞行模拟器上对热刺激的躲避并未受损,说明果蝇的运动能力,至少是飞行能力是正常的,但学习记忆能力下降^[10]. 中央复合体可能参与学习记忆过程,这一理论还有待证明.

对果蝇的学习记忆研究进行至今已经历了一个从行为学到分子神经生物学的过程.上述各种分子生物学技术的发展不仅使研究趋于微观化,使人们得以逐步揭开学习记忆的分子基础,同时也为脑区的功能定位、不同感觉信号的整合等研究提供了方法.具体到视觉学习记忆的研究,除了进一步明确视觉信息的传递通路以外,结合其他信息进行综合分析,在果蝇这种实验动物中确立信号整合的模型,以便推广到高级动物的学习记忆研究中去,是现在最引人关注的问题.

参 考 文 献

- 1 Rein K, Zöckler M, Heisenberg M. A quantitative three-dimensional model of the *Drosophila* optic lobes. *Current Biology*, 1999, **9** (2): 93 ~ 96
- 2 Ito K, Sass H, Urban J, et al. Gal4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of *Drosophila* central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 1997, **290** (1): 1 ~ 10
- 3 Crittenden J R, Skoulakis E, Han K, et al. Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learning & Memory*, 1998, **5** (1-2): 38 ~ 51
- 4 Menzel R, Giurfa M. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 2001, **5** (2): 62 ~ 71
- 5 Waddell S, Armstrong J D, Kitamoto T, et al. The *amnesiac* gene product is expressed in two neurons in the *Drosophila* brain that are critical for memory. *Cell*, 2000, **103** (5): 805 ~ 813
- 6 Dubnau J, Grady L, Kitamoto T, et al. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*, 2001, **411** (6836): 476 ~ 480
- 7 Davis R. Mushroom bodies, Ca²⁺ oscillations, and the memory gene *amnesiac*. *Neuron*, 2001, **30** (3): 653 ~ 656
- 8 Zars T, Fischer M, Schulz R, et al. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science*, 2000, **288** (5466): 672 ~ 675
- 9 Friedrich M J. Research with *Drosophila* provides clues to enhancing human memory. *J American Medical Association*, 2000, **284** (22): 2857 ~ 2858
- 10 Heisenberg M, Wolf R, Brembs B. Flexibility in a single behavioral variable of *Drosophila*. *Learning and Memory*, 2001, **8** (1): 1 ~ 10
- 11 Liu L, Wolf R, Ernst R, et al. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature*, 1999, **400** (6746): 753 ~ 756
- 12 Wolf R, Wittig T, Liu L, et al. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learning & Memory*, 1998, **5** (1-2): 166 ~ 178
- 13 Brembs B, Heisenberg M. The operant and the classical in conditioned orientation in *Drosophila melanogaster* at the flight simulator. *Learning & Memory*, 2000, **7** (2): 104 ~ 115
- 14 Tang S, Guo A. Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. *Science*, 2001, **294** (5546): 1543 ~ 1547

Molecular Mechanism of Learning and Memory in *Drosophila*

WEN Ai, LIU Li*

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

Abstract New neural histological methods based on molecular genetic techniques have been used to reveal the delicate structure of *Drosophila*'s neural system. Due to the research on the formation and retrieval of memory, mushroom bodies might play an important role in the formation of long-term memory, and the signal transmission between the dorsal paired medial cells and the mushroom bodies might contribute a lot to the retrieval process of memory. Experiments in different paradigms on the flight-simulator have demonstrated the existence of some advanced functions of the mushroom bodies, so as to provide more evidences to the research on the integration of visual signals.

Key words *Drosophila*, learning and memory, molecular neurobiology

* Corresponding author. Tel: 86-10-64888550, E-mail: liuli@sun5.ibp.ac.cn

Received: February 27, 2002 Accepted: March 28, 2002