

性激素对雄性小白鼠学习记忆 和脑中 GABA_A 受体亲和力的影响*

徐项桂

(苏州铁道师范学院生物学系 苏州 215009)

摘 要 本文研究了丙酸睾丸酮(T)、黄体酮(P)和苯甲酸雌二醇(E₂)对雄性小白鼠学习记忆及皮层、海马中 GABA_A 受体亲和力的影响。结果表明, T 降低皮层、海马中 GABA_A 受体亲和力, 但不影响学习记忆能力。P 对两者 GABA_A 受体亲和力无影响, E₂ 降低了皮层 GABA_A 受体亲和力而不影响海马 GABA_A 受体亲和力。P 和 E₂ 可损害学习记忆能力。这为性激素对学习记忆功能的药理学效应及其在脑中的作用机制提供了一些有价值的参考资料。

关键词 睾丸酮 黄体酮 雌二醇 学习和记忆 GABA_A 受体亲和力 雄性小白鼠

性甾体激素在脑中与抑制性神经递质 γ -氨基丁酸 A 型受体(GABA_A)复合物相互作用, 广泛地影响中枢神经系统(CNS)的功能^[1-2], 已报道, 脑中 GABA 能机制涉及了学习记忆功能^[3], 性激素可改变 GABA_A 受体功能影响学习记忆活动^[4-5]。由于性激素结构的差异, 它们对 GABA_A 受体存在双向调节, 有一些为 GABA 拮抗剂, 而另一些为 GABA 激动剂, 并且拮抗 GABA 的性激素可代谢为激动 GABA 的性激素^[1], 导致它们对多种精神生理效应, 包括记忆的复杂作用^[6]。目前对多种性激素在学习记忆中的作用还很不清楚, 为此, 本文研究了药理剂量的丙酸睾丸酮(T)、黄体酮(P)和苯甲酸雌二醇(E₂)对雄性小白鼠学习记忆和皮层、海马中 GABA_A 受体对 GABA 亲和力的影响, 为此领域提供一些有价值的参考资料。

1 材料和方法

选青年健康雄性昆明种小白鼠, 体重 19 ± 1g, 饲养在 25℃ 实验室中, 自由饮水, 每天早晨 8 点喂食一次, 维持其体重在原来水平的 90% 左右。

1.1 学习记忆训练 训练在张家港生物医学仪器厂制造的 AMG-2 型 Y 迷宫刺激器中进行。迷宫由放射形 I、II、III 臂组成, 小鼠放在

I 中适应 1 分钟, 接通电源, 电流仅通过臂 I 和 II, 并将这两个臂中指示灯关闭; 臂 III 未通电, 其指示灯亮, 为安全区。电流刺激小鼠足部产生回避反应。如闭灯后动物逃入安全区 III, 为一次正确反应, 逃入非安全区 II 为一次错误反应。连续 10 次训练中正确反应率达 100% 即为完成学习任务的指标, 记录完成学习所需的反应次数和学习过程中的错误次数。在完成学习任务后的第 4 天以同样的方法进行复习测试。在学习和复习时反应次数和错误次数越少, 则学习记忆能力越强。

1.2 GABA_A 受体亲和力测定 复习测试后即断头处死动物, 取皮层和海马, 在冰冷的 0.32mol/L 葡萄糖溶液中匀浆, 在 3 500r/min, 4℃ 下离心 10 分钟, 上清液 16 500r/min, 4℃ 离心 20 分钟, 取沉淀加 50 mmol/L Tris - acetate buffer (pH7.1) 在 16 500 r/min, 4℃ 离心 20 分钟后在 -20℃ 冰存 12 小时以上, 然后解冻 (0.02% Tritonx - 100, 37℃ 30 分钟), 再在 16 500r/min, 4℃ 下离心 20 分钟, 沉淀物加 50mol/L Tris - acetate buffer (pH7.1) 在

* 本文为铁道部科技专项基金资助项目(No. J 916 Z 108);

第一作者介绍: 徐项桂, 男, 56 岁, 学士, 副教授;

收稿日期: 1996-12-07, 修回日期: 1997-03-10

16 500 r/min, 4℃ 离心 20 分钟, 将沉淀物悬浮在 50 mol/L Tris - acetate buffer 中 (pH7.1), 即为 GABA_A 受体膜制剂。取一定量的制剂加 ³H - GABA 和适量缓冲液, 终浓度为 20 nmol/L 非特异性结合组另加 10⁻¹ mmol/L GABA。37℃ 结合 20 分钟, 在 16 500 r/min, 4℃ 下离心 20 分钟终止结合反应。重蒸水洗二遍, 加消化液 (甲酸:H₂O₂ = 3:1, 80℃ 消化 1 小时, 加 4 ml

闪烁液 (2.5 g PPO + 0.25 g POPOP/500ml 甲苯) 和乙二醇乙醚 1.5ml 澄清, 于 BACKMAN 液闪仪上测定 dpm 值, 以每 mg 蛋白质的 dpm 值表示 GABA_A 受体对 GABA 的亲合力。

1.3 药物试验 T、P 和 E₂ 为上海第九制药厂生产的注射针剂。³H - GABA (0.5mci, 41 ci · mol⁻¹) 由中国科学院上海原子核研究所供应。小鼠随机分为 4 组。所有药物以消毒芝麻

表 1 肌肉注射 T、P 和 E₂ 对雄性小白鼠学习记忆功能的影响 (Effect of intramuscular injection T、P、E₂ on learning and memory function of mice)

组别 (Groups)	n	学习 (Learning)				n	复习 (Review)			
		反应次数		错误次数			反应次数		错误次数	
		(Response number)		(Error number)			(Response number)		(Error number)	
		$(\bar{X} \pm SE)$		$(\bar{X} \pm SE)$		$(\bar{X} \pm SE)$		$(\bar{X} \pm SE)$		
对照组 (Control group)	11	11.8	0.46	0.82	0.18	9	0.1	0.10	0.1	0.10
T 组 (T group)	14	11.3	0.35	0.92	0.16	10	0.5	0.30	0.7	0.30
P 组 (P group)	10	15.3	0.89**	3.6	0.50***	10	0.5	0.56	0.6	0.34
E ₂ 组 (E ₂ group)	10	13.5	0.63	2.9	0.66**	10	1.5	0.48	1.4	0.67*

n: 动物例数 (Animal number); 与对照组比 (compared with the control group): * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

表 2 肌肉注射 T、P 和 E₂ 对皮层、海马中 GABA_A 受体与 ³H - GABA 亲和力的影响 (Effect of intramuscular injection T、P、E₂ on the affinity of GABA_A receptor with ³H - GABA in cerebral cortex and hippocampus of mice)

组别 (Groups)	GABA _A 受体与 ³ H - GABA 亲和力 (Affinity of GABA _A receptors for ³ H - GABA)	皮层 (Cerebral cortex)		海马 (Hippocampus)	
		$(\bar{X} \pm SE)$	$(\bar{X} \pm SE)$	$(\bar{X} \pm SE)$	$(\bar{X} \pm SE)$
对照组 (Control group)	87	8.26	35	11.90	
T 组 (T group)	15	2.80***	21	4.40*	
P 组 (P group)	92	41.2	26	9.30	
E ₂ 组 (E ₂ group)	37	12.5*	34	14.40	

每项数值由 5 个受体膜的平均数 ± 标准误 (Each number in groups in mean ± S E of five receptor - membranes); 与对照组比 (Compared with the control group): * P < 0.05, *** P < 0.01。

油 (SO) 溶解, 肌肉注射 (im) SO 溶液 10μl。注射剂量根据人体正常药理剂量, 按一般人体与小白鼠体重比例换算确定。1) 对照组, im SO 10μl; 2) T, im 1.25mg · kg⁻¹; 3) P, im 0.25mg · kg⁻¹; 4) E₂, im 0.05mg · kg⁻¹。所有动物每天上午 8 点钟注药, 持续 9 天, 在第 5 天执行学习训练, 第 9 天进行复习试验。

1.4 数据处理 各组数据均以平均数 ± 标准误表示, 以 Student's T 检验测定各实验组与对照组之间的差异显著性。

2 结果

2.1 学习记忆 在持续 5 天注射性激素后, T 不改变学习过程中的反应次数和错误次数, P 显著地增加了反应和错误次数, E₂ 也有同样效应, 错误次数增加显著。在复习测试中, T 和 P 对反应和错误次数没有明显影响, E₂ 显著地增加了反应和错误次数 (见表 1)。

表 1 说明 T 对雄性小鼠的学习记忆能力无明显影响, 而 P 和 E₂ 对学习记忆功能具有损

害作用。

2.2 GABA_A受体亲和力 T显著降低了皮层和海马中 GABA_A 的亲和力;P 对皮层、海马中 GABA_A 受体亲和力均无影响;E₂ 降低了皮层 GABA_A 受体亲和力,但对海马中 GABA_A 受体亲和力亦无影响(见表 2)。

3 讨论

甾体激素具有很高的亲脂性,它们很容易透过生物膜进入所有的细胞和器官,包括 CNS,同时 CNS 本身也能合成甾体激素,故目前称所有能影响神经组织活动的甾体激素为神经活性甾体激素,其中包括多种性激素^[1,7,8]。它们都是脑中 GABA_A 受体复合物的调制物,通过对 GABA_A 受体的作用可以形成大量精神生理现象,包括识别和记忆功能的基础^[1,4,5,7,9]。但由于它们结构上的差异,使它们和 GABA_A 受体作用的部位、方式和效应都不一样^[7,9,10],所以实验显示,药理剂量的 T 不影响雄性小鼠的学习记忆能力,尽管 P 对复习测试无明显影响,但它显著地损害了学习能力,而 E₂ 显著地损害了学习记忆能力。

因为 GABA_A 受体复合物上存在多种药物的结合部位,除了 GABA 以外还有巴比妥类、苯二萘氮等,并在不同脑区,如皮层和海马^[8,11],组成 GABA_A 受体的亚单位也是不一样的。甾体激素可改变其它配体与 GABA_A 受体结合,也可直接调节 GABA/Cl⁻ 通道复合物的活性,从而改变了 GABA_A 受体的功能。实验显示, T 能显著降低皮层和海马中 GABA_A 受体对 GABA 的亲和力,但这种效应与学习记忆无关。P 不改变皮层、海马中 GABA_A 受体亲和力,但它损害学习。E₂ 降低皮层 GABA_A 受体亲和力,但对海马 GABA_A 受体亲和力亦无影响。这些可以说明,脑中 GABA_A 受体亲和力的大小与学习记忆功能无关,P 和 E₂ 对学习记忆

的损害可能是直接调节 GABA/Cl⁻ 通道实现的。

参 考 文 献

- 1 Majewska, M. D. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.*, 1992, 38: 379 ~ 395.
- 2 Weiland, N. G., M. Orchinik. Specific subunit mRNA of the GABA_A receptor are regulated by progesterone in subfields of the hippocampus. *Molecular Brain Res.*, 1995, 32: 271 ~ 278.
- 3 Wigstrom, H., B. Gustaffson. Facilitation of hippocampus longlasting potentiation by GABA - antagonists. *Acta physiol. Scand.*, 1985, 125: 159 ~ 172.
- 4 Flood, J. F., E. Roberts. Dehydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice. *Brain Res.*, 1988, 448: 178 ~ 181.
- 5 Flood, J. F., G. E. Smith, E. Roberts. Dehydroepiandrosterone and its sulfate enhance memory retention in mice. *Brain Res.*, 1988, 447: 269 ~ 278.
- 6 Smith, S. S, B. D. Waterhouse, J. K. Chapin, D. J. Woodward. Progesterone alters GABA and glutamate responsiveness; a possible mechanism of its anxiolytic action. *Brain Res.*, 1987, 400: 353 ~ 359.
- 7 Gee, K. W., M. B. Bolger, R. E. Brinton, H. Corini, B. S. McEwen. Steroid modulation of chloride ionophore in rat brain: structure - activity requirements regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 1988, 246: 803 ~ 812.
- 8 Sieghart, W. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.*, 1995, 47(2): 182 ~ 224.
- 9 Demingoren, S, M. D. Majewska, C. E. Spivak, E. D. London. Receptor binding, electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA_A receptor. *Neuroscience*, 1991, 45: 127 ~ 135.
- 10 Mienville, J. M., S. Vicini. Pregnenolone sulfate antagonizes GABA_A receptor - mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res.*, 1989, 489: 190 ~ 194.
- 11 Ruano, D., F. Araujo, A. Machado, A. L. DeBlas, J. Vitorica. Molecular characterization of Type I GABA_A receptor complex from rat cerebral cortex and hippocampus. *Molecular Brain Res.*, 1994, 25: 225 ~ 233.

EFFECTS OF SEX STEROIDS ON LEARNING AND MEMORY AND AFFINITY OF GABA_A RECEPTOR IN CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF MALE MICE

XU Xianggui

(*Department of Biology, Suzhou Railway Teacher's College Suzhou 215009*)

ABSTRACT The paper studied the effects of testosterone(T), progesterone(P) and estradiol(E₂) on memory and GABA_A receptor affinity in cerebral cortex and hippocampus of male mice by using AMG-2 type Y maze and radio-receptor binding assay. The results showed that intramuscular injection (im) of T did not change response number (RN) and error number (EN) during learning and review, but decreased the affinity of GABA_A receptors ($P < 0.001$ or $P < 0.05$). P im increased RN and EN in learning, but did not change the affinity of GABA_A receptor, E₂ im increased RN and EN ($P < 0.01$) in learning and RN($P < 0.05$) and EN($P < 0.05$) in review. It decreased the affinity of GABA_A receptors in cerebral cortex, but not that of hippocampus. These results suggested that the impairment of P and E₂ on memory have no relation to the affinity of GABA_A receptors for GABA.

KEY WORDS Testosterone Progesterone Estradiol Learning and memory GABA_A receptor-affinity Male mice