

胚胎期糖皮质激素系统在光照改善 小鸡记忆中的作用*

胡家芬 匡培梓 管林初 隋 南**

(中国科学院心理研究所, 北京 100101)

摘 要 该研究采用胚胎期药物注射法和小鸡一次性被动回避反应行为模型, 观察了皮质酮和地塞米松对暗孵化小鸡记忆的影响, 以及两类皮质激素受体拮抗剂 RU-486 和 Spironolactone 对光照以及皮质酮效应的阻断作用。结果表明, 糖皮质激素可明显改善暗孵化小鸡的记忆; 两类受体拮抗剂均阻断了光照和皮质酮对暗孵化小鸡记忆的改善作用, 但糖皮质激素受体对小鸡记忆的作用是特异性的, 盐皮质激素主要通过改变小鸡的基本状态来影响记忆活动。因此, 糖皮质激素及其受体系统参与了光照对小鸡记忆的作用过程。

关键词 小鸡, 胚胎期, 糖皮质激素, 光照, 记忆。

分类号 B845.4

1 前言

在成年动物中, 糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 对神经系统和内分泌系统进行广泛的调节而使机体处于稳态 (homeostasis)。这些作用中大部分是可逆的。但在发育阶段, 这些系统中有许多还未发育成熟。此时 GC 可能对机体产生永久性的形态、生理以及行为上的影响, 比如它可以影响中枢神经系统的结构作用^[1]。在小鸡胚胎发育阶段, 孵化第 14 天 (E14) 其下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, HPA 轴) 已发育成熟并对各种外界刺激产生反应。最明显的变化便是促皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH) 的释放。CRH 在应激反应中起着重要作用, 应激刺激增强海马中 CRH mRNA 的表达; 脑内注射 CRH 可诱导一系列行为、生理和内分泌的变化, 这种作用与应激刺激的效应类似。CRH 的拮抗剂可同时减弱 CRH 以及应激刺激诱导的行为效应^[2]。CRH 调节 HPA 轴的活性并诱导 GC 的释放, 通过后者的负反馈调节使机体维持在稳态。Sui 的研究证实, E19 和 E20 的光照和皮质酮均可以改善暗孵化小鸡的记

忆^[3,4]。我们推测暗孵化小鸡缺乏外界环境的刺激, 体内 HPA 轴的活动较低, 因而体内循环的 GC 水平也可能低于光孵化小鸡。所以人为提高暗孵化小鸡体内的 GC 水平能产生与光照刺激相同的效应^[4]。本文拟观察 E20 时注射 GC 和地塞米松 (dex) 对暗孵化小鸡记忆的改善作用, 以及 GC 受体 (GR) 拮抗剂 RU-486 和盐皮质激素受体 (MR) 拮抗剂 Spironolactone (Spir) 对光照和 GC 作用的阻断效应。

2 材料和方法

2.1 实验动物

一日龄小鸡和 16 日龄鸡胚 (京白 939) 均购于北京种禽公司孵化厂。鸡胚放置于孵化箱内, 保持光照 12hr 亮 / 12hr 暗, 温度 $37.97 \pm 0.01^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%—80%, 每 2 小时翻蛋一次。孵化到第 18 天时将鸡胚移至出雏盘, 停止翻蛋。孵化到第 20 天时 (E20), 关闭灯光 24 小时 (暗孵化)。随后按正常条件孵化直到 E22 小鸡全部出壳。

2.2 药物配制和注射

用无水乙醇将皮质酮 (购于 Sigma 公司) 配成贮存液 (5mg/ml), -20°C 保存。使用时用无菌生理盐

本文初稿收到日期: 1999-05-27, 修改稿收到日期: 1999-09-17。

* 国家自然科学基金 (No.39570257), 中国科学院留学回国择优基金, 中国科学院生物与技术特别支持费资助项目, 中国科学院创新工程青年科学家小组。

** 通讯作者。

水配制成每只鸡 60ng/0.1ml^[3]。

用无水乙醇将地塞米松(购于 Sigma 公司)配成贮存液(2mg/ml), -20℃ 保存。使用时用无菌的生理盐水将之稀释成每只鸡 2μg/0.1ml^[5]。

糖皮质激素受体拮抗剂 RU-486(Plymouth meeting, USA): 按照说明书上建议的方法称取 2mg RU-486 溶解于 0.1ml 二甲亚砜(DMSO)中, 配制成 50mg/ml 的母液, 置于 -20℃ 保存。使用前用于 1M 的醋酸进行 10 倍稀释, 再用无菌生理盐水配成所需浓度, 每只鸡胚注射 1ng/0.1ml^[6]; 这个剂量的 RU-486 对皮质酮产生较好的抑制效果, 对小鸡的运动和啄食特性不产生明显的不良作用。

盐皮质激素受体拮抗剂(Spirolactone, 7α-[acetylthio]-17α-hydroxy-3-oxopregn-4-ene-21-carboxylic acid γ-lactone, C₂₄H₃₂O₄S)(购于 Sigma 公司): 用无水乙醇配制成 2mg/ml 的母液, -20℃ 保存。使用时用无菌的生理盐水配制成每只鸡 1μg/0.1ml^[7]。这个剂量能有效封闭 MR, 对个体的其它行为不产生明显的有害影响。

在暗光下(<1Lux)对 E20 鸡胚进行胎盘注射, 注射完用石蜡封口。

2.3 一次性被动回避反应实验程序

按照国际上通用的小鸡训练程序^[8], 将小鸡成对放入试验盒内(20cm×20cm×25cm)。对其中一只小鸡头部进行标记, 便于区分。盒顶部悬挂 25W 的灯泡照明, 使盒内温度保持在 28—30℃。让小鸡在盒内适应 1 小时左右, 开始预训练: 将蘸有清水的金属小珠(直径为 3mm)轻轻呈现在小鸡面前约 20 秒, 共进行 3 次, 间隔 5 分钟。小鸡一般会积极去啄珠子。预训练结束后, 开始训练: 将蘸有氨基苯甲酸甲脂(methyl anthranilate, MeA)的红色玻璃圆珠(直径为 4mm)呈现给小鸡约 10 秒, 小鸡啄食后大部分会表现出摇头、闭眼或后退等厌恶反应。没有上述反应的小鸡被淘汰掉。测试时用相同大小的红色和蓝色玻璃圆珠分别呈现给小鸡, 此时回避红珠子的小鸡为记忆良好者, 啄红珠子的为遗忘者。小鸡一般不拒绝蓝色玻璃圆珠。每只小鸡只测试一次。

评价小鸡记忆保持的指标为回避率(avoidance rate, AR), 它是用测试时回避红珠子的小鸡数占训练时啄红珠小鸡的百分数来表示的。测试时回避红珠的比率愈高, 表明小鸡的记忆保持愈好。用回避蓝珠小鸡的比率来测试药物注射是否对小鸡的啄食行为发生影响。回避蓝珠的比率愈低, 表明药物对小鸡记忆作用的特异性愈好。组间数据的差异用卡

方(χ^2)检验法进行分析。

3 实验结果

3.1 糖皮质激素对暗孵化小鸡记忆的影响

正常孵化的小鸡到 E20 时关掉孵化箱的灯光保持黑暗约 24 小时。在暗孵化当天将这些鸡胚分成 3 组, 每组 22 个。每组鸡胚分别注射皮质酮、地塞米松和无菌的生理盐水各 0.1ml。孵化到 E22 天时取出小鸡, 按照一次性回避反应实验程序对小鸡进行预训练, 对小鸡进行弱强化训练(10%MeA)。训练后 3 小时进行测试。结果见图 1。

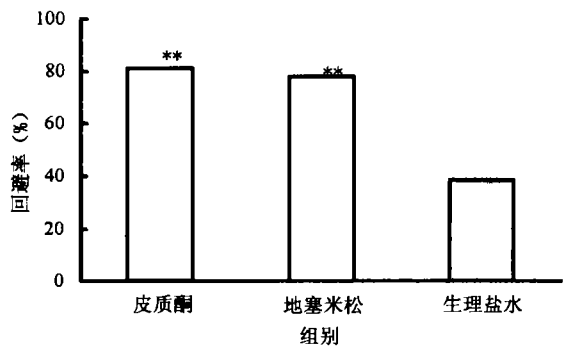


图1 皮质酮和地塞米松对暗孵化小鸡记忆的影响
注: **P<0.01, 与生理盐水组相比。

从图 1 可看出, 皮质酮和地塞米松两组小鸡的回避率明显高于生理盐水组($\chi^2 = 14.7$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 13.0$, $P < 0.01$)。表明皮质酮和地塞米松都能改善暗孵化小鸡的记忆保持能力, 它们之间没有显著性差异($\chi^2 = 0.05$, $P > 0.05$)。

3.2 皮质激素受体拮抗剂对光孵化小鸡记忆的影响

将 E20 光孵化(300Lux/24 小时)的鸡胚分成 3 组, 每组 25 个, 分别注射等体积的 RU-486, Spir 和无菌生理盐水各 0.1ml。孵化到 E22 天时取出小鸡, 按照一次性回避反应实验程序对小鸡进行预训练,

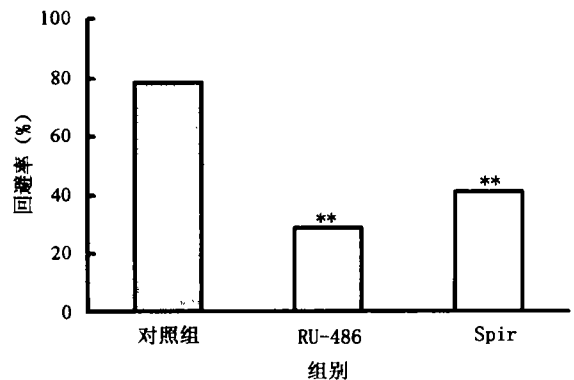


图2 皮质激素受体拮抗剂RU-486和Spirolactone对光孵化小鸡记忆的影响
注: **P<0.01, vs. sal group.

弱强化(10%MeA)训练。训练后3小时对小鸡进行测试。结果见图2。

从图2可看出,GC的两类受体拮抗剂皆对光孵化小鸡的记忆保持产生了抑制作用(与生理盐水组相比 $\chi^2 = 23.3, P < 0.01; \chi^2 = 11.9, P < 0.01$)。表明光照与两类糖皮质激素受体之间都存在着相互作用。其中GR特异拮抗剂RU-486对记忆的阻断作用比MR拮抗剂spironolactone要强,但两类受体拮抗剂的作用之间却没有显著性差异($\chi^2 = 2.1, P > 0.05$)。

3.3 皮质激素拮抗剂对糖皮质激素作用的影响

将E20暗孵化鸡胚分成5组,各组分别为23, 23, 26, 26, 23个,分别注射等体积的皮质酮+生理盐水(cs+sal),地塞米松+生理盐水(dex+sal),皮质酮+RU-486(cs+RU-486),地塞米松+Spironolactone(dex+spir)和生理盐水+生理盐水(sal+sal)。孵化到E22天时取出小鸡,按照一次性回避反应实验程序对小鸡进行预训练,弱强化训练(10%MeA)。训练后24小时对小鸡进行测试。结果见图3。

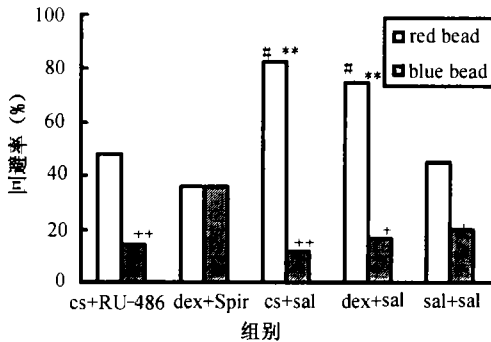


图3 皮质激素受体拮抗剂对20天各胚胎组小鸡改善记忆的影响
注: ** $P < 0.01$, 与sal+sal组相比; # $P < 0.02$, 与cs+RU-486和dex+spir组相比; ++ $P < 0.01$, + $P < 0.05$, 与dex+spir组相比。

图3的结果显示,cs+sal和dex+sal组小鸡对红珠的回避率高于sal+sal组($\chi^2 = 10.9, P < 0.01; \chi^2 = 7.5, P < 0.02$),说明小鸡的记忆保持得到改善。而皮质激素的两类受体拮抗剂皆可阻断糖皮质激素的这种改善作用($\chi^2 = 9.03, P < 0.01; \chi^2 = 13.95, P < 0.01$),因此糖皮质激素的作用可能是由两类受体介导的。Cs+RU-486和dex+spir两组小鸡之间没有差异($\chi^2 = 1.80, P > 0.05$),表明两类受体的抑制作用相近,它们与对照组相比也没有差异($\chi^2 = 1.07, \chi^2 = 0.01, P > 0.05$)。各组小鸡对蓝珠子的回避率都较低,但dex+spir组小鸡对蓝珠子的回避率高于另外四组,而且具有统计学上的显著性差异($\chi^2 = 9.26, \chi^2 = 12.03, P < 0.01; \chi^2 = 6.89,$

$\chi^2 = 4.29, P < 0.05$),这四组小鸡与生理盐水组之间皆没有差异($\chi^2 = 3.14, \chi^2 = 2.25, \chi^2 = 3.18, \chi^2 = 0.78, P > 0.05$)。

4 讨 论

胚胎期皮质酮和地塞米松都明显地改善了暗孵化小鸡的记忆。因此暗孵化小鸡的记忆水平低可能与其脑内GC达不到正常发育所需要的水平有关。而外源性的GC可能弥补了这个不足,从而使暗孵化小鸡记忆保持得到改善。GR两类拮抗剂RU-486和Spironolactone皆阻断了光孵化小鸡的记忆,表明GC和GR两类受体通路都可能参与了光照对小鸡记忆的改善作用。RU-486和Spironolactone也对GC的作用产生了明显的抑制,但两类受体影响记忆的机制是不同的。GC和GR对小鸡的啄食特性没有影响,因此,它们对小鸡记忆的影响具有特异性。Spironolactone明显改变了小鸡的啄食特性,表现为对蓝珠子的回避率的增加,这表明MR受体系统可能是通过改变小鸡的基本状态来起作用的。Oitzl和Sandi也发现,皮质激素两类受体对记忆的影响作用于不同的方面^[7,9]。比如MR的受体拮抗剂RU28318处理后的小鸡更易于接近新异刺激,而且啄珠子的频率也增高。我们的实验中也发现注射Spironolactone的小鸡表现出啄珠子频率的升高(未发表资料)。

经典的GR一般属于胞浆分子。由于GC具有疏水性,因而可扩散到胞内与受体结合,激素-受体复合物进入细胞核,与DNA上特异的甾体激素反应元件(HREs)发生作用,从而调节有关靶基因的转录^[10]。中间期和延迟期皆为这种基因机制。在中间期(1—10小时),糖皮质激素对各种递质酶系产生广泛的影响,特别是与儿茶酚胺合成有关的酶。从而调节靶基因的转录,也伴随着糖蛋白NCAMs的合成;在延迟期(24小时后),糖皮质激素促使蛋白质合成的增加,引起神经元形态上的改变以及神经元的自然凋亡过程^[11]。在本实验中,由于GC的注射与行为测试之间已超过了24小时,因此,GC引起的小鸡行为上的改变可能与脑发育过程中神经元的可塑性变化有着密切的关系;下一步的实验我们将对胚胎期光照和皮质酮对小鸡脑内GR水平的影响进行探讨。

参 考 文 献

- 1 Rosenfeld P, Sutano W, Levine S, De Kloet E R.

- Ontogeny of type I and type II corticosteroid receptors in the rat hippocampus, *Dev Brain Res*, 1988, 42:113—118
- 2 Merali Z, McIntosh J, Kent P et al. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci*, 1998, 18:4758—4766
- 3 Sui N, Sandi C, Rose S P R. Interactions of corticosterone and embryonic light deprivation on memory retention in day-old chicks. *Dev Brain Res*, 1997, 101:269—272
- 4 Sui N, Rose S P R. Effects of dark rearing and light exposure on memory for a passive avoidance task in day-old chicks. *Neurobiology of learning and memory*, 1997, 68: 230—238
- 5 Briski K P, DiPasquale B M, Gillen E. Induction of immediate-early gene expression in preoptic and hypothalamic neurons by the glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone. *Brain Res*, 1997, 768(1-2):185—196
- 6 Sandi C, Rose S P R. Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *Eur J Neurosci*, 1994, 6(8):1292—1297
- 7 Herman J P, Spencer R. Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vitro. *J Neurosci*, 1998, 18(18):7462—7473
- 8 管林初, 陈双双. 利用小鸡建立学习和记忆模型的方法介绍. *心理学报*, 1991, 23: 319—324
- 9 Oitzl M S, Sutanto W, De Kloet E R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci*, 1992, 106:62—71
- 10 Maccari S, Mormede P et al. Hippocampal type I and type II corticosteroid receptors are modulated by central noradrenergic system. *Psychoneuroendocrinology*, 1992, 17(2-3): 103—107
- 11 Mahajan P B, Thompson E A. Glucocorticoid regulation of rRNA synthesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1991, 104:195—200

THE INVOLVEMENT OF PRENATAL GLUCOCORTICOID SYSTEM ON MEMORY RETENTION OF CHICKS IMPROVED BY LIGHT EXPOSURE

Hu Jiafen Kuang Peizi Guan Linchu Sui Nan

(*Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

Abstract

The effect of two kinds of corticosteroids: corticosterone and dexamethasone on memory retention of dark hatched chicks and corticosteroid receptor antagonist RU-486 and Spironolactone on memory retention improved by light exposure or corticosterone were examined using one-trial passive avoidance model in chicks. It showed that corticosterone and dexamethasone markedly improved memory retention of dark hatched chicks respectively. RU-486 and Spironolactone blocked memory retention improved by light exposure or corticosterone administration in chicks. But the effect of glucocorticoid receptor was specific, however mineralocorticoid mainly affected the general state of the chicks. Thus, glucocorticoid and its receptors were involved in effect of light exposure on memory in chicks.

Key words glucocorticoid, light exposure, memory, chick, embryo, RU-486.