

大鼠作业成绩与脑内亮氨酸脑啡肽含量变化的相关性研究¹⁾

匡培梓 陈双双 管林初 戴晓红 向小宽

中国科学院心理研究所,北京

匡培根 任 韬 王国平 张凤英

中国人民解放军总医院研究生学院,神经介质实验室,北京

摘 要

本工作采用穿梭式电击回避反应法和脑啡肽的放射免疫测定法,分析比较了大鼠作业成绩与脑内亮氨酸脑啡肽(Leu-enkephalin, LEK)含量的关系,在本实验条件下,观察到作业成绩不良组纹状体内 LEK 含量显著高于成绩优良组和对照组,并由实验证明,它们之间的差异不是由于在实验中接受电击的次数或电击总量不同造成的。这一结果提示,内源性亮氨酸脑啡肽可能参与记忆获得的调制。

已有的研究表明,外周和中枢神经系统的一些激素或神经介质均参与信息在脑内的加工过程。虽然它们并不直接涉及加工过程,但是它们调节记忆贮存和/或提取过程。如去甲肾上腺素,β-内啡肽,促肾上腺皮质激素,肾上腺素,加压素等作为记忆调节系统已有很多的研究报道⁽¹⁾,这些系统可能单独地起作用,也可能彼此相互作用着。但是有关亮氨酸脑啡肽在学习记忆中调节作用的报道并不多。目前尚未查阅到学习记忆成绩与脑内 LEK 含量关系的报道。本实验采用放射免疫测定法,测定大鼠经条件反射训练后不同脑区 LEK 含量的变化,并分析比较不同作业成绩大鼠脑内 LEK 的含量,试图探讨 LEK 在学习记忆中的调节作用。

材 料 与 方 法

一、实验动物 成年 wistar 大白鼠,雄性,体重 150—200 克,共选用 108 只。

二、行为实验 实验装置为穿梭箱(shuttle box)。箱体分隔为均等的两个小室,中间有小门洞相通,箱底及小室四壁铺设铜棒,以便通电刺激大鼠脚掌,作为非条件刺激;两侧小室内各有 25w 白炽灯一盏,以灯光作为条件信号。

本工作包括三个变式实验,所有鼠均在上述同一实验装置内进行训练。

1) 本文于 1987 年 6 月 19 日收到。

• 本课题获国家自然科学基金会资助。

实验1,分析比较不同作业成绩鼠脑内 LEK 含量。选用大鼠38只,随机分为实验组(28只)和对照组(10只)。实验组鼠接受灯光-电击回避反应训练。训练前,大白鼠在箱内适应2—3分钟,同时双侧小室内各有25w白炽灯照亮。正式实验时,鼠所在一侧小室的灯光点亮作为条件信号;电击大鼠足掌作为非条件刺激,电刺激参数为方波0.7—1.5mA。条件信号单独作用3秒后与电刺激相结合,大鼠因受电击而从亮室逃往另一侧暗室内,即完成一次回避反应。在多次重复后,大鼠所在小室的灯光呈现时,电刺激尚未开始前,实验鼠立即逃往对侧小室即为条件反应。每次实验训练10回,共进行5次实验。第1,2实验日上下午各一次实验,第3实验日进行第5次实验后,立即断头取脑进行 LEK 测定。

大鼠作业成绩划分标准:凡条件反应出现率达70%以上,并连续三次实验中达到此标准者,为学习记忆成绩优良者(以下简称学习优良组);否则,归为学习记忆成绩不良组(以下简称学习不良组)。对照组鼠在相同时间内在实验箱内逗留10分钟,不呈现任何刺激。

实验2,按上述同样的方法步骤进行训练和分组。分为学习优良组(8只),学习不良组(16只),和对照组(13只)。当第五次实验完毕后,另追加一次行为实验,在这次实验中仅呈现10次灯光,无论有否条件反应均不给予电刺激强化。之后,立即快速断头取脑进行 LEK 测定。

实验3,本实验测定电击-回避反应次数对脑内 LEK 含量的影响。实验在上述实验箱内进行,大鼠进入箱内经适应后仅给予电击,电击后大鼠逃往对侧小室。这样的电击-回避反应实验也进行5次,各次实验中大鼠接受电击的次数参照学习不良组和学习优良组在实验中所接受的电刺激次数。

共选用大鼠33只,随机分为三组:电击1组(11只),电击2组(11只)和对照组(11只)。在五次实验中电击1组鼠接受电击回避训练的总次数平均为25次/只,相当于学习不良组鼠在五次实验中平均接受的电击数/只;电击2组平均为16次/只,相当学习优良组接受的电击数/只。对照组处理与实验1,2相同。

三、脑啡肽放射免疫测定法^[2] 行为实验完毕后,将清醒大鼠立即快速断头取脑,置于煮沸的生理盐水中3—5分钟,取出后按自然界线分出四个脑区:海马、纹状体、丘脑中脑,和脑桥延脑,(实验3中仅取出纹状体),并分别称重,置于0.1N盐酸中,然后经匀浆加添磷酸缓冲液、放射免疫稀释剂后,由低温离心,取出上清液、作放射免疫测定。测得各脑区 LEK 的 Pg 值后,经换算得出每 mg 脑组织的 LEK 含量。药盒由上海高血压研究所供应。

最后,将所测得的各脑区 LEK 含量的数值按大鼠学习成绩不同而分别计算,并进行组间 t 检验。

结 果

1、学习成绩与脑内 LEK 含量的关系见表1。

结果表明,学习不良组大鼠各脑区 LEK 含量均高于学习优良组和对照组,其中纹状

表1 不同作业成绩大鼠各脑区 LEK 含量的比较 ($\bar{x} \pm SE$ pg/mg)

| 组 别 | 海 马 | 纹状体 | 丘脑中脑 | 脑桥延脑 |
|-------|--------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| 学习不良组 | 23.50 ± 4.79 | 116.60 ± 11.66 [△] | 37.18 ± 4.50 | 34.29 ± 3.10 |
| 14只 | (12) | (13) | (14) | (13) |
| 学习优良组 | 21.45 ± 1.91 | 72.51 ± 5.74 | 29.81 ± 3.36 | 29.49 ± 2.56 |
| 14只 | (13) | (14) | (13) | (14) |
| 对照组 | 21.51 ± 3.49 | 71.48 ± 9.82 | 30.69 ± 3.46 | 33.27 ± 3.08 |
| 10只 | (10) | (7) | (10) | (10) |

() 内系样品数。

△ 与对照组比较 $t = 2.569$, $p < 0.05$ 。

•• 与学习优良组比较 $t = 3.473$, $p < 0.01$ 。

体内 LEK 含量与学习优良组和对照组相比较, 它们之间的差异是显著的。($p < 0.05$, $p < 0.01$)。学习优良组和对照组的 LEK 含量十分接近, 无显著性差异。

上述结果是否可能是由于在取脑前的最后一次实验中, 各组接受电刺激强化的多少不同而影响脑内 LEK 的含量, 因为学习优良组受到电刺激强化少, 相反, 学习不良组受到电刺激的机会就多, 为此设置了实验 2, 结果见表 2。

表2 实验2各组大鼠不同脑区 LEK 含量的比较 ($\bar{X} \pm SE$ pg/mg)

| 组 别 | 海 马 | 纹状体 | 丘脑中脑 | 脑桥延脑 |
|-------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|
| 学习不良组 | 20.15 ± 1.87 | 97.94 ± 4.05 [△] | 33.61 ± 2.93 | 32.13 ± 1.84 |
| 16只 | (16) | (16) | (16) | (16) |
| 学习优良组 | 19.07 ± 2.47 | 78.25 ± 6.51 | 24.51 ± 3.36 | 30.45 ± 3.15 |
| 8只 | (8) | (8) | (8) | (8) |
| 对照组 | 16.59 ± 1.25 | 74.51 ± 8.75 | 26.31 ± 1.71 | 24.80 ± 2.20 |
| 13只 | (13) | (13) | (13) | (13) |

标记同表 1。

从表 2 可见, 在实验 2 条件下所获得的结果与实验 1 是一致的。学习不良组纹状体内的 LEK 含量高于其他两组, 差异显著 ($p < 0.05$, $p < 0.05$)。因此, 可以认为不同作业成绩大鼠脑内 LEK 含量的差异, 不是由于接受电刺激次数的不同而造成的。

2. 电击回避反应与脑内 LEK 含量的关系: 实验 3 的结果表明, 电击 1 组 (受电击次数平均为 25 次/只) 和电击 2 组 (受电击次数平均为 16 次/只) 虽接受电击的次数不同, 但其纹状体内 LEK 的含量却十分接近, 分别为 112.38 ± 12.29 (11 个样品), 117.22 ± 15.58 (11 个样品), 对照组为 89.46 ± 4.99 (11 个样品)。电击 1, 2 组 LEK 含量虽也高于对照组, 但经 t 检验, 差异不显著。 ($p > 0.05$)。

讨 论

本工作采用穿梭箱电击回避反应的实验模型和脑啡肽的放射免疫测定方法, 分析比较了大鼠作业成绩与脑内 LEK 含量的关系。结果表明, 学习不良组大鼠纹状体 LEK 含量显著高于学习优良组和对照组; 学习优良组和对照组之间差异不显著。为了排除电击对脑内 LEK 含量的影响, 设置了实验 2 和 3。实验 2 在 5 次实验结束后, 增加一次只

给条件刺激(呈现灯光10次)而不给电击的实验;而实验3,在5次实验中只给非条件刺激。由实验2,3的结果看来,学习不良组与学习优良组纹状体内LEK含量的差异,似乎不是由于电击或电击总量不同造成的。

研究阿片样肽类物质对学习记忆的影响及纳洛酮能否翻转脑啡肽对记忆的影响,常用注射药物的方法。虽然外周注入肽类物质并不能通过血脑屏障而进入脑内,但是有实验表明,外周给药可以影响内源性脑啡肽含量^[9]。根据已有的报道,各种肽类物质对行为的影响是不同的^[4];同一类药物的效应,由于动物模型、种属及剂量的不同也各有差异^[1, 3, 6]。这说明,脑啡肽对学习记忆的作用机理是复杂的。Rigter等报道,LEK可抑制在穿梭箱内进行的主动回避反应,而易化被动回避反应;并且还发现,抑制主动回避反应的剂量为4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而易化被动回避反应的剂量仅为0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,相差一个数量级之多^[5, 6, 7, 8]。这种结果颇难简单地用LEK改变痛阈或光敏感性来解释,因为若阻抑主动回避反应是由于LEK的抗痛效应,或LEK的光敏感增加效应造成,则LEK对于被动回避反应也应该产生明显的阻抑作用,而非易化作用^[6]。本实验的学习记忆也是在穿梭箱内进行的,从实验1—3的结果来看,大鼠主动回避反应的作业成绩,也难以用内源性LEK释放增多或减少导致痛感受性变化来解释,本实验结果与Rigter等研究结果是一致的。

据报道,脑啡肽可影响学习记忆的获得,巩固和再现等不同阶段,也有报道称纳洛酮可翻转脑啡肽对记忆的影响^[6, 9, 10],但究竟是纳洛酮本身的直接作用,抑或是由于它阻断内源性阿片样物质与阿片受体的结合,尚不清楚,不同作者各有不同看法。因而在未能确切阐明LEK对学习记忆作用的环节和机理时,解释学习成绩与内源性LEK含量的关系也是困难的。不过下述事实也值得注意:(1)注射LEK对被动与主动回避反应产生相反的效应意味着,LEK不是影响学习记忆过程本身,而是一般性的、非特异性影响,如觉醒或恐惧反应;(2)含LEK前体(前脑啡肽源)的神经元广泛分布于脑脊髓各水平,包括大脑皮层,嗅结节,纹状体,边缘系统各个核团,外侧膝状体,四叠体,导水管周围灰质、室周核、脚间核、网状巨细胞核、孤束核,三叉神经脊束核,以及脊髓灰质^[11],从LEK神经元分布是如此广泛来看,LEK对中枢神经系统功能的影响必然是多方面的,就我们的实验结果,学习不良组纹状体内LEK含量较高可能与恐惧反应有一定的相关性,因为在本实验中学习不良组对电击的恐惧反应远较学习优良组为强烈而持久:或表现为僵持不动,或表现为跳窜,以及伴随着呼吸加深加快,偶有排便排尿等恐惧反应。相反,学习优良组随着条件反应的出现和巩固,对电刺激的反应逐渐减弱。我们的实验曾表明,应激伴随着纹状体内LEK含量增高,电休克又能使纹状体内已增高的LEK含量复原^[12]。因此,我们认为,维持纹状体内LEK的水平对学习和记忆的获得是重要的。学习不良组在纹状体内LEK含量较高,也许是LEK释放和降解速度减慢,这削弱了纹状体控制肌肉运动和植物性神经系统功能,继而降低了机体对外界环境变化的适应和稳定内在环境的能力,从而影响了学习记忆功能。

由于学习优良组与对照组比较,脑LEK含量差异不显著,那末,假若成绩不良者再经过多次训练,当其成绩达到优良者水平,这时是否这些原来学习不良者脑内LEK含量,也会降低,并达到对照组水平。这对阐明脑LEK对学习记忆的调剂作用当是有益的。这方面的工作尚待继续探讨。

参 考 文 献

- [1] Dias RD, et al., Effect of the pretraining administration of β -endorphin, leucine, methionine and (des-Tyr) methionine-enkephalin on the acquisition and retention of a shuttle avoidance response by rats. *Brazilian J Med Biol Res*, 1982, 15, 55-60.
- [2] 陆以信: 脑啡肽的放射免疫测定, *生物化学与生物物理学报*, 1980, 12 (2), 115-124.
- [3] Carrasco MA, et al., Effect of morphine, ACTH, epinephrine, Met-, Leu-, and des-Tyr-Met-enkephalin on β -endorphin-like immunoreactivity of rat brain. *Psychoneuroendocrinology*, 1982, 7 (2-3), 229-234.
- [4] Netto CA, et al., Response of the rat brain β -endorphin system to novelty: Importance of the fornix connection. *Behavioral and Neural Biology*, 1985, 43, 37-46.
- [5] Rigter H, et al., Enkephalins interfere with acquisition of an active avoidance response. *Life Sciences*, 1980, 26, 337-345.
- [6] Rigter H, et al., Enkephalin and fear-motivated behavior. *Proc Natl Acad Sci*, 1980, 7 (6), 3729-3732.
- [7] Rigter H, et al., Failure of naloxone to prevent reduction of amnesia by enkephalins. *Neuropharmacology*, 1977, 16, 545-547.
- [8] Rigter H. Attenuation of amnesia in rats by systemically administered enkephalins. *Science*, 1978, 200, 83-85.
- [9] Izquierdo I, et al., Effects of β -endorphin, Met, Leu, and des-Tyr-Met-enkephalin on learned behaviors, one or more effects? in: *Learning and Memory Drugs as Reinforcers*, Ed Skoji Saito, et al., International Congress Series, 620.83-95, 1982.
- [10] Izquierdo I, Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: Possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology*, 1979, 66, 199-203.
- [11] Khachaturian H, et al., Anatomy of the CNS opioid system. *TINS*, 1985, 8 (3), 111-119.
- [12] 匡培梓等, 电休克惊厥对亮氨酸脑啡肽的影响, *中华神经精神科杂志* 1986, 第13卷, 第8期, 179-181.

RELATIONSHIP BETWEEN PERFORMANCE SCORE AND LEU-ENKEPHALIN OF RAT BRAIN

Kuang Pei-zi Chen Shuang-shuang Guan Lin-chu

Dai Xiao-hong Xiang Xiao-kuan

Institute of Psychology, Academia Sinica

Kuang Pei-gen Ren Tao Wang Guo-ping Zhang Feng-ying

Neurotransmitter Research Laboratory Postgraduate Medical College,

Chinese PLA General Hospital

Abstract

Rats were trained in a shuttle avoidance task. Brain LEK levels were measured in rats after 5 training sessions. LEK level of striatum increased in the rats with low performance score compared with rats with high performance score ($P < 0.05$) and controls ($P < 0.01$). No difference in LEK level between rats with high performance score and controls was found. The data indicated that the foot-shock stimulation was not attributable to the difference in LEK level. These results suggest that endogenous LEK may be involved in the modulation of acquisition of shuttle avoidance responses.