

· 论 著 ·

用 Ro15-4513 逆转氟西洋耐受性并观察 GABA_A 受体亚单位表达的影响

郭文, 王丽

(北京大学第一医院儿科, 北京 100034)

[摘 要] 目的 苯二氮草类抗癫痫药长期应用, 可使 2/3 病人产生抗惊厥作用耐受性。本研究探讨苯二氮草类抗惊厥药物的耐受性和用氟马西尼(Ro15-4513)逆转耐受性的受体分子机制。**方法** 一组大鼠腹腔注射氟西洋 2 周, 产生有氟西洋耐受性而无依赖性的听源性惊厥大鼠模型。另一组大鼠于氟西洋用药第 8 天起, 每天腹腔注射 1 次 Ro15-4513, 共 7 d, 观察对耐受性的影响; 对照组腹腔注射同等体积的 20% 丙二醇。每组 5 只。用竞争性定量 RT-PCR 测定大鼠脑皮质运动区和海马区的 GABA_A 受体 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 的含量。**结果** 与对照组相比, 氟西洋耐受组大鼠皮质运动区的 α_1 亚单位下降 24%, α_3 下降 17%, α_5 上升 33%, γ_{2L} 下降 35%, γ_{2S} 下降 45%, 差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 0.01); 海马区的 α_1 下降 33%, γ_{2L} 下降 35%, γ_{2S} 下降 27%, 与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$)。合用 Ro15-4513 组大鼠皮质运动区 GABA_A 受体 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 含量与对照组相比差异均无显著性 ($P > 0.05$); 海马区 α_1 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 含量与对照组相比也同样差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 听源性惊厥大鼠的氟西洋耐受机制与中枢 GABA_A 受体 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 皮质运动区含量的适应性改变有关。Ro15-4513 通过影响皮质运动区和海马区部分 α 及 γ_2 亚单位的表达而产生逆转听源性惊厥大鼠对氟西洋耐受性的效应。 [中国当代儿科杂志, 2003, 5(5): 412-416]

[关 键 词] 苯二氮草类; 惊厥; 受体; 药物耐受性; 大鼠

[中图分类号] R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)05-0412-05

Modification of GABA_A Receptor Subunit Expression in Audiogenic Seizure Rat Cortex and Hippocampus Following Tolerance to Flurazepam and Reversal of Tolerance by Co-administration of Ro15-4513

Wen GUO, Li WANG. Department of Pediatrics, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China (E-mail: ziran@public.east.cn.net)

Abstract: **Objective** Some patients who have been administrated benzodiazepine for a long period will develop medicine tolerance. This study aims to investigate the molecular mechanism underlying this tolerance to benzodiazepine and the reversal of this tolerance by Ro15-4513. **Methods** One group of audiogenic seizure rats was administrated flurazepam for two weeks (the flurazepam group), which resulted in tolerance without behavioral signs of withdrawal to flurazepam. Another group was co-administrated Ro15-4513 daily for 7 days from the eighth day of flurazepam treatment (the Ro15-4513 group) to observe the effect of Ro15-4513 on the tolerance to flurazepam. The control group was administrated the same volume of propylene glycol as in the flurazepam group or the Ro15-4513 group. GABA_A receptor subunit α_1 , α_3 , α_5 , γ_{2L} and γ_{2S} were assayed using quantitative competitive RT-PCR in rat FrPaM and hippocampus. **Results** In the flurazepam group the content of mRNA encoding for α_1 , α_3 , γ_{2L} and γ_{2S} was all significantly decreased (by 24%, 17%, 35% and 45% respectively) in FrPaM, whereas that of α_5 was significantly increased (by 33%) compared with the control group. In hippocampus, α_1 , γ_{2L} , and γ_{2S} mRNA contents were significantly decreased (by 33%, 35% and 27% respectively). In the Ro15-4513 group, no significant changes were found with α_1 , α_3 , α_5 , γ_{2L} , and γ_{2S} in FrPaM, and α_1 , α_5 , γ_{2L} , and γ_{2S} in hippocampus compared with the control group. **Conclusions** The

[收稿日期] 2003-02-07; [修回日期] 2003-06-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30170994)

[作者简介] 郭文(1966-), 男, 主治医师, 医学博士。目前为美国哥伦比亚大学博士后。

[通讯作者] 王丽, 北京大学第一医院儿科, 邮编: 100034。

accomodated change in GABAA receptor subunit α_1 , α_3 , α_5 , γ_{2L} and γ_{2S} in FrPaM and hippocampus may be associated with the mechanism for flurazepam tolerance in audiogenic seizure rats. Ro15-4513 can reverse the tolerance to flurazepam by affecting the modification of GABAA receptor subunit α_1 , α_3 , α_5 , γ_{2L} , and γ_{2S} subunit expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(5): 412-416]

Key words: Benzodiazepine; GABA_A receptor; Tolerance; Seizure; Rat

苯二氮草类(benzodiazepine, BZ)具有镇静、催眠和抗惊厥等药理效应,临床应用十分广泛。BZ对各种原因引起的癫痫均有显著疗效。但由于在慢性使用过程中易产生抗惊厥耐受性,即药物效能逐渐减弱或消失,因而大大限制了BZ作为一线抗癫痫药物的临床应用。现已知BZ耐受性的产生与中枢GABA_A受体功能和结构的改变有关^[1]。GABA_A受体是中枢主要的抑制性受体,是由5个亚单位组成的5聚体门控氯离子通道受体。构成GABA_A受体的亚单位种类繁多,包括 α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , ρ_{1-3} , ϵ , δ 及 π ^[2]。已有大量报道慢性使用BZ产生耐受性时,可引起GABA_A受体亚单位表达的变化^[1],但这种变化在BZ耐受性中的确切作用尚不清楚。另外,如何逆转BZ的耐受性也是临床实践中亟待解决的难题。

反向激动剂概念在80年代末首次由Ehlert等提出^[3]。这种配体具有内在活性,但与受体结合产生的是与激动剂相反的负性效应。这与传统认为的与激动剂竞争结合受体,而无生物效应的竞争性拮抗剂是完全不同的。氟马西尼(Ro15-4513)是作用于GABA_A受体BZ位点的部分反向激动剂。关于部分反向激动剂慢性或急性作用与BZ耐受性的关系,国外已进行了不少研究。虽然已知道反复使用部分反向激动剂可增加或降低GABA_A受体的功能,减少或增加BZ结合位点;而慢性使用BZ也增加部分反向激动剂作用于GABA_A受体的药理活性^[4]。但关于部分反向激动剂能否干预BZ耐受性的产生,以及部分反向激动剂影响GABA_A受体结构和功能的机制,尚有待进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物和试剂 雄性P⁷⁷PMC大鼠30只,由北京医科大学动物中心提供,体重180~260g,用药前连续3d予110~120分贝铃声刺激均产生4~5级惊厥。P⁷⁷PMC的惊厥级别及表现是,I级:无反应;II级:潜伏期→奔跑,有时跳跃;III级:潜伏期→奔跑→休止期→奔跑;IV级:潜伏期→奔跑→惊厥;

V级:潜伏期→奔跑→休止期→奔跑→惊厥^[5]。氟西泮购自上海大众制药厂。Trizol, SphI和DNA聚合酶Klenow大片段、蛋白酶K、T7RNA聚合酶、RNase-free DNase I、TaqDNA聚合酶均购自Promega公司, MMLV购自Gibco公司。 α -³²Pd-CTP购自亚辉公司。 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位的5对特异引物在赛百胜公司合成。

α_1 亚单位的特异引物序列是:5'-AGCTATAC-CCCTAACTTAGCCAGG-3'和5'-AGAAAGC-GATTCTCAGTGCAGAGG-3'; α_3 亚单位:5'-CAACATAGTGGGAACACCTATCC-3'和5'-GGGGTTTGGGATTTTGGATGCTTC-3'; α_5 亚单位:5'-CAAGAAGGCCTTGAAGCAGCTAA-3'和5'-GGTTTCTGTCTTACTTTGGAGAG-3'; γ_{2L} 亚单位:5'-CTTCTTCGGATGTTTTCCTTCAAG-3'和5'-CATAGGGTATTAGATCGTTGGACT; γ_{2S} 亚单位:5'-AAGAAAAACCCTGCCCTACAATT-3'和5'-TTCGTGAGATTCAGCGAATAAGAC。

1.1.2 氟西泮耐受性模型的建立 氟西泮溶于20%丙二醇。用药前,先腹腔注射一次氟西泮10mg/kg,半小时后铃声刺激诱发惊厥。然后,按80mg/kg,分2次(8am, 4pm)腹腔注射。停药后12h腹腔注射氟西泮10mg/kg,半小时后铃声刺激诱发惊厥。对照组腹腔注射相同液量的20%丙二醇。

1.1.3 氟西泮耐受性的逆转 大鼠分3组。一组大鼠用氟西泮按同上剂量和给药方式处理2周,另一组在注射氟西泮的第8天起,按每天15mg/kg,腹腔注射一次Ro15-4513(Ro15-4513溶于20%丙二醇),共7d。对照组腹腔注射同等液量的20%丙二醇。每组5只。按同上方法检测耐受性。

1.1.4 氟西泮依赖性的检测 剂量同上,腹腔注射氟西泮2周后,停药2d,铃声刺激诱发惊厥,比较用药前后的惊厥潜伏期,同时观察体重变化和有无流涎等其它戒断表现^[3]。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取 断头处死大鼠,依照大鼠脑立体定位图谱,取皮质运动区和海马区。用Trizol试剂盒提取脑组织总RNA,紫外分光定量,

-70℃冷冻备用。

1.2.2 cRNA合成 分别含 GABA_A 受体 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位对照模板的 pGEM 质粒由美国 Dr. Grayson 惠赠。用 *sph*I 消化质粒 DNA 使其线性化,反应容积 20 μ l;质粒 DNA 2~5 μ g,*sph*I 0.5 μ l, RE 10 $\times$ buffer 2 μ l,37℃ 孵育过夜。加入 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段 10 U,室温放置 10 min。随后,加入蛋白酶 K,浓度 50 μ g/ml,于 37℃ 孵育 30 min。用等体积酚:氯仿抽提 2 次。吸出上清,加入 2 倍体积无水乙醇,-20℃ 过夜。次日,于 4℃,12 000 g/min 离心 10 min,弃上清,晾干。cRNA 体外转录反应容积 100 μ l;质粒 DNA 2~5 μ g,5 $\times$ buffer 20 μ l,DTT 10 μ mol/L,RNasin 30 U,rNTP 各 0.5 mmol/L,T₇RNA 聚合酶 30~40 U。于 37℃ 孵育 2 h。随后,加入 RNase (free DNase I 3.5 μ l,37℃ 孵育 1 h。等体积酚:氯仿抽提 2 次。上清中加入等体积 7.5 mol/L NH₄Ac,2 份体积无水乙醇,在 -70℃ 放置至少 30 min。4℃,12 000 g/min 离心 15 min,弃上清,晾干。加入 100 μ l 1 mol/L NH₄Ac 和 2 倍体积冰冷无水乙醇,置于 -70℃,不少于 30 min。4℃,12 000 g/min 离心 15 min,弃上清,晾干。溶于 20 μ l DEPC 处理水。用紫外分光确定 5 种 cRNA 的含量。

1.2.3 竞争性定量 RT-PCR 参照文献^[6],先通过系列稀释的 cRNA 与固定的 1 μ g 总 RNA 混合,反转录 PCR,确定脑组织亚单位 mRNA 的大致含量。然后,用接近亚单位 mRNA 粗定含量的稀释 cRNA 再与 1 μ g 总 RNA 混合做 RT-PCR,通过标准曲线求亚单位 mRNA 的含量。cRNA-RNA 混合物的逆转录反应参照 MMLV 说明书。PCR 反应体积 100 μ l;cDNA,1 μ mol/L 特异引物,200 μ mol/L dNTPs,1.5 mmol/L MgCl₂,10 μ l 10 $\times$ buffer,20 mmol/L (NH₄)₂SO₄,2.5 U Taq DNA 聚合酶,1 μ Ci [³²P]dCTP,50 μ l 石蜡油。反应条件:变性,94℃,45 s;退火,72℃,1 min;延伸,72℃,15 min。扩增 25~30 个循环。之后 72℃ 终延伸 15 min。取 51 μ l PCR 产物,加入 30 U Bgl II,终体积 60 μ l,消化过夜。因 5 种体外合成的 cRNA 片段的中间部位均含有 Bgl II 酶切位点,因此可通过琼脂糖电泳将 mRNA 和 cRNA 的 PCR 产物分开。切下 2 种产物的条带,测放射记数。计算二者比值,当比值为 1 时,亚单位 mRNA 含量等于 cRNA 起始量。

1.3 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SSPS 统计软件处理数据。用 *t* 检验检测显著性差异。

2 结果

2.1 氟西洋的耐受性

大鼠用氟西洋 2 周后,10 mg/kg 的小剂量氟西洋对大鼠的抗惊厥效能与用药前相比明显下降,表明大鼠的惊厥阈下降,对氟西洋产生了耐受性。见表 1。

表 1 使用氟西洋 2 周后大鼠惊厥级别的变化

Table 1 Changes of seizure levels 2 weeks after treatment with flurazepam (n=5)

N	用药前	用药 2 周
1	I	II
2	I	II
3	I	II
4	I	V
5	I	IV

2.2 氟西洋的依赖性

停药 0 d,体重为(284 $\pm$ 33.7) g;停药 2 d 体重为(295 $\pm$ 36.9) g,差异无显著性($P>0.05$)。无流涎、烦躁等。用药前铃声诱发惊厥的潜伏期为(9.5 $\pm$ 2) s,用药后为(10.6 $\pm$ 3.1) s,差异无显著性($P>0.05$),提示未产生依赖性。停药后无流涎、烦躁等表现。

2.3 氟西洋耐受性的逆转

在合用 Ro15-4513 组大鼠,10 mg/kg 的小剂量氟西洋的抗惊厥效能未见下降,提示氟马西尼可有效逆转 P⁷⁷PMC 对氟西洋所产生的耐受性。见表 2。

表 2 氟西洋合用 Ro15-4513 的大鼠惊厥级别的变化

Table 2 Changes of seizure levels in rats after using flurazepam combined with Ro15-4513 (n=5)

N	用药前	用药 2 周
1	I	I
2	I	I
3	I	I
4	I	I
5	I	I

2.4 皮层运动区(FrPaM)及海马区 GABA_A 受体亚单位 mRNA 含量的变化

与对照组相比皮质运动区的 α_1 亚单位下降 24%, α_3 下降 17%, α_5 显著上升 33%, γ_{2L} 下降 35%, γ_{2S} 下降 45%,差异均有显著性($P<0.05$ 或 0.01)。与对照组相比,海马区的 α_1 下降 33%, γ_{2L} 下降 35%, γ_{2S} 下降 27%,差异均有显著性($P<$

0.05); α_5 无显著性改变。见表 3。氟西洋合用 Ro15-4513 组皮质运动区 GABA_A 受体 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 含量与对照组相比差异均无显

著性 ($P > 0.05$); 海马区 α_1 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 含量与对照组相比也同样差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 3 氟西洋耐受大鼠皮质运动区和海马区 GABA_A 受体亚单位 mRNA 含量的变化

Table 3 Changes of the mRNA content of GABA_A subunit in FrPaM and hippocampus of

rats tolerant to flurazepam (n = 5, $\bar{x} \pm s$)					
组别	α_1	α_3	α_5	γ_{2L}	γ_{2S}
皮质运动区					
对照组	104.2 ± 16.59	77.8 ± 10.03	36.2 ± 4.92	31 ± 7.24	28.8 ± 6.22
氟西洋组	79.4 ± 6.53 ^a	64.2 ± 8.29 ^a	48 ± 9.46 ^a	20.2 ± 4.21 ^a	15.8 ± 3.56 ^b
海马区					
对照组	40.2 ± 8.55	—	39.2 ± 8.87	31.8 ± 7.46	42.6 ± 7.89
氟西洋组	27 ± 7.45 ^a	—	40.2 ± 7.76	20.8 ± 6.22 ^a	31 ± 5.7 ^a

注: a 与对照组比 $P < 0.05$; b 与对照组比 $P < 0.01$

表 4 氟西洋耐受被 Ro15-4513 逆转大鼠皮质运动区和海马区 GABA_A 受体亚单位 mRNA 含量的变化

Table 4 Changes of the mRNA content of GABA_A subunit in FrPaM and hippocampus of

rats tolerant to flurazepam inverted by Ro15-4513 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)					
组别	α_1	α_3	α_5	γ_{2L}	γ_{2S}
皮质运动区					
对照组	104.4 ± 8.62	78.1 ± 6.89	37 ± 4.47	31.4 ± 4.62	29 ± 5.24
氟西洋组	89.8 ± 17.63	71.8 ± 9.52	43.4 ± 10.7	27.4 ± 5.59	26.6 ± 6.23
海马区					
对照组	40.6 ± 6.5	—	40 ± 6.52	32 ± 4.3	43 ± 6.2
氟西洋组	35.2 ± 8.17	—	44 ± 8.46	27.6 ± 6.19	37.6 ± 6.54

3 讨论

国外曾有众多实验采用地西洋、氯巴占、劳拉西洋和氟西洋等观察到苯二氮草产生耐受性时,可引起 GABA_A 受体亚单位 mRNA 含量的改变。但报道的结论存在很大差异,这可能与用药种类、给药途径和用药时间的不同有关。总的来说,大多数报道 α_1 亚单位在皮质和海马区下降,部分无改变。绝大部分报道 γ_2 亚单位也是下降的。对于 α_5 亚单位,一般都报道表达上升,个别报道无改变^[7-9]。本文选用北医大裴印权培育的听源性惊厥大鼠,慢性使用氟西洋 2 周,产生耐受性,显示皮质运动区 α_1 下降 24%, α_3 下降 17%, α_5 上升 33%, γ_{2L} 下降 35%, γ_{2S} 下降 45%; 海马区 α_1 下降 33%, γ_{2L} 下降 35%, γ_{2S} 下降 27%。这表明氟西洋耐受性的产生确与 GABA_A 亚单位的改变有关。

当研究 BZ 的耐受性时,应避免依赖性的产生。BZ 耐受性和依赖性联系紧密,可相伴产生,但显然有不同的发生机制。耐受性和依赖性的产生是剂量

依赖和时间依赖的。Rosenberg 在口服氟西洋 7 d 的大鼠耐受性模型未发现戒断症状^[10]。我们采用较小剂量氟西洋,在 P⁷⁷PMC 大鼠用药 14 d,亦未发现依赖性表现。

组成 GABA_A 受体的众多亚型在大脑皮质运动区和海马区的种类和数量最多。因此,我们选择海马和皮质运动区。现认为苯二氮草类的作用位点在 α 和 γ 亚单位上。组成 GABA_A 受体的亚单位虽多,但 $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ 约占全部 GABA_A 受体的 43%, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 和 $\alpha_3\beta\gamma_2/\gamma_3$ (以 $\alpha_3\beta\gamma_2$ 为主) 约占全部 GABA_A 受体的 35%, 另外,推测约 60% 的 GABA_A 受体含 γ_2 亚单位。体外药理实验证明 α_1 和 α_3 与 γ_2 组成受体的 BZ 促 GABA 作用远强于 α_2 、 α_5 和 α_6 与 γ_2 组成的受体,而 γ_2 的存在有利于 BZ 的正性调节作用^[11,12]。因此, α_1 、 α_3 和 γ_{2L} 、 γ_{2S} 的下降以及 α_5 的上升可能是机体的自我调适反应,并可能与氟西洋耐受性的发生机理有关。

本文仅检测了 GABA_A 受体亚单位转录水平的变化。GABA_A 受体的表达须受亚单位翻译后的调节及受体装配、运输及膜上插入的复杂影响,因此转

录水平的改变是否与活性受体的改变一致尚有待进一步研究。

我们通过本实验发现 GABA_A 受体部分反向激动剂 Ro15-4513 可完全逆转听源性惊厥大鼠对慢性使用氟西泮 2 周产生的耐受性。进一步检测大脑皮质运动区和海马区 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 亚单位 mRNA 含量的变化,发现所有检测的 GABA_A 受体亚单位 α_1 、 α_3 、 α_5 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 与对照组相比均无显著性变化。根据前述结果,氟西泮耐受组大鼠皮质运动区 GABA_A 受体亚单位 α_1 、 α_3 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 与对照组相比显著下降, α_5 显著上升,同时海马区 α_1 、 γ_{2L} 和 γ_{2S} 显著下降。现已知 BZ 作用位点在 α 和 γ 亚单位上,结合氟西泮耐受组结果,提示 Ro15-4513 逆转氟西泮耐受性的机理可能与对 α 和 γ_2 亚单位表达的影响有密切的关系。另一方面,该结果也进一步表明 GABA_A 受体 α_1 、 α_3 、 α_5 和 γ_2 在皮质运动区和海马区表达的改变在氟西泮的耐受性发生机制中的重要作用。

Ro15-4513 作为部分反向激动剂,本身具有负性内在活性,在无激动剂存在的情况下,即可产生抑制 GABA_A 受体氯离子通道的效应。时下流行的反向激动剂作用机理的理论认为,受体(R)存在激活状态(R*)和非激活状态(R)两种状态,二者处于动态平衡,激动剂使 R 向 R* 方向移动,而反向激动剂使 R* 向 R 方向移动。由于反向激动剂在其基础状态下使 R* 减少,从而表现出对效应器基础活性的抑制作用^[13]。

已有不少实验表明慢性使用部分反向激动剂可影响到 GABA_A 受体的结构和功能,大多数认为慢性使用部分反向激动剂可致 GABA_A 受体功能和 BZ 结合位点下调,甚至引起类似“化学点燃”的效应,即本无致惊厥效应的部分反向激动剂可独立诱发用药鼠产生惊厥。这种效应可持续至停药后 1 月^[14]。相反地,也有报道认为慢性使用部分反向激动剂引起 GABA_A 受体 BZ 结合位点及受体功能的上调。作者认为前者采用间断用药方式,而后者采用连续用药方式,因而可能是产生相悖结论的主要原因^[14]。从这也能看出部分反向激动剂慢性作用于 GABA_A 受体产生效应的易变性。慢性使用 Ro15-4513 对 GABA_A 受体的功能和数量的作用可被拮抗剂 Ro15-1788 阻断,说明 Ro15-4513 的这种效应是通过与 GABA_A 受体的作用而实现的。我们选用的是连续使用 Ro15-4513 7 d,可以肯定对 GABA_A 受体的功能和结构有直接影响。因为 BZ 耐受性的产生与 GABA_A 受体功能下降有关,而 α_1 、 α_3 、 α_5 和 γ_2

亚单位是众多亚单位中组成 GABA_A 受体的优势亚单位,对于 BZ 的药理效应举足轻重^[12],因此慢性使用 Ro15-4513 对 GABA_A 受体功能的向上调节作用可能通过抑制慢性使用氟西泮对 α 和 γ_2 亚单位及相应 GABA_A 受体功能的负性影响而起到逆转氟西泮耐受性的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Barnes EM. Use-dependent regulation of GABA_A receptors [J]. *Int Rev Neurobiol*, 1996, 39: 53-76.
- [2] Alexander S, Petes JA. GABA_A receptors, Trends in pharmacological sciences, receptor and ion channel nomenclature supplement. 1999, 35-37.
- [3] Ehlert HJ. "Inverse agonists" cooperativity and drug action at benzodiazepine receptors [J]. *TIPS*, 1986, 7: 28-32.
- [4] Pritchard GA, Galpern WR, Lumpkin M, Miller LG. Chronic benzodiazepine administration. VIII. Receptor upregulation produced by chronic exposure to the inverse agonist FG-7142 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 258(1): 280-285.
- [5] 王晓军,王丽,陶成. 氯硝西泮抗大鼠听源性惊厥耐受性的受体学基础 [J]. *中国药理学通报*, 1996, 12(3): 224-226.
- [6] Grayson DR, Bovolenta P, Santi MR. Absolute quantitation of γ -aminobutyric acid A receptor subunit messenger RNAs by competitive polymerase chain reaction [J]. *Method Neurisci*, 1993, 12: 191-208.
- [7] 郭文,王丽. 苯二氮草类受体的结构和功能与苯二氮草类耐受性和依赖性机制的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(2): 111-114.
- [8] Tietz EI, Huang X, Chen S, Ferencak WF 3rd. Temporal and regional regulation of α_1 , α_2 and β_3 , but not α_2 , α_4 , α_5 , α_6 , β_1 or γ_2 GABA_A receptor subunit messenger RNAs following one-week oral flurazepam administration [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(1): 327-341.
- [9] Barnes EM Jr. Use-dependent regulation of GABA_A receptors [J]. *Int Rev Neurobiol*, 1996, 39: 53-76.
- [10] Rosenberg HC. Differential expression of benzodiazepine anti-convulsant cross-tolerance according to time following flurazepam or diazepam treatment [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, 51(2/3): 363-368.
- [11] McKernan RM, Whiting PJ. Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? [J]. *Trends Neurosci*, 1996, 19(4): 139-143.
- [12] Costa E, Guidotti A. Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation [J]. *TIPS*, 1996, 17(5): 192-199.
- [13] Milligan G, Bond RA, Lee M. Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? [J]. *TIPS*, 1995, 16: 10-13.
- [14] Little HJ, Gale R, Sellars N, Nutt DJ, Taylor SC. Chronic benzodiazepine treatment increases the effects of the inverse agonist FG7142 [J]. *Pharmacology*, 1988, 27(4): 383-309.

(本文编辑:俞燕)