

樟柳碱及其它胆碱能药物对家兔海马 $\theta$ 节律条件反应的影响

韩怡凡\* 陈先瑜 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**提要** 正常家兔海马条件性 $\theta$ 节律呈先增后减的动态变化。训练前、后不同时间 iv 樟柳碱 0.25-1.0 mg/kg, 可阻抑兔的学习和记忆巩固等过程, 其巩固时程约短于 3 h, iv 东莨菪碱 0.1 mg/kg 能抑制记忆再现过程, 毒扁豆碱 0.1 mg/kg 和氧化震颤素 5  $\mu$ g/kg 均能促进学习过程, 槟榔碱 0.1 mg/kg 时未见明显易化学习效应。

**关键词** 樟柳碱; 胆碱能药物; 海马 $\theta$ 节律条件反应; 学习; 记忆巩固

近十余年来, 有关胆碱能药物及中枢胆碱能神经系统对学习记忆效能的影响, 已开展了动物和人体实验研究<sup>(1,2)</sup>。樟柳碱是从茄科植物唐古特山莨菪 [*Anisodus tanguticus* (Maxim) Pasch 或 *Scopolia tangutica* Maxim] 中分得的一种新的 M-抗胆碱药, 其中枢及外周 M-抗胆碱作用比东莨菪碱弱, 而比山莨菪碱强, 但毒性较以上二药都小。较大剂量樟柳碱可引起幻觉, 健忘并抑制大鼠<sup>(3)</sup>和兔<sup>(4)</sup>的条件反射 (CR) 活动。但关于该药对学习记忆不同过程的作用及其机制则迄无报道。本文研究樟柳碱等 5 种胆碱能药物对兔海马 $\theta$ 节律 CR 的学习记忆各过程的作用, 以探讨中枢胆碱能神经系统与学习记忆行为间的关系。

### 材料和方法

**材料** 氢溴酸樟柳碱, 氢溴酸东莨菪碱: 成都制药一厂出品; 水杨酸毒扁豆碱: 上海市化学试剂公司英国进口分装; 氢溴酸槟榔碱: E. Merck 药厂出品; 氧化震颤素: 美国洛杉矶加州大学医学院 D Jenden 教授赠送。各药均于实验前用生理盐水配制。兔 iv 容量 0.5 ml/kg,

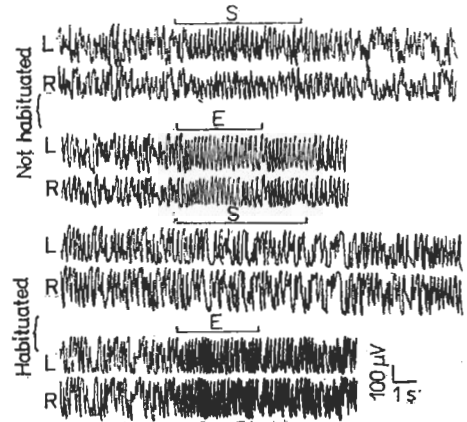


Fig 1. EEG of rabbits with chronically implanted electrodes in left (L) and right (R) dorsal hippocampus. S = sound stimuli; E = electrical stimuli;

实验用兔均由本院动物中心供应, 体重  $2.4 \pm$  (SD) 0.3 kg,  $\text{♀}$   $\text{♂}$  兼用。

**方法** 海马埋植电极手术时用戊巴比妥钠 (30 mg/kg, iv) 麻醉。按 Sawyer<sup>(5)</sup> 图谱在双侧海马背部各埋植 2 枚电极, 座标:  $P_4L(R)_4H_6$ ,  $P_4L(R)_5H_6$ 。术后休息 3-4 d 进行 CR 试验。

纯音-电 CR 试验系参考文献方法<sup>(6)</sup> 稍加改进。先进行纯音习惯化试验。用声-光刺激器 (ALVAR 牌) 提供 47 dB 250 Hz 纯音 (本底噪声 34 dB)。每兔每天进行 2-3 回试验, 每回持续 1.5-2 h, 每隔 1-1.5 min 给予 5-10 s 纯音刺激。同时用 12 导程墨水描记脑电图 (ALVAR 牌) 描记海马皮质脑电图。在清醒状态下, 兔海马自发脑电以不规则高幅慢波占优势, 频率 3-6 次/s, 振幅 50-250  $\mu$ V。给纯音刺激时, 在起初 3-5 回试验中均能引起规则整齐的 5-7 次/s 的 $\theta$ 节律, 振幅为 150-250  $\mu$ V。以后重复刺激可致习惯化 (即不再出现 $\theta$ 节律)。由 2-6 mA 直流电刺激右后肢 (4 s) 所诱发的海马 $\theta$ 节律振幅 (200-300  $\mu$ V), 频率 (6-8 次/s) 较高, 刺激停

1983年6月16日收稿 1983年8月18日修回

\* 1981年全国第二届心理学术年会上宣读

\* 现在上海医药工业研究院

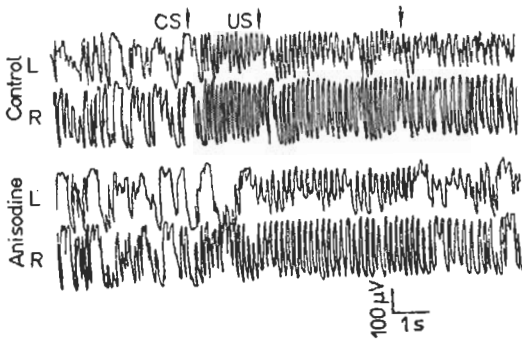


Fig 2. Effects of iv anisodine 1 mg/kg on conditioned response of the hippocampal  $\theta$ -rhythm in rabbits. CS = conditioned stimuli; US = unconditioned stimuli

止后效应可持续 2-5 s, 重复刺激无习惯化现象(图 1)。选择经 6-8 回试验, 最后 2 回时对纯音已完全习惯化的兔供 CR 试验用。

CR 试验时纯音刺激单独作用 6 s, 在第 2 s 末时加用电刺激强化 4 s。条件反应为海马规则整齐的 5-7 次/s 的  $\theta$  节律。每天实验一回, 每回条件与非条件刺激结合 24 次, 每次间隔约 1 min。每回实验的学习记忆成绩, 用以下二项指标表示: (1)  $\theta$  节律条件反应% (CR%); (2) 连续出现条件反应的最高次数 (no. of continuous conditioned responses, NCCR)。

Tab 1. Effects of iv anisodine (mg/kg) on conditioned response% (CR %) and numbers of continuous conditioned responses (NCCR) in rabbits ( $\bar{x} \pm SD$ )

	Group (n)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
CR%	Control (6)	29.8 ± 4.2	42 ± 13*	47 ± 19**	56 ± 18**	49 ± 17**	39 ± 12*	28.7 ± 2.5*
	0.25 (3)	28.1 ± 5.1 <sup>△</sup>	30.5 ± 6.2* <sup>△</sup>	33.7 ± 6.6* <sup>△</sup>	42 ± 14* <sup>△</sup>	28.9 ± 3.8 <sup>△△</sup>	22.5 ± 2.4* <sup>△</sup>	21.4 ± 0.9 <sup>△</sup>
	0.5 (3)	29.3 ± 1.2 <sup>△</sup>	18.7 ± 6.1 <sup>△△△</sup>	26.2 ± 2.4* <sup>△△</sup>	24.4 ± 8.0 <sup>△△</sup>	16.3 ± 3.3 <sup>△△△</sup>	16.4 ± 0.5 <sup>△△△</sup>	18.1 ± 5.0 <sup>△△</sup>
	1.0 (3)	27.1 ± 0.5 <sup>△</sup>	9.8 ± 6.9 <sup>△△△</sup>	6.8 ± 2.1 <sup>△△△</sup>	8.9 ± 2.3 <sup>△△△</sup>	10.7 ± 1.0 <sup>△△△</sup>	7.4 ± 2.3 <sup>△△△</sup>	7.3 ± 3.6 <sup>△△△</sup>
NCCR	Control (6)	2.5 ± 0.7	3.0 ± 1.2*	4.0 ± 2.0**	5.0 ± 2.7**	5.8 ± 3.2**	2.5 ± 0.5*	1.8 ± 0.7*
	0.25 (3)	2.0 ± 1.0 <sup>△</sup>	2.0 ± 1.0* <sup>△</sup>	2.7 ± 1.2* <sup>△</sup>	2.7 ± 1.2* <sup>△△</sup>	2.3 ± 0.5 <sup>△△</sup>	1.5 ± 0.9* <sup>△</sup>	1.5 ± 0.9* <sup>△</sup>
	0.5 (3)	2.3 ± 0.5 <sup>△</sup>	2.0 ± 1.0* <sup>△</sup>	1.8 ± 2.1* <sup>△△</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>△△</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>△△</sup>	1.0 ± 0.0* <sup>△</sup>	1.7 ± 0.5* <sup>△</sup>
	1.0 (3)	2.0 ± 0.0 <sup>△</sup>	1.3 ± 0.5* <sup>△</sup>	1.0 ± 0.0* <sup>△△</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>△△</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>△△</sup>	1.0 ± 0.0* <sup>△</sup>	1.0 ± 0.0* <sup>△</sup>

\*  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$  as compared to the 1st day of the same group;

<sup>△</sup>  $p > 0.05$ , <sup>△△</sup>  $p < 0.05$ , <sup>△△△</sup>  $p < 0.01$  as compared to control on the same day

本文选取 d 1 左背侧(因电刺激右后肢时, 左侧反应较明显)海马 CR%  $\geq 20\%$  的兔供正式 CR 实验用。所用各药剂量基本不干扰海马的自发、(纯音、电)诱发电活动及外观行为。实验完毕后, 随机抽取部分兔检查电极埋藏的位置。

## 结 果

### 正常兔海马 $\theta$ 节律 CR 的形成及其特点

兔 6 只, 在 d 2-7 实验日的训练前 10 min、训练后立即或 3 h 分别 iv 生理盐水 0.5 ml/kg, 6 兔结果合并统计作为对照组。结果可见, 在兔 CR 形成巩固过程中, 海马条件性  $\theta$  节律呈先增后减的动态变化。即在 d 1-4 内, 当 CR 结合达 10-20 次时, 纯音刺激开始在海马区引起有规则的  $\theta$  节律, 当 CR 结合达 50-60 次后, 纯音刺激已能频繁引起  $\theta$  节律; 此时  $\theta$  波的频率 6-8 次/s、振幅 150-300  $\mu$ V, 潜伏期 0-0.5 s, 持续时间 1.5-2.0 s(图 2), CR% 和 NCCR 成绩也不断提高; 但至 d 5 后, 纯音刺激不再能频繁地诱发  $\theta$  节律。 $\theta$  波的各项参数与 CR% 等成绩基本上重新降至 d 1-2 的水平。方差分析证明, 不同实验日间的 CR% 和 NCCR(表 1) 两项成绩各有明显差异。整个实验周期内, 兔

Tab 2. Effect of iv anisodine 1 mg/kg on learning and consolidation in rabbits ( $\bar{x} \pm SD$ )

	Group	(n)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
CR%	Control	(6)	29.8±4.2	42±13	47±19	56±18
	Before 10 min	(3)	10.3±1.7***	15.2±1.0***	13.0±1.9***	27.3±4.0***
	Immediate	(3)	27.1±1.7*	24.1±1.6**	26.8±3.3**	26.3±2.3***
	After 3 h	(4)	29.4±4.8*	48.7±4.8*	53.5±8.6*	55.5±2.6*
NCCR	Control	(6)	2.5±0.7	3.0±1.2	4.0±2.0	5.0±2.7
	Before 10 min	(3)	1.0±0.0*	1.7±1.2**	1.7±1.2***	2.0±0.9**
	Immediate	(3)	2.8±1.4*	1.8±0.5**	1.5±0.5***	2.3±0.9**
	After 3 h	(4)	2.3±0.6*	4.0±1.2*	6.0±1.2*	5.0±0.0*

\*  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$  as compared to control and the group of after 3 h; CR% = conditioned response %; NCCR = Number of continuous conditioned responses

海马区的自发脑电、非条件刺激的阈值及其所诱发的  $\theta$  节律均较稳定, 外观行为安静。

### 樟柳碱对兔海马 $\theta$ 节律 CR 的学习记忆的影响

1. 樟柳碱对学习过程的影响 1) 不同剂量连续给药 6 d 组、兔 12 只, 随机均分四组。各组在 d 2-7 的训练前 10 min 分别 iv 樟柳碱 0.25、0.5、1.0 mg/kg 或生理盐水 0.5 ml/kg。结果 0.5 和 1.0 mg/kg 两组条件刺激时  $\theta$  节律的频率(4-7 次/s)、振幅(60-200  $\mu V$ )降低, 潜伏期延长为 0.5-1.2 s。持续时间缩短至 0.8-1.2 s(图 2)。但剂量降为 0.25 mg/kg 时便与对照组无明显区别。0.25、0.5 和 1 mg/kg 三组的 CR% 依次降至 20-40, 16-26 和 6-10%; 同时, 对照与给药组间的 NCCR 也有显著差异(表 1)。上述表明, 樟柳碱可显著阻抑兔的学习过程, 且呈明显的量-效关系。2) 同一剂量连续给药 3 d 组, 兔 3 只, 经第 1 回 CR 试验(CR% 为  $27.4 \pm (SD) 2.8\%$ ), 合格后再进行 2-3 d 的纯音习惯化试验, 然后重新开始 CR 试验, 在其 d 1-3 的训练前 10 min iv 樟柳碱 1 mg/kg, d 4 停药, CR 实验连续进行 4 d。

实验结果见表 2。与对照组相比, 本组兔 CR 的各项学习记忆成绩明显下降。条件刺激时  $\theta$  节律的频率(5-7 次/s)、振幅(60-150  $\mu V$ )降低、潜伏期长达 0.8-1.0 s, 持续时间缩短为 0.8-1.2 s。d 1-3 时 CR% 仅存 10-15%, NCCR

降至 1.0-1.7 次。但 d 4 停药后各项指标立即恢复至其给药前水平。表明樟柳碱主要是特异性抑制了兔对本模式的学习过程。

2. 樟柳碱对记忆巩固过程的影响及巩固时程的测定 兔 10 只, 在 d 1-3, 给药组分别于训练结束后立即(n=4)或 3 h(n=3) iv 樟柳碱 1 mg/kg(简称立即或 3 h 给药组), 对照组则于训练后立即(n=2)或 3 h(n=1)给生理盐水, 各组均于 iv 后 24 h 进行下一回训练。d 4 停药。

结果如表 2 所示, 立即给药组兔的 CR 记忆过程显著阻抑, 其连续 4 d 的 CR% 等成绩始终徘徊在 d1 水平上, 与对照组相比有非常明显的差异。但 3 h 给药组的各项学习记忆成绩均和对照组相似, 而与立即给药相比有非常显著差异。上述结果表明, 兔学习结束后有一个记

Tab 3. Effects of iv 4 cholinergic drugs on learning and memory process in rabbits ( $\bar{x} \pm SD$ ); A and B, before and after drug

Drug	mg/kg (n)	Conditioned response %	No. of continuous conditioned response
Scopolamine	A 0.1 (3)	56.5±7.6	2.7±1.2
	B	12.5±6.2**	1.0±0.0*
Physostigmine	A 0.1 (3)	26.2±1.2	1.3±0.5
	B	72.1±8.8**	4.0±1.0***
Oxotremorine	A 0.005 (4)	23.3±3.4	1.5±0.6
	B	47.3±12.4**	3.8±1.2**
Arecoline	A 0.1 (4)	23.2±3.4	1.8±0.6
	B	30.7±10.8*	1.8±0.6*

\*  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$

忆巩固过程,其时程约短于3h;樟柳碱可抑制此巩固过程,连续3d给药几无后效应与蓄积作用。

### 其它胆碱能药物对兔海马 $\theta$ 节律CR学习记忆的影响

1. 东莨菪碱 选取第3或第4回CR训练前半回(每半回含12次测试)时CR% $\geq$ 50%的兔3只,iv东莨菪碱0.1mg/kg,给药后20min进行后半回训练,由表3结果可见,东莨菪碱能明显降低CR%和NCCR,抑制条件反应的再现过程。

2. 毒扁豆碱、氧化震颤素、槟榔碱 随机选取第1回CR训练前半回CR% $\geq$ 20%的兔11只,分别iv毒扁豆碱(0.1mg/kg,20min后,n=3)、氧化震颤素(5 $\mu$ g/kg,30min后,n=4)或御榔碱(0.1mg/kg,10min后,n=4),给药后间隔一定时间进行后半回训练。结果如表3所示,毒扁豆碱或氧化震颤素均可显著提高CR%和NCCR成绩,促进学习过程;但槟榔碱在此剂量时未见明显易化效应。

## 讨 论

$\theta$ 节律系海马激活时一种特殊型式的觉醒反应<sup>(7)</sup>。当猫作出正确分辨反应时,其背侧海马即呈规则的6次/s的优势频率,而错误反应时无此现象<sup>(8)</sup>;在兔CR初始阶段内海马条件性 $\theta$ 节律可逐渐升高,并能进行分化和消退<sup>(6)</sup>。本文除见到海马 $\theta$ 节律CR%会逐渐升高外,尚测得其学习后的记忆巩固时程约短于3h;如应用樟柳碱等阻滞其记忆获得或巩固过程,便能抑制CR%的递增。但本文及其它作者<sup>(6,8)</sup>均观察到,随着CR的持续进行,兔海马 $\theta$ 节律的CR%又转趋下降。已有的资料表明:切除双侧海马的病员可致严重的近期记忆丧失,但远期记忆不受影响;如于兔学习前或学习后数小时损毁海马,CR便难以建立和巩固,但学习后数天损毁即几无影响;学习初期海马RNA及且白质合成较其它脑区有明显增加<sup>(9)</sup>。随着CR的建立和巩固,条件性脑电反应普遍会发生动

态迁移现象<sup>(7,10)</sup>。综上似可认为:海马主要参与学习记忆的早期阶段,海马对声音条件刺激的 $\theta$ 波反应具有条件反应的性质,它伴随并能代表学习记忆的早期阶段;但随着学习记忆的重复和深入,海马的功用逐渐减退,因此其 $\theta$ 节律CR%也相应递减。

已知M-抗胆碱药可通过阻断膈区-海马通路而直接抑制 $\theta$ 节律,为此我们设计了一组樟柳碱连续给药3d的实验。结果表明,在给药的3d内,该药主要是特异性抑制了兔海马 $\theta$ 节律CR的学习过程。因为该药如系单纯阻滞 $\theta$ 节律的呈现,而并非干扰学习记忆过程本身,则给药组d4的学习记忆成绩应与对照组同一天者相近,而不致待d4停药后才刚开始正常学习。其次,采用了训练后给药、并待药物直接作用消失后再行测试的方法,从而能更有效地摒除药物直接抑制记忆再现过程或其它非特异性影响的干扰。此外,各实验均控制药量基本不影响兔的自发和诱发脑电及其外观行为。

本文表明,M-抗胆碱药樟柳和东莨菪碱可明显阻抑学习和记忆巩固等过程;拟胆碱药毒扁豆碱和氧化震颤素则可显著增进兔的学习记忆功能,槟榔碱在0.1mg/kg时未见明显易化学习效应,此或系剂量过低所致。综上及其它有关资料<sup>(1,2,11-13)</sup>可认为,中枢胆碱能神经系统的正常功能是学习记忆的必需条件,它可能主要是通过膈区-海马-边缘叶和大脑皮层两类M-通路而调节学习记忆过程的。

## 参 考 文 献

- 1 韩怡凡. 生理科学进展 1982; 13: 31
- 2 韩怡凡、陈先瑜. 同上 1983; 14: 216
- 3 中国医学科学院药物研究所药理室神经组. 中华医学杂志 1975; 55: 795
- 4 管林初、郭勤娥、邵道生. 心理学报 1982; 14: 239
- 5 Sawyer CH, Everett JW, Green JD. *J Comp Neurol* 1954; 101: 801
- 6 郭勤娥、匡培梓. 心理学报 1979; 11: 326
- 7 Green JD, Arduini AA. *J Neurophysiol* 1954; 17: 533
- 8 Bennett TL. *Electrophysiological correlates of*

- learning and performance. In: Bennett TL, ed. *Brain and behavior*. 1st ed. Monterey CA: Brooks/Cole, 1977: 212-6
- 9 Butters N, Cermak K. Some analyses of amnesic syndromes in brain-damaged patients. In: Isaacson RI, Pribram KH, eds. *The hippocampus*; vol 2, 1st ed. NY: Plenum Press, 1975: 377-409
- 10 Morrell F, Jasper HH. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1956; 8: 201
- 11 岳天立、王桂芬、宋振玉. 药学报 1979; 14: 208
- 12 Drachman DA, Sahakian BJ. Effects of cholinergic agents on human learning and memory. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ, eds. *Nutrition and the brain*; vol 5, 1st ed. NY: Raven Press, 1979; 351-66
- 13 韩怡凡、陈先瑜. 中国药理学报 1983; 4:220
- Acta Pharmacologica Sinica* 1984 Sep; 5 (3) : 166-170

## EFFECTS OF ANISODINE AND OTHER CHOLINERGIC DRUGS ON CONDITIONED RESPONSE OF THE HIPPOCAMPAL $\theta$ -RHYTHM IN RABBITS

HAN Yi-fan, CHEN Xian-yu

(*Inst Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** Anisodine is a muscarinic anticholinergic alkaloid isolated from *Anisodus tanguticus* (Maxim) Pascher or *Scopolia tangutica* (Maxim) in our institute. It is similar to scopolamine both in chemical structure and in pharmacological properties. In this paper effects of anisodine and 4 other cholinergic drugs on learning and memory were studied using conditioned response of the hippocampal  $\theta$ -rhythm in rabbits.

Anisodine (0.25-1.0 mg/kg) and scopolamine (0.1 mg/kg) impaired markedly the processes of acquisition, consolidation and retrieving of memory. The actions of anisodine on learning and memory appeared to be specific.

The time span for consolidation of memory was less than 3 h determined by the administration of anisodine shortly after training. There were no after-nor cumulative effects after anisodine iv 1.0 mg/kg, qd  $\times$  3 d. Physostigmine 0.1 mg/kg and oxotremorine 5  $\mu$ g/kg improved learning and memory behaviors significantly.

Our results convincingly support the view that normal function of the cholinergic system, especially the muscarinic system, is necessary for memory formation in the mammalian brain.

**KEY WORDS** anisodine; cholinergic agents; conditioning of hippocampal  $\theta$ -rhythm; learning; memory consolidation