

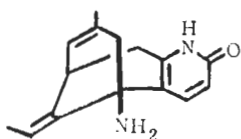
石杉碱甲对大鼠辨别学习和再现过程的影响

唐希灿、韩怡凡¹、陈小萍²、朱晓东 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用Y型迷宫箱测试, ip Hup 100-167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 能明显促进大鼠对明-暗分辨学习过程, ip 36-167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 对该反应的记忆再现有易化效应。毒扁豆碱也有上述增强作用。新斯的明未见易化效应。Hup 增强记忆再现的作用可分别为 sc 东莨菪碱、阿托品或 icv 密胆碱所拮抗, 但不受 sc 甲基溴化阿托品的影响。

关键词 石杉碱甲; 毒扁豆碱; 东莨菪碱; 阿托品; 密胆碱; 辨别学习; 记忆; 大鼠。

石杉碱甲(huperzine A, Hup)是从石杉科石杉属植物千层塔 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 中分离到的新生物碱⁽¹⁾。本实验室已证明, Hup 是一种强效、可逆胆碱酯酶抑制剂, 它对 AChE 的抑制作用比毒扁豆碱 (Phys) 等强, 而毒性则低于 Phys^(2,3)。近十余年来, 有关中枢胆碱能递质系统和抗胆碱酯酶药对学习、记忆的影响已日益引人关注⁽⁴⁾。本文研究 Hup 对大鼠明-暗分辨学习和记忆再现的促进效应, 并初步分析作用机理。



huperzine A

材 料 和 方 法

♂成年杂种大鼠由中科院上海分院动物饲养中心站供应。体重 $220 \pm \text{SD } 23 \text{ g}$, Hup 游离碱 (mp 230°C) 微黄色结晶性粉末, 由浙江医学研究院药物研究所提供, 以稀盐酸助溶配成

10 mg/ml 溶液, 置冰箱内备用, pH = 5; 柳酸 Phys 系英国进口, 上海化学试剂供应站分装; 氢溴酸东莨菪碱 (Scop) 由成都制药一厂生产; 甲基硫酸新斯的明 (Neos)、硫酸阿托品 (Atr) 及甲基溴化阿托品 (MA) 分别为上海信谊、天丰、第十一制药厂产品; 密胆碱系 Sigma 产品。以上各药均以生理盐水配制, ip 或 sc 容量约 1 ml/kg, 试验剂量不影响大鼠的自发活动, 运动协调及肌肉紧张度。

学习、记忆试验 三等分 Y 型迷路箱系本所自制。箱底铺设直径为 4 mm 的铜棒, 通以脉冲电 (脉冲刺激宽度为 120 ms, 脉冲周期 1.2 s, 20-28 V)。每臂顶端装有 15W 信号灯, 示安全区 (不通电), 安全区的方位按随机或两臂交替方式改变。大鼠受电击后从起步区直接逃至安全区为“正确反应”, 其余均属“错误反应”。大鼠学习和记忆成绩分别以其学习或测试时达到连续 5 或 10 次电击均为正确反应 (即 5/5 或 10/10) 前所需的电击次数 (又称尝试次数) 表示。实验在暗室内进行, 方法参照文献 (5,6) 稍加改进, 具体步骤如下:

1. 预选 室内明亮。将大鼠放入迷路箱内, 观察其自发活动 3 min, 然后给予电击至其三臂均探索进入止, 立即关闭闸门。选择自发活动活跃、对电击反应敏感并逃避迅速者供学习或记忆试验用。

2. 学习测验 大鼠在迷路箱内的一臂静置 3 min, 按两臂交替法给予灯光条件刺激 5 s, 继而施以电击至其逃避至安全区, 灯光继续作用 15 s, 然后熄灯休息 45 s, 接着给予第二次测验。依次重复训练至达 10/10 标准。若大鼠经 30 次训练仍未达此标准即停止试验。

3. 记忆的再现测验 按三臂随机法训练大鼠, 选取达到 5/5 标准前尝试次数为 5-20 次的大鼠, 休息 48 h 后, 再次同法测试至达

1986年1月30日收稿 1986年4月14日修回

¹上海医药工业研究院药理室

²上海师范大学生物系 81 届毕业生。现址: 中国科学院上海生物化学研究所

10/10 标准, 余同“学习”试验。

结 果

Hup, Phys 对学习过程的影响 正常大鼠 16 只, 学习测验前 20 min ip 生理盐水 1 ml/kg, 结果显示均在第一回 试验中学会明-暗分辨反应, 其达到 10/10 正确反应前所需的尝试次数为 13 ± 6 次; 但如果在学习前 20 min ip Hup 0.1, 0.167 mg/kg (约为 1/50-1/30 LD₅₀), 每剂量组 8 鼠, 则其所需尝试次数各降至 6.8 ± 2.8 和 3.0 ± 1.5 次, 与对照组相比 P 值均 < 0.01, 表明 Hup 能够明显增强大鼠的学习能力。在相同试验条件下, ip Phys 0.08, 0.12 mg/kg (约为 1/30-1/20 LD₅₀) 时具有相同效应, 学习成绩分别为 7 ± 3 和 3.0 ± 1.5 次, 与对照组相比均有非常显著差异。

Hup, Phys 及 Neos 对记忆再现的影响 大鼠经三臂随机法学习训练后, 休息 48 h, 按其达到 5/5 标准的学习成绩随机分为 8 组, 记忆测试前 20 min, 对照组 ip 生理盐水 1 ml/kg, 给药组分别 ip Hup 0.036, 0.06, 0.1 或 0.167 mg/kg 四种剂量。结果见表 1, 给药组达到 10/10 正确反应前的尝试次数较对照组均有明显改善, 其中 0.036, 0.06, 0.1 mg/kg 三剂量组间呈良好的量-效关系, 但当剂量增加至 0.167 mg/kg 时, 促进效应反趋减弱。ig Hup 0.3 mg/kg 也有明显促进记忆再现的效应。ip Phys 0.12, 0.15 和 0.18 mg/kg 剂量, 后两组大鼠的记忆再现也有显著增强。ip Neos 0.03 mg/kg, 测试成绩与对照组相比极为接近, 说明 Neos 不影响大鼠记忆的再现。

抗胆碱药物对 Hup 增强记忆再现的影响 学习合格大鼠 94 只, 随机分为 8 组: 生理盐水对照组、Hup 组、Scop 组、Atr 组和 MA 组以及此三药分别与 Hup 合用组。记忆测验前 20 min, 分别 ip 或 sc NS 或上述各药物。结果见表 2, sc Scop 0.2 mg/kg 组大鼠达到标准前的尝试次数由对照组的 14 ± 10 次增多到 27 ± 7 次, Scop 与 Hup 0.1 mg/kg 合用组为

Tab 1. Effects of anticholinesterase agents on the memory retrieval of a visual discrimination in rats. Drug was administered 20 min before test. ($\bar{x} \pm SD$)

Drug	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Rats	Trials to criterion	
			Training†	Test††
Saline	— ip	40	13 ± 4	14 ± 9
Huperzine A	36 ip	8	$11 \pm 4^*$	$7 \pm 7^{***}$
	60 ip	8	$12 \pm 5^*$	$4 \pm 4^{***}$
	100 ip	8	$10 \pm 4^*$	$2.5 \pm 1.4^{***}$
	167 ip	8	$10 \pm 4^*$	$5 \pm 5^{***}$
Physostigmine	120 ip	8	$13 \pm 4^*$	$13 \pm 2^*$
	150 ip	8	$9 \pm 4^*$	$6 \pm 4^{***}$
	180 ip	8	$11 \pm 6^*$	$3 \pm 3^{***}$
Neostigmine	30 ip	8	$14 \pm 4^*$	$17 \pm 7^*$
Saline	— ig	7	13 ± 6	15 ± 9
Huperzine A	300 ig	9	$12 \pm 4^*$	$6 \pm 4^{**}$

† Trials to criterion of 5 correct (run into safe area) out of 5 consecutive choices

†† Tested 48 h later after training. Trials to criterion of 10 correct out of 10 consecutive choices.

* $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ as compared with the saline control

21 ± 9 次, 而单用 Hup 组 仅需 3 ± 3 次尝试即达到标准。Scop 不仅能明显抑制大鼠对明-暗分辨反应的记忆再认过程, 尚可完全翻转 Hup 增强记忆再现过程, sc Atr 5 mg/kg 单用及其与 Hup 合用的结果亦与 Scop 相同。sc MA 2 mg/kg 组的记忆成绩和对照组相比颇为接近, MA 与 Hup 合用组的成绩与 Hup 单用组几无差别。说明 MA 对大鼠再现过程几无影响, 而且也无拮抗 Hup 易化记忆再现过程的作用。

密胆碱对 Hup 增强再现过程的影响 大鼠以乙醚麻醉, 切开头皮, 在 P₂R₂ 处用 6 号针头在颅骨上预先打洞定位, 休息 2 d 以上进行预选和学习。选取学习合格大鼠 30 只, 随机分为 4 组。记忆测验前 30 min icv, 10 min 后 ip, (1) 组 icv 和 ip 生理盐水; (2) 组 icv 生理盐水 + ip Hup; (3) 组 icv 密胆碱 + ip 生理盐水; (4) 组 icv 密胆碱 + ip Hup。icv 时用 10 μl 微量注射器插入深 3.5 mm, 于 1 min 内匀速注入 10 μl 并留针 1 min。结果见表 3, 对照

Tab 2. Effects of scopolamine (Scop), atropine (Atr) and methylatropine bromide (MA) on huperzine A (Hup)-induced facilitation of memory retrieval of a visual discrimination. ($\bar{x} \pm SD$)

Drug ip + sc	Dose (mg/kg)	Rats	Trials to criterion	
			Training†	Test††
NS + NS	1 ml + 1 ml	30	14 ± 4	14 ± 10
Hup + NS	0.1 + 1 ml	16	11 ± 4*	3 ± 3***
NS + Scop	1 ml + 0.2	8	13 ± 4*	27 ± 7***
Hup + Scop	0.1 + 0.2	8	12 ± 3*	21 ± 9***
NS + Atr	1 ml + 5	8	12 ± 5*	26 ± 12***
Hup + Atr	0.1 + 5	8	11 ± 5*	24 ± 11***
NS + MA	1 ml + 2	8	12 ± 3*	12 ± 5*
Hup + MA	0.1 + 2	8	11 ± 5*	4 ± 4***

Drugs were injected 20 min before test. †, †† to see Tab 1. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ as compared with NS (saline) + NS group

组和 Hup 两组达到标准前各需学习 14 ± 7 和 6 ± 5 次, 与前述非 icv 各组记忆成绩相比基本一致, 说明 icv 本身并不干扰大鼠记忆再现过程。icv 密胆碱 $20 \mu\text{g}$ 后则严重损害大鼠的再现过程, 达到标准前需学习次数高达 26 ± 6 次; 当与 Hup 合用, 可完全取消后者的增强记忆再现的作用, 重学次数由单用 Hup 时的 6 ± 5 次增高至 26 ± 6 次。

讨 论

中枢 M-胆碱能递质系统与学习、记忆功能密切相关。抗胆碱药对学习、记忆过程有阻

抑作用; 拟胆碱药, 胆碱酯酶抑制剂则有促进作用⁽⁴⁾。Hup 对 AChE 有选择性抑制作用, 且强于毒扁豆碱⁽²⁾。本文结果表明 Hup 在 $1/138$ 的 LD_{50} 剂量就能够促进大鼠对明-暗分辨反应的记忆过程, 而毒扁豆碱需用到 $1/16$ 的 LD_{50} 剂量才有效, 故 Hup 的作用明显优于毒扁豆碱。氚标记 Hup 追踪研究表明, 给药后 15 min 脑内即有分布(待发表资料), 与 Hup 在给药后 20 min 即能显示促进记忆再现的作用是相一致的。Hup 促进学习、记忆再现可被抗胆碱药 Scop, Atr 或 icv 脑内 ACh 合成抑制药密胆碱逆转, 而作用于外周的 MA 则对 Hup 的作用无影响。这些结果表明, Hup 促进学习、记忆再现主要是通过通过对脑内 AChE 的抑制, 使 ACh 含量升高, 达到激活脑内胆碱能递质系统的功能有关。

作者之一曾证实密胆碱能损害小鼠空间辨别的巩固过程⁽⁷⁾。也有报道在大鼠迷宫试验中, 未观察到有任何影响⁽⁸⁾, 与本文结果不一致, 由于未见该报道的研究结果, 很难对此进行分析。我们在预初试验中曾观察到训练前不同时间给药, 密胆碱的损害影响明显不一致, 推想不同的测试方法和程序或许是结果不一致的原因之一。

本工作观察到随剂量的增大, Hup 增强记忆再现的作用反而有所下降, 此与文献(9)报道 Phys 的作用性质相近似。Deutsch 的“记忆胆碱能突触假说”认为, 此系大剂量 AChE 抑制剂引起 ACh 过度堆积而使突触后膜发生去极

Tab 3. Reversal effect of hemicholinium (HC-3) on huperzine A (Hup)-induced facilitation of memory retrieval of a visual discrimination. ($\bar{x} \pm SD$)

Drug icv + ip	Dose (μg + mg/kg)	Rats	Trials to criterion	
			Training†	Test††
NS + NS	$10 \mu\text{l} + 1 \text{ ml}$	6	11 ± 4	14 ± 7
NS + Hup	$10 \mu\text{l} + 0.1$	8	10 ± 4*	6 ± 5***
HC-3 + NS	20 + 1 ml	8	11 ± 5*	26 ± 6***
HC-3 + Hup	20 + 0.1	8	11 ± 4*	26 ± 6***

HC-3 was injected 30 min before test, a dose of Hup was administered 10 min after HC-3. †, †† to see Tab 1. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$ as compared with NS + NS control

化阻滞所致⁽¹⁰⁾。Drachman 关于胆碱能系统中信息贮存、再现机制的“信号检测假说”认为,只有当信号与噪声强度之比达到较大值时,信息的贮存和再现才进入较佳状态,而过量拟胆碱药可降低信噪比值,故导致学习、记忆功能减退⁽¹¹⁾。

正常老年人及早老性痴呆 (Alzheimer's senile dementia)、慢性遗传性舞蹈病痴呆 (Huntington's disease) 患者脑内 (尤指大脑皮层和隔区-海马回路)胆碱乙酰化酶下降、AChE 活力增高和 ACh 受体活性减低⁽¹²⁾。iv Phys 0.125-1 mg/kg 可特异性增进正常人⁽¹³⁾及早老性痴呆患者⁽¹⁴⁾的记忆能力,缺点是副反应严重,作用短暂。本文结果表明 Hup 增强记忆再现作用优于 Phys, 而 Hup 的毒性低于后者 (本实验室未发表资料)。因此,作者曾推荐用于治疗脑动脉硬化症患者的记忆障碍、100 例治疗结果显示,im Hup 30-50 μg 对短、长时记忆功能均获明显改善,未见任何毒副反应⁽¹⁵⁾。提示 Hup 有可能用于治疗老年性记忆障碍。

致谢 俞超美同志提供精制石杉碱甲,陈先瑜副研究员赠送密胆碱,史丽雅同志参加部分技术工作。

参 考 文 献

- 1 Liu JS, Yu CM, Zhou YZ, *et al.* The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can J Chem* 1986; 64 : 837
- 2 王月娥、岳冬贤、唐希灿, 石杉碱甲的抗胆碱酯酶作用. *中国药理学报* 1986; 7 : 110
- 3 张守圭, 石杉碱甲通过鉴定. *新药与临床* 1985; 4 : 235
- 4 韩怡凡、陈先瑜. 中枢胆碱能递质系统与学习记忆关系的研究. *生理科学进展* 1983; 14 : 216
- 5 Burešová O, Bureš J. Discrimination learning. In: Bureš J, Burešová O, Huston J, eds.

Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1976 : 145-61

- 6 Stanes MD, Brown CP, Singer G. Effects of physostigmine on Y-maze discrimination retention in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 1976; 46 : 269
- 7 韩怡凡、陈先瑜. 樟柳碱及其它胆碱能药物对小鼠空间分辨学习和记忆的影响. *中国药理学报* 1983; 4 : 220
- 8 Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *The biochemical basis of neuropharmacology.* 4th ed. Oxford: Oxford Univ Press, 1982 : 102
- 9 Berger PA, Davis KL, Hollister LE. Cholinomimetics in mania, schizophrenia and memory disorders. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ, eds. *Choline and lecithin in brain disorders.* 1st ed. NY: Raven, 1979 : 425-41
- 10 Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. In: Deutsch JA, ed. *The physiological basis of memory.* 2nd ed. NY: Academic Press, 1983 : 365-86
- 11 Drachman DA, Sahakian BJ. Effects of cholinergic agents on human learning and memory. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ, eds. *Choline and lecithin in the brain disorders.* 1st ed. NY: Raven, 1979 : 351-66
- 12 Leathwood PD, Mauron J. Lecithin and senile memory loss in animals. In: Wertheimer J, Marois M, eds. *Senile dementia : outlook for the future.* 1st ed. NY: Alan R Liss, 1984 : 9-19
- 13 Davis K, Mons R, Tinklenberg J, Pfefferbaum A, Hollister L, Kopell B. Physostigmine : improvement of long-term memory processes in normal humans. *Science* 1978; 201 : 272
- 14 Davis KL, Mohs RC, Davis BM, Rosenberg GS, Horvath TH, DeNigris Y. Cholinergic agents and human memory: preliminary observation in alzheimer's disease. In: Papeu G, Ladinsky H, eds. *Cholinergic mechanisms.* 1st ed. NY: Plenum, 1981: 929-36
- 15 张慈祿. 石杉碱甲治疗老年人记忆功能减退的临床观察. *新药与临床* 1986; 5 : 260

Effects of huperzine A on learning and retrieval process of discrimination performance in rats

TANG Xi-can, HAN Yi-fan, CHEN Xiao-ping, ZHU Xiao-dong

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Huperzine A (Hup), a new alkaloid isolated from *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.⁽¹⁾, has powerful and reversible anticholinesterase activity⁽²⁾.

Rats were placed on an electrified grid in a Y-maze and learned to run into the light arm (safe area). The criterion of learning or retrieval was met after they had chosen the light arm 10 trials in succession. Hup injected intraperitoneally with 100, 167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 20 min before training caused a significant decrease in the number of trials to criterion. Facilitation of retrieval was also produced dose-dependently at doses of 36-167 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ip. Scopolamine 0.2 mg/kg sc, atropine 5 mg/kg sc or hemicholinium 20 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ icv antagonized the positive effects of Hup 0.1 mg/kg on retrieval process, but methyl-atropine (2 mg/kg sc) did not. Under the same conditions, physostigmine at doses of 80-180

$\mu\text{g}/\text{kg}$ ip improved learning and retrieval processes, but quaternary cholinesterase inhibitor neostigmine (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ip) did not.

Our results suggested that the facilitation actions of Hup were due to an effect on the central cholinergic system, especially the muscarinic system, since M-receptor blockers reversed the actions of Hup, but their quaternary nitrogen derivative methyl-atropine, which did not pass the blood-brain barrier, was inactive.

Besides, the preliminary clinical studies showed that Hup, the first nootropic compound in China, did improve short-term and long-term memory in patients of cerebral arteriosclerosis with memory impairment⁽¹⁵⁾.

KEY WORDS huperzine A; physostigmine; scopolamine; atropine; hemicholinium 3; discrimination learning; memory; rats