

脑室注射 6-羟基多巴胺对小鼠被动回避性反应和脑内乙酰胆碱及 M 受体的影响

潘思源 (北京中医学院药理教研室, 北京 100029, 中国)

Influences of intraventricular injection of 6-hydroxydopamine on passive-avoidance response, acetylcholine, and muscarinic receptors in mouse brain

PAN Si-Yuan (Department of Pharmacology, Beijing College of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT In step-through and step-down tasks, icv 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 20 μg on d 14 before training impaired the learning and memory processes in mice. But the amnesic effects in mice received icv 6-OHDA were overcome by ip scopolamine (Scop) 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 15 min before trial. When mice were pretreated with icv 6-OHDA the content of acetylcholine (ACh) in the brain showed no change, whereas the ACh-depleting action of Scop (2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was diminished. [^3H]Quinuclidinyl benzilate binding assay indicated that the brain muscarinic receptor density (B_{max}) and K_d in the mice after icv 6-OHDA were respectively decreased 48% and 57% as compared to the icv sterile water group. These findings suggested a possible participation of brain cholinergic nervous system in memory impairment induced by icv 6-OHDA in mice.

KEY WORDS 6-hydroxydopamine; quinuclidinyl benzilate; scopolamine; avoidance learning; memory; brain; acetylcholine; muscarinic receptors

摘要 用避暗法, 跳台法和放射性核素法研究发现, icv 6-羟基多巴胺(6-OHDA, 20 μg)后 d 14, 能抑制小鼠的被动回避性反应, 此作用可为东莨菪碱(Scop) 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 所拮抗。能减弱 Scop 对脑内乙酰胆碱含量下降的作用, 并使小鼠脑内 M 受体数减少 48%, 而亲和力增加 57%。本结果表明, icv 6-OHDA 对小鼠学习记忆的伤害作用, 可能与其脑内胆碱能神经有关。

关键词 6-羟基多巴胺; 二苯羟乙酸奎宁酯; 东莨菪碱; 回避学习; 记忆; 脑; 乙酰胆碱; 毒蕈碱受体

Received 1990 Sep 10

Accepted 1991 Apr 15

某些由中枢儿茶酚胺神经元功能亢进或减弱所引起的精神情感障碍和疾病, 往往伴有脑内胆碱能神经活动的改变⁽¹⁾。文献报道, 当脑内儿茶酚胺递质耗竭后, 脑干部位的胆碱乙酰化酶活性增加⁽²⁾, 并加强抗胆碱药物对动物行为活动的影响^(3,4)。在迷宫实验中增敏东莨菪碱(scopolamine, Scop)的致记忆缺损作用⁽⁵⁾。但在避暗法中却能延长小剂量 Scop 组小鼠测验期的潜伏期⁽⁶⁾。本文用 icv 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)毁损脑内儿茶酚胺神经末梢的方法, 以观察其对小鼠学习记忆及脑内胆碱能神经功能的影响。

MATERIALS AND METHODS

小鼠 昆明种, δ , 体重 $13 \pm \text{SD } 1.7 \text{ g}$ 。购于北京中医研究院动物房。用乙醚麻醉, 剪开头部皮肤, 取 AP-0.4, ML+1.5, DV-2.2⁽⁷⁾。于侧脑室注射 6-OHDA, 对照组注入 20 μl 注射用水。

药品 6-OHDA, Fluka 产品。Scop, Merck 产品。 [^3H]二苯羟乙酸奎宁酯 ([^3H]quinuclidinyl benzilate, [^3H]QNB) 251.4 $\text{TBq} \cdot \text{mol}^{-1}$, Amersham UK 产品。去甲肾上腺素(norepinephrine, NE), Serva 产品。多巴胺(dopamine, DA), Sigma 产品。5-羟色胺(serotonin, 5-HT), Sigma 产品。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh), [^3H]ACh, ACh 抗血清, 均由军事医学科学院供给。

孔径 0.45 μm 的混合纤维素微孔滤膜, 49 型玻璃纤维纸, 上海虹光纸厂生产。

被动回避性反应实验⁽⁸⁾ 采用避暗法(step-through)和跳台法(step-down)。避暗法记录小鼠训练期和 24 h 后测验期的错误潜伏

期, 及测验期的错误数. 跳台法训练期让小鼠适应 3 min, 然后通电 36 V, 5 min, 并记录 5 min 内的触电次数. 24 h 后测 5 min 内所出现的错误数.

ACh 放射免疫测定⁽⁹⁾ 小鼠断头取脑, 用冷 HClO₄ 0.1 mol · L⁻¹ 匀浆, 离心. ACh 抗血清用磷酸缓冲液 50 mmol · L⁻¹, pH 7.4, 1 : 500 稀释. [³H]ACh 用 HCl 0.01 mol · L⁻¹ 稀释. 样品测定管中含有稀释的 ACh 抗血清 500 μl, 脑组织上清液 10 μl 及稀释的 [³H]ACh 10 μl. 标准管在稀释的 ACh 抗血清 500 μl 中分别加入 ACh 160, 40, 10, 2.5 pmol · L⁻¹. 混匀后置 4℃ 12-16 h 后用混合纤维素微孔滤膜真空抽滤, 80℃ 烘干. 放入 0.5% 甲苯 PPO 闪烁液内, 用 Beckman 5801 液闪计数器测放射性.

脑组织中 ACh 含量的计算 计算公式如下:

$$B / B_0(\%) = (B - N) \cdot (B_0 - N)^{-1} \times 100$$

$$\hat{Y} = \text{logit } B / B_0(\%)$$

$$= \ln((B / B_0\%) \cdot (100 - B / B_0\%)^{-1});$$

$$X = \lg 10x$$

B 和 B₀ 为各标准管或样品管和零标准管的 dpm 数, N 为无抗 ACh 血清管读数. x 为加入的标准 ACh 数或样品管中的 ACh 量, 用直线回归处理求出 ACh pmol · (mg 脑)⁻¹.

M 胆碱受体的制备 小鼠脑用冷蔗糖 0.32 mol · L⁻¹ 1 : 20 (wt / vol) 匀浆. 4℃ 2 000 × g 离心 10 min. 取上清液 4℃ 40 000 × g 离心 10 min. 沉淀再用 Tris-HCl 50 mmol · L⁻¹, pH 7.4 缓冲液洗涤, 40 000 × g 离心 10 min. 最后沉淀加入 Tris 缓冲液, 置 -20℃ 备用. 膜制备中蛋白的含量用比色法⁽¹⁰⁾测定.

M 胆碱受体结合实验 总反应管中加入 [³H]QNB 0.03-4.0 nmol · L⁻¹. 非特异管中除加入相同浓度的 [³H]QNB 外, 另含有阿托品

0.5 μmol · L⁻¹. 反应液为 Na-K 磷酸缓冲液 50 mmol · L⁻¹, pH 7.4. 总反应管和非特异管都加入上述制备的膜蛋白 100 μg. 终容量 200 μl. 混匀后 37℃ 水浴 30 min. 然后用冷缓冲液中止反应. 49 型滤纸过滤, 80℃ 烘干. 置甲苯 PPO 闪烁液中测定放射性强度. 结果用总反应管的 dpm 数减去非特异管的 dpm 数. 求出 [³H]QNB 对 M 胆碱受体的特异性结合. 并用 Scatchard 作图法, 求出 M 受体的最大结合数 B_{max} 及其平衡解离常数 K_d 值.

RESULTS

对学习记忆的影响 小鼠分别 icv 6-OHDA 20, 10, 5 μg 及水. d 14 进行避暗实验. 结果发现, 训练期各组小鼠的潜伏期没有显著差异. 但在测验期, 6-OHDA 组小鼠的潜伏期缩短, 错误数增加. 其中 20 μg 组与对照组相差显著 (Tab 1).

Tab 1. Effects of icv 6-OHDA on mouse learning and memory processes in step-through. The experiment was performed on d 14 after icv 6-OHDA and sterile water. n = 13, $\bar{x} \pm \text{SD}$. *P > 0.05, **P < 0.05, ***P < 0.01 vs sterile water (control).

Group	Dose μg	Latencies (s)		Retention Memory errors
		Training	Retention	
Control	-	17 ± 11	274 ± 48	0.3 ± 0.5
6-OHDA	20	17 ± 9	166 ± 120***	1.1 ± 1.0**
6-OHDA	10	18 ± 8	216 ± 104*	0.6 ± 0.4*
6-OHDA	5	23 ± 12	245 ± 95*	0.4 ± 0.5*

对记忆再现或保留的影响 选择在测验期潜伏期 > 300 s 的小鼠. d 3 icv 6-OHDA 20 μg. 间隔 14 d 进行重测验, 观察此次的潜伏期. 结果对照组和 6-OHDA 组的潜伏期分别为 255 ± 89, 202 ± 122 (P > 0.05).

对 Scop 引起记忆障碍的影响 小鼠 icv 6-OHDA 后 d 14. 在进行被动回避性反应实验的训练期前 15 min, ip Scop. 记录训练期

Tab 2. Effects of icv 6-OHDA 20 μg on ip Scop-induced amnesia in mice that received 6-OHDA or sterile water d 14 before training test in step-through and step-down. $n=10$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs Control. + $P > 0.05$, ++ $P < 0.05$ vs Scop. Scop ip 15 min before training.**

Group	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Latencies to step-through (s)		Errors to step-down	
		Training	Retention	Training	Retention
Control	-	19 \pm 10	273 \pm 51	4.0 \pm 1.6	0.3 \pm 0.4
Scop	0.5	28 \pm 15*	107 \pm 74***	11 \pm 5***	2.5 \pm 1.1***
Scop	2	23 \pm 14*	115 \pm 79***	12 \pm 5***	4 \pm 4***
6-OHDA	-	20 \pm 8*	176 \pm 96*	4.0 \pm 1.9*	3 \pm 3***
6-OHDA + Scop	0.5	22 \pm 18**	217 \pm 87***	6 \pm 4**	0.9 \pm 1.2***
6-OHDA + Scop	2	21 \pm 10**	87 \pm 68****	12.0 \pm 2.8****	1.8 \pm 0.8****

和测验期避暗法的潜伏期，及跳台法中的错误数。结果显示，Scop 0.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 完全消除 icv 6-OHDA 对小鼠被动回避性反应的抑制作用，而 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 则无对抗作用(Tab 2)。

对 Scop 引起脑内 ACh 含量下降的影响

小鼠在接受 icv 6-OHDA 后 d 14，在取脑测 ACh 前 30 min 各组小鼠分别 ip 不同剂量的 Scop 或生理盐水。结果表明，icv 6-OHDA 对正常小鼠脑中 ACh 含量没有影响，但减弱 Scop 引起脑内 ACh 浓度下降的作用(Tab 3)。

对脑内 M 胆碱受体的影响

在进行脑 M 受体测定前 d 14，小鼠 icv 6-OHDA，通过

Tab 3. Effects of icv 6-OHDA 20 μg on normal ACh content and ip Scop-induced ACh depletion of brain in mice given icv 6-OHDA or sterile water (control) on d 14 before experiment. $n=10$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, * $P < 0.01$ vs control. + $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ vs Scop. Scop ip 30 min before test.**

Group	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Acetylcholine ($\text{pmol} \cdot (\text{mg brain})^{-1}$)
Control	-	11.5 \pm 2.0
6-OHDA	-	11.8 \pm 2.7*
Scop	0.5	7.6 \pm 1.6***
Scop	2	5.7 \pm 1.2***
6-OHDA + Scop	0.5	8.5 \pm 1.8****
6-OHDA + Scop	2	7.5 \pm 1.7****

受体结合实验及 Scatchard 作图发现。icv 6-OHDA 组小鼠脑内 M 受体密度比对照组减少 48%， K_d 值下降 57% (Tab 4)。

Tab 4. Effects of icv 6-OHDA on muscarinic receptors in mouse brain. 6-OHDA and sterile water (control) were injected icv on d 14 before test. $n=7$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P < 0.01$ vs control.**

Group	Dose μg	Muscarinic receptors	
		B_{max} ($\text{fmol} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$)	K_d ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	-	718 \pm 11	1.02 \pm 0.12
6-OHDA	20	374 \pm 19***	0.44 \pm 0.11***

对脑内单胺类神经递质的影响

icv 6-OHDA 后 d 14，用荧光分光光度法测定小鼠脑内单胺类神经递质的含量。其中以 NE 含量下降最明显(62%)，DA 下降 38%，而 5-HT 的含量则无影响(Tab 5)。

Tab 5. Effects of icv 6-OHDA on brain monoamine neurotransmitters in mice that received 6-OHDA or sterile water (control) on d 14 after icv. $n=9$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P < 0.01$ vs control.**

Group	Dose μg	NE ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	DA ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	5-HT ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)
Control	-	539 \pm 147	500 \pm 151	967 \pm 145
6-OHDA	20	204 \pm 65***	310 \pm 121***	952 \pm 109

DISCUSSION

选择性毁损脑内儿茶酚胺神经,对动物学习记忆的影响,文献报道不一⁽¹¹⁻¹⁴⁾。这可能与实验方法,动物月龄及递质耗竭的程度等因素有关。本文选用幼年小鼠,icv 6-OHDA能抑制其被动回避性反应,但对记忆的保留或再现无障碍作用。这说明脑内 NE 和 DA 神经主要参与记忆的获得或巩固过程。

Scop 通过阻断突触后膜的 M 受体而损伤记忆的获得过程。通过阻断突触前膜的 M 受体,使 ACh 释放增加,脑中含量减少。本实验发现,经过 icv 6-OHDA 处理的小鼠,Scop 的记忆障碍作用和降低脑中 ACh 的作用均减弱。这显示脑内儿茶酚胺神经末梢受损后,中枢的胆碱能神经突触前和突触后机能,均有一定的增强。从而部分的拮抗了 Scop 的中枢作用。或 Scop 的中枢作用可能与儿茶酚胺神经递质有关。或脑内的胆碱能神经可能参与 icv 6-OHDA 对小鼠被动回避性反应的抑制作用。

ACKNOWLEDGMENTS 孙建宁、单少杰参加单胺类神经递质的测定

REFERENCES

- 1 Davis KL, Berger PA, Hollister LE, Barchas JD. Minireview: Cholinergic involvement in mental disorders. *Life Sci* 1978; 22: 1865
- 2 Jaim-Etchevery G, Teitelman G, Zieher LM. Choline acetyltransferase activity increases in the brain stem of rats treated at birth with 6-hydroxydopa. *Brain Res* 1975; 100: 699
- 3 Mason ST, Fibiger HC. Interaction between noradrenergic and cholinergic systems in the rat brain; behavioural function in locomotor activity. *Neuroscience* 1979; 4: 517
- 4 Mason ST. Central noradrenergic-cholinergic interaction and locomotor behavior. *Eur J Pharmacol* 1979; 56: 131
- 5 Decker MW, Gallagher M. Scopolamine-disruption of radial arm maze performance: modification by noradrenergic depletion. *Brain Res* 1987; 417: 59
- 6 Decker MW, McGaugh JL. Effects of concurrent manipulations of cholinergic and noradrenergic function on learning and retention in mice. *Brain Res* 1989; 477: 29
- 7 Zhang YP, Zhang SY, Zhang ML, Huang XY. Study on the memory enhancement by central administration of (Arg⁸) vasopressin. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1990; 4: 1
- 8 Zhang JT, Saito H. Studies on susceptibilities to the amnesic effects of 12 chemicals on passive avoidance responses in mice: comparison between step down and step through tests. *Acta Pharm Sin* 1986; 21: 12
- 9 Bao ZQ, Ling SG, Liu FM, Wang GY, Li L. Radioimmunoassay for acetylcholine. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3: 166
- 10 Lowry OH, Roseborough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
- 11 Cornwell-Jones CA, Decker MW, Chang JW, et al. Neonatal 6-hydroxydopa, but not DSP-4, elevates brainstem monoamines and impairs inhibitory avoidance learning in developing rats. *Brain Res* 1989; 493: 258
- 12 Cole M, Robbins T. Dissociable effects of lesions to the dorsal or ventral noradrenergic bundle on the acquisition, performance, and extinction of aversive conditioning. *Behav Neurosci* 1987; 101: 476
- 13 Cornwell-Jones CA, Velasquez P, Wright EL, McGaugh JL. Early experience influences adult retention of aversively motivated tasks in normal, but not DSP4-treated rats. *Dev Psychobiol* 1988; 21: 177
- 14 Archer T, Jonsson G, Ross SB. Active and passive avoidance following the administration of systemic DSP4, xylamine, or *p*-chloroamphetamine. *Behav Neural Biol* 1985; 43: 238