

## 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\*

韩怡凡\*\* 陈先瑜 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**提要** 正常小鼠 80% 以上经一回训练便可学会空间分辨反应; 训练前 ip 樟柳碱 5 mg/kg 则能干扰学习过程; 如 ip 槟榔碱 0.25-10 mg/kg, 则小剂量时促进学习过程, 而大剂量时相反; 如将两药合用便能交互拮抗。小鼠训练后不同时间 ip 樟柳碱 1-5 mg/kg, 可明显破坏其记忆巩固过程, 其巩固时程约短于 3 h。M<sub>1</sub> 或 M<sub>2</sub> 测验前 ip 樟柳碱 5 mg/kg, 仅削弱较不巩固记忆的再认, 而不影响较巩固的记忆。训练后 icv 密胆碱 0.4-2.5 μg 也能损害记忆巩固。

**关键词** 樟柳碱; 槟榔碱; 密胆碱; 空间辨别; 学习; 记忆巩固; 再认

1982年7月19日收稿 1982年11月20日修回

\* 摘要刊于中国药学会全国药理学学术会议论文摘要集, 1982年9月; (上); 59

\*\* 现在上海医药工业研究院

近十余年来, 有关胆碱能药物及中枢胆碱能递质系统对学习记忆的影响已引起广泛关注和研究<sup>(1,2)</sup>。樟柳碱是从茄科植物唐古特山莨菪(*Scopolia tangutica Maxim*) [或 *Anisodus tanguticus (Maxim.) Pasch.*] 中分得的一种新的 M-ACh 受体阻滞剂, 其化学结构和药理性质与东莨菪碱颇为近似<sup>(3)</sup>。近年来该药已用于治疗多种疾病及静脉复合麻醉<sup>(4)</sup>。较大剂量樟柳碱可引起幻觉、健忘并抑制大鼠<sup>(3,5)</sup> 和家兔<sup>(5)</sup> 的条件反射(CR)活动, 作者<sup>(6)</sup>曾观察了该药对家兔 CR 学习记忆不同过程的作用。本文研究樟柳碱等 3 种胆碱能药物对小鼠空间分辨学习和记忆各过程的作用及其作用机制, 以进一步探讨中枢胆碱能递质系统与学习和记忆的关系。

## 材 料 和 方 法

氢溴酸樟柳碱由成都制药一厂出品, 氢溴酸槟榔碱系E. Merck药厂生产, 密胆碱为Sigma Chemical Co. 产品。各药均于实验前用生理盐水配制。实验用小鼠均由本院动物中心供应。体重22-30 g, ♂♀约各半。小鼠两前肢皮肤电阻150-300 k $\Omega$ 。

试验在隔音室进行。试验用三等分Y型迷宫<sup>(7)</sup>稍加改进制成(图1)。三臂末端小区可按I→II→III→I臂次序轮流作为安全区或起步区。凡小鼠受电击后能从起步区直接逃至左臂安全区的反应称为“正确反应”, 否则均属“错误反应”。小鼠学习和记忆成绩以其学习或测验时达到某一规定(详后)标准前所需的电击次数(又称错误反应次数)表示(设某鼠记忆测验时共予电击30次, 其中后10次中有9次为正确反应, 则其记忆成绩即达到此标准前所需的电击次数为20次)。部分实验中尚同时测定了小鼠达到连续10次电击中有9次(9/10)为正确反应时10次电击中的平均反应时。

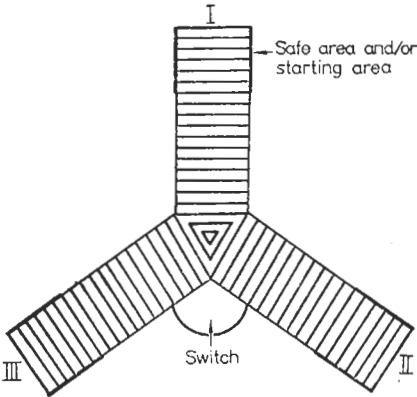


Fig 1. Partially automatic Y-maze.

### 学习试验

1. 预选 将小鼠放入迷宫适应环境8 min, 接着驱至I臂安全区休息2 min, 然后使I臂安全区通电(50 Hz, 0.1-0.15 mA)变成起步区, 小鼠逃至II臂安全区后停留30 s; 将鼠放回I臂安全区休息1 min, 再予第2次电击。依此重复训练。选取达到连续2次正确反

应前电击次数 $\leq 3$ 次、自由活动较敏捷的小鼠并休息1-2 d后供学习试验用。

2. 学习 (1) 将小鼠放入I臂安全区休息5 min, 按“预选”法训练其在I~III臂各达到连续正确2次止。接着,(2)使小鼠留在I臂安全区休息3 min, 按I→II→III→I臂顺序连续循环给予电击训练, 小鼠每次遭电击逃至安全区后休息1 min, 以小鼠达到9/10正确反应作为学会空间分辨反应的标准<sup>(8)</sup>。每回连续学习的电击总次数一般不得超过30次。如小鼠在第1回学习中未达到以上标准, 则须于次日再按(2)法训练一回。学习成绩以(1)、(2)两项成绩之和表示。

### 记忆试验

将小鼠放入迷宫适应环境8 min, 接着驱至I臂安全区休息2 min, 按“学习(1)”法训练之。选择(1)在任一臂错误反应 $\leq 3$ 次鼠供樟柳碱影响记忆各过程实验用,(2)I臂错误反应 $\leq 3$ 次。另两臂各 $\leq 2$ 次鼠供密胆碱影响记忆过程实验用。记忆测验分为两类:

1. 不巩固记忆测验(简称M<sub>1</sub>) 小鼠经上述预选及学习后1 d按学习(2)法(唯先在I臂安全区休息5 min)测验之。

2. 较巩固记忆测验(简称M<sub>2</sub>) 选取M<sub>1</sub>测验时已达到标准的小鼠于次日继续按同法测验一回。

## 结 果

**樟柳碱、槟榔碱单用及合用对学习过程的影响** 正常小鼠17只, 学习实验前1 h或10 min ip生理盐水10 ml/kg, 结果表明约83%的小鼠在第1回试验中即可学会空间分辨反应, 其达到9/10正确反应前所需的电击次数为 $22 \pm (\text{SD}) 10$ 次; 但如在学习前1 h ip樟柳碱5 mg/kg, 则其电击次数高达 $48 \pm 21^{***}$ , (n=10), 说明该药可显著减弱小鼠的学习能力。

如学习前10 min分别ip槟榔碱0.25(n=10)、0.5(n=10)、5(n=11)或10(n=3)mg/kg, 结果见其达到9/10正确反应前所需电击次数

依次为  $8 \pm 6^{**}$ 、 $15 \pm 12^*$ 、 $34 \pm 21^{***}$  和  $45 \pm 14^{***}$  次, 即小剂量 ( $0.25-0.5 \text{ mg/kg}$ ) 时能明显促进学习过程, 而大剂量 ( $5-10 \text{ mg/kg}$ ) 时则相反。

如学习前分别由双侧 ip 樟柳碱  $5 \text{ mg/kg}$  和槟榔碱  $0.5 \text{ mg/kg}$ , 则合用组小鼠达到 9/10 正确反应时的学习成绩 ( $22 \pm 17$  次,  $n=10$ ) 与对照组十分接近, 但与单用两药组相比有明显区别。

经多次训练后, 对照、槟榔碱及合用组三组部分小鼠可出现主动回避反应 (AA), 而樟柳碱组无此现象, 但此四组间的反应时 (依次为  $14 \pm 2$ ,  $15 \pm 9$ ,  $9 \pm 7$ ,  $14 \pm 5 \text{ s}$ ) 均无明显差异 ( $p > 0.05$ ), 表明药物并未干扰小鼠的运动功能。

### 药物对记忆功能的影响

1. 樟柳碱对记忆巩固过程的影响及巩固时程的测定 小鼠“预选及学习”后立即或 3 h 分别 ip 樟柳碱 (简称立即或 3 h 给药组), 对照组给予生理盐水, 各组均于 ip 后 24 h 进行记忆测验。结果可见对照组小鼠达到 9/10 正确反应前的电击次数仅需  $1.7 \pm 1.9$  次; 立即给予樟柳碱 1 或  $5 \text{ mg/kg}$  两组则分别高达  $14 \pm 16$  和  $21 \pm 21^{***}$  次 (表 1); 而 3 h 给药组 ( $5 \text{ mg/kg}$ ) 达到上述标准前所需的电击次数与对照组十分接近, 但和立即给药组相比则有显著差异 (表 2)。对照和 3 h 给药两组均有部分小鼠出现 AA, 但立即给药组无此现象。上述结果表明: 小鼠学会本模式后的一段时间为其进行记忆巩固的关键时期, 其巩固时程约短于 3 h; 樟柳碱能明显干扰此巩固过程, 且呈明显量-效关系; 给予樟柳碱后 24 h 作用已近完全消失。

2. 樟柳碱对  $M_1$  和  $M_2$  记忆再认过程的影响 小鼠 8 只,  $M_1$  测验前 1 h (即“预选及学习”后 23 h) ip 樟柳碱  $5 \text{ mg/kg}$  (简称  $M_1$  组), 同时另取部分小鼠 ip 生理盐水作为对照。结果如表 2 所示,  $M_1$  组小鼠达到 9/10 正确反应前的电击次数显著高于对照和 3 h 给药两组, 而与立即给药组极为近似; AA 基本消失。测验

Tab 1. Effect of anisodine on the process of consolidation ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Dose(mg/kg)	Mice	$L_3$	9/10( $M_1$ )
NS	10	$4.7 \pm 2.5$	$1.7 \pm 1.8$
1	10	$4.8 \pm 2.2^*$	$14 \pm 16^*$
5	10	$4.9 \pm 1.9^*$	$21 \pm 21^{**}$

$L_3$  and 9/10( $M_1$ ) are the trials to criterion in learning and memory<sub>1</sub> (9/10), respectively. Compared with control group \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$

Tab 2. Effect of anisodine 5 mg/kg on the different processes of memory ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Group	Mice	$L_3$	9/10( $M_1$ )
Control	15	$4.5 \pm 2.3$	$2.2 \pm 2.7$
Immediateness	10	$4.9 \pm 1.9^*$	$21 \pm 21^{***}$
3 h	10	$4.1 \pm 1.9^*$	$4 \pm 5^{**}$
$M_1$	8	$4.1 \pm 1.1^*$	$20 \pm 15^{**}$

Compared with 3 other groups \* $P > 0.05$  and with control group \*\* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

时小鼠起跑较快, 选择安全区时无迟缓表现, 反应时 ( $21 \pm 6 \text{ s}$ ) 与对照组 ( $23 \pm 10 \text{ s}$ ) 颇为接近。

另取小鼠 20 只, 按其  $M_1$  成绩均分为“良好” (电击次数  $< 5$ ) 和“中差” ( $5 < \text{电击次数} < 20$ ) 两类, 各类均分对照和给药两组, 进行  $M_2$  测验。测验前 1 h 分别 ip 生理盐水或樟柳碱  $5 \text{ mg/kg}$ , 结果由表 3 可见, 无论“良好”或“中差”类, 给药与对照两组的  $M_2$  成绩间均无明显区别。各组发生 AA 的鼠数和次数较  $M_1$  测验略增。

上述结果表明, 樟柳碱可明显干扰小鼠对于较不巩固记忆的再认过程, 但对较巩固记忆的再认则无影响 (包括“良好”与“中差”两类)。

3. 密胆碱对记忆过程的影响 小鼠 36 只, 按其“预选及学习”成绩均分四组。待“预选及学习”后 5 min 分别 icv (右侧) 生理盐水  $20 \mu\text{l}$  或密胆碱 0.4, 1.0 或  $2.5 \mu\text{g}$ 。结果如表 4 所示, 对照组小鼠达到 9/10 正确反应前的电击次数仅需  $2 \pm 4$  次, 但密胆碱 0.4、1.0 和  $2.5 \mu\text{g}$

Tab 3. Effect of anisodine 5 mg/kg on the process of retrieval of  $M_2$ . 5 mice/group. ( $\bar{x} \pm SD$ )

Class	Group	$L_3$	9/10( $M_1$ )	9/10( $M_2$ )	$M_1-M_2$	P Value
Good	Control	4.0 $\pm$ 2.0	0.6 $\pm$ 1.3	6 $\pm$ 13	5.4	>0.9
	Drug	3.2 $\pm$ 0.9	0.4 $\pm$ 0.4	6 $\pm$ 13	6.2	
Bad	Control	4.0 $\pm$ 0.7	9 $\pm$ 4	13 $\pm$ 11	4.4	>0.8
	Drug	6.0 $\pm$ 2.0	10 $\pm$ 4	13 $\pm$ 9	2.8	

Tab 4. Effect of hemicholinium on memory. ( $\bar{x} \pm SD$ )

Hemicholinium ( $\mu$ g/mouse)	Mice	$L_3$	9/10( $M_1$ )
0	9	4.4 $\pm$ 1.5	2 $\pm$ 4
0.4	9	4.6 $\pm$ 1.5*	14 $\pm$ 12*
1.0	9	3.4 $\pm$ 0.9*	23 $\pm$ 25**
2.5	9	3.7 $\pm$ 1.5*	23 $\pm$ 20**

Compared with 3 other groups \* $p > 0.05$  and with control group \*\* $p < 0.05$

三组则分别高达 14 $\pm$ 12, 23 $\pm$ 25和23 $\pm$ 20次。各组小鼠的外观活动及运动功能正常, 对照、密胆碱 0.4、1.0 和 2.5  $\mu$ g 四组间的反应时(依次为 15 $\pm$ 6, 17 $\pm$ 7, 13 $\pm$ 4 和 10.3 $\pm$ 1.8 s)均无明显区别。以上说明密胆碱也可明显损害小鼠记忆巩固等过程, 且呈一定的量-效关系。

## 讨 论

学习记忆药理研究中迄今尚无一种普遍满意的行为测试模式。本文报道的小鼠空间分辨反应的训练测试程序较文献常用者<sup>(7,8)</sup>有所改进, 颇为简便。如设立定点预选及训练步骤, 从而降低了小鼠个体间学习记忆能力的差异, 并加速了学习进程、增强了记忆能力, 有助于研究药物对学习尤其是记忆巩固过程的影响; 运用  $M_2$  测验法, 可供初步分析药物对不同巩固程度的记忆再认过程的作用。此外, 参考文献取消了食物奖励或灯光指示, 且每次电击后不需将小鼠捉回原起步区, 从而减少了由捉拿动物导致的非特异性干扰等。又, 本模式所需记忆巩固时程(约短于 3 h)亦与文献吻合。

观察药物对学习记忆作用时必须严格排除各种非特异性影响。为此, 本文通过测定反应

时等方法以控制用药剂量不致干扰小鼠的外观行为和运动功能。尤其是采用了训练后不同时间(立即或 3 h)给药、并待药物直接作用消失后再进行测试的方法, 以及根据同一时间(即学习、 $M_1$  和  $M_2$  前 1 h)给予同一剂量樟柳碱(5 mg/kg)呈现不同效应的结果等, 从而有效地摒除了药物非特异性干扰学习记忆的疑虑。

本工作表明, 樟柳碱可明显阻抑学习、记忆巩固及较不巩固记忆的再认, 但对较巩固记忆则无影响; 由该药引起的学习抑制效应可相当完全地为槟榔碱所拮抗。据此提示, 至少在本文所用剂量范围内, 樟柳碱对学习记忆的影响主要为其选择性作用于中枢 M-胆碱能系统的结果。而 M-激动剂槟榔碱在大、小不同剂量时对学习过程呈现阻抑或易化两种效应, 有作者认为此系该药过量后反使胆碱能突触传递产生去极化阻滞所致<sup>(9)</sup>。

密胆碱主要是竞争性抑制胆碱能神经末梢的胆碱转运系统, 其次尚能直接抑制胆碱乙酰化酶, 从而阻滞 ACh 合成。有人发现大鼠<sup>(10)</sup>或狗<sup>(11)</sup>icv 密胆碱 20-25  $\mu$ g 后 10 min 即能明显降低海马内 ACh 含量, 且作用可达 24 h 以上。但再增加剂量并不能进一步耗竭 ACh。迄今未见有关密胆碱对学习记忆功能影响的报道。本文结果表明, 小鼠 icv 密胆碱 0.4-2.5  $\mu$ g 后记忆能力显著减弱。但当剂量增至 2.5  $\mu$ g 时, 其损害效应并未相应加强。推想此或系脑内胆碱和胆碱乙酰化酶含量丰富, 所以即便使用大剂量密胆碱亦不足以将 ACh 合成完全阻断。鉴于该药作用可持续 24 h 之久, 因而设想其除抑制记忆巩固过程外, 对于记忆保持及再认诸过程也可能有直接的抑制效应。

综合本文及其它有关资料<sup>(1,2,12)</sup>可以认为,

中枢胆碱能系统的正常功能是学习记忆的必需条件。然其确切的调节机制及其作用部位迄未阐明。记忆胆碱能突触假说<sup>(9, 12, 13)</sup>认为,胆碱能神经通路本身即参与构成记忆痕迹。已知膈区-海马-边缘叶系统和大脑皮层有大量胆碱能神经元和M-胆碱能受体, M-胆碱能药物也选择性分布于上述部位<sup>(1, 14)</sup>, 由M-抗胆碱药所诱发的学习记忆障碍型与海马结构或大脑皮层受损伤者颇为近似, 二者又均能为拟胆碱药所拮抗和治疗<sup>(1, 13)</sup>。据此有人设想, 中枢胆碱能(尤指M-系统)可能主要是通过膈区-海马-边缘叶和大脑皮层两类通路而调节第一级记忆转入第二级记忆的过程。本文所获樟柳碱对学习记忆各过程影响的实验结果颇为支持以上设想。

### 参 考 文 献

- 1 韩怡凡. 生理科学进展 1982年1月; 13(1): 31
- 2 韩怡凡、陈先瑜. 同上 1983年7月; 14(2): 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年11月; 55(11): 795
- 4 陈先瑜. 抗胆碱药研究现状. 中国药理学会编. 药理学进展(1979). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 16-32
- 5 管林初、鄒勤娥、邵道生. 心理学报 1982年4月; 14(2): 239
- 6 韩怡凡、陈先瑜. 药理学报 1983年, 待发表
- 7 Bures JB, Buresova O, Huston J. Discrimination learning. In: Bures JB, Buresova O, Huston J, eds.: *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. 1st ed. NY: Elsevier, 1976: 156-68
- 8 Flexner JB, Flexner LB, Stellar E. *Science* 1963 Jul 5; 141(3575): 57
- 9 Deutsch LA. *Ibid* 1971 Nov 19; 174(4011): 788
- 10 Rommelspacher H, Kuhar MJ. *Fed Proc* 1974 Mar; 33(3): 505
- 11 Dren AT, Domino EF. *J Pharmacol Exp Ther* 1968 May; 161(1): 141
- 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, 1979: 351-66
- 13 Squire LR, Davis HP. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981; 21: 323
- 14 韩怡凡. 医师进修杂志 1982年4月; (4): 1

*Acta Pharmacologica Sinica* 1983 Dec; 4(4): 220-225

## EFFECTS OF ANISODINE AND OTHER CHOLINERGIC DRUGS ON LEARNING AND MEMORY IN SPATIAL DISCRIMINATION OF MICE

HAN Yi-fan, CHEN Xian-yu (*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** It has been recognized for a long time that some cholinergic drugs appear to affect the processes of information acquisition, consolidation, maintenance and retrieval. Anisodine is a new muscarinic anticholinergic agent isolated from *Scopolia tangutica* Maxim. It is similar to scopolamine both in chemical structure and in pharmacological properties. In this paper effects of anisodine, arecoline and hemicholinium on learning and memory were studied using spatial discrimination of mice as a model.

Anisodine (1-5 mg/kg, ip) and hemicholinium (0.4-2.5 µg, iv) inhibiting the physiological function of central cholinergic system impaired markedly the processes of acquisition, consolidation and retrieving of recent memory, while the remote memory remained unaffected. The role of anisodine on learning and memory appears to be specific and selective. Facilitation of acquisition was produced by arecoline 0.25-0.5 mg/kg (ip), but inhibition was obtained by 5-10 mg/kg. Arecoline 0.5 mg/kg effectively antagonized the disruptive effect of

anisodine 5 mg/kg on acquisition process. The time span for consolidation of memory was  $<3$  h in this model determined by the administration of anisodine shortly after training.

The result convincingly supports that normal function of the cholinergic system, especially the muscarinic system, is necessary for memory formation in mammalian brain.

The modified spatial discrimination model may be useful for studying the pharmacology of learning and memory.

**KEY WORDS** anisodine; arecoline; hemicholinium; spatial discrimination; acquisition; consolidation; retrieval

\* \* \* \* \*