

石杉碱甲和乙对小鼠记忆损害的改善作用

朱晓东、唐希灿 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 石杉碱甲 100-125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或石杉碱乙 1.0-1.5 mg/kg 均能明显改善小鼠由环己酰亚胺, NaNO_2 , 东莨菪碱, 以及最大电惊厥产生的被动回避操作记忆损害; 明显促进老年小鼠的记忆保持。毒扁豆碱 125-175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 也有上述改善作用。它们的剂量-效应曲线呈倒 U 形。石杉碱甲与毒扁豆碱的作用强度相当, 但比石杉碱乙约强 10 倍。

关键词 石杉碱甲; 石杉碱乙; 毒扁豆碱; 东莨菪碱; 放线菌酮; 电惊厥休克; 记忆; 认知; 老年小鼠

石杉碱甲(huperzine A, Hup-A)和乙(Hup-B)是从石杉科石杉属植物蛇足石杉 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 中分离得到的两个新

生物碱⁽¹⁾。它们对乙酰胆碱酯酶的抑制作用远比毒扁豆碱(physostigmine, Phy)强⁽²⁾, 治疗指数也比 Phy 大⁽³⁾。动物试验及临床研究均已观察到 Phy 有改善或促进记忆的作用⁽⁴⁾, 因而应用一些胆碱酯酶抑制剂用于治疗老年记忆功能减退已受到人们的重视, 作者曾证实 Hup-A 和 Hup-B 对正常大鼠⁽⁵⁾、小鼠⁽⁶⁾及老龄大鼠⁽⁷⁾的辨别操作学习与记忆均有明显的改善作用。跳台法因其简便, 已被广泛用于促智药的筛选和研究, 本文采用同时测定药物对跳台和逃避潜伏期的影响⁽⁸⁾, 进一步研究 Hup-A, Hup-B 改善各种实验性记忆损害小鼠记忆保持的作用, 并与 Phy 作比较。

1987年9月8日收稿 1988年4月15日接受

材 料 和 方 法

成年小鼠体重 $30 \pm \text{SD } 2 \text{ g}$, 雌雄兼用。老年小鼠的鼠龄在 12 个月以上, 雄性, 体重 $41 \pm 5 \text{ g}$ 。均由中国科学院上海分院实验动物中心供应。Hup-A 和 B 游离碱, 微黄色结晶性粉末 (mp 分别为 230°C 和 270°C), 由浙江医学研究院药物研究所植化室提供, 加蒸馏水 (以稀 HCl 助溶) 配成 5 mg/ml 水溶液。水杨酸毒扁豆碱 (英国产品), 环己酰亚胺 (cycloheximide, CXM, Fluka AG), 氢溴酸东莨菪碱 (scopolamine, Scop, 成都制药一厂), 亚硝酸钠 (NaNO_2 , AR, 上海试剂一厂)。除 CXM 用 0.9% 生理盐水 (NS) 外, 其余均用蒸馏水配成水溶液。sc, ip 或 ig 的药物均为 10 ml/kg 。小鼠于被动回避操作训练后立即损害其记忆, 同时 ip 或 ig 测试药物。使小鼠产生最大电惊厥 (MES, DS-3 电惊厥仪), 即将两电极分别夹在小鼠两侧耳壳上, 通电 30 mA , 0.2 s 。

记忆保持试验 被动回避操作装置为一个 $19 \times 12.5 \times 18 \text{ cm}$ 的聚乙烯塑料箱, 中央放置一平台 (直径 3.5 cm , 高 5 cm), 箱子底部铜棒通以 30 V 电刺激。实验开始前, 先将小鼠放入试验箱内使其熟悉环境 5 min , 然后轻放于平台上, 记录小鼠在台上停留的潜伏期 (SDL)。待小鼠从台上跳下, 四肢均接触铜棒时, 立即给予电刺激, 直至小鼠跳回到平台上, 记录小鼠从台上跳下受电刺激后逃避至台上的潜伏期 (EL)。选取 SDL 和 EL 在 $3\text{--}60 \text{ s}$ 的小鼠, 24 h 后用于记忆保持试验。经训练后的小鼠按 SDL 和 EL 随机分组, 各组小鼠 ($10\text{--}30$ 只) 之间的 SDL 和 EL 值 t 检验均为 $p > 0.05$ 。记忆保持测试时, 小鼠在平台上停留 3 min 仍未跳下者将其取下并放在试验箱一角, 使其尾对平台并给予电刺激, 测试其逃避至台上的 EL⁽⁸⁾。各小鼠的训练和记忆保持测试各进行一回, 各组测试时的 SDL 和 EL 均用 t 检验进行统计。

结 果

翻转环己酰亚胺引起的被动回避操作的记

忆保持损害 成年小鼠 214 只, 分为 14 组, 在训练后立即 sc CXM 150 mg/kg , 并同时 ip Hup-A, Hup-B 或 Phy, 对照组 ip NS, 10 ml/kg , 24 h 后测试。CXM 150 mg/kg 组与 NS 组比较, SDL 显著缩短 ($p < 0.01$), 但 EL 无明显变化。Hup-A 0.1 和 0.125 mg/kg , Hup-B 1.0 和 1.2 mg/kg 以及 Phy 0.125 , 0.15 和 0.175 mg/kg 各组的 SDL 均比 CXM 组明显延长 ($p < 0.05$)。小于或大于上述各剂量, 则作用不明显或减弱。各剂量组的 EL 与 CXM 组比较均无明显影响 (图 1)。

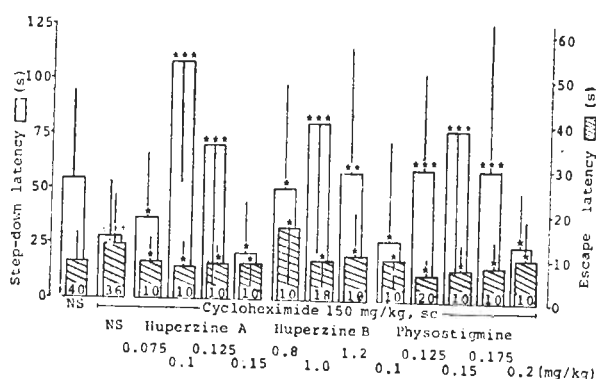


Fig 1. Improvement of cycloheximide-induced amnesia on retention of a passive avoidance task in mice ($\bar{x} \pm \text{SD}$). The retention test was performed 24 h after training. A dose of drug or saline (NS, 10 ml/kg) was injected ip immediately after cycloheximide. Numbers of mice in bars. † $p > 0.05$, †† $p < 0.01$ vs NS + NS. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs cycloheximide + NS.

翻转 NaNO_2 引起的被动回避操作的记忆保持损害 小鼠 190 只, 分成 14 组, 训练后立即 sc NaNO_2 120 mg/kg 及 ip 测试药物: 1) NS + NS; 2) NaNO_2 + NS; 3) NaNO_2 + Hup-A $0.075\text{--}0.15 \text{ mg/kg}$; 4) NaNO_2 + Hup-B $0.75\text{--}1.75 \text{ mg/kg}$; 5) NaNO_2 + Phy $0.125\text{--}0.175 \text{ mg/kg}$, 结果见表 1。 NaNO_2 对照组与 NS 对照组小鼠相比较, 其 SDL 显著缩短 ($p < 0.05$)。Hup-A $0.1, 0.125 \text{ mg/kg}$ 可使 SDL 明显延长, EL 则明显缩短 ($p < 0.01$)。Hup-B 1.25 mg/kg 或 Phy 0.15 mg/kg 也均能使 SDL 比之

Tab 1. Improvement of retention of a passive avoidance task in mice treated with huperzine A or huperzine B immediately after NaNO₂. NaNO₂ 120 mg/kg, sc immediately after a passive avoidance training. Test was performed 24 h after training. A dose of drug or saline (NS, 10 ml/kg) was injected immediately after sc NaNO₂. $\bar{x} \pm SD$. †p>0.05, ††p<0.05 vs NS+NS. *p>0.05, **p<0.05, ***p<0.01 vs NaNO₂ + NS.

Drug	Dose (mg/kg) ip	Mice	Latency (s)			
			Training Step-down	Escape	Step-down	Test Escape
NS+NS		30	12±11	16±13	60±44	8±6
NaNO ₂ +NS		25	17±14†	20±16†	29±23††	12±9†
+ Huperzine A	0.075	10	14±13*	16±10*	44±27*	8±4*
	0.1	15	12±11*	22±17*	73±64***	6±3***
	0.125	10	17±15*	22±16*	87±17***	4±2***
	0.15	20	16±11*	17±15*	46±44*	10±8*
+ Huperzine B	0.75	10	18±14*	22±14*	38±26*	12±9*
	1.0	10	14±11*	20±16*	67±66**	10±8*
	1.25	10	12±7*	20±17*	72±27***	6±5*
	1.5	10	16±12*	14±9*	69±73**	9±7*
	1.75	10	15±13*	20±12*	43±23*	11±8*
+ Physostigmine	0.125	10	16±16*	21±16*	43±53*	14±14*
	0.15	10	10±6*	19±11*	73±69***	8±7*
	0.175	10	11±14*	25±18*	50±41*	8±4*

NaNO₂ 组显著延长, 但对 EL 均无明显影响。

翻转最大电惊厥产生的被动回避操作的记忆保持损害 小鼠 19 组, 在训练后分别 ip 或 ig NS, Hup-A, Hup-B 及 Phy, 同时给予电刺激产生强直性惊厥, 24 h 后进行测试, 结果见表 2。小鼠经最大电惊厥处理后, 其 SDL 比正常 NS 对照组明显缩短。ip Hup-A, Hup-B 和 Phy 均能显著延长小鼠的 SDL (p<0.01), 其有效剂量分别为 0.125, 1.5 和 0.175 mg/kg。ig Hup-A, Hup-B 也有明显改善记忆保持损害的作用, 其有效剂量分别为 0.14, 0.16 和 2.4 mg/kg。各组药物测试组的 EL 均没有见到明显变化。

翻转东莨菪碱产生的短时记忆保持损害 小鼠 171 只, 训练后分成 11 组, 4 h 后(短时记忆)按以下组别进行测试: NS+NS; Scop+NS; Scop+Hup-A; Scop+Hup-B 及 Scop+Phy, 结果见表 3。小鼠 sc Scop 2 mg/kg 后其 SDL 比 NS 对照组明显缩短 (p<0.05), 而 ip Hup-A 0.1 mg/kg, Hup-B 1.25 mg/kg 或

Phy 0.125 mg/kg 均能取消 Scop 产生的短时记忆保持损害⁽⁹⁾, 使 SDL 显著延长 (p<0.01), EL 则相应缩短 (p<0.05)。

促进老龄小鼠被动回避操作的记忆保持 180 只小鼠, 分成 12 组, 训练后立即各 ip NS, Hup-A 0.075-0.175 mg/kg, Hup-B 1.0-1.5 mg/kg 或 Phy 0.125-0.175 mg/kg。24 h 后进行测试, 其中 Hup-A 0.125 mg/kg, 0.15 mg/kg, Hup-B 1.25 mg/kg 或 Phy 0.15 mg/kg 组的 SDL 均较对照组有明显延长 (p<0.05), 而对 EL 无明显影响, 结果见表 4。

讨 论

采用同时测定药物对跳台和逃避潜伏期的影响, 可以排除药物的非特异作用的干扰⁽⁸⁾。动物经记忆损害处理后, 再给予 Hup-A, Hup-B 或 Phy, 均能明显延长记忆损害小鼠的 SDL; 在部分 (Scop 和 NaNO₂) 记忆损害模型中, Hup-A 使 EL 明显缩短, 表明 Hup-A 是特异地作用于记忆过程。有报道⁽⁸⁾蛋白质合成

Tab 2. Reversal of maximal electroconvulsive shock (MES)-induced disruption of the retention of a passive avoidance task in mice treated with huperzine A (Hup-A), huperzine B (Hup-B) or physostigmine (Phy). $\bar{x} \pm SD$. $^{\dagger}p > 0.05$, $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.01$ vs NS without MES. $^*p > 0.05$, $^{}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$ vs MES + NS.**

Drug	Dose (mg/kg)	Mice	Latency(s) \ddagger	
			Step-down	Escape
NS without MES		30	59 \pm 40	9 \pm 7
MES + NS		30	32 \pm 34 †††	10 \pm 8 †
+ Hup-A	0.1 ip	15	37 \pm 46*	10 \pm 8*
	0.125	10	96 \pm 59 ***	5 \pm 3*
	0.15	12	38 \pm 30*	12 \pm 6*
+ Hup-B	1.25	10	53 \pm 53*	7 \pm 3*
	1.5	10	86 \pm 42 ***	6 \pm 5*
	1.75	10	48 \pm 38*	10 \pm 6*
+ Phy	0.15	10	44 \pm 52*	6 \pm 4*
	0.175	10	82 \pm 45 ***	6 \pm 4*
	0.2	10	48 \pm 38*	7 \pm 4*
NS without MES		20	68 \pm 58	8 \pm 5
MES + NS		30	33 \pm 32 ††	11 \pm 10 †
+ Hup-A	0.12 ig	10	40 \pm 32*	8 \pm 6*
	0.14	10	78 \pm 64 ***	7 \pm 4*
	0.16	10	69 \pm 60 **	8 \pm 6*
+ Hup-B	2.2	10	39 \pm 50*	11 \pm 6*
	2.4	10	100 \pm 70 ***	6 \pm 5*
	2.6	10	33 \pm 31*	9 \pm 4*

\ddagger Retention test was performed 24 h after a passive avoidance training. MES was applied immediately after training. A dose of test drug or saline (10 ml/kg) was ip or ig immediately after exposure to MES.

Tab 3. Reversal of scopolamine-induced transient disruption of short-term memory retention of a passive avoidance task in mice. Scopolamine (2 mg/kg, sc) immediately after a passive avoidance training. Test was performed 4 h after training. A dose of test drug or saline (NS, 10 ml/kg) was injected immediately after scopolamine (Sco). $\bar{x} \pm SD$. $^{\dagger}p > 0.05$, $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.01$ vs NS + NS. $^*p > 0.05$, $^{}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$ vs Sco + NS**

	Dose (mg/kg)	Mice	Response latency (s)			
			Training		Test	
			Step-down	Escape	Step-down	Escape
NS + NS		25	12 \pm 7	16 \pm 11	122 \pm 44	8 \pm 8
Sco + NS		30	12 \pm 10 †	19 \pm 14 †	59 \pm 52 †††	11 \pm 8 †
+ Huperzine A	0.075	20	10 \pm 8*	18 \pm 11*	82 \pm 56 ***	7 \pm 4*
	0.1	12	10 \pm 8*	15 \pm 10*	115 \pm 59 ***	6 \pm 4 **
	0.125	20	9 \pm 9*	19 \pm 8*	69 \pm 59*	7 \pm 7*
+ Huperzine B	1.0	10	11 \pm 8*	21 \pm 20*	91 \pm 45*	7 \pm 5*
	1.25	10	10 \pm 10*	22 \pm 13*	108 \pm 63 ***	6 \pm 4*
	1.5	10	14 \pm 13*	18 \pm 13*	89 \pm 79*	8 \pm 8*
+ Physostigmine	0.1	10	14 \pm 12*	15 \pm 9*	63 \pm 67*	8 \pm 3*
	0.125	10	12 \pm 9*	19 \pm 16*	116 \pm 60 ***	6 \pm 3 **
	0.15	10	15 \pm 13*	15 \pm 11*	95 \pm 58*	7 \pm 4*

抑制剂 CXM 可使 ddY 系小鼠产生记忆损害, 表现为 SDL 缩短, EL 延长。本文用杂种小鼠试验, 除 Scop 和 NaNO₂ 模型外, 尚未观察到对 EL 有影响。ddY 系小鼠对 CXM 150 mg/kg 剂量有很好的耐受⁽⁸⁾, 但本试验的小鼠在此剂量耐受较差, 外观有毛松现象。此外, 本试验所用实验箱因为穿梭箱改装, 故体积比文献⁽⁸⁾小。因此推测, 动物种属及平台周围空间大小很可能与反应差异有关。本文还观察到 Hup-A 和 B 的倒 U 剂量-效应关系, 这与过量的 ACh 可导致神经传导阻滞的现象⁽¹⁰⁾密切相关。由于这种剂量-效应间距较窄, 故临床应用时对剂量的确定需仔细选择。

由于损毁胆碱能通路可致学习和记忆的缺损, 老年性痴呆 (Alzheimer's disease) 与胆碱能神经传导缺损有关联^(11,12)。老龄大鼠脑内 ACh 释放仅相当于刚出生时的低水平⁽¹³⁾。缺氧可致依赖 Ca²⁺ 的 ACh 合成和释放受到抑制⁽¹⁴⁾。Scop 因它阻断脑内胆碱能功能, 以致记忆损害。动物经 MES 处理后, 脑内 ACh 含量下降⁽¹⁵⁾。小鼠脑切片自体放射自显影显示, Hup-A 与学习记忆有关的脑内各结构中均有分布(待发表)。由此推论, Hup-A 和 B 改善记忆保持的作用机理, 很可能是通过抑制 ChE,

Tab 4. Facilitation of retention of a passive avoidance task in aged (older than 12 months) mice treated with huperzine A, huperzine B or physostigmine. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs saline

Drug	Dose (mg/kg) ip	Mice	Latency (s, $\bar{x} \pm SD$) [†]			
			Training Step-down	Escape	Test Step-down	Escape
Saline		30	12 ± 14	23 ± 15	35 ± 24	15 ± 18
Huperzine A	0.075	10	9 ± 7*	29 ± 19*	38 ± 38*	9 ± 6*
	0.1	20	9 ± 8*	20 ± 15*	51 ± 42*	11 ± 9*
	0.125	15	11 ± 12*	26 ± 14*	67 ± 57**	8 ± 7*
	0.15	15	10 ± 8*	23 ± 15*	73 ± 52***	8 ± 6*
	0.175	16	11 ± 8*	20 ± 16*	40 ± 42*	10 ± 7*
Huperzine B	1.0	10	8 ± 10*	29 ± 16*	40 ± 29*	18 ± 17*
	1.25	15	9 ± 7*	23 ± 17*	71 ± 55***	7 ± 5*
	1.5	14	12 ± 13*	19 ± 13*	54 ± 53*	12 ± 8*
Physostigmine	0.125	10	11 ± 11*	25 ± 17*	50 ± 60*	9 ± 6*
	0.15	15	11 ± 14*	20 ± 15*	69 ± 64**	6 ± 3*
	0.175	10	14 ± 14*	21 ± 18*	59 ± 58*	8 ± 4*

[†] Retention test was performed 24 h after a passive avoidance training. A dose of test drug or saline (NS, 1 ml/kg) was injected immediately after training.

提高脑内 ACh 水平。Hup-A 和 B 对 CXM 产生的记忆损害也有拮抗作用, 从而推想 Hup-A 和 B 通过胆碱能环节达到改善记忆功能的作用不是唯一的作用环节。

参 考 文 献

- Liu JS, Zhu YL, Yu CM, *et al.* The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can J Chem* 1986; 64 : 837
- 徐 泓、唐希灿。石杉碱乙的抗胆碱酯酶作用。中国药理学报 1987; 8 : 18
- 严孝方、陆维华、楼伟建、唐希灿。石杉碱甲和乙对骨骼肌及脑电的作用。同上 1987; 8 : 117
- Mattio T, McIlhany M, Giacobini E, Hallak M. The effects of physostigmine on acetylcholinesterase activity of CSF, plasma and brain. A comparison of intravenous and intraventricular administration in beagle dogs. *Neuropharmacology* 1986; 25 : 1167
- 唐希灿、韩怡凡、陈小萍、朱晓东。石杉碱甲对大鼠辨别学习和再现过程的作用。中国药理学报 1986; 7 : 507
- 朱晓东、唐希灿。石杉碱甲和乙促进小鼠的空间辨别学习和记忆。药科学报 1987; 22 : 812
- 陆维华、寿 江、唐希灿。石杉碱甲改善老龄大鼠及实验性识别损害大鼠的明暗分辨行为。中国药理学报 1988; 9 : 11
- Kameyama T, Nabeshima T, Kozawa T. Step-

down-type passive avoidance- and escape-learning method. *J Pharmacol Methods* 1986; 16 : 39

- Cumin R, Bandle EF, Gamzu E, Haefely WE. Effects of the novel compound aniracetam (Ro 13-5057) upon impaired learning and memory in rodents. *Psychopharmacology* 1982; 78 : 104
- Warburton DM, Brown K. The facilitation of discrimination performance by physostigmine sulphate. *Ibid* 1972; 27 : 275
- Flicker C, Dean RL, Watkins DL, Fisher SK, Bartus RT. Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 18 : 973
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217 : 408
- Pedata F, Slavikova J, Kotas A, Pepeu G. Acetylcholine release from rat cortical slices during postnatal development and aging. *Neurobiol Aging* 1983; 4 : 31
- Peterson C, Gibson GE. 3,4-Diaminopyridine alters acetylcholine metabolism and behavior during hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222 : 576
- Spignoli G, Pepeu G. Oxiracetam prevents electroshock-induced decrease in brain acetylcholine and amnesia. *Eur J Pharmacol* 1986; 126 : 253

Improvement of impaired memory in mice by huperzine A and huperzine B

ZHU Xiao-Dong, TANG Xi-Can

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

ABSTRACT Both huperzine A (Hup-A) and huperzine B (Hup-B) are new alkaloids isolated from *Huperzia serrata* (Thunb. Trev.)⁽¹⁾. It has been shown in this laboratory that Hup-A and Hup-B are selective AChE inhibitors⁽²⁾ which exhibit larger therapeutic indices than does physostigmine (Phy)⁽³⁾. Using a step-down method, the effects of Hup-A and Hup-B on various forms of experimentally-produced impaired memory function in mice were examined. Mice received a single training trial on a passive avoidance task followed by a retention trial 24 h later. Immediately after training, each adult mouse received one of the following amnesic treatments: maximal electroconvulsive shock (MES), or an injection of scopolamine (Scop), NaNO₂ or cycloheximide (CXM). Step-down latency (SDL) and escape latency (EL) were measured and used as parameters of memory performance. In control mice, each amnesic treatment produced retrograde amnesia.

However, Hup-A or Hup-B administered immediately after each of the amnesic treatments significantly reversed the MES, Scop, NaNO₂- or CXM-induced disruptions of memory retention for passive avoidance tasks. Hup-A or Hup-B also markedly improved the retention of the learned task 24 h later in aged mice. These improvements or normalization of impaired memory function were observed at doses of 100-150 µg/kg ip and 140-160 µg/kg ig (Hup-A) or of 1.0-1.5 mg/kg ip and 2.4 mg/kg ig (Hup-B). Phy (0.125-0.175 mg/kg ip) for comparison, were active in all of the various experimental types of amnesia and had about 10 times the potency of Hup-B, but less than that of Hup-A.

KEY WORDS huperzine A; huperzine B; physostigmine; scopolamine; cycloheximide; electroconvulsion shock; memory; cognition; old mice