

樟柳碱所致学习和记忆障碍 动物模型的探讨^{* **1)}

管林初 崔秋耕

中国科学院心理研究所, 北京, 100012

摘 要

本实验采用水迷津法、步下法和步入法, 用樟柳碱制备学习和记忆障碍的动物模型。结果表明, 樟柳碱(10毫克/公斤)可使小鼠引起学习障碍, 其表现为通过水迷津全程的时间延长, 而且小鼠进入盲路的错误次数明显增多。樟柳碱(10毫克/公斤)可使小鼠引起记忆障碍, 在樟柳碱的影响下, 小鼠步下平台或步入暗箱的潜伏期明显缩短, 并使它们的错误次数增多。本实验结果进一步表明, 测定小鼠的记忆障碍, 步入法似乎比步下法更为敏感。

关键词: 樟柳碱、学习记忆、水迷津法、步下法、步入法、动物模型

为了进一步理解引起人类各种心理障碍的种种因素和心理紊乱的实质, 同时为了更有效地诊断、治疗和预防人体的各种心理障碍。现在, 许多学者和临床心理学家都主张利用实验动物来制备心理障碍的动物模型。

在众多的动物模型中, 人们对学习和记忆的动物模型似乎最感兴趣。这是因为研究动物的学习和记忆有如下两个主要的并且几乎是同样重要的理由^[1]:

1. 动物实验能为揭示学习和记忆的神经生物学机制提供颇有价值的实验室依据;
2. 研究动物的学习和记忆, 就能为研究人的学习和记忆提供有用的模型。

近年来, 利用心理药物来研究行为活动的神经生物学基础已愈来愈受到人们的重视。某些心理药物已成为研究行为的神经生物学机制的重要工具。利用作用机制较明确的一些心理药物来制备特定的脑功能障碍的动物模型已在生理心理学和认知心理学的研究中普遍应用。通过动物模型的制备, 不但可以了解心理药物是通过什么途径和什么方式使动物引起脑功能失调的。而且, 可以利用动物模型来寻找和筛选治疗认知功能障碍的药物。观察认知功能障碍的治疗过程和恢复过程, 这又有助于人们进一步了解调节高级功能的神经生物学机制。

随着医学科学的发展, 人类的寿命日益延长。而以记忆为代表的认知功能的障碍是老年人常见的临床症状, 这也是年龄老化的一个重要标志。因此, 如何改善老年人的学习和记忆障碍, 延缓老年人的衰老过程, 使老年人健康长寿, 这已成为当前老年医学和老年

* 本文为中国科学院择优基金资助项目。

** 本文曾在第一届中国科学院神经科学学术会议(北京, 1990, 12)上宣读。

1) 本文于1991年8月11日收到。

心理学中令人关注的研究课题^[2]。

为了更深入地研究引起老年人学习和记忆障碍的神经生物学机制,制备学习和记忆障碍的动物模型是十分必要的。很长时间以来,临床上把东莨菪碱看作导致遗忘症的一种制剂。国际上常把它作为制备学习和记忆障碍动物模型的药物,但价格昂贵。前几年,我国从中草药中提取出的樟柳碱,其化学结构和药理作用和东莨菪碱相似。不但樟柳碱的药源丰富,价格便宜,而且其毒性较低。为此,本文就以樟柳碱所致学习和记忆障碍的动物模型进行探讨。

实 验 方 法

选用昆明种小鼠,雄性,体重约为 20.0 ± 2.0 克,由中国科学院生物物理研究所动物房提供。实验前随机将动物分为三组,即樟柳碱 I 组、II 组和对照组。本实验分两部分进行:一为学习障碍动物模型的制备;二为记忆障碍动物模型的制备。

学习障碍动物模型的制备是在水迷津中进行的。每天训练动物一次,连续训练 5 天。在每次训练前半小时给樟柳碱 I 组和樟柳碱 II 组动物分别腹腔注射一定剂量的樟柳碱,给对照组动物腹腔注射等容积的生理盐水。将后 3 天的学习成绩进行统计分析。

记忆障碍动物模型的制备是参照国内外常用的制备方法和给药途径并通过步下法和步入法两种方法进行的^[3]。训练前半小时给樟柳碱 I 组和樟柳碱 II 组分别腹腔注射一定剂量的樟柳碱,给对照组动物腹腔注射等容积的生理盐水。

本实验所用的樟柳碱由中国医学科学院药物研究所陈先瑜教授和张均田教授惠赠。

一、学习障碍动物模型的制备

水迷津装置 ($72.5 \times 37.6 \times 20.0$ 厘米³) 是由黑色的有机玻璃组成的,由中国医学科学院药物研究所设计并制造。水深 10 厘米,水温一般控制在 $22.0-25.0^{\circ}\text{C}$ 之间。本装置共设 4 个盲端,终点设有台阶,动物通过台阶可上岸躲避滴水的威胁(图 1)。

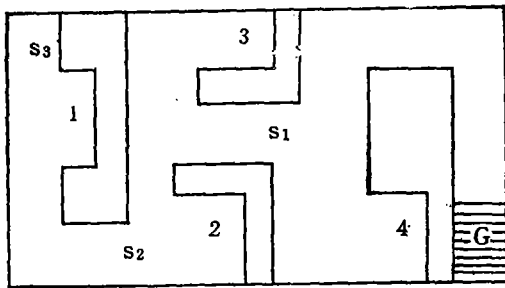


图 1 水迷津内部通路框图

1、2、3、4 分别为盲端; S₁ 为第一起始点; S₂ 为第二起始点; S₃ 为第三起始点; G 为终点台阶

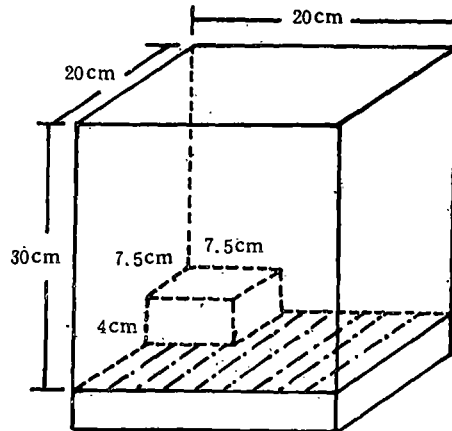


图 2 步下法实验箱示意图

此外,水迷津实验装置还设有自动记时和记数显示部分。它能自动显示动物通过水迷津全程所需的时间以及进入盲路的错误次数。如实验动物在规定时间内未通过全

程,即未能如期到达终点,待特定的时间一到,计时器和计数器便立即自动停止计时和计数。与此同时,报警器便立即自动发出悦耳的报警声。这就表示该实验动物在这规定的时间内没有学会躲避溺水的威胁。本实验将从第二起始点(S_2)起到终点为止的路程作为水迷津的全程,要求动物在 2 分钟内到达终点。

二、记忆障碍动物模型的制备

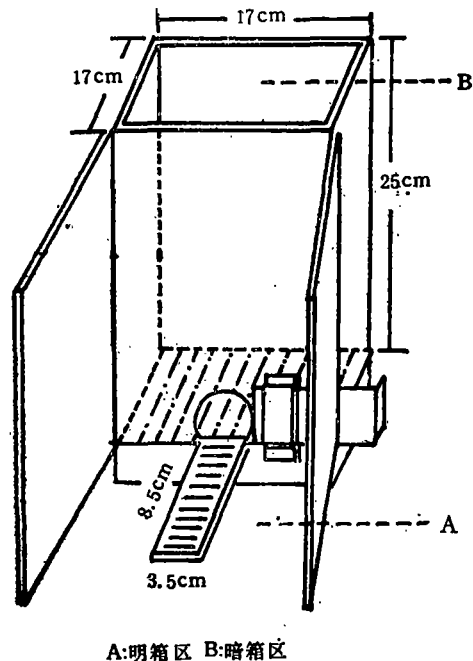
记忆障碍动物模型的制备按如下两种方法进行:

1. 步下法(step down test): 步下法通常又称跳台法。实验箱为 $20.0 \times 20.0 \times 30.0$ 厘米³,由本所工厂自制。它是由白色透明的塑料板组成的。箱底铺以间距为 1.0 厘米的铜栅,可以通电。在实验箱的左后位置 $7.5 \times 7.5 \times 4.0$ 厘米³ 乳白色不透明的塑料板平台(图 2)。由南京无线电厂生产的 SMI-1 型动物试验仪提供电刺激,它能自动控制刺激电流的强度和刺激时间。

实验时,先将动物放入实验箱内适应 3 分钟,再将动物放在平台上并立即通以电流,电流强度为 0.3—0.4 毫安。在通常的情况下当动物从平台上步下受到电击后,其正常反应是跳回平台以逃避电击。有些动物可能再次或多次从平台步下至铜栅上,当它们再次受到电击后,又迅速跳回平台。如此连续训练直至动物在平台上站立满 5 分钟,即作为达到学会的标准。记录在训练时每只动物下台受电击的次数,即错误次数。以此作为训练时动物的学习成绩。训练后 24 小时,将动物再次放置于平台上,以同样的方式进行测查。测查时,记录每只动物第一次步下平台的潜伏期以及 5 分钟内的错误次数。将潜伏期的长短和错误次数的多少以及错误动物所占的百分比作为评价记忆好坏的指标。

2. 步入法(step through test): 本实验装置是由深灰色有机玻璃板组成。它分明箱和暗箱两部分。暗箱的长宽高分别为 $20.0 \times 20.0 \times 30.0$ 厘米。在暗箱的底部铺以铜栅,可以通电。刺激电流同样由 SMI-1 型动物试验仪供给并调节。在暗箱箱体底部的正前方,有一个直径为 4 厘米的门洞,在此洞的下方有一块向箱体外延伸的小板(8.5×3.5 厘米²)。实验时,在这小板的上方设一白炽灯(60 瓦)形成明区,而箱体内部则为暗区(图 3)。

实验时,将动物背向门洞放置于箱体外的小板上,记录动物步入暗箱内的潜伏期。当动物一进入暗箱,立即将门洞关闭,并给予电击(0.3—0.4 毫安),电击时间为 3 秒钟。待电击结束后,将动物放回饲养笼。24 小时以后,再次将动物背向开启的门洞放置于小板上。测查时,当动物进入暗箱后,暗箱的门洞不再关闭,此时暗箱底部通电。观察并记录动物在 5 分钟之内步入暗箱的潜伏期和步入暗箱的错误次数。同样,将潜伏期的长短、错误次数的多少和错误动物所占的百分



A:明箱区 B:暗箱区

图 3 步入法实验箱示意图

比作为评价动物记忆好坏的指标。

实 验 结 果

为了进一步证实樟柳碱对小鼠的学习是否有破坏作用,本实验采用水迷津来观察樟柳碱对小鼠行为活动的影响。

动物在水迷津中从起始点到终点通过全程所花费时间的长短,是衡量它们的学习成绩的一个重要指标。结果表明,樟柳碱 I、II 组动物每天到达终点所费的时间较长,而对照组则较短(表 1)。随着训练时间的延长,对照组动物到达终点的时间愈来愈短。樟柳碱 I 组(5 毫克/公斤)的学习成绩较差,但它和对照组相比,差异并不显著。樟柳碱 II 组(10 毫克/公斤)的学习成绩更差,特别是当训练后第五天,和对照组相比差异非常显著(表 1)。

表 1 各组动物给药后到达终点的时间

组 别	动物数 (只)	给药后到达终点的时间(秒)变化(M±SD)			停药 1 天后到达终 点的时间(M±SD)
		第 三 天	第 四 天	第 五 天	
对 照	13	54.7±48.5	36.2±40.0	20.8±30.4	22.9±28.3
樟柳碱 I (5 毫克/公斤)	12	68.7±45.8	50.7±52.0	28.2±31.4	35.1±36.1
樟柳碱 II (10 毫克/公斤)	12	74.8±48.7	45.5±35.8	67.5±44.2*	34.8±37.5

和对照组比较: * $p < 0.001$

从训练后第三、第四和第五天连续三天的训练成绩来分析,对照组动物有一半以上三天来的学习成绩均在 1 分钟之内到达终点,而樟柳碱 I、II 组的学习成绩比对照组差(表 2)。其中,樟柳碱 II 组(10 毫克/公斤)和对照组之间的差异较为显著($P < 0.01$)。该组没有一只动物能在 1 分钟之内到达终点(表 2)。

表 2 连续 3 天均在 1 分钟之内达到终点的各组动物数

组 别	剂 量 (毫克/公斤)	动物数 (只)	连续 3 天到达终点均在 1 分 钟之内的动物数(%)
对 照	...	13	7/13(53.8)
樟柳碱 I	5.0	12	2/12(16.7)
樟柳碱 II	10.0	12	0/12(0)*

和对照组比较: * $P < 0.01$

动物在水迷津训练中进入盲路的次数,即错误次数的多少是判断它们的学习成绩的另一个重要指标。本实验的结果表明,樟柳碱可使动物进入盲路的错误次数增加(表 3)。不过,樟柳碱 I 组和对照组之间的差异无统计学意义。训练后第四天,樟柳碱 II 组和对照组之间的差异开始明显($P < 0.05$)。训练后第五天,两组之间的差异更为明显($P < 0.005$)。

樟柳碱对小鼠的步下行为有影响。不过,当樟柳碱的剂量为 5 毫克/公斤时,其影响不甚明显,而当樟柳碱的剂量为 10 毫克/公斤时,其影响较为明显(表 4)。对照组所有动物的潜伏期均为 300 秒。这就是说,对照组动物在平台上的站立时间均在 5 分钟或 5 分钟以上,在测验时没有一只动物步下平台而受到电击。而樟柳碱(10 毫克/公斤)能使动

表3 两分钟内各组动物进入盲路的错误次数

组 别	动物数 (只)	给药后错误次数的变化(M±SD)			停药 1 天后的错误 次数(M±SD)
		第三天	第四天	第五天	
对 照	13	6.2±6.2	3.4±3.7	2.1±3.8	2.5±3.4
樟柳碱 I (5毫克/公斤)	12	11.4±8.8	7.4±7.3	3.8±4.6	5.4±4.8
樟柳碱 II (10毫克/公斤)	12	11.5±7.8	8.8±6.8*	12.0±8.7**	4.3±4.8

和对照组比较: *P<0.05; **P<0.005

表4 樟柳碱对小鼠步下行为的影响

组 别	剂 量 (毫克/公斤)	动物数 (只)	训练后 24 小时动物的行为反应		
			潜伏期(秒) (M±SD)	错误次数 (M±SD)	错误动物的百分数 (%)
对 照	...	13	300.0±0	0	0
樟柳碱 I	5.0	12	275.3±85.7	0.1±0.3	8.3
樟柳碱 II	10.0	13	82.5±131.4*	0.9±0.7	69.2*

和对照组比较: *P<0.001

表5 樟柳碱对小鼠步入行为的影响

组 别	剂 量 (毫克/公斤)	动物数 (只)	训练后 24 小时动物的行为反应		
			潜伏期(秒) (M±SD)	错误次数 (M±SD)	错误动物的百分数 (%)
对 照	...	13	247.3±87.1	0.4±0.7	30.8
樟柳碱 I	5.0	12	111.5±129.6*	0.9±0.7	75.0*
樟柳碱 II	10.0	13	107.9±98.7**	1.5±0.9*	92.3**

和对照组比较: *P<0.05; **P<0.01

物的潜伏期明显缩短 ($P<0.001$), 使动物的错误次数增加, 并且, 有半数以上的动物步下平台曾受到 1 次或多次电击 ($P<0.001$)。

樟柳碱 5 毫克/公斤或 10 毫克/公斤均可使动物步入暗箱的潜伏期明显缩短, 使动物的错误次数增加, 并且, 樟柳碱可使错误反应动物所占的百分率增加 (表 5)。其中, 以樟柳碱剂量为 10 毫克/公斤时则更为明显 ($P<0.001$)。

讨 论

本实验成功地用樟柳碱制备了学习和记忆障碍的动物模型。实验结果表明, 在我们的实验条件下以樟柳碱剂量为 10 毫克/公斤所制备的学习和记忆的动物模型较为理想。该剂量组的各项观察指标和对照组相比, 其差异较为显著。而当樟柳碱剂量为 5 毫克/公斤时, 只能大致看到动物有学习和记忆障碍的趋势。和对照组相比, 除个别指标有显著性差异外, 一般来说, 其差异均不甚显著或不显著。

目前,制备学习和记忆障碍动物模型的方法很多,有电休克和电损毁的方法,有造成脑部缺血和缺氧的方法,还有应用某些化学制剂或神经毒素以及睡眠剥夺等方法^[4]。现在,可利用不同的给药方式来观察药物对学习和不同的记忆过程的影响。国内外有关学者一般认为,训练前给药,可观察药物对学习和记忆获得的影响;训练后给药,可观察药物对记忆保持的影响;测验前给药,可观察药物对记忆提取的影响。本实验选用的是训练前给药的方法。

一个动物模型能否正确地反映人类心理紊乱的基本特征,这是制备各种心理障碍动物模型成败的关键。一般来说,动物模型和人类实际的心理障碍之间有明显的差别,而且,动物模型只是人类的真正疾病或心理紊乱的一种简化形式或单纯的复制。正如 Mckinney 于1977年所叙述的那样^[5]，“模型就是模型”，而不是疾病的本身。事实上,没有一个动物模型是人类疾病的完善的和精确的复制品。更确切地说,动物模型通常是以高度简化和理论化为基础的,而不是全面的概括形式。动物模型永远不会是“真正的疾病”,而只是真正疾病的模型。

过去,评价动物模型缺乏确切的标准。近年来,许多研究者已提出作为判断心理障碍动物模型的若干标准。一般认为有三条标准,即动物模型的效度、特征性和实用性。Oltson(1985)指出^[6],记忆障碍动物模型的效度最终会受到如下三个方面的检验:1.涉及正常记忆的脑机制;2.能复制引起记忆损害的病理变化;3.通过治疗能减轻记忆损害。因此,他认为,一个动物模型如能反映或包括上述的三个方面,这方可认为是成功的动物模型。本实验采用樟柳碱造成动物的学习和记忆障碍,它完全能反映上述的三个方面。我们知道,胆碱能药物参与调节动物和人的学习和记忆过程。我们以往的工作多次表明^[7,8],樟柳碱和东莨菪碱同属抗胆碱能制剂。石杉碱甲等胆碱能激动剂可逆转、颀颀和改善樟柳碱所致动物的学习和记忆障碍。因此,可以认为,樟柳碱是制备学习和记忆障碍较理想的化学制剂,其优点是不但制备的方法简单,价格便宜和节省时间,而且方法可靠以及重复性好。它完全可代替进口的东莨菪碱。现在,樟柳碱不但可从我国天然的丰富的植物资源中提取,而且也可以人工合成。

我们必须对每一个动物模型进行客观的评价。好的并有代表性的动物模型要使其不断完善,并将推广到生理心理学和医学心理学中去应用。过去,动物模型对医学心理学已作出了重要的贡献。我们深信,不久,动物模型对医学心理学将会起更大的作用。

参 考 文 献

- [1] 管林初, 动物模型与医学心理学, 许淑莲主编, 医学心理学研究方法, 1989, 235—259, 团结出版社。
- [2] 管林初, 认知功能障碍及其治疗药物的研究, 药理学进展(1986), 中国药理学会编, 1987, 237—247, 人民卫生出版社。
- [8] Verloes, R. et al., Effects of Nootropic Drugs in a Scopolamine-induced Amnesia Model in Mice, *Psychopharmacology*, 1988, (95)226—230.
- [4] 张均田, 学习记忆的神经生理生化机制和药物研究现状, 药理学进展(1986), 中国药理学会编, 1987, 224—236, 人民卫生出版社。
- [5] Suomi, S.J., Relevance of Animal Models for Clinical Psychology, in "Handbook of Research Methods in Clinical Psychology", Kendall, P.C., Butcher, J.N., Eds., 1982, 249—271, John Wiley & Sons, New York.
- [6] Olton, D. S., Strategies for the Development of Animal Models of Human Memory Impairments, in "Memory Dysfunction", Olton, D.S., Gamzu, E., et al., Eds., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1985, (444), 113—121.
- [7] 管林初, 崔秋耕, 石杉碱甲对东莨菪碱和樟柳碱所致动物记忆障碍的改善作用, 第一届中国科学院神经科学学术会议论文集, 1990, 106.
- [8] 管林初, 陈双双, 崔秋耕等, 石杉碱甲对动物行为和脑皮层电图的影响, *心理学报*, 1991, (4)75—80.

INVESTIGATION INTO ANIMAL MODELS OF LEARNING AND
MEMORY DISORDER INDUCED BY ANISODINE

Guan Linchu Cui Qiugeng

Institute of Psychology, Academia Sinica

Abstract

Using anisodine to prepare animal models of learning and memory disorder with water maze test, step down test and step through test in mice was introduced in this paper. The results showed, anisodine (10 mg/kg) could significantly induce learning disorder in mice; Time through all pathways in the water maze was prolonged and errors in passing the blind alleys obviously increased. Anisodine (10 mg/kg) could significantly produce memory dysfunction in mice; the latencies of the step down test and step through test were significantly shortened, and errors of response in the step down test and step through test increased. The results further indicated that the step through test is more sensitive than the step down test for testing memory dysfunction in mice.

Key words: anisodine, learning and memory, water maze test, step down test, step through test, animal model