

# 腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂对学习记忆的影响及机制分析

张丹参<sup>1,2</sup>, 任雷鸣<sup>1\*</sup>

(1. 河北医科大学 药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 张家口医学院 药理学教研室, 河北 张家口 075029)

**摘要:** 目的 探讨腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂对学习记忆的影响及其与胆碱能、氨基酸能神经的关系。方法 采用避暗实验、分光光度法和 HPLC 法, 观察腺苷 A<sub>1</sub> 受体特异性阻断剂 8-环戊-1,3-二丙基黄嘌呤(DPCPX)对东莨菪碱(Scop) 2-氨基-5-磷戊酸(AP<sub>5</sub>)致小鼠记忆障碍及脑胆碱酯酶(AChE)活性、氨基酸水平的影响。结果 DPCPX可显著改善 Scop 致记忆障碍,但对 AP<sub>5</sub> 致记忆障碍无影响;在体内外高剂量 DPCPX 可显著抑制小鼠脑 AChE 活性;DPCPX icv 可显著升高小鼠脑 Glu 和 Asp 含量,降低 GABA 含量,使脑内 Glu/GABA 比值显著升高。结论 腺苷 A<sub>1</sub> 受体特异性阻断剂 DPCPX 可显著改善 Scop 而不能改善 AP<sub>5</sub> 致记忆障碍,在高剂量时可影响脑 AChE 活性和脑氨基酸水平,升高脑内 Glu/GABA 比值。

**关键词:** 8-环戊-1,3-二丙基黄嘌呤; 腺苷 A<sub>1</sub> 受体; 记忆; 2-氨基-5-磷戊酸; 胆碱酯酶; 谷氨酸; γ-氨基丁酸  
中图分类号: R338.64; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)06-0416-04

## Effect of adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist on learning and memory and analysis of its mechanism

ZHANG Dan-shen<sup>1,2</sup>, REN Lei-ming<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;  
2. Department of Pharmacology, Zhangjiakou Medical College, Zhangjiakou 075029, China)

**Abstract:** **Aim** To study the effect of blocking adenosine A<sub>1</sub> receptors on learning and memory and the relation with cholinergic and aminoacidergic nerve. **Methods** Using step through test, spectrophotometry and HPLC method, the effect of selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, 0.3, 0.15, 0.075, 0.03, 0.015 μg, icv) on memory impairment by scopolamine (Scop, 3 mg·kg<sup>-1</sup> ip) or 2-amino-5-phosphonovaleric (AP<sub>5</sub>, 2.5 ng, icv), acetylcholinesterase (AChE) activity and aminoacid level in brain of mice was studied. **Results** DPCPX was shown to significantly improve scopolamine-induced memory impairment, but not AP<sub>5</sub>-induced. The activity of AChE in mouse brain was significantly inhibited by large doses of DPCPX *in vitro* and *in vivo* test. DPCPX (0.3 μg, icv) was shown to significantly increase the content of glutamate and aspartic acid in brain of mice. DPCPX (0.3, 0.15 μg, icv) significantly decrease GABA and increase Glu/GABA in brain of mice. **Conclusion** The selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist DPCPX was shown to significantly improve scopolamine but not AP<sub>5</sub>-induced memory impairment. Large doses of DPCPX was shown to influence the AChE activity and the changes in aminoacid level in brain, especially increase Glu/GABA.

**Key words:** 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; adenosine A<sub>1</sub> receptor; memory; 2-amino-5-phosphonovaleric; acetylcholinesterase; glutamate; GABA

胆碱能、氨基酸能神经功能与学习记忆的关系已经得到肯定<sup>[1,2]</sup>,腺苷 A<sub>1</sub> 受体与学习记忆的相关性也有大量报道<sup>[3,4]</sup>。有资料表明,兴奋性氨基酸

收稿日期: 2002-08-22.

基金项目: 河北省科技攻关项目(00276147D).

\* 通讯作者 Tel: 86-311-5616164, E-mail: ren-leiming@263.net

NMDA 受体在脑组织的分布与腺苷 A<sub>1</sub> 受体分布完全一致<sup>[5]</sup>。但它们在学习记忆中的相互关系,特别是腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂改善学习记忆障碍的作用机制迄今未见报道。本文通过腺苷 A<sub>1</sub> 受体特异性阻断剂 8-环戊-1,3-二丙基黄嘌呤(8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, DPCPX)对学习记忆、胆碱酯酶(AChE)和氨基酸水平的影响,进一步探讨腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断在学习记忆中的作用机制及其与胆碱能、氨基酸能神经的关系。

## 材料与方法

**药品及试剂** 8-环戊-1,3-二丙基黄嘌呤(8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, DPCPX),2-氨基-5-磷戊酸(2-aminō-5-phosphonovaleic, AP<sub>5</sub>),碘化乙酰硫代胆碱(acetylthiocholine iodide, AThch),Sigma 公司;5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB),Fluka 公司;水杨酸毒扁豆碱(physostigmine),中国医药公司上海采购供应站;5-磺基水杨酸,北京国华化学试剂厂。内标液配制:L-正缬氨酸(L-norvaline),中国医药(集团)上海化学试剂公司,用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶解,双蒸水稀释(HCl:水=1:10),终质量浓度 0.4 g·L<sup>-1</sup>。乙腈和甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

**仪器** 惠普 1100 高效液相色谱,美国 Agilent;756MC 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器厂;SBA-2 型程控避暗箱,中国医学科学院药物研究所;DY89-I 型电动玻璃匀浆机,宁波新芝科器研究所;DK-8B 型电热恒温水槽,上海精密实验设备有限公司;PHS-3C 型酸度计,萧山市分析仪器厂;D-37520 冷冻离心机,德国 HERAEUS。

**动物** 昆明种小鼠 295 只,体重 23~25 g,由中国医学科学院药物研究所提供。

**避暗试验**<sup>[6]</sup> 采用 SBA-2 型程控避暗箱。小鼠 δ,随机分组。训练 3 min,24 h 后测验,纪录 3 min 内动物进入暗室的潜伏期及错误次数。

**对东莨菪碱致记忆障碍实验**:dl 训练前 10 min,各组分别 ip 生理盐水(normal saline, NS)或氢溴酸东莨菪碱(scopolamine, Scop) 3 mg·kg<sup>-1</sup>,训练前 3 min 各组分别 icv NS 及各剂量 DPCPX 5 μL,用水杨酸毒扁豆碱(0.3 μg, icv)作阳性对照,24 h 后测验记忆成绩。

**对 AP<sub>5</sub> 致记忆获得障碍实验**:dl 训练前各组分别 icv 生理盐水 5 μL 或 AP<sub>5</sub> 2.5 ng 于左侧脑室,30 s

后各组再分别 icv NS 或各剂量 DPCPX 5 μL 于右侧脑室,3 min 后进行训练,24 h 后测验记忆成绩。

**脑 AChE 活性测定**<sup>[7]</sup> 按文献方法制备标准曲线:  $C(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}) = 383.07 A - 21.15$ ,  $r = 0.9999$ 。

**icv 测定脑 AChE 活性**:取同胎小鼠,δ♀兼用,随机分组,各组分别 icv 生理盐水,水杨酸毒扁豆碱(0.3 μg),DPCPX(0.3, 0.15 μg)。icv 5 min 后断头取脑(去小脑和脑膜),用冷冻的 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.4 PBS 液制成 1% 脑匀浆(16 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 s)。按文献方法测各管吸光度(A),用测定管 A 减去对照管 A,查标准曲线,并换算成每克湿组织 AChE 的活性。

**体外测定脑 AChE 活性**:取小鼠 1 只,δ,断头,同上制备脑匀浆。生理盐水组的对照管和测定管加入生理盐水 0.1 mL,给药 I 和 II 组的对照管和测定管分别加入 30 和 15 mg·L<sup>-1</sup> DPCPX 溶液 0.1 mL。同上测定脑 AChE 活性。

**脑氨基酸水平测定** 取同胎小鼠,δ♀兼用,随机分组,各组分别 icv 生理盐水, DPCPX 0.3, 0.15 μg。5 min 后断头取脑(去小脑和脑膜),滤纸吸干,称重后用冰冷的 4% 磺基水杨酸 4 mL 制备脑匀浆(16 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 s),冷冻离心(20 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min)沉淀变性蛋白,取上清液,采用高效液相色谱(HPLC)法测定脑氨基酸水平。

**色谱条件**:色谱柱为 2.1 mm×200 mm,固定相为 Hypersil AA-ODS, 5 μm。流动相 A:0.02 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠-三乙胺-四氢呋喃(500:0.09:1.5), pH 7.20。流动相 B:0.1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠-乙腈-甲醇(1:2:2), pH 7.20。检测波长为 330 nm。柱前衍生化:样品(含 5 μL 内标) 100 μL + 衍生剂 100 μL,混匀(30 s),过 0.45 μm 滤膜,在 3 min 内进样 20 μL。梯度洗脱:流速 0.450 mL·min<sup>-1</sup>, 18~24 min 时流速增加到 0.80 mL·min<sup>-1</sup>,测定样品全过程 25 min。结果计算:样品与内标峰高比值×内标品含量(μg)/脑重(g) = 各氨基酸的含量(μg·g<sup>-1</sup> 脑组织)。

**数据分析和统计** 用 INSTAT-2 统计软件进行统计。数据资料采用 t 检验,方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示;错误百分率比较采用  $\chi^2$  检验。

## 结果

### 1 DPCPX 对 Scop 致记忆障碍的影响

结果表明:在避暗试验中, DPCPX 各剂量组可显著改善 Scop 引起的记忆获得障碍,与 Scop + NS 组相比,显著延长小鼠进入暗室的潜伏期( $P <$

0.001), 减少错误次数 ( $P < 0.01$ , 0.001) 及错误百分率 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

### 2 DPCPX对 AP<sub>5</sub> 致记忆障碍的影响

结果表明:在避暗试验中, DPCPX 各剂量组均不能对抗 AP<sub>5</sub> 引起的记忆获得障碍, 与 AP<sub>5</sub> + 生理盐水组相比无显著性差异。结果见表 1。

**Table 1 Effect of 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) icv in step-through test on mice of 2-amino 5-phosphonovaleric (AP<sub>5</sub>) (2.5 μg · 5 L<sup>-1</sup>, icv)-induced memory impairment (n = 15,  $\bar{x} \pm s$ )**

Group (icv)	Dose / μg	Latency / s	No. of error / 3 min	Animals showing error / %
NS + NS		155 ± 47	0.3 ± 0.4	27
AP <sub>5</sub> + NS		62 ± 59 <sup>***</sup>	2.1 ± 1.5 <sup>***</sup>	80 <sup>**</sup>
AP <sub>5</sub> + DPCPX	0.3	79 ± 66	1.6 ± 1.3	73
	0.15	75 ± 64	1.7 ± 1.2	87
	0.075	83 ± 63	1.6 ± 1.4	80
	0.03	80 ± 67	1.6 ± 1.3	73
	0.015	75 ± 62	1.5 ± 0.9	87

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs NS + NS

### 3 DPCPX体外给药对脑 AChE 活性的影响

结果表明:与生理盐水组相比, DPCPX 3.0 μg 剂量组对小鼠脑 AChE 活性有显著抑制作用 ( $P < 0.001$ ), 而 DPCPX 1.5 μg 剂量组对脑 AChE 活性无

影响 ( $P > 0.05$ )。

### 4 DPCPX icv 对脑 AChE 活性的影响

结果表明:与生理盐水组相比, 水杨酸毒扁豆碱 (0.3 μg), DPCPX (0.3, 0.15 μg) icv 均可显著抑制小鼠脑 AChE 活性, 但 DPCPX 对脑 AChE 活性的抑制作用较毒扁豆碱弱。结果见表 2。

**Table 2 Influence of DPCPX icv on acetylcholinesterase (AChE) activity in mouse brain (n = 12,  $\bar{x} \pm s$ )**

Group (icv)	Dose / μg	Concentration of AChE / μmol · g <sup>-1</sup> brain tissue
NS		272 ± 6
DPCPX	0.3	250 ± 8 <sup>***</sup>
	0.15	261 ± 10 <sup>**</sup>
Physostigmine	0.3	225 ± 7 <sup>***</sup>

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs NS

### 5 DPCPX icv 对脑氨基酸水平的影响

结果表明:与生理盐水组相比, DPCPX 0.3 μg 剂量组可显著增加小鼠脑组织谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp) 含量, 两个剂量组均可显著降低 γ-氨基丁酸 (GABA) 含量, 且 DPCPX 各剂量组升高小鼠脑组织 Glu/GABA 比值的差异更显著。结果见表 3。

**Table 3 Influence of DPCPX icv on aminoacid concentration in mouse brain (n = 7,  $\bar{x} \pm s$ )**

Group (icv)	Dose / μg	Concentration of aminoacid / μg · g <sup>-1</sup> brain tissue			Glu/GABA
		Asp	Glu	GABA	
NS		5.9 ± 0.7	27.7 ± 1.6	31.9 ± 2.6	0.87 ± 0.03
DPCPX	0.3	7.4 ± 0.9 <sup>**</sup>	30.5 ± 1.7 <sup>**</sup>	28.6 ± 2.7 <sup>*</sup>	1.07 ± 0.04 <sup>***</sup>
	0.15	6.3 ± 1.0	27.5 ± 1.7	28.7 ± 2.8 <sup>*</sup>	0.96 ± 0.04 <sup>***</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs NS

## 讨论

越来越多的证据表明, 中枢胆碱能神经系统功能状态与学习记忆密切相关<sup>[2]</sup>。而中枢抑制性递质 GABA 和兴奋性递质 Glu 对学习记忆的影响是继胆碱能神经之后神经递质调控学习记忆功能的又一重要课题, Glu 在脑内对学习记忆起极为重要的正性调节作用, 主要是通过 NMDA 受体而实现的<sup>[1,8]</sup>。icv NMDA 可改善学习记忆障碍<sup>[9]</sup>, 而 NMDA 受体特异性阻断剂 AP<sub>5</sub> 对记忆有损害作用<sup>[10]</sup>, 本实验中也得到了证实。

近年来, 腺苷 A<sub>1</sub> 受体与学习记忆的相关性研究

日益受到关注。研究证实, 腺苷 A<sub>1</sub> 受体分布极为广泛, 在对大鼠各组织原位杂交和受体放射自显影研究发现, 腺苷 A<sub>1</sub> 受体在脑基底核、海马、小脑等部位细胞表面的密度最高<sup>[11]</sup>。有资料表明<sup>[3,12-15]</sup>, 选择性腺苷 A<sub>1</sub> 受体激动剂可损害记忆, 腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂则对记忆损害有改善作用, 而腺苷 A<sub>2</sub> 受体激动剂无记忆损害作用。研究结果还显示, 在大鼠水迷宫试验中 DPCPX 可保护短暂缺氧造成的记忆损害<sup>[4]</sup>, 而选择性腺苷 A<sub>1</sub> 受体激动剂环戊腺苷 (cyclopentyladenosine, CPA) 可显著损害小鼠被动回避实验中的记忆保持<sup>[15]</sup>。上述研究均表明, 腺苷 A<sub>1</sub>

受体与学习记忆功能的调控有关。

另有资料表明,腺苷 A<sub>1</sub> 受体与 NMDA 受体的分布基本平行<sup>[5,11]</sup>,且腺苷 A<sub>1</sub> 受体激动剂和 NMDA 受体阻断剂具有协同作用<sup>[16]</sup>。因此,为了更进一步证实腺苷 A<sub>1</sub> 受体在记忆调控中的作用及其与脑内 Glu/GABA、胆碱能神经等已知学习记忆调节系统的相互关系,本文通过避暗试验观察到,腺苷 A<sub>1</sub> 受体特异性阻断剂 DPCPX 可拮抗胆碱受体阻断剂 Scop 引起的记忆障碍,并通过体内外试验证实:DPCPX 在高剂量时显著抑制脑 AChE 活性,提示其改善 Scop 致记忆损害作用与抑制脑内 AChE 活性有关。在避暗试验中还观察到,NMDA 受体特异性阻断剂 AP<sub>5</sub> 可以造成记忆损害,与文献<sup>[10]</sup>报道一致,但 DPCPX 不能改善 AP<sub>5</sub> 引起的记忆损害。研究结果表明,NMDA 受体阻断剂与腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂具有拮抗作用,可能 DPCPX 的记忆改善作用与 NMDA 受体的功能状态有关,或者说是有赖于 NMDA 受体的功能完整性。上述结果与两类受体的分布完全一致的观点有相似之处。为进一步证实 DPCPX 与脑内 Glu/GABA 学习记忆调节系统的关系,本文通过 HPLC 法测定小鼠脑内 Glu、Asp 和 GABA 水平实验观察到,高剂量 DPCPX icv 可显著降低脑 GABA 水平,升高 Glu 和 Asp 浓度,而且 Glu/GABA 的比值升高更显著,与脑内 Glu/GABA 学习记忆调节系统的理论观点<sup>[1]</sup>相吻合。结果提示,腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂 DPCPX 可通过改变 Glu/GABA 的比值,进而调控学习记忆功能状态,考虑到其不能对抗 AP<sub>5</sub> 的作用,故认为其作用影响环节很可能通过 NMDA 受体。有理由认为,腺苷 A<sub>1</sub> 受体阻断剂 DPCPX 可以通过抑制脑 AChE 活性和改变脑内 Glu/GABA 比值双重环节影响学习记忆过程。腺苷 A<sub>1</sub> 受体在胆碱能、氨基酸能神经的学习记忆调控中起着重要的作用,其作用很可能与 NMDA 受体相偶联,但其确切机制尚有待深入研究。

## References:

- [1] Zhang SS, Zhang L, Zhang DS. Cerebral glutamate/GABA system to regulate learning and memory [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1997, 32(8): 638 - 640.
- [2] Tang YP. Central cholinergic mechanism of learning and memory [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1993, 9(2): 85 - 89.
- [3] Pereira GS, Mello e Souza T, Vinade ERC, et al. Blockade of adenosine A<sub>1</sub> receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 437(3): 151 - 154.
- [4] Sun MK, Xu H, Alkon DL. Pharmacological protection of synaptic function spatial learning and memory from transient hypoxia in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300(2): 408 - 416.
- [5] Olney JW, Labruyere J, Wang G, et al. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention [J]. *Science*, 1991, 254(3): 1515 - 1518.
- [6] Shen LX, Zhang DS, Zhang L, et al. Action of osthon on learning and memory and its mechanism analysis [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1999, 34(6): 405 - 409.
- [7] Chen Q. *Experiment Method of Study on Antisenility* (抗衰老研究实验方法) [M]. Beijing: China Medic-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1996. 108 - 110.
- [8] Koles L, Wirkner K, Illes P. Modulation of ionotropic glutamate receptor channels [J]. *Neurochem Res*, 2001, 26(8-9): 925 - 932.
- [9] Zhang DS, Xue GP, Zhang L, et al. Effect of intracerebroventricular injection of N-methyl-D-aspartate on learning and memory in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1993, 28(5): 321 - 325.
- [10] Tonkiss J, Morris RGM, Rawlins, JNP. Intraventricular infusion of the NMDA antagonist AP<sub>5</sub> impairs performance on a non-spatial operant DRL task in the rat [J]. *Exp Brain Res*, 1988, 73(1): 181 - 188.
- [11] Shen FM, Chu ZX, Su DF. The cardiovascular effect of adenosine [A]. Wang YM, Su DF. *Advance in Pharmacology* (药理学进展) [M]. Beijing: Science Press, 2000. 54 - 60.
- [12] Tchekalarova J, Kambourova T, Georgiev V. Interaction of angiotensin II and III with A(1) receptor related drugs in passive avoidance conditioning in rat [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 129(1-2): 61 - 64.
- [13] Homayoun H, Khavandgar S, Zarrindast MR. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on pentylene tetrazole-induced amnesia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 430(2-3): 289 - 294.
- [14] Hauber W, Bareiss A. Facilitative effects of an adenosine A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period [J]. *Behav Brain Res*, 2001, 118(1): 43 - 52.
- [15] Tabata K, Matsumoto K, Murakami Y, et al. Ameliorative effects of paeoniflorin, a major constituent of peony root, on adenosine A<sub>1</sub> receptor mediated impairment of passive avoidance performance and long-term potentiation in the hippocampus [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(5): 496 - 500.
- [16] Assi AA. N<sup>6</sup>-cyclohexyladenosine and 3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-1-propenyl-1-phosphonic acid enhance the effect of antiepileptic drugs against induced seizures in mice [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2001, 4(1): 42 - 51.