

(-), (+) 黄皮酰胺对大鼠海马突触传递功能的不同影响

刘少林 张均田

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 采用细胞外电生理记录法记录了低频刺激所诱发的麻醉大鼠海马齿状回颗粒细胞层群峰电位(PS)并比较了侧脑室注射(-), (+)黄皮酰胺对PS及强直刺激所诱导的长时程增强效应(LTP)作用。结果表明:低剂量(1 nmol)时, (-)或(+)黄皮酰胺都对基础状态下的PS没有影响。对LTP(+)黄皮酰胺也无作用, (-)黄皮酰胺表现为增强作用;将剂量提高至4 nmol时, (-)黄皮酰胺对基础PS和LTP都有增强作用且对LTP的作用表现出一定的剂量依赖性, (+)黄皮酰胺对PS仍无影响, 对LTP有一定的抑制作用。提示黄皮酰胺对海马齿状回突触传递活动的作用具有光学选择性, 这一结果有力地支持了(-)黄皮酰胺促智作用的行为学和神经生化学研究结果。

关键词 黄皮酰胺; 长时程增强效应; 海马齿状回; 群峰电位

黄皮酰胺是从黄皮[*Clausena lansium* (Lour) Skells] 叶中提取的有效成分, 我所合成室已完成它的全合成并用拆分技术分离出了它的对映异构体。已有多种行为学实验证明^[1], (-)黄皮酰胺有明显的促智作用。离体实验也证实^[1], (-)黄皮酰胺对已被公认为是学习记忆神经生理机制的海马突触传递长时程增强效应(LTP)有明显的增强作用。为了进一步证实(-)黄皮酰胺对活体动物海马结构LTP的作用并同时比较(-), (+)黄皮酰胺的作用, 本实验用在体记录LTP的电生理学方法观察了这对光学异构体对麻醉大鼠海马齿状回基础突触传递活动和LTP的影响。

材料与方 法

动物 ♀ Sprague Dawley 大鼠(220 ± 20 g), 由中国药品生物制品检定所实验动物中心提供。

药品与试剂 黄皮酰胺由本所合成室黄量

教授课题组提供。先以二甲基亚砜(DMSO)配成0.5 mol·L⁻¹的贮存液置4℃冰箱保存。临用前以0.9%生理盐水稀释至所需浓度。

电极的埋植 动物以20%(w/v)乌拉坦(1.0 g·kg⁻¹, ip)麻醉并固定于立体定位仪上, 参照Pellegrino大鼠脑立体定位图谱在定位坐标为AP_{0.5-0.8}, L_{1.6-1.8}的位置用电钻在颅骨上钻一直径1.5 mm的小孔并将一外径0.8 mm的小钢管插入侧脑室。再以同样的方法埋植刺激和记录电极, 刺激电极(两枚间距0.5 mm, 外覆聚四氟乙烯绝缘层, 尖端裸露0.2 mm, 直径0.15 mm的不锈钢针构成)埋植于内嗅区穿通路(perforant path, PP)纤维间, 其定位坐标为: AP_{7.5-7.8}, L_{4.4-4.6}, H_{3.5-4.0}。记录电极(外覆绝缘层, 直径0.2 mm, 尖端裸露0.2 mm的不锈钢针)则埋藏在海马齿状回颗粒细胞层, 其定位坐标为: AP_{3.7-4.0}, L_{2.4-2.7}, H_{3.0-3.5}。埋植是在立体定位仪上按定位坐标并分别调整刺激电极和记录电极的位置, 找到以固定强度的刺激记录到最大的群峰电位(population spike, PS)时将电极固定。

PS的记录及其幅值的计算方法 PS幅值被作为齿状回颗粒细胞群兴奋性的指标。PS

本文于1997年6月16日收到。

本文为国家自然科学基金资助重大项目(No 29790121)

的记录是采用细胞外记录法。测试刺激(波宽为 0.15 ms 的方波刺激)由电子刺激器产生后,经刺激隔离器和刺激电极输向 PP,测试刺激频率为每 30 s 一次,刺激强度则采用引起最大 PS 所需刺激强度的 1/2。PS 幅值的计算方法如图 1A 所示,取第一(1)和第二个正相峰端(3)分别至负相峰端(2)的平均垂直距离。

强直刺激参数 LTP 是由 10 串电刺激所诱导,每串刺激由 5 个波宽 0.2 ms,频率 200 Hz 的方波组成,串刺激间隔为 200 ms,刺激强度与测试刺激相同。

给药方法与剂量 (-), (+) 黄皮酰胺和相应浓度的助溶剂 DMSO 都是通过植入侧脑室的套管给予。将连接微量注射器的细塑管导入套管后,稳定一定时间再记录 30 min 的 PS,代表给药前的基础突触传递,然后于 5 min 内将 5 μ l 的相应药物或助溶剂缓慢注入侧脑室。为了不影响记录,细塑管留置于套管内至实验结束。

药物剂量是在假设脑容量为 2 ml 的条件下,按理论上要达到的脑组织中的药物浓度而计算出来的^[2]。这样,当给以 5 μ l 的 2×10^{-4} mol \cdot L⁻¹ 或 8×10^{-4} mol \cdot L⁻¹ 的药物时,其在脑组织中的浓度将分别达到 0.5 μ mol \cdot L⁻¹ 和 2.0 μ mol \cdot L⁻¹; 5 μ l 的 0.08% (v/v) DMSO (比重 1.096, MW 78.13) 所含的 DMSO 量为 56 nmol,用该剂量时,脑组织中的 DMSO 浓度达 2.8×10^{-5} mol \cdot L⁻¹。

数据的分析与统计 每个测试刺激都诱发出一个 PS,将连续 10 个 PS 幅值的平均值作为一个时间点的 PS 幅值。以给药前 30 min 所测得 6 个时间点的 PS 幅值平均,再以该平均值分别除以所有时间点的 PS 幅值得出各相应时间点的 PS 相对幅值(%),最后以时间为横坐标,PS 相对幅值(%)为纵坐标绘出 PS 幅值的动态变化图。曲线下面积只计算 PS 动态图中强直刺激后第 10 min 到第 60 min 之间水平线 100% 以上的曲线下面积,用 Pharmacologic

Calculation System (Version 4.1) 软件进行分析和统计。

组间比较用 t 检验。

结 果

1 (-), (+) 黄皮酰胺对基础突触传递活动的影响

如图 1 所示,给以 2×10^{-4} mol \cdot L⁻¹ 的 (-) 或 (+) 黄皮酰胺 5 μ l 均对 PS 的幅值无影响。若将剂量增大 4 倍 (8×10^{-4} mol \cdot L⁻¹), 可见 (-) 黄皮酰胺组在给药 15 min 后 PS 幅度逐渐增大,而 (+) 黄皮酰胺组的 PS 幅度略有减小。t = 15 min, 对照组 PS 幅值为 110% \pm 9% (n = 5), (-) 黄皮酰胺组为 121% \pm 13% (n = 5, P < 0.05), (+) 黄皮酰胺组为 107% \pm 8% (n = 5, P > 0.05)。t = 60 min, 对照组 PS 幅值 102% \pm 7% (n = 5), (-) 黄皮酰胺组为 183% \pm 30% (n = 5, P < 0.05), (+) 黄皮酰胺组为 86% \pm 18% (n = 5, P > 0.05)。

2 (-), (+) 黄皮酰胺对强直刺激所诱导的 LTP 的影响

本实验所用的强直刺激型式很接近动物海马的 θ 节律自发电活动,能有效诱导海马齿状回 LTP 的形成。强直刺激都是在给药后 15 min 施加。如图 2 所示,对照组 (n = 5) 在强直刺激后,PS 幅值明显增大并维持 1h 无明显减弱。t = 0 min, PS 幅值 107% \pm 11%; t = 5 min, PS 达 227% \pm 25%; t = 60 min, PS 为 204% \pm 18%。 2×10^{-4} mol \cdot L⁻¹ (-) 黄皮酰胺组 (n = 5) 在强直刺激后,PS 幅度较对照组显著增大, t = 5 min, PS 幅值 277.4% \pm 16% (P < 0.01); t = 60 min, PS 幅值 252% \pm 4% (P < 0.01)。同剂量的 (+) 黄皮酰胺组 (n = 5) 却与对照组无显著差异, t = 5 min, PS 幅值 216% \pm 10% (P > 0.05); t = 60 min, PS 幅值 201% \pm 16% (P > 0.05)。

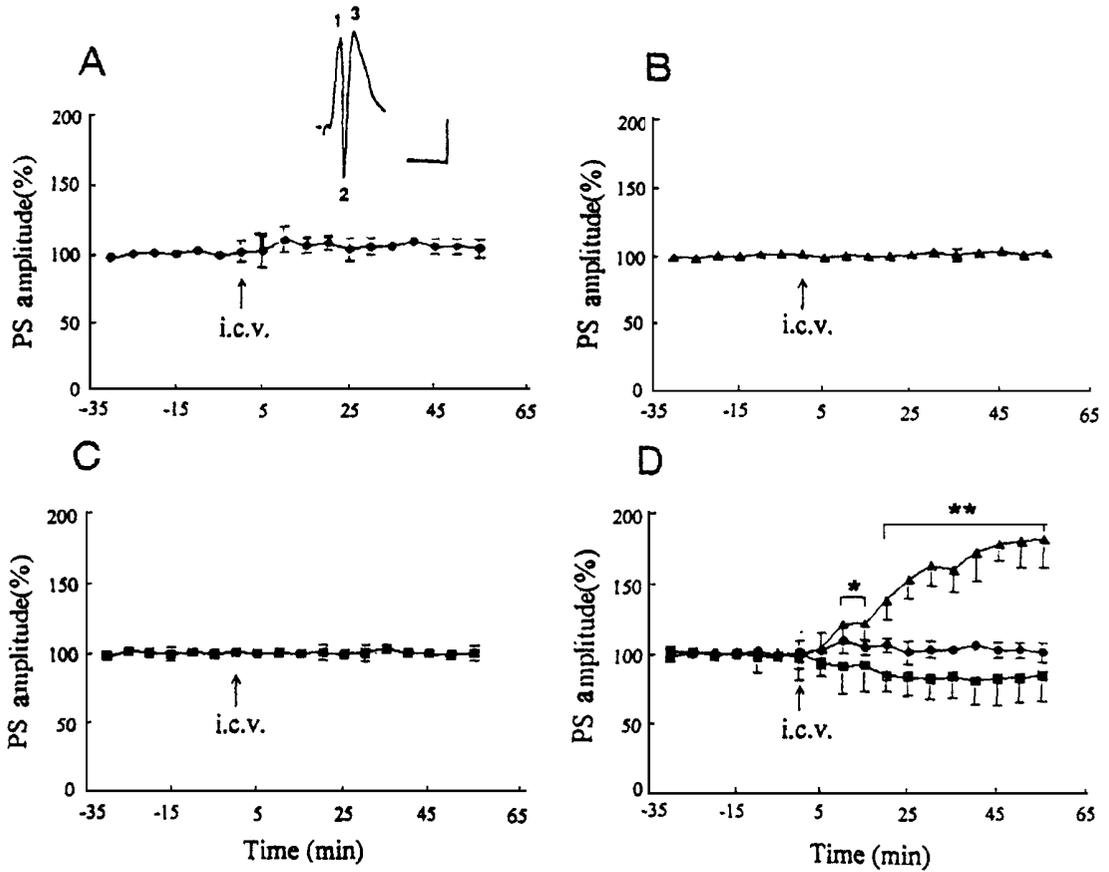


Fig 1 The effects of icv injection of (-) and (+) clausenaamide on evoked potential in the dentate gyrus of anesthetized rats. The inset in (A) is a typical evoked potential recorded in the dentate gyrus of an anesthetized rat. Calibration bars: vertical 2 mv, horizontal 10 ms. The amplitude of a population spike was defined as the average amplitude from the first (1) and the second (3) positive peak to the negative peak (2). A, B and C: time-course of changes in population spike amplitude after icv injection of vehicle (DMSO, 0.08% v/v, 5 μ l), (-) clausenaamide at $1.0 \text{ nmol} (2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, 5 \mu\text{l})$, respectively. D: time-course of changes in PS amplitude after icv injection of vehicle (DMSO, 0.08%, 5 μ l), (-) clausenaamide ($8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, 5 \mu\text{l}$) or (+) clausenaamide ($8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, 5 \mu\text{l}$). The abscissae indicate the time in min before and after drug injection. The average amplitude of the population spikes recorded 30 min before drug injection was defined as 100%. All data are represented as mean \pm SEM of 5 observations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle-injected group. •—• DMSO; \blacktriangle — \blacktriangle (-) Clau; \blacksquare — \blacksquare (+) Clau.

若将药物剂量增加至 $8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (5 μ l), 可见强直刺激后(-)黄皮酰胺组 PS 幅值

呈剂量依赖性增大 ($n = 5, P < 0.01$), 而(+)
黄皮酰胺组 PS 幅值降低 ($n = 5, P < 0.01$)。

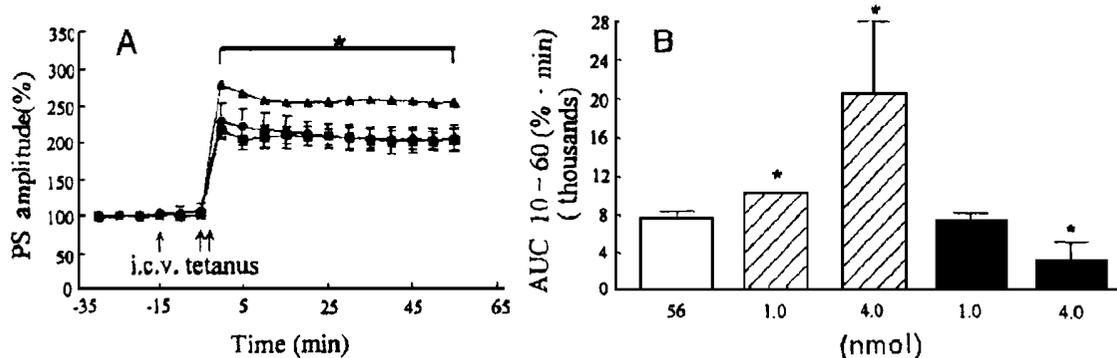


Fig 2 The effects of icv injection of (-) or (+) clausenamide on LTP in the dentate gyrus of anesthetized rats induced by 10 bursts of 5 stimuli (200 Hz, 0.15 ms stimulus duration, 200 ms interburst interval). A: time-course of potentiation of population spike amplitude after icv injection of vehicle (DMSO, 0.08% 5 μ l), (-) clausenamide (1.0 nmol) or (+) clausenamide (1.0 nmol). Asterisks indicate significant differences of the (-) clausenamide group from the value at respective time in the vehicle-injected group: * $P < 0.01$; student t -test. B: the effects of (-) clausenamide (shaded columns) and (+) clausenamide (solid black columns) at different doses on AUC (the area under the curve of time-course of potentiation) were summarized. The AUC above the horizontal line "PS amplitude = 100%" was calculated from 10 to 60 min after tetanus by using the "Pharmacologic Calculation System (Version 4.1)" software. * $P < 0.01$ vs vehicle-injected group (white column); student t -test. All data are represented as the mean \pm SEM of 5 observations.

•—• DMSO; ▲—▲ (-) Clau; ■—■ (+) Clau; DMSO; (-) Clau; (+) Clau.

讨 论

自 1973 年 Bliss 等首次在家兔海马结构上发现突触传递长时程增强 (LTP) 以来,越来越多的资料显示^[3,4],这种海马结构中的 LTP 现象与多种形式的学习记忆活动密切相关。主要表现在以下几方面:(1) 影响 LTP 的因素同时也影响学习记忆活动,比如 NMDA 受体拮抗剂 D(-) APV 可阻断 LTP 的诱导,并极大地损伤了大鼠在水迷宫中的学习活动;反之,一些影响学习记忆过程的因素也对 LTP 有着相应的影响,如青年大鼠较老年大鼠学习快的同时,其 LTP 的稳定速度也较老年大鼠快。(2) LTP 的诱导过程可易化学习过程, Berger 等报道,先在家兔海马齿状回诱导 LTP,再进行瞬膜条件反射训练时可加速其学习进程^[5]。(3) 动物在学习过程中伴有海马结构中 LTP 的产生, Thompson 等在给家兔进行瞬膜条件反射训练时就发现其海马结构中有类似 LTP 的现象出现^[6]。

此外,在 LTP 的形成和维持机制方面已取

得一些共识^[7,8]: Ca^{2+} 通过突触后膜 NMDA 受体上的离子通道内流可能在 LTP 的诱导中起着类似“开关”的作用;突触后细胞通过释放所谓“逆行信使”而作用于突触前膜以促使其持续性大量释放神经递质(如谷氨酸)被认为是研究 LTP 维持机制方面的一大进展。(-) 黄皮酰胺已被证实既有升高神经细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用,又能促进突触体释放谷氨酸^[1],这些或许是造成本实验中所观察到的(-) 黄皮酰胺增强活体大鼠海马齿状回基础突触传递活动和 LTP 的重要因素。由于 LTP 的形成和维持机制十分复杂,而且本实验是在急性麻醉条件下采取脑室给药方法,至于系统给药(比如灌胃)对清醒大鼠是否有相同的作用以及(-) 黄皮酰胺是否还作用于 LTP 形成和维持机制的其他环节尚需进一步探索,但本研究至少已有力的支持了我们以往的行为学和神经生化实验结果,也为进一步研究(-) 黄皮酰胺的促智机制提供了新的思路。

与许多含手性中心的药物一样, (+) 黄皮

酰胺具有与(-)黄皮酰胺完全不同的药效,这方面已有报道^[9]。本实验中,低剂量(1×10^{-4} mol·L⁻¹, 5 μl)(+)黄皮酰胺对海马基础突触传递活动和 LTP 无明显影响,而提高剂量至 4×10^{-4} mol·L⁻¹(5 μl)时,对 LTP 表现出抑制作用。可见,对于海马突触传递活动,(+)黄皮酰胺不但没有药效,而且剂量较大时还会部分抵消(-)黄皮酰胺的增强作用。因此,本实验不仅是对手性药物黄皮酰胺研究的丰富,也为将(-)黄皮酰胺发展成单一对映体促智药提供了重要的实验依据。

致谢 本工作在电生理技术方面曾得到中日友好医院临床医学研究所艾琳教授的指导和帮助。

参 考 文 献

1 张均田,蒋学英.黄皮酰胺促智作用机制的研究.中国医学科学院、中国协和医科大学学术年会论文集.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1994: 356

2 Manahan-Vaughan D, Reymann KG. 1 S, 3 R-ACPD dose dependently induces a slow onset potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Eur J Pharmacol*, 1995, **294**: 497

3 Rison RA, Stanton PK. Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurological diseases? *Neurosci Biobehav Rev*, 1995, **19**: 533

4 李永新,梅镇彤.长时程增强的形成机制及其与学习记忆的相关性.生理科学进展,1993, **24**: 278

5 Berger TW. Long-term potentiation of hippocampal synaptic transmission accelerates behavioral learning. *Science*, 1984, **224**: 627

6 Thompson RF. Neural mechanisms of classical conditioning in mammals. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)*, 1990, **329**: 161

7 Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1993, **361**: 31

8 Shen Y, Specht SM, Ghislaing IDS, *et al*. The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. *Prog Neurobiol*, 1994, **44**: 485

9 段文贞,张均田.(-),(+)黄皮酰胺对鼠脑内 NMDA 受体的影响.药理学报,1997, **32**: 259

DIFFERENCE BETWEEN THE EFFECTS OF (-) CLAUSENAMIDE AND (+) CLAUSENAMIDE ON THE SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE DENTATE GYRUS OF ANESTHETIZED RATS

Liu Shaolin(Liu SL) and Zhang Juntian(Zhang JT)

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT With the extracellular recording technique, the basal synaptic responses (population spike, PS) evoked by low frequency test stimulation in the dentate gyrus of anesthetized rats was recorded and the effects of (-) and (+) clausenamide(icv) on the PS and long-term potentiation (LTP) induced by tetanus (50 pulses at 200 Hz) were observed. The results showed that: (1) at a lower dose (1 nmol), (+) clausenamide showed no effect on either the basal PS or LTP, (-) clausenamide did not affect the basal PS but enhanced the magnitude of LTP. (2) At a higher dose (4 nmol), (-) clausenamide not only potentiated the basal PS but also dose-dependently augmented the magnitude of LTP. Meanwhile, (+) clausenamide did not affect the basal PS but attenuated the magnitude of LTP. These results suggest that the effects of clausenamide on the synaptic transmission in the dentate gyrus depend on its chirality. The potentiating effects of (-) clausenamide on synaptic transmission in hippocampus strongly support our previous behavioral and neurobiochemical studies on the nootropic action of (-) clausenamide.

KEY WORDS Clausenamide; Long-term potentiation(LTP); Dentate gyrus; Population spike (PS)