

[ 论著 ]

# 槟榔碱对小鼠酒精急性中枢抑制作用的影响<sup>\*</sup>

孙艳萍<sup>1</sup> 韩容<sup>1</sup> 罗娟<sup>1</sup> 陈锋<sup>2</sup> 梁建辉<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>(北京大学中国药物依赖性研究所, 北京, 100083)<sup>2</sup>(澳大利亚墨尔本大学Howard Florey 研究所, 墨尔本, 3010)

**摘要** 目的: 探讨非选择性毒蕈碱受体(M 受体)激动剂—槟榔碱, 对小鼠酒精急性中枢抑制作用的影响。方法: 测定小鼠的自主活动, 观察槟榔碱对酒精诱导的小鼠低活动性的影响。建立酒精诱导小鼠翻正反射消失(loss of the righting reflex, LORR)的模型, 观察槟榔碱对 LORR 潜伏期和持续时间的影响。结果: 酒精(1.0、2.0、3.0 g·kg<sup>-1</sup>)和槟榔碱(0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)均可剂量依赖性抑制小鼠的自主活动, 但槟榔碱对酒精诱导的小鼠低活动性无影响。槟榔碱(0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)对酒精诱导小鼠 LORR 的潜伏期无影响, 但可显著缩短 LORR 的持续时间。结论: 槟榔碱可以拮抗酒精诱导小鼠 LORR 的药理作用, 提示槟榔碱可能具有一定的醒酒作用。

**关键词** 酒精; 槟榔碱; 自主活动; 翻正反射

## EFFECTS OF ARECOLINE ON CENTRAL SUPPRESSION IN MICE TREATED ACUTELY WITH ETHANOL

SUN Yanping<sup>1</sup>, HAN Rong<sup>1</sup>, LUO Juan<sup>1</sup>, CHEN Feng<sup>2</sup>, LIANG Jianhui<sup>1</sup><sup>1</sup>(National Institute on Drug Dependence, Peking University, Beijing, 100083)<sup>2</sup>(Howard Florey Institute, University of Melbourne, Melbourne, Australia, 3010)

**ABSTRACT** *Objective:* To investigate the effects of arecoline (AREC), non-selective muscarine receptor agonist, on acute ethanol(EtOH)-induced central suppression in mice. *Methods:* Locomotor activity was detected to observe the effect of AREC on EtOH-induced hypoactivity after co-administration of AREC with EtOH in mice. Mice were induced loss of the righting reflex (LORR) to EtOH (4.0 g·kg<sup>-1</sup>), and administered with the combination of AREC and EtOH to observe the effects of AREC on the latency to and duration of EtOH-induced LORR. *Results:* A single intraperitoneal administration of EtOH (1.0、2.0、3.0 g·kg<sup>-1</sup>) or AREC (0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) dose-dependently inhibited the locomotor activity in mice, but there was no effect of AREC on EtOH-induced hypoactivity. AREC (0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) significantly shortened the duration of EtOH-induced LORR, although it had no effect on the latency to LORR. *Conclusion:* AREC can antagonize EtOH-induced LORR in mice. Thus, AREC may alleviate ethanol drinking.

**KEY WORDS** ethanol; arecoline; locomotor activity; loss of the righting reflex

酒精(ethanol)作用于啮齿类动物的中枢神经系统,可引起多种行为学变化。如单次给予小剂量的酒精可增强小鼠的自主活动性,而中到大剂量的酒精则可诱导自主活动性降低、共济失调和翻正反射消失(loss of righting reflex, LORR)等<sup>[1]</sup>。这些变化与酒精改变细胞膜的流动性<sup>[2]</sup>,影响多种离子通道的

功能和神经递质释放的作用有关。但是,到目前为止,酒精行为学效应的神经精神药理学机制尚不十分清楚。

体内外实验都表明,酒精能够抑制动物脑内乙酰胆碱的释放<sup>[3]</sup>。乙酰胆碱酯酶抑制剂毒扁豆碱能使酒精所致的小鼠睡眠时间缩短<sup>[4]</sup>。槟榔碱作为非选择性的毒蕈碱受体(M 受体)激动剂,对酒精诱导小鼠睡眠的影响尚未见报道。因此,本实验旨在以槟榔碱作为工具药,研究槟榔碱对小鼠酒精急性中

\* 受国家重点基础研究发展计划资助(课题编号: 2003CB515400)

\*\* 通讯作者: E-mail: liangjh@hotmail.com

Tel: (010) 82802452; Fax: (010) 62032624

枢抑制作用的影响,探讨酒精诱导睡眠可能的神经精神药理学作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

ICR 小鼠,♂,购自北京大学医学部动物中心(许可证编号:SCXK(京)2002-0001)。将小鼠随机分组,每组 11-14 只,入组时体重 18-22 g。动物房恒温、恒湿(温度  $22^{\circ}\text{C} \pm s 1^{\circ}\text{C}$ ,湿度  $50\% \pm s 10\%$ ),光照时间 8:00-20:00。实验开始前,小鼠在动物房适应至少 3 d,食水不限。

### 1.2 试剂

氢溴酸槟榔碱(arecoline hydrobromide, AREC),购自 Sigma 公司(批号:206-087-3)。无水酒精(ethanol, EtOH)购自北京化工厂(批号:20040210)。两种药物均用生理盐水(NS)溶解或稀释,在实验前新鲜配制。对照组给予生理盐水(购自北京双鹤药业股份有限公司,批号:03039522)。给药途径均为 ip,给药体积酒精为  $20\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,其余均为  $10\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

### 1.3 自主活动测定

小鼠自主活动由程控自主活动箱(ZIL-2,中国医学科学院药研所制造)测定。

### 1.4 IORR 测定

给予 EtOH( $4.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip)后,立即将小鼠单独放入透明有机玻璃盒( $28\text{cm} \times 18\text{cm} \times 12\text{cm}$ ),记录 LORR 开始和恢复的时间。恢复的标志为小鼠在 1 min 内可自行恢复翻正反射 3 次<sup>[5]</sup>。潜伏期为给药后至 LORR 开始的时间间隔(单位:秒(s)),持续时间为 LORR 开始至恢复的时间间隔(单位:分钟(min))。

### 1.5 实验程序

**1.5.1 酒精急性给药对小鼠自主活动的影响** 小鼠随机分为 4 组,测定 10 min 自主活动后,分别 ip NS 或 EtOH ( $1.0, 2.0, 3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),立即放入程控自主活动箱中,测定并记录 60 min 小鼠的自主活动。

**1.5.2 槟榔碱急性给药对小鼠自主活动的影响** 小鼠随机分为 4 组,测定 10 min 自主活动后,分别 ip NS 或 AREC( $0.25, 0.5, 1.0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),放回饲养笼 5 min 后 ip NS,然后立即放入程控自主活动箱中,测定并记录 60 min 小鼠的自主活动。

**1.5.3 槟榔碱对酒精诱导小鼠低活动性的影响** 小鼠随机分为 5 组,分别为 NS+NS 组、NS+EtOH 组、

AREC  $0.25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +EtOH 组、AREC  $0.5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +EtOH 组、AREC  $1.0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ +EtOH 组。测定 10 min 自主活动后,分别 ip NS 或 AREC,放回饲养笼 5 min 后分别 ip NS 或 EtOH( $2.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),然后立即放入程控自主活动箱中,测定并记录 60 min 小鼠的自主活动。

**1.5.4 槟榔碱对酒精诱导小鼠 LORR 的潜伏期和持续时间的影响** 小鼠随机分为 5 组,分别 ip NS 或 AREC ( $0.125, 0.25, 0.5, 1.0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),放回饲养笼 5 min 后 ip EtOH ( $4.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),然后立即放入有机玻璃盒观察 LORR 的潜伏期和持续时间。

### 1.6 统计学处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.5 软件包进行统计分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA),随后采用 LSD 检验进行组间两两比较。

## 2 结果

### 2.1 酒精急性给药对小鼠自主活动的影响

小鼠分别 ip NS 或 EtOH( $1.0, 2.0, 3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),立即测定 60 min 内的自主活动。EtOH( $1.0, 2.0, 3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组小鼠的自主活动计数与 NS 组相比,显著降低( $F(3, 43)=9.652, P<0.001$ ),图 1。预实验结果显示 EtOH( $1.0, 2.0, 3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )为小鼠 LORR 的阈下剂量,即不引起小鼠 LORR。

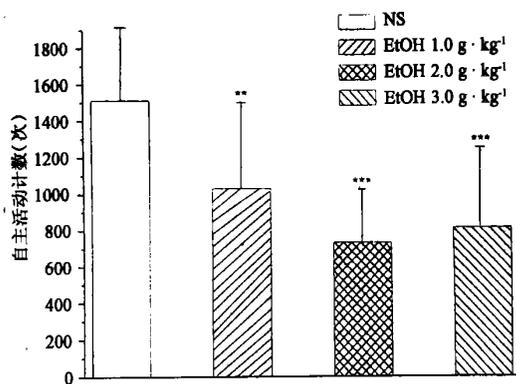


图 1 酒精急性给药对小鼠自主活动的影响  
 $n=11-12, \bar{x} \pm s, **P<0.01, ***P<0.001$ ,与 NS 组比较

### 2.2 槟榔碱急性给药对小鼠自主活动的影响

小鼠分别 ip NS 或 AREC ( $0.25, 0.5, 1.0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 5 min 后 ip NS,然后立即测定 60 min 内的自主活动。AREC( $1.0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )+NS 组小鼠的自主活动计数与 NS+NS 组相比,显著降低( $P<0.01$ ),图 2。

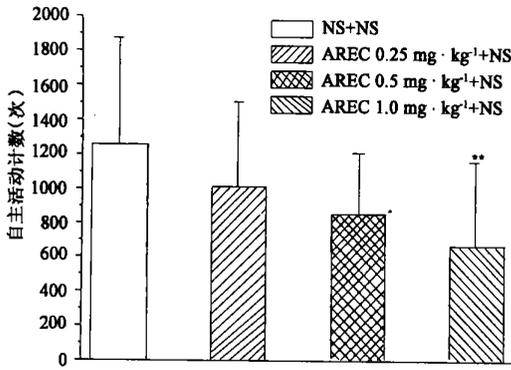


图2 槟榔碱急性给药对小鼠自主活动的影响  
n=12,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*P<0.01, 与NS+NS组比较

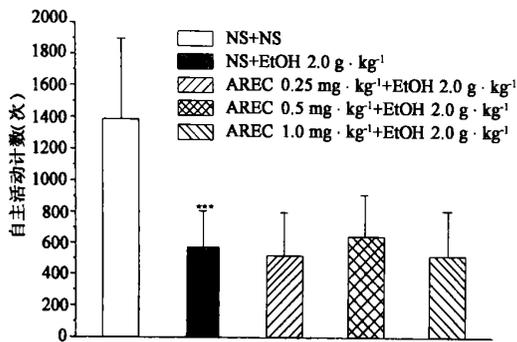


图3 槟榔碱对酒精诱导的小鼠低活动性的影响  
n=12,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*\*P<0.001, 与NS+NS组比较

### 2.3 槟榔碱对酒精诱导的小鼠低活动性的影响

小鼠分别 ip NS 或 AREC (0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>), 5 min 后分别 ip NS 或 EtOH (2.0 g·kg<sup>-1</sup>), 然后立即测定 60 min 内的自主活动。NS+EtOH (2.0 g·kg<sup>-1</sup>) 组小鼠的自主活动计数与 NS+NS 组相比, 显著降低 (P<0.001), 这与图 1 的结果一致, 表明酒精可稳定地诱导小鼠的低活动性。AREC (0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)+EtOH (2.0 g·kg<sup>-1</sup>) 组小鼠的自主活动计数与 NS+EtOH (2.0 g·kg<sup>-1</sup>) 组相比差异无显著性, 说明 AREC 对 EtOH (2.0 g·kg<sup>-1</sup>) 诱导的小鼠低活动性无影响 (图 3)。

### 2.4 槟榔碱对酒精诱导小鼠 LORR 的潜伏期和持续时间的影响

小鼠分别 ip NS 或 AREC (0.125、0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>), 5 min 后 ip EtOH (4.0 g·kg<sup>-1</sup>), 然后测定 LORR 的潜伏期和持续时间。EtOH 4.0 g·kg<sup>-1</sup> 可诱导小鼠 LORR, 潜伏期为 78.36 s±s 16.676 s, 持续时间为 15.43 min±s 6.442 min。AREC (0.125、0.25、

0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) 对 EtOH 诱导小鼠 LORR 的潜伏期无影响, 但 AREC (0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) 可显著地缩短其持续时间 (P<0.05), 图 4、5。实验中除 AREC (1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) 组的小鼠在给药后偶可观察到排稀便外, 各给药组均未发生流涎、震颤等胆碱能反应。预实验中 AREC (0.125、0.25、0.5、1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) 各个剂量均不引起小鼠的 LORR。

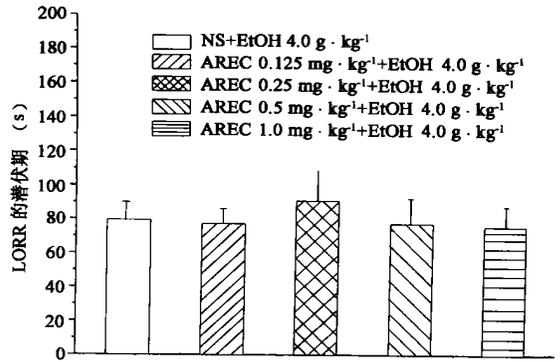


图4 槟榔碱对酒精诱导小鼠 LORR 的潜伏期的影响  
n=14,  $\bar{x} \pm s$ , 与 NS+EtOH 组比较

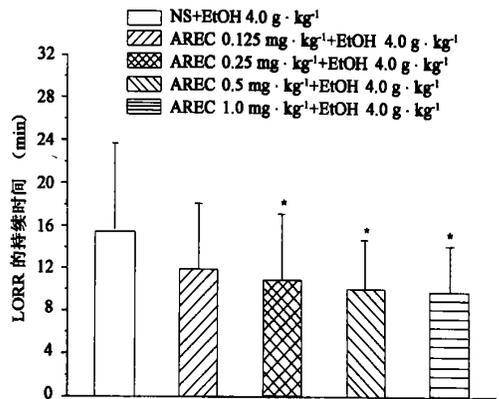


图5 槟榔碱对酒精诱导小鼠 LORR 的持续时间的影响  
n=14,  $\bar{x} \pm s$ , \*P<0.05 与NS+EtOH 组比较

### 3 讨论

本实验中, ip 酒精 (1.0—3.0 g·kg<sup>-1</sup>) 可剂量依赖性降低小鼠的自主活动性 (图 1)。以前的研究资料表明, 酒精对不同品系小鼠自主活动性的影响也不完全相同<sup>[6,7]</sup>。有的呈双向作用, 小剂量酒精 (1.0—2.25 g·kg<sup>-1</sup>) 可对 AU 6sAbg、SK/RrAbg 及 NMRI 小鼠产生兴奋作用, 较大剂量 (2.5—4.5 g·kg<sup>-1</sup>) 则产生抑制作用; 有的 (如 C57BL/6Abg 和 CBA

小鼠)只表现出抑制作用,后者与本实验的结果一致。本实验选用动物的品系是 ICR 小鼠,因此,酒精对 ICR 品系小鼠的自主活动呈抑制作用。酒精对自主活动的抑制是一种非特异性的中枢抑制作用,具体机制涉及多个方面,目前仍不清楚。

槟榔碱也可抑制小鼠的自主活动(图 2)。槟榔碱易透过血脑屏障,对中枢 M 受体具有激活作用。研究资料显示槟榔碱抑制自主活动的作用可以被中枢性 M 受体拮抗剂东莨菪碱所拮抗,却不能被另一种 M 受体拮抗剂甲基东莨菪碱(不通过血脑屏障)以及烟碱受体(N 受体)拮抗剂所拮抗<sup>[8,9]</sup>。因此,推测槟榔碱对小鼠自主活动的抑制作用可能是通过激动中枢神经系统中的 M 受体而产生的。

虽然酒精和槟榔碱均可抑制小鼠的自主活动,但是二者的有效剂量合用时,并未产生相加或协同作用,即槟榔碱对酒精诱导的小鼠低活动性无影响(图 3)。分析其原因,首先我们从实验数据资料方面可以排除一种天花板效应(ceiling effect)。因为酒精( $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )仅使小鼠的自主活动下降了接近 60%,如果槟榔碱的抑制作用与之相加或协同的话,还有足够的下降余地;反之,若槟榔碱对酒精诱导的低活动性产生拮抗作用,小鼠的自主活动也有足够的上升空间。因此我们推测,槟榔碱不影响小鼠酒精诱导的低活动性,可能是因为二者对自主活动抑制作用的机制不同。

大剂量的酒精可对中枢神经系统产生抑制作用,诱导动物(大鼠、小鼠)的 LORR。LORR 是评价酒精中枢抑制作用程度的经典模型之一<sup>[10]</sup>。酒精诱导的 LORR 涉及中枢神经系统的多种机制,但确切机制尚不清楚。许多学者对此作了大量的研究工作,结果表明:一些药物如纳洛酮<sup>[11]</sup>、咖啡因、SCH58261(一种选择性腺苷 A2A 受体拮抗剂)<sup>[12]</sup>等可拮抗酒精诱导的小鼠 LORR,另外还有许多药物可以增强 LORR。本实验首次发现槟榔碱能显著地缩短酒精诱导小鼠 LORR 的持续时间,这也是本实

验最重要的发现。与缩短酒精诱导小鼠 LORR 的持续时间不同,槟榔碱对潜伏期并无显著性影响(图 4),这可能与酒精( $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )诱导的小鼠 LORR 的潜伏期较短( $78.36 \text{ s} \pm 16.676 \text{ s}$ ),不容易观察到其改变有关系。在 Colombo 等的研究中<sup>[13]</sup>,酒精诱导的 LORR 的持续时间不同的两种大鼠,潜伏期(150 s 左右)也无显著性差异。此外,槟榔碱对酒精诱导小鼠 LORR 潜伏期和持续时间的影响不同,也可能是因为介导这两个时程的作用机制不完全相同,有待于进一步研究。

酒精可影响中枢神经系统的乙酰胆碱水平。离体实验表明酒精可抑制大鼠皮质脑片中自发<sup>[14]</sup>和电刺激引起<sup>[15]</sup>的乙酰胆碱的释放。Erickson 和 Graham 则在整体动物实验中发现酒精可剂量依赖性抑制兔脑皮质和中脑网状结构中乙酰胆碱的自发释放<sup>[16]</sup>。近年来,利用微透析技术的研究表明,酒精可抑制大鼠海马内自发和刺激性乙酰胆碱的释放<sup>[17,18]</sup>。上述这些脑区包含许多胆碱能通路<sup>[19]</sup>,对于觉醒和警觉的维持非常重要<sup>[20]</sup>。因此推测,酒精对乙酰胆碱释放的抑制作用是其诱导小鼠 LORR 的机制之一,槟榔碱对酒精诱导小鼠 LORR 的拮抗作用可能是通过作用于上述脑区中的 M 受体发挥作用的。

槟榔碱给药后可以激活下丘脑—垂体—肾上腺皮质(HPA)轴,增加内源性促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)的水平,促使肾上腺皮质释放糖皮质激素<sup>[21,22]</sup>。研究资料表明,糖皮质激素可剂量依赖性拮抗小鼠酒精诱导的 LORR<sup>[23]</sup>。因此槟榔碱也可能是通过提高糖皮质激素水平而缩短酒精诱导的 LORR。

综上所述,虽然槟榔碱本身可以抑制小鼠的自主活动,但是,并不加重酒精对小鼠自主活动的抑制作用。在相同的剂量范围内,槟榔碱可以缩短酒精诱导小鼠的睡眠时间,提示槟榔碱可能具有一定的醒酒作用。

#### 4 参考文献

- 1 Dnski LJ, Deitrich RA. Initial effects of ethanol on the central nervous system [A]. In: Deitrich RA, Erwin VG, eds. Pharmacological effects of ethanol on nervous system [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993. 227—249
- 2 Wood WG, Schroeder F. Membranes and ethanol: lipid domains and lipid—protein interactions [A]. In: Deitrich RA, Erwin VG, eds. Pharmacological effects of ethanol on nervous system [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993. 13—27
- 3 Deitrich RA, Dunwiddie TV, Harris RA, et al. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions [J]. Pharmacol

- Rev, 1989, 41(4): 489-537
- 4 Erickson CK, Burnam WL. Cholinergic alteration of ethanol-induced sleep and death in mice [ J ] . Agents Actions 1971, 2(1): 8-13
- 5 Wu CF, Zhang HL, Liu W. Potentiation of ethanol-induced loss of the righting reflex by ascorbic acid in mice: interaction with dopamine antagonists [ J ] . Pharmacol Biochem Behav, 2000, 66(2): 413-418
- 6 Dudek BC, Phillips TJ. Distinctions among sedative, disinhibitory, and ataxic properties of ethanol in inbred and selectively bred mice [ J ] . Psychopharmacology (Berl), 1990, 101(1): 93-99
- 7 Liljequist S, Karcz-Kubicha M. Genetic aspects on the effects of ethanol and central stimulants on locomotor activity and brain dopamine metabolism in mice [ J ] . Alcohol Alcohol Suppl, 1993, 2: 457-461
- 8 Pradhan SN, Dutta SN. Behavioral effects of arecoline in rats [ J ] . Psychopharmacologia 1970, 17(1): 49-58
- 9 Molinengo L, Fundaro AM, Cassone MC. Action of a chronic arecoline administration on mouse motility and on acetylcholine concentrations in the CNS [ J ] . J Pharm Pharmacol, 1988, 40(11): 821-822
- 10 Smolen TN, Smolen A. Putnergic modulation of ethanol-induced sleep time in long-sleep and short-sleep mice [ J ] . Alcohol, 1991, 8(2): 123-130
- 11 Devoto P, Colombo G, Cappai F, et al. Naloxone antagonizes ethanol- but not gamma-hydroxybutyrate-induced sleep in mice [ J ] . Eur J Pharmacol, 1994, 252(3): 321-324
- 12 El Yacoubi M, Ledent C, Pamentier M, et al. Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade [ J ] . Neuropharmacology, 2003, 45(7): 977-985
- 13 Colombo G, Agabio R, Carai MA, et al. Different sensitivity to ethanol in alcohol-preferring sP and -nonpreferring sNP rats [ J ] . Alcohol Clin Exp Res, 2000, 24(11): 1603-1608
- 14 Kalant H, Grose W. Effects of ethanol and pentobarbital on release of acetylcholine from cerebral cortex slices [ J ] . J Pharmacol Exp Ther, 1967, 158(3): 386-393
- 15 Carmichael FJ, Israel Y. Effects of ethanol on neurotransmitter release by rat brain cortical [ J ] . J Pharmacol Exp Ther, 1975, 193(3): 824-834
- 16 Erickson CK, Graham DT. Alteration of cortical and reticular acetylcholine release by ethanol *in vivo* [ J ] . J Pharmacol Exp Ther, 1973, 185(3): 583-593
- 17 Henn C, Löffelholz K, Klein J. Stimulatory and inhibitory effects of ethanol on hippocampal acetylcholine release [ J ] . Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998, 357(6): 640-647
- 18 Imperato A, Dazzi L, Carta G, et al. Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication [ J ] . Brain Res, 1998, 784(1-2): 347-350
- 19 Shute CC, Lewis PR. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections [ J ] . Brain, 1967, 90(3): 497-520
- 20 Rinaldi F, Himwich HE. Alerting responses and actions of atropine and cholinergic drugs [ J ] . AMA Arch Neurol Psychiatry, 1955, 73(4): 387-395
- 21 Calogero AE, Kamilaris TC, Gomez MT, et al. The muscarinic cholinergic agonist arecoline stimulates the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a centrally-mediated corticotropin-releasing hormone-dependent mechanism [ J ] . Endocrinology, 1989, 125(5): 2445-2453
- 22 Overstreet DH, Booth RA, Dana R, et al. Enhanced elevation of corticosterone following arecoline administration to rats selectively bred for increased cholinergic function [ J ] . Psychopharmacology (Berl), 1986, 88(1): 129-130
- 23 Sze PY. Glucocorticoids antagonize the sedative action of ethanol in mice [ J ] . Pharmacol Biochem Behav, 1993, 45(4): 991-993

收稿日期: 2005-04-20

修回日期: 2005-07-10