

咖啡因和可口可乐对大、小鼠的急性行为学效应 (一)

——对正常小鼠和记忆障碍小鼠被动回避性行为的影响

杨 迎 戴 寅 张均田* 徐晋康

(卫生部食品卫生监督检验所)

摘要: 采用小鼠一次性学习被动回避性行为——跳台和避暗反应法,同时观察了咖啡因和可口可乐对不同种属的正常小鼠和化学性记忆障碍小鼠学习和记忆获得、巩固和再现的影响,结果发现,可口可乐对动物记忆获得过程的影响呈一剂量——反应关系:低剂量促进记忆;中或高剂量时有一短暂而可逆的干扰作用;各剂量的咖啡因和可口可乐均不影响小鼠记忆巩固和记忆再现过程;对以上三个过程的化学性损害则有不同程度的改善作用。未发现KM、C57、BL/6j、NIH小鼠在记忆获得过程中明显的种属差异。

关键词: 咖啡因; 可口可乐; 记忆缺损; 一次性学习被动回避反应; 种属差异。

可口可乐*(Cola-Cola)是美国可口可乐公司生产的一种含咖啡因的专利饮料。尽管它已问世百余年,但少有其系统的生物学效应的研究报道,仅有的报道也与国外大量的有关咖啡因的资料报道不尽一致。而随着对外开放的发展,可口可乐及其他可乐型含咖啡因饮料已大量涌入我国市场。为了对咖啡因及含咖啡因饮料的安全性作出恰如其分的评价,为咖啡因是否允许加入饮料的决策提供依据,并制订出相应的卫生标准和管理办法,开展毒理学研究很有必要,本实验拟主要采用行为毒理学的方法,在大、小鼠同时进行咖啡因和可口可乐的毒理学研究。本文将阐述其对不同种属的正常小鼠和化学性记忆障碍小鼠一次性被动回避反应的影响。

材料与方 法

样品由北京饮料食品厂提供美国可口可乐公司生产的可口可乐浓缩汁原包装(含咖啡因5%),临用时按其所含咖啡因量稀释到所需浓度。

樟柳硷由中国医学院药物研究所化学合

成室提供,环己酰亚胺(日本和光纯药工业株式会社生产)和无水乙醇(AR级)均为市售。

样品和药品均用蒸馏水溶解或稀释。

实验所用动物均购自中国医学科学院动物中心,共用各种动物约1060只。将动物按体重随机分组,每组10只,雌雄各半,各组动物喂养条件,光照条件相同,均为自由饮水和进食,实验前在实验室喂养3—4天,以适应室内环境,用于实验时,鼠龄均为5—6周,KM小鼠体重 $22 \pm 2g$;NIH小鼠体重 $20 \pm 2g$;C57BL/6j小鼠体重 $17 \pm 2g$ 。

跳台法¹⁻³ 实验装置为 $10 \times 10 \times 60cm$ 的被动回避条件反射箱,用不透明的黑色塑料板分隔成十间,箱底有铜栅,通以36伏电流,每间置一橡皮垫(高和直径均为4.5cm)作为动物回避电击的安全区。实验时将动物放置在橡皮垫上,动物跳至铜栅上即受到电击,动物的正常反应是跳回橡皮垫上,如此训练8min并记录后5min的错误次数,24h或48h后重作测验,此即记忆保持测验。记录受电击的动物数,第一次跳下平台的潜

*中国医学科学院药物研究所

本文研究的可口可乐系指含咖啡因的可升可乐

伏期和3min内的错误总数,同时计算动物出现错误反应的百分率。

触铜栅或在避暗法进入暗室即认为其记忆力已达到消退程度。

流,明暗两室之间有一直径为3cm的洞口,反射箱连接一计时器,记录动物从明间通过洞口进入暗间的潜伏期。实验时,将小鼠面部背向洞口放入明室,同时启动计时器。动物穿过洞口进入暗室受到电击,计时器自动停止,取出小鼠,记录每鼠从放入明室至进入暗室遇到电击所需的时间,此即潜伏期。24h或48h后重作测验,记录每只动物进入暗室的潜伏期和5min内的电击次数。同时记录5min内进入暗室(错误反应)的动物百分率。

观察对樟柳硷引起的小鼠记忆获得障碍的影响系在实验前1h灌胃给受试物,实验前10min腹腔注射樟柳硷;观察对环己酰亚胺引起的小鼠记忆巩固障碍的影响系在实验后立即给受试物,实验前10min腹腔注射环己酰亚胺;观察对乙醇引起的小鼠记忆再现障碍的影响系在测验前1h给受试物,重测验前30min经口给30%乙醇。

以上全部实验均在隔音室中进行,每个实验至少重复两次。

实验均在上午8时—12时或下午1时—5时进行。训练和重测验(即记忆力测验)则在先后两天或三天相同的时间内完成,并测定动物72h时记忆消退的情况。动物在跳台法接

结果与讨论从表1、表2、表3、表4得出咖啡因和不同浓度可口可乐(以其中咖啡因含量表示)对正常小鼠跳台法和避暗法被动回避反应记忆全过程的影响如下:

表 1 咖啡因和可口可乐对不同种属小鼠跳台法记忆获得过程的影响

动物类别	组别	剂量 (mg/kg)	错误次数		潜伏期(秒) 测验	错误反应率 (%)
			训练	测验		
KM	对照	0	2.2±2.2*	0.7±0.8	133.0±72.8	50
	咖啡因	20	6.1±4.7	0.4±1.0	166.5±33.5	20
	可口可乐	2	1.9±1.1	0.0±0.0▲	180.0±0.0	0▲▲
	"	5	4.4±3.3	0.4±0.7	166.5±22.6	30
	"	20	7.5±4.0**	0.5±0.5	135.0±65.5	50
	"	40	7.4±2.8**	1.1±1.2	128.1±64.7	70
	"	60	4.9±5.0	1.5±2.3	136.0±62.1	50
C57BL/6j	对照	0	2.1±1.7	0.8±1.0	131.0±65.7	50
	咖啡因	20	6.0±1.9**	1.2±0.9	96.5±62.0	80
	可口可乐	2	1.9±1.1	0.3±0.5	133.0±77.1	30
	"	20	3.9±2.4	0.5±0.7	147.7±46.8	40
	"	40	5.9±2.6**	0.7±0.5	129.0±59.0	70
	"	60	4.9±2.5*	1.4±1.3	76.9±65.3	80
NIH	对照	0	5.3±4.0	2.3±4.1	108.5±83.1	60
	咖啡因	20	4.9±4.0	5.0±3.8	51.7±67.2	80
	可口可乐	2	4.5±1.5	1.7±2.6	124.0±82.5	50
	"	20	12.0±5.4**	3.4±4.0	71.7±62.2	90
	"	40	12.9±3.7**	3.9±2.1	42.6±59.5	90
	"	60	9.6±14.0	6.7±7.6	35.9±55.5	100*

*与对照组比较 P<0.05 } 记忆干扰
**与对照组比较 P<0.01 }

▲与对照组比较 P<0.05 } 记忆促进
▲▲与对照组比较 P<0.01 }

表 2 咖啡因和可口可乐对不同种属小鼠避暗法记忆获得过程的影响

动物类别	组 别	剂 量 (mg/kg)	潜 伏 期 (秒)		错 误 次 数 测 验	错误反应率 (%)
			训 练	测 验		
KM	对 照	0	16.8±3.9	177.3±134.5	0.5±0.7	60
	咖 啡 因	20	9.5±4.1**	153.2±105.3	1.2±1.0	80
	可 口 可 乐	2	18.1±11.6	207.5±81.4	0.8±0.9	70
	"	5	15.2±4.3	142.2±122.6	1.3±1.3	70
	"	20	47.2±91.2	163.6±96.6	1.3±1.2	80
	"	40	18.1±13.2	92.2±115.3	1.5±1.6	90
	"	60	12.3±13.5	70.5±95.3	1.7±1.3	90
BALB/c	对 照	0	15.4±0.7	173.9±101.3	0.9±0.7	70
	咖 啡 因	20	11.4±2.7	66.0±77.4*	2.7±2.7	100
	可 口 可 乐	2	8.8±1.6	136.8±124.5	1.6±1.6	70
NIH3T3	"	20	6.3±4.5	48.9±85.8	3.8±2.6	100
	"	40	6.3±3.5	49.1±91.4	5.0±2.7	100
	"	60	8.0±7.5	5.3±5.8	7.9±1.8**	100

* 与对照组比较 P<0.05

**与对照组比较 P<0.01

表 3 咖啡因和可口可乐对小鼠跳台法记忆过程的影响

记忆过程	组 别	剂 量 (mg/kg)	错 误 次 数 (X±SD)	潜 伏 期 (秒) (X±SD)	错误反应率 (%)
咖 啡 因	20	0.0±0.0	180.0±0.0	0	
可 口 可 乐	2	0.0±0.0	180.0±0.0	0	
可 口 可 乐	20	0.0±0.0	180.0±0.0	0	
可 口 可 乐	40	0.0±0.0	180.0±0.0	0	
可 口 可 乐	60	0.1±0.2	180.0±0.0	10	
再	对 照	0	0.1±0.3	176.0±12.6	10
	咖 啡 因	20	0.0±0.0	180.0±0.0	0
	可 口 可 乐	2	0.0±0.0	180.0±0.0	0
	可 口 可 乐	20	0.1±0.3	179.0±3.2	10
	可 口 可 乐	40	0.1±0.3	177.0±9.5	10
	可 口 可 乐	60	0.3±0.7	162.0±38.6	20

表 4 咖啡因和可口可乐对小鼠避暗法记忆过程的影响

记忆过程	组别	剂量 (mg/kg)	潜伏期 (秒)	错误次数	错误反应率
			(X ± SD)	(X ± SD)	(%)
巩固	对照	0	271.9 ± 76.6	0.4 ± 0.7	30
	咖啡因	20	216.4 ± 112.2	0.6 ± 0.8	40
	可口可乐	2	204.0 ± 119.1	0.6 ± 0.7	50
	可口可乐	20	218.4 ± 105.7	0.8 ± 1.0	50
巩固	可口可乐	40	254.4 ± 6.64	0.4 ± 0.5	40
	可口可乐	60	218.5 ± 78.6	0.7 ± 0.5	70
	对照	0	228.6 ± 95.6	0.8 ± 1.0	50
再现	咖啡因	20	170.8 ± 105.5	1.1 ± 1.0	70
	可口可乐	2	165.1 ± 142.5	0.6 ± 0.7	50
	可口可乐	20	253.0 ± 97.1	0.4 ± 0.7	30
	可口可乐	40	196.6 ± 93.5	0.8 ± 0.8	60
再现	可口可乐	60	241.0 ± 87.3	0.4 ± 0.5	40

表 5 咖啡因和可口可乐对小鼠化学性记忆障碍 (跳台法) 的改善作用

化合物	剂量 (mg/kg)	记忆过程	错误次数		潜伏期 (秒)	错误反应率 (%)		
			训练	测验	测验			
樟柳碱水	5	获	1.9 ± 0.9	2.0 ± 1.1**	21.7 ± 27.3**	100**		
	0		1.5 ± 0.7	0.3 ± 0.5	149.3 ± 51.9	30		
	咖啡因		20	2.0 ± 0.8	2.6 ± 1.1	31.5 ± 58.2	100	
	可口可乐		2	1.7 ± 0.8	0.8 ± 0.8▲▲	77.7 ± 88.6	60▲	
"	20	得	2.5 ± 2.6	2.5 ± 2.1	34.5 ± 59.3	90		
"	40		1.7 ± 1.1	0.9 ± 0.6▲	60.4 ± 86.0	80		
环己酰亚胺水	120	巩固		2.8 ± 1.6**	57.3 ± 60.9**	88.9*		
	0			0.3 ± 0.5	152.5 ± 54.7	30.0		
	咖啡因		20		0.7 ± 0.9▲▲	153.3 ± 53.7▲▲	55.6	
	可口可乐		2		2.0 ± 1.2	117.5 ± 70.8	70.0	
"	20	巩固		0.4 ± 0.7▲▲	131.8 ± 73.3▲	33.3▲		
"	40			0.8 ± 0.8▲▲	121.0 ± 68.2	44.4		
乙醇 (30%) 水	10ml/kg	再现		1.2 ± 1.1*	88.8 ± 80.7*	70*		
	0			0.3 ± 0.7	162.5 ± 44.4	20		
	咖啡因		20		0.5 ± 1.0	135.0 ± 72.5	30	
	可口可乐		2		0.5 ± 0.7	124.6 ± 75.9	40	
	"		20	再现		0.2 ± 0.4▲	166.6 ± 37.4	20▲
	"		40			0.7 ± 0.8	108.9 ± 76.9	50

* 与对照组相比较 P < 0.05 } 损害记忆 ▲ 与对照组相比 P < 0.05 } 改善记忆
 • 与对照组比较 P < 0.01 } ▲▲ 与对照组相比 P < 0.01 }

表 6 咖啡因和可口可乐对小鼠化学性记忆障碍(避暗法)的改善作用

化 合 物	剂 量 (mg/kg)	记 忆 过 程	潜 伏 期 (秒)		错 误 次 数 测 验	错误反应率 (%)
			训 练	测 验		
樟 柳 硷 水	5	获	75.7 ± 116.3	17.2 ± 18.0**	1.9 ± 1.2*	100*
	0		55.7 ± 36.8	151.7 ± 130.7	0.7 ± 0.7	60.0
	20		23.8 ± 15.0	15.6 ± 17.6	2.4 ± 1.1	100.0
咖 啡 因 可 口 可 乐	2	得	16.8 ± 9.9	31.9 ± 33.3	1.7 ± 0.7	100.0
	20		24.2 ± 10.3	83.0 ± 118.4	1.8 ± 1.2	80.0
	40		51.6 ± 93.3	19.6 ± 16.7	2.1 ± 0.9	100.0
环 己 酰 亚 胺 水	120	巩		71.9 ± 95.5	2.2 ± 1.2**	100.0
	0			96.9 ± 88.4	1.0 ± 0.5	90.0
	20			177.8 ± 130.2	0.9 ± 0.9▲	55.6▲
咖 啡 因 可 口 可 乐	2	固		71.0 ± 90.3	1.6 ± 1.0	90.0
	20			129.4 ± 136.4	1.1 ± 0.9▲	66.7
	40			123.8 ± 134.4	1.3 ± 1.2	66.7
乙 醇 (30%) 水	10ml/kg	再		150.1 ± 133.6	1.7 ± 2.1	70.0
	0			182.1 ± 125.9	1.3 ± 1.4	50.0
	20			166.8 ± 125.4	1.2 ± 1.2	60.0
咖 啡 因 可 口 可 乐	2	现		159.6 ± 132.5	1.0 ± 1.1	60.0
	20			159.9 ± 131.9	1.4 ± 1.4	60.0
	40			147.5 ± 133.8	1.7 ± 1.8	50.0

* 与对照组相比 $P < 0.05$
** 与对照组相比 $P < 0.01$

损害记忆

▲ 与对照组相比 $P < 0.05$
▲▲ 与对照组相比 $P < 0.01$

改善记忆

1. 一次经口给予不同浓度的可口可乐对小鼠记忆获得过程的影响呈剂量—反应关系; 2mg/kg的可口可乐对小鼠记忆获得过程不仅无干扰作用, 反而有一明显的促进作用。如跳台法24h重测验时, 未发现昆明种小鼠有错误反应, 其平均错误次数, 错误反应百分率均较对照组低, 差异有显著性意义 5mg/kg可口可乐则无明显作用; 20、40、60 mg/kg的可口可乐则对此过程有一定影响, 20mg/kg的咖啡因亦有同样的作用, 表现在训练和24h重测验时, 动物有时平均错误次数增加和平均潜伏期缩短, 但这种干扰作用是短时和可逆的, 因为在48h重测验和72h消退实验时, 各组间未表现出明显差异 ($P > 0.05$)。

2. 未见到咖啡因和可口可乐各剂量组对记忆巩固和记忆再现过程有明显的干扰或促进作用。

3. 咖啡因和不同浓度的可口可乐对KM、C57BL/6j、NIH三个不同品系小鼠记忆获得过程的影响基本一致, 每批小鼠多次重复同一实验也取得了相似的结果。

又由表5、表6可见咖啡因和可口可乐对化学性记忆障碍小鼠的影响如下:

1. 给樟柳硷后, 小鼠的记忆获得遭到严重破坏, 表现在樟柳硷组跳台、避暗的平均错误次数增多, 平均潜伏期缩短和出现错误反应的动物数增多, 达到100% (对照组则分别为30%和60%), 差异均有显著性意义。注射樟柳硷之前50min灌喂咖啡因和不同浓度的可口可乐, 对损害的记忆有改善作用, 这种作用在跳台法实验中较为明显。表现为2、40mg/kg的可口可乐使跳台平均错误次数减少 (分别为 0.8 ± 0.8 和 0.9 ± 0.6 , 樟柳硷组为 2.0 ± 1.1 , $P < 0.01$, $P < 0.05$); 2mg/kg的可口可乐组出现错误反应的动物数下

降(为60%,樟柳硷组则为100%, $P < 0.05$) 在避暗法未观察到咖啡因和可口可乐的此种效应。

2. 给环己酰亚胺后,小鼠的记忆巩固亦遭到严重破坏,环己酰亚胺组小鼠跳台法平均错误次数增多(2.8 ± 1.6 ,对照组 0.3 ± 0.5 , $P < 0.01$),平均潜伏期缩短(57.3 ± 60.9 ,对照组 152.5 ± 54.7 , $P < 0.01$)和出现错误反应的动物数明显增多(达到88.9%,对照组为30%, $P < 0.05$);避暗法平均错误次数亦增加(2.2 ± 1.2 ,对照组 1.0 ± 0.5 , $P < 0.01$)。20mg/kg咖啡因和20mg/kg可口可乐在跳台法和避暗法,40mg/kg可口可乐在避暗法对损害的记忆有明显的改善作用。

3. 30%乙醇10ml/kg可使小鼠跳台法错误次数、平均潜伏期和错误反应率增加,与对照组比较差异显著,20mg/kg的可口可乐可显著改善这种情况,小鼠跳台错误次数为 0.2 ± 0.4 (乙醇组 1.2 ± 1.1),平均潜伏期为 166.6 ± 37.4 (乙醇组 88.8 ± 80.7)错误反应率为20%(乙醇为70%)经统计学处理,两组间差异达到显著性水平($P < 0.05$),在避暗法,咖啡因和不同浓度的可口可乐对小鼠记忆再现障碍无明显改善作用。

一般认为^{[4]、[5]},记忆是训练的结果。通过学习而习得的行为或经验的保持和再现就是记忆。按照信息论的观点,记忆的过程可分为识记或获得(registration)或(acquisition),贮存和巩固(store)和(consolidation)以及再现或再认(retrieval)或(recognition)三个阶段。本实验通过三种不同的给药方案分别观察受试物对小鼠记忆这三个阶段的影响,得到的结果(见前述)与国外绝大多数有关咖啡因的文献报道较为一致^{[6]、[7]、[10]},即咖啡因在较低剂量时,如1—5mg/kg在试验前后投与不仅不会干扰学习记忆,而且会不同程度地促进学习和记忆过程,本研究发现2mg/kg的可口可乐对小鼠记忆获得过程有

一明显的促进作用,在较高剂量时,本实验为20mg/kg及更高剂量的咖啡因和可口可乐会影响学习记忆过程。国内有学者^[11]研究发现相当于含咖啡因2mg/kg的可口可乐对大鼠高架迷津学习来表现出任何作用;5mg/kg时在主动回避反应中表现出明显的干扰作用;相当于含咖啡因20、40mg/kg的可口可乐在这两种不同类型的学习中同样表现出了干扰作用,这些与本实验结果及国外报道不完全一致。

尽管咖啡因影响动物学习记忆的研究报道很多,但少有同时研究其对记忆全过程和记忆消退过程的报道,结合咖啡因和可口可乐对化学性记忆障碍小鼠的影响作用将有助于阐明其可能的作用机制。

目前认为^[5],采用记忆缺失的动物模型不但有助于评定受试物的作用,且可初步分析受试物的作用机制。

一般认为乙酰胆硷与记忆有密切关系,即胆碱能径路本身构成记忆径路^[2],蛋白质合成是长期记忆的内在基础,在学习过程中形成新的蛋白质是记忆的贮存分子^{[2]、[12]、[13]}。我们采用M胆硷阻滞剂樟柳硷和蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺引起小鼠记忆获得和巩固不良,采用乙醇造成小鼠记忆再现不良,后者影响记忆的确切机制目前尚不明确,其在体内引起的生化变化涉及许多方面,如脑内蛋白质和RNA生物合成受阻,胆硷能、多巴胺等多种系统也均发生改变^[1]。结果发现:20mg/kg的咖啡因及各种浓度的可口可乐均表现出对小鼠记忆障碍的改善作用,这种作用在跳台法实验中较为明显,见表5、6 Flood做了一些类似的实验,他发现在被动回避反应的记忆巩固和再现过程中,先注射蛋白质合成阻断剂Anisomyein再给予20mg/kg的咖啡因和尼古丁等物可以明显降低遗忘动物的百分率。

咖啡因的这种效应可能是由于①它对中

枢神经系统有兴奋作用,因而提高注意力,觉醒和运动活动水平^{6,7,10,14},从而易化并间接改善记忆过程,②它可直接拮抗或降低M—胆碱阻滞剂和蛋白质合成抑制剂引起的遗忘效应^{5,14}。

值得注意的是,咖啡因对学习记忆的作用决定于人和动物在给药前的神经功能状态⁵,动物在给药前处于高兴奋状态或学习成绩好者,咖啡因几无作用甚或产生破坏作用反之,动物于给药前处于低活动水平或学习成绩差者,则能促进学习和记忆的巩固。咖啡因这种作用的双向性可以解释20mg/kg咖啡因及不同浓度可口可乐对正常小鼠记忆获得过程的破坏作用,对记忆巩固和再现过程无明显作用及对小鼠记忆障碍的改善作用,在48h重测验时破坏作用消失,说明这种作用短暂而不持久,是完全可逆的。后述的实验结果证实,测定前1h给小鼠20mg/kg的咖啡因及20、40mg/kg的可口可乐,动物昼夜自主性活动量显著增加,而给受试物24h后测定,其活动量均接近于基础活动水平,也就是说在给受试物后1h检测其对记忆获得过程的影响时,动物正处于高兴奋状态,尤以较高剂量组($\geq 20\text{mg/kg}$)为甚,由此产生了对此记忆过程短暂的干扰作用。

咖啡因和不同浓度的可口可乐对三个不同种属小鼠记忆过程的影响基本相同,我们发现,尽管这三种小鼠的兴奋性不同,但在统计学上的差异却是较为一致的,这与Seale¹⁵和Sinton¹⁶等人的报道不完全相同,说明这三种小鼠对跳台法和避暗法被动回避

反应的敏感性无明显差别,推测如果增加行为学实验的类型,也许会发现这种差别。

参 考 文 献

1. 张均田、斋藤洋, 药学报 21(1), 12—7, 1986
2. 张秀娟、张均田, 药学报 21(10), 731—5, 1986
3. 谭文才、张均田, 中国医学科学院学报8(5), 366—70, 1986
4. 行为药理与神经递质受体 中国医学科学院药物研究所教材
5. 张均田 学习记忆的神经生理生化机理和药物研究现状. 药理学进展 王建华 张均田编辑, 人民卫生出版社 P224—236, 1987
6. Stripling, J S. Psychopharmacologia 38, 181—200, 1974
7. Castellano C. Psychopharmacologia 48, 255—260, 1976
8. Izquierdo, et al. Psychopharmacologia 61, 29—30, 1979
9. Izquierdo, et al. IRCS. Med. Sci. Libr. Compend. 10(5), 387, 1982
10. Brown, et al. Psychopharmacologia 11, 143—153, 1967
11. 张学明, 等·可口可乐的行为毒理学研究·中华医学学会第二届全国食品卫生学术会议交流资料, 1987
12. Leavitt F, et al. Drugs and behavior. 2ed. New York: John Wiley and Sons, 353—369, 1982
13. Edward L B, et al. In, Cherkin A, et al. Physiology and cell biology of agine (Agine V.8), New York: Raven Press, 141—150, 1979
14. Flood J F. Science 199, 4324—4326, 1978
15. Seale T W, et al. Pharmacol. Biochem. Behav 20(4), 567—73, 1984
16. Sinton. C. M. et al. Psychopharmacology 75, 69—74, 1981