

104-1-54  
在细胞外无钙条件下 3,4-二氨基吡啶诱发海马释放去甲肾上腺素<sup>1</sup>

黄华玉、戴树平、谢培国、徐 艳 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国) R 964

3,4-Diaminopyridine-evoked norepinephrine release from hippocampal in the absence of extracellular calcium

HUANG Hua-Yu, DAI Shu-Ping, XIE Pei-Guo, XU Yan  
(Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**ABSTRACT** Slices of rat hippocampus, preincubated with [<sup>3</sup>H]norepinephrine ([<sup>3</sup>H]NE), were superfused and stimulated by addition of 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) for 10 min to the superfusion medium. 3,4-DAP-evoked [<sup>3</sup>H]NE release both in the absence and presence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. 3,4-DAP-evoked Ca<sup>2+</sup>-independent release of [<sup>3</sup>H]NE was highly sensitive to sodium channel blocker, tetrodotoxin (TTX, 100% inhibition), suggesting that Na<sup>+</sup> per se entered into nerve terminals but not depolarization of membrane followed by Ca<sup>2+</sup> channel opening is necessary for 3,4-DAP-evoked Ca<sup>2+</sup>-independent release of [<sup>3</sup>H]NE. Phorbol ester PDB increased by 480% of control and polymyxin B (PMB) decreased 3,4-DAP-evoked [<sup>3</sup>H]NE release by 94% of control in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> indicating that the alterations of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-currents into the cells are not involved in the mechanism of the modulation of 3,4-DAP-evoked [<sup>3</sup>H]NE release by protein kinase C.

**KEY WORDS** aminopyridines; hippocampus; norepinephrine; extracellular space; calcium; protein kinase C

**提要** 在细胞外正常钙浓度下, 3,4-二氨基吡啶诱发大鼠海马释放去甲肾上腺素包含两个成分, 即钙依赖和钙不依赖释放。细胞外无钙时, 只出现钙不依赖释放。钙不依赖释放被河豚毒素完全抑制, 吡啶醇基酯或多粘菌素 B 仍能加强或减弱它, 说明蛋白激酶 C 对 3,4-二氨基吡啶诱发释放去甲肾上腺素的调制机制

Received 1991 Feb 25 Accepted 1991 Jun 26  
<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China. No 39070328

并不涉及膜上的钙离子通道。

**关键词** 氨基吡啶类; 海马; 去甲肾上腺素; 细胞外间隙; 钙; 蛋白激酶 C

3,4-二氨基吡啶 (3,4-diaminopyridine, DAP) 能有力地加强海马释放去甲肾上腺素<sup>(1)</sup>, 该作用对河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 敏感, 突触前去甲肾上腺素能  $\alpha_2$ -自身受体, 阿片受体  $\kappa$  亚型以及腺苷酸 A<sub>1</sub> 受体参与该作用的调制, 而且蛋白激酶 C 的激活剂吡啶醇基酯 (4 $\beta$ -phorbol 12,13-dibutyrate, PDB) 或抑制剂多粘菌素 B (polymyxin B sulfate, PMB) 能加强或减弱该作用<sup>(2)</sup>, 说明蛋白激酶 C 参与该作用的调制。本工作的目的是在无钙条件下, 进一步研究蛋白激酶 C 激活对 [<sup>3</sup>H]NE 释放的加强作用。

**MATERIALS AND METHODS**

**药品和试剂** [<sup>3</sup>H]去甲肾上腺素 (*l*-[7,8-<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H]NE, Amersham); DAP, PDB, TTX, PMB (Sigma); Soluene 350, Insta-gel XF, Hionic-Fluor (Packard), desipramine (Merck)。药物的贮备液用生理溶液或重蒸馏水配制, TTX 溶于枸橼酸钠缓冲液 pH 4.85, 4 $\beta$ -PDB 溶于 dimethylsulfoxide (DMSO)。

Sprague-Dawley 大鼠,  $\hat{\sigma}$ , 体重 250  $\pm$  s 25 g, 断头, 取全脑, 投入 4 $^{\circ}$ C 生理溶液, 在 6-8 $^{\circ}$ C 下分离海马, 用 McIlwain 组织切片机, 沿板状器方向制备厚 0.4 mm 的脑片, 用生理溶液淋洗后, 加入 2 ml 含 [<sup>3</sup>H]NE (1.6 PBq  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>, 0.1  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的生理溶液, 37  $^{\circ}$ C 保温 30 min, 再用生理溶液淋洗 3 次, 将脑片随机转入容量 1 ml 的灌流小室, 每室 1

片, 以  $0.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  流速进行表面灌流. 生理溶液成分 ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): NaCl 118, KCl 4.8,  $\text{CaCl}_2$  1.3,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, 葡萄糖 11, 抗坏血酸 0.57,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.03. 用 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  饱和. 加 NaOH 调 pH 至 7.4. 灌流液中另加 desipramine  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  灌流 45 min 后, 将流出液直接收集入闪烁杯内, 每 5 min 1 份, 加入闪烁液 Insta-gel XF 4 ml, 用液体闪烁计数器测  $^3\text{H}$  含量. 脑片用 Soluene 350  $0.25 \text{ ml}$  溶解后, 加入 Hionic-Fluor  $5 \text{ ml}$ , 然后测定  $^3\text{H}$  含量.

在灌流开始后 60 min, 脑片接受刺激(引入 3,4-DAP  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 持续 10 min, 以诱发  $^3\text{H}$ NE 释放, 通常在刺激之前 15 min 加入药物, 以测试其对诱发释放的影响, 每次同时进行对照实验.

被测药物的作用以计算刺激所诱发释放的  $^3\text{H}$ (包括刺激开始后 10 份样品中  $^3\text{H}$  含量减去基础释放量) 占脑片  $^3\text{H}$  总含量的百分率来评价, 所有结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用  $t$  检验测定组间差别的显著性<sup>(3)</sup>.

RESULTS

**细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  对 DAP 诱发海马释放 NE 的影响** 将 DAP 引入灌流液中, 明显加强  $^3\text{H}$ NE 释放, 10 min 后撤去刺激, 释放逐渐下降并恢复到基础水平. DAP 对  $^3\text{H}$ NE 释放的诱发作用呈浓度依赖关系, 无论在细胞外有钙或无钙条件下, 从 3,4-DAP  $50\text{--}400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用直线上升, 尽管在无钙时的作用明显低于有钙时(Fig 1).

**比较细胞外有钙和无钙条件下, DAP 诱发海马释放  $^3\text{H}$ NE 的时程** 将 3,4-DAP  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引入脑片周围的灌流液中 10 min, 在灌流液含  $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  时  $^3\text{H}$ NE 释放显著增加, 在刺激期间释放达最大值, 刺激停止后, 释放逐渐下降, 在刺激开

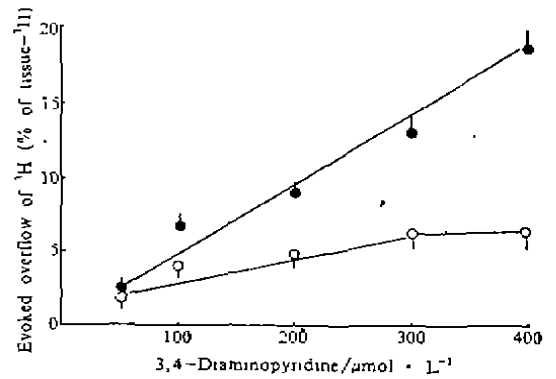


Fig 1. 3,4-Diaminopyridine-induced release of  $^3\text{H}$ NE from 2 rats hippocampal slices superfused with medium containing  $\text{Ca}^{2+} 0$  (○) or  $1.3$  (●)  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .  $n=4\text{--}6$  slices / rat,  $\bar{x} \pm s$ .

始后 50 min 内恢复到基础值. 但在细胞外无钙时, 3,4-DAP  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  诱发的  $^3\text{H}$ NE 释放在刺激停止后继续上升, 在刺激停止后的第 1 个 5 min 期间释放达最大值, 然后逐渐下降, 同样在刺激开始后 50 min 内恢复到基础值(Fig 2).

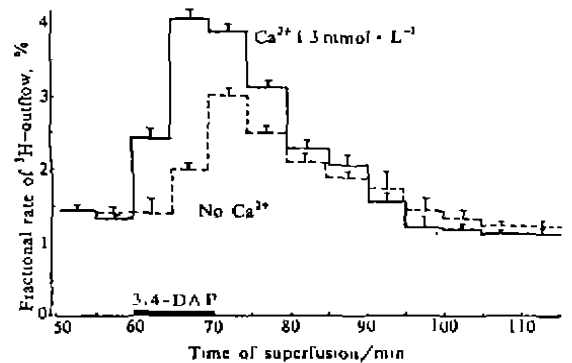


Fig 2. 3,4-Diaminopyridine-evoked  $^3\text{H}$ NE release from 2 rats hippocampal slices superfused with / without  $\text{Ca}^{2+}$ .  $n=4$  slices / rat,  $\bar{x} \pm s$ .

**TTX 对 DAP 诱发  $^3\text{H}$ NE 释放的影响** 在细胞外无钙条件下, 在刺激前 15 min 加入 TTX  $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 仍能完全地阻断 DAP

诱发<sup>3</sup>H]NE 释放(对照组 4.0 ± 0.6%, TTX 组 0.1 ± 0.7%, *P* < 0.001).

**蛋白激酶 C 的激活剂 PDB 对 DAP 诱发<sup>3</sup>H]NE 释放的加强作用** 在细胞外有钙情况下, 向灌流液中引入 3,4-DAP 100 μmol · L<sup>-1</sup> 10 min 刺激脑片释放<sup>3</sup>H]NE, 该诱发释放量为脑片<sup>3</sup>H]总含量的 6.5 ± 0.7%, 在细胞外无钙情况下诱发释放量为 3.5 ± 0.5%, 两者之差为组织<sup>3</sup>H]总含量的 3.2%. 如果在刺激前 15 min 引入蛋白激酶 C 激活剂 PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup>, 在细胞外有钙和无钙情况下 DAP 诱发的<sup>3</sup>H]NE 量显著增加到组织<sup>3</sup>H]总含量的 24.4 ± 2.0% 和 20.7 ± 2.0% (*P* < 0.001), 两者之差为 3.6%, 与不加 PDB 时相比无显著差别 (*P* > 0.05). 在使用 DAP 200 μmol · L<sup>-1</sup> 诱发<sup>3</sup>H]NE 释放实验中, 亦得到同样的结果. 若在无钙灌流液中加入 1 mmol · L<sup>-1</sup> EGTA 以除去细胞外液中可能存在的微量钙离子, 实验结果基本不变 (Tab 1).

**蛋白激酶 C 的抑制剂, PMB 对 DAP 诱发<sup>3</sup>H]NE 释放的抑制作用** 在刺激之前 45 min 给予 PMB 100 μmol · L<sup>-1</sup>, 3,4-DAP 100 μmol · L<sup>-1</sup> 诱发的<sup>3</sup>H]NE 释放, 在细胞外有钙和无钙情况下分别降低到对照组的 42% 和 6% (*P* < 0.01) (Fig 3).

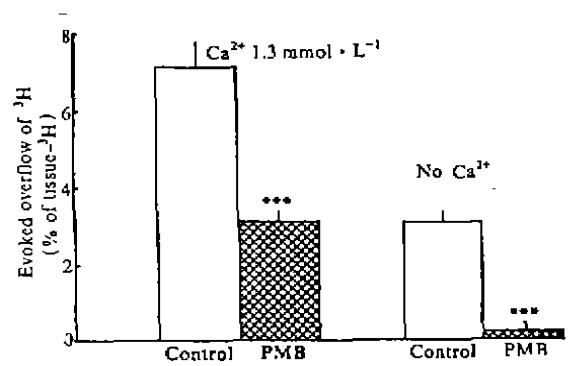


Fig 3. Effect of polymyxin B (PMB, add 45 min before stimulation) on 3,4-DAP-evoked <sup>3</sup>H]NE release from 2 rats hippocampal slices superfused with medium with / without Ca<sup>2+</sup>. *n* = 5 slices / rat,  $\bar{x} \pm s$ , \*\*\**P* < 0.01 vs control.

DISCUSSION

3,4-DAP 诱发大鼠海马释放 NE 包含两个成份: 钙依赖和钙不依赖释放. 在细胞外有钙条件下这两个成份同时存在, 在细胞外无钙条件下, 只出现钙不依赖释放部分. 两者之差就是细胞外钙离子通过膜上的电压敏感性钙离子通道进入膜内而引起的释放, 但这一部分释放不能单独活动. 在钙不依赖释放实验中, 细胞外 Ca<sup>2+</sup> (从细胞内向外渗漏的) 被涉及的任何可能性均可排除. 因为向灌流液中加入

Tab 1. Effects of 4β-phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) on 3,4-diaminopyridine-induced <sup>3</sup>H]NE release from rat hippocampal slices in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup> 1.3 mmol · L<sup>-1</sup>. Slices were superfused with medium containing Ca<sup>2+</sup> 1.3, 0 mmol · L<sup>-1</sup> or 0 mmol · L<sup>-1</sup> with EGTA 1 mmol · L<sup>-1</sup> and stimulated by DAP 100 or 200 μmol · L<sup>-1</sup>.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = number of observations, \*\*\**P* < 0.001 vs controls.

| Ca <sup>2+</sup><br>EGTA / mmol · L <sup>-1</sup> | <i>n</i> | Evoked overflow of <sup>3</sup> H] / % of tissue- <sup>3</sup> H] |          |               |          |               |
|---|----------|---|----------|---------------|----------|---------------|
|   |          | 1.3<br>0  | <i>n</i> | 0<br>0        | <i>n</i> | 0<br>1        |
| DAP 100 μmol · L <sup>-1</sup>                    |          |   |          |               |          |               |
| control   | 6        | 6.5 ± 0.7   | 6        | 3.5 ± 0.4     | 4        | 3.8 ± 0.4     |
| PDB   | 6        | 24.4 ± 2.0***   | 6        | 20.7 ± 2.0*** | 4        | 21.0 ± 0.8*** |
| DAP 200 μmol · L <sup>-1</sup>                    |          |   |          |               |          |               |
| control   | 4        | 8.9 ± 0.6   | 4        | 4.4 ± 0.3     | 4        | 4.4 ± 0.4     |
| PDB   | 4        | 29.5 ± 2.0***   | 4        | 24.4 ± 1.7*** | 4        | 25.0 ± 1.8*** |

1 mmol · L<sup>-1</sup> EGTA 足以将细胞外 Ca<sup>2+</sup> 浓度降低到 10<sup>-9</sup> mol · L<sup>-1</sup> (4), 而这时 DAP 诱发 [<sup>3</sup>H]NE 钙不依赖释放没有显著变化。

以往我们已在兔海马脑片上观察到 DAP 诱发 [<sup>3</sup>H]NE 释放对 Na<sup>+</sup> 通道阻断剂 TTX 高度敏感。本实验进一步观察到, 在细胞外无钙情况下, DAP 诱发 [<sup>3</sup>H]NE 释放亦被 TTX 完全阻断, 说明 DAP 诱发 [<sup>3</sup>H]NE 钙不依赖释放机制并不涉及细胞膜的去极化以及膜上电压敏感性 Ca<sup>2+</sup> 离子通道的开放, 而是进入膜内的 Na<sup>+</sup> 本身所引起的作用。因为细胞浆钠浓度提高, 可能通过加强钠钙交换动员细胞内贮备钙的释放, 最后导致神经递质的释放<sup>(5)</sup>。在释放的时间过程中观察到, 钙不依赖释放的峰值明显晚于细胞外有钙时, 这也说明在前者的释放机制中有着更; 为复杂的过程。

已有文献报道, 蛋白激酶 C 通过加强内向钙电流, 从而加强神经递质释放<sup>(6,7)</sup>。本实验观察到, 细胞外无钙条件下, 用 PDB 激活蛋白激酶 C 仍能加强 DAP 诱发的 [<sup>3</sup>H]NE 释放。值得注意的是, 在细胞外有钙和无钙时, DAP 诱发释放量之差, 在有无 PDB 存在时, 几乎相同, 这提示: 蛋白激酶 C 主要加强钙不依赖释放部分。另外, 蛋白激酶 C 的抑制剂 PMB 对 DAP 诱发 [<sup>3</sup>H]NE 释放的抑制作用特点亦支持这一结论, 因为在细胞外有钙时, PMB 只产生部分抑制作用, 而在细胞外无钙时, PMB 完全抑制了这一诱发释放。因此, 蛋白激酶 C 对 DAP 诱发大鼠海马 [<sup>3</sup>H]NE 释放的调制机制显然与神经末梢膜上

的电压敏感性钙通道的变化无关

#### REFERENCES

- 1 Huang HY, Allgaier C, Hertting G, Jackisch R. Phorbol ester-mediated enhancement of hippocampal noradrenaline release: which ion channels are involved? *Eur J Pharmacol* 1988; **153**: 175-84.
- 2 Huang HY, Hertting G, Allgaier C, Jackisch R. 3,4-Diaminopyridine-induced noradrenaline release from CNS tissue as a model for action potential-evoked transmitter release: effects of phorbol ester. *Eur J Pharmacol* 1989; **169**: 115-23.
- 3 Jackisch R, Werle E, Hertting G. Identification of mechanisms involved in the modulation of release of noradrenaline in the hippocampus of the rabbit *in vitro*. *Neuropharmacology* 1984; **23**: 1363-71.
- 4 Miledi R, Thies R. Tetanic and post-tetanic rise in frequency of miniature end-plate potentials in low calcium solutions. *J Physiol (Lond)* 1971; **212**: 245-57.
- 5 Crompton M, Moser R, Lüdi H, Carafoli E. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur J Biochem* 1978; **82**: 25-31.
- 6 Wakade AR, Malhotra RK, Wakade TD. Phorbol ester facilitates <sup>45</sup>Ca accumulation and catecholamine secretion by nicotine and excess K<sup>+</sup> but not by muscarine in rat adrenal medulla. *Nature* 1986; **321**: 698-708.
- 7 Zurgil N, Yarom M, Zisapel N. Concerted enhancement of calcium influx, neurotransmitter release and protein phosphorylation by a phorbol ester in cultured brain neurons. *Neuroscience* 1986; **19**: 1255-64.

#### 欢迎购阅《投稿须知》

《中国药理学报》根据国内外的新规定, 修改了投稿须知, 登载于本刊 1992 Jan; 13 (1): 3-8. 为投稿者必读的规范。现印少量单行本以满足作者需要。每份收成本费 1 元, 包括邮资, 请汇寄本刊编辑部。