

3,4-二氨基吡啉诱发去甲肾上腺素释放及 B-50 (GAP-43) 磷酸化¹黄华玉、唐彤²、陈秀芳(中国科学院上海生理研究所, ²中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031, 中国)

R365.2

3,4-Diaminopyridine-evoked norepinephrine release and B-50 (GAP-43) phosphorylation

关键词 钙; 3,4-二氨基吡啉; 去甲肾上腺素; B-50 (GAP-43); 蛋白激酶 C

HUANG Hua-Yu, TANG Tong², CHEN Xiu-Fang (Shanghai Institute of Physiology, ²Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT 3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) evoked [³H]norepinephrine ([³H]NE) release in rat hippocampal slices preincubated with [³H]NE and superfused with medium with or without Ca^{2+} . Phorbol ester 4 β -phorbol 12, 13, dibutyrate 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) enhanced and polymyxin B (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited the release of [³H]NE under both conditions. The neuron-specific protein B-50 is a major presynaptic substrate of protein kinase C and involved in exocytosis. Using *in situ* protein phosphorylation analyzed by SDS-PAGE and autoradiography, we observed that B-50 phosphorylation was significantly decreased by 3,4-DAP in the presence of extracellular Ca^{2+} and completely inhibited by removal of extracellular Ca^{2+} . It was suggested that B-50 phosphorylation was not involved in 3,4-DAP-evoked [³H]NE release.

KEY WORDS calcium; 3,4-diaminopyridine; norepinephrine; B-50 (GAP-43); protein kinase C

摘要 在胞外有 Ca^{2+} 或无 Ca^{2+} 时, 3,4-二氨基吡啉 (3,4-DAP) 都能诱发大鼠海马释放去甲肾上腺素, 哌啶醇基酯 (phorbol ester) 或多粘菌素 B 对此诱发释放有加强或抑制作用。在胞外有 Ca^{2+} 时, 3,4-DAP 显著地减弱 B-50 磷酸化, 除去胞外 Ca^{2+} , B-50 磷酸化完全被抑制。结果表明, B-50 磷酸化不参与 3,4-DAP 诱发海马去甲肾上腺素释放机制。

3,4-二氨基吡啉 (3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP) 能诱发海马释放去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)。蛋白激酶 C (PKC) 的激活剂 phorbol ester (4 β -phorbol 12, 13-dibutyrate, 4 β -PDB) 能加强这一诱发释放⁽¹⁾。位于突触前的 PKC 的特异性底物蛋白 B-50 (GAP-43) 磷酸化参与 4-aminopyridine (4-AP) 诱发神经递质释放以及 PKC 加强递质释放的机制⁽²⁾。本研究观察在细胞外有钙或无钙时, 3,4-DAP 诱发海马去甲肾上腺素的释放, 4 β -PDB 对这一诱发释放的加强作用以及脑片中 B-50 (GAP-43) 磷酸化, 以考察 B-50 磷酸化是否参与 3,4-DAP 诱发海马释放去甲肾上腺素及其调制机制。

MATERIALS AND METHODS

药品和试剂 [³H]NE (1-(7,8-³H) norepinephrine, [³H]NE, Amersham); 3,4-二氨基吡啉 (3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP), 哌啶醇基酯 (4 β -phorbol 12, 13-dibutyrate, 4 β -PDB), 多粘菌素 B (polymyxin B sulfate, PMB) (Sigma); Soluene 350, Insta-gel XF, Hionic-fluor (Packard), desipramine (Merck)。同位素标记的 n -[³²P]Na₃PO₄ (³²P, 无载体, 中国原子能研究院)。

[³H]NE 诱发释放实验 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 250 \pm s 25g, 断头, 取全脑, 投入 4℃ 生理溶液, 在 6-8℃ 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 [³H]NE (1.6 PBq \cdot mol⁻¹, 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的生理溶液, 37℃ 保温 30 min, 再用

Received 1991-12-10

Accepted 1992-07-01

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39070328 and No 9389007.

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, CaCl_2 1.3, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, 葡萄糖 11, 抗坏血酸 0.57, EDTA- Na_2 0.03。用95% O_2 +5% 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,将流出液收集入闪烁杯内,每5 min一份,加入闪烁液 Insta-gel XF 4 ml,用液体闪烁计数器测 ^3H 含量。脑片用 Soluenc 350 0.25 ml溶解后,加 Hionic-fluor 5 ml,然后测定 ^3H 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 ^3H NE释放,在刺激之前15 min和45 min加入4 β -PDB和PMB,以测试它们对诱发释放的影响,每次同时进行对照实验。药物的作用以计算刺激所诱发释放的 ^3H (包括刺激开始后10份样品中 ^3H 含量减去基础释放量)占脑片 ^3H 总含量的%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⁽³⁾。

体内 B-50 磷酸化实验⁽⁴⁾ 大鼠海马脑片0.4 mm,每管3片,加2 ml(含或不含 Ca^{2+})生理溶液,34°C保温30 min,然后将脑片移入900 μl (含3.7 MBq ^{32}P)生理溶液保温90 min,各管分别加入4 β -PDB $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或4 β -PDB $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4 β -PDB于3,4-DAP之前15 min加入,空白对照为不加任何药物。3,4-DAP作用10 min后,立即用4°C生理溶液(含或不含 Ca^{2+})洗去药物,并将反应管插入冰浴以终止反应。生理溶液成份: NaCl 124, KCl 5, MgSO_4 1.3, NaHCO_3 26, D-glucose 10, 含或不含 CaCl_2 $2 (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$, 用95% O_2 +5% CO_2 饱和,调pH至7.4。

从反应管中取出脑片,加入160 μl 蛋白变性溶液包含: Tris-HCl $62.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 6.8), 2.3%十二烷基磺酸钠(SDS), 10%甘油, 5% β -巯基乙醇和痕量溴酚兰制备匀浆,通过SDS-PAGE分离组织内的标记蛋白⁽⁵⁾。下胶(分离胶,110 mm \times 160 mm \times 1.2 mm)含有10%丙烯酰胺和0.27%双丙烯酰胺(Bis);上

胶(堆胶)含有4.4%丙烯酰胺和0.12% Bis。电泳缓冲液的成分为 Tris-HCl 0.05, EDTA 0.002, 甘氨酸 $0.375 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.1% SDS, pH 8.3。取组织匀浆20 μl (经定量测定含蛋白约35 μg)进行电泳。用作分子量测定的标准蛋白,分子量为:牛血清白蛋白 67 000, 卵清蛋白 43 000, 胰凝乳蛋白酶元 A 25 000 和核糖核酸酶 A 13 700。电泳电压:60 V, 电泳30 min,然后将电压调至125 V,电泳3-4 h,直到染料前沿到达离凝胶底边约1 cm处时停止电泳。凝胶经染色,真空干燥后,用放射自显影技术显示磷酸化蛋白电泳图谱。

RESULTS

1 在细胞外有 Ca^{2+} 条件下,将3,4-DAP引入脑片周围灌流液中, ^3H NE释放明显升高,10 min后撤去刺激,释放即逐渐下降,并恢复到基础水平。在细胞外无 Ca^{2+} 条件下,3,4-DAP亦能诱发 ^3H NE释放,10 min后撤去刺激,释放继续上升至高峰,然后逐步下降,并恢复到基础水平(Fig 1, 下部)。有 Ca^{2+} 组的释放量明显大于无 Ca^{2+} 组,两组之差(即由胞外 Ca^{2+} 进入胞内所引起的 Ca^{2+} -依赖性释放)为组织 ^3H 总含量的3.20%。

2 4 β -PDB加强3,4-DAP诱发 ^3H NE释放。无论在细胞外有无 Ca^{2+} 条件下,若刺激之前15 min加4 β -PDB $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3,4-DPA诱发 ^3H NE释放量显著增加,细胞外有 Ca^{2+} 组仍高于胞外无 Ca^{2+} 组,两组之差为组织 ^3H 总量的3.67% (Fig 1, 上部)与不加PDB时 (Fig 1, 下部)3.20%相比,无显著性差别($P > 0.05$)。

3 PMB抑制3,4-DAP诱发 ^3H NE释放。无论在细胞外有或无 Ca^{2+} 条件下,若在刺激之前45 min加入PMB $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3,4-DAP诱发 ^3H NE释放都受抑制,前者抑制了58%,后者抑制了94% (Tab 1)。

4 在细胞外有 Ca^{2+} 和无 Ca^{2+} 时B-50磷酸化。在细胞外有 Ca^{2+} 条件下,B-50磷酸化

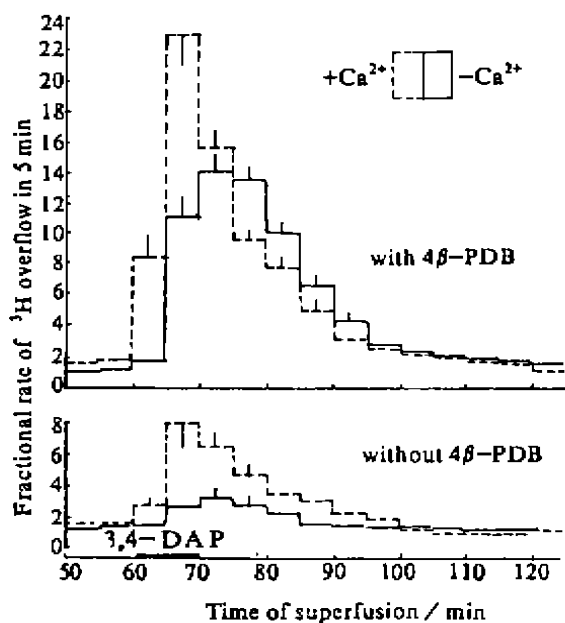


Fig 1. 3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP)-evoked ³H overflow in the presence or absence of extracellular Ca²⁺ with or without 4β-phorbol 12, 13 dibutyrate (4β-PDB). ³H overflow was induced by addition of 3,4-DAP 100 μmol · L⁻¹ for 10 min after 60 min superfusion. 4β-PDB 1 μmol · L⁻¹ was added 15 min before stimulation. n = 6-10 slices from 2-4 rats. $\bar{x} \pm s$.

Tab 1. Effects of polymyxin B (PMB) on 3,4-DAP-evoked [³H]NE release in the presence and absence of extracellular Ca²⁺. Hippocampal slices preincubated with [³H]NE, superfused with medium (with or without Ca²⁺) and stimulated by addition of 3,4-DAP 100 μmol · L⁻¹ for 10 min. PMB 100 μmol · L⁻¹ was added 45 min before the stimulation. n = 5-10 slices from 2-4 rats. $\bar{x} \pm s$. ***P < 0.001 vs controls.

	n	3,4-DAP-evoked ³ H overflow (% of tissue ³ H)	
		Ca ²⁺ 1.3 mmol · L ⁻¹	Ca ²⁺ 0 mmol · L ⁻¹
Control	10	7.04 ± 0.64	10 3.14 ± 0.34
PMB	5	3.10 ± 0.32***	5 0.16 ± 0.12***

结果(Fig 2, 左). 从左到右分别为: (0) 标准 B-50 蛋白磷酸化后的电泳定位(见箭头处); (1) 不加任何药物时, 磷酸化的 B-50 蛋白在标准蛋白相当的位置上被显示; (2) 加 4β-PDB 1 μmol · L⁻¹, B-50 磷酸化有所加强; (3) 加 3,4-DAP 200 μmol · L⁻¹ 10 min, B-50 磷酸化被抑制; (4)和(5) 4β-PDB 1 μmol · L⁻¹ 和 3,4-DAP 200 μmol · L⁻¹ 同时使用, B-50 磷酸化程度比单独使用 3,4-DAP 时略加强. 在细胞外无 Ca²⁺条件下, 脑片内的蛋白磷酸化普遍明显下降, 特别是 B-50 磷酸化几乎被完全抑制(Fig 2, right).



Fig 2. Effects of 3,4-DAP and 4β-PDB on B-50 protein phosphorylation *in vivo*. In the presence or absence of extracellular Ca²⁺ hippocampal slices were incubated with or without 3,4-DAP 100 μmol · L⁻¹ or/ and 4β-PDB 1 μmol · L⁻¹. *In situ* protein phosphorylation was analyzed by SDS-PAGE (10% gel) and autoradiography. The position of B-50 is indicated with an arrow. (0) standard B-50; (1) control; (2) 4β-PDB 1 μmol · L⁻¹; (3) 3,4-DAP 200 μmol · L⁻¹; (4) and (5) 4β-PDB 1 μmol · L⁻¹ + 3,4-DAP 200 μmol · L⁻¹.

DISCUSSION

1989年我们首次报道了3,4-DAP可以作为化学刺激物制造动作电位诱发神经递质释放模型,以研究递质释放及其调节机制。我们以往的实验结果⁽⁶⁾已提示其作用机制大致如下: (1)阻断 $I_D K^+$ 电流; (2)Na⁺通道开放,Na⁺进入细胞内; (3)细胞外Ca²⁺进入细胞内(在胞外无Ca²⁺时,进入膜内的Na⁺引起内源Ca²⁺释放); (4)最后诱发神经递质释放。现观察到用4 β -PDB激活蛋白激酶C,3,4-DAP诱发海马释放去甲肾上腺素显著加强,用PMB抑制PKC,能使这一诱发释放下降,而且PDB和PMB的作用主要在Ca²⁺不依赖释放部分。说明蛋白激酶C参与Ca²⁺不依赖释放机制。然而,PKC激活后加强胞吐的机制尚未得到阐明。位于突触前的蛋白激酶C的特异性底物蛋白B-50(GAP-43)参与胞吐机制,认为B-50磷酸化中介4-AP刺激去甲肾上腺素释放机制^(7,8)。我们观察到在细胞外有钙条件下,3,4-DAP对B-50磷酸化显示了抑制作用,这与Heemskerk等⁽⁹⁾1987年报道的结果相一致,而4 β -PDB无论在有无3,4-DAP的情况下都能加强B-50磷酸化。除去细胞外Ca²⁺,脑片中许多种蛋白(包括B-50)的磷酸化都受到很大抑制,而3,4-DAP诱发^[3H]NE释放仍非常明显,4 β -PDB对这一诱发释放的加强作用亦仍清晰可见,提示B-50磷酸化并不参与3,4-DAP诱发去甲肾上腺素释放或4 β -PDB加强这一诱发释放的机制,特别是在细胞外无Ca²⁺条件下。

ACKNOWLEDGMENTS 戴树平, 谢培国, 张建伟同志担任技术工作。

REFERENCES

- 1 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.
- 2 Dekker LV, De Graan PNE, Oestreicher AB, Versteeg DHG, Gispen WH. Inhibition of noradrenaline release by antibodies to B-50(GAP-43). *Nature* 1989; 342 : 74-6.
- 3 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.
- 4 Dekker LV, De Graan PNE, Versteeg DHG, Oestreicher AB, Gispen WH. Phosphorylation of B-50 (GAP 43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1989; 52 : 24-30.
- 5 Krueger BK, Forn J, Greengard P. Depolarization-induced phosphorylation of specific proteins, mediated by calcium ion influx, in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 1977; 252 : 2764-73.
- 6 Huang HY, Hertting G, Allgaier C, Jackisch R. 3,4-Diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampus: role of Na⁺ entry on Ca²⁺ pools of protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 1991; 206 : 221-30.
- 7 Heemskerk FMJ, Schrama LH, Ghijsen WEJM, De Graan PNE, Lopes da Silva FH, Gispen WH. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca²⁺ concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J Neurochem* 1991; 56 : 1827-35.
- 8 Heemskerk FMJ, Schrama LH, Gianotti C, Spierenburg H, Versteeg DHG, De Graan PNE, et al. 4-Aminopyridine stimulates B-50 (GAP43) phosphorylation and [³H]noradrenaline release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1990; 54 : 863-9.
- 9 Heemskerk FMJ, Schrama LH, De Graan PNE, Gispen WH. 4-Aminopyridine inhibits synaptosomal plasma membrane protein phosphorylation in vitro: effect of the selective NMDA-antagonist 2-amino-5-phosphonovalerate. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147 : 94-9.