

四氢小檗碱对中枢多巴胺突触前和突触后受体功能的阻滞作用

汪晓立 金国章 俞蕾平 李建华 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 THB(45 mg/kg, ip)拮抗去水吗啡所引起的大鼠嗅、舔、咬等定向活动, 并拮抗 *l*-dopa + 苄丝肼 + deprenyl 所引起的 DA 系统功能增强的活动, 表明 THB 阻滞 DA 突触后受体的功能. THB(100 或 150 mg/kg) 使大鼠纹状体内 HVA 含量增加 100-200%, THB(15-100 mg/kg) 并使纹状体内 *l*-dopa 含量增加 250-400%, 此效应可被去水吗啡完全拮抗; 而去水吗啡取消 GBL 积聚 *l*-dopa 的作用又被 THB 拮抗之. 这表明 THB 阻滞 DA 突触前受体的功能并与去水吗啡相互拮抗. 因此, 提示 THB 可能是 DA 受体阻滞剂.

关键词 四氢小檗碱; 去水吗啡; *r*-丁基内酯; 高香草酸; 左旋多巴; 定向活动; DA-受体阻滞剂

四氢小檗碱(tetrahydroberberine, THB)有安定作用⁽¹⁾, 近来又证明它对大鼠和小鼠引起的僵住症是由于 DA 受体功能受抑制, 而 M-ACh 功能相对亢进的缘故⁽²⁾, 这与安定剂的作用特征相似. 安定剂不但能阻滞 DA 突触后受体的生理功能, 还能阻滞 DA 突触前自身受体, 反馈性加强酪氨酸羟化酶(TH)的活力, 使脑内 *l*-dopa 生物合成明显增加, 应用脱羧酶抑制剂后易在纹状体内加以证实^(3,4). 本文进一步证明 THB 对 DA 突触前受体的阻滞作用, 着重研究它对大鼠纹状体中 *l*-dopa 含量的影响.

材 料

四氢小檗碱(THB)系游离碱, mp. 162-5°C, 由本所合成室制备, 用 2% 吐温-80 配成混悬液用于动物试验. 去水吗啡(apomorphine, APO)系沈阳制药厂出品; 氟哌啶醇(haloperidol, HAL)系上海十三制药厂出品; 苄丝肼(benserazide, Ro4-4602, 简称 Ro), *r*-丁基内酯(*r*-butyrolactone, GBL), B型单胺氧化酶抑制剂(MAOI-B) deprenyl 和 *l*-dopa 均系本所中间工厂制备; 阳离子交换树脂 Dowex

50W, X-4 系 Fluka AG & Buchs SG 出品; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-10 系 Pharmacia 出品.

方 法 和 结 果

THB 对去水吗啡引起的定向活动的影响

去水吗啡是 DA 受体专一的激动剂, 它所引起的定向活动是 DA 突触后受体功能亢进的表现. 选用大鼠的体重 $171 \pm (\text{SD}) 28 \text{ g}$, ♂ ♀ 兼用, 随机分组, 在室温 19-23°C 进行试验. 将大鼠预先放进 $35 \times 25 \times 20 \text{ cm}$ 铁丝笼内适应 30 min, 再 sc APO 5 mg/kg, 放回笼内, 10 min 后按记分法评定其嗅、舔、咬等定向活动情况⁽⁵⁾. 0 表示与生理盐水对照组的表現相同或安静少动; 1 表示大鼠出现间断性嗅; 2 表示大鼠围绕铁丝笼不断地嗅; 3 表示大鼠在较小

Table 1. Effect of THB on apomorphine-induced stereotyped behavior in rat

Rats	Drugs(mg/kg, ip)	Score($\bar{x} \pm \text{SD}$)
10	APO(5, sc)	2.8 ± 0.9]*
	APO + Saline	2.8 ± 0.9]
6	APO(5)	3.0 ± 0.0]**
	APO + THB(45)	1.2 ± 1.3]
9	APO(5)	3.0 ± 0.9]***
	APO + THB(60)	1.0 ± 1.3]
9	APO(5)	3.0 ± 1.0]***
	APO + THB(90)	0.2 ± 0.7]
10	APO(5)	2.7 ± 0.8]***
	APO + HAL(0.5)	0.9 ± 1.4]
6	APO(5)	3.2 ± 1.1]***
	APO + HAL(1.0)	0.6 ± 0.5]
8	APO(5)	2.6 ± 0.7]*
	APO + Phenobarbital-Na	2.6 ± 0.7]

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

1981年9月22日收稿 1981年12月28日修回
曾在1981年7月15日上海生理科学会上宣读

范围内连续地嗅并出现间断性舔、啃、咬；4表示大鼠连续地舔、啃、咬。评分后的大鼠分别作不同给药处理后，立即放回原处继续观察，并在30 min内再评分，与给药前作比较。大鼠sc APO 5 mg/kg，出现明显的定向活动，得分为 2.8 ± 0.9 ，可维持1-1½ h，大鼠ip THB 45, 60, 90 mg/kg后，在30 min内定向活动明显减弱，得分各为 1.2 ± 1.3 ， 1.0 ± 1.3 和 0.2 ± 0.7 (表1)。THB能有效地拮抗APO的作用($P < 0.05$ 或 0.01)说明THB具有阻断DA突触后受体功能的作用，与HAL的阻滞作用性质相似。镇静催眠药戊巴比妥钠(20 mg/kg, ip)使大鼠活动减少，但不影响嗅、舔、咬等行为。

THB对脑内DA功能增强表现的影响 选用的大鼠体重 165 ± 24 g，药物均ip。大鼠给予l-dopa(100 mg/kg)，苄丝肼(Ro, 300 mg/kg)和MAOI-B deprenyl(10 mg/kg)，1½ h后活动增加并伴有定向行为，约3 h后减弱。对照组大鼠作如上处理，在给药后2-3 h内每隔15 min评分1次，连续5次，总得分为 12.4 ± 2.6 ；另有3组大鼠在首次评分前15 min分别给予THB 30, 70, 100 mg/kg，总得分各为 9.7 ± 4.4 ， 2.8 ± 2.4 ， 2.9 ± 2.8 ，后两组与对照组有显著差别($P < 0.01$ ，表2)。这表明THB有对抗DA功能增强的表现，与拮抗APO定向活动的结果相一致。

Table 2. Effect of THB on dopaminergic activities in rat previously injected l-dopa 100 mg/kg in combination with benserazide 300 mg/kg and deprenyl 10 mg/kg

THB (mg/kg, ip)	Rats	Total score ($\bar{x} \pm SD$)
0	8	12.4 ± 2.6
30	9	$9.7 \pm 4.4^*$
70	8	$2.8 \pm 2.4^{***}$
100	7	$2.9 \pm 2.8^{***}$

* $P > 0.05$, *** $P < 0.01$

THB对纹状体内高香草酸(HVA)含量的影响 大鼠随机分为3组，对照组ip 2%吐温-80，其余2组分别ip THB 100或150 mg/kg，1 h后断头取脑，迅速分离纹状体，5只大鼠纹状体合并为一个样本(178 ± 24 mg)，用0.4 N HClO₄作匀浆，离心后取上清液，调整pH 2-3后加入预先制备好的Sephadex G-10柱内进行分离⁽⁶⁾，吸附在柱上的HVA用0.005 M磷酸缓冲液(pH 8.5)洗脱，收集2 ml，用K₃Fe(CN)₆氧化法测定荧光(320/440 nm)强度。回收率约75-86%。结果THB组的HVA含量分别为 675 ± 105 和 813 ± 90 ng/g组织，比对照组(229 ± 40 ng/g组织)约增加100-200%。提示THB促进DA神经元的活动。

THB对纹状体内l-dopa含量的影响

1. 树脂处理 先将树脂(H⁺型)用蒸馏水浸泡2 h，漂去过细颗粒。加2倍体积的2 N NaOH(内含1% EDTA)，用电磁搅拌洗涤10 min × 2次，用蒸馏水洗至中性后再用2倍体积2 N HCl在同样条件下洗涤5 min × 3次，用蒸馏水洗至中性后浸泡于0.1 M磷酸缓冲液(内含0.1% EDTA, pH 6.5)中，放于冰箱内备用。

2. l-dopa分离和荧光测定 3-4只大鼠纹状体合并为一块样本(131 ± 17 mg)，加6 ml冰冷的0.4 N HClO₄，0.1 ml 5% Na₂S₂O₈和0.2 ml 10% EDTA作匀浆，低温离心(20,000 × g, 4°C, 10 min)，取上清液，用5 N K₂CO₃调整pH至2，再离心(4,000转/min, 10 min)，去沉淀，上清液留作测定用。另取小脑组织2份，同样处理后作内标准和组织空白。临用前装好层析柱(0.5 × 4.0 cm)，依次加入上清液和下列试剂⁽⁷⁾：10 ml 0.1 M磷酸缓冲液(pH 6.5)，5 ml H₂O，上清液，7 ml 60%甲醇(洗去5 HIAA)，13 ml 60%甲醇，10 ml 0.1 M柠檬酸-磷酸钠缓冲液(pH 2.5)，10 ml H₂O，最后用5 ml柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5)洗脱l-dopa，弃去前1 ml，收集1 ml × 4管供测定用。加入上清液和收集含l-dopa洗脱液时采

Table 3. Effect of THB on *l*-dopa level of striatum in rats

Drug (mg/kg, ip)	Pooled samples	<i>l</i> -dopa(ng/g) ($\bar{x} \pm SD$)	% of control
Ro(800)	6	1162 ± 368	100
HAL(0.5) + Ro	4	8830 ± 1478***	501
THB(15) + Ro	3	4240 ± 273***	365
THB(30) + Ro	4	4885 ± 1324***	420
THB(100) + Ro	5	5815 ± 1105***	500
THB(70) + Ro	5	4831 ± 624***	416
APO(5) + THB(70) + Ro	3	2406 ± 811***	207
Ro(800)	3	435 ± 191	100
GBL(600) + Ro	3	1516 ± 480	349
APO(5) + GBL + Ro	4	199 ± 49	46
APO + THB(70) + GBL + Ro	4	992 ± 83	228

*** $P < 0.01$

用自然流速 0.2 ml/min, 其它各试剂过柱时均用自制减压抽滤器(约 10 mm Hg), 同时抽滤同批样本, 以减少误差, 控制流速在 0.5-0.6 ml/min.

荧光测定⁽⁷⁾时取洗脱液 1 ml + 0.15 M Na_2HPO_4 1 ml + 95% EtOH 0.4 ml + 0.2% ZnSO_4 0.1 ml + 0.1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1 ml, 控制反应 6 min, 最后用 5 N NaOH/1% 抗坏血酸(9/1, v/v) 1 ml 中止反应, 于 3-15 min 内进行荧光测定(355/490 nm). 实验在室温 17-26°C 进行, 过低时易析出沉淀物.

3. 给药试验 药物均 ip, 所有大鼠在给 Ro 后 30 min 处死取脑. 对照组单 ip Ro 800 mg/kg; THB 试验分 4 组: 分别在 Ro 前 5 min ip THB 15, 30, 70, 100 mg/kg; APO 组在 THB(70 mg/kg)前 5 min 先 ip APO 5 mg/kg; HAL 组在 Ro 前 1 h ip HAL 0.5 mg/kg. 结果表明 THB (15-100 mg/kg)使大鼠纹状体内 *l*-dopa 含量增加 2.5-4 倍(表 3), APO (5 mg/kg)有对抗 THB(70 mg/kg)的作用, 使 *l*-dopa 水平明显降低. HAL 亦增加 *l*-dopa 含量. 这表明 THB 和 HAL 一样能阻滞 DA 突触前受体, 反馈性增加 TH 活力.

THB 对 APO 取消 GBL 作用的影响 GBL 进入脑内水解为 r-羟基丁酸 (GHB), 使大鼠迅速出现麻醉作用, 并能选择性阻断 DA 神经冲动, 暂时切断黑质-纹状体神经元间连系⁽⁸⁾, 使纹状体内 DA 生物合成大大增加, 当 Ro 存在时 *l*-dopa 迅速积聚. 对照组大鼠 ip Ro 800 mg/kg 后 30 min 处死取脑, 其它各组分别作如下处理: 第 1 组 ip GBL 600 mg/kg 5 min 后给 Ro; 第 2 组先 ip APO 5 mg/kg, 10 min 后依次给 GBL 和 Ro; 第 3 组先给 APO, 5 min 后 ip THB 70 mg/kg, 又 5 min 后依次给 GBL 和 Ro. 试验证明 GBL 可使纹状体内 *l*-dopa 较对照组增加 250% 左右; APO 不但取消 GBL 作用, 并使 *l*-dopa 水平低于对照水平(表 3); THB 可翻转 APO 的作用, 使 *l*-dopa 增加为 APO 组的 5 倍左右, 虽未能恢复到 GBL 组水平, 但亦能充分说明 THB 促进 *l*-dopa 生物合成并拮抗 APO 抑制生物合成的影响. 提示 THB 和 APO 在 DA 突触前受体水平发生拮抗作用.

讨 论

本文研究了 THB 对 DA 突触后受体功能变化和纹状体内 DA 突触前受体反馈性调控生物合成的影响, 各种指标取得的结果, 一致表明 THB 对 DA 能受体有阻滞作用, 这进一步支持前文的结论⁽²⁾. 由于 THB 15 mg/kg 就有明显促进 *l*-dopa 生物合成, 提示 THB 对 DA 突触前受体生化指标的影响比突触后受体的生理效应更敏感.

THB 阻滞 DA 突触后受体功能, 拮抗 APO

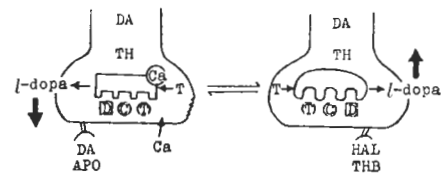


Fig 1. Model of conformational changes of tyrosine hydroxylase controlled by presynaptic DA-receptor. C = pteridine cofactor; D = end product DA; T = tyrosine; TH = tyrosine hydroxylase

和 DA 的效应很容易理解.但是如何理解 THB 阻滞 DA 突触前受体, 反馈性增强 DA 神经元活动, 导致 HVA、*l*-dopa 水平增高呢? 根据生化、电生理、神经药理实验证明位于 DA 神经末梢的自身受体参与 DA 生物合成和释放的调节(图 1)^(3,4), 在正常情况下, 自身受体(即突触前受体)对 DA 生物合成存在抑制性影响, 这负反馈调控概念已成为当前研究有关 DA 功能的重要学术见解.

HVA 是 DA 代谢的终产物, 主要来源是突触前部位, 由 DA 神经元内的 MAO 直接代谢, 再由神经元外的 COMT 转化成 HVA, 少部分 HVA 来自突触后释放的 DA, 先经 COMT 而后由 MAO 作用而来, 因此 HVA 含量变化能反映 DA 神经元的活动⁽⁸⁾. 已知安定剂能升高脑内 HVA 水平是由于阻滞了 DA 突触前受体, 反馈性促进生物合成的结果, 推论 THB 也通过类似机制促进 DA 生物合成. 为了证实这个想法, 最理想的指标是测定 *l*-dopa 含量的变化.

脑内脱羧酶活力很强, 通常情况下 *l*-dopa 不会积聚, 只有在脱羧酶被抑制的条件下, 防止它脱羧为 DA, 此时 *l*-dopa 积聚的程度可以反映 TH 的作用活力, 由于 TH 是 DA 生

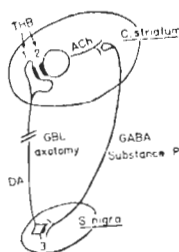


Fig 2. Neuronal circuit in substantia nigra and corpus striatum. 1) presynaptic DA-receptor in DA nerve ending; 2) postsynaptic DA-receptor located on M-ACh neuron; 3) DA-autoreceptor in DA neural soma.

物合成的限速环节, 所以测定 *l*-dopa 含量是反映 TH 活力的直接指标. Roth 等人提出 TH 两个构象互变的学说, 并阐明了 DA 突触前受体参与构象变化, 形成反馈调节的机

制.

DA 受体激动剂能兴奋突触前受体, 反馈性抑制 TH 活力, 故使 *l*-dopa 水平降低; 反之, DA 受体阻滞剂能反馈性增加 TH 活力, 使 *l*-dopa 水平增高. THB 促进纹状体内 *l*-dopa 大量积聚, 并翻转 APO 的抑制作用, 提供了它与 APO 在突触前受体水平进行竞争性拮抗的证据. THB 的这作用特性完全符合 DA 能受体阻滞剂的作用规律(图 1).

由于采用纹状体作试验, 所以 ACh-GABA-DA 神经环路对 *l*-dopa 生物合成的影响可能存在. 为了排除这些影响, 进一步证明 THB 对突触前受体的专一作用, 利用 GBL 抑制 DA 神经冲动的特性, 提供了一个专门用于研究突触前受体功能, 较为简便和可信的整体试验模型, 可评价药物对 DA 突触前受体兴奋或阻断的能力(图 2). 例如, 麦角类化合物, APO、各种安定剂的作用均支持这个可靠的事实^(9,11). 本文应用此法研究 THB 的作用以及它和 APO 的作用关系, 进一步证明 THB 具有阻断 DA 突触前受体的能力(图 2).

目前, 对 DA 受体的研究进展很快, 有关资料提示脑内存在多种 DA 受体亚型^(12,13). 已发现 DA 受体阻滞剂主要化构类型有 4 种—吩噻嗪类、丁酰苯类, sulpiride 和 clozapine 这些阻滞剂作用在不同亚型, 已受到普遍的重视. 我们证实四氢小檗碱有阻滞 DA 突触前、后受体的作用, 由于它的化学结构与上述已知 DA 受体阻滞剂都不同, 是一项有意义的发现. 有关 THB 的作用特点及临床价值正在进一步研究中.

参 考 文 献

- 1 金国章、竺心影、唐希灿、胥 彬. 生理学报 1962 年 9 月; 25 (3):182
- 2 汪晓立、洪庚辛、金国章. 中国药理学报 1981 年 12 月; 2(4):230
- 3 Roth RH, Walters JR, Murrin LC, Morgenroth VH. Dopamine neurons: Role of impulse flow and presynaptic receptors in the regulation

- of tyrosine hydroxylase. In: Usdin E, Bunney WE, eds. *Pre- and postsynaptic receptors*. 1st ed. NY: Marcel Dekker, 1975: 1—48
- 4 金国章. 脑内多巴胺能神经系统和安定剂的作用. 药理学进展. 第1版. 上海: 上海科技出版社, 1980: 43—56
 - 5 Costall B, Naylor RJ. *Eur J Pharmacol* 1973 May; 24 (1): 8
 - 6 杨方中、许建、金国章、俞蕾平、韩怡凡. 生理学报 1980年10月; 32 (4): 343
 - 7 Kehr W, Carlsson A, Lindqvist M. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1972 Aug; 274 (3): 273
 - 8 Westerink BHC. The effects of drugs on dopamine biosynthesis and metabolism in the brain. In: Horn AS, Korf J, Westerink BHC, eds. *The neurobiology of dopamine*. 1st ed. NY: Academic Press, 1979: 255—91
 - 9 Walters JR, Roth RH. *J Pharmacol Exp Ther* 1974 Oct; 191 (1): 82
 - 10 Andén N-E, Grabowska-Andén M. *Presynap-tic and postsynaptic effects of dopamine receptor blocking agents*. In: Poirier LJ, Sourkes TL, Bedard PJ, eds. *Advances in neurology*, vol 24. 1st ed. NY: Raven Press, 1979: 235—45
 - 11 Marek KL, Roth RH. *Eur J Pharmacol* 1980 Mar; 62 (2/3): 137
 - 12 Spano PF, Memo M, Stefanini E, Fresia P, Trabucchi M. Detection of multiple receptors for dopamine. In: Costa E, Greengard P, eds. *Advances in biochemical psychopharmacology*, vol 21. 1st ed. NY: Raven Press, 1980: 243—51
 - 13 Cools AR. Rapid development of hypersensitivity and hyposensitivity to apomorphine and haloperidol: Role of norepinephrine receptor mechanisms. In: Cattabeni F, Racagni G, Spano PF, Costa E, eds. *Advances in biochemical psychopharmacology*, vol 24. 1st ed. NY: Raven Press, 1980: 215—22
- Acta Pharmacologica Sini* 1982 Jun; 3 (2): 73—77

EFFECT OF TETRAHYDROBERBERINE ON BLOCKADE OF PRE- AND POSTSYNAPTIC DOPAMINE RECEPTORS

WANG Xiao-li, JIN Guo-zhang (K C Kin), YU Lei-ping, LI Jian-hua
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT THB 45 mg/kg (ip) to rat antagonized the stereotyped behavior induced by sc apomorphine 5 mg/kg. The hyperactivity and stereotyped behavior were induced by ip *l*-dopa 100 mg/kg in combination with ip benserazide 300 mg/kg and deprenyl 10 mg/kg. THB had the same antagonistic response to *l*-dopa as to apomorphine. These results showed that THB blocked the function of postsynaptic DA receptor.

After ip THB 100 or 150 mg/kg in rat, homovanillic acid level in corpus striatum was elevated from the control value (229 ± 40 ng/g tissue) to 675 ± 105 and 813 ± 90 ng/g, respectively.

THB 15, 30, 70 or 100 mg/kg ip increased the concentration of *l*-dopa in rat corpus striatum 250—400%. This enhance-

ment was antagonized by ip apomorphine 5 mg/kg. The accumulation of *l*-dopa in corpus striatum evoked by ip γ -butyrolactone 600 mg/kg was abolished completely by apomorphine, and ip THB 70 mg/kg reversed this depression by apomorphine. So there was an antagonistic effect on DA receptor between THB and apomorphine. These results indicated that THB enhanced the activity of tyrosine hydroxylase through a feed-back mechanism in blocking the presynaptic DA receptor, just as haloperidol did.

It is suggested that THB is a blocking agent of DA receptor.

KEY WORDS tetrahydroberberine; apomorphine; γ -butyrolactone; homovanillic acid; *l*-dopa; stereotyped behavior; blocker of dopamine receptor