

3,4-二氨基吡啶和 4-氨基吡啶诱发神经递质释放¹

黄华玉、戴树平 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国)

3,4-Diaminopyridine and 4-aminopyridine evoked neurotransmitter release

关键词 氨基吡啶类; 海马; 去甲肾上腺素; 蛋白激酶 C; 吩噻啉酯类

HUANG Hua-Yu, DAI Shu-Ping
(Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT We used 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) and 4-aminopyridine (4-AP) as stimuli for evoking [³H]norepinephrine ([³H]NE) release in rabbit hippocampal slices to investigate the mechanism underlying the aminopyridines evoked [³H]NE release and the effect of protein kinase C activator phorbol ester PDB. 3,4-DAP and 4-AP evoked [³H]NE release were concentration dependent and enhanced by phorbol ester PDB. 4-AP (300 μmol · L⁻¹) evoked [³H]NE release and enhancement of this evoked release by PDB were antagonized by protein kinase C inhibitor polymyxin B and almost abolished by tetrodotoxin. *N*-ethylmaleimide inhibited the facilitatory effect of PDB on 3,4-DAP evoked [³H]NE release implicating that G-protein is involved in the modulation of evoked [³H]NE release. 3,4-DAP evoked also dopamine release in caudates nucleus, and acetylcholine release in hippocampus suggesting that the mechanism by which 3,4-DAP evoked transmitters release is similar to that of electrical stimulation.

KEY WORDS aminopyridines; hippocampus; norepinephrine; protein kinase C; phorbol esters

摘要 3,4-二氨基吡啶和 4-氨基吡啶能诱发海马释放去甲肾上腺素。蛋白激酶 C 的激活剂吩噻啉酯 (phorbol ester PDB) 或抑制剂多粘菌素 B 能加强或抑制这一诱发释放。可卡因减弱 PDB 对这一诱发释放的增强作用, 河豚毒素则完全抵消它。*N*-ethylmaleimide 减弱 PDB 的增强作用, 3,4-二氨基吡啶亦能诱发海马释放乙酰胆碱, 诱发尾核释放多巴胺。

氨基吡啶是 K⁺通道阻断剂, 通过阻断突触前 K⁺通道, 延长动作电位, 使神经递质释放增加, 从而加强突触传递, 因此对中枢神经系统起兴奋作用⁽¹⁾。氨基吡啶类也能加强神经递质的自然释放, 4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP)及其衍生物能分别加强突触小体的 GABA、多巴胺以及乙酰胆碱等的自然释放⁽²⁾。但是有关氨基吡啶加强脑片 NE 自然释放的研究不多。我们首次报道了用 3,4-二氨基吡啶 (3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP) 作为刺激物诱发海马释放 NE⁽³⁾, 本实验进一步观察了 3,4-DAP 和 4-AP 诱发海马 NE 释放以及吩噻啉酯 (phorbol ester, PDB) 激活蛋白激酶 C 加强这一诱发释放的某些特征。

MATERIALS AND METHODS

药品和试剂 [³H]去甲肾上腺素((-)[ring-2,5,6-³H]-norepinephrine, [³H]NE, Amersham); 可卡因 cocaine HCl, 3,4-二氨基吡啶 (3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP), 4-氨基吡啶 (4-aminopyridine, 4-AP), 吩噻啉酯 (4β-phorbol 12,13-dibutyrate, PDB), 河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX), 多粘菌素 B (polymyxin B sulfate) (Sigma); *N*-乙基顺丁酰二酰亚氨 *N*-ethylmaleimide, NEM, Merck); Soluene 350, Lumagel (Packard).

兔, ♀♂兼用, 体重 2.5 ± SD 0.3 kg, 断头, 取全脑, 投入 4℃ 生理溶液, 于 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

Received 1990 Mar 28 Accepted 1990 Sep 8

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China № 3880329

洗后, 加入 2 ml 含 [³H]NE (1.6 TBq · mmol⁻¹, 0.1 μmol · L⁻¹) 的生理溶液, 37°C 保温 30 min, 再用生理溶液淋洗 3 次, 将脑片随机转入容量 1ml 的灌流小室, 每室 1 片, 重约 5 mg, 以 1 ml · min⁻¹ 流速进行表面灌流. 生理溶液成分 (mmol · L⁻¹): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 1.3, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, 葡萄糖 11, 抗坏血酸 0.57, EDTA 二钠盐 0.03. 用 95% O₂ + 5% CO₂ 饱和, 加 NaOH 调 pH 至 7.4. 灌流前, 另加可卡因 (30 μmol · L⁻¹). 灌流 45min 后, 将流出液直接收集入闪烁杯内, 每 5 min 1 份, 加入闪烁液 lumagel 7 ml, 用液闪仪测 ³H 含量. 脑片用 soluene 350 0.5 ml 溶解后, 加入闪烁液 10 ml, 然后测定 ³H 含量.

在灌流开始后 60 和 120 min, 脑片接受 2 次刺激 S₁ 和 S₂ (引入 3,4-DAP 200 μmol · L⁻¹), 每次 2 min, 以诱发 [³H]NE 释放. 通常在第 2 次刺激之前 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.

药物的作用通常以计算 2 次刺激所诱发的 [³H]NE S₂/S₁ 比率来评价, 所有结果均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 用 *t* 检验测定组间差别的显著性.

RESULTS

3,4-DAP 诱发 [³H]NE 释放, 以及附睾醇基酯 (PDB) 对这一诱发释放的加强作用 当引进一定浓度的 3,4-DAP 到灌流液中 2 min, 海马脑片 [³H]NE 释放增加 (S₁). 撤去 3,4-DAP 时, 释放迅速回复到基础水平. 当第 2 次再引入 3,4-DAP 溶液时, 诱发释放量 (S₂) 略大于第 1 次. S₂/S₁ 比值为 1.22 ± 0.05. 如在第 2 次引入 3,4-DAP 之前 15 min, 加 PDB 1 μmol · L⁻¹, 则第 2 次诱发释放 (S₂) 被显著增强. Tab 1 显示不同浓度 3,4-DAP (30-400 μmol · L⁻¹) 诱发 [³H]NE 释放, 以及 PDB 的增强作用. 可以看到, 3,4-DAP 从 30-300 μmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 释放 (S₁) 呈浓

度依赖式增高, 在 3,4-DAP 300-400 μmol · L⁻¹ 时释放达到稳定. 在有蛋白激酶 C 激活剂 PDB 的情况下, 3,4-DAP 诱发 [³H]NE 释放 (S₂) 仍随 3,4-DAP 的浓度而增高, 而 S₂/S₁ 比值总是近乎 4.0, 与 3,4-DAP 的浓度无关.

4-AP 亦能诱发海马脑片释放 [³H]NE, 在相同浓度下 4-AP 的作用较 3,4-DAP 弱, 在有或者没有 PDB 存在时, 4-AP 诱发 [³H]NE 都表现为浓度依赖性, 而 S₂/S₁ 比值约为 2.5, 说明 PDB 的增强作用在 4-AP 诱发释放明显地小于在 3,4-DAP 诱发释放 (Tab 1).

Tab 1. 3,4-Diaminopyridine and 4-aminopyridine-evoked [³H]NE release from hippocampal slices in the absence and presence of phorbol ester PDB. $\bar{x} \pm SD$

Drug (μmol · L ⁻¹)	n	Evoked overflow of ³ H (% of tissue ³ H)		S ₂ /S ₁
		S ₁ (-PDB)	S ₂ (+PDB)	
3,4-diaminopyridine				
30	4	0.30 ± 0.03	1.41 ± 0.02	4.34
100	6	1.87 ± 0.38	6.71 ± 0.12	3.70
200	20	3.75 ± 0.40	12.39 ± 0.74	4.04
300	6	6.40 ± 0.18	24.39 ± 0.35	3.82
400	6	6.70 ± 0.36	26.72 ± 0.83	3.85
4-aminopyridine				
100	4	0.61 ± 0.08	1.60 ± 0.04	2.65
200	6	0.79 ± 0.13	2.02 ± 0.17	2.53
300	6	2.05 ± 0.17	3.93 ± 0.29	1.91
400	4	3.17 ± 0.02	7.71 ± 0.22	2.43

TTX 和 polymyxin B 对 4-AP 诱发释放以及 PDB 加强诱发释放的影响 在 4-AP 诱发 [³H]NE 释放中, 同样亦可观察到 TTX 和蛋白激酶 C 的抑制剂 polymyxin B 的抑制作用. 从 Fig 1 可以看到, 4-AP 300 μmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 释放 S₂/S₁ 比值为 1.00 ± 0.06. 在 S₂ 之前 15 min 加入 PDB 1 μmol · L⁻¹, S₂ 的诱发释放增强, S₂/S₁ 比值升高到 1.51 ± 0.12. 若与 PDB 同时加入 TTX 0.3 μmol · L⁻¹, 则 PDB 的增强作用被完全抵消, S₂/S₁ 比值降低到 -0.02 ± 0.01, 若在 S₂ 之前 45 min 加入

polymyxin B $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4-AP 诱发释放亦几乎被完全抑制, 这时 S_2/S_1 比值为 0.004 ± 0.01 . 若 PDB 与 polymyxin B 结合使用, 则 PDB 的增强作用亦被抵消, S_2/S_1 比值为 0.11 ± 0.04 .

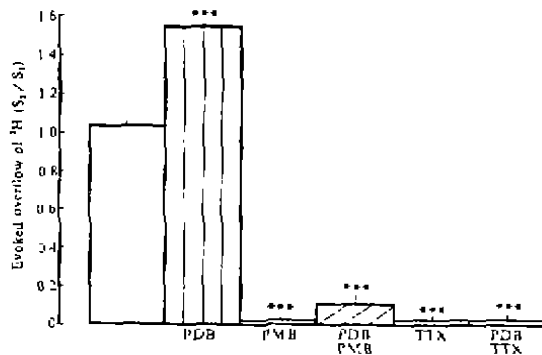


Fig 1. Effect of phorbol ester PDB ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence or presence of protein kinase C inhibitor polymyxin B (PMB) ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) or Na^+ -channel blocker tetrodotoxin ($0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on 4-AP ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)-evoked $[^3\text{H}]\text{NE}$ release in hippocampal slices. $n = 4-6$ observations from at least two separate experiments; $\bar{x} \pm \text{SD}$; ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs controls.

无 K^+ 条件下 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放以及 PDB 对诱发释放的增强作用 在 S_2 之前 40 min 撤去 K^+ , 3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 仍能诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放, 但 S_2/S_1 比值从正常 1.22 ± 0.05 降低到 0.59 ± 0.04 . 若在无 K^+ 情况下, 在 S_2 之前 15 min 加入 PDB $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 仍被显著地加强, 但 S_2/S_1 比值从正常 4.05 ± 0.25 降低到 1.58 ± 0.13 .

儿茶酚胺重摄取抑制剂对 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放以及 PDB 加强作用的影响 为了检查 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放中重摄取机制的作用, 我们测定了可卡因和 oxaprotiline 对 PDB 加强 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放的影响. Fig 3 显示了这些实验结果. 当可卡因 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 从灌流液中撤去时 (对照组), 3,4-DAP ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 引起的 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放

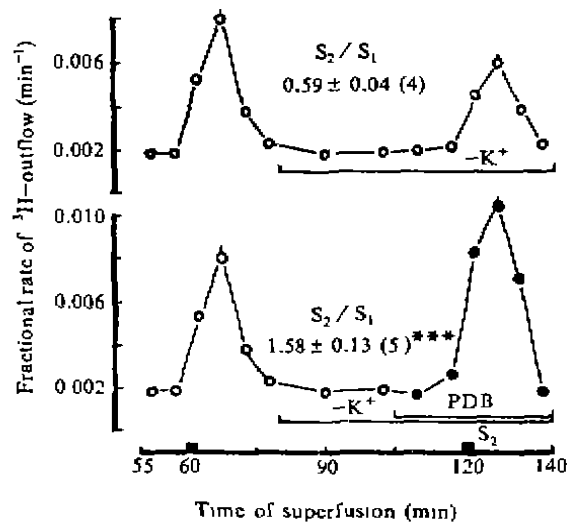


Fig 2. Effect of K^+ -free medium on the enhancement by PDB of tritium overflow evoked by 3,4-DAP from hippocampal slices. Upper curve (A): K^+ was omitted from the medium 40 min before S_2 . Lower (B): K^+ was omitted from the medium 40 min before S_2 and PDB ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was added to the superfusion medium 15 min before S_2 . S_2/S_1 values are given above the curves, numbers of experiments in parentheses. *** $P < 0.01$ vs controls.

S_1 值从 $3.38 \pm 0.06\%$ 升高到 $5.08 \pm 0.19\%$ (组织 ^3H 总含量为 100%), $P < 0.01$. 而且 PDB ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, S_2 之前 15 min 加入) 对 3,4-DAP 诱发释放的加强作用从对照的 $349 \pm 25\%$ (有可卡因) 升高到对照的 $612 \pm 62\%$ (无可卡因), $P < 0.01$. 当在整个灌流过程中用 oxaprotiline $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 代替可卡因时, S_1 为组织 ^3H 总含量的 $7.36 \pm 0.38\%$, 高于对照组或可卡因组, 而 PDB 增加 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放到对照组的 $546 \pm 51\%$. 明显大于可卡因组, 但与对照组无明显差别.

在用 NEM 预处理的脑片上 PDB 对 3,4-DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放的影响 为了研究三磷酸鸟苷结合蛋白(G-蛋白)是否参与 PDB 对 3,4-DAP 诱发释放加强作用的机制, 海马脑片在摄取 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 之前先与 NEM $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 保温 30 min. 观察到用 NEM 预处理脑片后 3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释

放. 其对照组 S_2/S_1 比值 1.20 ± 0.05 (无 PDB), 3.75 ± 0.21 (有 PDB). 在这里 PDB 增加 3,4-DAP 诱发释放到对照的 325%. 在 NEM 预处理组 S_2/S_1 比值 1.15 ± 0.08 (无 PDB) 和 2.15 ± 0.07 (有 PDB). 在这里 PDB 仅增强诱发释放到对照的 186%. 这说明 *N*-ethylmaleimide 抑制了 PDB 加强诱发释放的作用.

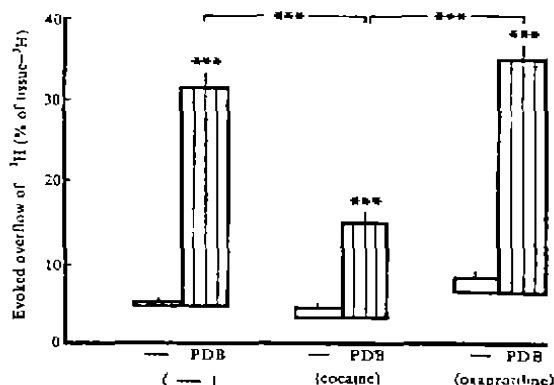


Fig 3. Effect of cocaine and oxaprotilline on the enhancement by PDB of tritium overflow evoked by 3,4-DAP from hippocampal slices. The columns in the figure should be interpreted as follows: the position in the figure (low end of the column) indicates the amount of tritium release at S_1 , the height of the column represents the difference S_2-S_1 , both in % of 5 experiments. *** $P < 0.01$ vs controls.

3,4-DAP 对事先摄取 [³H]-多巴胺的尾核脑片以及摄取 [³H]-胆碱或 [³H]-5HT 的海马脑片的作用 3,4-DAP 除能诱发 NE 释放外, 是否还能诱发其它神经递质的释放? 我们观察到 3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能在事先摄取 [³H]DA 的尾核脑片上诱发 [³H]DA 释放. 由 S_1 引起的 ³H 为组织 ³H 总含量的 $3.61 \pm 0.34\%$. PDB ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著地增加以及 Apomorphine ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著地减少 3,4-DAP 诱发 [³H]DA 释放. 但在事先摄取 [³H]胆碱的海马脑片上仅能引起 ³H 外溢, PDB 不能加强它(结果未显示), 而 3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 却完全不能从事先摄取

[³H]5HT 的脑片显著地诱发 ³H 外溢, PDB 亦未显示任何作用.

DISCUSSION

我们首先报道了 3,4-DAP 诱发海马 NE 释放, 可能通过阻断早钾离子通道 (I_A)^(3,4,5), 从而引发动作电位而实现的. 低浓度 3,4-DAP 和 PDB 同时应用时, 电刺激仍能进一步诱发 [³H]NE 释放⁽⁶⁾, 但当 3,4-DAP 高于 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 它与 PDB 产生明显的协同作用, 使 [³H]NE 释放达到相当高度, 以致于电刺激不再能引起任何额外的释放, 说明此时 3,4-DAP $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 完全代替了电刺激的作用. 此外对迟 K^+ 通道的阻断作用, 3,4-DAP 比 4-AP 强 50 倍⁽⁷⁾, 而诱发 [³H]NE 释放作用, 前者约为后者的 2 倍. 值得注意的是, 不论哪一种浓度的 3,4-DAP ($30-400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱发 [³H]NE 释放, PDB $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 总是把这一诱发释放增强 3 倍, 而对 4-AP ($100-400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), PDB 只使诱发释放增加 1.5 倍 (Tab 1). 这是否与它们的分子结构有关, 前者在第 3,4 位上各有一个氨基, 显然这样增加了结合氢的能力.

3,4-DAP 和 4-AP 诱发 [³H]NE 释放对 TTX 高度敏感说明内向钠离子流是诱发释放必不可少的先决条件, 而钙⁽²⁾、钾离子 (Fig 2) 都只是影响诱发释放的高度. 从儿茶酚胺重摄取抑制剂可卡因和 oxaprotilline 的比较中 (Fig 3) 亦进一步支持内向钠离子流的重要作用, 因为可卡因不但是 NE 重摄取抑制物, 在临床上它被用作局部麻醉药是由于它具有促进钠离子通道失活而阻断内向钠离子流的特性, 因此当灌流液中含有可卡因时, 3,4-DAP 诱发 [³H]NE 释放量降低. PDB 的加强作用亦显著地被减弱.

3,4-DAP 诱发海马释放 NE 在许多方面与电刺激的作用相似, 如: 蛋白激酶 C 的激活剂和抑制剂能加强和抑制它, 对 TTX 的敏

第 (1962)

感性和对 Ca²⁺的依赖性, G-蛋白以及突触前 α₂-、腺苷酸 A₁-和阿片 K-受体参预调制释放过程^(3,8), 而且 3,4-DAP 亦能诱发尾核释放多巴胺, 诱发海马释放乙酰胆碱⁽⁹⁾, 但不能诱发海马释放 5-HT⁽¹⁰⁾, 说明它们的作用机制不完全相同.

ACKNOWLEDGMENT 郭芸同志参加技术协助.

REFERENCES

1 Cook NS. The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9 : 21

2 Löffelholz K, Weide W. Aminopyridines and the release of acetylcholine. *Ibid* 1982; 3 : 147

3 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

4 Adams P. Voltage-dependent conductances of vertebrate neurones. *Trends Neurosci* 1986; 5 : 166

5 Rogawski MA. The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends Neurosci* 1985; 8 : 214

6 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

7 Kirsch GE, Narahashi T. 3,4-Diaminopyridine a potent new potassium channel blocker. *Biophys J* 1978; 22 : 507

8 Allgaier C, Hertting G, Huang HY, Jackisch R. Protein kinase C activation and α₂-auto-receptor-modulated release of noradrenaline. *Br J Pharmacol* 1987; 92 : 161

9 Allgaier C, Daschmann B, Huang HY, Hertting G. Protein kinase C and presynaptic modulation of acetylcholine release in rabbit hippocampus. *Br J Pharmacol* 1988; 93 : 525

10 Feuerstein TJ, Allgaier C, Hertting G. Possible involvement of protein kinase C (PKC) in the regulation of electrically evoked serotonin (5-HT) release from rabbit hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1987; 139 : 267

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Jan; 12 (1) : 32-36

在体伏安法测量四氢原小檗碱同类物对纹状体多巴胺释放和 3,4-双羟苯乙酸含量的影响¹

黄开星、孙宝存、Francois G GONON²、全国章 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Effects of tetrahydroprotoberberines on dopamine release and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid level in corpus striatum measured by *in vivo* voltammetry¹

HUANG Kai-Xing, SUN Bao-Cun, Francois G GONON², JIN Guo-Zhang (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²INSERM U-171-CNRS UA 1195, Lyon, France)

ABSTRACT The extracellular (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in rat striatum were measured by *in vivo* voltammetry to elucidate the effects of 3 tetrahydroprotoberberines on DA neurotransmission. *l*-tetrahydropalmatine (*l*-THP, 2 mg · kg⁻¹) or *l*-stepholidine (*l*-SPD, 0.5 mg · kg⁻¹) *iv* increased the striatal DA release by 225% and 233%, respectively; and *l*-SPD increased the DOPAC level by 70%. Moreover, the enantiomer *d*-THP (2 mg · kg⁻¹) increased the DA release by 97%, and a large dose of *d*-THP (20 mg · kg⁻¹) dramatically increased the extracellular DA by 1456% while it slightly elevated the DOPAC level by 123%. These results support the previous ideas that *l*-SPD and *l*-THP can block DA receptors and *d*-THP can deplete neuronal DA.

Received 1989 Sep 26 Accepted 1990 Oct 31
¹ Project supported by the National Science Foundation of China № 38070905
² Now in INSERM U-171, CNRS UA 1195, Lyon 69230, France