

蛋白激酶 C 激活加强高钾诱发去甲肾上腺素释放¹

黄华玉、戴树平 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国)

Enhancing effect of protein kinase C activation on high K⁺-induced norepinephrine release¹

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

ABSTRACT Raising the concentration of K⁺ in the superfusion medium increased the release of [³H]norepinephrine ([³H]NE) from rabbit hippocampus slices preincubated with [³H]NE. This evoked [³H]NE release was modulated by presynaptic α_2 -adrenergic, presynaptic opioid κ - and A₁-adenosine receptors and augmented with increasing K⁺ concentration (20-120 mmol · L⁻¹). The enhancement or inhibition of this release by activator (phorbol ester) or inhibitor (polymyxin B) of protein kinase C was blocked by tetrodotoxin and reduced with increasing K⁺ concentration. It was suggested that the Na⁺-influx was involved in the protein kinase C effect on the K⁺-evoked [³H]NE release.

KEY WORDS hippocampus; norepinephrine; protein kinase C; phorbol esters; polymyxin B; potassium

提要 海马脑片与 [³H]去甲肾上腺素 ([³H]NE) 保温, 用 K⁺ (20-120 mmol · L⁻¹) 诱发海马释放 [³H]NE。该诱发释放随 K⁺ 浓度提高而增强, 并受突触前受体所调制。哌啶醇基酯或多粘菌素 B (polymyxin B) 能加强或减弱高 K⁺ 诱发的 NE 释放, 这种增强或减弱作用能被河豚毒素抑制, 并随 K⁺ 浓度增高而减小。结果提示, 蛋白激酶 C 的作用机制似与神经末梢膜外 Na⁺ 内流有关。

关键词 海马; 去甲肾上腺素; 蛋白激酶 C; 哌啶醇基酯类; 多粘菌素 B; 钾

对许多受体来说, 二级信使肌醇磷脂系统在激动-反应偶联通路中起着重要的介导作用。在此系统中, 磷脂酶 C 水解磷酸脂酰肌

醇, 生成磷酸肌醇和甘油二酯, 前者移动细胞内钙, 后者激活蛋白激酶 C。已有报道^(1,2) 激活或抑制蛋白激酶 C 能加强或减弱不同神经递质的释放, 说明蛋白激酶 C 在神经递质释放的调制过程中起重要作用。本实验, 用高 K⁺ 诱发海马去甲肾上腺素释放, 观察蛋白激酶 C 的激活剂或抑制剂对该释放的影响, 从而探讨蛋白激酶 C 的作用机制。

MATERIALS AND METHODS

药品和试剂 [³H]去甲肾上腺素 (1-[7,8-³H]-noradrenaline, [³H]NE) (Amersham); 哌啶二丁酯盐 (4-phorbol 12,13-dibutyrate, PDB), 多粘菌素 B (polymyxin B sulfate, PMB), 河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX), 可卡因 (cocaine HCl), clonidine HCl, (-)-R-phenylisopropyladenosine (R-PIA), ethylketocyclazocine (EKC) (Sigma); Soluene 350 (Packard)。

实验步骤 兔, 体重 2.5 ± SD 0.3 kg, 断头, 取出全脑, 投入 4℃ 生理溶液, 于 4-8℃ 下分离海马。用 McIlwain 组织切片沿矢状面和冠状面方向各切 1 次, 脑片 (0.4 mm × 0.4 mm × 4 mm), 用冷生理溶液洗后, 加入 [³H]NE 0.1 μmol · L⁻¹, 4 ml (1.6 TBq / mmol), 于 37℃ 保温 30 min, 然后用温生理溶液淋洗 3 次, 随机分放到灌流小室中, 小室容量为 0.3 ml; 每小室放 10-20 脑片⁽³⁾, 脑片被置于两团玻璃棉 (相距 10 mm 左右) 之间, 以 1 ml · min⁻¹ 的速率在 37℃ 下进行表面灌流, 灌流液含有 cocaine 30 μmol · L⁻¹。生理溶液的组成 (mmol · L⁻¹) 为: NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 1.3, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, 葡萄糖 11, 抗

Received 1989 Sep 18

Accepted 1990 Jul 20

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

坏血酸 0.57, EDTA 二钠盐 0.03. 用 95% O₂ 和 5% CO₂ 通气达饱和, 用 NaOH 调 pH 至 7.4.

灌注 50 min 后, 开始收集样品, 每 5 min 1 份, 加入闪烁液后, 用液体闪烁计 * 数仪测定 ³H 含量. 在灌注期间, 脑片接受 2 次高 K⁺ 溶液 (20–120 mmol · L⁻¹), 每次 2 min. 第 1 次于灌注 60 min 后, 第 2 次于 120 min 后 (S₁, S₂). 当生理溶液中的 K⁺ 浓度需要提高时, 一方面增加溶液中的 KCl 浓度, 同时降低相等分子数的 NaCl, 这样溶液中的 Cl⁻ 浓度保持恒定不变, 亦使整个溶液的渗透压保持正常. 灌注结束, 用 Whatman GF/C 滤纸收集脑片并溶解于 1 ml Soluene 350 中, 再加入闪烁液后测 ³H 含量⁽⁴⁾.

RESULTS

1 高 K⁺ 诱发 [³H]NE 释放的浓度依赖性 当灌流液中的 K⁺ 浓度从正常 6 mmol · L⁻¹ 提高到 20, 40, 60, 80 或 120 mmol · L⁻¹ 时, 脑片释放 [³H]NE 立即增高, 从 Tab 1. 可见 S₁ 值随 K⁺ 浓度升高而增大 (在 K⁺ 60 mmol · L⁻¹ 以上 S₁ 趋向恒定), 撤去高 K⁺ 溶液, 释放恢复到基础水平, 第 2 次刺激诱发的释放 (S₂), 在 K⁺ 20 mmol · L⁻¹ 时与第 1 次近似, K⁺ 浓度在 40 mmol · L⁻¹ 以上, S₂ 均低于 S₁, 因此 S₂/S₁ 比值随 K⁺ 浓度升高而降低.

2 海马 NE 能神经末梢突触前受体对高 K⁺ 诱发 [³H]NE 释放的调制作用 用 K⁺ 30 mmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 释放, S₂/S₁ 比值为 0.85 ± 0.04. 在 S₂ 之前 15 min 加入 α₂-去甲肾上腺素能自身受体的激动剂 clonidine 1 μmol · L⁻¹, 显著地抑制 [³H]NE 的释放量, S₂/S₁ 比值下降到 0.56 ± 0.03 (P < 0.01), 同样在 S₂ 之前 15 min 加入突触前 A₁-腺苷酸受体激动剂 (-)R-phenyl-isopropyladenosine 1 μmol · L⁻¹ 或阿片 κ-受体激动剂 ethyl-ketocyclazocine 1 μmol · L⁻¹ 也明显地抑制

K⁺ 30 mmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 释放, S₂/S₁ 比值分别为 0.72 ± 0.02 (P < 0.01) 和 0.74 ± 0.02 (P < 0.01).

Tab 1. Concentration dependency of high K⁺ evoked [³H]NE release from hippocampal slices preloaded with [³H]NE. Tritium overflow was evoked by raising the K⁺ concentration two times (S₁, S₂) for 2 min to the concentrations indicated in the table. Data from 4–10 separate experiments; $\bar{x} \pm SD$.

K ⁺ (mmol · L ⁻¹)	n	Evoked overflow of ³ H (% of tissue- ³ H)		S ₂ /S ₁
		S ₁	S ₂	
20	10	0.75 ± 0.12	0.82 ± 0.05	1.07 ± 0.04
40	6	8.05 ± 0.34	6.76 ± 0.03	0.84 ± 0.03
60	4	18.35 ± 1.76	13.62 ± 0.04	0.78 ± 0.04
80	4	19.14 ± 2.92	10.53 ± 0.03	0.55 ± 0.03
120	4	18.92 ± 1.57	10.97 ± 0.03	0.58 ± 0.03

3 激活或抑制蛋白激酶 C 对 [³H]NE 释放的影响 蛋白激酶 C 的激活剂 4-β-苯基哌啶醇 PDB (1 μmol · L⁻¹) 在 S₂ 之前 15 min 加入灌流液, 显著地加强 K⁺ 30 mmol · L⁻¹ 诱发的 [³H]NE 释放, S₂/S₁ 比值从 0.85 ± 0.04 增加到 1.20 ± 0.02 (P < 0.01). 蛋白激酶 C 的抑制剂 polymyxin B (100 μmol · L⁻¹) 在 S₂ 之前 45 min 加入灌流液, 显著地抑制 K⁺ 30 mmol · L⁻¹ 诱发的 [³H]NE 释放, S₂/S₁ 比值降至 0.34 ± 0.04 (P < 0.01). 如果将 PDB 和 polymyxin B 结合使用, 则 PDB 的增强作用被强烈地抑制, S₂/S₁ 比值为 0.45 ± 0.02, 与 PDB 单独使用时相比, P < 0.01 (Fig 1).

4 Na⁺ 通道阻断剂 tetrodotoxin (TTX) 对 K⁺ 20 mmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 释放的影响 因为只在 K⁺ 20 mmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 的释放对 TTX 表现为高度敏感性, 而高于 K⁺ 40 mmol · L⁻¹ 诱发的 [³H]NE 释放对 TTX 不敏感. 因此, 我们采用 K⁺ 20 mmol · L⁻¹ 诱发 [³H]NE 释放, 观察 TTX (0.3 μmol · L⁻¹) 对 PDB 和 polymyxin B 作用的影响. Fig 1 显示

了 PDB 对 K^+ $20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 诱发的 $[^3H]NE$ 的增强作用, 从无 TTX 对照组的 158% 减少到有 TTX (S_2 之前 15 min 加入) 对照组的 114% ($P < 0.01$). 同样, polymyxin B 对释放 $[^3H]NE$ 的作用, 在无 TTX 时抑制 80%, 有 TTX 时只抑制 63% ($P < 0.05$) (Fig 1).

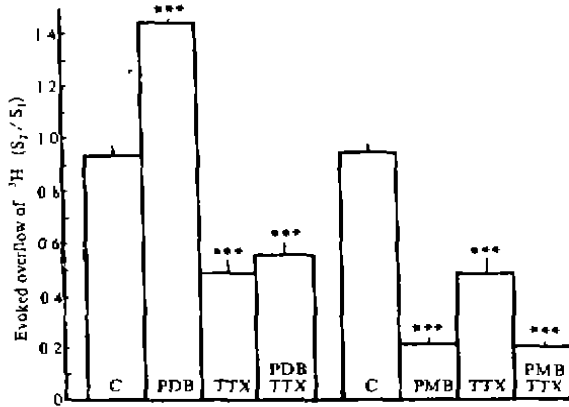


Fig 1. Effects of PDB and polymyxin B in the presence or absence of the Na^+ -channel blocker tetrodotoxin on the K^+ -evoked $[^3H]NE$ release in hippocampal slices. $n=4-6$ slices from at least two rabbits; $\bar{x} \pm SD$; *** $P < 0.01$ vs controls.

5 不同 K^+ 浓度诱发 $[^3H]NE$ 释放时, PDB 的加强作用和 polymyxin B 的抑制作用当 PDB $1 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 于 S_2 之前 15 min 加入灌流液, 非常显著地加强 K^+ $20-40 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 诱发的 $[^3H]NE$ 释放 ($P < 0.01$), 在 K^+ $60-80 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 诱发释放时, PDB 的增强作用仍然明显 ($P < 0.01$), 但当 K^+ 浓度高于 $80 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时, 这种增强作用逐步减弱, 到 $120 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时 PDB 作用完全消失. 选择性蛋白激酶 C 的抑制剂 polymyxin B⁽⁵⁾ ($100 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$, 于 S_2 之前 45 min 加入灌流液) 对 K^+ 浓度的变化表现出明显的相关. 在 K^+ $20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 诱发 $[^3H]NE$ 释放时 polymyxin B 的抑制作用几乎达 100%, K^+ $30 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时, 其抑制作用已明显降低, K^+ $40-80 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时继续下降, 直至 $120 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时变为完全无效.

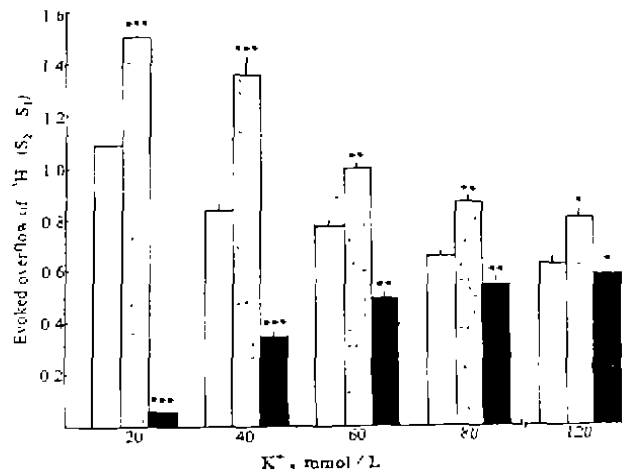


Fig 2. Effects of PDB and polymyxin B on K^+ -evoked $[^3H]$ -overflow from hippocampal slices. Control: open column; PDB: hatched column; polymyxin B: solid column. $n=4-30$ slices from at least two rabbits; * $P > 0.05$, $\bar{x} \pm SD$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs controls.

在本实验条件下, 无论是 PDB 或是 polymyxin B, 对 $[^3H]NE$ 的基础释放均不产生影响.

DISCUSSION

本实验观察到不同浓度 ($20-120 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) 高 K^+ 溶液诱发海马 NE 释放呈浓度依赖关系. 钠通道阻断剂 TTX 能抑制低浓度 K^+ 溶液 ($40 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) 诱发的 $[^3H]NE$ 释放, 蛋白激酶 C 的激活剂 6-氨基己酸或抑制剂 polymyxin B 能增强或减弱这一诱发释放. 并证明当用高钾溶液刺激 $[^3H]NE$ 释放时, 位于神经末梢的突触前 α_2 -肾上腺素能自身受体, 突触前阿片 κ -受体以及 A_1 -腺苷酸受体都对高 K^+ 诱发 $[^3H]NE$ 释放起着调制作用.

蛋白激酶 C 的激活剂 PDB 对释放的加强作用和抑制剂 polymyxin B 的抑制作用, 以及高 K^+ 诱发 $[^3H]NE$ 释放对 TTX 的敏感性均随 K^+ 浓度升高而下降⁽⁴⁾, 是否意味着钠离子的跨膜转移可能参与蛋白激酶 C 加强 $[^3H]NE$ 释放的作用机制之中. 实验结果提示这一可能

性。高 K^+ 诱发 [3H]NE 释放可能包含几种成分: 首先, 高钾引起神经末梢可兴奋膜局部去极化, 电压敏感性钙离子通道开放, 钙离子进入膜内, 于是胞裂外排发生; 其次高钾导致膜去极化, 使膜电位降低, 当膜电位低于阈值时, 钠通道开放, Na^+ 内流, 产生动作电位, 这能使更多的钙通道开放, 进一步提高膜内钙浓度, 诱发神经递质释放。此外, 进入膜内的钠离子本身亦可能通过加强线粒体膜两侧的 Na^+ / Ca^{2+} 交换⁽⁵⁾ 动员细胞内结合钙的释放从而对神经递质释放产生影响。当钾浓度低于 $40 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时, 细胞外液中有足够的钠离子, 神经递质的释放是上述几种成分共同作用的结果, 因而当河豚毒素阻断钠通道时, [3H]NE 释放明显下降, 表现为 TTX 敏感, 蛋白激酶 C 参与其中发挥其调制作用, 因此 PDB 和 Polymyxin B 能显示它们的加强或抑制作用。当钾浓度高于 $60 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时, 膜外钠离子浓度相应下降, 这时被诱发的 [3H]NE 释放对 TTX 不敏感, 说明内向钠流减弱而不足以对神经递质释放产生显著影响, 但 PDB 和 polymyxin B 的作用仍清晰可见, 推测被减弱了的内向钠离子流仍存在, 因而蛋白激酶 C 依然能起作用。直至钾浓度提高 $120 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 细胞外液中的钠离子浓度降得很低(约 $20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), 不能形成传导性的动作电位, 亦未能明显提高细胞浆内的钠离子浓度, 这时所诱发的 [3H]NE 释放仅仅是高钾引起膜局部去极化导致细胞外钙离子进入膜内的结果, 蛋白激酶 C 不可能再发挥其作用, 表现在它的激活剂 PDB 和抑制剂 polymyxin B 对高钾诱发的 [3H]NE 释放都没有显示任何作

用。为证实这一解释, 我们在进一步研究。

ACKNOWLEDGMENT 郭芸同志参加技术协助。

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
- 2 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
- 3 Mulder AH, Van den Berg WB, Stoof JC. Calcium-dependent release of radiolabeled catecholamines and serotonin from rat brain synaptosomes in a superfusion system. *Brain Res* 1975; 99 : 419
- 4 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
- 5 Allgaier C, Hertting G. Polymyxin B, a selective inhibitor of protein kinase C, diminishes the release of noradrenaline and the enhancement of release caused by phorbol 12,13-dibutyrate. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 334 : 218
- 6 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
- 7 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