

- 1983; 16 : 151
- 4 Gao SJ, Zeng GY. Cardiotoxic and toxic effects of peruvoside and neriifolin. *Acta Pharm Sin* 1983; 18 : 572
 - 5 Liu SG, Zhang LY, Zeng GY. Comparison of the bioactivity and plasma concentration of the constituents in thevetia neriifolia juss. *Chin J Cardiol* 1988; 16 : 161
 - 6 Zeng GY, Gao SJ, Zhang LY, Gao XF, Wei WZ. The cardiovascular effects of peruvoside and neriifolin in anesthetized dogs. *Ibid* 1983; 11 : 305
 - 7 Akera T, Ng YC, Shieh IS, Bero E, Brody TM, Braselton WE. Effects of K^+ on the interaction between cardiac glycosides and Na, K-ATPase. *Eur J Pharmacol* 1985; 111 : 147
 - 8 Yamamoto S, Akera T, Kim DH, Brody TM. Tissue concentration of Na^+ , K^+ -Adenosine Triphosphatase and the positive inotropic action of ouabain in guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 217 : 701
 - 9 Akera T, Brody TM. The role of Na^+ , K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol Rev* 1977; 29 : 187
 - 10 Akera T, Larsen FS, Brody TM. The effect of ouabain on sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 170 : 17
 - 11 Akera T, Brown BS. Cardiovascular toxicology of cardiotoxic drugs and chemicals. In : Van Stee EW, ed. *Cardiovascular toxicology*. NY : Raven Press. 1982 : 109-34
 - 12 Natorp VW, Schultz U. Influence of calcium chloride infusion on the toxicity of some glycosides. *Arzneimittelforschung* 1968; 18 : 1609

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Nov; 11 (6) : 494-497

细胞外钙对吡啶醇基酯加强海马去甲肾上腺素释放的影响¹

黄华玉、戴树平 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国)

Effect of extracellular calcium on enhancement of norepinephrine release in hippocampus by phorbol ester

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

ABSTRACT Rabbit hippocampal slices were preloaded with [³H]norepinephrine ([³H]NE) and superfused with medium. Tetrodotoxin (TTX) inhibited [³H]NE release evoked by high K^+ , but did not affect on that evoked by Ca^{2+} -pulse. The facilitatory effect of phorbol ester (PDB) on high K^+ -evoked [³H]NE release was elevated with increasing extracellular Ca^{2+} concentration. In the case of Ca^{2+} -pulse-evoked [³H]NE release, the enhancement by PDB was decreased with increasing Ca^{2+} concentration in the extracellular space. It was suggested

that the facilitation of Ca^{2+} -influx was not involved in the mechanism of action of protein kinase C.

KEY WORDS hippocampus; norepinephrine; protein kinase C; phorbol esters; calcium; tetrodotoxin

提要 用同位素方法研究海马脑片 [³H]去甲肾上腺素 ([³H]NE) 释放, 蛋白激酶 C 激活对高钾诱发 [³H]NE 释放的加强作用随细胞外钙离子浓度升高而增加, 而对钙脉冲诱发 [³H]NE 释放的加强作用却随细胞外钙离子浓度升高而降低. 结果提示: 蛋白激酶 C 并不直接作用于钙离子通道.

关键词 海马; 去甲肾上腺素; 蛋白激酶 C; 吡啶醇酯类; 钙; 河豚毒素

钙离子在神经递质释放过程中起着重要作用, 当神经受刺激时, 由于电压敏感的钙离子通道开放, 钙离子进入神经末梢膜内, 或由于细胞内钙储备释放, 使胞浆游离钙浓度升高, 从而扳动胞裂外排过程. 本实验采用改变细胞

Received 1989 Oct 6 Accepted 1990 May 26

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

外液中的钙离子浓度, 用高钾或钙脉冲诱发 [³H]NE 释放⁽¹⁾, 比较细胞外不同钙离子浓度在用哌啶醇基酯激活蛋白激酶 C, 加强 [³H]NE 释放过程中的影响。

MATERIALS AND METHODS

药品和试剂 [³H]去甲肾上腺素 (*l*-[7,8-³H] norepinephrine, [³H]NE, Amersham); 哌啶二丁脂盐 (4 β -phorbol 12,13-dibutyrate, PDB) 与河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) (Sigma); Soluene-350 (Packard)。

兔, 体重 $2.5 \pm \text{SD } 0.3 \text{ kg}$, 雌雄兼用, 断头, 取出全脑, 投入 4°C 生理溶液, 于 $4-8^\circ\text{C}$ 分离海马, 用 McIlwain 组织切片机沿矢状面和冠状面方向各切一次, 脑片 ($0.4 \times 0.4 \times 4 \text{ mm}$) 用冷生理溶液洗后, 加入 [³H]NE $0.1 \mu\text{mol/L}$ 4 ml (1.6 TBq/mmole), 于 37°C 保温 30 min , 随后用温生理溶液淋洗 3 次, 随机分置于容量为 $300 \mu\text{l}$ 的灌流小室中, 每室放 10-20 片⁽²⁾, 脑片被置于两团玻璃棉之间(相距约 10 mm), 在 37°C 下进行表面灌流 1 ml/min , 灌流液含 cocaine $30 \mu\text{mol/L}$ 。生理溶液的组成 (mmol/L): 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 钠盐 0.03。通 95% O₂+5% CO₂ 达饱和, 用 NaOH 调 pH 至 7.4, 在用 Ca²⁺-脉冲诱发 [³H]NE 释放的那些实验, 溶液含无 Ca²⁺/K⁺ 30 mmol/L 。

灌流 50 min 后, 开始收集流出液, 每 5 min 收集一份样品, 加闪烁液后测定 ³H 含量, 在灌流期间脑片接受 2 次刺激(含 K⁺ 30 mmol/L 的生理溶液或含不同 Ca²⁺ 浓度的生理溶液)以诱发 [³H]NE 释放, 每次 2 min。第 1 次于灌流 60 min 后, 第 2 次 120 min 后(S₁, S₂)。当生理溶液中的 Ca²⁺ 或 K⁺ 需要提高或降低时, 一方面增加或减少溶液中 CaCl₂ 或

KCl 的浓度同时也降低或提高相等分子数的 NaCl, 这样使溶液中的 Cl⁻ 浓度保持恒定不变, 亦使整个溶液的渗透压保持正常。

灌流结束后, 用 Whatman CF/C 滤纸收集脑片, 将脑片溶解在 1 ml Soluene-350 中, 加闪烁液, 用液体闪烁计数器测 ³H⁽³⁾。

资料计算和统计 诱发释放 S₁, S₂ 为刺激开始后 20 min 内被诱发的 ³H 释放占组织中 ³H 总量的 %。药物作用以 S₂/S₁ 比值来表示, 结果为 $\bar{x} \pm \text{SD}$, 用 *t* 检验计算组间差别的显著性。

RESULTS

细胞外不同钙离子浓度对高钾诱发 [³H]NE 释放的影响 分别用 Ca²⁺ $0.325-2.6 \text{ mmol/L}$ 的灌流液灌流脑片, 60 min 后, 用 K⁺ 30 mmol/L 诱发 [³H]NE 释放(S₁), 从 Tab 1 可见, S₁ 值不随细胞外 Ca²⁺ 浓度增加而变化, 甚至在 Ca²⁺ 的最低 0.325 mmol/L 与最高浓度 2.6 mmol/L 之间亦不存在明显的差别, S₁ 分别为 $5.78 \pm 0.53\%$ 和 $5.04 \pm 0.77\%$ 。在相反的实验条件下, 即灌流液含无 Ca²⁺/K⁺ 30 mmol/L , 此时神经末梢可兴奋膜处于去极化状态, 但只要细胞外液中缺乏 Ca²⁺, 胞裂外排过程就不可能发生, 此时, 若给以短时间(2 min) 一定浓度的 Ca²⁺ 脉冲, [³H]NE 释放立即发生, Tab 1 显示了这种 Ca²⁺ 脉冲诱发释放, 可以看到, [³H]NE 释放随 Ca²⁺ 脉冲浓度的提高而增强, 直至最高 Ca²⁺ 浓度 2.6 mmol/L 时, 释放趋于水平。

钠离子通道抑制剂 TTX 对高 K⁺ 或 Ca²⁺ 脉冲诱发释放的影响 灌流液含 Ca²⁺ 1.3 mmol/L , 用 K⁺ 30 mmol/L 诱发 [³H]NE 释放, 于 S₂ 之前 15 min 加入 TTX $0.3 \mu\text{mol/L}$, 对 [³H]NE 诱发释放有明显的抑制作用, S₂/S₁ 比值从对照组 0.89 ± 0.02 降低到 TTX 组的 0.70 ± 0.02 ($P < 0.05$)。在相反实验条件下, 即灌流液含无 Ca²⁺/K⁺ 30

Tab 1. Effect of extracellular Ca^{2+} on [3H] norepinephrine ([3H]NE) release evoked by K^+ (30 mmol/L) and Ca^{2+} -pulse. Hippocampal slices preloaded with [3H]NE, were superfused with Ca^{2+} and stimulated by K^+ 30 mmol/L, or superfused with Ca^{2+} -free medium containing K^+ 30 mmol/L and stimulated by Ca^{2+} . Stimulation with K^+ or Ca^{2+} (for 2 min each) was performed after 60 min of superfusion (S_1 value). $\bar{x} \pm SD$; Number of experiments (slices) in parentheses.

Ca^{2+} (mmol/L)	Evoked overflow of 3H at S_1 (% of tissue- 3H)	
	K^+ 30 mmol/L	Ca^{2+} -pulse
0.325	5.78 \pm 0.53 (6)	1.21 \pm 0.14 (6)
0.65	7.10 \pm 0.62 (6)	3.05 \pm 0.30 (10)
1.3	6.03 \pm 0.63 (20)	5.21 \pm 0.84 (6)
2.6	5.04 \pm 0.77 (6)	6.08 \pm 0.66 (6)

mmol/L, 用 Ca^{2+} 1.3 mmol/L 诱发释放, TTX 不产生显著的抑制性影响. 对照组 0.78 ± 0.04 , TTX 组 0.70 ± 0.02 ($P > 0.05$).

蛋白激酶 C 的激活剂 PDB 对高 K^+ 或 Ca^{2+} 脉冲诱发 [3H]NE 释放的加强作用 从 Fig 1A 可见, 灌流液中 Ca^{2+} 浓度不论是 0.325, 0.65,

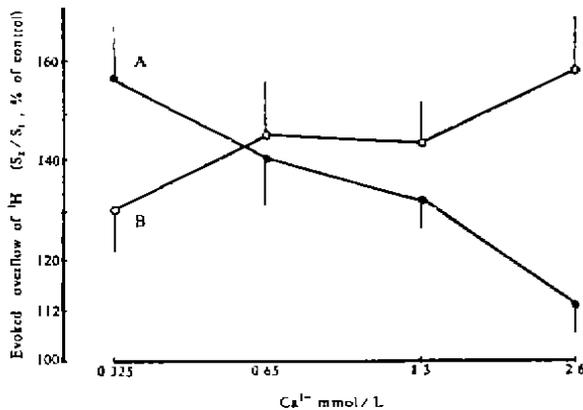


Fig 1. Effect of extracellular Ca^{2+} on enhancement of evoked [3H]NE release by phorbol ester (PDB). Slices were superfused with medium containing Ca^{2+} and stimulated with K^+ 30 mmol/L (A), or superfused with Ca^{2+} -free medium containing K^+ 30 mmol/L and stimulated with Ca^{2+} -pulse (B). PDB was added 15 min before S_2 onwards (hatched column). $n = 4-10$ Slices from at least two rabbits. $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs controls.**

1.3 或是 2.6 mmol/L, 于 S_2 之前 15 min 加入 PDB 1 μ mol/L 均能显著地加强 K^+ 30 mmol/L 诱发的 [3H]NE 释放, 该加强作用随灌流液中 Ca^{2+} 浓度升高而增强, 甚至在最高 Ca^{2+} 浓度 (2.6 mmol/L) 时, 该增强作用仍未出现平坦趋势. 从 Fig 1B 可见, 灌流液含无 Ca^{2+} / K^+ 30 mmol/L, 神经末梢可兴奋膜从灌流开始即处于去极化状态. 於 S_2 之前 15 min 加入 PDB 1 μ mol/L, 对 Ca^{2+} 0.325-1.3 mmol/L 诱发的释放有显著的增强作用, 但是该增强作用随 Ca^{2+} 浓度的提高而减弱. 用 Ca^{2+} 2.6 mmol/L 诱发 [3H]NE 释放时, PDB 不显示显著的增强作用.

比较细胞外 Ca^{2+} 浓度对 PDB 加强高钾和 Ca^{2+} 脉冲诱发 [3H]NE 释放的影响 Fig 2 A 表示灌流液中含 Ca^{2+} 0.325-2.6 mmol/L, 用 K^+ 30 mmol/L 诱发释放, 在 Ca^{2+} 0.325 mmol/L 时, PDB 加强释放到相应对照的 130%, 随着细胞外 Ca^{2+} 浓度的升高, 曲线向上逐渐升高, 到 Ca^{2+} 2.6 mmol/L

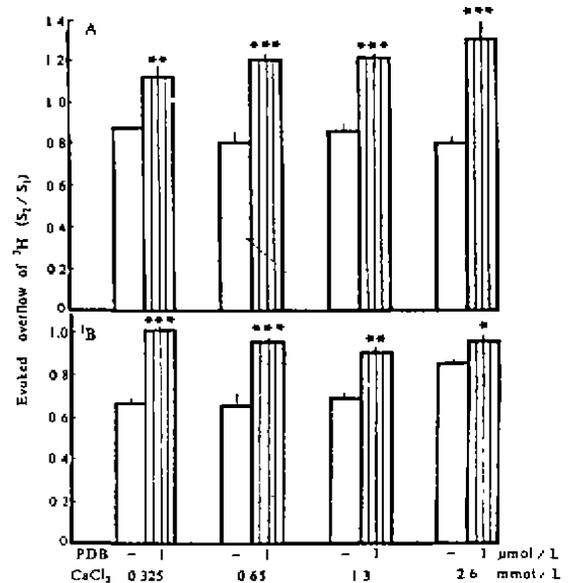


Fig 2. Comparison of the enhancement by phorbol ester (PDB) of [3H]NE release evoked by K^+ 30 mmol/L (A) or by Ca^{2+} -pulse (B). $n = 4-10$ observations from at least two separate experiments; $\bar{x} \pm SD$.

时,为相应对照的160%。Fig 2 B表示,灌流液中含 K^+ 30 mmol/L,用不同 Ca^{2+} 浓度诱发 $[^3H]NE$ 释放,可看到其变化方向正相反,在 Ca^{2+} 0.325 mmol/L时,PDB加强释放到相应对照的158%,随着细胞外 Ca^{2+} 浓度的增高,曲线逐步降低,在 Ca^{2+} 2.6 mmol/L时, $[^3H]NE$ 释放为相应对照的112%。

DISCUSSION

在不同细胞和组织上,PDB加强或减弱 Ca^{2+} 内流均有报道^(4,5)。然而,PDB激活蛋白激酶C,加强海马 $[^3H]NE$ 释放是否通过加强 Ca^{2+} 内流而实现,尚不能肯定⁽¹⁾。本实验观察到,当向无钙高钾溶液中加入 Ca^{2+} 时, Ca^{2+} 进入神经末梢膜内,导致胞裂外排过程。PDB对此释放的加强作用可以解释为PDB加强了 Ca^{2+} 内流,或PDB和 Ca^{2+} 在增加NE释放过程中产生协同作用。

但是,由 K^+ 30 mmol/L诱发的 $[^3H]NE$ 释放不随细胞外 Ca^{2+} 浓度的提高而变化,而PDB对这一释放模型的加强作用却明显地随细胞外 Ca^{2+} 浓度的提高而增强。由此相反,由 Ca^{2+} 脉冲诱发的 $[^3H]NE$ 释放随细胞外 Ca^{2+} 浓度的提高而增加,可是PDB对这一释放模型的加强作用却随细胞外 Ca^{2+} 浓度的提高而减弱。实验结果并不支持:蛋白激酶C激活后加强 $[^3H]NE$ 释放是通过直接易化内向 Ca^{2+} 流的结果。

在上述这两种释放模型中,钠离子通道抑制剂TTX对高钾诱发释放有显著的抑制作用,而对钙脉冲诱发释放的抑制作用无统计意义,说明:前者在高钾引起神经末梢膜去极化时,由于膜电位降低到阈值以下,引起钠离子通道开放,内向钠流突然增加而产生动作电位,从而增加内向钙离子流而诱发 $[^3H]NE$ 释放,因此,即使在 Ca^{2+} 最低浓度下 $[^3H]NE$ 释

放已达高限,提高细胞外 Ca^{2+} 浓度,释放不再增加,而后者对TTX不敏感,说明在诱发释放机制中没有足以引起动作电位的内向钠离子流参与,所诱发的 $[^3H]NE$ 释放只是由 K^+ 30 mmol/L引起的神经末梢膜局部去极化所引起的内向钙离子流所决定,因此释放量随细胞外 Ca^{2+} 浓度的提高而增加。此外,在我们以前的工作中亦观察到,PDB对NE释放的增强作用与内向钠离子流有一定的相关⁽⁶⁾。当然,我们亦注意到,TTX对上述这两种诱发释放模型的影响有差别,但并不非常大,因此,是否这就是造成PDB对上述这两种诱发释放产生不同增强作用的主要原因,我们正在研究。

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 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
- 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
- 4 Di Virgilio F, Pozzan T, Wollheim CB, Vicentini LM, Meldolesi J. Tumor promoter phorbol myristate acetate inhibits Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels in two secretory cell lines, PC12 and RINm 5F. *J Biol Chem* 1986; 261: 32
- 5 DeRiemer SA, Strong JA, Albert KA, Greengard P, Kaczmarek LK. Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature* 1985; 313: 313
- 6 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