

442-445

左旋千金藤立定和左旋四氢巴马汀阻滞突触前 D₂ 受体的反馈调控作用¹

陈丽娟、郭新、王青梅、金国章· (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

R 966

Feed-back regulation of presynaptic D₂ receptors blocked by *l*-stepholidine and *l*-tetrahydropalmatine¹

CHEN Li-Juan, GUO Xin, WANG Qing-Mei, JIN Guo-Zhang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT The activity of tyrosine hydroxylase by accumulation of *L*-dopa content in the striatum under decarboxylase inhibitor (benserazide, 400 mg · kg⁻¹) was measured by HPLC-ECD to ascertain whether *l*-SPD possesses an agonistic or antagonistic effect on D₂ receptor subtype.

The accumulated *L*-dopa content was increased with 1,4-butyrolactone (BL, 750 mg · kg⁻¹) to 1.8 ± 0.6 μg · g⁻¹ in rat striatum. After the rats were ip *l*-SPD 5 mg · kg⁻¹ or *l*-tetrahydropalmatine (*l*-THP) 10-20 mg · kg⁻¹, the increment of *L*-dopa level was much more than that in the BL group (*P* < 0.01) in a dose related manner. On the contrary, apomorphine (ip 5 mg · kg⁻¹) abolished the accumulation of *L*-dopa induced by BL. Furthermore, *l*-SPD and *l*-THP not only reversed the negative feed-back regulation by apomorphine on the accumulated level of *L*-dopa, but also increased this level over the accumulation by BL. These results showed that *l*-SPD and *l*-THP do possess the antagonistic effect on presynaptic DA receptor (D₂) without agonistic effect.

KEY WORDS *l*-stepholidine; berberines; *l*-tetrahydropalmatine; levodopa; dopamine receptors; dopaminergic agents

摘要 用 HPLC-ECD 检测大鼠纹状体内 *L*-dopa 含量, *l*-SPD (5 mg · kg⁻¹) 和 *l*-THP (10-20 mg · kg⁻¹)

均使 *L*-dopa 含量明显增加, 并有量效关系; 在翻转 Apo 的作用中, *l*-SPD 和 *l*-THP (20 和 40 mg · kg⁻¹) 使 *L*-dopa 含量增加, 分别为 Apo 组的 6.4 和 3.8 倍。实验结果证实 *l*-SPD 和 *l*-THP 是 DA 受体拮抗剂, 而未见到激动剂或部分激动剂的特性。

关键词 左旋千金藤立定; 小檗碱类; 左旋四氢巴马汀; 左旋多巴; 多巴胺受体; 多巴胺能剂

左旋千金藤立定(*l*-stepholidine, *l*-SPD) 和左旋四氢巴马汀(*l*-tetrahydropalmatine, *l*-THP) 都是四氢原小檗碱同类物(tetrahydroprotoberberines, THPB), 已证明它们是多巴胺(dopamine, DA) 受体拮抗剂⁽¹⁻⁶⁾。唯有在 6-羟基多巴胺(6-hydrodopamine, 6-OHDA)损毁黑质的大鼠旋转试验中, *l*-SPD 显示出对 DA 受体的激动作用, 并且有协同去水吗啡(apomorphine, Apo)的作用^(6,7)。为探讨这一新现象的作用机制, 是否由于 *l*-SPD 有部分激动作用特性, 基于这种设想, 本文用正常敏感性的纹状体突触前 DA 受体反馈调控试验加以验证, *l*-SPD 和 *l*-THP 是否有部分激动剂作用特性。

MATERIALS AND METHODS

药物与试剂 *l*-SPD (mp 161-2 °C, (α)_D 440 °, 吡啶)和 *l*-THP (mp 141-2 °C, (α)_D 289 °, CHCl₃) 均溶于 H₃PO₄ 1.5 mol · L⁻¹ 再用 NaOH 1 mol · L⁻¹ 调节 pH 至 5。多巴(*L*-dopa)和 *D*-10-樟脑磺酸(*D*-camphor-10-sulphonic acid) 为英国 BDH 公司产品。苄丝肼(benserazide, Ben)为本所实验药厂生产。NSD 1015 为 Aldrich Chemie, Germany 产品, 1,4 丁内酯(1,4-butyrolactone, BL) 为 Merck 公司产品。Apo 为沈阳市第一制药厂产品, 氟哌啶醇(haloperidol, Hal) 为海普制药厂产品。氯乙酸、

Received 1991-06-28 Accepted 1992-05-25

¹ Supported by the National Natural Science Foundation of China, No 38970826 and the State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, No K016.

NaOH, 乙二胺四乙酸(EDTA), 偏重硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 三羧甲氨基甲烷(Tris), Al_2O_3 , 高氯酸(HClO_4)均为AR级试剂, 水为三重蒸馏水。

溶液的配制 氯乙酸氢氧化钠缓冲液 pH 2.8, 内含氯乙酸 $0.16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaOH $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, D-10-樟脑磺酸 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及甲醇 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用前用微孔滤膜(孔径 $0.22 \mu\text{m}$)过滤, 然后减压抽气; Tris-HCl 缓冲液, 内含 EDTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Tris-HCl 缓冲液, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 pH 为 8.9, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, pH 为 8.6。

样品制备 Sprague-Dawley ♂ 大鼠, 体重 $240 \pm s 41 \text{ g}$, 由中国科学院上海实验动物中心供给。大鼠断头后于冰台上取出纹状体, 用 HClO_4 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (含 EDTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1:10 (wt/vol) 匀浆。离心 $10\,000 \times g$, 15 min, 4°C , 取其上清液 0.1 ml 加入 Tris-HCl (pH 8.9) 0.1 ml 然后加入到预先装有 20 mg 经 HCl $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理过的 Al_2O_3 的小试管中, 震荡 3 min 后弃上清液, 再加入 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6) 0.2 ml 震荡 2 min 后弃上清液, 加入三重蒸馏水 0.2 ml 震荡 2 min 后去上清液, 加入 HClO_4 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 0.1 ml 再震荡 3 min 后, 离心 $1500 \times g$, 5 min, 4°C , 后取其上清液 $50 \mu\text{l}$ 用于 HPLC 测定 L-dopa 含量, 与外标比较。

高效液相-电化学检测器(HPLC-ECD)检测系统

美国 Millipore 公司制 Waters HPLC-ECD 色谱系统包括 510 型输液系, u6k 进样器, 460 型 ECD 以及 740 型记录仪, 二个反相的 Lichrosob RP- C_{18} 色谱柱 ($50 \times 4 \text{ mm}$, $200 \times 4 \text{ mm}$), ECD 工作电压 0.7 V , 流速 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

RESULTS

L-SPD 和 L-THP 翻转 Apo 对大鼠纹状体内 L-dopa 含量的抑制作用 对照(Ben)组大鼠 ip Ben $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 第 2 组先 ip BL $750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 5 min 后 ip Ben, 第 3 组先 ip Apo $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 然后 ip BL 和 Ben, 第 4-7 组均

先 ip Apo 后 5 min 分别 ip L-SPD (1, 2.5, 10, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 或 L-THP (1, 10, 30, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 5 min 后, 再相继 ip BL 及 Ben。所有各组大鼠均在 ip Ben 后 30 min 杀死, 用 HPLC-ECD 测定纹状体内 L-dopa 含量, 用 *t* 测验来检验两组平均数间差异的显著性。试验结果表明 Ben 组 ($n=5$) L-dopa 含量为 $0.9 \pm s 0.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 组织, BL 使 L-dopa 含量比 Ben 组增加 1 倍 ($n=5$, $P<0.05$)。Apo 抑制 BL 的增强作用, 使其含量仅为 Ben 组的 $64 \pm 28\%$ ($n=6$, $P<0.01$), L-SPD 能翻转 Apo 的抑制作用, 有量-效关系。L-SPD ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 使 L-dopa 较 Apo 组增加 0.6 倍 ($n=5$, $P>0.05$), 但低于 BL 组, 仅为 BL 组的 $55 \pm 22\%$ 。L-SPD $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 能完全拮抗 Apo 的抑制作用 ($n=6$, $P<0.01$), 使 L-dopa 达到 BL 组水平。当 L-SPD $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 使 L-dopa 增加 5.4 倍 ($n=5$, $P<0.01$) 超过 BL 组水平, 显示出对 D_2 受体的阻滞作用; L-THP 翻转 Apo 抑制 L-dopa 合成的作用 (Tab 1) 与 L-SPD 相似。L-THP $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组使 L-dopa 比 Apo 组增加 0.8 倍; $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的 L-dopa 含量比 Apo 组增加 2.8

Tab 1. L-SPD and L-THP ip reversed the Apo evoked depression on L-dopa synthesis in rat striatum. $n=5-6$, $\bar{x} \pm s$, * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$, L-SPD or L-THP vs APO, ** $P<0.05$, BL + Ben vs Ben. $^{§§}P<0.05$, BL + Ben vs APO.

Drug / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	L-dopa / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Ben (400)	0.9 ± 0.6
Ben + BL (750)	$1.8 \pm 0.6^{**}$
Ben + BL + APO (5)	$0.58 \pm 0.25^{§§}$
Ben + BL + APO + SPD (1.0)	$0.9 \pm 0.4^*$
Ben + BL + APO + SPD (2.5)	$1.3 \pm 0.6^{**}$
Ben + BL + APO + SPD (10)	$1.9 \pm 0.6^{***}$
Ben + BL + APO + SPD (20)	$3.7 \pm 1.9^{***}$
Ben + BL + APO + THP (1.0)	$1.05 \pm 0.25^{***}$
Ben + BL + APO + THP (10)	$1.17 \pm 0.25^{***}$
Ben + BL + APO + THP (30)	$1.6 \pm 0.7^{**}$
Ben + BL + APO + THP (40)	$2.2 \pm 1.1^{***}$

倍($n=6$, $P<0.01$), 此时 *L*-dopa 超过了 BL 组水平, 表明 *l*-SPD 和 *l*-THP 有 DA 受体拮抗剂的特性, 未见激动剂的作用特性。

***l*-SPD 和 *l*-THP 增加纹状体内 *L*-dopa 积累** 前 3 组给药程序完全同前述, *l*-SPD 组 ip NSD-1015 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 代替 Ben, 其他各组不给 Apo, 直接观察 *l*-SPD 和 *l*-THP 对 BL 增加 *L*-dopa 的作用是否有抑制。如 Tab 2 所示, 各组 $n=6$, NSD-1015 组的 *L*-dopa 含量为 $1.2 \pm 0.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。BL 使 *L*-dopa 含量增加, 为 NSD-1015 组的 2.3 倍 ($P<0.05$), Apo 使 *L*-dopa 含量降低, 比 BL 组减少, 为 BL 组的 $50 \pm 28\%$, 差异显著 ($P<0.05$), *l*-SPD $0.5\text{--}2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *L*-dopa 含量与 BL 组无显著差异 ($P>0.05$), 当 *l*-SPD $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, *L*-dopa 含量为 $5.2 \pm 1.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P<0.01$); *l*-THP 10, 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对 *L*-dopa 含量的影响类似 *l*-SPD, 使 *L*-dopa 含量分别增至 3.3 ± 0.8 和 $3.5 \pm 1.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 为 BL 组 ($1.8 \pm 0.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 2. *l*-SPD and *l*-THP ip increased the accumulated level of *L*-dopa in rat striatum. $n=5\text{--}6$, $\bar{x} \pm s$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$, *l*-SPD, *l*-THP, Hal or Apo vs BL + NSD-1015 (or Ben). ** $P<0.05$, BL + NSD-1015 (or Ben) vs NSD-1015 (or Ben).

Drug / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>L</i> -dopa / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
NSD-1015 (50)	1.2 ± 0.7
NSD-1015 + BL (750)	$2.8 \pm 1.3^{**}$
NSD-1015 + BL + APO (5)	$1.4 \pm 0.8^{*}$
NSD-1015 + BL + SPD (0.5)	$3.2 \pm 1.2^{*}$
NSD-1015 + BL + SPD (1.0)	$3.2 \pm 2.2^{*}$
NSD-1015 + BL + SPD (2.5)	$4.3 \pm 1.4^{*}$
NSD-1015 + BL + SPD (5.0)	$5.2 \pm 1.1^{***}$
Ben (400)	0.9 ± 0.6
Ben + BL (750)	$1.8 \pm 0.6^{+}$
Ben + BL + APO (5)	$0.58 \pm 0.25^{***}$
Ben + BL + THP (10)	$3.3 \pm 0.8^{***}$
Ben + BL + THP (20)	$3.5 \pm 1.4^{**}$
Ben + BL + Hal (1.0)	$3.4 \pm 0.9^{**}$

的 1.8 及 1.9 倍, 均有显著差异 ($P<0.01$). Hal 增加 *L*-dopa 含量 ($3.4 \pm 0.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $P<0.01$), 为 BL 组的 1.9 倍。

DISCUSSION

本文结果表明, *l*-SPD 和 *l*-THP 不像 DA 受体激动剂 Apo 那样使纹状体内 *L*-dopa 含量明显减少, *l*-SPD 和 *l*-THP 都不能抑制 BL 增加 *L*-dopa 的作用, 且它们本身也能增加 *L*-dopa 的含量, 呈现拮抗剂的作用, 因此, *l*-SPD 和 *l*-THP 能翻转 Apo 对突触前 DA 受体激动作用的负反馈抑制。可见 *l*-SPD 和 *l*-THP 具有 D_2 受体拮抗剂特性, 而无激动剂的特性。本实验室曾观察到 *l*-SPD $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 *l*-THP $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能部分翻转 Apo 的作用^(5,9), 设想它们可能有部分激动剂特性。为此, 本文进行量效关系研究, 证明较大剂量的 *l*-SPD 和 *l*-THP 是能完全翻转 Apo 的负反馈调控作用。这表明 *l*-SPD 或 *l*-THP 有部分激动作用的可能性可以排除。以往的试验结果^(5,9), 可能由于 *l*-SPD 和 *l*-THP 剂量还不够大, 不足以完全拮抗 Apo 的抑制作用。在 DA 受体超敏情况下的旋转试验中, 曾证明 *l*-SPD 有激动作用且由黑质网状区 D_1 受体参与⁽¹⁰⁾。 *l*-SPD 的激动作用及其机制, 将应用其他方法加以论证。

REFERENCES

- Jin GZ. (-)Tetrahydropalmatine and its analogues, as new dopamine receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8 : 81-2.
- Jin GZ. Progress in studies of the pharmacology of (-)-tetrahydropalmatine and (-)-stepholidine. *Acta Pharm Sin* 1987; 22 : 472-80.
- Xu SX, Yu LP, Han YR, Chen Y, Jin GZ. Effects of tetrahydroprotoberines on dopamine receptor subtypes in brain. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 104-10.
- Wang XL, Jin GZ, Yu LP, Li JH. Effect of tetrahydropalmatine on blockade of pre- and postsynaptic dopamine receptors. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3 : 73-7.

- 5 Jin GZ, Xu SX, Yu LP. Different effects of enantiomers of tetrahydropalmatine on dopaminergic system. *Sci Sin [B]* 1986; 29 : 1054-64.
- 6 Jin GZ, Wang XL, Shi WX. Tetrahydroprotoberberine—a new chemical type of antagonist of dopamine receptors. *Sci Sin [B]* 1986; 29 : 527-34.
- 7 Shi WX, Chen Y, Jin GZ. Effect of (-)-stepholidine on rotational behavior in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 222-5.
- 8 Roth RH, Wolf ME, Deutch AY. Neurochemistry of midbrain dopamine systems. In: Meltzer HY, editor. *Psychopharmacology* New York: Raven, 1987 : 81-91.
- 9 Jin GZ, Han YR, Gonon FG, Yu LP, Xei Y, Xia Y. Inhibition of (-)-stepholidine on feedback regulation of striatal presynaptic DA receptor. *Chin J Physiol Sci* 1991; 7 : 195-203.
- 10 Huang KX, Sun BC, Jin GZ. (-)-stepholidine: a dopamine receptor antagonist shows agonistic effect on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Acta Pharmacol Sin* 1992; 13 : 17-22.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Sep; 13 (5) : 445-448

④ 445-448
山莨菪碱对兔离体胸主动脉平滑肌的钙拮抗作用

陈锦明、张明志¹、谷淑玲、张光毅¹ (徐州医学院药理教研室, 徐州 221002, 中国) R 965.1

Calcium antagonism of anisodamine on isolated rabbit thoracic aorta

CHEN Jin-Ming, ZHANG Ming-Zhi¹, GU Shu-Ling, ZHANG Guang-Yi¹
 (Department of Pharmacology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

ABSTRACT Anisodamine (Ani) or verapamil (Ver) relaxed the contracted thoracic aortic strips induced by CaCl₂ and KCl in a noncompetitive manner with pD₂' 3.6 and 5.8, respectively. Ani 50 μmol · L⁻¹ and Ver 1 μmol · L⁻¹ inhibited the intracellular Ca²⁺-dependent component of norepinephrine-induced contraction of aorta, but Ani 0.1 mmol · L⁻¹ did not decrease the extracellular Ca²⁺-dependent component.

In the presence of Ca²⁺, Ani 2.3 μmol · L⁻¹ inhibited the proliferation of aortic smooth muscle cells. In the absence of Ca²⁺, the effect induced by Ani was biphasic-stimulatory at 2.3 μmol · L⁻¹ concentrations and inhibitory at 61.7 μmol · L⁻¹ concentrations.

These results suggest that Ani, similar to

Ver, mainly inhibits the potentially operated calcium channels.

KEY WORDS atropine derivatives; verapamil; thoracic aorta; drug dose-response relationship; vascular smooth muscle; cultured cells

提要 Ani, Ver 对 CaCl₂ 和 Ani 对 KCl 所致兔胸主动脉条收缩的 pD₂' 分别为 3.6, 5.8 和 3.6. Ani 50 μmol · L⁻¹ 能抑制 NE 引起细胞内 Ca²⁺ 释放所致收缩的 21 ± 7%. Ani 0.1 mmol · L⁻¹ 对 NE 引起细胞外 Ca²⁺ 内流的收缩无影响. Ani 2.3 μmol · L⁻¹ 对有 Ca²⁺ 胸主动脉平滑肌细胞培养增殖有抑制, 对无 Ca²⁺ 培养, Ani 61.7 μmol · L⁻¹ 也能抑制其增殖. 提示 Ani 对 Ca²⁺ 有拮抗作用.

关键词 阿托品衍生物; 维拉帕米; 胸部动脉; 药物剂量-效应关系; 血管平滑肌; 培养细胞 山莨菪碱 平滑肌.

山莨菪碱(anisodamine, Ani)能对抗乙酰胆碱所致平滑肌痉挛, 也能解除血管痉挛, 改善微循环, 一般认为与阻断 M 受体和 α 受体有关⁽¹⁾. 我们曾在离体兔耳血管灌流中, 观察到 Ani 能拮抗去甲肾上腺素的作用⁽²⁾. Ani 有拮抗钙的作用⁽³⁾. 本文研究 Ani 对家兔离体胸主动脉平滑肌作用与 Ca²⁺ 的关系.

Received 1991-07-29

Accepted 1992-04-23

¹ Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China.