

生起作用。

REFERENCES

- 1 Deitmer JW, Ellis D. The intracellular sodium activity of cardiac Purkinje fibres during inhibition and re-activation of the Na-K pump. *J Physiol (Lond)* 1978; **284**: 241-59.
- 2 Glitsch HG. Characteristics of active Na transport in intact cardiac cells. *Am J Physiol* 1979; **230**: H189-99.
- 3 Glitsch HG. Inhibition of the Na pump — a mechanism in the genesis of cardiac arrhythmias. *Basic Res Cardiol* 1984; **79**: 611-9.
- 4 Han DY, Liu BY, Chen XL, Liu WF. Effects of extracellular sodium concentration on the sodium-pump activity in Purkinje fibres of sheep. *Acta Physiol Sin* 1990; **42**: 562-70.
- 5 Marsh AJ, Lloyd BL, Taylor RR. Age dependence of myocardial Na⁺-K⁺-ATPase activity and digitals intoxication in the dog and guinea pig. *Circ Res* 1981; **40**: 329-33.
- 6 Rhee HM. Ouabain sensitivity of Rb uptake in canine Purkinje fiber and ventricular muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; **310**: 344-8.
- 7 Lederer WJ, Tsien RW. Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibers. *J Physiol (Lond)* 1976; **263**: 73-100.
- 8 Colquhoun D, Neher E, Reuter H, Stevens CF. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature* 1981; **294**: 752-4.
- 9 Fedida D, Noble D, Rankin AC, Spindler AJ. The arrhythmogenic transient inward current *i_{T1}* and related contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 1987; **382**: 523-42.
- 10 Daut J. The role of intracellular sodium ions in the regulation of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 1982; **14**: 189-92.

249 - 252

15

4-氨基吡啶诱发小鼠舔体反应与肥大细胞释放组胺¹

林宇红, 徐建华² (浙江医科大学 药理学系 药理教研室, 杭州 310006, 中国)

R 965.2

4-Aminopyridine-induced licking response and histamine liberation in mice

LIN Yu-Hong, XU Jian-Hua
(Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT 4-Aminopyridine (4-AP) 1 mg · kg⁻¹ sc at the scruff induced a licking response in mice. H₁ receptor blockaders, such as diphenhydramine HCl (1, 10 mg · kg⁻¹, sc at the scruff or 40 mg · kg⁻¹, ip), chlorphenamine maleate (20 mg · kg⁻¹, ip), and

astemizole (2 mg · kg⁻¹, ig), inhibited the licking response caused by 4-AP. Repeated injections of 4-AP (1 mg · kg⁻¹) reduced the times of lick and the histamine content in the skin of injected site. 4-AP also promoted histamine release from incubated mouse peritoneal mast cells (PMC) in a dose-dependent manner. The results indicate that the licking response may originate from the histamine liberation of mast cells.

KEY WORDS 4-aminopyridine; animal behavior; histamine H₁ receptor blockaders; mast cells; histamine liberation

Received 1992-07-31 Accepted 1993-12-06
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39270788.

² To whom correspondence should be addressed.

摘要 4-氨基吡啶 (4-AP) 1 mg · kg⁻¹ 颈背部 sc 能诱发小鼠舔体反应。该反应可被苯海拉明、氯苯那敏或阿司咪唑所抑制。重复注射

(基文内容在页)

4-AP 可使舔体反应逐渐减少或不发生, 且给药部位皮肤组胺含量明显降低. 4-AP 也能促进小鼠离体腹腔肥大细胞释放组胺. 结果表明, 4-AP 具有释放组胺作用. 它诱发的小鼠舔体反应可能与释放组胺有关.

关键词 4-氨基吡啶; 动物行为; 组胺 H_1 受体阻断药; 肥大细胞; 组胺释放

4-氨基吡啶 (4-aminopyridine, 4-AP) 是一种钾通道阻滞剂, 具有广泛的中枢与外周作用. 它可诱发小鼠激怒反应^[1], 能促进神经末梢释放乙酰胆碱 (ACh)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 等递质^[2, 3], 促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[4]等. 作者发现 4-AP 还能诱发小鼠产生舔体反应和促进肥大细胞 (mast cell, MC) 释放组胺. 本文报道 4-AP 诱发的小鼠舔体反应的特征, H_1 受体拮抗剂对该反应的影响以及 4-AP 对小鼠皮肤与腹腔 MC 释放组胺的作用, 探讨了小鼠舔体反应与 4-AP 组胺释放作用之间的关系及释放作用的意义.

MATERIALS AND METHODS

NIH 种小鼠, 体重 23 ± 2 g, 雌雄兼用, 由本校实验动物中心供应.

4-AP 为 Alfa 产品, 化合物 48/80 (compound 48/80) 为 Sigma 产品, 盐酸苯海拉明 (diphenhydramine hydrochloride, Dip) 为广州第三制药厂产品, 马来酸氯苯那敏 (chlorphenamine maleate, Chl) 为上海第十制药厂产品, 阿司咪唑 (astemizole, Ast) 为西安扬森制药公司产品. 邻苯二甲醛 (o-phthalaldehyde, OPT) 为瑞士 Fluka 药厂产品, 100% MeOH 为衢州化学公司试剂厂产品. 组胺标准品由中国药品生物制品检定所提供. 化学试剂均为 AR.

荧光分光光度计系日立 F-4000 型, 透射电子显微镜为 Philips EM 410 型.

试剂的配制 4-AP 用生理盐水配成 0.5% 溶液, 放于冰箱贮藏, 三个月内使用, 临用前用盐水稀释. 精密称取组胺标准品约 10 mg, 用灭菌双蒸馏水配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 贮备液, 临用前稀释成 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的组

胺标准液, 在 7 d 内使用. 邻苯二甲醛用 100% EtOH 配成 1% 溶液, 7 d 内使用. MC 孵化液^[5] ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): Na_2HPO_4 , 4.0, KH_2PO_4 , 2.7, NaCl 150.0, KCl 2.7, 葡萄糖 2.0, CaCl_2 1.0, 含小牛血清 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pH 7.2.

4-AP 诱发小鼠舔体反应 小鼠 60 只, 雌雄各半, 实验在 $10-30^\circ\text{C}$ 进行, 在颈背部 sc 4-AP $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以等容量盐水作对照. 给药后以小鼠连续舔体至出现短暂停顿作舔体一次计算, 记录舔体次数, 至 1 min 内不再出现舔体为止.

H_1 受体阻断药抑制 4-AP 诱发的小鼠舔体反应 小鼠 60 只, 雌雄各半, 分成 6 组, 每组 10 鼠, 记录给 4-AP 后 10 min 内小鼠的舔体次数, 以舔体次数 > 3 为阳性反应, 统计各组舔体反应阳性的小鼠数.

小鼠皮肤组胺的含量^[6] 小鼠 16 只, 随机分成两组, 每组 8 只, 一组 sc 4-AP $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 记录舔体反应, 每隔 10 min 重复给药一次, 于第 4 次给药后即无舔体反应发生. 另一组 sc 等量生理盐水作对照. 将各鼠断头, 剃去颈背部毛, 剪取约 $3-4 \text{ cm}^2$ 的皮肤一块, 剔除皮下结缔组织, 称取皮肤湿重 0.25 g , 剪成 $< 1 \text{ mm}^2$ 的小块, 加 5.0 ml HClO_4 , $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 制成匀浆, 以 $1000 \times g$ 离心 0.5 h , 取上清液 2.0 ml , 用荧光法^[7]略作改进^[8]测定组胺. 另取 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的组胺标准液 0.5 ml , 加 HClO_4 , $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 2.0 ml , 与皮肤匀浆的上清液按同法进行提取和处理, 在激发波长 360 nm , 发射波长 450 nm 处测定荧光值, 每个样品重复测两次.

腹腔 MC (peritoneal MC, PMC)

1 PMC 悬液制备 取小鼠 5 只, 断头后 ip 孵化液 2 ml , 按摩腹部 $2-3 \text{ min}$. 打开腹腔, 将腹腔液移至置于冰浴的离心试管中, 以 $110 \times g$ 离心 5 min , 弃去上清液, 加入孵化液 2.0 ml , 混匀后即成 PMC 混悬液, 分成每管 0.4 ml , 置冰浴备用.

2 PMC 孵育 将 PMC 悬液的试管放于 37°C 预热 5 min , 加 4-AP 溶液 (样品管) 或孵化液 (对照管) 0.1 ml , 继续孵育 10 min , 加 0°C 孵化液至 1.0 ml 终止反应, 置冰浴 5 min 后 $110 \times g$ 离心 5 min , 取上清液测组胺含量.

3 PMC 悬液中组胺含量 按荧光法^[7]略作改进^[8], 取 PMC 孵育后的上清液测定组胺含量, 对照管 1 管, 不加 4-AP, 与样品管同样处理, 其组胺释放量为 PMC 组胺的自发释放量, 另取未孵育 PMC 悬液 1

管,置 100℃ 水浴煮沸 15 min 后加孵化液至 1.0 ml,上清液的组胺含量为 PMC 含组胺总量。每管样品重复测两次,按下式求出 4-AP 诱发小鼠 PMC 的组胺释放率。

$$\text{PMC 组胺释放率 (\%)} = (\text{样品管组胺释放量} - \text{对照管组胺释放量}) / \text{组胺总量} \times 100 \%$$

4 PMC 形态学观察 将 PMC 悬液 $110 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清液, 加入新鲜戊二醛 (4℃), 用磷酸缓冲液洗 3 次, 2% OsO₄ 固定 1 h, 用巴比妥缓冲液洗 3 次, 依次用 50%, 70%, 80%, 90% EtOH 脱水, 再用 100% EtOH 脱水 3 次, 100% 丙酮脱水 2 次, 每一步骤均为 15 min, 然后用 1:1 的丙酮与包埋剂浸透过夜, 包埋后切片, 用醋酸双氧铀与柠檬酸铅染色后, 在 Philips EM 410 型透射电镜下观察。

RESULTS

4-AP 诱发小鼠舔体反应 给小鼠颈背部 sc 4-AP 后 10 s 左右, 小鼠即出现反复扭头舔两侧背部的行为, 即舔体反应, 同时伴有用前足搔背外侧及面部等动作。4-AP $125 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 即可诱发舔体反应, 1 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作用很明显, 舔体次数在 30 次以上。舔体反应持续时间约 10 min。小鼠舔体反应无性别差异, 室温 10, 20, 30℃ 时结果也无显著差异。

H₁受体阻断药对 4-AP 诱发小鼠舔体反应的影响 Dip 1, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分别提前 2, 5 min 颈背部 sc, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 提前 20 min ip, Chl $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 提前 20 min ip, Ast $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 提前 2 h ig, 均使小鼠舔体次数明显减少 ($P < 0.01$), 而 Dip $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 无抑制作用。见 Tab 1。

4-AP 重复给药对小鼠舔体反应的影响

小鼠 7 只, 在 sc 4-AP $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 诱发的舔体反应结束后, 再次给予相同剂量的 4-AP, 可见舔体次数逐渐减少。连续给药 4 次后, 小鼠舔体反应均不再出现。见 Tab 2。

4-AP 多次给药后小鼠皮肤组胺含量的变化 一组小鼠每隔 10 min 重复 sc 4-AP $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 4 次后, 注射部位皮肤组胺含量为 $20 \pm$

$4 \mu\text{g}/\text{g tissue}$ ($n=8$)。另一组小鼠用生理盐水进行类似处理后, 注射部位皮肤组胺含量为 $38 \pm 6 \mu\text{g}/\text{g tissue}$ ($n=8$)。结果表明 4-AP 多次给药可使小鼠皮肤注射部位组胺含量明显减少 ($P < 0.01$)。

Tab 1. Influence of histamine H₁ receptor blockers diphenhydramine hydrochloride (DIP), chlorphenamine maleate (CHL), and astemizole (AST) on licking response induced by 4-aminopyridine $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc in mice. * $P > 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs saline.

Drug	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Route	n	Mice showing licking response	Times of licking in 10 min $\bar{x} \pm s$
Saline			20	20	39 ± 9
DiP	1	sc	10	10 ^a	12 ± 10^c
	10	sc	10	4 ^a	10 ± 6^c
	10	ip	10	10 ^a	34 ± 16^c
	40	ip	10	0 ^a	0 ^c
CHL	20	ip	10	8 ^a	10 ± 9^c
AST	2	ig	10	8 ^a	16 ± 13^c

Tab 2. Licking response after repeated sc 4-aminopyridine in mice. $n=7$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ vs the 1st injection.

Times of injection	Times of licking
1	39 ± 7
2	20 ± 6^c
3	7 ± 4^c
4	0 ^c

4-AP 对小鼠 PMC 释放组胺的影响 4-AP 能诱发小鼠 PMC 释放组胺, 并呈浓度依赖性 (Tab 3)。

4-AP 对小鼠 PMC 形态学的影响 正常 MC 胞浆内有大量含电子致密物质的分泌颗粒。4-AP $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后, 少量颗粒排出胞外, 胞膜基本完整 (Fig 1)。

DISCUSSION

以上结果表明, 小鼠颈背部 sc 4-AP 能诱

Tab 3. Histamine release induced by 4-aminopyridine from isolated mouse peritoneal mast cells.
 $\bar{x} \pm s$ of 8-10 experiments.

4-AP/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Histamine release/%
1	10 ± 1
2	20 ± 6
5	28 ± 4
10	53 ± 11
25	84 ± 9

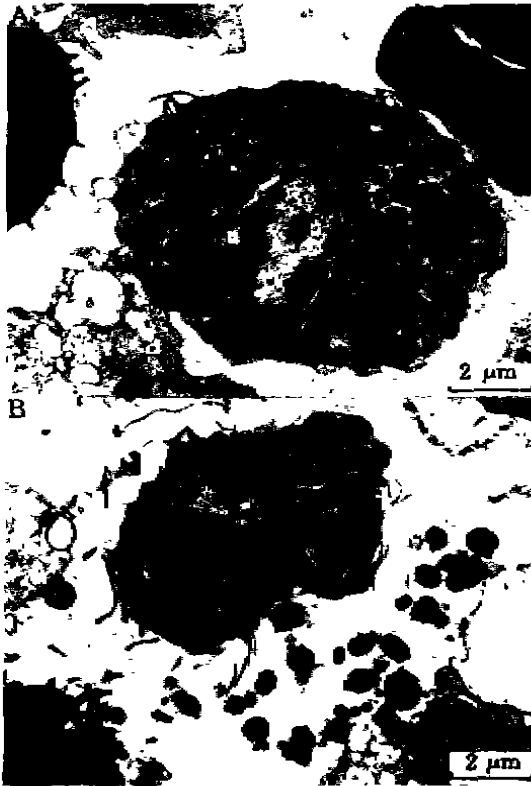


Fig 1. Electron microscopy of mast cell. A) Normal cell; B) Exposed to 4-aminopyridine $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 10 min, showing extrusion of granules ($\times 7100$).

发舔体反应, 此可被 H_1 受体阻断剂所抑制, 由于小剂量 Dip ip 无效, 而颈部 sc 有效, 且无中枢抑制作用的 Ast 也显效, 这表明 H_1 受

体阻断药抑制 4-AP 诱发小鼠舔体反应的作用部位是在外周, 本文结果也表明, 4-AP 能诱发小鼠 MC 脱颗粒, 并使 MC 组胺释放量增加, 呈浓度依赖性, 可能由于重复给药后 4-AP 刺激 MC 释放组胺量逐渐减少, 使小鼠舔体反应次数也随之减少, 因多次给药促进 MC 一次次释放组胺, 使用药局部皮肤组胺含量明显降低, 因此, 推测 4-AP 诱发的小鼠舔体反应可能与它促进 MC 释放组胺有关。

4-AP 组胺释放作用的证实, 表明 4-AP 不仅能促进神经递质的释放, 而且还能促进自体活性物质的释放, 在临床应用 4-AP 时, 应注意该作用引起的不良反应。

REFERENCES

- Xu JH, Liu HC, Zhang YP. 4-Aminopyridine induced rage reaction in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1991; **12**: 155-9.
- Tapia R, Sugés M. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res* 1982; **250**: 291-9.
- Damsma G, Biessels PTM, Westerink BHC, De Vries JB, Horn AS. Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-diaminopyridine on the *in vivo* release of acetylcholine and dopamine in freely moving rats measured by intrastriatal dialysis. *Eur J Pharmacol* 1988; **145**: 15-20.
- Abrén B, Leander S, Lundquist I. Effects of 4-aminopyridine on insulin secretion and plasma glucose levels in intact and adrenalectomized-chemically sympathectomized mice. *Eur J Pharmacol* 1981; **74**: 221-6.
- Boarato E, Mietto L, Toffano G, Bigon E, Bruni A. Different responses of rodent mast cells to lysophosphatidylserine. *Agents Actions* 1984; **14**: 613-8.
- Tharp MD, Suvunrungrasi RT, Sullivan TJ. IgE-mediated release of histamine from human cutaneous mast cells. *J Immunol* 1983; **130**: 1896-901.
- Shore PA, Burkhaier A, Cohn VH Jr. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1959; **127**: 182-6.
- Du MQ, Dai JZ, Zhang JW, Lu YP, Pan XX. Studies on degranulation and histamine release of mast cells in anaphylactic reaction. *Pharm Ind* 1985; **10**: 361-4.