

细胞外无钙条件下锂诱发海马去甲肾上腺素释放

黄华玉, 谢培国, 黄怡争 (中国科学院上海生理研究所, 上海200031, 中国)

Lithium-induced norepinephrine release from hippocampal slices in the absence of extracellular Ca^{2+}

HUANG Hua-Yu, XIE Pei-Guo, HUANG Yi-Zheng (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT Slices of rat hippocampus, preincubated with [3H] norepinephrine ([3H]NE) were superfused with Ca^{2+} -free medium containing desipramine $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Li^+ ($40-80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) evoked [3H]NE release in a concentration dependent manner. It was enhanced by 4β -phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) and inhibited by tetrodotoxin. Ca^{2+} -chelator BAPTA-AM did not attenuate this Li^+ -evoked [3H]NE release. After application of 3,4-diaminopyridine to evoke [3H]NE release and PDB to enhance this release, the Li^+ -evoked [3H]NE release was significantly inhibited. The findings suggest that the liberation of internal Ca^{2+} stores was not involved in this release process.

KEY WORDS lithium; hippocampus; norepinephrine; protein kinase C; calcium; pyridines

摘要 在细胞外无钙条件下, Li^+ 能诱发海马脑片释放去甲肾上腺素(NE)。佛波醇基酯(PDB)能加强这一诱发释放, 而河豚毒素能抑制它, Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM 对它无作用。

Received 1993-02-17

Accepted 1994-01-26

¹ Project supported by the Stiftung Volkswagenwerk, Germany and the National Natural Science Foundation of China, No 39070328.

R 965.

如先用3,4-二氨基吡啶诱发 NE 释放, 并用 PDB 加强这一释放, 则 Li^+ 诱发 NE 释放的作用被抑制。结果提示: 内源性 Ca^{2+} 释放并不参与 Li^+ 诱发 NE 释放的机制。

关键词 锂; 海马; 去甲肾上腺素; 蛋白激酶 C; 钙; 吡啶

锂(Li^+)临床应用于狂燥型精神病人有显著的镇静作用^[1]。狂燥病人的中枢神经递质失去平衡, Li^+ 通过改善递质的合成或释放而奏效^[2]。此外, Li^+ 能特异地抑制肌醇单磷酸酯酶, 阻断多磷酸肌醇循环, 从而加强神经递质的释放^[3]。也有报道认为, Li^+ 能抑制神经递质的释放^[4], 但对内源性神经递质水平并不产生影响^[5]。为排除 Ca^{2+} 内流对递质释放的影响, 本研究在细胞外无 Ca^{2+} 条件下观察 Li^+ 对海马 NE 释放的影响。

MATERIALS AND METHODS

药品和试剂 $LiCl$ 分析纯, 系上海虹光化工厂产品; [3H]去甲肾上腺素(1-[7,8- 3H]norepinephrine, [3H]NE, Amersham); 3,4-二氨基吡啶(3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP), desipramine HCl (Merck); 佛波醇基酯(4β -phorbol 12,13-dibutyrate, PDB), 河豚毒素(tetrodotoxin, TTX) (Sigma); tetraacetoxy methyl ester of 1-2-bis-(2-aminopenoxy) ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid (BAPTA-AM) (华东师大化学系合成); Soluene 350, Urimagold, Hionic-fluor (Packard)。药品在每次使用前, 用蒸馏液或重蒸水新鲜配制, PDB 和 BAPTA-AM 溶于 Me_2SO , TTX 溶于柠檬酸钠 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液 (pH 4.85)。

实验操作 Sprague-Dawley 大鼠, ♂, 体重 $250 \pm 25 \text{ g}$, 断头, 取出全脑投入 4°C 生理溶液, 在 6-8 $^\circ\text{C}$ 下分离海马, 用 McIlwain 组织切片机, 沿板状器方向

制备厚0.35 mm的脑片,用生理溶液淋洗后,加入生理溶液2 ml,含 $[^3\text{H}]\text{NE}$ $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.6 \text{ PBq}\cdot\text{mol}^{-1}$, 37°C 保温30 min,再用生理溶液淋洗3次,将脑片随机转入1 ml的灌流小室,每室1片,表面灌流 $0.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$,生理溶液组成: NaCl 118, KCl 4.8, CaCl_2 1.3, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, 葡萄糖11, 抗坏血酸0.57, edetic acid 二钠盐 $0.03 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 用95% O_2 -5% CO_2 饱和后,加 NaOH 调pH至7.4. 灌流液中 CaCl_2 被 egtazic acid $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 取代,另加 desipramine $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为阻断 NE 重摄取^[6]. 灌流45 min后,将流出液直接收集入闪烁杯内,每5 min 1份,加闪烁液 Ultima-gold 4 ml,用液体闪烁计数器测 ^3H 含量. 脑片用 Soluene 350 0.25 ml 溶解后,加入 Hionic Fluor 5 ml,然后测定 ^3H 含量^[7].

当生理溶液中需要含有 LiCl 时,同时减少相同分子数的 NaCl ,以保持溶液的正常渗透压. 在 BAPTA-AM 实验中,脑片与 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 保温30 min之前,先在 BAPTA-AM 溶液中(对照组脑片在0.5% Me_2SO 中)保温2 h. 在灌流开始后60 min引入不同浓度 Li^+ (或 DAP)作为刺激物以诱发 NE 释放. 通常在刺激之前15 min加入待测药物,以测试其对诱发释放的影响,每次同时进行对照实验.

数据处理 被测药物的作用,以刺激所诱发的 ^3H (包括刺激开始后10份样品中的 ^3H 含量减去基础释放量)占脑片 ^3H 总含量的%表示. Fig 1中 ^3H 溢出用每份样品中的 ^3H 含量占脑片中 ^3H 总量的%表示. 所有结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 t 检验判断组间差异的显著性^[8].

RESULTS

Li^+ 诱发海马脑片释放 NE 以及 PDB 的加强作用 胞外无 Ca^{2+} 条件下, LiCl $40-80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引入脑片灌流液中,明显加强 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放,然后迅速下降到基础水平. Li^+ 对 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放的诱发作用呈浓度依赖关系,若先用 PDB $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激活蛋白激酶 C (PKC),则 Li^+ 诱发的 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放显著地被加强,但 Li^+ 浓度愈高, PDB 的相对加强作用愈小, LiCl $40, 60, 80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, PDB 的加强作用分别为 152%, 65%, 31% (Tab 1).

Tab 1. Li^+ -evoked $[^3\text{H}]\text{NE}$ release and its enhancement by phorbol ester (PDB) in the absence of extracellular Ca^{2+} . Rat hippocampal slices preincubated with $[^3\text{H}]\text{NE}$ and superfused with Ca^{2+} -free medium containing egtazic acid $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and desipramine $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Li^+ ($40-80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added at 60 min of superfusion onwards, PDB $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was added 15 min before Li^+ . $n=4-6$ slices from 2 rats, $\bar{x}\pm s$. vs respective controls: $^b P<0.05$.

$\text{LiCl}/$ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Evoked ^3H outflow/ Control	% of tissue ^3H + PDB
40	18.52 ± 1.52	46.75 ± 3.01^b
60	40.12 ± 2.04	66.17 ± 4.68^b
80	60.42 ± 3.05	78.13 ± 4.51^b

TTX 和 BAPTA-AM 对 Li^+ 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放以及 PDB 加强作用的影响 在胞外无 Ca^{2+} 条件下,在加 LiCl 之前15 min加入 Na^+ 通道阻断剂 TTX $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,几乎完全抑制 LiCl $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 所诱发的 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放, $[^3\text{H}]\text{NE}$ 的释放量,对照组为脑片 ^3H 总含量的 $16.2\pm 0.9\%$, TTX 组为 $0.8\pm 0.4\%$ ($P<0.01$). 而 Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理海马脑片,对 Li^+ 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放以及 PDB 的加强作用不产生任何影响,对照组为脑片 ^3H 总含量的 $16.2\pm 0.9\%$,加 PDB 后为 $21.8\pm 0.8\%$; BAPTA-AM 组为 $16.4\pm 1.0\%$,加 PDB 后为 $20.8\pm 0.4\%$.

Li^+ 对 DAP 诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放以及 PDB 的加强作用的影响 改用 DAP $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为刺激物诱发 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 释放,在 DAP 之前15 min加入 PDB $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激活 PKC ,则 DAP 的诱发释放明显增强. 在灌流液中含有 LiCl $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, DAP 诱发 NE 释放的作用明显增强,从脑片 ^3H 总含量的 $3.5\pm 0.4\%$ 增强到 $12.4\pm 0.9\%$ ($P<0.01$). 但 PDB 的相对加强作用反而减弱,无 Li^+ 组加强到 $16.7\pm 0.9\%$,含 Li^+ 组加强到 $33.8\pm 1.8\%$ (从原来无 Li^+ 时增强4.7倍减少到2.7倍).

DAP 和 PDB 对 Li⁺ 诱发 [³H]NE 释放的影响 在灌流 60 min 时加入 Li⁺ 40 mmol · L⁻¹, [³H]NE 释放逐渐增加, 95—100 min 时达最大值, 随后迅速下降至基础值. 如在灌流 45 min 时, 先用 PDB 激活 PKC, 60 min 时用 DAP 作为刺激物诱发 NE 释放, 在 70—75 min 时达最大值, 在此情况下, LiCl 40 mmol · L⁻¹ 对 NE 释放的诱发作用被抑制, 95—100 min 时无释放高峰 (Fig 1).

DISCUSSION

实验结果表明, 在细胞外无 Ca²⁺ 条件下, Li⁺ 能诱发海马脑片释放 NE, 这与文献报道, Li⁺ 抑制神经递质释放的实验结果⁽⁴⁾ 不一致. Li⁺ 诱发 NE 释放作用, 与电刺激, 高 K⁺⁽⁷⁾ 或 DAP⁽⁸⁾ 诱发 NE 释放作用一样, 能被第二信使系统所调制, 因为用 PDB 激活 PKC⁽⁹⁾ 可加强 Li⁺ 诱发 NE 释放. 说明 Li⁺ 诱发 NE 释放是来自囊泡的胞吐, 而不是来自胞浆的渗漏.

那么, Li⁺ 通过什么机制诱发 NE 释放的呢? (1) Li⁺ 诱发 NE 释放作用能被 TTX 强烈抑制, 说明 Li⁺ 引起膜去极化, Na⁺-通道开放, Li⁺ 经 Na⁺-通道进入胞内. 在膜去极化期间, 电压依赖性 Ca²⁺-通道亦必然开放, 但并无内向钙流发生, 因为本实验是在胞外无钙条件下进行的. 因此, 通过外钙内流诱发 NE 释放的可能性可以排除; (2) Li⁺ 进入胞浆后, 是否和 Na⁺ 一样能在线粒体表面进行 Li⁺/Ca²⁺ 交换⁽¹⁰⁾, 使胞浆游离 Ca²⁺ 浓度升高而引起 NE 释放, 或者通过中断多磷酸肌醇循环⁽¹¹⁾, 增强 Ca²⁺ 从内网释放, 使胞浆游离 Ca²⁺ 浓度升高, 最后引起 NE 释放. 然而 BAPTA-AM 实验结果不支持这一可能性. BAPTA 是 Ca²⁺ 螯合剂, 但不易透过细胞膜, 而 BAPTA-AM 可渗入, 并在膜内侧分解放出 BAPTA, 这样, 胞浆游离 Ca²⁺ 浓度不可能显著升高⁽¹²⁾, 用 BAPTA-AM 预处理脑片, 并不减弱 Li⁺ 的作用, 提示内源钙释放并不参与 Li⁺ 诱发 NE 释

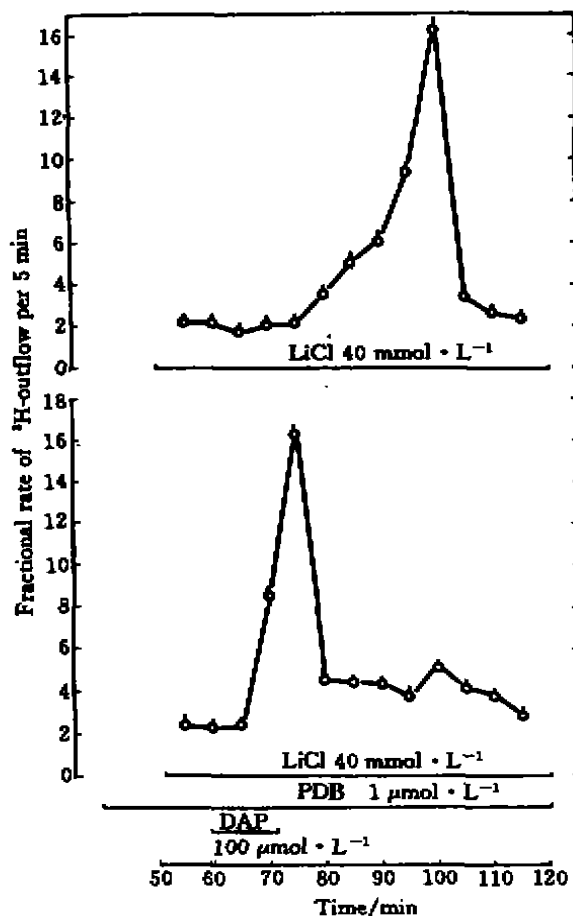


Fig 1. Effects of DAP and PDB on Li⁺-evoked [³H]NE release in the absence of extracellular Ca²⁺. Slices were preincubated with [³H]NE and superfused with Ca²⁺-free medium. n=4-6, slices from 2 rats. $\bar{x} \pm s$.

放过程; (3) PDB 能加强 Li⁺ 诱发 NE 释放作用, 但 Li⁺ 浓度愈高, PDB 的相对加强作用愈小 (Tab 1). 此外, 已经证明, 在胞外无钙条件下, DAP 也能作为刺激物有效地诱发 NE 释放⁽¹³⁾, PDB 也能加强这一诱发释放. 灌流液中含有 Li⁺ 10 mmol · L⁻¹ 时, DAP 的作用明显增强, 但 PDB 的相对加强作用反而减弱. 将 Li⁺ 40 mmol · L⁻¹ 与 DAP 和 PDB 同时使用, 则

Li⁺诱发 NE 释放作用被抑制(Fig 1). 实验结果提示 Li⁺和 PDB 可能通过相同的机制^[14]影响 NE 释放.

REFERENCES

- Cade JFJ. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust* 1949; **36**: 349-52.
- Jope RS. Effects of lithium treatment *in vitro* and *in vivo* on acetylcholine metabolism in rat brain. *J Neurochem* 1979; **33**: 487-95.
- Hallcher LM, Sherman WR. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem* 1980; **255**: 10896-901.
- Forn J, Valdecasas FG. Effects of lithium on brain adenylyl cyclase activity. *Biochem Pharmacol* 1971; **20**: 2773-9.
- Lacaille JC, Cloutier S, Reader TA. Lithium reduced synaptic transmission and increased neuronal excitability without altering endogenous serotonin norepinephrine and dopamine in rat hippocampal slices *in vitro*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1992; **16**: 397-412.
- Bonisch H. The role of co-transported sodium in the effect of indirectly acting sympathomimetic amines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; **332**: 135-41.
- 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**: 175-84.
- 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: effect of phorbol ester. *Eur J Pharmacol* 1989; **169**: 115-23.
- Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; **308**: 693-8.
- Crompton M, Muser R, Ludi H, Carafoli E. The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur J Biochem* 1978; **82**: 25-31.
- Sun GY, Navidi M, Yoa FG, Lin TN, Orth OE, Stubbs EB, *et al*. Lithium effects on inositol phospholipids and inositol phosphates; evaluation of an *in vivo* model for assessing polyphosphoinositide turnover in brain. *J Neurochem* 1992; **58**: 290-7.
- Yang LP, Zhang XD, Huang XA, Luo JS, Pan JM, Zhu PH. Studies on synthesis and properties of the fluorescence reagents BAPTA and BAPTA-AM. *J East China Normal Univ. (Special Edition in Chemistry)* 1991; **9**: 30-3.
- Huang HY, Hertting G, Allgaier C, Jackisch R. 3,4-Diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampus; role of Na⁺ entry on Ca²⁺ pools and of protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 1991; **206**: 221-30.
- Drummond AH, Raeburn CA. The interaction of lithium with thyrotropin-releasing hormone-stimulated lipid metabolism in GH₃ pituitary tumour cells. *Biochem J* 1984; **224**: 129-36.

《医学文摘》—医学世界之窗

《医学文摘》已于1993年9月扩大服务范围至中国读者。发行于超过四十多国家的医学文摘，一本初衷，籍著已建立的国际资讯网络，将传送给读者实用、精选的讯息。以简便易读的形式，提供丰富的医学新知，全书以英文编写并注有中文摘要。

本月刊现选择性地提供给国内专业医师阅读。其他医务人员及药业人才如欲订购，可直接来信邮购。

一年港币..... \$ 120 (12期)

二年港币..... \$ 192 (24期)

出版及发行：《医学文摘》

地址：香港湾仔 骆克道200号 东新商业中心1501室

电话：(852) 519 9303

传真：(852) 507 3817