

## 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  $4\beta$ -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

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

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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。也有报道认为,  $Li^+$ 能抑制神经递质的释放<sup>[4]</sup>, 但对内源性神经递质水平并不产生影响<sup>[5]</sup>。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( $4\beta$ -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  $4^\circ\text{C}$  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 $[^3\text{H}]\text{NE}$   $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1.6 \text{ PBq}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 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:  $\text{NaCl}$  118,  $\text{KCl}$  4.8,  $\text{CaCl}_2$  1.3,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  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%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ 饱和后,加  $\text{NaOH}$  调pH至7.4. 灌流液中  $\text{CaCl}_2$  被  $\text{egtazic acid}$   $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  取代,另加  $\text{desipramine}$   $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为阻断  $\text{NE}$  重摄取<sup>[6]</sup>. 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 $^3\text{H}$ 含量. 脑片用 Soluene 350 0.25 ml 溶解后,加入 Hionic Fluor 5 ml,然后测定 $^3\text{H}$ 含量<sup>[7]</sup>.

当生理溶液中需要含有  $\text{LiCl}$  时,同时减少相同分子数的  $\text{NaCl}$ ,以保持溶液的正常渗透压. 在  $\text{BAPTA-AM}$  实验中,脑片与 $[^3\text{H}]\text{NE}$ 保温30 min之前,先在  $\text{BAPTA-AM}$  溶液中(对照组脑片在0.5%  $\text{Me}_2\text{SO}$  中)保温2 h. 在灌流开始后60 min引入不同浓度  $\text{Li}^+$  (或  $\text{DAP}$ ) 作为刺激物以诱发  $\text{NE}$  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 $^3\text{H}$  (包括刺激开始后10份样品中的 $^3\text{H}$ 含量减去基础释放量)占脑片 $^3\text{H}$ 总含量的%表示. Fig 1中 $^3\text{H}$ 溢出用每份样品中的 $^3\text{H}$ 含量占脑片中 $^3\text{H}$ 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<sup>[8]</sup>.

## RESULTS

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

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

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

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

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

**DAP 和 PDB 对 Li<sup>+</sup> 诱发 [<sup>3</sup>H]NE 释放的影响** 在灌流 60 min 时加入 Li<sup>+</sup> 40 mmol · L<sup>-1</sup>, [<sup>3</sup>H]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<sup>-1</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 条件下, Li<sup>+</sup> 能诱发海马脑片释放 NE, 这与文献报道, Li<sup>+</sup> 抑制神经递质释放的实验结果<sup>(4)</sup> 不一致. Li<sup>+</sup> 诱发 NE 释放作用, 与电刺激, 高 K<sup>+</sup><sup>(7)</sup> 或 DAP<sup>(8)</sup> 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<sup>(9)</sup> 可加强 Li<sup>+</sup> 诱发 NE 释放. 说明 Li<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 通过什么机制诱发 NE 释放的呢? (1) Li<sup>+</sup> 诱发 NE 释放作用能被 TTX 强烈抑制, 说明 Li<sup>+</sup> 引起膜去极化, Na<sup>+</sup>-通道开放, Li<sup>+</sup> 经 Na<sup>+</sup>-通道进入胞内. 在膜去极化期间, 电压依赖性 Ca<sup>2+</sup>-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<sup>+</sup> 进入胞浆后, 是否和 Na<sup>+</sup> 一样能在线粒体表面进行 Li<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交换<sup>(10)</sup>, 使胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高而引起 NE 释放, 或者通过中断多磷酸肌醇循环<sup>(11)</sup>, 增强 Ca<sup>2+</sup> 从内网释放, 使胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 浓度不可能显著升高<sup>(12)</sup>, 用 BAPTA-AM 预处理脑片, 并不减弱 Li<sup>+</sup> 的作用, 提示内源钙释放并不参与 Li<sup>+</sup> 诱发 NE 释

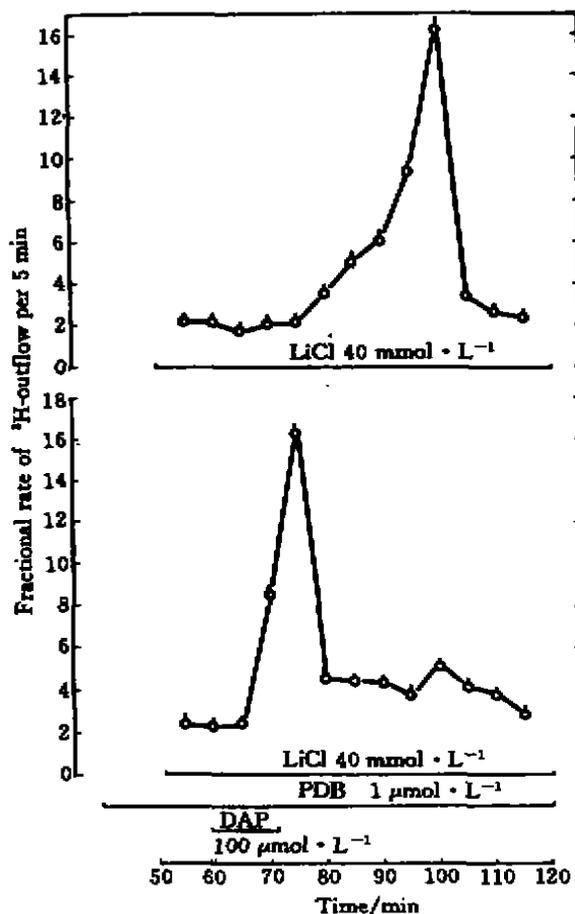


Fig 1. Effects of DAP and PDB on Li<sup>+</sup>-evoked [<sup>3</sup>H]NE release in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. Slices were preincubated with [<sup>3</sup>H]NE and superfused with Ca<sup>2+</sup>-free medium. n = 4—6, slices from 2 rats.  $\bar{x} \pm s$ .

放过程; (3) PDB 能加强 Li<sup>+</sup> 诱发 NE 释放作用, 但 Li<sup>+</sup> 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<sup>(13)</sup>, PDB 也能加强这一诱发释放. 灌流液中含有 Li<sup>+</sup> 10 mmol · L<sup>-1</sup> 时, DAP 的作用明显增强, 但 PDB 的相对加强作用反而减弱. 将 Li<sup>+</sup> 40 mmol · L<sup>-1</sup> 与 DAP 和 PDB 同时使用, 则

Li<sup>+</sup>诱发 NE 释放作用被抑制(Fig 1). 实验结果提示 Li<sup>+</sup>和 PDB 可能通过相同的机制<sup>[14]</sup>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 Schmiedeberg's 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<sup>+</sup> entry on Ca<sup>2+</sup> 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 GH<sub>3</sub> 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