

用蒿甲醚和吡喹酮早期治疗兔的血吸虫感染

R978.6
肖树华, 尤纪青, 梅静艳, 焦佩英 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海200025, 中国).

A 摘要 兔于感染血吸虫尾蚴后 d 7 或 d 21 分别开始 ig 1 次蒿甲醚(Art) 10 mg·kg⁻¹ 和吡喹酮(Pra) 40 mg·kg⁻¹, 然后每隔 1 wk ig 1 次相同

剂量的 Art 或 Pra 连给 3-4 次, 减子虫率达 98% 以上, 且部分兔无子虫, 上述兔经 Art 或 Pra 早期治疗后, 其肝脏与正常兔相仿, 或仅有轻度变化, 一些与急性血吸虫病有关的指标测定亦为阴性.

关键词 日本血吸虫; 蒿甲醚; 吡喹酮; 联合药物治疗法; 用药计划表

维拉帕米对大鼠脑突触体内 Ca²⁺ 和 Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATP 酶的影响¹

董志², 薛春生 (重庆医科大学生化药理研究室, 重庆630046, 中国)

Effect of verapamil on Ca²⁺ and Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATPase activity in rat brain synaptosomes

DONG Zhi², XUE Chun-Sheng
(Department of Biochemical Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630046, China)

ABSTRACT To elicit the correlation between the adrenergic transmitter release and calmodulin (CaM), the effect of verapamil on the free Ca²⁺ concentration was measured with fluorescence analysis and Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATPase activity in rat synaptosomes were studied.

When stimulated with high-K⁺ or norepinephrine, the concentration of free Ca²⁺ in rat synaptosome was increased by verapamil 10, 50, and 100 μmol·L⁻¹. But the free Ca²⁺ concentration in the resting synaptosome was

R965.2
reduced by verapamil. The activity of Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATPase in synaptosome was remarkably inhibited by verapamil in a dose-dependent manner. These results support our hypothesis that CaM not only acts directly on the vesicles to enhance the transmitter release, but also acts on the activity of Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATPase to reduce the free Ca²⁺ in the cytosol, and indirectly inhibited the transmitter release.

KEY WORDS calcium; Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATPase; synaptosomes; verapamil; calmodulin; potassium; brain; norepinephrine

A 摘要 维拉帕米(Ver) 10, 50和100 μmol·L⁻¹ 能增加高K⁺和去甲肾上腺素(NE)所致大鼠脑突触体内游离Ca²⁺的浓度, 但使静息状态突触体内游离Ca²⁺浓度下降. Ver还抑制突触体Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATP酶活性. 结果提示: 与静息状态不同, 在神经末梢受到刺激时, Ver可能是通过抑制CaM, 进而抑制Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATP酶活性, 使胞浆内游离Ca⁽²⁺⁾升高, 引起递质释放量增加.

Received 1992-09-22 Accepted 1994-02-22

¹ Project Supported by the National Natural Science Foundation of China, No 3880732.

² Graduate student (1991).

关键词 钙; Ca^{2+} Mg^{2+} -腺苷三磷酸酶; 突触体; 维拉帕米; 钙调素; 钾; 脑; 去甲肾上腺素

曾有报道三氟拉嗪(trifluoperazin, TFP), 地西洋(diazepam)和苯妥因(phenytoin)等钙调素(calmodulin, CaM)抑制剂能抑制突触体和囊泡释放递质, 从而认为CaM参与递质释放过程^[1,2].

维拉帕米(verapamil, Ver), TFP和diazepam等有CaM抑制作用的药物均可促进神经末梢自发和高 K^+ 诱导的递质释放, 此过程需 Ca^{2+} 需能^[3,4], 鉴于末梢内游离 Ca^{2+} 与递质释放密切相关, 且 Ca^{2+} 浓度在很大程度上受胞膜CaM依赖性 Ca^{2+} Mg^{2+} -ATP酶调节^[5], 由此推测: Ver和TFP等CaM抑制剂促进递质释放, 可能与末梢处 Ca^{2+} Mg^{2+} -ATP酶被抑制, 使胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高有关. 为此, 测定了Ver对末梢内游离 Ca^{2+} 及 Ca^{2+} Mg^{2+} -ATP酶的作用.

MATERIALS AND METHODS

突触体的制备 取体重 270 ± 16 g的Wistar大鼠72只, 每次实验用9只. 断头取脑, 尽可能去除白质, 称重. 每g组织加10 ml预冷(0-4 °C)的蔗糖($0.32 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液, 在冰浴中用内切式匀浆器将脑组织制成匀浆, 其余步骤基本同文献[6]. 离心后沉淀即为突触体. 经H 600透射电镜观察鉴定, 突触体及囊泡形态完整.

突触体内游离 Ca^{2+} 的测定 用荧光法^[7,8].

1 负荷Quin 2/AM Physiological saline solution₂ (PSS₂)组成 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 145; KCl 5; MgCl_2 2; CaCl_2 0.02; glucose 10; 丙酮酸钠0.1; NaH_2PO_4 0.1; HEPES 10, pH 7.4. PSS₁和PSS₃中的 MgCl_2 分别为1和3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 余相同. 相应的无 Ca^{2+} 液去 CaCl_2 , 加egtazic acid 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 将分离得到的突触体用PSS₁混悬, 加入以 Me_2SO 为溶媒的Quin 2/AM (acetoxymethyl ester of Quin 2/AM) 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在30 °C温育30 min, 然后用PSS₂将突触体

混悬液稀释20倍左右, 离心($1000 \times g$ 3 min). 弃去上清液后再加入PSS₃混悬, 离心去除Quin 2/AM, 以减少测定的干扰. 弃去上清液后再加入PSS₁混悬, 0-4 °C备用.

平行对照管仅加相同容量的 Me_2SO , 终浓度为0.46%, 余处理同上.

2 Ca^{2+} 的测定 取负荷Quin 2/AM的突触体悬液100 μl 加PSS₂ 2.5 ml稀释后在37 °C循环条件下放入Shimadzu RF-540 automatic fluorescent spectrophotometer的比色室平衡5 min后测定, λ_{ex} 339 nm, λ_{em} 520 nm. 游离 Ca^{2+} 浓度按下式计算:

$$\text{Ca}^{2+} (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}) = K_d \cdot (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$$

其中 K_d 为Quin 2/AM的亲和常数, 为115 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[9]. F_{max} 为加入digitonin 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 再加入 CaCl_2 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 所测得荧光值. F_{min} 为加入egtazic acid 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 MnCl_2 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 淬灭荧光后, 再以Tris base调节pH等于9时测得的荧光值.

平行对照管用以测定 F_{auto} ($F_{\text{auto}} = F_{\text{auto}} - F_{\text{min}}$). F_{auto} 包括突触体, 溶媒, 溶质和各种化合物在激发光照射下发出的荧光, 所有测定管的荧光值均减去相应平行对照管的 F_{auto} 值, 即突触体内游离 Ca^{2+} 的荧光值为 $F - F_{\text{auto}}$.

在静息状态下, 含 Ca^{2+} 液内突触体内游离 Ca^{2+} 浓度为 $262 \pm 111 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=26$), 与文献^[3]报道一致.

突触体 Ca^{2+} Mg^{2+} -ATPase的测定^[10] 将分离得到的突触体用Tris液20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 8.3)混悬, 储存于-30 °C, 1 wk内备用. 无机磷的测定按磷钼酸法^[11]进行.

膜蛋白质测定 按比色法^[12].

药品和试剂 Quin 2/AM (Sigma); ouabain (Sigma); ATP Na_2 (Boehringer, Germany); verapamil (南京中央药厂); Me_2SO (上海试剂总厂), 余均为国产AR试剂.

统计处理 结果 $\bar{x} \pm s$ 表示, paired t test处理.

RESULTS

高 K^+ 和NE对突触体内游离 Ca^{2+} 的影响

在含 Ca^{2+} 液中, KCl 20, 65和85 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 Ca^{2+} 浓度从 225 ± 81 分别增加到 420 ± 222 , 489 ± 268 和 $429 \pm 191 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; NE 1和2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 Ca^{2+} 浓度从 194 ± 82 分别增加到

249±100和337±171 nmol·L⁻¹。在无Ca²⁺含egtazic acid溶液中, NE 1和2 μmol·L⁻¹使Ca²⁺浓度从216±68分别增加到267±35和601±160 nmol·L⁻¹, 与对照组相比, 差异均有显著性(P<0.05或P<0.01)。

Ver 对高K⁺所致突触体内游离Ca²⁺浓度升高的影响 在含Ca²⁺液中, 高K⁺刺激后, Ver 10, 50和100 μmol·L⁻¹使Ca²⁺分别增加为原来的139±30%, 150±13%和208±24%, 与对照组相比, 差异非常显著(P<0.01)(Fig 1)。

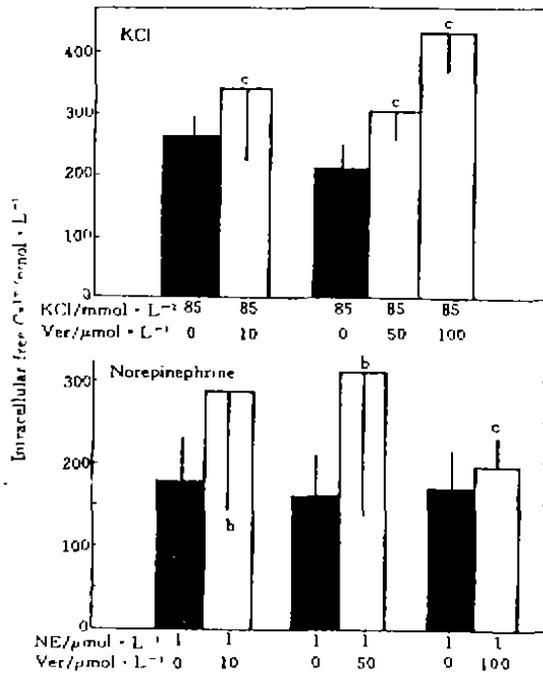


Fig 1. Effects of verapamil 10, 50, and 100 μmol·L⁻¹ on intracellular free Ca²⁺ concentrations in rat synaptosomes induced by KCl 85 mmol·L⁻¹ or norepinephrine 1 μmol·L⁻¹ in Ca²⁺-containing medium. n=8, $\bar{x} \pm s$. ^bP<0.05, ^cP<0.01 vs control.

Ver 对NE所致突触体内游离Ca²⁺浓度升高的影响 在含Ca²⁺溶液中, 以NE 1 μmol·L⁻¹刺激突触体时, Ver 10, 50和100 μmol·L⁻¹使Ca²⁺浓度分别增加到原值的169±49%, 198±84%和111±5%。与对照组相

比, 各组均有显著性差异(P<0.05或P<0.01)(Fig 1)。

Ver 对静息状态突触体内游离Ca²⁺的影响 在含Ca²⁺溶液中, Ver 10, 50和100 μmol·L⁻¹使Ca²⁺浓度由260±88分别减少至219±42, 171±66和145±31 nmol·L⁻¹, 与对照组相比, 有显著性差异(P<0.05或P<0.01)。在无Ca²⁺含egtazic acid溶液中, Ver 10, 50和100 μmol·L⁻¹使Ca²⁺浓度从204±62分别降至179±58, 163±49和148±49 nmol·L⁻¹, 与对照组比较, 后两者差异著(P<0.05)。

Ver 对突触体内ATPase的影响 Ver 10, 50和100 μmol·L⁻¹对Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATPase的抑制率分别为34.9%, 53.4%和66.3%。对Mg⁽²⁺⁾-ATPase的抑制率分别为9.1%, 11.5%和13.5%, 与对照组相比, 均有显著差异(P<0.05或P<0.01)。然而, Ver对Ca⁽²⁺⁾-ATPase则没有明显抑制作用(P<0.05)(Tab 1)。

Tab 1. Effect of verapamil on ATPase activity (nmol·min⁻¹/mg protein) in rat synaptosomes. n=10. $\bar{x} \pm s$. ^bP<0.05, ^cP<0.01 vs control.

Ver/μmol·L ⁻¹	Ca ⁽²⁺⁾ Mg ⁽²⁺⁾ -ATPase	Mg ⁽²⁺⁾ -ATPase
Control	19.8±1.2	63.6±2.1
10	13.0±0.9 ^b	57.9±1.5 ^b
50	9.2±0.4 ^c	56.3±0.7 ^b
100	6.7±0.4 ^c	55.0±0.5 ^b

DISCUSSION

本文结果证明: Ver明显增加高K⁺和NE所致突触体内游离Ca²⁺浓度的升高, 亦能抑制突触体Ca⁽²⁺⁾Mg⁽²⁺⁾-ATP酶活性, 为CaM对递质释放具有双重作用的假说^[13]提供了进一步的依据。

细胞内游离Ca²⁺浓度与递质释放密切相关, CaM在突触传递中起着重要作用。抑制

Ca⁽²⁺⁾ Mg⁽²⁺⁾-ATP 酶, 最可能致胞内游离 Ca²⁺ 增加, 使突触前膜递质释放增加^(3,4)。本文结果为此提供了进一步的依据。

结果提示: Ver 降低静息状态突触体内游离 Ca²⁺ 浓度, 这与 DeLorenzo 用其它 CaM 抑制剂使大鼠脑突触体递质释放减少相吻合, 但与本实验室观察到的 CaM 抑制剂致大鼠门静脉和尾动脉末梢递质增加^(3,4)不一致。我们认为与 DeLorenzo 结论差异的原因可能为实验标本不同。虽有人将突触体看作“完整神经末梢”, 但与门静脉和尾动脉的神经末梢是不同的。后者不断有节律地发放冲动, 不断除极和复极, 门静脉尤其明显。除极进入胞内的 Ca²⁺ 需 Ca⁽²⁺⁾ Mg⁽²⁺⁾-ATP 酶将其泵出, 才能使末梢恢复静息状态。而突触体本身不发放冲动, 可持续处于静息状态, 无除极时的 Ca²⁺ 内流, 亦无需 Ca⁽²⁺⁾ Mg⁽²⁺⁾-ATP 酶的作用即可保持低 Ca²⁺ 水平。Ver 虽不阻滞神经末梢 N 型通道, 但能抑制胞内结合 Ca²⁺ 释放, 或许是 Ver 致静息大鼠脑突触体内 Ca²⁺ 浓度降低的原因。由此推测 DeLorenzo 所以只观察到 CaM 抑制剂抑制大鼠脑突触体递质释放, 而未观察到突触体递质释放增加的原因亦在于此。但 DeLorenzo 在有的实验中亦使用了高 K⁺ 除极法, 结果也与我们不同。这个问题尚需探讨。

REFERENCES

- 1 DeLorenzo RJ, Freedmen SD, Yohe WB, Maurer SC. Stimulation of Ca²⁺-dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and a calmodulin-like protein isolated from synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 1838-42.
- 2 DeLorenzo RJ. Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc* 1982; **41**: 2265-72.
- 3 Meng XL, Xue CS. Facilitatory effect of trifluoperazine on adrenergic transmitter release from rat portal vein. *Acta Pharmacol Sin* 1988; **9**: 397-401.
- 4 Min L, Xue CS. Facilitatory effect of verapamil on adrenergic transmitter release and its relation to calmodulin. *Acta Pharmacol Sin* 1988; **9**: 530-2.
- 5 Ross DH, Cardenas HL. Calmodulin stimulation of Ca²⁺-dependent ATP hydrolysis and ATP-dependent Ca²⁺ transport in synaptic membranes. *J Neurochem* 1983; **41**: 161-71.
- 6 Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy J-P. A rapid method for preparing synaptosomes; Comparison with alternative procedures. *Brain Res* 1981; **226**: 107-18.
- 7 Nachshen DA. Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J Physiol (Lond)* 1985; **363**: 87-101.
- 8 Fisher SK, Domask LM, Roland RM. Muscarinic receptor regulation of cytoplasmic Ca²⁺ concentration in human SK-N-SH neuroblastoma cell; Ca²⁺ requirements for phospholipase C activation. *Mol Pharmacol* 1989; **35**: 195-204.
- 9 Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes; cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982; **94**: 325-34.
- 10 Gandhi CR, Ross DH. Characterization of a high-affinity Mg²⁺ independent Ca²⁺-ATPase from rat brain synaptosomal membranes. *J Neurochem* 1988; **50**: 248-56.
- 11 LeBel D, Poirier GG, Besudoin AR. A convenient method for the ATPase assay. *Anal Biochem* 1978; **85**: 86-9.
- 12 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-75.
- 13 Xue CS. Advances in research for relationship between the calmodulin and transmitter release. *Sichuan J Physiol Sci* 1988; **10** (2): 12-5.
- 14 Yamaguchi I, Matsumura F, Kadous AA. Heptachlor epoxide; Effects on calcium-mediated transmitter release from brain synaptosomes in rat. *Biochem Pharmacol* 1980; **29**: 1815-23.