

- malignant melanoma with fotemustine  
Cancer Chemother Pharmacol 1991; 29: 167-71
- 8 Buckner JC, Brown LD, Kugler JW, Cascino TL, Brook JE, Mailliard JA, *et al*. Phase II evaluation of recombinant interferon alpha and BCNU in recurrent glioma.  
J Neurosurg 1995; 82: 430-5
- 9 Kohn KW. Interstrand cross-linking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas  
Cancer Res 1977; 37: 1450-4
- 10 Kohn KW, Erickson LC, Ewig RAG, Friedman CA. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution.  
Biochemistry 1976; 15: 4629-37
- 11 Teicher BA, Holden SA, Kelley MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, *et al*. Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to *cis*-diamminedichloroplatinum (II).  
Cancer Res 1987; 47: 388-93
- 12 Erickson LC, Bradley MO, Ducore JM, Ewig RAG, Kohn KW. DNA crosslinking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with anticancer nitrosoureas.  
Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 467-71
- 13 Vistica DT. Cytotoxicity as an indicator for transport mechanism. Evidence that melphalan is transported by two leucine-preferring carrier systems in the L1210 murine leukemia cell.  
Biochim Biophys Acta 1979; 550: 309-17.

477-480

BIBLID: ISSN 0253-9756

Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报

1996 Sep; 17 (5): 477-480

## 氯代斯阔任对 D<sub>2</sub> 自身受体反馈调控作用的阻滞<sup>1</sup>

R 366

陈丽娟, 张雪翔, 郭新 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国) R 364

### Blockade of (±)12-chloroscoulerine on feed-back regulation of dopamine D<sub>2</sub> autoreceptors

CHEN Li-Juan, ZHANG Xue-Xiang, GUO Xin  
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**KEY WORDS** (±)12-chloroscoulerine; berbines; levodopa; dopamine; autoreceptors; substantia nigra; corpus striatum

**AIM:** To verify whether (±)12-chloroscoulerine (CSL) is antagonist or agonist effect to D<sub>2</sub> autoreceptors. **METHODS:** The levodopa content accumulated in the rat striatum was measured by HPLC-ECD, and the DA neuron firing activity in the substantia nigra zona compacta (SNC) was recorded. **RESULTS:** The accumulated levodopa content induced by CSL 40 mg·kg<sup>-1</sup> was much more than that of 1,4-butyro-lactone (BL) group (P < 0.01). After ip injection of apomorphine (Apo) 5 mg·kg<sup>-1</sup>, the levodopa content was decreased below that of BL group (P < 0.05). The Apo inhibition on levodopa content was

completely reversed by CSL (40 mg·kg<sup>-1</sup>, ip) and then increased the levodopa content (2.5 ± 1.1 μg·g<sup>-1</sup>) over that of Apo group (0.7 ± 0.3 μg·g<sup>-1</sup>, P < 0.01). In the electrophysiologic recording, Apo (15 μg·kg<sup>-1</sup>, iv) induced the decrease of SNC DA cell firing rate nearly to zero. At the accumulated dose of CSL up to 80 μg·kg<sup>-1</sup> (iv), the inhibition of Apo was attenuated and the firing activity was restored to predrug level. **CONCLUSION:** CSL showed an antagonistic action, an action to D<sub>2</sub> autoreceptors.

**关键词** (±)12-氯代斯阔任; 小檗碱类; 左旋多巴; 多巴胺; 自身受体; 黑质; 纹状体

**目的:** 研究氯代斯阔任[(±)12-chloroscoulerine, CSL]对 D<sub>2</sub> 自身受体是激动作用或阻滞作用。方法: 用 HPLC-ECD 检测大鼠纹状体内 levodopa 累积量, 观察对 levodopa 含量的影响; 并用电生理方法, 观察 CSL 对黑质致密区(SNC) DA 神经元放电活动的影响。结果: CSL 使纹状体内 levodopa 累积量增加, CSL 40 mg·kg<sup>-1</sup> 时, levodopa 含量(5.1 ± 1.5 μg·g<sup>-1</sup>)为 BL 组的(1.8 ± 1.1 μg·g<sup>-1</sup>) 2.8 倍(P < 0.01)。CSL 能翻转激动剂 Apomorphine (Apo)对 levodopa 含量的抑制, ip Apo 后, levodopa 含量(0.7 ± 0.3 μg·g<sup>-1</sup>)仅为

<sup>1</sup>Supported by the National Natural Science Foundation of China. No 39130091 and the State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, No K016. Received 1995-07-10 Accepted 1996-02-15

BL 组的 40%，ip Apo 后再 ip CSL 40 mg·kg<sup>-1</sup>，levodopa 含量 (2.5 ± 1.1 μg·g<sup>-1</sup>) 超过了 BL 组 (1.8 ± 1.1 μg·g<sup>-1</sup>) 水平；在 SNC 区 DA 神经元自发放电活动中，Apo (15 μg·kg<sup>-1</sup>，iv) 引起神经元放电频率下降接近零，当 CSL 累积量达 80 μg·kg<sup>-1</sup> (iv) 时，Apo 的抑制作用减弱，并放电活动恢复到基础水平。结论：CSL 对纹状体突触前 D<sub>2</sub> 自身受体和 SNC 区 DA 神经元树突上的 D<sub>2</sub> 自身受体都表现为 D<sub>2</sub> 自身受体的阻滞剂作用特性

氯代斯阔任 [(±)12-chloroscoulerine, CSL] 属于四氢原小檗碱类 (tetrahydroprotoberberines, THPB)，经放射配基受体结合分析，证明它对 D<sub>1</sub> 和 D<sub>2</sub> 受体有较高亲和力<sup>[1]</sup>。大鼠刻板活动和木僵行为试验中 CSL 表现为 DA 受体阻滞剂特性，但在 6-OHDA 损毁大鼠的旋转试验中表现出激动作用<sup>[1]</sup>。这些作用特性与 THPB 先导化合物左旋千金藤立定 [(-)stepholidine, SPD] 的作用相似<sup>[2-6]</sup>。为了探讨 CSL 对 DA 受体的作用特性，本文应用纹状体为实验材料，其 DA 神经末梢上的 DA 受体是突触前自身受体，属于 D<sub>2</sub> 受体，它对 levodopa 水平有反馈调控作用。SNC 区 DA 神经元胞体和树突上的 D<sub>2</sub> 自身受体对 DA 神经元放电活动有反馈调控作用，SNC 区是研究药物对 DA 神经元电活动较满意的部位。这二种方法也是区分 DA 受体阻滞剂和激动剂的敏感方法之一。本文观察 CSL 对 D<sub>2</sub> 受体是否有激动或部分激动作用，或是阻滞作用。

**MATERIALS AND METHODS**

药物与试剂 CSL (mp 135-8℃)，M<sub>r</sub> 为 362，为本所合成室提供，左旋多巴 (levodopa) 和 D-10-樟脑磺酸 (D-camphor-10-sulphonic acid) 为英国 BDH 公司产品，1,4-丁内脂 (1,4-butyro-lactone, BL) 为 Merck 公司产品，苄丝肼 (benserazide, Ben) 为本所实验药厂产品，去水吗啡 (apomorphine, Apo) 为沈阳市第一制药厂产品，氟哌啶醇 (haloperidol, Hal) 为上海海普制药厂产品。氯乙酸、NaOH、乙二胺四乙酸、偏重硫酸钠 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)，三羧甲基甲烷 (Tris)，Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、高氯酸 (HClO<sub>4</sub>) 均为国产 AR 级试剂。三碘季铵酚 (gallamine triethiodide) 为 Sigma 产品，溴胺天蓝 (pontamine sky blue) 系 Merck 公司产品。

大鼠纹状体 levodopa 含量测定<sup>[7]</sup> Sprague-Dawley

(SD) 大鼠，♂，体重 230 ± 22 g，中国科学院上海实验动物中心供给 (大鼠合格证号为清洁级 005，中科动管会)，ip Ben 30 min 后断头，在冰台上取出纹状体，用 HClO<sub>4</sub> 0.1 mol·L<sup>-1</sup>，以 1:10 (w/v) 匀浆，4℃，离心 10 000 × g，15 min，上清液经加热和酸化的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 吸附处理，再经 HClO<sub>4</sub> 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 提取，4℃，离心 1500 × g，5 min 后，其上清液 50 μL 作为样品，用 HPLC-ECD (Waters, 美国 Millipore 公司产品) 检测 levodopa 的含量，流动相为氯乙酸氢氧化钠缓冲液 (含氯乙酸 0.16, NaOH 0.1 mol·L<sup>-1</sup>) pH 2.8。用 t 测验检验二组平均数间差异显著性。

**黑质致密区 (SNC) DA 神经元放电活动的记录方法**

SD 大鼠，♂，体重 253 ± 30 g，乙醚麻醉，气管插管，尾静脉插管并注射三碘季铵酚 (16 mg·kg<sup>-1</sup>) 肌松，接人工呼吸机，切开头皮，定位于 SNC<sup>[8]</sup>，单管微电极 (内含 NaCl 2 mol·L<sup>-1</sup>，1% 溴胺天蓝) 从皮层向下插入 6-8 mm，记录到的细胞放电，经鉴定为 DA 细胞放电后<sup>[9]</sup>，放大 2000 倍，显示于示波器上，并经窗口甄别器，由计算机自动采样，作频率直方图。给药实验时，每次每鼠只记录一个 DA 细胞的自发放电活动。

**RESULTS**

CSL 对突触前 D<sub>2</sub> 自身受体作用的影响和对大鼠纹状体内 levodopa 累积的增强作用 第 1 组对照组，大鼠 ip 脱羧酶抑制剂苄丝肼 (Ben 400 mg·kg<sup>-1</sup>)，第 2 组 ip 丁内酯 (BL, 750 mg·kg<sup>-1</sup>)，达到抑制 DA 神经冲动的目的，5 min 后，ip Ben，Ben 和 BL 均使 levodopa 的累积量增加，第 3 组 ip Apo 5 mg·kg<sup>-1</sup>，然后 ip BL 和 Ben，观察 Apo 的抑制作用，第 4-7 组均 ip 不同剂量的 CSL 后，再 ip BL 和 Ben。各组样品经 HPLC-ECD 检测，对照组 (Ben) levodopa 为 0.8 ± 0.5 μg·g<sup>-1</sup>，BL 组的含量较 Ben 组高，为 Ben 组的 2.3 倍 (P > 0.05)。Apo 组的含量明显下降，仅为 BL 组含量的 40% (P < 0.05) 并且低于对照 Ben 组的含量。小剂量的 CSL (5 mg·kg<sup>-1</sup>) 未观察到类似 Apo 样抑制。levodopa 含量与 BL 组无显著差异 (P > 0.05)。但随着 CSL 增大剂量至 20, 40 mg·kg<sup>-1</sup> 时，其含量明显增加，分别为 BL 组的 1.7 和 2.8 倍，并且后者与 BL 组含量差异显著 (P < 0.01)。DA 受体阻滞剂 Hal (2.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 使 levodopa 含量提高，为 BL 组的 2.7 倍，有显著差异 (P < 0.01)。上述结果表明 CSL 不能使纹状体 levodopa 含量减少，而明显使纹状体内 levodopa 含量增加 (Tab 1)，它的

作用与 Hal 的作用相似, 表现为 DA 受体阻滞剂的作用特性。未见有激动剂或部分激动剂的作用 (Tab 1)。

Tab 1. CSL and Hal increased accumulated level of levodopa in rat striatum.  $n = 5 - 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^a P > 0.05$  vs Ben.  $^d P > 0.05$ ,  $^e P < 0.05$ ,  $^f P < 0.01$  vs BL.

Drug	Dose, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Levodopa, $\mu\text{g}/\text{g}$ tissue
Ben	400	$0.8 \pm 0.5$
Ben + BL	750	$1.8 \pm 1.1^a$
Ben + BL + Apo	5.0	$0.7 \pm 0.3^e$
Ben + BL + CSL	5.0	$1.2 \pm 0.6^d$
Ben + BL + CSL	10	$2.4 \pm 0.5^d$
Ben + BL + CSL	20	$3.2 \pm 2.0^f$
Ben + BL + CSL	40	$5.1 \pm 1.5^f$
Ben + BL + Hal	2.5	$4.9 \pm 1.0^f$

### CSL 翻转 Apo 抑制纹状体 levodopa 的作用

给药程序前 3 组同上述, 均先 ip Apo 5 min 后, 再 ip CSL 5, 10, 20, 40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和 Hal ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 5 min 后, 再 ip BL 及 Ben. Apo 使纹状体 levodopa 含量明显减少, 其含量仅为 BL 组的 40%, ip Apo 后再分别 ip CSL 不同剂量, CSL 5-10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  使 levodopa 呈增加的趋势 ( $P > 0.05$ ), 当 CSL 剂量增大到 20 和 40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, levodopa 含量显著增加, 完全翻转了 Apo 抑制 levodopa 水平, 并且其含量超过了 BL 组的 levodopa 水平, 翻转了 Apo 的抑制作用。这表明 CSL 有拮抗 Apo 的作用, 作用部位为突触前  $D_2$  受体, 是阻滞剂的作用特性 (Tab 2)。

Tab 2. CSL and Hal reversed the Apo-induced depression on levodopa level in rats striatum.  $n = 6 - 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^a P > 0.05$  vs Ben;  $^b P < 0.05$  vs BL;  $^c P > 0.05$ ,  $^f P < 0.01$  vs Apo.

Drug	Dose, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Levodopa, $\mu\text{g}/\text{g}$ tissue
Ben	400	$0.8 \pm 0.5$
Ben + BL	750	$1.8 \pm 1.1^a$
Ben + BL + Apo	5.0	$0.7 \pm 0.3^e$
Ben + BL + Apo + CSL	5.0	$1.3 \pm 0.7^b$
Ben + BL + Apo + CSL	10	$1.1 \pm 0.7^b$
Ben + BL + Apo + CSL	20	$1.4 \pm 0.1^f$
Ben + BL + Apo + CSL	40	$2.5 \pm 1.1^f$
Ben + BL + Apo + Hal	2.5	$2.7 \pm 1.1^f$

CSL 对黑质致密区 (SNC) DA 神经元放电活动的影响 实验时, 待 DA 细胞的自发放电活动稳定以后, 再记录 5 min, 然后尾静脉注射 Apo, DA 神经元的放电活动受到抑制。当 Apo 的累积注射剂量为  $15 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 放电频率接近零, 然后 iv 注射 CSL  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  观察到拮抗作用, 出现放电活动, 继续增加剂量, 作用增强, 当累积剂量达到  $80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 翻转了 Apo 的抑制放电作用, 使放电频率恢复到原水平 (Fig 1), CSL 拮抗激动剂 Apo 抑制放电作用, 表现为  $D_2$  受体阻滞剂的特性。

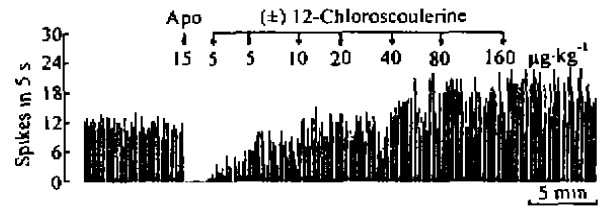


Fig 1. Reversal effects of ( $\pm$ )12-chloroscoulerine (CSL) on Apo-induced inhibition of SNC DA cell firing activity.

另一方面预先静脉注射 CSL  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 5 min 后再静脉注射 Apo, Apo 的累积剂量从原  $15 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  增大到  $128 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 2 min 后, 放电活动才降至零 (Fig 2)。

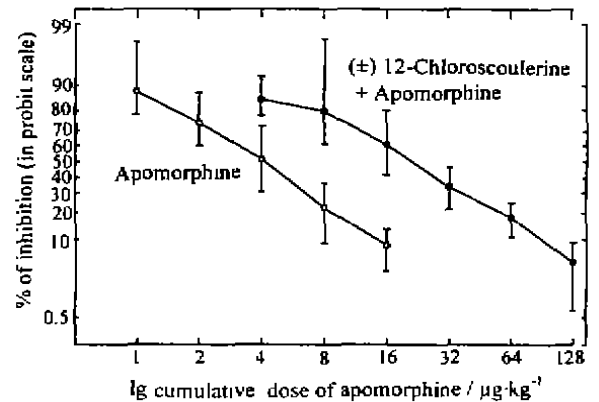


Fig 2. Pretreatment of CSL attenuated Apo-induced inhibition on SNC DA cell firing activity.

证明 CSL 削弱 Apo 抑制 DA 神经元的放电活动, 使 Apo 的量效反应曲线右移。上述结果表明 CSL 为  $D_2$  受体阻滞剂作用特性。未见有激动作用和部分激动作用特性。

## DISCUSSION

本文用 BL 抑制 DA 神经冲动传入纹状体, 排除黑质-纹状体神经环路对 levodopa 合成的可能影响, 为整体实验提供了研究突触前受体功能可靠的模型。突触前 D<sub>2</sub> 自身受体对纹状体 levodopa 生物合成有负反馈调控作用, DA 受体激动剂使 levodopa 合成减少, 而 DA 受体阻滞剂使 levodopa 合成增加, 因此, 用这种实验能鉴别激动剂和阻滞剂, 是较为满意的方法之一。注射 CSL 5-40 mg·kg<sup>-1</sup> 均未见使 levodopa 的含量减少, 而却使 levodopa 含量增加, 当 CSL 的剂量增大至 20 和 40 mg·kg<sup>-1</sup> 时, levodopa 含量明显增加。levodopa 含量超过了 BL 组的水平, 与 D<sub>2</sub> 受体阻滞剂 Hal 的作用相类似。还有, CSL 完全翻转了激动剂 Apo 对 levodopa 含量的抑制, 表明 CSL 拮抗 Apo 作用, 这是 D<sub>2</sub> 自身受体阻滞剂作用特性。这作用特性与 THPB 先导化合物 SPD 的作用相类似<sup>[7, 10]</sup>。观察药物对大鼠 SNC 区 DA 神经元放电活动的影响, 也能区分 DA 受体激动剂和阻滞剂作用, 因为 SNC 区 DA 神经元胞体树突上有 D<sub>2</sub> 自身受体, 对 DA 神经元的放电活动有负反馈调控作用, 激动剂抑制其放电活动, 而阻滞剂能翻转激动剂对放电的抑制作用<sup>[11]</sup>, 并增加 DA 神经元的放电活动。本实验结果表明 CSL 能翻转 Apo 对放电活动的抑制, 并能减弱 Apo 对 DA 神经元放电频率的抑制, 使 Apo 对放电抑制的量效曲线右移。表现为 D<sub>2</sub> 自身受体阻滞剂作用特性, 未见有部分激动剂或激动剂的作用。这些实验结果与 SPD 相似<sup>[12]</sup>, CSL 激动作用机制正在用其它方法进行研究之中。

ACKNOWLEDGMENT To Prof JIN Guo-Zhang for his guidance.

## REFERENCES

- 1 Chen LJ, Xi Y, Pang DW, Zhou QT, Jin GZ. Effect of (±)12-chloroscoulerine on brain dopamine receptors. *Acta Pharmacol Sin* 1996; **17**: 185-9.
- 2 Jin GZ. (-)Tetrahydropalmatine and its analogues as new dopamine receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1987; **8**: 81-2.
- 3 Xu SX, Yu LP, Han YR, Chen Y, Jin GZ. Effect of tetrahydroprotoberberines on dopamine receptor subtypes in brain. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 104-10.
- 4 Shi WX, Chen Y, Jin GZ. Effect of *l*-stepholidine on rotational behavior in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1984; **5**: 222-5.
- 5 Jin GZ, Wang XL, Shi WX. Tetrahydroprotoberberine — A new chemical type of antagonist of dopamine receptors. *Sci Sin (B)* 1986; **29**: 527-34.
- 6 Huang KX, Sun BC, Jun GZ. (-)Stepholidine: a dopamine receptor antagonist shows agonistic effect on rotational behavior in 6-hydroxy-dopamine-lesioned rats. *Acta Pharmacol Sin* 1992; **13**: 17-22.
- 7 Chen LJ, Guo X, Wang QM, Jin GZ. Feed-back regulation of presynaptic D<sub>2</sub> receptors blocked by *l*-stepholidine and *l*-tetrahydropalmatine. *Acta Pharmacol Sin* 1992; **13**: 442-5.
- 8 Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press, 1982: Plate 24-6.
- 9 Skirboll LR, Grace AA, Bunney BS. Dopamine auto- and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. *Science* 1979; **206**: 80-2.
- 10 Guo X, Chen LJ, Buda M, Jin GZ. Effects of *l*-stepholidine on tyrosine hydroxylase activity in rat corpus striatum. *Acta Pharmacol Sin* 1992; **13**: 289-92.
- 11 Bunney BS, Walters JR, Roth RH, Aghajanian GK. Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; **185**: 560-71.
- 12 Huang KX, Jin GZ. The antagonistic effects of tetrahydroprotoberberines on dopamine receptors: electrophysiological studies. *Sci China (B)* 1992; **35**: 688-96.

## 《中国药理学报》欢迎投稿

《中国药理学报》继续进入国际著名《科学引文索引》SCI 及 Current Contents, 并且保持引文率名列入选中国期刊前茅。继续入选国际药理学核心期刊, 成为其中唯一的中国期刊, 并首批入选美国 ISI 电子图书馆网络, 作者投稿我刊, 文献能最快地被国际同行检索, 获益最大。1996 年 5 月, 再次荣获中国科学院优秀期刊一等奖。为扩大国际交流, 更好地光大发展我国医药事业, 欢迎广大作者将优秀论文投寄我刊。