

甲基-4-乙基-6,7-二甲氧基-β-咔啉-3-羧酸盐 (DMCM) 对大鼠不同脑区离体脑片单胺递质释放的影响

杨晓敏、袁淑兰、阮金秀、罗质璞、周金黄 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提要 维持离体脑片良好的生理功能, 高 K^+ 或受试药物诱发单胺递质的释放, 高压液相色谱电化学检测器检测。反相激动剂 DMCM 显著增加海马、前叶皮层、杏仁核及脑干 NE 和 5-HT 释放, 仅增加杏仁核区 DA 释放。Ro 15-1788、蝇蕈醇和可乐定能显著拮抗 DMCM 增加单胺递质释放作用。Ro 15-1788 浓度增至 10 $\mu\text{mol/L}$ 亦可显著增加海马和杏仁核 5-HT 及海马 NE 的释放。

关键词 去甲肾上腺素; 多巴胺; 血清素; 脑; 高压液相色谱法; 甲基-4-乙基-6,7-二甲氧基-β-咔啉-3-羧酸盐(DMCM); 可乐定; 蝇蕈醇

中枢苯二氮䓬(benzodiazepines, BZD)受体反相激动剂(inverse agonist) methyl-4-ethyl-6,7-dimethoxy-β-carboline-3-carboxylate (DMCM) 具有与激动剂完全相反的药理作用⁽¹⁾, 我们以往有关行为药理学研究表明中枢去甲肾上腺素(NE)递质系统, 既参与 BZD 激动剂安定的抗惊厥⁽²⁾和抗焦虑作用⁽³⁾, 又参与反相激动剂 DMCM 的致焦虑作用(未发表资料)。为进一步阐明 NE 参与 DMCM 致焦虑作用确切机理, 本文观察 DMCM 对大鼠不同脑区离体脑片单胺递质释放的影响。

材料和方法

盐酸可乐定(clonidine hydrochloride, Clo, 常州制药厂); DMCM(Shering); Ro 15-1788 (Hoffmann-La Roche), 蝇蕈醇(muscimol)和高压液相色谱仪所用全部标准品均购自 Sigma。

Sprague-Dawley 大鼠 61 只, ♂, 体重 255 \pm SD 27 g, 由本院动物场提供。10 只一笼群养。食水不限。

标本制备 断头后 1 min 内取出全脑。于

4 $^{\circ}\text{C}$ 在垫有湿润滤纸的玻璃板上, 从全脑分离出前叶皮层(cortex)、杏仁核(amygdala)区、海马(hippocampus)和脑干(brain stem)四个脑区。称重后, 切成 0.5-1.0 mm 厚脑片, 置于 O_2 饱和的人工脑脊液, 其主要成份(mmol/L)为: KCl 5, NaCl 120, MgSO_4 1, CaCl_2 2.5, pargyline 0.1, Tris 20, 葡萄糖 10。用 HCl 调 pH 至 7.40。用高 K^+ 诱发递质释放时, 将 KCl 浓度增至 65 mmol/L, 而把 NaCl 浓度降至 55 mmol/L。冲洗后, 将脑片分别移至容量 1.2 ml, 盛有 1.0 ml 正常 K^+ 浓度人工脑脊液的微型浴槽。浴槽内维持 37 $^{\circ}\text{C}$ 。从浴槽底部通以 O_2 。平衡 15 min (P_1) 后, 抽取浴槽内全部人工脑脊液, 换入已预热的含高 K^+ 或受试药物的人工脑脊液, 再平衡 15 min (P_2), 收集溶液进行单胺递质的提取和测定。

递质的提取与测定 收集到的人工脑脊液中单胺递质的提取参照文献(4)进行, 但作如下重要修改: 1) 将盐析用 NaCl、提取用正丁醇和正庚烷分别由 4.0 g、12 和 17 ml 降至 1.0 g、3.0 和 4.0 ml; 2) 将低温高速离心改为室温(10-15 $^{\circ}\text{C}$)和低速(4000 \times g)离心; 3) 增加氯仿 1 ml 反洗, 减少杂质峰面积, 最终将样品中单胺递质洗脱于 200 μl 高氯酸(0.1 mol/L)溶液内, 每次进样 10 μl , 用高压液相色谱仪电化学检测器进行分析。

流动相主要成份为: 甲醇 8%, 八烷基磺酸钠 0.2 mol/L, EDTA 1 mmol/L, Na_2HPO_4 0.03 mol/L, 柠檬酸 0.53 mol/L。电化学检测器(ECD) (Bioanalytical System, Inc, USA)。玻璃炭电极与参比电极间电压置于 +0.7 V。

用 P_1 和 P_2 期内单胺递质释放变化的相对 % (P_2/P_1) 作指标, 观察 K^+ 浓度变化和受试药

物对单胺递质释放的影响。

各组别间的显著性用 t 检验。

结 果

在本实验条件下, NE, DA 和 5-HT 的回收率分别为 41.2 ± 2.4 、 44.2 ± 1.6 和 $48.5 \pm 1.8\%$, 与文献(4) 相比, 三者均较高。NE, DA 和 5-HT 浓度与峰下面积的相关系数分别为 0.9955 ± 0.0023 、 0.9988 ± 0.0004 和 0.9995 ± 0.0002 , 表明经改良后的本实验系统对样品中单胺递质的提取和回收无显著影响, 且被测单胺递质浓度与峰下面积具有良好的线性关系, 可根据被测物质与已知含量内标物质 DHBA 的相应面积比由微机计算被测物质的绝对含量。

如图 1 示, P_2 期人工脑脊液中 K^+ 浓度增

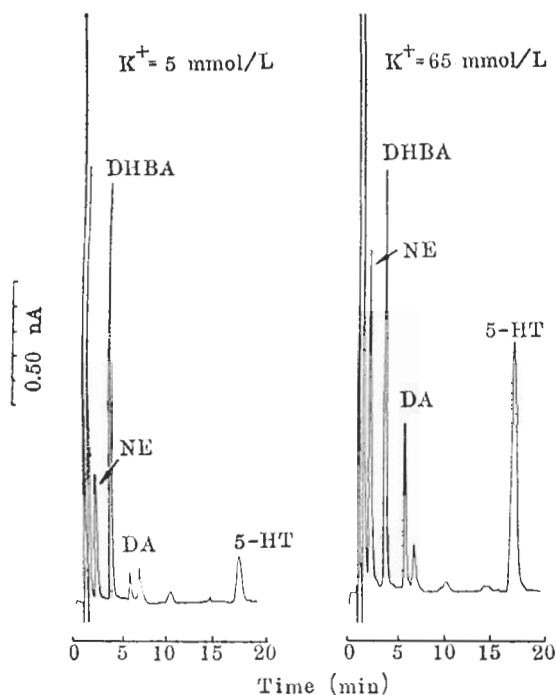


Fig 1. HPLC determination of the release of nor-epinephrine (NE), dopamine (DA) and serotonin (5-HT) from rat cerebral cortical slices caused by K^+ (65 mmol/L). Rats were decapitated and the cortexes were cut into 0.5-1.0 mm slices, which were kept physiological activities in the artificial cerebrospinal fluid (CSF).

至 65 mmol/L 时, 可诱发 NE, DA 和 5-HT 的显著释放, 表明在本实验条件下, 离体脑片保持良好的生理功能和对高 K^+ 除极化刺激的良好反应性。

DMCM 2 $\mu\text{mol/L}$ 对 4 个脑区 NE 释放无显著影响, 但增加浓度至 10 $\mu\text{mol/L}$ 则可显著增加 4 个脑区 NE 的释放, 其中对海马 NE 的释放增加较为显著, 接近高 K^+ 诱发 NE 释放的水平。DMCM 增加 4 个脑区 NE 释放的作用, 可分别为中枢 BZD 受体拮抗剂 Ro 15-1788 (5 $\mu\text{mol/L}$)、Clo (5 $\mu\text{mol/L}$) 和中枢 GABA A 型受体激动剂蝇蕈醇 (5 $\mu\text{mol/L}$) 显著拮抗, 当增加 Ro 15-1788 浓度至 10 $\mu\text{mol/L}$, 可引起海马 NE 释放的显著增加, 而对其余 3 个脑区 NE 释放无显著影响(图 2 A)。

尽管高 K^+ 可显著增加 4 个脑区 DA 的释放, 但 DMCM 的浓度由 2 $\mu\text{mol/L}$ 增加 10 $\mu\text{mol/L}$ 仅显著增加杏仁核区 DA 的释放, 而对其余 3 个脑区 DA 释放无显著影响。DMCM 对杏仁核区 DA 的释放影响, 可分别为 Ro 15-1788、Clo 和蝇蕈醇所拮抗。即使将 Ro 15-1788 浓度增至 10 $\mu\text{mol/L}$, 亦不能显著增加 4 个脑区 DA 的释放(图 2 B)。

如图 2 C 示, 当增加 DMCM 浓度至 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可显著增加 4 个脑区 5-HT 的释放。DMCM 的这一作用, 可分别为 Ro 15-1788、Clo 和蝇蕈醇所拮抗。当增加 Ro 15-1788 的浓度至 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 亦可显著增加海马和杏仁核 5-HT 的释放, 对皮层和脑干 5-HT 的释放无显著影响。

讨 论

中枢 BZD 受体激动剂和反相激动剂, 激活中枢同一受体系统却产生完全相反药理效应的机理, 是神经精神药理学研究的热点之一。有作者认为⁽⁵⁾, 受体被不同激动剂激活后发生不同的构象变化, 导致不同的药理效应。本实验观察到, 反相激动剂 DMCM 可显著增加 4 个脑区 NE 和 5-HT 释放。这一作用可被 BZD 受体特异拮

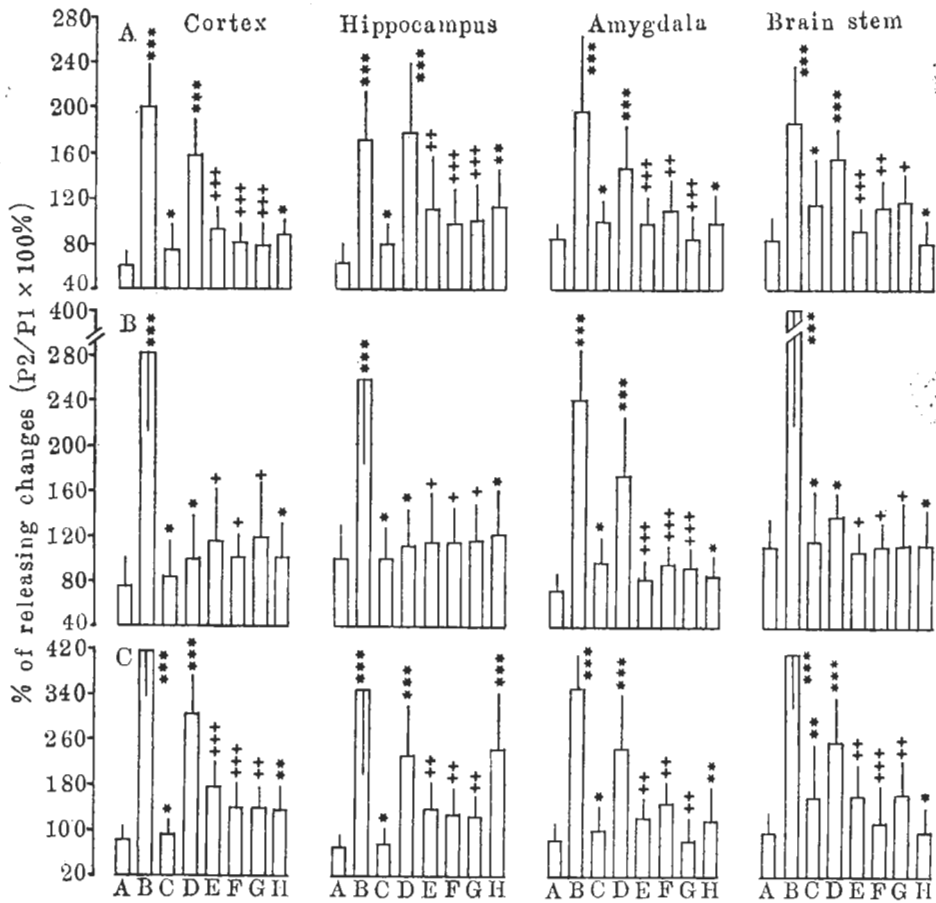


Fig 2. The stimulatory effects of methyl-4-ethyl-6,7-dimethoxy- β -carboline-3-carboxylate (DMCM) and high K^+ on the release of NE (A), DA(B) and 5-HT (C) from rat cerebral cortex, hippocampus, amygdala and brain stem. P_1 : the release of monoamine neurotransmitters in the first 15 min period, in which K^+ 5 mmol/L and the agents tested were not added to the CSF, P_2 : the release of monoamine neurotransmitters in the second 15 min period, in which K^+ was increased to 65 mmol/L or the agents tested were added to the CSF, except the control group. A) control, B) KCl 65 mmol/L, C) DMCM 2 μ mol/L, D) DMCM 10 μ mol/L, E) Ro 15-1788 5 μ mol/L + DMCM 10 μ mol/L, F) clonidine 5 μ mol/L + DMCM 10 μ mol/L, G) muscimol 5 μ mol/L + DMCM 10 μ mol/L, H) Ro 15-1788 10 μ mol/L. $n=7-10$, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs A; + $p > 0.05$, ++ $p < 0.05$, +++ $p < 0.01$ vs D.

抗剂 Ro 15-1788 所阻断, 提示 DMCM 增加 NE 和 5-HT 释放是反相激活 BZD 受体的结果。中枢 α_2 受体激动剂 Clo 亦可显著拮抗 DMCM 增加 NE 和 5-HT 释放作用, 这与我们在行为药理学实验中观察到 Clo 可拮抗 DMCM 致焦虑作用的现象相吻合。提示增强中枢 NE 和 5-HT 的功能活动, 特别是增加其释放 NE 可能是 DMCM 反相激活 BZD 受体后致焦虑作用的神

经机理之一。

中枢 BZD 受体激动剂可显著降低高 K^+ 除极化引起的 ATP 依赖性突触前 Ca^{2+} 内流, Ca^{2+} 内流减少, 可降低除极化引起的递质释放⁽⁶⁾。反相激动剂 DMCM 增加 NE 和 5-HT 释放的机理可能与激动剂相反, 即增加突触前 Ca^{2+} 内流, 致使递质释放增加。尽管本实验用较高浓度的 pargyline 抑制了单胺氧化酶的活

性,可基本排除 DMCM 影响代谢而增加浴液中递质含量,但不能排除 DMCM 增加 NE 和 5-HT 合成,而使递质释放增加的可能性。

DMCM 增加 NE 和 5-HT 释放可被 GABA A 型受体激动剂蝇蕈醇所拮抗,提示 DMCM 的这一作用可能与其降低 GABA 系统对 NE 和 5-HT 释放的抑制作用有关。

Ro 15-1788 为 BZD 受体的纯拮抗剂,不仅能拮抗激动剂的抗焦虑作用,亦可拮抗反相激动剂的致焦虑作用,但较大剂量 Ro 15-1788 亦有致焦虑作用⁽⁷⁾。本实验观察到 Ro 15-1788 5 μmol/L 显著拮抗 DMCM 增加单胺递质释放的作用,而 Ro 15-1788 10 μmol/L 亦显著增加海马部位 NE 和 5-HT 的释放,考虑到海马在情绪活动中的重要作用及投射到该部位的 NE 和 5-HT 为调节情绪活动最受关注的递质系统,本实验的这一结果提示,增加海马区 NE 和 5-HT 释放,可能是 Ro 15-1788 致焦虑作用的机理之一。

参 考 文 献

1 Stephens DN, Kehr W, Schneider HH,

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jul; 9 (4) : 304-307

Effects of methyl-4-ethyl-6,7-dimethoxy-β-carboline-3-carboxylate on the release of monoamine neurotransmitters from rat brain slices

YANG Xiao-Min, YUAN Shu-Lan, RUAN Jin-Xiu, LUO Zhi-Pu, ZHOU Jin-Huang

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT HPLC with electro-chemical detection was employed to analyse the release of monoamine neurotransmitters from rat brain slice preparations. An inverse benzodiazepine receptor agonist, methyl-4-ethyl-6,7-dimethoxy-β-carboline-3-carboxylate (DMCM, 10 μmol/L), significantly increased the release of norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) from the frontal cortex, hippocampus, amygdala and brain stem. However, it only increased the release of dopamine from the amygdala. These effects of DMCM were reversed by Ro 15-1788 (5 μmol/L), clonidine (5 μmol/L) and musci-

Schmiechen R. β-Carbolines with agonistic and inverse agonistic properties at benzodiazepinereceptors of the rat. *Neurosci Lett* 1984; 47 : 333

2 杨晓敏、罗质璞. 可乐定加强苯二氮革类药物抗戊四氮惊厥作用. *中国药理学与毒理学杂志* 1987; 1 : 231

3 杨晓敏、罗质璞、周金黄. 在大鼠群居焦虑模型上可乐定加强安定的抗焦虑作用. *中国药理学报* 1988; 9 : 104

4 Sasa S, Blank CL. Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine and serotonin in brain tissue by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Chim Acta* 1979; 104 : 29

5 Pole P, Bonetti EP, Schaffner R, Haefely W. A three-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilizers, β-carbolines, and phenobarbitone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1982; 321 : 260

6 Leslie SW, Friedman MB, Coleman RR. Effects of chlordiazepoxide on depolarization-induced calcium influx into synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 1980; 29 : 2439

7 File SE, Pellow S. Intrinsic actions of benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacology* 1986; 88 : 1

cimol (5 μmol/L). A higher concentration of Ro 15-1788 (10 μmol/L), a putative benzodiazepine receptor antagonist, also significantly increased the release of NE from the hippocampus and 5-HT from the amygdala and hippocampus. Our results suggest that both central NE and 5-HT systems may be involved in the anxiogenic action of DMCM.

KEY WORDS norepinephrine; dopamine; serotonin; brain; high pressure liquid chromatography; methyl-4-ethyl-6,7-dimethoxy-β-carboline-3-carboxylate; clonidine; muscimol