

三氟拉嗪对大鼠门静脉中肾上腺素递质释放的促进作用¹

孟宪丽²、薛春生 (重庆医科大学药理教研室, 重庆 630046)

提要 三氟拉嗪 (TFP) 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时显著促进递质的自发释放和高钾所致释放。此作用不为可卡因所拮抗, 但 Mn^{2+} , 2,4-二硝基酚和 TTX 则明显抑制之。在无钙 + EGTA 浴液中此作用完全消失。TFP 对钙调素活性有剂量依赖性抑制作用。钙调素依赖性激酶系统抑制剂安定也有促递质释放作用。结果提示, TFP

的促递质释放作用为一需钙、需能过程, 并与其钙调素抑制作用有关。

关键词 三氟拉嗪; 钙调素; 钙通道阻滞剂; 安定; 河豚毒素; 可卡因; 2,4-二硝基酚; 锰; 神经传递; 门静脉

1987年10月19日收稿 1988年4月14日接受

¹国家自然科学基金资助项目 No 85590

²研究生

神经末梢释放递质需要 Ca^{2+} 。目前认为 Ca^{2+} 进入神经末梢后, 与钙调素 (calmodulin,

CaM)形成复合物,并激活蛋白激酶系统,引起蛋白磷酸化等一系列过程而使递质释放。CaM抑制剂三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)与Ca²⁺/CaM激酶系统抑制剂安定和苯妥英都能抑制高K⁺和Ca²⁺透入剂卡西霉素(calcimycin, A 23187)所致递质释放⁽¹⁾。

但薛春生于1983年发现TFP 100 μmol/L明显促进递质释放(未发表资料)。其它CaM抑制剂W-7等,以及钙通道阻滞剂维拉帕米等也有促进递质释放作用⁽²⁾。

考虑到CaM抑制剂和钙通道阻滞剂都有促进递质释放作用,TFP也有抑制Ca²⁺内流的作用⁽³⁾,本文从TFP对CaM活性和Ca²⁺-依赖性两方面的作用探讨了其促进递质释放作用的机理。

材料与 方法

组织制备 10 wk龄♂ Sprague-Dawley大鼠,体重180-210 g,断头处死,取门静脉,置于2 ml Krebs-Henseleit(K-H)缓冲液⁽⁴⁾中,通以95%O₂+5%CO₂,37℃保温30 min。高K⁺溶液是用KCl 65 mmol/L代替等摩尔数NaCl。无钙溶液是去除K-H液中CaCl₂的同时,加入EGTA 1 mmol/L。平衡30 min后,将门脉移至含1-[³H]7,8-去甲肾上腺素([³H]NE)185 kBq/mmol的缓冲液中再保温30 min,使之预标记。

灌流和保温

1. 持续灌流法 基本同文献⁽⁴⁾。将预标记的门静脉悬吊于两个环形铂电极之间,此二电极相距1 cm。门静脉一端系于固定钩上,另一端与换能器相联。血管的基础张力约为500 mg。电极置于特制的保温室内,用37℃温水回流保温。

门静脉用K-H缓冲液灌流,流速为2 ml/min。缓冲液中加入可卡因3.3 μmol和氢可的松20 μmol以分别阻断神经末梢和神经外组织对NE的再摄取。

门静脉标本用K-H缓冲液冲洗15 min后,

给予预刺激(2 Hz, 300脉冲,波宽1 ms,超电压),以去除细胞外和神经外的放射性。再冲洗45 min。然后用含药K-H缓冲液灌流。灌流液用部分收集器连续收集,每3 min一管,每次给药收集5管。间隔15 min给药一次。以给药前一管的放射性计数为自发释放或基础释放量(basal release)。

2. 试管内保温法 参照文献⁽⁵⁾略加修改。门静脉标本悬吊于通气钩上,置于上述特制保温室内冲洗75 min。然后将门静脉迅速移置含5 ml K-H缓冲液的试管中,每管反应时间为5 min。以加药前一管作为递质自发释放标准。其后则按试验要求改用含药缓冲液或高K⁺缓冲液保温。全过程持续通以95%O₂+5%CO₂混合气,37℃水浴保温。在试验药物对TFP或高K⁺所致释放的影响时,先与所试药物一起保温5-10 min,然后再移至含该药和TFP的K-H缓冲液或高K⁺液管中反应5 min。若继续试验时,则将标本置于K-H缓冲液中至少保温15 min以使之恢复。

放射活性测定 收集灌流液前、后收集管均称重,以计算3 min内实际收集的灌流液量。保温管每管加缓冲液5 ml。由收集管或保温管中各取标本1 ml,加7 ml Triton 闪烁液(甲苯和Triton X-100(2:1)混合液中加PPO 5.5 g和POPOP 150 mg),用Beckman LS-1801型液闪计数器测得cpm和H数,再换算成dpm。组织中的放射活性系于实验结束时,将门静脉用34% H₂O₂ 0.2 ml、85%甲酸0.2 ml和辛醇1滴,加热至70-80℃,使之消化后再加7 ml 闪烁液进行液闪测定。计数效率30-50%。^{[3}H]NE释放量以%组分释放量(fractional release)表示,即由释入灌流液中的³H量除以当时组织中总³H量,乘以100而得。或以%基础释放量表示,即以基础释放量为100%,其它各加药管与之比较而得。

CaM活性测定 采用PDE法⁽⁶⁾。

药物 [³H]NE (1.37 TBq/mmol, Amer-sham), 盐酸三氟拉嗪(Sigma), 安定(湖北制

药厂), 河豚毒素(河北省水产研究所), 2,4-二硝基酚(北京化学试剂研究所), CaM 测定药盒(中国医学科学院基础所药理室), Triton X-100 (E Merck).

统计处理 所有资料均按配对 *t* 检验法统计显著性。

结 果

TFP 对 $[^3\text{H}]$ NE 自发释放和高 K^+ 所致释放的作用 采用连续灌流法试验, TFP 1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 对 $[^3\text{H}]$ NE 自发释放无明显影响, 100 $\mu\text{mol/L}$ 使 $[^3\text{H}]$ NE 自发释放量增加 3.9 倍($p < 0.01$).

用试管保温法试验, 在高 K^+ (65 mmol/L) 缓冲液中, $[^3\text{H}]$ NE 的释放量比自发释放增加 5.07 倍, TFP 与高 K^+ 同时作用时, 则使 $[^3\text{H}]$ NE 的释放量比自发释放增加 7.47 倍, 与高 K^+ 所致释放相比有显著差异($p < 0.05$) (图 1).

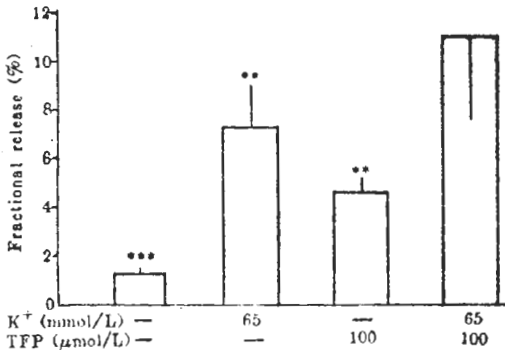


Fig 1. Effect of trifluoperazine (TFP) on the high K^+ -induced $[^3\text{H}]$ NE release from rat portal vein. $n = 4$ veins, $\bar{x} \pm \text{SD}$. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs high K^+ + TFP.

结果表明, TFP 对 $[^3\text{H}]$ NE 自发释放和去极化型释放都有促进作用。根据以上结果, 以下试验所用 TFP 均取 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度。

可卡因对 TFP 和酪胺所致 $[^3\text{H}]$ NE 释放的作用 酪胺 10 $\mu\text{mol/L}$ 使 $[^3\text{H}]$ NE 的释放量约增加 1 倍。可卡因 20 $\mu\text{mol/L}$ 能显著对抗酪胺的促释放作用, 但对 TFP 的促释放作用则无明显影响(图 2 A)。

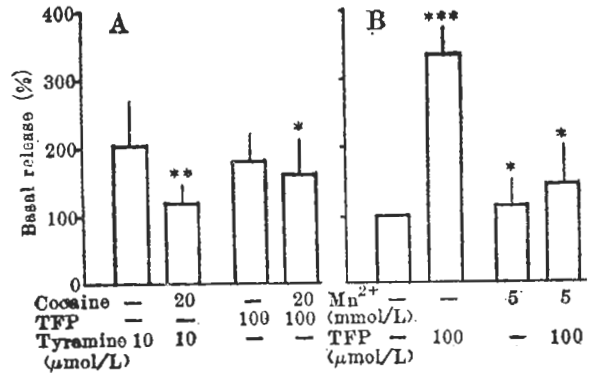


Fig 2. A) Effect of cocaine on the TFP and tyramine induced $[^3\text{H}]$ NE release within 5 min. $n = 4$ veins, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$ vs TFP alone, ** $p < 0.05$ vs tyramine alone. B) Effect of Mn^{2+} , a Ca^{2+} channel blocker, on the TFP induced $[^3\text{H}]$ NE release from rat portal vein. $n = 7$ veins, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$ vs basal release, *** $p < 0.01$ vs Mn^{2+} + TFP.

无钙 + EGTA 溶液中 TFP 的促 $[^3\text{H}]$ NE 释放作用 门静脉在无钙 + EGTA 溶液中保温 10 min 后, 移至加 TFP 的无钙 + EGTA 溶液管中, TFP 的促释放作用完全消失。说明 TFP 的促递质释放作用为一需 Ca^{2+} 过程。

Mn^{2+} 对 TFP 促 $[^3\text{H}]$ NE 释放作用的影响 Mn^{2+} 为离子型钙通道阻滞剂, 其阻滞作用甚至不被 Ca^{2+} 透入剂 A 23187 所逆转。由于 MnCl_2 与 HCO_3^- 形成沉淀, 因此不能用 K-H 缓冲液配制, 改用下述配方(按 mmol/L 计): NaCl 135; KCl 5; $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1; CaCl_2 1; Sodium phosphate 1; Glucose 10; Tris-HCl 1; pH 7.4。以此缓冲液配成 5 mmol/L 的 Mn^{2+} 溶液进行试验。结果 TFP 的促 $[^3\text{H}]$ NE 释放作用几乎被完全抑制(图 2 B)。进一步说明 TFP 促递质释放作用对 Ca^{2+} 的依赖性。

2,4-二硝基酚对 TFP 促 $[^3\text{H}]$ NE 释放作用的影响 2,4-二硝基酚为一线粒体能量代谢抑制剂。在 6.6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 它本身对 $[^3\text{H}]$ NE 自发释放无影响, 但能显著抑制 TFP 的促释放作用, 使 TFP 的促释放作用降低 57% ($p < 0.05$), 说明 TFP 的促释放作用为一需能过程。

河豚毒素对 TFP 促 $[^3\text{H}]$ NE 释放的影响

为了观察 Na^+ 在 TFP 促递质释放中的作用, 采用钠通道阻滞剂河豚毒(tetrodotoxin, TTX)进行试验. 结果表明, TTX $3 \mu\text{mol/L}$ 能部分抑制 TFP 的促释放作用, 使其% 组分释放量降低 48% ($p < 0.01$), 但却能完全抑制高 K^+ 所致释放. 提示 TFP 的促释放作用与钠通道亦有一定关系.

TFP 对 CaM 活性的抑制作用 TFP 为一已知 CaM 制剂. 所用 CaM 的浓度为 20 ng/ml , 此浓度在 Ca^{2+} 存在的条件下能 100% 激活磷酸二酯酶(PDE). TFP 在 $80 \mu\text{mol/L}$ 时能完全抑制 CaM 的活性. 此浓度与其促递质释放作用的有效浓度($100 \mu\text{mol/L}$)相近. 提示 TFP 的促递质释放作用与其对 CaM 活性的深度抑制有关.

安定对 [^3H]NE 释放的作用 安定为一 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 激酶系统抑制剂⁽¹⁾. 如果 TFP 的促递质释放作用确系通过对 CaM 的活性抑制所致, 则安定也应有与 TFP 相同的促递质释放作用. 安定置于 K-H 缓冲液中持续振荡 4-6 h 使之溶解, 新鲜配制. 用不同浓度的安定溶液持续灌流. 结果表明, 1 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度时对 [^3H]NE 自发释放无明显影响, $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度时则使 [^3H]NE 自发释放量增加 2.4 倍 ($p < 0.01$).

讨 论

本文结果进一步证明, TFP 对递质自发释放和高 K^+ 所致释放都有明显促进作用.

TFP 的促释放作用机理与酪胺不同, 不为可卡因所抑制. 可卡因也不增强 TFP 的促释放作用, 可见此作用亦与神经末梢对递质的再摄取无关. 在无钙 + EGTA 溶液中, 或用含 Mn^{2+} 缓冲液处理后, TFP 的促 [^3H]NE 释放作用完全消失. 说明此作用为一需钙过程, 而不是由于阻滞钙通道所致. 此点与 Karaki 等⁽²⁾ 所得结果不同, 而与 Jinnai 等⁽⁷⁾ 用膈神经-膈肌标本所得结果一致. 如果 TFP 的促释放作用系抑制 CaM 活性所致, 则应为需钙过程. 因为只有当 CaM 和 Ca^{2+} 形成复合物并发生构象变化

而露出疏水区时, TFP 才能与之结合并抑制之⁽⁸⁾.

TTX 能部分拮抗 TFP 促 [^3H]NE 释放的作用, 提示 TFP 的作用与神经膜去极化有一定关系. 但与对高 K^+ 所致释放不同, TTX 能完全消除高 K^+ 所致释放. 2,4-二硝基酚也能拮抗 TFP 的作用, 说明此作用为一需能过程. 由此可排除利血平样作用的可能性. 后者抑制囊泡上的胺泵而起作用, 毋需钙和能量供应. 同理也可排除 TFP 的促释放作用系由于对囊泡的损害而使递质“漏出”所致.

在排除上述可能性后, 我们认为 TFP 促递质释放最可能的机理为抑制 CaM 的活性. 因为: 1) TFP 为一已知特异性 CaM 抑制剂. 其它 CaM 抑制剂 W-7 和 TI 233 也有同样作用⁽²⁾. 2) 安定作为 CaM 激酶系统抑制剂也有促递质释放作用. 3) TFP 须在有 Ca^{2+} 条件下才能发挥促释放作用, 这与 TFP 只与 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合物结合, 而不与 CaM 直接结合这一特点是相符的. 4) 多种钙通道阻滞剂能与 CaM 结合并抑制其活性, 也都有促递质释放作用. 本实验室证明, 维拉帕米的促递质释放作用特点与 TFP 一致, 而与钙通道阻滞作用无关⁽⁹⁾.

本文结果与 DeLorenzo 等结果⁽¹⁾ 是相反的. 但我们无意否定 CaM 参与递质释放过程的学说, 只是在本文实验条件下发现并证明 TFP 和安定能通过抑制 CaM 的活性而促进递质释放, 由此揭示出 CaM 控制递质释放的一面, 并认为这在调节和控制递质释放量上具有普遍的生物学意义.

致谢 中国医学科学院基础所刘景生副研究员提供钙调素测定药盒并给予技术指导.

参 考 文 献

- 1 DeLorenzo RJ. Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc* 1982; 41 : 2265
- 2 Karaki H, Nakagawa H, Urakawa N. Effects of calcium antagonists on release of [^3H]noradrenaline in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol*

- 1984; 101 : 177
- 3 Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev* 1986; 38 : 321
 - 4 Meldrum MJ, Xue C-S, Badino H, Westfall TC. Effect of sodium depletion on the release of [³H] norepinephrine from central and peripheral tissue of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 : 59
 - 5 Ceña V, García AG, Khoyi MA, Salaiques M, Sanchez-García P. Effect of the dihydropyridine Bay K 8644 on the release of [³H] noradrenaline from the rat isolated vas deferens. *Br J Pharmacol* 1985; 85 : 691
 - 6 刘景生、刘 晔、金荫昌. 钙调蛋白的制备及活性测定. *中国医学科学院学报* 1985; 7 : 453
 - 7 Jinnai K, Takahashi K, Fujita T. Enhancement of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminal by calmodulin inhibitors. *Eur J Pharmacol* 1986; 130 : 197
 - 8 Cox JA. Calcium-calmodulin interaction and cellular function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8 : S 48
 - 10 闵 乐、薛春生. 维拉帕米促递质释放作用及其与钙调素的关系. *中国药理学报* 1988; 9 (6) : 待发

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Sep; 9 (5) : 397-401

Facilitatory effect of trifluoperazine on adrenergic transmitter release from rat portal vein¹

MENG Xian-Li², XUE Chun-Sheng

(Department of Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630046)

ABSTRACT To determine the relationship between calmodulin (CaM) and transmitter release, the effects of trifluoperazine (TFP) on adrenergic transmission in rat portal vein preparations prelabelled with [³H]norepinephrine ([³H]NE) were studied. It was found that the CaM inhibitor TFP, at a concentration of 100 μmol/L, significantly facilitated both the spontaneous and high-K⁺ (65 mmol/L) evoked release of [³H] NE. Diazepam, a Ca²⁺/CaM-dependent kinase system inhibitor, exhibited the same actions as TFP.

The facilitatory effect of TFP on [³H] NE release was abolished in Ca²⁺-free, EGTA-containing buffer, and attenuated by MnCl₂ 5 mmol/L and tetrodotoxin (TTX) 3 μmol/L. 2,4-Dinitrophenol, an ATP production inhibitor, had no effect on [³H]NE release when administered alone, but it did inhibit the TFP-evoked [³H]NE release. The facilitatory effect of TFP was not inhibited by cocaine, while that of tyramine was.

TFP inhibited CaM activity in a dose-dependent manner, and complete inhibition was observed at 80 μmol/L, a concentration needs by [³H]NE release facilitatory effect.

The pharmacological mechanism of the facilitatory effect of TFP is thought to be the result from its specific inhibition of CaM, without any involvement of the Ca²⁺ channel blocking effect. Consequently, it is suggested that CaM plays an important role not only in producing exocytosis as demonstrated by DeLorenzo and others, but also in controlling transmitter release. This action is Ca²⁺ and energy dependent process.

KEY WORDS trifluoperazine; calmodulin; calcium channel blockers; diazepam; tetrodotoxin; cocaine; 2,4-dinitrophenol; manganese; neural transmission; portal vein

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 85590

² Graduate student