

维拉帕米促肾上腺素能递质释放及其与钙调素的关系¹闵乐²、薛春生 (重庆医科大学药理教研室, 重庆 630046)

提要 维拉帕米(Ver) 100 μmol/L时, [³H]NE的自发释放和高K⁺所致释放分别增加1.36倍和0.69倍。Mn²⁺、无Ca²⁺缓冲液和2,4-二硝基酚能消除或抑制其促释放作用, A-23187不能对抗此作用。说明Ver的促递质释放作用为一需钙、需能过程, 而非阻滞神经末梢处钙通道的结果。鉴于Ver有明显的钙调素(CaM)抑制作用, 由此认为Ver促递质释放作用的机理亦为抑制CaM活性。

关键词 维拉帕米; 神经调节物; 钙通道阻滞剂; 钙调素; 卡西霉素(A-23187); 锰; 二硝基酚; 河豚毒素

Ca²⁺与神经末梢递质释放的调节密切相关。钙通道阻滞剂维拉帕米(verapamil, Ver)等有抑制递质释放的作用^(1,2)。也有报道认为对递质释放无影响^(3,4)。

近来发现Ver等促进刺激所致的递质释放⁽⁵⁻⁷⁾。作者还发现钙通道阻滞剂粉防己碱和钩藤碱也有促递质释放作用⁽⁸⁾。关于钙通道阻滞剂促递质释放作用的机理则了解甚少。

钙通道阻滞剂有抑制钙调素(calmodulin, CaM)的作用⁽⁹⁾。而CaM抑制剂有促进肾上腺素能递质释放的作用^(6,10)。因此, 在研究三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)的同时, 我们对Ver的促释放作用机理进行了对比研究, 以互相印证。

材料与方 法

材料与方 法均同前文⁽¹⁰⁾。惟所用标本为大鼠腹侧尾动脉。将全段尾动脉取下后, 折成三叠, 结扎悬吊于环形铂电极或通气钩上, 进行灌流或保温。

灌流液(或保温液)中和组织中的放射活性测定方 法以及统计方 法处理, 亦均同前文⁽¹⁰⁾。

试剂 卡西霉素(calcimycin, A-23187)

购自Sigma。维拉帕米购自天津中央药厂。其它同前文⁽¹⁰⁾。

结 果

Ver对[³H]NE自发释放和高K⁺所致释放的作用 Ver 10 μmol/L使[³H]NE自发释放增加7%(p<0.01), 100 μmol/L时则增加136%(p<0.01), 此浓度使高K⁺所致释放比单纯高K⁺时增加69%(p<0.01)。因此以下试验所用Ver的浓度均为100 μmol/L。

无Ca²⁺+EGTA缓冲液中Ver对[³H]NE自发释放的作用 用无Ca²⁺+EGTA缓冲液预处理10 min后, 再移入以无Ca²⁺+EGTA缓冲液配制的Ver溶液(100 μmol/L)中, Ver的促[³H]NE释放作用消失。

Mn²⁺对Ver促[³H]NE释放作用的影响 MnCl₂加入K-H缓冲液中出现絮状沉淀。因此参考文献中的缓冲液配方配制, 其组成详

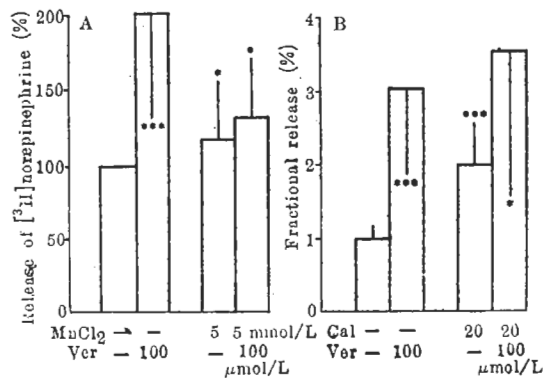


Fig 1. Effects of Mn²⁺ and calcimycin (Cal) on [³H]NE release from rat tail artery evoked by verapamil (Ver). A) Mn²⁺, n=7 arteries. *p>0.05, ***p<0.01 vs basal release. B) Cal, n=4 arteries. *p>0.05 vs Ver 100 μmol/L, ***p<0.01 vs control. $\bar{x} \pm SD$

1987年10月19日收稿 1988年5月28日接受

¹ 国家自然科学基金资助项目 No 85590

² 研究生

见前文⁽¹⁰⁾。MnCl₂ 5 mmol/L 本身对 [³H]NE 自发释放无明显影响, 但却使 Ver 所致释放降低 32%(图 1 A)。

A-23187 对 Ver 促 [³H]NE 释放作用的影响 A-23187 可拮抗钙通道阻滞剂对钙通道的阻断作用, 使细胞内 Ca²⁺ 浓度升高⁽¹³⁾。A-23187 20 μmol/L 单用时有促 [³H]NE 释放作用 (p<0.01), 但不能拮抗 Ver 的促 [³H]NE 释放作用(图 1 B)。

2,4-二硝基酚对 Ver 促 [³H]NE 释放作用的影响 2,4-二硝基酚本身对 [³H]NE 自发释放未见有影响, 但使 Ver 的促 [³H]NE 释放作用降低 59%(p<0.01)。

河豚毒对 Ver 促 [³H]NE 释放作用的影响 河豚毒 3 μmol/L 未见对 [³H]NE 自发释放有明显影响, 但使 Ver 的促 [³H]NE 释放作用降低 42%(p<0.01)。

Ver 对 CaM 活性的抑制作用 Ver 对 CaM 的活性呈浓度依赖性抑制作用, 100 μmol/L 时抑制率约为 60%(图 2)。

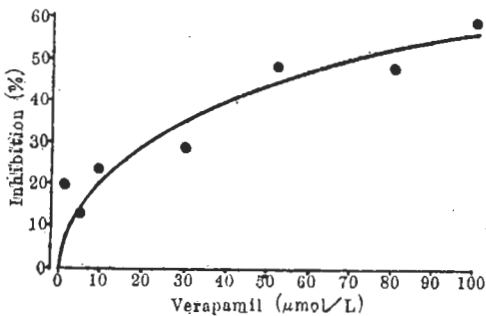


Fig 2. Inhibition of calmodulin activity by verapamil.

讨 论

本文证明, Ver 10-100 μmol/L 对递质自发释放和高 K⁺ 所致释放均有显著促进作用, 与文献(5-7)结果相符。关于钙通道阻滞剂促递质释放作用的机理, 有人认为与细胞外 Ca²⁺、神经末梢对 NE 的再摄取及 α₂ 受体无关, 亦有推测可能系利血平样作用^(6,7)。

在无 Ca²⁺ + EGTA 溶液中, 或用 Mn²⁺ 处

理后, Ver 的促释放作用消失或降低。A-23187 能拮抗 Ver 的钙通道阻滞作用⁽¹¹⁾, 但不能对抗 Ver 的促 [³H]NE 释放作用。本文上述结果说明 Ver 的促释放作用为一需钙过程, 而与其钙通道阻滞作用无关。现已证明, 钙通道可分为 T, N 和 L 3 个亚型⁽¹²⁾。神经末梢处主要为 N 亚型, 而目前所知有些钙通道阻滞剂只能阻滞 L 亚型。因此, Ver 不能通过阻滞神经膜上的钙通道而起作用是合乎逻辑的。

2,4-二硝基酚和河豚毒抑制 Ver 的促释放作用, 提示此作用为一需能过程, 且与 Na⁺ 内流有一定关系。Ver 的作用与酪胺不同, 与 α₂ 受体无关⁽⁷⁾。亦不可能为利血平样作用。

本文结果表明, Ver 促递质释放作用的特点与 TFP 完全一致。本文还证明 Ver 亦抑制 CaM 活性。钙通道阻滞剂抑制 CaM 活性比其阻滞钙通道所需剂量为大⁽⁹⁾, 本文结果亦与之相符。再联系到其它 CaM 抑制剂也有促递质释放作用^(6,8,10), 因此我们认为 Ver 促递质释放作用的机理仍然在于抑制 CaM 活性。

本文为 CaM 在神经末梢处参与递质的释放, 同时又抑制递质释放的双向作用的观点提供了进一步的依据。这是一种“钙信号终止钙信号”的实例, 对于调节递质释放量, 以及维持神经功能的稳定性和灵活性具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Gothert M, Nawroth P, Neumeyer H. Inhibition effects of verapamil, prenylamine and D600 on Ca²⁺-dependent noradrenaline release from the sympathetic nerves of isolated rabbit hearts. *Naunyn Schmiedeberges Arch Pharmacol* 1979; 310 : 11
- 2 Zelis R, Wichmann T, Starke K. Inhibition of vascular noradrenaline release by diltiazem. *Circulation* 1982; 66 : II-139
- 3 Miller RJ, Freedman SB. Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels? *Life Sci* 1984; 34 : 1205
- 4 Nachshen DA, Blaustein MP. The effects of some "calcium antagonists" on calcium influx in presynaptic nerve terminals. *Mol Pharmacol* 1979; 16 : 579

- 5 Steinsland OS, Berkowitz CJ, Schriabine A. Effect of nitrendipine (N) and verapamil (V) on adrenergic neurotransmission in rabbit ear artery. *Pharmacologist* 1981; 23 : 198
- 6 Karaki H, Nakagawa H, Urakawa N. Effects of calcium antagonists on release of [³H] noradrenaline in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 1984; 101 : 177
- 7 Chaudhry A, Vohra MM. Mechanism and metabolic disposition of verapamil-evoked overflow of radioactivity from isolated atria preloaded with [³H]norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 231 : 850
- 8 周岐新、张渝娟、高丽佳、薛春生。粉防己碱和钩藤碱的促进质释放作用和钙调蛋白活性抑制作用。 *中药药理与临床* 1987; 3(3) : 53
- 9 Johnson JD, Fugman DA. Calcium and calmodulin antagonists binding to calmodulin and relaxation of coronary segments. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 226 : 330
- 10 孟宪丽、薛春生。三氟拉嗪对大鼠门脉中肾上腺素能递质释放的促进作用。 *中国药理学报* 1988; 9 : 398
- 11 Ishida Y, Shibata S. Characteristic contractile response to the calcium ionophore, A23187, in guinea-pig vas deferens. *Br J Pharmacol* 1980; 71 : 581
- 12 Spedding M. Three types of Ca²⁺ channel explain discrepancies. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8 : 115

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Nov; 9 (6) : 530-532

Facilitatory effect of verapamil on adrenergic transmitter release and its relation to calmodulin¹

MIN Le², XUE Chun-Sheng

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

ABSTRACT The mechanisms of verapamil (Ver) enhanced transmitter release from rat tail artery prelabelled with [³H]NE were studied. It was found that Ver (10-100 μmol/L) increased both the spontaneous and high-K⁺ (65 mmol/L) induced [³H]NE release.

After pretreating with Mn²⁺ or a Ca²⁺-free, EGTA-containing solution, the facilitatory effects of Ver on [³H]NE release were either diminished or abolished. 2,4-Dinitrophenol, an ATP production inhibitor, had no effect on [³H]NE spontaneous release when administered alone, but it did inhibit Ver-evoked [³H]NE release. Calcimycin (A-23187), a calcium ionophore, was unable to antagonize the [³H]NE release caused by Ver. These results indicate that the facilitatory effect of Ver on the [³H]NE release requires an energy supply and Ca²⁺ influx, which is not caused by blocking Ca²⁺ channels.

The facilitatory effect of Ver on

[³H]NE release was reduced by 42% by tetrodotoxin, a sodium channel blocker. This implies that depolarization may be involved.

Ver inhibited calmodulin activity in a dose-dependent manner, with 100 μmol/L Ver significantly inhibiting calmodulin activity at a rate of 60%. It is possible that the effect of Ver on [³H]NE release is a result of the inhibition of calmodulin activity, similar to the effect of trifluoperazine on transmitter release. The data provides further evidence to support the hypothesis that calmodulin plays a dual role in regulating transmitter release.

KEY WORDS verapamil; neuroregulators; calcium channel blockers; calmodulin; calcimycin (A-23187); tetrodotoxin; manganese; dinitrophenol

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

² Graduate student