

3,4-二氨基吡啉诱发去甲肾上腺素释放及 B-50 (GAP-43) 磷酸化<sup>1</sup>黄华玉、唐彤<sup>2</sup>、陈秀芳(中国科学院上海生理研究所, <sup>2</sup>中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031, 中国)

R365.2

3,4-Diaminopyridine-evoked norepinephrine release and B-50 (GAP-43) phosphorylation

关键词 钙; 3,4-二氨基吡啉; 去甲肾上腺素; B-50 (GAP-43); 蛋白激酶 C

HUANG Hua-Yu, TANG Tong<sup>2</sup>, CHEN Xiu-Fang (Shanghai Institute of Physiology, <sup>2</sup>Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**ABSTRACT** 3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) evoked [<sup>3</sup>H]norepinephrine ([<sup>3</sup>H]NE) release in rat hippocampal slices preincubated with [<sup>3</sup>H]NE and superfused with medium with or without  $\text{Ca}^{2+}$ . Phorbol ester 4 $\beta$ -phorbol 12, 13, dibutyrate 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) enhanced and polymyxin B (100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) inhibited the release of [<sup>3</sup>H]NE under both conditions. The neuron-specific protein B-50 is a major presynaptic substrate of protein kinase C and involved in exocytosis. Using *in situ* protein phosphorylation analyzed by SDS-PAGE and autoradiography, we observed that B-50 phosphorylation was significantly decreased by 3,4-DAP in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and completely inhibited by removal of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . It was suggested that B-50 phosphorylation was not involved in 3,4-DAP-evoked [<sup>3</sup>H]NE release.

**KEY WORDS** calcium; 3,4-diaminopyridine; norepinephrine; B-50 (GAP-43); protein kinase C

**摘要** 在胞外有  $\text{Ca}^{2+}$  或无  $\text{Ca}^{2+}$  时, 3,4-二氨基吡啉 (3,4-DAP) 都能诱发大鼠海马释放去甲肾上腺素, 哌啶醇基酯 (phorbol ester) 或多粘菌素 B 对此诱发释放有加强或抑制作用。在胞外有  $\text{Ca}^{2+}$  时, 3,4-DAP 显著地减弱 B-50 磷酸化, 除去胞外  $\text{Ca}^{2+}$ , B-50 磷酸化完全被抑制。结果表明, B-50 磷酸化不参与 3,4-DAP 诱发海马去甲肾上腺素释放机制。

3,4-二氨基吡啉 (3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP) 能诱发海马释放去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)。蛋白激酶 C (PKC) 的激活剂 phorbol ester (4 $\beta$ -phorbol 12, 13-dibutyrate, 4 $\beta$ -PDB) 能加强这一诱发释放<sup>(1)</sup>。位于突触前的 PKC 的特异性底物蛋白 B-50 (GAP-43) 磷酸化参与 4-aminopyridine (4-AP) 诱发神经递质释放以及 PKC 加强递质释放的机制<sup>(2)</sup>。本研究观察在细胞外有钙或无钙时, 3,4-DAP 诱发海马去甲肾上腺素的释放, 4 $\beta$ -PDB 对这一诱发释放的加强作用以及脑片中 B-50 (GAP-43) 磷酸化, 以考察 B-50 磷酸化是否参与 3,4-DAP 诱发海马释放去甲肾上腺素及其调制机制。

## MATERIALS AND METHODS

**药品和试剂** [<sup>3</sup>H]NE (1-(7,8-<sup>3</sup>H) norepinephrine, [<sup>3</sup>H]NE, Amersham); 3,4-二氨基吡啉 (3,4-diaminopyridine, 3,4-DAP), 哌啶醇基酯 (4 $\beta$ -phorbol 12, 13-dibutyrate, 4 $\beta$ -PDB), 多粘菌素 B (polymyxin B sulfate, PMB) (Sigma); Soluene 350, Insta-gel XF, Hionic-fluor (Packard), desipramine (Merck)。同位素标记的  $n\text{-}[^{32}\text{P}]\text{Na}_3\text{PO}_4$  (<sup>32</sup>P, 无载体, 中国原子能研究院)。

**[<sup>3</sup>H]NE 诱发释放实验** Sprague-Dawley 大鼠, 体重 250  $\pm$  s 25g, 断头, 取全脑, 投入 4 $^{\circ}\text{C}$  生理溶液, 在 6-8 $^{\circ}\text{C}$  下分离海马, 用 McIlwain 组织切片机, 沿板状器方向制备厚 0.4 mm 的脑片。用生理溶液淋洗后, 加入 2 ml 含 [<sup>3</sup>H]NE (1.6 PBq  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>, 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的生理溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 30 min, 再用

Received 1991-12-10

Accepted 1992-07-01

<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39070328 and No 9389007.

生理溶液淋洗3次将脑片随机转入容量1 ml的灌流小室, 每室1片, 以 $0.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速进行表面灌流。生理溶液成分( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaCl}$  118,  $\text{KCl}$  4.8,  $\text{CaCl}_2$  1.3,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, 葡萄糖 11, 抗坏血酸 0.57,  $\text{EDTA-Na}_2$  0.03。用95%  $\text{O}_2$ +5%  $\text{CO}_2$ 饱和, 加 $\text{NaOH}$ 调pH至7.4。灌流液中另加 $\text{desipramine}$   $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。灌流45 min后, 将流出液收集入闪烁杯内, 每5 min一份, 加入闪烁液 Insta-gel XF 4 ml, 用液体闪烁计数器测 $^3\text{H}$ 含量。脑片用 Soluenc 350 0.25 ml 溶解后, 加 Hionic-fluor 5 ml, 然后测定 $^3\text{H}$ 含量。

在灌流开始后60 min, 脑片接受刺激(引入3,4-DAP  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )持续10 min, 以诱发 $^3\text{H}$ NE释放, 在刺激之前15 min和45 min加入 $4\beta$ -PDB和PMB, 以测试它们对诱发释放的影响, 每次同时进行对照实验。药物的作用以计算刺激所诱发释放的 $^3\text{H}$ (包括刺激开始后10份样品中 $^3\text{H}$ 含量减去基础释放量)占脑片 $^3\text{H}$ 总含量的%来评价, 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 $t$ 检验测定组间差别的显著性<sup>(3)</sup>。

**体内 B-50 磷酸化实验<sup>(4)</sup>** 大鼠海马脑片 0.4 mm, 每管3片, 加2 ml(含或不含 $\text{Ca}^{2+}$ )生理溶液, 34°C保温30 min。然后将脑片移入900  $\mu\text{l}$ (含3.7 MBq  $^{32}\text{P}$ )生理溶液保温90 min。各管分别加入 $4\beta$ -PDB  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 3,4-DAP  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $4\beta$ -PDB  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +3,4-DAP  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4\beta$ -PDB于3,4-DAP之前15 min加入, 空白对照为不加任何药物。3,4-DAP作用10 min后, 立即用4°C生理溶液(含或不含 $\text{Ca}^{2+}$ )洗去药物, 并将反应管插入冰浴以终止反应。生理溶液成份:  $\text{NaCl}$  124,  $\text{KCl}$  5,  $\text{MgSO}_4$  1.3,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $D$ -glucose 10, 含或不含 $\text{CaCl}_2$   $2 (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 。用95%  $\text{O}_2$ +5%  $\text{CO}_2$ 饱和, 调pH至7.4。

从反应管中取出脑片, 加入160  $\mu\text{l}$ 蛋白变性溶液包含:  $\text{Tris-HCl}$   $62.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 6.8), 2.3%十二烷基磺酸钠(SDS), 10%甘油, 5% $\beta$ -巯基乙醇和痕量溴酚兰制备匀浆, 通过SDS-PAGE分离组织内的标记蛋白<sup>(5)</sup>。下胶(分离胶, 110 mm $\times$ 160 mm $\times$ 1.2 mm)含有10%丙烯酰胺和0.27%双丙烯酰胺(Bis); 上

胶(堆胶)含有4.4%丙烯酰胺和0.12% Bis。电泳缓冲液的成分为  $\text{Tris-HCl}$  0.05,  $\text{EDTA}$  0.002, 甘氨酸  $0.375 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 0.1% SDS, pH 8.3。取组织匀浆20  $\mu\text{l}$ (经定量测定含蛋白约35  $\mu\text{g}$ )进行电泳。用作分子量测定的标准蛋白, 分子量为: 牛血清白蛋白 67 000, 卵清蛋白 43 000, 胰凝乳蛋白酶元 A 25 000 和核糖核酸酶 A 13 700。电泳电压: 60 V, 电泳30 min, 然后将电压调至125 V, 电泳3-4 h, 直到染料前沿到达凝胶底边约1 cm处时停止电泳。凝胶经染色, 真空干燥后, 用放射自显影技术显示磷酸化蛋白电泳图谱。

## RESULTS

**1** 在细胞外有 $\text{Ca}^{2+}$ 条件下, 将3,4-DAP引入脑片周围灌流液中,  $^3\text{H}$ NE释放明显升高, 10 min后撤去刺激, 释放即逐渐下降, 并恢复到基础水平。在细胞外无 $\text{Ca}^{2+}$ 条件下, 3,4-DAP亦能诱发 $^3\text{H}$ NE释放, 10 min后撤去刺激, 释放继续上升至高峰, 然后逐步下降, 并恢复到基础水平(Fig 1, 下部)。有 $\text{Ca}^{2+}$ 组的释放量明显大于无 $\text{Ca}^{2+}$ 组。两组之差(即由胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 进入胞内所引起的 $\text{Ca}^{2+}$ -依赖性释放)为组织 $^3\text{H}$ 总含量的3.20%。

**2**  $4\beta$ -PDB加强3,4-DAP诱发 $^3\text{H}$ NE释放。无论在细胞外有无 $\text{Ca}^{2+}$ 条件下, 若刺激之前15 min加 $4\beta$ -PDB  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 3,4-DPA诱发 $^3\text{H}$ NE释放量显著增加, 细胞外有 $\text{Ca}^{2+}$ 组仍高于胞外无 $\text{Ca}^{2+}$ 组, 两组之差为组织 $^3\text{H}$ 总量的3.67% (Fig 1, 上部)与不加PDB时 (Fig 1, 下部)3.20%相比, 无显著性差别( $P > 0.05$ )。

**3** PMB抑制3,4-DAP诱发 $^3\text{H}$ NE释放。无论在细胞外有或无 $\text{Ca}^{2+}$ 条件下, 若在刺激之前45 min加入PMB  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 3,4-DAP诱发 $^3\text{H}$ NE释放都受抑制, 前者抑制了58%, 后者抑制了94% (Tab 1)。

**4** 在细胞外有 $\text{Ca}^{2+}$ 和无 $\text{Ca}^{2+}$ 时B-50磷酸化。在细胞外有 $\text{Ca}^{2+}$ 条件下, B-50磷酸化

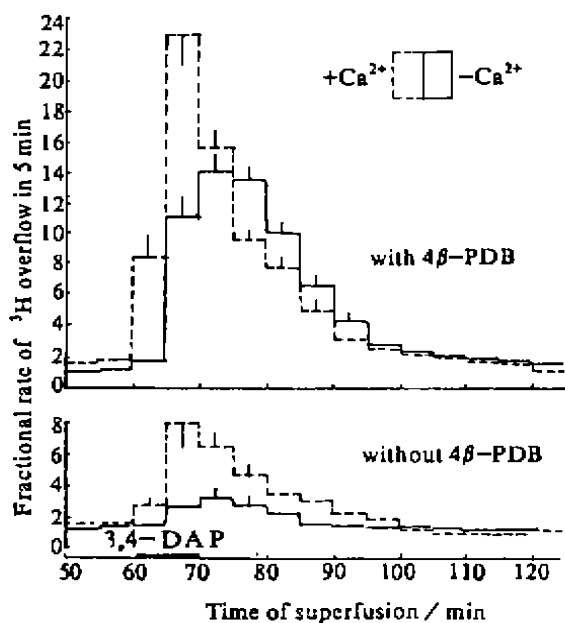


Fig 1. 3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP)-evoked <sup>3</sup>H overflow in the presence or absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> with or without 4β-phorbol 12, 13 dibutyrate (4β-PDB). <sup>3</sup>H overflow was induced by addition of 3,4-DAP 100 μmol · L<sup>-1</sup> for 10 min after 60 min superfusion. 4β-PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup> was added 15 min before stimulation. n = 6-10 slices from 2-4 rats.  $\bar{x} \pm s$ .

Tab 1. Effects of polymyxin B (PMB) on 3,4-DAP-evoked [<sup>3</sup>H]NE release in the presence and absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>. Hippocampal slices preincubated with [<sup>3</sup>H]NE, superfused with medium (with or without Ca<sup>2+</sup>) and stimulated by addition of 3,4-DAP 100 μmol · L<sup>-1</sup> for 10 min. PMB 100 μmol · L<sup>-1</sup> was added 45 min before the stimulation. n = 5-10 slices from 2-4 rats.  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\*P < 0.001 vs controls.

	n	3,4-DAP-evoked <sup>3</sup> H overflow (% of tissue <sup>3</sup> H)	
		Ca <sup>2+</sup> 1.3 mmol · L <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> 0 mmol · L <sup>-1</sup>
Control	10	7.04 ± 0.64	10 3.14 ± 0.34
PMB	5	3.10 ± 0.32***	5 0.16 ± 0.12***

结果(Fig 2, 左). 从左到右分别为: (0) 标准 B-50 蛋白磷酸化后的电泳定位(见箭头处); (1) 不加任何药物时, 磷酸化的 B-50 蛋白在标准蛋白相当的位置上被显示; (2) 加 4β-PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup>, B-50 磷酸化有所加强; (3) 加 3,4-DAP 200 μmol · L<sup>-1</sup> 10 min, B-50 磷酸化被抑制; (4)和(5) 4β-PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup> 和 3,4-DAP 200 μmol · L<sup>-1</sup> 同时使用, B-50 磷酸化程度比单独使用 3,4-DAP 时略加强. 在细胞外无 Ca<sup>2+</sup>条件下, 脑片内的蛋白磷酸化普遍明显下降, 特别是 B-50 磷酸化几乎被完全抑制(Fig 2, right).

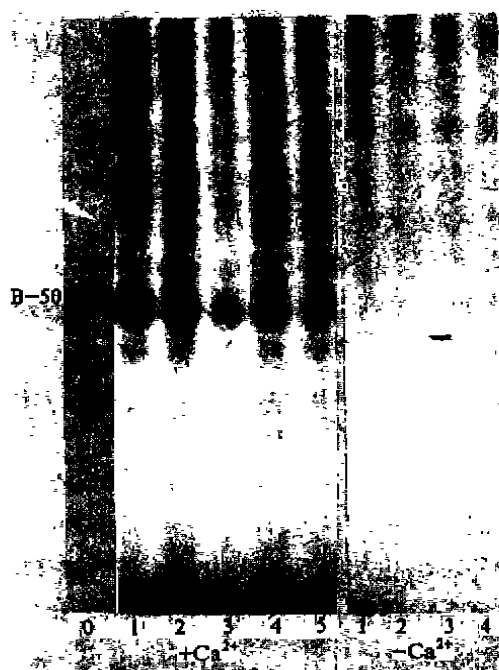


Fig 2. Effects of 3,4-DAP and 4β-PDB on B-50 protein phosphorylation *in vivo*. In the presence or absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> hippocampal slices were incubated with or without 3,4-DAP 100 μmol · L<sup>-1</sup> or/ and 4β-PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup>. *In situ* protein phosphorylation was analyzed by SDS-PAGE (10% gel) and autoradiography. The position of B-50 is indicated with an arrow. (0) standard B-50; (1) control; (2) 4β-PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup>; (3) 3,4-DAP 200 μmol · L<sup>-1</sup>; (4) and (5) 4β-PDB 1 μmol · L<sup>-1</sup> + 3,4-DAP 200 μmol · L<sup>-1</sup>.

## DISCUSSION

1989年我们首次报道了3,4-DAP可以作为化学刺激物制造动作电位诱发神经递质释放模型,以研究递质释放及其调节机制。我们以往的实验结果<sup>(6)</sup>已提示其作用机制大致如下:(1)阻断 $I_D K^+$ 电流;(2) $Na^+$ 通道开放, $Na^+$ 进入细胞内;(3)细胞外 $Ca^{2+}$ 进入细胞内(在胞外无 $Ca^{2+}$ 时,进入膜内的 $Na^+$ 引起内源 $Ca^{2+}$ 释放);(4)最后诱发神经递质释放。现观察到用 $4\beta$ -PDB激活蛋白激酶C,3,4-DAP诱发海马释放去甲肾上腺素显著加强,用PMB抑制PKC,能使这一诱发释放下降,而且PDB和PMB的作用主要在 $Ca^{2+}$ 不依赖释放部分。说明蛋白激酶C参与 $Ca^{2+}$ 不依赖释放机制。然而,PKC激活后加强胞吐的机制尚未得到阐明。位于突触前的蛋白激酶C的特异性底物蛋白B-50(GAP-43)参与胞吐机制,认为B-50磷酸化中介4-AP刺激去甲肾上腺素释放机制<sup>(7,8)</sup>。我们观察到在细胞外有钙条件下,3,4-DAP对B-50磷酸化显示了抑制作用,这与Heemskerk等<sup>(9)</sup>1987年报道的结果相一致,而 $4\beta$ -PDB无论在有无3,4-DAP的情况下都能加强B-50磷酸化。除去细胞外 $Ca^{2+}$ ,脑片中许多种蛋白(包括B-50)的磷酸化都受到很大抑制,而3,4-DAP诱发 $[^3H]NE$ 释放仍非常明显, $4\beta$ -PDB对这一诱发释放的加强作用亦仍清晰可见,提示B-50磷酸化并不参与3,4-DAP诱发去甲肾上腺素释放或 $4\beta$ -PDB加强这一诱发释放的机制,特别是在细胞外无 $Ca^{2+}$ 条件下。

**ACKNOWLEDGMENTS** 戴树平,谢培国,张建伟同志担任技术工作。

## REFERENCES

- Huang HY, Hertting G, Allgaier C, Jackisch R. 3,4-Diaminopyridine-induced noradrenaline release from CNS tissue as a model for action potential-evoked transmitter release: effects of phorbol ester. *Eur J Pharmacol* 1989; 169 : 115-23.
- Dekker LV, De Graan PNE, Oestreicher AB, Versteeg DHG, Gispen WH. Inhibition of noradrenaline release by antibodies to B-50(GAP-43). *Nature* 1989; 342 : 74-6.
- Huang HY, Allgaier C, Hertting G, Jackisch R. Phorbol ester-mediated enhancement of hippocampal noradrenaline release: which ion channels are involved? *Eur J Pharmacol* 1988; 153 : 175-84.
- Dekker LV, De Graan PNE, Versteeg DHG, Oestreicher AB, Gispen WH. Phosphorylation of B-50 (GAP 43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1989; 52 : 24-30.
- Krueger BK, Forn J, Greengard P. Depolarization-induced phosphorylation of specific proteins, mediated by calcium ion influx, in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* 1977; 252 : 2764-73.
- Huang HY, Hertting G, Allgaier C, Jackisch R. 3,4-Diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampus: role of  $Na^+$  entry on  $Ca^{2+}$  pools of protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 1991; 206 : 221-30.
- Heemskerk FMJ, Schrama LH, Ghijsen WEJM, De Graan PNE, Lopes da Silva FH, Gispen WH. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J Neurochem* 1991; 56 : 1827-35.
- Heemskerk FMJ, Schrama LH, Gianotti C, Spierenburg H, Versteeg DHG, De Graan PNE, et al. 4-Aminopyridine stimulates B-50 (GAP43) phosphorylation and  $[^3H]noradrenaline$  release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1990; 54 : 863-9.
- Heemskerk FMJ, Schrama LH, De Graan PNE, Gispen WH. 4-Aminopyridine inhibits synaptosomal plasma membrane protein phosphorylation in vitro: effect of the selective NMDA-antagonist 2-amino-5-phosphonovalerate. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147 : 94-9.