DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.07.011

左旋千金藤啶碱对大鼠纹体多巴氨受体亚型的作用特点*

董兆君** 王仕丽 李云鹏 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:研究左旋千金藤啶碱(SPD)和其同类物CSL、THPB10对大鼠纹状体D_1、D_2多巴胺(DA)受体作用特性。方法:24 mA直流电刺激体外灌流之大鼠纹状体脑薄片,每5 min收集灌流液测定[^{3}H]DA释放量;分离大鼠纹状体突触体,用放免方法测定腺苷酸环化酶活性。结果:D_2受体激动剂LY171555显著抑制电刺激诱发的[^{3}H]DA释放,SPD、CSL和THPB10翻转LY171555的抑制作用,SPD、CSL、THPB10也诱发DA释放。在用Butaclamol封闭D_2受体后,SPD和CSL以剂量依赖方式激活常敏大鼠纹状体突触体腺苷酸环化酶,而THPB10无作用。结论:含双羟基的SPD及其同类物CSL对DA受体不同亚型有激动/阻滞不同效应。

关键词 多巴胺受体;腺苷酸环化酶;纹状体

中图法分类号 R966

左旋千金藤啶碱[(-)-Stepholidine,SPD]是四氢原小檗碱同类物(Tertrahydroprotoberberines,THPBs)的先导化合物[1]。早期的研究资料证实,SPD对中枢多巴胺(Dopamine,DA)受体有选择性高亲和力结合[2],明显翻转去水吗啡(APO)对大鼠黑质致密区(SNC)DA神经元放电的抑制作用[3]。神经生化研究结果表明,SPD以剂量依赖关系激活酪氨酸羟化酶,促进DA合成和释放[4,5]。而在DA受体超敏的大鼠模型,SPD使大鼠产生健侧旋转行为[6]。上述结果提示,SPD对中枢DA受体呈阻滞/激动双相作用。本研究比较SPD及其同类物(-)-12-choloroscoulerine(CSL)和THPB10对大鼠纹状体D_1和D_2 DA受体作用特性。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

SPD、CSL和THPB10由中国科学院上海药物研究所馈赠,临用前以少量二甲基甲酰胺溶解,再用缓冲液稀释至所需浓度。LY171555、Haloperidol和APO购自Sigma,Dopamine、Nomifensin和Butaclamol为RBI产品,cAMP测定盒由上海中医药科大学提供。

1.2 纹状体脑片[^{3}H]DA释放

参照文献[7]方法进行,SD大鼠200~250 g,颈动脉放血处死后于4 ℃迅速开颅取双侧纹状体,于切片机上制备厚度为0.3 mm脑薄片,将3片3 mm×3 mm脑片移入2 ml 0.1 μmol/L[^{3}H]DA灌流液中摄取[^{3}H]DA。30 min后脑片转入约1 cm×1 cm×1 cm玻璃灌流小室中,以95% O_2饱和的灌流液37 ℃恒温持续灌流。灌流液组份为(mmol/L):NaCl 118;KCl 4.8;$CaCl_2$ 1.3;$MgSO_4$ 1.2;$NaHCO_3$ 25;KH_2PO_4 1.2;EDTA 0.03。平衡30 min后开始收集流出液,每5 min为一个样品,共6个时相点。于电刺激前5 min向灌流液中加入待测药物,在第10分钟时对脑片施加24 mA 3 Hz电刺激2 min。样品中加10 ml闪烁液,用LKB液闪仪测放射强度,结果以Bq表示。

1.3 腺苷酸环化酶活力测定

断颈处死大鼠,于冰上取双侧纹状体,按1∶20加分离液,匀浆。1 000×g离心10 min,上清液经2 000×g离心20 min,相同分离液洗2遍。沉淀块用反应液重悬后测蛋白含量。

玻璃试管中加突触体蛋白50 μg、待测药物100 μl、ATP 50 μl,ATP终浓度1 mmol/L。用反应液补足500 μl。30 ℃准确反应5 min,95 ℃水浴3 min终止反应。1 000×g离心10 min,取上清液100 μl,用放免法测cAMP含量。实验结果以$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

对照组脑片于受24 mA直流电刺激后第5分钟,[^{3}H]DA释放量迅速增加。第15、20、25、30分钟分别为1 255.4±170.3、2 414.6±213.4、2 254.0±208.6和1 016.8±102.7。其释放峰在第20分钟和第25分钟。灌流液中加入10 μmol/L Ly171555,电刺激诱发的[^{3}H]DA释放量明显小于对照组,20 min和25 min的释放量为1 447.2±286.6和1 403±219.1,见表1。

灌流液中同时加入Ly171555和SPD或CSL或THPB10时,Ly171555对电诱发大鼠纹状体脑片[^{3}H]DA释放的抑制作用明显减弱或被取消。

在不施加电刺激的大鼠纹状体脑片,SPD、CSL和THPB10也能诱发[^{3}H]DA释放,诱发时间于给药后10~15 min。50 μmol/L SPD、CSL和THPB10使第20分钟的释放量分别增加72.9%、148.6%和57.2%,见表2。

反应系统中含2 μmol/L D_2受体阻滞剂Butaclamol时,DA增加大鼠纹状体突触体腺苷酸环化酶活力,随浓度的升高,DA对酶活力的影响增加,见表3。SPD和CSL的作用与DA相似,但THPB10对腺苷酸环化酶活力无明显影响。

* 重庆市资助课题

** 董兆君,男,45岁,副教授,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　SPD、CSL、THPB10 对电诱发大鼠纹状体脑片[^{3}H]DA 释放量的影响(12 Bq，n=6)

Tab 1　Effect of SPD，CSL and THPB10(μ mol/L) on electric stimulation evoked [^{3}H]DA released from rats striatum slices *in vitro* (12 Bq，n=6)

	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Control	655.4±139.5	547.0±54.2	1255.4±170.3	2414.6±213.4	2254.0±208.6	1016.8±102.7
Ly171555(10)	727.5±178.0	563.2±51.8	888.2±194.8*	1447.2±286.6**	1403.4±219.1**	677.2±226.7**
Ly171555(10)+SPD(50)	556.8±77.4	573.8±104.1	1312.6±443.0	2009.2±516.8	2177.4±243.0	1034.2±145.1
Ly17155(10)+CSL(50)	522.0±57.3	535.8±41.1	1423.8±186.9	2003.0±409.9	1931.4±193.3	735.0±169.1**
Ly171555(10)+THPB10(50)	681.0±163.4	536.2±55.4	1192.6±151.4	2330.8±144.8	2315.6±217.4	965.6±100.7

*：P <0.05，**：P <0.01 *vs* control

表 2　SPD、CSL 和 THPB10 对大鼠纹状体脑片[^{3}H]DA 静息释放的影响(C_B/μmol·L^{-1}，n=5)

Tab 2　Effect of SPD、CSL and THPB10 on basic release of [^{3}H]DA from rats striatum slices *in vitro*(C_B/μmol·L^{-1}，n=5)

	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Control	606±35.7	599.0±145.7	655.4±139.5	727.2±178.0	579.1±61.2	562.2±49.3
SPD(50)	592.4±90.1	601.3±83.3	884.0±83.3	1257.4±102.2**	1258.2±181.1**	1056.0±135.5**
CSL(50)	558.2±87.5	583.6±78.3	905.4±149.1*	1807.6±98.4**	1685.8±158.6**	1449.0±231.6**
THPB10(50)	593.4±50.1	585.0±68.9	844.8±98.7	1143.2±177.3**	1467.2±181.3**	1202.8±53.5**

*：P <0.05，**：P <0.01 *vs* control

表 3　SPD 同类物对大鼠纹状体突触体腺苷酸环化酶活力的影响(cAMP，λ_B/pmol·mg^{-1}·min^{-1})

Tab 3　Effect of SPD analogues on synaptosomal adenylate cyclase activity(cAMP，λ_B/pmol·mg^{-1}·min^{-1})

	Control	Concentration (μmol/L)			
		1	10	100	1 000
Dopamine	103.6±8.99	105.0±13.32	187.6±10.26**	189.8±9.09**	199.4±9.99**
SPD	100.1±10.50	98.8±9.73	127.2±4.82	149.8±9.31**	161.6±5.59**
CSL	103.6±6.94	102.8±7.98	142.0±10.39**	160.8±10.83**	167.0±12.79**
THPB10	101.8±8.53	104.6±11.78	101.6±14.43	98.4±11.99	103.2±8.43

**：P<0.01 *vs* control

3　讨论

脑内 DA 神经元主要集中在中脑黑质致密区和中脑腹侧被盖区，分别支配纹状体和伏膈核、杏仁核、扣带回及额叶皮层等核团，与人类锥体外系运动功能和认识、情绪、记忆等有密切关系。已经证实，DA 神经退变是帕金森氏症的重要发病机制，作用于 DA 系统的药物研究日益引起人们的关注。SPD 是我国科学家从植物提取的有效化学成分。早期研究证实，SPD 对 DA 受体有选择性阻滞作用。但在用 6-OHDA 损毁单侧黑质的大鼠模型上，SPD 能引发动物的健侧旋转行为。提示 SPD 对 DA 受体兼有内在激动作用[6]。SPD 上述的阻滞作用和激动作用可能是其作用于不同 DA 受体亚型的结果，并与其化学结构中的羟基有关[8]。

纹状体 DA 神经突触前 D_2 为自身受体(Autoreceptors)，与 DA 释放有关。我们以离体大鼠纹状体片 DA 释放模型，研究 SPD 及其同类物 CSL 和 THPB10 对 D_2 受体的作用特性。10μmol/L 选择性 D_2 受体激动剂 LY171555 明显抑制电诱发的[^{3}H]DA 释放，此作用为 50μmol/L SPD、CSL 和 THPB10 所对抗，见表 1，提示三者均有 D_2 受体阻滞作用。但 CSL 的作用时间比 SPD 和 THPB10 短。在无 D_2 受体阻滞剂 LY171555 存在，又不施加电刺激时，浓度为 50 μmol/L 的 SPD、CSL 和 THPB10，均刺激脑片释放 DA，见表 2，这一步证实三者对 D_2 受体的阻滞作用特性。

中枢 DA 受体为 G 蛋白耦联受体，D_1 受体经 Gs 与腺苷酸环化酶正耦联，D_2 经 Gi 与腺苷酸环化酶负耦联。本研究用 D_2 受体阻滞剂 Butaclamol 封闭 D_2 受体，能准确研究 CSL 经 D_1 受体对腺苷酸环化酶的作用特点。在 mmol/L 至 μmol/L 的浓度范围内，SPD 和

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

CSL均明显提高腺苷酸环化酶活力，使cAMP生成量明显增加，且作用强度有随药物浓度升高而加强的趋势。这些结果与既往的行为实验结果相吻合，提示SPD和CSL对纹状体D_1受体有激动剂作用。

SPD同类物THPB10对大鼠纹状体突触体腺苷酸环化酶的活性无明显影响，即使浓度高达1 000μmol/L时，THPB10也不能显著改变cAMP的生成量，说明THPB10与SPD及CSL的作用性质不同，THPB10对D_1受体无激动特性。

SPD是THPB同类物的先导化合物。本实验证实双羟基化合物SPD和CSL具有D_2受体阻滞和D_1受体激动双重作用，而单羟基化合物THPB10未显示D_1受体激动作用。因此，双重作用可能由SPD同类物结构中双羟基所决定。此论点尚需大量同类物研究数据的支持。

参考文献

1 Jin G Z, Wang X L, Shi W X. Tetrahydroprotoberberine-a new chemical type of antagonist of dopamine receptors. Sci Sin B, 1986, 29(5): 527

2 Xu S H, Yu L P, Han Y R, *et al*. Effect of tetrahydroprotoberberines on dopamine receptor subtypes in brain. Acta Pharmacol Sinica, 1989, 10(2): 104

3 Huang K X, Jin G Z. The antagonistic effects of tetrahydro-protoberberines on dopamine receptors: electrophysiological studies. Sci China B, 1992, 35(6): 688

4 陈丽娟，郭 新，王青梅，等. 左旋千金藤立定和左旋四氢巴马汀阻滞突触前D_2的反馈调控作用. 中国药理学报，1992，13(5)：442

5 黄开星，孙宝存，金国章. 在体伏胺法测量四氢原小檗碱同类物对纹状体多巴胺受体释放和3，4-双羟苯乙酸含量的影响. 中国药理学报，1991，12(1)：32

6 Shi W X, Chen Y, Jin G Z. Effects of l-stepholidine on rotational behavior in rats. Acta Pharmacol Sin, 1984, 5(4): 222

7 黄华玉，戴树平. 细胞外钙对附拜醇基酯加强肾上腺素释放的影响. 中国药理学报，1990，11(6)：494

8 Dong Z J, Guo X, Chen L J, *et al*. Dual actionss of (−)-stepholidine on the dopamine receptor-mediated adenylate cyclase activity in rat corpus striatum. Life Sci, 1997, 61(4): 465

（收稿：1998-11-23；修回：1999-01-22）

（编辑 王 红）

Study of the characteristic pharmacological property of stepholidine on dopamine subtype receptors of the striatum in rats

Dong Zhaojun, Wang Shili, Li Yunpeng (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the pharmacological property of stepholidine (SPD) and its analogues as CSL and THPB10 on subtype receptors of the striatum in rats. Methods: Slices of the striatum of the rats, preincubated with ^{3}H-dopamine (^{3}H-Da), were superfused and stimulated with electricity. The efflux was collected in 5 min interval and the radiation of ^{3}H-Da in the samples was measured to identify the Da released from the striatum slices. The synaptosomes of the striatum were prepared and the adenlage cyclase activity was determined with radioimmunoassay. Results: Ly171555, a selective D_2 dopamine receptor agonist, significantly inhibited ^{3}H-Da release evoked electrically from the striatal slices. This effect of Ly171555 was antagonized or reversed by SPD, CSL and THPB10. The antagoning effect of CSL against Ly171555 in decreasing ^{3}H-Da release was short-lived as compared wtih that of SPD and THPB10. Interestingly to note, SPD, CSL and THPB10 themselves were obviously able to evoke ^{3}H-Da release in the striatal slices without electricity stimulation. In the samples of striatal synatosomes, in which the D_2Da receptors were blocked with butaclamol, the activity of adenylate cyclase was significantly stimulated by SPD and CSL but not by THPB10. Conclusion: These findings suggest that SPD and its analogue CSL possess 2 hydroxyl groups and exercise dual actions on D_1 and D_2 dopamine subtype receptors, agonist for D_1 receptors and antagonist for D_2 receptors. THPB10, however, exercises antagonist action for D_2 receptors only.

Key words dopamine receptor; adenylate cyclase; corpus striatum; rat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net