

多巴胺自身受体通过抑制依赖cAMP的磷酸化调控TH活性^{*}

胡刚

全国章

(神经药理研究室)

(中国科学院上海药物研究所)

摘要 应用HPLC-ECD法测定大鼠纹状体突触体TH的活性,研究DA自身受体介导的DA生物合成负反馈调控的机理。研究发现,AC激活剂FSK和PKA激活剂dbcAMP均以浓度依赖的方式激活突触体TH的活性,增加l-dopa的生成。DA自身受体激动剂LY171555能抑制FSK对TH的激活效应,但不影响dbcAMP对TH的激活。实验结果表明,DA自身受体介导的负反馈调控的机理是通过抑制依赖cAMP的PKA对TH的磷酸化激活,其作用环节在于抑制AC,而不是对PKA的直接抑制。

关键词 多巴胺自身受体 负反馈调控 酪氨酸羟化酶 纹状体 突触体

在体和离体的生化药理学研究表明,纹状体DA神经末梢存在着调节DA合成的突触前DA受体(即DA自身受体)^[1]。我们的研究工作已经证明,DA生物合成的负反馈调控是由突触前D₂受体介导的,与D₁受体无关^[1]。不久前,我们曾报道,DA自身受体通过与抑制性G蛋白(Gi)偶联,抑制腺苷环化酶(AC)的活性,减少cAMP的生成^[2],但是此效应是否与DA自身受体的负反馈调控相关?目前还不清楚。本文工作研究了DA自身受体激动剂对依赖cAMP的PKA磷酸化激活突触体TH的影响,旨在进一步阐明DA自身受体对自身递质生物合成的负反馈调控机理。

1 材料与与方法

1.1 药品与试剂 LY171555和NSD 1015为美国RBI公司产品; Forskolin (FSK), 二丁酰cAMP (dbcAMP), l-dopa, catalase, L-tyrosine, 6-甲基四氢喋呤(6-MPH₄), D-樟脑-β-磺酸(D-CSA)均为美国Sigma公司产品。实验中所用其它试剂均为分析纯级试剂。

1.2 动物 Sprague-Dawley大鼠♀♂兼用, 220~250g, 由中国科学院上海动物中心提供。

1.3 纹状体突触体的制备 按文献[2]方

法进行。将制备的突触体混匀于含20mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)和2mmol/L β-巯乙醇的0.32mmol/L蔗糖溶液内, 分装后于-60℃条件下贮存, 待测TH的活性。

1.4 TH活性的测定 应用脱羧酶抑制剂NSD 1015阻止l-dopa转化为DA, 测定单位时间内TH催化酪氨酸生成l-dopa的累积量而确定酶的活性。

1.4.1 酶促反应 加入50ml突触体混悬液于反应试管内, 置于恒温振荡水浴槽内预先孵育5min, 然后加入50μl酶促反应液开始反应, 对照反应管以0.32mol/L蔗糖溶液代之。酶反应液的组成: 10μl 10mol/L醋酸缓冲液(pH7.0), 10μl 2.5mmol/L 6-MPH₄, 10μl 2500U catalase, 10μl 2mmol/L tyrosine和14μl 10mmol/L NSD 1015。酸促反应进行10min后, 加入50μl mol/L HClO₄ (内含0.1mmol/L EDTA和0.1% NaS₂O₅)终止反应(标准管内加入的终止反应液含不同浓度的l-dopa), 然后离心(3000g, 10min, 4℃), 取上清液提取l-dopa^[1], 用高效液相与电化学检测器联用(HPLC-ECD)测定l-dopa的含量^[1]。

1.4.2 HPLC-ECD 柱系统: 美国Waters公司制Linchrosob C₁₈柱(20cm×0.4cm, 5μm), 并加预柱(同上, 5cm×0.4cm, 5μm)。流动相: CLCH₂COOH 0.16mol/L, NaOH 0.1mol/L, EDTA 0.1mol/L, D-

• 国家自然科学基金资助课题

GSA25mmol/L, 甲醇10%, pH2.8。仪器及工作条件: Waters公司510型泵, U6K进样阀, 460型电化学检测器和740型数据处理机; 洗脱液流速: 1ml/min; 电化学检测器工作电压: 0.7V。

1.5 蛋白质的测定 用Lowry法测定突触体的蛋白质。

1.6 数据处理及统计分析 全部数据均为 $\bar{x} \pm s$, 用t检验分析显著性差异。

2 结果

2.1 FSK和dbcAMP对大鼠纹状体突触体TH的激活 在酶反应体系中分别加入 FSK (50 nmol/L~100 μ mol/L) 和 dbcAMP_g (10 nmol/L~10mmol/L) 预先孵育10min后, TH的活性随着FSK和dbcAMP浓度的增加而显著增强, 使L-dopa的生成增加 (图 1, 图 2)。FSK和dbcAMP的EC₅₀分别是3.4 mmol/L和0.86mmol/L, 二者的最大激活效应分别可增加基础活性的217%和163%。实验结果表明依赖cAMP的PKA对TH的磷酸化能显著增强酶的活性。

2.2 LY171555对FSK和dbcAMP激活TH的影响 FSK和dbcAMP都能激活突触体TH的活性, 增加L-dopa的生成, 但是, DA自身

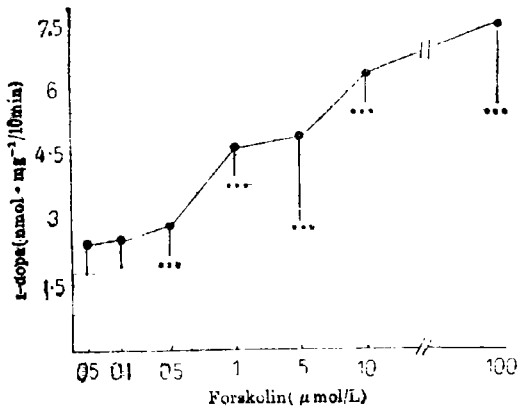


图 1 Forskolin对大鼠纹状体突触体酪氨酸羟化酶的激活 $\bar{x} \pm s$, n = 10, ***P<0.01, 与对照组比较。对照组酶活性是2.3±0.4

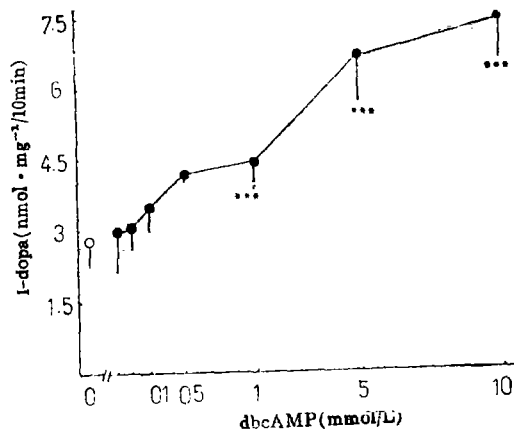


图 2 dbcAMP对大鼠纹状体突触体酪氨酸羟化酶的激活 (○) 对照组酶活性, $\bar{x} \pm s$, n = 10, ●●P<0.05, ●●●P<0.01, 与对照组比较

受体对TH活性的负反馈调节是否与PKA的磷酸化有关? 作用环节是在AC还是对PKA的直接作用? 因此, 本文工作观察了DA自身受体激动剂LY171555对FSK和dbcAMP激活效应的影响。研究发现, LY171555 (50 nmol/L~10 μ mol/L) 以浓度依赖的方式抑制FSK对TH的激活, 减少L-dopa的生成 (图 3)。LY171555在0.5 μ mol/L时, 即显著抑制FSK (1 μ mol/L) 的激活效应

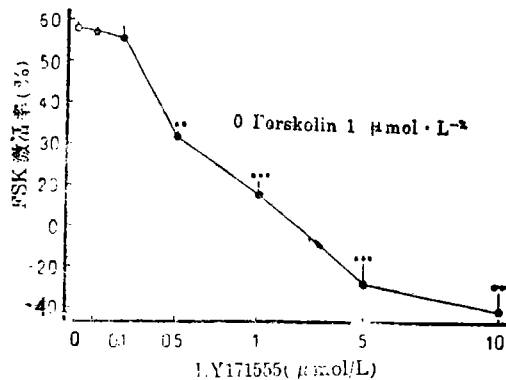


图 3 LY171555对Forskolin激活大鼠纹状体突触体酪氨酸羟化酶活性的影响 (○) 1 μ mol/L Forskolin, $\bar{x} \pm s$, n = 10, ●●P<0.05, ●●●P<0.01, 与(○)比较。对照组和(○)活性分别是2.40±0.1和4.75±0.21 L-dopa nmol/(mg·10 min)

($P < 0.05$), 当其浓度增至5和10 $\mu\text{mol/L}$ 时, LY171555 则能完全阻滞FSK对TH的激活, 此时TH的活性已显著低于基础活性 ($P < 0.01$)。然而, 在相同的实验条件下, 能显著抑制TH基础活性和FSK激活效应的LY171555 (1 $\mu\text{mol/L}$) 却不影响 dbcAMP 对TH的激活效应(图4)。结果表明 DA 自身受体控制TH活性的环节在于对 AC 的抑制, 而不是抑制PKA的直接作用。

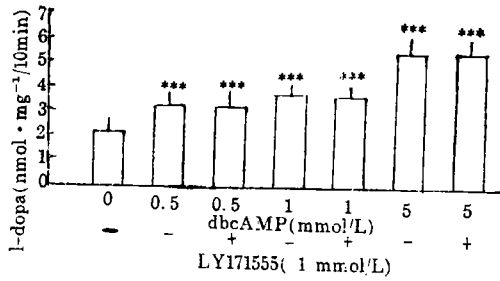


图4 LY171555对dbcAMP激活大鼠纹状体突触体酪氨酸羟化酶活性的影响 $\bar{x} \pm s$, $n = 10$, $\bullet \bullet \bullet P < 0.01$, 与对照组比较

3 讨论

从纹状体分离的突触体是研究 DA 自身受体反馈调控的理想模型^[9], 与在体研究相比较, 其优点主要表现在3个方面: (1) 排除了依赖神经冲动的反馈机制和神经环路调节的干扰, 能有效地用于研究药物对神经末梢DA自身受体调控作用的影响; (2) 能有效地用于研究DA神经元的生化和离子通道作用的机制; (3) 更易直接控制研究条件, 获得明确可靠的实验结果。

TH是DA生物合成的限速酶^[11], 自从

Goldstein等^[4]发现cAMP能增强纹状体切片TH的活性以后, 对TH磷酸化调节的研究备受重视。目前已证明数种蛋白激酶, 包括依赖cAMP的蛋白激酶(PKA)、依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的蛋白激酶(PKI)和依赖 Ca^{2+}/PI 的蛋白激酶(PKC)均能磷酸化和激活TH^[5-6], 但是, 由哪一类(或哪几类)蛋白激酶所介导的磷酸化与DA自身受体的反馈调控相偶联? 迄今仍不清楚。我们已报道了PKI和PKC对TH的磷酸化激活不参与DA自身受体的反馈调控^[7], 本文的研究结果则证明了依赖cAMP的PKA对TH的磷酸化激活与DA生物合成的负反馈调控相偶联。

FSK和dbcAMP均能促进依赖cAMP的PKA对TH的磷酸化激活, 但二者的作用环节不同。前者是AC的激活剂, 能直接兴奋AC, 增加cAMP的生成, 后者能穿透细胞膜进入细胞内, 替代cAMP直接激活PKA。FSK和dbcAMP是鉴别神经递质、激素或药物作用于细胞内信号转导系统的环节和研究PKA介导的磷酸化常用的工具药。本文研究工作发现, FSK和dbcAMP均以浓度依赖的方式激活大鼠纹状体突触体TH的活性, 增加l-dopa的积聚, 选择性DA自身受体激动剂LY171555则以浓度依赖方式抑制FSK对TH的激活。而LY171555则不影响dbcAMP对TH的激活效应。这些结果即可确定DA自身受体对TH活性抑制的作用部位是AC, 即抑制AC的活性, 减少cAMP的生成, 进而减弱PKA对TH的磷酸化和激活作用, 而不是直接影响PKA对TH的磷酸化调节。

参 考 文 献

- 1 Hu G, Jin GZ. (-)-Stepholidine antagonizes the inhibition by D_2 receptor agonists on synaptosomal tyrosine hydroxylase in rat corpus striatum. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, 16: 376
- 2 Hu G, Hu Y, Jin GZ. Antagonism of l-stepholidine on D_2 receptor-mediated inhibition of synaptosomal adenylate cyclase in rat corpus striatum.

DOPAMINE AUTORECEPTORS REGULATE THE ACTIVITY OF TYROSINE HYDROXYLASE THROUGH THE INHIBITION OF cAMP- DEPENDENT PHOSPHORYLATION

Hu Gang, Jin Guozhang

(Laboratory of Neuropharmacology, Xuzhou Medical College,
Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

To search into the mechanism of the negative feedback regulation of dopamine (DA) biosynthesis mediated by DA autoreceptors, the activity of synaptosomal tyrosine hydroxylase (TH) from rat striatum was assayed by HPLC-ECD method. The results showed that both adenylate cyclase (AC) activator forskolin (FSK) and protein kinase A (PKA) activator dibutyryl cAMP (dbcAMP) stimulated synaptosomal TH activity in a concentration-dependent manner, and therefore increased the formation of l-dopa. Moreover, DA autoreceptor agonist LY171555 could antagonize the activating effect of FSK on synaptosomal TH, but not that of dbcAMP. These results suggest that the negative feedback regulation on DA biosynthesis mediated by DA autoreceptors may be coupled with the inhibition of cAMP-dependent phosphorylation of TH through the inhibition of AC, but not of PKA.

KEY WORDS dopamine autoreceptors negative feedback regulation
tyrosine hydroxylase striatum synaptosomes

Acta Pharmacol Sin, 1992, 13: 104

- 3 McMullen BA. Striatal synaptosomal tyrosine hydroxylase activity: A model system for study of presynaptic dopamine receptors. *Biochem Pharmacol*, 1982, 31: 2643
- 4 Goldstein M. Regulatory mechanisms of dopamine biosynthesis at the tyrosine hydroxylase step. *J Pharm Pharmacol*, 1973, 25: 351
- 5 Zigmond RE. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Ann Rev Neurosci*, 1989, 12: 415
- 6 Campbell DG. Identification of four phosphorylation sites in the N terminal region of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem*, 1986, 261: 10489
- 7 Hu G, Jin GZ. Ca²⁺/phosphoinositide-dependent protein kinase involvement in K⁺ depolarization-induced activation of synaptosomal tyrosine hydroxylase from rat corpus striatum. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, in press

(收稿: 1995-11-10 修回: 1995-12-14)

(本文编辑: 程春开)