

对羟吡啶甲基腺苷在大鼠输精管 A_1 与非 A_1 受体作用

熊 杰 黄俊华

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 为进一步研究对羟吡啶甲基腺苷(HPMA)受体作用特点, 用离体大鼠前列腺端输精管, 比较了它与 A_1 受体特异性激动剂环己烷基腺苷(CHA)作用异同。结果表明, HPMA 有非 A_1 受体样突触后抑制作用, 能剂量依赖性地降低外源性 PE, NE, ACh 引起的输精管收缩反应; 在场刺激下它优先作用于突触前; 高剂量的 HPMA ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 不仅可完全抑制场刺激引起的输精管收缩反应, 同时还使组织对外源性 ACh 的反应性降低, 是突触前抑制和突触后抑制的共同结果。提示 HPMA 在大鼠输精管同时具有突触前 A_1 受体和突触后非 A_1 受体作用。

关键词 对羟吡啶甲基腺苷; 环己烷基腺苷; 嘌呤能受体; 突触前抑制; 突触后抑制

自 Drury 等首次报道腺苷的降血压作用^[1], 及其后 Burnstock 提出嘌呤能神经和嘌呤能受体概念^[2,3]后, 人们对腺苷这种体内生物活性物质及其类似物的生理作用、受体原理、构效关系等^[4~7]进行了广泛研究, 并发现和合成了大量较腺苷有更强的活性和选择性的类似物^[8,9]。N⁶-羟吡啶甲基腺苷(HPMA, N⁶-(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine) 是 80 年代从天麻共生菌密环菌中分离得到的微量活性腺苷 N⁶ 衍生物。HPMA 这一活性成分经药理学实验证明有减少运动、抗惊厥、抗缺氧、降血脂、脑保护等活性, 且毒性极低^[10,11]。它的化学结构和药理学活性均表明有腺苷 A_1 受体激动剂样的性质, 同时, 在离体大鼠近前列腺端输精管上的作用与 A_1 受体特异性激动剂 CHA 不完全相同。我们分别比较了有/无场刺激条件下, HPMA 和 CHA 对外源性 PE, NE 及 ACh 引起的大鼠输精管收缩反应的影响。

材 料 与 方 法

动物 体重 200~250 g ♂ Wistar 大鼠,

购于中国医学科学院实验动物养殖所。

药品与试剂 HPMA, N⁶-(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine, 本所合成室李河水提供; CHA (N⁶-cyclohexyladenosine), PE (phenylephrine), NE (norepinephrine), ACh (acetylcholine), 均购于 Sigma 公司, 溶于 0.9% 生理盐水。DPCPX (8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine), 购于 RBI, 先溶于少量 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 后以生理盐水稀释, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调至 pH 7.0, 再以生理盐水调至所需浓度。生理溶液采用 Krebs-Henseleit 溶液(KHS), 其组成为 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 118.3, NaHCO₃ 25.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, glucose 11.1。

方法 大鼠脱颈椎处死后, 沿正中腹白线剪开腹腔下端, 拉出两侧睾丸, 游离输精管。取近前列腺端 3 cm 浸入冰冷的 KHS 中(不需通氧), 用 KHS 缓冲液 1 ml 洗内壁后, 仔细剔除附着组织, 使输精管充分舒展, 留前列腺端 1.5 cm, 纵向悬挂于恒温 37°C 的 10 ml KHS 液浴槽, 持续通入 95% O₂/5% CO₂ 混合气, 1 g 静息张力平衡至少 60 min, KHS 液每 15 min 更换一次。每次反应后以 KHS 冲洗标本 3 次, 每次同样平衡 10 min, 至组织对工具药的反应

恢复到最初水平后方可再次给药, 以确保整个实验过程中组织的反应性相同。以 YSD-4G 药理生理实验多用仪(安徽蚌埠)造成恒定的矩形方波刺激, 刺激条件为 50 V, 0.125 Hz, 2 msec。输出方波两极分别接于浴槽内间距固定的两个平行铁圈, 形成稳定电场, 组织纵向悬挂于此电场中, 以 Type 3066 Pen recorder(四川仪表四厂)记录收缩力。数据处理时, 场刺激下, 以组织对场刺激的收缩反应为参照; 无场刺激时, 以组织对特定工具药的收缩反应为参照。

结 果

1 无场刺激时, HPMA 不同于 CHA 的突触后抑制作用(非 A₁ 样作用)

无场刺激条件下, 达到静息平衡后的离体大鼠近前列腺端输精管对外源性单剂量 NE (10⁻⁶ mol·L⁻¹) 和 ACh (10⁻⁴ mol·L⁻¹) 均能产生快速稳定的收缩反应, 收缩力大于 1 g。以这一稳定收缩反应为参照, 先在已平衡体系中加入不同剂量的 HPMA 与组织共同温育 5 min 后, 再给予外源性单剂量 NE (10⁻⁶ mol·L⁻¹) 或 ACh (10⁻⁴ mol·L⁻¹), 发现 HPMA 能剂量依赖性降低大鼠近前列腺端输精管对外源性单剂量 NE 和 ACh 的收缩反应(图 1), 当 HPMA 剂量为 3 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 时, 组织的收缩反应

分别为原有的 54.3% 和 45.2%, 不能完全被取消; 若在加入 HPMA 的同时再加入 A₁ 受体特异性拮抗剂 DPCPX (至 10⁻⁵ mol·L⁻¹), 由 HPMA 引起的抑制输精管收缩作用并没有得到反转, 仍为原有的 45.9% 和 42.5% (表 1)。A₁ 受体特异性激动剂 CHA (至 10⁻⁵ mol·L⁻¹) 在同样的实验中未发现类似 HPMA 的降低组织对外源性单剂量 NE 和 ACh 的收缩反应的作用; A₁ 受体特异性拮抗剂 DPCPX (至 10⁻⁵ mol·L⁻¹) 单独使用对外源性 NE 和 ACh 引起的组织收缩反应亦无影响, 说明 A₁ 受体不参与外源性 NE 和 ACh 引起的离体大鼠近前列腺端输精管的收缩反应, 提示 HPMA 的这种突触后抑制作用不是由 A₁ 受体介导。

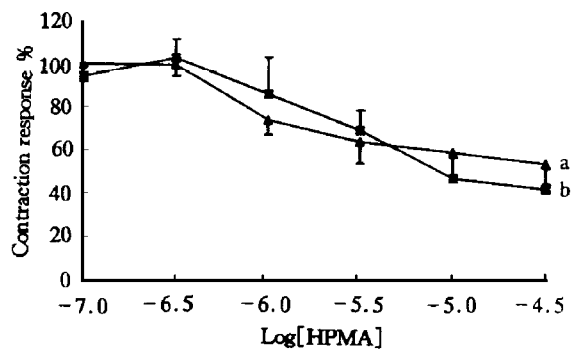


Fig 1 Effect of HPMA on the contraction response of rat vas deferens *in vitro* (n = 8). a. 10⁻⁶ mol·L⁻¹ NE; b. 10⁻⁴ mol·L⁻¹ ACh.

Tab 1 The actions of HPMA, CHA and DPCPX on the actions of norepinephrine(NE) and acetylcholine(ACh) in rat vas deferens *in vitro*

Group(mol·L ⁻¹)	CHA	HPMA	DPCPX	HPMA+DPCPX
NE 10 ⁻⁶	99.5 ± 5.4	59.2 ± 10.1 **	102.3 ± 5.1	45.9 ± 4.7 **
ACh 10 ⁻⁴	101.3 ± 6.9	47.2 ± 10.1 **	99.0 ± 8.5	42.5 ± 8.2 **

n = 8, mean ± s. The contraction response to 10⁻⁶ mol·L⁻¹ NE or 10⁻⁴ mol·L⁻¹ ACh was 100%. All concentrations of CHA (N⁶-cyclohexyladenosine), HPMA (N⁶-(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine) and DPCPX (8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine) were 10⁻⁵ mol·L⁻¹. ** P < 0.01.

2 场刺激下 HPMA 及 CHA 对 PE 和 ACh 收缩作用的影响

电场刺激下, 输精管能产生稳定的收缩反应(图 2a), 高浓度的 HPMA 和 CHA 均完全抑

制这一收缩反应。在场刺激的基础上给予外源性 PE, 输精管在场刺激收缩的背景上进一步产生剂量依赖性收缩反应(图 2b)。以 10⁻⁵ mol·L⁻¹ HPMA 和 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CHA 均能完

全抑制场刺激引起的收缩反应后。若再给外源性 PE, 组织虽然仍能产生收缩反应, 但量效曲

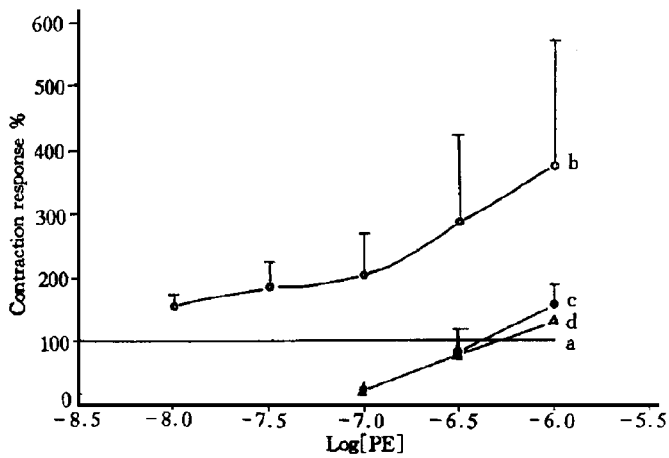


Fig 2 Effect of N^6 -(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine (HPMA) and N^6 -Cyclohexyladenosine (CHA) on the contraction response evoked by PE under field-stimulation of rat vas deferens *in vitro* ($n = 8$). a. contraction response under field-stimulation without PE; b. contraction response to PE under field-stimulation; c. contraction response to PE after adding $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HPMA under field-stimulation; d. contraction response to PE after adding $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHA under field-stimulation.

外源性 ACh 同样能使大鼠输精管在场刺激收缩的背景上进一步产生剂量依赖性收缩反应(图 3, b)。以 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HPMA 和 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHA 均可完全抑制场刺激引起的收缩反应后, 再给外源性 ACh, 组织仍有收缩反应, 量效曲线明显右移(图 3, c, d), HPMA 作用显示较 CHA 弱得多。

在场刺激条件下, 以 HPMA 抑制场刺激下收缩反应的 50% (IC_{50}) 后, 再给外源性 ACh, 发现组织对外源性 ACh 的反应性(扣除场刺激下的收缩背景)基本不变(图 4, a, b); 当以 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HPMA 完全取消场刺激引起的收缩反应后, 再给外源性 ACh, 组织的反应性减弱, 量效曲线明显右移(图 4, b, c)。

线明显右移(图 2, c, d)。HPMA 组与 CHA 组之间无显著性差异。

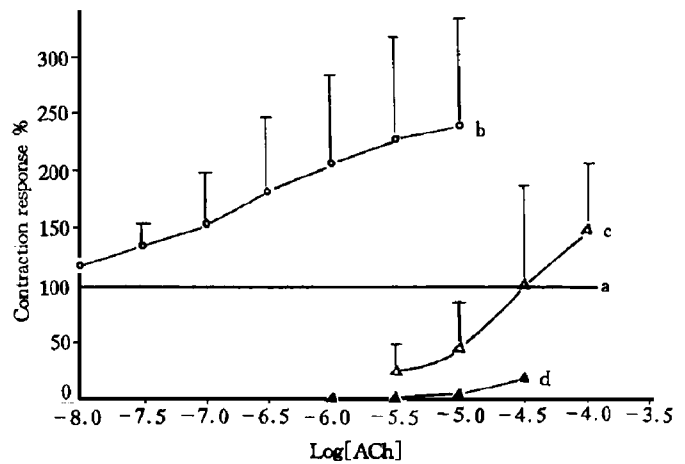


Fig 3 Effect of HPMA and CHA on the contraction response evoked by ACh under field-stimulation of rat vas deferens *in vitro* ($n = 8$). a. contraction response under field-stimulation without ACh; b. contraction response to ACh under field-stimulation; c. contraction response to ACh after adding $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HPMA under field-stimulation; d. contraction response to ACh after adding $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHA under field-stimulation.

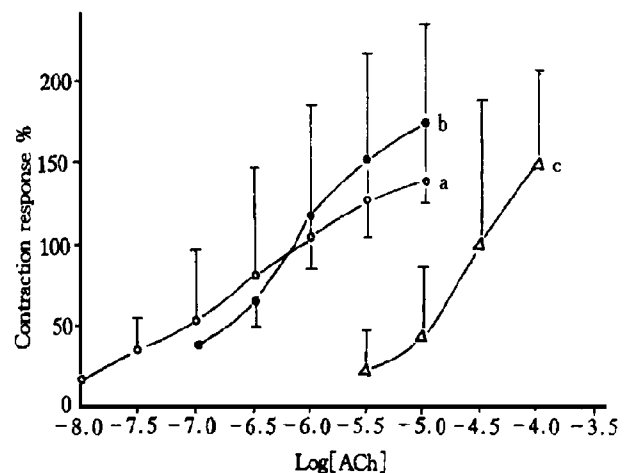


Fig 4 Effect of HPMA on the contraction response evoked by ACh under field-stimulation of rat vas deferens *in vitro* ($n = 8$). The contraction response under field-stimulation is subtracted. a. contraction response to ACh; b. contraction response to ACh after adding HPMA to depress 50% contraction of field-stimulation; c. contraction response to ACh after adding $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHA under field-stimulation.

讨 论

无场刺激时,外源性 NE 和 ACh 的作用一般认为是突触后作用。CHA 对外源性 NE, ACh 引起的收缩反应均无抑制作用,说明它不具有突触后作用,符合 A_1 受体激动剂的性质;HPMA 的作用明显不同于 CHA,它可以剂量依赖性地抑制外源性 NE, ACh 引起的大鼠输精管收缩反应,而且这种明显的突触后抑制效应并不受 A_1 受体特异性拮抗剂 DPCPX 的影响,说明这一效应不是由 A_1 受体介导的,这是 HPMA 的非 A_1 样受体作用的一个典型表现。

在场刺激作用下,组织神经末梢释放出 NE, ACh, ATP 等神经递质,作用于突触后受体,引起输精管有规律的稳定收缩。HPMA 和 CHA 均可完全抑制这种场刺激引起的收缩反应,并且这种抑制作用可被 A_1 受体特异性拮抗剂 DPCPX 拮抗;在作用性质上,DPCPX 对 HPMA 的拮抗是非竞争性的,而对 CHA 的拮抗则是特异性的和竞争性的(未发表),说明 HPMA 在大鼠输精管的作用不同于经典的 A_1 受体特异性激动剂 CHA。在本实验中,当我们分别以 HPMA 和 CHA 完全抑制场刺激引起的收缩反应后,发现二者对外源性 ACh 的反应性存在不同。

本实验还显示,以 HPMA(约 $3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)抑制场刺激引起的收缩反应的 50% 后,并不影响场刺激下组织对外源性 ACh 的反应性;相同剂量的 HPMA 在无场刺激时,已对外源性 ACh 和 NE 引起的收缩反应有明显的抑制作用。说明在场刺激下, $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平的 HPMA 优先作用于突触前,发挥其 A_1 受体激动剂样作用,抑制场刺激引起的突触前递质释放,使收缩反应减弱,而对外源性 ACh 和 NE 的突触后作用无影响;只有在取消了场刺激后,该剂量的 HPMA 才对外源性 ACh 和 NE 的突触后作用产生抑制。以 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HPMA 完全抑制场刺激引起的收缩反应后,组织对外源性 ACh 的反应性明显降低,说明在场

刺激下,高浓度 HPMA($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的作用是突触前抑制和突触后抑制作用的总和。从本实验结果提示,在大鼠输精管,HPMA 不仅具有 A_1 样突触前抑制递质释放作用,还具有不同于 CHA 的非 A_1 样作用,即突触后抑制作用。在有场刺激存在的条件下,HPMA 首先表现出 A_1 样突触前抑制作用,随着浓度的增加才逐步表现出非 A_1 样突触后抑制作用。

参 考 文 献

- 1 Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenosine with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (Lond.)*, 1929, **68**:213
- 2 Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 1972, **24**:509
- 3 Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW and Bolis L, eds. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. New York: Raven Press. 1978:107~118
- 4 Sparks HV, Bardenheuer H. Regulation of adenosine formation by the heart. *Circ Res*, 1986, **58**:193
- 5 Burnstock G. Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels. *Trends Pharmacol Sci*, 1988, **9**:116
- 6 Yeung SM, Green RD. Agonist and antagonist affinities for inhibitory adenosine receptors are reciprocally affected by 5'-guanylylimidodiphosphate or N-ethylmaleimide. *J Biol Chem*, 1983, **258**:2234
- 7 Moos WH, Szotek DS, Bruns RF. N^6 -cycloalkyladenosines. Potent, A_1 -selective adenosine agonists. *J Med Chem*, 1985, **28**:1383
- 8 Dunwiddie TV, Worth TH, Olsson RA. Adenosine analogs mediating depressant effects on synaptic transmission in rat hippocampus: Structure-activity relationship for the N^6 subregion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1986, **334**:77
- 9 Paton DM. Structure-activity relations for presynaptic inhibition of noradrenergic and cholinergic transmission by adenosine: evidence for action on A_1 receptors. *J Auton Pharmacol*, 1981, **1**:287
- 10 Araki H, Huang JH. The adenosine analogue and cerebral protecting agent, AMG-1, has no effect on

delayed neuronal death following ischemia.
Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1989, **11**:731
11 Huang JH. Pharmacological properties of effective
component AMG-1 from *armillaria mellea*. Bridging

Biochemical Pharmacology and Traditional
Medicine-An International Symposium. Beijing,
1990:21

THE A₁- AND NON A₁-EFFECTS OF N⁶-(5-HYDROXY-2-PYRIDYL)- METHYL-ADENOSINE ON RAT VAS DEFERENS

Xiong Jie(Xiong J) and Huang Junhua(Huang JH)

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT N⁶-(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine (HPMA) is a novel N⁶-substituted adenosine analogue recently obtained from *Armillaria mellea* (an edible fungus on which depends the growth of the famous Chinese traditional drug *Gastrodia elata*). It has been shown to have some characters of A₁ receptor agonists of purinergic nerve. In this study, we compared the effects of HPMA with that of N⁶-Cyclohexyladenosine(CHA), an A₁ selective agonist, on rat vas deferens *in vitro*, and found remarkable differences between them. In our study, HPMA dose-dependently decreased the contraction responses to exogenous Phenylephrine(PE), Norepinephrine(NE) and Acetylcholine(ACh) on rat vas deferens, while CHA showed no effect on these responses. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX), an A₁ selective antagonist, did not show any influence on these effects of HPMA, indicating that the depression effect of HPMA may be through a non-A₁ mechanism. Using HPMA to decrease about 50% of the twitch responses evoked by field-stimulation on rat vas deferens, the responsiveness to exogenous ACh seemed to be similar to that without HPMA pretreatment. These indicate that HPMA at this dosage (IC₅₀ dosage) preferentially acted on pre-synapse (may be the A₁ receptor) to attenuate the release of neurotransmitters. At a high dosage(10⁻⁵ mol•L⁻¹), HPMA abolished the neurogenic twitch responses evoked by electrical field-stimulation, while the responsiveness of rat vas deferens to exogenous ACh was decreased showing both pre-synapse and post-synapse depression.

KEY WORDS Purinergic receptor; Pre-synapse depression; Post-synapse depression; N⁶-Cyclohexyladenosine(CHA); N⁶-(5-hydroxy-2-pyridyl)-methyl-adenosine(HPMA)