

Abstract

Project Code : MRG4580036

Project Title : Molecular Studies of the Action Mechanism of Corymine, an Alkaloid from *Hunteria zeylanica*, Using Receptor Expression in *Xenopus* oocytes

Investigator : Assistant Professor Dr. Pathama Leewanich Srinakharinwirot University

E-mail Address : pathama@swu.ac.th

Project Period : 2 years (1 July 2002- 30 June 2004)

Previous studies demonstrated that corymine, an indole alkaloid isolated from the leaves of *Hunter zeylanica*, dose-dependently inhibited strychnine-sensitive glycine-induced currents but its effect on glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor have not been identified. This study aimed to evaluate effects of corymine on NR1a/NR2B NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes using the two-electrode voltage clamp technique. The receptors expressed in oocytes injected with NR1a and NR2B subunit mRNAs showed pharmacological properties of NMDA receptors. Effects of corymine on NMDA-induced currents depended on glycine concentrations. Corymine (1-100 μ M) rarely reduced the NMDA-induced currents at saturated concentration of glycine (10 μ M) but it dose-dependently potentiated NMDA-induced currents in the presence of low concentrations of glycine (0.01-0.1 μ M). The potentiating effect was decreased when the concentration of glycine was increased. The NMDA-induced currents recorded from oocytes of day 3 and 4 after RNA injection were significantly potentiated by corymine but no potentiation was observed from the oocytes of day 6. Corymine potentiation of NMDA-induced currents in the oocytes of day 3 and 4 was significantly enhanced by spermine and reversed by the NMDA receptor antagonist AP-5 and the NMDA channel blocker MK801, but not by the non-specific chloride channel blocker DIDS. There was no correlation in the magnitudes of NMDA current potentiation effect between corymine and spermine. Taken together, this study suggests that corymine potentiates the NMDA-induced currents by interacting with the site different from the spermine binding site.

Keywords : corymine, potentiating effect, NR1a/NR2B NMDA receptor, *Xenopus* oocyte

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4580036

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ corymine ที่ได้จากต้นมูกขาวโดยใช้รีเซพเตอร์ที่ปรากฏในไข่กบ *Xenopus*

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ล้วนิช มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

E-mail Address : pathama@swu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (1 กรกฎาคม 2545 - 30 มิถุนายน 2547)

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโคลิซีนซึ่งเป็นสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้จากใบของต้นมูกขาว มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ strychnine-sensitive glycine receptor แต่ฤทธิ์ของโคลิซีนต่อ glycine binding site ที่อยู่บน NMDA receptor ยังไม่มีการศึกษามาก่อน งานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารโคลิซีนต่อการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA โดยเลือกศึกษารีเซพเตอร์ NMDA ชนิดที่ประกอบด้วย NR1a/NR2B subunits เพราะมีบทบาทสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำ โดยใช้ไข่กบ *Xenopus* เป็นแบบจำลองและเก็บข้อมูลโดยการวัดกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี two-electrode voltage clamp ผลการศึกษาพบว่ารีเซพเตอร์ที่เกิดขึ้นบนไข่กบที่ถูกฉีดด้วย RNA ของ NR1a และ NR2B subunits มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหมือนรีเซพเตอร์ NMDA ที่อยู่ในร่างกาย เมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโคลิซีนต่อการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA พบว่าฤทธิ์ของโคลิซีนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ glycine ที่ใช้ โคลิซีน (1-100 ไมโครโมล) ทำให้กระแสไฟฟ้าที่เกิดจากการกระตุ้นรีเซพเตอร์ NMDA ลดลงเพียงเล็กน้อยถ้าใช้ glycine ขนาด 10 ไมโครโมล แต่เมื่อลดขนาดของ glycine ลง (0.01-0.1 ไมโครโมล) พบว่าโคลิซีนทำให้ฤทธิ์ของ NMDA เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการเพิ่มการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA นี้ไม่ได้เกิดขึ้นกับไข่กบทุกใบ พบว่าฤทธิ์ของ corymine ขึ้นอยู่กับเวลาหลังจากฉีด RNA เข้าไปในไข่กบ โดยจะเห็นฤทธิ์นี้มากที่สุดหลังจากฉีด RNA ได้สองวัน หลังจากนั้นฤทธิ์จะลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งไม่เหมือนการออกฤทธิ์ของ spermine ที่จัดเป็น NMDA modulator ชนิดหนึ่ง spermine สามารถเพิ่มการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA ได้ในไข่ทุกใบ รวมทั้งไข่ที่ไม่สนองตอบต่อ corymine ทำให้เกิดสมมุติฐานว่าการรวมกันของ RNA subunits เพื่อประกอบเป็นรีเซพเตอร์ NMDA ในไข่กบอาจมีมากกว่าหนึ่งแบบ การออกฤทธิ์ของ corymine ในการเสริมฤทธิ์ NMDA ถูกยับยั้งได้ด้วย NMDA antagonist ทั้งที่เป็น competitive และ noncompetitive แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย non-specific chloride channel blocker นอกจากนี้ปริมาณการออกฤทธิ์ของ corymine และ spermine ไม่มีความสัมพันธ์กัน ผลการศึกษาทั้งหมดเหล่านี้สนับสนุนว่า การออกฤทธิ์ของ corymine ในการเพิ่มการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA เกิดจากการกระตุ้นรีเซพเตอร์ NMDA ตรงตำแหน่งที่แตกต่างจากตำแหน่งออกฤทธิ์ของ spermine และ corymine น่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่มีการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA บกพร่อง

คำหลัก : โคลิซีน, NR1a/NR2B subunit, ไข่กบ *Xenopus*, การเสริมฤทธิ์ รีเซพเตอร์ NMDA