



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ **corymine**
ที่ได้จากต้นมูกขาว
โดยใช้รีเซพเตอร์ที่ปรากฏในไข่กบ *Xenopus*

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลีวนิช

มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ **corymine**
ที่ได้จากต้นมูกขาว
โดยใช้รีเซพเตอร์ที่ปรากฏในไข่กบ *Xenopus*

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลีวนิช
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นการรายงานการวิจัยที่ได้รับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของ
อาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2545 จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย ตามสัญญาเลขที่ MRG4580036

ขอขอบคุณ Professor Hiroshi Watanabe, Professor Kinzo Matsumoto และ Assistant
Professor Michihisa Tohda, Division of Medicinal Pharmacology, Institute of Natural Medicine,
Toyama Medical and Pharmaceutical University ในการให้คำปรึกษาแนะนำและความช่วยเหลือ
เกี่ยวกับเทคนิคต่าง ๆ ทางอนุชีววิทยา ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณ
รองศาสตราจารย์สมัยศึก โสภาสรรค์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ใน
การให้คำปรึกษาแนะนำและการสนับสนุนเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยนี้
ต่อไปได้ด้วยความเรียบร้อย

ขอขอบคุณ Professor Hiromitsu Takayama, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba
University ในการเตรียมสารบริสุทธิ์ corymine และสารอื่นที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้าย corymine

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุน กำลังใจ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ทำให้สามารถ
ดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

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 *Hunteria 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 μM) rarely reduced the NMDA-induced currents at saturated concentration of glycine (10 μM) but it dose-dependently potentiated NMDA-induced currents in the presence of low concentrations of glycine (0.01-0.1 μM). 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 ที่ได้จากต้นมูกขาวโดย
ใช้รีเซพเตอร์ที่ปรากฏในไขกบ *Xenopus*

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลีวนิช มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

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

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

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโคลิมีนซึ่งเป็นสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้จากใบของต้นมูกขาว มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ strychnine-sensitive glycine receptor แต่ฤทธิ์ของโคลิมีนต่อ glycine binding site ที่อยู่บน NMDA receptor ยังไม่มีการศึกษามาก่อน งานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารโคลิมีนต่อการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA โดยเลือกศึกษารีเซพเตอร์ NMDA ชนิดที่ประกอบด้วย NR1a/NR2B subunits เพราะมีบทบาทสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำ โดยใช้ไขกบ *Xenopus* เป็นแบบจำลองและเก็บข้อมูลโดยการวัดกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี two-electrode voltage clamp ผลการศึกษาพบว่ารีเซพเตอร์ที่เกิดขึ้นบนไขกบที่ถูกฉีดด้วย RNA ของ NR1a และ NR2B subunits มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหมือนรีเซพเตอร์ NMDA ที่อยู่ในร่างกาย เมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโคลิมีนต่อการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA พบว่าฤทธิ์ของโคลิมีนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ glycine ที่ใช้ โคลิมีน (1-100 ไมโครโมล) ทำให้กระแสไฟฟ้าที่เกิดจากการกระตุ้นรีเซพเตอร์ NMDA ลดลงเพียงเล็กน้อยถ้าใช้ glycine ขนาด 10 ไมโครโมล แต่เมื่อลดขนาดของ glycine ลง (0.01-0.1 ไมโครโมล) พบว่าโคลิมีนทำให้ฤทธิ์ของ NMDA เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการเพิ่มการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA นี้ไม่ได้เกิดขึ้นกับไขกบทุกใบ พบว่าฤทธิ์ของ corymine ขึ้นอยู่กับเวลาหลังจากฉีด RNA เข้าไปในไขกบ โดยจะเห็นฤทธิ์นี้มากที่สุดหลังจากฉีด RNA ได้สองวัน หลังจากนั้นฤทธิ์จะลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งไม่เหมือนการออกฤทธิ์ของ spermine ที่จัดเป็น NMDA modulator ชนิดหนึ่ง spermine สามารถเพิ่มการทำงานของรีเซพเตอร์ NMDA ได้ในไขกบทุกใบ รวมทั้งไขที่ไม่สนองตอบต่อ corymine ทำให้เกิดสมมุติฐานว่าการรวมกันของ RNA subunits เพื่อประกอบเป็นรีเซพเตอร์ NMDA ในไขกบอาจมีมากกว่าหนึ่งแบบ 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 : โคลิมีน, NR1a/NR2B subunit, ไขกบ *Xenopus*, การเสริมฤทธิ์ รีเซพเตอร์ NMDA

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
Abstract	ii
บทคัดย่อ	iii
เนื้อหางานวิจัย	
1. บทนำ	1
2. วิธีการทดลอง	3
3. ผลการทดลอง	5
4. บทวิจารณ์	14
5. หนังสืออ้างอิง	16
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.	v
ภาคผนวก	vi

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

1.1 *Hunteria zeylanica* และ Corymine

Hunteria zeylanica เป็นพืชในตระกูล Apocynaceae (Hooker, 1980-1982; Ridley 1923) ที่จัดว่ามีสารพวก indole alkaloids เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิดและด้วยปริมาณที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับส่วนต่าง ๆ ของพืชและแหล่งที่มา (Lavaud et al, 1982; Arambewela and Khuong-Huu, 1981) alkaloids เป็นสารที่มีฤทธิ์แรง และมีความเป็นไปได้อาจสูงที่จะนำมาใช้เป็นยารักษาโรค ในสมัยโบราณมีการนำ *Hunteria zeylanica* มาใช้รักษาโรค (Perry and Metzger, 1980; Whitmore, 1973) สำหรับประเทศไทย พบ *Hunteria zeylanica* ได้ที่ทางภาคใต้ มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นว่า มูกขาวหรือยางขาว เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบและเปลือกของต้นไม้นี้พบว่าประกอบด้วยสารประเภท indole alkaloid หลายชนิด (Subhadhirasakul, 1994a; 1994b) สารสกัดหยาบ alkaloids ที่ได้จากเปลือกของพืชชนิดนี้มีฤทธิ์ในการระงับปวด ลดไข้ และแก้ชักเสบ (Reanmongkol, 1994a; 1994b) สารสกัดหยาบ alkaloid จากใบมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง corymine ซึ่งเป็น indole alkaloid ชนิดหนึ่งและเป็นสารหลัก (main compound) ที่สกัดได้จากใบ (Takayama et al, 1994) มีฤทธิ์ส่งเสริมการทำงานของสารกระตุ้นระบบประสาท (CNS stimulants) บางชนิดในสัตว์ทดลอง (Leewanich, 1996) เมื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต่อรีเซพเตอร์ที่ปรากฏในไขกบ *Xenopus* หลังจากฉีด mRNA ที่แยกมาจากสมองหรือไขสันหลังของสัตว์ทดลอง พบว่า corymine สามารถยับยั้งการทำงานของ strychnine-sensitive glycine receptors และ GABA_A receptors (Leewanich, 1997) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ corymine บางตำแหน่งทำให้การออกฤทธิ์ต่อรีเซพเตอร์ทั้งสองแตกต่างกัน (Leewanich, 1998a) เมื่อศึกษาผลของ corymine ในการยับยั้ง glycine receptors พบว่า corymine จับกับ glycine receptors คนละตำแหน่งกับที่ glycine เข้าไปจับ (Leewanich, 1998b) แต่ยังไม่สามารถพิสูจน์ตำแหน่งการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของ corymine ได้

โครงการวิจัยนี้ได้กำหนดขึ้น เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ corymine ต่อ NMDA receptors เพราะจัดเป็น inotropic receptors เช่นเดียวกันกับ glycine receptors มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น (stimulatory effects) การทำงานของระบบประสาทส่วนกลางที่สำคัญ NMDA receptors มีตำแหน่งสำหรับ glycine เข้าไปจับและต้องมี glycine อยู่ด้วยเสมอในการกระตุ้นรีเซพเตอร์ (Huettner, 1991) มีโรคหลายอย่างที่สามารถรักษาได้ด้วยยาที่ออกฤทธิ์ผ่านรีเซพเตอร์ชนิดนี้ ยาที่ออกฤทธิ์ผ่าน NMDA receptors สามารถนำไปใช้รักษา ความซึมเศร้า ความจำเสื่อมในโรคที่มี

ความผิดปกติทางระบบประสาท เช่น Alzheimer's dementia และ Parkinson's disease เป็นต้น (Muller et al, 1995; Johnson et al, 1993; Rogawski, 1993) ยาที่ออกฤทธิ์ผ่านรีเซพเตอร์เหล่านี้ประกอบด้วยยาที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายมาก รวมทั้งที่เป็นสาร alkaloids ด้วย ยาเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาแตกต่างกันได้ เช่น กลไกการออกฤทธิ์ ความแรงในการออกฤทธิ์ ประสิทธิภาพในการรักษาโรค และการเกิดอาการข้างเคียง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของยาเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (Mathison et al, 1995) โครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันจะทำให้ยาสามารถจับและเกิดปฏิกิริยาต่อรีเซพเตอร์แต่ละชนิดได้ต่างกัน (Mehta and Ticku, 1999; Yamakura and Shimoji, 1999) ด้วยเหตุนี้ การแบ่งชนิดของรีเซพเตอร์และรีเซพเตอร์ย่อย (subtypes) จึงอาศัยความสามารถในการออกฤทธิ์ของยาเป็นตัวกำหนด

1.2 Receptor expression in *Xenopus* oocytes

ระเบียบวิธีการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต อาจแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การศึกษาที่ทำกับร่างกายของสิ่งมีชีวิต หรือที่เรียกว่า *in vivo* study และการศึกษาที่ทำในหลอดทดลอง โดยแยกเซลล์หรือเนื้อเยื่อบางส่วน of สิ่งมีชีวิตนั้นออกมาศึกษา เรียกว่า *in vitro* study การวิจัยในทางเภสัชวิทยาก็เช่นเดียวกัน เมื่อต้องการศึกษาผลที่เกิดจากการออกฤทธิ์ของยาต่อร่างกายทั้งระบบก็จะต้องศึกษาแบบ *in vivo* แต่เมื่อต้องการศึกษาเพื่อทำความเข้าใจสิ่งที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์หรือโมเลกุล ต้องศึกษาแบบ *in vitro* เพราะการศึกษาแบบ *in vivo* จะไม่สามารถให้คำตอบได้ชัดเจนเนื่องจากร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในคนและสัตว์ มีกลไกควบคุมการทำงานระหว่างเซลล์ หรือระหว่างเนื้อเยื่อ หรือระหว่างระบบต่างๆ ซึ่งกันและกัน และมีความสลับซับซ้อน การศึกษาแบบ *in vitro* เป็นวิธีการศึกษาที่เหมาะสม เพราะสามารถเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนออกมาศึกษาได้ เป็นการตัดตอนกลไกควบคุมที่ซับซ้อนจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนอื่นออกไป

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาที่ออกฤทธิ์ผ่านรีเซพเตอร์ นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามศึกษาวิจัยเพื่อทำความเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาเหล่านี้ โดยการคิดค้นหาวิธีการและเทคนิคต่างๆในการศึกษา เทคนิคที่มีอยู่ส่วนมากเกี่ยวข้องกับการตัดชิ้นเนื้อของเนื้อ (tissue slice) การบดละเอียดเนื้อเยื่อ (membrane homogenate) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) ซึ่งเป็นเทคนิคทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เทคนิคทางเภสัชวิทยาที่เคยนิยมใช้กันมาก คือ การใช้สารรังสี เพื่อศึกษาการจับกันระหว่างยากับรีเซพเตอร์ (radioligand – binding assay) เทคนิคเหล่านี้มีข้อเสีย คือผลที่ได้บางครั้งไม่สัมพันธ์กับปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย เนื่องจากกรรมวิธีที่ยุ่งยาก หลายขั้นตอน ทำให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นกลายสภาพไปได้ นักวิทยาศาสตร์จึงได้พยายามคิดค้นหาวิธีการและเทคนิคใหม่ๆ ที่ไม่ซับซ้อนและมีความน่าเชื่อถือมากกว่า เริ่มจากในปี 1971 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ John Gurdon และเพื่อนร่วมงานของเขา (Gurdon et al, 1971) ค้นพบว่าไข่

ของกบ *Xenopus laevis* สามารถสังเคราะห์โปรตีนจาก RNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ฉีดเข้าไปในไซโตพลาสซึมได้ การค้นพบนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญยิ่งในการพลิกโฉมงานวิจัยทางเภสัชวิทยา เพราะต่อมาในปี 1982 Miledi และเพื่อนร่วมงานของเขา (Miledi et al, 1982) ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าไซของกบ *Xenopus laevis* นั้นสามารถสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นรีเซพเตอร์ของยาในกลุ่ม GABA_A (gamma- aminobutyric acid) ได้เมื่อฉีด mRNA ที่แยกสกัดมาจาก optic lobe ของไก่ ทั้งนี้เป็นเพราะว่ารีเซพเตอร์ส่วนใหญ่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงได้ให้ความสนใจต่อเทคนิคนี้กันอย่างมาก ทำให้ต่อมาพบว่านอกจาก GABA แล้ว ยังมีรีเซพเตอร์ของยาอีกหลายชนิดที่ไซของกบชนิดนี้สามารถสังเคราะห์ได้ ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของ mRNA เช่น การใช้ mRNA ที่สกัดได้จากสมองของคนหรือสัตว์ทดลอง เช่น หนู ไซกบชนิดนี้จะสามารถสังเคราะห์รีเซพเตอร์ของยาในกลุ่ม GABA, glycine, glutamate และ kainate ได้ การใช้ mRNA ที่ได้จากไขสันหลังของสัตว์ก็จะทำให้สามารถสังเคราะห์รีเซพเตอร์ของ NMDA (N-methyl-D-aspartate) และ glycine ได้ นอกจากนี้นักวิจัยยังพบว่ารีเซพเตอร์ที่เกิดขึ้นจากไซกบชนิดนี้มีคุณลักษณะและทำหน้าที่ได้คล้ายกับรีเซพเตอร์ที่มีอยู่ในร่างกาย และเป็นที่ยอมรับว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคของไซกบนี้สามารถนำไปอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นจริงกับรีเซพเตอร์ในร่างกายได้ (Soreq and Seiman, 1992)

ในทางเภสัชวิทยา เราสามารถแบ่งรีเซพเตอร์ออกเป็นชนิดต่าง ๆ ได้โดยใช้ความแตกต่างในการตอบสนองต่อสารที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของรีเซพเตอร์ หรือที่เรียกว่า agonist และสารที่ทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของรีเซพเตอร์ หรือเรียกว่า antagonist ดังนั้น ในการทดสอบว่ารีเซพเตอร์ที่เกิดขึ้นในไซกบมีคุณสมบัติเหมือนรีเซพเตอร์ที่เกิดขึ้นในร่างกายหรือไม่ และเป็นชนิดใด ก็สามารถทำได้โดยใช้สารที่เป็น agonist และ antagonist เหล่านั้นเป็นตัวทดสอบ เช่น การทดสอบการสังเคราะห์รีเซพเตอร์ของ NMDA รีเซพเตอร์ที่ได้จะต้องถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วยสารที่เป็น agonist ของมัน คือ glutamate หรือ NMDA และ glycine ถูกเสริมฤทธิ์เมื่อให้ร่วมกับยาที่เป็น modulator กลุ่ม polyamine และถูกยับยั้งได้ด้วยสารที่เป็น antagonist คือ AP-5 และ MK-801 ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้เกิดขึ้นจริงกับรีเซพเตอร์ของ NMDA ที่ทำหน้าที่อยู่ในสมอง

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียม corymine

corymine และสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้าย corymine ได้รับมาจาก Professor Hiromitsu Takayama (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University) corymine ถูกเตรียมมาจากใบของ *Hunteria zeylanica* โดย มีขั้นตอนการเตรียมโดยย่อ คือ นำใบแห้งของ

Hunteria zeylanica มาแช่ด้วย 25 % ammonium hydroxide เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาสกัดด้วย methanol และ chloroform ตามลำดับ หลังจากที่เราเหวี่ยงแยกได้ความเข้มข้นแล้ว นำสารสกัดหยาบ chloroform มาแยกต่อโดยใช้ column chromatography จนได้สารบริสุทธิ์ corymine ออกมาใช้ศึกษาตลอดโครงการวิจัย

2.2 สัตว์ทดลอง

กบที่ใช้ในโครงการนี้ได้แก่ กบพันธุ์ *Xenopus laevis* เพศเมียที่มีถิ่นกำเนิดมาจากแอฟริกาใต้ ถูกนำมาเลี้ยงในอ่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดประมาณ 1×0.5 เมตร ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศ ที่ 18 ± 1 องศาเซลเซียส และควบคุมแสงสว่างในห้องด้วยสวิทช์ ปิด-เปิดอัตโนมัติทุก 12 ชั่วโมง โดยกำหนดให้มีแสงสว่างในช่วงเวลาระหว่าง 7-19 นาฬิกา อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงปลาดุก โดยให้อาหารสัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง และทำความสะอาดบ่อเลี้ยงสัปดาห์ละครั้งหรือตามความจำเป็น

2.3 การเตรียมไขกบ

นำกบมาทำให้สลบโดยการจุ่มลงในน้ำแข็งประมาณ 5 นาที แล้วทำการผ่าหน้าท้องด้านข้าง ยาวประมาณ 1 ซม. ตัดส่วนที่เป็นรังไข่ออกมาประมาณ 1 ลูก แล้วเย็บแผลปิดด้วยไหมละลาย นำกบกลับไปไว้ในอ่างเลี้ยงเมื่อเริ่มรู้สึกตัว ทำการแยกไข่แต่ละฟองออกจากกันด้วย fine forceps เลือกไข่ที่ผิดปกติออก นำไข่ที่มีสภาพสมบูรณ์ไปใส่ใน buffer ที่มีเอนไซม์ collagenase ทำการเขย่าเพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้ทั่วถึง collagen ที่หุ้มไข้อยู่จะถูกย่อยสลายออกไป เลือกไข่ที่อยู่ในระยะที่ 5 หรือ 6 ไว้สำหรับฉีด RNA

2.4 การเตรียม RNA

RNA ของ NR1a และ NR2B NMDA subunits ถูกเตรียมจาก cDNA ที่ได้รับมาจาก Professor Kazuei Igarashi (Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Chiba University) ด้วยการ translocation เข้าไปใน DH5alpha E. coli แล้วทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Miniprep kits (Quigen[®]) นำ DNA ที่ได้มาตัดด้วย restriction enzymes และทำการสังเคราะห์ ให้ได้ RNA โดยใช้ in vitro transcription kit (Ambion[®]) นำสารละลาย RNA มาละลายในน้ำกลั่น แล้วเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

2.5 การฉีด RNA เข้าไปในไขกบ

นำ RNA ที่ได้มาฉีดเข้าไปในไขกบในอัตราส่วนของ NR1a : NR2B = 1 : 4 โดยใช้ microinjector ปริมาตร 25 นาโนลิตร ฉีดเข้าไปตรงบริเวณที่เป็นไซโตพลาสซึมของไข่ ต้องระวัง

ไม่ให้มีการปนเปื้อน RNase แล้วนำไขที่ได้ไปแช่ใน buffer และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสเพื่อรอให้ไขสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นรีเซพเตอร์ ทำการเปลี่ยน buffer ทุกวัน และเลือกไขที่เสียหายออก

2.6 การเก็บข้อมูล

หลังจากเก็บไขไว้ในตู้เย็นได้ 2 วัน นำไขไปตรวจสอบว่ามีการสังเคราะห์รีเซพเตอร์ที่ต้องการหรือไม่ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า two-electrode voltage clamp ซึ่งประกอบด้วย electrode 2 ตัว บรรจุด้วย KCl โดยตัวหนึ่งสำหรับเป็นตัวยึดกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เซลล์เพื่อควบคุมความต่างศักย์ภายในเซลล์ให้คงที่ ที่ -60 mV และอีกตัวหนึ่งสำหรับวัดกระแสไฟฟ้าภายในเซลล์ของไขกบ การตรวจสอบการปรากฏของ NMDA รีเซพเตอร์ ทำโดยใช้สารมาตรฐาน NMDA $30\text{ }\mu\text{M}$ ร่วมกับ glycine $10\text{ }\mu\text{M}$ หยอดลงไปในไขกบที่หล่อเลี้ยงด้วย Mg^{2+} -free MBS solution (modified Barth's solution: 88 mM NaCl , 1 mM KCl , 0.41 mM CaCl_2 , $0.33\text{ mM Ca(NO}_3)_2$, 2.4 mM NaHCO_3 , $7.5\text{ mM Tris-(hydroxymethyl) aminomethane}$, pH 7.6). ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีต่าง ๆ คือ ถ้ามีการแสดงออกของรีเซพเตอร์จะได้กราฟหัวกลับปรากฏตามจังหวะการหยอดสาร

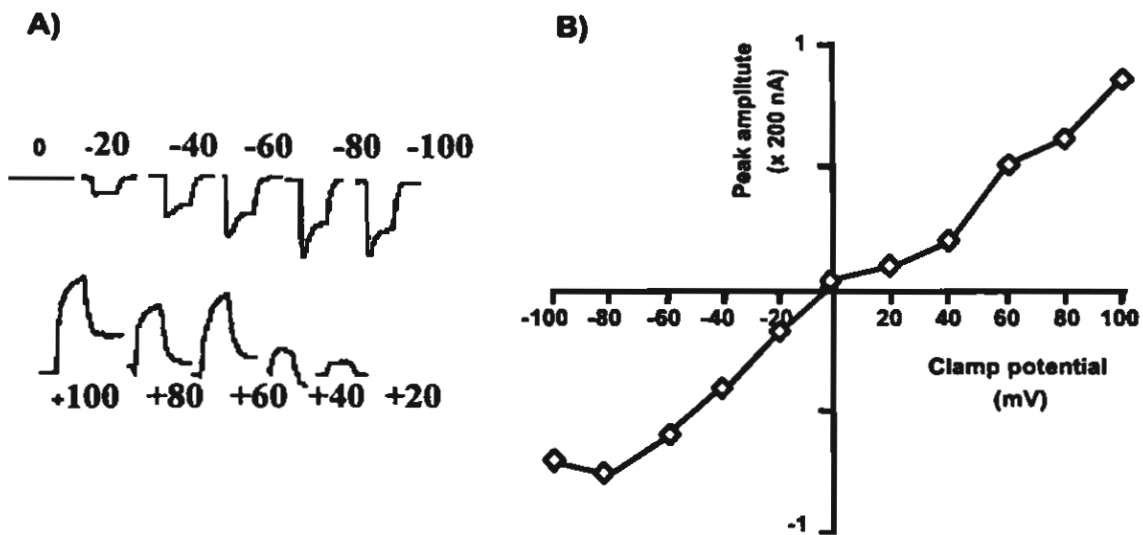
3. ผลการทดลอง

3.1 การทดสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของ NMDA receptor ที่ปรากฏ

เพื่อศึกษาว่า NMDA receptor ที่ปรากฏบนไขกบมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหมือน NMDA receptor ที่มีอยู่ในร่างกายหรือไม่ ได้ทำการวิจัยโดยการใส่ Mg^{2+} -free MBS solution ที่มี NMDA และ glycine ผสมอยู่ลงไป chamber ที่มีไขกบวางอยู่ แล้วทำการบันทึกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ผลการวิจัยพบว่า

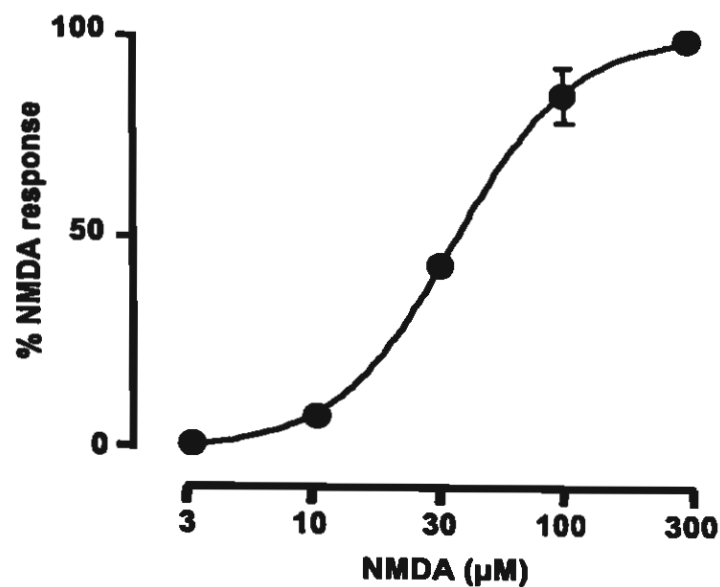
1) การใส่ NMDA และ glycine ลงไปในสารละลายที่หล่อเลี้ยงไขกบ ทำให้เกิดการเคลื่อนผ่านเข้าออกของกระแสไฟฟ้าภายในไขกบ (NMDA-induced current) ซึ่งสามารถวัดออกมาเป็น downward deflection เมื่อ clamp เซลล์ของไขกบไว้ที่ -120 ถึง -20 mV และลักษณะกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็น upward deflection เมื่อ clamp ที่ $+20$ mV ถึง $+100$ mV (รูปที่ 1)

2) การให้ NMDA ขนาดต่าง ๆ จะทำให้ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเปลี่ยนไปตามความเข้มข้นของ NMDA ที่ใช้ (dose-dependent) ความเข้มข้นของ NMDA ที่ทำให้เกิดการตอบสนองเป็นครึ่งหนึ่งของการตอบสนองสูงสุด (ED_{50}) มีค่าประมาณ $50\text{ }\mu\text{M}$ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1. แสดง reverse potential ของ NMDA receptors

A) เป็น tracing แสดงการตอบสนองของ NMDA receptor ต่อ NMDA เมื่อใช้กับถูก clamp ด้วยค่า potential ต่างกัน, B) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง clamp potential และ peak amplitude ของการตอบสนอง



รูปที่ 2. Dose-response curve ของ NMDA receptor เมื่อใช้ 300 μM NMDA ที่มี 10 μM glycine อยู่เป็น control. แสดงข้อมูลด้วย mean $\pm$ S.E.M., n = 2

3) NMDA-induced current ที่เกิดขึ้นสามารถถูกยับยั้งได้เมื่อให้สารที่เป็น NMDA receptor competitive antagonist (AP5) และ NMDA receptor channel /noncompetitive blocker (MK-801) และถูกส่งเสริมได้เมื่อให้สารที่เป็น NMDA receptor modulator (spermine) (รูปที่ 3)

3.2 ฤทธิ์ของ corymine ต่อ NMDA-induced current

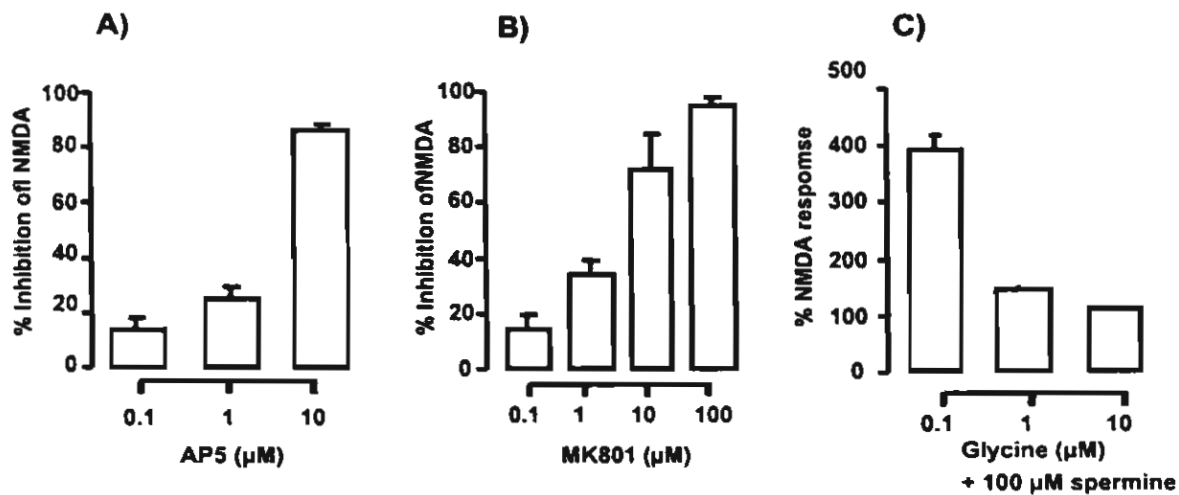
3.2.1 corymine ยับยั้ง NMDA-induced current

เพื่อศึกษาว่า corymine สามารถยับยั้ง NMDA-induced current ได้หรือไม่ NMDA ขนาด 30 หรือ 100 μM ที่มี glycine ขนาด 10 μM ผสมอยู่ถูกเลือกใช้เป็นค่าเริ่มต้น เมื่อให้ corymine 30 μM พร้อมกับ NMDA 100 μM พบว่า corymine ไม่สามารถลด NMDA-induced current ได้ การเพิ่ม corymine เป็น 100 μM สามารถลด NMDA-induced current ที่เกิดจาก NMDA 100 μM ได้เล็กน้อย ในทางตรงกันข้าม corymine 100 μM ทำให้ NMDA-induced current เพิ่มขึ้นเมื่อให้ครั้งแรก และลดลงในการให้ครั้งที่สอง เมื่อให้ซ้ำต่อไปอีกจะเห็นความสูงของ NMDA-induced current ค่อย ๆ ฟื้นกลับมา (รูปที่ 4) เมื่อทดสอบสารอื่นที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้าย corymine ได้แก่ dihydrocorymine (no 1), pleiocarpamine (no 2), (+)-isoburnamine (no 3), pleiomutinine (no 4), hunterioside (no 5) และ strictosidinic acid (no 6) ในขนาด 100 μM พบว่าสารหลายตัวก็ให้ผลคล้ายกับ corymine ขณะที่สารมาตรฐาน NMDA receptor competitive antagonist (AP5), NMDA receptor channel /noncompetitive blocker (MK-801) และ non-specific chloride channel blocker DIDS ไม่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว (รูปที่ 5, 6)

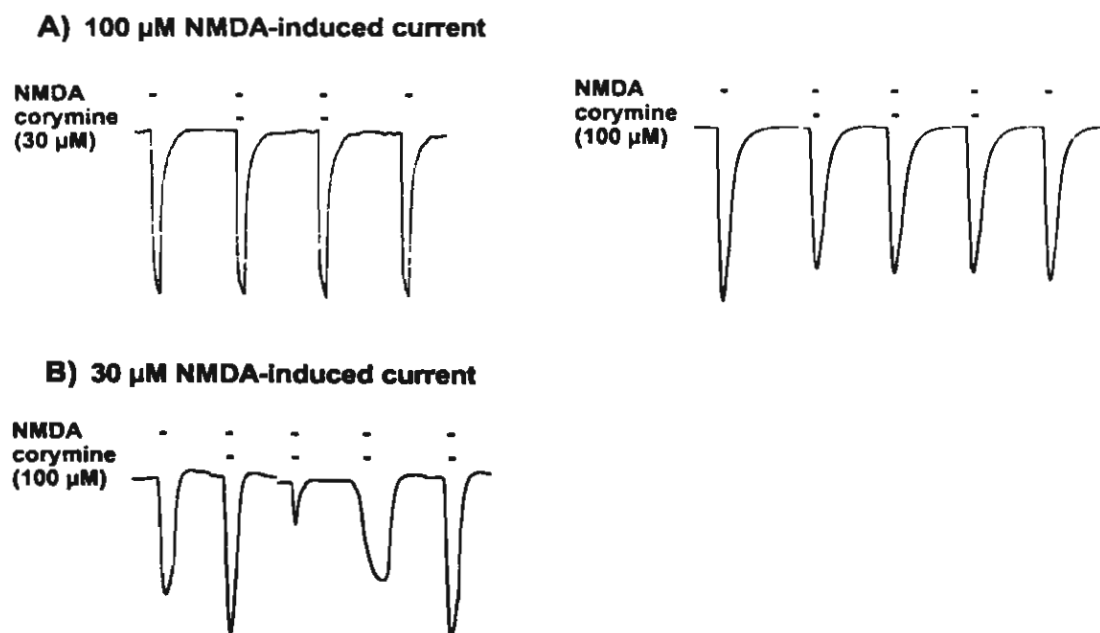
การให้ corymine (ขนาด 3-300 μM) พร้อมกับ NMDA (30 μM) พบว่า corymine 100 μM ยับยั้ง NMDA-induced current ได้ไม่เกิน 10 % แต่เมื่อเพิ่มเป็น 300 μM การยับยั้ง NMDA-induced current เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 20 % โดยมีความแปรปรวนสูงมาก (รูปที่ 7) การให้ corymine ก่อนให้ NMDA พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งของ corymine เพิ่มขึ้น (รูปที่ 8) นอกจากนี้การเปลี่ยนสารหล่อเลี้ยงไขกบเป็น Ca^{2+} -free MBS solution ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งของ corymine ลดลง (รูปที่ 9)

3.2.2 corymine เพิ่ม NMDA-induced current

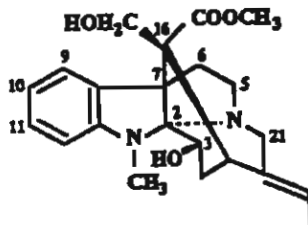
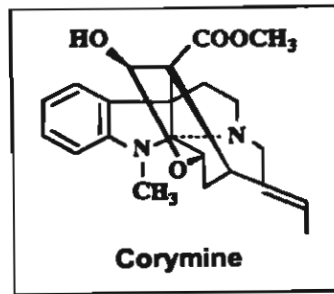
เพื่อศึกษาสาเหตุที่ทำให้ corymine และสารคล้าย corymine แสดงออกทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งและเพิ่ม NMDA-induced current เมื่อให้ซ้ำ การวิจัยครั้งนี้เริ่มด้วยการปรับขนาดความเข้มข้นของ glycine ให้น้อยกว่า 10 μM พบว่า corymine ทำให้ NMDA-induced current เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ glycine ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 μM (รูปที่ 10) และฤทธิ์ในการเพิ่ม NMDA-induced current ของ corymine ในแต่ละวันที่ทำการทดลองไม่คงที่ จึงติดตามการออกฤทธิ์ของ corymine ทุกวัน พบว่าฤทธิ์ในการเพิ่ม NMDA-



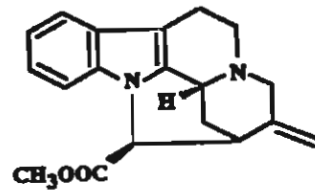
รูปที่ 3. ผลของ NMDA antagonists และ modulator ต่อ NMDA receptor AP5 (A) และ MK801 (B) ทำให้ NMDA -induced currents ที่เกิดจาก 30 μM NMDA และ 10 μM glycine ลดลงตามขนาดความเข้มข้นของสารที่ใช้ แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ S.E.M., n = 2-4 และ 4 ตามลำดับ, spermine (C) ทำให้ NMDA -induced currents ที่เกิดจาก 30 μM NMDA เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ glycine ลดลง แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ S.E.M., n = 4-10



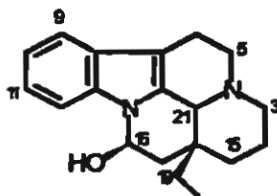
รูปที่ 4. การออกฤทธิ์ยับยั้ง NMDA-induced current ของ corymine เมื่อ NMDA-induced current เกิดจาก 100 μM NMDA และใช้ 30 หรือ 100 μM corymine (A) และ NMDA-induced current ที่เกิดจาก 30 μM NMDA และใช้ 100 μM corymine (B)



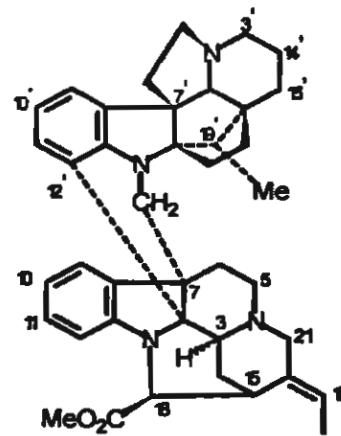
**Dihydrocorymine
(no 1)**



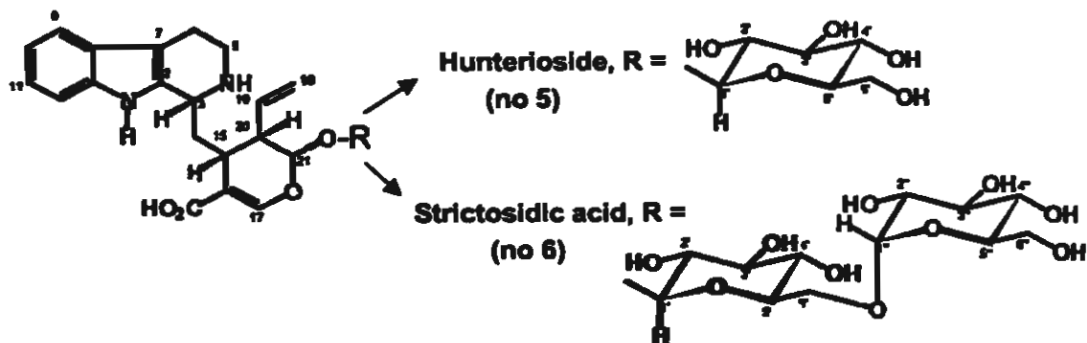
**Pleiocarpamine
(no 2)**



**(+)-Isoeburnamine
(no 3)**

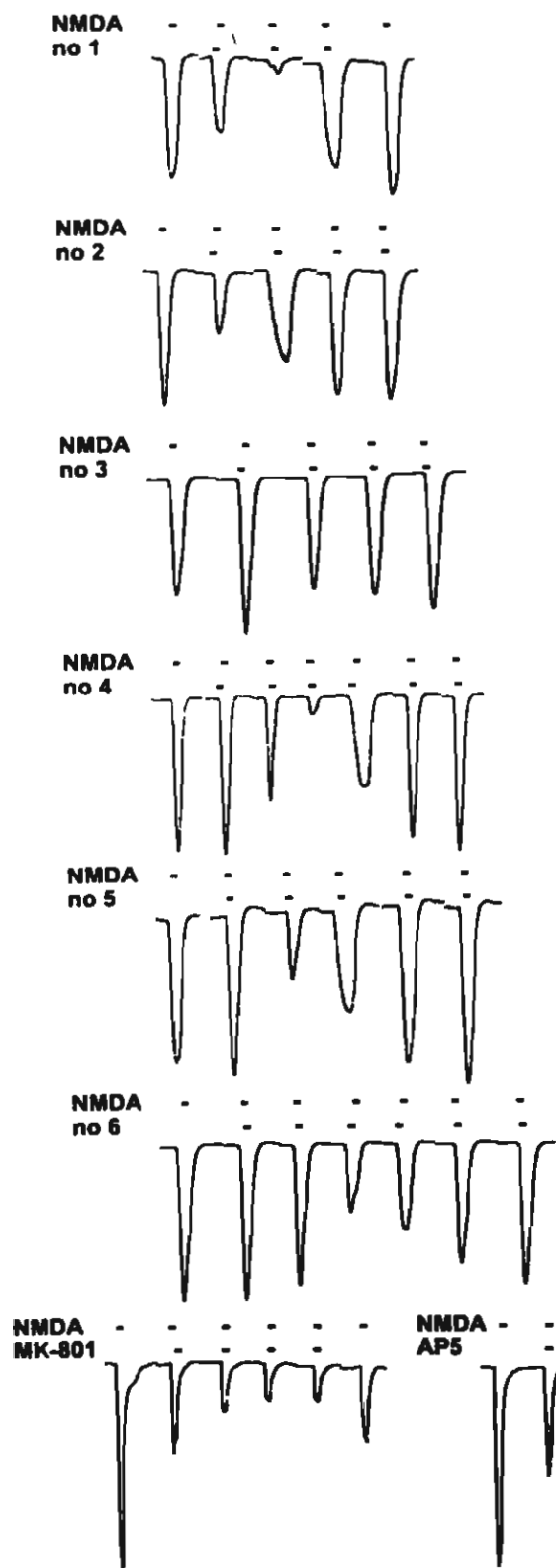


**Pleiomutinine
(no 4)**

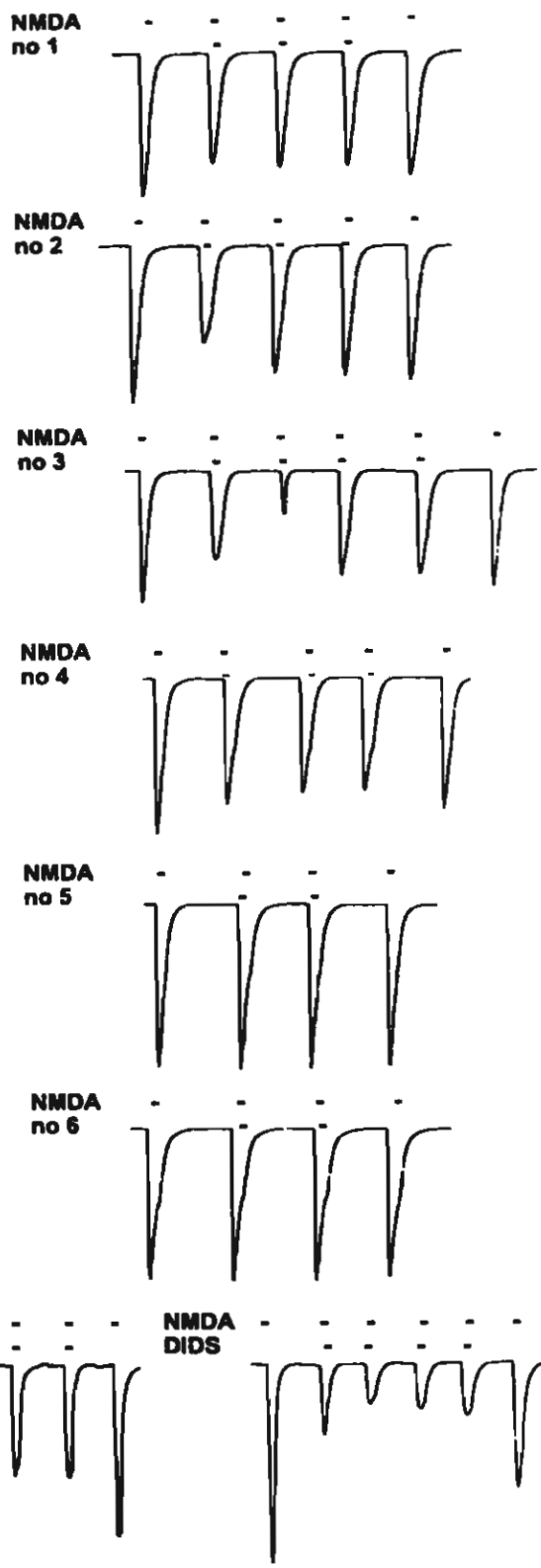


รูปที่ 5. โครงสร้างทางเคมีของ corymine และสารที่คล้าย corymine

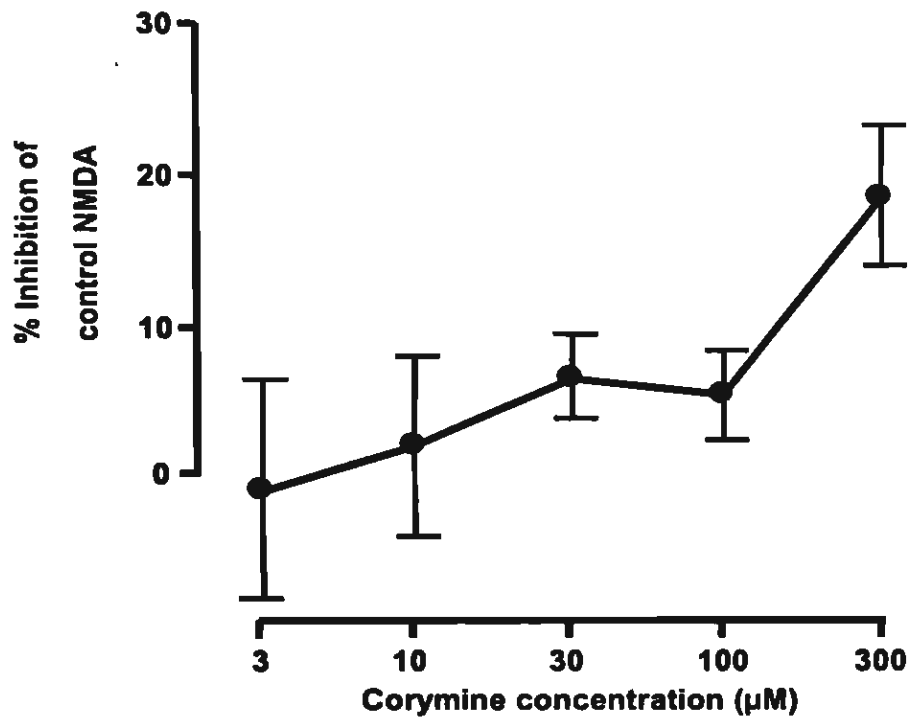
A) 30 μ M NMDA-induced current



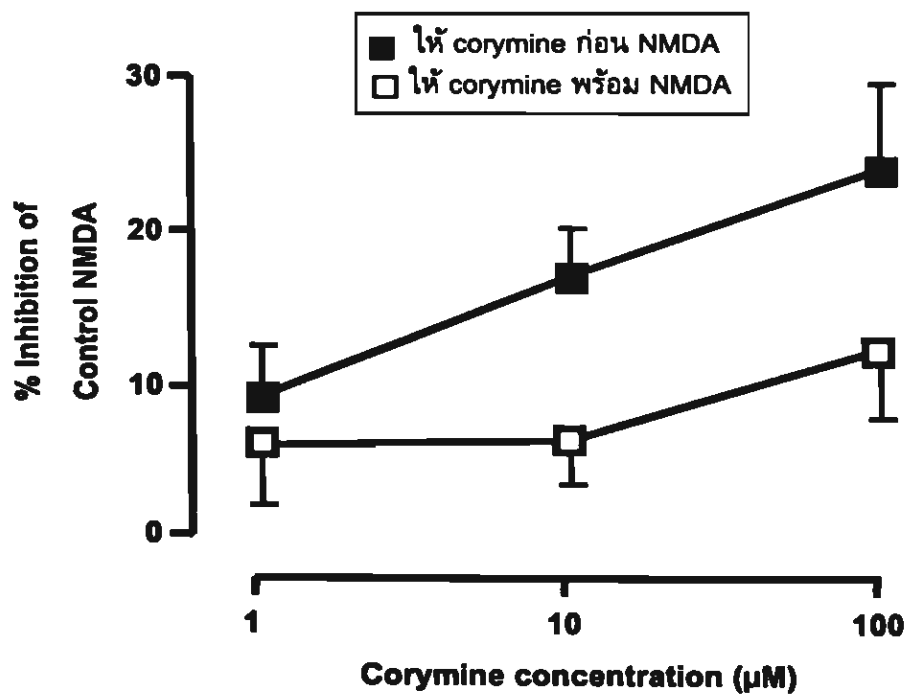
B) 100 μ M NMDA-induced current



รูปที่ 6. การออกฤทธิ์ยับยั้ง NMDA-induced current ของสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้าย corymin (ขนาด 100 μ M); dihydrocorymine (no 1), pleiocarpamine (no 2), (+)-isobumamine (no 3), pleiomutinine (no 4), hunterioside (no 5) และ strictosidinic acid (no 6) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน MK801, AP5 และ DIDS เมื่อใช้ NMDA ขนาด 30 μ M (A) และ 100 μ M (B)

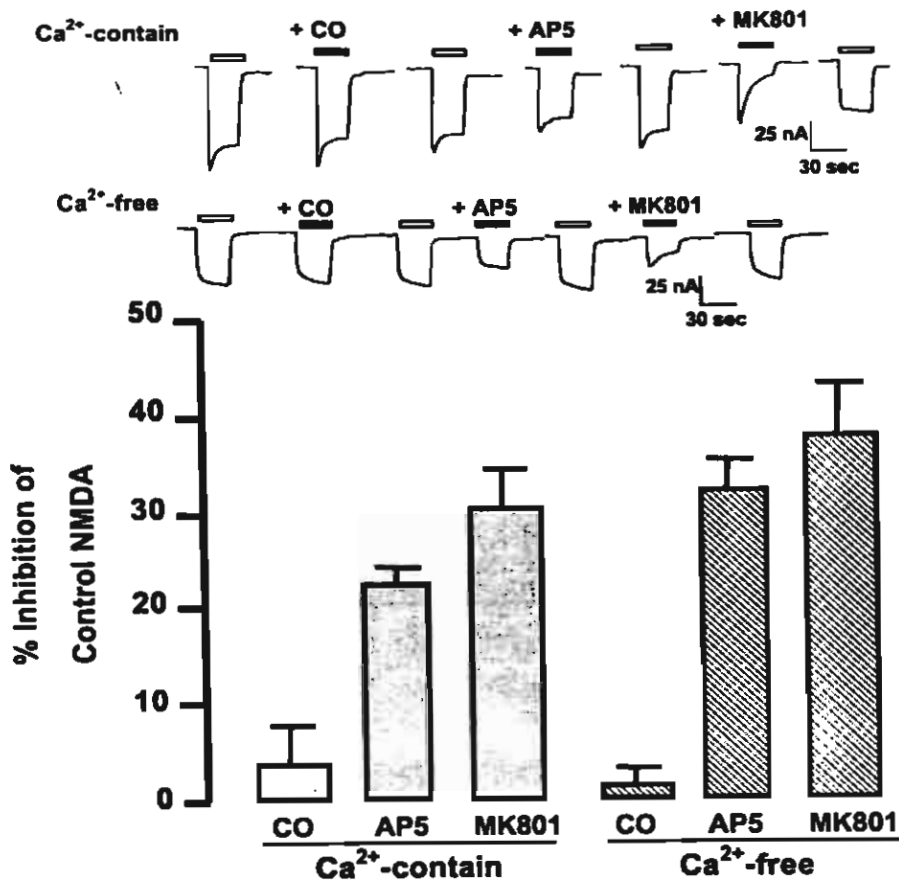


รูปที่ 7. Dose-response curve ของ corymine ในการยับยั้ง NMDA-induced current ที่เกิดจาก 30 μ M NMDA แสดงข้อมูลด้วย mean $\pm$ S.E.M., n = 6-8

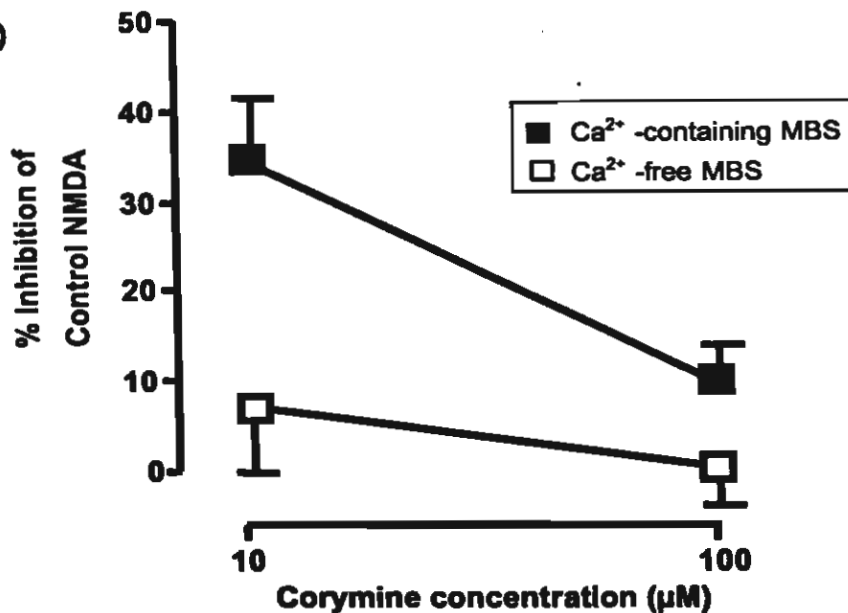


รูปที่ 8. ผลของการให้ corymine ก่อน และพร้อม NMDA NMDA-induced current เกิดจาก 30 μ M NMDA (และ 10 μ M glycine) แสดงข้อมูลด้วย mean $\pm$ S.E.M., n = 4-8

A)

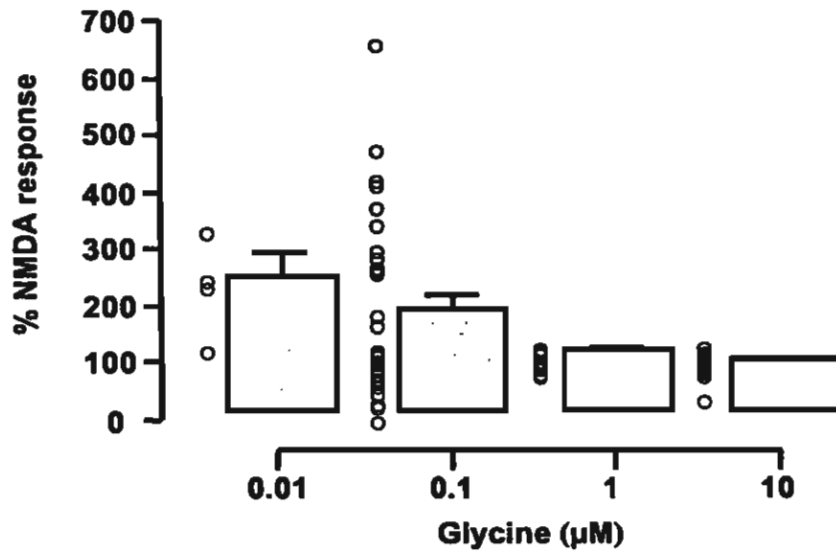


B)

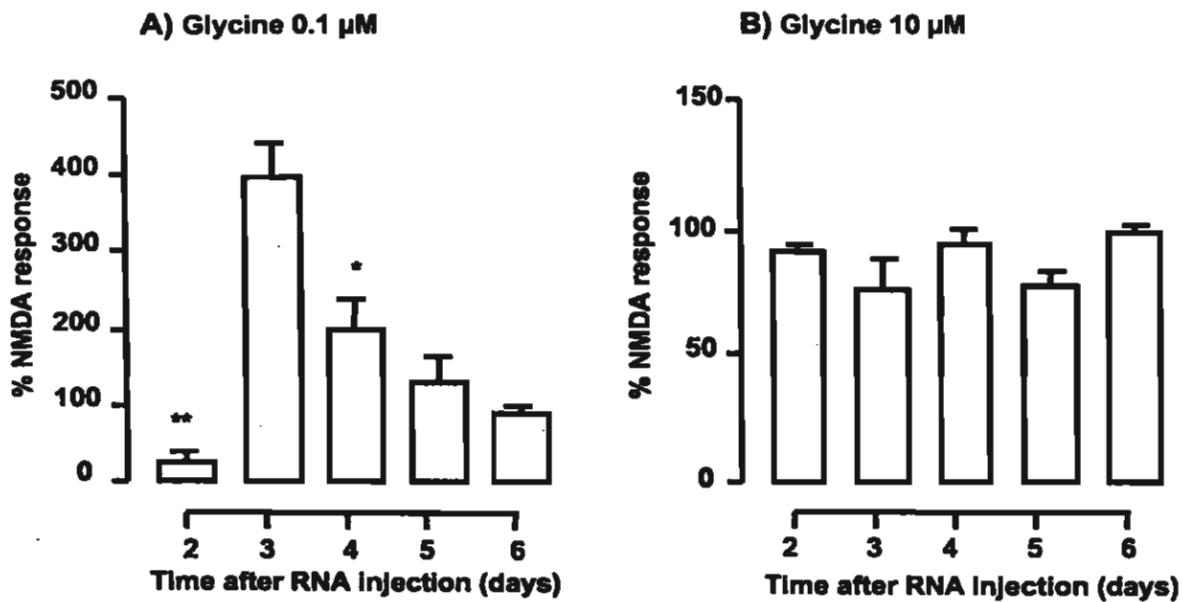


รูปที่ 9. ผลของ calcium ต่อการยับยั้ง NMDA-induced current โดย corymine เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน AP5 และ MK801

A) แสดงรูปร่างของ NMDA-induced current ที่เกิดจาก 30 μ M NMDA ในสารละลายที่มีและไม่มี calcium และค่า mean $\pm$ S.E.M., n = 4-9, B) แสดงการยับยั้ง NMDA-induced current ผกผันกับความเข้มข้นของ corymine ในสารละลายที่มี calcium แสดงข้อมูลด้วย mean $\pm$ S.E.M., n = 3-6



รูปที่ 10. การเสริมฤทธิ์ของ corymine ต่อ NMDA-induced current ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ glycine กราฟแสดงค่า mean $\pm$ S.E.M., $n = 4-46$ วงกลมเปิดแสดงค่าที่ได้จากไขแต่ละใบ



รูปที่ 11. การเสริมฤทธิ์ของ corymine ต่อ NMDA-induced current ขึ้นอยู่กับเวลาหลังจากฉีด RNA เปรียบเทียบผลของการใช้ glycine ขนาด 0.1 (A) และ 10 (B) μM

induced current ของ corymine เกิดขึ้นมากที่สุดในวันที่ 3 หลังจากฉีด RNA เข้าไปในไขกบ หลังจาก นั้นฤทธิ์จะค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่เห็นฤทธิ์นี้ในวันที่ 6 (รูปที่ 11) การออกฤทธิ์ของ corymine แปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ (รูปที่ 12)

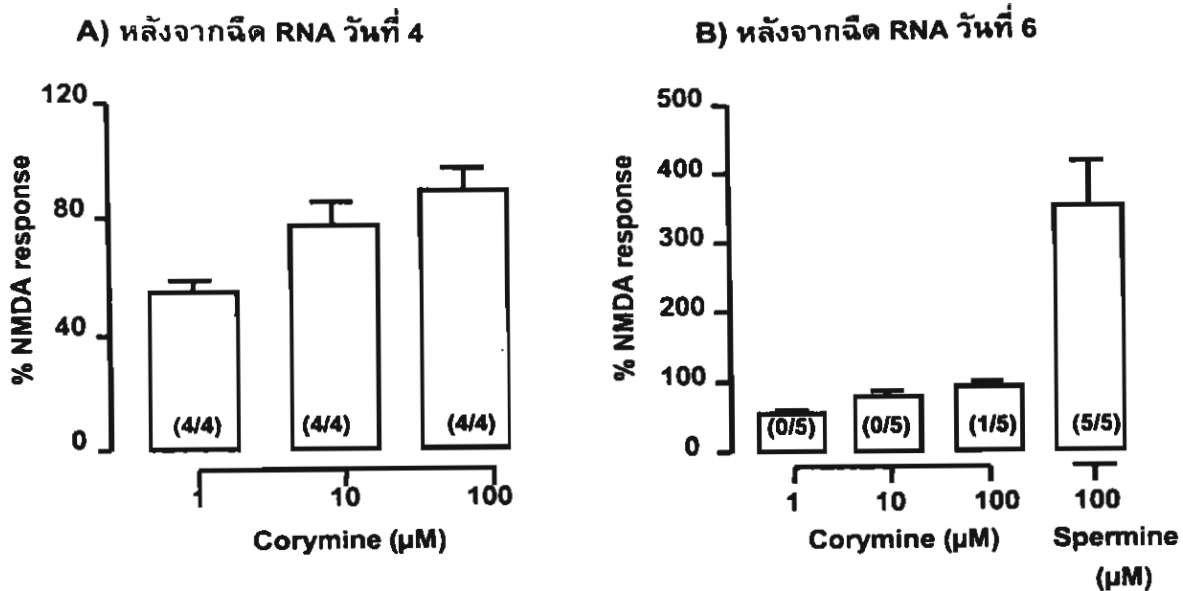
เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ corymine ต่อ NMDA receptor ได้ทำการทดสอบปฏิกิริยาต่อกันระหว่าง corymine กับสารอื่นที่ออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ บน NMDA receptor ผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ส่งเสริมของ corymine เพิ่มขึ้นเมื่อให้ร่วมกับ spermine และฤทธิ์ส่งเสริมของ corymin ลดลงเมื่อให้ร่วมกับ NMDA receptor competitive antagonist AP5 และ NMDA receptor noncompetitive antagonist MK-801 แต่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อให้ร่วมกับ non-specific chloride channel blocker DIDS (รูปที่ 13A) นอกจากนี้ ฤทธิ์ส่งเสริมของ corymine และของ spermine ก็ไม่สัมพันธ์กัน (รูปที่ 13B)

4. บทวิจารณ์

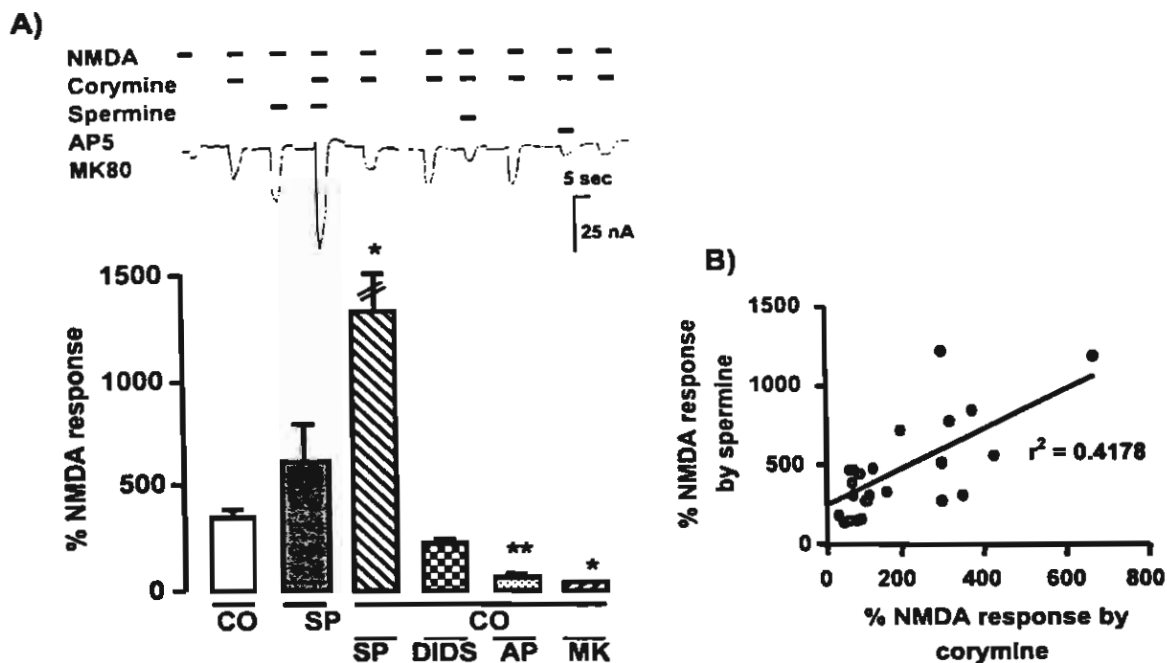
การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า NMDA receptor ที่เกิดจากการฉีด RNA ของ NR1a และ NR2B NMDA receptor subunits เข้าไปในไขกบ *Xenopus laevis* มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาเหมือนกับ NMDA receptor ที่อยู่ในร่างกาย (Buller LA, 1994)

การทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง NMDA receptor พบว่า corymine ยับยั้ง NMDA-induced current ได้น้อยมาก โดยเฉพาะเมื่อใช้ NMDA ขนาดสูง (100 μ M) ถึงแม้ว่าการให้ corymine ก่อน NMDA จะเห็นว่าฤทธิ์ของ corymine เพิ่มขึ้น แต่ขนาดความเข้มข้นสูงสุดของ corymine ที่ใช้ก็สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ NMDA ได้แค่ประมาณ 30 % นอกจากนี้เมื่อทดลองเปลี่ยน buffer เป็น calcium-free MBS พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้ง NMDA ของ corymine ลดลง แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ยับยั้งของ corymine อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง calcium-induced chloride channel ที่เป็นส่วนประกอบหนึ่งในการตอบสนองทั้งหมดที่เกิดจากการกระตุ้น NMDA receptor ขณะที่ไขอยู่ในสารละลายที่มี calcium เป็นส่วนผสมอยู่ (Leonard, 1990; Miledi and Parker, 1984; Weber et al., 1995a; b) ดังนั้นฤทธิ์ในการยับยั้ง NMDA receptor ของ corymine จึงอาจไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ NMDA receptor โดยตรง

เมื่อมีการปรับความเข้มข้นของ glycine ให้ต่ำกว่าปกติ (10 μ M) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแทนที่ corymine จะแสดงฤทธิ์ยับยั้ง NMDA receptor แต่ corymine กลับทำให้การตอบสนอง NMDA receptor เพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการเพิ่ม NMDA-induced current นี้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ glycine เพิ่มขึ้น ลักษณะการออกฤทธิ์ของ corymine นี้คล้ายกับการออกฤทธิ์ของ NMDA modulator ตัวหนึ่ง คือ spermine ที่มีรายงานว่า spermine เสริมฤทธิ์ของ NMDA โดยทำให้ glycine มี affinity ต่อ NMDA receptor เพิ่มขึ้น (Benveniste and Mayer, 1993 ; Durand et



รูปที่ 12. การเสริมฤทธิ์ของ corymine ต่อ NMDA-induced current ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ corymine เปรียบเทียบหลังจากฉีด RNA วันที่ 4 (A) และ 6 (B) ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนไขกบที่ให้ผลเสริมฤทธิ์ต่อจำนวนไขกบทั้งหมดที่นำมาทดสอบ



รูปที่ 13. ฤทธิ์ของ corymine (CO) ต่อ NMDA-induced current ถูกเสริมโดย spermine (SP) และถูกหักล้างโดยสารมาตรฐาน AP5 (AP) และ MK801 (MK)

A) แสดงตัวอย่างข้อมูล, B) แสดงข้อมูลด้วยค่า mean S.E.M., $n = 3-4$ และ C) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ในการเพิ่ม NMDA-induced current ของ corymine และ spermine

*, $p < 0.05$ และ **, $p < 0.005$ เปรียบเทียบกับผลของ corymine อย่างเดียว

al., 1993; Durand et al., 1992; Masuko et al., 1999) สิ่งที่ corymine แตกต่างจาก spermine ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้คือ การออกฤทธิ์เสริม NMDA-induced current ของ corymine ไม่ได้เกิดขึ้นกับไข่มุกใบ แต่ขึ้นกับเวลาหลังจากฉีด RNA เข้าไปในไข่มุก ในทางตรงกันข้าม ฤทธิ์ของ spermine ในการเสริม NMDA-induced current เกิดขึ้นกับไข่มุกใบที่นำมาทดสอบ เพื่ออธิบายถึงสาเหตุของปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น อาจพิจารณาได้ว่า NMDA receptor ที่ปรากฏบนไข่มุกมีมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งข้อสมมุติฐานนี้มีความเป็นไปได้เพราะมี RNA จาก subunit สองชนิด NR1a และ NR2B ถูกฉีดเข้าไปในไข่มุก receptor ที่เกิดขึ้นในไข่มุกจึงอาจเป็น NR1a/NR2B heteromer หรือ NR1a monomer (Garcia-Gallo et al., 2001; McIlhinney, 2003) จากผลการทดลองชี้ว่า NMDA receptor ทั้งสองชนิดนี้ตอบสนองต่อ spermine ได้ดี แต่มีเพียงชนิดเดียวที่ตอบสนองต่อ corymine ได้ดี ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปว่าเป็น NMDA receptor ชนิดใด

การที่ NMDA antagonist ทั้ง competitive antagonist AP5 และ noncompetitive antagonist MK801 ยับยั้งฤทธิ์ของ corymine ได้ แต่ non-specific chloride channel blocker DIDS ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ corymine ได้ แสดงว่า corymine อาจออกฤทธิ์เสริม NMDA-induced current โดยจับกับ NMDA receptor ตรงตำแหน่งที่แตกต่างจาก spermine และไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่าน calcium-induced chloride channel ซึ่งสมมุติฐานนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ว่า ปริมาณการออกฤทธิ์ของ corymine และ spermine ไม่มีความสัมพันธ์กัน

การที่ corymine สามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ของ NMDA เมื่อความเข้มข้นของ glycine มีค่าต่ำได้บ่งชี้ว่า corymine น่าจะมีประโยชน์ต่อการรักษาอาการผิดปกติทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ NMDA receptor ต่ำกว่าปกติ เช่น schizophrenia (Javitt, 1994; Mohn et al., 1999; Olney and Farber, 1995) อย่างไรก็ตามจะต้องทำการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของ corymine ต่อไป

5. หนังสืออ้างอิง

- Arambewela, L. S. R., Khuong-Huu, F., 1981. Indole alkaloids from *Hunteria zeylanica*. *Phytochemistry* 20, 349-350.
- Benveniste, M., Mayer, M.L., 1993. Multiple effect of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurons. *Journal of Physiology* 464, 131-163.

- Buller, A.L., Larson, H.C., Schneider, B.E., Beaton, J.A., Morrisett, R.A., Monaghan, D.T., 1994. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *Journal of Neuroscience* 14, 5471-5484.
- Durand, G.M., Gregor, P., Zheng, X., Bennett, M.V., Uhl, G.R., Zukin, R.S., 1992. Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 89, 9359-9363.
- Durand, G.M., Bennett, M.V., Zukin, R.S., 1993. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 90, 6731-6735.
- Foye, W. O., Lemke, T. L., Williams, D. A. (1995). *Principles of Medicinal Chemistry*. 4th Edition, Lippincott. pp. 25-49.
- Garcia-Gallo, M., Renart, J., Diaz-Guerra, M., 2001. The NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor can be efficiently expressed alone in the cell surface of mammalian cells and is required for the transport of the NR2A subunit. *Biochemical Journal* 356, 539-547.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., Marbaix, G. 1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature (Lond.)* 233, 177-182.
- Hooker, J. D., "The Flora of British India," Vol III, L Reeve & Co., Ltd., The Oast House, Kent, 1980-1982, p.637.
- Huettnner, J. E. (1991) Competitive antagonism of glycine at the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. [Review]. *Biochem. Pharmacol.* 41, 9-16.
- Javitt, D.C., Zylberman, I., Zukin, S.R., Heresco-Levy, U., Lindenmayer, J.P., 1994. Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *American Journal of Psychiatry* 151, 1234-1236.
- Johnson, K. M., Snell L. D., Sacaan, A. I., Jones, S. M. (1993) Pharmacologic regulation of the NMDA receptor-ionophore complex. [Review]. *NIDA Res Monogr* 133:13-39.
- Lavaud, C., Massiot, G., Vercauteren, J., Le Men-olivier, L. (1982) Alkaloids of *Hunteria zeylanica*. *Phytochemistry* 21, 445-447.

- Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1996) Behavioral studies on alkaloids extracted from the leaves of *Hunteria zeylanica*. *Biol Pharm Bull* 19:394-399.
- Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1997) Inhibitory effects of corymine, an alkaloidal component from the leaves of *Hunteria zeylanica*, on glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 332:321-326.
- Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1998a) Inhibitory effects of corymine-related compounds, indole alkaloids, on glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Jpn J Pharmacol* 77:169-172.
- Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1998b) A possible mechanism underlying corymine inhibition of glycine-induced chloride current in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 348:271-277.
- Leonard, J.P., Kelso, S.R., 1990. Apparent desensitization of NMDA responses in *Xenopus* oocytes involves calcium-dependent chloride current. *Neuron* 4, 53-60.
- Masuko, T., Kuno, T., Kashiwagi, K., Kusama, T., Williams, K., Igarashi, K., 1999. Stimulatory and inhibitory Properties of Aminoglycoside Antibiotics at N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290, 1026-1033.
- McIlhinney, R.A., Philipps, E., Le Bourdelles, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P., 2003. Assembly of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans* 31, 865-868.
- Mehta, A. K., Ticku, M. K. (1999) An update on GABAA receptors, (Review). *Brain Res. Rev.* 29,196- 217.
- Miledi, R., Parker, I. and Sumikawa, K., 1982. Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 216, 509-515.
- Miledi, R., Parker, I., 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 357, 173-183.
- Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Koller, B.H., 1999. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98, 427-436.

- Muller, W. E., Mutschler, E., Riederer, P. (1995) Noncompetitive NMDA receptor antagonists with fast open-channel blocking kinetics and strong voltage-dependency as potential therapeutic agents for Alzheimer's dementia. [Review]. *Pharmacopsychiatry* 28, 113-124.
- Olney, J.W., Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 52, 998-1007
- Perry, L. M., Metzger, J., 1980. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*, The MIT Press Cambridge, England, p. 33. 367.
- Reanmongkol, W., Matsumoto, K., Watanabe, H., Subhadhirasakul, S., Sakai, S., 1994a. Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1345-1350.
- Reanmongkol, W., Matsumoto, K., Watanabe, H., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Sakai, S., 1994b. Effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica* on acute inflammation in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 33-36.
- Ridley, H. N., "The Flora of the Malay Peninsula," Vol II, L Reeve & Co., Ltd., Henrietta Street, Covent Garden< London, 1923, p. 335.
- Rogawski, M. A. (1993) Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. [Review]. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 325-331.
- Subhadhirasakul, S., Aimi, N., Takayama, H., Ponglux, D., Sakai, S., 1994a. Hunterioside, first biogenetically bound monoterpenoid indole alkaloid from *Hunteria zeylanica*. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 991-993.
- Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Miyabe, Y., Aimi, N., Ponglux, D., Sakai, S., 1994b. New corymine-related indole alkaloids from *Hunteria zeylanica* in Thailand. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 2645-2646.
- Soreq, H. and Seaman, S., 1992. *Xenopus* oocyte microinjection: From gene to protein. *Methods in Enzymology*, Vol. 207. pp 225-265.
- Takayama, H., Subhadhirasakul, S., Mizuki, J., Kitajima, M., Aimi, N., Ponglux, D., Sakai, S., 1994. A new class of dimeric indole alkaloids, coryzeylamine and deffrmylcoryzeylamine from the leaves of *Hunteria zeylanica* in Thailand. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1957-1959.

- Weber, W.M., Liebold, K.M., Reifarth, F.W., Uhr, U., Clauss, W., 1995a. The Ca^{2+} -induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a Cl^- channel. *Journal of Membrane Biology* 148, 263-275.
- Weber, W.M., Liebold, K.M., Reifarth, F.W., Uhr, U., Clauss, W., 1995b. Influence of extracellular Ca^{2+} on endogenous Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. *Pfluegers Archiv* 429, 820-824.
- Whitmore, T. C., 1973. *Tree Flora of Malaya*, Vol II, Wing Tai Cheng Printing Co., Ltd., Hongkong, p. 16.
- Yamakura, T., Shimoji, K. (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog. Neurobiol.* 59(3), 279-98.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Leewanich P, Tohda M, Matsumoto K, Takayama H, Sophasan S, Watanabe H.
Corymine potentiates NMDA-induced currents in *Xenopus* oocytes expressing NR1a/NR2B
glutamate receptors. J Pharmacol Sci. (submitted)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทำให้เกิดความร่วมมือในการแลกเปลี่ยนนักวิจัยกับ Division of Medicinal Pharmacology,
Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan

3. อื่น ๆ

มีแผนที่จะนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 27 เรื่อง New Era in
Pharmacotherapy ที่จัดโดยสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ร่วมกับ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะ
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในระหว่างวันที่ 17-18 มีนาคม 2548 ณ โรงแรมกรุง
ศรีวิเวอร์ พระนครศรีอยุธยา

ภาคผนวก

Manuscript

**Corymine potentiates NMDA-induced currents in *Xenopus oocytes*
expressing NR1a/NR2B glutamate receptors**

**Pathama Leewanich^{a, b*}, Michihisa Tohda^b, Kinzo Matsumoto^b, Hiromitsu Takayama^c,
Samaisukh Sophasan^d, Hiroshi Watanabe^b**

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University,
Bangkok 10110, Thailand

^bDivision of Medicinal Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical
and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

^cFaculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba 263, Japan

^dDepartment of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400,
Thailand

***Corresponding author. Tel.: 662-260-2122, ext. 4806; Fax; 662-260-2122, ext. 4013**

e-mail address: pathama@swu.ac.th

Abstract

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. Effects of corymine on NMDA-induced currents depended on glycine concentrations. Corymine (10-100 μ M) 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 examined at high concentrations (1-10 μ M) of glycine. 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

I. Introduction

Corymine is an indole alkaloid isolated from the leaves of *Hunteria zeylanica*, a plant native to Thailand. We previously demonstrated that this alkaloid potentiated the convulsions induced by strychnine, a competitive glycine receptor antagonist, and picrotoxin, a non-competitive γ -aminobutyric acid (GABA) receptor antagonist, in mice (Leewanich, 1996). Moreover, in previous electrophysiological studies using a *Xenopus* oocyte receptor expression model we have found that corymine inhibits preferentially strychnine-sensitive glycine receptor function rather than GABA receptor function, suggesting that blockade of strychnine-sensitive glycine receptors mainly contributes to the convulsion potentiating effect of this alkaloid (Leewanich, 1997; 1998).

Glycine acts as an inhibitory neurotransmitter for strychnine-sensitive glycine receptors in the spinal cord and as a co-agonist on strychnine-insensitive glycine binding site of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. Evidence indicates that intrathecal administration of glycine enhances, rather than inhibits, strychnine- and NMDA-induced convulsions by acting on the strychnine-insensitive glycine binding site of NMDA receptors (Larson, 1988). Thus, it is likely that the seizure-potentiating effect of corymine in the animal model may involve activation of the NMDA receptor.

NMDA receptor plays important roles in the pathologies of the central nervous system (CNS) and is a target for several therapeutic agents, including NMDA agonists, antagonists and modulators (Heresco-Levy et al., 2002; Koch, 2004; Schwartz, 1996; Tamminga, 1998; Watkins, 1994; William, 2001). Three NMDA receptor subunit families (NR1a-h, NR2A-D and NR3A-B) have been identified (Dingledine et al., 1999; Monyer et al., 1992). Native NMDA receptors in the mammalian CNS are thought to

consist of tetrameric, heterooligomeric assemblies of NR1, which possesses the glycine binding site and mandates channel activity, and NR2 subunits, which possesses glutamate binding site and modulates functional and pharmacological properties of the NMDA-gated channel (Hirai et al., 1996; Ishii et al., 1993; Laube et al., 1998; Monaghan and Larsen, 1997). Evidence indicates that different subunit combinations (or “subtypes”) have distinct biophysical and pharmacological characteristics (Hollmann and Heinemann, 1994; Priestley et al., 1995; Williams, 1993; Woodward et al., 1995), yielding potential for the development of NMDA receptor subtype-selective therapeutic agents (Williams, 1993). Of the NMDA receptor subunits, the NR2B subunit is particularly interesting because it is involved in several CNS pathologies including acute and chronic pain, stroke and head trauma, drug-induced dyskinesias, and dementia in Alzheimers disease and Parkinson’s disease (Blanchet et al., 1999; Chazot, 2004; Myhrer, 1998; Tang et al., 2001).

To further clarify the mechanism underlying the seizure-potentiating effect of corymine, in this study we investigated using a receptor expression model of *Xenopus* oocytes whether corymine can modulate the functions of NR1a/NR2B NMDA receptor.

2. Materials and Methods

2.1 NR1a/NR2B RNA preparation

cDNA clones for NR1a and NR2B were kindly provided by Dr. K. Igarashi (Faculty of pharmaceutical Sciences, Chiba University). The circular cDNAs were linearized with NotI (NR1a) or EcoRI (NR2B) and transcribed into cRNAs *in vitro*

with T7 (NR1a) or T3 (NR2B) RNA polymerase using a mMessage mMachine transcription kit (Ambion, Austin, TX, USA). NR1a and NR2B cRNAs were diluted with nuclease free water to $\approx 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ of each and were mixed at a ratio of 1:4 before injection.

2.2. Oocyte injection

Xenopus laevis (*Xenopus express*, Cape, South Africa) were anesthetized in ice-water and a lobe of the ovary was removed and placed in sterile modified Barth's solution (MBS: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl_2 , 0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.82 mM MgSO_4 , 2.4 mM NaHCO_3 , 7.5 mM Tris-(hydroxymethyl) aminomethane, pH 7.6). Oocytes were then isolated manually and defolliculated by incubation in 1.5 mg/ml collagenase (type 1A, Sigma, MO, USA) at 19°C for 1 h in calcium-free MBS solution. cRNA mixture were injected into oocytes, stage V-VI, (27.6 nl) with a microinjector (Drummond, USA). For expression, the oocytes were incubated in MBS containing 2.5 units/ml penicillin and 2.5 mg/ml streptomycin at 18°C.

2.3. Electrophysiological recording

Responses to NMDA were recorded using a two-electrode voltage-clamp amplifier (GeneClamp 500B, Axon Instrument, Foster City, CA, USA) at a holding potential of -60 mV unless noted otherwise. Electrodes were filled with 3 M KCl and had resistances of 0.5-5 $\text{M}\Omega$. Oocytes were positioned in a 50 μl chamber and continuously perfused with Mg^{2+} -free MBS solution at 1 ml/min at room temperature.

The drugs were applied until a plateau or peak of the response was observed. Data were recorded simultaneously on a computer hard disk. The washout period for recovery was 3-5 min, depending on the concentration of drugs applied. Most data was expressed as mean $\pm$ S.E.M. For statistical analysis, data were subjected to an unpaired *t*-test using Sigma Stat[®] (ver 3.0) program. ED₅₀ values and correlation coefficients for curve fitting were determined using Prism[®] (ver 2.0) program.

2.4. Compounds

Corymine used in this study was isolated from the leaves of *Hunteria zeylanica* as previously described (Leewanich, 1997). *N*-Methyl-D-aspartate (NMDA), glycine, (5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK801), 4,4 diisothiocyano stilbene-2,2-disulfonoc acid (DIDS) and spermine were from Sigma (St. Louis, MO, USA), 2-Amino-5-phosphonopentanone (D-AP5) was from Tocris (MO, USA). In the experiment, corymine was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to final DMSO concentrations (≤ 0.1 %) that induced no change in membrane current on its own and which had no effect on NMDA-induced currents in control experiments (Blank et al., 1997).

3. Results

3.1. Pharmacological properties of the expressed NMDA receptors

We first characterized the pharmacological properties of the expressed NMDA receptors. Bath application of NMDA containing saturated concentration of glycine (10

μM) to oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs elicited inward currents at clamp potentials of -100 to -20 mV and outward currents at those of $+20$ to $+100$ mV (Fig. 1A). A concentration-response curve for NMDA was made at a clamp potential of -60 mV. The ED_{50} value was $54 \pm 12.2 \mu\text{M}$ (Fig. 1B). In further experiments, we used $30 \mu\text{M}$ NMDA plus $10 \mu\text{M}$ glycine, as a control (unless specified elsewhere).

The responses elicited by $30 \mu\text{M}$ NMDA plus $10 \mu\text{M}$ glycine were dose-dependently reduced by the competitive antagonist AP5 (Fig. 1C) and the noncompetitive antagonist MK801 (Fig. 1D). Spermine ($100 \mu\text{M}$), a NMDA modulator, enhanced NMDA response at glycine concentration of $0.1 \mu\text{M}$ but not of 1 and $10 \mu\text{M}$ (Fig. 1E).

2.3. Potentiating effect of corymine on the expressed NMDA receptors depended on glycine concentration

To investigate the effect of corymine on the expressed NMDA receptors, oocytes were applied with $30 \mu\text{M}$ NMDA plus various concentrations of glycine (0.01 – $10 \mu\text{M}$) in the presence and absence of $100 \mu\text{M}$ corymine. Corymine remarkably potentiated NMDA responses at low concentrations of glycine (0.01 – $0.1 \mu\text{M}$) but had less or no effect at high concentrations of glycine (1 – $10 \mu\text{M}$) (Fig. 2). The NMDA responses-potentiating effect of corymine disappeared easily after washing out by infusion buffer (Fig. 2A). The potentiating effect of corymine did not occur in all of oocytes that showed NMDA responses. Percentages of oocytes in which the NMDA response was potentiated by corymine application were 100 (4 of 4), 56 (22 of 39), 54 (7 of 13) and 17 (8 of 46) % when examined in the presence of 0.01 , 0.1 , 1 and $10 \mu\text{M}$ glycine, respectively. When corymine at 10 – $100 \mu\text{M}$ was tested, the potentiating effect was dose-dependent (Fig. 3).

3.3 Potentiating effect of corymine on the expressed NMDA receptors depended on day after cRNA injection

To clarify a factor that influences the variation of corymine effect on the NMDA response in oocytes, the potentiating effect of corymine was elucidated at day 2 to day 6 after cRNA injection into oocytes. When applied with 30 μ M NMDA plus 0.01 or 0.1 μ M glycine, corymine pronouncedly potentiated NMDA response in oocytes recorded at day 3 after cRNA injection. However, the extent of potentiation by corymine was gradually decreased until day 6 (Fig. 4A). Percentages of oocytes that showed corymine-induced potentiation of NMDA currents were 0 (0 of 3), 100 (5 of 5), 71 (12 of 17), 40 (4 of 10) and 20 (1 of 5) % at days 2, 3, 4, 5 and 6 after cRNA injection, respectively. When 10 μ M glycine was used, the potentiation by corymine was rarely observed in neither day (data not shown). Corymine (1-100 μ M) hardly potentiated NMDA responses in oocytes recorded at day 6 after cRNA injection, while spermine, a NMDA modulator, remarkably potentiated the NMDA response (Fig. 4B). Percentages of oocytes that gave the NMDA responses more than control were 0 (0 of 5), 0 (0 of 5), 20 (1 of 5) and 100 (5 of 5) for corymine 1, 10, 100 μ M and spermine, respectively.

3.4 Potentiating effect of corymine on the expressed NMDA receptors was enhanced by spermine and antagonized by AP5 and MK801

To study a possible mechanism by which corymine potentiates the NMDA currents, the effects of spermine (a NMDA modulator) and other antagonists (AP5, MK801 and DIDS) on corymine potentiation were examined. After NMDA response was potentiated by 100 μ M corymine, either spermine (100 μ M), AP5 (10 μ M), MK801

(100 μ M) or DIDS (100 μ M) was co-applied and the changes of NMDA response were observed. Simultaneous application of corymine and spermine to oocytes caused a significant increase of the NMDA responses when compared to that of corymine alone (Fig. 5A, B). In contrast, the effect of corymine was significantly decreased by co-application of AP5 and MK801, but not by DIDS. A linear regression analysis revealed a correlation coefficient of 0.5251 between the magnitudes of the potentiating effects of corymine and spermine (Fig. 5C).

4. Discussion

The present study has demonstrated that corymine can potentiate NMDA receptor function in the presence of low glycine concentrations in *Xenopus* oocyte injected with NR1a and NR2B cRNAs. Data suggested that the potentiating effect is mediated by corymine interaction with the site which may be different from a spermine-binding site on the NMDA receptors.

In this study, we found that corymine did not activate the NMDA receptor channel in the absence of glycine (data not shown). In contrast, corymine enhanced NMDA-induced current responses in the presence of low glycine concentrations (<0.1 μ M), indicating that corymine can positively modulate the NMDA receptor function and that the effect is dependent on the presence of glycine. It is generally estimated that glycine concentration in the synaptic cleft of glutamatergic synapses is lower than the K_D value (100 - 500 nM) of glycine for high affinity glycine binding site on the NMDA receptor (Buller et al., 1994; Kew, 1998; Priestley et al., 1995; Supplisson and Bergman,

1997; Wilcox, 1996). Taken these findings together, it is likely that corymine can enhance little current responses of NMDA receptors at low extracellular glycine concentrations.

The glycine-dependent action of this alkaloid is quite similar to the action of spermine on the NMDA receptor mediated response (Benveniste and Mayer, 1993; Durand et al., 1993; Durand et al., 1992; Masuko et al., 1999). This allow us to infer that corymine, like spermine, may potentiate the NMDA response by increasing the affinity of glycine for the glycine site on the NMDA receptor (Benveniste and Mayer, 1993; McGurk et al., 1990; Zhang et al., 1994). However, corymine did not show the NMDA response-potentiating effect in every oocyte during the experiment period, while spermine potentiation of the NMDA response was invariably observed in every cell (data not shown). Moreover, it is of interest to note that combination of corymine and spermine potentiated the NMDA receptor-mediated current response in oocytes in an additive manner and there is not a good correlation between magnitudes of corymine and spermine effects. Together, these findings suggest that corymine and spermine do not share the same binding site involved in positive modulation of the NMDA receptor function.

The reason for the cell-to-cell and day-by-day variability of corymine-induced potentiation of the NMDA response is unclear. It may be due to a difference in the expression between NMDA receptor subunit compositions, NR1a and NR2B, with different sensitivities to corymine in *Xenopus* oocytes, i.e., corymine-sensitive and -insensitive NMDA receptor subunit compositions. The corymine-sensitive NMDA receptor subunit complexes may be not expressed to the same extent in all cells injected

with NMDA receptor subunit cRNAs or not stable enough to show the potentiating effect of corymine during the experiment period of 5-6 days after injecting NMDA subunit cRNAs. In this study, each oocyte received cRNAs of NR1a and NR2B subunits at a ratio of 1:4 to avoid NR1a homomer formation (Kleckner et al., 1999). However, we can not exclude the possibility that the NR1a or NR2B homomers, or both are generated (Garcia-Gallo et al., 2001; McIlhinney, 2003) since spermine reportedly potentiates the function of NMDA receptors consisting of NR1 homomer and NR1/NR2B heteromers (Benveniste and Mayer, 1993; McGurk et al., 1990; Zhang et al., 1994). Thus, it can be inferred that the corymine-sensitive NMDA receptors expressed in the oocytes may be either the NR1a homomer or the NR1/NR2B heteromer.

The exact mechanism by which corymine potentiates the NMDA receptor-mediated current response in *Xenopus* oocytes remains unclear, but there is a possibility that corymine apparently potentiated the NMDA receptor function in *Xenopus* oocytes by activating Ca^{2+} -dependent Cl^- channel since NMDA-induced increase in intracellular Ca^{2+} likely induces Cl^- currents via Ca^{2+} -dependent Cl^- channels which are natively expressed on the oocyte membrane (Leonard, 1990; Miledi and Parker, 1984; Weber et al., 1995a; b). However, in this study the potentiating effect of corymine on NMDA-induced current was not affected by DIDS, a non-specific chloride channel blocker, suggesting that Ca^{2+} -dependent Cl^- channel activation is not involved in the effect of corymine on the NMDA receptor function.

Evidence indicates that the NR1a/NR2B NMDA receptor is involved in learning and memory (Tang et al., 2001). Moreover, psychiatric disorders such as schizophrenia appear to implicate the NMDA receptor hypofunction (Javitt, 1994; Mohn et al., 1999;

Olney and Farber, 1995). Thus, the potentiation of NMDA receptor-mediated responses by corymine may be beneficial for the treatment of these diseases which involve NMDA receptor dysfunction.

In conclusion, this study suggests the potentiating effect of corymine on the NMDA-induced currents at low glycine concentrations probably via the site different from the spermine-binding site of NMDA receptors. The positive modulatory action of corymine against the NMDA receptor function is likely involved in corymine potentiation of strychnine- and picrotoxin-induced convulsion in mice. However, further investigation is needed to better understand the mechanism underlying corymine potentiation of the NMDA receptor function.

5. Acknowledgements

We thank Dr. K. Igarashi, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japan, for providing cDNA plasmids of NR1a and NR2B subunits. This work was supported in part by the Thailand Research Fund (MRG 4580036) and by Japan Society for the Promotion of Science Core University Program.

6. References

- Benveniste, M., Mayer, M.L., 1993. Multiple effect of spermine on N-methyl-d-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurons. *Journal of Physiology* 464, 131-163.
- Blanchet, P., Konitsiotis, S., Whittemore, E.R., Zhou, Z.L., Woodward, R.M., Chase,

- T.N., 1999. Differing effects of N-methyl-D-aspartate receptor subtype selective antagonists on dyskinesias in levodopa-treated 1-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290, 1034-1040.
- Blank, T., Nijholt, I., Teichert, U., Kugler, H., Behrsing, H., Fienberg, A., Greengard, P., Spiess, J., 1997. The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 94, 14859-14864.
- Buller, A.L., Larson, H.C., Schneider, B.E., Beaton, J.A., Morrisett, R.A., Monaghan, D.T., 1994. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *Journal of Neuroscience* 14, 5471-5484.
- Chazot, P.L., 2004. The NMDA Receptor NR2B Subunit: A Valid Therapeutic Target for Multiple CNS Pathologies. *Current Medicinal Chemistry* 11, 389-396.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 51, 7-61.
- Durand, G.M., Bennett, M.V., Zukin, R.S., 1993. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 90, 6731-6735.
- Durand, G.M., Gregor, P., Zheng, X., Bennett, M.V., Uhl, G.R., Zukin, R.S., 1992. Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase

C. Proceeding of National Academy of Sciences USA 89, 9359-9363.

Garcia-Gallo, M., Renart, J., Diaz-Guerra, M., 2001. The NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor can be efficiently expressed alone in the cell surface of mammalian cells and is required for the transport of the NR2A subunit. *Biochemical Journal* 356, 539-547.

Heresco-Levy, U., Ermilov, M., Shimoni, J., Shapira, B., Silipo, G., Javitt, D.C., 2002. Placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics, olanzapine, or risperidone in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 159, 480-482.

Hirai, H., J., K., Laube, B., Betz, H., Kuhse, J., 1996. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Neurobiology* 93, 6031-6036.

Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience* 17, 31-108.

Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., Nakanishi, S., 1993. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biologic Chem* 268, 2836-2843.

Javitt, D.C., Zylberman, I., Zukin, S.R., Heresco-Levy, U., Lindenmayer, J.P., 1994. Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *American Journal of Psychiatry* 151, 1234-1236.

Kew, J.N., Richards, J.G., Mutel, V., Kemp, J.A., 1998. Development changes in NMDA

receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 18, 1935-1943.

Kleckner, N.W., Glazewski, J.C., Chen, C.C., Moscrip, T.D., 1999. Subtype-selective antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors by felbamate: insights into the mechanism of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 886-894.

Koch, H.J., Szecey, A., Haen, E., 2004. NMDA-antagonism (Memantine): An Alternative Pharmacological Therapeutic Principle in Alzheimer's and Vascular Dementia. *Current Pharmaceutical Design* 10, 253-259.

Larson, A.A., Beitz, A.J., 1988. Glycine potentiates strychnine-induced convulsions: role of NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 8, 3822-3826.

Laube, B., Kuhse, J., Betz, H., 1998. Evidence for a Tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18, 2954-2961.

Leewanich, P., Tohda M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N., Watanabe, H., 1997. Inhibitory effects of corymine, an alkaloidal component from the laeves of *Hunteria zeylanica*, on glycine receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology* 332, 321-326.

Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N., Watanabe, H., 1996. Behavioral studies on alkaloids extracted from the laeves of *Hunteria zeylanica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19, 394-399.

Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N., Watanabe, H., 1998. A possible mechanism underlying corymine inhibition of

glycine-induced chloride current in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology* 348, 271-277.

Leonard, J.P., Kelso, S.R., 1990. Apparent desensitization of NMDA responses in *Xenopus* oocytes involves calcium-dependent chloride current. *Neuron* 4, 53-60.

Masuko, T., Kuno, T., Kashiwagi, K., Kusama, T., Williams, K., Igarashi, K., 1999. Stimulatory and inhibitory Properties of Aminoglycoside Antibiotics at *N*-Methyl-D-Aspartate Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290, 1026-1033.

McGurk, F.J., Bennett, V.L.M., Zukin, S.R., 1990. Polyamines potentiate response of *N*-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurobiology* 87, 9971-9974.

McIlhinney, R.A., Philipps, E., Le Bourdelles, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P., 2003. Assembly of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans* 31, 865-868.

Miledi, R., Parker, I., 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 357, 173-183.

Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Koller, B.H., 1999. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98, 427-436.

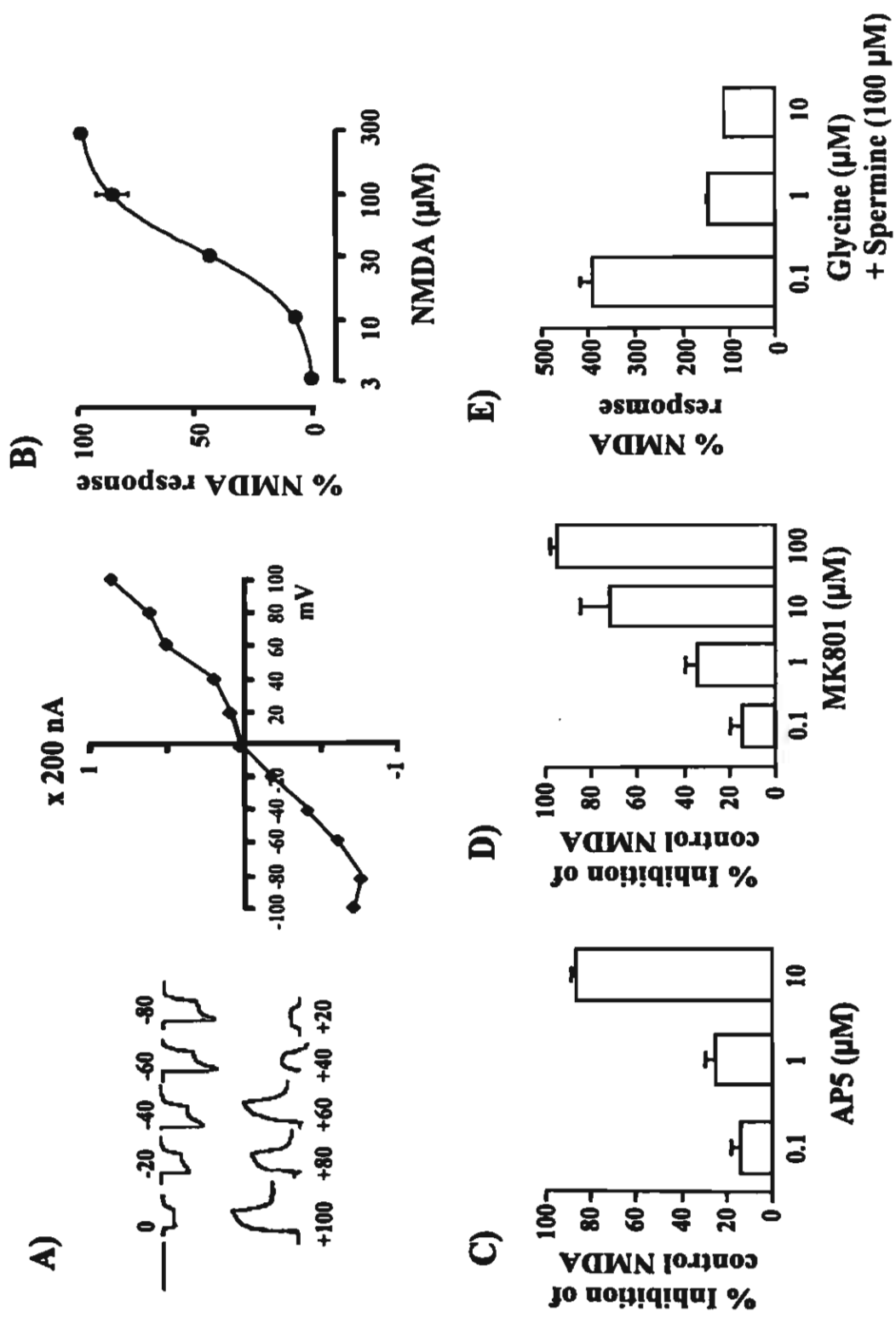
Monaghan, D.T., Larsen, H., 1997. NR1 and NR2 subunit contributions to *N*-Methyl-D-aspartate receptor channel blocker pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280, 614-620.

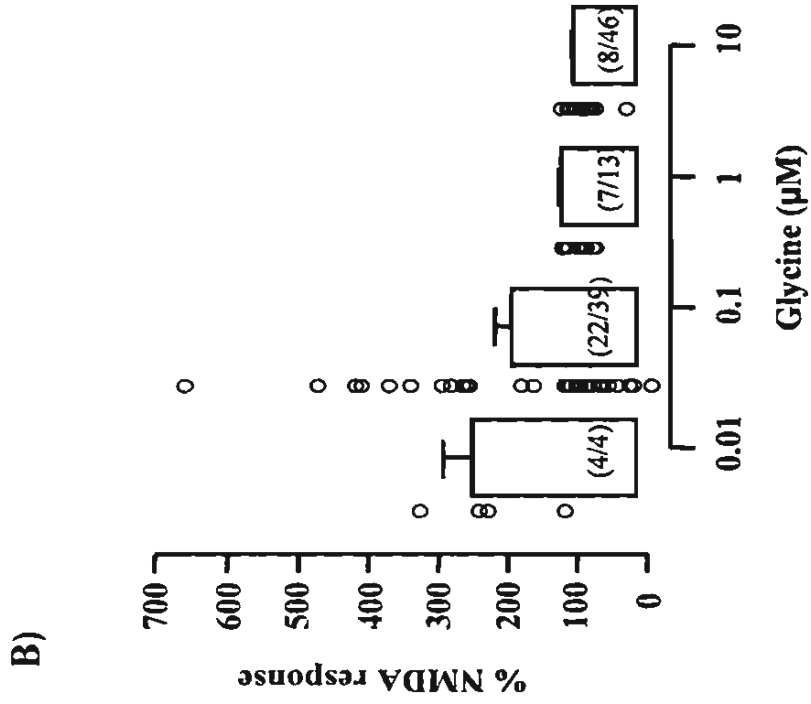
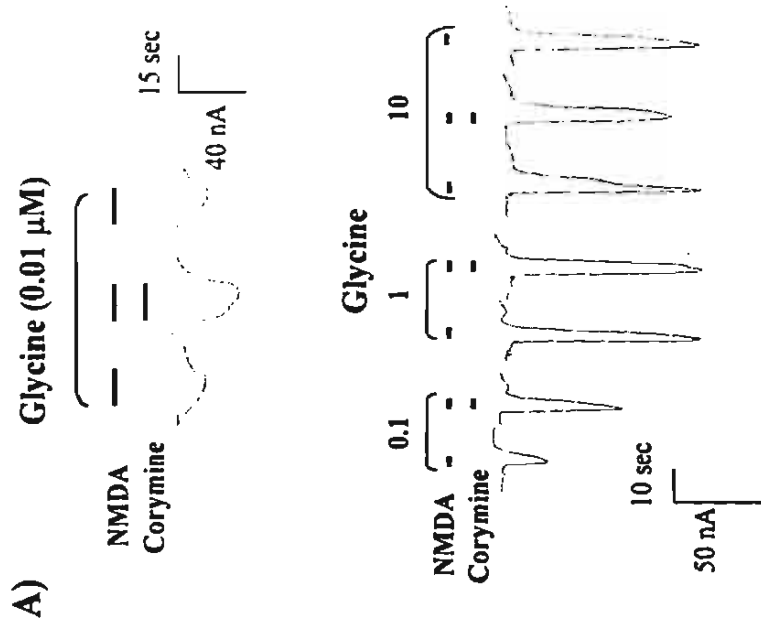
Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev,

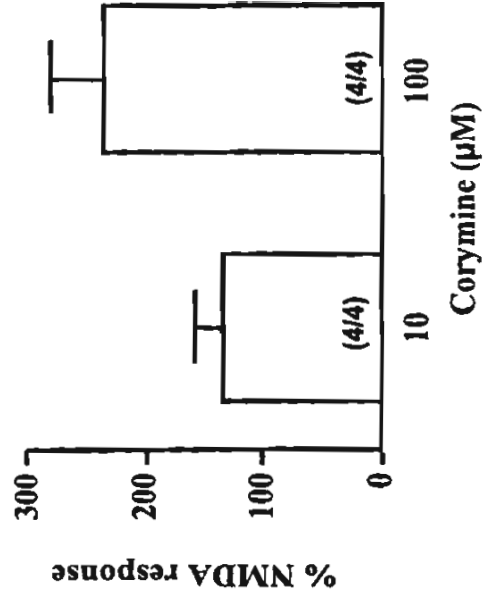
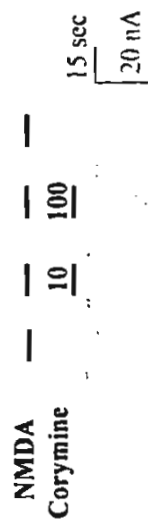
- N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1992. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217-1221.
- Myhrer, T., 1998. Adverse psychological impact, glutamatergic dysfunction, and risk factors for Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 131-139.
- Olney, J.W., Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 52, 998-1007.
- Priestley, T., Laughton, P., Myers, J., Le Bourdelles, B., Kerby, J., Whiting, P.J., 1995. Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Molecular Pharmacology* 48, 841-848.
- Schwartz, B.L., Hashtroudi, S., Herting, R.L., Schwartz, P., Deutsch, S.I., 1996. D-cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. *Neurology* 46, 420-424.
- Supplisson, S., Bergman, C., 1997. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neuroscience* 17, 4580-4590.
- Tamminga, C., 1998. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 21-36.
- Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., Tsien, J.Z., 2001. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779-790.

- Watkins, J.C., 1994. The NMDA Receptor, Oxford Univ. Press, New York, p. 1-30.
- Weber, W.M., Liebold, K.M., Reifarth, F.W., Uhr, U., Clauss, W., 1995a. The Ca^{2+} -induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a Cl^- channel. *Journal of Membrane Biology* 148, 263-275.
- Weber, W.M., Liebold, K.M., Reifarth, F.W., Uhr, U., Clauss, W., 1995b. Influence of extracellular Ca^{2+} on endogenous Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. *Pfluegers Archiv* 429, 820-824.
- Wilcox, K.S., Fitzsimonds, R.M., Johnson, B., Dichter, M.A., 1996. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* 76, 3415-3424.
- William, K., 2001. Ifenprodil, a Novel NMDA Receptor Antagonist: Site and Mechanism of Action, Vol. Volume 2, Number 3, p. 285-298.
- Williams, K., 1993. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology* 44, 851-859.
- Woodward, R.M., Huettner, J.E., Guastella, J., Keana, J.F., Weber, E., 1995. In vitro pharmacology of ACEA-1021 and ACEA-1031: systemically active quinoxalinediones with high affinity and selectivity for N-methyl-D-aspartate receptor glycine sites. *Molecular Pharmacology* 47, 568-581.
- Zhang, L., Zheng, X., Paupard, M.C., Wang, A.P., Santchi, L., Friedman, L.K., Zukin, R.S., Bennett, M.V., 1994. Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10883-10887.

—







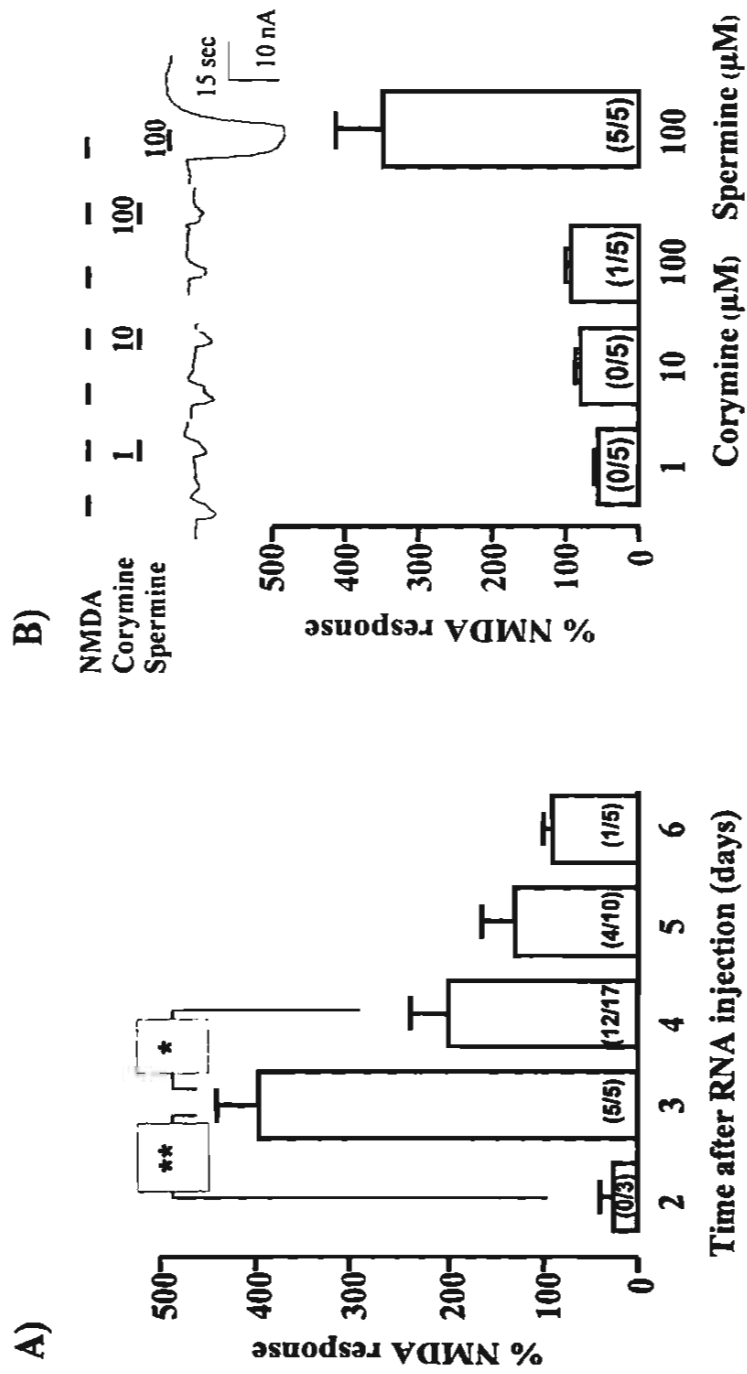


Figure Legends

Fig. 1. Pharmacological properties of the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs. A) Tracings and I-V relationship show reverse potential of NMDA-induced currents at around 0 mV in an oocyte applied with 30 μ M NMDA plus 10 μ M glycine at various clamp potentials. B) A dose-response curve of NMDA relative to the maximal response elicited by 300 μ M NMDA. C) Dose-dependent inhibition of 30 μ M NMDA (plus 10 μ M glycine)-induced currents by AP5. Each data represents the mean $\pm$ S.E.M. from 2-4 oocytes. D) Dose-dependent inhibition of 30 μ M NMDA (plus 10 μ M glycine)-induced currents by MK801. Each data represents the mean $\pm$ S.E.M. from 4 oocytes. E) Potentiation of 30 μ M NMDA (plus 10 μ M glycine)-induced currents by 100 μ M spermine at various glycine concentrations. Each data represents the mean $\pm$ S.E.M. from 4-10 oocytes.

Fig. 2. Potentiating effect of corymine on the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs depends on glycine concentration. Oocytes were applied with 30 μ M NMDA plus various concentrations of glycine (0.01-10 μ M) in the presence and absence of 100 μ M corymine. A) Tracings from oocytes show potentiating effect of corymine in various concentrations of glycine. B) Data are expressed as percentages of control NMDA response. Each column shows the mean $\pm$ S.E.M. and each open circle shows data from individual oocytes. The number in each parenthesis indicates number of oocytes that give response higher than control to number of tested oocytes.

Fig. 3 Potentiating effect of corymine on the expressed NMDA receptor in *Xenopus* oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs was dose-dependent. Corymine (10-100 μ M) dose-dependently potentiated NMDA response at 0.01 μ M glycine on day 4. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of percentages of control NMDA response from 4 oocytes.

Fig. 4. Potentiating effect of corymine on the expressed NMDA receptor in *Xenopus* oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs depended on time after cRNA injection. A) Potentiating effect of corymine was followed from day 2 to day 6 after RNA injection. Oocytes were applied with 30 μ M NMDA plus 0.1 μ M glycine in the presence and absence of 100 μ M corymine. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of percentages of control NMDA response from 3-17 oocytes. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.005$. B) Effect of corymine (1-100 μ M) and spermine (100 μ M) on NMDA response at 0.1 μ M glycine on day 6. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of percentages of control NMDA response from 5 oocytes. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.005$. The number in each parenthesis indicates number of oocytes that give response higher than control to number of tested oocytes.

Fig. 5. Effects of spermine, AP5, MK801, and DIDS on corymine-induced potentiation of NMDA currents in *Xenopus* oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs. Currents were elicited by application of 30 μ M NMDA plus 0.1 μ M glycine in the presence and absence of test drugs. After the NMDA currents were potentiated by corymine (CO, 100 μ M), either spermine (SP, 100 μ M), AP5 (AP, 10 μ M), MK801 (MK, 100 μ M) or DIDS (100 μ M) was co-applied with. A) Tracings from an oocyte show additive effect by

spermine and inhibitory effect by AP5 and MK801. B) Percentages of control NMDA response are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. from 3–4 oocytes. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.005$. C) Correlation between the extents of potentiation caused by corymine and spermine. Data were obtained from 24 different oocytes. Each point indicates the data from individual oocytes.