维普资讯 http://www.cqvip.com

① 92,17(1) 1-6

实验性肝性脑病小鼠GABA受体分析

生化教研室 杨 惠 王征泰

Q591.2

提 要 作者用自己建立的只需一只小鼠即可作GABA受体分析的方法（NSB、TB、SB，CV<10%），进行了肝性脑病（HE）小鼠大脑的GABA受体分析。此外，测定了HE时GABA调节蛋白的变化。结果表明HE组虽有Triton处理的突触膜上低亲和力GABA受体消失，但起作用的GABA受体位点不变。同时，新鲜和处理突触膜上GABA受体亲和力增加，提示GABA突触传递活性增强。HE小鼠突触膜上结合的GABA调节蛋白含量减少，抑制活性降低。它可能是HE小鼠GABA受体亲和力增加的原因之一

关键词 肝性脑病；GABA受体；GABA调节蛋白
中图分类号 Q591.2

自1982年Schafer[1]提出HE的GABA假说以来，有不少实验就HE时脑内、外GABA来源、代谢、浓度变化及血脑屏障通透性等方面说明该假说的可能性。但这些都不能直接反映脑GABA突触传递情况。为此，分析HE时GABA受体的变化，从而推测GABA突触传递状况显得尤为重要。已报道HE家兔[2,3,4,5]和大鼠[6,7]有GABA受体的变化。然而这两种动物模型的结果不尽相同，如果GABA介导的神经抑制与HE发病有关，GABA受体变化理应在多种动物身上重复与核证。GABA突触传递不仅与突触膜上GABA受体的密度和亲和力有关，也受GABA调节蛋白的影响。关于GABA调节蛋白在GABA神经传递性疾病尤其是HE发病中是否起作用未见报道。本文首次以D-氨基半乳糖复制小鼠HE模型研究GABA受体变化，并对HE时突触膜对GABA调节蛋白的反应性以及与突触膜结合的GABA调节蛋白含量作了初步探讨。

材料和方法

1. 材料

（1） [4-^{3}H]-GABA。 中科院原子核研究所产品，比放射性35ci/mol，放射性化学纯度大于90%。

（2） D-氨基半乳糖。 本组从猪硫酸软骨素制备[8]。注射液为20%的生理盐水溶液，pH7.2。

（3） 0.05mol/L，pH7.1的Tris-柠檬酸缓冲液（缓冲液Ⅰ）。

（4） 0.05mol/L，pH7.1，含0.01%Triton-X100的Tris-柠檬酸缓冲液（缓冲液Ⅱ）。

（5） 闪烁液。萘100g，2，5-二苯噁唑6g，1，4-双[5-苯基噁唑-2]-苯0.3g溶于1000ml二氧六环中。

2. 方法

（1） 动物处理 C-57雄性小鼠（18～23g体重）随机分为正常组和HE组。HE模型由腹腔注射D-氨基半乳糖（6mg/g体重）造成。多数小鼠于给药后16～38h出现昏迷，表现为嗜睡，尿黄，后肢瘫、单方向旋转，抽搐和扶正反射消失等。

（2） 突触膜制备 参照Enna 1975[9]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1977[10]年提出的方法：小鼠断头后迅速取出全脑，在冰冷条件下经生理盐水洗净后称重，加入0.32mol/L蔗糖溶液（1:15）制成匀浆。先于1,000g离心10min取上清液再于20,000g离心20min，沉淀中加入重蒸水（约4ml/小鼠），用MSE超声破碎器（振幅12μm，30s）粉碎沉淀。8,000g离心20min，收集上清液和上层淡黄色沉淀，36,000g离心20min，所得沉淀为新鲜突触膜（膜A）。向膜中加入缓冲液Ⅰ（0.5ml/小鼠），匀浆器分次沉淀后用同种缓冲液准确稀释到1mg蛋白质/ml，立即用于受体分析。

将膜A贮存于－30℃、36h后室温融冻，加入缓冲液Ⅱ（约4ml/小鼠）。37℃保温30min后36,000g离心20min，沉淀用缓冲液Ⅰ洗净后36,000g离心20min。将沉淀重复一次上述缓冲液处理及洗涤过程，所得沉淀为处理突触膜（膜B）。按膜A相同方法准确稀释至1mg蛋白质/ml，用于受体分析和GABA调节蛋白测定，可－30℃贮存。

（3）GABA调节蛋白制备　按1mg膜A加入9.0ml（总体积）缓冲Ⅰ，0℃15min后于36,000g离心20min，上清液即为GABA调节蛋白提取液（膜A提取液）[11]。膜B提取操作同上。

（4）GABA受体测定　测定在缓冲液Ⅰ中进行，总体积200μl，膜蛋白50μg，^{3}H-GABA浓度为11.28～225.5nmol/L（9个点），4℃保温5min后36,000g离心10min，用冰冷重蒸水洗涤沉淀两次（4ml×2），转移（50μl×2）至闪烁瓶内，加甲酸（85%），H_2O_2（30%）各5μl，85℃放置2h，冷却后加5ml闪烁液并于暗处过夜。以Beckmen LS100C液闪仪计数，平均计数效率为35%。其中加有1mmol/L GABA管为非特异性结合管（NSB），双管重复，不加者为总结合管（TB，三管重复），二者之差为特异性结合（SB）。数据按Scatchard分析求出受体密度（B_{max}）和平衡解离常数（K_D）。

（5）GABA调节蛋白测定。^{3}H-GABA浓度为20.16nmol/L，膜A提取液30μl，其他同受体测定。将正常或HE组膜A提取液加入正常膜B中，以每ml提取液中GABA调节蛋白的单位（U/ml，能抑制30%^{3}H-GABA结合的调节蛋白的量定为一个单位[11]）定量地表示GABA调节蛋白的抑制活性。分别在二组动物的膜B中加入同一来源的正常组膜A提取液，以Ⅰ%/μg蛋白质定量地表示突触膜对GABA调节蛋白的反应性。

$$\text{Ⅰ\%/μg蛋白质} = \frac{\text{无提取液SB} - \text{加提取液SB}}{\text{无提取液SB}} \times 100\% \Big/ \text{30μl提取液中蛋白质量(μg)}$$

（6）蛋白质浓度测定　采用考马斯亮兰法[12]。

（7）统计学处理　t检验。

结果和讨论

1. 方法学：^{3}H-GABA计数回收率平均为104.9%，GABA受体测定重复性良好，CV%均小于10%，见表1及2。

表1　^{3}H-GABA计数回收率

	标准管*	测定管**	回收率(%)
	5	10	10
dpm($\bar{x}$±SD)	359,046±20,768	376,489±18,326	104.9±5.1
CV(%)	5.8	4.9	4.9

* 50μl(46.12nmol/L)^{3}H-GABA直接计数

** 50μl(46.12nmol/L)^{3}H-GABA加膜B50μg消化后计数

表2　GABA受体测定重复性*

	NSB	TB	SB
n	10	10	10
dpm($\bar{x}$±SD)	4,127±158	12,416±599	8,289±599
CV(%)	3.8	4.8	7.2

* ^{3}H-GABA浓度为20.16nmol/L

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3显示膜蛋白浓度低，SB/NSB及SB/TB比率大，所以膜蛋白浓度不宜过高。此外，SB/NSB及SB/TB比率随^{3}H-GABA浓度增高而下降，正如Enna[8]提及的在Scatchard分析中，高浓度^{3}H-GABA的数据不太可靠。

表3 影响SB/TB及SB/NSB的因素

^{3}H-GABA (nmol/L)	膜蛋白/总体积 (μg/μl)	SB/TB (%)	SB/NSB
22.88	200/0.5	35.5	0.51
22.88	75/0.5	42.5	0.73
11.28	50/0.2	65.7	1.93
22.55	50/0.2	61.4	1.58
45.11	50/0.2	52.5	1.10
90.21	50/0.2	38.8	0.63
180.42	50/0.2	30.5	0.44
225.53	50/0.2	27.5	0.38

据报道最高密度的^{3}H-GABA受体结合在脑的粗突触部分，SB/NSB为0.66左右（比放射性10Ci/mmol；0.8～1.2mg膜蛋白/2.0ml；^{3}H-GABA浓度为2nmol/L，在GABA受体常规分析中，SB/TB为40～50%[13]。当SB/TB小于20%时则要求良好的精确度和重复性。其他条件固定时，比率主要取决于膜制剂和脑区域[14]。作者参照Toffano[11]建立的较低膜蛋白浓度的^{3}H-GABA受体测定法，除较高浓度点外，SB/TB及SB/NSB均达分析要求。经重复性和回收率检验，改进后的方法是一种稳定而且灵敏的方法。只需单只小鼠即可作Scatchard分析，而同样实验根据报道常用3～4只大鼠。这就从方法学上克服了需用较大动物和多个动物大脑合为一个样品的弱点。

2. **GABA受体分析** 正常小鼠膜A上只检出一种GABA受体，膜B上有高、低亲和力两种GABA受体。HE小鼠膜A上GABA受体亲和力增加（$p<0.01$），受体密度与正常组无差异（$p>0.05$）；膜B上低亲和力GABA受体消失，留下的GABA受体亲和力增加（$p<0.01$），受体密度低于正常组高亲和力受体（$p<0.01$），见表4、图1及2。据文献报道正常小鼠膜B上是有两种GABA受体，正常大鼠膜A和膜B的材料[9,10,11,15,16]均与表4的结果一致。

表4 GABA受体Scatchard分析结果*

膜	动物组	K_{D_1}**	B_{max_1}***	K_{D_2}**	B_{max_2}***
A	正常(n=6)	106±4	1.9±1.1	—	—
	HE(n=6)	81±4	1.7±0.4	—	—
B	正常(n=7)	146±25	7.7±1.2	45±5	4.3±1.0
	HE(n=6)	—	—	28±6	1.6±0.5

* $\bar{x}\pm SD$；** nmol/L；*** ^{3}H-GABA pmol/mg蛋白质

在制备突触膜过程中处理愈少，条件愈温和，获得的膜制剂愈接近体内状态。膜A未经冰冻、冻融、Triton-X^{100}处理和缓冲液洗涤，理应更接近体内突触膜状态。把膜A的GABA受体设想为开放性的起作用的位点，HE时虽有膜B上低亲和力受体消失，但膜A上可检出的GABA受体密度与正常组膜A无差异，即起作用的GABA受体位点不变，同时伴有HE小鼠膜A和膜B上GABA受体亲和力增加。受体密度和/或亲和力增加都将使机体对该受体相应配基的敏感性增加。HE小鼠GABA受体的变化提示对GABA介导的神经抑制作用的敏感性增强。用激活GABA递质系统的药物[17,18]引起的昏迷，其视觉诱发电位（VEP）的波型与D-氨基半乳糖所致的昏迷动物及临床HE病人的相同。GABA受体拮抗剂荷包牡丹碱能缓解HE家兔的神经状态和纠正VEP。苯二氮䓬类受体拮抗剂R_o15-1788用于临床HE病人同样获得缓解[19,20,21]。这些都是HE与GABA神经传递增强有关的重要佐

维普资讯 http://www.cqvip.com

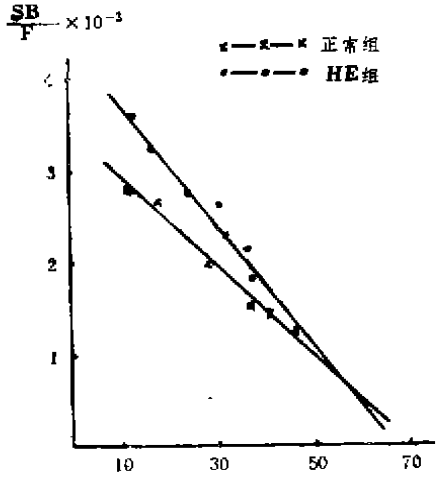


图1 膜A Scatchard作图

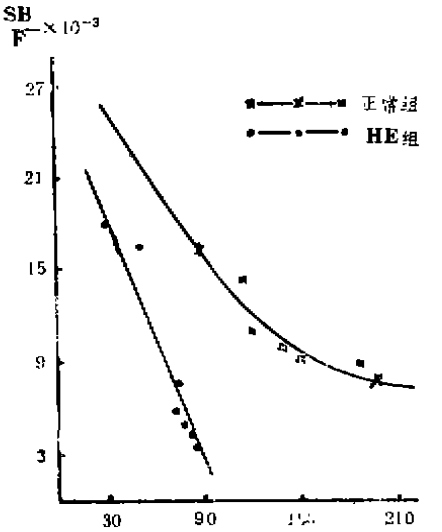


图2 膜B Scatchand 作图

证。加之，尿毒症[22]和低血糖昏迷[6]动物及非肝源性死亡病人[23,24]均没有GABA受体变化。可见HE动物GABA受体变化是肯定的而且是特异的。但不同种类动物，不同的实验手段所得的GABA受体变化是有差异的。重要的是除了已有报道的家兔和大鼠外，本文首次添加了小鼠的材料，使之更具有普遍意义。

HE时GABA受体变化的机理不清，一种可能是神经膜的改变，由于肝昏迷家兔突触膜脂/蛋白质比率增加[25]和向温性过渡（thermotropic transition）性质改变[26]所致。第二种可能是类似肽类激素受体系统对递质浓度表现的上或下调节，脑内GABA含量升高将导致GABA受体密度降低[27]，但也有相反的报道[28]。关键是脑内GABA含量不能代表突触间隙GABA浓度，也就很难弄清GABA受体变化与其递质浓度间的关系。

3. GABA$_A^T$调节蛋白　大鼠实验表明[11]膜A提取液中存有一种内源性GABA受体结合抑制剂，即GABA调节蛋白（该提取液中GABA浓度小于1nmol/L，对³H-GABA与受体结合无任何干扰）。这种内源性抑制活性与所加入提取液的量成正比关系，膜B提取液中无此种抑制活性。我们用小鼠实验证实了上述结果，见图3。GABA调节蛋白通过改变突触膜上GABA受体的亲和力与密度影响GABA突触传递。实验证明[11]向膜B中加入纯化的GABA调节蛋白，当加入量少于一定量时，膜B上两种GABA受体无任何变化。当加入量超过这一定量时，只能检出一种GABA受体，并随加入量的增加，GABA受体亲和力与密度进一步减少。

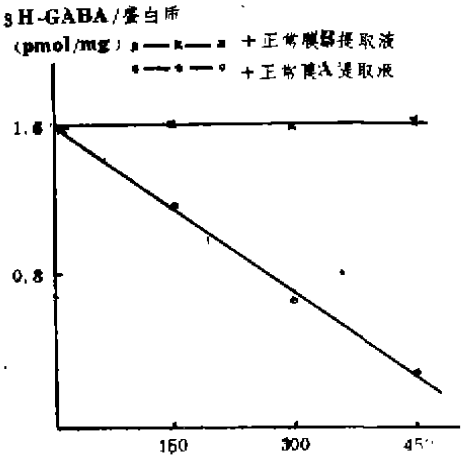


图3 膜A上存有GABA调节蛋白

HE小鼠突触膜B对GABA调节蛋白的反应性无变化（见表5），但突触膜A上结合的

维普资讯 http://www.cqvip.com

表5 突触膜对GABA调节蛋白的反应性*

膜B	HE组	正常组	
n	11	11	
I%/μg蛋白组**	26.4±2.4	24.3±4.7	P>0.05

* 实验条件见材料和方法；** x̄±SD

表6 GABA调节蛋白含量与抑制活性*

膜A提取液	HE组	正常组	
n	11	12	
蛋白质(μg/ml)**	51.0± 9.6	90.1±10.7	P<0.01
抑制活性(U/ml)**	57.2±11.6	73.4±12.5	P<0.01

* 实验条件见材料和方法；** x̄±SD

GABA调节蛋白含量减少，抑制活性降低(见表6)，这可能导致HE小鼠GAABA受体亲和力增加，为HE时受体变化的机理提供了第三种可能性。

本文首次报道了HE小鼠可检出的GABA受体亲和力增加，起作用的受体位点数不变，推测有GABA介导的神经抑制作用加强，为HE的GABA假说的普通性意义提供了实验依据；提出HE小鼠突触膜上结合的GABA调节蛋白含量减少，抑制活性降低可能是HE小鼠GABA受体亲和力增加的一个原因。这是很有意义的线索，有必要对GABA调节蛋白的含量、分布、在正常及HE条件下的作用进行深入的研究。

参 考 文 献

[1] Schafer DF. Lancet 1982; 2:18

[2] Schafer DF, et al. Gastroenterology 1980; 79:1123

[3] Schafer DF, et al. Clin Res 1980; 28:485A

[4] Pappas SC. Hepatology 1984; 4:1051 Abstract B

[5] Schafer DF, et al. J Lab Clin Med 1983; 102:870

[6] Baraldi M, et al. in Dynamic of Neurotransmitter Function. ed by Hunin I, Rayen Press, New York 1984; 349

[7] Baraldi M, et al. Science 1982; 216: 427

[8] Whert, et al. Biochemical Preparations 1963; 10:52

[9] Enna SJ, et al. Brain Res 1975; 100: 81

[10] Enna SJ, et al. Mol Pharmacol 1977; 13:442

[11] Toffano G, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75(8):4024

[12] Bradford MM. Anal Biochem 1976; 72 :248

[13] Wang YJ, et al. Biochem Pharmacol 1979; 28:1123

[14] Olsen RW. in The GABA Receptors. ed by Enna SJ. The Humana Press. Clifton, New Jersey 1983; 63

[15] Zukin SR, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71(12):4802

[16] Bowey NG. in The GABA Receptors. ed by Enna SJ. The Humana Press. Clifton, New Jersey 1983; 178

[17] Schafer DF, et al. Gastroenterology 1980; 79:1052 Abstract

[18] Zieve L, et al. Hepatology 1986; 6: 902

[19] Scollo-Lavizzari G, et al. Lancet 1985; 1:1324

[20] Grimm G, et al. J Hepatol 1987; 4

维普资讯 http://www.cqvip.com

(suppl 1):521
[21] Bansky G, et al. Lancet 1985; 1:1324
[22] Ferenci P, et al. Hepatology 1984; 4:186
[23] Tran VT, et al. Ann Neurol 1981; 9: 289
[24] Ferenci P, et al. Gastroenterology 1983; 84:1371 Abstract
[25] Pappas SC, et al. Hepatology 1982; 2:708
[26] Pappas SC, et al. Hepatology 1984; 4:1051 Abstract(a)
[27] Jones EA, et al. in Progress in Liver Diseases, Vol VIII, ed by Popper H and Schaffner F, Gnine and Stratton, New York, 1986, 525
[28] Sykes C, et al. Biochem Pharmacol 1984; 33:387

(收稿日期: 1991-06-07)

THE CHANGES OF GABA RECEPTORS IN MICE WITH EXPERIMENTAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Yang Hui et al

Dept. of Biochemistry

The GABA hypothesis of hepatic encephalopathy (H.E) was supported by many reports with regard to its content, metabolism, permeability against blood brain barrier, etc. But the experimental data which reflect the changes of GABA receptors in H.E. were limitted only to rabbits and rats.

We established a method with a small concentration of membrane protein (50ug/0.2ml) for the analysis of GABA receptors with satisfactory results (NSB, TB, SB; CV<10%; SB/TB; 66-30% at the concentrations of ^{3}H-GABA 11.28-225.5 pmole/L). The synaptic membrane prepared from the brain of a single mouse was sufficient for an experiment, thus, avoiding the pooling of brain extracts from several mice.

Our results showed for the first time that mice with H.E were associated with a loss of low-affinity receptors in Triton treated synaptic membrane, but the densities of the active binding sites were not changed. The increase of the affinities of GABA receptors in fresh and Triton treated synaptic membrane suggests the increase of GABA synaptic transmissional activity in mice with H.E. Boin the amount of protein extracted from the fresh membrane and its inhibitory activities as GABA-modulin of mice with H.E. were significantly lower than those of the control($p<0.01$). These may explain partly for the increase of the affinities of GABA receptors in mice with H.E

KEY WORDS Hepatic Encephalopathy; GABA Receptor; GABA Modulin