维普资讯 http://www.cqvip.com

肝性脑病小鼠GABA—T及其抑制物的研究

生化教研室 蒋晓秋 王征泰

提 要 采用修改的^{14}C-GABA法测定小鼠脑、肝、肾组织GABA-T活性，方法灵敏可靠。氨基半乳糖诱发的肝性脑病小鼠肝脏GABA-T活性明显降低。首次报道了小鼠肝匀浆上清液对脑GABA-T有抑制作用，经加热、盐析、Sephadex G-150层析，抑制活性在洗脱前段。提示严重肝损害时肝脏对GABA的分解代谢降低，正常肝细胞中存在有对脑GABA-T有抑制作用的分子量较大的物质

关键词 GABA-T；GABA-T抑制物；GABA；肝性脑病

目前，对肝性脑病的发病机制仍解释不一，Schafer (1982) 提出的r-氨基丁酸(GABA)假说是一条新的研究线索[1]。Ferenci(1983) 推测*D*—氨基半乳糖诱发的家兔急性肝功能衰竭的模型动物血清GABA浓度升高的可能原因是GABA分解代谢降低，但实验结果与作者的设想不符，肝及肾的GABA-T活性不仅没有降低，反而分别增加56%和80%[2]，而脑GABA-T活性降低[3]。

以小鼠和大鼠为在实验动物，我们证实了肝昏迷动物血清中存在有抑制脑GABA降解的物质，并进一步发现小鼠肝中也含有器官特异的GABA降解抑制物（待发表）。

GABA降解涉及了两步反应，首先，GABA由r-氨基丁酸转氨酶(GABA-T, E.C 2.6.1.19)催化生成琥珀酸半醛(SSA)，再经琥珀酸半醛脱氢酶(SSA-DH, E.C1.2.1.24)催化氧化为琥珀酸(SA)。为此，我们采用灵敏、直接的同位素标记法探讨上述GABA降解物能否作用于脑GABA-T以及肝性脑病小鼠脑、肝、肾GABA-T活性变化，以期进一步考核肝性脑病的GABA假说。

材料与方法

[*U*—^{14}C] GABA (200mCi/mmol), Amersham International plc, England产品；*D*-氨基半乳糖盐酸盐，本室从猪硫酸软骨素制备[4]；阳离子交换树脂732，湿计粒度0.3—1.2mm，上海树脂厂产品；Sephadex *G*-150，粒度40—120μ，Phar-

(SRID). Serum α_1-AT, α_1-AG and HP levels were all significantly elevated in patients with five-cancers above as compared with those benign diseases or normal blood donors. By application of the stepwise discriminatory analysis, discreminatory formula has been established foe seven groups data. Let all data to back substitution, among normal blood donors, benign diseases and HCC-three group's rate of consistency are over 80 persent. The experiment results indicate that index is expounded in patients with cancers, especially in HCC for differential diagnosis

KEY WORDS Patients with cancer; α_1-Antitrypsin (α_1-AT); α_1-Acid glycoprotein (α_1-AG); Heptoglobin (HP); Single adrial immunodiffusion (SRID)

维普资讯 http://www.cqvip.com

mucia产品；β-巯基乙醇(β-ME)，比重1.12，纯度95%，Triton X-100，BDH产品；磷酸吡哆醛(PLP)，Merck产品；考马斯亮蓝G-250，Fluka进口分装，上海化学试剂分装厂；闪烁液：2,5,-二苯基噁唑(PPO)10g，1,4-双[5-苯基噁唑-2]-苯(PoPoP)0.5g，萘50g，乙二醇乙醚167ml，加二氧六环至1000ml。

1. 肝昏迷模型动物：

雄性小白鼠，体重25—56g，随机分成两组。实验组腹腔注射新鲜配制的D-氨基半乳糖。两组小鼠均自由进食，饮水。实验组动物给药后11—46小时多数出现拒食，嗜睡，尿黄，行动迟缓，后肢瘫痪，尿失禁，翻身扶正反射消失等异常表现，判断为发生肝性脑病。断头处死。

2. 小鼠脑匀浆、肝肾匀浆上清液的制备分离：

两组小鼠断头处死后，迅速取出全脑、肝及肾，分别用冰冷的0.2mole/L磷酸钾缓冲液(pH8.0，含有0.1mmole/L EDTA，0.04mmole/L PLP，4.5mmole/L β-ME，0.2%Triton X-100)各制成1:10、1:5、1:5(w:v)匀浆，肝肾组织匀浆经4℃，15,000g×30min离心，分离出上清液(LHS，KHS)。使用前仍用上述缓冲液分别稀释达所需浓度。

3. GABA-T活性的测定：

按White报道的同位素标记法([^{14}C]GABA)测定GABA-T活性，在样本体积、离子交换树脂、闪烁液等方面作了修改[3,5]，根据底物[^{14}C]GABA的比放射性计算生成产物的量。

4. 小鼠LHS脑GABA-T抑制物的Sephadex G-150层析：

正常小鼠LHS，经55℃保温20min，取45—65%饱和硫酸铵盐析部份，以0.2mole/L磷酸钾缓冲液(pH8.0)溶解后，进行Sephadex G-150柱层析，分段收集洗脱液，测定其对脑GABA-T的抑制作用。

5. 蛋白质浓度按Bradford法测定[6]。

结　果

1. 测定GABA-T活性方法的评价：

(1) 方法的变异程度：

分别取10μl 1:140BH，1:100LHS，1:60KHS，测定方法的变异程度，结果见表1：

表1 方法的变异程度

样本	n	$\bar{X}\pm SD$(dpm)	CV(%)
BH	10	3956±148.7	3.76
LHS	10	1159±64.2	5.54
KHS	10	2438±171.0	7.01

(2) 小鼠BH、LHS和KHS的体积与放射性大小(dpm)的关系：

结果见图1：

在所选条件下，dpm与BH、LHS、KHS体积在0—20μl、0—25μl、0—20μl (即所含蛋白质分别在0—18μg、0—28μg、0—39μg)

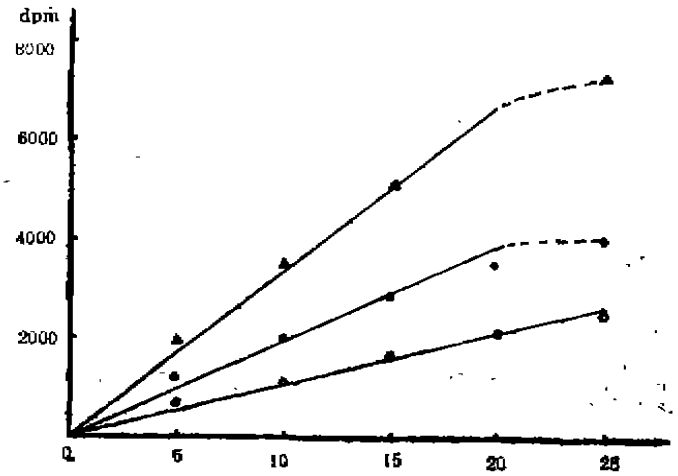


图1 样本体积与dpm的关系

注：蛋白质浓度分别为：BH，0.9mg/ml，LHS，1.12mg/ml，KHS，1.97mg/ml。

维普资讯 http://www.cqvip.com

以内有良好的线性关系。综上可见，修改后的White法是灵敏可靠的。

2. 肝昏迷小鼠脑、肝、肾组织 GABA-T活性的改变：

结果见表2：

表2 肝昏迷小鼠脑、肝、肾组织 GABA-T活性的改变

	GABA-T活性(pmole/h/μgprotein)		P值
	对照组($n=8$) ($\bar{X}\pm SD$)	昏迷组($n=8$) ($\bar{X}\pm SD$)	
BH	194.5±15.40	180.6±14.66	>0.05
LHS	58.2±4.68	41.9±5.92	<0.01
KHS	60.6±5.30	56.5±5.02	>0.05

昏迷组LHS GABA-T活性有明显降低($P<0.01$)，与对照组比较平均降低29.6%，而BH和KHS GABA-T活性无显著差异($P>0.05$)。

3. 小鼠LHS对 BH GABA-T 的抑制作用：

在测定 BH GABA-T 活性的系统中加入不同体积(5—25μl) 正常小鼠LHS所测得结果如表3和图2，

表3 加入LHS对脑GABA-T活性的影响

LHS(μl)	dpm_{BH+LHS}	dpm_{LHS}	dpm	$I\%$
0	3499	0	3499	0
5	3834	735	3099	11.4
10	4128	1167	2961	15.4
15	4282	1753	2529	27.7
20	4649	2201	2448	30.0
25	4910	2604	2306	34.1

注，dpm_{BH+LHS}，10μl BH加入不同体积LHS(0—25μl)后的放射性；

dpm_{LHS}，不同体积LHS(0—25μl)的放射性（与μl呈线性关系）；

dpm，$dpm_{BH+LHS}-dpm_{LHS}$的差值。

$I\%$(抑制率)$=\frac{dpm_0-dpm}{dpm_0}\times 100\%$

其中dpm_0表示加入LHS 0 μl时的dpm值。

由图2可见，在一定范围LHS体积 (0—25μl)内，随着加入LHS体积增加，抑制率也逐渐增加。

4. LHS中脑GABA-T抑制物的 Sephadex G-150层析：

结果见图3：

可见，LHS 经55℃保温20分钟，45—65%饱和硫酸铵盐析后上 Sephadex G-150

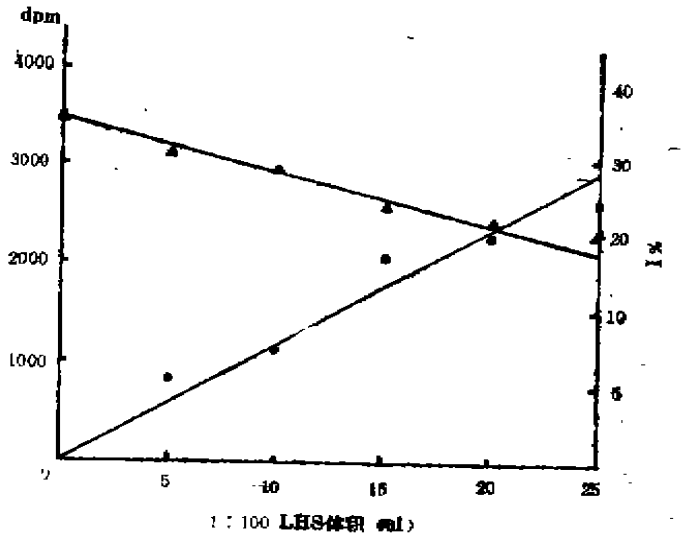


图2 加入LHS对脑GABA-T活性的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

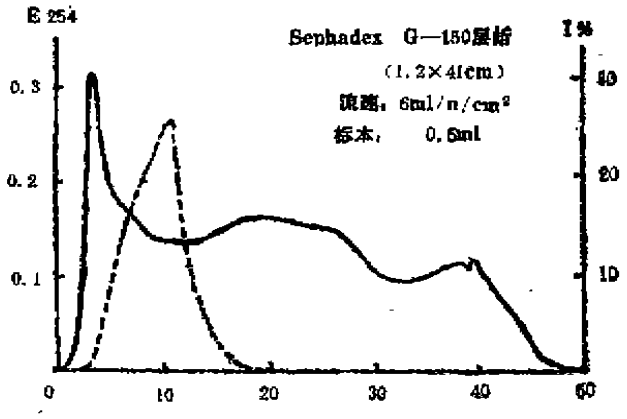


图3 小鼠LHS中脑GABA-T 抑制物的Sephadex G-150层析。洗脱缓冲液：0.05mole/L磷酸钾缓冲液(pH8.0)。(E_{254} ——；I%：……)

柱层析，显示抑制活性洗脱在前段。

讨 论

所建立的方法保证小鼠 BH、LHS 和 KHS分别在含蛋白质0—18μg、0—28μg、0—39μg以内与*dpm*呈线性关系。据报道，测定时加入 NAD^+ 可扩大转氨酶反应的线性范围，因为产物SSA和谷氨酸的堆积能导致逆反应速度的增加，而NAD^+的加入可通过内源性的SSA—DH作用使SSA保持较低浓度，尽管如此，作者认为加入 NAD^+ 会使影响GABA-T 活性测定因素复杂化[7]。我们控制酶促反应中底物转化为产物不超过10%，使逆反应的影响减少或忽略不计[6]。因此，测定时每100μl 酶反应混合液含放射性88,000*dpm*(0.2mmole/L[^{14}C]GABA,2mCi/mmole)，反应后，产物SSA和SA 的放射性不应超过8,800*dpm*，即避免由于加入NAD^+而使测定因素复杂化又突出了，具有组织样品用量少，同位素取量微的优点。

目前认为，引起肝性脑病的"毒性物质"主要在肝脏中解毒，肝脏损害时血中浓度升高，此时有神经抑制作用的物质能穿过血脑屏障，使其在脑中的含量增加。血及脑中含量的改变出现在脑病发生之前，而且含量变化的程度与脑病的程度基本一致等[8]。Schafer在假说中提出的GABA 比较符合这种"毒性物质"的特征[1]。肝肾组织在GABA的分解代谢中具有重要的作用，肝组织 GABA-T 活性占全身组织（包括中枢神经系统）的80%[2]，我们测得正常小鼠肝肾酶活性分别占全身组织（包括脑、肝和肾）酶活性的60%以上和10%，可见肝肾组织对GABA 的分解代谢是不容忽视的。实验发现[2,3,9,10,11]，注射了D-氨基半乳糖的家兔在明显肝昏迷症状出现前血中 GABA 水平已经增加；暴发性肝损害与失代偿性肝硬化并发肝性脑病的病人血中 GABA也明显增高，其水平倾向于与脑病程度相关；肝昏迷家兔和大鼠注射^{3}H-GABA后，血中 ^{3}H-GABA 浓度比对照组下降延迟，与此时较低浓度的其^{3}H代谢物相平行，这些现象提示肝昏迷时肝脏对GABA的摄取降低，周围组织GABA-T的活性降低。但Ferenci却报道肝GABA-T活性是增加的[2]。我们在测定 D-氨基半

维普资讯 http://www.cqvip.com

乳糖诱发的肝昏迷小鼠肝脏GABA-T活性时发现与对照组比较，酶活性不是增加，而是降低29.6%，与上述推论一致，即严重肝损害时肠道细菌产生的GABA[12,13]，由于不能被肝脏迅速摄取并降解，因此进入血循环使血GABA浓度增加，由于此时血脑屏障通透性发生改变[14,15,16,17]，特别是李倩以^{3}H-GABA示踪法首次报道了肝昏迷时血脑屏障对GABA的通透性增加[18]，可使脑中GABA浓度增高，产生神经抑制效应，引起一系列脑病症状。

肝昏迷时小鼠全脑匀浆GABA-T活性没有改变，这一结果与曾昭淳报道的一致[19]，但同Ferenci肝昏迷家兔的全脑GABA-T活性降低矛盾[3]，这也许与动物种属差异有关，值得指出的是，小鼠与家兔对D-氨基半乳糖的忍受能力也有较大的差异。

在我室以往工作基础上采用直接的同位素法首次发现小鼠LHS对脑GABA-T的抑制作用，这种抑制作用在一定范围内与LHS体积成线性关系，抑制物经55℃热处理和饱和硫酸铵分段盐析，Sephadex G-150层析洗脱在前段，提示其分子量较大，与Ferenci报道的肝昏迷家兔血清中分子量低于25,000道尔顿的抑制物不同[3]。研究该抑制物在肝昏迷发生中是否发挥了作用以及如何作用就很有必要，或许(1)严重肝损害使该抑制物入血，加之血脑屏障通透性的改变使原来不能通过它的通过某种特异的转运系统进入脑；(2)严重肝损害使该抑制物释放入血后降解为仍保留抑制作用的较小分子物质，血脑屏障通透性的改变使其进入脑，值得进一步研究。

参考文献

[1] Schafer D F, et al. Lancet 1982; 2:18

[2] Ferenci P, et al. Hepatology 1983; 3:507

[3] Ferenci P, et al. J. Neurochem. 1984; 42:1487

[4] Wheat R W, et al. Biochemical preparation 1963; vol. 10:52

[5] White H L, et al. J. Neurochem. 1978; 31:41

[6] Bradford M M. Anal. Biochem. 1976; 72:248

[7] Hall Z W, et al. J. Neurochem. 1967; 14:45

[8] Jones E A. Postgrad. Med. J. 1983; 59(Supple 4):42

[9] Schafer D F, et al. Gastroenterology 1980; 78:1320

[10] Schafer D F, et al. Gastroenterology 1980; 79:1123

[11] Zeneroli M L, et al. J. Neurochem. 1982; 38:1219

[12] Schafer D F, et al. Gastroenterology 1980; 79:1052

[13] Schafer D F, et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1981; 167:301

[14] Livingstone A S, et al. Gastroenterology 1977; 73:697

[15] Horowitz M, et al. Pediatr. Res. 1981; 15:706

[16] Horowitz M, et al. Gastroenterology 1983; 84:1003

[17] Zaki AEO, et al. Hepatology 1984; 4:359

[18] 李倩，王征泰. 重庆医科大学学报 1987; 12(1):13

[19] 曾昭淳，王征泰. 重庆医学院学报 1984; 增刊: 27

维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1989年第14卷第4期

长角血蜱、亚洲璃眼蜱和残缘璃眼蜱同功酶的研究

寄生虫学教研室 裘明华*
第二医院 周友梅 刘 军
刘连珠**

提 要 本文首次报道三种硬蜱不同发育期的同功酶酶谱研究。

长角血蜱雌、雄虫，若虫和幼虫：苹果酸脱氢酶同功酶分别显示6、5、5和4条酶带。酯酶同功酶分别显示5、5、5和8条酶带。乳酸脱氢酶同功酶分别显示2、3、2和2条酶带。

亚洲璃眼蜱雌、雄虫、幼虫和卵：苹果酸脱氢酶同功酶分别显示3、3、5和9条酶带。酯酶同功酶分别显示6、6、6和3条酶带。乳酸脱氢酶同功酶分别显示2、2、2和2条酶带。

残缘璃眼蜱卵：苹果酸脱氢酶同功酶显示8条酶带。酯酶同功酶显示5条酶带。乳酸脱氢酶同功酶显示2条酶带

关键词 长角血蜱；亚洲璃眼蜱；残缘璃眼蜱；苹果酸脱氢酶；酯酶；乳酸脱氢酶；同功酶

我们对硬蜱科二属三种硬蜱——长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis Neumann*)，亚洲璃眼蜱(*Hyalomma asiaticum asiaticum Schulze & Schlottke*和残缘璃眼蜱(*Hylom-*

* 现在浙江医科大学
** 第三军医大学

STUDIES ON GABA-T AND ITS INHIBITOR IN MICE WITH HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Jiang Xiaoqiu
(Department of Biochemistry)

The GABA-T activities of mice brain, liver and kidney were determined by the modified labeled ^{14}C-GABA method, and the method has been proved sensitive and feasible.

Hepatic encephalopathy in galactosamine-induced mice was associated with a marked decrease of GABA-T activity of liver. The inhibition of brain GABA-T activity by the LHS of normal mice was demonstrated for the first time. After heat denaturation at 55℃ and ammonium sulfate fractionation, the elution pattern of Sephadex G-150 gel filtration showed the inhibitory activity localized just behind the exclusive volume. These findings indicate a decrease of GABA catabolism in liver in severe liver injury, and there is a kind of GABA-T inhibitor in LHS with rather big molecular weight.

KEY WORDS GABA-T; GABA-T inhibitor; GABA; Hepatic encephalopathy