

# 氨基乙酸对鼠脑匀浆高亲和性 $\gamma$ -氨基丁酸摄取系统的选择性抑制<sup>1</sup>

朱剑琴、孙玉、王新光 (南京大学生物系, 南京 210008)

**提要** 动力学分析证明小鼠不同脑区存在着2种GABA摄取系统。其一对底物具有高亲和性,  $K_m$ 为12.6  $\mu M$ , 另一则具有较低亲和性,  $K_m$ 为110  $\mu M$ 。AOAA ip或体外实验都只抑制高亲和性GABA摄取系统, 不影响低亲和性GABA摄取系统。AOAA对GABA摄取的抑制和它对 $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)的抑制并无关系。

**关键词** 氨基乙酸;  $\gamma$ -氨基丁酸; 氨基丁酸转氨酶; 大脑皮层; 小脑; 下丘脑; 纹状体

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统(CNS)中的抑制性神经递质<sup>(1,2)</sup>。一般认为神经递质突触后效应的终止由特异性的摄取系统负责, CNS存在两种GABA摄取系统, 即高亲和性和低亲和性摄取系统<sup>(3)</sup>。已知氨基乙酸(AOAA)是(GABA-T)的专一性抑制剂, 由于它阻断GABA的代谢而使CNS中GABA的含量激增<sup>(4)</sup>, 但AOAA对GABA摄取的影响文献报道并不一致<sup>(5,6)</sup>。本文研究了AOAA对CNS中两种GABA摄取系统的影响, 得到了有意义的结果。

## 材料和方法

**药品** AOAA由中国科学院上海药物研究所供给, [<sup>3</sup>H]GABA (1480 GBq/mmol)由中国科学院上海原子核研究所供给。

**脑组织匀浆测定[<sup>3</sup>H]GABA摄取的体外实验** 小鼠断头处死, 不同部位脑组织在冷条件下, 迅速称重并用10倍于脑组织体积的0.3 M蔗糖溶液置玻璃匀浆器中研磨后, 离心(1000  $\times$  g)30 min, 取上清液按文献<sup>(7)</sup>方法测定[<sup>3</sup>H]GABA的摄取。上清液0.2 ml (相当于20 mg脑组织), 0.2 ml AOAA和4.6 ml培养

液25 $^{\circ}$ C预温15 min加入[<sup>3</sup>H]GABA后再温育10 min, 立即转入冰浴, 然后离心(40000  $\times$  g)30 min, 收集沉淀, 并用冰冷培养液洗涤2次, 最后在沉淀中加甲酸0.4 ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 ml, 置80 $^{\circ}$ C消化1 h, 冷却后加闪烁液(PPO, POPOP) 5 ml和乙二醇乙醚4 ml制成透明均相溶液, 并用FJ-2101型双道液闪仪测定放射性强度。每次实验都同时做平行空白对照。

**AOAA影响的体内实验** 给小鼠ip配制在pH 7.5 Krebs-磷酸缓冲液中的AOAA溶液, 4 h后处死取脑组织, 按上法制成匀浆测定GABA的摄取。

GABA-T的活力按文献<sup>(8)</sup>测定。

## 结果

**低浓度GABA的摄取** 图1是4个脑区在0.05  $\mu M$ 摄取GABA的时间曲线, 皮层和下丘脑匀浆温育60 min后, 组织与介质比(dpm/g组织:dpm/ml介质)高达150, 这比用脑切片所得的结果为低<sup>(9)</sup>, 图1结果表明皮层、下丘脑、纹状体和小脑4个不同脑区对

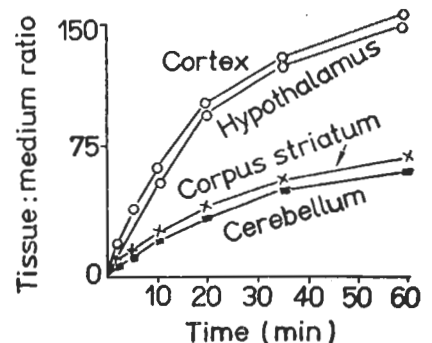


Fig 1. [<sup>3</sup>H] GABA (0.05  $\mu M$ ) uptake by homogenates from various regions of brain. 3 mice/point

$[^3\text{H}]\text{GABA}$  的摄取速度不同。

**GABA 浓度对摄取速度的影响** 皮层和小脑匀浆分别和含有不同浓度的未标记的 GABA 以及恒定浓度  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  的介质温育, 摄取速度和 GABA 浓度的双倒数作图, 如图 2 所示, 曲线由两部份组成, 这表明有两个不同

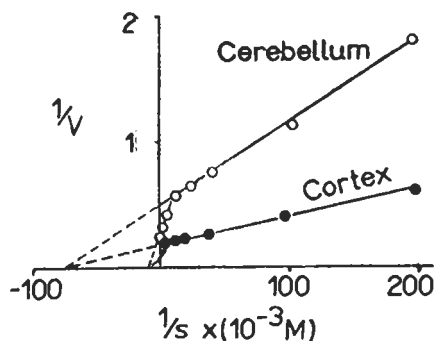


Fig 2. Double reciprocal plots to GABA concentration on rate of GABA uptake.  $V = \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  brain tissue;  $s = \text{GABA}$  concentration.

的 GABA 摄取系统, 一个对底物有高亲和性  $K_m = 12.6 \mu\text{M}$ , 另一个是低亲和性,  $K_m = 110 \mu\text{M}$ 。

**AOAA 的影响** 以皮层为材料观察体外 AOAA 对高亲和性 GABA 摄取系统的影响, 从图 3 所示, AOAA 对高亲和性 GABA 摄取

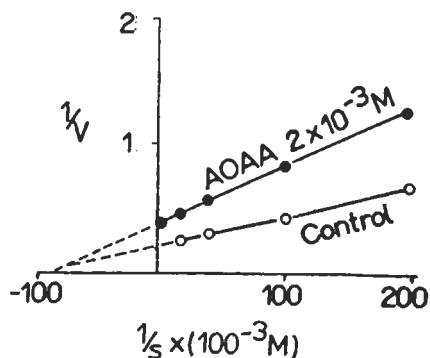


Fig 3. Non-competitive inhibitory effect of AOAA on the high affinity GABA uptake system of cerebral cortex. Homogenates were preincubated with AOAA for 15 min and then incubated with  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  for 10 min. 3 mice/point.

系统呈非竞争性抑制, AOAA 存在时  $V_{\text{max}}$  值约为对照组的一半。以小脑为材料 AOAA 对

低亲和性 GABA 摄取系统影响(见图 4、图 5)。

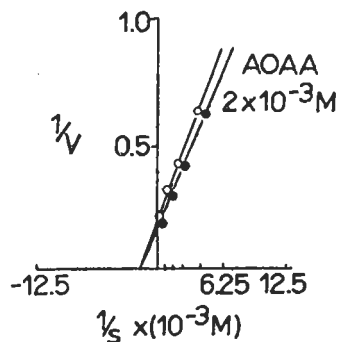


Fig 4. No inhibitory effect of AOAA on low affinity GABA uptake system of cerebellum. The concentration of GABA range from 0.2 mM to 1.28 mM. 3 mice/point.

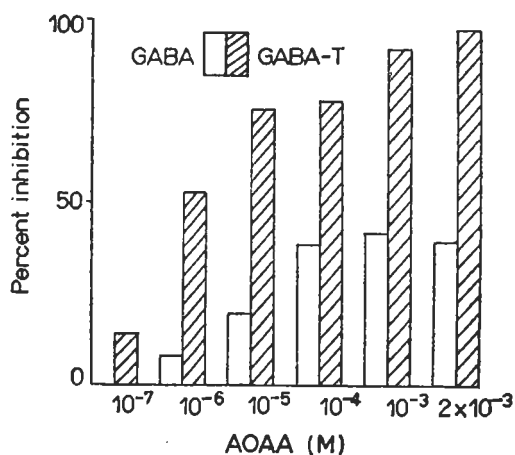


Fig 5. AOAA inhibition of  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  and GABA-T activity of cortex. Brain homogenates 20 mg was incubated with AOAA for 15 min and then incubated with  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  0.05  $\mu\text{M}$  for 10 min.

示不同浓度 AOAA 对 GABA 摄取和 GABA-T 的抑制作用。经 ip AOAA 后对 GABA 摄取系统的抑制作用总结在表 1 中。

Tab 1.  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  uptake ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  brain tissue,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) 4 h after mice ip AOAA or saline

GABA concn	0.05 $\mu\text{M}$	2 mM
Control	8.6 $\pm$ 0.4 (4)	8.4 $\pm$ 0.2 (4)
AOAA 30 mg/kg	7.4 $\pm$ 0.3 (4)**	8.5 $\pm$ 0.3 (5)
AOAA 60 mg/kg	7.1 $\pm$ 0.5 (5)**	8.3 $\pm$ 0.4 (4)

\*\* $p < 0.05$  as compared to control;

Number of mice in parentheses

## 讨 论

本实验结果表明高亲和性和低亲和性 GABA 摄取系统,对 GABA 的  $K_m$  分别为 12.6  $\mu M$  和 110  $\mu M$ , 这和 Bond 用脑切片为材料所得的结果<sup>(9)</sup>很接近。这两个摄取系统呈不均一的分布,各脑区同时具有这两个摄取系统。从图 1 可知皮层、下丘脑的 GABA 摄取系统主要是高亲和性的,它们对 GABA 的摄取比小脑或纹状体快 1 倍。

以大脑皮层切片为材料 AOAA 对 GABA 摄取具有抑制作用<sup>(6)</sup>,实验所用的 GABA 浓度为 0.025  $\mu M$ ,在此浓度下,应是对高亲和性摄取系统的影响。我们的结果表明无论是体内或是体外实验 AOAA 只抑制高亲和性 GABA 摄取系统,但对低亲和性摄取系统并无影响。AOAA 对 GABA 摄取的抑制看来和 GABA-T 的抑制无关系,因为从图 5 可知抑制摄取所需的 GABA 浓度远比抑制 GABA-T 为高。由于 GABA 摄取系统很可能是终止这一抑制性递质突触后作用的重要机制,低剂量 AOAA 能选择性地抑制高亲和性 GABA 摄取系统,而不影

响 GABA 的突触后受体<sup>(5)</sup>,这或许能解释低剂量的 AOAA 的抗惊厥作用,并证明 AOAA 是一个药理学上有用的 GABA 摄取抑制剂。

## 参 考 文 献

- 1 Curtis DR, Johnston GAR. Amino acid transmitters. In: Lajtha A, ed. *Handbook of neurochemistry*; vol 4. 1st ed. NY: Plenum Press, 1970:115
- 2 Krnjevic K. Inhibitory action of GABA and GABA-mimetics vertebrate neurons. In: Robert E, Chase TN, Tower DB, eds. *GABA in nervous system function*; vol 5. 1st ed. NY: Raven Press, 1976:269
- 3 Iversen LL, Neal MJ. *J Neurochem* 1968; 15: 1141
- 4 Baxter CF, Robert E. *J Biol Chem* 1961; 236: 3284
- 5 Iversen LL, Johnston GAR. *J Neurochem* 1971; 18:1939
- 6 Snodgrass SR, Iverson LL. *Ibid* 1973; 20:439
- 7 Snyder SH, Coyle JT. *J Pharmacol Exp Ther* 1969; 165:78
- 8 朱剑琴、宗玉英、龚明娥、洪余壁、陈均. 科学通报 1979; 24:45
- 9 Bond PA. *J Neurochem* 1973; 20:511

*Acta Pharmacologica Sinica* 1986 Jan, 7 (1): 13-15

## SELECTED INHIBITION OF AMINOXYACETIC ACID ON HIGH AFFINITY GABA UPTAKE SYSTEM IN MICE BRAIN HOMOGENATES<sup>1</sup>

ZHU Jian-qin, SUN Yu, WANG Xin-guang

(Dept Biology, Nanjing University, Nanjing 210008)

**ABSTRACT** The kinetic analysis demonstrated 2 distinct uptake systems for GABA in various regions of mice brain. One system showed a relatively high substrate affinity  $K_m = 12.6 \mu M$ , while the other showed a low affinity  $K_m = 110 \mu M$ . Aminooxyacetic acid (AOAA), either added to the incubation medium or injected ip, showed inhibitory effects on high affinity GABA uptake system. The inhibition of AOAA seems not

to be related to the inhibition of GABA- $\alpha$ -ketoglutarate transaminase (GABA-T).

**KEY WORDS** aminooxyacetic acid; GABA; aminobutyrate aminotransferase; cerebral cortex; cerebellum; hypothalamus; corpus striatum

<sup>1</sup> Projects supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences.