

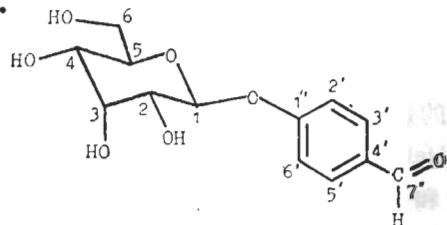
豆腐果甙对小鼠全脑及突触体中四种氨基酸代谢的影响

周 曦、赵天睿、南国华、李建一 (江西医学院生化教研室, 南昌 330006)

提要 iv 豆腐果甙 (Hel) 对正常小鼠全脑及突触体中 GABA, Asp 和 Glu 含量影响不大, 但能降低全脑 Gln 水平, 升高全脑 GABA/Glu 比值; 使氨基硫脲(TSC) 导致的全脑和突触体中 GABA 含量的下降及突触体中 Glu 和 Asp 含量的上升均恢复正常; 抑制全脑谷氨酰胺合成酶活性, 增强 GPT 活性, 对 GOT 和谷氨酰胺酶活性无影响。Hel 的上述作用可能与其维持 CNS 的兴奋与抑制平衡有关。

关键词 豆腐果甙; 氨基酸; 氨基硫脲; 脑; 突触体

豆腐果甙(helicid, Hel)系从山龙眼科萝卜树(*Helicia erratica* Hook)的果实中提取的一种成分, 其单体化学名为 4'-甲酰基苯基-β-D-吡喃阿洛糖甙(4'-formyl-phenyl-β-allopyranoside)⁽¹⁾。其结构与天麻素(gastrodin, 4'-羟甲基苯基-β-D-吡喃葡萄糖甙)⁽²⁾相似, 而与传统的抗癫痫和抗惊厥药物⁽³⁾迥异。实验证明, Hel 有镇静、催眠和一定的抗惊厥作用(王懋德, 未发表资料)。目前认为⁽⁴⁾, Glu 和 Asp 是 CNS 的兴奋性递质, GABA 是抑制性递质。它们参与维持 CNS 的兴奋与抑制平衡。本文观察了 Hel 对全脑及突触体中这类氨基酸代谢的影响。



Helicid (4'-formyl-phenyl-β-allopyranoside)

方 法

体重 $23.2 \pm SD 2.4$ g 的健康♂成年小白鼠, 随机分四组。对照组: ip 生理盐水(NS) + iv NS, 在相当于氨基硫脲(TSC)的最大致惊厥作用出现时将小鼠断头; TSC 组: ip TSC 15 mg/kg + iv NS, 当小鼠最大惊厥发作

时断头; Hel 组: ip NS + iv Hel 120 mg/kg, 断头时间同对照组; TSC + Hel 组: ip TSC 15 mg/kg + iv Hel 120 mg/kg, 断头时间同对照组。以上各组两次注射间隔均为 30 min。小鼠断头后, 立即用预冷的 80% 酸化乙醇在冰浴中制成 1:15 的脑匀浆。取 5 ml, 于 4℃ 放置 1 h, 离心 20 min (900 × g, 4℃), 上清液加氯仿 3 ml 充分乳化, 同上离心 30 min, 吸取上层水相供氨基酸含量测定用。

突触体制备及其氨基酸提取 用日立 65-P-T 型超速离心机进行密度梯度超离心 (64000 × g, 4℃, 1 h) 制备突触体⁽⁵⁾。并用日产 JEM-100 cx 型电镜鉴定突触体的存在。低渗胀破突触膜使其中氨基酸释放, 加乙醇离心沉淀蛋白质, 取上清液蒸干, 加 0.5 ml 蒸馏水溶解氨基酸, 次加 0.1 ml 氯仿充分乳化, 离心。测定上清液中氨基酸含量。

突触体制备中蛋白质含量测定 按文献 (6)。

氨基酸含量测定 同文献 (7)。

全脑 GAD 和 GABA-T 活性测定 同前文 (8)。

全脑 GPT, GOT 和谷氨酰胺酶活性测定 均参考文献 (9)。GPT 和 GOT 活性测定分别以 Ala 和 Asp 为供氨基体, 均以 α-KG 为受氨基体。两酶活性均以净生成 Glu 的 μmol/(g 鲜脑·h) 表示。谷氨酰胺酶活性以净生成 Glu 的 μmol/(g 鲜脑·15 min) 表示。

全脑谷氨酰胺合成酶活性测定 参考文献 (10)。酶活力以 OD₆₄₀ 增加 0.01/(h·g 鲜脑) 表示。

结 果

Hel 对全脑氨基酸含量的影响 从表 1 全脑氨基酸的含量可见, TSC 可使全脑 GABA

Tab 1. Effects of iv helacid (Hel) 120 mg/kg and/or ip thiosemicarbazide (TSC) 15 mg/kg on contents of 4 amino acids in mouse brains ($\mu\text{mol/g}$ wet brain). $n=8$, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $p>0.05$, ** $p<0.05$, vs control; † $p>0.05$, †† $p<0.05$, ††† $p<0.01$ vs TSC.

Treatment	GABA	Asp	Glu	Gln	GABA/Glu
Control	1.97 \pm 0.13	4.06 \pm 0.23	10.2 \pm 0.5	4.76 \pm 0.27	0.195 \pm 0.016
TSC	1.79 \pm 0.12**	4.00 \pm 0.24*	10.3 \pm 0.5*	4.62 \pm 0.24*	0.174 \pm 0.009**
Hel	2.12 \pm 0.17*†††	4.04 \pm 0.24*†	9.8 \pm 0.4*†	4.43 \pm 0.28**†	0.217 \pm 0.022**†††
TSC + Hel	1.95 \pm 0.13*††	3.96 \pm 0.24*†	9.7 \pm 0.4*†	4.42 \pm 0.24**†	0.200 \pm 0.011*†††

Tab 2. Effects of iv helacid (Hel) 120 mg/kg and/or ip thiosemicarbazide (TSC) 15 mg/kg on contents of 4 amino acids in synaptosomes of mouse brains (nmol/mg protein). $n=3$, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $p>0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$ vs control; † $p>0.05$, †† $p<0.05$, ††† $p<0.01$ vs TSC.

Treatment	GABA	Asp	Glu	Gln	GABA/Glu·Asp
Control	22.8 \pm 2.2	21.1 \pm 2.7	28.2 \pm 2.3	8.6 \pm 0.9	0.040 \pm 0.011
TSC	14.9 \pm 2.3**	29.1 \pm 2.6**	38.2 \pm 2.0***	9.3 \pm 1.0*	0.014 \pm 0.004**
Hel	26.9 \pm 1.8*†††	20.7 \pm 1.2*†††	27.3 \pm 2.4*†††	9.5 \pm 1.0*†	0.048 \pm 0.004*†††
TSC + Hel	22.2 \pm 2.1*††	23.2 \pm 1.8*††	29.1 \pm 1.0*†††	9.0 \pm 0.7*†	0.033 \pm 0.006*†††

含量和 GABA/Glu 比值下降; Hel 可使 Gln 含量和 GABA/Glu 比值分别降低和升高; ip TSC 后再 iv Hel, GABA 含量和 GABA/Glu 比值均恢复正常, Gln 含量仍低于正常。提示: Hel 对正常小鼠全脑 GABA, Asp 和 Glu 含量的影响不明显, 但有保护 GABA 含量不受 TSC 影响和降低正常小鼠全脑 Gln 含量的作用。

Hel 对脑突触体中氨基酸含量的影响 小鼠随机分组, 每 15 只鼠脑制备一份突触体。突触体制备经电镜观察可见典型的突触前囊结构, 突触小泡清晰, 且含量较丰富(图 1 见图版 1)。

由表 2 突触体中氨基酸的含量可见, TSC 可导致突触体中 GABA 含量降低, Glu 和 Asp 含量升高, GABA/Glu·Asp 比值下降; 单用 Hel 突触体中各氨基酸含量及 GABA/Glu·Asp 比值与对照组比较均无显著性差异。ip TSC 后再 iv Hel 时, 突触体中 GABA 水平高于 TSC 组, Glu 和 Asp 水平低于 TSC 组, GABA/Glu·Asp 比值显著高于 TSC 组, 但与对照组比较, 上述氨基酸含量及比值的均无显著性。提示: Hel 对正常小鼠脑突触体中这些氨基酸含量影响不大, 但能保护突触体中

GABA, Glu 和 Asp 水平以及 GABA/Glu·Asp 比值不受 TSC 作用的影响。

Hel 对全脑 GAD 和 GABA-T 活性⁽⁸⁾的影响 Hel 不影响正常小鼠全脑谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD) 活性 ($p>0.05$), TSC 可明显抑制 GAD 活性 (-21.6%, $p<0.01$), ip TSC 后再 iv Hel 可使 GAD 活性明显高于 TSC 组 (+24.4%, $p<0.01$), 而与对照组无显著性差异 ($p>0.05$)。各组 γ -氨基丁酸转氨酶 (γ -aminobutyrate transaminase, GABA-T) 活性差异均无显著性 ($p>0.05$)。提示: Hel 可保护小鼠全脑 GAD 活性不受 TSC 作用的影响。

Hel 对全脑谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺酶、GPT 和 GOT 活性的影响 iv Hel 120 mg/kg 30 min 后, 与对照组比较, 小鼠全脑谷氨酰

Tab 3. Effects of iv helacid 120 mg/kg on activities of glutamine synthetase, glutaminase, GPT and GOT in mouse brains. $n=8$, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $p>0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$

	Saline	Helicid
Synthetase	189 \pm 16	109 \pm 10***
Glutaminase	119 \pm 5	120 \pm 6*
GPT	26.5 \pm 1.9	28.6 \pm 1.6**
GOT	95 \pm 7	92 \pm 8*

胺合成酶活性明显降低, GPT 活性升高, 谷氨酰胺酶和 GOT 活性无改变(表 3)。

讨 论

Hel 对正常小鼠全脑和突触体中 GABA 含量无甚影响, 但可使 TSC 降低的全脑和突触体中 GABA 含量恢复正常, 此作用与 Hel 能恢复 TSC 抑制的 GAD 活性⁽⁸⁾吻合。提示 Hel 可能通过保护 GAD 的活性使脑内 GABA 水平维持正常。

TSC 除可导致全脑和突触体中 GABA 含量下降, 还可引起突触体中兴奋性氨基酸 (Asp, Glu) 增加。加用 Hel 时, 此两氨基酸均降至正常。这或许亦为 Hel 对致惊厥剂诱发惊厥的保护作用。Hel 保护 GAD 活性和增强 GPT 活性的作用可能与 Glu 降低有关。

脑中 Gln 系 Glu 和 GABA 的主要前体。Hel 可明显抑制全脑谷氨酰胺合成酶活性, 使全脑 Gln 含量下降, 但不改变突触体中 Gln 含量, 可能与代谢分区有关。

惊厥的发生与任何单一的 GABA 代谢参数(如 GAD 活性、GABA-T 活性或 GABA 含量)之间并无简单的相关⁽¹¹⁾。但 Glu-GABA 代谢的平衡是惊厥的关键因素之一⁽¹²⁾。本文就全脑 GABA/Glu 比值进行分析显示: TSC 组比值下降, Hel 组比值上升(该组 GABA 和 Glu 含量的变化与对照组比较并无显著性), TSC + Hel 组比值恢复正常。表明全脑 GABA/Glu 值比单以 GABA 或 Glu 含量作为衡量兴奋与抑制的指标更有说服力。

有人以脑脊液的“氨基酸神经介质兴奋性指数”来衡量大脑兴奋性⁽¹³⁾。据此, 我们试用脑突触体水平上的 GABA/Glu·Asp 比值作为大脑兴奋性指标。结果显示: TSC 组比值下降, 而 TSC + Hel 组的比值与对照组比较差异并无显著性。可见, 大脑兴奋性的高低与此比值的降和升有一定的关系。

致谢 中国科学院昆明植物研究所提供豆腐果甙, 本院范淑荣主管技师指导突触体电镜观察, 本院电镜室

摄制电镜照片。

参 考 文 献

- 1 Chen WS, Lu SD, Breitmaier E. Helicid, ein β -Allopyranosid aus *Helicia erratica* Hook. *Liebigs Ann Chem* 1981; (10): 1893
- 2 周俊、杨雁宾、杨崇仁. 天麻的化学研究 I. 天麻化学成分的分和鉴定. *化学学报* 1979; 37: 183
- 3 Jones GL, Woodbury DM. Principles of drugs action: structure-activity relationships and mechanisms. In: Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE, ed. *Antiepileptic drugs*. 2nd ed. NY: Raven Press, 1982: 83-109
- 4 Bradford HF. Amino acid transmitters and their malfunction in disease. In: Taylor A, Jones MT, eds. *Chemical communication with the nervous system and its disturbance in disease*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press, 1978: 83-110
- 5 Cotman CW. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. In: Fleischer S, Packer L, ed. *Methods in enzymology*; vol 31. NY: Academic Press, 1974: 445-52
- 6 Schleif RF, Wensink PC. *Practical methods in molecular biology*. 1st ed. NY: Springer-Verlag, 1981: 74-6
- 7 周曦、赵天容、南国华. 小白鼠脑内某些递质氨基酸的单相下行纸层析法分离和定量. *江西医学院学报* 1985; 25 (2,3): 17
- 8 阎麟、蔡锡麟、赵天容、南国华、李建一. 豆腐果甙对小鼠脑谷氨酸脱羧酶和 γ -氨基丁酸转氨酶活性的影响. *核技术* 1987; 10 (7): 43
- 9 董景明、赵天容. 急性氨中毒对大鼠脑氨基酸代谢的影响. *中国药理学报* 1984; 5: 14
- 10 Rajalakshmi R, Govindarajan KR, Ramakrishnan CV. Effect of dietary protein content on visual discrimination learning and brain biochemistry in the albino rat. *J Neurochem* 1965; 12: 261
- 11 Wood JD, Peesker SJ. Development of an expression which relates the excitable state of the brain to the level of GAD activity and GABA content, with particular reference to the action of hydrazine and its derivatives. *Ibid* 1974; 23: 703
- 12 Wiechert P, Herbst A. Provocation of cerebral seizures by derangement of the natural balance between glutamic acid and γ -aminobutyric acid. *Ibid* 1966; 13: 59
- 13 张宗昊、左启华. 惊厥和癫痫时脑脊液中氨基酸介质和环一磷酸腺苷 (cAMP) 含量的改变. *北京医学院学报* 1981; 13: 255

Influences of helcid on metabolism of four amino acids in the brain and synaptosomes in mice

ZHOU Xi, ZHAO Tian-Rui, NAN Guo-Hua, LI Jian-Yi

(*Department of Biochemistry, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006*)

ABSTRACT After iv helcid (Hel) 120 mg/kg, the contents of GABA, Asp and Glu in the brain and synaptosomes of normal mice were unchanged, but the level of Gln in the brain was reduced and the ratio of GABA/Glu was raised. The descent of the contents of GABA in the brain and synaptosomes and the ascent of the contents of Glu and Asp in synaptosomes elicited by thiosemicarbazide all returned to normal. A fall in the activity of glutamine synthetase

and a rise of that of GPT were observed, but on those of GOT and glutaminase no effects were seen.

The influences of Hel on the metabolism of these amino acids may relate to its maintenance of the excitoinhibitory balance of CNS.

KEY WORDS helcid; amino acids; thiosemicarbazide, brain; synaptosomes