

急性氨中毒对大鼠脑氨基酸代谢的影响

董景明 赵天睿 (江西医学院生化教研室, 南昌 330006)

提要 ip 乙酸铵使大鼠造成急性氨中毒, 并对其脑中的氨基酸、游离氨含量及部分氨基酸代谢酶活性进行测定. ip 后 15 min, 全脑中的 Asp、Glu 与 Ser 含量减少; Gln 含量增加; GABA、Ala 与 Gly 含量无变化. GOT 与谷氨酰胺酶活性降低; GDH 与谷氨酰胺合成酶活性增强; GPT 活性无改变. 氨负荷后, 脑 Asp 含量与脑氨含量的变化呈负相关. 随脑氨含量降低, 脑中 Asp 与 Glu 含量可恢复正常.

关键词 氨中毒; 肝昏迷; 脑; 天冬氨酸; 谷氨酸; 谷氨酰胺; 乙酸胺

血氨浓度升高是肝昏迷的原因之一, 但氨对中枢神经系统毒性作用的机制迄今仍未完全阐明. 氨中毒动物脑中一些具有神经介质功能的氨基酸含量发生异常^(1,2), 有关这些氨基酸代谢的变化及其与氨中毒的关系说法不一. 为了阐明氨的神经毒性作用与脑中氨基酸介质变化的关系, 本文研究了急性氨中毒对大鼠脑中的兴奋性氨基酸: 天冬氨酸(Asp)与谷氨酸(Glu)代谢的影响,

1982年7月17日收稿 1983年4月9日修回

方 法

体重 $201 \pm (\text{SD}) 27 \text{ g}$ 的 δ 大鼠, 随机分为两组。实验组 ip 乙酸铵溶液 (0.45 g/kg)⁽³⁾, 对照组 ip 同容量生理盐水, ip 后 2, 10, 60, 120 min 断头, 取全脑或分取大脑, 脑干, 小脑, 分别投入 10 倍量预冷的 85% 乙醇中, 置冰浴中, 用玻璃匀浆器磨成匀浆。离心, 取上清液, 用氯仿萃取全部水相, 蒸干, 重溶于适量的蒸馏水, 供氨基酸测定用。

脑中游离氨基酸含量测定 参照文献⁽⁴⁾。薄层层析基本按文献⁽⁴⁾进行。层析毕, 80°C 显色 30 min, 刮取氨基酸显色斑于小试管内, 用 1.2 ml 洗脱液 (按 2:33 比例将 0.2% 硫酸铜溶液与 75% 乙醇在临用前混和) 洗脱 1 h, 离心, 取上清液在 721 型分光光度计上读取 OD_{614} 。

脑转氨酶活性测定 取 pH 7.6, 67 mM 磷酸缓冲液 (PB) 制成的 1:10 脑匀浆 1 ml, 加供氨基体 (L-Glu 或 L-Asp) 及受氨基体 (丙酮酸或 α -酮戊二酸) 各 25 μmol , 加 PB 至反应总容量为 2 ml, 混匀, 37°C 保温 1 h 后用无水乙醇 6 ml 终止反应。测定新生成的氨基酸量。酶活性以净生成氨基酸 $\mu\text{mol/g}$ 鲜脑/h 为单位表示。

脑谷氨酰胺酶活性测定 取 pH 8.0, 67 mM PB 制成的 1:10 脑匀浆 0.5 ml, 加 L-谷氨酰胺 (Gln) 20 μmol , 加 PB 至反应总容量为 0.75 ml, 混匀, 37°C 保温 15 min 后用无水乙醇 4 ml 终止反应。测定水解生成的 Glu 量。酶活性以净生成 Glu $\mu\text{mol/g}$ 鲜脑/15 min 为单位表示。

脑谷氨酰胺合成酶活性测定⁽⁵⁾ 酶活性以活性单位 (OD_{540} 增加 0.001/h 为一个活性单位) 表示。

脑谷氨酸脱氢酶活性测定 参照文献⁽⁵⁾, 但不加 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride, 加入 NAD 后 2 min 用 751 型紫外分光光度计读取 OD_{340} 。酶活性以活性单位 (OD_{340} 增加

Tab 1. Effect of ip ammonium acetate (15 min) on amino acids in rat brain ($\mu\text{mol/g}$ wet brain) $\bar{x} \pm \text{SD}$

	Rats	ip saline	NH_4Ac 0.45 g/kg
Asp	7	2.36 ± 0.36	$1.53 \pm 0.32^{***}$
Glu	7	7.36 ± 0.82	$6.20 \pm 0.62^{**}$
Gln	7	3.51 ± 0.34	$5.07 \pm 0.83^{***}$
Ala	7	0.57 ± 0.10	$0.55 \pm 0.08^*$
Gly	7	1.11 ± 0.25	$1.07 \pm 0.19^*$
Ser	7	0.82 ± 0.09	$0.66 \pm 0.09^{***}$
GABA	5	1.46 ± 0.19	$1.42 \pm 0.15^*$

* $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. Same in the following table or figures

0.001/min 为一个活性单位) 表示。

脑游离氨含量测定 按酚-次氯酸钠显色法⁽⁶⁾进行。

结 果

急性氨中毒对大鼠全脑游离氨基酸含量的影响 ip 乙酸铵 2-3 min 后, 大鼠逐渐出现木僵、呆滞、呼吸急促等表现, 15 min 后进入昏迷, 50 min 后可逐渐恢复清醒。与对照组比较, ip 乙酸铵后 15 min, 大鼠全脑中 Asp、Glu 与丝氨酸 (Ser) 含量明显减少, Gln 含量增加, γ -氨基丁酸 (GABA)、丙氨酸 (Ala)、甘氨酸 (Gly) 含量无明显改变。(表 1)

ip 铵盐后不同时间, 大鼠脑各区中 Asp、Glu 含量与脑游离氨含量变化的关系 ip 乙酸铵后 2, 10, 60, 120 min, 分别测定大鼠的大脑, 脑干中游离氨含量及大脑、脑干、小脑中的 Asp 和 Glu 含量。结果显示, 氨负荷后, 随脑氨含量升高, 脑各区中的 Asp 与 Glu 含量先后减少。ip 铵盐 2 min 后, 脑氨含量即升高, 脑各区中的 Asp 含量明显减少。10 min 后, 脑氨含量升至最高值, 脑各区中的 Asp 含量也减少到最低水平; 同时, 大脑中的 Glu 含量开始减少。以后, 随着脑氨含量降低, 脑各区中的 Asp 含量也开始回升, ip 后 120 min, Asp 含量恢复正常, 显示脑中 Asp 含量与脑氨含量的变化呈密切负相关 ($r = -0.507, p < 0.01$)。ip 后 60 min 大脑中的 Glu 含量继续减少到最低水

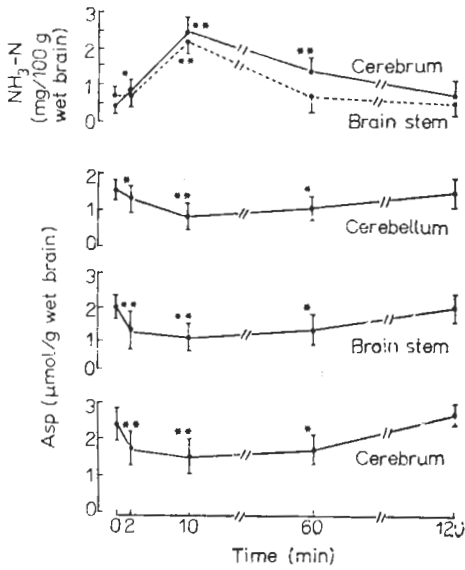


Fig 1. Relationship of Asp and NH_3 concentrations in rat brain after ip ammonium acetate

平, 脑干与小脑中的 Glu 含量也出现减少。ip 后 120 min 脑各区中的 Glu 含量均恢复正常。(图 1, 2)

急性氨中毒对大鼠全脑中部分氨基酸代谢酶活性的影响 ip 乙酸铵后 15 min, 大鼠全脑中谷草转氨酶(GOT)活性降低, 谷丙转氨酶

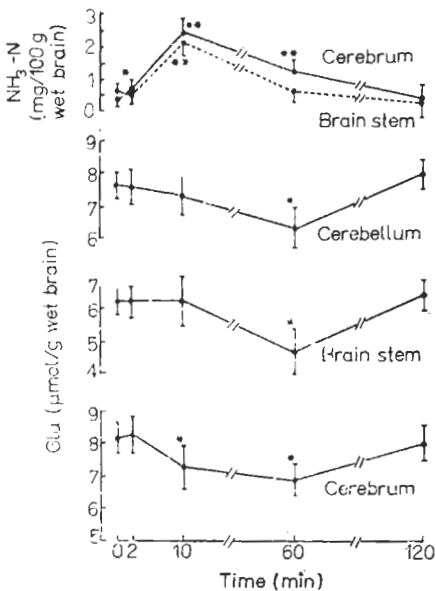


Fig 2. Relationship of Glu and NH_3 concentrations in rat brain after ip ammonium acetate

Tab 2. Effect of ip ammonium acetate (15 min) on enzyme activities in amino acid metabolism in rat brain. 6 rats/group. $\bar{x} \pm \text{SD}$

	ip saline	NH_4Ac 0.45 g/kg
GOT	34 ± 6	$29 \pm 4^{**}$
GPT	24.4 ± 2.9	$26.2 \pm 1.3^*$
GDH	658 ± 68	$901 \pm 119^{**}$
Glutamine synthetase	512 ± 80	$700 \pm 96^{***}$
Glutaminase	107 ± 10	$91 \pm 9^{**}$

(GPT)活性无变化, 谷氨酰胺合成酶与谷氨酸脱氢酶(GDH)活性均明显增强, 谷氨酰胺酶活性降低。(表 2)

讨 论

急性氨中毒大鼠脑中的 Asp 与 Glu 含量的减少可能是其主要的神经化学损害之一⁽²⁾, 但无进一步的资料说明, 这两种兴奋性氨基酸含量的变化是否确与氨的毒性作用有关。本文实验结果表明, 血氨含量升高确可造成脑中 Asp 与 Glu 含量明显减少; 脑分区的实验进一步发现, 脑 Asp 含量与脑氨含量的变化呈密切负相关。在大鼠未完全进入昏迷时, 脑各区中的 Asp 含量已明显减少。随 Asp 含量回升, 大鼠逐渐恢复清醒(图 1)。提示氨所致昏迷的发生确有可能与其降低了脑中的 Asp 含量有关。ip 后 10 min 大脑中的 Glu 含量也显著减少。Asp 与 Glu 两种兴奋性氨基酸主要是在大脑皮层(质)输出纤维及海马等处发挥神经介质作用的⁽⁷⁻⁹⁾。氨负荷后, 大脑局部中这两种兴奋性氨基酸含量的减少可能破坏了中枢神经系统内正常的兴奋/抑制的平衡, 使中枢神经系统处于高度抑制中, 因而可能与昏迷的发生有一定的关系。

虽然 GDH 活性增强, 但由于谷氨酰胺合成酶活性增强而谷氨酰胺酶活性降低, 使大量 Glu 转变成 Gln, 这可能是造成 Glu 含量减少的主要原因。根据最近提出的谷氨酰胺循环学说, 神经末梢中 Glu 的主要来源是来自神经胶质细胞中的 Gln 的水解⁽¹⁰⁾。因此, 谷氨酰胺酶活性降低特别影响了介质池(transmitter pools)中的 Glu 含量, 海马组织薄片在有铵离子存在

时, Glu 的自发性释放增加, 而高 K^+ 诱发的释放反减少⁽¹¹⁾, 提示氨浓度增加可耗竭介质池中的 Glu 量。导致 Asp 含量减少的机制不清楚。GOT 活性的抑制, 可使 Asp 生成减少。由于 Asp 的降解与生成均主要通过转氨基反应进行, 各反应物与生成物之间的相对浓度的变化也可使反应方向发生改变。氨负荷后, 脑中 α -酮戊二酸含量正常⁽¹²⁾ 或增加⁽²⁾, 草酰乙酸含量则明显减少^(2, 12)。提示氨含量升高时, Asp 可能主要经转氨基途径转变成草酰乙酸, 并进一步被合成 α -酮戊二酸、Glu 与 Gln, 导致 Asp 含量显著减少。

参 考 文 献

- 1 Hawkins R, Miller AL, Nielsen RC, Veech RL. *Biochem J* 1973; 134 : 1001
- 2 Hindfelt B, Plum F, Duffy TE. *J Clin Invest*

- 1977; 59 : 386
- 3 Ehrlich M, Plum F, Duffy TE. *J Neurochem* 1980; 34 : 1538
- 4 Lato M, Rufini S, Ghebrezabher M, Ciuffini G, Mezzetti T. *Clin Chim Acta* 1974; 53 : 273
- 5 Rajalakshmi R, Govindarajan KR, Ramakrishnan CV. *J Neurochem* 1965; 12 : 261
- 6 董景明、赵天容。生物化学与生物物理进展、待发表
- 7 Bromberg MB, Penney JB, Stephenson BS, Young AB. *Brain Res* 1981; 215 : 369
- 8 Nadlev JV, White WF, Vaca KW, Perry BW, Cotman CW. *J Neurochem* 1978; 31 : 147
- 9 Di Lauro A, Schmid RW, Meek JL. *Brain Res* 1981; 207 : 476
- 10 Shank RP, Aprison MH. *Life Sci* 1981; 28 : 837
- 11 Hamberger A, Lindroth P, Nystrom B. *Brain Res* 1982; 237 : 339
- 12 Benzi G, Arrgoni E, Strada P, Pastoris O, Villa RF, Agnoli A. *Biochem Pharmacol* 1977; 26 : 2397

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Mar; 5 (1) : 14-17

EFFECTS OF ACUTE AMMONIA INTOXICATION ON CEREBRAL AMINO ACIDS METABOLISM IN RATS

DONG Jing-ming, ZHAO Tian-rui

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

ABSTRACT Acute ammonia intoxication was produced by ip ammonium acetate 0.45 g/kg in rats. After 15 min, the concentrations of Asp, Glu and Ser of the brain were reduced, GABA, Ala, Gly unchanged, and Gln increased. A fall in the activities of GOT and glutaminase in the brain along with a rise in that of glutamine synthetase and GDH was seen. No change was observed in the activity of GPT. The change in

the concentration of Asp was negatively correlated with the level of brain ammonia after ammonia intoxication. The concentration of Asp and Glu returned to normal when the brain ammonia level reduced.

KEY WORDS ammonia intoxication; hepatic coma; brain; aspartate; glutamates; glutamine; ammonium acetate