

# 大鼠脑水肿脑组织谷氨酸与 $\gamma$ -氨基丁酸的变化及黄芩甙对其影响\*

尹 飞 杨于嘉 虞佩兰 俞 燕 陶永光 毛定安

**内容提要** 目的:了解大鼠感染性脑水肿脑组织谷氨酸(Glu)与  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的变化及黄芩甙对其影响。方法:百日咳菌液诱发大鼠感染性脑水肿及腹腔注射黄芩甙后,用高效液相色谱-荧光检测法测定大鼠脑组织匀浆中 Glu 和 GABA 含量。结果:空白对照组(C组)、生理盐水组(NS组)、百日咳菌液组(PB组)和黄芩甙组(BC组)大鼠脑组织匀浆 Glu 含量变化不大( $P>0.05$ ),PB组大鼠脑组织 GABA 含量( $2.71 \pm 0.29$ )增加,BC组 GABA 含量( $4.06 \pm 0.52$ )增加更明显,与 C组、NS组、PB组比较均有显著性差异( $P<0.01$ )。同时 BC组大鼠脑含水量( $79.8 \pm 0.4$ )明显下降,与 PB组大鼠脑含水量( $82.2 \pm 0.3$ )比较有显著性差异( $P<0.01$ )。结论:黄芩甙对大鼠感染性脑水肿有保护作用,其机制可能与黄芩甙能增加感染性脑水肿大鼠脑组织的 GABA 含量有关。

**关键词** 谷氨酸  $\gamma$ -氨基丁酸 黄芩甙 脑水肿 大鼠

**Changes of Glutamate and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Contents in Brain Tissue of Brain Edema and Effects of Baicalin on Them in Rats** YIN Fei, YANG Yujia, YU Peilan, et al *Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Hunan Medical University, Changsha (410008)*

**Objective:** To observe the changes of glutamates (Glu) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) contents in brain tissue of infectious brain edema, and effects of baicalin on them in rats. **Methods:** The high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the Glu and GABA contents in homogenized brain tissue after baicalin was injected intraperitoneally on infectious brain edema induced by pertussis bacilli in rats. **Results:** Glu contents of homogenized brain tissue in blank control group (C), normal saline group (NS), pertussis bacilli group (PB) and baicalin group (BC) had no significant difference ( $P>0.05$ ). The concentration of GABA was more significantly increased in the BC group ( $4.06 \pm 0.52$ ) than that in the PB group ( $2.71 \pm 0.29$ ) ( $P<0.05$ ). Water content of brain was reduced in the BC group ( $79.8 \pm 0.4$ ) as compared with the PB group ( $82.2 \pm 0.3$ ) ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Baicalin has a protective effect against the pertussis bacilli-induced brain edema in rats, and protective effect was correlated to the increased content of GABA in the brain tissue in rats.

**Key words** glutamate,  $\gamma$ -aminobutyric acid, baicalin, brain edema, rat

感染性脑水肿是儿内科常见的危急重症之一,防治较为棘手,病死率高,其发病机制涉及氧自由基和内源性兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAAs)。本科业已证明黄芩甙(Baicalin, BC)可通过抑制氧自由基对大鼠感染性脑水肿有保护作用<sup>[1]</sup>。但黄芩甙对内源性兴奋性氨基酸的影响尚不清楚。为此,我们在复制了百日咳菌液大鼠脑水肿模型的基础上,研究大鼠感染性脑水肿脑组织谷氨酸(Glu)和  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的改变及黄芩甙对其影响。

## 材料与方法

1 药物与试剂 黄芩甙,分子量 446,由湖南医科大学湘雅医院提供,纯度 98%;百日咳菌液由卫生部北京生物制品研究所提供(批号:93-24-1),含菌  $10.8 \times 10^9/\text{ml}$ ,使用前超声波充分破碎。

2 主要仪器 高效液相仪为日本岛津 LC-6A 系统,荧光分光计为日本岛津 FR-530。

3 动物和分组 SD 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 ( $220 \pm 20$ )g,本院动物室提供。随机分为 4 组,每组 8 只。即空白对照组(C组),生理盐水组(NS组),百日咳菌液组(Pertussis Bacilli, PB组),黄芩甙组(BC组)。

\* 本课题由国家自然科学基金资助(No. 39470233)

湖南医科大学湘雅医院儿科(长沙 410008)

4 模型制作方法 使用陈翔等<sup>(2)</sup>建立的百日咳菌液诱导大鼠感染性脑水肿模型。大鼠采用 25% 乌拉坦腹腔注射麻醉(4ml/kg);取仰卧位,分离左侧股动脉,将内径 0.56mm 塑料管插入左股动脉后,连接四道生理仪监测血压及取血样。颈正中切口,分离左颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及分支,结扎翼腭动脉和枕动脉。夹闭颈外动脉后,用 1ml 注射器配 4.5 号针头于左颈总动脉穿刺向左颈内动脉注射百日咳菌液 0.2ml/kg(含菌  $10.8 \times 10^9$ /ml),5~15s 内注射完毕。NS 组动物则用同法注射等量的灭菌生理盐水。黄芩甙组大鼠在注射菌液后 1h 腹腔注射黄芩甙 120mg/kg 体重。各组动物在注射菌液或 NS 后 4h 断头处死。空白对照组未作任何处理,断头处死。

5 大鼠脑组织匀浆标本制备及氨基酸测定 在冰台上将大鼠断头处死,迅速取出左大脑部分全层脑组织,称湿重后,按 V/V 为 10:1 加入无水乙醇,恒速匀浆 35 次左右,取匀浆液置离心管中,4℃,20 000 r/min,离心 30min,收集上清液,用高效液相色谱-荧光法测定 Glu 和 GABA 含量。

6 统计学方法 数据均用 Excel 5.0 软件计算,组间比较用单因素方差分析。

## 结 果

1 实验动物生理指标 实验过程中各组动物体温维持在  $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。平均动脉压、pH、 $\text{PaCO}_2$ 、 $\text{PaO}_2$  在实验过程中均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

2 各组大鼠脑含水量比较 见表 1。C 组和 NS 组大鼠脑含水量比较无显著性差异( $P > 0.05$ ),表明手术方式和向颈内动脉注射 NS 对脑含水量影响不大。PB 组大鼠脑含水量明显高于 C 组和 NS 组( $P < 0.01$ ),而 BC 组大鼠脑含水量明显低于 PB 组( $P < 0.01$ ),显示黄芩甙对百日咳菌液大鼠脑水肿具有保护作用。

3 各组大鼠脑组织 Glu 和 GABA 含量比较 见表 1。各组大鼠脑组织 Glu 含量无显著性差异( $P > 0.05$ )。GABA 含量在 PB 组大鼠增加( $P < 0.01$ ),BC 组增加更明显,与其它各组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ )。

表 1 各组大鼠脑组织含水量、Glu 及 GABA 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | n | 脑含水量(%)                  | Glu( $\mu\text{mol/g}$ 脑组织) | GABA( $\mu\text{mol/g}$ 脑组织) |
|----|---|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| C  | 8 | $78.4 \pm 0.4$           | $7.11 \pm 0.80$             | $2.08 \pm 0.15$              |
| NS | 8 | $78.6 \pm 0.3$           | $6.75 \pm 0.50$             | $2.04 \pm 0.22$              |
| PB | 8 | $82.2 \pm 0.3^*$         | $5.83 \pm 0.89$             | $2.71 \pm 0.29^*$            |
| BC | 8 | $79.8 \pm 0.4^{*\Delta}$ | $5.58 \pm 0.66$             | $4.06 \pm 0.52^{*\Delta}$    |

注:与 C 组、NS 组比较, \*  $P < 0.01$ ;与 PB 组比较,  $\Delta P < 0.01$

## 讨 论

脑组织水份含量测定是反映脑水肿的主要指标,脑含水量的高低直接反映脑水肿的严重程度,同时也可反映脑细胞的损伤程度。本研究发现大鼠注射菌液后 4h 脑含水量明显增加,与 C 组、NS 组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。说明已成功复制了大鼠感染性脑水肿模型。

自 Lucas 和 Olney 发现 Glu 可作为内源性兴奋毒素损伤中枢神经细胞以来<sup>(3,4)</sup>,Glu 的神经毒性作用受到了广泛重视<sup>(5,6)</sup>。生理条件下,它主要是作为兴奋性突触的神经递质。脑损伤或脑缺血后,神经细胞去极化,神经细胞和胶质细胞摄取 Glu 功能下降或受损,使细胞外 Glu 含量增高,通过与 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体或非 NMDA 受体结合,造成神经元细胞损伤或坏死。同时 Glu 又是中枢神经系统中主要抑制性神经递质 GABA 的前体物质,GABA 的合成酶为谷氨酸脱羧酶(GAD)。其含量与 GABA 相平行,主要存在于灰质中,特别是富含突触体的脑区内,GABA 释放后主要被神经末梢重吸收,其降解主要由 GABA 转氨酶(GABA-T)将氨基去除,生成琥珀半醛。GABA 释放后作用于其受体而发挥作用。其主要生理功能是突触前抑制兴奋递质的释放。本研究采用高效液相色谱-荧光检测法检测脑组织匀浆中的 Glu 和 GABA 的水平。脑组织标本前处理简单,结果稳定可靠,明显优于氨基酸分析仪对氨基酸的分析结果<sup>(7)</sup>。我们运用此方法来研究大鼠百日咳菌液脑水肿时 Glu 和 GABA 的改变。结果显示 C 组、NS 组、PB 组和 BC 组 Glu 含量变化不大( $P > 0.05$ )。而 GABA 在 PB 组注射菌液后 4h 后产生反应性增高,与 C 组和 NS 组比较,有显著性差异( $P < 0.01$ )。表明在感染性脑水肿时机体调节机制发生变化,Glu 在谷氨酸脱羧酶的作用下产生大量的 GABA,从而抑制兴奋性氨基酸释放。而在 BC 组 GABA 增高更加明显,与 PB 组比较也有明显差异( $P < 0.01$ ),显示了在黄芩甙治疗 3h 后大鼠脑组织中的 GABA 含量可大量增加以对抗兴奋性氨基酸的毒性作用。

黄芩是唇形科植物,它的有效成分是黄酮类化合物,迄今已分离出 40 种黄酮,其中 3 种主要成分为黄芩甙、黄芩素和汉黄芩,以黄芩甙的药理作用最强。黄芩甙( $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ ,分子量 446)具有抗炎、清除超氧离子等药理作用,临床上有较广泛的应用。本研究发现腹腔注射黄芩甙可减轻感染性脑水肿大鼠模型的脑含水量,显示黄芩甙对大鼠感染性脑水肿具有保护作用。



其重要的保护作用机制之一可能是增加脑组织 GABA 的含量,对抗兴奋性氨基酸的神经毒性作用。有报道黄芩甙对 Glu 受体激动剂海人酸(KA)所致的神经毒性有抑制效应<sup>[8]</sup>,表明黄芩甙可通过降低兴奋性氨基酸的神经毒性作用,保护神经细胞,为感染性脑损害的治疗提供了一种新的思路。

### 参 考 文 献

1. 杨于嘉,朱彩云,陈翔,等.黄芩甙对百日咳菌液致大鼠脑水肿的保护作用.中华医学杂志 1998;78(8):630—632.
2. 陈翔,杨于嘉,陶永光,等.百日咳菌液诱导大鼠急性脑水肿模型.湖南医科大学学报 1996;21(3):214—216.
3. Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic amino acids on the infant mouse central nervous system. Exp Brain Res 1971;14(1):61—76.
4. Katayama Y, Becker DP, Tamura T, et al. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. J Neurosurg 1990;73(6):889—900.
5. Leib SL, Kim YK, Ferriero DM, et al. Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist Kynurenic acid in experimental bacterial meningitis. J Infect Dis 1996;173(1):166—171.
6. Meldrum BS. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. Neurology 1994;44(Suppl8):s14—s21.
7. 叶惟泠.邻苯二甲醛衍生化高效液相色谱法分析脑氨基酸.生理学报 1988;40(3):308—313.
8. 韩喻美,晏金平.黄芩甙类对海人酸所致神经毒性作用.江西医学院学报 1995;35(3):5—7.

(收稿:1999-09-01 修回:2000-02-28)

## ·新 药 片 治 验·

### 新 药 片 治 疗 类 风 湿 性 关 节 炎 55 例

吴克山 陈军平 叶美美

1997 年 10 月~1999 年 4 月,我们用新药片治疗类风湿性关节炎 55 例,与吲哚美辛片为主治疗 55 例作对照,报告如下。

#### 临床资料

1 诊断标准 所有病例均符合美国风湿病协会 1987 年颁布的类风湿性关节炎诊断标准[中华内科杂志 1989;28(2):1];活动性关节炎,晨僵时间 $\geq 1$ h,关节压痛,对称性关节肿,血沉 $\geq 30$ mm/h,血清类风湿因子阳性,手或足 X 线摄片改变,或关节功能受限。

2 一般资料 110 例患者均为门诊病例,随机分为两组。治疗组 55 例,男 13 例,女 42 例;年龄 21~60 岁,平均 45 岁;病程 6 个月~18 年,平均 12 年。其中急性发病 32 例,慢性迁延者 23 例;有家族史 6 例;关节畸形 14 例。对照组 55 例,男 14 例,女 41 例;年龄 20~80 岁,平均 47 岁;病程 10 个月~20 年,平均 15 年;其中急性发病 30 例,慢性迁延者 25 例;有家族史 8 例;关节畸形 18 例。两组一般资料有可比性。

治疗方法 治疗组采用新药片(组成:九节茶、三七、牛黄、珍珠层粉,每片含生药 0.32g,厦门中药厂生产,批号:971108),每次 6 片,每天 2 次,饭后口服。对照组选用吲哚美辛肠溶片(江苏省金坛市制药厂生产,批号:9709062),每次 25~50mg,每天 3 次;并加服吡喃硫胺片(杭州民生药厂生产,批号:970885),每次 25~50mg,每天 3 次,饭后口服。两组均以 30 天为 1 个疗程,共观察 2~3 个疗程,每个疗程间隔 2~3 天。

#### 结 果

1 疗效标准 参照下列 8 项指标综合评定:(1)关节晨僵;(2)关节疼痛;(3)关节肿胀;(4)关节压痛;(5)关节发热;

(6)皮下结节;(7)血沉;(8)血清类风湿因子。临床缓解:临床症状消失,血沉恢复正常,类风湿因子转为阴性,关节功能恢复;且停药后可维持 3 个月以上病情无复发者。显效:前 5 项症状明显好转,皮下结节缩小,血沉降低,血清类风湿因子试验滴度降低或无变化。有效:前 6 项临床症状有改善,后 2 项化验检查无变化。无效:8 项中无好转,或仅 1~2 项有改善者。

2 结果 治疗组临床缓解 15 例(27.3%),显效 20 例(36.4%),有效 14 例(25.5%),无效 6 例(10.9%),总有效率 89.1%。对照组临床缓解 8 例(14.5%),显效 13 例(23.6%),有效 19 例(34.5%),无效 15 例(27.3%),总有效率 72.7%。两组总疗效经 Ridit 分析,有显著性差异( $u = 2.7054, P < 0.05$ )。

讨 论 中医对本病常按痹证辨治,临床多见虚实夹杂为患,以肝肾气血不足,复感风寒湿热之邪,侵害关节、肌肉、筋骨,阻滞经络,气血运行不畅而致血滞为瘀,湿凝为痰,痰瘀互结,闭阻经络,湿入骨骱而致关节晨僵、肿胀、疼痛、肢体伸屈不利。新药片中九节茶祛风散寒除湿,三七疏通经络气血,消除关节僵硬、肿痛,牛黄、珍珠层粉通阳补气、开通关节、清热利湿、祛除肿痛。诸药合用,切中病机,有助缓解临床证候。药理研究证实,新药片抗炎及镇痛作用均强于吲哚美辛,且退热作用强度亦不弱于吲哚美辛。本临床观察表明新药片可以作为类风湿性关节炎早期诊断后及时治疗药物之一。治疗组服用过程中未发现胃肠反应,对照组有 2 例出现皮疹,3 例有恶心、呕吐、腹痛,但未影响疗程,因用药时间较长,对患有溃疡病、消化道出血者,仍应慎用。

(收稿:2000-01-17 修回:2000-04-17)