

缺氧及某些条件下大白鼠大腦谷 一丙轉氨酶活力的变化

苏拔賢
(生物系)

自从 Brunstein 和 Kritzmann 1937年发现酶促氨基移换作用以来⁽¹⁾, 对許多动物、植物組織、微生物抽提液中氨基移换酶均进行了系統的研究⁽²⁾, 它在生物界中广泛分布及代謝中的重要作用已被大量工作所証实⁽³⁾⁽⁴⁾, 在哺乳动物組織中, 由于大多数 L-氨基酸氧化酶活力很低, 分布不广, 轉氨作用在代謝中的重要性, 更引起了人們的注意⁽⁵⁾。

谷氨酸-草酰乙酸轉氨酶(以下簡称G.O.T.), 谷氨酸-丙酮酸轉氨酶(以下簡称 G.P.T.) 在轉氨作用中占有中心地位⁽⁴⁾。1939年 Brunstein 証明很多氨基酸均能与 G.O.T. 及 G.P.T. 体系相偶联进行氧化脫氨基作用⁽⁶⁾, Забарский 还认为: 动物腦組織中的氨基酸, 除了 L-谷氨酸能直接氧化脫氨基外, 其他氨基酸均需通过轉氨作用而进行⁽⁷⁾。腦組織中存在活跃的轉氨作用⁽⁸⁾, 表明腦組織糖代謝和氨基酸代謝有着密切的联系。

大腦組織具有一系列調节能量代謝的机构⁽⁹⁾。在正常状况下, 腦的能量来源主要依靠血糖所供給⁽⁷⁾, 但在某些情况下, 腦組織也能利用某些非糖物質作为能量的来源⁽¹⁰⁾。大腦对缺氧及低血糖反应均极为灵敏, 缺氧条件下, 腦的能量来源主要通过无氧酵解途径来維持, 此时产生大量乳酸⁽⁷⁾⁽¹¹⁾, 随着缺氧时间的延长, 酵解强度又趋减弱, 但腦中乳酸的积累仍高于腦中糖元及葡萄糖所能轉換的总量⁽¹²⁾, 說明腦中发生着由其他物質形成乳酸的过程。因此, 在缺氧条件下, 研究各种物質相互轉变, 尤其是氨基酸和糖之間相互轉变, 将是一个有意义的問題。

关于大腦缺氧及低血糖时, 腦中各种物質成分的变化, 前人已做了許多工作⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾。不同缺氧条件下, 腦中 G.O.T. 活力的变化也有过一些工作⁽¹⁵⁾, 但用窒息方法研究不同時間內腦中 G.P.T. 活力的变化的資料还很少, 低血糖时鼠腦 G.P.T. 活力研究工作也不多。本实验主要探求窒息引起缺氧及低血糖时, 大白鼠大腦 G.P.T.

• 本工作得到北京大学王鏡岩先生指导, 謹此致謝。

活力的变化,以求对氨基酸代谢和糖代谢之间关系的进一步研究,提供一点线索。

材 料 和 方 法

(一)材料:成年健康大白鼠,体重平均为200—230克,取其大脑部分,脑重平均1.1—1.3克。

(二)处理方法:

缺氧:引起缺氧方法是将动物置于体积为2700—2900毫升体积密闭干燥器内,进行窒息性缺氧,一般成年健康大鼠在这样处理条件下2小时半左右死亡。此实验共分缺氧30', 60', 濒死期(此时动物瞳孔放大,卧倒,呼吸极弱)及濒死期后恢复供氧30'等四个组进行。

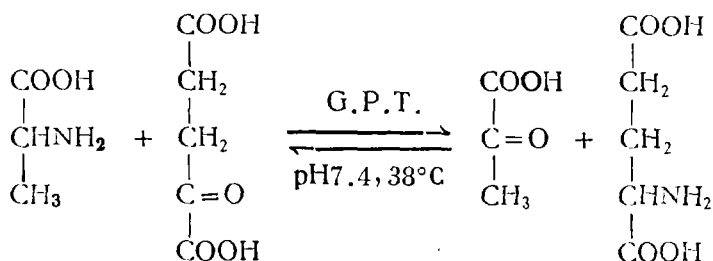
胰岛素处理:每公斤体重动物注射胰岛素200个单位,第一次出现痉挛时(气喘,吱叫声)杀死。

饥饿:动物除给水外,禁食2—3天后杀死。

(三)匀浆的制备:正常及实验动物处理后,用剪刀迅速剪下头部,小心挖出脑子,用滤纸吮干血痕,然后切取大脑部分,称重,以0.1M pH7.4磷酸缓冲液制成1:40之匀浆。使用时,每20ml匀浆含 $\frac{1}{500}$ M 碘醋酸0.5ml,以抑制乳酸脱氢酶之活力^[16],以上操作均在冰冷条件下进行,断头时,注意保持动物的安静。

(四)转氨酶活力的测定:采用 Tonhazy 方法^[17],并参考 Cohen 的报告^[18],作了某些修改,匀浆浓度改为1:40,保温时间改为30',同时作了L-丙氨酸氧化酶活力的校正,方法的原理简述如下:

1.在G.P.T.催化下,L-丙氨酸与 α -酮戊二酸反应生成丙酮酸和谷氨酸。



2.利用2,4-二硝基苯肼试剂测定丙酮酸之生成量。该试剂与丙酮酸反应后,生成丙酮酸二硝基苯腙复合物,再用甲苯抽提分离,在强碱溶液中呈色。

3.L-丙氨酸氧化酶活力测定:在缺乏 α -酮戊二酸条件下,用同上方法测定丙酮酸生成量。在本实验条件下,该酶活力很低,未超过各组实验误差范围外,故忽略不计。

(五)操作步骤:

每組实验均作平行二个試管，每管加入底物 0.1M, pH7.4L-丙氨酸和 α -酮戊二酸各 0.2ml, 0.1M, pH7.4磷酸緩冲液 0.4ml, 38°C 保温10'后，加入1:40脑匀浆0.1ml。繼續保温30'（其間搖动三至四次），保温后，各管立即加入100%三氯醋酸0.1ml，使反应終止，隨即加入2,4-二硝基苯肼試剂 1 ml，搖匀。再保温10'（38°C），取出冷却，各管加入甲苯水飽和溶液 2 ml，振蕩数分钟，使各管抽提程度完全一致，然后在室温下靜置20'—30'，取各管甲苯层 1 ml移入另一試管中，加入 5 ml KOH—95%乙醇溶液，使之呈色，在国产科伟比色計 520m μ 滤光片下讀数。

空白对照組除先加入三氯醋酸破坏酶的活力外，其余条件与实验組完全一致。

（六）标准曲綫及回收率：在本实验条件下，丙酮酸濃度在 20 μ g—160 μ g/ml 范围内与光密度成正比，回收率为91.2—98.3%。

实 驗 結 果

（一）正常鼠大脑G.P.T.活力的測定：

每組数字代表一只动物，我們共測定了十五批正常实验动物大脑 G.P.T. 的活力，平均值为77.4 $\pm$ 8 μ mole 丙酮酸/克鮮組織/小时，各次实验結果見表一：

表一 正常大白鼠大脑G.P.T.活力測定

实 驗 时 間	实 驗 批 次	酶 活 力 (μ mole丙酮酸/克鮮組織/小时)
1963,2	1	94.5
1963,2	2	70.0
1963,2	3	80.0
1963,2	4	90.9
1963,3	5	87.2
1963,3	6	74.2
1963,3	7	73.0
1963,3	8	96.0
1963,5	9	72.7
1963,5	10	76.4
1963,5	11	51.7*
1963,5	12	72.0
1963,10	13	73.0
1963,10	14	75.0
1963,10	15	75.0
平 均 值		77.4 $\pm$ 8

2. 不同缺氧時間鼠大腦G.P.T.活力之測定

共分四組：缺氧30'、缺氧60'、缺氧至頻死期、頻死期后恢復供氧30'，每組每次實驗時均同時作一正常動物測定，以茲對照。各組實驗結果見表二：

表二 不同缺氧時間大白鼠大腦G.P.T.活力測定

實驗批次	正常組	缺氧 30'	缺氧 60'	缺氧至頻死期	頻死期后恢復供氧 30'
4	90.9			110.0	
5	87.2			123.0	
7	73.0			95.0	
9	72.7	87.3	130.0	55.3	65.4
10	76.4	135.5	127.0	72.7	90.0
11*	51.7	72.8	65.4	65.4	
12	72.0	102.0	90.4		88.0
13	73.0	116.0	94.5	76.4	76.0
15	75.0	103.0	105.0		62.0
平均值	74.7	102.8	102.0	85.4	74.5

酶活力單位： μmole 丙酮酸/克鮮組織/小時

* 本批動物品種及健康狀況與前有較大的差異，測得酶活力較低，但不同缺氧時間酶活力

變化與各批次比較是一致的。

以各批實驗動物正常組G.P.T.活力為100，比較不同缺氧時間鼠大腦G.P.T.活力變化如圖一：

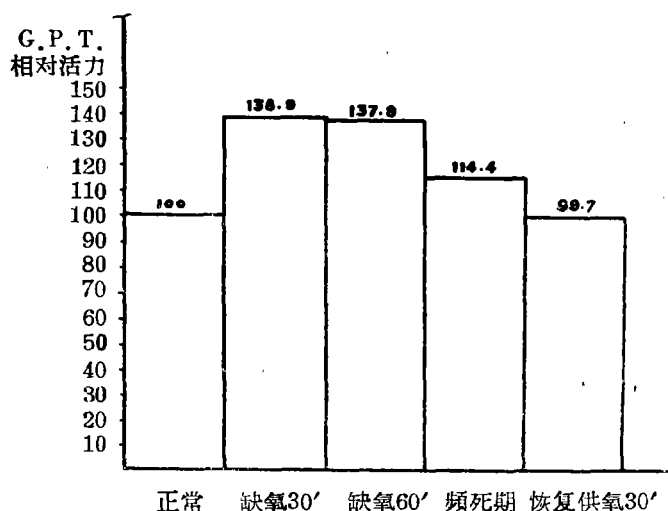


圖1 正常及不同缺氧時間大白鼠大腦G.T.P.相對活力比較（以各批實驗大白鼠正常組G.T.P.活力為100）

图一說明：缺氧30'酶活力比正常組有显著升高，30'—60'酶活力一直維持在較高水平，頻死期虽比缺氧60'时略有降低，但一般仍高于正常值，此时酶活力变化幅度較大，頻死期后恢复供氧30'，酶活力趋向正常水平。

(三) 飢餓及胰島素处理对鼠大脑G.P.T.活力的影响：在本实验中，我們初步观察到飢餓及胰島素处理引起鼠大脑G.P.T.活力降低现象，飢餓二至三天后鼠脑G.P.T.活力为 $50.1 \pm 7 \mu\text{mole}$ 丙酮酸/克鮮組織/小时，比正常組織降低为65%，胰島素处理后，鼠脑G.P.T.活力为 $49.9 \pm 8 \mu\text{mole}$ 丙酮酸/克鮮組織/小时，比正常組織降低为64.4%。

表三 飢餓及胰島素处理大白鼠大脑G.P.T.活力的測定。

实 驗 批 次	正 常 值	飢 餓 (2—3天)	胰 島 素 处 理 (200单位/kg体重)
1	—	37.5	—
2	—	48.0	—
3	74.0	58.2	65.0
4	73.0	56.5	34.5
5	87.0	—	51.0
6	80.0	—	49.4
均 均 值	78.7	50.1 ± 7	49.9 ± 8

(酶活力单位： μmole 丙酮酸/克鮮組織/小时)

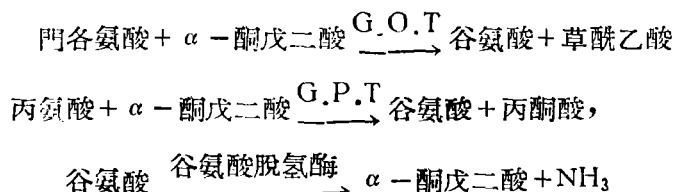
討 論

(一) 本实验使用窒息缺氧方法，致死期比較緩慢，体外气压变化很少，接近于自然缺氧条件，

(二) 正常鼠脑G.P.T.活力的測定：文献中各作者由于使用方法及实验条件不同，所得結果差別頗大[19][20][21]，我們測出正常大白鼠大脑G.P.T.活力为 $77.4 \pm 8 \mu\text{mole}$ 丙酮酸/克鮮組織/小时，稍低于Awapara使用紙层析方法所得結果($154 \mu\text{mole}$ 谷氨酸/克鮮組織/小时) [19]，与顧天爵方法所得結果相一致($73 \mu\text{mole}$ 谷氨酸/克鮮組織/小时) [20]，

(三) 大脑是大量需氧和消耗能量的器官，脑重不及体重2%，需氧量竟达全身1/4[22]，在正常情况下，脑的呼吸商約等于1，表明脑活动所需能量基本上来自糖。缺氧时，乳酸的积累[7]，意味着酵解途径的加强。这是缺氧时呼吸作用受到抑制时一种代謝的补偿。另脑組織还含有极丰富且白质和氨基酸，脑中游离氨基酸浓度約二倍于血液的含量[11]。正常状况下，氨基酸与糖可以通过轉氨作用而相互轉变，这一点已为許多工作所証实[7][8][23]。在缺氧情况下，糖与氨基酸之間

相互轉变的詳細情况,迄今仍未完全了解。王鏡岩等曾証明断头缺氧时小白鼠大脑G.O.T.活力均有显著提高(15),本实验发现缺氧初期大白鼠脑G.P.T.活力比正常組織升高为133.9—137.8%。这些现象可能說明,在氧供应不足情况下脑中氨基酸代謝存在下列变化:



此外,前人工作証明:缺氧能引起中樞神經兴奋,大量消耗能量,有氧过程逐步被抑制,无氧酵解大大加强,血糖含量逐渐降低(11)(24),乳酸积累超过血糖及糖元所能轉換的总量(12),这些迹象表明,在缺氧情况下,脑組織存在着利用氨基酸作为能量来源的可能性。

(四)表二和图一表明:随着缺氧时间的延长,脑中G.P.T.活力并没有随时间而升高,至頻死期反而比缺氧60'有所下降,而且此时G.P.T.活力变化不大稳定,可能說明动物在頻死期中樞神經系統失常,代謝途径出现了紊乱现象,但在整个缺氧过程中G.P.T.活力都維持在高于正常組織水平,这是明显的。缺氧时,酵解过程是脑組織供能主要途径,轉氨酶在缺氧时活力升高和供能可能存在一定关系,故酵解和轉氨过程对不同缺氧时间反应存在着某些相似之处(12)。另在本实验条件下,缺氧30'—60',有氧氧化途径并未完全抑制,因而丙氨酸通过轉氨作用生成丙酮酸后,还有可能进入三羧酸循环进行氧化,以后有氧氧化逐渐被抑制,随着大脑兴奋性也漸降低,能量消耗的减少,故G.P.T.活力維持一定水平后而下降。

(五)生命恢复30'后,鼠脑G.P.T.活力下降至正常水平,在此期間,脑組織能代謝可能与頻死时间不同,頻死时间酵解途径极弱,血糖供应不足,而生命开始甦醒后血糖含量比頻死期大大增加(25)。虽然,在M.C.Гаевская的实验曾观察到动物在临床死亡期后恢复生命1—2小时内不能利用有氧氧化途径,所需能量几乎由无氧酵解所維持(11),但此时脑中血糖升高及缺氧时期丙氨酸的消耗,含量减少,无需再利用非糖物质以維持能的平衡,可能是造成G.P.T.活力下降原因。但在生命恢复时间,是否发生着糖向氨基酸轉变途径,还有待于以后工作的証实。

(六)飢餓及胰島素处理均能引起血中葡萄糖含量的下降,低血糖时脑中物质代謝变化,前人已有許多工作,徐京华曾証明:脑缺乏葡萄糖时谷氨酸大量轉变为 α -酮戊二酸(26) Grausto 和 Ropp 等人也观察到胰島素处理引起动物痙攣时,脑中谷氨酸,丙氨酸含量下降(27)(28),而胰島素处理引起脑組織能代謝的变化,除血糖降低外,还可能与脑的机能状态改变有关,据王世真等人报告,动物发生痙攣时,脑組織大量消耗能量,葡萄糖氧化率大大加强(7),飢餓則无此反应,在我們实验中观察到飢餓及胰島素处理均导致脑中G.P.T.活力的下降, Awapara 用鼠肝

作实验,也观察到动物饲料养份不足时,肝中G.O.T.和G.P.T.活力显著降低,并认为这可能是酶且白合成速率受到了影响(29),但在本实验处理条件下,脑中G.P.T.活力下降机制是否如此,尚难肯定。在徐京华报告中还提到脑缺乏葡萄糖时,乙酰辅酶A供应不足,也能引起能代谢中某些障碍。这是否和G.P.T.活力变化有关,都是值得进一步探讨的问题。

摘 要

本实验测得正常大白鼠大脑谷—丙轉氨酶活力为 $77.4 \pm 8 \mu\text{mole}$ 丙酮酸/克鮮組織/小时。缺氧30',酶活力为 $102.8 \mu\text{mole}$ 丙酮酸/克鮮組織/小时,比正常状况升高为138.9%,缺氧60'与缺氧30'比较,酶活力无明显变化。濒死期略有下降,但仍比正常值升高为114.4%。恢复供氧后30',酶活力下降至正常水平。

飢餓及胰島素处理,大白鼠大脑谷—丙轉氨酶活力比正常状况分别降低为51.8%和64.4%。

参 考 文 献

- [1] Brunstein, A.E. & Kritzmman, M.G. Enzymologia, 1937, 2, 129.
- [2] Cohen, P.P. The Enzymes, 1951, 1, 1040.
- [3] Meister, A. Advance in Enzymology, 1955, 16, 185.
- [4] 刘殿珍: 氨基移換研究的进展。生理科学进展, 1959, 12, 124頁。
- [5] Bender, A.E. & Krebs, H.A. Biochem. J., 1950, 46, 210.
- [6] Meister, A. Method In Enzymology, 1950, 1, 404.
- [7] 王世真、魏文齡: 脑的功能与生物化学。中华医学杂志, 1953, 12, 875—892頁。
- [8] 奥村二吉、佳田新平: 脑のグルタミン酸生成について・日本生化学, 1957, 28, 745. (科学文摘——生理科学, 1957, 4卷, 6期, 540頁。
- [9] H.M. 西薩江等, 生物化学中的重要問題(中文譯本), 上海科技出版社, 1961, 120頁。
- [10] Richter, D. protein metabolism of the brain. proceedings of the fourth international Congress of Biochemistry, 1950, IV, 178—185.
- [11] 王鏡岩: 脑的机能生物化学。生理科学进展, 1963, 5, 68頁。
- [12] 王鏡岩: 大白鼠在組織缺氧状态下大脑皮层不同层内乳酸的积累过程, 北京大学学报, 1962, 3, 266頁。
- [13] A.B. 巴拉金主編: 神經系統生物化学(中文譯本), 科学出版社, 1961, 121頁。

- [14] 同上, 135頁。
- [15] 王銳岩等: 缺氧状态下大鼠及小鼠脑中氨基移換酶及乳酸的一些变化。中国生理学会生物化学营养学学术討論会論文集(摘要), 1962, 6 頁。
- [16] C.E.謝維林等編: 动物生物化学实验指导(中文譯本), 高等教育出版社, 1955, 13頁。
- [17] Tonhazy, N.E. et al. Arch. Biochem. Biophys., 1950, 28, 36.
- [18] Cohen, P.P. J. Biol. Chem., 1941, 140, 715.
- [19] Awapara, J. J. Biol. Chem., 1952, 194, 497.
- [20] 顧天爵: 轉氨酶在临床上的应用。临床檢驗杂志, 1958, 2, 3期, 18頁。
- [21] 顧天爵等: 从大腸桿菌制备专一性谷氨酸脫羧酶及其用于血清与組織中谷氨酸轉氨酶的測定。生物物理与生物化学学报, 1962, 2, 3期, 226頁。
- [22] Richler, D. The Biochemistry of Cerebral Function in Perspectives in Neuropsychiatry, 1950, 95.
- [23] A.B.巴拉金主編: 神經系統生物化学(中文譯本), 科学出版社, 1961, 96頁。
- [24] Albaum, H.G; Hoell, W.K. & Chinn, H.J. Am. J. Physiol., 1953, 174, 408.
- [25] A.B.巴拉金主編: 神經系統生物化学(中文譯本), 科学出版社, 1961, 151頁。
- [26] 徐京华、章生良: 科学纪录, 1957, 新1, NO:4, 235頁。
- [27] Gravioto, R.O. et al. Proc. Soc. Expt. Biol. (N.Y.), 1951, 78, 356.
- [28] Ropp, R.S. DE. & Snedeker, E.H. J. Neurochem., 1961, 7, 128—134.
- [29] Awapara, J. J. Biol. Chem., 1953, 200, 237.

The Effect of Oxygen Deficiency and Some Other
Factors on the Activity of Glutamic-alanine
Transaminase in Rat Brain

Su Ba-sien

The activity of glutamic-alanine transaminase was estimated in normal rat brain. During anoxia of 30 seconds the enzymatic activity increases significantly. No significant difference in enzymatic activity during anoxia of 60 seconds and of 30 seconds but somewhat decreases during the period of coma and will resume normal level by the recovery of oxygen supply.

Starvation and injection of insulin will result in the decrease of the enzymatic activity.