

# $O_2^-$ 增强谷氨酸与其受体的结合力 及 EBSELEN 的保护作用

易 永 杨祥良 赵西龙<sup>1)</sup> 张亨山<sup>1)</sup> 秦钰慧<sup>1)</sup> 徐辉碧<sup>2)</sup>

(华中理工大学化学系, 武汉 430074)

**摘要** 用放射配体测定受体法研究了黄嘌呤 (X) / 黄嘌呤氧化酶 (XO) 体系产生的超氧阴离子自由基 ( $O_2^-$ ) 对 [ $^3H$ ] DL-谷氨酸与小鼠大脑皮层突触膜谷氨酸受体结合的影响, 结果表明  $O_2^-$  明显增强谷氨酸与其受体的结合力, 此作用能被 2-苯基-1, 2-苯并异噻唑-3 (2H) 酮 (EBSELEN) ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 所抑制.

**关键词** 大脑皮层突触膜, 谷氨酸, 超氧阴离子自由基, 2-苯基-1, 2-苯并异噻唑-3 (2H) 酮 (EBSELEN)

较其他组织而言, 脑组织易受自由基攻击. 因为脑组织富含活性氧攻击的主要靶分子——多不饱和脂肪酸和含硫氨基酸, 大脑需要相对多的氧供应, 脑内相对缺乏自由基清除体系而富含对自由基产生及脂质过氧化损伤有特殊贡献的铁<sup>[1]</sup>, 因而脑损伤中自由基发病机理的研究越来越受到重视. 谷氨酸是中枢神经系统重要的兴奋性神经递质, 然而病理情况下, 细胞外液谷氨酸浓度持续升高, 引起突触后膜谷氨酸受体病理性过度刺激, 最终导致神经元兴奋性毒性损伤. 近来研究揭示在某些神经系统疾病发生发展过程中, 活性氧形成与谷氨酸兴奋性毒性常相伴发生<sup>[2]</sup>, 然二者之间如何影响并不十分清楚. 我们研究发现  $O_2^-$  能抑制突触体对谷氨酸的重摄取功能, 增强脑片对谷氨酸递质的释放功能, 活性氧这种作用可能与其损伤突触膜  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 有关. 本文拟从活性氧影响谷氨酸与其受体结合的角度进一步探讨活性氧系统与谷氨酸系统的相关关系.

2-苯基-1, 2-苯并异噻唑-3 (2H) 酮 (EBSELEN) 是一种具有谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性的小分子有机硒化合物, 对实验性脑水肿有抑制作用<sup>[3]</sup>. 我们发现它能有效拮抗  $O_2^-$  对突触体谷氨酸重摄取的抑制及对脑

片谷氨酸递质释放的增强, 可能与其保护突触膜  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 有关. 本文进一步研究它对  $O_2^-$  诱发的 [ $^3H$ ] DL-谷氨酸与突触膜谷氨酸受体结合力增强的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、超氧化物歧化酶 (SOD) 为 Sigma 产品; PPO 及 POPOP 闪烁体为 Fluka 产品; [ $^3H$ ] DL-谷氨酸 (放射比活度 777 GBq/mmol) 为中国科学院上海原子核研究所产品; EBSELEN 为华中理工大学化学系合成; 其他试剂为市售分析纯.

### 1.2 仪器

Pharmacia Wallac1209 液体闪烁计数器; Beckman Optima VP 超速离心机; Kontron T124 高速冷冻离心机.

### 1.3 脑突触膜制备

选健康成年雄性 Wistar 大鼠, 体重 ( $200 \pm 20$ ) g, 断头处死后迅速取出大脑, 立即在冰盘上剥离出大脑皮层部分并投入到冰冷的

<sup>1)</sup> 中国预防医学科学院环境卫生监测所, 北京 100021.

<sup>2)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1996-10-30, 修回日期: 1997-03-05

0.32 mol/L 蔗糖溶液中, 冰浴中用匀浆器制备匀浆. 匀浆液离心 (1 500 g, 10 min, 4℃). 然后弃沉淀, 将上清离心 (10 000 g, 20 min, 4℃); 再将沉淀加 20 倍体积 Tris-HCl 缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.4) 混悬, 于上述条件离心二次. 然后将沉淀按蔗糖密度梯度超速离心法离心<sup>[4]</sup>, 得到的沉淀用 Tris-HCl 缓冲液混悬后再次离心 (30 000 g, 10 min, 4℃), 沉淀物即为突触膜. Lowry 法测蛋白质含量, 稀释分装后贮存在-70℃备用.

1.4 配基受体结合实验

反应总体积 0.5 ml, 其中总结合管含 25 mmol/L Hepes 缓冲液、25 μg 突触膜蛋白、自由基产生体系 X (0.5 mmol/L) / XO (20 U/L) 及一定浓度的 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸. 非特异结合管另加入 1 mmol/L L-谷氨酸. 冰浴中温育 4 h, 温育过程中经常摇动. 反应管取出后用多头细胞收集器真空抽滤. 再加入 10 ml Tris 醋酸缓冲液冲洗试管三次并抽滤. 取出玻璃纤维滤膜, 经红外烤箱烘干, 放入闪烁瓶中. 然后加 5 ml 甲苯闪烁液 (含 0.5% PPO 及 0.02% POPOP) 暗化过夜, 在液闪计数器上用 [<sup>3</sup>H] 谱道测定放射活性. 谷氨酸与其受体特异结合量等于总结合量减去非特异结合量. 生理盐水作对照, SOD (120 U/L) 和 EBSELEN (1 μmol/L) 先与突触膜作用 5 min, 再加 X/XO 损伤体系.

2 结 果

2.1 O<sub>2</sub><sup>-</sup>对谷氨酸与其受体结合的影响

在配基受体结合反应体系中加入不同剂量的 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸, 随 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸浓度加大, 特异结合量逐渐增加, 将所得数据转换后, 用 Scatchard 作图分析比较 X/XO 体系对结合曲线的影响 (图 1), 可见对照曲线与 X/XO 作用曲线均呈直线变化. 由直线回归方程求得对照组 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与突触膜谷氨酸受体结合的平衡解离常数为 128 nmol/L, 而自由基作用组为 93 nmol/L.

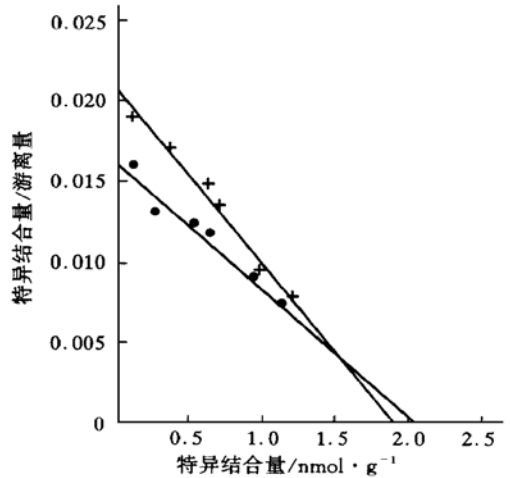


图 1 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与突触膜谷氨酸受体结合的 Scatchard 作图

●—●: 对照组.  $\bar{y} = 0.0161 - 0.0078\bar{x}$ ,  $r = -0.986$ ,  $K_d = 128 \text{ nmol/L}$ ,  $B_{\max} = 2.06 \text{ nmol/g}$ ; + —+: X/XO 组.  $\bar{y} = 0.0206 - 0.0108\bar{x}$ ,  $r = -0.992$ ,  $K_d = 93 \text{ nmol/L}$ ,  $B_{\max} = 1.92 \text{ nmol/g}$ .

2.2 EBSELEN 抑制 O<sub>2</sub><sup>-</sup>对谷氨酸与其受体结合的影响

X/XO 体系显著性增强 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与突触膜谷氨酸受体的特异结合量 (单独 X 或 XO 无此效应,  $P > 0.05$ ), SOD 和 EBSELEN 明显抑制 X/XO 体系此增强作用 (在无 X/XO 存在条件下, SOD 或 EBSELEN 本身对 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与其受体结合无明显影响,  $P > 0.05$ ).

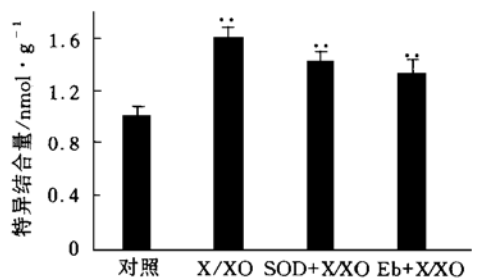


图 2 EBSELEN 抑制 O<sub>2</sub><sup>-</sup>对 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与突触膜谷氨酸受体结合的影响

X/XO 组与对照组相比较; SOD+ X/XO 及 Eb+ X/XO 组与 X/XO 组相比较; [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸终浓度: 100 nmol/L; \*\*:  $P < 0.01$ ;  $n = 6$ .

### 3 讨 论

谷氨酸是中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质. 它从突触前膜释放后, 作用于突触后膜的谷氨酸受体, 传递的信息经细胞内第二信使转导, 其本身通过酶降解和重摄取迅速被清除. 然而, 谷氨酸递质生化代谢失调和神经递质传递过程的紊乱都会引起一系列的中枢神经系统病理性损害. 另一方面, 随着自由基生物学与医学研究的不断深入, 自由基神经毒机理受到广泛重视. Stephen 等<sup>[5]</sup>认为神经元损伤的自由基机理与兴奋性毒性机理在一定程度上相互影响和依赖, 二者之间相关关系的研究已被许多学者所关注. 本文结果提示, X/XO 自由基产生体系显著性增强 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与大鼠大脑皮层突触膜谷氨酸受体的特异结合量 (单独 X 或 XO 无此作用), 而 SOD 能明显抑制 X/XO 此增强作用, 说明此增强作用为 X/XO 体系产生的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>所致. 由图 1 可见, X/XO 体系作用下, [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与突触膜谷氨酸受体结合的平衡解离常数 (93 nmol/L) 较对照组 (128 nmol/L) 明显较少, 提示 O<sub>2</sub><sup>-</sup>能使 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸对谷氨酸受体亲和力增加. 一般来说, 配体与受体的结合力的改变包括受体对配体的亲和性的变化, 受体结合位点数量的变化及受体的性质可随离子成分和内源性结合抑制物而改变. O<sub>2</sub><sup>-</sup>对谷氨酸与其受体结合的影响可能与 O<sub>2</sub><sup>-</sup>对膜脂成分和膜结构影响有关. 应用脂肪酸自旋标记物及马来酰亚胺自旋标记物观察到自由基能改变细胞膜的流动性, 使表层流动性降低, 巯基含量下降, W/S 下降 (Tu H *et al.* International Symposium on Nature Antioxidants: Molecular Mechanisms and Health, Beijing, 1995. 260), 提示 O<sub>2</sub><sup>-</sup>可能通过与膜成分作用使配基与受体亲和力增强或结合位点数量增多, 表现为 [<sup>3</sup>H] DL-谷氨酸与谷氨酸受体结合量的增多. 这方面的研究有待进一步深入.

EBSELEN 是一种正在研制的新药, 正在

进行治疗蛛网膜下腔出血、脑梗塞、脑水肿的研究. 它对自由基引起的膜表层流动性改变和巯基含量改变的抑制<sup>[6]</sup>可能是其抑制 O<sub>2</sub><sup>-</sup>对谷氨酸与其受体结合力影响的原因之一.

### 参 考 文 献

- 1 Schmidley J W. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*, 1990, **12** (7): 1086~ 1090
- 2 Domenico E P G, Giovanna C, Marina A *et al.* Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia induced neuronal damage. *J Neurosci*, 1990, **10** (3): 1035~ 1041
- 3 Johshita H, Sasaki T, Mastui T. Effects of Ebsele (PZ 51) on ischemic brain edema after focal ischemia in cats. *Acta Neurochir*, 1990, **51** (suppl): 239~ 241
- 4 郭 佐, 陈宜张, 郑 尊. 一种改进的神经突触膜制备方法. *生物化学与生物物理进展*, 1993, **20** (2): 129 ~ 131
- 5 Stephen C B, Carl P L. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med*, 1993, **14**: 633~ 642

**Promotive Effect of Superoxide and Inhibitory Effect of EBSELEN on Glutamate Binding to Rat Cortical Synaptosomal Membranes.** YI Yong, YANG Xiangliang, ZHAO Xilong<sup>1)</sup>, ZHANG Hengshan<sup>1)</sup>, QIN Yuhui<sup>1)</sup>, XU Huibi (*Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; <sup>1)</sup> Institute of Environmental Health Monitoring, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100021, China*).

**Abstract** Promotive effect of superoxide and inhibitory effect of EBSELEN on [<sup>3</sup>H] DL-glutamate binding to rat cortical synaptosomal membranes were studied by radiolabeled receptor assay. O<sub>2</sub><sup>-</sup> results in a marked increase of specific glutamate binding. EBSELEN (1 μmol/L) shows an inhibition effect on glutamate binding influenced by O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

**Key words** cortical synaptosomal membranes, glutamate, superoxide, EBSELEN