

破伤风桿菌感染对小白鼠脑 γ -氨基丁酸代謝的影响

童競亞* 趙天睿

(江西医学院生物化学教研组, 南昌)

破伤风毒素影响神經机能之机制,迄未完全闡明。应用生理学方法研究的結果^[1],証明毒素可使抑制脊髓运动神經原的作用減弱或消失。另外文献[2—5]报导,某些因素引起机体发生痙厥时,动物脑的 γ -氨基丁酸(GABA)含量显著降低,谷氨酸含量亦有改变。可以推想,感染破伤风桿菌动物脑的氨基酸代謝,特别是 GABA 代謝亦必趋向紊乱,本文应用小白鼠实验,証实上述推断。

实验材料与方法

实验用雄性小白鼠进行 文献[6]报导不同发育阶段动物脑中 GABA 含量不同。故在实验中应用了两批不同发育阶段动物: 出生1个月(体重17—19克)及3个月(25—28克)者。每批动物均再分为对照及感染两组。感染组动物注射破伤风桿菌培养物,对照组注射未接种细菌的培养基。

实验用破伤风桿菌之毒力 系用肉渣培养基4天培养物给17—19克体重小白鼠行肌肉注射測定之。规定使小白鼠于7天内全部死亡所用最小量为一个最小致死量(MLD)(1MLD = 10^{-4} 0.1升),感染动物用量为5MLD/10克体重,此剂量由肌肉注射给小白鼠后,按规定时间经心脏放血处死,立即取全脑进行实验。

自由氨基酸測定 按我们前记方法^[4]抽提及用纸上层析法測定之。

脑 L-谷氨酸脫羧酶活力測定 系取刚杀死动物全脑,于2—3分钟内用冰水制备之匀浆(1:5)0.5毫升,加 pH 7.0 L-谷氨酸液(0.2 M) 0.1 毫升及 M/15 pH 6.4 磷酸盐缓冲液 1.2 毫升,于 37°C 恆温水浴上温育 1 小时后,加 pH 4.2 醋酸缓冲液 0.2 毫升,置沸水浴上 3 分钟,放冷,离心,按[4]測定上清液中生成的 GABA。

GABA— α -酮戊二酸,谷—丙及谷—草轉氨酶活力之測定 系按[7]法进行,但以 1:5 脑匀浆代组织切片。

結 果

(一) 感染破伤风桿菌小白鼠脑 GABA, 谷氨酸及丙氨酸含量 不論幼年(1月龄)或成年(3月龄)小白鼠,在实验条件下感染破伤风桿菌后 34 小时,刺激之,即呈全身痙攣,动物脑自由氨基酸含量见表 1。

从表 1 可見,正常成年动物脑 GABA 含量高于幼年动物,而谷氨酸及丙氨酸水平則不受年龄影响。不論成年或幼年小白鼠在感染破伤风桿菌后 34 小时,脑 GABA 量均較相

* 现在赣南医学院微生物学教研组工作。
本文 1964 年 6 月 26 日收到。

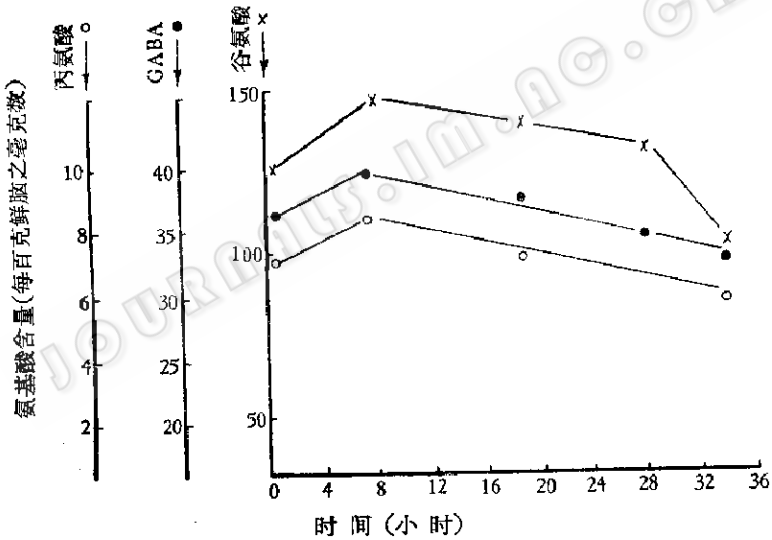
应对照动物显著降低,谷氨酸及丙氨酸含量也显著降低。

表 1 感染破伤风杆菌之小白鼠脑内 GABA、谷氨酸及丙氨酸含量

氨基酸	全脑氨基酸含量(毫克数/100克鲜脑)					
	一月龄小白鼠			三月龄小白鼠		
	对照组(10)	感染组(13)	P 值	对照组(6)	感染组(6)	P 值
GABA	28.20±1.14*	23.90±0.69	<0.05	35.31±0.84	30.77±0.71	<0.05
谷氨酸	123.10±0.67	77.20±1.13	<0.01	127.08±1.21	99.29±2.91	<0.01
丙氨酸	7.40±0.21	5.60±0.36	<0.01	6.80±0.13	4.60±0.21	<0.01

“()” 动物数; * 平均值±标准差。

(二) 小白鼠在感染破伤风杆菌后不同时间内脑自由氨基酸含量变化 成年小白鼠在感染破伤风杆菌后 8 小时(潜伏期), 18 小时(开始出现局部痙攣), 26 小时(出现全身痙攣)及 34 小时(剧烈全身痙攣)脑 GABA, 谷氨酸及丙氨酸含量如图所示。



“0” 系未感染组小白鼠脑氨基酸含量: 谷氨酸为 127.08; GABA 为 35.31; 丙氨酸为 6.80。

图 1 感染破伤风杆菌后的不同时间内成年小白鼠脑内氨基酸含量的变化。

由图 1 可见, 感染后 8 小时, 脑的谷氨酸及丙氨酸含量, 与对照动物比较, 有明显升高, 每 100 克鲜脑中谷氨酸及丙氨酸含量, 对照动物分别为 127.08 ± 1.2 及 6.8 ± 0.13 毫克, 感染组动物分别为 142.19 ± 5.1 及 8.2 ± 0.1 , P 值均 <0.05 , 差异显著。感染动物脑 GABA 也有所增长, 经统计学处理, 并不明显。8 小时后, 上述 3 种氨基酸水平逐渐下降, 待局部痙攣出现时 (18 小时), 各氨基酸含量已恢复到常值, 以后随着痙攣的加剧, 3 种酸含量继续平行地下降, 至全身剧烈痙攣时 (34 小时), 3 种酸的含量均较正常动物低。

(三) 感染破伤风杆菌小白鼠脑 L-谷氨酸脱羧酶活力 为了观察感染动物脑 GABA 含量降低是否与 L-谷氨酸脱羧酶活力改变有关, 进行了实验, 结果见表 2。

从表 2 可见, 感染对脑 L-谷氨酸脱羧酶活力有激动作用, 每克鲜脑所产生 GABA 微克分子数, 对照动物仅为 20.16 ± 0.47 , 感染动物则达 24.40 ± 0.23 , $P < 0.01$, 差异显著。

表 2 感染破伤风杆菌之成年小白鼠脑内 L-谷氨酸脱羧酶活力
(酶活力以每克鲜脑每小时生成 GABA 微克分子数表示)

组 别	动 物 数	生成 GABA 量(微克分子数/1 克鲜脑/1 小时)(平均值±标准差)
对 照 组	4	20.16±0.47
感 染 组	5	24.40±0.23
P 值		< 0.01

实验条件: 加 20% 脑匀浆 0.5 毫升及 L-谷氨酸(0.2M)0.1 毫升于 M/15 pH 6.4 磷酸缓冲液 1.2 毫升中, 在 37℃ 温育 1 小时后加 pH 4.2 醋酸缓冲液 0.2 毫升, 在沸水浴上煮 3 分钟停止反应。

(四) 感染破伤风杆菌小白鼠脑的转氨基作用 另一影响脑内 GABA 水平的因素是 GABA- α -酮戊二酸转氨酶, 谷—丙及谷—草转氨酶则与谷氨酸合成相关。为此, 测定了感染动物脑匀浆中上述 3 种酶的活力, 结果见表 3。

表 3 感染破伤风杆菌小白鼠脑转氨基作用

加 入 基 质	生成氨基酸(微克分子数/1 克鲜脑/1 小时)	
	对 照 组 (4) (平均值)	感 染 组 (4) (平均值)
GABA + α -酮戊二酸	39*	39.6
L-天门冬氨酸 + α -酮戊二酸	64.9*	63.6
L-谷氨酸 + 丙酮酸	33.6**	32.1

“()” 动物数; * 谷氨酸量; ** 丙氨酸量。

实验条件 每个样品包括供氮体及 α -酮酸各 20 微克分子, 除 GABA- α -酮戊二酸转氨酶反应在 M/15, pH 8.4 磷酸缓冲液中进行外, 余在 M/15, pH 7.4 磷酸缓冲液中进行, 总体积 1.8 毫升, 37℃, 1 小时, 加 pH 4.2 醋酸缓冲液 0.2 毫升及在沸水浴上 3 分钟停止反应。

表 3 可见, 感染后 34 小时动物脑匀浆不论由 GABA 和 α -酮戊二酸或由 L-天门冬氨酸和 α -酮戊二酸生成的谷氨酸量, 以及由谷氨酸和丙酮酸生成的丙氨酸量均与对照动物无显著差异(P 值均 > 0.05), 显示感染并不影响 GABA- α -酮戊二酸, 谷—丙及谷—草转氨酶活力。

讨 论

在实验中观察到正常小白鼠脑 GABA 含量, 随年龄增长, 与文献[6]一致。

文献[2, 4, 8]报导氰化物或肼类导致动物痉挛时, 脑 GABA 水平均见降低, 我们也观察到细菌引起动物痉挛时, 动物脑 GABA 量也显著降低(表 1)。有趣的是, 感染 8 小时后, 脑 GABA 略有升高现象, 以后逐渐下降, 待局部痉挛症状开始出现, GABA 含量已恢复到正常动物水平, 以后随着痉挛的加深, 继续下降, 降低程度与痉挛加剧相平行。看来, 感染动物的痉挛的发生可能与 GABA 的改变有一定关系。

破伤风杆菌导致脑 GABA 降低的原因, 主要是由于生成 GABA 的前体——谷氨酸缺乏所致, 由感染动物脑谷氨酸同时降低可见(表 1 及图), 而与有关 GABA 代谢的酶系似无关系(表 2 及 3), 感染并未影响 GABA- α -酮戊二酸转氨酶活力改变, 也未导致 L-

谷氨酸脱羧酶活力的降低,反而趋向激动。

破伤风杆菌对于脑谷氨酸的影响,仅以现有材料,尙难解释,但可以肯定,与有关谷氨酸生成酶系谷一丙及谷草转氨酶无关(表3)。L-谷氨酸脱羧酶活力的加强,固可导致谷氨酸水平的降低,但从 GABA 并未积蓄,反见降低看来,这也不是导致谷氨酸含量显著降低的原因。此外,在预试中观察到感染动物脑 L-谷氨酸脱羧酶活力也正常,因而通过这一途径大量降解的可能性也不存在。考虑到感染动物脑丙氨酸量的同时降低,似有可能在感染后糖代谢障碍,以致合成谷氨酸的原料—— α -酮戊二酸来源缺乏,因而影响谷氨酸的合成,这尙待进一步实验证实。

结 论

(一) 雄性小白鼠在感染破伤风杆菌后 34 小时,脑的 GABA, 谷氨酸及丙氨酸含量均显著降低。感染后 8 小时,脑谷氨酸及丙氨酸水平显著升高,以后 GABA, 谷氨酸及丙氨酸含量均随痉挛加剧而平行地降低。

(二) 感染动物脑 L-谷氨酸脱羧酶活力显著比正常动物为高,而谷一丙,谷一草及 GABA- α -酮戊二酸转氨酶的活力则无改变。

参 考 文 献

- [1] Brooks, V. B., Curtis, D. R. and Eccles, J. C.: *J. Physiol.*, **135**:655, 1957.
- [2] Killam, K. F. and Bain, A.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **119**:255, 1957.
- [3] Dixon, M. W. and Automia Nernadakis: *Federation Proc.*, **17**:420, 1958.
- [4] 赵天睿、温博贵、叶钟祥、李木英: 江西医学院学报, **11**(1):24—28, 1962.
- [5] Deropp, R. S. and Snedcker, E. H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **106**:696, 1961.
- [6] Roberts, E., Harman, P. G. and Frankel, S.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **78**:799, 1951.
- [7] Мардашев, С. Р. и Чжао Тенн-рей: *ДАН. СССР*, **133**: 230, 1960.
- [8] Tursky, T.: *Nature*, **187**:322, 1960.

THE EFFECT OF INFECTION BY TETANUS BACILLUS ON THE METABOLISM OF γ -AMINO BUTYRIC ACID IN BRAIN OF MICE

TUNG CHING-YA AND CHIAO TIEN-RUEY

(Department of Biochemistry, Kiangsi Medical College, Nanchang)

(1) 34 hrs. after injection of Tetanus Bacillus intraperitoneally (5 MLD/10 g. body wt.), the level of γ -aminobutyric acid, glutamic acid and alanine in brain of male mice showed significant decrease as compared with that of the controls.

(2) The activity of L-glutamic acid decarboxylase in brain of mice infected by Tetanus Bacillus showed significant increase as compared with that of normal adult male mice, but the activities of glutamic-pyruvic, glutamic-oxalacetic, and GABA- α -keto-glutric transaminases remained unchanged.