

## γ-羟基丁酸受体在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用

靳榕<sup>1</sup>, 蒋新颖<sup>2</sup>, 马行<sup>1</sup>, 谷淑玲<sup>1\*</sup>, 戴体俊<sup>3</sup>

(徐州医学院 1. 药理学教研室, 2. 附属医院检验科; 3. 江苏省麻醉学重点实验室, 江苏 徐州 221002)

**摘要:** 研究 γ-羟基丁酸 (gamma-hydroxybutyric acid, GHB) 受体在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用及其机制。选用 GHB 受体选择性激动剂 NCS-356 和特异性拮抗剂 NCS-382 作为工具药, 采用改良的 Longa 法制备大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型。缺血 2 h 再灌注 2 h 后, 动物进行 Longa 法行为功能评分; 再灌注 24 h 后, 部分动物用 TTC 染色法测定大鼠脑梗死体积; 部分动物应用流式细胞仪测定神经细胞内游离钙离子浓度; 分光光度法测定缺血侧大脑皮质中总一氧化氮合酶 (tNOS)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 活性和一氧化氮 (NO) 含量; 放射免疫法测定大鼠缺血侧大脑皮层环磷酸鸟苷 (cGMP) 含量。Isc/R 组大鼠行为功能评分、脑梗死体积、神经细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度、cGMP 和 NO 含量、tNOS 及 iNOS 活性均显著高于假手术组; NCS-356 160  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $N_1$ )、NCS-356 320  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $N_2$ )、NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $N_3$ ) 和尼莫地平 600  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Nim) 组的上述各指标均不同程度地低于 Isc/R 组, 而 NCS-382 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (NCS-382 +  $N_3$ ) 组则能显著对抗  $N_3$  组的作用。激动 GHB 受体对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与降低神经细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度, 减少 NO 及 cGMP 含量有关。

**关键词:** γ-羟基丁酸受体; 脑缺血; 再灌注损伤; 一氧化氮; 环磷酸鸟苷

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)08 - 0838 - 05

## Effect of gamma-hydroxybutyric acid receptor on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

JIN Rong<sup>1</sup>, JIANG Xin-ying<sup>2</sup>, MA Xing<sup>1</sup>, GU Shu-ling<sup>1\*</sup>, DAI Ti-jun<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacology, Xuzhou Medical College, 2. Clinical Laboratory of Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 3. Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou 221002, China)

**Abstract:** This study is to investigate the effect of gamma-hydroxybutyric acid receptor (GHBR) on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism. NCS-356 (the agonist of GHBR) and NCS-382 (the antagonist of GHBR) were adopted as the tool medicine. The ripe male Sprague-Dawley rats weighing 240 - 280 g were randomly divided into seven groups: sham operation group (sham), ischemia-reperfusion group (Isc/R), NCS-356 160  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group ( $N_1$ ), NCS-356 320  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group ( $N_2$ ), NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group ( $N_3$ ), NCS-382 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group (NCS-382 +  $N_3$ ), and nimodipine (Nim) 600  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model referring to Longa's method with modifications was adopted. The effect of GHBR on behavioral consequence of MCAO rats was studied after 2 h of ischemia-reperfusion. After 24 h of ischemia-reperfusion, part of animals were used to measure the cerebral infarction volume by TTC staining; ischemic cortex of another part of animals were used to measure the content of intracellular free calcium by flow cytometry, the tNOS, iNOS activity and the content of NO by spectrophotometric method, the content of cGMP by radioimmunoassay. The neurological function score and infarction volume rate in Isc/R group

收稿日期: 2006-12-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970715); 江苏省教育厅自然科学基金资助项目 (03KJB310141).

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 516 - 85748484, E-mail: gushling@163.com

rats increased significantly than that in sham group; The content of intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) of cortex neuron and cGMP, the activities of tNOS and iNOS, and the content of NO in Isc/R group were higher than that in sham group obviously ( $P < 0.01$ ); These consequence we mentioned of  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$  and Nim group were lower than that of Isc/R. NCS-382 +  $N_3$  group could significantly antagonize the above effect of  $N_3$ . Thus, NCS-356 has protective effects against ischemia-reperfusion brain injury by activating GHBR. The neuroprotective effect of GHBR is related with decreasing the content of  $[Ca^{2+}]_i$ , NO, cGMP and tNOS, iNOS activity in MCAO rats.

**Key words:** gamma-hydroxybutyric acid receptor; brain ischemia; reperfusion injury; nitric oxide; cyclic guanosine monophosphate

$\gamma$ -羟基丁酸 (gamma-hydroxybutyric acid, GHB) 受体是新近克隆出的 G 蛋白偶联大家族受体<sup>[1]</sup>, 主要分布在大脑皮质、海马、纹状体、嗅束等多巴胺能神经核团<sup>[2]</sup>。该受体在脑中的作用目前尚不清楚。已有报道 GHB 的钠盐——羟丁酸钠具有脑保护作用<sup>[3-5]</sup>, 并且在大鼠海马脑片缺氧/复氧模型上初步证实这种作用与其激动 GHB 受体有关<sup>[6]</sup>, 但在整体动物水平激动脑内 GHB 受体是否也对缺血性脑损伤产生保护作用? 如果有作用, 主要通过下游的哪条信号转导通路发挥作用? 目前尚未见报道。本实验采用 GHB 受体选择性激动剂 NCS-356 和特异性拮抗剂 NCS-382 作为工具药, 观察 GHB 受体在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用及其与可能的信号转导通路的关系。

## 材料与方 法

**动物** 成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 240 ~ 280 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。合格证号: syxk(苏) 2001-0051。

**药品和试剂** NCS-356 及 NCS-382 为 Sigma 公司产品。2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chlorid, TTC), 中国医药上海化学试剂公司产品。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒及一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 试剂盒为南京建成生物工程公司产品。环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 放射免疫试剂盒由上海中医药大学同位素室提供。Fluor-3/AM 及 F-127 购自美国 Molecular Probes 公司。

**主要仪器** 江湾 I 型 C 立体定位仪, 上海第二军医大学修配厂。FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。RUN6010 型  $\gamma$  放射免疫计数仪, 西安 262 仪器厂。GL20C 型高速冷冻离心机, 中国科学院武汉科学设备厂。JY92-II 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科研器材研究所。752 型分光光度计, 上海分

析仪器厂。

**动物分组** 实验动物共分为 7 组, 分别为假手术组 (sham), 缺血再灌注组 (Isc/R)、NCS-356 160  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 ( $N_1$ )、NCS-356 320  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 ( $N_2$ )、NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 ( $N_3$ )、NCS-382 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 (NCS-382 +  $N_3$ ) 和尼莫地平 (nimodipine, Nim) 600  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组。各组均于缺血前 30 min 和再灌注前两次经侧脑室给药, 假手术组和 Isc/R 组给予等体积的生理盐水。

**大鼠脑缺血再灌注损伤模型的建立** 参照 Longa 等<sup>[7,8]</sup> 线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型。实验时水合氯醛 (35  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 腹腔注射, 待大鼠完全麻醉后固定于手术台上, 颈部正中切开 2 cm, 分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉, 结扎颈外动脉近端, 动脉夹闭颈总动脉近心端, 在颈总动脉近动脉分叉处剪一小口, 插入直径 0.26 mm 的硅化栓线, 缓慢向颈内动脉插入, 直到有阻力不能再插入为止, 回抽少许, 栓线插入深度约为 (18.5  $\pm$  0.5) mm, 在颈总动脉根部结扎, 松开动脉夹, 缝合皮肤。体外留少许栓线, 缺血 2 h 将栓线抽离颈总动脉分叉处造成再灌注模型。假手术组只穿线不结扎。于再灌注 2 h 时采用 Longa 等<sup>[7]</sup> 5 分制法进行神经功能评分: 无神经功能异常为 0 分; 不能完全伸展对侧前爪者为 1 分; 爬行时向对侧转圈者为 2 分; 行走时身体向对侧偏瘫倾斜者为 3 分; 不能自发行走、意识丧失者为 4 分。清醒时评分为 0 分和 4 分者均剔除。

**TTC 染色法测定脑梗死体积** 各组大鼠缺血再灌注 24 h 时迅速断头取脑, 沿冠状切面切片, 厚约 2.0 mm, 2% TTC 避光染色 30 min, 生理盐水漂洗后, 正常组织呈红色, 损伤组织呈白色, 多聚甲醛溶液固定后, 采用病理图像分析系统测出一侧脑总

面积和梗死灶面积,计算相应的脑体积以及梗死灶体积百分比。

**流式细胞仪测定细胞内游离钙** 取 MCAO大鼠缺血再灌注 24 h后的病灶组织,首先将其制成细胞数为  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 37 °C 预温 5 min,加入 Fluor3/AM 及 F-127(终浓度为  $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 45 min,再以含 10%牛血清白蛋白的 Hanks液洗 2遍,细胞于 37 °C 中复温 3 min后,用流式细胞仪测定  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ,应用 CellQuest软件进行检测分析。

**NO和 NOS的测定** 取 MCAO大鼠缺血再灌注 24 h后的缺血区皮层组织,制备成 10%的组织匀浆液,离心取上清液 0.05 mL,分别用分光光度法测定 NOS活性,硝酸还原酶法测定 NO含量,均按试剂盒说明书操作步骤严格进行测定。以每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NO为 1 个活性单位(U)。

**缺血侧皮层组织中 cGMP的测定** 称取 MCAO大鼠缺血再灌注 24 h后的缺血侧皮层组织约 50 mg,放入盛有冷醋酸缓冲液 2 mL的试管中,超声匀浆后混匀静置,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 收集上清液并烘干,加醋酸缓冲液溶解,应用放射免疫法测定样品放射性强度,并进行相应含量计算。

**统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用完全随机设计方差分析法(ANOVA),再用 S-N-K法进行均数的两两比较,所有数据均用 SPSS 11.5 软件进行分析。

## 结果

### 1 NCS-356对 MCAO大鼠神经功能、脑梗死灶体积的影响

Isc/R组神经功能评分明显高于假手术组 ( $P < 0.01$ ),缺血侧额顶叶皮层及尾状核出现大片白色的脑梗死灶;  $\text{N}_3$ 组及尼莫地平组能降低神经功能评分,分别为 Isc/R组的 80.5%及 73.0% (均  $P < 0.05$ );  $\text{N}_3$ 组及尼莫地平组也能缩小脑梗死灶范围,分别为 Isc/R组的 74.6%及 71.1% (均  $P < 0.05$ ); NCS-382 +  $\text{N}_3$ 组神经功能评分、脑梗死体积百分比略低于 Isc/R组 ( $P > 0.05$ ),但明显高于  $\text{N}_3$ 组 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2 NCS-356对 MCAO大鼠缺血侧皮层神经元内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 含量的影响

Isc/R组神经细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$ 荧光强度较假手术组明显增强 ( $P < 0.01$ );  $\text{N}_1$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_3$ 组和尼莫地

平组  $\text{Ca}^{2+}$ 含量均降低,分别为 Isc/R组的 87.5% ( $P > 0.05$ ), 75.8% ( $P < 0.05$ ), 70.9% ( $P < 0.01$ )及 66.0% ( $P < 0.01$ ); NCS-382 +  $\text{N}_3$ 组  $\text{Ca}^{2+}$ 含量稍低于 Isc/R组 ( $P > 0.05$ ),但比  $\text{N}_3$ 组升高,是其 1.25倍 ( $P < 0.01$ ),见表 2。

**Table 1** Effect of NCS-356 on behavior and infarction volume rate in MCAO rats

Group	Behavior evaluation / score	Infarction volume rate / %
Sham	0.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
Isc/R	2.67 ± 0.52 <sup>▲▲</sup>	27.31 ± 6.42 <sup>▲▲</sup>
$\text{N}_1$	2.42 ± 0.53 <sup>▲▲</sup>	23.44 ± 5.32 <sup>▲▲</sup>
$\text{N}_2$	2.28 ± 0.45 <sup>▲▲</sup>	22.52 ± 5.13 <sup>▲▲</sup>
$\text{N}_3$	2.15 ± 0.35 <sup>▲▲*</sup>	20.37 ± 4.25 <sup>▲▲*</sup>
NCS-382 + $\text{N}_3$	2.48 ± 0.46 <sup>▲▲*</sup>	25.47 ± 5.24 <sup>▲▲*</sup>
Nim	1.95 ± 0.35 <sup>▲▲*</sup>	19.42 ± 4.66 <sup>▲▲*</sup>

Recording behavioral consequence of MCAO rats with Longa's method after 2 h of ischemia-reperfusion and measuring the cerebral infarction volume by TTC staining after 24 h of ischemia-reperfusion. Sham: Sham operation group; Isc/R: Ischemia-reperfusion group;  $\text{N}_1$ : NCS-356 160  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group;  $\text{N}_2$ : NCS-356 320  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group;  $\text{N}_3$ : NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group; NCS-382 +  $\text{N}_3$ : NCS-382 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group; Nim: Nimodipine 600  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group.  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>▲▲</sup>  $P < 0.01$  vs sham group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  vs Isc/R group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  vs  $\text{N}_3$  group

**Table 2** Effect of NCS-356 on the content of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and cGMP in ischemic cortex of MCAO rats

Group	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fluorescence intensity)	cGMP / pmol · mg <sup>-1</sup>
Sham	133 ± 29	0.18 ± 0.05
Isc/R	265 ± 56 <sup>▲▲</sup>	0.41 ± 0.11 <sup>▲▲</sup>
$\text{N}_1$	232 ± 42 <sup>▲▲</sup>	0.36 ± 0.12 <sup>▲▲</sup>
$\text{N}_2$	201 ± 38 <sup>▲▲*</sup>	0.33 ± 0.09 <sup>▲▲</sup>
$\text{N}_3$	188 ± 35 <sup>▲▲**</sup>	0.27 ± 0.06 <sup>▲▲**</sup>
NCS-382 + $\text{N}_3$	235 ± 41 <sup>▲▲**</sup>	0.35 ± 0.10 <sup>▲▲**</sup>
Nim	175 ± 33 <sup>▲▲**</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>▲▲**</sup>

Measuring the content of intracellular free calcium by flow cytometry and the content of cGMP by radioimmunoassay after 24 h of ischemia-reperfusion in rats. Sham: Sham operation group; Isc/R: Ischemia-reperfusion group;  $\text{N}_1$ : NCS-356 160  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group;  $\text{N}_2$ : NCS-356 320  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group;  $\text{N}_3$ : NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group; NCS-382 +  $\text{N}_3$ : NCS-382 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + NCS-356 640  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group; Nim: Nimodipine 600  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  group.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>▲▲</sup>  $P < 0.01$  vs sham group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs Isc/R group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs  $\text{N}_3$  group

**Table 3** Effect of NCS-356 on tNOS, iNOS activities and the content of NO in ischemic cortex of MCAO rats

Group	tNOS/U $\cdot$ mg $^{-1}$ (protein)	iNOS/U $\cdot$ mg $^{-1}$ (protein)	NO/nmol $\cdot$ mg $^{-1}$ (protein)
Sham	1.09 $\pm$ 0.33	0.25 $\pm$ 0.14	5.98 $\pm$ 1.45
Isc/R	2.31 $\pm$ 0.47 <sup>▲▲</sup>	0.71 $\pm$ 0.22 <sup>▲▲</sup>	13.69 $\pm$ 3.12 <sup>▲▲</sup>
N <sub>1</sub>	2.17 $\pm$ 0.36 <sup>▲▲</sup>	0.64 $\pm$ 0.16 <sup>▲▲</sup>	11.23 $\pm$ 2.56 <sup>▲▲</sup>
N <sub>2</sub>	2.04 $\pm$ 0.32 <sup>▲▲</sup>	0.52 $\pm$ 0.14 <sup>▲▲*</sup>	10.51 $\pm$ 2.14 <sup>▲▲*</sup>
N <sub>3</sub>	1.74 $\pm$ 0.46 <sup>▲▲*</sup>	0.42 $\pm$ 0.1 <sup>▲▲**</sup>	7.25 $\pm$ 1.45 <sup>▲▲**</sup>
NCS-382 + N <sub>3</sub>	2.15 $\pm$ 0.36 <sup>▲▲*</sup>	0.67 $\pm$ 0.13 <sup>▲▲**</sup>	11.35 $\pm$ 2.38 <sup>▲▲**</sup>
Nim	1.53 $\pm$ 0.34 <sup>▲▲*</sup>	0.40 $\pm$ 0.09 <sup>▲▲**</sup>	7.10 $\pm$ 1.66 <sup>▲▲**</sup>

Measuring tNOS, iNOS activities and the content of NO by spectrophotometric method after 24 h of ischemia-reperfusion in rats. Sham: Sham operation group; Isc/R: Ischemia-reperfusion group; N<sub>1</sub>: NCS-356 160  $\mu$ g $\cdot$  kg $^{-1}$  group; N<sub>2</sub>: NCS-356 320  $\mu$ g $\cdot$  kg $^{-1}$  group; N<sub>3</sub>: NCS-356 640  $\mu$ g $\cdot$  kg $^{-1}$  group; NCS-382 + N<sub>3</sub>: NCS-382 640  $\mu$ g $\cdot$  kg $^{-1}$  + NCS-356 640  $\mu$ g $\cdot$  kg $^{-1}$  group; Nim: Nimodipine 600  $\mu$ g $\cdot$  kg $^{-1}$  group.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>▲▲</sup>  $P < 0.01$  vs sham group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs Isc/R group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs N<sub>3</sub> group

### 3 NCS-356对MCAO大鼠缺血侧皮层组织中cGMP含量的影响

Isc/R组的cGMP含量较假手术组明显升高,是其2.28倍( $P < 0.01$ ); N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>组的cGMP含量比Isc/R组低,但无统计学差异( $P > 0.05$ ); N<sub>3</sub>组和尼莫地平组则明显低于Isc/R组,cGMP含量分别是Isc/R组的65.9%及58.5%(均 $P < 0.01$ ); NCS-382 + N<sub>3</sub>组的cGMP含量低于Isc/R组( $P > 0.05$ ),但比N<sub>3</sub>组高,是其1.30倍( $P < 0.05$ ),见表2。

### 4 NCS-356对MCAO大鼠缺血侧皮层组织tNOS、iNOS活性及NO含量的影响

Isc/R组tNOS、iNOS活性及NO含量均显著高于假手术组(均 $P < 0.01$ ); N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、尼莫地平组的tNOS活性、iNOS活性、NO含量低于Isc/R组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); NCS-382 + N<sub>3</sub>组各指标值与Isc/R组无统计学差异,但均较N<sub>3</sub>组高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ),见表3。

## 讨论

临床上神经功能的改善是评价药物有效的一个重要指标。本实验结果显示,激动GHB受体可以改善大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤引起的行为功能障碍,减少脑梗死体积,说明激动GHB受体对大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。实验结果还显示,大鼠脑缺血前和再灌时给予GHB受体激动剂NCS-356,能降低缺血后脑细胞内的Ca<sup>2+</sup>、cGMP、NO含量及NOS活性,且随其剂量的增加作用增强。而在给予GHB受体激动剂NCS-356之前预先给予

GHB受体拮抗剂NCS-382,则能明显对抗NCS-356的上述作用,提示激动GHB受体产生的脑保护作用与其降低神经细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度,减少NO及cGMP含量有关。

已有文献<sup>[9-11]</sup>报道,激动GHB受体能影响cAMP、cGMP、Ca<sup>2+</sup>及PI水平。还有文献<sup>[12,13]</sup>报道,GHB受体属于G蛋白家族(G<sub>o</sub>或G<sub>i</sub>家族)偶联受体。激活G<sub>o</sub>蛋白可以直接抑制钙通道活性,降低Ca<sup>2+</sup>内流,并能调节NOS活性;激活G<sub>i</sub>蛋白可以抑制腺苷酸环化酶,减少cAMP生成,从而抑制蛋白激酶A(PKA)。

脑缺血时大量Ca<sup>2+</sup>进入细胞内,可通过激活NOS而产生大量的NO,NO激活可溶性鸟苷酸环化酶,使细胞的cGMP水平增高,作用于cGMP依赖性酶,导致多种蛋白质磷酸化及去磷酸化,从而加重脑缺血损伤。因此Ca<sup>2+</sup>、NOS、NO及cGMP在缺血性脑损伤中均发挥了重要的作用,常作为一个体系相互影响,相互促进,使脑损伤加重。本实验结果证实GHB受体激动剂NCS-356能降低缺血后脑细胞内的Ca<sup>2+</sup>、NO及cGMP含量,由此推测GHB受体可能通过GHB受体—G<sub>o</sub>—Ca<sup>2+</sup>—NO—cGMP这条通路发挥对脑缺血损伤的保护作用。

GHB受体作为一种G蛋白家族偶联受体,由于存在不同类型的G蛋白亚基,不同亚基通过不同通路产生不同的生物学效应,而本实验仅研究了其中的一条主要通路,加上缺血性脑血管疾病发病的原因及机制复杂,因此要全面了解GHB受体对脑缺血的保护作用机制还需做进一步深入的研究。

## References

- [ 1 ] Andriamampandry C, Taleb O, Viry S, et al. Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neurotransmitter gamma-hydroxybutyrate (GHB) [ J ]. *FASEB J*, 2003, 17: 1691 - 1693.
- [ 2 ] Maitre M. The  $\gamma$ -hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and functional implications [ J ]. *Prog Neurobiol*, 1997, 51: 337 - 361.
- [ 3 ] Ottani A, Vergoni AV, Saltini S, et al. Effect of late treatment with gamma-hydroxybutyrate on the histological and behavioral consequences of transient brain ischemia in the rat [ J ]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 485: 183 - 191.
- [ 4 ] Li M, Cui JY, Gu SL, et al. Neuroprotective effects of sodium oxybate against focal cerebral ischemia-reperfusion injury and the relation to GABA in rats [ J ]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2004, 20: 295 - 298.
- [ 5 ] Ottani A, Saltini S, Bartiromo M, et al. Effect of gamma-hydroxybutyrate in two rat models of focal cerebral damage [ J ]. *Brain Res*, 2003, 986: 181 - 190.
- [ 6 ] Gu SL, You WB, Ma X, et al. Effect of gamma-hydroxybutyric acid receptor on protection of hypoxia-reoxygenation injured hippocampus in rats by sodium oxybate [ J ]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2006, 20: 91 - 95.
- [ 7 ] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [ J ]. *Stroke*, 1989, 20: 84 - 91.
- [ 8 ] Liu P, Wang JY, Li Q, et al. Effect of baicalin on HSP70 expression of hippocampal neurons in focal brain ischemia-reperfusion injury rats [ J ]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 619 - 624.
- [ 9 ] Vayer P, Maitre M. Gamma-hydroxybutyrate stimulation of the formation of cyclic GMP and inositol phosphates in rat hippocampal slices [ J ]. *J Neurochem*, 1989, 52: 1382 - 1387.
- [ 10 ] Maitre M. The  $\gamma$ -hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and functional implications [ J ]. *Prog Neurobiol*, 1997, 51: 337 - 361.
- [ 11 ] Kemmel V, Taleb O, Perard A, et al. Neurochemical and electrophysiological evidence for the existence of a functional  $\gamma$ -hydroxybutyrate system in NCB-20 neurons [ J ]. *Neuroscience*, 1998, 86: 989 - 1000.
- [ 12 ] Ratomponirina C, Hodé Y, Hechler V, et al.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate receptor binding in rat brain is inhibited by guanyl nucleotides and pertussis toxin [ J ]. *Neurosci Lett*, 1995, 189: 51 - 53.
- [ 13 ] Snead OC III. Evidence of G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor [ J ]. *J Neurochem*, 2000, 75: 1986 - 1996.