

L-谷氨酰胺对大鼠次声性脑损伤的防护效应*

滕光寿¹ 李玲^{2,4} 袁华¹ 牟翔¹ 陈景藻¹ 张美霞¹ 李永明³

摘要 目的:探讨 L-谷氨酰胺对 16Hz 130dB 次声暴露下大鼠学习记忆能力、血清 S-100 β 蛋白的影响。方法:将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、次声组、次声+药物组及药物 $\rightarrow$ 次声组,分别将次声组、次声+药物组及药物 $\rightarrow$ 次声组暴露于 16 Hz 130dB 次声环境中,正常对照组也置于次声舱内,但不给予次声作用。次声+药物组及药物 $\rightarrow$ 次声组分别在次声暴露后和次声暴露前饲料中加入药物。上述各组大鼠经 7d 相应处理后测试其记忆功能、S-100 β 蛋白水平的变化情况。结果:与正常对照组比较,次声对照组记忆功能明显下降($P<0.01$),S-100 β 蛋白水平有明显升高($P<0.01$);次声+药物组、药物 $\rightarrow$ 次声组与次声组比较,其学习记忆功能有显著性提高($P<0.05$),S-100 β 蛋白水平明显降低($P<0.05$)。结论:16Hz 130dB 次声可引发大鼠脑损伤,使其记忆功能受损,S-100 β 蛋白水平升高;L-谷氨酰胺对次声性脑损伤具有防护和治疗的效应。

关键词 次声;L-谷氨酰胺;脑损伤;学习记忆;S-100 β 蛋白

中图分类号:R493,R651 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-07-0587-03

The protecting effects of L-glutamine on the injury of infrasound to rats' brains/TENG Guangshou, LI Ling, YUAN Hua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(7):587—589

Abstract Objective: To study the effects of L-glutamine on learning and memory abilities and the contents of S-100 β protein in serum of rats exposed to 16Hz 130dB infrasound. **Method:** Sixty male SD rats were randomly divided into control group, infrasound group, infrasound plus drug-treatment group and drug-prevention plus infrasound group. Learning and memory abilities and the serum concentrations of S-100 β protein were measured 7 d after corresponding intervention. **Result:** In infrasound group compared with control group, rats' memory abilities went down significantly ($P<0.01$) and serum levels of S-100 β protein heightened significantly ($P<0.01$). Compared with those in infrasound group, in drug-treatment group and drug-prevention group rats' memory abilities raised ($P<0.05$) and the serum levels of S-100 β protein lowered ($P<0.05$). **Conclusion:** Rats' learning and memory abilities could be damaged by 16Hz 130dB infrasound, which also caused S-100 β protein heightening in rats' serum, while L-glutamine could alleviate the infrasonic injury to rats' brains.

Author's address Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, 710032

Key words infrasound; L-glutamine; brain injury; learning and memory; S-100 β protein

次声是频率在 0.0001—20Hz 之间的声波,在自然界及人工环境中广泛存在。高强度次声可致受试者各组织器官损害,但较为敏感的部位是大脑^[1],可引起脑的结构和功能的改变^[2-3]。既往研究表明^[3-4],次声可通过产生过量自由基,导致脑神经细胞脂质过氧化;L-谷氨酰胺具有重要的抗氧化作用^[5],本实验通过观察 L-谷氨酰胺对暴露于 16Hz,130dB 次声环境中大鼠学习记忆能力、S-100 β 蛋白(脑损伤特异性指标)水平的影响,从而探讨对次声损伤的防治措施。

1 材料与方法

1.1 材料来源

L-谷氨酰胺(美国 Amresco 公司生产;沃尔森公司分装);血清 S-100 β ELISA 试剂盒(第四军医大

学生理教研室提供);雄性 SD 大鼠(第四军医大学实验动物研究中心提供);Y 型电迷宫(第四军医大学防原教研室提供);次声压力舱及检测系统由第四军医大学、航天工业总公司第 41 所、中科院声学研究所等协作研制。

1.2 方法步骤

1.2.1 动物筛选和分组:健康雄性 SD 大鼠,体重(180 $\pm$ 20) g,进行 Y 型电迷宫学习训练。电击后,小鼠直接从起步区奔向安全区为正确,连续 9 次正确

* 基金项目:全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题(OIL071)

1 第四军医大学西京医院康复理疗科,西安,710032

2 解放军总医院第一附属医院康复理疗科

3 第四军医大学基础部免疫学教研室

4 通讯作者

作者简介:滕光寿,男,住院医师,硕士

收稿日期:2008-11-17

即为学习完成,计训练的次数为学习成绩^⑥。取平均训练次数近似的大鼠 60 只,随机分成 4 组(正常对照组、次声组、次声+药物组和药物→次声组)。

1.2.2 实验处理方法:正常对照组置入次声仓内 2h/d,无次声作用;次声组、次声+药物组、药物→次声组置入次声仓内每天暴露 2h(16Hz,130dB),正常对照组、次声组予以常规大鼠饲料喂养,次声+药物组及药物→次声组饲料中添加有 L-谷氨酰胺,占饲料比重 3%,其中次声+药物组是暴露次声环境期间给予药物饲料,药物→次声组是给予药物饲料喂养 7d 后置于次声环境中,暴露次声环境期间给予常规饲料。上述实验操作 1 次/d,共持续 7d。

1.2.3 次声作用后学习能力评定:学习的评定:第 6 天实验操作完后,采用 Y 型电迷宫法,测定小鼠的学习能力。凡受刺激后从起步区直接奔向安全区(即灯亮处)为正确反应,否则为错误反应;以 10 次训练中连续有 9 次反应正确为学会标准,记录每只小鼠达到学会标准所需的训练次数^⑥。

记忆力测试:第 7 天实验操作完后,采用 Y 型电迷宫法测试记忆保持能力,用 10 次训练中的正确百分率代表;同时记录每次跑到安全区所需的时间,10 次中每次到达安全区的平均时间作为该大鼠跑到安全区所需要的时间^⑥。

1.2.4 S-100 β 蛋白水平测定:7d 后各组大鼠进行学习能力评定后,腹腔注射氯丙嗪(冬眠灵)麻醉,解剖腹腔,从腹主动脉抽血 6ml,静置 15min 后,用离

心机以 2500r/min 离心 15min,即可分离出血清,移液枪取出血清,-20℃保存。采用双抗体夹心酶联免疫分析法同批测定血清 S-100 β 蛋白浓度。

1.3 统计学分析

研究所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS10.0 版统计软件(统计方法采用单因素方差分析方法)进行统计学分析。

2 结果

2.1 次声作用对小鼠学习能力的影响

实验前各组大鼠的成绩差异无显著性意义($P>0.05$)。实验后,次声组较正常对照组学习成绩下降,表现为错误反应增多,建立条件反射所需训练次数增多($P<0.05$),记忆能力下降,表现为 10 次训练中的正确百分率降低,同时记录每次跑到安全区所需的时间增加;次声+药物组与次声组比较,其学习成绩提高,表现为训练次数减少($P<0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠血清中 S-100 β 蛋白水平结果比较

正常对照组大鼠血清中 S-100 β 蛋白水平极低,次声组大鼠血清中 S-100 β 蛋白水平明显增高,组间差异有显著意义($P<0.01$),次声+药物组、药物→次声组大鼠血清中 S-100 β 蛋白水平较正常对照组升高,但较单纯次声组降低,组间差异有显著性意义($P<0.05$),药物→次声组大鼠血清中 S-100 β 蛋白水平高于次声+药物组,组间差异有显著性意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠学习成绩及血清中 S-100 β 蛋白水平结果比较

($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	学习成绩(训练次数)		记忆能力		S-100 β ($\mu\text{g/L}$)
	实验前	实验后	正确率(%)	跑到安全区所需要的时间(s)	
正常对照组	12.43 $\pm$ 1.31	13.02 $\pm$ 1.40	79.24 $\pm$ 13.51	6.3 $\pm$ 2.1	0.065 $\pm$ 0.024
次声组	12.71 $\pm$ 1.72	21.73 $\pm$ 2.58 ^①	52.16 $\pm$ 10.53 ^①	11.4 $\pm$ 3.5 ^①	0.945 $\pm$ 0.174 ^①
次声+药物组	12.56 $\pm$ 1.33	16.61 $\pm$ 2.15 ^{①②}	67.63 $\pm$ 15.27 ^{①②}	9.2 $\pm$ 1.9 ^{①②}	0.504 $\pm$ 0.134 ^{①②}
药物→次声组	12.39 $\pm$ 1.54	19.10 $\pm$ 1.17 ^{①②③}	59.17 $\pm$ 11.76 ^{①②③}	9.5 $\pm$ 2.7 ^{①②}	0.722 $\pm$ 0.181 ^{①②③}

①与正常对照组比 $P<0.01$;②与次声组比 $P<0.05$;③与次声+药物组比 $P<0.05$

3 讨论

以往研究报道,生物共振是次声对机体作用的始动机制,在此基础上进一步影响生物体内的理化过程,使体内自由基产生增多,直接损害或通过一系列过氧化链式反应而引起广泛的生物结构破坏;引起脑组织谷氨酸浓度及代谢型谷氨酸受体(mGluR)mRNA 表达水平的升高,导致次声性脑损害;引起细胞内钙离子浓度增高甚至钙超载造成神经细胞迟发性损伤或触发细胞凋亡;可使内皮素-1 合成增多,NO 合成减少,破坏血管内皮结构的完整性,进而影响各器官、组织的微循环灌注^⑦。

L-谷氨酰胺是人体条件必须氨基酸之一,具有重要的抗氧化作用,其主要作用包括^⑧:①作为能源

物质氧化:在神经细胞内,突触部位的线粒体对谷氨酰胺的摄取远高于非突触部位,表明在信号传导的主要部位-突触对谷氨酰胺的需要量较多。通过谷氨酰胺的氧化,可消除细胞的一些强氧化性物质,实际上保护了细胞内另外一些重要组分免受氧化性伤害。②参与凋亡酶的调节。谷氨酰胺可能与细胞内的氧化还原平衡具有极为重要的关系,主要表现为对细胞信号传递系统产生影响,防止细胞内钙超载触发细胞凋亡。③作为谷胱甘肽的前体物质,减轻氧化压力。在脑内,谷氨酰胺参与氨和多余的谷氨酸毒性作用的消除,并使谷氨酸保持正常水平。④加速细胞增殖。谷氨酰胺对于多种类型的细胞的生长和增殖都是必需的。⑤抑制 NO 的合成。L-谷氨酰胺广泛生

理功能及重要的抗氧化特性, 为次声部分损伤机制的防护提供了理论依据。

本实验室以往研究发现, 高分贝的次声作用可以引起实验动物的学习记忆能力下降^[3,8]。本实验无论提前给药组还是暴露期间给药组, 实验动物的学习记忆能力较次声组有所改善, 表现为训练次数减少, 训练中的正确百分率降低, 每次跑到安全区所需的时间增加减少。

S-100 β 蛋白特异性地存在于中枢神经系统的神经胶质细胞, 是神经胶质的标记蛋白, 也是脑特异性蛋白质^[9-10], 正常情况下不能通过血脑屏障, 故正常动物血清中含量较低。颅脑损伤后, 脑组织的损伤直接导致脑细胞和血脑屏障的广泛破坏, S-100 β 通过破坏的血脑屏障释放到血清, 从而使血清 S-100 β 蛋白水平迅速升高。近年来研究表明, S-100 β 蛋白对颅脑损伤有高度敏感性和特异性, 成为迄今最能反映脑损伤程度和预后的特异性蛋白之一, 是判断颅脑损伤程度和预后的客观指标^[11-12]。一般来说, S-100 β 蛋白血清水平越高, 脑损害越严重, 预后越差。本实验暴露期间给药组血清 S-100 β 蛋白水平与次声组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 说明 L-谷氨酰胺能减轻大鼠颅脑损伤, 具有治疗作用。药物 $\rightarrow$ 次声组在次声暴露期间停止给药, 血清 S-100 β 蛋白水平与次声组比较仍有显著差异 ($P < 0.05$), 说明仍可减轻颅脑损伤, 具有提前防护作用, 可能是由于 L-谷氨酰胺作为谷胱甘肽的前体物质, 具有抗氧化储备作用, 具体机制有待进步研究。

本实验结果从动物行为能力(学习记忆)及脑损伤生化指标上初步证明了 L-谷氨酰胺对大鼠次声性脑损伤具有一定防护效应, 但具体机制有待进一步研究。和既往一些次声防护药物^[13](抗氧化剂)比较, L-谷氨酰胺具有其特有的优势: 首先, L-谷氨酰胺是人体自有的一种氨基酸, 因此 L-谷氨酰胺可作为食物添加剂; 其次实验结果表明, L-谷氨酰胺具有提前防护作用, 这为自然界次声(噪音)广泛性及

不可预知性的防护提供了可能。

参考文献

- [1] 陈景藻. 次声的产生及生物学效应[A]. 中国人民解放军总后勤部编著. 医药卫生科学技术进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997: 194—197.
- [2] 费舟, 张翔, 王小峰, 等. 次声作用后鼠脑超微结构与血脑屏障的改变[J]. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21: 134—135.
- [3] 袁华, 龙华, 牟翔, 等. 8Hz 次声对大鼠学习记忆能力和神经元再生的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(5): 385—387.
- [4] 叶琳, 龚书明, 陈耀明, 等. 次声作用对大鼠大脑皮质脂质过氧化的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 60—362.
- [5] 王学斌, 刘凤莲, 李东风, 等. 体内游离谷氨酰胺的抗氧化作用[J]. 生物物理学报, 2004, 20(6): 429—433.
- [6] 王跃春. Y 型电迷宫在大鼠学习记忆功能测试中的合理运用[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1): 69—70.
- [7] 庄志强, 裴兆辉, 陈景藻. 次声生物学效应的相关机制[J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(4): 328—330.
- [8] 牟翔, 袁华, 李玲, 等. 高强度次声作用小鼠后海马内 P53 mRNA 表达的变化 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(4): 320—321.
- [9] Rothoerl RD, Woertgen C, Brawanski A. S-100 serum levels and outcome after severe head injury [J]. Acta Neurochir Suppl, 2000, 76: 97—100.
- [10] Gazzolo D, Grutzfeld D, Michetti F, et al. Increased S-100 β in cerebrospinal fluid of infants with bacterial meningitis: Relationship to brain damage and routine cerebrospinal fluid findings [J]. Clin Chem, 2004, 50: 941—944.
- [11] Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, et al. Serum S-100 β and interleukin -8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury [J]. Crit Care Med, 2002, 30 (12): 2669—2674.
- [12] Monnier D, Vidal C, Martin L, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: a population-based cancer registry descriptive study of 66 consecutive cases diagnosed between 1982 and 2002 [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2006, 20: 1237—1242.
- [13] 范建中, 杨俊峰, 陈景藻, 等. 加味补阳还五汤对 8Hz 130dB 次声暴露下小鼠大脑过氧化水平及超微结构的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(4): 296—298.