

·基础研究·

L-谷氨酰胺对次声致大鼠海马细胞凋亡和坏死的影响^{*}

滕光寿¹ 李 玲² 袁 华³ 牟 翔³ 王冰水³ 刘 卫³ 陈景藻³ 曲丽莉³ 王兴亚⁴

摘要

目的:探讨 L-谷氨酰胺(L-Gln)对次声暴露下大鼠海马细胞凋亡率和坏死率的影响。

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、药物→次声组,分别将次声组、次声+药物组、药物→次声组暴露于 16Hz、130dB 次声环境中,正常对照组也置于次声舱内,但期间不给予次声作用。经 7d 相应处理后测试各组大鼠海马细胞凋亡率和坏死率的变化。

结果:与正常对照组大鼠相比,次声组海马细胞凋亡率和坏死率显著升高($P<0.01$);与次声组相比,次声+药物组、药物→次声组,海马细胞凋亡率和坏死率显著降低($P<0.01$);与药物→次声组相比,次声+药物组海马细胞凋亡率和坏死率降低,但差异无显著性意义($P>0.05$)。

结论:次声(16Hz/130dB, 2h/d, 共 7d)作用可引起大鼠海马细胞凋亡及坏死,导致海马细胞损伤;L-Gln 能够部分有效预防和保护次声对大鼠海马细胞损伤的作用。

关键词 次声;L-谷氨酰胺;海马细胞;凋亡;坏死

中图分类号:R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-11-1044-03

The effect of L-glutamine on rat hippocampal cells' apoptosis and necrosis after infrasound exposure/
TENG Guangshou, LI Ling, YUAN Hua, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(11):
1044—1046

Abstract

Objective: To study the effects of L-glutamine (L-gln) on rat hippocampal cells' apoptosis and necrosis rates after infrasound exposure.

Method: Sixty male SD rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, infrasound group (16Hz/130dB infrasound), infrasound + drug group (16Hz/130dB infrasound + L-Gln), drug→infrasound group (L-Gln for 7 days, and then exposed to 16Hz/130dB infrasound). No special treatment was performed on the normal control group, and the remained 3 groups were performed to L-Gln and/or infrasound treatment. 7d later, hippocampus was isolated and the cell suspension was collected to detect the apoptosis and necrosis rates of hippocampal cells.

Result: Compared with normal control group, apoptosis and necrosis rates of hippocampal cells in infrasound group increased significantly ($P<0.01$). Compared with infrasound group, the rates of apoptosis and necrosis of hippocampal cells in infrasound + drug group and drug→infrasound group decreased significantly ($P<0.01$). Compared with drug→infrasound group, it showed a lower rates of hippocampal cells apoptosis and necrosis in infrasound + drug group, but there was no significant difference between both groups($P>0.05$).

Conclusion: Infrasound (16Hz/130dB, 2h/d, 7d) administration can induce apoptosis and necrosis of rat hippocampal cells and lead to cellular damage in hippocampus; L-Gln can partly prevent and protect from the infrasound-induced injury on the rat hippocampus.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.006

^{*} 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 第四军医大学唐都医院药剂科, 西安, 710038; 2 解放军总医院第一附属医院康复理疗科; 3 第四军医大学西京医院康复与理疗科; 4 中国人民解放军 95340 部队

作者简介:滕光寿,男,硕士,主治医师; 收稿日期:2010-07-16

Author's address Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038

Key words infrasound; L-glutamine; hippocampal cell; apoptosis; necrosis

次声是频率在 0.0001—20Hz 之间的声波,高强度次声可导致受试者各组织器官损害,但较为敏感的部位是大脑^[1],引起记忆功能降低^[2],海马细胞凋亡^[3]。既往研究表明,L-谷氨酰胺对大鼠次声性脑损伤具有防护效应^[4],本实验通过观察 L-谷氨酰胺对次声致使鼠海马细胞凋亡和坏死的影响,进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

L-谷氨酰胺(美国 Amresco 公司生产;沃尔森公司分装);AnnexinV-FITC 试剂盒(美国 Alexis 公司);雄性 SD 大鼠(第四军医大学实验动物研究中心提供);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。同时本研究还用到流式细胞仪(FACScan 型,美国 BD 公司)、光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司)、离心机及恒温水浴箱等设备。

1.2 方法

1.2.1 动物筛选和分组。健康二级雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为 4 组:正常对照组、次声组、次声+药物组、药物→次声组。

1.2.2 实验处理方法。正常对照组大鼠置于次声舱中 2h/d,不予次声暴露,其余各组给予 16Hz/130dB 的次声暴露,2h/d。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→次声组以大鼠药物饲料(常规饲料:L-Gln=97:3)喂养,其中次声+药物组暴露次声环境期间给予药物饲料,药物→次声组给予药物饲料喂养 7d 后置于次声环境中,暴露次声环境期间给予常规饲料喂养。所有大鼠自由进食和饮水。上述实验操作共持续 7d。

1.2.3 海马细胞悬液的制备及流式细胞仪检测凋亡和坏死细胞的百分率。第 7 天后大鼠断头处死,无菌条件下超净工作台内光学显微镜下分离海马组织,加入 0.25%胰蛋白酶 2ml,37℃下,于 5% CO₂ 培养箱中消化 15min 后移入离心管,用等量接种液终止消化反应。用吸管吹打数次后 1000 转/min 离心

5min。去除上清液,加入接种液 2—3ml,用细口径吸管(尖端直径 2mm)反复轻轻吹打使之均匀分散,静置 2—3min,等残渣沉淀,吸出上层细胞悬液保留,再加入 2—3ml 接种液,上述过程重复共 3 次。收集所得海马细胞悬液,用接种液将细胞悬液稀释至所需密度 1×10^6 个/ml,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中待测。

根据 AnnexinV-FITC 试剂盒说明书,取每份海马细胞悬液 1ml,4℃、1000 转/min 离心 10min,去上清液后加入 1ml 冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,4℃、1000 转/min 离心 10min,弃上清液。再重复操作 1 次后加入 100μl Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin-V (20μg/ml)10μl,室温避光反应 20min,再加入 PI (50μg/ml)5μl,避光反应 5min 后,加入 400μl Binding Buffer,立即用流式细胞仪 FACScan 进行定量检测,同时以不加 AnnexinV-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。

1.3 统计学分析

所有实验数据以均值±标准差表示,采用 SPSS 11.5 统计软件中的单因素方差分析,不同组间比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

大鼠海马细胞凋亡率:与正常对照组比较,次声组、次声+药物组、药物→次声组的海马细胞凋亡率升高,差异有显著性差异($P < 0.01$);与次声组比较,次声+药物组和药物→次声组的海马细胞凋亡率降低,差异有显著性差异($P < 0.01$);与次声+药物组相比,药物→次声组海马细胞凋亡率升高,差异无显著性意义($P > 0.05$)。大鼠海马细胞坏死率:大鼠海马细胞坏死率结果和凋亡率类似,见表 1。

表 1 L-Gln 对次声损伤大鼠海马细胞凋亡率和坏死率的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	正常对照组	次声组	次声+药物组	药物→次声组
凋亡率	2.11±0.59	14.86±4.03 ^①	8.72±2.81 ^{①②}	9.56±2.74 ^{①②③}
坏死率	9.95±2.72	27.13±5.04 ^①	18.09±3.01 ^{①②}	20.96±3.48 ^{①②③}

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

3 讨论

细胞有多种不同的死亡形式,其中最为主要的两种方式:凋亡(apoptosis)与坏死(necrosis)。凋亡和坏死是机体细胞对于不同的损伤所做的不同反应,当损伤刺激较轻、相对较为温和时细胞发生凋亡,当损伤过强时,细胞会发生快速的坏死^[5]。

本实验次声组海马细胞凋亡率比正常对照组高($P<0.01$),说明次声导致海马细胞损伤,可能与次声损伤机制有关:激活体内氧化系统,使自由基产生增多^[6-7],导致细胞内 Ca^{2+} 浓度增高甚至超载^[8],一氧化氮合成减少^[9]。L-谷氨酰胺是体内含量最丰富的条件必需氨基酸,具有重要抗氧化作用。

3.1 作为能源物质氧化^[10]

L-Gln 是线粒体形成 ATP 的主要供能物质。在神经细胞内,突触部位的线粒体对 L-Gln 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 L-Gln 的需要量较多。通过 L-Gln 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。另据推测,L-Gln 的分解可能为神经元线粒体的核酸及重要蛋白质的合成提供能量。

3.2 参与凋亡酶的调节^[11]

谷氨酰胺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。

3.3 作为谷胱甘肽的前体物质^[12]

减轻氧化压力:在脑内,谷氨酰胺参与氨和多余谷氨酸毒性作用的消除,并使谷氨酸保持正常水平。

3.4 抑制一氧化氮的合成^[13]

一氧化氮可直接诱导细胞凋亡,L-Gln 是一氧化氮合成的有效抑制剂,可明显减轻这种损伤。

次声+药物组暴露次声环境中同时给药,主要观察药物治疗效果,药物→次声组提前给药结束后暴露次声环境中,主要是观察药物预防效果。与次声组比较,次声+药物组、药物→次声组海马细胞凋亡率和坏死率降低($P<0.01$);与正常对照组比较,次声+药物组、药物→次声组海马细胞凋亡率升高($P<0.01$);与次声+药物组比较,药物→次声组海马细胞凋亡率相对较高,但差异无显著性意义($P>0.05$),说明暴露于次声环境之前或同时给予 L-Gln 能够部分

预防和保护次声对大鼠海马细胞损伤的作用,其机制可能与抗氧化损伤有关。

学习和记忆是脑的重要功能之一,海马损伤的患者学习记忆能力下降,包括空间学习记忆和情景学习记忆,提示海马在学习记忆的形成中起重要作用^[14]。L-谷氨酰胺对大鼠次声性脑损伤具有防护效应,减轻大鼠记忆能力下降^[4],与 L-谷氨酰胺能够部分有效预防和保护次声对大鼠海马细胞损伤的作用有关。

参考文献

- [1] 陈景藻. 次声的产生及生物学效应 [A]. 见: 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] 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.
- [3] 刘朝晖, 陈景藻, 李康樗, 等. 不同声压级次声对大鼠海马细胞凋亡的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(3): 148—151.
- [4] 滕光寿, 李玲, 袁华, 等. L-谷氨酰胺对大鼠次声性脑损伤的防护效应[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(7): 587—589.
- [5] Hengartner Mo. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 40(7): 770—776.
- [6] 崔芳, 任雨笙, 李玲, 等. 不同声强 8Hz 次声作用对大鼠 GSH-Px, SOD 活性及 MDA 含量的影响[J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(9): 743—744.
- [7] 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.
- [8] 刘朝晖, 陈景藻, 王志鹏, 等. 8Hz/130dB 次声对大鼠海马细胞内钙离子浓度的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(4): 304—306.
- [9] 裴兆辉, 陈景藻, 朱妙章. 次声作用后大鼠血浆一氧化氮与内皮素-1 含量变化及意义[J]. 中国临床康复, 2004, 8(12): 2260—2261.
- [10] Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. Glutamine transport in brain mitochondria[J]. Neurochem Int, 2000, 37: 131—138.
- [11] Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, et al. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(5): 439—458.
- [12] Fan YP, Yu JC, Kang WM, et al. Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery[J]. Chin Med Sci, 2009, 24(1): 55—59.
- [13] Elena K, Maria L, Cannina M, et al. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide [J]. Neurochemistry International, 2003, 43(4-5): 493—499.
- [14] Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory[J]. Neuron, 1998, 20(3): 445—468.