

# 外源性磷酸肌酸对游泳力竭小鼠大脑中谷氨酸和钙-ATP酶活力的影响

马集<sup>a</sup>, 卢畅<sup>a</sup>, 姜茜<sup>a</sup>, 殷林波<sup>a</sup>, 刘彦娜<sup>b</sup>, 刘克敏<sup>b</sup>

**【摘要】** 目的:研究外源性磷酸肌酸(PCr)对游泳力竭小鼠大脑中谷氨酸(Glu)和钙-ATP酶(Ca<sup>2+</sup>-ATPase)活力的影响,以进一步揭示PCr的抗疲劳机制。方法:将44只6周龄小鼠分为力竭对照组12只(A组)、力竭给药组12只(B组)、游泳8min对照组10只(C组)、游泳8min给药组10只(D组),采取小鼠负重游泳的力竭运动模型,每只小鼠负重量为自身体质量的6%。于游泳前30min,B、D组小鼠经腹腔注射磷酸肌酸钠溶液1000mg/kg;A、C组小鼠注射同等比例生理盐水作为安慰剂。记录力竭组小鼠的力竭游泳时间,采用化学比色法检测4组小鼠大脑中Glu含量和Ca<sup>2+</sup>-ATPase的活性。结果:经检测,B组小鼠的力竭游泳时间明显长于A组(P<0.05)。小鼠大脑Glu含量检测显示,B组明显低于A组,D组明显低于C组(P<0.05);Ca<sup>2+</sup>-ATPase活力检测显示,B组明显高于A组,D组明显高于C组(P<0.05)。结论:外源性PCr的抗疲劳机制与增强Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性和间接降低大脑中的Glu含量有关。

**【关键词】** 运动性疲劳;磷酸肌酸;谷氨酸;钙-ATP酶

**【中图分类号】** R49;R87 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2013.03.002

**Effects of exogenous creatine phosphate on glutamic acid and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in brain of mice after exhaustive exercise** MA Ji, LU Chang, JIANG Qian, et al. Medical Laboratory of Dalian Medical University, Dalian 116044, China

**【Abstract】** Objective: To observe the effects of exogenous creatine phosphate on glutamic acid level and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in brain of mice after exhaustive exercise and to further reveal the mechanism of exogenous creatine phosphate in allaying tiredness. Methods: All 36 mice, 6-week-age, were divided into 4 groups: exhaustive swimming control group (group A); exhaustive swimming with medication group (group B); 8-min swimming control group (group C); and 8-min swimming with medication group (group D). The method of mice weight-loading swimming was used to set up the model of exhaustive exercise, and each mouse loaded weight with 6% of the mass of itself. Thirty min before the experiment, mice in groups B and D were given the intraperitoneal injection with creatine phosphate sodium by the standard of 1000 mg/kg, and the mice in groups A and C were given the same proportionate normal saline as placebo. The exhaustive swimming time was recorded, and glutamic level and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity were measured by using biochemical kits. Results: After testing, the exhaustion time in group B was longer than that in group A (P<0.05). The Glu contents in groups B and D were significantly lower than in groups A and C (P<0.05). Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in groups B and group D was significantly higher than that in groups A and C (P<0.05). Conclusion: The mechanism of exogenous creatine phosphate in allaying tiredness may be closely related with increased Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and reduced glutamic level.

**【Key words】** exhaustive exercise; creatine phosphate; glutamic acid; Ca<sup>2+</sup>-ATPase

在运动性疲劳中,中枢疲劳占主导,急剧或长时间运动导致中枢神经系统稳态失调而引发的中枢疲劳将直接导致脑机能下降<sup>[1]</sup>,从而影响运动能力。大量研究证明补充外源性磷酸肌酸(exogenous creatine

phosphate, PCr)能提高运动员在短时间内的运动爆发力<sup>[2-3]</sup>,也有研究表明补充磷酸肌酸可延缓疲劳的发展<sup>[4]</sup>,但其缓解中枢疲劳的作用机制尚不清楚。本实验通过给小鼠注射PCr,观察小鼠大脑中物质和能量的代谢,检测与中枢疲劳密切相关的2个指标谷氨酸(glutamic, Glu)含量和钙-ATP酶(Ca<sup>2+</sup>-ATPase)活力的改变,来进一步探究磷酸肌酸的抗疲劳作用机制。

基金项目:大连医科大学大学生科技创新活动基金资助项目(2013022)

收稿日期:2012-11-07

作者单位:大连医科大学 a. 医学检验系, b. 基础医学院运动医学教研室, 辽宁大连 116044

作者简介:马集(1991-),男,本科在读,主要从事运动、康复的研究。

通讯作者:刘彦娜,讲师。

## 1 材料与方法

1.1 材料 ①动物:雄性昆明种小鼠 50 只,6 周龄,体质量(38±4)g,SPF 级,由大连医科大学动物实验中心提供。②主要药品及试剂:磷酸肌酸钠粉末,哈尔滨博莱制药有限公司;注射用 0.9%氯化钠,沈阳新兴试剂厂;谷氨酸测定试剂盒、ATP 酶测定试剂盒,南京建成科技有限公司。

1.2 方法 ①饲养及分组:在清洁房间内分笼饲养,温度 20~25℃,自然光照,自由进食饮水,常规饲养 2 周,第 2 周进行适应性游泳训练,每天 15min。实验前 3d 剔除体质差异大及游泳不佳小鼠 6 只,剩余 44 只分为 4 组,即力竭对照组 12 只(A 组)、力竭给药组 12 只(B 组)、游泳 8min 对照组 10 只(C 组)、游泳 8min 给药组 10 只(D 组)。②药物干预:B、D 组小鼠经腹腔注射磷酸肌酸钠溶液 1000mg/kg;A、C 组小鼠注射同等比例生理盐水作为安慰剂。均于游泳前 30min 经腹腔注射<sup>[5]</sup>。③动物模型建立:小鼠在实验前 24h,均禁食禁水。游泳水深 60cm,水温(30±2)℃。A、B 组小鼠进行一次性负重力竭游泳,负重量为小鼠体质量的 6%,力竭标准为小鼠沉入水中 10s 不能自主浮上水面且放在平面无法完成翻正反射<sup>[6]</sup>;C、D 组小鼠同样承载自身体质量 6%的重量进行游泳,8min 后捞出。运动结束,迅速取出小鼠大脑,在冰生理盐水中洗去血液,0℃保存,待测。

1.3 评定标准 ①脑组织匀浆的制备:将脑组织与预冷的双蒸水置于匀浆器中,手工匀浆,制成 10%的匀浆液。将制备好的匀浆液低温低速离心 2000r/min,离心 10min,取上清进行测定,以上操作均在低温下进行。②指标测定:Glu 含量和 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力测定均严格按照试剂盒说明操作,最终利用化学比色法测定吸光度值,仪器采用上海产 721 型分光光度计。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

经检测,B 组小鼠的力竭游泳时间明显长于 A 组 [(26.7±7.4)min、(18.1±9.5)min,  $P < 0.05$ ]。小鼠大脑 Glu 含量检测显示,B 组明显低于 A 组,D 组明显低于 C 组 ( $P < 0.05$ );Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力检测显示,B 组明显高于 A 组,D 组明显高于 C 组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 4 组小鼠大脑 Glu 含量和 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力比较  $\bar{x} \pm s$

组别	n	Glu ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ca <sup>2+</sup> -ATPase ( $\mu\text{molPi/mgprot/hour}$ )
A 组	12	217.42±29.00	0.60±0.09
B 组	12	198.43±22.95 <sup>a</sup>	0.69±0.09 <sup>a</sup>
C 组	10	193.17±22.81	0.74±0.09
D 组	10	168.52±26.12 <sup>b</sup>	0.83±0.08 <sup>b</sup>

与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 3 讨论

竞技运动已发展成为当代遍及世界的热门现象,随着运动强度加大,运动疲劳的产生直接影响了竞技水平的提升,因此疲劳发生机制的研究有着重要的价值<sup>[7]</sup>。

PCr 是人体重要的能量供应源和能量转运者,可通过“PCr 通道”至少使总能量的 80%从线粒体由 PCr 分子输出<sup>[8]</sup>,研究发现 PCr 的抗疲劳的作用可能是多方面的,但目前临床上主要用于心肌保护。Glu 作为大脑最主要的兴奋性神经递质在大脑缺血后会引起脑组织的继发性损伤,大量兴奋性氨基酸聚积在细胞外会产生谷氨酸毒性损伤反应,使胞内 Ca<sup>2+</sup> 超载进而引发一系列复杂的生化反应,造成神经细胞坏死或凋亡<sup>[9]</sup>;目前非谷氨酸受体依赖的钙毒性机制引发的细胞损伤也逐渐受到重视<sup>[10]</sup>。Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶即钙泵,通过催化质膜内侧的 ATP 水解,释放出能量,驱动细胞内的 Ca<sup>2+</sup> 泵出细胞,对保持细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的稳定具有重要作用。因此,剧烈或长期运动引发细胞内钙离子紊乱而产生的细胞损伤程度与钙泵的作用直接相关,因而可检测钙泵活性反映钙集聚和细胞受损情况。本实验通过研究 PCr 对中枢疲劳的相关指标 Glu 和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的影响,发现:①注射 PCr 小鼠的力竭运动时间明显延长。说明 PCr 确实有延缓疲劳和提高小鼠运动能力的作用。PCr 延长小鼠的运动时间,通过减轻膜脂质过氧化,维持了膜的完整性;减少细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流,防止胞内钙集聚,从而避免了严重氧化应激的发生<sup>[11]</sup>;同时通过直接保护线粒体,维持线粒体正常的氧化磷酸化,保证了细胞能量供应<sup>[12]</sup>;此外,PCr 在一定程度上补偿由于脑部缺氧或葡萄糖的减少造成的 ATP 缺乏,提高组织对缺氧和缺血损伤的抵抗力,有一定程度的大脑保护作用进而减缓了中枢疲劳的发生,延长了小鼠的游泳时间<sup>[13]</sup>。②PCr 在一定阶段内降低了小鼠大脑中的 Glu 含量。一般条件下,Glu 被神经元谷氨酸转运体(excitatory amino acid carrier 1,EAAC1)摄取需与 Na<sup>+</sup> 伴随进入膜内同时交换 K<sup>+</sup> 出胞,此过程必须依靠 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 泵维持离子平衡,因此缺血情况下离子泵功能异常加上强烈去

极化使细胞内外的离子和电压梯度发生改变,EAAC1的逆向转运反而引起胞外谷氨酸升高<sup>[14]</sup>。本文结果显示C组的Glu含量高于D组,说明磷酸肌酸可在一定阶段内使运动小鼠大脑中谷氨酸含量降低。剧烈运动导致小鼠大脑缺血缺氧,Glu过多释放产生的细胞毒性可导致神经元大量死亡,释放到突触间隙的谷氨酸可被EAAC1重摄取,而终止其突触传递效应。若EAAC1的功能受损,细胞外液的谷氨酸浓度异常升高,激活细胞膜上的谷氨酸受体,使钙离子大量进入细胞内,干扰线粒体的功能,造成严重的氧化应激,并启动细胞凋亡机制。推测PCr可能通过直接供能、改善微循环和维护线粒体结构和功能<sup>[15-16]</sup>,保证了钠钾泵的能量供应,使钠钾泵依赖性谷氨酸转运体对谷氨酸进行重摄取,通过减少细胞外谷氨酸含量,缓解了谷氨酸的细胞毒性反应,以实现抗疲劳作用和增加小鼠游泳时间的功效。实验结果中,力竭组的谷氨酸含量均大于相应的游泳8min组,说明随运动时间的延长,小鼠大脑谷氨酸发生蓄积,当其浓度达到较高水平,即发生小鼠力竭。原因可能是剧烈运动使小鼠大脑兴奋性递质谷氨酸含量不断增多,造成神经元损伤,机体为避免神经元的进一步损伤,通过保护性抑制产生中枢疲劳,降低了运动能力,防止机体发生过度的机能衰竭,此推测与陈健等<sup>[17]</sup>人研究的缺氧过程大鼠呈现先兴奋后抑制状态的结果一致。③PCr在一定程度上增加了小鼠大脑中Ca<sup>2+</sup>-ATPase酶活力。本文结果显示B组的Ca<sup>2+</sup>-ATPase活力大于A组,同时D组的Ca<sup>2+</sup>-ATPase活力也大于C组,说明磷酸肌酸显著提高了运动小鼠大脑Ca<sup>2+</sup>-ATPase的活力。剧烈运动导致的谷氨酸兴奋性毒性和非谷氨酸受体依赖的钙毒性共同导致细胞内钙严重超载,钙可通过与CDR(一种依赖钙离子的调控蛋白)结合激活系列蛋白酶系统,升高细胞膜兴奋性又促进电压门控性Ca<sup>2+</sup>通道开放,进一步促进Ca<sup>2+</sup>内流,加速缺氧后的神经元死亡<sup>[18]</sup>。也有研究表明Ca<sup>2+</sup>被线粒体摄取后,线粒体氧化磷酸化的障碍直接影响离子泵功能并导致线粒体停止产生ATP<sup>[19]</sup>,进一步引起线粒体能量代谢障碍,诱导神经细胞凋亡。本实验中,给药组小鼠的Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活力大于对照组。可能是因为PCr通过降低脑中CaM、NO的含量,及时供给脑组织能量或作用于线粒体<sup>[20]</sup>,保证了ATP供应,通过维持钙泵功能,减轻了胞内钙蓄积;也可能因PCr减缓了谷氨酸兴奋性毒性和非谷氨酸受体依赖钙毒性的发生,减少了细胞损伤和凋亡<sup>[21]</sup>;此外,PCr有改善微循环作用,可通过减轻缺血状态为钙泵供能,一定程度上增加钙泵活力,亦实现抗疲劳和提高运动能力的作用。

综上所述,PCr可增加Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活力,通过将Ca<sup>2+</sup>泵出细胞减轻了钙超载现象;同时降低脑中的谷氨酸含量,减轻了兴奋性神经毒性的发生,缓解因剧烈或长时间运动导致大脑缺氧缺血产生的损伤,有效提高了机体的运动能力。

### 【参考文献】

- [1] Nybo L, Secher NH. Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise[J]. Prog Neurobiol, 2004, 72(4): 223-231.
- [2] Murphy AJ, Watsford ML, Coutts AJ, et al. Effects of creatine supplementation on aerobic power and cardiovascular structure and function[J]. Sci Med Sport, 2005, 8(3): 305-313.
- [3] Izquierdo M, Ibanez J, Badillo JJ, et al. Effects of creatine supplementation on muscle power, endurance, and sprint performance[J]. Med Sci Sports Exerc, 2002, 34(2): 332-343.
- [4] 尹少松, 陈晓红. 肌酸磷酸肌酸抗疲劳和提高运动能力的作用机制[J]. 云南医药, 2010, 31(6): 649-652.
- [5] 邹玲莉, 李秋莎, 韩国柱, 等. 离子对反相高效液相色谱法同时测定大鼠血浆和红细胞中外源性磷酸肌酸及其代谢产物和相关三磷酸腺苷[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 45-50.
- [6] 张全江, 李秋霞, 熊正英. 耐力训练后再力竭运动对小鼠血液部分生化指标的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 32(1): 98-101.
- [7] 吴琳. 运动性中枢疲劳的研究综述[J]. 鞍山师范学院学报, 2010, 12(6): 82-87.
- [8] Saks V, Kaambre I, Guzun R, et al. The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modeling approaches [J]. Subcell Biochem, 2007, 46(1): 27-65.
- [9] Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity[J]. Arth Dis Child Fatal Neonatal Ed, 2008, 93(2): 153-161.
- [10] 向军, 唐宇平, 蔡定芳. 非谷氨酸受体依赖的钙毒性机制在急性脑缺血损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1224-1228.
- [11] 赵力, 李午生, 李凯, 等. 磷酸肌酸对阿奇霉素引起心肌损伤大鼠体内SOD、CAT和LPO水平的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(7): 5-8.
- [12] 常建华, 景桂霞, 党旭云. 磷酸肌酸预处理对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2011, 32(2): 151-154.
- [13] 金越, 韩国柱, 李颖, 等. 磷酸肌酸的脑保护作用研究[J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(6): 521-525.
- [14] David J, Ross I, Takeo O. Glutamate in severe brain ische-

- mia is mainly by reversed uptake[J]. *Nature*, 2000, 403(67):316-321.
- [15] 张秀山,刘擘,张彦,等. 磷酸肌酸钠辅助治疗急性重型颅脑损伤的疗效评价[J]. *吉林大学学报*, 2009, 35(5):940-944.
- [16] 张玉晶,赵霞霞,杨艳辉,等. 磷酸肌酸钠对新生鼠缺氧缺血性脑损伤线粒体功能的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 21(13):4040-4043.
- [17] 陈健,江莲,武秀华,等. 缺氧缺血时新生大鼠脑中谷氨酸含量的变化及其与脑损伤的关系[J]. *河北医科大学学报*, 2003, 24(5):287-288.
- [18] Gao J, Duan B, Wang DG, et al. Coupling between NMDA receptor and acid sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death[J]. *Neuron*, 2005, 48(4):635-646.
- [19] Fernande Z, Gomez FJ, Galindo MF, et al. Involvement of mitochondrial potential and calcium buffering capacity in minocycline cytoprotective actions [J]. *Neuroscience*, 2005, 133(4):959-967.
- [20] 桂静,陈莹,李永凤,等. 磷酸肌酸钠对缺氧幼鼠脑组织中钙调蛋白一氧化氮水平的影响[J]. *郑州大学学报*, 2012, 47(1):63-66.
- [21] Balestrino M, Lensman. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage[J]. *Amino Acids*, 2002, 23(1-3):221-223.

• 经验交流 •

## 超短波治疗脊髓损伤患者急性附睾炎的临床观察

武亮<sup>1</sup>, 李建军<sup>2</sup>, 赵虎<sup>1</sup>, 饶建宇<sup>1</sup>, 张海青<sup>1</sup>

【关键词】 超短波; 脊髓损伤; 急性附睾炎

【中图分类号】 R49; R683.2 【DOI】 10.3870/zgkf.2013.03.030

2008年7月~2010年3月我院收治的脊髓损伤后并发急性附睾炎患者7例,年龄24~48岁;马尾神经损伤3例,颈髓损伤4例;ASIA分级<sup>[1]</sup>:A、B、C级各1例,D级4例;长期留置尿管者3例,间歇导尿者3例,利用集尿器集尿者1例;主要为泌尿系统感染;双侧发病,2例以右侧为重。发病时附睾红肿、增大,其内组织水肿、淤血。急性发病患者早期均出现寒战,后期伴随持续高热。彩色多普勒超声显示附睾肿大,以尾部为重,内部回声不均匀,边缘不规则。彩色多普勒血流显像(color doppler flow imaging, CDFI)示附睾尾或整个附睾内血流信号增多变强。7例患者均采用消炎、50%硫酸镁液外敷、膀胱冲洗等常规治疗后未见明显好转,继而采取超短波治疗:患者排空膀胱,并保持会阴部干燥;将DL-C-B超短波电疗机2个电极板于耻骨联合前后对置,频率40.68MHz、输出功率200W、电流50mA,无热量。每日1次,每次15min,共20次。

7例患者采取传统治疗方法1周后,6例较重的患者(85.7%)发热得到缓解,但附睾肿胀缓解不明显;另1例无发热患者(14.3%)附睾肿胀略有消退,继续抗炎15d后肿胀缓解较慢但未愈。采取超短波治疗后,第2天红肿减退明显;3d后肿胀消退70%;1周后基本消失,复查彩超见鞘内有积液和空囊形成;继续超短波巩固治疗13d后,患者均治愈(100%):附

睾疼痛完全消失,附睾大小、质地恢复正常,血液中白细胞数 $4.0\sim 10.0\times 10^9/L$ <sup>[2]</sup>,随访3个月后无复发。

附睾炎是阴囊内最常见的炎性反应,主要继发于尿路感染、前列腺炎、精囊炎。小剂量(无热量)超短波对侵入人体的病原体具有很强的杀伤力<sup>[3]</sup>。超短波治疗可使局部PH升高,减轻或消除组织酸中毒;局部钙离子增加而钾离子减少,使组织兴奋性低而减少渗出,细菌生长和繁殖的局部环境受到限制;可使附睾炎症迅速消退,肿大的附睾能在短期内恢复至正常大小、质地<sup>[2]</sup>。本研究采用超短波治疗脊髓损伤后畸形附睾炎,效果显著,值得临床推广应用。但同时也要注意以下几点:①在治疗前需排空膀胱,并保持会阴部干燥,防止组织损伤;②治疗时选择无热量,既可以防止组织灼伤,又可以避免热作用促进炎症的蔓延;③阴囊处组织娇嫩,每次治疗时时间不宜超过15min;④治疗周期不宜超过20次,防止累积效应对组织的损伤;⑤超短波治疗不排除常规治疗,两者可合用以增强治疗效果。

### 【参考文献】

- [1] Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011)[J]. *J Spinal Cord Med*, 2011, 34(6):535-546.
- [2] 成双珍. 超短波治疗急性附睾炎82例[J]. *实用医技*, 2000, 8(2):125-125.
- [3] 李秋革,李贺芝. 超短波在临床疾病治疗中的研究进展[J]. *中国社区医师·医学专业*, 2011, 13(34):17-17.

收稿日期:2013-04-07

作者单位:1. 北京小汤山医院康复中心,北京 102211;2. 中国康复研究中心,北京 100068

作者简介:武亮(1972-),男,副主任医师,主要从事脊髓损伤康复方面的研究。

通讯作者:李建军。