

L-谷氨酰胺、谷氨酰胺分解酶和谷氨酰胺合成酶对豚鼠 CAP 阈值的影响

孙 玉 温

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230026)

摘 要

本文用负直流电 $300\mu\text{A}$ ($-\text{DC}300\mu\text{A}$) 刺激豚鼠耳蜗圆窗, 耗尽耳蜗突触前毛细胞内递质, 然后分别用 L-谷氨酰胺、谷氨酰胺分解酶和谷氨酰胺合成酶灌流鼓阶。结果表明, 谷氨酰胺灌流后, 耳蜗神经的 CAP 阈值明显提高, 并使电刺激耳蜗圆窗所导致的 CAP 阈值的升高加速恢复。用谷氨酰胺合成酶灌流耳蜗鼓阶后能提高 CAP 阈值 50dB, 而用谷氨酰胺分解酶灌流则对 CAP 阈值影响很小。该结果提示 L-谷氨酰胺可能为豚鼠耳蜗兴奋性传入递质的候选者。

关键词: L-谷氨酰胺, 谷氨酰胺分解酶, 谷氨酰胺合成酶, CAP 阈值

耳蜗感觉毛细胞与耳蜗内一级听神经元之间的传入突触为化学传递^[1]。然而, 耳蜗传入递质为何物迄今未知^[2-5]。据已有的研究表明 L-谷氨酸和天冬氨酸在 Corti 氏器内的含量较耳蜗其他部位高^[6], 故提出 L-谷氨酸及其有关化合物可能为耳蜗传入突触的神经递质^[3,4,7,8]。支持这种观点的事实是当用 L-谷氨酸和天冬氨酸灌流豚鼠和猫的耳蜗鼓阶时, 能够抑制耳蜗神经的诱发动作电位和增加听传入神经节细胞的自发发放率^[4,7]。但所需浓度较高, 非生理学用量。众所周知, L-谷氨酰胺是谷氨酸的重要化合物, 它可在谷氨酰胺合成酶的催化下由 L-谷氨酸和氨合成。在大脑皮层和视网膜内都能合成谷氨酰胺^[9,10]。而谷氨酰胺在脑脊液的含量高出其他氨基酸 10—100 倍^[11], Eybalin 等^[12]用放射自显影方法研究了 [^3H] L-谷氨酰胺和 [^3H] L-谷氨酸在豚鼠耳蜗内的摄取情况, 发现 [^3H] L-谷氨酰胺主要是被内毛细胞所摄取。谷氨酰胺主要被耳蜗内毛细胞摄取的事实, 意味着谷氨酰胺在耳蜗传入突触的传递过程中起着重要的作用。本文拟通过圆窗负直流电刺激, 耗尽内源性递质, 以谷氨酰胺及其有关酶灌流耳蜗, 观察其对耳蜗神经 CAP 阈值和对 $-\text{DC}$ 刺激后 CAP 阈值恢复时间的影响, 试图探讨 L-谷氨酰胺在耳蜗内可能的作用。

一、实验方法

实验动物为 68 只体重 150—290g 的健康豚鼠, 用戊基巴比妥钠麻醉 (30mg/kg), 腹腔

内注射, 每两小时补充注射 Innovar-vet(0.5ml/kg)。麻醉前皮下注射阿托平 (0.65mg/kg)。按常规做气管插管施人工呼吸 (5%CO₂ 和 95%O₂)。以空心耳杆固定动物, 并用可控温热毯, 维持动物体温在 38℃。除去动物右侧外耳, 并将空心耳杆插入外耳道。在背外侧打开右侧听泡, 以暴露耳蜗。用绝缘细银丝做引导电极, 置于右侧耳蜗圆窗附近骨缘 (图 1), 记录耳蜗神经对短纯音 (tone burst) (上升和下降时间为 1ms, 持续时间为 20ms) 反应的阈值, 纯音频率为 2—20kHz。参考电极置于颈部肌肉。纯音通过塑料管递送至空心耳杆, 前者连接到 Beyer DT40 耳机。

在耳蜗底圈鼓阶钻一小孔 (直径 30μm), 通过听泡后外侧孔暴露耳蜗尖端, 用纤细探针在耳蜗尖端钻一小孔, 作为灌流液的流出口。每次钻孔后均要测量实验动物的听阈, 以监视耳蜗机能状态, 如图 2 所示。

用玻璃毛细管拉制成微灌流管, 充以灌流液, 用微操纵器插入耳蜗底圈鼓阶小孔, 通过塑料管连接电子微量泵, 进行灌流, 灌流速率为 2—3 μl/min。用软纸做成一个纸蕊, 从听泡后外侧孔插入听泡腔, 将耳蜗尖端流出液吸去, 保持听泡腔内干燥。

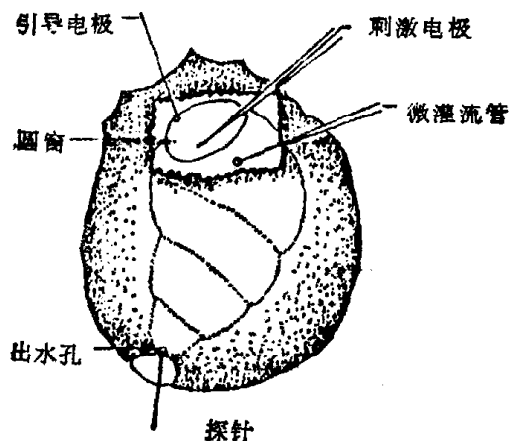


图 1 记录、刺激和灌流的示意图

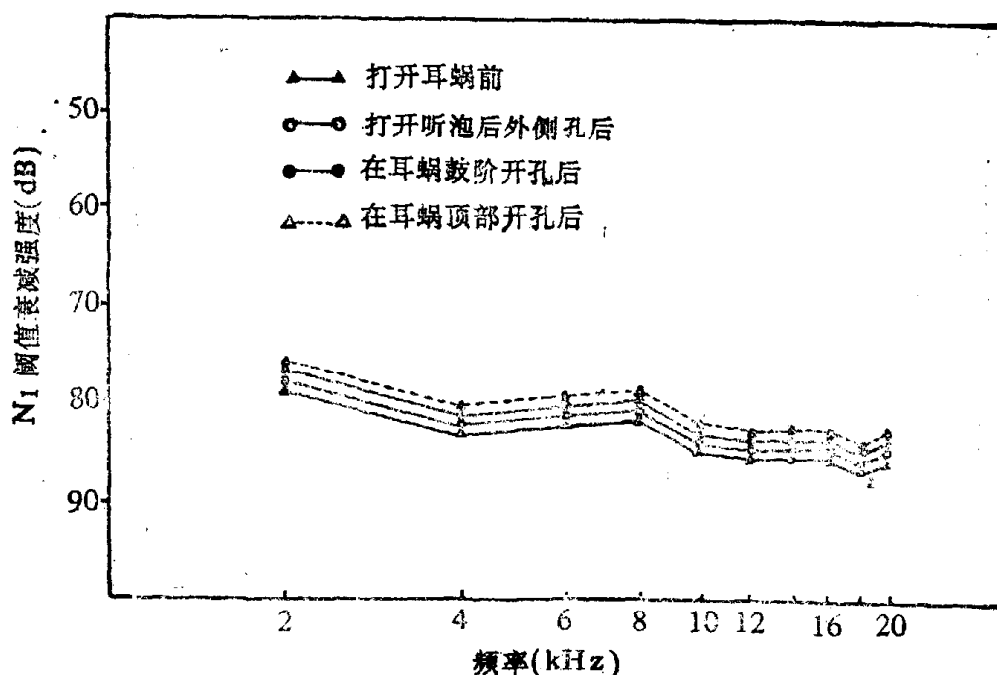


图 2 每步手术后 2—20kHz 的纯音 CAP(N₁) 听阈图

实验溶液为人工外淋巴液加入欲观察的物质, 在实验当天早晨配制, pH 值为 7.3。谷氨酰胺分解酶和谷氨酰胺合成酶为美国 SIGMA 化学公司出品, 实验前配制后立刻放置在冰箱的干冰中冷冻备用。

耳蜗圆窗负直流电刺激由直流电刺激器 (Digitimer, Model DS9A) 发出。用玻璃微电

极充以 0.9% NaCl, 作为刺激电极置于圆窗, 回流电极置于颈部肌肉。

负直流电强度为 $300\mu\text{A}$, 刺激持续时间为 5min。负电流刺激耳蜗圆窗后立刻测量 18kHz 的耳蜗神经动作电位的阈值, 还有部分实验是用负电流 $300\mu\text{A}$ 刺激圆窗 5min 后, 立刻用 10 mmol/L 谷氨酸胺灌流耳蜗; 在对照实验中立刻用人工外淋巴液灌流, 灌流 5min 后连续测量 18kHz 短纯音的耳蜗神经动作电位的反应阈值。

二、结 果

1. L-谷氨酸胺对短纯音引起的耳蜗神经动作电位阈值的影响

用 1mmol/L 谷氨酸胺以 $2-3\mu\text{l}/\text{min}$ 的速率, 灌流耳蜗鼓阶 5min, 灌流停止后, 立刻测量 CAP 阈值。结果表明, 在 18kHz CAP 阈值对短纯音的反应平均提高 20dB, 图 3-1 表明 18kHz 的耳蜗神经动作电位阈值在灌流停止后 5min 完全恢复。另外一些实验例用 5 和 10 mmol/L 谷氨酸胺分别灌流耳蜗, 同样可提高 CAP 阈值, 用 5mmol/L 谷氨酸胺灌流耳蜗, 18 kHz CAP 阈值最大提高 37dB, 18kHz 的 CAP 阈值在灌流停止后 13min 完全恢复, 如图 3-2 所示。用 10mmol/L 谷氨酸胺灌流耳蜗, CAP 阈值平均提高 41dB, CAP 阈值大约在 17 min 后完全恢复到正常水平(图 3-3)。在对照实验中用人工外淋巴液灌流耳蜗, CAP 阈值不受影响, $p < 0.01$ 。

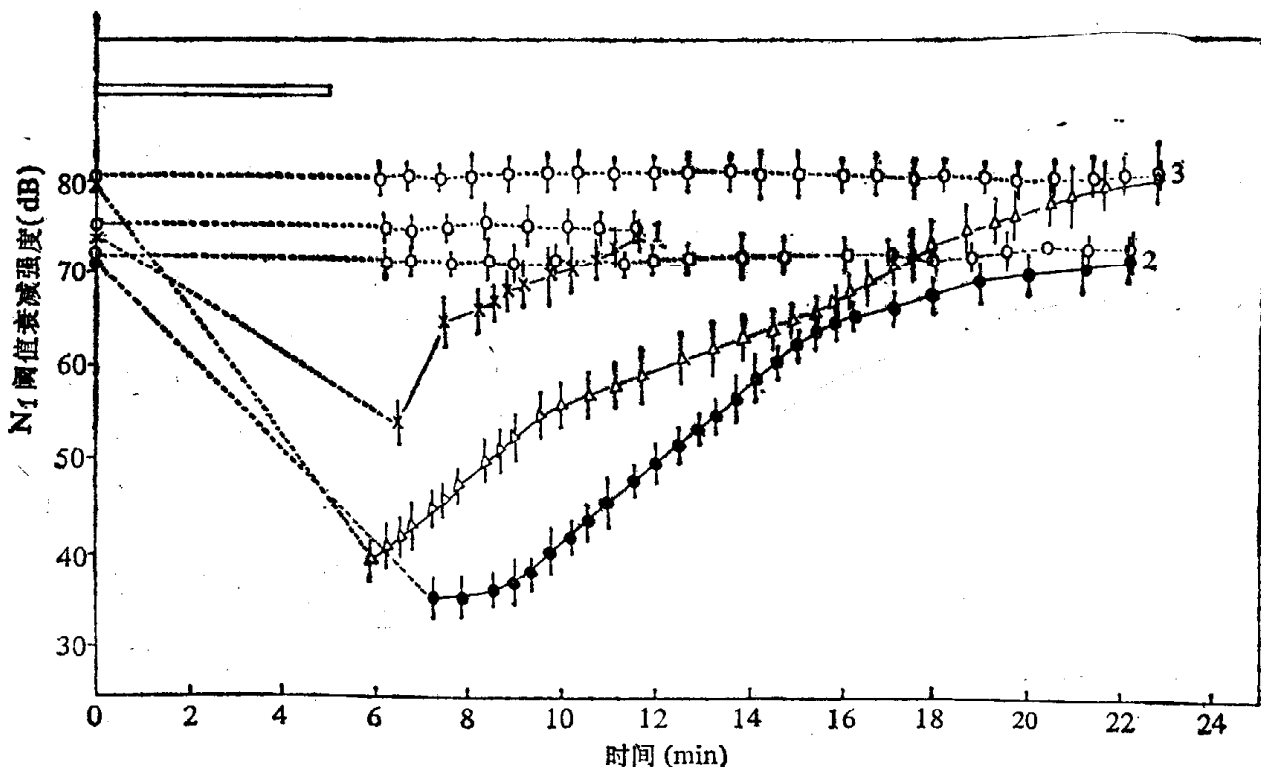


图 3 谷氨酸胺对短纯音引起的 CAP 阈值的影响

- (1——1mmol/L 谷氨酸胺灌流后对 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的影响,
2——5mmol 谷氨酸胺灌流后对 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的影响,
3——10mmol/L 谷氨酸胺灌流后对 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的影响。
图上方横棒代表灌流持续的时间)

2 圆窗负直流电刺激对 18kHz 纯音的 CAP 阈值的影响

8 例实验结果表明, 以一 DC 刺激圆窗 ($300\mu\text{A}$, 5min), 18kHz CAP 阈值平均提高 50

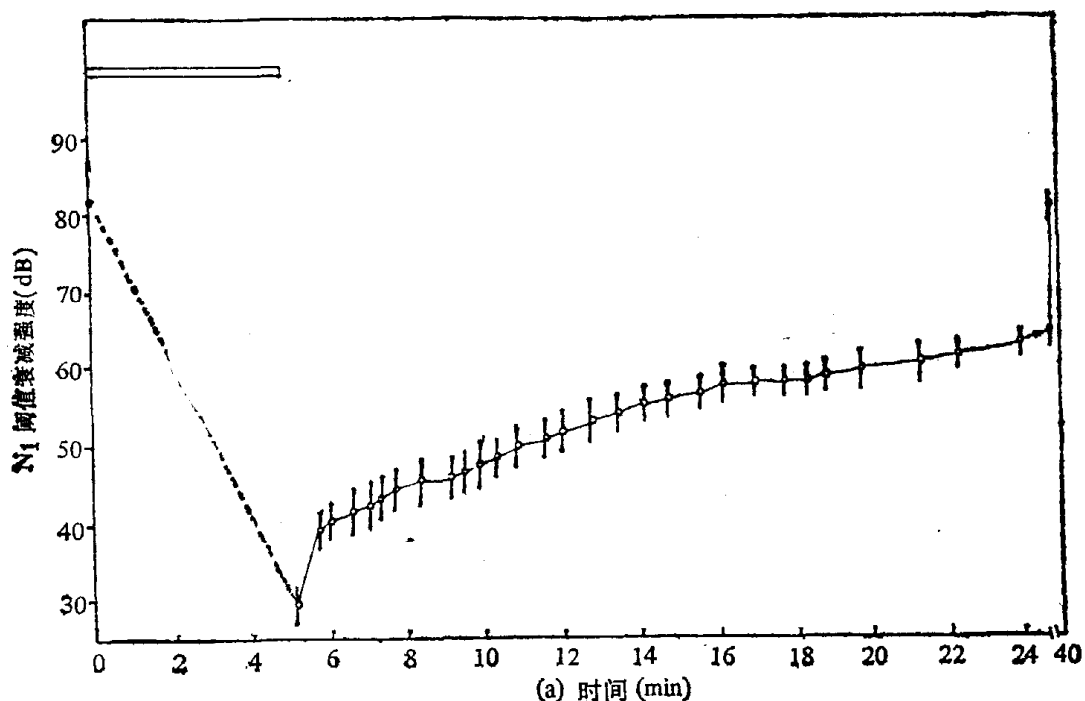


图 4(a) 表示以 $-DC300\mu A$ 刺激圆窗后 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的恢复周期
(图上方的横棒代表负直流电持续的时间)

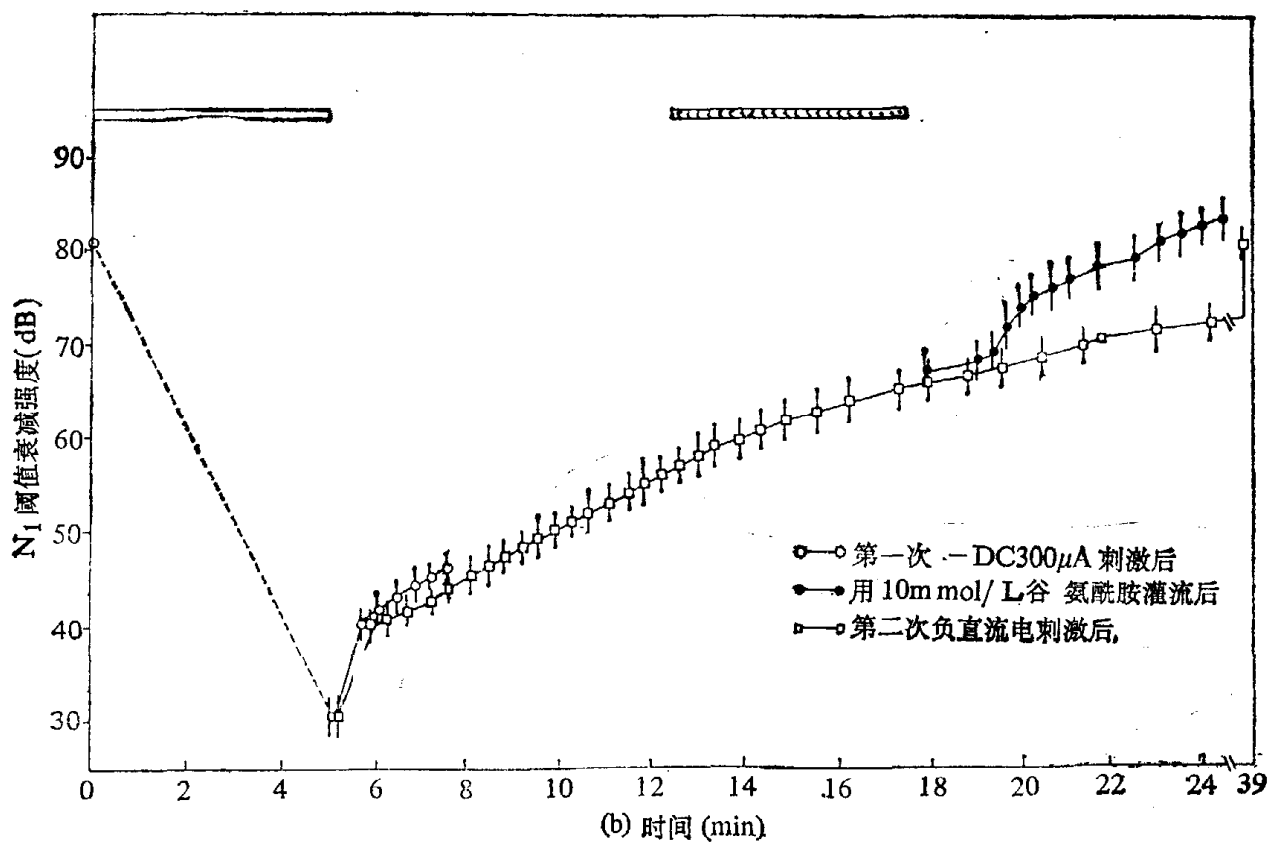


图 4(b) 表示负直流电刺激后,立刻灌以 10mmol/L 谷氨酰胺对 18kHz 纯音
CAP(N_1) 阈值恢复周期的影响
(CAP(N_1) 阈值达到完全恢复只需 5—6min)

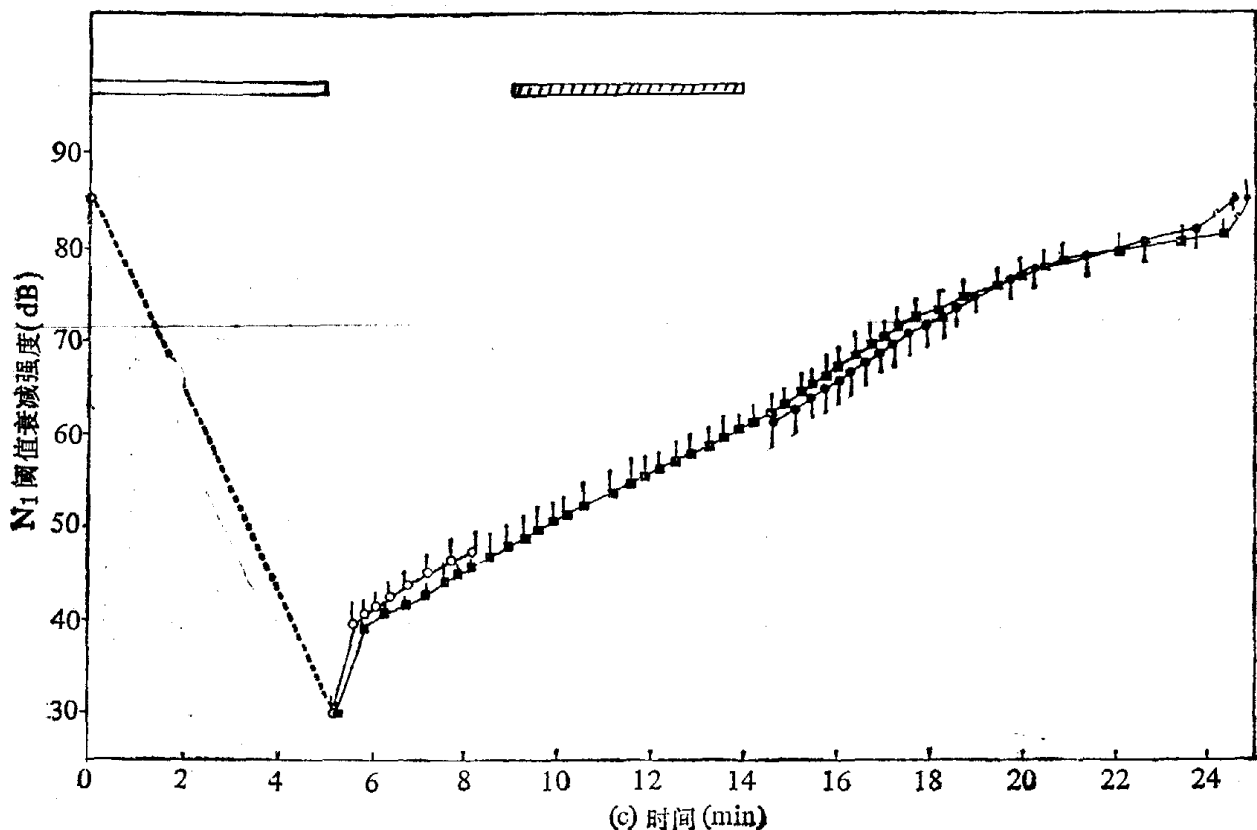


图 4(c) 表示用负电流 $300\mu\text{A}$ 刺激圆窗 5min 后,立刻灌流人工外淋巴液对 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的恢复周期的影响

((○)第一次电刺激; (●)电刺激后立刻灌流人工外淋巴液, CAP(N_1) 在 22min 内完全恢复; (■)在灌流人工外淋巴液 CAP(N_1) 阈值完全恢复后,第二次电刺激后 CAP(N_1) 阈值在 25min 内恢复)

dB, 刺激停止后 17—39min 内, CAP 阈值完全恢复到刺激前水平(图 4(a)). 结果表明对 8kHz 以下的短纯音的反应, CAP 阈值提高较小,但 8kHz 以上纯音明显提高 CAP 阈值. 这些结果与早期直流电刺激猫耳蜗圆窗^[43]所得结果一致.

3. L-谷氨酰胺对—DC 刺激圆窗后 CAP 阈值恢复时间的影响

在这些实验中,用—DC $300\mu\text{A}$ 刺激圆窗 5min, 然后立刻以 10mmol/L L-谷氨酰胺灌流耳蜗, 结果表明, 负直流电刺激耳蜗圆窗后的恢复时间明显缩短, 只需 5—6min 即恢复到刺激前水平. 若只以负直流电刺激圆窗, 18kHz CAP 阈值恢复时间平均为 17—39min. 然而负直流电刺激圆窗后, 立即再以 10mmol/L 谷氨酰胺灌流耳蜗, 18kHz CAP 阈值恢复时间缩短 12—33min. 但在对照实验中进行同样刺激后再立即以人工外淋巴液灌流耳蜗, 18kHz CAP 阈值则不受影响, $p < 0.01$.

4. L-谷氨酰胺合成酶和分解酶对 CAP 阈值的影响

在人工外淋巴液中加入谷氨酰胺合成酶 (25 单位/ $1\mu\text{l}$), 以 $2\text{—}3\mu\text{l/min}$ 的速率灌流 5min. 结果表明, 18kHz 短纯音引起的 CAP 阈值立刻提高, 平均提高 50dB, 之后又逐渐恢复到灌流前水平(如图 5 所示), 完全恢复需 42min. 在对照实验中灌以人工外淋巴液对 18kHz CAP 阈值则无影响, $p < 0.001$.

另一些实验例在人工外淋巴液中加入 L-谷氨酰胺分解酶 (25 单位/ μl), 同样以 $2\text{—}3\mu\text{l/}$

min 的速率灌注耳蜗。结果表明, 18kHz CAP 阈值平均仅提高 10—13dB, 最大提高阈值出现在灌注后 5min, CAP 阈值完全恢复需 10min, 在对照实验中则无影响(如图 5)。

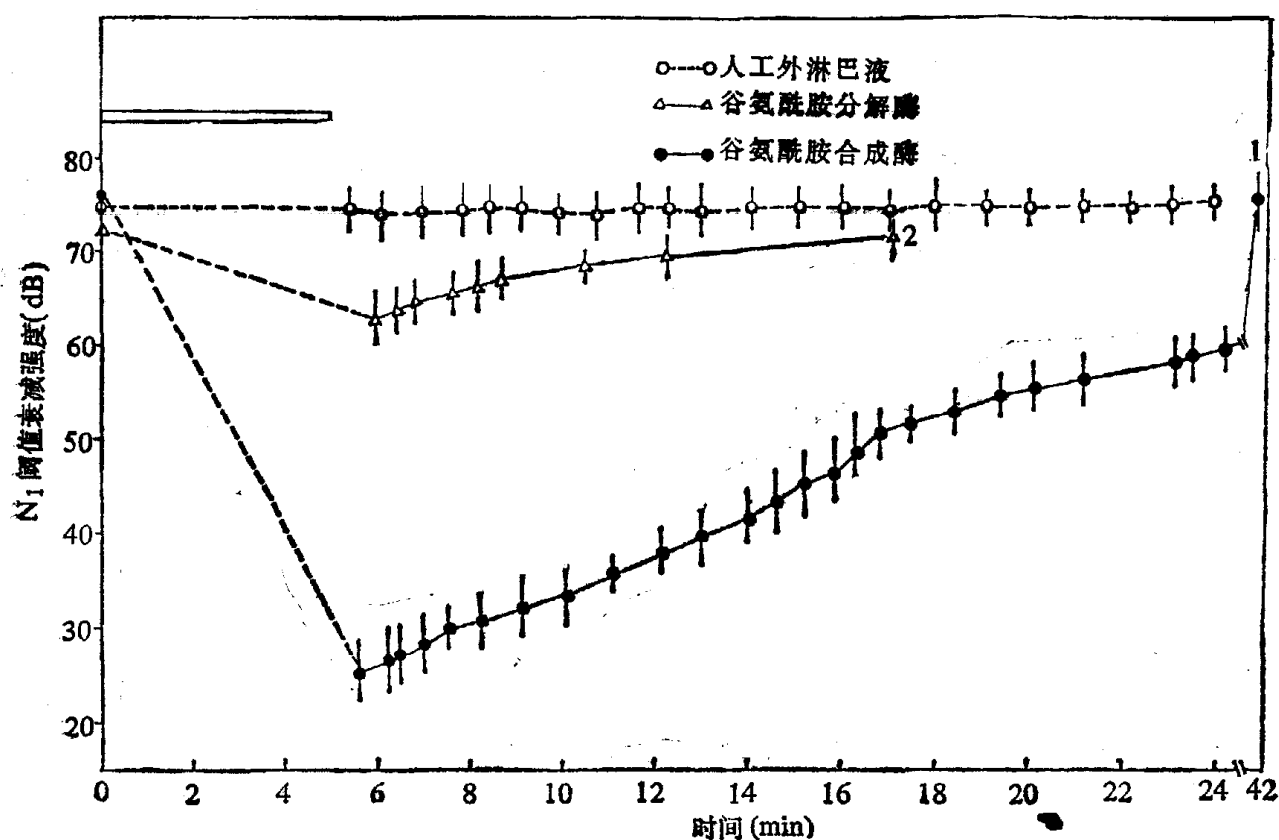


图5 L-谷氨酰胺合成酶和分解酶对 CAP 阈值的影响

(1——表示用谷氨酰胺合成酶(25单位/ μ l)灌注后对 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的影响, 灌注后 CAP(N_1) 阈值提高 50dB, 在 42min 内恢复到正常值; 2——表示用谷氨酰胺分解酶(25单位/ μ l)灌注对 18kHz 纯音 CAP(N_1) 阈值的影响, 而用人工外淋巴液灌注对 CAP(N_1) 阈值则无影响)

三、讨 论

用 L-谷氨酰胺灌注耳蜗所得实验结果与 Bobbin^[3,4] 以及 Comis 等^[8] 用 L-谷氨酸灌注耳蜗的实验结果表明, L-谷氨酰胺对 CAP 阈值的提高更有效。在该实验中以 1mmol/L L-谷氨酰胺灌注豚鼠耳蜗鼓阶平均提高 18kHz CAP 阈值 20dB。同样, 以 5mmol/L L-谷氨酰胺灌注, 可使 18kHz CAP 阈值平均提高 37dB。

Bobbin^[3] 报道用 1mmol/L L-谷氨酸灌注耳蜗, 对耳蜗神经动作电位影响极小, 用浓度 10, 25 和 50mmol/L L-谷氨酸灌注耳蜗, 发现仅 50mmol/L L-谷氨酸较大地增加神经发放率^[4]。Comis 等也指出 1mmol/L L-谷氨酸对 CAP 影响很小。这些事实指出, L-谷氨酰胺可能为一种强去极化因子, 使内毛细胞去极化, L-谷氨酰胺可能为内毛细胞和传入突触之间的递质候选者。

前人研究指出耳蜗圆窗负电流刺激可能导致耳蜗毛细胞去极化^[13], 同时在一 DC 刺激下, 长时间的不间断的递质释放可使毛细胞递质排空^[14]。因此, 负电流刺激后的恢复时间显著延长, 平均为 17—39min。CAP 阈值恢复时间在负电流刺激后显著延长, 可能反应毛细胞递质

的再摄取和再合成所需的时间^[13]。但在负电流刺激后立刻以 10mmol/L L-谷氨酰胺灌流耳蜗,结果表明,L-谷氨酰胺加速 CAP 阈值的恢复,平均只需 5—6min 即可恢复到刺激前的水平,缩短了 12—33min。这可能由于 L-谷氨酰胺补充了细胞外递质物质所致。

众所周知,L-谷氨酰胺为哺乳类组织细胞的成分,它是在谷氨酰胺合成酶的催化下,由氨和谷氨酸合成。放射性自显影研究指出,谷氨酰胺优先标记在内毛细胞,并着重标记内毛细胞顶端及内毛细胞基部和神经末梢之间。谷氨酰胺合成酶可能位于靠近传入突触毛细胞或支持细胞的细胞膜上^[14]。Eybalin 等^[15]用放射自显影研究指出内毛细胞主要被 [³H] 谷氨酰胺标记,并指出标记的谷氨酰胺可由标记的 [³H] 谷氨酸合成。或许,在耳蜗内谷氨酰胺亦如在脑和视网膜内,可能在内毛细胞周围的细胞由谷氨酰胺合成酶催化形成^[10,16]。

用谷氨酰胺合成酶灌流耳蜗后,明显提高耳蜗神经的 CAP 阈值,这可能是由于增加了耳蜗内谷氨酰胺的合成,提高了耳蜗内 L-谷氨酰胺的含量,因而导致耳蜗神经的 CAP 阈值的提高。这种效应相似于直接用 L-谷氨酰胺灌流耳蜗。

Bradford 等^[11]指出,脑组织的突触体微粒中含有大量的谷氨酰胺分解酶。Fex 等 1985 年报道,在内毛细胞的听神经树突中存在着谷氨酰胺分解酶样免疫反应活动^[17]。Gregory 等于 1986 年发现大白鼠耳蜗内的听神经外周树状突起和内毛细胞区域内存在着很高的谷氨酰胺分解酶的活动^[18]。众所周知,谷氨酰胺分解酶能够催化谷氨酰胺形成谷氨酸和氨。将谷氨酰胺分解酶以每微升 25 单位灌流耳蜗。实验结果表明,仅能较小地提高 CAP 阈值(对 18kHz 纯音最大提高 13dB,在 8min 内即可恢复)。这可能是由于耳蜗内的谷氨酰胺,在用谷氨酰胺分解酶灌流耳蜗后,被水解成为谷氨酸和氨,而少量的谷氨酸对 CAP 阈值的影响很小。

谷氨酰胺和谷氨酰胺合成酶灌流耳蜗后,明显提高 CAP 阈值。这些实验结果支持 L-谷氨酰胺可能是豚鼠耳蜗传入突触递质的候选者。

实验结果表明,L-谷氨酰胺比L-谷氨酸能更有效地提高 CAP 阈值。同时,L-谷氨酰胺在耳蜗圆窗负直流电刺激后,耳蜗内毛细胞持续去极化,导致神经递质的排空,但此刻立即灌流 L-谷氨酰胺,明显加速 CAP 阈值的恢复。这可能是补充了内毛细胞排空后的递质,故能加速 CAP 阈值的恢复。综上所述,根据前人研究和这些实验结果进一步提示,可能 L-谷氨酰胺在耳蜗内毛细胞周围的细胞内,被谷氨酰胺合成酶从谷氨酸和氨合成,然后由内毛细胞摄取,当毛细胞兴奋并去极化时,释放谷氨酰胺,兴奋过后,在突触间隙存留的谷氨酰胺微粒,随即由存在于内毛细胞的听神经树突中的谷氨酰胺分解酶水解,于是谷氨酰胺迅速从其作用位点移去,而由谷氨酰胺水解释放的谷氨酸和氨可能由内毛细胞周围的细胞重新摄取,并在谷氨酰胺合成酶的作用下,再次转变成谷氨酰胺。谷氨酰胺分解酶可能类似胆碱酯酶在胆碱能神经纤维的作用。

该实验结果支持 L-谷氨酸及其有关化合物可能为耳蜗传入突触的递质。L-谷氨酰胺是 L-谷氨酸重要的有关化合物。实验结果表明,L-谷氨酰胺对耳蜗神经 CAP 阈值的影响较 L-谷氨酸的影响要强,L-谷氨酰胺可能是耳蜗传入突触递质的候选者。

参 考 文 献

- [1] Guth, P. S., Norris, S. H. & Bobbin, R. P., *Pharmac. Rev.*, 28(1976), 95—115.
- [2] Flock, A. & Lam, D. M. K., *Nature (Lond)*, 249 (1974), 142—144.
- [3] Bobbin, R. P. & Thompson, M. H., *Ann. Otol. Rhinol. Lar.*, 87(1978), 185—190.

- [4] Bobbin, R. P., *Exp. Brain Res.*, 34(1979), 389—393.
- [5] Klinke, R., *Hearing Res.*, 22(1986), 235—243.
- [6] Godfrey, D. A. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 24(1976), 468—470.
- [7] Klinke, R. & Oertel, W., *Expl Brain Res.*, 30(1977), 145—146.
- [8] Comis, S. D. & Leng, G., *ibid.*, 36(1979), 119—128.
- [9] Krebs, H., *Glutamine Metabolism Enzymology and Regulation*, Academic Press, New York, 1980, 319—329.
- [10] Ripee, R. E. & Norenburg, M. D., *Nature*, 268(1977), 654—655. p
- [11] Bradford, H. F. & Ward, H. K., *Brain Res.*, 110(1976), 115—125.
- [12] Eybalin, M. & Pujol, R., *Neuroscience*, 9(1983), 863—871.
- [13] Schreiner, C. E. et al., *Hearing Res.*, 21(1986), 213—226.
- [14] Smith, R. L. & Brachman, M. L., *Biol. Cybern.*, 44(1982), 107—120.
- [15] Allenf, R. & Schwartz, I., *Brain Res.*, 290 (1984), 376—379.
- [16] Norenberg, M. D. & Martinez-hernandez, A., *Brain Res.*, 161 (1979), 303—310.
- [17] Fex, J. et al., *Hearing Res.*, 17(1985) 101—103.
- [18] Gregory, et l., *ibid.*, 24(1986), 137—150.