GABA 牛磺酸和 pH 值影响蝌蚪耐缺氧能力的研究

王 莉. 樊瑞军2. 魏智清3

(1.宁夏医学院药检系,宁夏 银川 750021; 2.宁夏回族自治区人民医院检验科,宁夏 银川 750021; 3.宁夏大学生命科学学院,宁夏 银川 750021)

摘要: 在水中溶解氧一定的条件下,将蝌蚪放入 $50\,\mathrm{mL}$ 密闭三角瓶内,观察不同质量分数的牛磺酸、 GA BA 以及水体不同 pH 值对蝌蚪耐缺氧能力的影响。结果显示,质量分数为 0 4% 的 GA BA 水溶液对蝌蚪耐缺氧能力有极显著改善 $(P < 0\ 01)$, 0 3% 的 GA BA 对蝌蚪耐缺氧能力有显著改善 $(P < 0\ 05)$ 。0 3% 的牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力有极显著改善 $(P < 0\ 01)$, 0 1%、0 2%、0 4%、0 5% 的牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力有显著改善 $(P < 0\ 05)$ 。 实验证明, GABA 、牛磺酸均可提高蝌蚪的耐缺氧能力。而 0 2%的 β — 丙氨酸可明显减弱牛磺酸的耐缺氧能力。pH 值为 5 4 8 0时可极显著减弱蝌蚪的耐缺氧能力 $(P < 0\ 01)$,pH 值为 7.2,7 7时可显著减弱蝌蚪的耐缺氧能力 $(P < 0\ 05)$ 。

关键词: GABA; 牛磺酸; pH值; 蝌蚪; 耐氧能力

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2008)02-0071-05

Y-氨基丁酸(Y- am inobutyric acid GABA)、牛 磺酸(taurine, Tau)均属于非蛋白氨基酸,普遍存在 干动物体内。牛磺酸又称牛胆素, 化学名称为 2-氨基乙磺酸(其结构式为 H₂N - CH₂ - CH₂ -SO₃H), 是正常存在于动物体内的含硫氨基酸, 有着 广泛的生理药理作用(杨平伟和杨祖英, 1997),其 分子量小, 无抗原性, 各种给药途径均易吸收。 β -丙氨酸 (β – alan in e)是牛磺酸转运体 (Tau transporter Tau-T)的抑制剂,它与 Tau-T竞争性地结合, 从而抑制牛磺酸的转运,降低内源性牛磺酸的含量。 实验证明牛磺酸具有广泛的心肌保护作用,如保护 缺氧缺血心肌、保护心肌细胞膜等(丁力和万华印、 1995,林静和康毅, 1998)。现在人们已经普遍认为 牛磺酸是调节正常生理功能的重要物质。GABA的 结构式为 H₂N - CH₂ - (CH₂)₂ - COOH, 由谷氨酸 在谷氨酸脱羧酶的催化下转化而成,并与 GA BAA、 GABAB、GABAC 受体结合后发挥作用 (林静和康毅, 1998)。研究表明、GABA作为中枢神经中一种重要 的抑制性神经递质起作用, 它是多种生理活动和病 理过程的重要影响因素,是一种重要的抑制性保护 物质(甘平等, 2004)。

在水产养殖中,经常发生由于水中溶氧低于水产动物呼吸需要的情况,此时呼吸作用就会受到抑

制,甚至窒息死亡。蝌蚪是变温动物,盛夏季节由于水温升高,水中氧气的溶解度降低,同时高温还使血红蛋白与氧的亲合力变小,双重因素导致蝌蚪缺氧,影响其生存。另外,水体 pH值的改变也可能影响蝌蚪的耐缺氧能力。近年来,有学者以鲫、泥鳅、青鱂等为研究对象,证明牛磺酸、GABA可以提其耐缺氧能力(邱小琮等,2006,魏智清等,2006,魏智清,2006b)。但牛磺酸、GABA以及水体 pH值的改变是否会影响两栖类动物的耐缺氧能力,还缺少报道。因而,本实验以蝌蚪对此进行研究和探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料及药品

实验动物为花背蟾蜍 (Bufo raddei)的蝌蚪 (tadpoles), 采于宁夏银川市西夏区一水塘, 实验前在室内用曝气处理自来水暂养 7 d, 用煮熟的鸡蛋黄喂养。选择大小一致、体重相近、游动正常的健康蝌蚪进行实验。 蝌蚪生活水体温度均为 (20 0 \pm 1.5) $\mathbb C$ 。牛磺酸 (批号 20021024)、 β – 丙氨酸 (批号 20020906)、GABA (批号 20040629)均为中国医药集团上海化学试剂公司产品。

12 实验方法

1.2.1 牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力的影响 用 50 mL三角瓶,对照组装满自来水,实验组分别加入质量分数为 0.05%、0 1%、0 2%、0 3%、0 4%、0.5%的牛磺酸,各组分别放入 5只蝌蚪。各三角瓶分别用塑料膜封口,使瓶内不留气泡,然后倒置于盛有水的盘子里,观察各瓶中蝌蚪的死亡时间,以探讨

收稿日期: 2007- 07- 03

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0715)。

作者简介: 王莉, 1978年生, 女,陕西宝鸡人,助理实验师,主要

从事动物集理学家验研究。Academic Journal Electronic Publishing Flowse: 美国观察首和中野野的北京即即,允许到

牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力的影响。本实验重复 3 次。

将蝌蚪置于质量分数为 0.2% 的 β – 丙氨酸自来水溶液中处理 96 h 以耗竭蝌蚪本身内源的牛磺酸,对照组装满自来水并放入 5 只未经处理的蝌蚪,实验 1 组装满自来水并放入 5 只经 0.2% 的 β – 丙氨酸自来水溶液处理的蝌蚪,实验 2 组装满 0.4% 的牛磺酸自来水溶液并放入 5 只未经处理的蝌蚪,实验 3 组装满 0.4% 的牛磺酸自来水溶液并放入 5 只经 0.2% 的 β – 丙氨酸自来水溶液处理的蝌蚪,进行密闭缺氧实验,以探讨 β – 丙氨酸对蝌蚪耐缺氧能力的影响。本实验重复 3 次。

1.2.2 GABA 对蝌蚪耐缺氧能力的影响 用 50 mL三角瓶,对照组装满自来水,实验组分别加入质量分数为 0.05%、0 1%、0 2%、0.3%、0 4%、0.5%的 GABA,各组分别放入 5 只蝌蚪,各三角瓶分别用塑料膜封口,使瓶内不留气泡,然后倒置于盛有水的盘子里,观察各瓶中蝌蚪的死亡时间,进行密闭缺氧实验,以探讨 GABA 对蝌蚪耐缺氧能力的影响。本实验重复 3次。

1.23 pH 值对蝌蚪耐缺氧能力影响的实验 用 50 mL三角瓶, 对照组装满 pH 值为 6.7的自来水, 实验组分别加入用盐酸调配的 pH 值为 5.4.5.8 6.2及用 N aOH 调配的 pH 值为 7.2.7.7.8 0的自来水溶液, 各组三角瓶分别放入 5只蝌蚪, 进行密闭缺氧实验, 以探讨水体不同 pH 值对蝌蚪耐缺氧能力的影响。本实验重复 3次。

13 数据处理

观察数据均以 $x \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析 LSD法。表 $1 \sim$ 表 4中所列数据,同一列数字右侧小写字母相同者表示差异不显著 (P > 0 05),不同者表示差异显著 (P < 0 05);同一列数字右侧大写字母相同者表示差异不显著 (P > 0 05),不同者表示差异极显著 (P < 0 01)。

2 结果

2 1 实验观察

蝌蚪在密闭缺氧条件下,起初游动正常,随后渐渐失去平衡,游动减缓,有的长时间停在水下,偶尔上下游动。一段时间后蝌蚪逐渐丧失游动能力,仅有口、鳃不断开闭,最后死亡。死亡时口和鳃盖张开,部分个体蜷缩。

2 2 牛磺酸对蝌蚪耐氧能力的影响

对体长(2.7±0.1) cm,体重(0.23±0.01) g的。

蝌蚪进行牛磺酸耐氧能力的影响实验结果如表 1所示。与对照组相比,不同质量分数的牛磺酸水溶液均可延长蝌蚪平均存活时间,0.3%的牛磺酸水溶液对蝌蚪耐缺氧能力有极显著影响 (P < 0.01), 0.1%、0.2%、0.4%、0.5%的牛磺酸水溶液对蝌蚪耐缺氧能力有显著影响 (P < 0.05)。

表 1 牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力的影响

Tab 1 The effect of taurine on anti- anoxia abilities of tadpoles

	组别 Group	生活水体 Living en vironm ent	平均存活 时间 /m in	差异显著性 Significance	
			A verage alive time	$\alpha = 0.05$	
	对照组	自来水	61 0±10 0	b	В
	实验 1组	0 05% 牛磺酸	66 8±13. 2	ab	AB
	实验 2组	0 1% 牛磺酸	74 4±14.4	a	AB
	实验 3组	0 2% 牛磺酸	75 6±15.6	a	AB
	实验 4组	0 3% 牛磺酸	79 6±11.6	a	A
	实验 5组	0 4% 牛磺酸	77. 8±11. 8	a	AB
_	实验 6组	0 5% 牛磺酸	76 4±16.4	a	AB

蝌蚪体长 (2.8 ± 0.1) cm, 体重 (0.38 ± 0.01) g 经 0.2% β – 丙氨酸溶液处理后, 实验 1 组蝌蚪耐缺氧存活时间已低于未经处理的对照组 (P<0.01), 说明 β – 丙氨酸已部分耗竭了蝌蚪的内源牛磺酸,降低了其耐缺氧能力; 而补充外源牛磺酸后, 蝌蚪的耐缺氧能力又得到了提高。结果见表 2.

表 2 0 2% β – 丙氨酸预处理及补充牛磺酸 对蝌蚪耐缺氧能力的影响

Tab 2 The effect of 0. $2\% \beta$ – A lanine pre-tream ent and complementary of taurine

on anti- anoxia abilities of tadpoles

	生活水体	β – 丙氨酸	平均存活	差异.	显著性
组别		预处理	时间/min	S ign	ificance
G roup	Living en vironm ent	β – A lan ine	A verage	$\alpha = 0 0$	$5 \alpha = 0 01$
	environment	pre tre alm ent	alive time		
对照组	自来水	否	66 4 ±5. 6	b	В
实验 1组	自来水	是	52 6 ±4. 4	\mathbf{c}	C
实验 2组	0 4% 牛磺酮		80 2±13.8	a	A
实验 3组	0 4% 牛磺酮	发 是	66 0 ±5. 0	$_{\mathrm{bc}}$	BC

2 3 GABA 对蝌蚪耐缺氧能力的影响

蝌蚪体长 (3.4 ± 0.1) cm、体重 (0.39 ± 0.01) g 与对照组相比,不同质量分数的 GABA 水溶液均可延长蝌蚪平均存活时间, 0.4% GABA 溶液对蝌蚪耐缺氧能力有极显著影响 (P<0.01), 0.3%的 GABA 水溶液对蝌蚪耐缺氧能力有显著影响 (P<0.05)。结果如表 3所示。

2 4 pH值对蝌蚪耐缺氧能力的影响

实验蝌蚪体长 (2.7 ±0 1) cm 体重 (0.23 ±

0.01) g. 不同 pH值的水溶液对蝌蚪耐缺氧能力的影响不同, pH 5 4和 pH 8 0的水溶液使蝌蚪平均存活时间极显著缩短 (P < 0.01), pH 7.2 pH 7.7的水溶液使蝌蚪平均存活时间显著缩短 (P < 0.05)。结果如表 4所示。

表 3 GABA对蝌蚪耐缺氧能力的影响

Tab 3 The effects of GABA on anti- anoxia abilities of tadpoles

组别	生活水体	平均存活 时间 /m in	差异显 Signif	a著性 Ficance
G roup	Living environment	Average alive time	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
对照组	自来水	55. 2±8 8	b	В
实验 1组	0. 05% GABA	65. 2±21 8	ab	AB
实验 2组	0. 1% GABA	65. 4±13 6	ab	AB
实验 3组	0. 2% GABA	67. 8±11 2	ab	AB
实验 4组	0. 3% GABA	69. $0 \pm 10 \ 0$	a	AB
实验 5组	0. 4% GABA	73. 0±11 0	a	A
实验 6组	0. <i>5</i> % GABA	61. 4±14 6	ab	AB

表 4 pH 值对蝌蚪耐缺氧能力的影响

Tab 4 The effect of pH value on anti- anox ia abilities of tadpo les

		平均存活	差异显著性	
组别	pH 值	时间/m in	Significance	
G roup	pH value	Average	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
		alive time		
对照组	6. 7	89. 2±11. 8	a	A
实验 1组	5. 4	71. 8±5 2	b	В
实验 2组	5. 8	80. 2±5 8	ab	AB
实验 3组	6. 2	85. 4±9 6	ab	AB
实验 4组	7. 2	75. 2 ± 11.2	b	AB
实验 5组	7. 7	73. 2 ± 11.8	b	AB
实验 6组	8. 0	67. 8±5 2	b	В

3 分析与讨论

脑、心肌缺氧时轻者发生细胞变性,严重者引起细胞坏死,进而导致组织代谢紊乱,机体死亡。已有报道 (Gabriel E M et al 1998),缺血期间及缺血后,胞外抑制性氨基酸 GA BA 和牛磺酸是增加的。在脑缺氧状态下,神经递质代谢紊乱是神经细胞功能丧失乃至死亡的重要原因。近年来研究发现 (赵彤等,2003),缺氧后海马细胞外谷氨酸、GA BA 等神经递质的浓度均急剧升高且维持在一定水平。其中,兴奋性氨基酸的过量释放,将对细胞产生毒性作用,这已被多数学者接受 (孙桂莲等,1998)。本实验采用密封瓶口的方法,三角瓶中水的溶氧量一定,且在相同溶氧量的条件下,随着蝌蚪对氧的消耗,CO2会从鳃排出,这样 CO2分压升高和 pH 值降低,加重缺氧程度。造成蝌蚪最后麻痹呼吸中枢而死亡。缺氧

对呼吸中枢是直接抑制,随着缺氧程度的加深而加强,直到呼吸停止。

3 1 牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力的影响

本实验证明,适当浓度的牛磺酸溶液增强蝌蚪 耐缺氧能力的效果相当明显. 尤其是 0.3% 的牛磺 酸水溶液对蝌蚪的耐缺氧能力有极显著改善。从目 前的资料分析, 牛磺酸是维持细胞功能稳态的重要 物质,具有增强细胞对缺血、缺氧的耐受力,防止多 种致病因素引起的细胞钙超载和脂质过氧化损伤的 作用。已有实验证明,牛磺酸是一种内源性细胞保 护剂,能保护血浆成分,也是维持细胞功能的重要物 质、具有调节细胞内渗透压、稳定细胞膜、维持钙离 子稳态和清除自由基等保护作用(刘雪芬和莫志 贤, 1995), 此实验充分说明了牛磺酸对缺氧损伤同 时具有保护机制。在蝌蚪通过鳃上皮进入血液的 氧、大约 98% 是以与血红蛋白结合的形式存在干红 细胞内,约2%的氧以物理性溶解态存在于血浆中。 可见,加入牛磺酸能使蝌蚪血液中的红细胞膜稳定, 可能使血红蛋白含量增加,提高其对氢的运输能力, 或在氧分压下降时提高血红蛋白与氧的亲和力, 因 而对蝌蚪的呼吸有重要作用。但牛磺酸对蝌蚪耐缺 氢能力增强作用的机理还不太清楚,还有待进一步 研究。

 β – 丙氨酸是牛磺酸转运体的抑制剂, 它与 T au – T 竞争性地结合, 从而抑制牛磺酸的转运, 降低组织牛磺酸的含量。本实验中, 经 β – 丙氨酸处理后, 蝌蚪的耐缺氧能力有所减弱, 其中 0.2% β – 丙氨酸处理组影响显著 (P < 0.05)。 β – 丙氨酸作为牛磺酸转运体的竞争性抑制剂, 使蝌蚪内源性牛磺酸下降, 减弱了其耐缺氧能力, 这说明内源性牛磺酸在蝌蚪耐缺氧方面起着重要作用。

3 2 GABA 对蝌蚪耐缺氧能力的影响

GABA同样是一种抑制性氨基酸,加入适量的GABA也能增强蝌蚪的耐缺氧能力。实验结果显示,0 4%的GABA水溶液对蝌蚪的耐缺氧能力有极显著改善。这说明了GABA对缺氧损伤具有保护作用。GABA是中枢神经系统内最重要的抑制性氨基酸递质,具有突触后抑制作用,可通过突触后膜超极化,减少离子内流,降低细胞代谢及氧消耗量等机制,使突触后神经元处于保护性抑制状态。GABA通过存在于神经后膜的GABA、GABA、GABA、GABA。GABA通过存在于神经后膜的GABA、GABA、GABA、GABA。自其它神经递质相互作用,参与动物体内多种重要的行为和生理反应的调节(林静和康毅、1998)。目前的大量研究已表明、GABA、受体介导的生物效

应在脑缺血性损伤的保护作用中起着重大作用。 GABA可提高海马脑片耐缺氧能力(赵彤等, 2003). 其机制可能与 GABA 通过 GABA、受体提高氯离子 内流有关。GABA作为体内一种重要的抑制性氨基 酸,在脑缺血时,其合成与释放均增加,与兴奋性氨 基酸、自由基等毒性物质的含量增高有关,通常认 为,抑制性氨基酸可通过多种途径对脑缺血组织起 到保护作用 (Schaller B & GrafR, 2002)。 脑缺血缺 氧后、针对兴奋性氨基酸的毒性作用、机体建立相应 的"抑制性保护"机制,这一保护性机制的建立,主 要是 GABA 的作用。秦旺华等 (2004) 研究了龟脑 的强抗氧化功能与龟类长寿的相关性问题, 认为龟 脑在缺氧条件下,可以抑制兴奋性神经递质的毒害 作用, 其机制之一是通过胞外的 GABA 浓度的持续 升高和其受体密度的相应增加,抵抗活性氧基团的 生成,并且免受其伤害。

3 3 pH 值对蝌蚪耐缺氧能力影响

nH 值对水产动物也有较显著的影响。实验结 果显示, pH 值 5 4和 pH 值 8 0时, 蝌蚪的存活时间 显著缩短。一方面, 对 值的通过影响水中物质的存 在形式和迁移过程,间接地影响水生动物,如 NH₄⁺、S₂⁻、CN⁻、HCO₃⁻ 等若转化为 NH₃、H₂S₄ HCN、CO2时,则增加了对水生动物的毒性;另一方 面, pH 值直接危害或影响水生动物, 如酸性水可使 水生动物血液 出值下降,导致载氧能力下降,使血 中氧分压变小,造成缺氧症,同时 出值降低,会刺 激蝌蚪体内释放大量兴奋性氨基酸 (EAA), 加重缺 氧程度,造成蝌蚪最后麻痹呼吸中枢而死亡(李鹄 鸣和王菊凤, 1995)。如碱性过强则会腐蚀鳃组织。 蝌蚪生活的适宜 pH 值为 6~7, 当 pH 值高于或低 于这个范围时均会影响蝌蚪的正常生活。通过本实 验的研究,证实了 GABA、牛磺酸对蝌蚪耐缺氧能力 的改善有显著影响, 水体不同 pH 值也影响蝌蚪的 耐缺氧能力。由此提示,可以通过饲喂含 GABA、牛 磺酸的饲料增加水产养殖动物体内的 GABA、牛磺 酸含量,使其顺利度过炎热的夏季以及其它缺氧时期,减少经济损失。还可以通过喷洒石灰水等方法调节水体 pH值,以改善水生动物的耐缺氧能力。参考文献:

- 丁力, 万华印. 1995. 牛磺酸对心肌细胞的保护作用与机理 [J]. 广州医药, 5(1): 3-5.
- 甘平, 杨茹, 程介士. 2004. GABA 受体在脑缺血中的作用 [J]. 中国神经科学杂志, 20(1): 78-81.
- 林静, 康毅. 1998 牛磺酸对高血脂的影响 [J]. 高血压杂志, 6 (1): 18-21.
- 刘雪芬, 莫志贤. 1995 牛磺酸对红细胞的保护作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 11(2): 190-191.
- 李鹄鸣, 王菊凤. 1995 经济蛙类生态学及养殖工程 [M]. 北京: 中国林业出版社.
- 邱小琮,赵红雪,魏智清. 2006 牛磺酸对鲫鱼密闭缺氧存活时间和血红蛋白含量的影响 [J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 19(2): 179-180, 184
- 孙桂莲, 韩玉昆, 毛健, 等. 1998 新生儿缺氧缺血性脑病脑脊液氨基酸含量的变化 [J]. 中国实用儿科志, 13(2): 85 88.
- 魏智清,杨涓,赵红雪,等. 2006a 牛磺酸、Y 氨基丁酸影响 泥鳅抗缺氧能力的实验研究 [J]. 农业科学研究, 27 (1): 39 41, 58
- 魏智清,等. 2006b. GABA、牛磺酸及枸杞子水浸液对青鳉抗缺氧能力的影响[J]. 水利渔业, 26(2): 1-3
- 杨平伟, 杨祖英. 1997 牛磺酸的生理功能及其营养作用 [J]. 中国食品卫生杂志, 9(5): 36-40
- 赵彤,等. 2003 GABA对大鼠海马脑片缺氧损伤的保护作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 19(1): 16-19.
- Gabriel EM, et al 1998 Ischemia injnjury and extracellular amino acid accumularion in hiooocampal area CA1 are not dependent upon an inract septo-hippocampl pathway[J]. Brain Res. 785: 279-286
- Schaller B & Graf R. 2002 Cerebral ischem ia blerance [J].
 Schweiz Rundsch Med Prax, 91 1639-1644.

 (责任编辑 万月华)

Effects of Taurine, GABA and DifferentW ater pH on the Anti- anoxia Abilities of Tadpoles

WANG Li, FAN Ru÷jun², WEIZh÷qing³

(1 Medical Exam Department of Ningxia Medical College, Yinchuan 750021; 2 Dept of Clinical laboratory, Ningxia Hui Autonomous People s Hospital, Yinchan 750021; 3. Life Science College of Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract: Under the condition of fixed solute oxygen in water, the effects of different concentrations of taurine, GABA and different water pH on anti- anoxia of tadpoles in the obturating 50 mL - Erlenmeyer flasks were researched. The results showed that 0.4% water solution of GABA exhibited a highly significant improvement in the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.01) while 0.3% water solution of GABA significantly in proved the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.05), 0.3% water solution of taurine extremely significantly in proved the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.01). 0.1%, 0.2%, 0.4% and 0.5% water solution of taurine significantly improved the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.05). The test indicated that GABA and taurine could increase the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.05). The test indicated that GABA and taurine could increase the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.05). The test indicated that GABA and taurine transporter) significantly reduced the anti- anoxia abilities of tadpoles (P < 0.05).

Keywords GABA; taurine, pH value, tadpoles, anti- anoxia