

# 茶氨酸提高运动能力的中枢机制

白宝丰\*

(南京体育学院运动健康科学系, 南京 210014)

**[摘要]** **目的:**建立大鼠一次性力竭游泳模型,研究茶氨酸对大鼠纹状体递质性氨基酸及谷氨酸受体蛋白含量与酪氨酸磷酸化水平的影响,从而探讨其对提高运动能力的中枢机制。**方法:**雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、茶氨酸高、中、低剂量(400, 200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组 10 只。各组大鼠适应性饲养 1 周后 ig 给药,正常对照组 ig 给予等体积生理盐水,共 30 d。第 31 天,比较各组大鼠游泳至力竭时间;断头取纹状体,高效液相色谱测定纹状体匀浆中谷氨酸(glutamic acid, Glu)、甘氨酸(glycine, Gly)、 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)与天冬氨酸(aspartic acid, ASP)含量,通过免疫印迹法与免疫沉淀法测定 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体亚基(*N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunits 2A, NR2A)蛋白含量与酪氨酸磷酸化水平。**结果:**茶氨酸有效延长大鼠游泳时间(149.4 ± 4.0), (164.7 ± 4.1) min, ( $P < 0.01$ ),高剂量茶氨酸显著提高纹状体中 Glu 含量(10 063.2 ± 359.5)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;与对照组比较,高剂量茶氨酸提高 NR2A 蛋白相对含量(134.1 ± 3.6)与酪氨酸磷酸化水平(123.2 ± 4.4, 对照组为 100, 显著降低 GABA 含量(1 881.3 ± 336.1)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与正常对照组(2 237.1 ± 198.4)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  比较,  $P < 0.05$ 。**结论:**茶氨酸能缓解急性运动导致的中枢神经系统兴奋性抑制,从而提高运动能力,机制可能与其提高兴奋性神经递质含量降低抑制性神经递质含量及提高谷氨酸受体活性有关。

**[关键词]** 茶氨酸; 运动能力; 神经中枢

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0201-04

## Effect and Mechanism of *L*-theanine on Improving Exercise Capacity in Rats

BAI Bao-feng\*

(Sport and Health Science Department in Nanjing Sport Institute, Nanjing 210014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of *L*-theanine on amino acids neurotransmitter and GluRs in rats by acute exhaustion swimming and mechanism of *L*-theanine improves exercise capacity. **Method:** SD male rats were randomly divided into high, middle and low dose (400, 200, 100 mg·kg<sup>-1</sup>, ig) groups and normal control group, ig, ( $n = 10$ , in each group). After one week, each group was started to give *L*-theanine for 30 days. The normal control group was given normal saline. On the day 31, rat exhaustive swimming time was

**[收稿日期]** 20120405(011)

**[基金项目]** 江苏高校优势学科建设工程资助项目;南京体育学院院级课题项目(YJ201104)

**[通讯作者]** \*白宝丰, 硕士, 讲师, 从事运动营养与功能性食品开发, Tel: 13770538024, E-mail: baibaof@163.com

- [4] 何家靖, 杨兆丽, 林燕芳, 等. Friend 鼠白血病病毒对 BALB/c 小鼠和 KM 小鼠的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(9): 605.
- [5] 雷萍, 关洪全, 王昊, 等. 不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 218.
- [6] 杨子峰, 洪志哲, 唐明增, 等. 白藜芦醇对小鼠艾滋病治疗作用的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 148.
- [7] 雷萍, 关洪全, 王昊, 等. 不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 218.
- [8] 陆春伟, 佟海侠, 陆美言. 急性白血病患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(11): 2230.
- [9] 展昭民, 邓来军, 韩冰虹, 等. 滋肾生血胶囊治疗急性髓系白血病的疗效机制研究[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1665.

[责任编辑] 聂淑琴]

measured. Meanwhile, Glu, Gly, GABA and Asp of corpus striatum in rats were determined by HPLC. Immunoprecipitation and immunoblotting were applied to analyze the level of NR2A and tyrosine phosphorylation. **Result:** Compared with the normal control group, swimming time in high and middle dose groups increased significantly [ (149.4 ± 4.0), (164.7 ± 4.1) min, (P < 0.01) ]. Level of Glu, NR2A, tyrosine phosphorylation showed obviously higher in high dose group than the normal control group [ (10 063.2 ± 359.5) μmol · L<sup>-1</sup>, (134.1 ± 3.6), (123.2 ± 4.4), (P < 0.05) ]. High dose group also showed lower GABA (1 881.3 ± 336.1) μmol · L<sup>-1</sup> level than normal control group (2 237.1 ± 198.4) μmol · L<sup>-1</sup> (P < 0.05). **Conclusion:** L-theanine has the effect of improving exercise capacity in rats possibly through enhancing Glu, NMDAR2A, tyrosine phosphorylation level and inhibiting the synthesis or secretion of GABA in brain.

[ **Key words** ] L-theanine; exercise capacity; nerve center

茶氨酸为茶叶中具有重要生理活性的次级代谢产物<sup>[1]</sup>。已有大量的研究报道,茶氨酸能够缓解精神压力,抗焦虑<sup>[2]</sup>,促进神经生长,提高认知能力<sup>[3-4]</sup>,并且能够与谷氨酸竞争受体位点,缓解兴奋毒性<sup>[5]</sup>,有利于记忆与学习<sup>[6]</sup>。也有学者发现,茶氨酸能够从不同角度提高运动能力,如缓解运动导致的免疫抑制<sup>[7-9]</sup>,通过影响脑内神经递质含量,提高小鼠游泳时间<sup>[10-11]</sup>等。

本研究以大鼠一次性力竭运动为模型,研究不同剂量茶氨酸对大鼠纹状体兴奋与抑制性氨基酸类神经递质含量与谷氨酸受体(N-甲基-D-天冬氨酸受体亚基,NMDAR2A)蛋白与酪氨酸磷酸化水平的影响,从而为探索提高运动能力的神经机制提供数据参考,也为进一步开发运动性功能补剂提供理论支撑。

## 1 材料

**1.1 动物** 6 周龄雄性 SD 大鼠,体重 185 ~ 195 g,由南京医科大学实验动物中心提供。SPF 级,许可证号 SCXK(苏)2008-0004。

**1.2 药品与试剂** 茶氨酸(纯度 99%),浙江杭州和田生物技术公司;氨基酸混合标准品(美国 Sigma 公司),NMDAR2A 抗体(anti-glutamate-receptor NMDAR2A,美国, Sigma 公司),磷酸化抗体(monoclonal anti-phosphorylation clone PT-66,美国 Sigma 公司),二抗(goat-anti-rabbit IgG-AP,美国 Santa Cruz 公司),goat-anti-mouse IgG-AP(美国 Santa Cruz 公司),其余为国产分析纯。

**1.3 仪器** 高效液相色谱仪 Water™ 600E(美国 water 公司);Mini 垂直电泳槽、电转槽与电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);超速离心机 Awanti™ 230(美国 Beckman 公司);高速匀浆器 Art-Micro D-8(德国 Micra-Art 公司);凝胶图像分析系统 SYNGENE(英国 Synoptics LTP 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 大鼠随机分为正常对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组四组,每组 10 只。饲养条件为室内,自然光照,通风条件良好,温度 24 °C,所有大鼠自由饮水,进食。

**2.2 给药方案** 各组适应性饲养 1 周后,茶氨酸低、中、高剂量组大鼠分别 ig 100,200,400 mg · kg<sup>-1</sup> 茶氨酸溶液;正常对照组 ig 等体积生理盐水;持续给药 30 d。第 31 天,所有组大鼠进行游泳运动至力竭。力竭标准为游泳动作明显失调,不能再坚持,沉入水底 10 s 不能回到水面<sup>[12]</sup>。力竭后,所有大鼠断头取纹状体。

**2.3 脑纹状体氨基酸样品制备** 断头处死大鼠,在冰面上快速分离纹状体。加入 10% 的冰磺柳酸并匀浆(匀浆速度 18 000 r · min<sup>-1</sup>,时间 20 s),离心(4 000 r · min<sup>-1</sup>,5 min),取上清,置 -80 °C 冰箱待用。

**2.4 脑纹状体受体粗提物制备** 大鼠断头后快速分离纹状体置液氮中冻存备用。以下操作均在冰水浴中进行。从液氮中取出纹状体,加 1 mL 的匀浆缓冲液,用高速匀浆器匀浆(10 s × 2 次),10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液测蛋白后分装,置 -80 °C 冰箱待用。

### 2.5 观察指标及测定方法

**2.5.1 Glu, Gly, GABA, ASP HPLC 测定** 测定参数:hypersil BDS 色谱柱 150 mm × 4.6 mm,5 μm 卡套柱。流动相 A 相:20 mmol · L<sup>-1</sup> NaAc + 0.3% THF(四氢呋喃) + 0.02% 三乙胺, pH 7.2; B 相:100 mmol · L<sup>-1</sup> NaAc (pH 7.2): 乙腈: 甲醇 = 200: 350: 450;梯度:0 ~ 25 min, B:6% ~ 60%; 26 ~ 28 min, B:60% ~ 100%;流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温 40 °C;荧光检测器 EX 340 nm, Em 450 nm;进样量 1 μL。

**2.5.2 NR2A 蛋白含量** Western blotting 7.5%

SDS-PAGE 电泳后,在冷却条件下 100 V 电转 3 h。取出转印膜,BSA 封闭后加入 1:3 000 稀释的抗 NMDAR2A 抗体,4 ℃ 过夜。洗膜,加入二抗(羊抗兔 IgG-AP),37 ℃ 反应 2 h,洗膜。以 NBT/BCIP 显色,结果以图像处理仪处理。

**2.5.3 NMDAR2A 酪氨酸磷酸化水平 Immunoprecipitation 与 Western blotting** 取蛋白样品 200 μg,加入 SDS 和 DTT 至终浓度分别为 0.5% 和 1 mmol·L<sup>-1</sup>,沸水浴 5 min。加入 400 μL 免疫沉淀缓冲液和适量抗 NR2A 抗体,4 ℃ 旋转混匀,过夜。加入 25 μL Protein A Sepharose CL-4B,4 ℃ 旋转混匀 2 h。10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 2 min,沉淀用免疫沉淀缓冲液洗 3 遍。所得沉淀中加入 5 倍浓度的 SDS-PAGE 样品处理液 10 μL,混匀,沸水浴 10 min。离心取上清,7.5% SDS-PAGE 分离。用抗磷酸酪氨酸单抗作免疫印迹分析。

**2.6 统计学处理** 全部数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间的显著性检验用 SPSS 12.0 软件做单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

**3 结果**

**3.1 对大鼠体重的影响** 不同剂量组大鼠初始体重与最终体重同正常对照组相比,无显著性差异。

**3.2 对大鼠游泳时间的影响** 茶氨酸高剂量组大鼠游泳时间均显著长于其他各组( $P < 0.01$ ),中剂量组显著长于低剂量组与对照组( $P < 0.01$ ),低剂量组与正常对照组无显著性差异。见表 1。

表 1 茶氨酸对大鼠游泳时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	游泳时间/min
对照	-	127.5 ± 5.8
茶氨酸	100	129.4 ± 4.0
	200	149.4 ± 4.0 <sup>1,2)</sup>
	400	164.7 ± 4.1 <sup>1,2,3)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与茶氨酸 100 mg·kg<sup>-1</sup>组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与茶氨酸 200 mg·kg<sup>-1</sup>组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

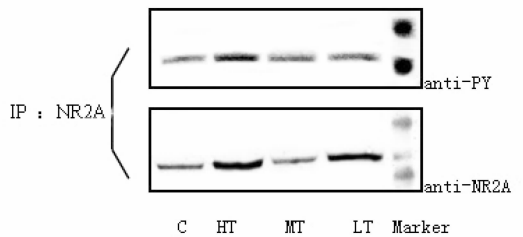
**3.3 力竭运动后大鼠纹状体 Glu, Asp, GABA 和 Gly 含量的变化** 力竭运动后,高剂量茶氨酸组大鼠纹状体中 Glu 浓度显著高于对照组,GABA 浓度显著低于对照组( $P < 0.05$ ),其他剂量各组间并无显著性变化。见表 2。

表 2 力竭运动后大鼠纹状体 Glu, Asp, GABA 和 Gly 含量的变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Glu	Asp	GABA	Gly
对照	-	9 556.3 ± 326.2	2 508.2 ± 331.3	2 237.1 ± 198.4	1 809.3 ± 56.8
茶氨酸	100	9 573.4 ± 112.1	2 561.2 ± 102.4	2 187.7 ± 369.2	1 801.3 ± 102.5
	200	9 758.1 ± 147.4	2 596.3 ± 314.0	2 169.3 ± 124.4	1 890.4 ± 78.9
	400	1 0063.2 ± 359.5 <sup>1)</sup>	2 601.1 ± 104.3	1 881.3 ± 336.1 <sup>1)</sup>	1 910.4 ± 69.6

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表 3 同)。

**3.4 力竭运动后大鼠纹状体 NR2A 蛋白含量与酪氨酸磷酸化水平变化** 力竭运动后,茶氨酸高剂量组 NR2A 蛋白含量与磷酸化水平均高于对照组( $P < 0.05$ ),其他组间无显著性差异。见表 3,图 1。



C. 对照组;HT. 茶氨酸 400 mg·kg<sup>-1</sup>组;MT. 茶氨酸 200 mg·kg<sup>-1</sup>组;LT. 茶氨酸 100 mg·kg<sup>-1</sup>组;Marker. 标准分子量;NR2A. NR2A 蛋白含量;PY. 酪氨酸磷酸化水平

表 3 茶氨酸对力竭运动后大鼠纹状体

NR2A 蛋白含量与磷酸化水平变化的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NR2A 蛋白含量	磷酸化水平
对照	-	100	100
茶氨酸	100	118.1 ± 2.4	112.0 ± 4.4
	200	123.4 ± 4.5	120.2 ± 3.5
	400	134.1 ± 3.6 <sup>1)</sup>	123.2 ± 4.4 <sup>1)</sup>

**4 讨论**

运动能力是机体形态、素质、机能、技能和心理能力等因素的综合表现。诸多研究发现<sup>[13-15]</sup>,运动能力与机体神经中枢机能密切相关,尤其是兴奋与抑制性神经递质含量的交替变化是导致运动能力转

图 1 茶氨酸对力竭运动后大鼠纹状体 NMDAR2A 蛋白含量与磷酸化水平变化的影响

变的一个普遍现象。因此通过服用营养物质,改善中枢机能,是提高运动能力的有效途径之一。纹状体与运动的控制密切相关<sup>[16-18]</sup>,N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)是一类离子型谷氨酸受体,广泛存在于纹状体中,由 NR1 和 NR2 (A-D) 两类亚基组成。其中 NR1 是 NR 的功能亚基,NR2 是调节亚

基,后者具有调节受体通道动力学的作用。研究发现,运动疲劳时受体蛋白含量有短暂下降的趋势<sup>[19]</sup>。通过补充营养物质是否能干预急性运动引起的受体变化的研究鲜有报道。本研究发现,大鼠补充中、高剂量的茶氨酸后,游泳时间有显著性的增加,其中高剂量补充茶氨酸能够显著增加纹状体中 Glu 含量,显著性降低 GABA 含量,同时, NR2A 蛋白含量与磷酸化水平均有显著性升高,这些变化说明茶氨酸能够提高中枢兴奋性,适当降低抑制性,有利于维持机体神经中枢的正常机能,从而提高运动能力,延缓疲劳的出现。

### [参考文献]

[ 1 ] Goto T. Chemical composition of commercially available Japanese green tea [ J ]. Foods Ingrid J, 1996, 170: 46.

[ 2 ] Yin C, Gou L, Liu Y, et al. Antidepressant-like effects of *L*-theanine in the forced swim and tail suspension tests in mice [ J ]. Phytother Res, 2011, 25(11):1636.

[ 3 ] Kakuda T. Neuroprotective effects of theanine and its preventive effects on cognitive dysfunction [ J ]. Pharmacol Res, 2011, 64(2):162.

[ 4 ] Giesbrecht T, Rycroft J A, Rowson M J, et al. The combination of *L*-theanine and caffeine improves cognitive performance and increases subjective alertness [ J ]. Nutr Neurosci, 2010, 13(6):283.

[ 5 ] Di X, Yan J, Zhao Y, et al. *L*-theanine protects the APP ( Swedish mutation ) transgenic SH-SY5Y cell against glutamate-induced excitotoxicity via inhibition of the NMDA receptor pathway [ J ]. Neuroscience, 2010, 168(3):778.

[ 6 ] Park S K, Jung I C, Lee W K, et al. A combination of green tea extract and *L*-theanine improves memory and attention in subjects with mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled study [ J ]. J Med Food, 2011, 14(4):334.

[ 7 ] Murakami S, Kurihara S, Titchenal C A, et al. Suppression of exercise-induced neutrophilia and lymphopenia in athletes by cystine/theanine intake: a

randomized, double-blind, placebo-controlled trial [ J ]. Int Soc Sports Nutr, 2010, 7(1):23.

[ 8 ] Murakami S, Kurihara S, Koikawa N, et al. Effects of oral supplementation with cystine and theanine on the immune function of athletes in endurance exercise: randomized, double-blind, placebo-controlled trial [ J ]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(4):817.

[ 9 ] Kawada S, Kobayashi K, Ohtani M, et al. Cystine and theanine supplementation restores high-intensity resistance exercise-induced attenuation of natural killer cell activity in well-trained men [ J ]. J Strength Cond Res, 2010, 24(3):846.

[ 10 ] 李敏,沈新南,姚国英,等. 茶氨酸延缓运动性疲劳及其作用机制研究 [ J ]. 营养学报, 2005, 27(4):326.

[ 11 ] 白宝丰. 茶氨酸抗运动性疲劳机制及应用前景的思考 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):279.

[ 12 ] 辛东,李辉,李静先,等. 力竭运动时大鼠脑组织自由基产生及氧化、抗氧化能力的动态观察 [ J ]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(4):321.

[ 13 ] 白宝丰,王斌,张蕴琨. 力竭运动前后大鼠脑皮质运动区递质性氨基酸含量的动态变化 [ J ]. 南京体育学院学报:自然科学版, 2008, 7(3):1.

[ 14 ] 李人,陶心铭. 运动性疲劳与脑中  $\gamma$ -氨基丁酸 [ J ]. 中国运动医学杂志, 1985, 4(2):81.

[ 15 ] 张蕴琨,王斌,蒋晓玲. 游泳训练对小鼠脑组织递质性氨基酸和 5-羟色胺的影响 [ J ]. 中国运动医学杂志, 1999, 18(4):324.

[ 16 ] 李继硕. 神经科学基础 [ M ]. 北京:高等教育出版社, 2002:205.

[ 17 ] 孙晓芳,王丹巧,吴兆恩,等. 首乌方对帕金森病模型大鼠血液和纹状体细胞外液左旋多巴药代动力学影响的研究 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):111.

[ 18 ] 田允,宋文婷,徐立,等. 补肾中药对帕金森病模型小鼠黑质-纹状体多巴胺的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):134.

[ 19 ] 白宝丰,张蕴琨. 力竭运动后大鼠脑皮质运动区谷氨酸受体 NR2A 蛋白含量及酪氨酸磷酸化水平的变化 [ J ]. 中国运动医学杂志, 2005, 24(4):400.

[责任编辑 聂淑琴]