

α -硫辛酸和牛磺酸对急性镉氧化损伤影响的实验研究

喻道军, 徐兆发*, 王雨, 贺安宁, 徐斌

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨 α -硫辛酸 (LA) 和牛磺酸 (Tau) 对急性镉氧化损伤的影响。方法 实验用 Wistar 大鼠 32 只, 分为 4 组, 第一组为对照组, 第二组为单纯染镉组, 两组均先腹腔注射生理盐水, 2 h 后分别皮下注射生理盐水和 35 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 溶液。第三组和第四组为 LA 和 Tau 预处理组, 先分别腹腔注射 175 $\mu\text{mol/kg}$ 的 LA 溶液和 4 mmol/kg 的 Tau 溶液, 2 h 后皮下注射 35 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 溶液。染毒 24 h 后腹主动脉取血并取肝肾, 测定血清乳酸脱氢酶 (LDH)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性, 肝、肾皮质中 Cd、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。结果 与对照组比较, 单纯染镉组的血清 LDH、ALT 活性及肝、肾皮质镉含量显著升高, SOD 活性显著下降。肝 GSH、MDA 含量显著升高, GSH-Px 活性显著下降。与单纯染镉组比较, LA 和 Tau 干预组的血清 ALT 和 LDH 活性及肝组织 Cd 含量显著降低, 肝 GSH-Px 活性显著增高。LA 干预组的肝 MDA 含量显著降低, 肝、肾皮质 SOD 活性显著升高。Tau 干预组肝 GSH 含量、肾皮质镉含量显著降低。结论 LA 和 Tau 预处理对镉所致急性肝脏氧化损伤有一定拮抗作用。

关键词: 镉; α -硫辛酸; 牛磺酸; 氧化应激

中图分类号: O614.242

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2005)04-0199-03

An experimental study on effects of alpha-lipoic acid and taurine on acute oxidative damage caused by cadmium

YU Dao-jun, XU Zhao-fa, WANG Yu, HE An-ning, XU Bin

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To study the effects of alpha-lipoic acid (LA) and taurine (Tau) on acute oxidative damage caused by cadmium. **Method** Thirty-two Wistar rats were divided into four groups randomly, with eight rats in each group. The first group was given intraperitoneally with normal saline 5 ml/kg as control. The second one was given intraperitoneally with normal saline first and subcutaneously with cadmium chloride (CdCl_2) 35 $\mu\text{mol/kg}$ two hours later. The third one was pretreated intraperitoneally with LA 175 $\mu\text{mol/kg}$ first and injected subcutaneously with CdCl_2 35 $\mu\text{mol/kg}$ two hours later. And the fourth one was pretreated intraperitoneally with taurine 4 mmol/kg first and injected subcutaneously with CdCl_2 35 $\mu\text{mol/kg}$ two hours later. Twenty-four hours after treatment, blood specimens were collected from the abdominal aortae of the rats and then they were killed and their liver and kidney were taken out. Activities of lactic acid dehydrogenase (LDH) and alanine aminotransferase (ALT) in serum, levels of Cd, malonyldialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in the liver and renal cortex were measured. **Result** Serum activities of LDH and ALT and level of Cd in the liver and renal cortex increased significantly, activity of SOD declined significantly, levels of GSH and MDA increased significantly and activity of GSH-Px declined significantly in the rats exposed to Cd only, as compared to the controls. Activities of ALT and LDH and level of Cd declined significantly and activity of GSH-Px in the liver increased significantly in the rats pretreated with LA and Tau, and level of MDA declined significantly in the liver and activity of SOD in the liver and renal cortex increased significantly in the rats pretreated with LA and level of GSH in the liver and level of Cd in the renal cortex declined significantly in the rats pretreated with Tau, as compared with the rats treated with Cd only. **Conclusion** Pretreatment with LA and Tau in rats could antagonize acute oxidative liver damage induced by cadmium to a certain extent.

Key words: Cadmium; Alpha-lipoic acid; Taurine; Oxidative stress

镉是一种有毒的重金属, 肝脏、肾脏是镉毒性作用的主要靶器官, 氧化应激被认为是镉致肝、肾毒性的一个重要机制^[1]。 α -硫辛酸 (alpha-lipoic acid, LA)

是已知最强的天然抗氧化剂之一, 具有很强的清除自由基和活性氧的功能, 并与其他抗氧化剂有协同作用^[2]。牛磺酸 (taurine, Tau) 是内源性抗氧化剂, 化学名 2-氨基乙磺酸, 广泛分布于动物组织细胞内, 具有维持渗透压平衡、保护细胞膜、抗氧化应激和免疫调节等广泛的生物效应^[3,4]。本研究的目的是通过观察 LA 和 Tau 预处理对急性染镉所致的肝脏和肾脏损

收稿日期: 2004-12-27; 修回日期: 2005-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371200)

作者简介: 喻道军 (1969-), 男, 博士研究生, 研究方向: 镉毒理学。

* 通讯作者

伤的影响,为急性镉氧化损伤的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供 Wistar 大鼠 32 只,体重 (150±10) g,雌雄各半。正式实验前适应性喂饲 5 d,按体重随机分为 4 组,每组 8 只。第一组为对照组,第二组为单纯染镉组,腹腔注射生理盐水,第三、四组为干预组,分别腹腔注射 175 μmol/kg 的 LA 溶液、4 mmol/kg 的 Tau 溶液。2 h 后,第一组皮下注射生理盐水,其余 3 组皮下注射 35 μmol/kg 的 CdCl₂ 溶液。注射容量除 Tau 为 10 ml/kg 外,均为 5 ml/kg。染毒 24 h 后乙醚麻醉,腹主动脉取血,分离血清。剥离肾脏被膜,切取肝脏、肾皮质各 0.3~0.5 g,制备 10% 的组织匀浆。

1.2 测定指标和方法

测定血清乳酸脱氢酶 (LDH) 用 2,4-二硝基苯肼比色法^[3],谷氨酸氨基转移酶 (ALT) 用赖氏法^[6]。组织中谷胱甘肽 (GSH) 测定用 DTNB 法^[7],丙二醛 (MDA) 用硫代巴比妥酸比色法测定^[8],谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定用 DTNB 直接显色法^[9],超氧化物歧化酶 (SOD) 测定用 Nitrite-kit 法^[10],组织蛋白测定用 Lowry 法^[11],肝、肾皮质中 Cd 含量测定用原子吸收分光光度火焰法。

1.3 统计分析

用 SPSS 软件单因素方差分析方法 (ANOVA) 进行组间差异的显著性检验,两组间比较用 *q* 检验 (Newman-Knells)。

2 结果

2.1 血清 LDH 和 ALT 活性

如表 1 所示,单纯染镉组血清中 LDH、ALT 活性均明显高于对照组,LA 和 Tau 干预组血清中 LDH、

ALT 活性明显低于单纯染镉组,差异有显著性。

表 1 大鼠血清 LDH 和 ALT 活性变化 ($\bar{x} \pm s$) U/L

组别	血清 LDH	血清 GPT
对照组	120.47±57.00	32.03±9.37
染 Cd 组	261.11±52.14 ^{**}	88.92±15.06 ^{**}
LA+ Cd 组	172.84±34.45 ^{*△△}	32.56±12.33 ^{△△}
Tau+ Cd 组	210.22±37.25 ^{*△△}	41.38±21.41 ^{△△}

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与染 Cd 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 肝、肾皮质镉含量

如表 2 所示,单纯染镉组肝、肾皮质镉含量明显增高,LA 干预组肝、肾皮质镉含量均明显低于单纯染镉组,而 Tau 干预组只有肝镉含量降低。

表 2 大鼠肝、肾皮质镉含量变化 ($\bar{x} \pm s$) μg/g

组别	肝脏镉	肾皮质镉
对照组	0.32±0.18	0.17±0.09
染 Cd 组	33.57±5.19 ^{**}	14.84±4.61 ^{**}
LA+ Cd 组	24.76±4.48 ^{*△△}	9.46±1.74 ^{*△△}
Tau+ Cd 组	27.46±5.15 ^{*△△}	12.46±5.22 ^{**}

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与染 Cd 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 肝脏、肾皮质的 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性

从表 3 可以看出,与对照组相比,单纯染镉组肝中 GSH、MDA 含量显著升高,GSH-Px、SOD 活性明显降低;与单纯染镉组相比,LA 干预组肝中 MDA 含量显著降低,而 GSH-Px、SOD 活性明显高于单纯染镉组,但仍显著低于对照组;Tau 干预组肝中 GSH-Px 活性显著增高,GSH 含量显著降低。除单纯染镉组肾皮质中 SOD 活性较对照组显著下降,LA 干预组 SOD 活性比单纯染镉组明显增高外;各实验组大鼠肾皮质 GSH、MDA 含量和 GSH-Px 活性无显著变化。

表 3 大鼠肝脏、肾皮质 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏				肾皮质			
	GSH(μg/g Pro)	MDA(nmol/g Pro)	GSH-Px(U/mg Pro)	SOD(U/g Pro)	GSH(μg/g Pro)	MDA(nmol/g Pro)	GSH-Px(U/mg Pro)	SOD(U/g Pro)
对照组	12.10±4.36	51.10±15.70	0.65±0.21	69.57±12.95	11.39±2.35	186.84±45.36	0.40±0.11	64.09±9.00
染 Cd 组	20.81±6.67 ^{**}	108.54±72.93 ^{**}	0.22±0.10 ^{**}	37.11±16.32 ^{**}	13.00±5.11	190.07±50.09	0.58±0.26	47.25±19.89 [*]
LA+ Cd 组	18.32±2.17 ^{**}	61.17±15.26 [△]	0.43±0.03 ^{*△△}	50.26±4.43 ^{**△}	12.74±4.34	197.88±20.68	0.61±0.36	69.94±15.94 ^{△△}
Tau+ Cd 组	15.14±2.02 [△]	85.22±21.73	0.51±0.09 ^{*△△}	47.39±4.90 ^{**}	13.62±3.26	185.30±52.84	0.54±0.46	55.91±12.38

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与染 Cd 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

研究表明,镉所引起的组织、器官损伤与脂质过氧化有关^[12]。镉在体内可与还原性巯基 (—SH) 结合,拮抗富含巯基的 SOD、GSH-Px 及金属硫蛋白、

还原性谷胱甘肽 (GSH) 等,从而削弱机体对脂质过氧化物代谢能力,导致脂质过氧化作用增强。而脂质过氧化可致细胞损伤,增加膜的通透性。本实验用血清中的 LDH 和 ALT 来反映肝损伤情况。LDH 和 ALT

在肝脏内含量较高, 少量组织坏死或细胞膜通透性增高即可释放。给大鼠皮下注射 $35 \mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 溶液 24 h 后发现, 其血清中的 LDH 和 ALT 显著增高, 分别为对照组的 2.2 倍及 2.8 倍, 与对照组比较, 单纯染 Cd 组肝脏的 Cd 含量以及多种氧化指标的变化提示大鼠急性染 Cd 后可引起肝脏明显的氧化损伤。实验中还发现, 单纯染 Cd 组与对照组相比较, 肾脏并无明显的氧化损伤, 这可能由于在本次实验条件下急性染镉的主要靶器官是肝脏, 而肾脏并未受到明显累及。

α -硫辛酸是一种代谢型抗氧化剂, 其与在生物体内的还原型产物二氢硫辛酸 (DHIA), 能清除几乎所有的自由基和活性氧^[13]。本次实验结果表明, α -硫辛酸可恢复肝脏 GSH-Px、SOD 活性, 减少 MDA 生成, 从而减轻急性镉染毒所致肝脏损伤, 使血清 LDH 和 ALT 显著降低, 这可能与 LA 和 DHIA 的强大抗氧化能力有关。LA 和 DHIA 的氧化还原激活了生物体内其他抗氧化剂的代谢循环, 形成独特的生物抗氧化剂再生循环网络, 维持机体正常的抗氧化剂水平, 共同发挥生物抗氧化作用^[14]。体内存在的还原型 GSH 含有巯基, 可以立即与进入体内的镉离子结合形成复合物, 阻止镉对组织细胞的毒性, 是防止镉急性毒性的第一道防线, 在急性镉中毒时表现为肝脏 GSH 应激性升高。LA 和 DHIA 能螯合汞、镉等金属离子, 抑制其发挥毒性作用, 降低脂质过氧化水平, 避免 GSH 应激性升高。另一方面, DHIA 是一种强还原剂, 能将胱氨酸还原为半胱氨酸, 细胞对半胱氨酸的吸收速率比对胱氨酸的吸收快 10 倍, 有利于 GSH 的生物合成, 因而 LA 干预能显著增加细胞内 GSH 水平^[15]。两种作用相叠加, 使 LA 干预组肝脏 GSH 含量与单纯染镉组比较并没有显著下降。另外, 本次实验中发现, LA 干预后, 肝脏和肾皮质镉含量显著低于单纯染 Cd 组, 可能也是由于 LA 和 DHIA 与 Cd^{2+} 结合, 并促进其排出。

牛磺酸作为一种含硫的 β 氨基酸磺酸类似物, 是一种内源性抗氧化剂。本实验我们采用 4 mmol/kg Tau 干预后发现, 血清中 LDH 和 ALT 活性和肝脏的 GSH 含量明显降低, 肝脏 GSH-Px 活性得以恢复。这说明 Tau 可减轻急性镉中毒所致肝脏氧化损伤, 并缓解镉对抗氧化酶的抑制^[16]。Tau 与 2 价金属离子有较高的亲和性, 与 Cd^{2+} 结合后, 避免了 GSH 应激性升高, 并解除对 GSH-Px 活性的抑制, 抑制镉诱发的脂质过氧

化^[17], 同时 Tau 具有较强的膜稳定作用^[4], 也使血清中 LDH 和 ALT 活性降低。但 Tau 干预组肝脏 MDA 含量无显著变化, 机制有待探讨。综上所述, LA 和 Tau 对镉所致急性肝脏氧化损伤有一定拮抗作用。

参考文献:

- [1] Shaikh ZA, Vu T, Zaman K. Oxidation stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 154 (3): 256-263.
- [2] Packer L, Trischler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha lipoic acid [J]. *Free Rad Biol & Med*, 1997, 22: 359-378.
- [3] 何彤榕. 牛磺酸对心肌细胞实验性“缺血”和再灌注的电生理效应 [J]. *中国药理学报*, 1996, 12 (4): 322.
- [4] 周玉宽. 牛磺酸膜稳定作用的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 1997, 13 (3): 277.
- [5] 生物化学及生物化学检验技术编写组. 生物化学及生物化学检验技术 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1980. 237-239, 246-248.
- [6] 沈同. 生物化学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 465-467.
- [7] 张平, 孟宪均. 分光光度法测定大鼠不同组织还原型 GSH 含量 [J]. *中华实用外科杂志*, 1989, 6 (3): 141-142.
- [8] 夏奕明. 改良红细胞还原型谷胱甘肽氧化酶活力的测定方法 I. DTNB 直接法 [J]. *卫生研究*, 1987, 16 (4): 29.
- [9] 张永兴, 楼介治, 孟德成等. 烟草工人粉尘接触水平与肺功能损害的卫生学调查 [J]. *中国公共卫生*, 1994, 10 (5): 214-216.
- [10] Qyanangni Y. Reevaluation of assay methods and establishment of leit for superoxide dismutase activity [J]. *Analytical biochemistry*, 1984, 142: 290-296.
- [11] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folinphenol reagent [J]. *Biology*, 1951, 193: 265-275.
- [12] Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, et al. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate and cadmium chloride to rats [J]. *Bio Med*, 1997, 22: 471-473.
- [13] Packer L, Witt ET, Trischler HJ. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant [J]. *Free Radical Biol Med*, 1995, 19: 227-235.
- [14] Packer L, Kraemer K, Rimbav G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications [J]. *Nutrition*, 2001, 17 (10): 888-895.
- [15] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Lipoic acid increases glutathione production and enhances the effect of mercury in human cell lines [J]. *Toxicology*, 2002, 175 (1-3): 103-110.
- [16] Balkan J, Abbasoglus D, Kanbaglio et al. Taurine has a protective effect against thioacetamide induced liver cirrhosis of decreasing oxidative stress [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2001, 20 (5): 251-254.
- [17] 张静波, 郭啸华, 袁发焕等. 牛磺酸大鼠被动型 Heymann 肾炎的疗效观察 [J]. *中华内科杂志*, 2000, 39 (7): 486-487.