

谷胱甘肽和 α -硫辛酸对锰致大鼠体内过氧化反应的影响

刘莉, 徐兆发*, 杨敬华, 徐斌, 贺安宁, 贾克

(中国医科大学公共卫生学院 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 将 Wistar 大鼠 32 只随机分为 4 组, 即对照组、单纯染锰组、硫辛酸 (LA) 干预组、谷胱甘肽 (GSH) 干预组。对照组腹腔注射生理盐水, 其余各组腹腔注射 MnCl_2 $150 \mu\text{mol/kg}$, 2 h 后, 对照组、单纯染锰组皮下注射生理盐水, 每周染毒 5 次; 硫辛酸干预组皮下注射 LA $35 \mu\text{mol/kg}$, 谷胱甘肽干预组皮下注射 GSH 1 mmol/kg , 隔日干预, 共计 4 周。测定肝、脑和肾组织中的谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛含量 (MDA) 和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, 单纯染锰组肝、脑、肾组织中的 MDA 含量均升高 ($P < 0.05$), GSH 含量和 GSH-Px、SOD 的活性都有不同程度的降低; 两干预组肾组织中 MDA 含量降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与单纯染锰组比较, GSH 干预组肝组织的 MDA、GSH 含量降低 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活性升高 ($P < 0.05$), 脑和肾组织的 MDA 含量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); LA 干预组肝组织 SOD、GSH-Px 的活性升高 ($P < 0.01$), 脑、肾组织的 MDA 含量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示 GSH 和 LA 对锰致大鼠氧化损伤有一定的拮抗作用。

关键词: 锰; 氧化损伤; 谷胱甘肽; α -硫辛酸

中图分类号: O614.711 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0099-02

Experimental study of the effects of glutathione and alpha-lipoic acid on oxidative response induced by manganese in rats

LIU Li, XU Zhao-fa*, YANG Jing-hua, XU Bin, HE An-ning, JIA Ke

(Public Health College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Thirty-two Wistar rats were randomly divided into control group, MnCl_2 group, GSH group and LA group by body weight. Control group was only injected with 0.9% sodium chloride intraperitoneally, other three groups were all injected with $150 \mu\text{mol/kg}$ manganese chloride (MnCl_2) intraperitoneally first, two hours later, the rats in control group and MnCl_2 group were injected with 0.9% sodium chloride subcutaneously, while rats in GSH group and LA group were respectively injected with 1 mmol/kg GSH and $35 \mu\text{mol/kg}$ LA subcutaneously, all administration were given 5 times a week for 4 weeks. Then the levels of GSH and malonyldialdehyde (MDA), and the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in liver, brain and kidney of rats were all determined. Results showed that compared with control group, the MDA contents in liver, brain and kidney of the rats from MnCl_2 group were all increased, the GSH contents, GSH-Px and SOD activities were decreased; while the MDA contents in brain and kidney of the rats from GSH group and LA group were declined. Compared with MnCl_2 group, MDA and GSH contents in the liver of rats from GSH group showed some decrease, while SOD and GSH-Px activities increased, and the MDA contents in brain and kidney were decreased; there was the same situation in LA group. It is indicated that GSH and LA both have a certain antagonized effect on oxidative damage caused by manganese in rats.

Key words: Manganese; Oxidative damage; Glutathione; Alpha-lipoic acid

过量的锰进入机体可产生大量自由基, 干扰能量代谢, 引起中枢神经系统受损, 对肝脏、肾脏等组织也有一定的损害作用^[1]。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 为细胞内普遍存在的三肽化合物, 是机体重要的解毒物质, 它能有效清除生物氧化产生的自由基, 维持细胞内环境的稳定。 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。

本研究通过使用 GSH 和 LA 两种抗氧化剂作为干预物质, 初步探讨 GSH 和 LA 对锰致大鼠机体氧化反应的影响, 为锰致机体氧化损伤的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与染毒

Wistar 大鼠 32 只, 雌雄各半, 体重 (130 ± 10) g, 由中国医科大学实验动物中心提供。动物自由饮水摄食, 实验动物室温度 $17 \sim 23^\circ\text{C}$, 相对湿度 $45\% \sim 55\%$, 饲料由中国医科大学实验动物中心提供。正式实验前适应性喂养 7 d, 按体重随机分为 4 组, 每组 8 只。第 1 组为对照组, 第 2 组为单纯染锰组, 第 3、4 组为干预组。第 1 组腹腔注射生理盐水, 第 2~4 组腹腔注射 MnCl_2 $150 \mu\text{mol/kg}$, 2 h 后, 第 1 组和第 2 组皮下注

收稿日期: 2005-10-17; 修回日期: 2005-12-20

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究基金资助项目 (项目编号 2004C025)。

作者简介: 刘莉 (1976-), 女, 讲师, 博士在读, 主要从事微量元素与健康的研究。

* 通讯作者, 教授, 博士生导师。

射生理盐水,第3组皮下注射 LA 35 μmol/kg,第4组皮下注射 GSH 1 mmol/kg,注射容量 5 ml/kg,每周 5 次,隔日干预,共计 4 周,染毒 20 次,干预 10 次。注射结束后将大鼠用乙醚麻醉,腹主动脉放血,快速切取肝、肾和脑组织 0.7 g 左右,制备 10%的组织匀浆,整个过程均在冰浴下进行。

1.2 测定指标及方法

组织中谷胱甘肽(GSH)测定用 DTNB 直接法^[2];丙二醛(MDA)测定用硫代巴比妥酸法^[3];谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定用 DTNB 直接显色法^[4];超氧化物歧化酶(SOD)测定用黄嘌呤氧化酶法^[5];蛋白测定用 Lowry 法^[6]。

1.3 统计分析

用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验,实验数据均用平均数±标准差表示。

2 结果

2.1 肝组织 GSH、MDA 含量及 GSH-Px、SOD 活性

如表 1 所示,与对照组比较,单纯染锰组 MDA 含量升高;各组的 GSH 含量都低于对照组;LA 干预组的 GSH-Px 和 SOD 的活性高于对照组。与单纯染锰组比较,GSH 干预组 GSH、MDA 含量降低,GSH-Px、SOD 活性升高;LA 干预组 GSH-Px 和 SOD 活性升高。

表1 大鼠肝组织 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 的活性(̄x±s)

分组	GSH (μmol/g pro)	MDA (nmol/g pro)	GSH-Px (U/ng pro)	SOD (U/mg pro)
对照组	2.91±0.41	64.31±6.88 [#]	1.31±0.12	62.67±7.20
染 Mn 组	2.13±0.54 [*]	80.07±7.30 [*]	1.16±0.10	59.81±3.48
GSH+Mn 组	1.38±0.79 ^{##}	64.63±10.53 [#]	1.42±0.18 [#]	70.02±9.46 [#]
LA+Mn 组	1.91±1.32 ^{**}	75.56±17.33	1.87±0.21 ^{**##}	78.27±7.85 ^{**##}

与对照组比较 **P*<0.05, ***P*<0.01;与染锰组比较[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01。下表同。

2.2 脑组织 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性

如表 2 所示,与对照组比较,单纯染锰组的 MDA 含量升高;LA 干预组 GSH-Px 活性升高;GSH 干预组 SOD 活性降低。与单纯染锰组比较,两干预组 MDA 含量降低;LA 干预组 GSH-Px 活性升高。

表2 大鼠脑组织 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 的活性(̄x±s)

分组	GSH (μmol/g pro)	MDA (nmol/g pro)	GSH-Px (U/ng pro)	SOD (U/mg pro)
对照组	1.64±0.29	185.47±27.84 [#]	0.53±0.29	42.48±4.46
染 Mn 组	1.36±0.28	226.31±34.45 [*]	0.40±0.21	41.86±6.43
GSH+Mn 组	1.24±0.37	184.25±25.70 [#]	0.31±0.25	37.80±5.51 [*]
LA+Mn 组	1.29±0.32	181.93±44.53 [#]	1.32±0.63 ^{**##}	44.78±8.13

2.3 肾组织 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性

表3 大鼠肾组织 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 的活性(̄x±s)

分组	GSH (μmol/g pro)	MDA (nmol/g pro)	GSH-Px (U/ng pro)	SOD (U/ng pro)
对照组	1.79±0.19	123.62±22.01 [#]	0.76±0.10	41.25±5.21
染 Mn 组	1.35±0.31 [#]	181.33±30.86 ^{**}	0.71±0.11	39.54±5.62
GSH+Mn 组	1.66±0.54	98.17±17.74 ^{##}	0.68±0.16	33.52±8.53
LA+Mn 组	1.94±0.55 ^{##}	88.10±27.36 ^{##}	0.67±0.09	34.67±3.93

如表 3 所示,与对照组比较,单纯染锰组的 MDA 含量升高、GSH 含量下降;LA 和 GSH 干预组 MDA 含量降低。与单纯染锰组比较,两干预组的 MDA 含量均降低,LA 干预组的 GSH 含量升高。

3 讨论

本实验采用测定组织中 GSH、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性作为研究锰致大鼠体内氧化损伤的指标。研究发现,对照组大鼠的肝、脑、肾组织的 MDA 含量均低于单纯染锰组(*P*<0.01, *P*<0.05),提示锰可引起大鼠体内的氧化反应。单纯染锰组的肝、肾组织的 GSH 均较对照组低,而脑组织的 GSH 与对照组相比,差异不显著,可能由于锰首先引起这两个器官的 GSH 耗竭,进而引起对脑组织的损害。

正常情况下 GSH 主要存在于细胞内,细胞外浓度极低。体外给予的 GSH 不能直接进入细胞内分解,但产生的氨基酸和肽可转入细胞,经谷氨酸半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶连续催化反应,在细胞内合成 GSH,导致细胞内 GSH 浓度适当增高,从而实现其抗氧化损伤作用^[7]。本研究经 GSH 干预后,可明显降低肝、脑、肾组织的 MDA 含量,此研究剂量的 GSH 可减少 MDA 的生成,减轻锰所致肝、脑、肾的氧化损伤。LA 是一种代谢型抗氧化剂,能透过血脑屏障,并与生物体内的还原型产物二氢硫辛酸(DHIA)共同清除几乎所有的活性氧和自由基^[8]。本研究经 LA 干预后,可明显降低脑 MDA 含量,并且脑 GSH-Px 活力明显升高,提示此研究剂量的 LA 可减少脑 MDA 生成,减轻锰所致急性脑氧化损伤,其保护机制可能是直接通过 LA 的抗氧化作用,反馈性地调节使抗氧化酶 GSH-Px 活力适应性增高,从而增强了脑组织拮抗锰氧化损伤的能力。

关于锰毒性的机制有多种,目前还未完全阐明,锰致机体氧化损伤是其中之一。本次实验的结果证实,锰可引起大鼠体内的氧化损伤,且抗氧化剂 GSH 和 LA 能在一定程度上拮抗锰引起的氧化损伤,对锰中毒的预防和治疗可能具有一定的意义。

参考文献:

[1] 褚金花,耿荣,张淑华,等.不同价态的锰对老年大鼠体内脂质过氧化的影响[J].首都医科大学学报,2004,25(1):1.
[2] 张平,孟尧均.分光光度法测定大鼠不同组织还原型 GSH 含量[J].中华实验外科杂志,1989,6(3):141-142.
[3] 万伯健.卫生毒理学[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1992.216-217.
[4] 夏奕明.改良红细胞还原型谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法—DTNB 直接法[J].卫生研究,1987,16(4):29.
[5] 冯华芳,高丽清.简易灵敏的超氧化物歧化酶测定方法[J].第三军医大学学报,1994,16(5):365-367.
[6] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein with the folin phenol reagent[J]. Biol Chem, 1951, 193: 265-267.
[7] 王敏彦,魏素珍,姜玲玲.抗氧化酶及脂质过氧化物对机体衰老过程影响的模糊综合评判[J].数理医药杂志,2000,13(1):21-22.
[8] Packer L, Witt ET, Trirschler HJ. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant[J]. Free Radical Biol Med, 1995, 19: 227-235.