

氨基胍对山羊内毒素血症心肌抗氧化能力的影响

刘朝明, 杨红, 石达友, 刘静, 郭剑英, 李英, 潘家强, 唐兆新
(华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

摘要:为探讨自由基在山羊内毒素血症发病机理中的作用,将48只山羊随机分为4组,每组12只,分别为生理盐水对照组(SL)、内毒素组(LPS)、氨基胍保护组(LPS + AG)和氨基胍组(AG). 分别在处理后第3和6 h 每组各宰杀6只,制备心肌组织匀浆,检测心肌中总超氧化物歧化酶(T-SOD)、铜锌超氧化物歧化酶(Cu-Zn-SOD)、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)和过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)含量的变化. 结果显示,内毒素血症时山羊心肌中超氧化物歧化酶(SOD)、CAT活性和T-AOC降低,MDA含量明显升高,而氨基胍保护组超氧化物歧化酶、CAT活性和T-AOC以及MDA含量与内毒素组差异显著($P < 0.05$). 该试验表明由于自由基的增多而引起的脂质过氧化损伤在山羊内毒素血症发病机理中起着重要的作用,氨基胍可有效拮抗脂质过氧化造成的损伤.

关键词:氨基胍; 内毒素; 山羊; 心肌; 抗氧化能力
中图分类号:S856.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-411X(2010)01-0079-04

Effect of Aminoguanidine on Myocardium Antioxidant Capacity in Goats with Endotoxemia

LIU Zhao-ming, YANG Hong, SHI Da-you, LIU Jing,
GUO Jian-ying, LI Ying, PAN Jia-qiang, TANG Zhao-xin
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:To study the role of free radical on pathogenesis of endotoxemia in goats, Forty-eight goats were divided randomly into 4 groups of 12 goats in each group, namely normal control, LPS group, LPS + AG group, and AG group. Six goats of every group were killed at 3 and 6 h after the beginning of experiment. The changes of the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity and the content of MDA in myocardium were detected respectively. The results showed that in goats with endotoxemia the activity of SOD, T-AOC and CAT in myocardium decreased, the content of MDA in myocardium significantly increased after LPS challenge. Compared with the LPS group the situation of aminoguanidine treatment group was significantly improved. The results indicated that, lipid peroxidation damage in the goat caused by the over-produced free radicals played an important role in the pathogenesis of endotoxemia. Aminoguanidine could effectively antagonise lipid peroxidation damage.

Key words: aminoguanidine; endotoxin; goat; myocardium; antioxidant capacity

正常生理状态下,机体内存在一整套完善的抗氧化系统,主要的抗氧化酶包括:超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GR-PX)和谷胱甘肽还原酶(GR)等^[1-2]. 抗氧化酶能及时清除体内自由基,使机体免受损害,自由基的产生与清除保持动态平衡. 学者在大鼠、山羊、家兔

等动物内毒素血症时研究发现,氧自由基参与组织细胞的损伤,且主要损伤细胞膜、细胞膜内的酶及细胞核中的 DNA 等多种细胞成分.近几年,氨基胍广泛地应用于实验性糖尿病、内毒素性休克和炎症的治疗过程中,在相当一部分试验中显示了其有益的作用^[3-4].氧自由基(OFR)可作用于细胞膜及亚细胞器膜上的多不饱和脂肪酸(PUFA)而引起脂质过氧化损害^[5].一方面自由基与膜上的酶和受体共价结合,改变了膜成分的活性及其结构;另一方面 PUFA 发生过氧化作用而形成丙二醛(MDA),MDA 与膜脂质或蛋白上的游离氨基交联生成 schiffs 碱,导致膜结构改变^[6].内毒素血症中自由基生成增多的机制尚不十分明确,许多学者认为可能与内毒素直接作用、组织缺血及机体清除功能下降等因素有关,氨基胍作为细胞保护剂在抗各类休克时已广泛应用,但其保护机理仍不十分清楚.本试验旨在通过人工复制山羊内毒素模型,观察内毒素血症山羊的心肌中各种抗氧化酶活性以及总抗氧化能力的变化,以揭示内毒素对心肌抗氧化能力的影响.

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Eppendorf5804R 型低温高速冷冻离心机(德国);UV-8500 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器公司);MODEL925REL#10 超低温冰箱(美国 Thermo Forma 公司);DY-89I 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所).

1.2 药品与试剂

氨基胍、大肠杆菌(*Escherichia coli* O₁₁₁B₄)内毒素脂多糖(LPS)、蔗糖、甘露醇、牛血清白蛋白、HEPES、乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)及考马斯亮蓝(G-250)购自 Sigma 公司.MDA、SOD 和 CAT 试剂盒,购自南京建成生物工程研究所,其余试剂为国产分析纯.

1.3 动物分组与处理

健康本地山羊 48 只,购自广州增城种羊场,体质量(9.99 ± 1.23) kg,雌雄各半,随机分为 4 组,氨基胍(AG)组、内毒素(LPS)组、氨基胍保护(AG + LPS)组和生理盐水(SL)对照组. AG 组颈静脉注射 AG 25 mg/kg(按体质量给药,下同),LPS 组颈静脉注射 LPS 1 mg/kg,AG + LPS 组颈静脉预先注射 AG 25 mg/kg,0.5 h 后颈静脉注射 LPS 1 mg/kg,SL 组注射等量生理盐水.每组分别在处理后第 3 和 6 h 各宰杀 6 只羊.

1.4 10%心肌组织匀浆的制备

参照文献[7]方法并略加改进.取样品 1 g,用生

理盐水冲洗干净,按样品质量加 9 倍体积的匀浆液,在 4 °C 冰浴中用眼科剪剪碎,用匀浆器匀浆备用.匀浆液含 220 mmol/L 甘露醇,70 mmol/L 蔗糖,2 mmol/L HEPES,0.5 mg/mL 牛血清白蛋白,1 mmol/L 四羧酸螯合剂.试验前分别用 0.5 和 1.0 mol/L KOH 溶液将 pH 调至 7.4.

1.5 测定项目与方法

总抗氧化能力(T-AOC):FRAP 法;SOD 活性:黄嘌呤氧化酶法^[8];MDA 含量:硫代巴比妥酸比色法^[9];CAT:紫外分光光度法^[10].严格按试剂盒说明的操作步骤进行.

1.6 数据处理

数据用 $\bar{x} \pm SE$ 表示,运用 SPSS 统计分析软件统计各组的平均值和标准误,通过 Duncan's 新复极差检验法比较各组间的差异.

2 结果

2.1 LPS 与 AG 对山羊心肌组织 T-AOC 的影响

从表 1 可以看出,3 h 时 LPS 组的 T-AOC 明显降低,应用 AG 进行保护后,T-AOC 明显增强,LPS 组与 SL 组相比存在显著的差异($P < 0.05$),LPS 组、AG + LPS 组与 AG 组相比存在显著的差异($P < 0.05$),AG + LPS 组和 AG 组与 SL 组相比无显著差异($P > 0.05$).6 h 时 LPS 组的 T-AOC 降得更低,与其他各组相比均存在显著的差异($P < 0.05$).

表 1 LPS 与 AG 对山羊心肌组织总抗氧化能力(T-AOC)的影响¹⁾

Tab. 1 Effect of LPS and AG on T-AOC in the goat myocardium U · mg⁻¹

处理	T-AOC	
	3 h	6 h
SL	1.253 ± 0.128a	1.055 ± 0.144a
LPS	0.737 ± 0.112b	0.286 ± 0.02b
AG + LPS	1.452 ± 0.115ab	1.321 ± 0.173a
AG	1.449 ± 0.214ac	1.315 ± 0.176a

1) 样本数 $n = 6$,表中同列数据后标有不同字母者表示组间差异显著($P < 0.05$);标有相同字母者,表示组间差异不显著($P > 0.05$),Duncan's 新复极差检验

2.2 LPS 与 AG 对山羊心肌组织 CAT 活性的影响

由表 2 可见,3 h 时 LPS 组的 CAT 活性明显降低,应用 AG 进行保护后,CAT 活性明显增强,LPS 组与其他各组相比均存在显著的差异($P < 0.05$),6 h 时 LPS 组的 CAT 活性降得更低,与其他各组相比均存在显著的差异($P < 0.05$).

表 2 LPS 与 AG 对山羊心肌组织 CAT 活性的影响¹⁾

Tab.2 Effect of LPS and AG on CAT in the goat myocardium $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$

处理	CAT 活性	
	3 h	6 h
SL	209.33 ± 10.42a	186.67 ± 14.11a
LPS	115.21 ± 19.05b	83.48 ± 14.44b
AG + LPS	214.26 ± 21.40a	187.51 ± 17.03a
AG	238.78 ± 27.22a	194.07 ± 12.69a

1) 样本数 $n=6$, 表中同一列内标有不同字母者表示组间差异显著 ($P<0.05$); 标有相同字母者, 表示组间差异不显著 ($P>0.05$), Duncan's 新复极差检验

表 3 LPS 与 AG 对山羊心肌组织 T-SOD、Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性的影响¹⁾

Tab.3 Effect of LPS and AG on T-SOD、Cu-Zn-SOD and Mn-SOD in the goat myocardium $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$

处理	T-SOD 活性		Cu-Zn-SOD 活性		Mn-SOD 活性	
	3 h	6 h	3 h	6 h	3 h	6 h
SL	62.001 ± 2.887a	58.506 ± 0.866a	36.063 ± 1.733a	36.244 ± 1.299	25.938 ± 1.732a	22.262 ± 1.155a
LPS	31.417 ± 0.870b	39.345 ± 1.675b	19.543 ± 1.361b	28.467 ± 1.444b	11.874 ± 0.577b	10.878 ± 0.577b
AG + LPS	58.001 ± 1.155a	55.427 ± 1.940a	28.278 ± 1.273a	35.933 ± 1.213a	29.723 ± 1.732a	19.494 ± 1.732a
AG	63.333 ± 3.180a	61.766 ± 2.038a	35.930 ± 0.967a	36.506 ± 1.327a	26.401 ± 1.732a	25.261 ± 2.309a

1) 样本数 $n=6$, 表中同列数据后标有不同字母者表示组间差异显著 ($P<0.05$); 标有相同字母者, 表示组间差异不显著 ($P>0.05$), Duncan's 新复极差检验

2.4 LPS 与 AG 对山羊心肌 MDA 含量的影响

如表 4 所示, 3 h 时 LPS 组的 MDA 含量明显升高, 应用 AG 进行保护后, MDA 含量明显降低, LPS 组与其他各组相比均存在显著的差异 ($P<0.05$), 6 h 时 LPS 组随着时间的延长 MDA 含量继续升高, 与其他各组相比仍存在显著的差异 ($P<0.05$).

表 4 LPS 与 AG 对山羊心肌组织 MDA 含量的影响¹⁾

Tab.4 Effect of LPS and AG on MDA content in the goat myocardium $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$

处理	b(MDA)	
	3 h	6 h
SL	0.781 ± 0.069a	0.872 ± 0.197a
LPS	1.750 ± 0.231b	2.881 ± 0.245b
AG + LPS	1.175 ± 0.219a	1.158 ± 0.248a
AG	0.791 ± 0.116a	0.828 ± 0.101a

1) 样本数 $n=6$, 表中同列数据后标有不同字母者表示组间差异显著 ($P<0.05$); 标有相同字母者, 表示组间差异不显著 ($P>0.05$), Duncan's 新复极差检验

3 讨论

3.1 内毒素对山羊心肌 MDA 含量的影响

MDA 是反映氧化损伤的指标之一, 其生成量随氧自由基生成的增加而增加^[11-12]. 自由基通过与细

2.3 LPS 与 AG 对山羊心肌组织 T-SOD、Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性的影响

从表 3 可以看出, 3 h 时 LPS 组的 T-SOD、Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性明显降低, 应用 AG 进行保护后, T-SOD, Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性明显增强, LPS 组与其他各组相比均存在显著的差异 ($P<0.05$). 6 h 时 LPS 组的 T-SOD、Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性有所升高, 但 LPS 组与其他各组相比仍存在显著的差异 ($P<0.05$).

胞和亚细胞器膜磷脂中的多不饱和脂肪酸 (PUFA) 经链式或支链反应生成一系列脂质过氧化产物, 引起细胞结构和功能的破坏, 其反应终产物 MDA 可与类脂、蛋白质形成交联物. 因此, 测定组织 MDA 含量可估价组织脂质过氧化损伤程度和氧自由基的生成情况. 本试验结果表明应用 LPS 处理后机体自由基产生量增多, 自由基清除能力下降, 使山羊心肌脂质过氧化加重, MDA 含量明显上升.

3.2 内毒素对山羊心肌 SOD 活力的影响

SOD 是体内最重要的自由基清除剂之一. 机体内主要有 3 种 SOD, 一种是以 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 为活性中心, 存在于胞浆中的 Cu-Zn-SOD; 一种是以 Mn^{4+} 为活性中心存在于线粒体中的 Mn-SOD; 还有一种是以 Fe^{2+} 为活性中心的 Fe-SOD. SOD 能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应, 消除体内氧自由基的派生源, 减轻自由基链式反应对机体的损害. Cu-Zn-SOD 在体内能够清除 O_2^- 的毒害作用, 是一种保护性组分, 所以 Cu-Zn-SOD 在防御氧的毒性、抗辐射损伤、预防衰老和防治肿瘤和炎症方面有重要作用. 机体内的 Cu-Zn-SOD 不仅可以清除许多酶系统产生的氧自由基, 并在降低细胞膜不饱和脂肪酸脂质过氧化过程中发挥着重要的作用^[13]. SOD 作为体内自由基清除生物酶, 在国内外均得到广泛重视, LPS 处理后,

由于引起血液循环障碍,使供氧下降而发生自动氧化,而使超氧自由基剧增,引发病理性脂质过氧化反应,从而加速生物膜的破坏,本试验表明 LPS 组心肌的 T-SOD, Cu-Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性明显降低,应用 AG 进行保护后,它们的活性明显增强, LPS 组与其他各组相比均存在显著的差异($P < 0.05$),这是由于 LPS 处理后心肌脂质过氧化反应加速导致 SOD 活力急剧下降.由此可见单独应用 AG 能较好地保持体内具有较高的 SOD 活性,这说明了 AG 不但可以直接清除自由基,还可以维持体内具有较高的 SOD 活性,能提高机体的抗氧化能力.

3.3 内毒素对山羊心肌 T-AOC 的影响

T-AOC 是近几年研究发现的用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标, T-AOC 的大小可代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态,是反映机体抗氧化功能的一个良好指标.本试验表明 AG 对 LPS 引起的内毒素血症具有一定的拮抗作用,能提高心肌 T-AOC,减轻氧自由基诱发的脂质过氧化损伤.

3.4 内毒素对山羊心肌 CAT 的影响

CAT 是生物体的抗氧化酶之一, CAT 能清除过氧化氢,保护线粒体膜的结构完整^[14]. CAT 的主要生理作用就是催化对生物体有毒害作用的 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,使得 H_2O_2 不至于与 $O\cdot$ 在螯合物作用下反应生成非常有害的 $\cdot OH$,以减少自由基和过氧化脂质的形成,因而减少过氧化物对机体的损害,在体内起到解毒和保护巯基的作用. CAT 在阻断自由基链式反应中起着关键作用,因此 CAT 活力的高低直接影响机体的抗氧化能力和健康状况.本次试验表明 AG 能提高心肌中 CAT 活力,有效清除体内组织中多余的自由基,对组织和细胞起保护作用; AG 对 LPS 引起的内毒素血症具有一定的对抗作用,能提高机体 CAT 活力,消除体内过多的氧自由基,以减轻氧自由基诱发的脂质过氧化损伤,对组织细胞起保护作用.

参考文献:

[1] YANG C F, SHEN H M, ONG C N. Ebselen induces apop-

toxis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols[J]. Archive of Biochemistry and Biophysics, 2000, 374(2):142-152.

- [2] NUTTAL K L. Elemental selenium and glutathione reductase[J]. Medical Hypotheses, 1985, 16(2):155-158.
- [3] GROSSMAN C J. Interration between the gonadal steroids and the immune system[J]. Science, 1995, 227:257-261.
- [4] YANG C F, SHEN H M, ONG C N. Intracellular thiol depletion causes mitochondrial permeability transition in ebselen-induced apoptosis[J]. Archive of Biochemistry and Biophysics, 2000, 380(2):319-330.
- [5] GAO X Y, ZHANG J S, ZHANG L D. Hollow sphere selenium nanoparti-cles: Their *in vitro* anti hydroxyl radical effect[J]. Advanced Materials, 2002(14):290-293.
- [6] GOODE H F, WEBSTER N R. Free radical peroxide formation and membrane damage endotoxin-poisoned mice[J]. Microbiol Immunol, 2004, 25(3):229-244.
- [7] 唐兆新, 高洪, 陈万芳. 山莨菪碱对内毒素诱导山羊肺脂质过氧化损伤的影响[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(4):371-376.
- [8] OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction[J]. Biochem, 2005, 95:351-358.
- [9] POCKER L. Oxygen radicals in biological systems[J]. Methods of enzymology, 2004, 105(1):3-5.
- [10] BERMEYER H U, BERMEYER J, GRABI M. Catalase in methods of enzymatic analysis[J]. Biochem, 1983, 3(13):273-282.
- [11] 陈瑗, 周玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:353-355.
- [12] 唐兆新, 王炫英, 高洪. 山莨菪碱对山羊内毒素休克时肝脏自由基损伤的保护机理[J]. 中国兽医学报, 1998, 118(5):490-493.
- [13] MEDEIROS M H, WEFERS H, SIES H. Generation of excited species catalyzed by horseradish peroxidase or hemin in the presence of reduced glutathione and H_2O_2 [J]. Free Radic Biology Medicine, 2006, 3(2):107-109.
- [14] 毕铭华, 张淑文, 王宝恩, 等. 大鼠内毒素血症早期肝细胞线粒体的氧化损伤及中药 912 液的干预作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2001, 10(2):79-81.

【责任编辑 柴 焰】