

## • 基础研究 •

## L-精氨酸对糖尿病大鼠肝损伤的保护作用

董敏 陈秀芳 郑巧敏

**【摘要】** 目的 探讨 L-精氨酸(L-Arg)对糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用。方法 给大鼠腹腔注射四氧嘧啶制备糖尿病模型,随机分为糖尿病组、L-Arg 治疗组及正常对照组;用药 4 周末处死大鼠,检测肝细胞线粒体超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量,肝组织细胞一氧化氮合酶(NOS)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  活性以及 NO 含量。结果 与正常组比较,糖尿病组大鼠肝细胞线粒体 Mn-SOD、GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量显著升高,肝组织细胞内 NOS、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  活性明显降低;与糖尿病组比较,L-Arg 治疗组大鼠肝细胞线粒体 Mn-SOD、GSH-Px 活性明显升高,且肝组织细胞内 NOS、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  活性及 NO 含量显著升高。结论 L-Arg 对糖尿病大鼠肝脏损伤具有一定的保护作用。

**【关键词】** 糖尿病;左旋精氨酸;肝;自由基; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

## L-arginine in protecting diabetic rats from liver injury

DONG Min, CHEN Xiufang, ZHENG Qiaomin

Central Laboratory of Biology, Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325035, China

**【Abstract】** Objective To study the efficacy of L-arginine in preventing and treating liver injury of experimental diabetic rats. Methods The diabetic rat models were established by injecting alloxan(160mg/kg, ip). Rats were divided into three groups at random, diabetes group, L-arginine treatment group and normal group. The rats were sacrificed 4 weeks after using L-arginine(300 mg/kg). The activities of Mn-SOD, glutathione peroxidase(GSH-Px) and the levels of MDA in mitochondria of liver of the three groups were determined. The activities of nitric oxide synthase (NOS),  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  and the contents of NO in liver tissues were examined. Results The activities of Mn-SOD and GSH-Px decreased significantly and the levels of MDA increased remarkably in mitochondria of liver, and the activities of NOS,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  in liver tissues also reduced obviously in diabetic rats compared with those in control group. The activities of Mn-SOD and GSH-Px were increased remarkably in mitochondria of liver, and the activities of NOS,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  and the contents of NO also increased significantly in liver tissues in L-arginine treatment group compared with those in diabetic group. Conclusions There is oxidative damage caused by oxygen free radicals in liver of diabetic rats. L-arginine can enhance anti-oxidation function and protect liver from oxidative damage to some degree.

**【Key words】** diabetes; L-arginine; liver; free radicals;  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

糖尿病并发症累及多器官系统的功能损害。近年来,动物实验和临床研究均显示活性氧自由基介

导的氧化损伤是糖尿病及其并发症发生发展的共同机制之一。左旋精氨酸(L-arginine, L-Arg)是机体的自由基清除剂<sup>[1]</sup>,良好的免疫功能调节剂,并能兴奋胰岛β细胞分泌胰岛素<sup>[2]</sup>;而且其作为一氧化氮(nitric oxide, NO)合成的前体物质,能够促进体内NO的合成。NO是一种新型的细胞信息分子,具有抑制脂质过氧化和糖基化终末产物形成等作用<sup>[3]</sup>。我们以往的研究发现 L-Arg 对糖尿病大鼠心肌、肾脏、大脑、睾丸组织自由基损伤具有一定的拮抗作用<sup>[4,5]</sup>,但糖尿病状态下肝脏生化功能有何改变及

收稿日期:2006-05-08

基金项目:温州市科技计划项目(S2000A08)

作者单位:325035 温州市,温州医学院生物学实验教学中心(董敏、郑巧敏);基础医学院生化教研室(陈秀芳)

作者简介:董敏,女,1975年1月生,浙江温州人,医学学士,实验师。

Tel:0577-86689795, E-mail: dmjwh@wzmc. net

通讯作者:陈秀芳, Tel:0577-86689979

L-Arg 对肝脏作用如何,迄今未见详细报道。本研究拟通过对糖尿病大鼠给予外源性 L-Arg,观察 L-Arg 对糖尿病大鼠肝细胞线粒体超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, Mn-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malonyldialdehyed, MDA)含量,以及肝组织细胞中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性和 NO 含量的影响,旨在探讨 L-Arg 在防治糖尿病大鼠肝脏损伤中的作用。

1 材料与方 法

1.1 动物 清洁级(2级)SD 大鼠 40 只,体重 180~220g,2 月龄(由温州医学院实验动物中心提供)。

1.2 方法 (1)药品与试剂:四氧嘧啶(Alloxan)、L-Arg 均为美国 Sigma 公司产品;NO、NOS、Mn-SOD、GSH-Px、MDA 及 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 等检测试剂盒均购自南京建成生物工程公司;血糖仪及测试条由北京怡成生物电子技术有限公司提供;其余试剂均为国产分析纯。(2)模型制备:随机取 10 只大鼠作为正常对照组(NC 组),余 30 只禁食 12h 后,用四氧嘧啶 160mg/kg 一次性左下腹腔注射,72h 后取尾血用快速血糖仪测血糖,≥16.8mmol/L 的为糖尿病大鼠。再将糖尿病大鼠随机分为两组:糖尿病未治疗组(DM 组),L-Arg 治疗组(L-Arg 组);每只每天腹腔注射 L-Arg,剂量为 300mg/kg 体重。对照组及糖尿病未治疗组每只每天腹腔注射等体积生理盐水,各组大鼠每天在规定时间内用药,于同等条件下饲养 4 周。(3)标本采集:大鼠给药处理 4 周后,股动脉放血处死,取肝组织用 4℃ 预冷生理盐水洗净血液,滤

纸吸干水分后称重,每克肝组织加 10ml 生理盐水,置匀浆机上 10 000 r/min×10s×3 次,制备 10% 匀浆,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再 10 000 r/min 离心 15 min,制备肝细胞线粒体,-20℃ 保存待测。(4)指标测定:Mn-SOD 活性用黄嘌呤氧化酶法、GSH-Px 活性用化学比色法、MDA 含量用硫代巴比妥酸法、NO 含量用硝酸还原酶法、NOS 活性用化学比色法、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 酶活性用定磷法测定,均按试剂盒说明书操作。用双缩脲法测定蛋白质含量。

1.3 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用完全随机方差分析(One-way ANOVA)组间 LSD(least-significant difference)检验。

2 结 果

2.1 L-Arg 对糖尿病大鼠肝细胞线粒体 Mn-SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 见表 1。糖尿病组大鼠肝细胞线粒体 Mn-SOD、GSH-Px 活性较正常对照组显著降低(均  $P < 0.01$ ),MDA 含量明显升高( $P < 0.01$ ),因而抗氧化指标 GSH Px/MDA 比值显著降低。给予外源性 L-Arg 治疗后,Mn-SOD、GSH-Px 活性显著升高(分别为  $P < 0.001, P < 0.05$ ),MDA 含量略下降,GSH Px/MDA 比值略有升高。

2.2 L-Arg 对糖尿病大鼠肝组织细胞 NOS 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 NO 含量的影响 见表 2。糖尿病大鼠肝组织细胞 NOS、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性较对照组明显下降(分别为  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$ );补充外源性 L-Arg 后,肝组织细胞 NOS、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 NO 含量均显著升高(分别

表 1 L-Arg 对糖尿病大鼠肝细胞线粒体 Mn-SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	Mn-SOD(kU/g pro)	GSH-Px(kU/g pro)	MDA( $\mu$ mol/g pro)	GSH Px/MDA
正常对照组	11.91±4.10*	36.21±7.75*	3.88±1.65*	10.60±4.95 <sup>△</sup>
糖尿病组	6.65±1.76	25.01±5.75	5.38±0.80	4.74±1.21
L-Arg 治疗组	13.15±4.59 <sup>△</sup>	32.27±8.55*	4.77±0.56	6.92±2.51

注:与糖尿病组比较,\* $P < 0.05$ ,\* $P < 0.01$ ,<sup>△</sup> $P < 0.001$ ; pro:protein

表 2 L-Arg 对糖尿病大鼠肝细胞 NOS 和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	NOS(kU/g pro)	NO( $\mu$ mol/g pro)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase [mmol Pi/(g pro·h)]	Ca <sup>2+</sup> -ATPase [mmol Pi/(g pro·h)]
正常对照组	0.60±0.07*	0.21±0.13	1.50±0.34*	1.45±0.25*
糖尿病组	0.48±0.06	0.18±0.08	1.15±0.18	1.18±0.20
L-Arg 治疗组	0.63±0.20*	0.33±0.10*	1.78±0.34 <sup>△</sup>	1.56±0.34*

注:与糖尿病组比较,\* $P < 0.05$ ,\* $P < 0.01$ ,<sup>△</sup> $P < 0.001$ ; pro:protein

为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

线粒体是真核生物细胞内一种重要而独特的细胞器,是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所,也是机体耗  $O_2$  的主要部位。在生物体内,90%以上的  $O_2$  在线粒体中被消耗。线粒体耗氧主要用于呼吸链(电子传递链)的氧化磷酸化过程生成 ATP 以供机体的能量需求,同时有约 2% 的  $O_2$  通过呼吸链电子漏生成活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) [6]。正常情况下,存在于线粒体中的 Mn-SOD 将  $O_2^-$  歧化成  $H_2O_2$ , GSH-Px 可利用 GSH 将  $H_2O_2$  还原生成  $H_2O$ , 使线粒体内活性氧自由基含量保持在生理浓度。糖尿病时长期高糖诱导下,线粒体超氧自由基产生过多 [7], 且 Mn-SOD、GSH-Px 等自由基清除酶发生了非酶性糖基化而活性降低,对  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  清除减少,  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  可通过一系列链锁式自由基反应生成更多的其他形式的自由基 [8], 使线粒体内自由基含量进一步升高。过多的自由基使线粒体膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应形成脂质过氧化物,后者分解产生 MDA, 使线粒体内 MDA 含量升高; MDA 可与线粒体的膜脂、膜蛋白交联形成 Schiff 氏碱使膜流动性降低 [9], 进而影响线粒体的电子传递和磷酸化过程,使 ATP 合成减少,影响细胞的功能。

NO 又称内皮衍生舒张因子(endothelium-derived relaxing factor),由 L-Arg 在 NOS 的催化作用下生成,是一个重要的信号转导分子,参与多种细胞功能的调节。有研究表明,适量的 NO 对氧自由基具有清除作用 [10], 而且 SOD 可以保护 NO 免受氧自由基失活 [11]。糖尿病时,由于 NOS、SOD 活性降低,自由基产生增多,致使 NO 含量也相应减少,进一步影响细胞功能。

$Na^+-K^+-ATPase$  和  $Ca^{2+}-ATPase$  对调节细胞膜内外离子平衡,维持膜的正常功能十分重要,两者的活性依赖于膜流动性并受 ATP 含量影响。糖尿病时过多的氧自由基使细胞膜流动性下降,且糖代谢障碍,可利用的供能 ATP 量减少,  $Na^+-K^+-ATPase$  和  $Ca^{2+}-ATPase$  活性降低,细胞发生  $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  超载和水积聚,进而导致细胞的形态结构和功能的异常。

本研究表明,糖尿病大鼠肝细胞线粒体 Mn-SOD、GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,肝细胞

NOS 及  $Na^+-K^+-ATPase$ 、 $Ca^{2+}-ATPase$  活性降低,提示糖尿病状态下肝细胞存在氧化损伤及能量供应障碍。而 L-Arg 能明显逆转上述变化,提示其能在一定程度上提高机体的抗氧化能力,拮抗脂质过氧化,改善肝细胞的能量代谢,发挥对糖尿病大鼠肝脏的保护作用。L-Arg 是一种多功能氨基酸 [12], 同时是合成 NO 的底物, L-Arg 对糖尿病大鼠肝脏的保护作用是否通过 NO 来实现,其机制尚待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 姜楨,郭克芳,董苏斐.左旋精氨酸与自由基的相互作用.临床麻醉杂志,2000,16:503-505.
- [2] Porte D. Beta-cells in type II diabetes mellitus. Diabetes, 1991,40:166-180.
- [3] Xiong Y, Li YJ, Deng HW. Protection of L-arginine against oxygen free radicals-injured rabbit aortic endothelium. Acta Pharmacol Sin, 1994,15:119-123.
- [4] 陈秀芳,雷康福,董敏,等. L-精氨酸对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用. 中国老年学杂志,2005,25:184-186.
- [5] 雷康福,陈秀芳,董敏,等. L-精氨酸对糖尿病大鼠肾脏、大脑、睾丸氧自由基和抗氧化水平的影响. 中国老年学杂志,2005,25:935-937.
- [6] 赵云罡,徐建兴.线粒体,活性氧和细胞凋亡.生物化学与生物物理进展,2001,28:168-171.
- [7] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, 2001,414:813-820.
- [8] Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev, 2001,53:135-159.
- [9] Mecocci P, Cherubini A, Beal MF, et al. Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain. Neurosci Lett, 1996,207:129-132.
- [10] Wink DA, Michell JB. Chemical biology of nitric oxide: insight into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med, 1998,25:434-456.
- [11] Ohishi K, Carmines PK. Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. J Am Soc Nephrol, 1995,5:1559-1566.
- [12] 葛奎,陆树良,青春. 精氨酸代谢及其对创面愈合的影响. 中国临床营养杂志,2005,13:48-51.