

## $\alpha$ -硫辛酸对高糖诱导 GK 大鼠肝氧化损伤的影响

丁倩<sup>1</sup>, 董媛<sup>1</sup>, 张福东<sup>1</sup>, 帅怡<sup>2</sup>, 王彦琴<sup>2</sup>, 蔡美琴<sup>1</sup>

**摘要:** [目的] 探讨  $\alpha$ -硫辛酸( $\alpha$ -LA)对高糖诱导 GK 大鼠肝氧化损伤的影响。[方法] 选用 GK 大鼠 36 只, 分为 6 组, 阴性对照组普通饮水、阳性对照组及 4 个干预组分别给予等量 30% 蔗糖饮水, 干预组分别给予不同剂量的  $\alpha$ -LA (25、50、75、100 mg/kg) 灌胃。干预 9 周后观察不同剂量的  $\alpha$ -LA 对高糖诱导下 GK 大鼠肝组织脂质过氧化水平、抗氧化酶活力以及肝线粒体活性氧(ROS)水平的影响。[结果] 阳性对照组大鼠丙二醛(MDA)和线粒体 ROS 水平明显高于阴性对照组( $P < 0.05$ ), 而超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平明显低于阴性对照组( $P < 0.05$ ), 提示高糖饮水明显增加了 GK 大鼠肝脏的氧化应激水平。在高糖诱导情况下, 各  $\alpha$ -LA 干预组与对照组比较, 给予 25 mg/kg 和 50 mg/kg 剂量的  $\alpha$ -LA 干预可以有效降低肝组织 MDA 浓度, 提高 SOD、GSH-P 活性以及降低肝线粒体 ROS 水平( $P < 0.05$ ), 其抗氧化损伤的效果好于 75 mg/kg 和 100 mg/kg 两个高剂量干预组。[结论] 25 mg/kg 和 50 mg/kg 剂量的  $\alpha$ -LA 对高糖诱导的 GK 大鼠肝组织的氧化损伤具有保护作用, 但这种保护作用并未呈现明显的剂量作用关系, 高剂量的  $\alpha$ -LA (75~100 mg/kg) 保护作用不如低剂量组。

**关键词:**  $\alpha$ -硫辛酸; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 活性氧

**Effects of  $\alpha$ -Lipoic Acid on Liver Oxidative Damage Induced by Hyperglycemia in GK Rats** DING Qian<sup>1</sup>, DONG Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Fu-dong<sup>1</sup>, SHUAI Yi<sup>2</sup>, WANG Yan-qin<sup>2</sup>, CAI Mei-qin<sup>1</sup> (1. Department of Nutrition, Medical College, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2. Division of Toxicology, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China). Address correspondence to CAI Mei-qin, E-mail: caimeiqin@sjtu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Abstract:** [Objective] To investigate the protective effects of  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA) on sucrose-induced liver oxidative damages in Goto-Kakizaki (GK) rats. [Methods] Thirty-six eight-week-old male GK rats were randomly divided into 6 groups: 1 negative control (no treatment), 1 positive control (30% sucrose solution), and 4 experimental (30% sucrose solution+daily  $\alpha$ -LA supplementation of 25, 50, 75, or 100 mg/kg by gavage, respectively) groups. Nine weeks after the interference, changes in lipid peroxidation concentrations, antioxidases activity, and reactive oxygen species (ROS) levels in liver mitochondria were recorded. [Results] The levels of malondialdehyde (MDA) and ROS increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the activities of superoxidase dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in mitochondria of liver decreased remarkably in the positive control rats compared with those of the negative control rats ( $P < 0.05$ ), which indicated that sucrose feeding obviously enhanced oxidative stress in the liver cells of GK rats. Compared with the positive control rats, the rats treated with 25 or 50 mg/kg  $\alpha$ -LA showed significant declines in the levels of MDA and ROS and increases in the activities of GSH-Px and SOD in mitochondria of rat liver ( $P < 0.05$ ), and the above antioxidative effects were superior to the similar indicators in the rats with 75 and 100 mg/kg  $\alpha$ -LA interference. [Conclusion]  $\alpha$ -lipoic acid within a certain range of concentration may have a protective effect on the oxidative damage in liver cells of sucrose-induced GK rats.

**Key Words:**  $\alpha$ -lipoic acid; malondialdehyde; superoxidase dismutase; glutathione peroxidase; reactive oxygen species

氧化应激,是指机体在遭受各种有害刺激时,氧化程度超出机体的清除能力,氧化系统和抗氧化系统失衡,从而导致组织氧化损伤。大量的研究发现,氧化应激与糖尿病及其并发症的发生和发展有密切关系<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -硫辛酸( $\alpha$ -lipoic acid,

$\alpha$ -LA)是一种高效的抗氧化剂,兼具水溶性和脂溶性,在人体中可以由肝脏和其他组织少量合成。 $\alpha$ -LA 能通过直接清除活性氧(ROS),促进维生素 C、维生素 E 和谷胱甘肽等外源性和内源性抗氧化剂的再生,螯合金属离子等途径起到高效抗氧化作用<sup>[2]</sup>。目前在德国, $\alpha$ -LA 已被批准作为治疗糖尿病神经病变的临床用药。 $\alpha$ -LA 在美国可以作为膳食补充剂以非处方药的形式被消费者购买<sup>[3]</sup>,每片能提供 50~500 mg 的  $\alpha$ -LA,是正常膳食摄入量的数百甚至上千倍<sup>[4]</sup>。对  $\alpha$ -LA 生理功能的研究已有 40 多年的历史,但对其作为外源性补充剂的研究近年才刚刚开始。本研究拟观察不同剂量的  $\alpha$ -LA 对高糖诱导 GK 大鼠

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 30872121)

[作者简介] 丁倩(1986—),女,硕士生;研究方向: 营养素与慢性病防治; E-mail: xyxy@shsmu.edu.cn

[通信作者] 蔡美琴教授, E-mail: caimeiqin@sjtu.edu.cn

[作者单位] 1. 上海交通大学医学院营养系,上海 200025; 2. 上海市疾病预防控制中心毒理室,上海 200336

肝组织氧化损伤的影响,探讨  $\alpha$ -LA 的抗氧化损伤作用以及可能有效的作用范围。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

7 周龄雄性 GK 大鼠 36 只,体重 230~310 g, GK 大鼠购自上海斯莱克动物有限公司,实验动物生产许可证: SCXK(沪)2007—0005,使用许可证: SYXK(沪)2007—0008。室温(22±3)℃,相对湿度 30%~70%,单笼喂养(长 46 cm×宽 31 cm×高 20 cm),每周更换 2 次,每天给予 12 h 正常光照。大鼠自由进食基础饲料,自由饮水。

GK 大鼠适应性喂养 1 周后,分为 6 组:阴性对照组、阳性对照组、4 个  $\alpha$ -LA 干预组(剂量分别为 25、50、75、100 mg/kg)。阴性对照组大鼠给予普通饮水,每周统计日均饮水量,阳性对照及各干预组按前一周阴性对照组大鼠日均普通饮水量给予等量 30% 蔗糖水,自由饮用。 $\alpha$ -LA 按各组干预剂量用羧甲基纤维素钠悬浮后每日上午 9 点灌胃给药,阴性对照组和阳性对照组仅给予等量羧甲基纤维素钠。

干预期为 9 周,周一上午固定时间称量各组大鼠体重,统计周体重增长情况。周一、五上午固定时间称量各组大鼠饲料摄入量,每周统计周饲料摄入量及总能量摄入量。总能量来源包括饲料及 30% 蔗糖饮水两部分。饲料配方为粗蛋白质 20%、粗脂肪 5%、水分 10%、矿物质 10%、碳水化合物 55%,能量密度为 14.31 kJ/g。总能量计算方式为:能量(kJ)=饲料摄入量×14.31+30% 蔗糖饮水量×0.3×4×4.184。周一一晚各组大鼠隔夜禁食,次日早晨行尾尖采血(针刺法),强生稳步型血糖仪测定空腹血糖。

1.2 试剂和仪器

蔗糖,购自国药集团化学试剂有限公司; $\alpha$ -LA、罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123)及双氢罗丹明 123(Dihydro-rhodamine123, DHR123)购自美国 Sigma 公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物工程公司;FACSscan 流式细胞仪,购自美国 BD 公司;HP8453 型紫外-可见分光光度计,购自美国惠普公司。

1.3 方法和指标

干预结束,各组大鼠经 60 mg/kg 戊巴比妥麻醉后处死,取 2 g 肝叶组织用 0.86% 冷生理盐水制成 10% 组织匀浆,测定以下肝氧化应激指标。

MDA 含量测定:采用硫代巴比妥酸法测定,按照试剂盒说明书,用分光光度计分别在 450 nm 处和 530 nm 处测定 MDA 的吸光度值,并分别计算 MDA 的含量。SOD 活性测定:采用黄嘌呤氧化酶法。GSH-Px 活力测定:采用化学比色法,均按试剂盒说明书操作。

肝线粒体 ROS 浓度的测定:先提取肝脏线粒体,步骤如下。取 1 g 新鲜肝叶组织,冰浴剪碎后加入 10 mL 4℃ 由蔗糖 250 mmol/L、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)0.5 mmol/L、羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)10 mmol/L 配成的 pH 值为 7.4 的分离液,匀浆器研磨后用细胞过滤器过滤,过滤后的匀浆于 4℃、1 000×g 离心 10 min,取上清液后再次 4℃、1 000×g 离心 10 min。弃上清液取沉淀后用分离液重悬,得到较为纯净的线粒体。采用流式细胞术检测线粒体 ROS 水平的变化。采用双氢罗丹明 123 为荧光探针,加入二甲基亚砜(DMSO)稀释成 0.2 mmol/L 的应用液,取 30  $\mu$ L 该应用液加入 1 mL 上述制成的线粒体悬液,37℃ 孵育 30 min 后于 4℃、10 000×g 下离心 5 min。取沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后上流式细胞仪检测,检测条件:激发波长 488 nm,发射波长 525 nm。实验独立重复做 3 次,结果以平均荧光值表示,即 ROS 水平用 DHR123 的荧光强度表示。

1.4 统计分析方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 GK 大鼠体重和能量摄入比较

实验期间各组大鼠的体重均有增加,但是各组间体重比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。蔗糖饮水未对 GK 大鼠的体重产生影响(表 1)。阴性对照组大鼠每周总能量摄入量在整个实验期间均明显低于其他饮蔗糖水组( $P<0.05$ )。其余各组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )(表 2)。

表 1 各组 GK 大鼠体重变化情况( $\bar{x}\pm s$ , g)

| 组别                         | 初始     | 第 1 周  | 第 3 周  | 第 5 周  | 第 7 周  | 第 9 周  |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 阴性对照组                      | 278±22 | 281±25 | 289±22 | 315±20 | 327±23 | 339±22 |
| 阳性对照组                      | 277±22 | 277±16 | 297±16 | 316±16 | 334±19 | 338±22 |
| $\alpha$ -LA 干预组-25 mg/kg  | 276±22 | 278±15 | 292±17 | 310±16 | 326±17 | 333±14 |
| $\alpha$ -LA 干预组-50 mg/kg  | 275±22 | 277±18 | 296±16 | 306±17 | 322±18 | 328±21 |
| $\alpha$ -LA 干预组-75 mg/kg  | 274±22 | 279±21 | 296±18 | 309±21 | 329±27 | 335±31 |
| $\alpha$ -LA 干预组-100 mg/kg | 276±22 | 276±21 | 295±18 | 308±17 | 326±17 | 330±22 |

表 2 各组 GK 大鼠周总能量摄入量( $\bar{x}\pm s$ , kJ)

| 组别                         | 第 1 周      | 第 3 周      | 第 5 周      | 第 7 周      | 第 9 周      |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 阴性对照组                      | 1 774±318  | 1 699±285  | 1 761±222  | 1 862±343  | 1 996±326  |
| 阳性对照组                      | 2 013±255* | 1 996±238* | 2 368±272* | 2 452±356* | 2 653±326* |
| $\alpha$ -LA 干预组-25 mg/kg  | 1 966±176* | 1 833±197* | 2 251±142* | 2 238±184* | 2 272±201* |
| $\alpha$ -LA 干预组-50 mg/kg  | 2 021±159* | 2 075±276* | 2 431±272* | 2 460±326* | 2 573±285* |
| $\alpha$ -LA 干预组-75 mg/kg  | 2 243±393* | 2 079±155* | 2 527±218* | 2 544±209* | 2 527±234* |
| $\alpha$ -LA 干预组-100 mg/kg | 1 854±218* | 2 071±159* | 2 481±172* | 2 489±201* | 2 582±247* |

[注]\*:和阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

## 2.2 各组 GK 大鼠肝组织匀浆 MDA 水平、SOD 及 GSH-Px 活力及 ROS 浓度比较

表 3 可见, 阳性对照组大鼠肝组织 MDA 和肝线粒体 ROS 水平明显高于阴性对照组, 而 SOD、GSH-Px 明显低于阴性对照组, 提示高糖饮水明显增加了大鼠肝脏的氧化应激水平。在高糖诱导情况下, 不同剂量  $\alpha$ -LA 干预结果显示, 与阳性对照组相比较, 给予 25 mg/kg 和 50 mg/kg 中低剂量  $\alpha$ -LA 的干预效果好于 75 mg/kg 和 100 mg/kg 两个高剂量组。当给予低浓度的

25 mg/kg  $\alpha$ -LA 干预时, 血清 MDA 水平低于阴性对照组, SOD 及 GSH-Px 活力高于阴性对照, ROS 浓度也低于阴性对照, 提示虽然喂饲高糖饮食, 但是因为  $\alpha$ -LA 的干预使肝细胞和肝线粒体损伤程度减轻。当  $\alpha$ -LA 的干预剂量增加到 75 mg/kg 和 100 mg/kg 时, SOD 反而有所下降, ROS 水平有所增加。综合分析各指标可见, 25 mg/kg 和 50 mg/kg 中低剂量组的  $\alpha$ -LA 干预效果好于 75 mg/kg 和 100 mg/kg 两个高剂量组。

表 3 MDA、SOD、GSH-Px 活力及肝线粒体 ROS 浓度 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                   | MDA (nmol/mg 蛋白) | SOD (U/mg 蛋白)     | GSH-Px (U/mg 蛋白)  | ROS                  |
|----------------------|------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 阴性对照组                | 1.54 $\pm$ 0.45  | 394.0 $\pm$ 73.6  | 183.0 $\pm$ 49.3  | 75.78 $\pm$ 9.98     |
| 阳性对照组                | 1.89 $\pm$ 0.40* | 372.9 $\pm$ 59.5* | 171.7 $\pm$ 28.5* | 114.066 $\pm$ 11.87* |
| $\alpha$ -LA 干预组-25  | 1.43 $\pm$ 0.43# | 396.5 $\pm$ 20.8# | 229.6 $\pm$ 45.2# | 73.68 $\pm$ 13.75#   |
| $\alpha$ -LA 干预组-50  | 1.51 $\pm$ 0.62# | 410.7 $\pm$ 88.3# | 238.4 $\pm$ 57.7# | 90.26 $\pm$ 16.72#   |
| $\alpha$ -LA 干预组-75  | 1.87 $\pm$ 0.27  | 359.5 $\pm$ 26.7  | 251.8 $\pm$ 30.9# | 97.29 $\pm$ 7.74#    |
| $\alpha$ -LA 干预组-100 | 1.96 $\pm$ 0.46  | 387.6 $\pm$ 43.1  | 225.1 $\pm$ 53.3# | 96.01 $\pm$ 9.19#    |

[注]\*: 和阴性对照组比较,  $P < 0.05$ ; #: 和阳性对照组比较,  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

GK 大鼠是通过连续数代近亲繁殖葡萄糖不耐受的 Wistar 大鼠而培育出的自发性非肥胖性 2 型糖尿病鼠种。该鼠具有胰岛素分泌受损, 空腹高血糖, 肝糖原生成增多, 肝脏、肌肉和脂肪组织中度胰岛素抵抗等特点, 晚期合并各种并发症, 与人类 2 型糖尿病进展极为相似<sup>[5]</sup>。

大量的流行病学研究表明, 食糖消费量与糖尿病患病率呈正相关<sup>[6]</sup>。很多动物实验也表明两者存在关联: 高糖饮食能够迅速诱导大鼠产生代谢综合征的症状<sup>[7]</sup>。蔗糖能够通过增加氧化应激而加速大鼠胰腺、肝脏等组织脏器的病变进程。葡萄糖及其衍生物摄入增加会造成  $\beta$  氧化和线粒体呼吸作用增强, 进而引发氧化应激。在线粒体的呼吸过程中, 分子氧对三磷酸腺苷 (ATP) 的生成至关重要。在正常的氧化磷酸化过程中, 大约有 0.4%~4.0% 的氧分子会转化为超氧阴离子自由基 ( $O_2^-$ ), 随后  $O_2^-$  会转化为其他活性氧。细胞中存在的内源性抗氧化系统会中和这些活性氧并维持氧化还原系统的平衡。当内源性抗氧化系统因为种种原因不能及时有效清除这些活性氧时就会出现氧化应激。本实验结果显示, 蔗糖饮水可明显增加 GK 大鼠肝脏的氧化应激水平, 表现在反映脂质过氧化水平的 MDA 含量上升, 反映机体的抗氧化能力的 SOD 及 GSH-Px 活力下降, 同时线粒体 ROS 水平上升, 提示可能 ROS 引发了线粒体膜电位的超极化。如果同时给予 25 mg/kg 的抗氧化剂  $\alpha$ -LA 干预能明显降低线粒体 ROS 水平, 使线粒体膜电位去极化。这些结果可能与  $\alpha$ -LA 能维持氧化还原系统的平衡, 抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 通路激活和胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 丝氨酸磷酸化, 保持胰岛素刺激的 IRS-1 酪氨酸磷酸化, 恢复胰岛素的敏感性有关<sup>[4]</sup>。

实验还发现, 25 mg/kg 和 50 mg/kg 中低剂量组的  $\alpha$ -LA 干预能明显减轻这种氧化应激, 且保护效果好于 75 mg/kg 和 100 mg/kg 两个高剂量组。这可能与  $\alpha$ -LA 及其还原物二氢硫辛酸 (DHLA) 也能产生某种促氧化作用有关: DHLA 能同时螯合铁和亚铁, 并将  $Fe^{3+}$  还原为  $Fe^{2+}$ , 促使铁从铁蛋白中剥

离, 加速 Fenton 反应中  $\cdot OH$  的生成, 从而增加  $Fe^{2+}$  介导的氧化损伤的危险性<sup>[8]</sup>; DHLA 在清除 ROS 时, 会产生比原来的 ROS 氧化能力更强的氧化中间产物如含硫自由基 (HSRS $\cdot$ ), 而 HSRS $\cdot$  能快速被  $O_2$  氧化导致  $O_2^-$  的产生<sup>[9]</sup>。此外, 线粒体通透性转变 (MPT) 能导致线粒体外膜破裂, 细胞间质组成物流失, 从而诱发细胞凋亡。促氧化剂、 $Ca^{2+}$  的积累以及有机物的磷酸化均能促进 MPT, 硫醇还原剂则能抑制 MPT。按此推论  $\alpha$ -LA 和 DHLA 应当能抑制 MPT, 但有体外实验表明, 二者在 0.01~0.1 mmol/L 下均能导致小鼠肝脏线粒体  $Ca^{2+}$  的累积, 促进 MPT, 且 DHLA 在丙酮酸作为线粒体电子传递链底物时该作用更为明显<sup>[10]</sup>。 $\alpha$ -LA 和 DHLA 这种抗氧化和促氧化的双向作用也许可解释为何高剂量的  $\alpha$ -LA 并未呈现出低剂量补充时所产生的保护作用。

抗氧化和促氧化两种作用各自在哪种生理状态下起主导作用, 究竟这种大剂量外源性补充对人体是有益还是有害需要进一步更审慎、系统的研究。本研究结果将为  $\alpha$ -硫辛酸抗肝氧化损伤及有效剂量范围提供一定科学依据。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

## 参考文献:

- [1] PACKER L, WITT E H, TRITSCHLER H J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant [J]. Free Radic Biol Med, 1995, 19 (2): 227-250.
- [2] BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. Nature, 2001, 414 (6865): 813-820.
- [3] SINGH U, JIALAL I. Retracted: Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes [J]. Nutr Rev, 2008, 66 (11): 646-657.
- [4] MARITIM A C, SANDERS R A, WATKINS J B 3rd. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Nutr Biochem, 2003, 14 (5): 288-294.
- [5] KOYAMA M, WADA R, SAKURABA H, et al. Accelerated loss of islet beta cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of (下转第 779 页)