

糖尿病大鼠的 SOD 活性与抗氧化剂治疗 对机体抗氧化状态的影响

周玉, 王伶俐, 黄杨, 曹明香, 杨昌明*

(荆门市第一人民医院麻醉科, 湖北 荆门 448200)

【摘要】 目的 探究糖尿病大鼠主要脏器 SOD 活性及蛋白表达水平的变化,并观察抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)短期治疗(4周)后对机体抗氧化状态的影响。方法 STZ 诱导的糖尿病大鼠(D组, $n = 8$)每天给予 NAC 1.5 g/kg 灌胃治疗(D+N组, $n = 8$),正常对照组(C组, $n = 8$)同时给予同体积生理盐水。4周后,获取心、肺、肝、肾组织,试剂盒检测血浆总 SOD、总抗氧化物浓度、脂质过氧化特异性标志物 15-F₂t-isoprostane 及各组织总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,Western blotting 分析 SOD 亚型 Cu/Zn-SOD 及 Mn-SOD 蛋白表达水平。结果 与 C 组相比,D 组大鼠血浆 15-F₂t-isoprostane 与总抗氧化物浓度及心肌组织中总 SOD 活性显著升高,而血浆、肺、肝、肾组织总 SOD 活性显著降低;心、肺组织中 Cu/Zn-SOD 蛋白表达水平明显升高,而肝、肾组织中明显降低;肺、肾组织中 Mn-SOD 蛋白表达水平明显降低,而肝组织明显升高,但心肌组织变化不明显。NAC 干预能不同程度逆转上述改变,但进一步降低肾组织 Mn-SOD 表达。结论 糖尿病大鼠各组织中总 SOD 活性、Cu/Zn-SOD 及 Mn-SOD 蛋白表达水平具有组织差异性,抗氧化剂 NAC 能不同程度恢复糖尿病大鼠各组织抗氧化水平,从而起到阻止或延缓糖尿病相关的靶器官功能损害的作用。

【关键词】 糖尿病;N-乙酰半胱氨酸;超氧化物歧化酶;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0422-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.016

Effect of anti-oxidant treatment on the expression and activity of SOD in diabetic rats

ZHOU Yu, WANG Ling-li, HUANG Yang, CAO Ming-xiang, YANG Chang-ming*

(Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Jingmen, Hubei 448200, China)

【Abstract】 Objective To study the changes of total SOD activity and expression in major organs and observe the effects of antioxidant N-acetylcysteine (NAC) on antioxidant status in diabetic rats. **Methods** Normal rats (group C, $n = 8$) or streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (group D, $n = 8$) were treated with NAC 1.5 g/kg/d (Group D + N, $n = 8$) or equal volume of normal saline once daily by gastric gavage for 4 weeks. Blood samples were collected and the 15-F₂t-isoprostane, total antioxidant concentration and SOD activity were assayed. The heart, lung, liver and kidney tissues were collected for assay of the total SOD activity using a kit and the protein expression of SOD isoforms, including Cu/Zn-SOD and Mn-SOD, was determined by western blot. **Results** The levels of 15-F₂t-isoprostane and total antioxidant concentration in plasma, total SOD activity in the heart, protein expression of Cu/Zn-SOD in the heart and lung, and Mn-SOD expression in the liver were significantly increased ($P < \text{for all}$), but the levels of SOD activity in plasma, lung, liver and kidney, Cu/Zn-SOD expression in liver and kidney, and Mn-SOD expression in the lung and kidney in the diabetic rats

[基金项目]湖北省自然科学基金项目(编号:2014CFC1028);荆门市科技计划重点项目。

[作者简介]周玉(1976-),女,硕士研究生,研究方向:麻醉药理。

[通讯作者]杨昌明(1972-),男,主任医师,研究方向:麻醉药理。Email: hbjmyangem@126.com

were significantly decreased as compared with those in the control rats ($P < \text{for all}$). NAC treatment attenuated or reversed all these changes except renal expression of Mn-SOD. **Conclusions** The levels of total SOD activity and protein expression of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in diabetic rats are tissue specific, and antioxidant NAC can attenuate the target organ damages to a certain degree by restoring the antioxidant levels in diabetic rats.

【Key words】 diabetes mellitus; N-acetylcysteine; Superoxide dismutase, SOD; Rats

Corresponding author: YANG Chang-ming. E-mail: pyb1980@mail.scuec.edu.cn

机体通过精密的信号转导调控,如线粒体能形成一种高氧化环境^[1],以满足某种生理需要。糖尿病患者慢性高血糖状态,进行性破坏了这种复杂的调控模式,从而使局部的氧化应激水平激化并进一步扩大,同时可直接对抗氧化防御系统造成损伤,最终引起多种代谢紊乱和靶器官损害(target organ damage, TOD)^[2]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是机体抗氧化防御系统的重要组成部分,按其亚细胞区域分布的不同,分为胞质 Cu/Zn-SOD、线粒体 Mn-SOD 和胞外 SOD 三种亚型^[3]。细胞内氧化应激的程度密切影响着 SOD 的表达水平,这种动态改变参与了糖尿病及其相关并发症的进展过程^[4, 5]。这提示应用抗氧化剂抑制机体氧化应激水平或许能改变糖尿病及其并发症的转归。然而,临床实验表明应用抗氧化剂如维生素 C 与维生素 E 并未有满意的效果^[6]。因此,进一步探究亚细胞区域抗氧化防御系统的改变,是深刻认识糖尿病相关的 TOD 病理生理机制的重要课题,对于优化糖尿病及其并发症防治策略具有指导性意义。本研究旨在观察链脲佐霉素(streptozotocin, STZ)诱导的 SD 大鼠 1 型糖尿病模型中主要脏器,包括心脏、肺、肝、肾组织,观察总 SOD 活性及 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 蛋白表达的变化,同时探究抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)早期干预的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分组与模型

8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠,由武汉大学动物实验服务中心提供【SCXK(鄂)2014-0004】,共 24 只,体重 220~250 g。所有动物实验符合武汉大学实验动物实验管理条例。实验前适应性喂养 7 d,整个实验中自由饮食,有创操作前给予戊巴比妥钠(50 mg/kg,湖北鸿运隆生物科技有限公司)麻醉。通过计算机产生随机数列后,将大鼠随机分为三组(每组 8 只):正常组(C)、糖尿病组(D)和糖尿病+NAC 治疗组(D+N)。所有大鼠禁食一夜后,采用

单次性尾静脉注射 STZ(65 mg/kg)法诱导 1 型糖尿病模型。3 d 后血糖值稳定在高于 16.8 mmol/L 水平表示建模成功。建模 1 周后, D+N 组每天灌胃给予 NAC 1.5 g/kg。建模及干预时,给予 C 组和 D 组同体积生理盐水。血糖仪监测血糖每周 1 次,称重法饮水量每天记录 1 次。

1.1.2 主要试剂与仪器

N-乙酰半胱氨酸与链脲佐菌素(STZ)(美国 Sigma 公司);15-F2t-isoprostane、总抗氧化物浓度及超氧化物歧化酶活性检测试剂盒(美国 Cayman 公司);内参 GAPDH(1:2000)、二抗(1:10 000)(美国 Cell Signaling 公司);一抗 Cu/Zn-SOD、一抗 Mn-SOD(1:1000)(美国 Millipore 公司)。

1.2 标本获取与检测

第 4 周末,抗凝后腹腔大剂量注射戊巴比妥钠处死大鼠,注射器心内取血,获取用心脏、肺、肝、肾组织,并立即置入液氮中。所有样本-80℃妥善贮存。按试剂盒标准操作检测血清 15-F2t-isoprostane、SOD 与总抗氧化物浓度,及各组织总 SOD 活性。提取各组织总蛋白,BCA 法测量蛋白浓度。50 μg 上样,Western blotting 分析各组织 Cu/Zn-SOD 与 Mn-SOD 蛋白表达情况,按奥德赛(Odyssey)红外扫描仪操作人员手册扫描条带(美国 LI-COR Biosciences 公司),分析并导出蛋白条带灰度值。

1.3 数据处理及统计分析

所有数据基于内参做标准化处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graph Pad Prism 软件对所有实验数据进行统计学处理,组间采用单因素方差分析或 *t* 检验,差异具有统计学意义标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

本次研究中 STZ 诱导的大鼠糖尿病模型表现出了典型的 1 型糖尿病特征,包括高血糖、多饮、多食、多尿以及体重下降($P < 0.05$)。NAC 干预后,糖尿病大鼠仅食物摄入量及饮水量显著性降低,但仍

明显高于正常大鼠。见表 1。

2.2 血浆 15-F2t-isoprostane、总抗氧化物浓度及 SOD 活性

如表 2 所示,与 C 组比较,D 组大鼠血浆 F-2t-isoprostane 与总抗氧化物浓度显著增加,而 SOD 活性显著降低,经 NAC 治疗 4 周后,血浆 F-2t-isoprostane 与总抗氧化物浓度明显降低,但对血浆 SOD 活性无显著影响。

表 1 各组大鼠大体情况($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 General characteristics in the experimental rats

组别 Groups	食物摄取/g/(kg·d) Food consumption	饮水量/mL/(kg·d) Water intake	体重/g Body weight	血糖/mmol/L Plasma glucose
正常组 Group C	69.5 ± 4.47	115.3 ± 10.8	474.1 ± 28.9	6.8 ± 0.8
糖尿病组 Group D	186.1 ± 13.12*	785.8 ± 30.5*	302.8 ± 28.8*	24.6 ± 4.4*
糖尿病 + 治疗组 Group D + N	139.4 ± 13.68*#	489.2 ± 27.4*#	305.8 ± 31.7*	25.2 ± 4.9*

注: * 与 C 组比较 $P < 0.05$, # 与 D 组比较 $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$ compared with the control group, # $P < 0.05$ compared with the diabetic group

表 2 血浆 15-F2t-isoprostane、总抗氧化物浓度及 SOD 活性($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The levels of serum 15-F2t-isoprostane, total antioxidant and SOD activity in the rats

组别 Groups	15-F2t-isoprostane/pg/mL	总抗氧化物浓度/mmol/L Total antioxidant	SOD 活性/U/mL SOD activity
正常组 Group C	125.6 ± 27.8	0.61 ± 0.17	1.42 ± 0.31
糖尿病组 Group D	265.3 ± 39.5*	1.46 ± 0.36*	0.74 ± 0.16*
糖尿病 + 治疗组 Group D + N	144.7 ± 21.6*#	0.81 ± 0.23*#	0.68 ± 0.18*

注: * 与 C 组比较 $P < 0.05$ # 与 D 组比较 $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group, # $P < 0.05$, compared with the diabetic group.

表 3 各组大鼠各组织总 SOD 活性(U/mg protein, $n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 SOD activity in various organ tissues in the rats

组别 Groups	心脏 Heart	肺 Lung	肝 Liver	肾 Kidney
正常组 Group C	2.609 ± 0.159	2.402 ± 0.110	8.310 ± 0.307	6.575 ± 0.374
糖尿病组 Group D	3.390 ± 0.282*	1.842 ± 0.049*	5.948 ± 0.697*	5.147 ± 0.338*
糖尿病 + 治疗组 Group D + N	3.173 ± 0.393*	2.225 ± 0.121#	7.095 ± 0.581#	5.531 ± 0.516*

注: * 与 C 组比较 $P < 0.05$ # 与 D 组比较 $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group, # $P < 0.05$, compared with the diabetic group.

2.4 各组织中 Cu/Zn-SOD 蛋白表达水平

如图 1 所示,与 C 组比较,D 组大鼠心脏、肺组织中 Cu/Zn-SOD 蛋白表达水平显著升高;而肝、肾组织中显著降低。经 NAC 治疗 4 周后,D + N 组大鼠肝、肾组织中 Cu/Zn-SOD 蛋白表达量显著增加($P < 0.05$),心肌组织中显著减少($P < 0.05$),而肺组织中减少的程度不明显。

2.5 各组织中 Mn-SOD 蛋白表达水平

如图 2 所示,各组大鼠心肌组织 Mn-SOD 蛋白表达水平改变不明显。与 C 组比较,D 组大鼠肺、肾组织中 Mn-SOD 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),而肝组织中明显升高($P < 0.05$)。与 D 组比较,D + N 组大鼠肺组织 Mn-SOD 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),而肝组织中降低不明显,但肾组织

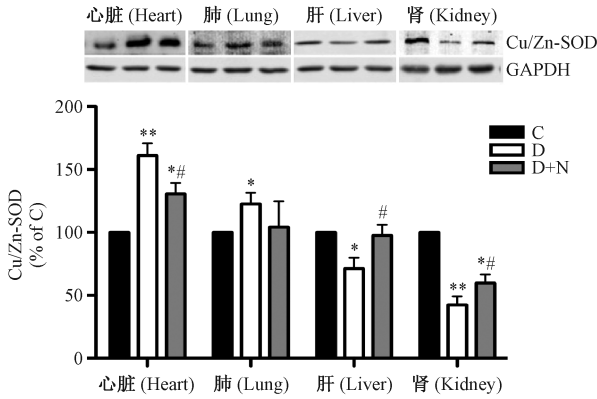
2.3 各组织中总 SOD 活性水平

C 组大鼠的肝、肾组织中总 SOD 活性几乎是心、肺组织中的 3 倍。与 C 组相比,D 组大鼠肺、肝、肾组织中总 SOD 活性明显降低($P < 0.05$),但心肌组织中明显升高($P < 0.05$)。与 D 组相比,D + N 组大鼠肺与肝组织中总 SOD 活性恢复($P < 0.05$),而在肾与心肌组织中虽然分别有所升高和降低,但变化并不明显。见表 3。

中显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论

据国际糖尿病联合会预测,到 2035 年,全球糖尿病患者将接近 6 亿。而 2014 年这一数字已达 3.87 亿,其中约有 5 百万人死于糖尿病及其相关并发症。然而,临床上糖尿病相关并发症主要包括糖尿病心脏病和糖尿病肾病^[7],而糖尿病相关的肝、肺病变则相对少见。这说明,虽然持续的高糖刺激对机体施加的不良影响是一致的,但不同组织的反应却不一样。糖尿病状态下的这种组织特异性反应,取决于组织自身的抗氧化能力及其对氧化应激的敏感性^[8]。我们发现,正常组大鼠肝、肾组织总 SOD 活性几乎是心脏、肺组织的 3 倍,而糖尿病状

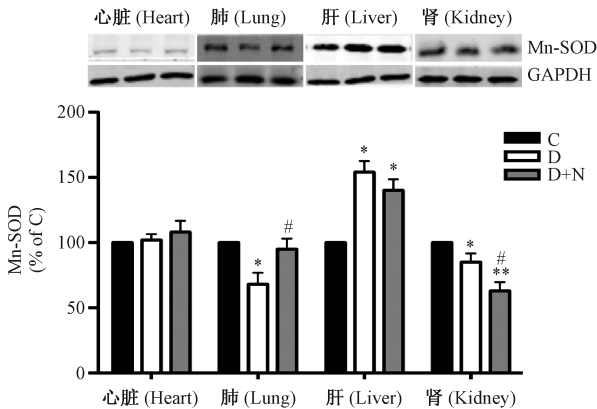


注: * 与 C 组比较 $P < 0.05$, ** 与 C 组比较 $P < 0.01$, # 与 D 组比较 $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠各组织中 Cu/Zn-SOD 蛋白表达水平的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Note: * $P < 0.05$ compared with group C, ** $P < 0.05$ compared with group C, # $P < 0.05$ compared with group D.

Fig. 1 The expression levels of Cu/Zn-SOD protein in various organ tissues of the rats



注: * 与 C 组比较 $P < 0.05$, ** 与 C 组比较 $P < 0.01$, # 与 D 组比较 $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠各组织中 Mn-SOD 蛋白表达水平的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Note: * $P < 0.05$, compared with the control group, ** $P < 0.01$, compared with the control group, # $P < 0.05$, compared with the diabetic group.

Fig. 2 The expression levels of Mn-SOD protein in various organ tissues of the rats

态下肝、肾、肺组织总 SOD 活性均显著降低,但心肌组织总 SOD 活性明显升高。这说明糖尿病大鼠肾、肝、肺组织抗氧化能力下降,而心肌组织似乎具有更强的抗氧化损伤代偿能力。这同时也提示,虽然心肌组织具有更强的代偿功能,但其与肾脏组织一样,对氧化应激损伤更为敏感。而肺组织虽然生理状态下总 SOD 活性相对较低,但其对氧化应激损伤的耐

受性更强。这可能是因为肺组织作为呼吸器官,长期处于氧暴露状态,从而产生了一定的适应性^[9]。另外,在糖尿病早期使用抗氧化剂 NAC 治疗,能有效恢复肺与肝组织总 SOD 活性,而对心脏、肾组织中总 SOD 无明显影响。可见,NAC 的作用也表现出了组织特异性,这与临床应用 NAC 的研究结果相一致^[10,11]。

线粒体活性氧自由基的产生与糖尿病相关并发症的发生发展密切相关^[10]。随着糖尿病病情进展,线粒体局部氧化应激不断激化,从而波及到其他亚细胞区域。已有充分的证据显示,持续性高糖刺激引起的 ROS 蓄积,可直接造成抗氧化防御系统功能受损,这是糖尿病相关并发症发生发展的关键因素^[11]。本研究结果显示,在糖尿病状态下,过氧化损伤特异性指标 15-F2t-isoprostane 显著增加,血浆 SOD 活性降低,而总抗氧化物浓度显著增加。这提示机体总抗氧化物浓度代偿性增加并不能减少组织氧化损伤。进一步研究发现,心脏、肺组织中 Cu/Zn-SOD 蛋白表达水平显著升高,而肝肾组织中显著降低;Mn-SOD 蛋白表达水平在心肌组织中无明显变化,在肺、肾组织中显著降低,而在肝组织中显著升高。这说明,不同亚细胞区域的抗氧化能力以及对氧化应激的敏感性也存在差异。因此,笼统的抗氧化治疗的效果可能并不确切,糖尿病患者需要更精准的靶向抗氧化治疗。目前,线粒体靶向抗氧化药物已经被设计,并在动物实验中取得了良好效果^[12]。

与许多研究^[13]一致,我们的实验结果也表明 NAC 能有效改善糖尿病大鼠症状,但似乎没有降糖作用。这提示,整个实验过程中 NAC 治疗组大鼠高血糖刺激的不良影响持续存在,NAC 可能并不能减少 ROS 的来源,而是通过其他途径来发挥保护作用。在本实验中,NAC 能不同程度恢复糖尿病状态下各组织胞质和线粒体 SOD 蛋白表达变化,从而恢复组织总 SOD 活性。但其进一步下调了肾组织 Mn-SOD 的表达。临床研究也表明,中等剂量的 NAC 治疗 30 d 后,糖尿病肾病患者氧化应激状态和蛋白尿症状未出现明显改善^[14]。

综上所述,生理状态下 SD 大鼠心脏、肺组织总 SOD 活性较肝、肾组织弱。在糖尿病状态下,心脏、肾组织对氧化应激更敏感性,而肺组织耐受性更强。在糖尿病早期阶段,使用抗氧化剂 NAC 进行干预,能不同程度地限制 Cu/Zn-SOD 与 Mn-SOD 蛋白表

达水平变化,从而恢复各组织总 SOD 活性,然而 NAC 进一步下调了糖尿病大鼠肾组织 Mn-SOD 表达。因此,进一步研究 NAC 影响不同组织中亚细胞区域抗氧化能力的具体机制,是深入认识糖尿病相关的靶器官损害的新途径。

参 考 文 献

- [1] Cummins TD, Higdon AN, Kramer PA, et al. Utilization of fluorescent probes for the quantification and identification of subcellular proteomes and biological processes regulated by lipid peroxidation products [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013. 59: 56 – 68.
- [2] Thandavarayan RA, Giridharan VV, Sari FR, et al. Depletion of 14-3-3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAPK/NF-kappa B signaling pathways after streptozotocin-induced diabetes mellitus [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011. 28(5): 911 – 922.
- [3] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression [J]. *Free Radical Biol Med*, 2002, 33(3): 337 – 349.
- [4] Kim JW, Chae JY, Nam SM, et al. Treadmill exercise prevents diabetes-induced increases in lipid peroxidation and decreases in Cu/Zn-superoxide dismutase levels in the hippocampus of Zucker diabetic fatty rats [J]. *J Vet Sci*, 2015. 16(1):11 – 16.
- [5] Kresyun NV, Godlevskii LS. Superoxide dismutase and catalase activities in the retina during experimental diabetes and electric stimulation of the paleocerebellar cortex [J]. *Bull Eep Biol Med*, 2014. 158(2): 206 – 208.
- [6] Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? [J]. *Cleve Clin J Med*, 2014. 71: 327 – 334.
- [7] Corriere M, Rooparinesingh N, Kalyani RR, et al. Epidemiology of diabetes and diabetes complications in the elderly: an emerging public health burden [J]. *Curr Diab Rep*, 2013. 13(6): 805 – 813.
- [8] Fabbrini E, Serafini M, Baric IC, et al. Diabetes. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects [J]. *Diabetes*, 2014. 63(3): 976 – 981.
- [9] Agarwal AR, Yin F, Cadenas E. Metabolic shift in lung alveolar cell mitochondria following acrolein exposure [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. 305(10): L764 – 773.
- [10] Yesilbursa D, Serdar A, Senturk T, et al. Effect of N-acetylcysteine on oxidative stress and ventricular function in patients with myocardial infarction [J]. *Heart Vessels*, 2006. 21(1): 33 – 37.
- [11] Saklayen MG, Yap J, Vallyathan V. Effect of month-long treatment with oral N-acetylcysteine on the oxidative stress and proteinuria in patients with diabetic nephropathy: a pilot study [J]. *J Investig Med*, 2010. 58(1): 28 – 31.
- [12] Towler DA. Mitochondrial ROS deficiency and diabetic complications: AMP[K]-lifying the adaptation to hyperglycemia [J]. *J Clin Invest*, 2013. 123(11): 4573 – 4576.
- [13] Gokturk H, Ulusu NN, Gok M, et al. Long-term treatment with a beta-blocker timolol attenuates renal-damage in diabetic rats via enhancing kidney antioxidant-defense system [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014. 395(1–2): 177 – 186.
- [14] Huang W, Cash N, Wen L, et al. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone in murine acute pancreatitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2015. 2015: 901780.
- [15] Xu J, Lei S, Liu Y, et al. Antioxidant N-acetylcysteine attenuates the reduction of Brg1 protein expression in the myocardium of type 1 diabetic rats [J]. *J Diabetes Res*, 2013. 2013: 1 – 8.

[收稿日期] 2015-12-08