

牛磺酸对糖尿病大鼠膈肌酶活性的影响

王 蕾, 关宿东

[摘要]目的: 观察牛磺酸对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠膈肌损伤的保护作用, 探讨其作用机制。方法: SD大鼠 24只, 随机分为正常对照组(NC)、糖尿病组(DM)、牛磺酸治疗组(Tau)。腹腔注射链脲菌素 50 mg/kg制备 DM 大鼠模型。NC组和 DM 组予自来水, Tau组予 1%牛磺酸饮水, 4周后测大鼠体重、血糖, 检测膈肌组织中的超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮合酶(NOS)活性和丙二醛(MDA)、NO含量的变化; 电镜下观察膈肌组织超微结构的改变。结果: 与 NC组相比, DM组大鼠膈肌组织中 SOD、NOS活性、NO含量显著降低($P < 0.01$), MDA含量显著增加($P < 0.01$); 电镜下, 肌小节和线粒体形态改变。与 DM组相比, Tau组 SOD、NOS活性、NO含量增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 血糖和 MDA含量降低($P < 0.01$); 电镜下, 超微结构损伤减轻。结论: 牛磺酸可提高 DM大鼠膈肌组织中 SOD、NOS活性和 NO含量, 降低血糖浓度、MDA含量, 能保护 DM膈肌的损伤。

[关键词] 糖尿病; 膈肌; 牛磺酸; 酶; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 578.1 [文献标识码] A

Effects of taurine on activity of enzymes in tissues of diaphragm in diabetic rats

WANG Lei GUAN Su Dong

(Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of taurine on diaphragm injury in diabetic rats. **Methods** Twenty four SD rats were randomly divided into normal control (NC) group, diabetic (DM) group and taurine treatment (Tau) group. DM group and Tau group rats were given streptozocin (STZ) 50 mg/kg intraperitoneal injection. NC group and DM group rats were treated with water. Tau group rats were treated with 1% taurine in drinking water. After 4 weeks, the body weight (BW) and level of blood glucose (BG) were measured. Superoxide dismutase (SOD), nitric oxide synthase (NOS) activities and malondialdehyde (MDA), NO contents in diaphragm tissues were also measured. The ultrastructure of diaphragm were investigated by electron microscope. **Results** SOD, NOS activities, NO contents were significantly lower ($P < 0.01$), BG and MDA content were significantly higher in DM group ($P < 0.01$). Compare with DM group, SOD, NOS activities and NO contents were higher ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), BG and MDA content were lower in Tau group ($P < 0.01$). The ultrastructure under electron microscope indicated that in DM group diaphragm fibres fracture, mitochondrions swelling and degeneration. The above changes were inhibited by treatment of taurine. **Conclusions** Taurine can increase SOD, NOS activities, NO contents and decrease MDA content in diabetic diaphragm.

[Key words] diabetes mellitus; diaphragm; taurine; enzyme; rats

骨骼肌是胰岛素刺激状态下葡萄糖摄取的主要部位, 并且骨骼肌又是糖尿病(diabetes mellitus, DM)损害的主要靶位^[1], 因此糖尿病性肌病成为糖尿病较常见的并发症。膈肌作为重要的呼吸肌, 具有终身收缩和维持呼吸的特性, 对机体完成呼吸功能具有极其重要的作用。因此糖尿病对膈肌形态和功能的损伤近年来已逐渐引起重视。牛磺酸是体内一种主要的自由氨基酸, 具有稳定细胞膜、调节细胞钙稳态、抗脂质过氧化等细胞保护作用^[2], 本研究通过对膈肌组织中与氧自由基损伤有关酶活性的变化, 探讨牛磺酸对糖尿病大鼠膈肌的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物: 成年 SD大鼠(200~250 g), 由本院实验动物中心提供, 雌雄兼用。(2)主要药品、试剂、仪器为: 链脲菌素(streptozocin, STZ), Sigma公司产品。牛磺酸, 购自黄冈永安药业有限公司。One touch II 血糖仪(美国强生公司)。电子分析天平(JA2003型, 上海精密科学仪器有限公司)。恒温水浴槽(501型, 上海市上海县第二五金厂)。超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮合酶(NOS)活性、丙二醛(MDA)和 NO 试剂盒, 购自南京建成生物制品有限公司。

1.2 模型的建立与分组 (1)SD大鼠 24只, 随机分出 8只作为正常对照组(NC), 其余用于造模。(2)DM模型以一次性腹腔注射 STZ 50 mg/kg 诱发, STZ临时用 0.05 mol/L, pH 5.0 的柠檬酸缓冲

[收稿日期] 2005-10-18

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金计划项目(2003KJ0022C)

[作者单位] 蚌埠医学院 生理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王 蕾(1970-), 女, 讲师。

液配成 2%浓度,在冰水中进行。注射前大鼠禁食 12 h,注射 72 h后,由尾静脉采血,应用 One touch II 血糖仪测定空腹血糖,血糖 $> 16.7 \text{ mmol/L}$ 确定为 DM 模型。DM 大鼠分笼饲养,固定饲料,自由饮水。将 DM 大鼠随机分为 DM 和牛磺酸 (Tau) 两组。(3)牛磺酸组予含 1%牛磺酸的自来水,对照组与糖尿病组予自来水。喂养 4周。

1.3 膈肌组织生化指标测定 将动物 20 ml 乌拉坦 (6 ml/kg) 麻醉,迅速去头、开胸,术中再次测血糖浓度。取膈肌组织,用预冷的生理盐水洗净残血,在冰浴中用生理盐水制成 10% 的匀浆,3 000 r/min 离心 10 min 取上清检测膈肌 SOD、NOS 活性和 MDA、NO 含量,测定膈肌组织匀浆蛋白含量。其中 SOD 测定用羟胺法,MDA 测定用硫代巴比妥酸法,NO、NOS 测定用比色法,蛋白含量测定用考马斯亮蓝法。

1.4 细胞超微结构观察 取膈肌组织,制成 1 mm^3 小块,置于 2.5% 戊二醛溶液 (安徽省立医院提供) 中固定,电子显微镜观察膈肌的超微结构。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、血糖的变化 DM 组大鼠体重明显低于 NC 组 ($P < 0.01$),与 Tau 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。DM 组大鼠血糖显著高于 NC 组 ($P < 0.01$),Tau 组大鼠血糖明显低于 DM 组 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 膈肌组织生化指标测定 DM 组膈肌组织 SOD 活性均显著低于 NC 组和 Tau 组 ($P < 0.01$)。

DM 组 MDA 含量均显著高于 NC 组和 Tau 组 ($P < 0.01$)。DM 组 NO 和 NOS 含量均低于 NC 组和 Tau 组 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$) (见表 2)。

表 1 牛磺酸对糖尿病大鼠体重、血糖的影响 ($n_i = 8 \bar{x} \pm s$)

分组	体重 (g)	血糖 (mmol/L)
NC	298.75 ± 55.03	5.84 ± 0.91
DM	203.13 ± 22.83**	22.01 ± 3.31**
Tau	217.50 ± 27.12**	18.18 ± 1.81 $\Delta\Delta$
F	14.89	113.79
P	< 0.01	< 0.01
MS _{组内}	1 428.335	5.020

q 检验:与 NC 组比较 ** $P < 0.01$;与 DM 组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 牛磺酸对糖尿病大鼠膈肌组织 SOD、NOS 活力和 MDA、NO 含量的影响 ($n_i = 8 \bar{x} \pm s$)

Group	SOD (U/mgprot)	MDA (mol/mgprot)	NOS (U/mgprot)	NO ($\mu\text{mol/mgprot}$)
NC	80.33 ± 11.54	3.98 ± 0.48	1.78 ± 0.57	3.90 ± 0.83
DM	160.47 ± 10.54**	5.51 ± 0.76**	0.85 ± 0.34**	2.18 ± 0.99**
Tau	184.65 ± 14.13 $\Delta\Delta$	4.12 ± 0.57 $\Delta\Delta$	1.35 ± 0.47 Δ	3.16 ± 0.92 Δ
F	13.59	15.16	7.86	7.10
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
MS _{组内}	147.937	0.378	0.220	0.838

q 检验:与 NC 组比较 ** $P < 0.01$;与 DM 组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 膈肌超微结构的变化 电镜下观察 NC 组:肌纤维结构完整,Z 线清晰、整齐,线粒体形状规则,无肿胀变性。DM 组:肌纤维萎缩,Z 线模糊不清,线粒体肿胀变性,部分有空泡变和髓样小体形成。Tau 组:肌纤维完整或有轻度萎缩,Z 线较清晰,线粒体无肿胀变性或有轻度水肿,无空泡变和髓样小体形成 (见图 1)。

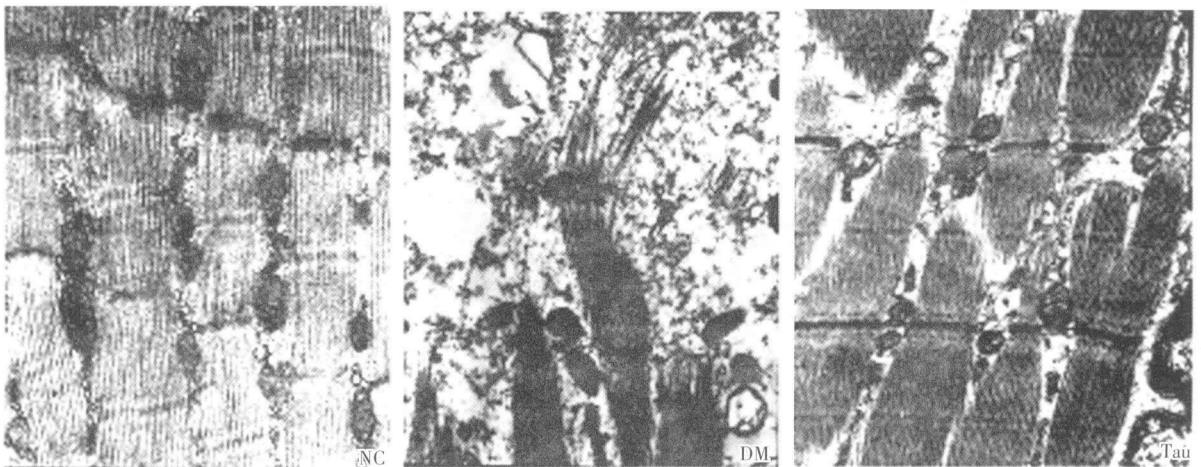


图 1 各组膈肌组织超微结构的变化 [NC 组:肌纤维完整,Z 线清晰,线粒体无肿胀 ($\times 20\ 000$); DM 组:肌纤维萎缩,Z 线模糊不清,线粒体肿胀变性,部分有空泡变和髓样小体形成 ($\times 15\ 000$); Tau 组:肌纤维完整或有轻度萎缩,Z 线较清晰,线粒体无肿胀变性或有轻度水肿 ($\times 15\ 000$)]

3 讨论

葡萄糖是细胞生长的重要调节因子,长期高血糖对机体内环境有普遍的毒性,引起一系列病理反应。糖尿病时,血糖浓度升高,膈肌组织中氧化应激增加,自由基生成增加^[3],使SOD活性降低,脂质过氧化产物MDA生成增加,导致机体抗氧化屏障作用减弱。过量生成的自由基可直接损伤膈肌组织的蛋白质、核酸、脂质,干扰呼吸链,可引起细胞膜损伤,细胞内钙含量紊乱等变化,最终导致细胞结构和功能的损伤。本实验中电镜检查证实了糖尿病大鼠膈肌损伤的存在。

牛磺酸主要存在于神经、肌肉组织中,是体内自由基清除剂,也是病理条件下抗自由基、抗脂质过氧化的物质,并具有保护胰岛B细胞、降低血糖的作用^[4]。本实验结果显示,牛磺酸组大鼠较糖尿病组大鼠血糖浓度降低,膈肌组织中MDA含量明显减少,SOD活力明显升高,改善DM时自由基清除力,由自由基增多所致膈肌组织损伤明显减弱。另外糖尿病时自由基生成增多,脂质过氧化增强,破坏了生物膜的结构,导致细胞钙超载;钙超载可进一步增加膜的通透性,促进自由基生成,形成恶性循环。有研究显示,牛磺酸具有调节钙稳态^[5]、抑制多种损伤因素导致的细胞内钙超载的作用^[6],进而减少自由基的生成,打断了钙超载和自由基生成之间的恶性循环,对膈肌起到血液灌流障碍、自由基保护作用。

NO在内皮细胞内由L-精氨酸经NOS催化形成,是一种脂溶性的具有高反应活性的自由基气体和生物活性信使分子,具有广泛的生物活性。有资料表明,高血糖可引起血管内皮功能异常,NOS表达下降,NO产生减少^[7]。NO是一种内皮舒张因子,具有舒张血管平滑肌的功能,从而维持组织正常血供。因此,DM时NO产生减少,胰岛素刺激肌肉

血流增加的效应减弱,从而使骨骼肌代谢所需的氧和底物供应不足^[7],构成了DM膈肌损伤的又一重要原因。另外NO可作为氧自由基的内源性清除剂,并能减轻氧自由基的损伤^[8]。牛磺酸不仅具有清除自由基、抗脂质过氧化的作用,还能有效拮抗高糖所致的NO生成的减少^[9]。牛磺酸能促进血管内皮细胞NOS的活性,增加NO的生成^[4,10]。

牛磺酸可通过降低血糖,清除自由基,抗脂质过氧化,增加NO的生成,改善膈肌血液灌注,糖尿病膈肌损伤起到明显的保护作用。

[参 考 文 献]

- [1] 张宏,白景文,于得民,等.糖尿病性肌病的超微病理结构及可能机理[J].中国糖尿病杂志,2002,10(6):326-329
- [2] Ohta H, Azuma J, Awata N, et al. Mechanism of the protective action of taurine against isoprenaline myocardial damage[J]. *Cardiovasc Res* 1998, 22(6): 407-413.
- [3] 马善峰,方迎艳,关宿东,等.大豆异黄酮对糖尿病大鼠心肌自由基损伤的保护作用[J].蚌埠医学院学报,2004,29(3):197-199
- [4] Huxtable RJ. Physiological action of taurine[J]. *Physiol Rev* 1992, 72(1): 101-163
- [5] Sole MJ, Jeejeebhoy KN. Conditioned nutritional requirements and the pathogenesis and treatment of myocardial failure[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000, 3(6): 417-424
- [6] Holloway G, Kotsanas G, Wendt I. Acute effects of taurine on intracellular calcium in normal and diabetic cardiac myocytes[J]. *Pflugers Arch* 1999, 438(3): 384-391
- [7] Takeshita M, Ina K, Kitamura H, et al. Ultrastructural study of capillary and myocytic changes in the masseter and heart of KK-Ay mice[J]. *J Electron Microsc* 1997, 46(5): 413-423.
- [8] 万梅,于占久.内皮衍生舒张因子对缺血(缺氧)再灌注(复氧)心肌的保护作用[J].生理学报,1995,47(3):231-237.
- [9] 刘江华,文格波,曹仁贤,等.牛磺酸对高葡萄糖损伤血管内皮细胞的保护作用[J].中国糖尿病杂志,2000,8(6):362-364
- [10] 刘国庆,隋国良,徐伟民,等.牛磺酸对糖尿病大鼠肾脏保护机制的研究[J].中华内分泌代谢杂志,2000,16(6):377-378.

论文写作中的致谢要求

在文后致谢是表示感谢并记录在案的意思。对给予实质性帮助而又不能列为作者的单位或个人应在文后给予致谢。但必须征得被致谢人的书面同意。致谢应避免以下倾向:(1)对确实给予了帮助的单位或个人,甚至用了他人的方法、思路、资料,而不公开致谢和说明。(2)出于某种考虑,将应被致谢人放在作者的位置上,混淆了作者和被致谢者的权利和义务。(3)以名人、知名专家包装自己的论文,抬高论文的身份,将未曾参与工作的,也未阅读过该论文的知名专家写在致谢中。

被致谢者包括:(1)对研究提供资助的单位和 个人、合作单位。(2)协助完成研究工作和提供便利条件的组织和 个人。(3)协助诊断和提出重要建议的人。(4)给予转载和引用权的资料、图片、文献、研究思想和设想的所有者。(5)作出贡献又不能成为作者的人,如提供技术帮助和给予财力、物力支持的人,阐明其支援的性质。(6)其他需致谢者。