

网络出版时间:2013-05-02 10:55

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130502.1055.026.html>

魔芋葡甘聚糖对饮酒大鼠血清硒及脂质过氧化的影响

杨 芳¹, 禹 强², 韩玉翠², 王中兴¹

(1 安康学院 农学与生命科学学院 陕西省富硒食品工程实验室, 陕西 安康 725000; 2 安康市中心医院, 陕西 安康 725000)

【摘要】 **【目的】**探究魔芋葡甘聚糖(Konjac glucomannan, KGM)对饮酒大鼠血清硒及脂质过氧化的影响。**【方法】**将 45 只供试雄性 SD 大鼠随机分成正常对照组、酒精肝模型组、质量分数 5% 和 10% KGM 预防组及质量分数 10% 谷胱甘肽(GSH)阳性对照组, 每组 9 只, 进行相应处理, 12 周后, 心脏无菌穿刺采血, 制备血清, 并处死大鼠, 取其肝组织, 测定血清中的硒含量及肝组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、GSH、H₂O₂ 的含量。**【结果】**与其他各组相比, 酒精肝模型组大鼠血清硒水平极显著降低($P < 0.01$); KGM 预防组大鼠血清硒水平与 GSH 阳性对照及正常对照组均无显著性差异($P > 0.05$)。大鼠肝脏 GSH-Px 活性与血清硒水平呈极显著正相关($r = 0.542, P = 0.001$)。与其他各组相比, 酒精肝模型组 SOD 活性极显著降低($P < 0.01$), GSH-Px 活性及 GSH 含量显著或极显著降低(除 5% KGM 预防组 GSH-Px 活性外), MDA、H₂O₂ 含量均极显著升高($P < 0.01$); 2 个 KGM 预防组与正常对照组和阳性对照组各指标水平较为接近。**【结论】**KGM 能有效发挥其抗氧化应激作用, 从而预防乙醇导致的大鼠肝脏脂肪变性。

【关键词】 大鼠; 酒精型脂肪肝; 葡甘聚糖; 抗氧化

【中图分类号】 S859.79⁺4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)05-0014-05

Antioxidant effect of KGM on serum selenium and lipid peroxidation in rats with chronic alcohol abuse

YANG Fang¹, YU Qiang², HAN Yu-cui², WANG Zhong-xing¹

(1 Food Engineering Laboratory of Shaanxi Province, Department of Agriculture and Life Sciences, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000, China; 2 Ankang Central Hospital, Ankang, Shaanxi 725000, China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed to analyze the antioxidant effect of KGM on serum selenium and lipid peroxidation in rats with chronic alcohol abuse. **【Method】** Male SD rats were divided into 5 groups: normal control group, drinking alcohol group, 5% KGM preventive group, 10% KGM preventive group, and 10% GSH positive control group. After the 12 weeks of experiment, the rat serum selenium levels were measured by atomic fluorescence spectrometry. Hepatic GSH-Px and SOD activity were evaluated and GSH, MDA and H₂O₂ levels were determined using an assay kit. **【Result】** After 12 weeks, compared with the other groups, serum selenium levels of rats in drinking alcohol group were significantly reduced ($P < 0.01$). There was no significant difference ($P > 0.05$) between rats in preventive group and rats in both GSH positive control group and normal control group. The experimental results showed that the liver GSH-Px activity and serum selenium were positively correlated ($r = 0.542, P = 0.001$). Compared with the

【收稿日期】 2012-08-26

【基金项目】 陕西省自然科学基金项目(2010JM4052); 陕西省教育厅科技专项(12JK0848)

【作者简介】 杨 芳(1974—), 女, 陕西旬阳人, 讲师, 硕士, 主要从事富硒食品功能评价研究。E-mail: akxyyf@163.com

other groups, SOD activity of rats in drinking alcohol group decreased significantly ($P < 0.01$), GSH-Px activity and GSH content significantly decreased (except GSH-Px of rats in 5% KGM prevention group), and MDA and H_2O_2 content increased significantly ($P < 0.01$). Each index level of rats in prevention group was relatively close to that of rats in both normal control group and positive control group. 【Conclusion】 The KGM has antioxidant effect on serum selenium and lipid peroxidation in rats with chronic alcohol abuse.

Key words: rat; alcoholic fatty liver; KGM; antioxidant

60种因饮酒导致的身体机能紊乱最终的共同结局就是酒精性肝病(Alcoholic liver disease, ALD)^[1]。在我国,ALD已成为仅次于病毒性肝炎的第2大肝病。ALD的致病机制很复杂,包括氧化还原状态的改变、氧化应激、细胞因子环境和信号传递的改变及免疫应答损伤等。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)与谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione-peroxidase, GSH-Px)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)协同作用,能够有效地清除机体新陈代谢产生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),从而组成一道多酶的防护群带,保护细胞膜和其他细胞组分结构与功能,维持组织内的氧化平衡^[2-3]。GSH-Px是生物体内重要的含硒酶,其mRNA表达水平可以作为评估硒摄入状况的标志^[4]。硒原子以硒代半胱氨酸(Sec)的形式存在于GSH-Px活性中心。天然GSH-Px以谷胱甘肽(Glutathione, GSH)作为结合底物,以Sec作为催化基团分解体内的氢过氧化物^[5]。Sec是由GSH-Px基因上的UGA终止密码子编码的,该密码子被一个特异的tRNA所识别。在丝氨酸-tRNA连接酶的作用下,tRNA携带丝氨酸,丝氨酸-tRNA经硒半胱氨酸合成酶催化后,生成硒半胱氨酸 tRNA,而丝氨酸则被转换为Sec。当细胞生长缺硒时,Sec-tRNA^{Sec}合成受阻,会影响硒蛋白在减轻细胞的过度氧化应激中的功能^[6]。

有关酒精性脂肪肝的发病机制,近年的研究比较支持“二次打击”学说^[7-9],即肝脏在受到酒精或胰岛素抵抗的一次打击后,再受到其他因素的二次打击就会产生脂肪肝。在众多二次打击的因素中,脂质过氧化起着重要作用。乙醇通过诱导某些CYP450酶导致肝微粒体自由基增多,使内源性抗氧化剂消耗增加及脂质过氧化反应增强,从而造成酒精性肝损伤。肝脏组织中含有多种抗过氧化物酶,即使是某一抗氧化物酶的活性下降,也会导致肝细胞受损^[10]。研究表明,雌性大鼠在怀孕和哺乳期饮酒可致其幼崽的GSH-Px活性下降^[11]。GSH是

广泛存在于人体细胞内的重要生理性代谢调节物质,对酒精性肝病肝功能的恢复有较好的疗效^[12]。

魔芋为天南星科魔芋属的多年生草本植物,含有丰富的葡甘聚糖(Konjac glucomannan, KGM)。试验表明,KGM能有效预防大鼠酒精性肝脏脂肪变性^[13],本研究在前期试验^[13]的基础上,分析了KGM对大鼠血清硒及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)、 H_2O_2 、总GSH含量及GSH-Px活性的影响,旨在为KGM预防酒精性脂肪肝的效果及预防机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及饲料 SPF级雄性SD大鼠(45只,体质量为180~200 g/只,动物使用许可证号为SCXK2007-001)和专用鼠粮,购自西安交通大学医学院实验动物中心;大鼠粉状饲料,购于第四军医大学动物实验中心。

1.1.2 试剂及仪器 无水乙醇,国产分析纯级;肝脏组织GSH-Px、SOD、MDA、GSH、 H_2O_2 检测试剂盒,购于南京建成生物科技有限公司;纯化魔芋精粉,购于安康九龙魔芋加工生物科技有限公司,KGM含量为75.98%^[14];还原性GSH,购于日本山之内株式会社;考马斯亮蓝(G-250)购于美国Sigma公司。

试验大鼠特配饲料自制装置(专利号ZL 201130010281.6,为陕西省富硒食品工程实验室自行设计制作);FD-1D-50型真空冻干机(上海楚定分析仪器有限公司);101-2AB型烘箱(天津市泰斯特仪器有限公司);SY2200-T型超声波清洗机(上海声源超声波仪器设备有限公司);PF6-2型非色散原子荧光分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 大鼠特配饲料的制作

将大鼠粉状饲料、添加成分(魔芋精粉或GSH)和适量的水按一定比例混匀,成团,再将饲料团块填充到试验大鼠特配饲料自制装置中,压实,然后用注

射器的活塞将饲料推出。100 g 含质量分数 5% KGM 的特配饲料中含大鼠粉状饲料 93.42 g,魔芋精粉 6.58 g;100 g 含质量分数 10%KGM 的特配饲料中含大鼠粉状饲料 86.84 g,魔芋精粉 13.16 g;100 g 含质量分数 10%GSH 的特配饲料中含大鼠粉状饲料 90.00 g,还原性 GSH 10.00 g。添加成分为魔芋精粉的特配饲料采用高温烘干,添加成分为 GSH 的特配饲料采用冷冻干燥。

1.3 分组与处理

大鼠称体质量、编号后,用简单随机法将其分为 5 组,每组 9 只,具体分组情况如下:第 1 组为正常对照组,第 2 组为酒精肝模型组,第 3 组为质量分数 5%KGM 预防组,第 4 组为质量分数 10%KGM 预防组,第 5 组为质量分数 10%GSH 阳性对照组。在试验过程中,5 组大鼠均自由采食,分笼饲养,每笼 4 或 5 只,在室温及稳定湿度条件下喂养 12 周。大鼠酒精肝模型建立方法以及 KGM 干预方式参考文献[13]。

1.4 大鼠血清硒含量的测定

1.4.1 血清制备 试验结束后,大鼠禁食禁饮 12 h,称体质量后用乙醚吸入麻醉,心脏无菌穿刺采血,2 000 r/min 离心 3 min,制备血清。

表 1 PF6-2 型非色散原子荧光分光光度计的工作条件

Table 1 Working conditions of PF6-2 non dispersive atomic fluorescence spectrophotometer

项目 Item	工作条件 Working conditions	项目 Item	工作条件 Working conditions
负高压 Negative high voltage	280 V	空白判别值 Blank discriminant value	3.0
原子化温度 Atomic temperature	200 ℃	第 2 次载液进样量 The second carrier liquid sample	1.5 mL
炉丝亮暗度 Furnace wire bright and dark	3	清洗过程中载液进样量 The cleaning process of carrier liquid sample	1.0 mL
第 1 次载液进样量 The first carrier liquid sample	1.5 mL	推样时间 Push sample time	20 s
样品进样量 Sample quantity	1.5 mL	读数时间 Reading time	15 s
延迟时间 Delay time	3 s	测量方法 Method of measuremen	标准曲线法 Standard curve method
载气流量 Carrier gas flow	400 mL/min	进样方式 Sampling mode	自动进样 Automatic sampling
屏蔽气流量 Shielding gas flow	300 mL/min	读数方式 Reading mode	面积 The measure of area

1.5 大鼠肝脏脂质过氧化物含量的测定

处死大鼠后取肝脏右叶组织,存于-80 ℃冰箱中待用。用电子天平称取 400 mg 肝组织放入烧杯中,加入 9 倍的质量分数 0.9%氯化钠溶液,用剪刀剔除结缔组织后剪碎,倒入研钵中捣匀,3 000 r/min离心 15 min,弃沉淀留上清液,即得质量分数 10%肝组织匀浆,整个过程均在 4 ℃下进行。用考马斯亮蓝法测定肝匀浆中的蛋白含量,按试剂盒说明测定 GSH-Px、SOD 活性及 MDA、GSH、H₂O₂ 的含量。

精确量取大鼠血清样品 1.0 mL 于 100.0 mL 锥形瓶中,加混合酸溶液(V(硝酸):V(高氯酸)=3:2) 15.0 mL 后,超声波处理 20 min,接着在 160 ℃消化炉上消化 12 h,再在加热板上热消化至 2 mL 左右,相应地精确量取蒸馏水 1.0 mL 于 100.0 mL 锥形瓶中,按上述步骤操作做空白对照。待消化结束后,在冷却的锥形瓶中加入 5.0 mL 6 mol/L 盐酸溶液,100 ℃水浴 20 min,取出冷却,再加入 5.0 mL 去离子水,过滤定容至 25.0 mL,待测。

1.4.2 标准曲线的绘制 将 100 mg/L 的硒标准溶液(由国家标准物质中心提供)用体积分数 10%的盐酸逐级稀释成 20.0 μg/L 的硒标准贮备液。分别移取 20.0 μg/L 硒标准贮备溶液 0,4.00,8.00,12.00 和 16.00 mL,用 1.63 mol/L 盐酸溶液定容至 25 mL 即得硒标准工作溶液。测定硒标准工作液的荧光强度,以硒的质量浓度为 y 轴,测得的荧光强度为 x 轴,绘制标准曲线,求其回归方程。

1.4.3 样品分析 设定好 PF6-2 型非色散原子荧光分光光度计工作条件和有关参数(表 1)后,将仪器预热 20 min,然后启动自动进样系统,依次测定空白溶液、系列标准溶液、样品溶液的荧光强度,通过仪器自动计算结果。

1.6 数据的统计分析

试验数据采用 SPSS13.0 统计软件分析。多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用多重比较分析;分析 GSH-Px 活性与血清硒含量的相关性。

2 结果与分析

2.1 魔芋 KGM 对大鼠血清硒含量的影响

对硒系列标准溶液的荧光强度进行测定,发现硒的质量浓度(y)与其对应的荧光强度(x)呈良好的线性关系,线性回归方程为 $y = 0.014\ 9x +$

0.306 6($R^2=0.999\ 1$)。

各组大鼠血清中硒含量见表 2。从表 2 可见,酒精肝模型组与正常对照组及 2 个 KGM 预防组相比,血清中的硒含量极显著降低($P<0.01$);2 个 KGM 预防组与 GSH 阳性对照组、正常对照组血清硒含量均无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 魔芋 KGM 对饮酒大鼠血清中硒含量的影响(n=9)

Table 2 Effect of KGM on serum selenium of rats with chronic alcohol abuse				μg/L
组别 Group	血清硒 Serum selenium	组别 Group	血清硒 Serum selenium	
正常对照组 Control group	184.64±7.50**	10%KGM 预防组 10%KGM preventive group	188.29±10.62**	
酒精肝模型组 Drinking alcohol group	142.33±13.44	10%GSH 阳性对照组 10%GSH positive control group	179.74±6.57**	
5%KGM 预防组 5%KGM preventive group	183.35±10.51**			

注:与酒精肝模型组相比,标*表示差异显著($P<0.05$),标**表示差异极显著($P<0.01$)。下表同

Note:comparison with drinking alcohol group,mark* show significant difference ($P<0.05$),mark** show very significant difference ($P<0.01$). The same below.

相关分析结果显示,大鼠肝脏 GSH-Px 活性与大鼠血清硒水平呈极显著正相关($r=0.542,P=0.001$)。

2.2 魔芋 KGM 对饮酒大鼠肝脏氧化、抗氧化指标的影响

SOD 活性极显著降低($P<0.01$),GSH-Px 活性(除 5%KGM 预防组 GSH-Px 活性外)及 GSH 含量显著或极显著降低,MDA 和 H_2O_2 含量均极显著升高($P<0.01$);2 个 KGM 预防组与正常对照组和阳性对照组各指标水平较为接近,没有显著性差异。

由表 3 可见,与其他各组相比,酒精肝模型组

表 3 魔芋 KGM 对大鼠肝脏脂质过氧化及抗氧化指标的影响(n=9)

组别 Group	GSH/ (mg·g ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	H ₂ O ₂ / (nmol·g ⁻¹)
正常对照组 Control group	33.41±2.03*	333.97±14.76**	1 068.67±39.05*	1.46±0.38**	24.46±3.13**
酒精肝模型组 Drinking alcohol group	22.01±1.81	265.22±30.69	617.09±60.74	3.22±0.45	32.50±1.33
5%KGM 预防组 5%KGM preventive group	34.92±2.51**	333.81±8.99**	975.82±45.06	1.86±0.38**	24.20±1.65**
10%KGM 预防组 10% KGM preventive group	32.39±1.33*	357.51±16.39**	1 012.66±85.07*	1.93±0.28**	22.18±2.16**
10%GSH 阳性对照组 10%GSH positive control group	31.63±3.73*	333.10±7.60**	1 062.66±85.07*	1.92±0.40**	24.52±0.82**

3 讨论

硒是构成 GSH-Px、谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶(PHG-Px)和硒蛋白 P(Se-P)的必需成分,这些氧化酶可清除自由基,保护肝细胞免受自由基的损伤。Llaneza 等^[15]研究表明,在过度肥胖的绝经女性中,其血清中低硒与血液中的高胆固醇、高低密度脂蛋白和高甘油三酯存在一定的相关性。本试验表明,血清中硒含量与 GSH-Px 活性呈极显著正相关。与酒精肝模型组相比较,正常对照组、KGM 预防组和 GSH 阳性对照组大鼠血清中的硒和 GSH-Px 活性较高。有研究显示,与肝脏组织中的硒水平相比,血清中的硒水平更能反映 GSH-Px 的活性^[16],这可能是因为血清中的硒能使 GSH-Px 保持较高的酶活性,从而防御乙醇导致的氧化应激。

本研究结果表明,饮酒可致大鼠血清硒水平下降,这与 María 等^[11]的研究结果一致。有研究表明,血清硒水平可以作为酗酒者预后评价的重要参数^[17]。本研究发现,魔芋 KGM 可以有效地平衡乙醇导致的大鼠血清硒水平的降低,从而有助于预防酒精肝。

乙醇在体内代谢过程中,产生了过多氧应激产物,这些物质可激活磷脂酶及脂质过氧化反应,抑制 SOD、GSH-Px 活性,消耗自由基清除剂 GSH,使脂质过氧化产物 MDA 及 H_2O_2 显著增多,破坏蛋白质的结构和功能,最终形成酒精性脂肪肝。本试验结果表明,与酒精肝模型组、正常对照组和 GSH 阳性对照组相比,KGM 预防组可通过提高 SOD、GSH-Px 活性,使体内的 H_2O_2 迅速被清除,GSH 消耗减少,从而降低脂质过氧化作用,使 MDA 含量

下降,保护肝细胞,其预防保护作用与 GSH 无显著性差异。GSH 作为重要的抗氧化剂,已被临床广泛使用。使用生物抗氧化剂 KGM 切断过氧化链式反应可以抑制机体的自由基损伤,KGM 中的多糖可以捕捉脂质过氧化链式反应中产生的活性氧,减少链式反应的长度,阻断或减慢脂质氧化的进行,降低“第二次打击”的程度。本试验仅设了质量分数 5%和 10% 2 种 KGM 剂量,尚未表现出量效关系,而多糖的疗效不一定与剂量呈正比关系,往往有个最适剂量,下一步可多设定几种剂量,以寻求 KGM 预防脂肪肝、抑制脂质过氧化反应的最适剂量。

[参考文献]

- [1] Li T K. Quantifying the risk for alcohol-use and alcohol-attributable health disorders: Present findings and future research needs [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(Suppl 1): S2-8.
- [2] Flohé L. The glutathione peroxidase reaction: molecular basis of the antioxidant function of selenium in mammals [J]. *Curr Top Cell Regul*, 1985, 27: 473-478.
- [3] Das S K, Mukherjee S. Long term ethanol consumption leads to lung tissue oxidative stress and injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(6): 414-420.
- [4] Sunde R A, Thompson K M, Evenson J K, et al. Blood glutathione peroxidase-1 mRNA levels can be used as molecular biomarkers to determine dietary selenium requirements in rats [J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2009, 234(11): 1271-1279.
- [5] Yu H J, Liu J Q, Liu X M, et al. Engineering glutathione transferase to a novel glutathione peroxidase mimic with high catalytic efficiency. Incorporation of selenocysteine into a glutathione-binding scaffold using an auxotrophic expression system [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 11930-11935.
- [6] Downey C M, Horton C R, Carlson B A, et al. Osteo-chondroprogenitor-specific deletion of the selenocysteine tRNA gene, Trsp, leads to chondronecrosis and abnormal skeletal development: A putative model for Kashin-Beck disease [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(8): e1000616.
- [7] French S W. Mechanisms of alcoholic liver injury [J]. *Can J Gastroenterol*, 2000, 14(4): 327-332.
- [8] Hoek J B, Pastorino J G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury [J]. *Alcohol*, 2002, 27(1): 63-68.
- [9] French S W. Alcoholic hepatitis: Inflammatory cell-mediated hepatocellular injury [J]. *Alcohol*, 2002, 27(1): 43-46.
- [10] Wojciech L, Ewa Z, Elzbieta S. Influence of green tea on erythrocytes antioxidant status of different age rats intoxicated with ethanol [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(3): 424-428.
- [11] Maria L O, Beatriz V, Fátima N, et al. Ethanol consumption by wistar rat dams affects selenium bioavailability and antioxidant balance in their progeny [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2009, 6: 2139-2149.
- [12] 鲁晓岚, 罗金燕, 张双保, 等. 抗 TNF 抗体和谷胱甘肽对大鼠脂肪肝的防治作用研究 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2007, 16(6): 555-560.
- Lu X L, Luo J Y, Zhang S B, et al. The effect of monoclonal antibody of tumor necrosis factor- α and glutathione on rat fat liver experimental models [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 16(6): 555-560. (in Chinese)
- [13] 杨 芳. 魔芋葡甘聚糖对大鼠酒精性脂肪肝的预防效果 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012, 40(8): 8-12.
- Yang F. A study on the preventive effect of KGM on the rat with alcoholic fatty liver [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2012, 40(8): 8-12. (in Chinese)
- [14] 杨 芳, 谢娟平, 王中兴, 等. 富硒魔芋精粉葡甘聚糖和硒含量的测定分析 [J]. *陕西农业科学*, 2011, 57(2): 61-63.
- Yang F, Xie J P, Wang Z X, et al. A study on determination of glucomannan and selenium in several kinds of konjac powder [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 57(2): 61-63. (in Chinese)
- [15] Llana P, González C, Fernandez-Inarrea J, et al. Selenium and health-related quality of life in menopausal women [J]. *Menopause Int*, 2009, 15(4): 144-149.
- [16] Payne R L, Southern L L. Changes in glutathione peroxidase and tissue selenium concentrations of broilers after consuming a diet adequate in selenium [J]. *Poult Sci*, 2005, 84(8): 1268-1276.
- [17] González R E, Galindo M L, Santolaria F F, et al. Prognostic value of serum selenium levels in alcoholics [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2008, 125(1): 22-29.