

中图分类号: S 852.35 文献标识码: A 文章编号: 1673-4696(2007)07-0610-04

# 氨基胍对内毒素血症肉鸡肝自由基损伤的影响

王友令<sup>1</sup>, 唐兆新<sup>2</sup>

(1. 山东省农业科学院 家禽研究所, 山东 济南 250100; 2. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为了探讨自由基在肉鸡内毒素血症发病机理中的作用, 将 90 只 30 日龄的肉鸡, 公母各半, 随机分为生理盐水对照组(A 组)、内毒素注射组(B 组)和氨基胍治疗组(C 组), 每组 30 只。分别在试验后第 1、3、5、7 和 9 h 每组各宰杀 6 只, 提取肝组织, 检测肝组织中的总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)含量的变化。结果显示, 内毒素血症时肝组织中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性降低, MDA 含量明显升高, 肝组织中 T-AOC 下降, 而氨基胍治疗组的情况明显好转。证实, 由自由基增多而引起的脂质过氧化损伤在肉鸡内毒素血症发病机理中起着重要的作用, 氨基胍可有效降低脂质过氧化造成的损伤。

**关键词:** 氨基胍; 肉鸡; 内毒素血症; 自由基; 肝

## Effect of aminoguanidine on liver free radical injury in broilers with endotoxemia

WANG You-ling<sup>1</sup>, TANG Zhao-xin<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;

2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To explore the effect of free radical in the pathogenesis of endotoxemia in broilers, ninety 30-day old broilers were randomly divided into three groups of A, B and C with 30 each. Group A was the control with injection of normal saline solution. Groups B and Group C were intravenously injected with lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurium* but Group C was intravenously injected with aminoguanidine one hour before injection of endotoxin. Six broiler livers were collected from every group. Activities of T-AOC, T-SOD, GSH-Px and CAT and content of MDA in the liver tissue were examined at different time points post-treatment. Content of MDA of Group B was increased gradually, and activities of T-AOC, T-SOD, CAT and GSH-Px of Group B were decreased gradually. The activities of antioxidase of Group C were improved much better than Group B. The results indicated that lipid peroxidation of liver tissue induced by endotoxin plays an important role in endotoxemia in broilers, and aminoguanidine can reduce this injury and effectively protect liver functions and structure.

**Key words:** aminoguanidine; broiler; endotoxemia; free radical; liver

自由基在许多疾病的发生和发展中已引起普遍关注。在内毒素血症或休克时, 肝作为机体清除内毒素的主要器官所受到的损伤, 一方面内毒素对肝细胞的直接损伤<sup>[1]</sup>, 另一方面是由于微循环障碍可能诱发氧自由基损伤, 破坏细胞结构和功能<sup>[2-3]</sup>。研究发现, 在试验性内毒素血症中, 肝功能明显减

退, 形态学亦发生显著变化, 包括肝组织内中性粒细胞和血小板聚集, 肝上皮细胞浊肿、空泡变性、坏死脱落等, 但其发生机理尚不清楚。氨基胍作为细胞保护剂在抗各类休克时已广泛应用, 但其保护机理仍不十分清楚。

本试验以肉鸡内毒素血症为模型, 通过检测肝

收稿日期: 2007-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(300750574, 30371068)

作者简介: 王友令(1974-), 男, 山东烟台人, 助理研究员, 硕士, Tel: 13793133972, E-mail: wangyouling71@163.com。

组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性等指标,探讨了肉鸡内毒素血症时氧自由基诱导的肝脂质过氧化损伤,并应用氨基胍研究了其保护机制,旨在为内毒素血症的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

30日龄岭南黄鸡90只:购自广东省农业科学院畜牧研究所养殖场,试验期内自由采食和饮水。伤寒沙门菌内毒素(LPS)、氨基胍(AG)购于Sigma公司。T-AOC、SOD、MDA、GSH-Px、CAT试剂盒为南京建成生物工程公司产品。

### 1.2 试验设计

30日龄试验鸡随机分为A、B、C共3组,每组30只。B组按每千克体重5mg的剂量经翅静脉注射LPS(简称LPS组),C组在注射LPS前1h按每千克体重300mg的剂量经翅静脉注射AG(简称AG+LPS组),A组注射同等体积的生理盐水(简称NSS组)。

### 1.3 肝组织的采取

在注射完毕后第1、3、5、7、9h,每组各宰杀6只试验鸡。迅速采取肝组织块10g,立即用滤纸吸干其表面的血液和水分,制备样品。

### 1.4 样品的制备<sup>[4]</sup>

取0.5g肝组织置于组织匀浆器中,用匀浆液(内含0.25mol/L蔗糖,5mmol/L Tris-HCl,0.1mmol/L EDTA,pH7.5)制成100g/L匀浆,500×g离心10min,取上清液进行检测。另取0.5g肝组织用匀浆液(10mmol/L磷酸缓冲液,pH7.5)制成100g/L匀浆,10000×g离心70min,取上清液,用预冷氯仿-甲烷混合液[V(氯仿):V(甲烷)=0.25:0.15]提取5min,10000×g离心15min,取上清液用于SOD活性测定。

### 1.5 测定项目与方法<sup>[4]</sup>

丙二醛(MDA)的含量:采用硫代巴比妥酸比色法;总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性:采用黄嘌呤氧化酶法;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性:采用DTNB法;过氧化氢酶(CAT)活性:采用Fenton反应和Gress试剂显色法;总抗氧化能力(T-AOC):采用FRAP法。

### 1.6 数据处理

应用SAS统计分析软件计算各组平均值和标准误,采用Ducans新复极差检验法(DMRT法)判断各组间的差异。

## 2 结果

### 2.1 LPS和AG+LPS对肉鸡肝MDA含量的影响

LPS组和AG+LPS组肉鸡肝组织中MDA含量分别与NSS组相比,各时间点均显著升高( $P<0.05$ )。AG+LPS组肉鸡肝组织中MDA含量与LPS组相比,除第1h外,在其他时间点均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表1。

### 2.2 LPS和AG+LPS对鸡肝T-SOD活性的影响

LPS组肉鸡肝组织T-SOD活性与NSS组相比,在所有时间点均显著降低( $P<0.05$ )。AG+LPS组肉鸡肝组织T-SOD活性与NSS组相比,除第7h无显著差异( $P>0.05$ )外,在其他时间点均显著降低( $P<0.05$ )。AG+LPS组与LPS组相比,在所有时间点,肉鸡肝T-SOD活性均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表1。

### 2.3 LPS和AG+LPS对鸡肝GSH-Px活性的影响

LPS组肉鸡肝组织GSH-Px活性与NSS组相比,除第1h无显著差异外,在其他时间点均显著降低( $P<0.05$ )。AG+LPS组肉鸡肝组织GSH-Px活性与NSS组相比,除第9h无显著差异外,在其他时间点均显著降低( $P<0.05$ )。AG+LPS组肉鸡肝GSH-Px活性与LPS组相比,在第1、3h时显著降低( $P<0.05$ ),在第5h时显著升高( $P<0.05$ ),而在第7、9h时差异不显著。结果见表1。

### 2.4 LPS和AG+LPS对肉鸡肝CAT活性的影响

LPS组肉鸡肝组织CAT活性与NSS组相比,在所有时间点均显著降低( $P<0.05$ )。AG+LPS组肉鸡肝组织CAT活性与生理盐水组相比,均显著降低( $P<0.05$ ),且其本身无大的波动。AG+LPS组肉鸡肝组织CAT活性与LPS组相比,在第3、9h时差异不显著( $P>0.05$ ),在第1、5、7h均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表1。

### 2.5 LPS和AG+LPS对肉鸡肝T-AOC的影响

LPS组肉鸡肝组织T-AOC与NSS组相比,除第9h无显著差异( $P>0.05$ )外,在其他时间点均显著下降( $P<0.05$ ),其动态变化整体上呈现缓慢上升的趋势。AG+LPS组肉鸡肝组织T-AOC与NSS组相比,在第1、7h时,差异不显著( $P>0.05$ ),在第3、5h时,显著下降,而在第9h时,又显著上升( $P<0.05$ ),其动态变化呈现先升高后下降的趋势。AG+LPS组肉鸡肝组织T-AOC与LPS组相比,在第1h时差异不显著( $P>0.05$ ),在第3、7、9h时显著升高( $P<0.05$ ),而在第5h时显著下降( $P<0.05$ )。结果见表1。

表 1 各组肉鸡肝组织 MDA 含量、T-SOD 活性、GSH Px 活性、CAT 活性、T-AOC 的变化

Table 1 Changes of MDA content,activities of T-SOD,GSH Px and CAT and T-AOC in liver tissue of broilers

指标 Indexes	组别 Groups	处理后不同时间点的各指标检测值 The indexes at different time points post-treatment				
		1st h	3rd h	5th h	7th h	9th h
MDA/ (g · L <sup>-1</sup> )	NSS	0.624 ±0.015 <sup>b</sup>	0.646 ±0.022 <sup>c</sup>	0.635 ±0.021 <sup>c</sup>	0.650 ±0.014 <sup>c</sup>	0.637 ±0.013 <sup>c</sup>
	LPS	1.351 ±0.011 <sup>a</sup>	1.450 ±0.039 <sup>a</sup>	1.584 ±0.028 <sup>a</sup>	1.740 ±0.014 <sup>a</sup>	2.470 ±0.040 <sup>a</sup>
	AG+LPS	1.313 ±0.005 <sup>a</sup>	1.209 ±0.022 <sup>b</sup>	1.065 ±1.065 <sup>b</sup>	1.265 ±0.007 <sup>b</sup>	1.600 ±0.005 <sup>b</sup>
T-SOD/ (U · mL <sup>-1</sup> )	NSS	677.268 ±0.712 <sup>a</sup>	690.132 ±0.709 <sup>a</sup>	666.257 ±0.709 <sup>a</sup>	664.403 ±7.577 <sup>a</sup>	664.671 ±7.577 <sup>a</sup>
	LPS	525.211 ±1.461 <sup>c</sup>	416.814 ±0.721 <sup>c</sup>	566.478 ±1.770 <sup>c</sup>	578.067 ±0.754 <sup>c</sup>	549.689 ±0.806 <sup>c</sup>
	AG+LPS	624.017 ±0.433 <sup>b</sup>	608.465 ±0.577 <sup>b</sup>	612.582 ±0.685 <sup>b</sup>	683.800 ±0.489 <sup>a</sup>	606.904 ±0.724 <sup>b</sup>
GSH-Px/ (U · mL <sup>-1</sup> )	NSS	24.257 ±0.929 <sup>a</sup>	24.029 ±0.703 <sup>a</sup>	24.226 ±0.369 <sup>a</sup>	24.170 ±0.919 <sup>a</sup>	24.084 ±0.818 <sup>a</sup>
	LPS	21.890 ±0.953 <sup>a</sup>	20.383 ±0.475 <sup>b</sup>	15.057 ±0.845 <sup>c</sup>	18.975 ±0.443 <sup>b</sup>	21.796 ±0.844 <sup>b</sup>
	AG+LPS	19.837 ±0.995 <sup>b</sup>	17.848 ±0.424 <sup>c</sup>	19.749 ±0.411 <sup>b</sup>	19.990 ±0.495 <sup>b</sup>	22.693 ±0.380 <sup>ab</sup>
CAT/ (U · mg <sup>-1</sup> )	NSS	21.193 ±0.854 <sup>a</sup>	19.480 ±0.940 <sup>a</sup>	21.458 ±0.484 <sup>a</sup>	22.206 ±0.621 <sup>a</sup>	20.569 ±1.019 <sup>a</sup>
	LPS	12.393 ±0.783 <sup>c</sup>	15.382 ±0.474 <sup>b</sup>	11.417 ±0.576 <sup>c</sup>	9.852 ±0.438 <sup>c</sup>	12.981 ±1.209 <sup>b</sup>
	AG+LPS	15.269 ±0.422 <sup>b</sup>	15.345 ±0.738 <sup>b</sup>	12.947 ±0.492 <sup>b</sup>	14.692 ±0.408 <sup>b</sup>	14.251 ±1.351 <sup>b</sup>
T-AOC/ (U · mg <sup>-1</sup> )	NSS	5.247 ±0.351 <sup>a</sup>	5.326 ±0.391 <sup>a</sup>	4.981 ±0.338 <sup>a</sup>	5.058 ±0.320 <sup>a</sup>	5.145 ±0.321 <sup>a</sup>
	LPS	3.088 ±0.455 <sup>b</sup>	2.460 ±0.122 <sup>c</sup>	3.856 ±0.195 <sup>b</sup>	2.774 ±0.221 <sup>b</sup>	4.263 ±0.240 <sup>a</sup>
	AG+LPS	4.825 ±0.898 <sup>ab</sup>	3.504 ±0.201 <sup>b</sup>	2.766 ±0.447 <sup>c</sup>	5.067 ±0.386 <sup>a</sup>	9.116 ±1.084 <sup>b</sup>

表中同一列带有不同上标字母的均值间差异显著 (P<0.05)

Means with different superscripts within the same column are different significantly (P<0.05)

3 讨论

3.1 内毒素血症时氧自由基的产生及抗氧化酶活性的变化

肝是细菌内毒素的主要清除器官,一方面枯否氏细胞吞噬内毒素,肝细胞摄取内毒素,另一方面中性粒细胞可产生一种酰羟水解酶,将内毒素的脂酰基切断,降低其生物活性。当内毒素血症或休克时,内毒素不仅引起肝血液动力学改变,使肝微静脉和小动脉收缩,肝有效循环血量下降,导致组织缺血缺氧,而且内毒素直接激活多形核白细胞和巨噬细胞,使细胞膜上的 NADPH 脱氢酶激活,催化分子氧单价还原生成氧自由基。Liu 等<sup>[2]</sup>的研究表明,内毒素激活的枯否氏细胞和中性粒细胞是产生氧自由基的主要来源。当肝微循环障碍时,缺血缺氧使 ATP 合成减少,细胞内阳离子分布异常,增多的 Ca<sup>2+</sup> 激活蛋白水解酶,使组织中黄嘌呤氧化酶(XOD)活化,催化黄嘌呤和次黄嘌呤产生超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)<sup>[5]</sup>。Kunimoto 等<sup>[6]</sup>给内毒素血症动物注射 SOD,可提高大鼠存活率,抑制 XOD 的活力,减少自由基释放。本试验证实,肉鸡内毒素血症时,机体处于氧化应激状态,抗氧化系统功能明显下降,脂质过氧化损伤加重。正常生理状态下,机体内自由基不断地产生,也不断地被自由基清除系统清除,维持着动态平衡。在内毒素血症时,氧自由基参与组织

细胞损伤,主要损伤细胞膜、细胞膜内酶及细胞核中 DNA 等多种细胞成分。自由基通过与细胞和亚细胞器膜磷脂中的多不饱和脂肪酸(PUFA)经链式或支链反应生成一系列脂质过氧化产物,引起细胞结构和功能的破坏,其反应终产物 MDA 可与类脂、蛋白质形成交联物<sup>[7]</sup>。因此,测定组织 MDA 含量及抗氧化系统功能可估价组织脂质过氧化损伤程度和氧自由基的生成情况。本试验结果显示,肉鸡内毒素血症时,在各时间段肝组织 GSH-Px、SOD、CAT 和 T-AOC 的活性明显降低,脂质过氧化物 MDA 含量明显增加,充分说明内毒素血症时肝组织抗氧化功能显著降低,自由基生成增多,导致肝组织脂质过氧化损伤。唐兆新等<sup>[4、8-10]</sup>对山羊内毒素性休克的研究结果表明,肝、肾、肺和血清中抗氧化酶活力明显下降,丙二醛含量明显升高,显示各器官和血液中存在明显的脂质过氧化损伤。充分表明,氧自由基在内毒素发病机制中起着非常重要的作用。

3.2 氨基胍对内毒素血症的保护作用

氨基胍是诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的抑制剂,能够减轻内毒素对机体的损伤作用。现在认为,其作用机制主要是由于氨基胍选择性地抑制了 iNOS 的活性,降低了体内 NO 的过量产生。在正常的情况下,体内产生的 NO 可以舒张血管,维持血管张力<sup>[11]</sup>。Crouser 等<sup>[12]</sup>研究表明,在内毒素血症时,肝是最早受到损伤的靶器官。Laskin 等<sup>[13]</sup>对试验

性肝损伤的研究表明,内毒素可刺激肝产生大量的NO。NO对机体的损害作用表现为:过量的NO会影响线粒体功能的发挥,主要是抑制复合体、抑制了电子的传递,这不但使ATP的产生量减少,还使氧自由基的生成增多<sup>[14]</sup>;过量的NO还会抑制线粒体中蛋白质和DNA的合成<sup>[15]</sup>。本试验结果表明,在注射氨基胍的内毒素治疗组脂质过氧化产物的量明显下降,并与生理盐水对照组差异不显著;同时在应用氨基胍后,各种抗氧化酶的活性明显升高。表明氨基胍抑制了iNOS的活性,降低了NO的生成量,从而降低了NO对线粒体的破坏作用,减少了氧自由基的产生,保证了能量的生成。

## 参考文献(References)

- [1] FOX E S, BROITMAN S A, THOMAS P. Bacterial endotoxins and the liver[J]. *Lab Invest*, 1990, 63(6): 733-741.
- [2] LIU P, FISHER M A, FARHOOD A, et al. Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin induced liver injury during ischemia and reperfusion[J]. *Circ Shock*, 1994, 43: 64-703.
- [3] JAESCHKE H. Enhanced sinusoidal glutathione efflux during endotoxin-induced oxidant stress *in vivo*[J]. *Am J Physiol*, 1992, 263: 60-68.
- [4] 唐兆新, 王炫英, 高洪, 等. 山莨菪碱对山羊内毒素休克时肝脏自由基损伤的保护机理[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(5): 490-493.
- TANG Zhao-xin, WANG Xuan-ying, GAO Hong, et al. Protective effect of anisodamine against liver free radical injury during endotoxic shock in goats[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1998, 18(5): 490-493. (in Chinese)
- [5] 周向东, 陈意生, 史景泉. 内毒素条件下参与中性粒细胞-血管内皮细胞黏附过程的分子基础[J]. *第三军医大学学报*, 1996, 18(2): 96-98.
- ZHOU Xiang-dong, CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan. Molecular basis of the adhesive process of neutrophils to vascular endothelial cells under endotoxin condition[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 1996, 18(2): 96-98. (in Chinese)
- [6] KUNIMOTO F, MORITA T, OGAWA R, et al. Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats[J]. *Circ Shock*, 1987, 21(1): 15-22.
- [7] FARBER J L, KYLE M E, COLEMAN J B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species[J]. *Lab Invest*, 1990, 62(6): 670-679.
- [8] 唐兆新, 高洪, 陈万芳. 山莨菪碱对内毒素诱导山羊肺脂质过氧化损伤的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 1998, 29(4): 371-376.
- TANG Zhao-xin, GAO Hong, CHEN Wan-fang. Effects of anisodamine on lung lipid peroxidation injury induced by endotoxin in goats[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1998, 29(4): 371-376. (in Chinese)
- [9] 唐兆新, 高洪, 马吉飞, 等. 山羊内毒素休克时山莨菪碱对肾脏自由基代谢的影响[J]. *南京农业大学学报*, 1998, 21(1): 91-95.
- TANG Zhao-xin, GAO Hong, MA Ji-fei, et al. Effects of anisodamine on renal free radical metabolism during endotoxic shock of goats[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1998, 21(1): 91-95. (in Chinese)
- [10] 唐兆新, 李培英, 王炫英, 等. 山羊内毒素休克诱发脂质过氧化作用及山莨菪碱对其影响的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 1998, 29(2): 179-185.
- TANG Zhao-xin, LI Pei-ying, WANG Xuan-ying, et al. Study on lipid peroxidation and effects of anisodamine in endotoxic shock of goats[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1998, 29(2): 179-185. (in Chinese)
- [11] WITTE K, SCHNECKO A, ZUTHER P, et al. Contribution of the nitric oxide-guanylyl cyclase system to circadian regulation of blood pressure in normotensive Wistar-Kyoto rats[J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 30(5): 682-688.
- [12] CROUSER E D, JULIAN M W, HUFF J E, et al. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia[J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(2): 478-488.
- [13] LASKIN D L, VALLE M R, HECK D E, et al. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats in mediatedly increased inducible nitric oxide synthase gene expression[J]. *Hepatology*, 1995, 22(1): 223-234.
- [14] BILLIAR M S M Jr. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis[J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(1): 829-839.
- [15] BILLIAR T R, CURRAN R D, STUEHR D J, et al. An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro*[J]. *J Exp Med*, 1989, 169(4): 1467-1472.

(责任编辑 张文举)