

L-NAME 对急性高眼压状态下大鼠视网膜的影响

归东梅 李迅 高殿文

【摘要】 目的 通过对大鼠实验前给予左旋-硝基精氨酸甲脂 (L-NAME, NO 前体左旋精氨酸类似物) 后, 观察急性高眼压后大鼠视网膜电图 (ERG) b 波幅的变化, iNOSmRNA 的表达情况。探讨 L-NAME 和 iNOS 在高眼压视网膜损伤中的作用。**方法** Wistar 大鼠 48 只随机分为 6 组, 前房加压灌注成高眼压模型, 6 组分别为高眼压 30min, 90min 组, 高眼压 90min 后 12h 组; 注射 L-NAME+ 高眼压 30min, 90min 组, 注射 L-NAME+ 高眼压 90min 后 12h 组。Alnplaldamk15 型视电生理仪检测 FERG-b 波波幅变化。RT-PCR 法检测 iNOSmRNA 的表达。**结果** 注射 L-NAME 组的 ERG-b 波波幅与未用药高眼压组相比, 前者明显恢复 ($P < 0.01$)。高眼压 30min, 90min, 高眼压 90min 后 12h iNOSmRNA 的表达逐渐增强, 但 L-NAME 组 iNOSmRNA 的表达明显低于对应的高眼压未用药组 ($P < 0.01$)。**结论** L-NAME 做为—氧化氮合酶的抑制剂, 通过抑制 iNOS 合成, 有助于缺血后的视网膜功能的恢复, 对视网膜起到保护作用。

【关键词】 高眼压; iNOS; 视网膜保护

Effect of L-NAME in rat retina on acute high ocular pressure GUI Dong-mei, LI Xun, GAO Dian-wen. NO2 affiliated clinic hospital of the China Medical University. ShenYang, 110004, China

【Abstract】 Objective Pretreatment with intravenous L-NAME, a precursor of nitric oxide(NO), observe the changes of electroretinography b-wave amplitude and expression of induced nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in rat retina under acute high ocular pressure, meanwhile observe b-wave of ERGs changes of retina. study the effect of L-NAME and iNOS in rat retinal damage under hypertension. **Methods** 48 Wistar rats were divided randomly into six groups. Ocular hypertension 30 min, 90 min and 12h after reperfusion, injection L-NAME+ hypertension 30 min, injection L-NAME+ hypertension 90 min, injection L-NAME+ 12h after reperfusion. Elevation of the ocular pressure in the anterior chamber of the rat eye caused retina ischemic damage. Then recorded b-wave of ERGs and expression of iNOS mRNA by PT-PCR. **Result** Pretreatment with intravenous L-NAME enhanced greatly b-wave amplitude($P < 0.01$) as compared with the groups of hypertension. The expression of iNOS mRNA is lower than the untreated groups. **Conclusion** As an inhibitor of iNOS, L-NAME may play an important role in protecting the retina from ischemic and post-ischemic injury.

【Key words】 high ocular pressure; iNOS; retinal protection

青光眼时导致视网膜神经纤维的破坏是最终引起患者视力严重下降的解剖基础。文献报导^[1]—氧化氮 (NO) 作为一种化学信使, 在青光眼的视网膜损害中起重要作用, 特别是诱导型—氧化氮合酶 (iNOS) 催化诱导产生的 NO 对视网膜神经节细胞的毒性作用。也有文献^[2]报道 NOS 的抑制剂左旋-硝基精氨酸甲脂 (L-NAME) 可提高视神经切断后的视网膜神经节细胞的存活力。我们拟通过静脉注

射一定剂量的 L-NAME 后, 观察视网膜电生理变化以及 iNOSmRNA 的表达的变化, 从而探讨 L-NAME 对青光眼视网膜的作用。

材料和方法

1. 实验动物及分组 选择 48 只出生 40-50 天的 Wistar 大鼠 (中国医科大学附属第二临床学院动物室)。体重 200-220 克, 无眼疾, 雌雄兼用。随机分为用药组和对照组两大组, 各组再分为 3 组共 6 组, 每组 8 只。每只大鼠一只眼为实验眼, 另一只眼为自身对照组, 6 组分别为高眼压 30min 组; 高

眼压 90min 组; 高眼压 90min 后 12h 组; 注射 L-NAME+ 高眼压 30min 组; 注射 L-NAME+ 高眼压 90min 组; 注射 L-NAME+ 高眼压 90min 后 12h 组。

2. 动物模型的制备 3% 戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射, 完全麻醉后, 将连接生理盐水瓶的输液管的 4 号针头沿颞侧角膜缘刺入 Wistar 大鼠的前房, 然后升高实验眼的输液瓶至与动物垂直距离为 136cm 处, 此高度可在眼内形成 13.33kPa (1kPa=7.5 mmHg) 的眼压, 其中 2 组分别维持 30min, 和 90min 制成高眼压模型^[1], 另 1 组为高眼压 90min 后血供恢复 12h。注射 L-NAME 组: L-NAME 由 Sigama 公司生产, 将 L-NAME 按 50mg/ml 的浓度溶于 PBS 液中, 注射时暴露大鼠的股静脉, 按 1ml/kg iv L-NAME 溶液 30min 后^[2]按前面所述方法制成另 3 组即注射 L-NAME+ 高眼压 30min 组; 注射 L-NAME+ 高眼压 90min 组和注射 L-NAME+ 高眼压 90min 后 12h 组。

3. 视网膜电图的测量: 采用周健等方法^[3], 充分散瞳暗适应后, 用 Alnplaldamk15 型视电生理仪检测 FERG-b 波变化。将钢针电极插入两眼连线中点和同侧耳廓皮下, 分别作为参考电极, 1% 地卡因点眼表面麻醉安放角膜电极, 角膜平面距离刺激器 15cm, 每分钟连续闪光 100 次, 滤波 0.01~100Hz 放大倍数 10。

4. 组织取材及视网膜 iNOSmRNA 的测定^[4]: 检测 ERG 后动物处死, 立即摘除双眼球, 置入 0℃ 生理盐水中, 沿睫状体平坦部冠状面切开眼球, 弃去眼前节, 小心完整分离视网膜后用滤纸吸干水分 -80℃ 深冻冰箱保存备用。总 RNA 的提取按照总 RNA 提取的试剂盒说明操作。iNOS 引物序列: 正义 5'-AGC ATC ACC CCT GTG TTC CAC CC-3', 反义 5'-TGG GGC AGT CTC CAT TGC CA-3' (引物由北京奥科生物技术有限公司合成) 扩增产物 388bp。β-actin 为内参照, 扩增产物 621bp。RT-PCR 条件: 50℃ 30min 逆转录, 94℃ 1min 变性, 64℃ 45s 退火, 72℃ 60s 延伸, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。iNOS 及 β-actin 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。紫外灯下拍照后用凝胶成像分析系统 (kodak digital science) 扫描扩增带, 以内参照值标准化 iNOS 值, 得到 iNOS 的相对含量。

5. 资料的统计分析 数据应用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析, 计算平均值与标准差 ($\bar{x} \pm s$),

两组之间比较用 t 检验。

结 果

一、L-NAME+ 高眼压组与对照组及高眼压组的 FERG-b 波振幅的比较 (见表 1):

表 1 急性高血压及缺血再灌注后 FERG-b 波振幅值 ($\bar{x} \pm s$, uV)

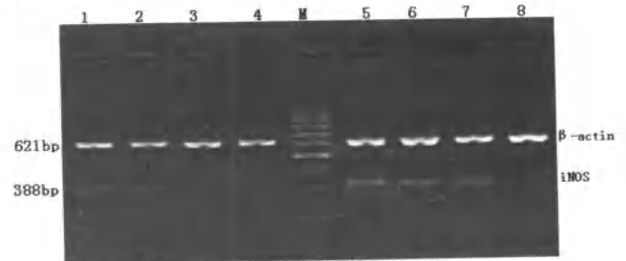
时间	例数	用药组 (高血压前给 L-NAME)	对照组 (高血压前未给药组)	t 值	P 值
高血压前	8	152.85 ± 11.39	154.17 ± 12.63	1.759	>0.05
高血压 30min	8	102.29 ± 13.13	14.32 ± 2.78	5.765	<0.01
高血压 90min	8	49.06 ± 8.40	13.92 ± 3.46	3.543	<0.05
高血压 90min 后 12h	8	103.31 ± 11.67	62.34 ± 8.01	4.868	<0.05

两组大鼠经暗适应后, 未给任何处理因素时 FERG-b 波波幅值比较, $P > 0.05$, 没有明显差异; 高眼压后, 用药组和对照组的 FERG-b 波波幅变化从高到低, 在高眼压 90 分钟时到达最低, 高眼压 90min 后 12 小时, 对照组和用药组 FERG-b 波波幅值都又开始恢复, 但用药组始终均明显高于对照组, 两组比较 $P < 0.05$, 有明显统计学意义。L-NAME 组高眼压 90min 后 12h, ERG-b 波恢复到实验前的 67%, 而对照组仅恢复到实验前的 47%, 两组比较 t 检验, $t=4.868$, $P < 0.05$ 。

二急性高血压及再灌注下大鼠视网膜内 iNOS-mRNA 的表达 (见表 2, 图 1)

表 2 急性高血压及缺血再灌注后 iNOSmRNA ($\bar{x} \pm s$)

时间	例数	用药组 (高血压前给 L-NAME)	对照组 (高血压前未给药组)	t 值	P 值
高血压前	6	0.367 ± 0.16	0.345 ± 0.25	0.976	>0.05
高血压 30min	6	0.496 ± 0.17	0.583 ± 0.21	1.658	<0.05
高血压 90min	6	0.536 ± 0.16	0.905 ± 0.14	3.849	<0.01
高血压 90min 后 12h	6	0.679 ± 0.18	1.258 ± 0.24	4.576	<0.01



1. 用药组高血压后 12 小时; 2. 用药组高血压 90 分钟;
3. 用药组高血压 30 分钟; 4. 用药组高血压前; M 100bp DNA ladder
5. 对照组高血压后 12 小时; 6. 对照组高血压 90 分钟;
7. 对照组高血压 30 分钟; 8. 对照组高血压前。

图 1 急性高眼压及缺血再灌注后 iNOSmRNA 表达

对照组与用药组在高血压前 iNOSmRNA 比较差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。随着高血压时间的延

长 iNOSmRNA 逐渐增加, 高眼压 90min 后 12h 达到高峰; 用药组 iNOSmRNA 的增加趋势明显减弱, 而且在各个时间段与对照组比较, 均具有显著性差异。

讨 论

文献报道内源性的 NO 不仅是眼循环中有力的血管扩张剂, 调节眼血管紧张性, 而且是重要的非胆碱能非肾上腺素能神经递质, 同时还是内毒素诱导的前葡萄膜炎的重要媒介物^[5,7]。在生理状态下的视网膜组织中 NO 是通过激活鸟苷酸环化酶产生大量环磷酸鸟苷 (cGMP), 由 cGMP 发挥一系列生物学效应。cGMP 水平与中枢神经系统兴奋性神经元传导密切相关, 作为第二信使 cGMP 在视网膜光感受器兴奋中起重要作用。在 NO-cGMP 信号传导系统中, 我们知道一氧化氮合酶 (NOS) 是 NO 合成的关键酶, NOS 有三种异构体, 即 nNOS, eNOS, iNOS。它们是不同的基因的表达产物, 其组织分布, 调节机制, 催化活性和抑制的敏感性均不相同。nNOS, eNOS 在生理条件下基因低水平表达, 酶活性依赖于钙离子, 合成的 NO 的作用以细胞传递为主。而 iNOS 为钙离子非依赖型, 在生理情况下一般无 iNOS 基因的表达, 是在某些刺激因素下诱导生成, 但此酶一旦诱生, 可持续合成 NO, 直至底物耗竭或细胞死亡。其合成的 NO 主要发挥细胞毒性作用。因此 NO 对细胞具有双重作用, 作用效应取决于 NO 的来源和含量以及机体的生理状况^[6]。我们以往的研究^[11]发现在急性高眼压下大鼠视网膜的 nNOS, eNOS 的表达降低, 而 NO 的含量却是升高, 我们间接的推测 iNOS-NO 途径在视网膜的损伤中占重要作用, 本实验证实了这一点。高眼压 30min 后, 视网膜中 iNOSmRNA 的表达开始升高而高眼压 90min 后 iNOSmRNA 的表达明显升高 ($P < 0.01$), 这种表达的升高直到高眼压 90min 后再灌注 12h 后, 这符合以往文献报道的 iNOS 在诱导因子的作用下起效慢, 但一旦诱生, 大量持续表达, 直至细胞死亡的特点。说明 iNOS 与高眼压下视网膜的损伤有密切关系。

左旋-硝基精氨酸甲酯 (L-NAME) 是 NO 的底物左旋精氨酸 (L-Arg) 的类似物, 竞争抑制 NOS 的活性, 从而使 NO 的产量降低^[6]。本研究结果显示, 注射 L-NAME+ 高眼压组与高眼压对照组相比较,

各个时间段 L-NAME+ 高眼压组 FERG-b 波波幅值明显高于对照组 ($P < 0.05$), L-NAME 组高眼压 90min 后 12h, ERG-b 波恢复到实验前的 67%, 而对照组仅恢复到实验前的 47%, 两组比较 $P < 0.05$ 。说明从视网膜的生理功能的角度看, L-NAME 对高眼压的视网膜具有保护作用。另外, RT-PCR 结果显示, L-NAME 组中 iNOSmRNA 的表达明显低于对应的高眼压对照组说明 L-NAME 抑制了 iNOS 的活性。而 iNOS 催化合成的大量 NO 可作为自由基与超氧阴离子反应生成超氧亚硝根离子 (ONOO), 它具有强的细胞毒性, 造成缺血再灌注后对视网膜的损伤加重^[9]。进一步说明 L-NAME 对高眼压后的视网膜的保护作用是通过抑制 iNOS 的活性, 使具有细胞毒性的 NO 的合成大大减少。但由于 L-NAME 是 NOS 的非特异的抑制剂, 因此它抑制 iNOS 的同时也抑制了 nNOS, eNOS 途径合成的 NO 作为细胞信使维持细胞的正常生理功能, L-NAME 抑制了信使 NO 的合成是否对细胞的其他一些功能造成影响还需进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 归东梅, 高殿文, 徐洪斌等. 急性高眼压状态大鼠视网膜一氧化氮及其合酶变化的研究. 中华眼底病杂志, 2001, 17: 230-233
- 2 Nikolaj Klj?cker, Alessandro Cellerino, Mathias B?hr. Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. The Journal of Neuroscience, 1998, 18(3):1038-1046
- 3 周健, 惠延年, 郭守一, 等. 玻璃体切除术对兔视网膜电图和超微结构的影响. 眼科研究, 1996, 14: 92-94
- 4 Feng Wu, Frank Park, Allen W. et al. Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol 1999, 276:F874-F881
- 5 Esplugues JV. NO as a signaling molecule in the nervous system. Br J Pharmacol, 2002, 135:1079-1095
- 6 Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J, 2001, 357:593-615
- 7 May CA, Mitty T. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) positive retinal amacrine cells are altered in the DBA/2N^{nia} mouse, a murine model for angle-closure glaucoma. J Glaucoma. 2004 Dec; 13(6):496-9
- 8 Koeberle PD, Ball AK. Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. Exp Neurol. 1999 Aug; 158(2):366-81
- 9 彭玉豪, 李和平, Clark AF. 青光眼性视网膜神经节细胞凋亡的病理机制. 中华眼科杂志, 2004, 40:495-499

(收稿时间: 2006-09)