

3'-大豆苷元磺酸钠在缺血再灌注损伤时对视网膜抗氧化能力及 NOS 活性的影响

李良东 黄志华 黎晓 刘东 占敏艳 曾靖

Effects of DSS on anti-oxidation and NOS activity after retinal ischemia/reperfusion injury in rats

Li Liangdong, Huang Zhizhua, Li Xiao, Liu Dong, Zhan Minyan, Zeng Jing. Department of Physiology, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

Abstract Objective The goal of this study was to research the effect of 3'-daidzein sulfonic sodium's (DSS) on anti-oxidation and nitric oxide synthase(NOS) activity following retinal ischemia /reperfusion (RI/R) injury. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided into sham control group, model group of RI/R injury, low-dosage DSS group and high-dosage DSS group randomly. The model of RI/R injury was created by dissociating and clamping the left CCA for 1 hour and then open the CCA for 1 hour in 18 SD rats, and the CCA was not clamped in sham group. 1 mL/kg normal saline solution (NS) was injected via sublingual vein after operation in sham group and model group, and 1 mg/kg and 2 mg/kg DSS was utilized at the same way respectively in low dosage or high dosage. After clamped CCA for 1 hour and reperused for 1 hour, the vein blood was collected for detection of contents of malondialdehyde (MDA) and NO in serum, the activity of NOS, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) was determined by colorimetric method. The use of animal followed the Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** The content of MDA in serum was obviously increased in model group compared with sham group ($P < 0.05$), and that in low-dosage DSS was decreased in comparison with model group ($P < 0.05$). The activity of GSH-Px in high-dosage DSS group was higher than that of model group ($P < 0.05$). The activity of SOD in low-dosage group was significantly higher than that of model group ($P < 0.05$). The content of serum NO in model group was lower than in sham group ($P < 0.001$). The content of serum NO in model group was lower than in low-dosage DSS group ($P < 0.05$) and high-dosage DSS group ($P < 0.01$) respectively. The activity of total NOS in low-dosage group was higher than that in model group ($P < 0.05$), and the endothelial NOS in two DSS groups showed an increase in comparison with model group ($P < 0.05$). **Conclusion** DSS can protect retina against cellular damage in RI/R injury eye through elevating the content of NO, activity of SOD and GSH-Px and increasing anti-oxidation of retina.

Key words 3'-daidzein sulfonic sodium; retinal ischemia/reperfusion; anti-oxidation; nitric oxide synthase

摘要 目的 研究 3'-大豆苷元磺酸钠 (DSS) 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤时对视网膜抗氧化能力及一氧化氮合酶 (NOS) 活性的影响。 **方法** 24 只 SD 大鼠按随机数字表法分成 4 组: 对照组、视网膜缺血再灌注模型组、低剂量 (1 mg/kg) 及高剂量 (2 mg/kg) DSS 组。颈总动脉夹闭法制作视网膜缺血再灌注模型, 比色法测定血清丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 浓度及 NOS、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。 **结果** 与对照组相比, 模型组血清 MDA 浓度升高 ($P < 0.05$), NO 浓度降低, eNOS 活性降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 低剂量 DSS 组 MDA 浓度降低, SOD 活性升高 ($P < 0.05$); 高剂量 DSS 组 GSH-Px 活性升高 ($P < 0.05$), tNOS 活性升高 ($P < 0.05$); DSS 低剂量组 ($P < 0.05$) 及高剂量组 ($P < 0.01$) NO 浓度与模型组比较均升高, 低剂量及高剂量 DSS 组 eNOS 活性均升高 ($P < 0.05$)。 **结论** DSS 可通过提高 eNOS、SOD 及 GSH-Px 的活性, 从而提高视网膜缺血再灌注损伤时的抗氧化能力及 NO 的释放, 降低组织细胞损伤, 保护眼功能。

关键词 3'-大豆苷元磺酸钠; 视网膜缺血再灌注损伤; 抗氧化; 一氧化氮合酶

分类号 R 774.1 R 998.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0545-04

缺血再灌注可造成视网膜损伤,与其他组织的损伤机制相同,也是多因素综合作用的结果,主要包括钙离子超载^[1]、自由基的大量产生^[2]、兴奋性氨基酸的过量释放^[3]、炎症反应^[4-5]、视网膜神经细胞凋亡^[6-8]、一氧化氮(NO)浓度及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)^[9]活性改变有关。3'-大豆苷元磺酸钠(3'-daidzein sulfonate sodium, DSS) (C₁₅H₉O₇SNa)是中药葛根的主要有效成分大豆苷元进行结构修饰和改性的新合成的强水溶性物质。本课题组前期研究显示, DSS具有耐缺氧^[10]、扩血管^[11]、抗氧化^[12]等作用。本实验通过颈总动脉夹闭法制备视网膜缺血再灌注损伤模型,研究 DSS对视网膜缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其保护作用与抗氧化作用的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及药物 DSS由沈阳药科大学提供,纯度>99%; NO、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、NOS分型试剂盒均购自南京建成生物工程公司。

1.1.2 实验动物及分组 24只清洁级雄性SD大鼠(江西中医学院实验动物中心,动物中心许可证号:2005-0001,动物合格证号:JZDW2006-076),体重250~280g。动物的使用和管理遵循国家科委颁布的《实验动物管理条例》。按随机数字表法将大鼠随机分成4组:对照组、模型组、低剂量DSS(1mg/kg)组及高剂量DSS(2mg/kg)组。

1.2 方法

1.2.1 大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型的制备 用10%水合氯醛溶液350mg/kg腹腔注射大鼠进行麻醉,采用夹闭左侧颈总动脉法制备视网膜缺血再灌注损伤模型,75%乙醇消毒颈部皮肤,沿颈正中中线剪开皮肤,分离颈总动脉,用动脉夹夹闭。夹闭颈总动脉前后,行眼底照相,视网膜血管变细以确定视网膜缺血形成,60min后松开动脉夹,舌下静脉注射荧光素钠进行荧光素血管造影,确定再灌注形成。对照组不夹闭颈总动脉,其余步骤均与实验组相同。对照组及模型组于分离颈总动脉后舌下静脉给予1mL/kg的生理盐水,其余2组注射同体积的低剂量或高剂量DSS。

1.2.2 血清 NOS、SOD、GSH-Px 活性及 NO、MDA 浓度的测定 再灌注60min后,大鼠腹腔静脉取血,4℃,3000r/min离心10min,取血清,-80℃保存。采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定 SOD 活性,化学比色法测

定 GSH-Px 活性, TBA 法测定 MDA 浓度, 硝酸还原酶法测定 NO 的浓度, 化学比色法分别测定总 NOS(total NOS, tNOS)及诱导型 NOS(induce NOS, iNOS)的活性, 两者之差即为内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)的活性。

1.3 统计学方法

应用 Prism 4.0 统计学软件进行统计学分析。各测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 4 组间各测定指标的总体比较采用单因素方差分析, 组内各指标的多重比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DSS 对视网膜缺血再灌注损伤时血清 MDA 浓度的影响

模型组大鼠血清 MDA 浓度高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 2 组 DSS 治疗后, 血清 MDA 浓度均降低, 其中低剂量组与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 DSS 对视网膜缺血再灌注损伤时血清 SOD 活性的影响

模型组与对照组大鼠相比血清 SOD 活性无明显差异, 2 组 DSS 治疗后, 血清 SOD 活性均有所升高, 其中低剂量组与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 DSS 对视网膜缺血再灌注损伤时组织 GSH-Px 活性的影响

模型组与对照组相比血清 GSH-Px 活性差异无统计学意义, 2 组 DSS 治疗后, 血清 GSH-Px 活性均升高, 其中高剂量组与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 DSS 对视网膜缺血再灌注损伤时血清 NO 浓度的影响

视网膜缺血再灌注模型组的血清 NO 浓度低于对照组 ($P < 0.01$), 低剂量 ($P < 0.05$) 及高剂量 ($P < 0.01$) 的 DSS 治疗后, 血清 NO 浓度均升高, 且呈剂量依赖性 (图 4)。

2.5 DSS 对视网膜缺血再灌注损伤时血清 NOS 活性的影响

模型组的血清 eNOS 活性低于对照组 ($P < 0.01$), tNOS 活性无明显变化; 2 组 DSS 治疗后, 大鼠血清 tNOS 及 eNOS 活性均升高, 其中高剂量组 tNOS 升高差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 低剂量及高剂量组的 eNOS 活性差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5, 6)。模型组 iNOS 活性较对照组升高, 而 DSS 低剂量组较模型组降低, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

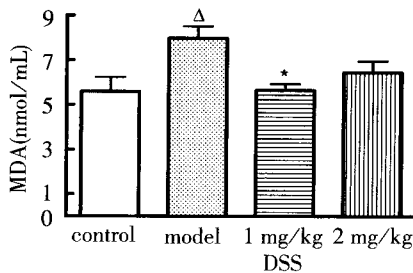


图 1 血清 MDA 浓度测定结果

Fig. 1 Concentration of MDA in serum $F = 4.676, P = 0.016$; control group vs model group: $q = 4.643, \Delta P < 0.05$; model group vs 1 mg/kg DSS group: $q = 4.528, * P < 0.05$ (One-way ANOVA, SNK- q test)

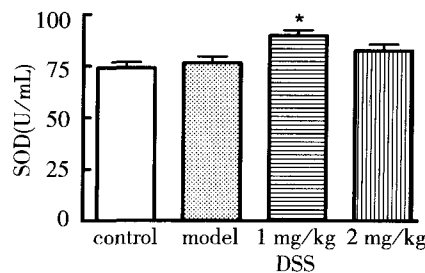


图 2 血清 SOD 活性测定结果

Fig. 2 Activity of SOD in serum $F = 5.776, P = 0.009$; model group vs 1 mg/kg DSS group: $q = 4.500, * P < 0.05$ (One-way ANOVA, SNK- q test)

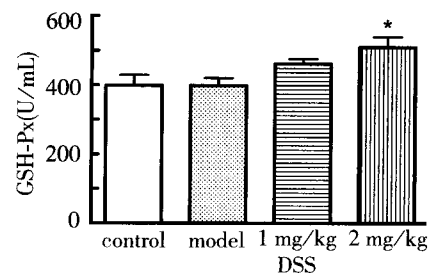


图 3 血清 GSH-Px 活性测定结果

Fig. 3 Activity of GSH-Px in serum $F = 4.075, P = 0.015$; model group vs 1 mg/kg DSS group: $q = 4.477, * P < 0.05$ (One-way ANOVA, SNK- q test)

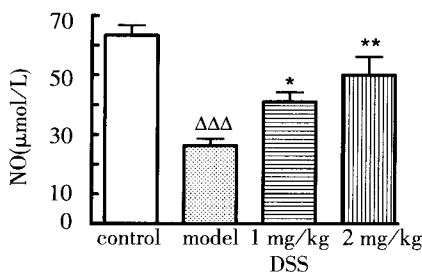


图 4 血清 NO 浓度测定结果

Fig. 4 Concentration of NO in serum $F = 14.840, P < 0.01$; control group vs model group: $q = 9.172, \Delta \Delta \Delta P < 0.01$; model group vs 2 mg/kg DSS group: $q = 5.860, * P < 0.01$; model group vs 1 mg/kg DSS group: $q = 3.656, * P < 0.05$ (One-way ANOVA, SNK- q test)

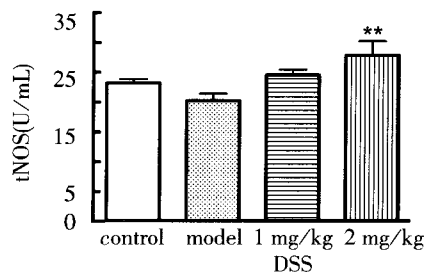


图 5 血清 tNOS 活性测定结果

Fig. 5 Activity of tNOS in serum $F = 4.645, P < 0.01$; model group vs 2 mg/kg DSS group: $q = 5.194, ** P < 0.01$; model group vs 1 mg/kg DSS group: $q = 2.936, P > 0.05$ (One-way ANOVA, SNK- q test)

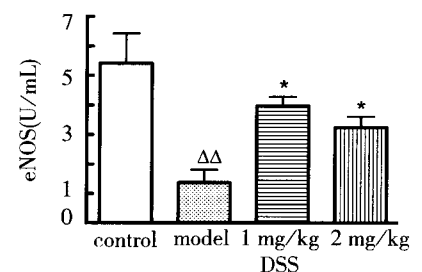


图 6 血清 eNOS 活性测定结果

Fig. 6 Activity of eNOS in serum $F = 7.711, P < 0.01$; control group vs model group: $q = 6.673, \Delta \Delta P < 0.01$; model group vs 2 mg/kg DSS group: $q = 3.095, * P < 0.05$; model group vs 1 mg/kg DSS group: $q = 4.308, ** P < 0.05$ (One-way ANOVA, SNK- q test)

3 讨论

急性闭角型青光眼急性发作、视网膜中央动脉闭塞等,可导致视网膜血流减少或中断而引起缺血损伤;当眼压降低或血管阻塞解除,视网膜血流重新恢复时又可引起视网膜组织细胞更严重的损伤^[13]。视网膜缺血再灌注损伤是由多种因素介导的复杂病理生理过程,而自由基连锁反应是造成组织损伤的核心环节。在视网膜缺血再灌注的过程中,抗氧化酶系统活性减弱,氧自由基及自由基类产物增加^[14]。活性氧自由基不但通过一系列的链式反应引起细胞凋亡,而且通过脂质过氧化产物引起细胞的损伤^[2]。MDA 是各类自由基攻击细胞膜中不饱和脂肪酸后形成的脂质过氧化稳定产物,其浓度的高低可反映细胞的损伤程度。SOD 及 GSH-Px 是生物体产生的一种天然抗氧化酶,可清除生理及病理状态下产生的氧自由基,减轻组织细胞的脂质过氧化损伤。本研究显示,经 DSS 治疗后,大鼠血清 MDA 浓度减少,SOD、GSH-Px 活性升高,

提示 DSS 可通过提高抗氧化酶系统的功能,减轻氧自由基介导的脂质过氧化反应,减轻缺血再灌注对视网膜细胞的损伤。

NO 是中枢神经系统中重要的神经调节因子,参与视网膜许多重要的生理过程。NO 是在 NOS 催化下,由 L-精氨酸分解而成。NOS 有 3 种亚型,分别为 nNOS、eNOS 及 iNOS。来源于 iNOS 的 NO 具有毒性,其对各种类型的细胞包括神经细胞都具有抑制作用和细胞毒性作用;由 eNOS 催化形成的 NO 通过增加缺血区域的血流量,防止血小板聚集和白细胞黏附,以及作为一种抗氧化剂,阻断脂质过氧化连锁反应^[15],而对组织细胞缺血有保护作用;来源于 nNOS 的 NO 具有神经毒性作用。本实验应用硝酸还原酶法测定 NO 的浓度,发现视网膜缺血再灌注模型组血清 NO 浓度降低,而 DSS 具有一定的刺激内皮细胞释放 NO 的能力;进一步实验证实 DSS 主要是通过提高 eNOS 的活性来促进 NO 的合成,因此推测 DSS 可通过增加保护性 NO 的释放而对视网膜缺血再灌注损伤起保护作用。

参考文献

- 1 Torin N, Akaike A, Yasuyoshi H, et al. Lomerizine, a Ca^{2+} channel blocker, reduces glutamate induced neurotoxicity and ischemia reperfusion damage in rat retina [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70 (4): 475 - 484
- 2 Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, et al. Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina [J]. *Glia*, 2005, 50 (1): 1 - 11
- 3 Kwon YH, Rickman DW, Baruah S, et al. Vitreous and retinal amino acid concentrations in experimental central retinal artery occlusion in the primate [J]. *Eye*, 2005, 19 (4): 455 - 463
- 4 Yoneda S, Tanihara H, Kido N, et al. Interleukin-1 betamediates ischemic injury in the rat retina [J]. *Exp Eye Res*, 2001, 73 (5): 661 - 667
- 5 Sanchez RN, Chan CK, Garg S, et al. Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (9): 4006 - 4011
- 6 Oz O, Gurelik G, Akyurek N, et al. A short duration transient ischemia induces apoptosis in retinal layers: an experimental study in rabbits [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2005, 15 (2): 233 - 238
- 7 陈芝清, 姚克, 徐雯, 等. E-64d 对大鼠视网膜缺血再灌注损伤中 Calpain 和 Caspase-3 表达的调控作用 [J]. *眼科研究*, 2007, 25 (1): 44 - 48
- 8 牛膺筠, 赵颖, 贾新国, 等. 视网膜缺血再灌注损伤后 HSP70、NF- κ B 的表达和细胞凋亡的关系 [J]. *眼科研究*, 2005, 23 (4): 377 - 379
- 9 Cheon EW, Park CH, Kang SS, et al. Change in endothelial nitric oxide synthase in the rat retina following transient ischemia [J]. *Neuroreport*, 2003, 14 (3): 329 - 333
- 10 曾靖, 曾昭毅, 黄志华, 等. 3'-大豆苷元磺酸钠的耐缺氧作用 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10 (23): 130 - 132
- 11 Li LD, Zeng J, Qiu F. Effect of 3'-Daidzein sulfonate sodium on contractile of rabbit thoracic aortic strips [J]. *Drug Devel Res*, 2005, 66 (3): 243
- 12 黄志华, 李良东, 肖海, 等. 3'-大豆苷元磺酸钠对心肌缺血再灌注损伤及抗氧化作用的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25 (4): 481 - 483
- 13 Tsujikawa A, Ogura Y, Hiroshiba N, et al. Retinal ischemia-reperfusion injury attenuated by blocking of adhesion molecules of vascular endothelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 1183 - 1190
- 14 Song Y, Gong YY, Xie ZG, et al. Edaravone (MCI-186), a free radical scavenger, attenuates retinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29 (7): 823 - 828
- 15 Rios L, Cluzel J, Vennat JC, et al. Comparison of intraocular treatment of DMTU and SOD following retinal ischemia in rats [J]. *Ocul Pharmacol Ther*, 1999, 15 (6): 547 - 556

(收稿: 2009-03-03 修回: 2009-05-23)

(本文编辑: 王莉红)

读者·作者·编者

本刊英文参考文献著录的注意事项

按照我国出版物中的文后参考文献的著录规则, 英文的参考文献主要涉及主要责任者、题名、版本、出版项(出版地、出版者、出版日期)、期刊名称、出版年、卷(期)和页码等信息。

1 主要责任者的著录方法

1.1 个人著者采用姓在前用全称, 名在后用缩写的著录形式。一般来说, 国外作者在发表文章时常采用名前姓后的形式, 所以作者在著录参考文献时应注意交换原文中作者姓名的书写顺序。

1.2 姓名中若表示“小”或“几世”时, 应将其放置于姓名最后, 并用逗号隔开, 如 Day FW, Jr.

1.3 西方人姓名中的 von, van, de, la 为姓的组成部分, 当其移至前面时, 首字母大小写均可, 如 von Hindenberg P.

1.4 如姓名中出现复姓时, 著录格式为夫姓-妇姓在前均用全称, 名在后用缩写的形式。

1.5 著作方式相同的责任者不超过 3 人时, 可全部照录。责任者超过 3 人时, 只著录前 3 位责任者, 其后加“et al”字样。

1.6 集体责任者, 可直接按照著录来源著录, 每个词的首字母大写。

2 题名和出版项的著录方法

2.1 题名 包括书名和刊名。作者书写刊名时可采用国际上通行刊名缩写的方法。有以下规则供作者参考: 1 个单音节或 5 个以下字母组成的词不缩写; 由一个单独的词构成的刊名不缩写(如 Ophthalmology); 一般可从缩写刊名中删除英文的虚词; 参考各英文期刊惯用的缩写刊名。题名的字母大小写可参考拟投稿期刊的格式要求。

2.2 出版项 参考文献的出版项按出版地、出版者和出版年顺序著录。如 New York: Academic Press, 1978.

2.2.1 出版地 即出版者所在的城市名称。原著作中若著有多个出版地时, 只著录一个处于明显位置的出版地。原著作无出版地时, 应注明[s. l.]字样(出版地不详)。

2.2.2 出版者 可按照原著作中的形式、公认的简化形式或缩写形式著录。原著作中若著有多个出版者时, 只著录一个处于明显位置的出版者。无出版者时应注明[s. n.]字样(出版者不详)。

2.2.3 出版日期 以阿拉伯数字著录。

(本刊编辑部)