

- 12 Buch H, Morten V, Cour ML, et al. The prevalence and causes of bilateral and unilateral blindness in an elderly urban Danish population. The Copenhagen City Eye Study [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2001, 79: 441-449
- 13 Munoz B, West SK, Rubin GS, et al. Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans [J]. *Arch Ophthalmol*, 2000, 118: 819-825
- 14 Faran MF, Rajhi AA, Omar OM, et al. Prevalence and causes of visual impairment and blindness in the southwestern region of Saudi Arabia [J]. *Int Ophthalmol*, 1993, 17: 161-165
- 15 Klein R, Klein BEK, Linton KLP, et al. The Beaver Dam Eye Study: visual acuity [J]. *Ophthalmology*, 1991, 98: 1310-1315
- 16 Bourne RRA, Dineen B, Ali SM, et al. The national blindness and low vision prevalence survey of Bangladesh: Research design, eye examination methodology and result of the pilot study [J]. *Ophthalmol Epidemiol*, 2002, 9: 119-132
- 17 Tielsch JM, Sommer A, Witt K, et al. Blindness and visual impairment in an American urban population [J]. *Arch Ophthalmol*, 1990, 108: 286-290
- 18 Baasanhu J, Johnson GJ, Burendei G, et al. Prevalence and causes of blindness and visual impairment in Mongolia: a survey of populations aged 40 years and older [J]. *Bull World Health Organ*, 1994, 72: 771-776
- 19 张士元, 邹留河, 高永庆, 等. 全国盲及低视力的流行病学调查 [J]. *中华眼科杂志*, 1992, 28: 260-266
- 20 Klein BEK, Klein R, Ritter LL. Is there evidence of an estrogen effect on age-related lens opacities; the Beaver Dam Eye Study [J]? *Arch Ophthalmol*, 1994, 11(2): 85-91
- 21 陈建华, 徐亮, 胡爱莲, 等. 北京市城乡限定人群低视力与盲的患病率及其病因的调查 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(16): 1413-1417
- 22 王研, 孙葆忱, 徐亮, 等. 北京市 40 岁以上部分人群屈光矫正前后视力损害分析 [J]. *眼视光学杂志*, 2004, 6: 109-113

(收稿: 2009-07-30 修回: 2009-10-20)

(本文编辑: 尹卫靖)

## · 短篇论著 ·

## 氨基胍对缺血-再灌注损伤视网膜形态和功能的影响

曹永亮 赵岩松 张 杰 王 平 王 杰

视网膜缺血-再灌注损伤 (retina ischemia reperfusion injury, RIRI) 是眼科临床常见的病理过程, 可导致视网膜结构和功能的严重损伤, 其损伤机制复杂, 治疗效果不理想, 影响患者视功能的恢复。研究发现 NO 在 RIRI 中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>, 一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 是 NO 合成的限速酶, 应用 NOS 抑制剂氨基胍 (aminoguanidine, AG) 对大鼠青光视网膜神经节细胞具有明显的保护作用<sup>[3]</sup>, 而 AG 对 RIRI 有无保护作用尚不清楚。本研究通过建立大鼠 RIRI 模型, 腹腔注射 AG, 光镜观察其组织病理学变化, 视网膜电图 (flash electroretinogram, F-ERG) 检测视网膜功能变化, 探讨 AG 对 RIRI 的保护作用。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 AG (美国 Sigma 公司) 用蒸馏水溶解, 配制成 0.5% AG 溶液, 0.1 mol/L 盐酸滴定, pH 为 7.0~7.5, 质量分数 25 mg/kg<sup>[4]</sup>; 生理盐水 (山东临淄制药有限公司)。电生理仪-2000 (美国 EPIC 公司); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 图像分析系统 (德国 Opton Vidas 公司)。

1.1.2 实验动物及分组 健康无眼疾 SD 大鼠 (中国人民解放军第八十九医院实验动物中心提供) 50 只, 体重 250~300 g, 雌雄不限, 室温环境饲养。随机分为正常组 (仅行麻醉处理)、对照组 (麻醉后仅前房刺入针头, 不升高眼压)、模型组、生理盐水治疗组、AG 治疗组, 每组 10 只, 其中 5 只行组织病理学观察,

5 只行 F-ERG 检测。

## 1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 应用升高眼压的方法建立视网膜缺血-再灌注损伤动物模型<sup>[5]</sup>。右眼缺血 2 h 后再灌注 24 h。

1.2.2 给药方法与剂量 SD 大鼠右眼视网膜缺血 2 h, 再灌注 24 h 后腹腔注射给药, 应用 5 mL 一次性注射器, AG 质量分数为 25 mg/kg<sup>[4]</sup>, 生理盐水质量分数 10 mg/kg, 每日 2 次, 连续 7 d。

1.2.3 视网膜组织病理学检测及图像分析 饲养 7 d 各不同实验组 5 只大鼠, 颈椎脱臼法处死动物, 摘除眼球, 10% 甲醛固定, 常规石蜡切片, 厚度为 5  $\mu$ m, 苏木精-伊红染色, 光镜观察。图像分析系统测量视网膜内层厚度, 并计数视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的数量。

1.2.4 F-ERG 检测 饲养 7 d 各组 5 只大鼠, 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 0.5% 托吡卡胺滴眼液散瞳, 1% 丁卡因滴眼液表面麻醉, 记录 F-ERG 最大值反应 a 波、b 波振幅和 OPs 波各小波振幅之和 OZ 值<sup>[6]</sup>。每只大鼠测量 3 次, 取其平均值。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件对数据进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组总体均数比较采用两因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-q 检验, 两样本均数差异比较采用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 视网膜的形态学变化 正常组与对照组大鼠视网膜结构无明显差异, 视网膜组织结构清晰可见, RGCs 排列整齐, 分布均匀。模型组和生理盐水治疗组鼠视网膜组织结构相似, 视网

膜内层明显变薄, RGCs 减少, 排列紊乱, 分布稀疏, 有空泡及核固缩现象, 其视网膜内层厚度和 RGCs 数量与正常组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 生理盐水治疗组与模型组相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。AG 治疗组鼠视网膜内层较模型组明显增厚, RGCs 排列基本整齐, 分布稍稀疏, 偶见核固缩现象, 与模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 与正常组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 1), 说明 AG 对缺血 - 再灌注损伤视网膜有一定的治疗保护作用。

表 1 实验各组视网膜内层厚度和 RGCs ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	视网膜内层 ( $\mu\text{m}$ )	RGCs (个)
正常	5	90.26 $\pm$ 3.69	23.60 $\pm$ 3.85
对照	5	87.88 $\pm$ 3.83	24.80 $\pm$ 2.78
模型	5	69.18 $\pm$ 5.38 <sup>ef</sup>	15.00 $\pm$ 2.74 <sup>ef</sup>
生理盐水	5	67.65 $\pm$ 3.90 <sup>f</sup>	15.60 $\pm$ 2.41 <sup>f</sup>
AG	5	84.46 $\pm$ 4.36	21.22 $\pm$ 3.03
F		223.86	114.37
P		<0.01	<0.01

<sup>e</sup>  $P < 0.01$  vs 正常组, <sup>f</sup>  $P < 0.01$  vs AG 组

2.2 F-ERG 的变化 正常组与对照组鼠 F-ERG 波形基本相似, a、b、OPs 波形规整。模型组和生理盐水治疗组 F-ERG 波形不规整, a、b、OPs 波振幅均降低, 与正常组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 生理盐水组与模型组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 2), 说明生理盐水对缺血 - 再灌注损伤视网膜无治疗保护作用。AG 治疗组 F-ERG 波形比较规整, a、b、OPs 波振幅均有提高, 与模型组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 与正常组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 2), 说明 AG 能明显提高 F-ERG 的 a、b、OPs 波振幅, 改善缺血 - 再灌注损伤视网膜的功能。

表 2 实验各组 F-ERG a、b、OPs 波振幅 OZ 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	a 波振幅 ( $\mu\text{V}$ )	b 波振幅 ( $\mu\text{V}$ )	OPs 波振幅 (OZ) ( $\mu\text{V}$ )
正常	5	137.72 $\pm$ 25.39	247.38 $\pm$ 25.53	216.14 $\pm$ 16.05
对照	5	143.01 $\pm$ 25.00	244.58 $\pm$ 24.13	218.26 $\pm$ 13.87
模型	5	61.22 $\pm$ 15.00 <sup>ef</sup>	175.04 $\pm$ 23.06 <sup>ef</sup>	148.56 $\pm$ 10.14 <sup>ef</sup>
生理盐水	5	48.68 $\pm$ 11.77 <sup>f</sup>	172.49 $\pm$ 32.68 <sup>f</sup>	147.76 $\pm$ 13.27 <sup>f</sup>
AG	5	125.53 $\pm$ 24.90 <sup>f</sup>	232.25 $\pm$ 18.90 <sup>f</sup>	186.80 $\pm$ 10.23 <sup>f</sup>
F		11.31	19.07	27.84
P		<0.01	<0.01	<0.01

<sup>e</sup>  $P < 0.01$  vs 正常组, <sup>f</sup>  $P < 0.01$  vs AG 组

### 3 讨论

眼科临床上许多疾病均可导致 RIRI 发生, 由于其发病机制复杂、治疗困难而成为眼科研究的热点。研究发现 NO 参与了 RIRI 过程<sup>[1-2]</sup>, 而 NOS 抑制剂可有效抑制 iNOS mRNA 活性, 减少 NO 生成, 从而减轻组织损伤<sup>[7]</sup>。

本研究应用 NOS 抑制剂 AG 抑制 iNOS 活性, 减少 NO 的生成, 探讨其对 RIRT 治疗保护作用。光镜观察发现正常组和

对照组鼠视网膜组织结构清晰可见, RGCs 排列整齐, 分布均匀, 模型组和生理盐水治疗组鼠 IRL 明显变薄, RGCs 减少, 排列紊乱, 分布稀疏, 并有空泡及核固缩现象, 而 AG 治疗组鼠 IRL 较模型组和生理盐水治疗组明显增厚, RGCs 排列基本整齐, 偶见核固缩现象。F-ERG 发现模型组和生理盐水治疗组 a、b、OPs 波振幅均较低, 但 AG 治疗组 F-ERG 波形比较规整, a、b、OPs 波振幅均有明显提高, 说明 AG 对缺血 - 再灌注损伤视网膜从形态上和功能上都有一定影响, 对 RIRT 有一定的治疗保护作用。AG 是一类胍类化合物, 为选择性 iNOS 抑制剂, 可有效抑制 iNOS 活性, 减少 NO 生成, AG 对 RIRT 治疗保护作用可能通过与 iNOS 催化部位血红素铁可逆性结合, 改变其活性基团构象, 从而抑制 iNOS 活性, 减少 NO 生成<sup>[7]</sup>, 同时也减少了 NO 来源的毒性过氧化亚硝酸阴离子 ( $\text{ONOO}^-$ ) 产生<sup>[8]</sup>, 从而保护细胞和线粒体膜性结构的稳定性和功能, 促进神经功能的恢复, AG 也可抑制缺血局部炎性细胞的渗出, 减轻组织水肿<sup>[9]</sup>, 起到神经保护作用。AG 具有高度选择性, 是高效、低毒和安全的 iNOS 抑制剂<sup>[10]</sup>, 为眼科临床缺血性视网膜疾病的治疗提供了新的方法。但有关 AG 治疗时给药时间、剂量、体内代谢特点等尚需进一步研究。

### 参考文献

- Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, et al. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Eye Res*, 1996, 63 (5): 501 - 509
- 曹永亮, 仇宜解, 康凤英, 等. iNOS mRNA 在缺血再灌注损伤视网膜中的表达 [J]. *眼科研究*, 2002, 20 (5): 437 - 439
- Neufeld AN, Sawada A, Becker B. Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (17): 9944 - 9948
- Geyer O, Almog J, Lupu-Meir M, et al. Nitric oxide synthase inhibitors protect rat retina against ischemic injury [J]. *FEBS Lett*, 1995, 374: 399 - 402
- Buchi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rat: an experimental model for quantitative study [J]. *Ophthalmologica*, 1991, 203: 138 - 147
- 孟磊, 唐仕波, 林少芬, 等. 银杏内酯 B 对 N-甲基-N-亚硝基豚鼠的大鼠视网膜变性的保护作用 [J]. *眼科研究*, 2006, 24 (4): 340 - 343
- Wolff DJ, Lubeskie A. Aminoguanidine is an isoform-selective mechanism based inactivator of nitric oxide synthase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 316 (1): 290 - 301
- Becqet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide in the eye: multifaceted role and diverse outcome [J]. *Surv Ophthalmol*, 1997, 42: 71 - 81
- Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, et al. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis [J]. *Diabetes*, 1998, 47: 1114 - 1120
- Foote EF, Look ZM, Giles P, et al. The pharmacokinetics of aminoguanidine in end-stage renal disease patients on hemodialysis [J]. *Am J Kidney Dis*, 1995, 25 (3): 420 - 425

(收稿: 2009-08-14)

(本文编辑: 尹卫靖)