

## 氨基胍高选择性抑制 iNOS 在糖尿病大鼠视网膜中的研究\*

罗大卫, 邹海东, 刘 堃, 郑 志, 孙晓东, 许 迅, 朱弼珺<sup>△</sup>

(上海交通大学附属第一人民医院眼科 200080)

**摘要:**目的 探讨氨基胍对糖尿病大鼠视网膜的治疗作用及机制。方法 60 只大鼠分为对照组( $n=20$ )、糖尿病组( $n=20$ )、氨基胍治疗组( $n=20$ ), 给药 14 d 后取大鼠眼组织进行病理学观察(HE 染色), 采用 ELISA、Western blot、PT-PCR 检测各组大鼠诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮细胞性一氧化氮合酶(eNOS)、神经型一氧化氮合酶(nNOS)水平及表达的差异。结果 HE 染色结果显示, 氨基胍治疗组与糖尿病组比较, 大鼠视网膜组织缺损明显降低, 神经元细胞增多。氨基胍治疗组、对照组 iNOS 水平显著低于糖尿病组, 对照组 nNOS 水平明显低于其他两组; 3 组 eNOS 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。氨基胍治疗组与糖尿病组比较, iNOS 蛋白表达降低( $P<0.05$ ), 与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。氨基胍治疗组大鼠 iNOS mRNA 表达低于 eNOS mRNA 和 nNOS mRNA。结论 氨基胍可以改善糖尿病大鼠视网膜组织病变, 作用途径可能是选择性地抑制 iNOS 的活性。

关键词: 糖尿病; 氨基胍; 一氧化氮合酶

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)19-2440-03

## Treatment of aminoguanidine in retina of diabetic of rats with selective inhibits induced nitric oxide synthase\*

Luo Dawei, Zou Haidong, Liu Kun, Zheng Zhi, Sun Xiaodong, Xu Xun, Zhu Bijun<sup>△</sup>

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

**Abstract: Objective** To investigate the treatment and mechanism of aminoguanidine in retina of diabetic of rats. **Methods** Total 60 rats were divided into control group( $n=20$ ), diabetic group( $n=20$ ) and aminoguanidine treatment group( $n=20$ ) which would be treated by aminoguanidine for 14 days. Then the eye tissue of rats were took after 14 days administration for pathological observation(HE staining), and the induced nitric oxide synthase(iNOS), endothelial nitric oxide synthase(eNOS), nerve type of nitric oxide synthase(nNOS) level and the expression of differences content and expression were investigated by ELISA, Western blot and PT-PCR. **Results** HE staining showed that retinal tissue defects decreased and neuronal cells of rats in aminoguanidine treatment group were increased and significant( $P<0.05$ ) compared rats in diabetic group. The iNOS content and expression of rats in aminoguanidine treatment group were lower than diabetic group by ELISA, Western blot and PT-PCR, it was significantly difference ( $P<0.05$ ) and without significant difference between the normal group and diabetic group( $P>0.05$ ). Compared with diabetes group, iNOS, eNOS, nNOS protein expression in the rat retina in aminoguanidine treatment group were reduced ( $P<0.05$ ), and without significant difference between the normal group and aminoguanidine treatment group( $P>0.05$ ). The iNOS mRNA expression was lower than that of eNOS mRNA and nNOS mRNA in aminoguanidine treatment group. **Conclusion** Aminoguanidine can improve retinal tissue of diabetic rats with lesions, the pathways may be selectively inhibit inducible nitric oxide synthase activity of iNOS.

Key words: diabetes mellitus; aminoguanidine; nitric oxide synthase

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见、最严重的并发症之一,也是成年人低视力和盲的主要原因<sup>[1]</sup>。DR 发病机制迄今尚未完全阐明,且无有效的治愈方法,早期发现、早期治疗对延缓其进展至关重要<sup>[2]</sup>。一氧化氮(NO)作为一种重要的血管活性物质,与 DR 中毛细血管闭塞、微循环障碍、内皮细胞增殖相关<sup>[3]</sup>。一氧化氮合酶(NOS)是 NO 合成过程中的关键酶,可直观反映 NO 在 DR 中的作用机制<sup>[4]</sup>。氨基胍是一类 NOS 抑制剂,可以抑制 NOS 的活性,对 DR 等具有一定的治疗效果<sup>[5]</sup>,但是其作用途径及机制尚不明确,因此,研究氨基胍治疗 DR 的机制可以指导临床用药,对开发新的治疗药物具有一定的指导作用。

## 1 材料与方

**1.1 材料** (1)实验动物:健康雄性 Wistar 大鼠共 60 只,体质量 180~200 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,合格证

号:SYXK(皖)2012004。在普通环境下(通风,温度 18~23℃,湿度 50%~60%)饲养,自由饮水。(2)实验试剂与仪器:氨基胍(AG, Sigma);胰激肽原酶(常州千红生化制药);链脲佐菌素(STZ, Alexi);DMEM,诱导型 NOS(iNOS)、内皮细胞型 NOS(eNOS)、神经型 NOS(nNOS)ELISA 试剂盒购自碧云天;蛋白质提取试剂盒(碧云天),iNOS、eNOS、nNOS 抗体,羊抗鼠二抗,鼠  $\beta$ -actin 抗体购自北京中杉金桥,手术器材,CO<sub>2</sub> 培养箱,光学显微镜,酶标仪,紫外分光光度计,离心机。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及造模** 将 60 只大鼠分为糖尿病组、氨基胍治疗组和对照组,每组 20 只。氨基胍治疗组和糖尿病组大鼠使用 STZ 制造糖尿病模型。按 50 mg/kg 称取 STZ 溶于 pH 为 4.4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,对禁食 12 h 的大鼠进行腹腔注射 STZ 造模,注射后 24~48 h 取尾血测血糖。造模成功

标准:血糖大于 16.65 mmol/L,对照组 20 只仅腹腔注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

**1.2.2 给药方法** 氨基胍治疗组大鼠每天灌胃给药氨基胍 100 mg/kg,糖尿病组和对照组大鼠予等量的生理盐水灌胃。连续灌胃给药 14 d 后,处死大鼠取出双眼眼球,用生理盐水清洗,一只放于 4%多聚甲醛中固定过夜后存放于 70%乙醇中,用于 HE 染色;另一只存放于 -80 ℃ 冰箱中,用于 Western blot 和 PT-PCR 检测。血液在室温下静置 0.5 h 后放于 4 ℃ 冰箱中过夜,第 2 天离心后取出上清液存放于 4 ℃ 冰箱中,用 ELISA 检测。

**1.2.3 HE 染色** 多聚甲醛固定过的眼球标本用石蜡包埋,连续切片,厚度 5 μm,常规 HE 法染色。

**1.2.4 ELISA 检测大鼠血清 iNOS、eNOS、nNOS 水平** 大鼠血液静置过夜后离心,取上清液,使用 iNOS、eNOS、nNOS 酶联免疫试剂盒检测血清中 iNOS、eNOS、nNOS 水平。

**1.2.5 Western blot 检测大鼠视网膜中 iNOS、eNOS、nNOS 表达水平** 将大鼠眼球组织块取出,剪碎后用蛋白质提取试剂盒提取蛋白,18 000 r/min 离心 1 h,去上清液,固定后进行蛋白质定量,然后使用 SDS-PAGE 电泳分离,转移到纤维膜,封闭。在漂洗后敷 iNOS、eNOS、nNOS 抗体(1:500)和 β-actin 抗体(1:300),TPBS 漂洗后敷二抗(1:5 000),ECL 显色,曝光。

**1.2.6 PT-PCR 测定 iNOS、eNOS、nNOS mRNA 表达** 将眼球匀浆后,用 Trizol 法提取总 RNA,然后取 2 μg RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增,扩增条件为 50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s。结果采用 SDS 软件进行 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法相对定量分析。引物序列:eNOS 上游引物 5'-GGA GAG ATC CAC CTC ACT GTA GC-3',下游引物 5'-CAC ATA GGT CTT AGG G-3',扩增产物长度 421 bp;nNOS 上游引物 5'-GTG GAG GTG CTG GAG GAG TTC-3',下游引物 5'-CGG ATT CAT TCC TTT GTG TTG-3',扩增产物长度 374 bp;iNOS 上游引物 5'-CAA TAA CCT GAA GCC CGA AGA C-3',下游引物 5'-GTA ATC CTC AAC CTG CTC CTC AC-3',扩增产物长度 496 bp;β-actin 上游引物 5'-CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3',下游引物 5'-ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC T-3',扩增产物长度 227 bp。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析,检验水准  $\alpha=0.05$ ,多样本组间比较采用方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 3 组大鼠视网膜病理组织学 HE 染色比较** 通过光学显微镜观察 HE 染色的大鼠视网膜切片,结果发现,对照组大鼠组织结构清晰,完成,染色较为均匀,神经节细胞排列均匀。糖尿病组大鼠缺损最为明显,神经节细胞减少。氨基胍治疗组大鼠缺损不明显,神经节细胞略少于正常大鼠。见图 1。

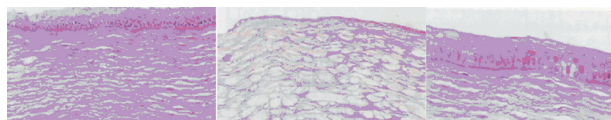


图 1 各组视网膜切片 HE 染色(×100)

**2.2 3 组大鼠血清中 NOS 水平比较** 检测结果发现,氨基胍

治疗组、对照组 iNOS 水平显著低于糖尿病组,对照组 nNOS 水平明显低于其他两组,3 组 eNOS 水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。氨基胍治疗组与糖尿病组比较,iNOS 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 3 组大鼠血清中 NOS 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=20, U/mgprot$ )

组别	iNOS	eNOS	nNOS
糖尿病组	0.393±0.092	0.263±0.051	0.313±0.031 <sup>b</sup>
氨基胍治疗组	0.285±0.063 <sup>a</sup>	0.257±0.066	0.286±0.043 <sup>b</sup>
对照组	0.276±0.076	0.249±0.058	0.216±0.074

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与糖尿病组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较。

**2.3 3 组大鼠 NOS 蛋白表达比较** Western blot 结果显示,对照组大鼠视网膜中 iNOS、eNOS、nNOS 蛋白表达较低,糖尿病组较高。氨基胍治疗组中 iNOS 的蛋白表达明显弱于糖尿病组( $P=0.039$ ),与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2、3。

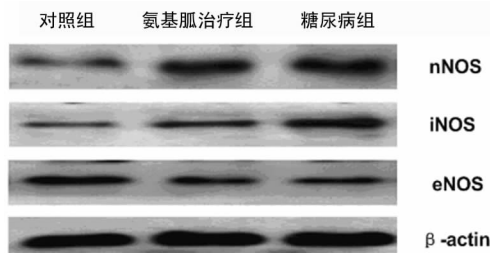


图 2 3 组大鼠视网膜中 NOS 蛋白表达比较

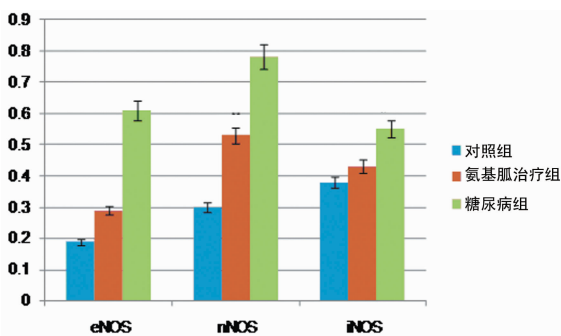


图 3 3 组大鼠血清中 NOS 蛋白表达比较

**2.4 3 组大鼠 NOS mRNA 表达比较** PT-PCR 检测显示,氨基胍可以抑制 iNOS mRNA 的高表达,对 eNOS mRNA 和 nNOS mRNA 的高表达影响不明显,见表 2。

表 2 各组大鼠 NOS mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

组别	iNOS mRNA	eNOS mRNA	nNOS mRNA
糖尿病组	1.684±0.280	1.413±0.250	1.553±0.130
氨基胍治疗组	1.166±0.130 <sup>a</sup>	1.378±0.230	1.399±0.180
对照组	1.209±0.210	1.105±0.190	1.018±0.210

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与糖尿病组比较。

**3 讨 论**

DR 是一种多因素、多作用途径的糖尿病并发症,严重危害人类生命健康。DR 的发生受到多种条件控制,例如视网膜新生血管,细胞凋亡等等<sup>[6]</sup>,早期糖尿病的研究主要集中在细胞凋亡,细胞凋亡与 DR 的发病有着密切的联系<sup>[7]</sup>。研究发

现,氨基胍会引起蛋白非酶糖基化终产物(AGEs)增加,AGEs可以通过使 Bc-12/Bax 的比例降低以及 caspase3 的活化,从而引起毛细血管周细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。同时,氨基胍作为一种 NOS 抑制剂,对 NOS 具有显著的抑制作用<sup>[8-9]</sup>,并有文献报道,氨基胍对 DR 的治疗作用与抑制 NOS 有关,但是其抑制作用是否具有 NOS 亚型选择作用目前并不清楚,需要进一步的研究证实<sup>[9-10]</sup>。

DR 都会引起视网膜细胞的缺损,神经节细胞减少<sup>[10-11]</sup>,降低视网膜细胞的缺损,增加神经节细胞数量是治疗视网膜病变的主要目的。本研究发现,使用氨基胍的大鼠视网膜细胞缺损情况减轻,神经节细胞明显增多。说明氨基胍可以抑制糖尿病大鼠的视网膜病理性病变。

NOS 分为 iNOS、nNOS、eNOS 3 个亚型<sup>[11-12]</sup>,它们在体内起到不同的作用。研究发现,糖尿病大鼠视网膜中 iNOS mRNA 水平明显提高,iNOS 阳性细胞数也显著增多,且阳性细胞主要分布在 INL<sup>[13]</sup>。有研究表明,在正常大鼠视网膜中,iNOS 免疫反应沉淀物主要出现在 INL 的 Müller 细胞中<sup>[12-15]</sup>,而此细胞是维系视网膜血管结构的重要的神经胶质细胞<sup>[16]</sup>。由此可推测 iNOS 产生的过多的 NO 有可能对血管造成损伤。因此,抑制 iNOS 的表达可能对治疗 DR 具有一定的效果。本研究发现,氨基胍对 iNOS 的水平及表达具有显著的抑制作用,且具有选择性。

本研究证实了氨基胍可以改善 DR,且作用途径与选择性抑制 iNOS 有关。对于氨基胍参与多作用途径治疗糖尿病微血管病变提供了试验依据,同时,为研究和开发新型的治疗 DR 药物起到一定的指导作用。

#### 参考文献:

- [1] Franklin SW, Rajan SE. An automated retinal imaging method for the early diagnosis of diabetic retinopathy[J]. *Technol Health Care*, 2013, 21(6): 557-569.
- [2] Oh E, Yoo TK, Park EC. Diabetic retinopathy risk prediction for fundus examination using sparse learning; a cross-sectional study[J]. *BMC Med Inform Decis Mak*, 2013, 13(1): 106-110.
- [3] 白双,于鑫,杜瑛培,等.枸杞多糖对 NMDA 致大鼠视网膜损伤保护作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(5): 670-674.
- [4] 袁爱花,梅妍,周鸿鹰,等.一氧化氮合酶在糖尿病大鼠视网膜中表达模式的研究[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 27(4): 453-457.
- [5] 董娟,郎平,吴昌凡.一氧化氮和一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病视网膜病变[J]. *国际眼科杂志*, 2010, 10(11): 2144-2146.
- [6] Noonan JE, Jenkins AJ, Ma JX, et al. An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes[J]. *Diabetes*, 2013, 62(12): 3968-3975.
- [7] 杨宏伟,陈晓隆,卜立敏,等.细胞凋亡在 STZ 诱导糖尿病大鼠早期视网膜病变中的作用机制[J]. *眼科研究*, 2009, 27(6): 472-476.
- [8] Mishra A, Newman EA. Aminoguanidine reverses the loss of functional hyperemia in a rat model of diabetic retinopathy[J]. *Front Neuroenergetics*, 2012, 10(3): 10-15.
- [9] 张浩,咎金行,刘培勋.诱导型一氧化氮合酶抑制剂的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(6): 665-669.
- [10] 陈雪,周昌华,洪纓,等.保存期内红细胞内皮型一氧化氮合成酶 mRNA 表达的变化[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(2): 481-483.
- [11] Shazly AH, Mahmoud AM, Darwish NS. Potential prophylactic role of aminoguanidine in diabetic retinopathy and nephropathy in experimental animals[J]. *Acta Pharm*, 2009, 59(1): 67-73.
- [12] 周平,徐启革,姜洪翠,等.阿司匹林对高糖和高胰岛素诱导的血管平滑肌细胞内 iNOS 含量的影响[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32(2): 110-113.
- [13] Lopez-Costa JJ, Goldstein J, Saavedra JP. Neuronal and macrophagic nitric oxide synthase isoforms distribution in normal rat retina[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 232(3): 155-158.
- [14] 崔海月.糖尿病视网膜病变发病机制研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2013, 29(1): 95-97.
- [15] Agroiya P, Philip R, Saran S, et al. Association of serum lipids with diabetic retinopathy in type 2 diabetes[J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2013, 17 Suppl 1: S335-337.
- [16] Chen P, Ong RT, Tay WT, et al. A Study assessing the association of glycosylated hemoglobin A1C(HbA1C) associated variants with HbA1C, chronic kidney disease and diabetic retinopathy in populations of asian ancestry[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79767.

(收稿日期:2014-02-22 修回日期:2014-03-27)

(上接第 2439 页)

- enolase: radioimmunoassay development[J]. *Tumour Biol*, 1984, 5(2): 127-139.
- [11] Yordan T, Cevik Y, Donderici O, et al. Elevated serum S100B protein and neuron specific enolase levels in carbon monoxide poisoning[J]. *Am J Emerg Med*, 2009, 27(7): 838-842.
  - [12] 谷兴华,张供,张希全.血清蛋白 B 亚型和神经元特异性烯醇化酶对早期判断体外循环术后脑损伤的意义[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(14): 975-977.
  - [13] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: in-

tracellular regulator and extracellular signal[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(6): 1008-1022.

- [14] Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, et al. S100B in brain damage and neuro-degeneration[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(6): 614-632.
- [15] Sandhir R, Onyszchuk G, Berman NE. Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury[J]. *Exp Neurol*, 2008, 213(2): 372-380.

(收稿日期:2014-02-18 修回日期:2014-03-22)