

N-乙酰半胱氨酸预防亚硒酸钠诱导大鼠白内障的研究

马奕萍, 马 萍, 姜海瑞

武警宁夏总队医院, 宁夏 银川 750004

摘要: **目的** 对亚硒酸钠诱导白内障大鼠采用 *N*-乙酰半胱氨酸进行预防性治疗, 探讨 *N*-乙酰半胱氨酸对白内障大鼠模型氧化损伤和晶状体浑浊程度的影响。 **方法** 30 只 SD 乳鼠随机分为 3 组, 模型组 ip 3.46 mg/kg 亚硒酸钠溶液造模后, ip 0.1 mL/10 g 生理盐水; 实验组 ip *N*-乙酰半胱氨酸 10 mg/g, 30 min ip 亚硒酸钠溶液造模; 对照组 ip 0.1 mL/10 g 生理盐水。所有动物均为隔日注射, 连续 6 次。比较大鼠晶状体浑浊程度和 SOD 活性、NOS 活性和 MDA 水平。 **结果** 在晶状体核区、后囊区、前囊区+后囊区、前囊区+皮质区+核区+后囊区中, 实验组与模型组比较得分差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组 SOD 活性和 MDA 活性与模型组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** *N*-乙酰半胱氨酸能够预防后囊和核区白内障的发生, 其作用是通过减少 MDA 水平、提高 SOD 活性、改善氧化应激实现的。

关键词: *N*-乙酰半胱氨酸; 亚硒酸钠; 白内障; 氧化损伤

中图分类号: R965.1; R988.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)07-0717-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.07.004

Preventive effect of *N*-acetylcysteine on cataract in rats induced by sodium selenite

MA Yi-ping, MA Ping, JIANG Hai-rui

Armed Police Corps Hospital of Ningxia, Yinchuan 750004, China

Abstract: **Objective** To use *N*-acetylcysteine for preventive treatment of cataract in rats induced by sodium selenite, and to investigate the preventive effect of *N*-acetylcysteine on oxidative damage and degree of lens opacity in cataract model of rats. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups, the rats in model group were ip injected with 3.46 mg/kg sodium selenite for modeling, then 0.1 mL/10 g ip injection of physiological saline; The rats in experimental group received ip injection of *N*-acetylcysteine 10 mg/g, 30 min ip injection of sodium selenite for modeling; The rats in control group were ip injected with 0.1 mL/10 g of saline. All rats were injected every other day, 6 times in a row. The lens turbidity degree, SOD activity, NOS activity, and MDA level of rats were compared. **Results** In the lens nucleus, posterior capsule, anterior capsular area + posterior capsular area, anterior capsular area, and cortex + core + posterior capsule area, the difference of score of the experimental group between the model group were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the difference of SOD and MDA activity of the experiment group was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** *N*-acetylcysteine can prevent posterior and nucleus cataract, and its mechanism may be realized by reducing the content of MDA, increasing the activity of SOD, and improving the oxidative stress.

Key words: *N*-acetylcysteine; sodium selenite; cataract; oxidative damage

白内障是老年人致盲的主要原因之一, 是影响老年人生活质量的重要因素^[1]。与发病后手术治疗相比, 白内障的预防具有更重要的经济价值和社会效益。氧化损伤是白内障发生发展的关键环节, *N*-乙酰半胱氨酸能够抑制细胞凋亡关键酶 caspase-3 活性, 在体外能够有效防护 H₂O₂ 诱导的氧化损伤。从药理学意义上讲, *N*-乙酰半胱氨酸在体内也能够预防和延缓白内障的发生和发展。考虑到亚硒酸钠

诱导白内障与老年白内障在发病上的相关性, 本实验利用亚硒酸钠建立动物模型, 以 *N*-乙酰半胱氨酸进行预防性治疗, 以探讨 *N*-乙酰半胱氨酸对白内障大鼠模型氧化损伤和晶状体浑浊程度的预防作用, 以为年龄相关性白内障预防药物研发提供思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计 (德国 Loptcom 公司);

收稿日期: 2014-04-01

作者简介: 马奕萍, 女, 副主任医师, 眼科专业硕士, 研究方向: 白内障。Tel: 13909503588 E-mail: mayipingNX@163.com

可见分光光度计 (日本 TOP 公司); SL—LE 型裂隙灯 (美国 Sigma 公司)。

N-乙酰半胱氨酸 (上海纪宁实业有限公司, 批号 0412-25G, 规格 25 g, 质量分数为 98.5%), 制成 2 mmol/L (100 mg/mL) 溶液; 亚硒酸钠结晶体 (北京中天乔试剂公司, 批号 20110645, 规格 0.2 mg, 按硒计 91.3 mg); 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (深圳晶美生物工程有限公司, 批号 20091041); 一氧化氮合酶 (NOS) 检测试剂盒 (南京建成生物有限公司, 批号 20121415); 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (武汉华星生物有限公司, 批号 20111125)。

1.2 实验动物

10 日龄 SD 乳鼠 30 只, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 山东大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (鲁) 2013-0009。

1.3 分组与造模

按照随机数字表将大鼠分为 3 组, 每组 10 只, 雌雄各半。参考文献报道^[1]建立大鼠白内障模型。模型组 ip 3.46 mg/kg 亚硒酸钠溶液造模后, ip 0.1 mL/10 g 生理盐水; 实验组参考相关文献报道^[2] ip *N*-乙酰半胱氨酸 10 mg/g, 30 min 后 ip 亚硒酸钠溶液造模; 对照组 ip 0.1 mL/10 g 生理盐水。所有动物均为隔日注射, 连续 6 次。

1.4 检测指标

1.4.1 晶状体浑浊程度检测 各组大鼠散瞳后以裂隙灯检测晶状体浑浊程度, 参考 LOCSIII 标准^[3], 结合本实验具体情况进行评价。对浑浊按晶状体区域分为前囊区、核区、皮质区和后囊区 4 个部分。皮质区和后囊区得分为 0.1~5.9, 前囊区和核区得分为 0.1~6.9。评价时, 先对各区域单独比较, 然后将各区域得分总和再行比较。

1.4.2 SOD、NOS 和 MDA 检测比较 各组大鼠断

头后冰浴取出晶状体, 冷冻保存。ELISA 法测定 SOD、NOS 和 MDA 的活性。每组取 5 个晶状体组织, 磨碎后离心, 以上清液进行 SOD 和 MDA 测定。结果以 SOD 活性、NOS 活性和 MDA 水平表示。按说明书进行操作。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 各组间比较采用 One-way ANOVA 分析, 组间事后分析采用 SNK-*q* 检验进行; 计数资料以实际发生数表示, χ^2 检验进行比较。

2 结果

2.1 各组大鼠晶状体浑浊程度得分比较

在晶状体前囊区和皮质区, 各组间晶状体浑浊程度得分差异无统计学意义; 在核区、后囊区、前囊区+后囊区、前囊区+皮质区+核区+后囊区中, 实验组与模型组比较得分差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示 *N*-乙酰半胱氨酸预防性用药对亚硒酸钠诱导大鼠白内障具有保护作用。见表 1。

2.2 各组大鼠 SOD、NOS 和 MDA 比较

各组大鼠 NOS 活性差异无统计学意义; 实验组的 SOD 活性和 MDA 水平与模型组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

3 讨论

氧化损伤在年龄相关性白内障的发病中发挥了重要作用。晶状体蛋白富含半胱氨酸巯基 (-SH), 受到氧化应激损伤后易出现翻译后修饰错误, 使 Ca^{2+} 通透性增加, 蛋白构象改变, 蛋白聚集影响晶状体透明性, 从而出现白内障。Mukesh 等^[4]认为, 当蛋白质相对分子质量超过 5×10^6 时, 晶状体外观即可表现为浑浊。亚硒酸钠可以诱导大鼠晶状体出现一系列生化改变, 细胞应答性表达改变。裴雪婷等^[5]研究已发现, 氧化刺激可导致大鼠抗氧化酶基因表达增加, 并促使抗氧化酶的表达增加; 吴菁漪

表 1 各组大鼠晶状体浑浊程度得分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of lens opacity scores among groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	前囊区	皮质区	核区	后囊区	前囊区+后囊区	前囊区+皮质区+核区+后囊区
对照	0.004±0.001	0.145±0.026	0.112±0.024	0.514±0.141	0.394±0.314	0.987±0.8725
模型	0.041±0.002	0.218±0.034	2.174±0.954**	2.118±0.998**	2.364±1.021**	4.615±1.264**
实验	0.092±0.044	0.221±0.075	1.624±0.247 ^{##}	1.621±0.695 ^{##}	1.745±0.845 ^{##}	3.425±0.854 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表2 各组大鼠 SOD、NOS 和 MDA 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 2 Comparison of SOD, NOS and MDA among groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	NOS/(U·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(mmol·g ⁻¹)
对照	0.139±0.015	86.957±16.941	10.214±3.658
模型	0.156±0.121	52.369±12.658**	16.485±4.215**
实验	0.143±0.096	71.589±24.125 ^{##}	12.569±6.102 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

等^[6]对亚硒酸钠诱导白内障大鼠的研究也发现,亚硒酸钠还可以造成机体细胞的 DNA 氧化损伤,并导致抗氧化酶活性丧失。亚硒酸钠诱导大鼠白内障已成为目前研究年龄相关性白内障较为成熟的模型。理论上讲,通过对晶状体上皮-SH 的保护,可以有效抑制和预防白内障的发生和发展。也有学者^[1,7]利用抗氧化剂对白内障模型进行治疗,并取得良好效果。

SOD 是体内重要的抗氧化酶。Babizhayev 等^[8]对亚硒酸钠诱导白内障大鼠模型的研究已表明,SOD 活性与晶状体浑浊程度存在负性相关关系。当患者白内障完全成熟时,SOD 活性也完全丧失。MDA 则是白内障患者晶状体上皮细胞中不饱和脂肪酸氧化的产物之一,它与白内障程度呈现正性相关关系,Carey 等^[9]认为,MDA 甚至可以作为细胞损伤程度的指标。本研究证实,模型组大鼠核区和后囊区出现明显浑浊,说明白内障模型建立成功。同时,研究发现,模型组大鼠 SOD 含量降低、MDA 含量上升,也证明了 Carey 等的结论。对 *N*-乙酰半胱氨酸预防组,本研究发现,实验组大鼠晶状体浑浊程度明显低于模型组,说明 *N*-乙酰半胱氨酸对大鼠亚硒酸钠诱导的白内障具有明显预防作用。有学者认为,*N*-乙酰半胱氨酸的预防作用可能与它抑制脂质过氧化反应、保护晶状体上皮细胞免受氧化损伤有关。本研究中实验组 SOD 水平降低、MDA 水平升高,也支持该推论。

NOS 能够在细胞因子和内毒素作用下生成 NO,具体抑制内皮素合成、抑制钙离子内流和调节眼压的作用。Babizhayev 等^[10]认为,NO 能够导致晶状体核酸损伤和脂质过氧化,并造成上皮细胞-SH 含量降低。而杨春潇等^[11]的研究认为,NO 可以生成过氧化亚硝酸盐,并且该反应在 SOD 浓度较低时更易实现。本研究中并未发现模型组与其他各组 NOS 含量有区别,可能与本研究进行的时间较短,SOD 含量尚未降低到较低程度有关,这也反

过来说明在白内障发生早期,以 SOD 和 MDA 损伤为主,晚期才有 NOS 的参与。

目前已有多位学者报道^[12-13]年龄相关性白内障患者出现谷胱甘肽、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽转移酶的改变,而 *N*-乙酰半胱氨酸在细胞内可脱乙酰基,生成谷胱甘肽前体,对晶状体氧化损伤和水通道蛋白具有明显保护作用。张莉等^[14]在离体培养的晶状体中已证实 *N*-乙酰半胱氨酸具有明显预防白内障效果,本研究在活体大鼠体内也证实,*N*-乙酰半胱氨酸能够预防亚硒酸钠诱导大鼠白内障的发生,该作用与提高 SOD 活性、减少氧自由基生成、减轻晶状体上皮细胞不饱和脂肪酸氧化有关。但其具体机制还期待进一步研究。

参考文献

- [1] 冯万国,付波,杜玲玲,等. 姜黄素对大鼠牺牲性白内障的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 12(11): 123-125.
- [2] 郑广瑛,王华君,谭楠,等. 活体观察 *N*-乙酰半胱氨酸防治白内障的实验研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(6): 515-517.
- [3] Chylack L T, Wolfe J K, Singer D M, *et al.* The lens opacities classification system III [J]. *Arch Ophthalmol*, 1993, 111 (12): 831-836.
- [4] Mukesh B N, Le A, Dimitrov P N, *et al.* Development of cataract and associated risk factors: the Visual Impairment Project [J]. *Arch Ophthalmol*, 2006, 124(18): 79-85.
- [5] 裴雪婷,鲍永珍,黎晓新. 晶状体密度测量在年龄相关性白内障诊断中的价值探讨 [J]. 眼科研究, 2009, 27(1): 49-51.
- [6] 吴菁漪,栾洁. 年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜 DNA 氧化损伤及其修复的研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 24(1): 78-81.
- [7] 李佳,刘丹. 茶多酚对体外培养鼠晶状体抗氧化损伤作用的研究 [J]. 国际眼科杂志, 2012, 26(2): 169-172.
- [8] Babizhayev M A, Deyev A I, Yermakova V N, *et al.*

- N*-Acetylcarnosine, a natural histidine-containing dipeptide, as a potent ophthalmic drug in treatment of human cataracts [J]. *Peptides*, 2011, 22(6): 437-441.
- [9] Carey J W, Pinarci E Y, Penugoonda S, *et al.* *In vivo* inhibition off ibuthionine-(*S,R*)-sulfoximine-induced cataracts by a novel antioxidant, *N*-acetylcysteine amide [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(14): 722-739.
- [10] Babizhayev M A. Ocular drug metabolism of the bioactivating antioxidant *N*-acetylcarnosine for vision in ophthalmic prodrug and codrug design and delivery [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34(10): 1124-1126.
- [11] 杨春潇, 严红, 刘擎, 等. 氢饱和生理盐水对大鼠亚硒酸钠性白内障的抑制作用 [J]. 眼科新进展, 2013, 16(4): 321-324.
- [12] 仇成章, 陈永东. 白内障发病机制及预防治疗措施 [J]. 中国中医药咨讯, 2011, 15(13): 158-160.
- [13] 孙慧, 刘丹. *N*-乙酰半胱氨酸对紫外线损伤大鼠晶状体水通道蛋白-1的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2011, 27(12): 543-545.
- [14] 张莉, 王宁利, 张伟, 等. 氧化还原信号转导抑制剂对人晶状体上皮细胞增殖的调控作用 [J]. 中华眼科杂志, 2008, 32(8): 159-161.