

硫辛酸烟酸二联体对蓝光致大鼠视网膜损伤的防治作用

程天豪^{1,2}, 邹玉平², 简柳连^{1,2}, 章梦一², 豆艺璇^{1,2}

引用:程天豪,邹玉平,简柳连,等. 硫辛酸烟酸二联体对蓝光致大鼠视网膜损伤的防治作用. 国际眼科杂志, 2024, 24(2): 196-202.

基金项目:广东省自然科学基金(No.2019A1515011732);广州市科学技术局资助项目(No.202002030413)

作者单位:¹(510006)中国广东省广州市,广州中医药大学研究生院;²(510010)中国广东省广州市,中国人民解放军南部战区总医院眼科

作者简介:程天豪,男,在读硕士研究生,研究方向:蓝光视网膜损伤。

通讯作者:邹玉平,男,教授,博士研究生导师,研究方向:蓝光视网膜损伤. gzzouyuping@sina.com

收稿日期:2023-09-22 修回日期:2024-01-04

摘要

目的:探讨硫辛酸烟酸二联体(N2L)对蓝光致SD大鼠视网膜损伤的防治作用及最佳药物剂量,探寻其可能存在的保护机制。

方法:选取150-200 g的SPF级雄性SD大鼠36只,随机分为正常对照组、蓝光损伤组、N2L低剂量组(1.0 mg/kg)、N2L中剂量组(2.5 mg/kg)、N2L高剂量组(5.0 mg/kg)及生理盐水组,每组各6只。正常对照组12 h明暗循环饲养,其余组每日接受9 h日常光照,3 h波长455 nm、强度 3000 ± 50 lx蓝光照射及12 h黑夜来建立损伤模型,持续14 d。同时每日腹腔注射1 mL对应剂量的药物。14 d后,所有组常规12 h明暗循环再饲养5 d,采用视网膜电图检查。过量麻醉法处死大鼠制备标本,HE染色,在光学显微镜下观察外核层厚度;CheKineTM超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒检测SOD活性;Western Blot检测大鼠视网膜Caspase-3、醌氧化还原酶1(NQO1)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、Bcl-2和Bax蛋白表达量。

结果:蓝光损伤组暗视ERG 3.0、10.0 (cd·s)/m²刺激光下b波、明视ERG 3.0 (cd·s)/m²刺激光下b波振幅及震荡电位第2个波峰振幅显著低于正常对照组(均 $P < 0.01$),N2L中剂量组较蓝光损伤组振幅显著提高(均 $P < 0.05$),且与正常对照组无显著差异;蓝光损伤组较正常对照组视网膜ONL厚度下降($P < 0.001$),N2L中剂量组厚于蓝光损伤组($P < 0.001$),与正常对照组无显著差异;N2L中剂量组超氧化物歧化酶活性显著高于其余5组($P < 0.05$);蓝光损伤组Caspase-3、Bax及NQO1表达量较正常对照组更高(均 $P < 0.01$),N2L中剂量组Bax、Caspase-3表达量较蓝光损伤组显著降低(均 $P < 0.001$),而GST、NQO1及Bcl-2显著增加(均 $P < 0.01$)。

结论:2.5 mg/kg N2L能有效拮抗蓝光对SD大鼠视网膜的损伤作用,有望成为其防治药物。

关键词:蓝光;SD大鼠;硫辛酸烟酸二联体(N2L);氧化损伤;视网膜

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.2.04

Prevention and treatment of lipoic acid - niacin on blue - light - induced retinal damage in rats

Cheng Tianhao^{1,2}, Zou Yuping², Jian Liulian^{1,2}, Zhang Mengyi², Dou Yixuan^{1,2}

Foundation items: Guangdong Provincial Natural Science Foundation (No.2019A1515011732); Funded Project of Guangzhou Science and Technology Bureau (No.202002030413)

¹Graduate School, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong province, China;

²Department of Ophthalmology, General Hospital of the Southern Theater of Operations of the Chinese People's Liberation Army, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zou Yuping. Department of Ophthalmology, General Hospital of the Southern Theater of Operations of the Chinese People's Liberation Army, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China. gzzouyuping@sina.com

Received:2023-09-22 Accepted:2024-01-04

Abstract

• **AIM:** To investigate the preventive effect and optimal drug dose of lipoic acid-niacin (N2L) against blue light-induced retinal damage in SD rats, and to explore its possible protective mechanism.

• **METHODS:** A total of 36 specific pathogen free-grade male SD rats of 150-200 g were selected and randomly divided into normal control group, blue light injury group, N2L low-dose group (1.0 mg/kg), N2L medium-dose group (2.5 mg/kg), N2L high-dose group (5.0 mg/kg), and physiological saline group, with 6 rats in each group. The normal control group was reared in a 12 h dark and light cycle, and the rest of the groups received 9 h of daily light exposure, 3 h of blue light irradiation with a wavelength of 455 nm and an intensity of 3000 ± 50 lx, and 12 h of darkness to establish the injury model, and were exposed to light exposure for 14 d. For 14 consecutive durations, a 1 mL dose of the corresponding drug was injected intraperitoneally. The rats were reared for another 5 d with a regular 12 h light - dark cycle and were examined by electroretinography. Specimens were prepared by over anesthesia, HE staining, and the thickness of the outer nuclear layer was observed under a optical microscope; superoxide dismutases (SOD) activity was detected by CheKineTM SOD Activity Assay Kit; and the retinal Caspase-3, quinone oxidoreductase 1

(NQO1), glutathione S transferase (GST), Bcl-2, and Bax protein expression in rat retina were detected by Western blot.

• **RESULTS:** The amplitude of b-wave in dark-vision ERG 3.0 and 10.0 (cd · s)/m² stimulated light, b-wave in bright-vision ERG 3.0 (cd · s)/m² stimulated light, and the amplitude of the 2nd wave peak of oscillatory potential were significantly lower in blue light injury group than that in the normal control group (all $P < 0.01$), while the amplitude was significantly higher in the N2L medium-dose group than in the blue light injury group (all $P < 0.05$), and was not statistically different from that of the normal control group; the thickness of the retina in the blue light injury group was decreased in the ONL compared with that of the normal control group ($P < 0.001$), while in the N2L medium dose group, it was thicker than that of the blue light injury group ($P < 0.001$), and there was no statistically significant difference from the normal control group; SOD activity was significantly higher in the N2L medium-dose group than in the remaining 5 groups ($P < 0.05$); the expression of Caspase-3, Bax, and NQO1 in the blue light injury group was higher than that of the normal control group (all $P < 0.01$), and expression of Bax and Caspase-3 was significantly lower in the N2L medium-dose group compared with the blue light injury group (all $P < 0.001$), whereas GST, NQO1 and Bcl-2 were significantly increased (all $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** A concentration of 2.5 mg/kg N2L can effectively antagonize the damaging effect of blue light on the retina of SD rats, and it is expected to be a preventive and curative drug for it.

• **KEYWORDS:** blue light; SD rat; lipoic acid - niacin (N2L); oxidative damage; retina

Citation: Cheng TH, Zou YP, Jian LL, et al. Prevention and treatment of lipoic acid-niacin on blue-light-induced retinal damage in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(2):196-202.

0 引言

随着新型光照,如手机、高功率显示器、诊疗仪器等的出现,人眼接触大剂量蓝光机会日益增多^[1]。蓝光在可见光中波长最短,但能量较高,能通过角膜与晶状体达到视网膜^[2-3],即使在低照度的情况下,蓝光就能引起 N-视黄酰亚烯 - N - 视黄醇胺 (N - retinylidene - N - retinylethanolamine, A₂E) 在视网膜中堆积^[4]、活性氧增加^[5]等变化,最终导致光化学损伤,这是引起年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 等视网膜退行性变疾病^[6-7]的发病诱因之一。蓝光视网膜损伤的机制十分复杂,在细胞层面上,已有较多学者开展了相关研究,据以往报道,氧化应激在此环节中扮演着极为重要的角色^[8-9],在我们团队前期的研究中发现蓝光通过氧化应激途径激活 Bax/Bcl-2 凋亡通路导致视网膜色素上皮细胞损伤^[10]。α-硫辛酸 (alpha lipoic acid, ALA) 和烟酸 (niacin) 被认为是高效的抗氧化剂,同时具有神经保护作

用。烟酸和 ALA 形成的新型复合物,被命名为硫辛酸烟酸二联体 (lipoic acid-niacin, N2L),该复合物的生物利用度更高,更易穿过血-脑屏障,药物代谢更快,较烟酸和 ALA 的副作用更少^[11]。在我们团队既往的研究中发现 N2L 可以防止细胞受到氧化应激引起的损伤^[12],上调 Bcl-2 同时抑制 Bax 表达从而保护人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19)^[13],但该药物缺乏在体内实验相关研究,需进一步探寻其药物效果及最佳剂量。本实验首次将 N2L 应用于大鼠,旨在探讨 N2L 对蓝光暴露下大鼠视网膜损伤的保护作用,并探索其保护机制,以期为临床防治蓝光视网膜损伤提供新的理论依据和防治策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 36 只 5 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 150-200 g,由广州红萝卜生物科技有限公司提供 (许可证号: SCXK 2021-0059)。给予充足的食物与水,在 12 h 明暗交替环境下饲养。应用随机数字表法将 36 只 SD 大鼠随机分为 6 组,每组 6 只大鼠。分别为正常对照组、蓝光损伤组、N2L 低剂量组 (1.0 mg/kg)、N2L 中剂量组 (2.5 mg/kg)、N2L 高剂量组 (5.0 mg/kg) 及生理盐水组。本研究动物的使用和喂养遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明 (审批号: SYDW2022108)。

1.1.2 **主要试剂与仪器** 硫辛酸烟酸二联体 (中山大学药学院); 蓝光灯板 (中山共炫光电科技有限公司); 复方托吡卡胺滴眼液 (沈阳市兴齐制药有限责任公司); 透明质酸钠凝胶 (广州铭安生物科技有限公司); Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, 1:1000); GAPDH (D16H11) XP[®] Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, 1:1000); Caspase-3 (D3R6Y) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, 1:1000); NQO1 (D6H3A) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, 1:1000); Bax Antibody (Affinity, Rabbit, 1:1000); Bcl-2 Antibody (Affinity, Rabbit, 1:1000); GST (91G1) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, 1:1000); Affinity[™] ECL kit (picogram); HE 染色液 (北京索莱宝科技有限公司); 罗兰电生理仪 (德国罗兰公司); 角膜接触镜电极 (北京高视远望科技有限公司); CheKine[™] 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒 (Abbkine); BX-51 显微镜 (日本 Olympus 公司); 冷冻研磨仪 (广州露卡测序仪器有限公司); 酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司); 凝胶成像分析仪与电泳仪 (美国伯乐公司); 生物安全柜 (青岛海尔生物医疗股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 **实验动物蓝光视网膜损伤造模** 正常对照组大鼠饲养于 12 h/12 h 正常光照/黑暗环境中,低、中、高剂量组及生理盐水组每日 9:00 腹腔注射 1 mL 对应药物 (按体质量用 0.9% NaCl 溶液稀释), 分别为 1.0 mg/kg N2L、2.5 mg/kg N2L、5.0 mg/kg N2L 及 0.9% NaCl 溶液, 11:00 位进行蓝光照射,照射前 15 min 双眼滴复方托吡卡胺散瞳,待散瞳后将大鼠暴露于 LED 蓝光灯板 (光照强度 3000±50 lx, 波长 455 nm) 下 3 h,连续 14 d。造模装置包括箱顶的盖状 55.5 cm×36.5 cm 蓝光灯板 (由 24×48 个均

匀分布LED蓝光灯组成),箱体为55 cm×36 cm×40 cm透明亚克力板构成的鼠笼,中间以“田”字形透明隔板隔开,周围包裹锡纸,每个隔间放置1只大鼠。大鼠在蓝光暴露下出现疲惫状态,需每10-20 min唤醒1次。

1.2.2 ERG法评估大鼠视网膜功能 蓝光辐照完成后将大鼠正常饲养5 d再进行该项检测以达到最佳损伤变化^[14]。检测前将各组大鼠置于暗室至少24 h。暗室微弱红光源下检查,以0.3 mL/100 g腹腔注射10%水合氯醛,双眼滴复方托吡卡胺散瞳,静置15 min。固定四肢于自制保暖活动床上,将3根针电极分别连接于两侧眼下5 mm和尾根部皮下,双眼角膜涂抹适量甲基纤维素钠,万向轴固定环形金电极轻柔贴附于角膜表面。打开RETI port ERG(视网膜电图, electroretinogram)软件,暗视0.01 (cd·s)/m²强度(极低亮度)刺激光,记录3次,间隔2 s;3.0 (cd·s)/m²强度(中亮度)刺激光,记录3次,间隔10 s;10.0 (cd·s)/m²强度(高亮度)刺激光,记录3次,间隔10 s。暗视震荡电位(oscillatory potentials, OPs),记录3次,3.0 (cd·s)/m²,闪烁光频率30 Hz,10次叠加平均,间隔15 s。明视采用25 (cd·s)/m²曝光10 min,以3.0 (cd·s)/m²刺激光进行刺激,记录3次,间隔10 s。导出数据后测量ERG b波及OPs震荡电位第2个波峰(OS2)振幅及ERG b波及OPs震荡电位第2个波谷(P2)潜伏期。完成检查后双眼滴适量氧氟沙星眼膏。

1.2.3 取材 将各组大鼠注射过量10%水合氯醛处死,摘取一侧眼球,于12:00位及3:00位黑色纹身染料标记,置于4%多聚甲醛固定。摘取另一侧眼球,冰上操作,在预冷至0℃的PBS缓冲液中,用组织剪沿角膜缘剪去角膜,去除晶状体,显微镊沿锯齿缘轻柔钝性分离视网膜,最后分离视神经部位较紧密连接处。取得的组织置于冻存管内保存在液氮中,1 h后转移至-80℃冰箱保存待后续使用。

1.2.4 HE染色检测视网膜厚度 固定24 h于4%多聚甲醛,逐级乙醇脱水,常规石蜡包埋,平行于视神经进行切片,厚度3 μm,苏木精-伊红(HE)染色,在BX-51光学显微镜下观察外核层(outer nuclear layer, ONL)的厚度,利用计算机图像分析系统测量,以此作为光感受器丧失的判断指标。

1.2.5 超氧化物歧化酶测试盒检测SOD表达 采用CheKine™SOD活性检测试剂盒进行SOD活性检测,将冻存于-80℃冰箱的视网膜研磨至均匀粉状,取视网膜组织(每条约30 mg冰冻研磨混匀粉状视网膜组织)与溶解缓冲液溶液按照1 mg:10 μL冷冻研磨仪上按照-65℃、75 Hz持续30 s、暂停20 s运行4个循环匀浆,完成后置于低温离心机4℃,12000 g离心5 min,取上清液检测。按说明书分别配制体积为120 μL的样本孔、样本对照孔、空白孔及空白对照孔,混匀加入96孔板,37℃孵育30 min,酶标仪测定450 nm处吸光度,记录数据后按如下公式计算得出结果:SOD活性(U/g)=6×抑制百分率/(1-抑制百分率)/W(样本质量)×n(稀释倍数)。

1.2.6 Western Blot检测相关蛋白的表达 取视网膜组织(每条约50 mg冰冻研磨混匀粉状视网膜组织)和RIPA裂解液按1 mg:10 μL混合后于冷冻研磨仪上按照

-65℃、75 Hz持续30 s、暂停20 s运行4个循环匀浆,冰上孵育30 min后,于低温离心机4℃,12000 g离心15 min获取蛋白。BCA蛋白定量后,在SDS-PAGE上进行电泳,转移至PVDF膜上,室温下5%牛血清白蛋白封闭60 min,置于摇床40 r/min,加入GAPDH、Caspase-3、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、醌氧化还原酶1(NQO1)、Bax、Bcl-2及NQO1抗体(通用型抗体稀释液1:1000)4℃孵育过夜, TBST洗涤3次, Anti-rabbit IgG(通用型抗体稀释液1:1000)室温孵育90 min,摇床40 r/min,洗涤3次。避光下ECL显影,采用凝胶成像仪拍照,Image J测定各条带灰度值并比较。重复3次,计算平均值。

统计学分析:采用基于4.2.3版本的R语言建立的Rstudio分析数据。计量资料经Shapiro-Wilk检验均符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据经Levene检验方差齐,采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用Tukey HSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜ONL厚度比较 相较正常对照组,长时间蓝光辐照可明显降低大鼠视网膜ONL层厚度,观察视盘中心偏颞侧400 μm位置(图1)。正常对照组、蓝光损伤组、N2L低剂量组、N2L中剂量组、N2L高剂量组及生理盐水组大鼠视网膜ONL层厚度分别为34.4±3.24、25.6±3.45、29.5±2.58、33.1±3.97、28.3±2.96、27.0±2.34 μm,各组大鼠视网膜ONL层厚度差异有统计学意义($F = 10.382, P < 0.001$)。与正常对照组比较,蓝光损伤组、N2L低、高剂量组ONL厚度下降($P < 0.001, P = 0.025, P = 0.004$),正常对照组与N2L中剂量组ONL厚度无显著变化($P = 0.961$);N2L中剂量组ONL厚度明显高于蓝光损伤组及N2L高剂量组($P < 0.001, P = 0.017$)。

2.2 各组大鼠ERG波形比较 各组暗视ERG b波不同刺激光强度及震荡电位P2潜伏值均无显著差异。暗视ERG b波极低亮度刺激光振幅各组无显著差异;中亮度刺激光下,蓝光损伤组振幅显著低于正常对照组($P = 0.016$),N2L中剂量组振幅高于蓝光损伤组($P = 0.022$);高亮度刺激光下,蓝光损伤组、N2L低剂量和高剂量组振幅低于正常对照组($P < 0.001, P = 0.001, P = 0.008$),N2L中剂量组振幅高于蓝光损伤组($P = 0.003$);蓝光损伤组及N2L低剂量组震荡电位OS2振幅低于正常对照组(均 $P < 0.001$),N2L中剂量和高剂量组振幅高于蓝光损伤组($P < 0.001, P = 0.010$),N2L中剂量组高于N2L低剂量组($P = 0.004$),见表1,图2。各组明视ERG b波潜伏值无显著差异;蓝光损伤组振幅显著低于正常对照组($P < 0.001$),N2L中剂量和高剂量组高于蓝光损伤组($P < 0.001, P = 0.001$),N2L中剂量高于N2L低剂量组($P = 0.003$),见表2。

2.3 各组大鼠视网膜SOD表达量比较 正常对照组、蓝光损伤组、N2L低剂量组、N2L中剂量组、N2L高剂量组及生理盐水组大鼠视网膜SOD活性分别为52.09±4.82、58.64±3.10、66.19±2.27、72.38±3.57、62.23±2.69、57.72±2.59 U/g,各组比较差异有统计学意义($F = 37.32, P < 0.001$)。蓝光损伤组大鼠视网膜SOD活性稍高于正常对照组($P = 0.017$);N2L低、中剂量组SOD活性增加相较蓝

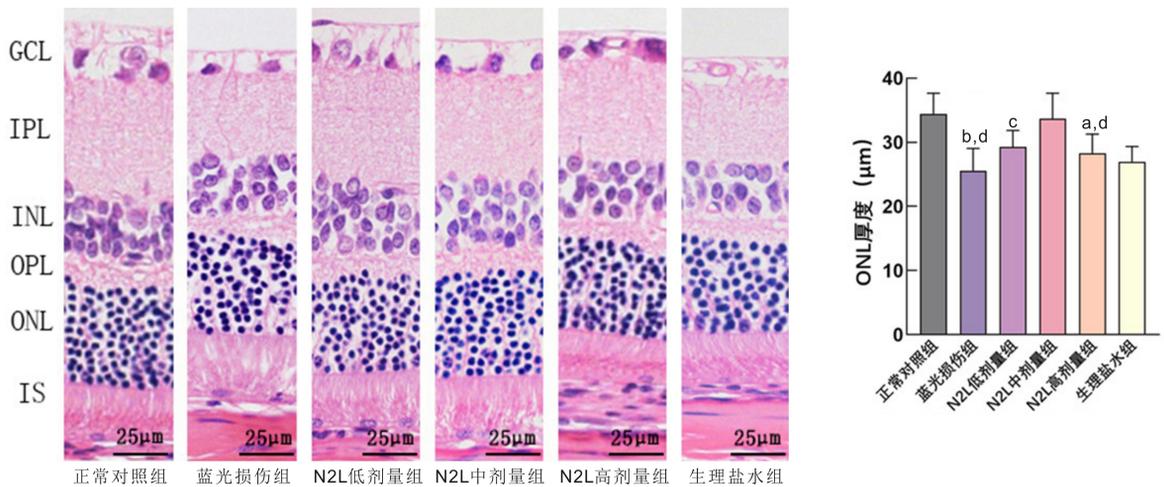


图1 各组大鼠视网膜外核层厚度比较 GCL: 神经节细胞层; IPL: 内丛状层; INL: 内核层; OPL: 外丛状层; ONL: 外核层; IS: 光感受器内节。^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs N2L 中剂量组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 正常对照组。

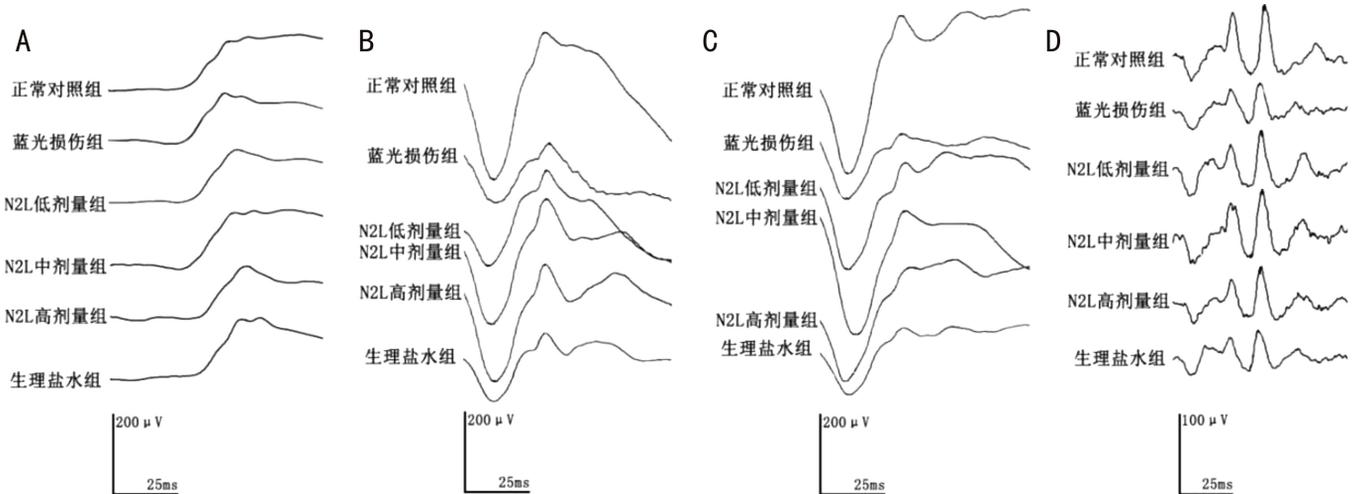


图2 各组大鼠视网膜蓝光损伤后暗视 ERG 波形变化 A: 强度 0.01 (cd·s)/m² (Scot 0.01); B: 强度 3.0 (cd·s)/m² (Scot 3.0); C: 强度 10.0 (cd·s)/m² (Scot 10.0); D: 强度 3.0 (cd·s)/m² (OPs)。

表1 各组大鼠暗视 ERG b 波与 OPs P2 潜伏值、b 波与 OPs OS2 振幅比较

组别	样本量	ERG b 波潜伏值(ms)			ERG b 波振幅(μV)			震荡电位 OPs	
		0.01(cd·s)/m ²	3.0(cd·s)/m ²	10.0(cd·s)/m ²	0.01(cd·s)/m ²	3.0(cd·s)/m ²	10.0(cd·s)/m ²	P2 潜伏值(ms)	OS2 振幅(μV)
正常对照组	6	46.41±2.62	32.30±0.81	32.53±1.08	122.62±15.71	216.21±23.78	303.73±22.92	36.35±2.25	84.32±11.92
蓝光损伤组	6	46.61±2.04	32.96±1.09	33.70±1.57	118.40±21.49	163.24±33.70 ^a	188.53±38.32 ^a	39.63±1.73	52.96±11.26 ^a
N2L 低剂量组	6	47.38±2.46	32.86±1.22	33.26±1.36	116.91±16.67	176.84±38.37	203.50±22.32 ^a	38.69±1.47	60.56±13.04 ^{a,c}
N2L 中剂量组	6	48.03±3.39	33.71±2.18	33.06±0.81	125.84±13.60	214.41±28.39 ^c	271.80±47.41 ^{c,e}	37.18±1.75	82.36±9.67 ^{c,e}
N2L 高剂量组	6	44.47±2.72	31.46±0.70	32.57±1.80	125.71±17.54	198.66±37.73	227.69±41.54 ^a	38.05±1.81	72.84±11.16 ^c
生理盐水组	6	46.54±3.82	32.48±1.61	33.93±1.50	120.52±15.42	156.76±18.35 ^{a,#}	193.52±46.45 ^{a,#}	38.27±1.02	55.56±9.16 ^{a,#,i}
<i>F</i>		1.377	1.881	1.359	0.431	5.554	13.422	0.403	12.19
<i>P</i>		0.252	0.118	0.259	0.824	0.001	<0.001	0.844	<0.001

注: ^a*P*<0.05 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05 vs 蓝光损伤组; ^e*P*<0.05 vs N2L 低剂量组; [#]*P*<0.05 vs N2L 中剂量组; ⁱ*P*<0.05 vs N2L 高剂量组。

表2 各组大鼠明视 ERG b 波潜伏值与振幅比较

组别	样本量	明视 b 波潜伏值(ms)	明视 b 波振幅(μV)
正常对照组	6	36.74±1.89	120.45±7.55
蓝光损伤组	6	38.75±1.13	69.65±16.92 ^a
N2L 低剂量组	6	38.69±1.47	78.03±15.06 ^a
N2L 中剂量组	6	37.18±1.75	107.39±12.17 ^{c,e}
N2L 高剂量组	6	38.05±1.81	103.45±13.19 ^{c,e}
生理盐水组	6	38.48±1.23	79.46±18.88 ^{a,#,i}
<i>F</i>		2.286	15.55
<i>P</i>		0.063	<0.001

注: ^a*P*<0.05 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05 vs 蓝光损伤组; ^e*P*<0.05 vs N2L 低剂量组; [#]*P*<0.05 vs N2L 中剂量组; ⁱ*P*<0.05 vs N2L 高剂量组。

光损伤组更明显($P=0.001, P<0.001$), N2L 中剂量组增加程度较 N2L 低、高剂量组更明显($P=0.006, P<0.001$)。2.4 各组大鼠视网膜各蛋白表达量比较 蓝光损伤组 Caspase-3 蛋白表达量高于正常对照组($P<0.001$), N2L 低、中、高剂量组表达量均显著低于蓝光损伤组(均 $P<0.001$), N2L 中、高剂量组较 N2L 低剂量组表达量更低(均 $P<0.001$); N2L 低、中、高剂量组 GST 蛋白表达量均显著高于蓝光损伤组(均 $P<0.001$), N2L 低、中剂量组高于 N2L 高剂量组($P=0.019, P=0.002$); 蓝光损伤组 NQO1 蛋白较正常对照组轻度升高($P=0.002$), N2L 低、中剂量组高于蓝光损伤组($P=0.005, P=0.016$); 蓝光损伤组 Bax 表达量显著高于正常对照组($P=0.001$), N2L 低、中、高剂量组低于蓝光损伤组($P<0.001, P<0.001, P=0.001$), N2L 中剂量组低于 N2L 低、高剂量组($P=0.031, P=0.030$); 蓝光损伤组 Bcl-2 表达量与正常对照组无显著差异($P=0.782$), N2L 中剂量组表达量高于蓝光损伤组及 N2L 低剂量组($P=0.002, P=0.021$); N2L 中剂量组 Bcl-2/Bax 明显高于正常对照组、蓝光损伤组、N2L 低剂量组、N2L 高剂量组和生理盐水组($P<0.001, P<0.001, P=0.001, P=0.004, P<0.001$), 见表 3, 图 3。

3 讨论

蓝光视网膜损伤的主要途径之一是诱导组织的氧化应激反应^[2]。ALA 和烟酸是高效的抗氧化剂且具有神经保护作用^[11], 然而, ALA 在组织中含量有限且脂溶性较差, 两种药物均可能引起血管扩张导致的面色潮红以及恶心、腹泻和尿道炎等副作用。有报道证实, 与其他药物联合使用时, 烟酸的活性可以增强, 副作用可以减弱^[15]。烟

酸和 ALA 形成的新型复合物, 被命名为硫辛酸烟酸二联体(N2L)。该复合药物的生物利用度更高, 更易穿过血脑屏障, 代谢更快且副作用更少^[11, 15]。2013 年王观峰等^[12]学者探讨了 N2L 对氧化应激诱导的 ARPE-19 损伤的保护作用, 研究发现该药物可以显著增加细胞活性, 防止细胞肿胀、变性、坏死, 抑制凋亡小体的形成; 2014 年邹秀兰等^[13]学者发现 N2L 对 ARPE-19 细胞的保护作用机制是通过激活抗凋亡蛋白 Bcl-2 并抑制 Bax 的表达。

既往 N2L 相关研究集中于细胞层面^[12-13], 该药物的实际防治效果需要进一步完善。本研究首次将 N2L 用于大鼠蓝光损伤模型的防治研究, 通过 ERG 检查评估了大鼠的视网膜功能, 初步探索了该药物对视网膜的保护作用及适宜剂量。为了解决预实验中出现的的大鼠模型双眼损伤差异及各组照射强度差异, 本研究采用了大面积蓝光灯板以提高光线的均匀度, 更类似日常暴露于发光二极管的情况; 灯板定制增加了滑动变阻器调控光线强度, 将光照强度误差控制低于 1.7%; 自制了透明亚克力鼠笼并用透明隔板隔开每只大鼠, 以防其堆叠导致的损伤差异。

ONL 属于感光细胞层, 在受到损伤时往往会出现厚度降低, 视杆细胞与视锥细胞的数量下降^[16], 进而导致视觉敏感度下降、视野缺失和色觉异常等问题。ERG 能通过检测微电流以反映视网膜各细胞、组织的健康水平^[17], b 波主要反映双极细胞和 Müller 细胞的功能^[18], 其振幅的下降代表光线在神经感觉层的传导受到影响。在我们的实验中, 与正常对照组基线水平相比, 蓝光损伤组 ERG b 波在中、高强度刺激光下振幅显著降低, ONL 厚度明显变薄, 这与其他学者蓝光损伤的造模结果相符^[3, 14]。生理盐

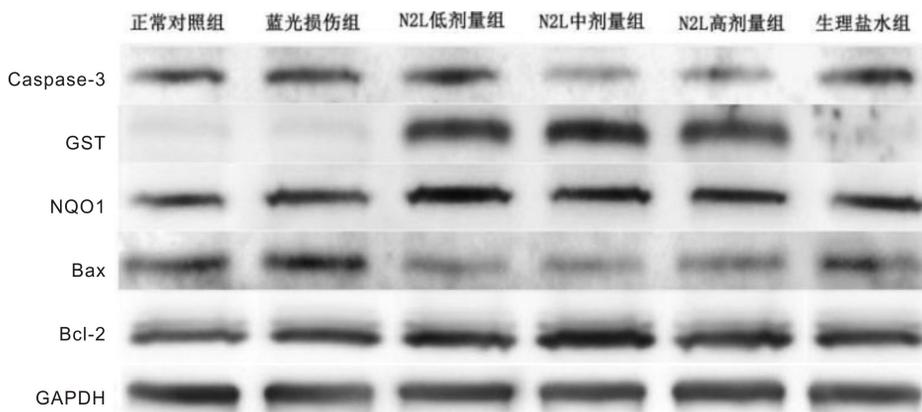


图3 各组大鼠视网膜各蛋白表达量。

表3 Western blot 检测法检测各组大鼠视网膜凋亡及保护性蛋白相对表达量

组别	样本量	Caspase-3	GST	NQO1	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
正常对照组	6	1.000±0.004	1.000±0.057	1.000±0.008	1.000±0.009	1.001±0.010	0.999±0.002
蓝光损伤组	6	1.453±0.073 ^a	1.615±0.079	1.728±0.122 ^a	1.131±0.125	1.527±0.087 ^a	0.741±0.084
N2L 低剂量组	6	1.194±0.041 ^{a,c}	7.315±0.323 ^{a,c}	2.164±0.351 ^{a,c}	1.278±0.165	0.955±0.051 ^c	1.336±0.129
N2L 中剂量组	6	0.606±0.053 ^{a,c,e}	7.586±0.249 ^{a,c}	2.057±0.133 ^{a,c}	1.671±0.119 ^{a,c,e}	0.625±0.113 ^{a,c,e}	2.760±0.733 ^{a,c,e}
N2L 高剂量组	6	0.693±0.026 ^{a,c,e,g}	6.493±0.390 ^{a,c,e,g}	1.728±0.161 ^{a,e}	1.429±0.112 ^a	0.958±0.049 ^{c,g}	1.495±0.153 ^g
生理盐水组	6	1.471±0.067 ^{a,e,g,i}	1.567±0.252 ^{e,g,i}	1.663±0.078 ^{a,e,g}	1.158±0.151 ^g	1.557±0.221 ^{a,e,g,i}	0.749±0.098 ^g
<i>F</i>		180.6	461.7	26.24	9.884	32.39	17.36
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 蓝光损伤组;^e $P<0.05$ vs N2L 低剂量组;^g $P<0.05$ vs N2L 中剂量组;ⁱ $P<0.05$ vs N2L 高剂量组。

水组各项检查结果与蓝光损伤组无显著差异(生理盐水组除注射物质不同以外其余操作均与各剂量药物组保持一致),确保了防治效果来自于药物本身而非试验操作。

SOD 活性反映了组织抗氧化损伤能力的强弱。Caspase-3 是 Caspase 家族成员导致细胞凋亡的最终执行者^[6];NQO1 及 GST 属于抗氧化蛋白,接受上游 Nrf2、PKC 等蛋白调控^[3,19-20];Bax 和 Bcl-2 是凋亡调控中功能对立的一对重要基因,其相对比例对细胞凋亡有重要影响,Bax 相对高表达时启动凋亡,而 Bcl-2 相对高表达时对抗其诱导凋亡的作用,延长细胞存活期^[21]。连续的蓝光照射会导致组织无法及时清除活性氧(ROS),加重氧化应激损伤的同时抑制 RPEc 中溶酶体吞噬光感受器细胞的 ROS,引起脂褐质的堆积^[22-23],脂褐质中含有的 A2E 对蓝光极为敏感,进一步引起 RPEc 凋亡、线粒体 DNA 功能障碍及氧化应激反应加重的恶性循环^[23-24]。我们观察到,应用 N2L 使 SOD 活性增加,GST、NQO1 及 Bcl-2 的表达升高,这或许能够阻断 A2E 堆积等情况的发生。此外,该药物降低了 Caspase-3 及 Bax 的表达,将正常对照组 Bcl-2/Bax 的比值作为判断细胞凋亡或增殖趋势的平衡状态,蓝光损伤组比值小于 1,而 N2L 各剂量组的比值均大于 1。因此,我们推测 N2L 降低氧化应激损伤的同时增加细胞的增殖速率,减少凋亡的同时更好地保留视网膜功能,HE 染色和 ERG 检测中的结果也印证了这一点。各剂量 N2L 组 ONL 厚度高于蓝光损伤组,暗视 ERG 中、高强度刺激光下 b 波、震荡电位 OS2 及明视 ERG b 波振幅显著高于蓝光损伤组,其中 2.5 mg/kg 浓度的 N2L 药物效果最佳,能更为有效地减少蓝光引起的视网膜损伤,保留视觉功能,降低蓝光引起的敏感度、视野和色觉上的损伤。

我们推测,更高剂量的 N2L 可能由于其内含有的烟酸成分会导致血糖控制紊乱^[25],这可能会加重视网膜组织的炎症反应,进而促进蓝光损伤并使损伤难以得到控制,ROS 无法及时清除^[26]。因此,N2L 浓度与疗效并非完全正相关。对于这一有趣的现象我们需要今后设置更大样本量、浓度分层更多的实验来加以探究。同时我们发现,N2L 能增加多种抗氧化蛋白的表达,拮抗蓝光导致的氧化应激损伤,结合其他学者的实验结论,这或许与其上游蛋白 Nrf2/AREs 通路相关^[27-28],其机制需要进一步验证。该复合药物起效过程中,各药物成分对蓝光防治效果的贡献度及药效作用是否有叠加等问题也是我们团后续研究的方向之一。此外,该实验造模阶段采用的是大鼠散瞳后整体照射,以使得空间内的光照强度均匀而不受大鼠活动影响,视网膜损伤范围较未散瞳更大。然而,皮肤受蓝光照射或许会对实验结果产生一定影响,配置动眼跟随系统或覆盖大鼠皮肤后再进行造模也许能够避免该问题。

综上,本研究探讨了 N2L 对大鼠蓝光视网膜损伤的防治作用和适宜剂量,初步探索了该药物保护机制,为进一步研究其相关信号通路以及临床蓝光损伤提供了新的理论依据和防治策略。

参考文献

[1] 王珊珊,李泳宁,张月芬,等. 维生素 E 对大剂量蓝光诱导损伤

视网膜色素上皮细胞的影响. 国际眼科杂志, 2022,22(2):189-193.

[2] 杨戴帝,孙汝许,陈雪,等. 蓝光照射对小鼠视网膜形态和功能的损伤作用. 中华实验眼科杂志, 2020,38(1):10-15.

[3] 张楚,陈倩雯,周周杰,等. MiR-22-3p 对蓝光暴露下大鼠视网膜神经节细胞的保护作用及其机制. 眼科新进展, 2022,42(10):780-785.

[4] Lin CH, Wu MR, Huang WJ, et al. Low-luminance blue light-enhanced phototoxicity in A2E-laden RPE cell cultures and rats. Int J Mol Sci, 2019,20(7):1799.

[5] Bindewald A, Schmitz - Valckenberg S, Jorzik JJ, et al. Classification of abnormal fundus autofluorescence patterns in the junctional zone of geographic atrophy in patients with age related macular degeneration. Br J Ophthalmol, 2005,89(7):874-878.

[6] 周周杰,俞永珍,徐哲,等. 线粒体 DNA 参与蓝光诱导视网膜色素上皮细胞损伤的机制. 中华实验眼科杂志, 2018,36(4):267-272.

[7] 李丹丹,邹秀兰,陈京霞,等. 组织因子靶向肽对蓝光诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用. 中华实验眼科杂志, 2017,35(7):603-609.

[8] 王晓慧,李志坚. 短波蓝光对眼部损伤的研究进展. 医学综述, 2021,27(1):116-120.

[9] 潘逸聪,牟郑林,邵毅. 蓝光致眼部损伤机制研究进展. 国际眼科杂志, 2023,23(2):208-211.

[10] 邹秀兰,俞永珍,徐哲,等. 蓝光诱导的人视网膜色素上皮细胞的氧化损伤及其线粒体机制. 中华实验眼科杂志, 2015,33(2):129-134.

[11] Zou XL, Yu YZ, Yu HH, et al. Protective effects of lipoic acid-niacin dimers against blue light-induced oxidative damage to retinal pigment epithelium cells. Int J Ophthalmol, 2019,12(8):1262-1271.

[12] 王观峰,姚敏,李文立,等. 硫辛酸烟酸二联体对丙烯醛损伤 ARPE-19 细胞的保护作用. 眼科新进展, 2013,33(2):106-109.

[13] 邹秀兰,王观峰,李文立,等. 硫辛酸烟酸二联体拮抗丙烯醛诱导 ARPE-19 细胞凋亡的作用机制. 实用医学杂志, 2014,30(15):2381-2383.

[14] 田亮,夏峰,张磊,等. 一种改良的光诱导视网膜分级损伤大鼠模型. 中华实验眼科杂志, 2011,29(3):209-214.

[15] McNamara MJ, Sayanlar JJ, Dooley DJ, et al. A randomized pilot study on the effect of niacin on pulmonary arterial pressure. Trials, 2015,16:530.

[16] 强薇,张小娟,曹楠珏,等. 近视患者光学相干断层成像与多焦视网膜电图的变化. 国际眼科杂志, 2017,17(6):1073-1076.

[17] 王茜. 视网膜电图在诊疗高海拔视网膜疾病中的应用进展. 高原医学杂志, 2019,29(2):61-64.

[18] 俞永珍,程天豪,邹秀兰,等. 蓝光致棕色挪威大鼠慢性视网膜光损伤的实验研究. 天津医药, 2023,51(11):1193-1198.

[19] Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. Biochem J, 2002,365(Pt 2):405-416.

[20] Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. Mol Cell Biol, 2003,23(22):8137-8151.

[21] 李红,吕建平,蔡善君,等. 蓝光照射致人视网膜色素上皮细胞线粒体凋亡的途径及机制. 中华实验眼科杂志, 2015,33(1):16-20.

[22] Ruan Y, Jiang SB, Gericke A. Age-related macular degeneration: role of oxidative stress and blood vessels. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3):1296.

[23] Feldman TB, Dontsov AE, Yakovleva MA, et al. Photobiology of lipofuscin granules in the retinal pigment epithelium cells of the eye: norm, pathology, age. *Biophys Rev*, 2022, 14(4):1051-1065.

[24] Marie M, Bigot K, Angebault C, et al. Light action spectrum on oxidative stress and mitochondrial damage in A2E-loaded retinal pigment epithelium cells. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):287.

[25] Collins PD, Sattar N. Glycaemic effects of non-statin lipid-lowering therapies. *Curr Cardiol Rep*, 2016, 18(12):133.

[26] Kang QZ, Yang CX. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol*, 2020, 37:101799.

[27] Calzia D, Degan P, Caicci F, et al. Modulation of the rod outer segment aerobic metabolism diminishes the production of radicals due to light absorption. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117:110-118.

[28] Keum YS, Han YH, Liew C, et al. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes. *Pharm Res*, 2006, 23(11):2586-2594.

2023《中国科技期刊引证报告》核心版眼科期刊主要指标及排名 (以综合评价总分为序)

期刊名称	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2068	2	1.881	1	76.2	1
眼科新进展	1189	3	0.766	2	56.9	2
国际眼科杂志	2095	1	0.728	4	55.2	3
中华实验眼科杂志	1114	4	0.760	3	37.6	4
中华眼科医学杂志电子版	167	10	0.458	8	37.4	5
中华眼底病杂志	719	6	0.564	6	34.6	6
临床眼科杂志	341	8	0.302	9	32.3	7
眼科	355	7	0.302	9	21.7	8
中华眼视光学与视觉科学杂志	753	5	0.591	5	19.4	9
中国斜视与小儿眼科杂志	239	9	0.500	7	15.7	10

摘编自 2023 版《中国科技期刊引证报告》核心版