

## D-硝基精氨酸对小鼠肾损伤及氧化应激作用

韩 滨, 张丽丽, 由振强, 辛艳飞, 陈云祥, 陈国灿, 徐潘生, 陈 颖, 宣尧仙  
(浙江省医学科学院安全性评价研究中心, 浙江 杭州 310013)

**摘要:**目的 研究 D-硝基精氨酸(D-NNA)对小鼠的肾损伤及其氧化应激机制。方法 ICR 小鼠 ig 给予 D-NNA 150, 50 和 15 mg·kg<sup>-1</sup>, 连续 30 d。测定并计算肾系数;血液生化分析仪检测血清中肌酐(Crea)和尿素氮(BUN);分光光度法测定肾组织一氧化氮(NO), 硫代巴比妥酸法测丙二醛(MDA)含量, 比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活性;观察肾病理组织学变化。结果 与 5% 葡萄糖对照组相比, D-NNA 150, 50 和 15 mg·kg<sup>-1</sup> 组血清中 BUN 分别明显升高了 83.6%, 36.2% 和 27.4% ( $P < 0.05$ ), D-NNA 150 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组血清中 Crea 分别明显升高了 281.6% 和 10.6% ( $P < 0.05$ ); D-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组肾系数和 NO 水平分别明显降低了 5.6% 和 25.5% ( $P < 0.05$ ); D-NNA 150 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> 组肾组织中 MDA 水平分别明显升高了 69.0% 和 36.9% ( $P < 0.01$ ), SOD 活性和 GSH-Px 活性分别明显下降了 17.4% 和 17.7%, 7.3% 和 13.7% ( $P < 0.05$ ); D-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组病理检查可见肾小管损伤, 嗜碱性变, 萎缩或囊性扩张和间质炎性浸润, D-NNA 50 和 15 mg·kg<sup>-1</sup> 组出现炎症细胞浸润。结论 D-NNA 对小鼠肾有一定的损伤作用, 其作用机制可能与 D-NNA 的手性转化产物 L-NNA 导致 NO 合成减少, 产生 ROS 有关。

**关键词:** D-硝基精氨酸; 肾损伤; 一氧化氮; 氧化应激

**中图分类号:** R963 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2011)03-0275-05

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.03.011

D-硝基精氨酸(<sup>N<sup>G</sup></sup>-nitro-D-arginine, D-NNA)在体内可发生手性转化, 生成 L 型对映异构体, 而肾是 D-NNA 发生手性转化的主要器官, 约有 80% 的 D-NNA 在肾发生手性转化。研究证实, D-NNA 手性转化存在两步反应机制: ① D-NNA 在肾 D 型氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase, DAAO)作用下氧化脱氨生成  $\alpha$ -酮酸; ②  $\alpha$ -酮酸在转氨酶参与下, 通过立体选择性获取氨基生成 L-硝基精氨酸(<sup>N<sup>G</sup></sup>-nitro-L-arginine, L-NNA), 实现手性转化<sup>[1-4]</sup>。D-NNA 的手性转化产物 L-NNA 是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的抑制剂, NOS 活性被抑制后, 可减少体内 NO 生成, 而 NO 是体内一种重要的生物信号分子, 具有调节血管阻力、血压、血小板聚集与黏附等多种生物学作用, NO 生成减少会引起动物血压长时间升高、肾动脉管腔缩小、动脉管壁的限制性坏死和微细血管堵塞, 引起多种病理损伤。前期研究还发现在 D-NNA 手型转化过程中, 会产生

大量活性氧(reactive oxygen species, ROS), 生理状态的自由基有刺激细胞生长作用, 但是当自由基的产生和清除的平衡状态被打破后, 自由基大量堆积, 会导致氧化应激, 引发脂质过氧化, 形成脂质过氧化物, 对蛋白质、脂肪和核酸均具有损害作用, 造成氧化损伤<sup>[5]</sup>。

ROS 和 NO 减少在肾功能损伤中起重要作用<sup>[6-7]</sup>。D-NNA 在肾手性转化过程中产生的大量 ROS 和对 NOS 活性的抑制可能会对肾有损伤作用。为此, 本研究通过长期给药, 观察 D-NNA 对 ICR 小鼠肾损伤作用, 并探讨其可能的作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和仪器

D-NNA 购自 Bachem Biosciences 公司, 用 5% 葡萄糖超声溶解; NO 试剂盒, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 丙二醛(malondialdehyde, MDA), 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。全自动血液生化分析仪(Hitachi, 日本)。

#### 1.2 动物及分组处理

40 只健康 ICR 小鼠, 雄性, 体质量 18 ~ 22 g, 清洁级, 由浙江省实验动物中心提供。动物合格证号: 0010040。饲养于屏障系统动物实验房内, 自由饮水

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30931759); 浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2009B001); 浙江省实验动物科技计划项目(2008F80001)

**作者简介:** 韩 滨(1986 -), 男, 硕士研究生, 主要从事药物毒理学研究。

**通讯作者:** 宣尧仙, E-mail: nndsvc@mail.hz.zj.cn, Tel: (0571)87568016

摄食,饲料为全价营养颗粒饲料,饮水为城市饮用水经 LAWS-2000 实验动物反渗透纯水机处理。小鼠随机分为 4 组,每组 10 只:5% 葡萄糖对照组, *D*-NNA 150,50 和 15 mg·kg<sup>-1</sup>组,连续 ip 给药 30 d。给药结束次日进行小鼠称重和所有指标的检测检查。

### 1.3 肾功能检测

给药结束次日,小鼠眼眶采血,3000 × *g* 离心 10 min 得到血清,用全自动生化分析仪测定血清肌酐 (creatinine, Crea) 以及血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平。

### 1.4 肾系数的测定

小鼠手术分离取肾,除去周围结缔脂肪组织,用冷生理盐水冲洗,除去血液,滤纸拭干,电子天平精确称重,按下述公式计算肾系数:

$$\text{肾系数}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \text{肾质量}(\text{mg})/\text{体质量}(\text{g})。$$

### 1.5 肾 NO 水平的检测

取 1 g 肾组织加入 9 ml 生理盐水于玻璃匀浆管中制成 10% 组织匀浆,于 4℃ 12 000 × *g* 离心 20 min,取上清,按照试剂盒说明采用分光光度法进行 NO 指标检测。

### 1.6 肾 MDA 水平、比色法检测肾 GSH-Px 和 SOD 活性的测定

取制备好的肾组织匀浆上清液,按照说明书硫代巴比妥酸法检测肾组织匀浆的 MDA 含量、以比色法检测 GSH-Px 和 SOD 活性。

### 1.7 组织病理学观察

肾用体积分数为 10% 甲醛固定 48 h,经常规取材,脱水后石蜡包埋,制片,HE 染色,在光镜下检查。

### 1.8 统计学分析

实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 *D*-硝基精氨酸对小鼠血清肌酐和尿素氮水平的影响

表 1 结果显示,与 5% 葡萄糖对照组比较,血清中 BUN 随 *D*-NNA 剂量的增加而增加 ( $P < 0.05$ ); *D*-NNA 150 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>组 Crea 明显升高 ( $P < 0.05$ ),*D*-NNA 15 mg·kg<sup>-1</sup>组无显著变化。

### 2.2 *D*-硝基精氨酸对小鼠肾系数的影响

与 5% 葡萄糖对照组肾系数 (17.74 ± 0.69) mg·g<sup>-1</sup> 相比, *D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组肾系数 (16.74 ± 0.55) mg·g<sup>-1</sup> 明显降低 ( $P < 0.05$ ),*D*-NNA 50 和 15 mg·kg<sup>-1</sup> 组肾系数无明显差异,分别为 17.64 ± 1.19 和 (17.49 ± 1.17) mg·g<sup>-1</sup>。

表 1 *D*-硝基精氨酸(*D*-NNA)对小鼠血清尿素氮(Crea)和尿肌酐(BUN)水平的影响

Tab.1 Effect of N<sup>G</sup>-nitro-*D*-arginine (*D*-NNA) on serum creatinine(Crea) and blood urea nitrogen(BUN) levels of mice

组别	BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	Crea/mmol·L <sup>-1</sup>
5% 葡萄糖对照	5.25 ± 0.47	45.2 ± 3.9
<i>D</i> -NNA 15	6.69 ± 1.01 *	46.4 ± 1.8
50	7.15 ± 0.89 *	50.6 ± 8.5 *
150	9.61 ± 3.20 **	172.4 ± 62.8 **

小鼠分别 ip 给予 5% 葡萄糖或 *D*-NNA 15 ~ 150 mg·kg<sup>-1</sup>, 每天 1 次, 连续 30 d.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与 5% 葡萄糖对照组比较。

### 2.3 *D*-硝基精氨酸对小鼠肾组织中 NO 水平的影响

与 5% 葡萄糖对照组小鼠肾组织中 NO 水平 (12.8 ± 1.2) μmol·L<sup>-1</sup> 相比, 只有 *D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> 小鼠肾组织中 NO 水平为 (10.2 ± 2.6) μmol·L<sup>-1</sup>, 明显降低 ( $P < 0.05$ ), *D*-NNA 50 和 15 mg·kg<sup>-1</sup> 组肾组织中 NO 水平无明显差异, 分别为 (11.4 ± 2.2) μmol·L<sup>-1</sup> 和 (12.2 ± 1.6) μmol·L<sup>-1</sup>。

### 2.4 *D*-硝基精氨酸对小鼠肾 MDA 水平和 GSH-Px 及 SOD 活性的影响

如表 2 所示, 与 5% 葡萄糖对照组相比, *D*-NNA 50 和 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组 MDA 水平和 SOD 和 GSH-Px 活性明显升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), *D*-NNA 15 mg·kg<sup>-1</sup> 组无显著差异。

表 2 *D*-NNA 对小鼠肾丙二醛(MDA)含量,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Tab.2 Effect of *D*-NNA on the level of renal malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) activities of kidneys of mice

组别	SOD/ kU·g <sup>-1</sup>	GSH-Px/ kU·g <sup>-1</sup>	MDA/ mmol·g <sup>-1</sup>
5% 葡萄糖对照	82 ± 12	226 ± 14	0.8 ± 0.1
<i>D</i> -NNA 15	85 ± 19	219 ± 29	0.9 ± 0.3
50	77 ± 12 *	196 ± 33 *	1.2 ± 0.3 **
150	68 ± 28 *	186 ± 27 *	1.4 ± 0.5 **

动物分组及给药见表 1.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与 5% 葡萄糖对照组比较。

### 2.5 *D*-硝基精氨酸对小鼠肾组织的作用

光镜检查发现,5% 葡萄糖对照组小鼠肾小球、肾小管结构清晰、形态正常,无异常病理表现(图 1A)。*D*-NNA 给药组小鼠肾产生一定的病理形态变化,*D*-NNA 15 和 50 mg·kg<sup>-1</sup> 主要表现为炎症细胞浸润(图 1B, C)。*D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组主要表现为肾小管损伤,嗜碱性变、萎缩或囊性扩张,间质炎性浸润(图 1D)。

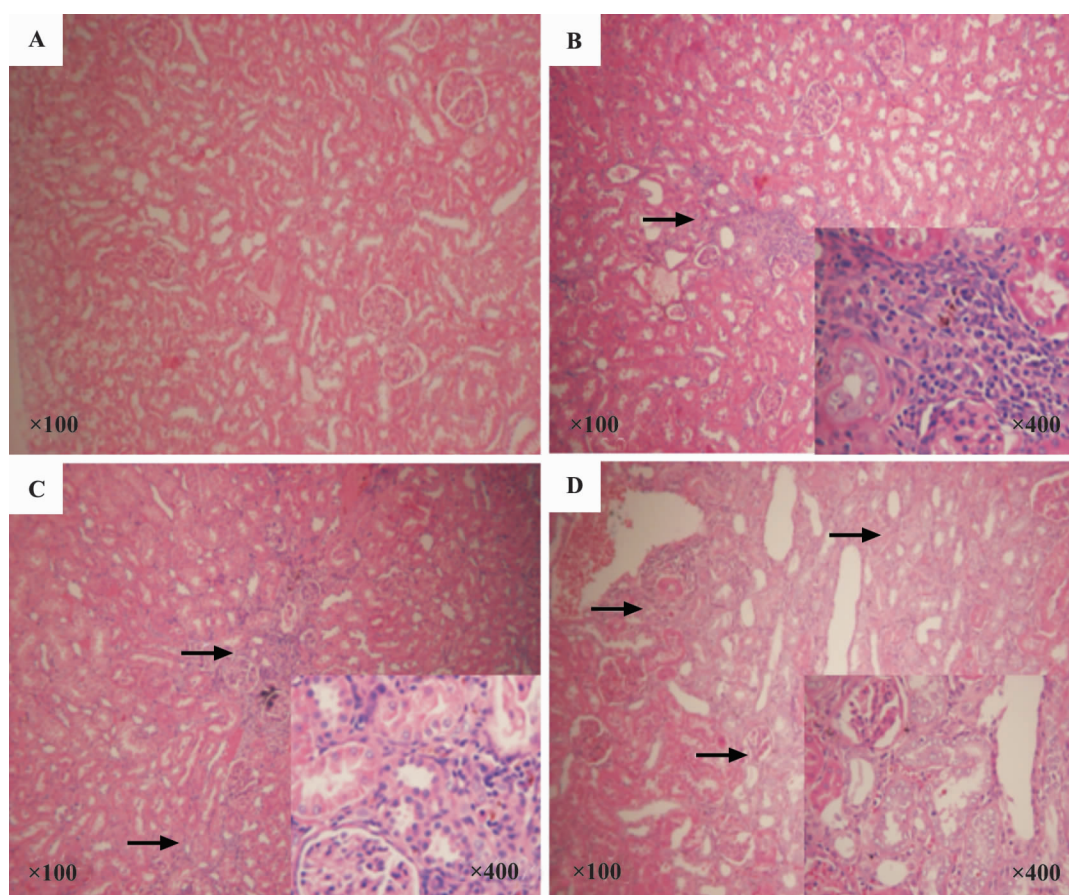


图1 *D*-硝基精氨酸对小鼠肾组织的作用。动物分组及给药见表1。A: 5%葡萄糖对照组,肾组织结构正常;B: *D*-NNA 15 mg·kg<sup>-1</sup>组,间质炎性浸润(箭头所示);C: *D*-NNA 50 mg·kg<sup>-1</sup>组,间质炎性浸润(箭头所示);D: *D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup>组,肾小管损伤,间质炎性浸润。

Fig.1 Effect of *D*-NNA on kidney morphology of mice.

### 3 讨论

Crea 和 BUN 是肾功能的主要指标,如果肾功能受损,排除尿素的能力自然下降,血液中 Crea 和 BUN 水平就会升高。本实验对 ICR 小鼠给予 *D*-NNA 150 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>后,小鼠血清中 Crea 和 BUN 的含量明显升高,表明 *D*-NNA 对肾功能具有损伤作用,肾病理学检查同样证实长期给予 *D*-NNA 会引起肾病理改变。

研究表明,肾是 *D*-NNA 在体内发生手性转化的主要器官,在手性转化过程中产生了大量对肾有损伤的 ROS<sup>[8-9]</sup>,ROS 可以和细胞大分子反应,导致脂质过氧化。脂质过氧化可能导致膜损伤,SOD 和 GSH-Px 是机体主要的抗氧化酶<sup>[10-12]</sup>,SOD 和 GSH-Px 水平反映机体抗氧化能力。MDA 是脂质过氧化的产物,通过 MDA 含量可以反映脂质过氧化程度<sup>[13]</sup>。本实验给予 ICR 小鼠 *D*-NNA 150 和 50 mg·kg<sup>-1</sup>后,小鼠肾组织 MDA 水平明显升高,SOD 活性和 GSH-Px 活性明显下降,表明 *D*-NNA 对肾具有一定的氧化损伤作用。

*L*-NNA 是 *D*-NNA 发生手性转化的产物,*L*-NNA 是一种 NOS 抑制剂,在体内 NO 是由 NOS 催化 *L*-NNA 氧化生成,NO 作为体内的重要信号分子,它能舒张血管,抑制血小板黏附、聚集,抑制白细胞黏附、浸润,减轻炎症介导的细胞坏死,从而保护组织细胞。本实验长期给予 ICR 小鼠 *D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup>后发现,肾 NO 水平明显降低,在生理条件下释放的 NO 使血小板处于较低水平的活化状态,防止其黏附聚集,NOS 活性受到抑制使 NO 合成减少,导致血小板活化,并释放血栓素、5-羟色胺、腺嘌呤核苷酸、血小板源性生长因子等引起血管收缩,平滑肌细胞增生并向内膜下迁移,白细胞向内膜黏附,破坏内皮细胞功能<sup>[14]</sup>,当内皮细胞功能破坏时,局部血管收缩,血小板黏附、聚集功能增强,血液黏滞性增高,加重微循环障碍,增加外周阻力,导致血压升高<sup>[15]</sup>从而对肾造成损伤作用。

*D*-NNA 的手性转化产物 *L*-NNA 能抑制 NOS 活性导致 NO 生成减少,手性转化过程中产生大量 ROS,而哺乳动物对外源物进行生物转化过程中产生的活性氧自由基能够破坏机体的抗氧化防御系统<sup>[16]</sup>,

使机体受到超氧游离基的攻击造成组织细胞损伤<sup>[17-18]</sup>。肾是 *D*-NNA 发生手性转化的主要器官, 约有 80% *D*-NNA 在肾发生手性转化, 对肾造成的损伤较大, 所以使小鼠肾质量和肾系数变小。

综上所述, 本研究发现, 长期给予 *D*-NNA 对小鼠肾具有一定的损伤作用, 且存在一定的剂量关系, 其氧化应激的机制与 *D*-NNA 的手性转化产物 *L*-NNA 导致 NO 合成减少, 造成肾血管系统功能病变以及在转化过程中产生的 ROS 有关。

#### 参考文献:

- [1] Wang YX, Poon CI, Pang CC. *In vitro* and *ex vivo* inhibitory effects of *L*- and *D*-enantiomers of N<sup>G</sup>-nitro-arginine on endothelium-dependent relaxation of rat aorta [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, **265**(1):112-119.
- [2] Wang YX, Cheng X, Pang CC. Bilateral kidney ligation abolishes pressor response to N<sup>G</sup>-nitro-*D*-arginine [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, **366**(2-3):175-179.
- [3] Wang Q, Cwik M, Wright CJ, Cunningham F, Pelligrino DA. The *in vivo* unidirectional conversion of nitro-*D*-arginine to nitro-*L*-arginine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, **288**(1):270-273.
- [4] 辛艳飞, 程 熹, 王广基, 周向军, 王永祥. 肾脏是体内 N<sup>G</sup>-*D*-硝基精氨酸单向手性转化的主要器官 [J]. *中国药理学通报*, 2004, **20**(9):989-993.
- [5] 辛艳飞, 周向军, 王永祥. *D*型氨基酸氧化酶活性对于 *D*-硝基精氨酸手性转化的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(2):135-139.
- [6] Mahieu S, Contini Mdel C, González M, Millen N. Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney [J]. *Toxicol Lett*, 2009, **190**(1):9-15.
- [7] Vaziri ND, Liang K, Ding Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension [J]. *Kidney Int*, 1999, **56**(4):1492-1498.
- [8] Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose [J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, **77**:S19-S25.
- [9] 郑美玲, 樊均明. 氧化应激对糖尿病肾病时细胞、细胞外基质及血管通透性的影响机制 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, **11**(25):4988-4991.
- [10] Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kaur K. Heart failure due to doxorubicin [J]. *Kuwait Med J*, 2001, **33**(2):111-115.
- [11] Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2003, **123**(10):855-866.
- [12] Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage [J]. *FASEB J*, 2004, **18**(6):664-675.
- [13] 安利峰, 胜利, 范桂香. 硒的功能及其相关疾病 [J]. *国外医学医学地理分册*, 2005, **26**(2):56-57, 79.
- [14] 于 静, 邓 起. 一氧化氮的生理作用及与人体多个系统疾病发病过程的关系 [J]. *实用医技杂志*, 2007, **14**(13):1781-1782.
- [15] Hartman JC, Wall TM, Hullinger TG, Shebuski RJ. Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140 [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, **21**(6):996-1003.
- [16] 李桂珠, 许运新, 赵晓松, 王玉军, 孙安娜, 王洪阶. 人参床土中五氯硝基苯残留特性的模拟 [J]. *吉林农业科学*. 2002, **27**(5):55-57.
- [17] Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme [J]. *Biochemistry*, 1975, **14**(24):5294-5299.
- [18] Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals [J]. *Mech Ageing Dev*, 1990, **51**(3):283-297.

## Renal toxicity and oxidative stress mechanism of N<sup>G</sup>-nitro-*D*-arginine on the kidney of mice

HAN Bin, ZHANG Li-li, YOU Zhen-qiang, XIN Yan-fei, CHEN Yun-xiang, CHEN Guo-can,  
XU Pan-sheng, CHEN Ying, XUAN Yao-xian

(National Key Laboratory of Safety Evaluation for New Drugs, Zhejiang Academy of Medical Sciences,  
Hangzhou 310013, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To explore the renal toxicity of N<sup>G</sup>-nitro-*D*-arginine (*D*-NNA) and oxidative stress mechanism. **METHODS** After *D*-NNA 150, 50 and 15 mg·kg<sup>-1</sup> was ip given for

30 d, the kidney index, blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Crea) were assessed. The nitric oxide (NO) concentration, malondialdehyde (MDA) content, glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activities in the renal cortex were determined and histopathological changes in renal tissues were detected. **RESULTS** Compared with 5% glucose control group, BUN in *D*-NNA 150, 50 and 15 mg·kg<sup>-1</sup> groups increased by 83.6%, 36.2% and 27.4% ( $P < 0.05$ ), respectively; Crea in *D*-NNA 150 and 50 mg·kg<sup>-1</sup> groups increased by 281.6% and 10.6% ( $P < 0.05$ ); the kidney index and NO concentration decreased significantly to 5.6% and 25.5% in *D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> group; the MDA content increased significantly to 69.0% and 36.9% ( $P < 0.01$ ) while SOD and GSH-Px activities decreased significantly to 17.4% and 17.7% ( $P < 0.01$ ), 7.3% and 13.7% ( $P < 0.05$ ) in *D*-NNA 150 and 50 mg·kg<sup>-1</sup> groups. Histopathology of mice showed renal tubular injury, basophilic change, atrophy, cystic expansion mild interstitial inflammatory infiltration in *D*-NNA 150 mg·kg<sup>-1</sup> group, but interstitial inflammatory infiltration in *D*-NNA 50 and 15 mg·kg<sup>-1</sup> groups. **CONCLUSION** *D*-NNA can induce renal toxicity, the mechanism of which may be due to the decreasing of NO content and increase of ROS induced by *L*-NNA which is a chiral inversion product of *D*-NNA.

**Key words:** N<sup>G</sup>-nitro-*D*-arginine; renal damage; nitric oxide; oxidative stress

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30931759); Zhejiang Medical Science Research Fund (2009B001); Animal Science and Technology Projects in Zhejiang Province (2008F80001)

**Corresponding author:** XUAN Yao-xian, E-mail: nndsvc@mail.hz.zj.cn, Tel: (0571)87568016

(收稿日期: 2010-07-16 接受日期: 2010-12-21)

(本文编辑: 乔虹)

## 祝贺《中国药理学与毒理学杂志》被评为 RCCSE 中国核心学术期刊(A)!

近日,本刊编辑部收到武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)的通知:贵刊在第二届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”。至此,本刊成为国内全部权威期刊评价体系中的核心期刊。中国核心学术期刊(A)为排在 5%~20% 的期刊,占各学科期刊总数的 15%。

《中国药理学与毒理学杂志》编辑部

2011.05.09