文章编号:1000-5404(2005)09-0881-04

论著

牛磺酸对大鼠视网膜光化学损伤的保护作用研究

陈 卡,糜漫天,余小平 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 应用持续高强度光照条件下大鼠视网膜光化学损伤的模型,观察膳食中添加牛磺酸对大鼠视网膜中感光细胞的影响。**方法** 以白色荧光灯为光源,用(3 000±200) lx的光照强度分别给予普通饲料组和4%牛磺酸饲料组SD大鼠24 h持续光照,同时设立正常对照,测定视网膜电图,观察病理形态和超微结构变化,并测定视网膜中丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活性。**结果** 光照后视网膜电图结果显示普通饲料组a波、b波幅值显著降低($P<0.01$),潜伏时间延长($P<0.01$),4%牛磺酸饲料组a波幅值下降($P<0.01$),其它指标无明显变化;光照后普通饲料组视网膜内外节段排列紊乱,外核层变薄,内节线粒体肿胀,感光细胞核固缩,而牛磺酸添加组视网膜结构保持良好;光照后MDA含量在两组均显著增加,牛磺酸组比普通饲料组低($P<0.01$),SOD、GSH-px活性在光照组显著降低,而牛磺酸组虽有升高但无显著意义。**结论** 预防性喂饲牛磺酸能给予感光细胞一定的保护作用,其保护作用部分可能与牛磺酸的抗氧化以及自由基清除有关。

关键词:牛磺酸;视网膜光化学损伤;抗氧化
中图法分类号:R322.91; R774.1; R914.4 **文献标识码**:A

Protective effects of taurine on retina photochemical damage in rats

CHEN Ka, MI Man-tian, YU Xiao-ping (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical university, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the animal model of photochemical damage and investigate the protective effects and mechanism of taurine on the retina photochemical damage in rats. **Methods** Fifty rats were randomly divided into normal control group, light damage group and 4% taurine supplementation group. After 15 day cyclic light and 24-hour dark adaptation, the last two groups were exposed to (3000±200) lx transmitted by six cold white lights. After 24-hour exposure, the rats were stayed in darkness. The retinal morphology was detected through light and electron microscope and the retinal function was detected by Scot-ERG. The concentration of MDA and the activity level of SOD/GSH-px were measured. **Results** In light damage group, the a and b amplitude (Aa/Ab) were significantly decreased, but in taurine group, except the decreased Aa, others were of no significant changes. The retina inner and outer segments were swollen and in disorder after exposure, the outer nuclear layer got thinner than that of control. The mitochondria in light damage group was swollen, but in taurine group changes were less significant. After exposure, the concentration of MDA in retina was markedly increased in light damage group and the activity level of SOD/GSH-px were decreased, but in taurine group MDA slightly increased and SOD/GSH-px was up-regulated but of no significance. **Conclusion** Dietary supplementation with 4% taurine partially protected photoreceptor from degeneration, which might correlate with the antioxidation and inhibition of free radical character of taurine.

Key words: taurine; photochemical damage; antioxidation

在日常生活中可见光、紫外线、红外线、激光以及科研、临床中使用的如裂隙灯、手术显微镜、检眼镜及眼内导光纤维导致的视网膜光化学损伤不断发生,自1966年Noell首次建立光性视网膜损伤的动物模型起,国内外都对其进行了广泛的研究[1]。视网膜光化学损伤(photochemical damage)是当光照时间与光照强度达到一定阈值后,视网膜各级神经元尤其是视网膜感光细胞出现变性、凋亡或坏死的病理过程,但其具体机制并不十分清楚。国内外研究表明,光照引发形成的自由基以及产生的大量脂质过氧化副产物均在视网

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200228)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200228)
作者简介:陈 卡(1979-),女,四川省广安市人,硕士研究生,主要从事营养与视功能方面的研究。电话:(023)66538722
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2004-11-16;修回日期:2005-03-22

膜光化学损伤中发挥了极为重要的作用[2]。在该理论基础上采用抗氧化剂如抗坏血酸、三七总皂甙、二甲基硫脲以及自由基清除剂 PBN 均观察到保护效应[3~5]。牛磺酸(taurine)是体内一种游离的条件必需氨基酸,在视网膜生长发育以及维持正常视功能方面发挥了极其重要的作用,近年研究表明牛磺酸也是一种抗氧化物质,在糖尿病视网膜疾病以及白内障中起到一定的保护作用[6,7]。本实验拟采用饲料中添加牛磺酸,以观察其对大鼠视网膜光化学损伤是否有保护作用,并进一步从抗脂质过氧化、自由基清除方面进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 Spregue-Dawley 大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供) 45 只,体质量 150 g 左右,雌雄不限。随机分为正常对照组(control)、普通饲料光照组(damage)、牛磺酸光照组(taurine),每组 15 只。按照实验分组分别喂饲普通饲料或者添加了 4% 牛磺酸(北京世纪维他生物技术有限公司,纯品)的普通饲料,循环光照(12 h 明:12 h 暗)两周后分别接受处理。

1.2 化学损伤动物模型建立

采用 SYD-I 型多功能光照控制箱(本实验室和西南师范大学物理学院联合研制)建立光损伤动物模型。箱内开启 6 盏白色荧光灯,大鼠活动水平光照强度为(3 000 ± 200) lx,温度 20 ℃,换气良好,大鼠在光照箱内能自由进食和饮水。各组循环光照后,暗适应 1 d,托吡肼胺(湖北潜江制药厂出品)散瞳后接受 24 h 持续光照,然后重新放入暗室。

1.3 视网膜功能测定

各组大鼠暗适应 24 h,托吡肼胺散瞳 20 min,速眠新注射液(长春解放军农牧大学兽医研究所)腹腔内注射(1.0 ml/kg)麻醉,采用 AVES-8000 型视觉电生理刺激仪(第三军医大学西南医院眼科提供)记录各组动物的暗适应视网膜电图(scotopic electroretinograph, scot-ERG)。记录电极为环形金电极,置于大鼠眼角膜缘;参考电极和接地电极为不锈钢针,分别置于记录眼同侧内眦部以及额正中皮下。采用单次闪光刺激,刺激光强为 2.00 $cd \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$,叠加 5 次,每次间隔 2 min,通频带为 1~300 Hz,记录 ERG 的 a 波及 b 波振幅以及潜伏时间。

1.4 视网膜形态光镜观察及外核层厚度测定

大鼠光照后暗适应 2 d,乙醚麻醉后迅速摘除眼球,10% 的中性甲醛固定,常规石蜡包埋,经视神经矢状纵切眼球,作 5 μm 厚切片,行 HE 染色后观察视网膜形态,并采用 Motic-Image 图像分析系统测定各组视网膜外核层厚度(outer nuclear layer, ONL)。

1.5 视网膜超微结构观察

大鼠光照后暗适应 2 d,4% 多聚甲醛灌注固定后迅速摘除眼球,沿角膜缘切除眼前节组织及玻璃体,常规透射电镜观察。

1.6 视网膜过氧化物以及抗氧化酶活性分析测定

大鼠光照后暗适应 2 d,乙醚麻醉后迅速摘除眼球,剥离视网膜,按 5%(W/V)加入组织匀浆介质(0.01 mol/L Tris HCl, 0.001 mol/L EDTA-2Na,0.01 mol/L 蔗糖,0.8% 的氯化钠溶液,pH 7.4)制备匀浆液,4 ℃ 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,羟胺法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,DTNB 直接法测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活性,操作过程按试剂盒说明书进行(南京建成生物工程研究所)。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 10.0 统计分析软件处理,采用 t 检验。

2 结果

2.1 视网膜电生理指标的观察

光照后普通饲料组视网膜电图波型不典型,a 波、b 波幅值(Aa/Ab)显著降低($P < 0.01$),甚至熄灭,a 波、b 波潜伏时间(La/Lb)延长($P < 0.01$),而在牛磺酸组波型典型,除 a 波幅值较正常对照有降低外,其它指标没有明显差异。牛磺酸光照组与普饲光照组相比,各项指标均有显著性差异。

表 1 牛磺酸对光照后大鼠视网膜电图的影响($n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

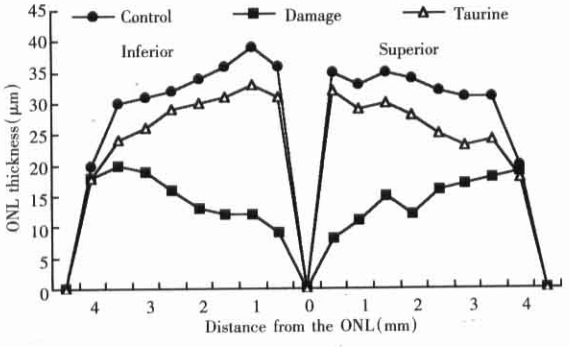
Tab 1 Effects of taurine on scot-ERG of rat after light exposure ($n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

Group	La(ms)	Aa(μV)	Lb(ms)	Ab(μV)
Control	12.50 ± 0.50	97.21 ± 12.25	94.00 ± 2.75	267.09 ± 30.16
Damage	39.54 ± 1.50*	24.55 ± 20.75*	82.50 ± 3.50*	32.71 ± 16.52*
Taurine	13.00 ± 0.50◇	77.15 ± 14.06*◇	99.50 ± 1.95◇	275.51 ± 50.36◇

*: $P < 0.01$, *vs* control; ◇: $P < 0.01$, *vs* damage

2.2 视网膜病理组织学观察

普饲光照组视网膜内外节段(retinal inner /outer segment, RIS/ROS)排列紊乱,外核层层次混乱,而牛磺酸干预组感光细胞排列较整齐。外核层厚度普饲光照组、牛磺酸光照组显著变薄($P < 0.01$),但牛磺酸组比普饲光照组厚($P < 0.01$)(图 1)。



Measurements were made at 0.5-mm intervals along the vertical meridian to the superior and inferior ora serrata

图 1 牛磺酸对视网膜外核层厚度的影响

Fig 1 Effects of taurine on ONL thickness

2.3 视网膜超微病理结构观察

普饲光照组视杆外节盘膜叠状结构解离,内节线粒体肿

胀，线粒体嵴排列紊乱，内质网肿胀，核固缩，同时还发现色素上皮细胞中出现大量的吞噬物，甚至崩解。而在牛磺酸光照组大外节段排列稍有紊乱，而内节段排列仍然较整齐，靠近内节的线粒体发现了少量线粒体的肿胀，感光细胞核排列整齐，未观察到肿胀或是浓缩等异常现象，同时观察到视网膜色素上皮细胞保存完好。

2.4　视网膜 MDA 含量、SOD /GSH-px 活性测定结果

MDA 含量在普饲光照组、牛磺酸光照组显著增加（$P < 0.01$），但牛磺酸组显著低于普饲光照组（$P < 0.01$）；SOD 、GSH-px 活性在普饲光照组显著降低，牛磺酸组虽有升高但无显著意义（$P > 0.05$）（表 2）。

表 2　大鼠视网膜中 MDA 含量及 SOD/GSH-px 活性测定（$n = 18$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　The level of MDA and SOD/GSH-px in rat retina（$n = 18$，$\bar{x} \pm s$）

Group	MDA (nmol/g)	SOD(IU/g)	GSH-px($nmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)
Control	32.76 ± 5.23	86.91 ± 8.32	24.48 ± 3.51
Damage	98.48 ± 15.32*	30.82 ± 5.54*	10.37 ± 2.66*
Taurine	49.26 ± 10.63*◇	90.28 ± 5.31◇	28.02 ± 2.48◇

*：$P < 0.01$，*vs* control；◇：$P < 0.01$，*vs* damage

3　讨论

牛磺酸是一种含硫的 β 氨基亚磺酸类似物，自 Hayes 报道的幼猫膳食中缺乏牛磺酸会导致视功能减退或者失明始，人们对牛磺酸进行了广泛的研究。牛磺酸在视觉信号转导以及维护正常视功能有很强的作用，近年研究还发现牛磺酸作为一种抗氧化剂，对于糖尿病性视网膜病变、白内障等同样具有极强的保护作用[6,7]。光化学损伤条件下，视网膜感光细胞处于较高的氧化应激状态，本实验从抗氧化角度观察牛磺酸对视网膜感光细胞的影响。

3.1　牛磺酸在功能和形态学方面对大鼠视网膜光化学损伤具有一定的保护作用

视网膜电图是评价视网膜功能变化的早期指标，即视网膜受到光刺激后，所产生的横跨视网膜径线方向的慢性电位变化，它代表了视感受器到无长突细胞的视网膜各层的综合电活动[8]。光化学损伤时，视网膜电图 a 波、b 波幅值降低且波型不典型，在本研究中光损伤组大鼠视网膜电图发生明显改变，a 波、b 波幅值降低（$P < 0.01$），甚至熄灭，而在牛磺酸干预大鼠中仅 a 波幅值有一定降低。a 波反映的是感光细胞层功能变化，表明高强度光照改变了外核层功能，或者由于感光细胞减少导致，其它指标没有明显变化，且波型典型，表明牛磺酸对光损伤条件下视网膜功能有一定的保护作用。

文献[9,10]报道利用动物模型研究光化学损伤，并详实阐述了其形态功能变化。本实验采用（3 000 ± 200）lx 可见光连续 24 h 光照，病理形态学以及超微结构结果显示成功复制了大鼠光化学损伤模型，牛磺酸组与损伤组相比较仍属于较轻微的损伤，外核层细胞仍保留较多且排列较整齐，通过形态学的观察发现牛磺酸在该光照条件下确实能够给予一定的保护作用。

3.2　牛磺酸通过抗脂质过氧化以及清除自由基来保护感光细胞

视网膜感光细胞是视觉传导通路的第一级神经元，与其功能相适应的外节段盘膜富含多价不饱和脂肪酸，持续光照后会产生大量超氧阴离子、单线态氧以及羟自由基等活性氧自由基，其可攻击不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化反应，产生大量细胞毒性产物如丙二醛（MDA），同时由于感光细胞处于高张氧环境中，而内节段富含线粒体，因此持续光照可以激发内源性的氧自由基，造成一个损伤的环境，产生光化学损伤[1]。研究表明，抗氧化以及能够快速清除自由基的物质如三七总皂甙、VitC、VitE、β 胡萝卜素能在视网膜光化学损伤中发挥一定的保护作用。

文献[7]报道牛磺酸可明显降低高浓度半乳糖性白内障的发生，还能减轻或延缓糖尿病性视网膜疾病的发生，上述都与其抑制 MDA 升高有关。在本实验研究中，光损伤后视网膜组织中丙二醛（MDA）含量升高，而牛磺酸干预组与正常对照无显著差异，说明牛磺酸对光损伤条件下感光细胞的防护作用，部分可能是由于牛磺酸清除组织内脂质过氧化产物，防止了其对细胞的继发性损伤。体外研究结果表明，牛磺酸具有明显的清除羟自由基和超氧阴离子自由基的作用[7]，牛磺酸也可能是通过清除大量自由基，在 MDA 形成上游阻断过氧化链式反应，从而抑制其生成，保护感光细胞。SOD 和 GSH-px 是体内重要的抗氧化物酶，前者是人体防御内外环境中超氧阴离子损伤的重要酶，后者能消除过氧化物保护生物膜[11]。本实验测定显示，普饲光照组 SOD、GSH-px 活性降低（$P < 0.01$），而在牛磺酸光照组二酶酶活性虽有升高但并无显著性差异，是否是由于牛磺酸通过稳定盘膜结构，视网膜内自由基以及脂质过氧化产物不会因光照而激增，组织内氧化和抗氧化系统基本维持平衡，因此 SOD、GSH-px 有一定的增强，但牛磺酸是否也可以通过上调抗氧化酶活性来发挥作用还需进一步研究。

本研究表明牛磺酸在光化学损伤中发挥了一定保护作用，可能与其抗氧化和清除自由基有关，牛磺酸具有多种生物学作用，参与了调节细胞的渗透压平衡，钙

离子平衡。最近研究还表明其活性代谢物 Tau-Cl 还通过抑制核转录因子 NFκB 核转移而发挥作用[12]，因此牛磺酸保护感光细胞的机制还需进一步探讨，从而为牛磺酸的开发利用提供更坚实的理论基础。

参考文献：

[1] 陈 鹏，钱焕文. 视网膜光化学损伤机制的研究进展[J]. 国外医学眼科学分册，2002，26(2)：96－99.

[2] Kaldi I, Dittmar M, Pierce P, *et al*. L-NAME protects against acute light damage in albino rats, but not against retinal degeneration in P23H and S334ter transgenic rats[J]. Exp Eye Res, 2003, 76(4): 453－461.

[3] 谢伯林，王正国，朱佩芳，等. 三七总皂甙及抗坏血酸对大鼠视网膜光化学损伤的防护作用[J]. 第三军医大学学报，1999，21(3)：175－177.

[4] Organisciak D T, Wang H M, Li Z Y, *et al*. The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(11): 1580－1588.

[5] Organisciak D T, Darrow R M, Jiang Y I, *et al*. Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33(5): 1599－1609.

[6] 宋旭东，陈翠真，董 冰，等. 牛磺酸对链脲佐菌素-糖尿病性白内障干预机制初探[J]. 中华眼科杂志，2003，39(10)：605－609.

[7] 张 伟，陈翠真，董 冰，等. 牛磺酸对大鼠自由基的清除作用及其对亚硒酸钠性白内障脂质过氧化的影响[J]. 中华眼科杂志，2002，38(3)：157－160.

[8] 阎洪禄，于秀敏. 眼生理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001. 339－356.

[9] 刘学政，于树春，李永洋. 实验性大鼠视网膜光损伤模型的建立与研究[J]. 锦州医学院学报，2002，23(6)：1－4.

[10] 张 纯，王 薇. 大鼠光损伤性内层视网膜变性的超微病理学研究[J]. 中华眼底病杂志，2003，19(7)：222－225.

[11] 周爱儒，查锡良. 生物化学[M]. 第5版. 北京：人民卫生出版社，2001. 158－160.

[12] Shuller Levis G B, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid [J]. FEMS Microb Lett, 2003, 226(2): 195－202.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)09-0884-01

PRK、LASIK 术后新兵入伍视力标准的探讨

Suggestion on sight standard of recruit after PRK or LASIK operation

徐 越，毛正兴，晏艳霜，陈 旭，周伟玲 （解放军422中心医院眼科，湛江 524005）

我国是近视大国，近视的发病率一直保持着低龄化、高增长的趋势。面对入伍体检的限制，大量应征青年采用多种方式提高远视力。最常见的是准分子激光屈光性手术。现结合我科对某部入伍的部分新兵进行的视力复检，对屈光性手术后入伍视力标准进行探讨。

1 临床资料

曾接受我科视力复检的 2001－2005 年某部新兵，2001、2002、2003 年度分别为 265 人(530 眼)、258 人(516 眼)、267 人(534 眼)。依据《应征公民体格检查标准》，安排眼科医生进行远视力、矫正视力、裂隙灯检查、既往史询问及随访。

2 结果

2001、2002、2003 年度 4.7 以下近视眼数分别为 84 眼(15.85%)、98 眼(18.99%)、107 眼(20.04%)。行近视治疗的新兵情况见表 1，近年来曾治疗过近视的新兵数量及比率有明显增长，特别是行 PRK、LASIK 术的人数。

表 1 近视治疗的新兵情况

年份	受检人数	PRK、LASIK 术后人数			OK 镜治疗数	药物及其它治疗数	PRK、LASIK 占总治疗人数百分率(%)
		2年及以上	半年－2年	半年内			
2001	265	0	2	3	3	11	5/19(26.32)
2002	258	3	2	5	4	7	10/21(47.62)
2003	267	5	6	17	2	13	28/43(65.11)

通过 2 年的随访及门诊调查，发现屈光手术后出现角膜瓣移位及翻转的共 3 眼(人)，其中 2 例为半年内术者；视网膜脱离 1 眼，术前双眼为屈光度－8.5D 的高度近视；干眼症及其它不良反应的共 7 人。

3 讨论

随着我军装备的改善及高技术兵种增加，部队对新兵学历提出了要求，这些应征人员面临的最大困惑将是视力问题。从本组 3 个年度视力复检的新兵来看，视力 4.7 以下人数占一定比例，主要原因是学习中用眼不卫生及大量接触电脑、电视等。大量应征青年为过体检关，争相去治眼，诸如 OK 镜、各种明目液及时下流行的 PRK、LASIK 术等。但部队是一个特殊群体，训练艰苦，任务重，眼部受伤的机会高于普通人群，由此导致的屈

（下转 887 页）

作者简介：徐 越(1977－)，男，江西省南昌市人，医师，主要从事眼科临床方面的研究。电话：(0759)3565896

收稿日期：2004-09-02；修回日期：2005-02-28