论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0662-03

牛磺酸对缺氧大鼠视网膜缺氧诱导因子-1α表达的影响

陈 芳,糜漫天,许红霞,白 雪,陈 卡 (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 观察牛磺酸对高原缺氧条件下大鼠视网膜中缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)表达的影响,探讨牛磺酸对视网膜缺氧适应的影响。**方法** SD大鼠分为4组,平原对照组(C)、模拟5 500 m高度缺氧组(H)与平原牛磺酸组(T)、模拟5 500 m高度缺氧牛磺酸组(HT),分别以基础饲料和添加了2.4%牛磺酸的饲料喂养1周,营养干预后平原对照组、平原牛磺酸组在平原继续饲养,模拟缺氧组、模拟缺氧+牛磺酸组放入低压舱模拟5 500 m高原缺氧,分别在处理0、2、6、12、24、48、72 h后取视网膜。应用RT-PCR、免疫组化和Western blot方法检测视网膜中HIF-1α在mRNA和蛋白水平的表达。**结果** 缺氧后视网膜中HIF-1α免疫阳性神经元数目明显增多,主要分布在视网膜内层,内核层(INL)中细胞免疫阳性率从缺氧2 h开始增加,到72 h阳性率下降到与对照无显著性差异。mRNA与蛋白的表达在缺氧早期高于后期。牛磺酸处理后细胞免疫阳性率增加,HIF-1α mRNA与蛋白的表达量也明显增强。**结论** 牛磺酸能通过缺氧诱导因子途径促进视网膜缺氧适应性调节,保持正常的视觉功能。

关键词:缺氧;视网膜;牛磺酸;缺氧诱导因子-1α

中图法分类号:R322.91;R364.4;R977.4 **文献标识码**:A

Effect of taurine on hypoxia inducible factor 1α expression of retina in rats exposed to hypoxia

CHEN Fang, MI Man-tian, XU Hong-xia, BAI Xue, CHEN Ka (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of taurine on the expression of hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) in rat retina and investigate the protection mechanism of taurine against hypoxia. Methods A total of 112 SD rats were divided into 4 groups: plain group (C), high altitude group (H), plain + taurine group (T), high altitude + taurine group (HT). The rats of C and H groups were fed with regular forage, and the rats of T and HT groups were supplemented 2.4% taurine for one week. Then rats of C and T groups were fed in plain, and the rats of H and HT groups were put into low pressure chamber imitating 5 500 m altitude. At 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 h after hypoxia, HIF-1α expression in the detached retina were determined by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting. Results The expression of HIF-1α in retina inner layer increased after hypoxia. The rate of HIF-1α expression in INL increased at 2 h after hypoxia, but no difference between at 72 h and control. The expression of HIF-1α mRNA and protein was stronger in earlier period than anaphase. Taurine up-regulated HIF-1α mRNA and protein expression in retina cells. Conclusion Taurine can promote the adaptability to hypoxia through HIF pathway that keeps normal visual function.

Key words: hypoxia; retina; taurine; hypoxia inducible factor 1α

视网膜对氧敏感,高原缺氧引起的暗适应时间延长、视力下降、视网膜出血在临床上很常见,尤其在急进高原时表现突出,其程度随海拔高度增加而加深,5 500 m为人类长期生存的极限高度,快速进驻此高度地区易引起视网膜功能性和器质性损伤。促进机体快速建立缺氧适应是应对缺氧的重要途径,通过增强缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)表达能有效改善缺氧反应。牛磺酸是视觉保护因子,前期的研究表明牛磺酸促进视网膜正常结构的维持,并能提高线粒体中某些代谢酶的活性。另有研究表明,当功能性线粒体缺乏时,细胞不能通过激活HIF-1感受低氧。那么牛磺酸是否能通过缺氧诱导因子的信号途径参与视网膜的缺氧适应性调节呢,以往的研究尚不明确。为此,本研究采取营养干预手段研究牛磺酸

基础项目:全军"十一五"专项资助项目(06Z028)
Supported by the Foundation of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06Z028)

作者简介:陈 芳(1977-),女,四川省彭州市人,博士研究生,主要从事营养与视网膜缺氧病变方面的研究。电话:(023)68752291
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期:2005-09-02;修回日期:2006-01-17

对大鼠视网膜 HIF-1 关键亚基缺氧诱导因子-1α（HIF-1α）的影响，探讨牛磺酸促进缺氧适应的分子机制。

1　材料与方法

1.1　材料

清洁级成年 SD 大鼠，体质量（200 ± 50）g，雌雄各半，购于第三军医大学大坪医院实验动物中心。

1.2　试剂及仪器

Trizol RNA 抽提试剂，逆转录及 PCR 试剂为 Promega 产品。引物由重庆升博生物技术公司合成。兔抗 HIF-1α 抗体购自博士德公司，即用 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 试剂盒及 PBS 缓冲液购于北京中山生物技术有限公司。RT-PCR 和 Western blot 采用 Bio-RAD 系统。低压舱由本校高原医学系提供。

1.3　方法

1.3.1　动物分组及缺氧模型　　SD 大鼠 112 只，分为 4 组，平原对照组（C）、平原牛磺酸组（T）、模拟 5 500 m 高度缺氧组（H）和模拟 5 500 m 高度缺氧牛磺酸组（HT），每组 28 只。每组由 7 个时相点组成：0、2、6、12、24、48、72 h。C、H 组大鼠饲以基础饲料，T、HT 组用添加了 2.4% 牛磺酸的饲料喂养，1 周后进行实验。将 H 组和 HT 组大鼠放入低压舱内，以 100 m/s 的速度减压至 5 500 m 高度，维持此高度至设定的时间。

1.3.2　视网膜总 RNA 提取　　采用 RT-PCR 一步法，逆转录为 cDNA。β-actin 为内参，扩增条件为 FP1：5′-AAGTCCCT-CACCCTCCCAAAAG-3′；RP2：5′-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC-3′，退火温度 58 ℃，产物长度为 97 bp。RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 的表达，其扩增条件为 FP1：5′- CTGATTGCATCTCCAC-CTTCTACC-3′；RP2：5′-TTCCAAGAAAGCGACATAGTAGGG-3′，退火温度 57.4 ℃，产物长度 344 bp。2% AGE 鉴定 RT-PCR 产物，Bio-RAD 凝胶成像分析系统扫胶分析。PCR 特异条带以相对吸光度（intensity）× 面积（mm^2）表示，以各组的校正吸光度与其 β-actin 校正吸光度的比值表示。

1.3.3　免疫组化　　摘取眼球，立即以 4℃的 4% 多聚甲醛固定 24 h，石蜡包埋，切片。HIF-1α 抗体免疫组化按照常规组化方法及试剂盒说明进行，苏木精复染，用 PBS 代替一抗作为阴性对照。对内核层（INL）阳性细胞进行记数，分别观察 5 个视野，每个视野观察 100 个细胞，记录阳性细胞数，计算细胞阳性率。

1.3.4　Western blot　　提取视网膜细胞核蛋白，Lowry 法定量。制备 6% 分离胶、5% 积层胶，上样，电泳，转膜，加入抗体反应，显色，结果以 Bio-Rad 凝胶成像分析系统扫描分析，以 C 组积分光密度值为参照，其余各组与之比值为相对表达量。

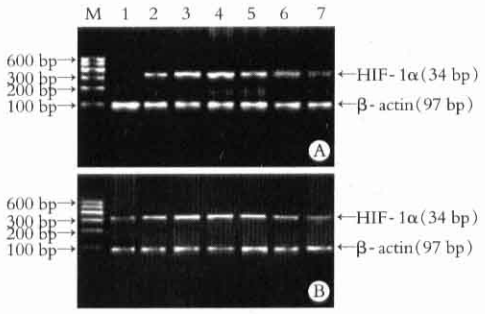
1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析，计数资料用 χ^2 检验，计量资料用方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　RT-PCR 结果

对照组大鼠视网膜 HIF-1α mRNA 无表达，H 组和 HT 组在缺氧 2 h 即开始表达，缺氧 6、12 h 呈强表达，在 24、48、72 h 表达降低。HT 组与 H 组相比各时相点的表达均有增加。图像分析结果显示，H 组表达在 12 h 达到最大，HT 组在 6 h 即达到最大。缺氧各时相点与对照的表达差异显著（$P < 0.05$），HT 组与 H 组相比各时相点的表达均有显著差异（$P < 0.05$）。HT 组的表达在 2、6、12、24、48、72 h 分别是 H 组的 1.2、1.7、1.4、1.5、1.6、1.9 倍（图 1）。



A：H 组；B：HT 组；M：标准；1：0 h；2：2 h；3：6 h；4：12 h；5：24 h；6：48 h；7：72 h

图 1　缺氧大鼠视网膜 HIF-1α mRNA 表达的变化

2.2　免疫组化结果

C 组与 T 组的 INL 细胞 HIF-1α 免疫细胞阳性率无差异。H 与 HT 组 INL 细胞阳性率从缺氧 2 h 开始增加，6 h 达到最大，6 h 后开始下降，但仍较对照组高，到 72 h 阳性率下降到与对照无差异。HT 组的阳性率高于 H 组，两者相比差异显著（$P < 0.05$）（表 1）。

表 1　缺氧大鼠视网膜 INL HIF-1α 细胞阳性率（%）

组别	0 h	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
C	20.2	17.2	22.2	25.0	19.6	20.4	18.4
T	23.6	23.0	20.4	25.2	24.4	24.0	20.4
H	20.0	40.4^{a}	64.4^{a}	60.4^{a}	60.4^{a}	45.6^{a}	25.4
HT	25.8	60.6^{ab}	92.6^{ab}	88.2^{ab}	78.8^{ab}	35.6^{ab}	30.0

a：$P < 0.05$，与 C 组比较；b：$P < 0.05$，与 H 组比较

2.3　Western blot 结果

结果显示，对照组大鼠视网膜 HIF-1α 蛋白有少量表达，H 组和 HT 组分别在缺氧 2、6、12 h 呈强表达，在 24、48、72 h 表达有所降低，但仍高于正常水平。HT 组与 H 组相比各时相点的表达均有增加。图像分析结果显示，H、HT 组在 6 h 表达达到最大。缺氧各时相点与对照的表达差异显著（$P < 0.05$），HT 组与 H 组相比各时相点的表达差异显著（$P < 0.05$）（图 2）。



1：C0 h；2：2 h；3：6 h；4：12 h；5：24 h；6：48 h；7：72 h；8：T0 h

图 2　缺氧大鼠视网膜 HIF-1α 蛋白表达的变化

3 讨论

5 500 m 高度的大气中氧含量约为平原的一半,在此高度,缺氧疾病的发生率高,症状表现突出。人和哺乳动物体内存在的氧感受器,能敏感识别组织和细胞中氧浓度的变化,由氧感受器感应到缺氧,激活 HIF-1,HIF-1 转位到细胞核,引起目的基因的上调或下调,参与机体对低氧的细胞和全身性反应,包括无氧代谢、红细胞生成、血管增生和呼吸增强,从而使细胞在低氧条件下生存,产生缺氧适应[1],这是目前公认的缺氧诱导基因转录和缺氧信息传递的共同通路。由于 HIF-1 在其中起关键作用,被称为低氧适应调节的管家转录因子[2]。HIF-1 是缺氧适应性反应所需要的核信号,是机体耐受缺氧、保持氧稳态的重要因素。HIF-1 由 HIF-1α 和 HIF-1β 组成,HIF-1β 在细胞中组成性表达,HIF-1α 则受到氧或其他因素的调控[3]。本实验模拟了 5 500 m 的高原缺氧条件,我们观察到对照组的视网膜中 HIF-1α 蛋白表达很低,且 HIF-1α mRNA 基本无表达,缺氧引起了视网膜中 HIF-1α 在 mRNA 和蛋白水平的表达,这提示我们视网膜对氧的变化很敏感,氧浓度降低一半可引起 HIF-1α 在视网膜中出现明显变化。细胞可通过 2 条途径调控 HIF-1α,当氧充足时,羟化酶促进 HIF-1α 亚基降解,其降解需要肿瘤抑制蛋白(von hippel-lindau,VHL)参与,同时也阻止了 HIF-1α 与 p300 和其他与基因转录相关蛋白的结合能力。低氧限制了羟化酶活性,提高了 HIF-1 活性[4]。除了缺氧,Co^{2+}、Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 以及铁螯合也能够促进 HIF-1 的活化[5]。HIF-1 被活化的结果有利于视网膜产生缺氧适应,避免高原缺氧导致的严重视网膜功能改变。

牛磺酸是神经系统中游离存在的含硫氨基酸,具有广泛的生理功能,在视网膜中具有抗脂质过氧化、减少清除自由基、稳定膜结构、调节细胞渗透压、调节钙稳定等作用[6]。前期的研究证明了牛磺酸对缺氧引起的视网膜细胞线粒体结构和功能损伤有明显的保护作用。氧是电子传递链的最终受体,缺氧时伴随着大量能量代谢变化,因此越来越多的研究集中在线粒体对感受缺氧的作用,甚至提出线粒体就是氧感受器。有研究指出,当功能性线粒体缺乏时,细胞不能通过激活 HIF 感受低氧[7]。实验结果显示胎鼠细胞在缺氧时线粒体 DNA 缺失的细胞不能进行细胞内呼吸,HIF-1α 被降解,不能诱导 Epo、糖酵解酶和 VEGF 的表达[8]。当加入呼吸链抑制剂 MPTP,其代谢物 MPP^+ 抑制了线粒体复合物的活性,同时低氧诱导 HIF-1α 表达降低[9]。这表明缺氧诱导的一系列反应与线粒体功能抑制直接相关。本研究中观察到牛磺酸促进 HIF-1α 在 mRNA 和蛋白水平的表达。HIF-1α mRNA 在缺氧 2 h 即开始表达,6 h 时达到高峰,24 h 后表达变弱,牛磺酸处理后表达增强,但并不能加速或延迟 HIF-1α 的表达,显示 HIF-1α mRNA 的转录是一过性的。与对照组相比,HIF-1α 在核中的高表达反映出缺氧时 HIF-1α 的转录非常活跃,为激活下游基因的转录提供基础,便于视网膜快速进行缺氧适应调节,牛磺酸促进 HIF-1α 在细胞核中表达,提示其能促进视网膜缺氧适应机制的建立,减轻缺氧造成的损伤。HIF-1α 的免疫阳性细胞主要分布在视网膜内层,尤其是内核层和节细胞层,内层细胞是缺氧适应的调节中心,牛磺酸使阳性细胞率大大增加有利于促进内层视网膜的应激反应,解决内层细胞由于供氧不足引起的功能减退,保证整个视觉信号传导网络的功能正常。总之,牛磺酸是视网膜中重要的视觉调节因子[10-12]。可通过缺氧诱导因子途径参与视网膜缺氧损伤的防护,促进 HIF-1α 上调而有利于视网膜的缺氧适应,保护视觉功能。

参考文献:

[1] MARX J. Cell biology. How cells endure low oxygen[J]. Science, 2004, 303(5663): 1454-1456.

[2] SEMENZA G L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(2): 167-171.

[3] ZHU H, BUNN H F. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes[J]. Respir Physiol, 1999, 115(2): 239-247.

[4] HON W C, WILSON M I, HARLOS K, *et al*. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL[J]. Nature, 2002, 417(6892): 975-978.

[5] DERY M A, MICHAUD M D, RICHARD D E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(3): 535-540.

[6] HANNA J, CHAHINE R, AFTIMOS G, *et al*. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium[J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 56(3): 189-194.

[7] MANSFIELD K D, GUZY R D, PAN Y, *et al*. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation [J]. Cell Metab, 2005, 1(6): 393-399.

[8] CHANDEL N S, MALTEPE E, GOLDWASSER E, *et al*. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(20): 11715-11720.

[9] AGANI F H, PICHIULE P, CHAVEZ J C, *et al*. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia[J]. J Biol Chem, 2000, 275(46): 35863-35867.

[10] 陈 卡, 糜漫天, 余小平. 牛磺酸对大鼠视网膜光化学损伤的保护作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 881-884.

[11] 严灿荣, 梁轩伟, 冯晓津, 等. 牛磺酸对失血性休克复苏兔视网膜组织 NO 含量及 NOS 活性影响的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 545-546.

[12] 许红霞, 糜漫天, 朱俊东, 等. 谷氨酸兴奋毒性及牛磺酸干预对大鼠视网膜 GFAP 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(11): 1078-1082.

(编辑 薛国文)