文章编号:1000-5404(2006)06-0565-04

论著

# 牛磺酸对高原缺氧大鼠视网膜形态结构及SDH、LDH活性的影响

陈 芳,糜漫天,白 雪 (第三军医大学军事预防医学院营养卫生学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 观察急性持续性高原缺氧条件下视网膜结构、功能变化,探讨牛磺酸对视网膜缺氧损伤的保护作用。**方法** 以低压舱模拟4 500 m和5 500 m高原条件,SD大鼠经2.4%牛磺酸干预后入舱缺氧。光镜观察视网膜层状结构,检测琥珀酸脱氢酶(SDH)和乳酸脱氢酶(LDH)活性的变化,电镜技术观察视网膜Müller细胞的超微结构。**结果** 缺氧使内核层、内网状层和节细胞层受损。缺氧早期内网状层细胞移行高于对照组($P<0.05$),4 500 m时牛磺酸促进细胞的移行,5 500 m早期抑制细胞移行。缺氧后Müller细胞肿胀,核崩解,细胞器变形,添加牛磺酸损伤减轻。缺氧导致SDH与LDH活性显著下降($P<0.05$),牛磺酸能上调其活性($P<0.05$)。**结论** 缺氧引起视网膜内层细胞出现损伤,牛磺酸能显著提高SDH、LDH的活性,减轻视网膜的缺氧损伤,其保护作用与Müller细胞的功能和结构维持相关。

**关键词:** 缺氧;视网膜;牛磺酸;Müller细胞

**中图法分类号:** R322.91;R339.54;R977.4 **文献标识码:** A

# Effects of taurine on high-altitude hypoxia induced changes of retina morphology and SDH, LDH activity

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

**Abstract: Objective** To investigate retina structure and function under the condition of acute continuous hypoxia at high altitude and study on the protective effects of taurine on retina injury. **Methods** Low-pressure chamber was used to simulate 4 500 m and 5 500 m altitude. A total of 126 SD rats were used in this study, half assigned to the conditions under plain, 4 500 m and 5 500 m, the other half before the same assignment fed with 2.4% taurine in plain for a week. At 2, 6, 12, 24, 48, 72 h after entering the chamber, the eyes of SD rats were taken out, fixed and sectioned. Retina layer structure and ultrastructure of retina Müller cells were observed by light microscope and transmission electron microscope. The activity of succinate dehydrogenase (SDH) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected with enzymohistochemistry. **Results** INL, IPL and GCL were injured in low oxygen. In the early period, migrating IPL cells increased ($P<0.05$), and taurine increased migration at 4 500 m, but inhibited migration at 5 500 m. In hypoxia group Müller cells were swollen with nucleus degradation, organells swelling or deformation. Cells in INL of taurine group had lower injury. Taurine up-regulated the activity of SDH and LDH ($P<0.05$) that decreased after hypoxia ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia results in the injury of retina inner layer cells. Taurine can up-regulate the activity of SDH and LDH and relieve the injury. The protective effects are related to the function and structure of retina Müller cells.

**Key words:** hypoxia; retina; taurine; Müller cell

急进高原后,人体出现暗适应时间延长,严重的出现视网膜出血,引起高原视网膜病(HAR),在初期症状表现明显[1,2]。视网膜出血在4 500 m以上很常见,5 500 m是人类长期生存的界限,视网膜缺氧疾病的发生更加频繁。Müller细胞是视网膜主要的胶质细胞,为视网膜能量代谢的中心。牛磺酸为必要的视觉营养

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:2005-06-29;修回日期:2006-01-08

因子，以往研究表明牛磺酸对心肌缺氧有明显的保护作用，但牛磺酸对视网膜的缺氧损伤是否有保护作用并不清楚。本研究采取动物实验，观察缺氧和牛磺酸干预下大鼠视网膜中 Müller 细胞的形态和功能的变化，旨在进一步认识牛磺酸与视觉功能的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级成年 Sprague-Dawley(SD)大鼠 126 只，体质量(200±50)g，雌雄各半，购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

### 1.2 主要仪器设备

小型低压舱，由第三军医大学高原军事医学系提供。

### 1.3 方法

1.3.1 减压方法 将大鼠放入低压舱内，以 100 m/s 的速度迅速减压至实验设定的高度，维持此高度。

1.3.2 实验动物分组 大鼠分为平原对照组(C)、平原牛磺酸组(T)、4 500 m缺氧组(45H)、4 500 m缺氧 + 牛磺酸组(45HT)、5 500 m缺氧组(55H)和5 500 m缺氧 + 牛磺酸组(55HT)6 组，每组 21 只。牛磺酸组大鼠以添加了 2.4% 牛磺酸(北京世纪维他生物技术有限公司，纯品)的饲料饲养 1 周后进行实验。缺氧组及缺氧 + 牛磺酸组大鼠置入低压舱，按设计的条件进行缺氧处理，分别在 2、6、12、24、48、72 h 后将动物迅速移出。

1.3.3 视网膜组织病理学观察 处死大鼠，迅速摘取眼球，置于 4 ℃预冷 10% 甲醛固定过夜，石蜡包埋，沿眼球的中轴角膜及视神经旁行连续的 5 μm 环状切片，苏木精-伊红(HE)染色，观察视网膜各层结构及厚度，尤其是外核层(ONL)、内核层(INL)、内网状层(IPL)、节细胞层(GCL)及神经纤维层(NFL)的变化。对 IPL 中的细胞总数记数。

1.3.4 SDH、LDH 活性检测 摘取眼球，立即放入液氮冷冻，沿眼球的中轴行 10 μm 冰冻切片，酶组织化学法参照文献[3]操作，即滴片法加入特征底物孵育液，NBT 显色，显色深浅与酶活性成正相关，采用 Bio-RAD 图像分析系统进行定量分析，选择视网膜酶活性最强层次的 10 个点进行测定，计算灰度密度，以此作为酶的相对活性。

1.3.5 透射电镜观察超微结构 眼球迅速置于 4 ℃预冷的 3% 戊二醛固定过夜，沿角膜缘剪开眼球，去除角膜、晶状体、玻璃体，分离视网膜，1% 锇酸固定，系列丙酮脱水，环氧树脂浸透包埋，光镜定位后做超薄切片，透射电镜观察视网膜 Müller 细胞超微结构。

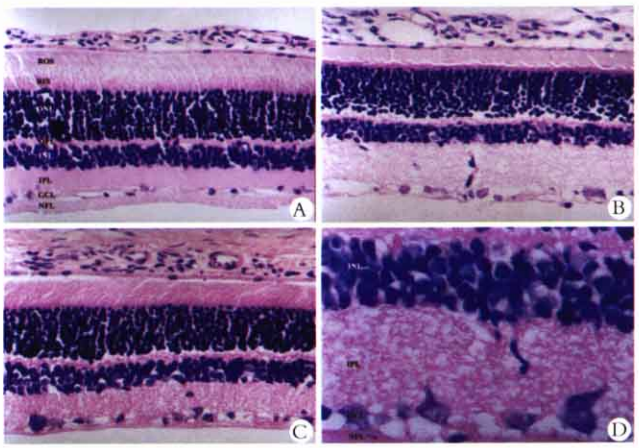
### 1.4 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计学软件进行组间 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 视网膜的形态学观察

各组视网膜 ONL 感光细胞未见改变。55H 组 INL 中细胞核大部分呈圆形，散在分布少数梭形、星形细胞核；IPL 发生肿胀，结构松散，厚度变厚；GCL 节细胞少；NFL 明显变薄，神经纤维分散。55HT 组 INL 中胶质细胞包绕在神经元周围，数量有所增加，核呈多角形，在多个部位向外突出，INL 靠 OPL 的一侧可见典型的 Müller 细胞，另一侧边缘有不规则细胞向 IPL 延伸，并在 IPL 中发现了这样的细胞，是 Müller 细胞发生了移行；GCL 节细胞有两极突起；NFL 中纤维聚集，均匀分布(图 1)。




A:C 组；B:55H 组 IPL 肿胀(HE×400)；C:55HT 组胶质细胞数量增加(HE×400)；D:55HT 组 GC 突起丰富，INL 神经细胞结构明显，有典型的 Müller 细胞(HE×1 000)

**图 1 缺氧和牛磺酸干预大鼠视网膜的形态比较**

对 IPL 的细胞记数结果如图 2，45H 组的细胞数在 6 h 达到最大值后随缺氧时间的延长而降低，48 h 后与 C 组无显著性差异。45HT 组与 45 H 组有相似的变化趋势，2 h 后各时相点的 IPL 细胞数均高于 T 组($P<0.05$)。45HT 组细胞数大于 45H 组，在 6 h 和 12 h 有显著性差异($P<0.05$)。除在 12 h 55H 组与 C 组有差异($P<0.05$)外，55H 组和 55HT 组各时相点的细胞数与 C 组和 T 组无显著性差异，55HT 组细胞数在 2 h 以后与 55H 组相比呈下降趋势。可见，视网膜中度缺氧和严重缺氧诱导的细胞移行上牛磺酸表现的作用是不同的。

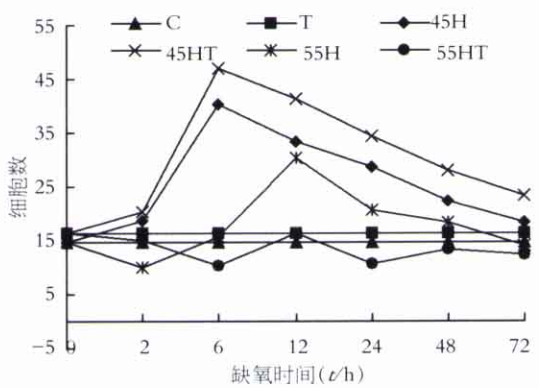
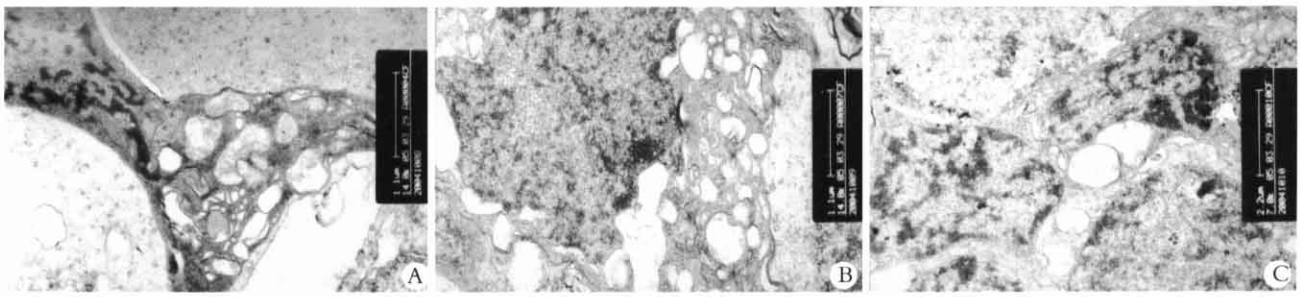



**图 2 牛磺酸对缺氧大鼠视网膜 IPL 细胞数的影响**

### 2.2　牛磺酸对超微结构的影响

各组视网膜 ONL 神经元结构正常，无明显变化。INL 细胞出现明显的超微结构变化。在 C 组，可见胶质细胞突起中集中了大量的细胞器。缺氧组 INL 神经元数目减少，INL 靠 OPL 一侧可见血管增生，Müller 细胞的突起包围血管内皮细胞，其染色质向核膜边缘固缩，但细胞器完好；其他位置的 Müller 细胞出现损伤，明显肿胀，核膜崩解，细胞核严重变形，细胞质出现大量空泡，线粒体严重肿胀，嵴减少甚至消失，内质网有明显扩张。HT 组损伤情况有所减轻，Müller 细胞核仁正常，细胞质空泡较少，线粒体无明显肿胀（图 3）。




A：C 组，细胞器丰富，结构完整；B：55H 72 h Müller 细胞肿胀，出现大量空泡；C：55HT 72 h 空泡少

**图 3　透射电镜下视网膜 Müller 细胞的超微结构**

### 2.3　牛磺酸对 SDH 与 LDH 酶活性的影响

2.3.1　SDH 活性　　SDH 活性部位染色为蓝紫色，视网膜中染色的阳性部位主要出现在杆锥层内节（RIS）、OPL、IPL 和 GCL，其中 RIS 的活性最强，杆锥层外节（ROS）、ONL 和 INL 的活性弱。55H 组、55HT 组与 C 组相比 SDH 活性显著降低（$P<0.05$），55HT 组 SDH 活性高于 55H 组，对应于各自的时相点均有显著性差异（$P<0.05$），见表 1。

**表 1　牛磺酸对缺氧大鼠视网膜 SDH 活性的影响（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | ROS | RIS | ONL | OPL | INL | IPL | GCL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | 17.35 ± 0.79 | 30.36 ± 1.04 | 18.11 ± 1.05 | 27.72 ± 0.66 | 16.47 ± 0.82 | 25.87 ± 1.04 | 25.81 ± 0.71 |
| 55H 24 h | 10.31 ± 1.11$^{a}$ | 15.38 ± 1.81$^{a}$ | 10.06 ± 1.08$^{a}$ | 10.61 ± 0.82$^{a}$ | 9.12 ± 1.38$^{a}$ | 10.1 ± 0.79$^{a}$ | 10.23 ± 0.83$^{a}$ |
| 55H 48 h | 10.80 ± 1.19$^{a}$ | 19.88 ± 1.91$^{a}$ | 9.20 ± 0.68$^{a}$ | 17.60 ± 1.92$^{a}$ | 12.08 ± 0.81$^{a}$ | 16.39 ± 2.40$^{a}$ | 19.15 ± 3.21$^{a}$ |
| 55H 72 h | 10.12 ± 1.37$^{a}$ | 20.43 ± 1.78$^{a}$ | 8.54 ± 1.00$^{a}$ | 16.84 ± 2.21$^{a}$ | 9.85 ± 1.18$^{a}$ | 12.70 ± 1.03$^{a}$ | 14.04 ± 1.25 |
| 55HT 24 h | 14.87 ± 1.30$^{ab}$ | 24.64 ± 1.39$^{ab}$ | 13.05 ± 0.87$^{ab}$ | 22.21 ± 1.26$^{ab}$ | 14.35 ± 0.69$^{b}$ | 20.27 ± 1.37$^{ab}$ | 19.88 ± 1.28$^{ab}$ |
| 55HT 48 h | 12.00 ± 0.83$^{ac}$ | 25.96 ± 1.53$^{ac}$ | 12.94 ± 0.59$^{ac}$ | 25.05 ± 1.23$^{ac}$ | 16.11 ± 1.08$^{c}$ | 23.68 ± 0.92$^{ac}$ | 25.97 ± 1.23$^{c}$ |
| 55HT 72 h | 12.20 ± 0.68$^{ad}$ | 27.15 ± 1.45$^{ad}$ | 11.29 ± 1.11$^{ad}$ | 19.22 ± 2.80$^{ad}$ | 12.90 ± 0.72$^{ad}$ | 18.19 ± 1.27$^{ad}$ | 18.46 ± 1.72$^{ad}$ |

a：$P<0.05$，与 C 组比较；b：$P<0.05$，与 H 24 h 比较；c：$P<0.05$，与 H 48 h 比较；d：$P<0.05$，与 H 72 h 比较

2.3.2　LDH 活性　　LDH 活性强时染色显蓝色，弱时显红色，阳性染色部位出现在视网膜的 RIS、OPL、IPL、GCL 和 NFL，其中 RIS 与 GCL + NFL 活性最强，ROS、ONL 和 INL 活性弱。55H 组、55HT 组的 RIS 与 GCL + NFL 中 LDH 活性与 C 组相比活性显著降低（$P<0.05$），牛磺酸对 ONL 和 INL 的 LDH 活性影响较小，在 ROS、OPL、IPL 上变化趋势与 RIS 与 GCL + NFL 类似。55HT 组的 LDH 活性高于 55H 组，对应于各自的时相点均有显著性差异（$P<0.05$），见表 2。

**表 2　牛磺酸对缺氧大鼠视网膜 LDH 活性的影响（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | ROS | RIS | ONL | OPL | INL | IPL | GCL + NFL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | 17.66 ± 1.63 | 30.93 ± 0.39 | 10.28 ± 0.90 | 29.51 0.38 | 15.61 ± 1.88 | 28.14 ± 0.93 | 29.26 ± 0.60 |
| 55H 24 h | 14.92 ± 1.23$^{a}$ | 18.78 ± 0.86$^{a}$ | 11.27 ± 0.87$^{a}$ | 22.27 ± 1.73$^{a}$ | 13.74 ± 1.34$^{a}$ | 16.38 ± 1.08$^{a}$ | 19.78 ± 0.90$^{a}$ |
| 55H 48 h | 14.17 ± 1.51 | 14.81 ± 1.96$^{a}$ | 11.80 ± 1.39$^{a}$ | 17.81 ± 1.44$^{a}$ | 14.20 ± 1.27$^{a}$ | 16.74 ± 1.45$^{a}$ | 18.96 ± 0.97$^{a}$ |
| 55H 72 h | 13.51 ± 1.17$^{a}$ | 13.52 ± 1.56$^{a}$ | 10.70 ± 0.97 | 16.05 ± 1.07$^{a}$ | 11.70 ± 1.08$^{a}$ | 16.25 ± 1.51$^{a}$ | 17.06 ± 1.73$^{a}$ |
| 55HT 24 h | 20.97 ± 2.48$^{ab}$ | 21.62 ± 1.57$^{ab}$ | 12.79 ± 1.48$^{ab}$ | 21.93 ± 1.35$^{a}$ | 13.47 ± 1.69$^{a}$ | 19.06 ± 1.42$^{ab}$ | 25.21 ± 2.86$^{ab}$ |
| 55HT 48 h | 17.62 ± 0.62$^{c}$ | 18.81 ± 0.45$^{ac}$ | 13.98 ± 1.09$^{ac}$ | 20.09 ± 0.99$^{ac}$ | 13.77 ± 0.58$^{a}$ | 18.94 ± 0.97$^{ac}$ | 23.02 ± 1.92$^{ac}$ |
| 55HT 72 h | 15.66 ± 0.89$^{ad}$ | 16.72 ± 1.18$^{ad}$ | 11.51 ± 0.78$^{ad}$ | 18.90 ± 1.18$^{ad}$ | 13.90 ± 0.51$^{ad}$ | 17.85 ± 1.09$^{ad}$ | 23.10 ± 1.47$^{ad}$ |

a：$P<0.05$，与 C 组比较；b：$P<0.05$，与 55H 24 h 比较；c：$P<0.05$，与 55H 48 h 比较；d：$P<0.05$，与 55H 72 h 比较

## 3 讨论

初入高原，由于机体的适应性调节机制滞后，极易导致人体各项生理功能紊乱，严重者可危及生命。神经系统对氧极其敏感，视网膜是中枢神经系统的延伸，血眼屏障加剧了视网膜内层细胞的缺氧反应。缺氧直接引发细胞能量代谢障碍，糖酵解和氧化磷酸化效率降低，胞内 ATP 水平降低，引起膜功能和离子环境稳定退化，触发级联反应终致神经元死亡，阻断视觉信号传导通路[4,5]。SDH 是线粒体呼吸链的第 1 个酶，存在于有氧代谢的细胞内，与线粒体内膜紧密结合，其活性反映三羧酸循环的情况。LDH 是无氧代谢的标志酶，在视网膜内层显示高活性说明内层细胞主要依靠无氧酵解供能。本研究显示缺氧时 SDH 与 LDH 活性均显著下降，牛磺酸能显著上调其活性。由此可见，牛磺酸可通过促进有氧代谢和无氧代谢两种途径减轻缺氧所致的能量代谢失调，保证视网膜在缺氧状态的能量供给。缺氧引起细胞内线粒体通透性增加，水分进入线粒体造成线粒体肿胀和脱嵴，牛磺酸是有力的渗透压调节剂，本研究观察到牛磺酸能减轻线粒体的损伤，这就是牛磺酸能够调节代谢酶活性阻止早期的代谢紊乱的一个重要原因。Müller 细胞是视网膜中主要的胶质细胞，胞体贯穿于整个视网膜，为复杂的视觉形成提供能量[6]。Müller 细胞富含细胞质，内层细胞的能量供给主要由它承担，它是视网膜能量代谢的中心环节[7]，关键在于它丰富的突起能延伸至视网膜微血管吸取营养成分，牛磺酸促进了 Müller 细胞突起的延伸，保证了内层细胞在缺氧时的营养供给。

体内外研究显示，Müller 细胞在损伤刺激时会发生增殖[8]，这是视网膜调节自身适应性的重要机制。本研究中也观察到这种现象，牛磺酸能明显增强 Müller 细胞的这种反应性改变。牛磺酸调节 Müller 细胞功能适应性增强能在缺氧早期阻止损伤发生，有利于急性缺氧损伤的防护。近年来研究表明，在视网膜脱离-再置术的实验模型中发现了 Müller 细胞在视网膜脱离时发生了移行，移行方向是朝 ONL，当视网膜发生重构后，Müller 细胞的位置又恢复正常[9]。视网膜中的氧水平能影响星形胶质细胞在视网膜发育分化中的移动[10]。不同的是本实验观察到了部分细胞向 IPL 移行，从形态上判断这些细胞可能是 Müller 细胞，Müller 细胞中含有大量的中间纤维，具有发生大范围移动的条件，缺氧导致内层细胞损伤，Müller 细胞可通过移行加强与神经元的联系，保护神经元。牛磺酸在不同缺氧程度上的调节情况相反的现象可能是因为膳食添加 2.4% 的牛磺酸作用有限，在中度缺氧牛磺酸具有较强的即时反应，实验中表现为促进 45H 组细胞移行，而严重缺氧时，Müller 细胞本身的突起结构出现了损伤，牛磺酸并不能完全对抗细胞的这种损伤，实验中表现为 55H 与 55HT 组细胞移行均不显著。但其详细的机制需要进一步的研究。

综上所述，膳食中添加牛磺酸能在一定程度上减轻视网膜缺氧损伤，保护视觉。模拟高原缺氧的早期，牛磺酸可维持视网膜的组织形态及细胞的超微结构，其调节作用与视网膜中 Müller 细胞的形态及功能的完整性相关，牛磺酸可能通过渗透调节、促细胞增殖而起作用。

**参考文献：**


[1] WIEDMAN M, TABIN G C. High-altitude retinopathy and altitude illness[J]. Ophthalmology, 1999, 106(10): 1924 - 1927.

[2] 刘载环，糜漫天，张乾勇，等. 模拟海拔 5 000 m 高原间断性缺氧对大鼠视网膜的损伤及牛磺酸的防护作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(21)：1936 - 1939.

[3] 刘能保，王西明. 现代实用组织学与组织化学技术[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，2003：104 - 106.

[4] GARIANO R F. Cellular mechanisms in retinal vascular development [J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(3): 295 - 306.

[5] TRICK G L, BERKOWITZ B A. Retinal oxygenation response and retinopathy[J]. Prog Retin Eye Res, 2005, 24(2): 259 - 274.

[6] BRINGMANN A, SKATCHKOV S N, PANNICKE T, *et al*. Müller glial cells in anuran retina[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(5): 384 - 393.

[7] FISCHER A J, REH T A. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina[J]. Nat Neurosci, 2001, 4(3): 247 - 252.

[8] SETHI C S, LEWIS G P, FISHER S K, *et al*. Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(1): 329 - 342.

[9] FISHER S K, LEWIS G P. Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data[J]. Vision Res, 2003, 43(8): 887 - 897.

[10] ZHANG Y, PORAT R M, ALON T, *et al*. Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1999, 118(1 - 2): 135 - 145.


（编辑 薛国文）