论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0304-03

牛磺酸营养干预下缺氧大鼠视网膜中葡萄糖转运蛋白1的表达

陈 芳,糜漫天,白 雪,许红霞,陈 卡 (第三军医大学军事预防医学院营养卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察高原缺氧条件下大鼠视网膜中葡萄糖转运蛋白1(GLUT-1)的变化,探讨牛磺酸对视网膜缺氧适应的影响。**方法** 96只SD大鼠随机分为6组,对照组(C)、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),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C组、T组继续在平原饲养,45H组、45HT组和55H组、55HT组放入低压氧舱分别模拟4 500 m和5 500 m高度的高原缺氧条件。在处理0、1、2、3 d后取视网膜,提取总RNA和总蛋白,应用RT-PCR和Western blot方法检测视网膜GLUT-1 mRNA和蛋白表达。**结果** 缺氧第1天视网膜中GLUT-1 mRNA与蛋白的表达显著降低($P<0.05$)。缺氧第2天mRNA与蛋白的表达开始回升,第3天mRNA的表达恢复正常水平,蛋白的表达高于对照,牛磺酸处理后表达量均比对应的缺氧组高。**结论** 高原缺氧条件下,牛磺酸能通过上调GLUT-1的表达促进视网膜缺氧适应性调节机制的建立。

关键词:缺氧;视网膜;牛磺酸;葡萄糖转运蛋白

中图法分类号:R151.2;R322.91;R339.54 **文献标识码**:A

Expression of glucose transporter type 1 in rat retina induced by hypoxia and taurine

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

Abstract: Objective To explore the effect of taurine on glucose transporter type 1 (GLUT-1) in rat retina and investigate the protection mechanism of taurine to hypoxia. **Methods** Ninety-six adult Sprague Dawley rats were divided into 6 groups randomly. The rats in control group (C), 4 500-meter hypoxia group (45H) and 5 500-meter hypoxia group (55H) were fed with regular forage, while the rats in taurine group (T), 4 500-meter hypoxia combining with taurine group (45HT) and 5 500-meter hypoxia with taurine group (55HT) were supplemented with forage containing 2.4% taurine for one week. Then rats of 45H, 45HT, 55H, and 55HT groups were put into low-pressure chamber in which air condition at 4 500-meter and 5 500-meter altitude was simulated respectively. On day 0, 1, 2, 3 after hypoxia, retinas were taken out to extract total RNA and protein. Expression of GLUT-1 in retina was determined by RT-PCR and Western blotting. **Results** The expression of GLUT-1 mRNA and protein in retina decreased on day 1 after hypoxia, ($P<0.05$), began to rise on day 2, and mRNA returned to control level and protein expression overpassed control level on day 3. Taurine up-regulated the expression as compared with hypoxia groups. **Conclusion** Taurine will promote the adaptability adjustment of hypoxic retina through up-regulating GLUT-1 that keeps normal visual function in high-altitude hypoxia.

Key words: hypoxia; retina; taurine; GLUT-1

牛磺酸是重要的视觉保护因子,我们研究发现,牛磺酸对视网膜的缺氧损伤具有保护作用,此作用与视网膜中Müller细胞的功能有关[1,2]。进一步的研究表明,牛磺酸能提高视网膜组织中缺氧诱导因子1α(hypoxia inducible factor 1α, HIF-1α)的表达,HIF-1α是缺氧适应调节的中心环节,建立缺氧适应是应对高原缺氧的有效途径。葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter type 1, GLUT-1)是存在于Müller细胞上的葡萄糖转运蛋白,为HIF-1调控的下游基因之一,我们采用动物实验,进一步研究缺氧条件下GLUT-1的表达情况,深入了解视网膜中缺氧适应的分子机制,明确牛磺酸在视网膜中的抗缺氧机制。

基金项目:全军医学科学技术研究"十一五"计划基金重点课题(06Z028)
Supported by the Research Project 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,讲师,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:2006-03-13;**修回日期**:2006-08-20

1　材料与方法

1.1　材料

清洁级成年 Sprague Dawley(SD)大鼠 96 只，体质量(200 ± 50)g，雌雄各半，由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2　试剂及仪器

牛磺酸由北京世纪维他公司提供。Trizol RNA 抽提试剂为上海生工生物工程技术公司产品，逆转录及 PCR 试剂为 Promega 产品。兔抗 GLUT-1 抗体购自 Chemicon 公司，二抗、三抗、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。低压氧舱由第三军医大学高原军事医学系提供。

1.3　方法

1.3.1　动物分组及缺氧模型　　96 只 SD 大鼠，分为 6 组，对照组(C)、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)，每组 16 只。每组分 4 个时相点：0、1、2、3 d。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 的速度减压至模拟的高度，维持此高度至设定的时间。

1.3.2　RT-PCR　　用 Trizol 一步法提取视网膜总 RNA，逆转录为 cDNA。β-actin 为内参，按照 RT-PCR 操作方法检测 GLUT-1 mRNA 的表达。Primer 5.0 设计引物，β-actin：FP1：5′-AAGTCCCTCACCCTCCCAAAAG-3′，RP2：5′-AAGCAATGCTGT-CACCTTCCC -3′，产物长度 97 bp，退火温度 58 ℃；GLUT-1：FP1：5′- GTGTCTGCCGTGCTTATGGGTTTC -3′，RP2：5′- TCTTG-GCCCGGTTCTCCTCGTTA -3′，产物长度 364 bp，退火温度 61 ℃。引物由重庆升博生物技术公司合成。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　Western blot　　提取视网膜组织总蛋白，Lowry 法定量。制备 10% 分离胶、5% 积层胶，上样，电泳，转膜，湿转结束洗膜后以 BSA 封闭，封闭结束加入抗体反应，显色，结果以 Bio-Rad 凝胶成像分析系统扫描分析，以 β-actin 表达量为内参，其余各个时相点与之比值为 GLUT-1 的相对表达量。

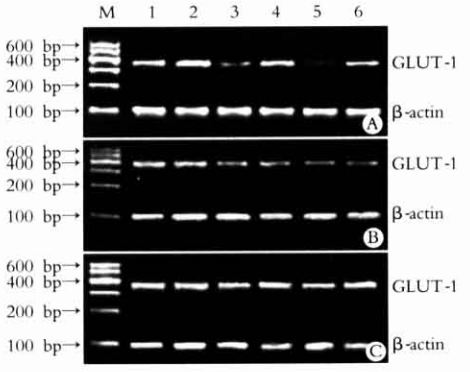
1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　RT-PCR 结果

RT-PCR 结果显示，与 C 组和 T 组相比，第 1 天缺氧下调了视网膜 GLUT-1 mRNA 的表达($P < 0.05$)，55H 组比 45H 组下降更多，经过牛磺酸干预后视网膜 GLUT-1 mRNA 的表达增强，但仍较平原条件下的低。GLUT-1 mRNA 的表达在第 2 天仍然很低，45HT 组表达高于 45H 组，55HT 组与 55H 组无明显差异($P > 0.05$)。第 3 天表达增强，45H 组和 55H 组基本恢复到正常水平，牛磺酸干预后 45HT 组和 55HT 组的表达增强，分别提高了 1.18 倍和 1.49 倍(图 1，表 1)。



A：缺氧 1 d；B：缺氧 2 d；C：缺氧 3 d；M：标准；1：C 组；2：T 组；3：45H 组；4：45HT 组；5：55H 组；6：55HT 组

图 1　缺氧大鼠视网膜 GLUT-1 mRNA 表达的变化

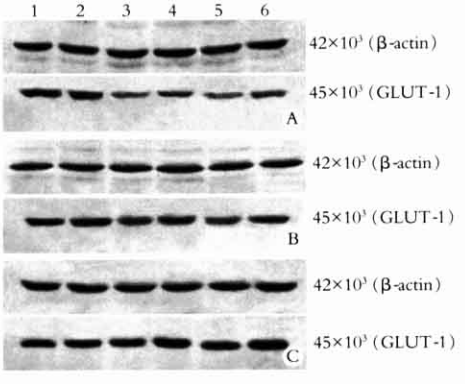
表 1　缺氧大鼠视网膜 GLUT-1 mRNA 表达的图像分析结果

组别	缺氧时间(t/d)		
	1	2	3
C	0.62 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.82 ± 0.08
T	0.80 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.88 ± 0.04
45H	0.33 ± 0.03[a]	0.49 ± 0.03[a]	0.90 ± 0.03
45HT	0.72 ± 0.02[c]	0.64 ± 0.07[bc]	1.07 ± 0.06[bc]
55H	0.25 ± 0.06[a]	0.48 ± 0.01[a]	0.73 ± 0.01
55HT	0.53 ± 0.06[bd]	0.41 ± 0.06[b]	1.10 ± 0.05[bd]

a：$P < 0.05$，与 C 组比较；b：$P < 0.05$，与 T 组比较；c：$P < 0.05$，与 45H 组比较；d：$P < 0.05$，与 55H 组比较

2.2　Western blot 结果

Western blot 结果表明，缺氧第 1 天，与 C 组和 T 组相比，45H 组和 55H 组 GLUT-1 蛋白的表达明显降低($P < 0.05$)，而 4 500 m和 5 500 m 的缺氧结果无差异。随着缺氧时间的延长，到第 2 天，45H 组与 45HT 组表达恢复至正常水平，而 55H 组仍然低于 C 组，55HT 组则与 T 组无差异。缺氧第 3 天，45HT 组、55H 组、55HT 组表达明显增强($P < 0.05$)，在 2 个海拔高度牛磺酸使 GLUT-1 的表达量分别提高了 1.25 倍和 1.07 倍(图 2，表 2)。



A：缺氧 1 d；B：缺氧 2 d；C：缺氧 3 d；1：C 组；2：T 组；3：45H 组；4：45HT 组；5：55H 组；6：55HT 组

图 2　缺氧大鼠视网膜 GLUT-1 蛋白表达的变化

表2 缺氧大鼠视网膜 GLUT-1 蛋白表达变化的图像分析结果

组别	缺氧时间(t/d)		
	1	2	3
C	0.92 ± 0.03	0.92 ± 0.02	0.90 ± 0.08
T	0.96 ± 0.01	0.94 ± 0.09	0.92 ± 0.06
45H	0.54 ± 0.06[a]	0.90 ± 0.02	0.90 ± 0.05
45HT	0.54 ± 0.04[b]	0.90 ± 0.05	1.12 ± 0.02[bc]
55H	0.53 ± 0.04[a]	0.77 ± 0.02[a]	1.09 ± 0.04
55HT	0.67 ± 0.03[bd]	0.96 ± 0.01[d]	1.17 ± 0.04[bd]

a: $P<0.05$，与 C 组比较；b: $P<0.05$，与 T 组比较；c: $P<0.05$，与 45H 组比较；d: $P<0.05$，与 55H 组比较

3 讨论

视网膜的代谢活性依赖于能源前体物质葡萄糖，葡萄糖由葡萄糖转运蛋白载入细胞进行代谢。神经组织中组织葡萄糖转运的蛋白主要是 GLUT-1 和 GLUT-3，GLUT-3 分布在神经细胞，穿越血-神经运输葡萄糖的工作主要由 GLUT-3 完成[3]。GLUT-1 存在于胶质细胞和血管内皮细胞上，有 2 种分子：45×10^3 和 55×10^3，55×10^3 蛋白主要负责将血管中的葡萄糖转运到细胞间隙，45×10^3 蛋白则在神经细胞和胶质细胞之间进行活动。新近研究报道，胶质细胞特别是星形胶质细胞是神经元功能活动的重要伴侣，它们主动参与了神经元的活动[4]。在脑缺血、缺氧和再灌注等病理条件下，星形胶质细胞功能状态决定着神经元的生存，星形胶质细胞可通过分泌一些活性物质如生长因子、细胞因子等功能蛋白增强神经元对损伤的耐受和促进受损神经元功能的恢复[5]。Müller 细胞是视网膜主要的胶质细胞，糖原染色呈强阳性，为视网膜的供能中心。Müller 细胞 GFAP 表达阳性，表达 GLUT-1。

GLUT-1 的表达受很多因素的影响。长时间的葡萄糖缺乏状态会引起 GLUT-1 mRNA 与蛋白的升高。此外，佛波酯、降糖药、钒酸盐、丁酸盐、低氧、cAMP、血清、癌基因、一些细胞因子和激素也可以增加 GLUT-1 的表达[6]。培养液中葡萄糖的浓度与 GLUT-1 蛋白质或 mRNA 的表达量呈反比关系[7]。我们研究发现正常视网膜中 45×10^3 GLUT-1 的 mRNA 和蛋白的表达均较高，在缺氧早期，GLUT-1 在 mRNA 和蛋白水平上有显著的降低，这是由于机体突然暴露在低氧环境中，各项功能表现出急性下降，随着缺氧时间延长，机体自身的调节作用开始发挥作用，在实验中观察到第 2 天 GLUT-1 在 mRNA 和蛋白的表达逐步回升至正常水平，到第 3 天甚至高于正常组中的表达，可见视网膜中的缺氧适应机制在缺氧过程中逐步得到巩固和完善。在缺氧后期缺氧为什么引起 GLUT-1 的上调呢？对于缺氧环境，细胞要产生应激，缺氧时基因激活的主要分子机制是通过 HIF-1 诱导的。缺氧时，HIF-1α 与 HIF-1β 形成的 HIF-1 转位到细胞核，反式激活作用于缺氧反应元件，使下游靶基因表达，改变组织的血管生成和代谢变化来维持氧的稳态[8]。GLUT-1 是 HIF-1 的靶基因之一[9]，因此，缺氧下 HIF-1 通过调控 GLUT-1 基因的表达调节葡萄糖在细胞间的转运。

我们前期研究发现牛磺酸不加速或延迟 HIF-1α 的表达，但增强了 HIF-1α 在 mRNA 和蛋白水平上的一过性表达，与本次实验结果结合起来分析可以看出牛磺酸是通过适应调节作用提高 GLUT-1 的表达，从而刺激机体增进葡萄糖的运载，改变由于缺氧缺血引起的葡萄糖转运障碍。反映出牛磺酸对 HIF-1 通路具有一定的调节作用。牛磺酸是视觉保护因子，对视网膜的功能调节具有多种作用，牛磺酸对组织和细胞的缺氧有保护作用，很多研究表明牛磺酸能促进神经元的存活，保护视网膜的正常功能，它能调节 HIF-1 通路引起 GLUT-1 上调促进细胞对葡萄糖的利用可能是它对抗缺氧的主要分子机制之一。

参考文献：

[1] 刘戟环，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.

[2] 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.

[3] Vannucci S J, Reinhart R, Maher F, *et al*. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1998, 107(2): 255－264.

[4] Harada C, Harada T, Quah H M, *et al*. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration[J]. Neuroscience, 2003, 122 (1): 229－235.

[5] Kawasaki A, Otori Y, Barnstable C J. Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(11): 3444－3450.

[6] Mobasheri A, Dobson H, Mason S L, *et al*. Expression of the GLUT1 and GLUT9 facilitative glucose transporters in embryonic chondroblasts and mature chondrocytes in ovine articular cartilage[J]. Cell Biol Int, 2005, 29 (4): 249－260.

[7] Rajah T T, Olson A L, Grammas P. Differential glucose uptake in retina- and brain-derived endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2001, 62 (3): 236－242.

[8] 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.

[9] Chen C H, Pore N, Behrooz A, *et al*. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia [J]. J Biol Chem, 2001, 276(12): 9519－9525.

（编辑 薛国文）