文章编号:1000-5404(2008)04-0295-04

论著

牛磺酸对糖尿病大鼠视网膜损伤的防护效应

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

摘 要:目的 应用链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)诱导建立糖尿病大鼠动物模型,观察膳食中添加牛磺酸对糖尿病大鼠视网膜损伤的影响。**方法** SD 大鼠用链脲佐菌素诱导糖尿病,分为正常对照组、糖尿病组、1% 牛磺酸干预糖尿病组、5% 牛磺酸干预糖尿病组、胰岛素治疗糖尿病组。2 个月后测定视网膜电图(electroretinograph, ERG),并应用免疫组织荧光双标化学技术检测视网膜中胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)、牛磺酸转运蛋白(taurine transporter, Taut)表达。**结果** 视网膜电图结果显示:糖尿病组视杆细胞反应 a 波、b 波、最大反应 b 波、phot-ERG b 波、OPs p4 波的潜伏期分别比正常对照组明显延长;OPs Os_1 波的幅值比正常对照组明显降低;5% 牛磺酸干预可明显缩短以上各波的潜伏期,升高 OPs Os_1 波的幅值。免疫荧光结果显示:与正常对照组相比,糖尿病组整个视网膜 GFAP 表达明显增加,其阳性表达主要出现在外核层、外网状层、内核层、内网状层,视网膜中 Taut 的表达明显减少,只在外界膜、外核层和外网状层有少量表达;1% 牛磺酸和 5% 牛磺酸干预可降低糖尿病大鼠视网膜中 GFAP 的表达,增加视网膜中 Taut 的表达,呈剂量效应关系。**结论** 膳食喂饲牛磺酸对糖尿病引起的视网膜损伤有一定的保护作用,其保护作用可能与降低视网膜中 GFAP 表达、增加 Taut 表达有关。

关键词:牛磺酸;糖尿病;视网膜
中图法分类号:R587.1;R774.1;R977.2 **文献标识码**:A

Protective effects of taurine against retinal damage in diabetic rats

ZENG Kai-hong, XU Hong-xia, ZHANG Ya-jie, MI Man-tian, CHEN Fang (Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of taurine against the retinal damage in diabetic rats. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into 5 groups with 12 rats in each group: normal control group (NC), diabetes mellitus group (DM), 1% taurine intervention plus diabetes mellitus group (DM+1% T), 5% taurine intervention plus diabetes mellitus group (DM+5% T), insulin treatment plus diabetes mellitus group (DM+I). Streptozotocin was used to induce diabetes in rats. Simultaneously, taurine was added into forage at 1% or 5% as taurine intervention and insulin (20 U/kg) was subcutaneously injected as insulin treatment. Two months after induction of DM, the retinal function was detected by electroretinograph (ERG); the glial fibrillary acid protein (GFAP) and taurine transporter expression in the rat retina were determined by immunohistofluorescence. **Results** The implicit time of a and b wave of rod-response, b wave of max-response, p4 wave of OPs and b wave of phot-ERG of diabetic rats was respectively prolonged significantly as compared to that of control rats. The Os1 amplitude of OPs was significantly decreased in diabetic rats. The GFAP expression in inner nuclear layer, outer nuclear layer, inner plexiform layer and outer plexiform layer increased 2 months after induction of DM. The taurine transporter expression in retina decreased 2 months after induction of DM. Taurine up-regulated GFAP expression and down-regulated taurine transporter expression in retinal cells. **Conclusion** Dietary supplementation with taurine protects retina from diabetic damage.

Key words: taurine; diabetes; retina

基金项目:国家自然科学基金(30571570)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571570)

作者简介:曾凯宏,女,新疆维吾尔自治区昌吉回族自治州人,博士研究生,检验师,主要从事营养与视功能方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)68752291,E-mail:zkh999@yahoo.com.cn
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail:mimt@sina.com

收稿日期:2007-05-14;**修回日期**:2007-07-24

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的严重并发症之一,是造成视功能损害或完全失明的主要原因。多年来对其发病机制的研究主要集中在视网膜毛细血管微循环的改变上,认为是血管的改变引起了视网膜神经细胞的改变及视觉的丧失[1]。新近研究发现,在视网膜发生微血管病变以前,起源于神经视网膜内层的振荡电位振幅下降,潜伏期延长,其异常早于血-视网膜屏障通透性异常[2]。胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)是胶质细胞的标志蛋白,正常情况下只在视网膜星形胶质细胞中表达,在 Müller 细胞中不表达。GFAP 在 Müller 细胞中的表达可作为早期视网膜细胞受损的标志[3]。牛磺酸(taurine)是一种 β-丙氨酸,经口摄入有 90% 被机体吸收,并很快出现在血液中,其中大部分被分配到脑、视网膜、心脏等部位。视网膜富集牛磺酸的过程要通过血-视网膜屏障。牛磺酸脂溶性差,通过细胞膜的速度较慢,但其在视网膜细胞内外的浓度差可达 400∶1,这是由于视网膜细胞上存在大量牛磺酸转运蛋白(taurine transporter, Taut),所以牛磺酸能很快进入视网膜细胞,发挥作用[4]。

本研究采用链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)诱导建立糖尿病大鼠动物模型,观察牛磺酸对糖尿病视网膜损伤的防护效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级成年 SD 大鼠 60 只,体质量(200 ± 50)g,雄性,购于本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.2 试剂及仪器

牛磺酸纯品购于北京世纪维他生物技术有限公司,STZ 购于 Sigma 公司,抗 Taut 一抗购于 Abi 公司,抗 GFAP 一抗购于 Sigma 公司,荧光二抗罗丹明、FITC 购于北京中杉生物技术有限公司,北京怡成血糖仪及其专用一次性血糖试纸,一次性尿糖试纸购于广州市越秀东方新科技研究所,RETI-port 视觉电生理系统(Roland Consult ,德国)由第三军医大学西南医院全军眼科中心提供,激光共聚焦扫描电镜由第三军医大学西南医院中心实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 糖尿病大鼠模型的建立及实验分组 实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水,用 STZ 诱导糖尿病,临用前用 0.1 mol/L (pH 4.2)的柠檬酸缓冲液配制成 2% 的 STZ 溶液,按 60 mg/kg 一次性左下腹腔注射 STZ,注射后 72 h 检测定性尿糖和血糖,用尿糖试纸测尿糖达(+++)以上,尾静脉采血测血糖浓度大于 16.7 mmol/L 即为模型建立成功。

将造模成功的糖尿病大鼠采用配对设计随机分成 5 组:正常对照组(NC)、糖尿病组(DM)、1% 牛磺酸干预糖尿病组(DM +1% T)、5% 牛磺酸干预糖尿病组(DM +5% T)、胰岛素治疗糖尿病组(DM +I),每组 12 只。大鼠单笼喂养,正常对照组和胰岛素治疗组饲以标准颗粒饲料(购自本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心),牛磺酸干预组饲以标准颗粒饲料添加 1% 及 5% 牛磺酸的饲料。胰岛素治疗组采用 20 U/kg,每天皮下注射。自由进食饮水,勤换垫料,采用 12 h 光照/12 h 黑暗循环光照条件喂养。于造模后 2 个月取材检测。

1.3.2 视网膜功能测定 对造模成功 2 个月后的各组大鼠进行视网膜电图(electroretinograph, ERG)测定。暗适应 3 h 以上的大鼠,腹腔速眠新 0.8 ml/kg 注射液麻醉,将麻醉状态的大鼠固定于有机玻璃实验台上,左眼滴 5 g/L的托品酰胺散瞳,尾部、左侧颊部和左眼角膜表面分别安放接地电极、参考电极和记录电极,并在角膜表面滴 10 g/L 的甲基纤维素(保证角膜和电极充分接触)。参考电极和接地电极由不锈钢针制成,记录电极为 0.2 mm 银-氯化银制成的环形电极。采用 RETI-port 视觉电生理系统进行视杆细胞反应(rod-response)、最大反应(max-response)、振荡电位(oscillatory potentials, OPs)、明适应视网膜电图(photopic electroretinograph, phot-ERG)和 20 Hz 闪烁反应(20 Hz-flicker response)记录。杆细胞反应光强为 0.011 cd · s^{-1} · m^{-2},phot-ERG、OPs 和 20 Hz 闪烁反应光强为 3.5 cd · s^{-1} · m^{-2}。记录 ERG 的通频带为 1 ~ 300 Hz,OPs 为 100 ~ 300 Hz。phot-ERG 和 20 Hz 闪烁反应之前进行 10 min 的明适应(明适应光强 37 cd · s^{-1} · m^{-2})。观察 ERG a 波、b 波、OPs 波和 20 Hz 闪烁反应 P_1 波潜伏期和幅值的变化。

1.3.3 免疫组织荧光双标染色 冰冻切片经 PBS 缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.2 ~ 7.4)漂洗 5 min × 3 次,用含 1% BSA、0.5% TritonX-100 的 PBS 缓冲液孵育 30 min,同前漂洗后,用含 5% ~ 10% 正常羊血清的 PBS 缓冲液孵育 10 min,加1∶2 000 稀释的 Anti-Taut, 4 ℃过夜,PBS 漂洗后与罗丹明标记的山羊抗兔荧光二抗 37 ℃孵育 30 min,PBS 缓冲液漂洗 5 min × 3 次,再加 1∶1 000 稀释的 Anti-GFAP,37 ℃孵育 2 h,PBS 漂洗后与 FITC 标记的山羊抗小鼠荧光二抗 37 ℃孵育 30 min,90% 甘油封片(PBS 配),激光共聚焦扫描电镜观察并照相。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况及体质量、血糖变化情况

正常对照组大鼠每日饮水量、尿量正常,毛色光滑、柔顺,体质量随周龄增加而明显增加;糖尿病组大鼠每日饮水量、尿量明显多于正常对照组,毛色灰暗,且体质量不随周龄的增加而增加。牛磺酸干预和胰岛素治疗对糖尿病大鼠一般情况有明显的改善作用,但牛磺酸干预组大鼠体质量随周龄增加不明显,胰岛素治疗组大鼠体质量随周龄增加情况接近正常组;正常对照组、胰岛素治疗组大鼠血糖处于正常范围 2.8 ~ 7.5 mmol/L[5]。糖尿病组大鼠血糖值始终处于模型要求的标准之内,牛碘酸干预对血糖影响不大。见表 1。

表 1　牛磺酸对患糖尿病 2 个月大鼠体质量、血糖的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	体质量（g）	血糖（mmol/L）
NC	12	458 ± 25	4.3 ± 0.2
DM	10	204 ± 24	24.4 ± 0.3
DM + 1% T	10	244 ± 26	21.4 ± 0.3
DM + 5% T	11	287 ± 31	20.3 ± 0.4
DM + I	12	426 ± 28	6.8 ± 0.2

2.2　视网膜功能测定

糖尿病组视杆细胞反应 a 波、b 波、最大反应 b 波、phot-ERG b 波、OPs p4 波的潜伏期分别与正常对照组相比，明显延长（$P < 0.01$，表 2），OPs Os_1 波的幅值与正常对照组相比，明显降低。视杆细胞反应 a 波和 b 波的幅值、最大反应 a 波的潜伏期及幅值和 b 波的幅值、OPs Os_1 波的潜伏期、phot-ERG a 波的潜伏期及幅值和 b 波幅值、20 Hz 闪烁反应 p1 波的潜伏期及幅值分别与对照组相比，均无明显差异（$P > 0.05$）。1% 牛磺酸干预对糖尿病大鼠各波的潜伏期无明显改善作用，但可增加 OPs Os_1 波的幅值；5% 牛磺酸干预和胰岛素治疗可明显缩短视杆细胞反应 a 波、b 波、最大反应 b 波、phot-ERG b 波、OPs p4 波的潜伏期，5% 牛磺酸干预明显增加 OPs Os_1 波的幅值（$P < 0.01$），胰岛素治疗也可增加 OPs Os_1 波的幅值，但效果不显著（表 2）。

2.3　视网膜中 GFAP、Taut 的表达

免疫组织荧光化学染色结果显示：正常大鼠视网膜 GFAP 免疫反应主要出现在节细胞层（GCL）、神经纤维层（NEL）和色素上皮细胞层（PEL），呈明显的纤维丝状走向，在节细胞处包绕细胞体，呈圆形或椭圆形。糖尿病 2 个月时，整个视网膜 GFAP 表达明显增加，其阳性表达主要出现在内核层、外核层、内网状层和外网状层。1% 牛磺酸和 5% 牛磺酸干预均可降低糖尿病大鼠视网膜中 GFAP 的表达，其中内核层及外核层 GFAP 表达明显低于糖尿病组，胰岛素治疗也可降低整个视网膜中 GFAP 的表达，主要降低内网状层、外网状层和神经纤维层 GFAP 的表达，对内核层和外核层的影响效果并不显著。

表 2　各组大鼠视网膜电图结果（$\bar{x} \pm s$）

组别	暗视 ERG a 波潜时（ms）	暗视 ERG b 波潜时（ms）	最大反应 b 波潜时（ms）	闪烁 ERG b 波潜时（ms）	振荡电位 Os_1 波振幅（μV）	振荡电位 p4 波潜时（ms）
NC	26.0 ± 4.2	70.0 ± 4.2	45.0 ± 2.8	39.0 ± 3.2	13.1 ± 1.0	43.0 ± 2.6
DM	37.0 ± 3.7[a]	90.0 ± 3.5[a]	61.0 ± 2.6[a]	45.0 ± 2.4[a]	7.6 ± 3.1[a]	64.0 ± 2.4[a]
DM + 1% T	38.0 ± 2.5[a]	89.0 ± 3.4[a]	61.0 ± 3.5[a]	45.0 ± 2.8[a]	10.8 ± 1.0	62.0 ± 1.9[a]
DM + 5% T	27.0 ± 4.4[b]	72.0 ± 4.2[b]	50.0 ± 4.5[b]	39.0 ± 3.4[b]	12.3 ± 1.0[b]	46.0 ± 2.7[b]
DM + I	26.0 ± 3.6[b]	65.0 ± 3.7[b]	47.0 ± 3.7[b]	40.0 ± 2.9[b]	8.4 ± 1.7[a]	45.0 ± 3.5[b]

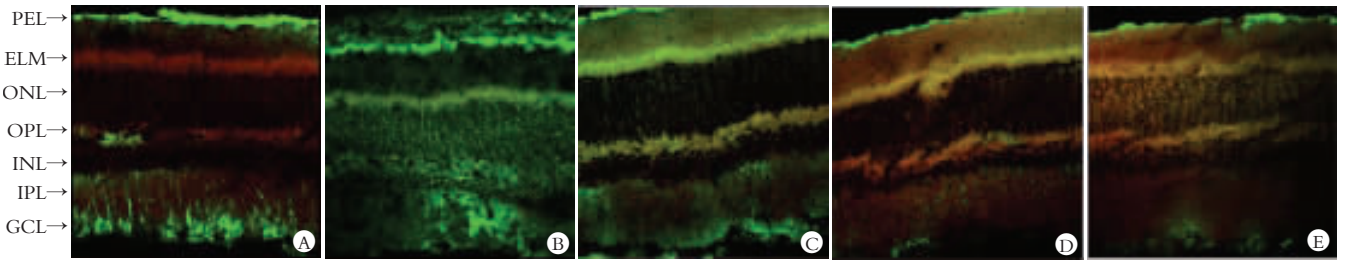
a：$P < 0.01$，与 NC 组比较；b：$P < 0.01$，与 DM 组比较

正常大鼠视网膜 Taut 在视网膜各层均有阳性表达。主要在外界膜、内网状层和外网状层表达，糖尿病 2 个月时，视网膜中 Taut 表达明显减少，只在外界膜、外核层和外网状层有少量表达，1% 牛磺酸和 5% 牛磺酸干预可明显增加 2 个月糖尿病视网膜中 Taut 的表达，呈剂量效应关系。胰岛素治疗也可明显增加视网膜中 Taut 的表达（图 1）。

3　讨论

3.1　糖尿病早期视网膜功能的改变

近年来研究表明，糖尿病除了引起血管病变外，还引起神经元和神经胶质的损伤，并且神经元和神经胶质的改变可能发生在临床可见的血管病变之前。研究显示，患糖尿病早期会发生视网膜电生理特性的改变和神经变性。在对糖尿病大鼠的研究中发现，患糖尿病 1 个月即发生了视网膜生理和生化的改变[6]。视觉电生理检查是反映视网膜各个层次细胞功能状态的客观检查。本实验中，我们观察到糖尿病大鼠在早期阶段出现了视觉电生理功能的改变，表现为 EGR 的潜伏期比对照组明显延长，充分提示糖尿病早期即出现了视网膜功能的损害。另外，在糖尿病早期会发生视网膜 Müller 细胞从休眠状态到活性状态的改变，这常伴随着 GFAP 表型和表达水平的改变。正常情况下，GFAP 只在星形胶质细胞中表达，在 Müller 细胞中不表达或少表达，Müller 细胞在压力、热、机械损伤、光照等情况下，其中 GFAP 表达上调[7,8]。Barber 等[9]用 STZ 诱导糖尿病大鼠时发现，糖尿病大鼠在病程 1 个月时，视网膜中的 GFAP 表达无明显变化；2 个月时，大多数大鼠星形胶质细胞中 GFAP 表达下降，只有少数 Müller 细胞中 GFAP 表达增加；4 个月后，几乎所有的大鼠 Müller 细胞中 GFAP 表达上调，星形胶质细胞中几乎未见 GFAP 表达。Li 等[10]在 STZ 诱导的 DR 大鼠 5 ~ 6 周可发现 Müller 细胞中 GFAP 表达上升[3]。本研究中，患糖尿病 2 个月大鼠视网膜中 GFAP 表达明显增加。正常大鼠视网膜中 GFAP 主要在节细胞、神经纤维层等星形胶质细胞分布区域表达，患糖尿病



A：NC 组；B：DM 组；C：MD + 1% T 组；D：MD + 5% T 组；E：DM + I 组　　GFAP（绿色）；Taut（红色）；GFAP + Taut 信号（黄色）；
PEL：色素上皮细胞层；ELM：外界膜；ONL：外核层；OPL：外网状层；INL：内核层；IPL：内网状层；GCL：节细胞层

图 1　各组大鼠视网膜 GFAP、Taut 免疫荧光双标检测结果　（×600）

2 个月时主要在内界膜到外界膜之间的 Müller 细胞分布区域表达,这些结果提示,在实验性 DR 大鼠早期,GFAP 在星形胶质细胞和 Müller 细胞中的表达量和分布发生了改变。

3.2 牛磺酸对糖尿病视网膜病变的防护效应

牛磺酸是视网膜组织中含量较高的一种游离氨基酸。以往的研究表明,牛磺酸对视网膜具有多种复杂的生物学效应。与视网膜神经组织的发育、分化、正常结构、功能的维持、移植后的再生及一些视网膜疾病的发病机制都有密切的联系[11]。因牛磺酸分子中有磺酸基,故牛磺酸不能合成蛋白质而在体内呈游离状态,且大部分分布在细胞内,细胞内含量高出细胞外数十至数千倍,这是因为牛磺酸通过细胞膜上的 Taut 转运入细胞内所致。某些疾病发生时牛磺酸跨膜转运发生异常,机体发生一系列病理生理学改变。许多因素可影响牛磺酸的转运,如高浓度葡萄糖、酒精、PMA、内皮素、白细胞介素 1、肿瘤坏死因子等 可使 Taut 转运活性降低,而使牛磺酸摄入细胞内减少;细胞外高渗、红细胞生成素、cAMP 等可上调 Taut 的活性,使牛磺酸摄入细胞内增加;NO 等可使细胞内牛磺酸释放增加[12]。本研究表明,患糖尿病 2 个月时,视网膜中 Taut 的表达明显减少,只在外界膜、外核层和外网状层有少量表达,从而使摄入细胞内的牛磺酸减少。牛磺酸干预可明显改善视网膜电图各波潜伏期,降低视网膜中 GFAP 的表达,增加 Taut 的表达,说明牛磺酸干预对糖尿病早期视网膜损伤有明显的防护效应。牛磺酸对糖尿病视网膜损伤的防护效应与调节 Müller 细胞功能有关,而胰岛素主要是通过维持稳定的血糖水平来调节视网膜功能。

参考文献:

[1] Frank R N. Diabetic retinopathy [J]. N Engl J Med, 2004, 350(1): 48 - 58.

[2] Fortune B, Schneck M E, Adams A J. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(11): 2638 - 2651.

[3] Lewis G P, Fisher S K. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression[J]. Int Rev Cytol, 2003, 230: 263 - 290.

[4] Hillenkamp J, Hussain A A, Jackson T L, *et al*. Compartmental analysis of taurine transport to the outer retina in the bovine eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(11): 4099 - 4105.

[5] 陈主初, 吴端生. 实验动物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 267.

[6] Ewing F M, Deary I J, Strachan M W, *et al*. Seeing beyond retinopathy in diabetes: electrophysiological and psychophysical abnormalities and alterations in vision[J]. Endocr Rev, 1998, 19(4): 462 - 476.

[7] Layton C J, Chidlow G, Casson R J, *et al*. Monocarboxylate transporter expression remains unchanged during the development of diabetic retinal neuropathy in the rat[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(8): 2878 - 2885.

[8] 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 GTAP 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(11): 1078 - 1082.

[9] Barber A J. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2): 283 - 290.

[10] Li Q, Puro D G. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(9): 3109 - 3116.

[11] Sakurai T, Miki T, Li H P, *et al*. Colocalization of taurine and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in mouse hippocampus induced by short-term ethanol exposure[J]. Brain Res, 2003, 959(1): 160 - 164.

[12] 张亚洁, 许红霞, 曾凯宏, 等. 牛磺酸对糖尿病大鼠视网膜müller 细胞凋亡的防护研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1193 - 1196.

(编辑 吴培红)

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31 - 1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000 - 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各 1 份,照片提供 3 份。电子投稿 E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038) **电话:**(023)68752782