论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2176-04

# 牛磺酸对急性低氧大鼠视网膜内网状层损伤的防护效应

陈 卡,糜漫天,陈 芳,许红霞,曾凯宏,张亚洁 (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** 观察牛磺酸(Taurine,Tau)对模拟急性低氧(hypobaric hypoxia,H)条件下大鼠视网膜内网状层(inner plexiform layer,IPL)形态结构及功能的影响。**方法** 64只SD大鼠随机分为标准饲料组和牛磺酸干预组(2.4 g/100 g)。营养干预14 d后进行连续1、3 d或7 d模拟5 000 m低氧处理,同时分别设立常氧对照即标准饲料正常对照组和牛磺酸干预正常对照组。低氧处理后立即测定视网膜振荡电位(oscillatory potentials,OPs),观察内网状层超微结构,并结合免疫荧光染色法测定突触蛋白(synapsin,SYS)平均光密度。**结果** 低氧1、3 d两组大鼠OPs波较正常对照潜伏时间长、幅值低,低氧7 d接近正常,其中牛磺酸干预组低氧处理后其$OS_2$幅值均高于标准饲料组($P<0.05$),$OS_2$潜伏时间在低氧3 d时较标准饲料组低氧3 d时短($P<0.05$)。超微结构显示急性低氧后标准饲料组IPL轴突内线粒体肿胀、空化,树突终末微管溶解,突触稀少,突触带弯曲、短小,突触囊泡缺失;牛硫酸干预组突触结构清晰,突触囊泡较多。免疫组织荧光化学染色显示各组大鼠IPL内均见SYS阳性表达,急性低氧1、3 d视网膜SYS平均光密度值低于对照($P<0.05$),其中牛磺酸低氧1 d组SYS表达较低氧1 d组强($P<0.05$)。**结论** 牛磺酸对急性低氧大鼠视网膜内网状层结构和功能具有一定的保护效应。

**关键词:** 牛磺酸; 急性低氧; 视网膜; 内网状层

**中图法分类号:** R151.41; R364.4; R774.101 **文献标识码:** A

# Protective effects of taurine on inner plexiform layer of retina in rats exposed to hypobaric hypoxia

CHEN Ka, MI Man-tian, CHEN Fang, XU Hong-xia, ZENG Kai-hong, ZHANG Ya-jie (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 on the structure and function of retinal inner plexiform layer (IPL) of rats exposed to hypobaric hypoxia. **Methods** Sixty-four rats were randomly divided into 2 groups: normal diet group (N), taurine supplemented group (T). Rats from normal diet group were fed with normal chew for 14 d, and then further divided into 4 subgroups, normoxia control (NC), and the groups (NH) who were placed into low pressure chamber to imitating 5 000 m high altitude for 1, 3 or 7 d respectively. Rats fed with 2.4% taurine supplemented chew for 14 d were divided into 4 subgroups, that is, TC groups, and those in hypobaric hypoxia for 1, 3 or 7 d respectively (TH groups). After the hypoxia treatment, IPL function was evaluated by testing oscillatory potentials (OPs) with RETI port system, by observing ultrastructure of IPL with transmission electron microscope, and by determining the average density of synapsin with immunohistofluorescence method. **Results** Prolonged latency and lower amplitude in OPs were found in rats exposed to 1 or 3 days' hypobaric hypoxia of both NH and TH groups, but for those rats having 7 days' exposure, the latency of their OPs reduced to relative normal value, but the amplitude was significantly lower in comparison to NC and TC groups ($P<0.05$). There were significant difference in the latency of $OS_2$ wave between the NH rats and TH rats after 3 days' exposure ($P<0.05$), and the $OS_2$ amplitude in TH groups were significantly higher than those in NH groups ($P<0.05$). IPL of rats in NH groups showed swelling and swollen mitochondria

**基金项目:** 全军医学科研"十一五"计划专项课题(06Z028);重庆市营养与食品安全重点实验室开放课题(2007);第三军医大学科研创新基金(2007XG19)
Supported by the Special Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06Z028), the Opening Program of Key Laboratory of Nutrition and Food Safety of Chongqing (2007), and the Foundation of the Innovative Scientific Research of Third Military Medical University (2007XG19)

**作者简介:** 陈 卡,女,四川省邻水县人,博士研究生,助教,主要从事营养与视功能方面的研究。电话:(023)66828787,E-mail:chen_ka@sina.com

**通信作者:** 糜漫天,电话:(023)68752292

**收稿日期:** 2008-06-02;**修回日期:** 2008-06-25

in axon, disintegrated dendritic microtube, scarce synapses with depleted vesicle, while TH group displayed distinct synapses with abundant vesicles. Synapsin was mainly distributed in IPL of every group. Compared with NC group, the density of synapsin decreased in rats exposed to hypoxia for 1 or 3 d in both groups ($P<0.05$). But in TH 1 d group, the synapsin density was significantly higher than the NH 1 d group ($P<0.05$). **Conclusion** Taurine ameliorates the retinal IPL damage of rats suffering from acute hypobaric hypoxia.

**Key words**: taurine; hypobaric hypoxia; retina; inner plexiform layer

视网膜是对氧高度敏感的神经组织,未经习服者进入低压缺氧(hypobaric hypoxia,HBH)环境如高原(海拔高于 3 000 m)地区等则会出现暗适应时间延长、视力下降、色觉减退等视功能障碍,严重者出现眼底病改变甚至失明[1]。针对上述视功能障碍,以往研究多将其归结于视网膜内动静脉代偿性扩张,而对视觉信息传递主体——视网膜神经元变化的报道较少。本实验室以往研究发现光镜下急性低氧大鼠视网膜内网状层(inner plexiform layer,IPL)肿胀[2],而 IPL 主要由视网膜内核层神经元如双极细胞的轴突、无长突细胞的突起及节细胞的树突组成,分布有大量的突触,是视觉信号传导的主要通道和枢纽。目前国内外对 IPL 形态结构及功能改变尚少见具体报道。牛磺酸广泛存在于视网膜,是一类小分子 β 巯基氨基酸,其不仅作为神经递质直接参与视觉信号传递,还参与调节视网膜渗透压,同时还发现牛磺酸在多种应激条件下通过抗氧化、抗凋亡等发挥保护视网膜结构及功能的作用。本实验室早期研究证实 2.4% 牛磺酸能有效减弱急性低氧对视网膜的损害[2]。本研究拟在弄清急性低氧大鼠视网膜内网状层突触改变的基础上,进一步观察牛磺酸补充剂对视网膜的防护效应。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物及实验设计

清洁级成年动物 Sprague-Dawley 大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)64 只,体质量(210 ± 20) g,雌雄各半。将大鼠随机分为 2 组,分别喂饲标准饲料(N 组)或添加 2.4% 牛磺酸[2](2.4 g/100 g,北京世纪维他生物技术公司)的饲料(T 组)14 d。大鼠在 12 h 明/12 h 暗循环光照条件喂养,自由进食饮水。各组大鼠营养干预后,参照文献[2]方法,将大鼠置于低压舱(第三军医大学高原军事医学系提供),模拟海拔 5 000 m 高度(大气压 406 mmHg,氧分压 85 mmHg)连续减压 1、3 d 或 7 d(每个时相点 8 只大鼠),同时分别设立常氧对照即标准饲料正常对照组和牛磺酸干预正常对照组($n=8$)。低氧期间每天开舱 30 min 补充水和饲料。各组动物低氧处理完毕,从低压氧舱取出后立即做相关检测。

### 1.2　视网膜振荡电位测定

采用 RETI-port 视觉生理系统(Roland consult,德国;第三军医大学西南医院全军眼科中心提供)记录振荡电位(oscillatory potentials,OPs)。大鼠暗适应 30 min 后,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,双眼滴加托吡肼胺(5 g/L)散瞳以及甲基纤维素(10 g/L)角膜表面麻醉。将麻醉状态大鼠固定于有机玻璃实验台,并在记录眼角膜表面、同侧颊部及尾部安放记录电极、参考电极和接地电极。OPs 记录采用单次闪光刺激,频率 0.1 Hz,通频带 100 ~ 300 Hz,叠加 3 次。分析 OPs 中各项指标的变化情况。

### 1.3　视网膜内网状层超微结构观察

大鼠乙醚麻醉后迅速摘除眼球,沿角膜缘去除眼前节组织及玻璃体,将视杯置于 4 ℃预冷 3% 戊二醛固定过夜,1% 锇酸固定,系列丙酮脱水,环氧树脂浸透包埋,光镜定位后行超薄切片,透射电镜(第三军医大学中心实验室提供)观察视网膜内网状层超微结构变化。IPL 主要由轴突末梢、树突和神经胶质细胞的突起组成。轴突以含线粒体、突触小泡等作为辨认标志。树突在切片上可见纵切、横切和斜切的各种断面,其粗细长短各不相同。树突内平行排列的微管,可作为与轴突鉴别的依据。

### 1.4　视网膜突触蛋白(synapsin,SYS)免疫组织荧光化学染色

大鼠乙醚麻醉后迅速摘除眼球,去除眼球外周结缔组织,置于 4 ℃预冷的新鲜配置 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PB,pH 7.4)中后固定 2 h,去除眼前节组织及玻璃体后,0.01 mol/L PBS 漂洗眼球 1 h,5%、10%、20% 梯度蔗糖脱水各 2 h,30% 蔗糖脱水过夜,OCT 包埋,矢状纵切 10 μm 厚度的组织冰冻切片。冰冻切片经 0.01 mol/L PB/0.3% Triton X-100 室温漂洗15 min × 2 次后,5% BSA 室温封闭 30 min,加 1∶25 稀释的兔抗大鼠 anti-Synapsin(CST,#2312)4 ℃孵育过夜,PBS 缓冲液漂洗 10 min × 3 次后,加 1∶50 稀释的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 于 37 ℃湿盒孵育 1 h,PBS 缓冲液漂洗 5 min 后,再加 DAPI 室温孵育 10 min,PBS 缓冲液漂洗 10 min × 3 次,80% 缓冲甘油封片,激光共聚焦显微镜观察并照相。每张切片沿视神经轴对称选取 5 点,采用 Quality One 图像分析软件测定 SYS 光密度,并计算其平均光密度。

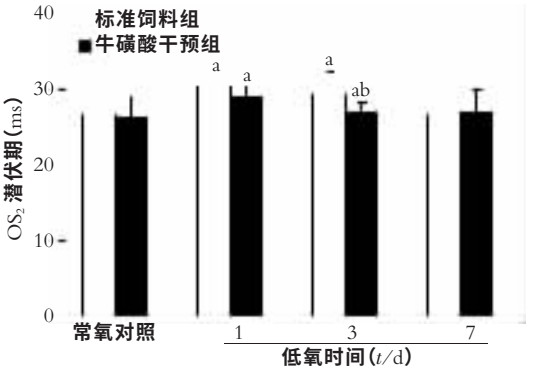
### 1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

## 2　结果

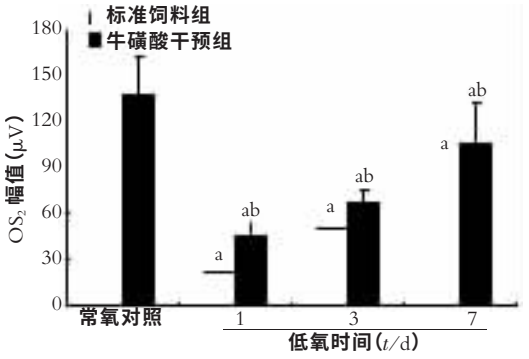
### 2.1　视网膜 OPs 结果

低氧处理后,两组大鼠 OPs 波变化趋势相似,即低氧 1、3 d OPs 波潜伏时间延长,幅值降低,随着低氧适应的建立,低氧7 d OPs 波接近正常。牛磺酸干预组低氧处理后其 $OS_2$ 波改变与标准饲料组相比有显著差异,其中 $OS_2$ 潜伏时间在低氧 3 d 时较短($P<0.05$)(图 1),$OS_2$ 幅值均高于标准饲料组($P<0.05$)(图 2)。




a:$P<0.05$,与常氧对照比较;b: $P<0.05$,与标准饲料组比较

**图1 牛磺酸对低氧处理大鼠视网膜 $OS_2$ 潜伏期的影响**




a:$P<0.05$,与常氧对照比较;b: $P<0.05$,与标准饲料组比较

**图2 牛磺酸对低氧处理大鼠视网膜 $OS_2$ 幅值的影响**

### 2.2 视网膜内网状层超微结构观察

正常组内网状层神经终末空泡少,突触复合体数量多,突触小泡丰富。急性低氧1、3 d后,标准饲料组内网状层轴突内线粒体肿胀、空化,树突终末微管溶解,突触稀少,突触小泡稀少;牛磺酸干预组网状层树突轴突也见肿胀,但突触复合体结构清晰,突触小泡较多、排列整齐(图3)。随着急性低氧时间延长,内网状层线粒体肿胀程度减轻,标准饲料组和牛磺酸干预组内均可见大量的突触小泡。

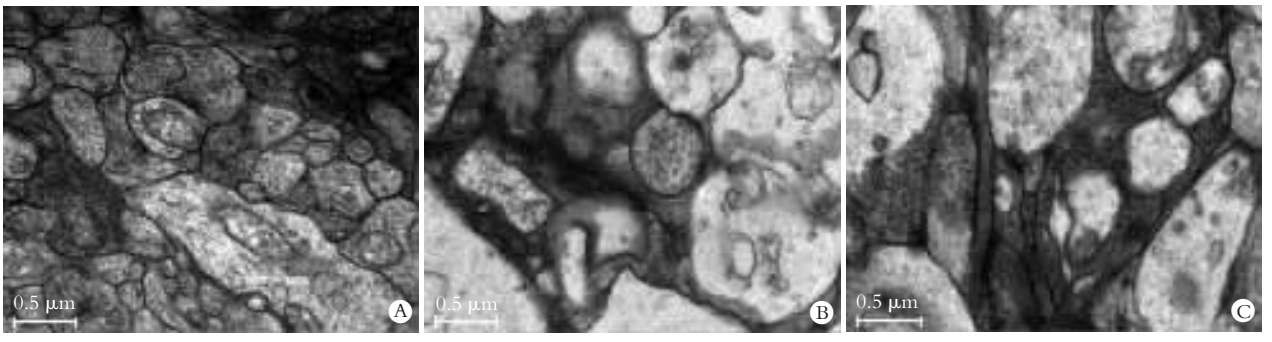
### 2.3 视网膜突触蛋白表达情况

免疫组织荧光化学染色显示SYS呈层状、颗粒状及点状绿色荧光标记,主要位于视网膜IPL层,而视网膜其他各层少见阳性表达(图4);DAPI标记视网膜各层神经元细胞核,呈蓝色荧光。各组大鼠视网膜层次结构清晰,IPL内均见SYS阳性表达,在急性低氧早期(1、3 d)SYS平均光密度值低于对照($P<0.05$),而到低氧后期(7 d)与对照无差异。其中牛磺酸干预低氧1 d组SYS表达较标准饲料低氧1 d组强($P<0.05$),且在接近神经节细胞层可见层状分布的SYS表达。

## 3 讨论

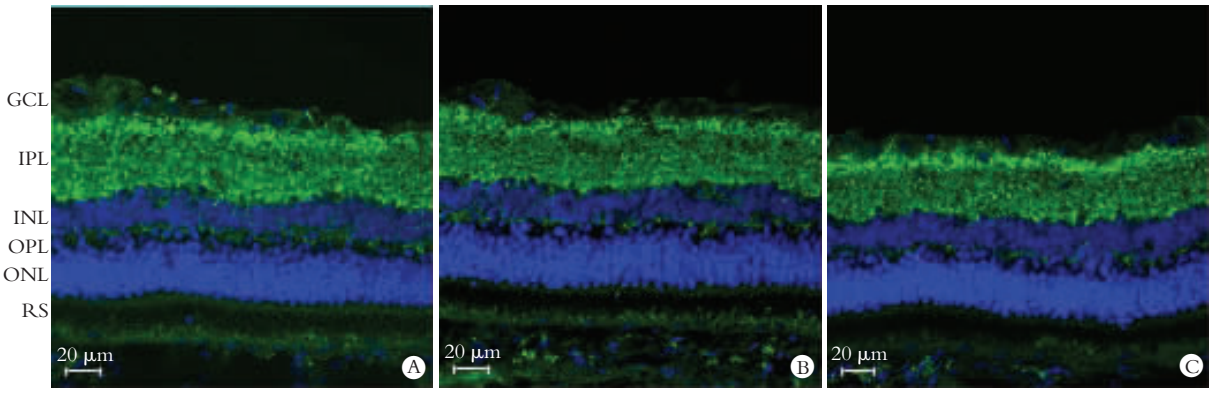
### 3.1 急性低氧对视网膜内网层功能结构的损伤

视网膜电图是评价视网膜功能变化的早期指标,它代表了光感受器到无长突细胞的视网膜各层的综合电活动[3],其中OPs是b波波峰上的有节律的一系列振荡波,传统观点认为其依赖于视网膜内层血液循环,




A:标准饲料正常对照组;B:标准饲料低氧1 d组;C:牛磺酸干预低氧1 d组

**图3 各组大鼠视网膜内网状层超微结构观察**




A:标准饲料正常对照组;B:标准饲料低氧1 d组;C:牛磺酸干预低氧1 d组

GCL:神经节细胞层;IPL:内网状层;INL:内核层;OPL:外网状层;ONL:外核层;RS:外节段

**图4 各组大鼠视网膜突触蛋白免疫荧光双标检测结果**

而近年来,大量研究证实 OPs 还能反映内层神经元其是 IPL 电活动[3,4]。振荡电位由一系列子波 $OP_1$、$OP_2$、$OP_3$、$OP_4$等组成,有些学者认为各子波起源于视网膜的不同层次,但尚未证实。本研究发现低氧 1、3 d 后各子波均出现幅值显著下降、潜伏时间延长,与以往研究急性低氧导致视网膜血流异常吻合,同时也提示视网膜内层神经元及 IPL 功能损害,与视网膜主要病理改变 IPL 肿胀相符合;低氧 7 d 后观察到 $OP_2$ 潜伏时间与正常对照无显著差异,幅值也明显高于低氧早期,可能与机体发生一系列代偿适应性变化改善氧运输有关,但 $OP_2$ 幅值仍然低于正常对照,提示 IPL 结构的破坏。

正常大鼠视网膜神经元间具有复杂的纵向横向突触联系,视网膜主要分布在内、外网状层,是视觉信息传递的关键区域,该区域突触数量和结构变化可影响视觉功能[5,6]。IPL 主要由视网膜内核层神经元如双极细胞的轴突、无长突细胞的突起及节细胞的树突组成,本研究发现急性低氧视网膜 IPL 超微结构发生了较大变化,如内质网、线粒体肿胀,尤其在低氧早期多见空泡状线粒体,说明线粒体功能严重受损,而常膨大成突触小体的树突终末内代谢活跃,线粒体功能受损则会直接影响递质合成及释放,干扰视觉信息传递,甚至会累及整个神经元;电镜观察还发现急性低氧后突触稀少,突触囊泡减少等,说明低氧对神经元突触结构的直接破坏作用。近年来,大量研究将突触蛋白作为突触形态学标记,通过免疫标记后测定其平均光密度,可间接反映突触数目[7]。本研究发现急性低氧 1 d 后 IPL 内 SYS 表达下调,说明低氧后突触数目减少,这与电镜观察结果一致。突触蛋白包括 Synapsins Ⅰa、Ⅰb、Ⅱa、Ⅱb 和Ⅲa 五大类,属于磷酸化蛋白家族的囊泡膜蛋白,主要分布于囊泡的膜表面。体外实验证实 SYS 能将囊泡锚定在神经末梢内以肌动蛋白为基础的细胞骨架上,通过影响囊泡的生理性聚集发挥对兴奋性、抑制性神经递质释放的调节作用[7]。SYS 还具有促进突触发生等功能,与突触功能、形态可塑性及神经环路的调节密切相关,因此急性低氧早期 SYS 减少意味着可释放性突触囊泡减少,突触传递效能降低,干扰视觉信息传递,这与临床中出现视敏度下降、色觉减退等症状密切相关。

### 3.2　牛磺酸对急性低氧视网膜内网状层的防护效应

牛磺酸是视网膜内含量较高的一种游离氨基酸,具有广泛的生理功能,在视网膜中具有抗脂质过氧化、清除自由基、调节细胞渗透压、拮抗谷氨酸兴奋毒性等作用。本实验室前期研究证明了牛磺酸能上调视网膜内 Muller 细胞缺氧诱导因子 1a 表达,进而上调 GLUT-1 表达,有利于视网膜低氧适应,从而保护视网膜[2]。本研究发现急性低氧早期,牛磺酸干预组大鼠 $OS_2$ 潜伏时间较短,幅值较高,提示牛磺酸能有效保护急性低氧视网膜功能。超微结构观察虽见 IPL 肿胀、但突触结构破坏程度较低氧组低,大都结构完整,仍可见大量突触小泡,SYS 平均光密度也比低氧组高,也证实牛磺酸能有效保护急性低氧视网膜形态结构。研究表明细胞处于缺氧状态时,大量钙离子内流[8],从而激活钙蛋白酶 2(Calpain 2),而 SYS 是 Calpain2 的特异底物[9,10],则会进一步影响突触囊泡聚集和释放,干扰信息传递,而有研究证实牛磺酸能调节神经元钙离子流动以及线粒体对钙的缓冲作用[11,12],推测牛磺酸与维持突触可塑性有关,但具体机制尚待进一步研究。

## 参考文献:


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

[2] 陈　芳,糜漫天,许红霞,等. 牛磺酸对缺氧大鼠视网膜缺氧诱导因子-1α 表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2006,28(7):662 - 664.

[3] Rosolen S G, Kolomiets B, Varela O, *et al*. Retinal electrophysiology for toxicology studies: applications and limits of ERG in animals and ex *vivo* recordings[J]. Exp Toxicol Pathol, 2008, 60(1):17 - 32.

[4] Forte J D, Bui B V, Vingrys A J. Wavelet analysis reveals dynamics of rat oscillatory potentials[J]. J Neurosci Methods, 2008, 169(1): 191 - 200.

[5] 赵　霞. 牛蛙视网膜内神经肽 Y 的免疫组织化学研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(20): 2084 - 2087.

[6] 马　静,唐仕波,罗　燕,等. 条件培养液对人视网膜前体细胞分化的诱导[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(1): 65 - 68.

[7] Akbergenova Y, Bykhovskaia M. Synapsin maintains the reserve vesicle pool and spatial segregation of the recycling pool in Drosophila presynaptic boutons[J]. Brain Res, 2007, 1178: 52 - 64.

[8] Sasaki T, Kaneko A. Elevation of intracellular $Ca^{2+}$ concentration induced by hypoxia in retinal ganglion cells[J]. Jpn J Ophthalmol, 2007, 51(3): 175 - 180.

[9] Azuma M, Shearer T R. The role of calcium-activated protease calpain in experimental retinal pathology[J]. Surv Ophthalmol, 2008, 53(2):150 - 163.

[10] Tamad Y, Nakajima E, Nakajima T, *et al*. Proteolysis of neuronal cytoskeletal proteins by calpain contributes to rat retinal cell death induced by hypoxia[J]. Brain Res, 2005,1050(1 - 2):148 - 155.

[11] El-Idrissi A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection[J]. Amino Acids, 2006, 34(2):321 - 328.

[12] Liu H Y, Gao W Y, Wen W, *et al*. Taurine modulates calcium influx through L-type voltage-gated calcium channels in isolated cochlear outer hair cells in guinea pigs[J]. Neurosci Lett, 2006, 399(1 - 2):23 - 26.


(编辑　汪勤俭)