DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.021
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
1936 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)21-1936-04

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

刘载环,糜漫天,张乾勇,许红霞,徐朝霞 (第三军医大学预防医学院营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨间断性低氧对大鼠视网膜的损伤及牛磺酸的防护作用。方法 动物经基础饲料饲养或牛磺酸干预4周后,利用低压舱模拟5 000 m海拔高度,每天低氧停留时间为8 h,连续3 d。用氨基酸分析仪检测视网膜中牛磺酸、谷氨酸和γ氨基丁酸的含量,通过免疫组织化学方法观察大鼠视网膜中谷氨酸和γ氨基丁酸的分布情况,通过电镜观察大鼠视网膜外网状层双极细胞超微结构变化。结果 高原缺氧引起大鼠视网膜各层组织及细胞结构的明显损伤,而牛磺酸干预能减轻缺氧对视网膜的损伤。高原缺氧导致视网膜组织中的谷氨酸和牛磺酸含量显著增加,而牛磺酸干预能拮抗缺氧引起Glu的升高。结论 牛磺酸营养干预能明显拮抗高原缺氧引起的视网膜组织中的谷氨酸含量增加而降低谷氨酸的兴奋毒性作用,从而对视网膜的神经元起到保护作用。

关键词:急性高原低氧;牛磺酸干预;视网膜;谷氨酸
中图法分类号:R364.6;R774 文献标识码:A

Protective effect of taurine on the damage of retina in rats exposed to 5 000 m high altitude

LIU Ji-huan, MI Man-tian, ZHANG Qian-yong, XU Hong-xia, XU Zhao-xia (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of taurine on the damage of retina in rats exposed to high altitude. Methods After taurine nutritional intervention for 4 weeks, rats were exposed to 5 000 m high altitude in a hypobaric chamber for 3 d (8 h/d). The concentrations of taurine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid in rat retina were determined with the amino acid analyzer. The distribution of glutamate and gamma-aminobutyric acid in rat retina was determined by immunohistochemistry. The pathological changes of rat retina were observed electron microscopically. Results We observed the apparent damages of neuron structure in retina of rats exposed to discontinuous acute hypoxia, but the taurine nutritional intervention could lighten the retina damage of rats exposed to acute hypoxia. The taurine nutritional intervention could inhibit the increase of glutamate in retina of rats exposed to simulated 5 000 m high altitude. Conclusion These findings suggest that the taurine nutritional intervention can inhabit the increase of glutamate concentration in retina and can also protect the damage of retina in rats exposed to 5 000 m high altitude.

Key words: acute hypoxia of high altitude; taurine nutritional intervention; retina; glutamate

中枢神经系统对缺氧最为敏感,完全阻断大脑血流5~6 min,就可导致大脑某些神经元出现不可逆的损伤[1]。有研究表明,缺氧引起视网膜神经元损伤主要是由兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAA)的兴奋毒作用介导的[2]。谷氨酸(glutamate, Glu)是视网膜中最主要的兴奋性神经递质,感光细胞和双极细胞均以Glu为神经递质传递神经电信号。释放到突触间隙的Glu由Muller细胞重摄取入细胞内进行代谢[3]。缺氧可以增强神经递质的释放,干扰其摄入,因而导致Glu的浓度上升到兴奋毒作用水平,介导其对神经细胞的兴奋毒损害。γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)是视网膜组织中主要的抑制性神经递质,与其受体(gamma-aminobutyric acid receptor, GABAR)结合能阻断Glu的兴奋作用,组织中GABA和Glu含量保持着动态平衡,缺血条件下Glu能诱导无长突细胞释放GABA,使之含量增加,拮抗Glu的兴奋作用,推测在缺氧条件下视网膜组织中存在这种自身保护作用。牛磺酸(taurine, Tau)是视网膜中含量最丰富的游离氨基酸[4],它在视网膜中是一个多功能因子。有研究表明,作为一种抑制性神经递质,Tau在调节Glu介导的信号传递过程中充当了一个重要角色。本实验运用低压氧

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA182)
Supported by the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01MA182)
作者简介:刘载环(1970-),男,四川省绵阳市人,硕士,主治医师,主要从事高原营养方面的研究,发表论文6篇,现在广州军区联勤卫生防疫队,广州 510050。电话:(023)68753585
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2004-01-21;修回日期:2004-05-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

舱模拟 5 000 m 高原低氧环境, 并用牛磺酸对大鼠进行干预试验, 研究间断性缺氧(本实验所指间断性缺氧是大鼠每天只在 5 000 m 海拔高度停留 8 h 后, 回到平原正常饲养, 没有连续性)对大鼠视网膜的影响及牛磺酸的防护作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

健康幼年 Wistar 大鼠 80 只, 雄性, 体质量(100±10)g, 由第三军医大学实验动物中心提供。动物分为 4 组, 每组 20 只: 平原对照组(C)、平原牛磺酸组(Tau C)、高原缺氧组(H)和高原牛磺酸干预组(Tau H)。平原对照组和高原缺氧组大鼠用基础饲料饲养; 牛磺酸干预组用基础饲料加 0.6%的牛磺酸饲养。动物饲养 4 周后, 用低压氧舱模拟海拔 5 000 m 高度急性间断性缺氧处理 3 d, 每天 8 h, 减压速度为 100 m/min。

1.2　主要试剂

牛磺酸(Taurine): 北京世纪维他保健品公司。兔抗 Glu(1∶3 000, Sigma 公司); 鼠抗 GABA(1∶200, Sigma 公司); S-P-9000 通用型试剂盒和 S-P-9003 试剂盒均由北京中山生物试剂有限公司。

1.3　视网膜中 Tau、Glu、GABA 含量的测定[5]

每组各取大鼠 6 只处死, 取出眼球, 将眼球用眼科剪沿角膜缘剪开, 去除角膜、晶状体、玻璃体, 翻转视杯, 用钝性镊子钝性分离视网膜, 精确称重, 按每 0.1 g 视网膜组织加入 10 ml 10%磺基水杨酸(SSA)的比例加入 10%磺基水杨酸, 冰浴匀浆, 18 000 r/min 低温高速离心 20 min, 取上清液, 低温冰箱(−70 ℃)冻存待测。用 Beckman 公司的 6300 黄金系统高效氨基酸分析仪, 601 黄金系统色谱工作站分析视网膜样本中的牛磺酸、Glu、GABA 含量。色谱条件: 色谱柱: Beckman 氨基酸分析锂柱(10 cm×4.0 mm); 流动相: Li-A、Li-C、Li-R, 流速 10 ml/h; 茚三酮显色剂: 流速 10 ml/h; 柱温: 33.5 ℃, 77 ℃; 进样量: 50 μl/次; 比色波长: 570 nm。

1.4　免疫组织化学染色观察大鼠视网膜的 Glu 和 GABA 变化[6]

乙醚麻醉大鼠后, 先用生理盐水 200～250 ml 灌注, 再换用 4 ℃预冷的 4%多聚甲醛 100～200 ml 灌注固定, 取出眼球于 4%多聚甲醛固定 6～8 h, 30%蔗糖多聚甲醛液 4 ℃过夜, 冰冻切片, 将切片置于涂有 1%多聚赖氨酸的载玻片上, 再用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次。0.5% H_2O_2 室温处理 5～10 min, 灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水漂洗; 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min×3 次, 用 10%正常山羊血清封闭 10 min; 弃去血清, 分别滴加 100 μl 兔抗 Glu 和鼠抗 GABA 抗体工作液(阴性对照实验以 PBS 代替一抗)将切片浸泡, 37 ℃孵育 2 h, 然后 4 ℃过夜。用 PBS 漂洗, 5 min×3 次; 滴加 200 μl 生物素化二抗(通用型生物素标记羊抗 IgG)工作液将切片浸泡, 37 ℃孵育 2 h; PBS 漂洗, 5 min×3 次; 100 μl 辣根过氧化酶标记的链酶卵蛋白素工作液将切片浸泡, 37 ℃孵育 30 min; PBS 漂洗, 5 min×3 次。加 100 μl 新鲜配制的 DAB 显色液(含 0.05%DAB, 0.03% H_2O_2, 用 10 mmol/L pH 7.4 Tris·Cl 缓冲液配制), 室温避光显色 5～10 min; 蒸馏水小心冲洗, 并用过滤纸将水分吸干。显微镜下观察并照相。将每一动物同一部位的视网膜切片随机抽取 3 张, 在相同倍数(×200 倍)下每张切片的相应区域观察 3 个不同的视野照相, 并记录。

1.5　透射电镜观察视网膜的超微结构变化

大鼠经乙醚麻醉, 灌注固定后, 取出眼球置于 3%戊二醛固定液, 室温静止放置, 而后常规 1%锇酸固定, 系列丙酮脱水, 环氧树脂浸泡包埋, 经超薄切片, 于 TENCAI10 PHILIPS 透射电镜下观察视网膜组织超微结构的变化。

1.6　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠视网膜组织中 Tau、Glu、GABA 含量变化

各组大鼠视网膜组织中 Tau、Glu、GABA 含量见表 1。平原牛磺酸组视网膜中 Tau 含量显著高于平原对照组, 但 GLU 和 GABA 含量与平原对照组无明显差别。高原缺氧组和高原牛磺酸组视网膜组织中 Tau、Glu、GABA 含量均显著高于平原对照组。高原牛磺酸组视网膜中 Tau 含量显著高于高原缺氧组, 而 Glu 含量显著低于高原缺氧组。

表 1　缺氧对大鼠视网膜组织中 **Tau、Glu、GABA** 含量的影响(**mmol/g**, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Contents of Tau, Glu, and GABA in retina of rats exposed to 5 000 m high altitude in a hypobaric chamber (mmol/g, $\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Tau	Glu	GABA
Control	6	30.38±0.39	16.48±0.39	5.47±0.39
Tau C	6	31.10±0.32 *	16.19±0.56	5.78±0.26
H	6	32.38±0.38 *	27.30±0.50 *	7.02±0.29 *
Tau H	6	33.50±0.47 △	22.58±0.45 △	6.83±0.34 *
F		9.664	563.492	36.954
P		0.006	0.000	0.000

*: $P<0.01$, *vs* control; △: $P<0.01$, *vs* H

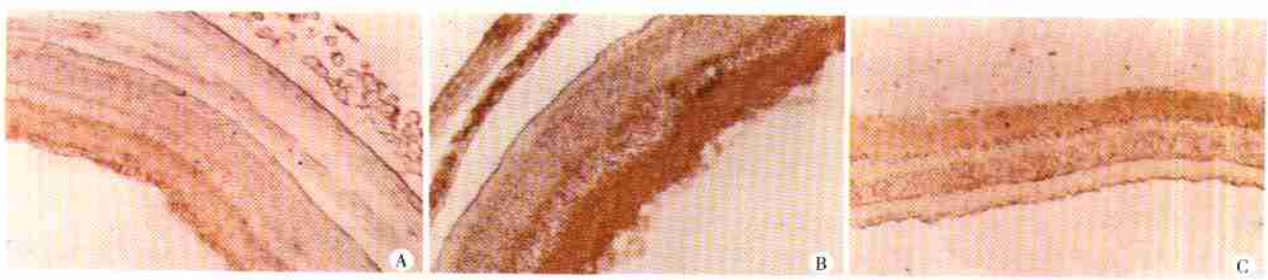
2.2　间断性高原缺氧对大鼠视网膜组织中 Glu 和 GABA 分布的影响

免疫组化分析结果(图 1): Glu 免疫组化染色阳性出现在外网状层、内网状层及神经纤维层; 高原缺氧组各层阳性染色最深, 高原牛磺酸组次之, 平原对照组和平原牛磺酸组无明显差异。GABA 染色阳性出现在外核层、内核层及神经纤维层, 但各组间差别不明显。

2.3　高原缺氧对视网膜各层组织结构的影响

透射电镜扫描观察结果见图 2。正常组大鼠下视网膜各层组织及细胞结构正常, 各层组织区分明显, 细胞核仁明显, 居中, 核膜清晰, 细胞器较多, 结构清楚。高原缺氧组大鼠视网膜各层组织及细胞结构有所变化, 主要表现是视杆细胞膜盘结构疏松, 排列紊乱, 出现不规则扩张, 外网状层双极细胞线粒体肿胀, 内质网明显扩张, 核仁靠近核膜, 细胞有损伤的变化。牛磺酸营养干预组结果显示, 视杆细胞膜盘结构紧凑, 排列有序, 未出现不规则扩张, 外网状层双极细胞线粒体无明显肿胀, 但内质网有轻度扩张。

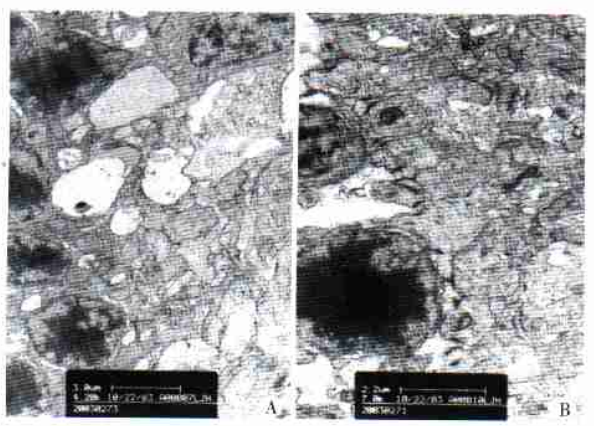
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Control; B: Rats exposed to 5 000 m high altitude; C: Rats exposed to 5 000 m high altitude treated with Tau intervention

图 1 间断性模拟海拔 **5 000 m** 高度对大鼠视网膜组织 **Glu** 免疫组化染色的影响 (S-P×200)

Fig 1 Effects of acute hypoxia at the simulated 5 000 m high altitude on Glu concentration in retina of rats determined by immunohistochemistry (S-P×200)



A: Rats exposed to 5 000 m high altitude; B: Rats exposed to 5 000 m high altitude treated with Tau intervention

图 2 间断性模拟海拔 **5 000 m** 高度对大鼠视网膜外网状层双极细胞超微结构的影响 (TEM× 20 000)

Fig 2 Effects of acute hypoxia at the simulated high altitude on retina structure of rats observed with an electron microscope (TEM×20 000)

3 讨论

视网膜(retina)位于眼球壁的最内面一层，属于高度分化的神经组织，它的主要功能是感受光线并把视觉信息通过视神经传向中枢。在人的感官系统中，视网膜对低氧的耐受性最低。视网膜组织代谢非常旺盛，血液中氧的水平及弥散入组织的氧浓度，对维持视网膜的各种正常代谢起着至关重要的作用。大量研究表明，缺氧可导致视网膜神经元损伤，尤其是神经节细胞[2]。早在 1988 年，David 发现处于低氧环境中的鸡胚胎视网膜内核层、内网状层及神经节细胞层受损。24 h 缺氧可导致视网膜所有类型的细胞数明显下降。我们用透射电镜扫描[7]观察到：高原缺氧引起大鼠视网膜各层组织及细胞结构有明显损伤，而牛磺酸干预能减轻缺氧对视网膜的损伤。

有研究表明[8~12]，缺氧引起视网膜神经元损伤主要是由 EAA 的兴奋毒作用介导的。谷氨酸(Glutamate, Glu)是视网膜中最主要的兴奋性神经递质，感光细胞和双极细胞均以 Glu 为神经递质传递神经电信号。缺氧可以增强神经递质的释放，干扰其摄入，因而导致 Glu 的浓度上升到兴奋毒作用水平，介导对神经细胞的兴奋毒损害。γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)是视网膜组织中主要的抑制性神经递质，与其受体(gamma-aminobutyric acid receptor, GABAR)结合能阻断 Glu 的兴奋作用，有研究资料表明，GABA 和 Glu 含量保持着动态平衡，缺血条件下 Glu 能诱导无长突细胞释放 GABA，使之含量增加，拮抗 Glu 的兴奋作用，推测在缺氧条件下视网膜组织中存在这种自身保护作用。本课题追踪研究检测高原组 5 000 m 和 3 000 m 组视网膜组织中 GABA 的含量比较，5 000 m 组含量较高，但差异不显著，可能说明 GABA 并没有随着 Glu 的升高而增加，在低氧加重的条件下，升高的 GABA 含量不足以拮抗 Glu 的毒性作用，从而未能阻断视网膜的损伤。牛磺酸(Taurine, Tau)是视网膜中含量最丰富的游离氨基酸[4]，它在视网膜是一个多功能因子。有研究表明，作为一种抑制性神经递质，Tau 在调控 Glu 介导的信号传递过程中充当了一个重要角色。在缺氧、低血糖、缺血及暴露于自由基的情况下 Tau 的释放均大大增加。这种释放被认为具有神经保护效应，它可以通过几种途径中和同时释放的 EAA 的效应。Tau 的释放可以防止 EAA 达到神经毒水平。Tau 的释放是 Glu 所诱导的，兴奋毒浓度的 Glu 促使小鼠海马片层 Tau 释放，Glu 活化的 Tau 释放对未成熟的海马构成了一个重要的保护机制。本研究表明高原缺氧导致视网膜组织中的谷氨酸和牛磺酸含量显著增加，而牛磺酸干预组牛磺酸增加最多，且能拮抗缺氧引起 Glu

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的升高。免疫组织化学染色证实，Glu 染色阳性出现在外网状层、内网状层及神经纤维层，模拟海拔 5 000 m 高度高原缺氧组各层阳性染色最深，高原牛磺酸组次之。说明牛磺酸营养干预能明显拮抗模拟海拔 5 000 m 高度高原缺氧引起的视网膜组织中的谷氨酸含量增加而减低谷氨酸的兴奋毒性作用，从而对视网膜的神经元起到保护的作用。

参考文献：

[1] 王玉洁，何维为，郎恩千. 脑缺血后脑组织的病理生理改变[J]. 解剖科学进展，1995，1(3)：264－270.
[2] Luo X, Lambrou G N, Sahel J A, *et al*. Hypoglycemia induced general neuroal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death *in vitro*[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(11)：2695－2705.
[3] Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina[J]. Trends Neurosci, 1996, 19(8)：307－312.
[4] Sturman J A. Taurine in development[J]. Physiot Rev, 1993, 73(1)：119－147.
[5] Lima L, Obregon F, Mutus P. Taurine, glutamate and GABA modulate the outgrowth from goldfish retinal explants and its concertrations are affected by the crush of the optic nerve[J]. Amino Acids, 1998, 15(3)：195－209.
[6] 蔡文琴，王伯汴云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 78－82.
[7] 苟　琳，张作明，郭守一，等. 缺氧对视网膜 Muller 细胞超微结构及 GFAP 表达的影响[J]. 第四军医大学学报，2002, 23(5)：472－475.
[8] Izumi Y, Shimamoto K, Benz A M, *et al*. Glutamate transporters and retinal excitotoxicity[J]. Glia, 2002, 39(1)：58－68.
[9] Honigman B, Noordewier E, Kleinman D. High altitude retinal emorrhages in a Colorado skier[J]. High Alt. Med Biol, 2001, 2(4)：539－544.
[10] Rao N A, Fernandez M A, Cid L L, *et al*. Retinal lipid peroxidation in experimental uveitis[J]. Arch Ophthalmol, 1987, 105(12)：1712－6716.
[11] Morgan J, Caprioli J, Koseki Y. Nitric oxide mediates excitotoxic and anoxic damage in rat retinal ganglion cells cocultured with astroglia[J]. Arch Pohthalmol, 1999, 117(11)：1524－1529.
[12] Kitano S, Morgan J, Caprioli J. Hypoxic and excitotoxic damage to cultured rat retinal ganglion cells[J]. Exp Eye Res, 1996, 63(1)：105－112.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2004)21-1939-01

个案与短篇

声带曲霉菌感染 1 例

Aspergillosis of the vocal cords: a case report

袁　伟，张学渊，黄茂华　　（第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科，重庆 400038）

患者，女，38 岁，因突发性声嘶十余天入院。患者于 2002 年 5 月突发性声嘶 10 d，进行性加重，无吞咽困难、发热、盗汗。电子喉镜提示：鼻、鼻咽、口咽正常；左侧声带见白色欠光滑新生物，周围少许糜烂。查体、化验检查均未见异常。入院后在显微镜下完整钳取新生物，搔刮基底部。病理报告：声带曲霉菌伴炎性坏死。术后停用所有抗生素，给予斯皮仁诺胶囊 2 粒，口服，3 次/d，连服 5 d，喉部呋喃西林液雾化吸入，声嘶明显好转出院。一年后来院复查：声带光滑，闭合正常，声嘶及咽部异物感症状消失。

讨论

曲霉菌属曲菌属，是条件致病菌[1,2]。在机体环境发生变化时致病。声带曲霉菌感染临床少见，国内外均只有个案报道。本例病人在发病前有用声过度伴受凉史，导致声带局部有病理性损伤，真菌侵犯声带，大量繁殖呈进行性损伤，破坏声带上皮层和固有层。其主要症状是声嘶，临床检查与喉癌、结核很难区分，组织病理学检查及真菌培养是鉴别诊断的准确方法[3]。真菌培养出典型的分枝分隔菌丝。治疗上若能局部擦药效果最佳，但不现实，我们采用斯皮仁诺（伊曲康唑）冲击疗法，副作用少、时间短、花费少，配合禁声，长期随访取得了较好的治疗效果。

关键词：曲霉菌；声带
中图法分类号：R767.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 农辉图，李菊裳，黄光武，等. 喉曲菌病[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，1995，30(2)：111－113.
[2] 张　民，黄　辉，姬长友. 曲菌性鼻窦炎 33 例临床分析[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1498－1499.
[3] Kheir S M, Flint A, Moss J A. Primary aspergillosis of the larynx simulating carcinoma[J]. Human Am Pathology, 1983, 14：134.

（编辑　冷怀明）

作者简介：袁　伟(1972－)，男，河北省张家口市人，硕士，主治医师，主要从事耳鼻方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023) 68765891

收稿日期：2004-09-06；修回日期：2004-10-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net