DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.020
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1177-03

论著

牛磺酸及复合微量营养素对大鼠视网膜 iNOS mRNA 的影响

许红霞,糜漫天,郎海滨,韦 娜,黄国荣,余小平 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨牛磺酸及复合微量营养素对光照和暗适应条件下大鼠视网膜 iNOS mRNA 的影响。方法 在幼年大鼠的饲料配方中分别添加牛磺酸及 VA、VB_1、VB_2、尼克酸、Zn、Se 等复合微量营养素,营养干预 4 周后,采用原位分子杂交技术检测各组大鼠视网膜 iNOS mRNA 在光照和暗适应条件下的分布和表达。结果 光照时 iNOS mRNA 分布于内、外核层及节细胞层,而暗适应时分布于内、外网状层。牛磺酸组暗适应时亦分布于内、外核层及节细胞层,微量营养素组光照和暗适应时 iNOS mRNA 的分布分别与普通饲料组暗适应和光照时的分布一致。结论 iNOS mRNA 的分布因光适应状态而异,上述复合微量营养素能影响光照和暗适应时 iNOS mRNA 的分布和表达,牛磺酸则主要影响其暗适应时的分布和表达。

关键词:牛磺酸;复合微量营养素;视网膜;iNOS;暗适应
中图法分类号:R151;R322.91;R339.14 文献标识码:A

Effects of taurine and micronutrient complex on iNOS mRNA in retina of rat

XU Hong-xia, MI Man-tian, LANG Hai-bin, WEI Na, HUANG Guo-rong, YU Xiao-ping (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of taurine and micronutrient complex on the expression of inducible NOS (iNOS) mRNA in rat retina of rat under the condition of light and dark adaptation. **Methods** After supplementation of taurine, vitamin A, vitamin B_1, vitamin B_2, niacin, Zinc and Selenium in rat diet for 4 weeks, the localization and expression of iNOS mRNA in rat retina under the condition of light and dark adaptation were observed with *in situ* hybridization. **Results** iNOS mRNA was expressed in outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL), and ganglion cells layer (GL) under the condition of light adaptation, and in outer plexiform layer (OPL) and inner plexiform layer (IPL) under the condition of dark adaptation. The changes of iNOS mRNA expression were coincident with normal group in light adaptation after taurine treatment, but the intervention of micronutrient complex induced an opposite alternation of iNOS mRNA expression to normal group in light and dark adaptation. **Conclusion** The localization and expression of iNOS mRNA are quite different under various condition of light adaptation. The supplementation of micronutrient complex could modulate the localization and expression of iNOS mRNA in dark and light adaptation, but taurine only modulate the localization and expression of it in dark adaptation.

Key words: taurine; micronutrient complex; retina; iNOS; dark adaptation

在中枢神经系统,一氧化氮(Nitric oxide, NO)作为一种神经递质或神经调质对神经系统的信号传导起重要作用[1]。近来发现,NO 对视网膜回路亦具有调节作用,NO 可在视网膜形成 NO:GC:cGMP 调控系统[2,3]。

牛磺酸是视网膜中含量最丰富的游离氨基酸,它可以调节视网膜 Ca^{2+} 摄入,进而影响视网膜视觉信号传递。新近研究表明,牛磺酸调节 Ca^{2+} 摄入可能与其影响 cGMP 通道有关[4],但牛磺酸是否影响 NO:GC:cGMP 系统,尚不清楚。以往资料显示,VA、VB_1、VB_2、尼克酸、Zn、Se 等微量营养素对大鼠暗适应功能有影响,但它们是否影响 NO:GC:cGMP 系统,亦不得知。本实验分别观察牛磺酸和上述复合微量营养素对视网膜在光照和暗适应条件下诱生型一氧化氮合酶(Inducible NOS, iNOS)mRNA 的表达有何影响,旨在探讨牛磺酸及复合微量营养素对视网膜 NO:GC:cGMP 回路的影响,深入认识营养与视功能的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

幼年 Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体重(70±10)g,随机分为 4 组,即普通饲料组、微量营养素组、牛磺酸组和缺乏组。动物自由进食和饮水,置于 12 h 光照/12 h 黑暗的环境条件下单笼饲养。营养干预 4 周后,每组再随机分为光照组和暗适应组,光照组光照条件同前,暗适应组置于暗室(平均照度 3.0 lx),继续喂养 3 d,观察各项分析指标的变化。

1.2 营养干预的大鼠饲料配方

1.2.1 大鼠基础饲料配方 玉米淀粉 58.8%,酪蛋白 18%,蔗糖 10%,芝麻油 5%,纤维素 3%,混合矿物质 4%,混合维生素 1%,DL-蛋氨酸 0.2%,其中混合矿物质及混合维生素采用 AOAC 配方,因 AOAC 配方中无硒,在其中加入 Na_2SeO_3 形式的 Se 40 μg/kg 饲料。

1.2.2 各组动物饲料配方 普通饲料组:在基础饲料配方的基础上添加 0.12%牛磺酸。微量营养素组:在基础饲料配方基础上添加多种微量营养素,包括维生素 A(VA)、维生素 B_1(VB_1)、维生素 B_2(VB_2)、尼克酸、锌(Zn)、硒(Se),其含量为普通饲料组的 5 倍剂量。牛磺酸组:在基础饲料配方的基础上,添加普通饲料组 5 倍剂量(0.6%)的牛磺酸。缺乏组:牛磺酸、VA、VB_1、VB_2、尼克酸、Zn、Se 的量为普通饲料组的 1/3。其余营

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900120);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(98Q055)
作者简介:许红霞(1970—),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事营养与视功能方面的研究 电话:(023)68752291
收稿日期:2000-10-10;修回日期:2001-03-17

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

养素的量同基础饲料。

1.3 iNOS 的检测

1.3.1 探针制备 pUC19-iNOS 质粒由美国 Carl Nathan 教授提供。质粒由 *EcoR* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 内切酶内切。

大肠杆菌新鲜感受态细菌的制备、质粒转化及提取、酶切鉴定、目的片段的回收：均参照文献[5]的方法。酶切结果显示 5.3 kb 和 0.7 kb 两条带，其 0.7 kb 条带为 iNOS 目的片段。

探针标记及标记效率检测：均按地高辛标记及检测试剂盒（Boehringer Mannheim 公司）说明进行，其标记效率为 50 ng/μl。

1.3.2 原位分子杂交 4%多聚甲醛（0.1 mol/L 无菌 PB 配制，含 0.5%DEPC）灌注固定大鼠，无菌取眼球，4% 多聚甲醛 4 ℃后固定 4～6 h，30%蔗糖（4%多聚甲醛配）过夜，冰冻切片（10～15 μm）。所用试剂和器材均经去 RNA 酶处理。原位杂交参照文献[6]。阴性对照实验：杂交液中不加探针进行原位杂交。

2 结果

普通饲料组光照时 iNOS mRNA 的杂交信号主要集中在外核层、内核层及节细胞层，其中以外核层染色最深，内核层次之，节细胞层仅有少许胞体被染色。暗适应后的染色特征完全不同于光照时，阳性染色主要出现在外网状层和内网状层。表明 iNOS mRNA 的表达部位在不同光适应状态下是不同的，见表 1、图 1。

牛磺酸组在光照和暗适应时 iNOS mRNA 的原位杂交染色特征均与光照时的普通饲料组相似，即阳性染色主要分布于外核层、内核层和节细胞层。且暗适应后牛磺酸组的内、外核层及节细胞层染色均较深，以内核层染色最深，见表 1。表明牛磺酸不影响光照时 iNOS mRNA 的的分布及表达，而明显影响其在暗适应条件下的分布及表达。

微量营养素组在光照和暗适应时的染色特征与普通饲料组正好相反，即它在光照时染色于内、外网状层，而在暗适应时染色于内、外核层及节细胞层，且暗适应时内核层、节细胞层染色较深，外核层染色较浅。表明所添加的多种微量营养素对光照和暗适应条件下 iNOS mRNA 的分布及表达均有影响，见表 1、图 2。

缺乏组的染色特征与普通饲料组相似，即光照时染色于内、外核层和节细胞层；暗适应时染色于内、外网状层，其中外网状层染色较明显，而内网状层染色很浅。表明缺乏牛磺酸及 VA、VB_1、VB_2、尼克酸、Zn、Se 等复合微量营养素后 iNOS mRNA 的表达下降，见表 1。

表 1 牛磺酸和复合微量营养素对 **iNOS mRNA** 表达的影响

Tab 1 Effects of taurine and micronutrient complex on iNOS mRNA

Condition of illumination	Group	ONL	OPL	INL	IPL	GL
Light	Normal diet group	++	−	+	−	+
	Micronutrient group	−	+	−	+	−
	Taurine group	++	−	+	−	+
	Deficient group	+	−	+	−	+
Dark	Normal diet group	−	++	−	++	−
	Micronutrient group	+	−	++	−	+++
	Taurine group	++	−	+++	−	+
	Deficient group	−	++	−	+	−

ONL: Outer nuclear layer; OPL: Outer plexiform layer; INL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer; GL: Ganglion cells layer; +++: Intensive positive; ++: Positive; +: Slight positive; −: Negative

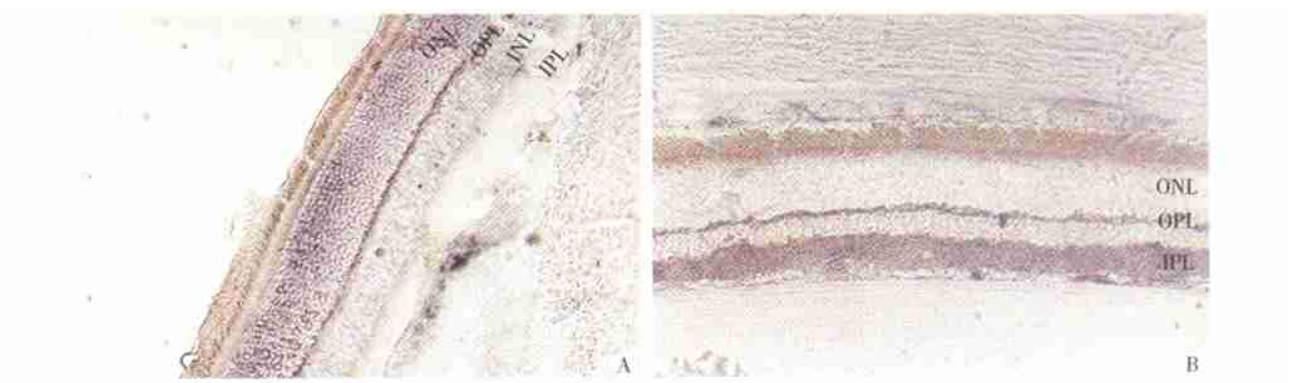


图 1 普通饲料组 **iNOS mRNA** 原位杂交分析 （× 200） A：光照条件下；B：暗适应条件下

Fig 1 *In situ* hybridization of iNOS mRNA in normal group （× 200） A: Under light adaptation; B: Under dark adaptation

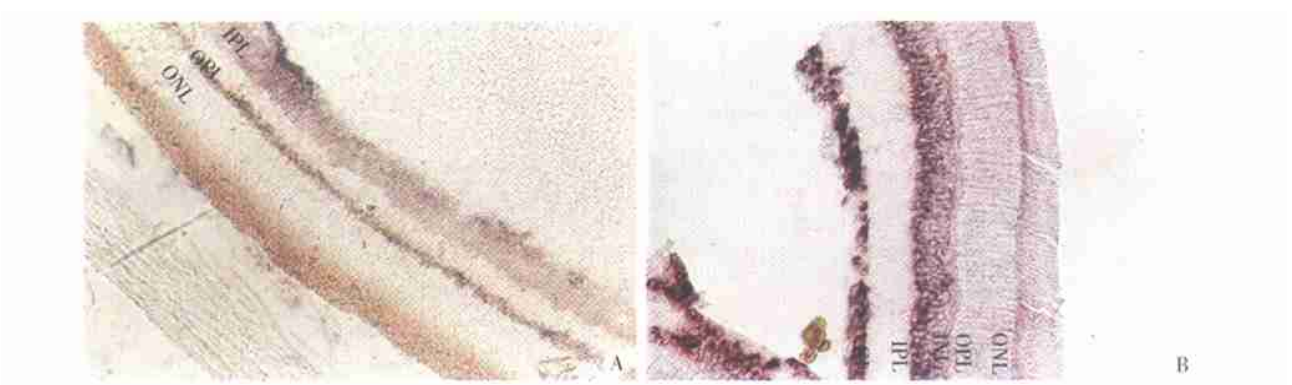


图 2 微量营养素组 **iNOS mRNA** 原位杂交分析 （× 200） A：光照条件下；B：暗适应条件下

Fig 3 *In situ* hybridization of iNOS mRNA in micronutrient group （× 200） A: Under light adaptation; B: Under dark adaptation

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

3　讨论

现已证实, NO 通过激活视网膜可溶性鸟苷酸环化酶(sGC), 催化 GTP 生成 cGMP, 形成 NO-sGC-cGMP 调控系统, GC 的亚铁原卟啉基团为 NO 的作用靶。目前发现 NO-sGC-cGMP 系统广泛影响视网膜回路, 它可能在以下诸多环节影响视觉信号传递: (1)在光感受器特别是视杆外段, NO 可能通过激活 GC, 使 cGMP 升高, cGMP 门控通道开放, 从而影响光感受器的兴奋及复原[2]; (2)NO 可调节水平细胞间的电耦合, 进而调制外网状层信息传递。NO 和 cGMP 还可抑制水平细胞上的离子型谷氨酸受体通道, 保护水平细胞免受谷氨酸的兴奋毒性作用[7]; (3)NO 和胞内第二信使 cGMP 可调制视杆双极细胞和部分神经节细胞上代谢型谷氨酸受体相关的 cGMP 门控通道[8]。

在体内, NO 由 L-精氨酸在一氧化氮合酶(Nitricoxide synthase, NOS)作用下生成。NOS 可被分为组成型(Constitutive NOS, cNOS)和诱生型(Inducible NOS, iNOS)两种。cNOS 无需诱导生成, 而 iNOS 的表达有赖于 NADPH 的双加氧酶和外源性诱导因素。NOS 通常存在于靶细胞或与靶细胞毗邻的细胞, 它在不同动物视网膜中的分布是不同的, 可见于光感受器内段、水平细胞、无长突细胞等各种神经元, 其分布因光适应状态而异。在兔和大鼠, NOS 的免疫组化反应和 NADPH-黄递酶组化反应均染色于内核层、节细胞层, 而现在认为内核层的阳性细胞主要是水平细胞和部分无长突细胞。小牛视杆细胞 NOS 染色阳性, 鱼视网膜的 Muller 细胞也被染色[9]。本实验用原位杂交检测大鼠视网膜 iNOS mRNA 的分布, 发现光照时染色于外核层、内核层及节细胞层, 以外核层染色为主; 而暗适应状态下染色于外网状层、内网状层, 与上述结果相符, 且表明 iNOS mRNA 的分布也因光适应状态而异。推测光照时iNOS 在胞体处被大量转录, 暗适应状态下 mRNA 转移到突触附近(内、外网状层), 以利于 iNOS 合成, 并产生大量 NO 参与突触部位的信号传递。提示 NO 在不同光适应状态下视网膜回路的视觉信号传递中起重要调节作用。

研究显示, 牛磺酸对光照时 iNOS mRNA 的分布及表达量无明显影响, 但暗适应后阳性染色仍出现于内、外核层及节细胞层, 且内核层的表达强于外核层。表明牛磺酸对暗适应状态下 iNOS mRNA 的分布和表达有影响, 提示添加牛磺酸后, 在暗适应状态下仍有大量 iNOS 转录, 牛磺酸可能由此而影响视网膜暗适应功能, 但对于这种影响的利弊及其可能的机制, 尚需进一步研究。

已有研究表明, NOS 的活性有赖于 FMN、FAD 及 NADPH 的存在, 而此三者来源于 VB_2 和尼克酸; Zn^{2+} 作为一种神经调质, 已发现它缺乏时可引起小脑、纹状体和下丘脑 NOS 活性及 cGMP 水平降低, 它也可能影响 iNOS 的表达。本结果显示, 给大鼠添加 VA、VB_1、VB_2、尼克酸、Zn、Se 等微量营养素, 光照时 iNOS mRNA 杂交信号主要见于内、外网状层, 而暗适应时主要见于内、外核层及节细胞层, 这与普通饲料组 iNOS mRNA 在光照和暗适应时的分布恰恰相反, 提示上述复合微量营养素能影响 iNOS mRNA 在光照和暗适应状态下的分布及表达, 它们也可能由此而影响视网膜暗适应功能。

参考文献:

[1] Jaffrey S R, Synder S H. Nitric oxide: a neural messenger. [J] Annu Rev Cell Dev Biol, 1995, 11: 417-440.

[2] Koch K W, Lambrecht H G, Haberecht M, *et al*. Functional coupling of a Ca^{2+}/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells[J]. EMBO J, 1994, 13(14): 3 312-3 320.

[3] Mills S L, Massey S C. Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells[J]. Nature, 1995, 377(6551): 734-737.

[4] Militante J D, Lombardini J B. Pharmacological characterization of the effects of taurine on calcium uptake in the rat retina[J]. Amino Acids, 1998, 15(1-2): 99-108.

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫 译. 分子生物实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 5-68.

[6] 蔡文琴, 王伯行 主编. 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. 406-427.

[7] Mcmahon D G, Ponomareva L V. Nitric oxide and cGMP modulate retinal glutamate receptors[J]. J Neurophysiol, 1996, 76(4): 2 307-2 315.

[8] Ahmad I, Leinders Zufall T, Kocsis J D, *et al*. Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors [J]. Neuron, 1994, 12(1): 155-165.

[9] Liepe B A, Stone C, Koistinaho J, *et al*. Nitric oxide synthase in Muller cells and neurons of salamander and fish retina[J]. J Neurosci, 1994, 14(12): 7 641-7 654.

(编辑　陈聪连)

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