

# 牛磺酸对兔 RPE 细胞光损伤的保护作用

崔璟琳, 修巍威, 曹书杰, 张晓峰, 路航

作者单位: (161000) 中国黑龙江省齐齐哈尔市第一医院眼科  
作者简介: 崔璟琳, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障、角膜病。  
通讯作者: 崔璟琳. cjl35jjcc@126.com  
收稿日期: 2012-03-02 修回日期: 2012-06-04

## Protection effect of taurine on photic injury in RPE cells of rabbits

Jing-Lin Cui, Wei-Wei Xiu, Shu-Jie Cao, Xiao-Feng Zhang, Hang Lu

Department of Ophthalmology, the First Hospital of Qiqihaer City, Qiqihaer 161000, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Jing-Lin Cui. Department of Ophthalmology, the First Hospital of Qiqihaer City, Qiqihaer 161000, Heilongjiang Province, China. cjl35jjcc@126.com  
Received: 2012-03-02 Accepted: 2012-06-04

### Abstract

- **AIM:** To detect the protection effect of taurine on photic injury in retinal pigment epithelial (RPE) cells of rabbits with single-cell gel electrophoresis assay (SCGE).
- **METHODS:** The 2-4 passage RPE cells of rabbits were adopted to establish visible high damage model. The cultured RPE cells were pretreated with taurine of 40mmol/L, 80mmol/L for 24 hours, whereas control group was pretreated without taurine. The cell's DNA damage of various groups was detected with SCGE.
- **RESULTS:** The DNA damage on RPE cells of rabbits was reduced, 80mmol/L group had obvious effect than the other groups. There was significant difference with control group in tail DNA% and tail length ( $P < 0.01$ ).
- **CONCLUSION:** Taurine can protect RPE cells in rabbits against photic injury. Its effect is dose-dependent.
- **KEYWORDS:** taurine; retinal pigment epithelial cells; photic injury; single-cell gel electrophoresis assay

**Citation:** Cui JL, Xiu WW, Cao SJ, et al. Protection effect of taurine on photic injury in RPE cells of rabbits. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(7):1248-1250

### 摘要

**目的:** 应用 SCGE 法检测牛磺酸对家兔视网膜色素上皮细胞可见光损伤的保护作用。  
**方法:** 取 2~4 代的家兔色素上皮细胞建立光损伤模型, 然后分别应用 40mmol/L 和 80mmol/L 浓度牛磺酸液对光损伤的细胞继续培养 24h, 并设立无牛磺酸培养的对照组。应用单细胞凝胶电泳法分别测定各组细胞 DNA 的改变。

**结果:** 光损伤后的家兔 RPE 细胞经过牛磺酸液培养后 DNA 损伤程度均有所减轻, 尤其 80mmol/L 剂量组的保护作用更为明显, 细胞的尾长、彗星细胞百分率与对照组相比均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 牛磺酸中的有效成分对家兔 RPE 光损伤有明显的保护作用, 且呈剂量依赖的量效关系。

**关键词:** 牛磺酸; 视网膜色素上皮细胞; 光损伤; 单细胞凝胶电泳

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.07.07

**引用:** 崔璟琳, 修巍威, 曹书杰, 等. 牛磺酸对兔 RPE 细胞光损伤的保护作用. *国际眼科杂志* 2012;12(7):1248-1250

### 0 引言

牛磺酸 (taurine) 其化学名为 2-氨基乙磺酸, 是一种  $\beta$  型含硫氨基酸, 广泛存在于动物组织细胞内, 在海洋动物中的含量尤为丰富。人体内牛磺酸总含量约 12~18g, 其中 3/4 以上存在于骨骼肌, 血浆含量极低, 仅 150mg 左右。牛磺酸具有多种药理学作用, 是实验研究中常用的抗氧化剂之一。

眼是人和动物唯一的光感受器, 它直接暴露于光和氧中, 从理论上讲最容易产生光化学反应, 也最易遭受氧化损伤。视网膜色素上皮细胞间有封闭小带或称紧密连接, 可以避免脉络膜血管正常露出液中的大分子物质进入视网膜, 起着视网膜外屏障或称视网膜-脉络膜屏障作用, 所以视网膜色素上皮 (RPE) 具有重要的生理保护功能<sup>[1]</sup>。长期、低强度、间歇性的阳光辐射以及眼科常用诊疗器械 (如间接检眼镜和手术显微镜等) 的强光源照射、某些伴有强光源照射的职业环境都可造成视网膜光化学损伤, 最终导致光感受器和视网膜色素上皮变性。这类损伤可能是老年黄斑变性等视网膜变性疾病的基本病理过程。根据我院近 5a 来诊治的视网膜光损伤相关病例共 87 例, 询问病史发现其中 59 例存在长期接触户外可见光或从事伴有强光源刺激职业史。本实验应用单细胞凝胶电泳法 (single-cell gel electrophoresis assay, SCGE, 又称彗星试验), 测定可见光对培养的家兔 RPE 细胞的损伤作用, 探讨视网膜光损伤发生机制, 对该病的职业相关性加以分析, 以及观察抗氧化剂牛磺酸对光损伤后 RPE 细胞的保护作用, 为该病的治疗提供实验依据。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 选用健康无眼病的大耳家兔 10 只 (齐齐哈尔医学院动物实验室提供), 雌雄不限, 体质量 2.2~2.5kg。牛磺酸 (上海生化工试剂公司); 正常熔点琼脂糖和低熔点琼脂糖 (上海华舜生物工程有限公司); 溴化乙锭 (Sigma 公司); 荧光显微镜 (Olympus Vanox 型), 电泳仪 DYY-32 型 (北京六一仪器厂)。牛磺酸分别配制为 40mmol/L 和 80mmol/L 浓度溶液。裂解 A 液 (pH=10): 2.5mol/L

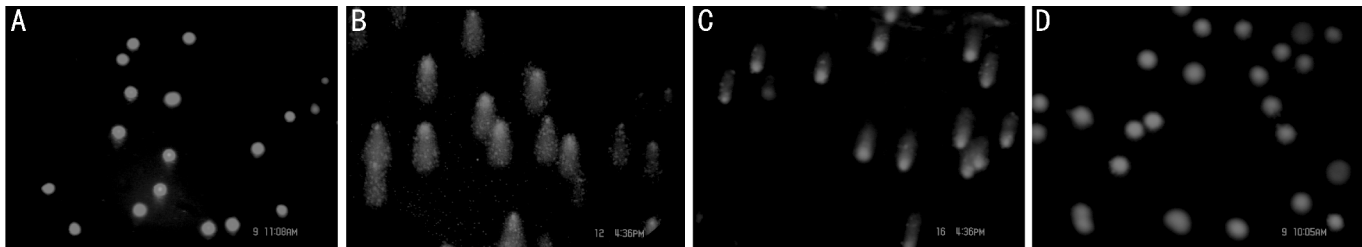


图1 牛磺酸对家兔 RPE 细胞 DNA 光损伤的影响(EB 染色 $\times 200$ ) A:正常对照组;B:损伤对照组;C:40mmol/L 牛磺酸组;D:80mmol/L 牛磺酸组。

NaCl,100mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,10mmol/L Tris,10g/L 十二烷基肌氨酸钠;B液:Triton-X100;C液:DMSO(分析纯);用时按 A:B:C=89:1:10 混合。5g/L 低熔点、7g/L 正常熔点琼脂糖凝胶均用 PBS 液配制。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分组与预处理

在无菌操作下摘除家兔眼球,分离并去除视网膜神经层,于眼杯内滴加 2.5g/L 胰酶和 0.2g/L 乙二胺四乙酸各 0.5mL,37℃ 消化 60min。用吸管吹打 RPE 面使细胞脱落,1000r/min 离心 10min。加入培养基(DMEM 13.4g,L-谷氨酰胺 330mg/L,加入 1000mL 三蒸水中,其中 FBS 浓度为 200mL/L)吹打后,调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,在含 50mL/L  $\text{CO}_2$  的 37℃ 培养箱中培养。3d 换液一次。培养 20d 左右细胞分裂成片后行 1:2 传代,取 2~4 代用于实验<sup>[2]</sup>。将 RPE 细胞随机共分为四组,每组 4 管,制成细胞悬液,调整细胞浓度为  $10^6$  个/mL,4℃ 中保存,用前离心。A 组(正常对照组)不光照不给药持续培养 24h;B 组(阳性对照组)光照后不给药持续培养 24h;C 组持续光照 1h 后加入 40mmol/L 浓度牛磺酸液继续培养 24h;D 组持续光照 1h 后加入 80mmol/L 浓度牛磺酸液继续培养 24h。光照在培养箱内密闭进行,无自然光干扰。与被照细胞同一水平的光照强度为  $(12600 \pm 500)$  Lx(用 ST-III 型照度计测得),光照时该水平温度变化在 36.5℃ ~ 37.5℃ 之间。

### 1.2.2 单细胞电泳

根据 Singh 等方法加以改良。

#### 1.2.2.1 制片

7g/L 正常熔点琼脂糖凝胶 100 $\mu\text{L}$  溶解后滴加在磨砂载玻片上,用盖玻片使胶均匀展开,4℃ 下固化 10min,即第 1 层胶。取混有新鲜制备细胞悬液的低熔点琼脂糖凝胶 75 $\mu\text{L}$  加入到第 1 层胶上,立即盖上盖玻片,4℃ 固化 5min,即第 2 层胶,轻轻揭去盖玻片待裂解。

#### 1.2.2.2 裂解

将凝胶载玻片浸没于新配制的裂解液中(pH=10)裂解 1h,除去细胞浆。

#### 1.2.2.3 解旋

从裂解液中取出载玻片,用蒸馏水冲洗 5min 后移入水平电泳槽内解旋 30min(1mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,300mmol/L NaOH,pH=13)。

#### 1.2.2.4 电泳

电压 20V,电流 90mA,低温避光,电泳时间 40min。

#### 1.2.2.5 染色和观察

0.4mol/L Tris 漂洗 5min,然后每张胶片滴加 30 $\mu\text{L}$  溴化乙锭(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )染色,放置 4℃ 避光保存,24h 内阅片。于倒置荧光显微镜下观察并拍照,每片随机观察 50 个细胞。计数拖尾细胞百分率,用彗星图像处理软件测量拖尾细胞尾长。

统计学分析:每组共观察 200 个细胞,数据经 SPSS 13.0 软件处理,应用随机设计方差分析检验统计,检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

表 1 牛磺酸对家兔 RPE 细胞 DNA 光损伤的影响  $\bar{x} \pm s$

分组	n(细胞数)	彗星细胞百分率(%)	细胞尾长( $\mu\text{m}$ )
A 组	200	20.21 $\pm$ 5.39	19.46 $\pm$ 6.24
B 组	200	85.36 $\pm$ 5.58	81.34 $\pm$ 5.63
C 组	200	67.35 $\pm$ 6.44	63.40 $\pm$ 6.11
D 组	200	26.82 $\pm$ 5.45 <sup>a</sup>	22.62 $\pm$ 7.45 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P>0.05$  vs A 组。

## 2 结果

实验中观察到涂片细胞数适中,杂质干扰少,DNA 分布均匀,清楚地反映了 RPE 细胞损伤与牛磺酸保护作用情况。阳性对照组(B 组)在光损伤后 RPE 细胞显示典型头尾分明的彗星图像,随着牛磺酸浓度的增加,光损伤造成的晶状体上皮细胞 DNA 损伤程度明显减轻,80mmol/L 牛磺酸组(D 组)与 40mmol/L 浓度牛磺酸组(C 组)相比对细胞的保护作用更加明显,在光损伤后细胞仍保持圆形较少拖尾,接近于正常细胞形态,与正常对照组(A 组)相比并无明显差异( $P>0.05$ )。应用随机设计方差分析做统计学处理数据,计算 A,C,D 组与对照 B 组间以及各实验组间对比的  $F$  值,结果显示正常对照组(A 组)及各浓度牛磺酸组(C,D 组)细胞的尾长、彗星细胞百分率与阳性对照组(B 组)相比有显著差异( $F=695.302$ , $P<0.01$ );而正常对照组(A 组)与 80mmol/L 浓度牛磺酸组(D 组)细胞的尾长、彗星细胞百分率相比无显著差异( $t_{\text{尾长}}=1.842$ , $t_{\text{百分率}}=2.361$ , $P>0.05$ ,图 1,表 1)。

## 3 讨论

牛磺酸(2-氨基乙磺酸)是体内含量最丰富的含磺氨基  $\beta$ -氨基酸,以游离形式存在于人体各种组织,但不参与蛋白质的合成。过去认为牛磺酸是无功能的终末代谢产物,近年来研究证明牛磺酸具有广泛的生物学作用。血液、免疫、生殖系统视觉功能和视网膜结构都需要牛磺酸,它还作为中枢性神经递质调节中枢神经系统。研究发现牛磺酸具有调节细胞钙稳定、清除氧自由基、抑制脂质过氧化、维持细胞渗透压、稳定细胞膜等多种作用。在心血管系统有抗心律失常、心肌保护和降低血压等作用<sup>[3]</sup>。有研究表明,晶状体细胞膜受损导致细胞内游离氨基酸丢失,而晶状体中谷氨酸的含量明显降低可影响谷胱甘肽的合成而促使形成白内障,而给予一定量牛磺酸后,晶状体细胞膜稳定性及抗脂质过氧化能力逐渐恢复,从而游离氨基酸含量亦相应提高,提示牛磺酸对白内障有一定治疗作用<sup>[4]</sup>。

RPE 含有大量的黑色素粒,是进入眼底光线的主要吸收部位。由于细胞内线粒体等膜性结构丰富,代谢活跃,并且处于高氧环境,长期接受光照刺激,易受自由基的

攻击。临床观察发现,与光的慢性损害密切相关的老年黄斑变性的早期病变显示玻璃膜疣,提示 RPE 的损伤变性<sup>[5]</sup>。还有研究结果表明,视网膜光化学损伤过程中 RPE 的改变最先发生,而光感受器的改变为继发性的。因此,RPE 光损伤可能是视网膜光损伤的关键部位。视网膜光化学损伤的机制有以下几点:(1)由视色素介导的损伤;(2)自由基与脂质过氧化物:光照激发氧自由基发生过氧化反应;(3)眼部色素:黑色素对视网膜有保护作用,脂褐素可激发活性氧来损伤组织;(4)细胞因子的作用:光损伤后释放内源性细胞因子(碱性成纤维细胞生长因子等)以保护光感受器细胞;(5)钙超载的作用:Ca<sup>2+</sup>依赖的内源性核酸内切酶被激活引起细胞凋亡时 DNA 降解;(6)细胞凋亡:在光致视网膜损伤中,细胞凋亡是感光细胞和 RPE 细胞丢失的主要机制。有关报道显示抗氧化剂如人参皂甙和维生素 E 等,对于视网膜光损伤有一定的治疗作用,可以抵抗 RPE 细胞的氧化损伤。

单细胞凝胶电泳是近年来在多种检测技术基础上逐步发展起来的一种检测哺乳类有核细胞 DNA 断裂的新技术,其中 DNA 迁移的长度与 DNA 片段长短有关,而 DNA 迁移的量与 DNA 断裂的程度有关,它能够对单个细胞的 DNA 损伤进行研究,避免了只能对细胞群体的 DNA 改变进行检测的不足,适用范围广,敏感性高,采用该技术与以往其它 DNA 片断检测法相比有较明显的优越性。

本实验应用单细胞凝胶电泳的方法检测了牛磺酸对体外培养的兔 RPE 细胞光损伤的保护作用,实验中观察到 80mmol/L 浓度牛磺酸组与正常对照组相比并无明显差异( $P>0.05$ ),40mmol/L 浓度牛磺酸组 RPE 细胞对可见光的损伤亦有抵抗作用,提示牛磺酸对体外培养的 RPE 细胞可见光损伤有明显的保护修复作用,且呈剂量依赖的量效关系,即随着牛磺酸浓度的增加,其提高细胞抵抗光损伤及促进细胞 DNA 修复的能力也随之增加。研究表明,由于细胞对抗损伤的个体差异性不同,因此实验中观察到在拖尾细胞百分率及细胞尾长方面存在轻微的不均

现象,但仍能从整体上反应细胞的损伤程度和保护因素的作用效果。视网膜光化学损伤与脂质过氧化有关,光照使细胞内 SOD 水平下降,或同时伴有自由基的增加,细胞内有害自由基得不到及时清除,自由基进而攻击多不饱和脂肪酸,使 RPE 细胞核膜、线粒体膜和其它细胞器膜内的脂类受到不可逆的破坏,功能受损,严重者导致生物膜溶解和细胞死亡,造成光化学损害。RPE 受损后,使血-视网膜外屏障破坏,同时影响光感受器的营养和代谢等多种功能,光感受器变性,因而加重了视网膜光化学损伤。总结先前此领域的研究成果,推测本实验中牛磺酸是通过影响 RPE 细胞的代谢,降低脂质过氧化物含量,稳定生物膜,提高 SOD 活性来发挥其抗自由基作用。更深入的研究认为,牛磺酸可与次氯酸或次氯酸金属蛋白复合物反应,清除过多的羟自由基,同时还可以通过其调节渗透压作用,抑制细胞水肿,调节细胞内 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup>浓度和水分的的作用。

综上所述,抗氧化剂牛磺酸具有很强的抗脂质过氧化和自由基清除作用,能够显著提高兔 RPE 细胞对抗光损伤的能力,可为抗氧化药物在眼科临床及职业相关光损伤眼病中的应用提供实验借鉴。

#### 参考文献

- 1 Katz ML. Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34(3):359-370
- 2 刘学政,侯瑞鹏,张鹏. 维生素 C 对光照后兔视网膜色素上皮细胞内 B 细胞淋巴瘤表达的影响. *眼视光学杂志* 2006;8(6):374-375
- 3 袁国平,陈赛贞. 牛磺酸应用研究进展. *海峡药学* 2004;16(3):20-23
- 4 宋秀君,王仁杰. 牛磺酸对半乳糖性白内障大鼠房水和晶状体游离氨基酸的含量的影响. *中国药理学和毒理学杂志* 2000;12(3):225-228
- 5 戈升荣,俞一心,谢更新. 丹酚酸的药理作用. *中药材* 2002;25(9):683-686