

血-视网膜屏障的发育与大鼠硒性白内障形成的关系

陆萍

作者单位:(201908)中国上海市宝山区罗店医院眼科

作者简介:陆萍,本科,主治医师,研究方向:白内障。

通讯作者:陆萍. Lu_ping75@126.com

收稿日期:2017-04-27 修回日期:2017-11-06

Relationship between blood-retinal barrier development and formation of selenite nuclear cataract in rat

Ping Lu

Department of Ophthalmology, Shanghai Baoshan Luo Dian Hospital, Shanghai 201908, China

Correspondence to: Ping Lu. Department of Ophthalmology, Shanghai Baoshan Luo Dian Hospital, Shanghai 201908, China.

Lu_ping75@126.com

Received:2017-04-27 Accepted:2017-11-06

Abstract

• **AIM:** To investigate the relationship between development of blood-retinal barrier and formation of selenite nuclear cataract in rat.

• **METHODS:** Activity of GPx, MDA level in lens and selenium content in the eyeballs of different ages rats were determined. Besides, lanthanum hydroxide [La(OH)₃] tracer method was used to detect development status of blood-retina barrier at different ages.

• **RESULTS:** The result showed that the enzyme activity of GPx was highest in young rats before open eyes, but then decreased gradually with age. Distribution of La(OH)₃ in retinal pigment epithelial layer of 20-day-old rats was significantly less than 11-day-old rats. Injecting sodium selenite to 9-day-old rats, lanthanum hydroxide increased obviously and extended to the inner layers of the retina after 48h, and the retinal pigment epithelial layer was damaged seriously; while injecting sodium selenite to 18-day-old rats with the same dose, number of lanthanum hydroxide decreased significantly and did not extend to the inner layer after 48h. Before opening eyes, the content of MDA in the lens of rats was the highest, and decreased significantly after opening eyes. The Se group was 5 times as that of the control group. Besides, in these groups of rats, selenium content in the eyeballs and MDA level in the lens were in agreement with the change of La(OH)₃ distribution.

• **CONCLUSION:** These results indicated that antioxidant capacity in the eyelid unopened rats is not the main reason for selenite induced cataract formation. The real reason is that blood-retina barrier development is not

mature in the eyelid unopened rats.

• **KEYWORDS:** rat; blood-retinal barrier; sodium selenite; cataract

Citation: Lu P. Relationship between blood-retinal barrier development and formation of selenite nuclear cataract in rat. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(12):2218-2221

摘要

目的:探讨大鼠硒性白内障形成是否与血-视网膜屏障的发育情况有关。

方法:测定了不同年龄段大鼠晶状体中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性、丙二醛(MDA)水平以及眼球中的硒含量;并采用氢氧化镧[La(OH)₃]示踪法观察不同年龄段血-视网膜屏障的发育情况。

结果:开眼前幼鼠GPx的酶活性最高,之后随着年龄的增长而逐渐下降;出生第20d大鼠视网膜色素上皮层的La(OH)₃分布显著少于出生第11天龄幼鼠。对出生第9d大鼠注射亚硒酸钠(Na₂SeO₃)48h后,La(OH)₃大量进入视网膜的内层,视网膜色素上皮层受到严重破坏;而注射相同剂量Na₂SeO₃的18天龄大鼠在48h后,只有少量的La(OH)₃进入。开眼前大鼠晶状体中MDA含量最高,开眼后下降显著;Se组是对照组的5倍。再者,大鼠眼中的La(OH)₃分布与眼球中的硒含量、晶状体中的MDA水平的变化基本一致。

结论:亚硒酸钠诱导形成的硒性白内障主要原因是幼鼠血-视网膜屏障发育不成熟,而不是抗氧化能力。

关键词:大鼠;血-视网膜屏障;亚硒酸钠;白内障

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.12.07

引用:陆萍. 血-视网膜屏障的发育与大鼠硒性白内障形成的关系. 国际眼科杂志 2017;17(12):2218-2221

0 引言

白内障为常见的致盲性疾病,凡是能引起晶状体混浊都可称为白内障。当今,白内障已经成为中国乃至全球致盲的最主要原因。白内障的发生与年龄有一定的关联,因此,随着全球人口老龄化,白内障患病率也在不断增加。目前,白内障手术治疗效果理想,技术也比较成熟,然而药物治疗方面相对滞后。因此,阐明白内障的发病机制进而找到有效的治疗手段是目前十分重要的研究课题之一。血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的结构主要分内层视网膜屏障和外层视网膜屏障两部分。其中内层血-视网膜屏障由视网膜微血管内皮细胞及细胞间紧密连接构成,外层血-视网膜屏障由色素上皮细胞构成。与血液、视网膜组织液与脉络膜组织液相分离,避免血液中某些有害成分如免疫复合物、淋巴毒素等对视网膜的侵害。因此,BRB对眼睛起到重要的保护作用;反之,BRB

一旦受到破坏,会导致严重的视力缺损。Ostadolova 等^[1]率先发现给出生后 10d 的大鼠幼鼠注射亚硒酸钠可诱发产生核性白内障。张家萍等^[2]进一步证明了 Na_2SeO_3 能够诱发成熟白内障。主要用于模拟人类老年性白内障之一就是亚硒酸钠诱发的白内障动物模型,其机制为过量的亚硒酸钠诱发产生大量的活性氧,损伤幼鼠的晶状体。硒性白内障模型因其迅速、方便,被广泛用于研究白内障形成的各种机制。血-视网膜屏障与硒性白内障之间是否存在关联,鲜有报道。本研究通过测定不同天龄注射亚硒酸钠大鼠的谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性、晶状体中的丙二醛(MDA)水平以及眼球中的硒含量,并观察血-视网膜屏障的发育情况,研究血-视网膜屏障的发育对大鼠硒性白内障形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 本次试验材料为体质量 240~300g 成年雌、雄性 Wistar 大鼠,纳入研究的大鼠共计 66 只 132 眼,购于上海市疾病预防控制中心,将其饲养于带空调的实验室,室内温度保持在 $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。幼鼠出生当天记为出生后第 1d。本次试验已获得本市实验动物伦理审查委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 大鼠晶状体的剥离 试验中,将大鼠分为 5 组(共 30 只 60 眼),每组 6 只 12 眼:A 组:9 天龄;B 组:22 天龄,也即开眼后第 5d;C 组:2 月龄;Se 组:硒性白内障组,将亚硒酸钠溶于无菌的生理盐水,分别在出生后第 9、11、12、13d 于大鼠颈背部注射剂量为 22nmol/g B.W. (body weight) 的亚硒酸钠溶液,选取 22d 龄大鼠作为试验材料;CK 组:对照组,用同等体积的无菌生理盐水代替亚硒酸钠溶液,做硒性白内障同样的处理,选取 22d 龄大鼠作为试验材料。在 A 组、B 组、C 组、Se 组和 CK 组饲养时间点,迅速将大鼠双眼球摘除,每只大鼠的两个眼球作为一个样品,放置于冰冷的 PBS 缓冲液中,将晶状体快速剥离,然后储藏于 -80°C 冰箱内,备用。在无菌条件下,用匀浆器研磨晶状体组织,制备晶状体匀浆,再置离心机中 12000r/min 离心 10min (温度调至 4°C),取上清液,备用。

1.2.2 谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定 材料如 1.2.1 处理,A、B、C、Se、CK 每组 3 个样品。采用 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)比色法测定 GPx 活性^[3]。蛋白浓度用 Bradford 法^[4]确定,以牛血清蛋白(BSA)作为标准品。

1.2.3 大鼠血-视网膜屏障的电镜观察 将大鼠分为 4 组(共 12 只 24 眼):出生后第 11d、出生后第 20d、9 天龄注射亚硒酸钠 35nmol/g B.W. 后的第 48h、18 天龄注射亚硒酸钠 35nmol/g B.W. 后的第 48h。每组 3 只大鼠。参照文献^[5],制备透射电镜观察的样品。大鼠腹腔注射 9% 水合氯醛($0.40\text{mL}/100\text{g}$)进行麻醉,将大鼠四肢固定于实验台上。用剪刀打开胸腔,将输液针插入心脏的主动脉,灌入生理盐水,等到流出的液体是清亮的,然后灌注氢氧化镧 [$\text{La}(\text{OH})_3$] 固定液。完成固定后,取出眼球,浸泡于氧化镧前固定液。然后按照透射电镜的样品制备流程,制备样品。置于透射电镜下观察血-视网膜屏障的发育情况。

1.2.4 脂质过氧化的降解产物 MDA 含量的测定 材料如 1.2.1 处理,在 A、B、C、Se、CK 组,每组 3 个样品。脂质过



图 1 大鼠硒性白内障 对 22 天龄大鼠开眼前注射亚硒酸钠。

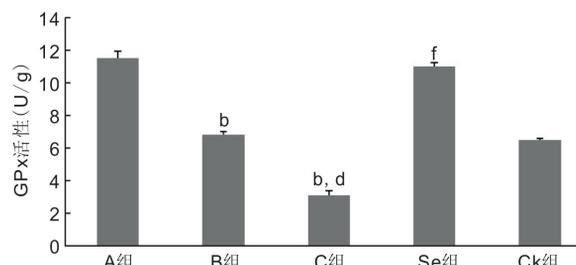


图 2 不同年龄段大鼠晶状体中 GPx 活性 ^b $P < 0.01$ vs A 组; ^d $P < 0.01$ vs B 组; ^f $P < 0.01$ vs CK 组。

氧化的降解产物,按照文献^[6]进行测定,以每克蛋白中所含 MDA 的 nmol 表示。测试严格按照试剂盒说明进行。

1.2.5 大鼠眼球中硒含量的测定 利用氢化物发生原子荧光光谱法(HG-AFS)检测大鼠眼球中的硒含量^[6]。大鼠分为 4 组(共 24 只 48 眼):出生后第 9d、出生后第 18d、出生后第 9d 注射 Na_2SeO_3 35nmol/g B.W. 后的第 24h、出生后第 18d 注射 Na_2SeO_3 35nmol/g B.W. 后的第 24h。每组 6 只大鼠,每只大鼠的两个眼球作为一个样品。制备样品:精确称取样品于微波消解管中,加入 5mL 硝酸、2mL 双氧水,在温度为 200°C 的条件下微波消解 1h。消解后体积约 8~9mL,加入 0.1g 硫脲、1mL 浓盐酸,转移至 10mL 容量瓶中,定容,摇匀待测。制备标准曲线:由仪器自动吸取 6~8 个梯度体积的 $1.5\mu\text{g/mL}$ 硒标准应用液,在选定的 AFS 仪器工作条件下测定荧光强度。在测定不同的样本前都要对进样器进行清洗。

统计学分析:采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组之间的差异比较先进行方差分析,采用 Tukey 检验进行多重比较,而 t 检验进行两组之间比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硒性核性白内障的形成 在注射 Na_2SeO_3 试验过程中发现在开眼前对新生大鼠注射 Na_2SeO_3 ,开眼后,就会有明显的核性白内障形成(图 1)。

2.2 晶状体中 GPx 的活性 大鼠晶状体的 GPx 活性随年龄增长而显著下降,刚出生大鼠的 GPx 活性最强。B 组(22 天龄大鼠)晶状体 GPx 活性相对于 A 组(9 天龄大鼠)降低了 41% ($4.71 \pm 0.52\text{U/g}$),而 C 组(2 月龄)降低 73% ($8.40 \pm 0.63\text{U/g}$)。注射亚硒酸钠诱导白内障后,GPx 活性均显著增加。与对照组相比,Se 组 GPx 的活性增加了 69% ($4.48 \pm 0.41\text{U/g}$,图 2)。

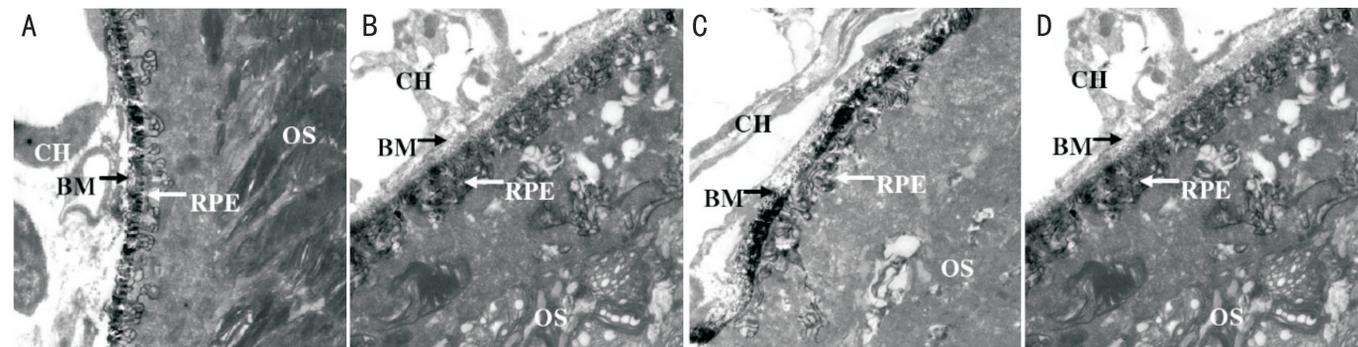


图3 大鼠血-视网膜屏障的透射电镜成像分析($\times 400$) A:正常11天龄大鼠;B:正常20天龄大鼠;C:注射 Na_2SeO_3 (35nmol/g B. W.)48h后的9天龄大鼠;D:注射 Na_2SeO_3 (35nmol/g B. W.)48h后的18天龄大鼠;CH:脉络膜;BM:Bruch膜;RPE:视网膜色素上皮层;OS:感光细胞外节段。

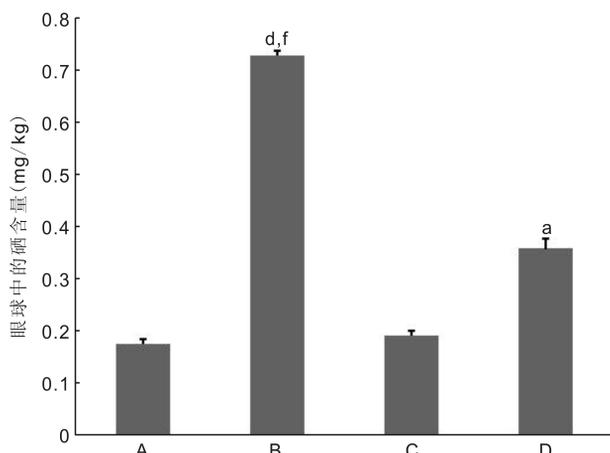


图4 大鼠眼球中的硒含量 A:正常9天龄大鼠;B:注射 Na_2SeO_3 24h后的9天龄大鼠;C:正常18天龄大鼠;D:注射 Na_2SeO_3 24h后的18天龄大鼠;^a $P < 0.05$ vs C; ^d $P < 0.01$ vs A; ^f $P < 0.01$ vs D。

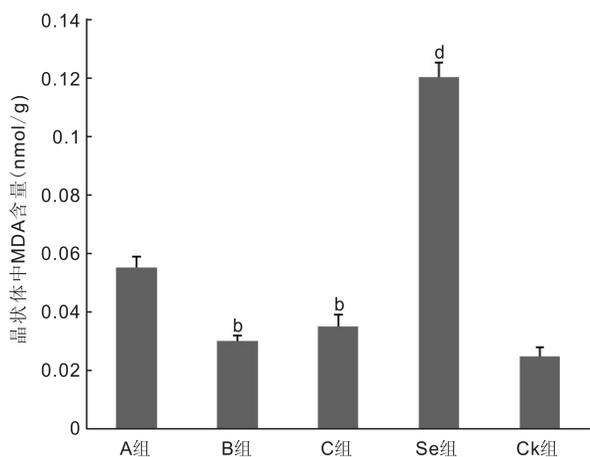


图5 大鼠晶状体中的MDA含量 ^b $P < 0.01$ vs A组; ^d $P < 0.01$ vs CK组。

2.3 血-视网膜屏障的透射电镜成像 利用 $\text{La}(\text{OH})_3$ 作为示踪剂观察不同年龄段大鼠血-视网膜屏障的通透性(图3)。11天龄的大鼠视网膜色素上皮层能够明显地观察到 $\text{La}(\text{OH})_3$ 的分布(图3A),而20天龄的大鼠 $\text{La}(\text{OH})_3$ 分布较少(图3B)。对9天龄大鼠注射 Na_2SeO_3 ,48h后发现视网膜上皮层的 $\text{La}(\text{OH})_3$ 明显增加,而且视网膜色素上皮层损伤并严重破坏(图3C);然而,对18天龄大鼠

注射相同剂量 Na_2SeO_3 ,48h后 $\text{La}(\text{OH})_3$ 的分布明显减少且没有延伸到内层(图3D)。此外,无论注射 Na_2SeO_3 与否,在出生后第19d的Bruch膜比起出生后第10d明显增厚。

2.4 眼球中的硒含量 在对大鼠眼球中硒含量测定中发现,9天龄大鼠与18天龄大鼠眼球中的硒含量分别为 0.18 ± 0.02 、 0.19 ± 0.02 mg/kg,硒含量十分接近,无显著差异。通过对9天龄和18天龄的大鼠注射 Na_2SeO_3 ,24h后眼球中硒含量都有一定程度的增加,分别增加4倍和89%,见图4。

2.5 晶状体中脂质过氧化物的降解产物MDA的含量变化 通过比较三个年龄段的大鼠晶状体中MDA含量的变化发现,开眼前大鼠晶状体中MDA含量最高,开眼后下降显著,22天龄大鼠和2月龄大鼠MDA含量变化不明显。同时,在 Na_2SeO_3 注射诱导白内障后的Se组中,晶状体中的MDA含量显著增加,几乎是对照组的5倍(图5)。

3 讨论

研究表明,GPx活性在人和鼠体内随着年龄的增长而下降^[7-9]。本研究中,进一步证实了该结论,大鼠晶状体中GPx活性随着年龄增长而下降。GPx活性在开眼前最强,这也间接说明了抗氧化能力不强并不是在开眼前注射 Na_2SeO_3 所形成白内障的主要原因。血-视网膜屏障在维持视网膜内环境稳定方面起到重要作用。研究表明,外层血-视网膜屏障功能障碍能够引起氧化的低密度脂蛋白诱导的视网膜色素上皮层细胞衰老。为了进一步了解大鼠血-视网膜屏障的功能,本研究通过透射电镜成像来观察研究不同年龄段大鼠血-视网膜屏障变化。在11天龄的大鼠中视网膜色素上皮层明显分布着 $\text{La}(\text{OH})_3$,而在出生后20d的大鼠中只有很少的 $\text{La}(\text{OH})_3$,这结果表明11天龄的大鼠血-视网膜屏障未发育成熟;在出生后第9d注射 Na_2SeO_3 ,48h后视网膜色素上皮层中的 $\text{La}(\text{OH})_3$ 分布不仅仅量在增加,而且范围也在扩大,已经延伸至视网膜内层,这说明血-视网膜屏障主要受到 Na_2SeO_3 的破坏;而给18天龄大鼠注射 Na_2SeO_3 ,48h后在视网膜色素上皮层只有少量 $\text{La}(\text{OH})_3$ 分布,表明此时的血-视网膜屏障已经发育成熟,可以抵抗 Na_2SeO_3 的破坏,从而阻挡 $\text{La}(\text{OH})_3$ 的向内延伸。

而各组大鼠眼球硒含量的差异进一步证实了上述结果。大鼠硒含量在开眼前注射 Na_2SeO_3 是在开眼后注射的近2倍。这与前人的研究类似^[10]。前人研究表明,对

30天龄大鼠注射 Na_2SeO_3 并不能引起眼中硒含量的增加^[11]。这些都表明在开眼前注射 Na_2SeO_3 要比开眼后注射对晶状体细胞造成的损伤严重得多。Gupta 等^[12] 认为 Na_2SeO_3 能够渗透到眼睛内部后,对晶状体造成损伤,使得晶状体蛋白发生沉积,出现混浊^[13]。大鼠在开眼前,血-视网膜屏障发育还没有完全成熟, Na_2SeO_3 容易大量涌入眼中,影响晶状体细胞的正常代谢,从而造成白内障;在开眼后,血-视网膜屏障发育成熟,发挥重要的保护作用,阻碍 Na_2SeO_3 进入眼内。因此,只有少量 Na_2SeO_3 进入眼内,并不足以造成白内障。

前人研究表明, Na_2SeO_3 能够导致膜损伤加剧,表现为 MDA 水平的升高。MDA 水平可以间接反映晶状体及眼组织中氧化损伤的程度^[14],基本跟本研究结果相符。眼球中的硒含量和晶状体中的 MDA 水平变化基本一致。

参考文献

- 1 Oštádalová I, Babický A, Obenberger J. Cataract induced by administration of a single dose of sodium selenite to suckling rats. *Experientia* 1978;34(2):222-223
- 2 张家萍, 侯伟敏, 刘世荣, 等. 晶状体生化的研究—— Na_2SeO_3 诱发大鼠白内障的同位素示踪研究. *中国生物化学与分子生物学报* 1985; z1:28-32
- 3 周庆, 黄强, 石卿, 等. 硒对黄粉虫谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响. *四川畜牧兽医* 2010; (3):24-25
- 4 Gupta S, Su H, Bi R, *et al.* Life and death of lymphocytes; a role in immunosenescence. *Immun Ageing* 2005;2:12

- 5 Gupta S. Molecular and biochemical pathways of apoptosis in lymphocytes from aged humans. *Vaccine* 2000;18(16):1596-1601
- 6 Gupta S. Molecular steps of cell suicide; an insight into immune senescence. *J Clin Immunol* 2000;20(4):229-239
- 7 宋建领, 王金萍, 杨斌. 细胞凋亡的研究近况. *云南畜牧兽医* 2003; 1:5-7
- 8 Zhang L, Yan Q, Liu JP, *et al.* Apoptosis: its functions and control in the ocular lens. *Curr Mol Med* 2010;10(9):864-875
- 9 Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress; signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22(3):193-201
- 10 Kyselova Z. Different experimental approaches in modelling cataractogenesis; An overview of selenite-induced nuclear cataract in rats. *Interdiscip Toxicol* 2010;3(1):3-14
- 11 Marchetti MA, Lee W, Cowell TL, *et al.* Silencing of the methionine sulfoxide reductase A gene results in loss of mitochondrial membrane potential and increased ROS production in human lens cells. *Exp Eye Res* 2006;83(5):1281-1286
- 12 Gupta S, Kalaiselvan V, Srivastava S, *et al.* Evaluation of anticataract potential of Triphala in selenite-induced cataract; *In vitro* and *in vivo* studies. *J Ayurveda Integr Med* 2010;1(4):280
- 13 Combs GF, Midthune DN, Patterson KY, *et al.* Effects of selenomethionine supplementation on selenium status and thyroid hormone concentrations in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(6):1808-1814
- 14 蔡求因, 徐国旭, 刘东伟, 等. 大鼠放射性白内障氧化损伤机制的探讨. *中华放射医学与防护杂志* 2010;30(2):177-178