

· 实验研究 ·

高氧环境下未成熟大鼠视网膜的脂质过氧化损伤

周冬¹, 钟敬祥², 肖昕¹, 刘秀香¹, 朱春玲²

(暨南大学附属第一医院 1. 新生儿科; 2. 眼科, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的 探讨氧化应激在视网膜脂质过氧化损伤发生机制中的作用。方法 21 d 出生的 60 只未成熟 SD 大鼠随机分为空气组和高氧组(每组 30 只)。空气组在空气中饲养;高氧组置于高浓度氧(95%)中饲养。ELISA 方法检测大鼠血浆 8-异-前列腺素 $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF_{2 α}) 含量,透射电镜观察视网膜超微结构改变。结果 在空气组,未成熟新生大鼠生后第 3 天、7 天和 14 天血浆 8-iso-PGF_{2 α} 分别为 19.09 ± 5.57 , 18.24 ± 5.91 , 17.00 ± 5.58 pg/mL,差异无显著性($F = 1.024$, $P = 0.3634$);在高氧组,未成熟新生大鼠生后第 3 天、7 天和 14 天血浆 8-iso-PGF_{2 α} 含量分别为 28.33 ± 5.59 , 51.20 ± 15.01 和 84.54 ± 14.85 pg/mL,差异具有显著性($F = 150.7$, $P < 0.01$),并明显高于同一时间点空气组水平($t = 2.863$, $P < 0.05$; $t = 5.073$, $P < 0.01$; $t = 11.006$, $P < 0.01$)。空气组未成熟大鼠的视网膜超微结构正常;高氧组未成熟新生大鼠在生后第 3 天视网膜超微结构即发生变化,表现为膜盘结构疏松、扭曲、断裂及线粒体显著肿胀等。结论 氧化应激可导致未成熟视网膜脂质过氧化损伤,血浆 8-iso-PGF_{2 α} 水平升高与视网膜损伤程度相关。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(2):174-176]

[关键词] 高氧; 视网膜; 8-异-前列腺素 $F_{2\alpha}$; 氧化应激; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)02-0174-03

Hyperoxia-induced retinal peroxidative injury in immature rats

ZHOU Dong, ZHONG Jing-Xiang, XIAO Xin, LIU Xiu-Xiang, ZHU Chun-Ling. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China (Zhong J-X, Email: zjx85221206@163.com)

Abstract: Objective To investigate the role of oxidative stress in the pathogenesis of retinal injury induced by hyperoxia. **Methods** Sixty immature Sprague-Dawley (SD) rats, born at a gestational age of 21 days, were randomly exposed to room air (air group, $n = 30$) or 95% oxygen (hyperoxia group, $n = 30$) immediately after birth. Plasma 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF_{2 α}) levels were determined by ELISA. The ultrastructures of the retina were observed under a transmission electron microscope. **Results** The plasma 8-iso-PGF_{2 α} contents of the air group were 19.09 ± 5.57 , 18.24 ± 5.91 and 17.00 ± 5.58 pg/mL on the 3rd, 7th and 14th days after birth, respectively ($F = 1.024$, $P > 0.05$). The plasma 8-iso-PGF_{2 α} contents in the hyperoxia group on the 3rd (28.33 ± 5.59 pg/mL), the 7th day (51.20 ± 15.01 pg/mL) and 14th day (84.54 ± 14.85 pg/mL) after birth were significantly higher than those of the air group ($t = 2.863$, $P < 0.05$; $t = 5.073$, $P < 0.01$; $t = 11.006$, $P < 0.01$). Moreover, the plasma 8-iso-PGF_{2 α} contents in the hyperoxia group increased with the prolonged hyperoxia exposure ($F = 150.7$, $P < 0.01$). The ultrastructures of retina in the air group were normal. Hyperoxia exposure resulted in abnormalities of the ultrastructures of retina, manifesting as the membrane discs rarefied, twisted and disrupted and mitochondrial swelling. **Conclusions** Oxidative stress can results in retinal injury in immature rats. An increased plasma level of 8-iso-PGF_{2 α} is related to the injury degree of retina.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(2):174-176]

Key words: Hyperoxia; Retina; 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$; Oxidative stress; Rats

未成熟儿(早产儿)往往需要氧疗。氧气是一把双刃剑,既可有效改善早产儿缺氧症状,挽救其生命,又可因长期高浓度吸氧导致未成熟的视网膜损伤,即早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity, ROP)^[1]。ROP 主要病理改变是新生血管形成和纤

维化,推测可能与氧自由基所致的脂质过氧化损伤有关^[1~3]。8-异-前列腺素 $F_{2\alpha}$ (8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$, 8-iso-PGF_{2 α}) 是细胞膜和线粒体膜多不饱和脂肪酸经活性氧自由基氧化后产生的终末产物,在体液和组织中含量极其稳定,可特异准确地反映高氧

[收稿日期] 2006-08-14; [修回日期] 2006-12-12

[基金项目] 广东省医学科研基金(984182)及暨南大学自然科学基金(620008)资助。

[作者简介] 周冬,男,硕士,主治医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者] 钟敬祥,教授,博士,硕士生导师,暨南大学附属第一医院眼科,邮编:510632。

应激所致的脂质过氧化损伤^[4]。有鉴于此,本研究以未成熟新生大鼠为模型,探讨高氧暴露下血 8-iso-PGF_{2α} 水平变化及其与视网膜超微结构损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

60 只妊娠 21 d 经剖宫产出生的未成熟 SD 大鼠随机分为空气组和高氧组,每组 30 只,每组又随机分为生后 3 d、7 d 和 14 d 亚组。空气组在空气中饲养;高氧组置于高浓度氧(95%)箱中饲养。

1.2 试剂与方法

各组大鼠于生后第 3 天、第 7 天和第 14 天时进行取材。大鼠断头取血,血液置于 EDTA 抗凝管中,3 000 r/min 离心 10 min 后取出血浆,−80℃ 低温冰箱保存,留待同批测定 8-iso-PGF_{2α} 含量(ELISA 法,试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司),结果用 $\bar{x} \pm s$ 表达,采用 SPSS10.0 统计软件包,对同一时间点不同组别、不同时间相同组别的血浆 8-iso-PGF_{2α} 含量进行方差分析和 *t* 检验。

将大鼠眼球取下后立即投入 2.5% 戊二醛中固定 1 h,用锐利刀片在赤道后部颞侧取约 1 mm × 1 mm 眼组织块,置于新鲜的戊二醛中继续固定,低温保存,应用透射电镜观察视网膜超微结构改变。

2 结果

2.1 未成熟大鼠血浆 8-iso-PGF_{2α} 的含量

表 1 可见,在高氧组,未成熟大鼠生后第 3、7 和 14 天的血浆 8-iso-PGF_{2α} 水平差异具有显著性,即随着高氧暴露时间延长,血浆 8-iso-PGF_{2α} 水平随之升高;在空气组,未成熟大鼠生后第 3、7 和 14 天血浆

8-iso-PGF_{2α} 水平无明显变化。此外,高氧组未成熟大鼠生后第 3、7 和 14 天的血浆 8-iso-PGF_{2α} 水平均显著高于空气组,差异有显著性意义。

表 1 空气组与高氧组血浆 8-iso-PGF_{2α} 含量

		(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)				
分组	例数	3 天	7 天	14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
空气组	30	19.09 ± 5.57	18.24 ± 5.91	17.00 ± 5.58	1.024	0.363
高氧组	30	28.33 ± 5.59	51.20 ± 15.01	84.54 ± 14.85	150.7	0.000
<i>t</i>		2.863	5.073	11.006		
<i>P</i>		<0.05	<0.01	<0.01		

2.2 未成熟大鼠视网膜结构

空气组:未成熟大鼠生后第 3 天、7 天和 14 天的视网膜各层组织区分明显,细胞结构完整,核膜清晰,核仁明显;神经纤维层神经微管及微丝结构清晰,突触结构完好;内、外界膜结构清楚。视细胞外节的膜盘平行排列,平面与纵轴垂直,内节中含较多量纵形的长杆状线粒体,结构清晰,无水肿及空泡样变化;外网状层和内网状层含有较多线粒体,大多呈椭圆形或圆形,结构清晰(图 1A)。高氧组:未成熟大鼠生后第 3 天的视网膜视细胞膜盘结构疏松,部分扭曲变形;内段线粒体部分肿胀,双层膜结构模糊,嵴排列出现紊乱,但尚有嵴结构,无空泡形成;外网状层和内网状层线粒体稍肿胀(图 1B)。生后第 7 天,视细胞上述改变较前明显,视细胞外节肿胀,呈不规则扩张,膜盘间隙增大,局部出现溶解断裂,膜盘内和膜盘间出现空泡;内节线粒体肿胀明显,嵴消失,部分出现空泡样变化;内、外网状层线粒体肿胀,部分嵴消失,部分呈空泡样变(图 1C)。生后第 14 天,上述改变更加明显,视细胞外节膜盘间隙明显增大,多处出现断裂、溶解,膜盘内和膜盘间出现空泡;内节线粒体肿胀呈球形,大部分呈空泡变;内、外网状层线粒体嵴模糊不清,空泡增多(图 1D)。

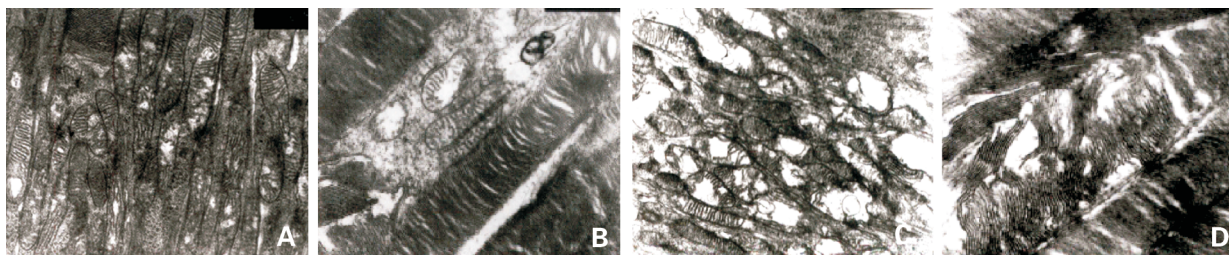


图 1 视网膜内节、外节的超微结构(×10000, ×13000)A:空气组外网状层和内网状层含有较多线粒体,大多呈椭圆形或圆形,结构清晰;B:高氧组第 3 天,视网膜视细胞膜盘结构疏松,部分扭曲变形;C:高氧组第 7 天,视网膜内节膜盘内和膜盘间出现空泡;D:高氧组第 14 天,视网膜光感受区水肿变性,结构疏松,出现碎裂、空泡样变。

3 讨论

ROP发生的根本原因在于早产和低出生体重,吸氧是极其重要的诱发因素^[1]。动物试验研究表明,吸氧对不成熟视网膜血管的发育产生重大影响,即高氧环境下,早产儿视网膜血管明显收缩和阻塞,继而新生血管形成^[5,6];前瞻性临床研究结果也提示,高浓度给氧(94%~98%)使ROP发生率明显提高,且受损程度重^[7]。

ROP的发生发展与氧自由基所致的脂质过氧化损伤有关^[3]。正常机体存在抗自由基损伤的防护系统(自由基清除系统和酶性清除系统),可有效清除机体产生的等自由基,因而不致对机体造成损害;高氧环境下,活性氧等自由基大量产生,机体抗自由基损伤的防护系统功能不足,体内氧化/抗氧化系统失衡,可导致组织细胞的各种损伤^[2]。8-iso-PGF_{2α}作为多不饱和脂类(主要是花生四烯酸)经活性氧自由基作用后产生的特异性终末产物,可以特异、准确反映体内氧化应激导致的脂质过氧化损伤水平^[2,4]。动物试验和临床研究发现,血、尿8-iso-PGF_{2α}水平测定在评估高氧或缺氧所致疾病的严重程度及判断预后具有重要价值^[8~10]。本研究发现在空气环境下生活的未成熟大鼠,其血8-iso-PGF_{2α}水平稳定,视网膜超微结构正常发育;而在高氧环境下,未成熟大鼠自生后第3天起,血浆8-iso-PGF_{2α}的水平升高;且高氧暴露时间越长,血浆8-iso-PGF_{2α}的水平越高,同时视网膜视细胞膜盘结构疏松,扭曲变形;内段及内外网状层线粒体肿胀,双层膜结构模糊,嵴排列紊乱,提示高氧可使未成熟个体的过氧化代谢作用增强,导致视网膜结构损伤。

线粒体是细胞呼吸代谢中心和能源中心,具有维持细胞内环境稳定的功能,与细胞的生命活动有着极为密切的关系。视细胞内节、外网状层和内网状层是线粒体集中的地方,耗氧量大,线粒体的供能状况可从形态学方面表现出来^[11]。由于线粒体是反应细胞损伤最为灵敏的细胞器之一,因而它成为观察细胞超微结构损伤的较理想指标^[12]。本研究表明:高氧暴露下,在血浆8-iso-PGF_{2α}水平升高的同时,未成熟大鼠视网膜的各类细胞线粒体肿胀明显,且随着暴露时间延长而进行性加重,提示与氧化应激可引起未成熟个体的线粒体等细胞器损伤。可能解释是:高氧状态下产生的自由基化学性质极为活泼,它可以和细胞的各种结构成分发生反应,最终引起过氧化损伤,组织和血浆8-iso-PGF_{2α}含量增

加^[8]。也有研究提示,高氧条件下一氧化氮(NO)生成增加。NO是一种气体氧自由基,能与高氧条件下产生的过量超氧阴离子(O₂⁻)生成氧化性更强的过氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻),使生物膜发生脂质过氧化作用,产生8-iso-PGF_{2α}等脂质过氧化物^[3,13]。大量8-iso-PGF_{2α}反过来又使生物膜不饱和脂肪酸/蛋白质比例失调,引起膜结构的一系列病理生理反应,包括细胞膜正常结构的破坏,膜流动性和通透性的改变,膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,导致胞浆Na⁺、Ca²⁺浓度升高等,形成恶性循环。线粒体膜脂质过氧化,线粒体功能抑制,ATP生成减少,进一步加重细胞损伤^[2,4]。

[参 考 文 献]

- [1] Anderson CG, Benitz WE, Madan A. Retinopathy of prematurity and pulse oxymetry: a national survey of recent practices [J]. J Perinatol, 2004, 24(3):164-168.
- [2] De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26(1-2):202-226.
- [3] Hardy P, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Vamma DR, et al. Oxidants, nitric oxide and prostanooids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy [J]. Cardiovasc Res, 2000, 47(3):489-509.
- [4] Pratico P, Lawson JA, Rokach JM, FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine [J]. Trends Endocrinol Metab, 2001, 12(6):243-247.
- [5] 王玉环,陈超,石文静,肖虹蕾,童蓓燕,周国民. 不同吸氧方式对新生鼠视网膜血管发育的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):129-132.
- [6] 石文静,陈超,周国民,肖虹蕾. 高氧诱导新生鼠视网膜病变的实验研究[J]. 中华围产医学杂志, 2004, 7(3):170-174.
- [7] Tin W, Milligan DWA, Penefather P, Hey E. Pulse oximetry, severe retinopathy, and outcome at one year in babies of less than 28 weeks gestation [J]. Arch Dis Child, 2001, 84(2):F106-F110.
- [8] 肖昕,刘秀香,周晓光,熊爱华. 氧化应激在高氧肺损伤发生中的作用及N-乙酰半胱氨酸的干预效果[J]. 中华围产医学杂志, 2006, 9(3):177-180.
- [9] 肖昕,熊爱华,陈文清,周晓光,叶贞志. 尿8-异-前列腺素F_{2a}在新生儿缺氧缺血性脑病病情评估中的价值[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(7):531-532.
- [10] Chu CY, Xiao X, Zhou XG, Lau TK, Rogers MS, Fok TF, et al. Metabolomic and bioinformatic analyses in asphyxiated neonates [J]. Clin Biochem, 2006, 39(3):203-209.
- [11] Yu DY, Cringle SJ. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease [J]. Prog Retin Eye Res, 2001, 20(2):175-208.
- [12] 过贵元,申洪. 大鼠实验性视网膜缺血组织中线粒体的形状因子定量及动态研究[J]. 中国体视学与图像分析, 2000, 5(4):239-242.
- [13] 刘雪雁,吴捷,薛辛东. 高氧致新生鼠肺损伤时肾组织一氧化氮及氧自由基的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(1):71-74.

(本文编辑:吉耕中)