

血脂异常对 ApoE 基因缺失小鼠视网膜及 Bruch 膜的影响

莫亚¹, 曾庆华², 谢礼丹², 刘小虎², 唐春燕²

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973774)
作者单位:¹(610072)中国四川省成都市,成都中医药大学附属医院眼科;²(610072)中国四川省成都市,成都中医药大学眼科
作者简介:莫亚,博士,副主任医师,研究方向:中医药防治眼底病。
通讯作者:曾庆华,教授,研究方向:中医药防治老年性眼底病。
zqhmyw@126.com
收稿日期:2011-05-30 修回日期:2011-07-27

Retina and Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice effected by dyslipidemia

Ya Mo¹, Qing-Hua Zeng², Li-Dan Xie², Xiao-Hu Liu², Chun-Yan Tang²

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30973774)

¹Department of Ophthalmology, Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China;²Department of Ophthalmology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Qing-Hua Zeng. Department of Ophthalmology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. zqhmyw@126.com

Received: 2011-05-30 Accepted: 2011-07-27

Abstract

• **AIM:** To research retina and Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice effected by dyslipidemia.

• **METHODS:** Twenty-four 2-month-old ApoE^{-/-} mice and 24 C57BL mice were randomly divided into group of normal chow and group of high fat chow, 12 mice each group. Animals were killed four months later and plasma total cholesterol (TG) levels were determined. Light microscopy and transmission electron microscopy were used to observe retina and Bruch membrane.

• **RESULTS:** The plasma TG of the group of 6-month-old ApoE^{-/-} mice high fat chow (HF) was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). The thickness of outer nuclear layer (ONL) and retinal pigment epithelium (RPE) was statistically lower than that of control group ($P < 0.05$), while the thickness of Bruch membrane was significantly higher than the control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The pathology change of photoreceptor, RPE and Bruch membrane was similar to the change of

early age-related macular degeneration (AMD).

• **KEYWORDS:** dyslipidemia; ApoE^{-/-}; photoreceptor; retinal pigment epithelium; Bruch membrane

Mo Y, Zeng QH, Xie LD, et al. Retina and Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice effected by dyslipidemia. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(9):1518-1520

摘要

目的:研究血脂异常对 ApoE 基因缺失 (apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-}) 小鼠视网膜及 Bruch 膜的影响。

方法:随机将 24 只 2 月龄 (ApoE^{-/-}) 小鼠和 24 只 C57BL/6J 小鼠分别分为高脂组和普食组, 每组动物 12 只, 喂养 4mo 后检测其体质量、血浆总胆固醇, 视网膜及 Bruch 膜行光镜和电镜检查。

结果:6 月龄 ApoE^{-/-} 高脂组的血浆总胆固醇均显著性高于对照组 ($P < 0.05$); 6 月龄 ApoE^{-/-} 高脂组外核层厚度、色素上皮细胞层厚度显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而其 Bruch 膜厚度则显著大于对照组 ($P < 0.05$)。

结论:血脂异常使 ApoE^{-/-} 动物的视网膜光感受器细胞、色素上皮细胞及 Bruch 膜发生病理改变, 其改变相似于早期年龄相关性黄斑变性的改变。

关键词:血脂异常; ApoE^{-/-}; 光感受器细胞; 色素上皮细胞; Bruch 膜

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.09.007

莫亚, 曾庆华, 谢礼丹, 等. 血脂异常对 ApoE 基因缺失小鼠视网膜及 Bruch 膜的影响. 国际眼科杂志 2011;11(9):1518-1520

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age related-macular degeneration, AMD) 是工业化国家老年人不可逆视力丢失的主要原因。血管模型学说认为 AMD 和动脉硬化有相似的风险因素和发病机制, 认为动脉硬化形成过程中血管内压力增加, 脂质进行性渗漏增加, 脉络膜毛细血管逐渐变窄, 血管压增加, 最终导致脉络膜新生血管化, 因此脂代谢异常可能是 AMD 病因的一个非常重要的风险因素^[1]。研究表明, ApoE 基因缺失 (apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-}) 小鼠在标准啮齿类饲料喂养下就可自发形成血管动脉硬化改变^[2], 是研究人类动脉硬化常用的小鼠模型^[3], 而且 Dithmar 等通过对 ApoE^{-/-} 小鼠喂养标准啮齿类饮食观察到了 Bruch's 膜的超微结构改变^[4]。因此, 我们提出假说: 如果给 ApoE^{-/-} 小鼠喂高脂饲料后其视网膜光感受器细胞、色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 及 Bruch 膜也可能出现与 AMD 相似的改变, 据此我们进行实验, 具体报告如下。

表 1 ApoE^{-/-}和 C57BL/6 小鼠体质量及血浆 TC 浓度比较

$\bar{x} \pm s$

组别	TC (mmol/L)	6 月龄体质量 (g)	2 月龄体质量 (g)	RPE 厚度 (μm)	ONL 厚度 (μm)	Bruch 膜的厚度 (μm)
ApoE ^{-/-} -普食组	9.72 \pm 0.41 ^a	32.53 \pm 1.02 ^a	22.97 \pm 0.50	7.59 \pm 1.54	96.59 \pm 5.12	0.87 \pm 0.04
ApoE ^{-/-} -高脂组	13.26 \pm 0.45 ^{c,e}	35.67 \pm 0.94 ^{c,e}	23.25 \pm 0.46	5.11 \pm 1.28 ^{b,f}	86.97 \pm 4.04 ^{b,f}	0.98 \pm 0.07 ^{b,f}
C57BL/6 普食组	5.15 \pm 0.31	25.38 \pm 0.75	21.62 \pm 1.18	7.15 \pm 0.98	94.29 \pm 6.30	0.59 \pm 0.03
C57BL/6 高脂组	6.97 \pm 0.54 ^a	28.97 \pm 0.88 ^a	21.92 \pm 1.91	7.44 \pm 1.85	97.99 \pm 4.85	0.77 \pm 0.03 ^d

^a $P < 0.05$ vs C57BL 普食组; ^c $P < 0.05$ vs C57BL 高脂组; ^e $P < 0.05$ vs ApoE^{-/-}-普食组; ^b $P < 0.01$ vs C57BL 高脂组; ^d $P < 0.01$ vs C57BL 普食组; ^f $P < 0.01$ vs ApoE^{-/-}-普食组。

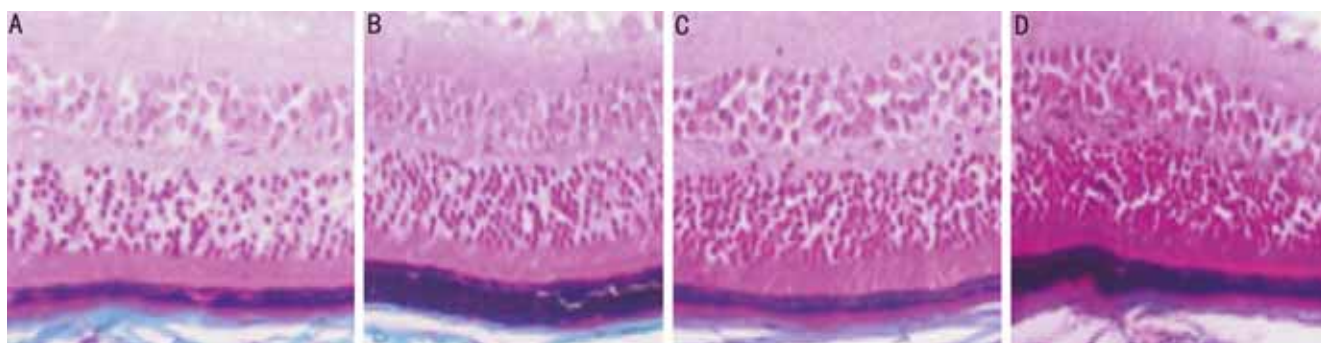


图 1 外核层和 RPE 及 Bruch 膜厚度的变化 (Masson 法 $\times 200$) A: ApoE^{-/-}-高脂组; B: ApoE^{-/-}-普食组; C: C57BL 高脂组; D: C57BL 普食组。

1 材料和方法

1.1 材料 实验用 8 周龄的雄性普食 C57BL/6 小鼠和以 C57BL/6 为背景的 ApoE^{-/-}小鼠, 分别由四川大学华西实验动物中心 (动物合格证: 川实动管质第 09 号) 和北京大学实验动物中心 (美国 Jackson 实验室引进) 提供。普通饲料和高脂饲料均由成都达硕动物实验有限公司提供。所有实验根据赫尔辛基宣言和保护及运用动物的指导原则来进行。

1.2 方法 实验分为 4 组, 24 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为: 6 月龄 ApoE^{-/-}-高脂组 ($n = 12$) 和 6 月龄 ApoE^{-/-}-普食组 ($n = 12$)。24 只 C57BL/6 小鼠随机分为: 6 月龄 C57BL/6 高脂组 ($n = 12$) 和 6 月龄 C57BL/6 普食组 ($n = 12$)。高脂组动物予高脂饲料, 普食组动物予标准啮齿类动物饲料, 饲料与水均自由摄取, 所有动物在装有清洁过滤器的笼子中饲养, 温度保持在 22 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%, 保持 12h 昼夜循环, 每周称质量, 共饲养 16wk。

1.2.1 血液生化检测血浆总胆固醇 禁食 8h 后, 在动物宰杀前 ip 镇静剂戊巴比妥钠, 用肝素化的毛细管采集股静脉血。采用日立 7170 全自动生化分析仪分析血浆总胆固醇 (total plasma cholesterol, TC)。

1.2.2 Masson 三色染色观察外核层和 RPE 及 Bruch 膜厚度 摘除左眼, 共 12 眼球, 保留约 2 ~ 3mm 长视神经组织, 并在 40mL/L 多聚甲醛 PBS 缓冲液中固定整晚, 常规乙醇脱水, 石蜡包埋, 于后极部视神经周围切片, 制 4 ~ 5 μm 的组织切片, 常规脱蜡脱水后, 行 Masson 三色染色。连接于 Sony SSC-DC398P 彩色数码摄像头连续摄取切片彩色图像, 目镜放大倍数 20 倍, 最终屏幕放大倍数为 200 倍, 采用 BI-2 000 医用图像分析系统, 每个标本随机选择 10 幅图像, 每幅图像 10 次, 测量外核层 (outer nuclear layer, ONL)、RPE 和 Bruch 膜厚度, 取 100 次测量的平均值进行分析。

1.2.3 电镜观察 RPE 和 Bruch 膜超微结构变化 摘取右眼, 每组取 2 眼球, 经 30mL/L 戊二醛预固定, 10g/L 四氧

化锇再固定, 丙酮逐级脱水, Epon812 包埋, 半薄切片光学定位, 超薄切片, 醋酸铀及枸橼酸铅双重染色, H-600IV 型透射电镜观察。

统计学分析: 用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料之间的比较采用单因素方差分析, 先行正态性检验及方差齐性检验 (方差齐用 LSD、SNK 法或 Dunnett 法, 方差不齐用 Tamhane's T2 法)。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血浆 TC 及体质量的比较 从表 1 可见, 6 月龄 ApoE^{-/-}-高脂组的血浆总胆固醇及体质量均显著性高于 ApoE^{-/-}-普食组和 C57BL 高脂组 ($P < 0.05$), ApoE^{-/-}-普食组的体质量显著性高于 C57BL 普食组 ($P < 0.05$)。

2.2 外核层和 RPE 及 Bruch 膜厚度的变化 6 月龄 ApoE^{-/-}-高脂组外核层厚度、色素上皮细胞层厚度显著低于 ApoE^{-/-}-普食组和 C57BL 高脂组 ($P < 0.05$), 而其 Bruch 膜厚度则显著大于 ApoE^{-/-}-普食组和 C57BL 高脂组 ($P < 0.05$, 表 1, 图 1)。

2.3 RPE 和 Bruch 膜超微结构变化 RPE: ApoE^{-/-}-高脂组 RPE 基底膜皱褶变短且减少, 胞质内线粒体肿胀, 可见核边聚, 胞浆中可见大量空泡; ApoE^{-/-}-普食组 RPE 基底膜皱褶减少, 胞质内线粒体轻度肿胀, 可见核边聚现象; C57BL/6 高脂组 RPE 基底膜皱褶稀疏, 胞质内仍可见轻度肿胀线粒体; C57BL/6 普食组 RPE 基底膜未见明显皱褶, 胞质内线粒体结构基本正常。Bruch 膜: ApoE^{-/-}-高脂组 Bruch 膜明显变厚, 纤维结构明显减少, 弹力层断裂, 出现大量空泡 (图 2A)。ApoE^{-/-}-普食组 Bruch 膜纤维结构不均匀, 弹力层断裂, 有空泡出现。C57BL/6 高脂组 Bruch 膜纤维结构不均匀, 弹力层断裂, 仅有少量空泡。C57BL/6 普食组 Bruch 膜纤维结构均匀, 弹力层连续, 未见明显空泡 (图 2, 箭头所指为 Bruch 膜)。

3 讨论

ApoE 是一种主要由肝脑合成的糖蛋白^[3], 是神经系统中脂质和胆固醇的主要转运者, 它也在 AMD 脂质转运

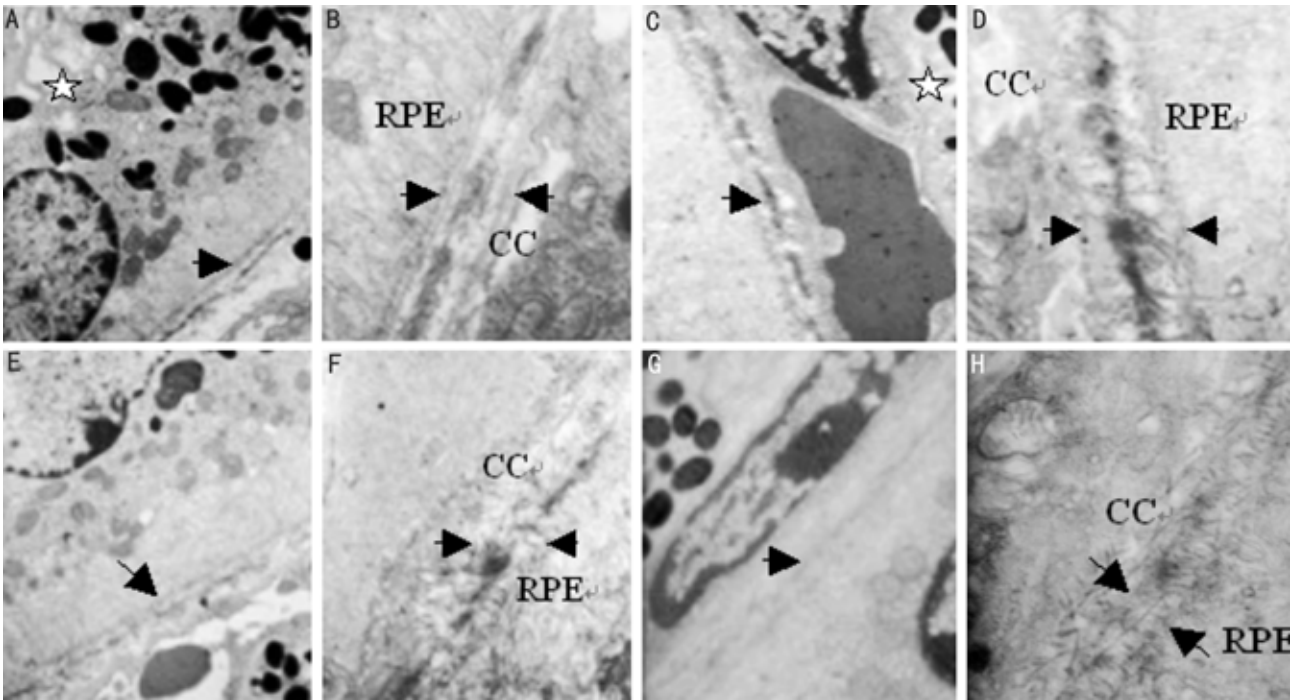


图2 RPE 和 Bruch 膜超微结构变化 A: ApoE^{-/-}-高脂组(×8000); B: ApoE^{-/-}-高脂组(×25000); C: ApoE^{-/-}-普食组(×8000); D: ApoE^{-/-}-普食组(×25000); E: C57BL 高脂组(×8000); F: C57BL 高脂组(×25000); G: C57BL 普食组(×8000); H: C57BL 普食组(×25000)。

中起作用^[4],是脂质转运蛋白,担当低密度脂蛋白受体的配体,在中枢神经系统和周围神经系统的神经元细胞膜中可见^[5]。ApoE 在血清胆固醇动态平衡之间扮演重要角色,通过它与其它胆固醇和其它脂质结合并介导它们转运进入细胞中。在中枢神经系统中,ApoE 是由神经胶质细胞产生的中央神经系统脂蛋白的主要蛋白成分,在神经再生中可见,ApoE 在中央神经系统的脂质转运和清除中扮演重要角色,细胞脂质和胆固醇平衡对保持大量神经细胞组成的视网膜功能有非常重要的作用。

基于此 ApoE 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠常导致脂蛋白代谢异常,它是研究异常脂蛋白代谢和高胆固醇血症的动物模型,它被广泛用于心血管和神经系统疾病研究中。我们在该研究中用 ApoE^{-/-}小鼠摄取高脂来研究视网膜及 Bruch 膜超微结构的改变。研究显示,6 月龄 ApoE^{-/-}高脂组小鼠和 6 月龄 ApoE^{-/-}普食组小鼠的 TC 和体质量均显著性高于对照组小鼠($P < 0.05$),6 月龄 ApoE^{-/-}高脂组小鼠的 TC 和体质量也显著性高于 6 月龄 ApoE^{-/-}普食组小鼠($P < 0.05$),而且 6 月龄 ApoE^{-/-}普食组就表现出血脂升高,喂养高脂饲料的 6 月龄 ApoE^{-/-}小鼠血脂进一步增加,再现 ApoE^{-/-}小鼠可造成高脂模型的结论(表 1)^[6]。

AMD 以视网膜中心黄斑的光感受器细胞死亡和功能紊乱、中心视力进行性丢失为特点。AMD 分为两种形式:干性或湿性。干性以 RPE 丢失为主,可导致严重的视力损害,同时伴随着广泛的 RPE 萎缩,而湿性的特点是继发生于脉络膜毛细血管(choroidal capillary, CC)的 CNV 出现^[7],因此它的病理改变影响光感受器细胞、RPE 和 Bruch 膜。因 ONL 是光感受器细胞核所在之处,它的功能异常将导致视力的受损。本研究显示,6 月龄 ApoE^{-/-}高脂组 ONL 厚度较对照组显著性降低($P < 0.01$),有研究也表明 AMD 常伴光感受器细胞功能异常和光感受器细胞丢失($P < 0.01$)^[8],因此,ONL 厚度变薄的改变符合 AMD 的病理特点。实验中观察到 6 月龄 ApoE^{-/-}高脂组 RPE 的

厚度较对照组显著性减少($P < 0.01$),推测其机制可能是血脂增高导致脉络膜血管逐渐变窄,脉络膜灌注降低,导致局部缺血缺氧,可使 RPE 细胞功能异常、萎缩,出现 RPE 变薄^[9],符合干性 AMD 的病理改变。

综上所述,ApoE^{-/-}高脂动物的视网膜光感受器细胞、RPE 和 Bruch 膜发生了相似于 AMD 的改变,可用该动物模型进行 AMD 的相关研究。

参考文献

- 1 Peponis V, Chalkiadakis SE, Bonovas S, et al. The controversy over the association between statins use and progression of age-related macular degeneration: a mini review. *Clin Ophthalmol* 2010;4:865-869
- 2 Imaizumi K. Diet and atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *BioSci Biotechnol Biochem* 2011;75(6):1023-1035
- 3 Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, et al. Absence of microbiota(germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in apoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. *J Atheroscler Thromb* 2010;17(8):796-804
- 4 Utheim A, Ritland JS, Utheim TP, et al. Apolipoprotein E genotype and risk for development of cataract and age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2008;86(4):401-403
- 5 Thakkinstian A, Bowe S, McEvoy M, et al. Association between Apolipoprotein E Polymorphisms and Age-related Macular Degeneration: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 2006;164(9):813-822
- 6 Debernardi N, Roijers RB, Krams R, et al. Microcalcifications in atherosclerotic lesion of apolipoprotein E-deficient mouse. *Int J Exp Pathol* 2010;91(6):485-494
- 7 Johnson LV, Mace BE, Saloupis P, et al. Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: A model for age-related retinal degeneration. *PNAS* 2005;33(102):11900-11905
- 8 Ramkumar HL, Zhang J, Chan CC. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Prog Retin Eye Res* 2010;29(3):169-190
- 9 Kashani AH, Keane PA, Dustin L, et al. Quantitative subanalysis of intraretinal cystoid spaces and outer nuclear layer using optical coherence tomography in neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(7):3366-3373