

膳食诱导的肥胖型 C57BL/6 小鼠视网膜神经节细胞凋亡的机制

白霞¹, 赵剑², 赵文青¹, 陈玉玲¹

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202227); 辽宁省科技厅博士启动基金项目 (No. 20121122)

作者单位: ¹(110001) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学基础医学院生理学教研室; ²(110016) 中国辽宁省沈阳市, 沈阳药科大学药理教研室

作者简介: 白霞, 博士, 讲师, 研究方向: 视网膜神经元的结构与功能。

通讯作者: 白霞. spring1216@163.com

收稿日期: 2013-12-05 修回日期: 2014-01-28

Mechanism of retinal ganglion cells apoptosis in the diet-induced obese C57BL/6 mice

Xia Bai¹, Jian Zhao², Wen-Qing Zhao¹, Yu-Ling Chen¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81202227); Doctoral Initiating Fund of Science and Technology Department of Liaoning Province, China (No. 20121122)

¹Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; ²Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xia Bai. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. spring1216@163.com

Received: 2013-12-05 Accepted: 2014-01-28

Abstract

• **AIM:** To investigate the mechanism of retinal ganglion cells (RGCs) apoptosis in the diet-induced obese C57BL/6 mice.

• **METHODS:** Mice were fed high-fat diet. After 19 weeks of feeding, the mice were divided into diet induced obesity-resistant (DIO-R) group and diet induced obesity (DIO) group, while mice of the control (CON) group were fed a basal diet at the same time. The apoptosis of RGCs was detected by TUNEL. Laser scanning confocal microscope was used to detect the intracellular calcium ion concentration.

• **RESULTS:** TUNEL staining showed apoptosis cells in ganglion cell layer (GCL) in DIO group increased and the percentage of apoptotic cells was $(6.7 \pm 1.2)\%$ which was much higher than in CON and DIO-R groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). There was no significant difference between CON group and DIO-R group ($P > 0.05$). Laser scanning confocal microscope detection showed Ca^{2+} staining intensity of RGCs in DIO group increased and its staining

intensity was significantly higher than in CON and DIO-R mice ($P < 0.01$, $P < 0.01$), whereas there was no significant difference between CON group and DIO-R group ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** Intracellular calcium ion overload might be involved in the RGCs apoptosis in the diet-induced obese C57BL/6 mice.

• **KEYWORDS:** obesity; retinal ganglion cells; apoptosis; calcium ion concentration

Citation: Bai X, Zhao J, Zhao WQ, et al. Mechanism of retinal ganglion cells apoptosis in the diet-induced obese C57BL/6 mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):399-401

摘要

目的: 探讨高脂饮食诱导的 C57BL/6 肥胖小鼠视网膜神经节细胞 (RGCs) 凋亡的机制。

方法: 高脂饲料喂养 19wk 后, 小鼠分为肥胖抵抗 (DIO-R) 组和肥胖倾向 (DIO) 组, 同时对照组 (CON) 小鼠给予基础饲料。TUNEL 法检测各组小鼠 RGCs 的凋亡情况, 并应用激光共聚焦显微镜检测 RGCs 内钙离子的浓度。

结果: TUNEL 法凋亡检测结果显示, DIO 组小鼠视网膜神经节细胞层可见较多黄色着染的凋亡细胞, 其凋亡指数为 $(6.7 \pm 1.2)\%$, 显著高于对照组和 DIO-R 组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 对照组和 DIO-R 组间比较无显著差异 ($P > 0.05$)。激光共聚焦结果显示, 与对照组和 DIO-R 组比较, DIO 组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca^{2+} 荧光染色明显增强, 其荧光染色强度比值显著升高 (均 $P < 0.01$); 对照组和 DIO-R 组视网膜神经节细胞内 Ca^{2+} 荧光染色强度无明显差异 ($P > 0.05$)。

结论: 细胞内钙离子超载可能介导了肥胖型 C57BL/6 小鼠视网膜神经节细胞的凋亡过程。

关键词: 肥胖; 视网膜神经节细胞; 凋亡; 钙离子浓度

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.05

引用: 白霞, 赵剑, 赵文青, 等. 膳食诱导的肥胖型 C57BL/6 小鼠视网膜神经节细胞凋亡的机制. 国际眼科杂志 2014;14(3):399-401

0 引言

生活方式和饮食习惯的改变, 使肥胖和超重的发生率逐年攀升。肥胖作为隐性杀手, 以其并发症严重影响着人类的健康。肥胖除能导致心血管、营养代谢^[1]、糖尿病、癌症、生殖^[2,3]等方面的疾病外, 眼部并发症^[4]的危害亦不容忽视, 特别是视网膜变性已成为发达和发展中国家致盲的一个主要原因^[5]。本研究室以往研究显示, 高脂饮食诱导的肥胖模型小鼠视网膜变性可发生在视网膜各层组织细胞中, 其中视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的凋亡十分明显^[6,7], 但肥胖引起 RGCs 凋亡

的机制研究十分欠缺,结论尚不明朗。本研究在观察肥胖模型小鼠视网膜神经节细胞凋亡改变的基础上,应用激光共聚焦显微镜检测 RGCs 内钙离子的浓度,以其揭示 RGCs 凋亡的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康,雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,6 周龄,体质量 16 ± 2 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。27 只高脂饮食,9 只给予基础饲料(饲料构成见表 1),另外,高脂饲料中每千克另添加:盐酸硫胺素、核黄素各 15mg,盐酸吡哆醇、叶酸各 10mg,维生素 K 310mg,泛酸钙 50mg,尼克酸 20mg,氯化胆碱 1mg,肌醇 0.5mg。动物自由进食水,室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,室内相对湿度(52 ± 5)%,昼夜比 12:12 (h)。TUNEL 凋亡试剂盒(德国 Merck 公司),Fluo-3, AM ester (美国 Biotium 公司)。Olympus BX51 型光镜及照相系统,计算机图像分析系统(Leica Q win 软件),震荡切片机(美国 WPI 公司),激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 肥胖倾向与肥胖抵抗判定 基础与高脂饲料分别喂养小鼠 19wk,每周测量体质量一次。高脂饮食小鼠喂养 19wk 后,按体质量由高至低排序,体质量增长位于上游前 1/3 的小鼠判定为肥胖倾向(DIO)小鼠,体质量增长位于下游后 1/3 的小鼠判定为肥胖抵抗(DIO-R)小鼠,介于两者之间的弃之。

1.2.2 TUNEL 法检测细胞凋亡 分别取各组小鼠 3 只,迅速摘除眼球,置于 40g/L 多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片(厚度为 $6 \mu\text{m}$)。按 TUNEL 试剂盒说明书操作后,每个视网膜标本取 3 张切片,光镜观察,细胞核呈棕黄色着色者为阳性,蓝色着色者为阴性。每个标本随机抽取 3 张切片,高倍镜下,在每张切片视网膜神经节细胞层随机选取 5 个视野,计数正常细胞数和阳性细胞数,计算阳性细胞所占的百分比,即为视网膜神经节细胞凋亡指数。

1.2.3 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度 小鼠麻醉后,立即取出眼球,显微镜下沿角膜缘后 2mm 剪开眼球,去除角膜、晶状体及玻璃体,轻柔分离视网膜,并将其迅速置于准备好的保存液中。将 2% 低熔点琼脂放入含有视网膜的保存液中,保持温度在 $37^{\circ}\text{C} \sim 39^{\circ}\text{C}$ 。将含有视网膜标本的琼脂块置于震荡切片机上,以 $50 \mu\text{m}$ 厚度连续切片。将视网膜切片标本置于含有浓度为 5mmol/L Fluo-3 的共聚焦皿中, 37°C 孵育 1h,持续通氧,取出后用保存溶液冲洗切片 3 次,送实验室由专业人员检测。用 OLYMPUS FLUOVIEW 3.1a Viewer 软件拍摄图片并进行钙离子浓度的测定。每个标本选取 5 张切片,每张切片选取染色明显、细胞形态清晰的 RGCs,测量的平均数值进行荧光染色强度的对比,即细胞内钙离子浓度的变化。

统计学分析:采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,所有实验数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各指标比较采用单因素方差分析,随后采用 LSD-t 法进行两两比较。显著性检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量的变化 实验前,对照组、DIO-R 组和 DIO 组小鼠体质量无显著差异($P > 0.05$)。喂养 2wk 末,给予高脂饲料的小鼠体质量开始分化,DIO 组小鼠体质量显著高于 DIO-R 和对照组小鼠($P < 0.01$);到实验 19wk 结束时,DIO 组小鼠体质量仍显著高于 DIO-R 和对照组小鼠($P < 0.01$),而 DIO-R 组与对照组小鼠体质量

表 1 100g 基础饲料和高脂饲料的成分构成 g

饲料成分	基础饲料	高脂饲料
标准粉	35	16
麸皮	14	17
大豆粉	20	20
玉米粉	24	13
鱼粉	5	5
酵母粉	5	1
鱼肝油	1	1
猪油	-	20
酪蛋白	-	7

表 2 各组小鼠视网膜神经节细胞凋亡指数的比较

组别	n	凋亡指数($\bar{x} \pm s, \%$)
对照组	6	1.2 ± 0.4
DIO-R 组	6	1.5 ± 0.5
DIO 组	6	$6.7 \pm 1.2^{b,d}$

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs DIO-R 组。

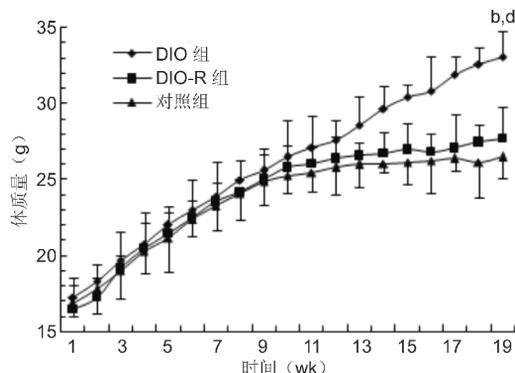


图 1 各组小鼠体质量的变化 ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs DIO-R 组。

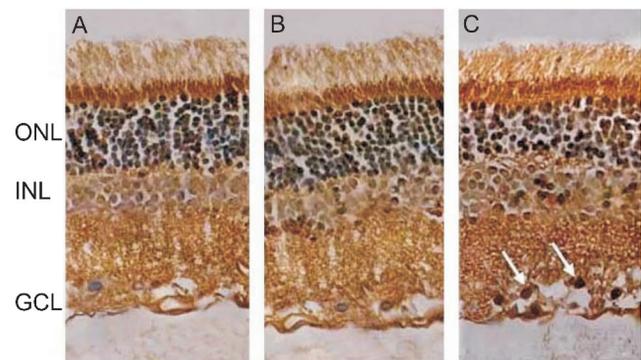


图 2 各组小鼠视网膜 TUNEL 细胞凋亡检测(HE $\times 200$) A: 对照组; B: DIO-R 组; C: DIO 组。ONL: 外核层; INL: 内核层; GCL: 视网膜神经节细胞层。

无显著性差异($P > 0.05$, 图 1)。

2.2 TUNEL 法检测各组小鼠视网膜神经节细胞凋亡情况 DIO 组小鼠视网膜 GCL 层可见较多黄色着染的凋亡细胞(图 2 箭头所示),对照组和 DIO-R 组小鼠 RGCs 偶见黄色着染者,大多数 RGCs 为蓝色着染(图 2)。利用图像分析系统计数并计算各组的 RGCs 凋亡指数。与对照组和 DIO-R 组比较,DIO 组 RGCs 的凋亡指数显著升高($P < 0.01$, 表 2)。

2.3 各组小鼠视网膜神经节细胞钙离子浓度 对照组和 DIO-R 组视网膜神经节细胞内 Ca^{2+} 荧光染色强度无明显差异($P > 0.05$),DIO 组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca^{2+} 荧

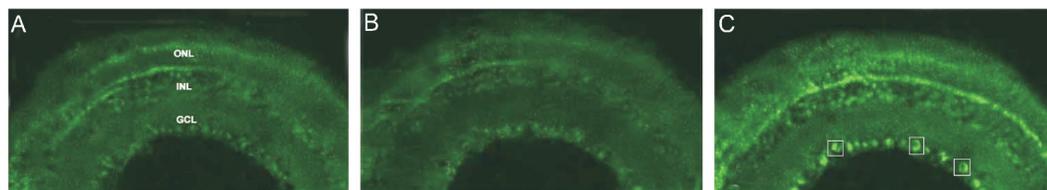


图3 激光共聚焦检测各组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca^{2+} 荧光染色强度 A, 对照组; B: DIO-R 组; C: DIO 组。 ONL: 外核层; INL: 内核层; GCL: 神经节细胞层; □: 为 Ca^{2+} 荧光染色强度增高的视网膜神经节细胞。

表3 各组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca^{2+} 荧光染色强度比值

组别	n	Ca^{2+} 荧光染色强度比值
对照组	6	1064.26±52.07
DIO-R 组	6	1078.50±83.68
DIO 组	6	1454.23±175.36 ^{b,d}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs DIO-R 组。

光染色明显增强,其荧光染色强度比值显著高于对照组和 DIO-R 组(均 $P < 0.01$),见图3及表3。

3 讨论

近些年,大量的流行病学调查和科学研究结果显示,肥胖和眼部疾病有着明显的联系。肥胖症患者和超重人群更容易患眼部疾病,包括老年性黄斑部退化症、白内障、青光眼和糖尿病型视网膜病变。这四种眼部疾病随着时间推移会逐渐恶化,最终可能导致失明。其中对糖尿病型视网膜病变的大量研究发现,在无临床可见的视网膜微血管病变之前,就已发生了视网膜神经节细胞(RGCs)的凋亡、损伤及数量减少^[8-10]。在本研究中发现,给予 C57BL/6 小鼠高脂饮食 19wk 后,视网膜 GCL 层出现了较多黄色着染的凋亡细胞。通过图像分析系统计数并进行计算,与对照组和 DIO-R 组比较, DIO 组 RGCs 凋亡指数有明显增高。这一结果表明,肥胖确实可能造成 RGCs 的损伤和凋亡,进而导致眼部疾病的发生和发展。

引起 RGCs 凋亡的因素很多,例如神经营养因子剥夺,谷氨酸的兴奋性毒性作用, RGCs 凋亡的相关基因调控,一氧化氮的神经毒性作用及氧化应激等。RGCs 损伤的主要是由于缺血、缺氧等因素引起其轴突轴浆运输阻断,神经营养因子缺乏,造成 RGCs 的原发损伤,同时产生较多的兴奋性毒素,作用于 RGCs 的表面受体,出现大量钙离子(calcium ion, Ca^{2+})内流,通过胞内信号转导,激发一系列级联式反应,激活了某些导致凋亡的基因,最终导致 DNA 断裂,细胞发生凋亡,从而引起 RGCs 的继发性损害。 Ca^{2+} 内流引起的细胞内 Ca^{2+} 超载被认为是引起细胞凋亡的主要机制之一。 Ca^{2+} 是参与多种蛋白质、磷脂和核酸分解酶的激活因子,特别是核酸内切酶,它是凋亡过程中 DNA 断裂成片段的执行者。化学毒物、细菌、病毒等通过干扰 Ca^{2+} 通道及转运系统引起钙稳态失衡,从而诱导凋亡。有研究表明,在 RGCs 凋亡的机制中,细胞内 Ca^{2+} 超载是谷氨酸兴奋毒性引起神经细胞死亡的中心环节^[11]。

那么,肥胖患者和超重人群并发的糖尿病型视网膜病变所引起的 RGCs 凋亡是否与细胞内 Ca^{2+} 超载有关,是本研究所关注的重点问题。因此在本实验研究中,应用激光共聚焦方法检测了正常、肥胖和肥胖抵抗小鼠的 RGCs 的 Ca^{2+} 荧光染色强度,发现 DIO 组小鼠 RGCs 的 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组和 DIO-R 组,这说明肥胖小鼠神经节细胞 Ca^{2+} 内流增多,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高而引起的细胞内 Ca^{2+} 超载可能是肥胖引起的视网膜病变中导致 RGCs 凋亡的原因。 Ca^{2+} 超载的因素主要有:电压依赖性钙通道、配体门控通道通透性的改变和细胞内 Ca^{2+} 的释放。然而只有在细胞变性或凋亡的后期,才会伴随钙库释放,所以胞内 Ca^{2+} 的释放并不是引起细胞内 Ca^{2+} 超载的主要原因。那么,肥胖导致的视网膜病变所引起的 RGCs 内 Ca^{2+} 超载是通过哪种钙通道通透性改变而引起的,其机制如何是我们今后需要进一步研究的问题。

参考文献

- Amundson DE, Djurkovic S, Matwiyoff GN. The obesity paradox. *Crit Care Clin* 2010;26(4):583-596
- Reis LO, Dias FG. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. *Reprod Sci* 2012;19(8):778-785
- 翟玲玲, 马玉东, 白霞, 等. 膳食诱导肥胖小鼠下丘脑 Kiss-1 和 GPR54 mRNA 表达. *中国公共卫生* 2013;29(7):999-1001
- Cheung N, Wong TY. Obesity and eye diseases. *Surv Ophthalmol* 2007;52(2):180-195
- Krishnaiah S, Das T, Nirmalan PK, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: findings from the Andhra Pradesh Eye Disease Study in South India. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4442-4449
- 白霞, 马玉东, 孟凡鑫, 等. 高脂诱导肥胖小鼠的视网膜变性及其与氧化应激的关系. *国际眼科杂志* 2011;11(12):2076-2078
- 白霞, 胡庆哲, 马玉东, 等. 高脂诱导肥胖小鼠视网膜变性的形态学改变. *解剖科学进展* 2011;17(5):450-453, 457
- McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, et al. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1077-1087
- Li P, Xu X, Zheng Z, et al. Protective effects of rosiglitazone on retinal neuronal damage in diabetic rats. *Curr Eye Res* 2011;36(7):673-679
- Szabadi K, Szabo A, Kiss P, et al. PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int* 2014;64:84-91
- Brandt SK, Weatherly ME, Ware L, et al. Calcium preconditioning triggers neuroprotection in retinal ganglion cells. *Neuroscience* 2011;172:387-397