

# 洛美利嗪对膳食诱导的 C57BL/6J 肥胖小鼠视网膜神经节细胞凋亡的保护作用

白霞<sup>1</sup>, 赵剑<sup>2</sup>, 赵文青<sup>1</sup>, 陈玉玲<sup>1</sup>

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:<sup>1</sup>(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;<sup>2</sup>(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:2013-12-30 修回日期:2014-03-03

## Neuroprotective effects of lomerizine on retinal ganglion cells in the diet-induced obese C57BL/6J mice

Xia Bai<sup>1</sup>, Jian Zhao<sup>2</sup>, Wen-Qing Zhao<sup>1</sup>, Yu-Ling Chen<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department 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: 2013-12-30 Accepted: 2014-03-03

### Abstract

• AIM: To research the neuroprotective effects of lomerizine (LOM) on retinal ganglion cells (RGCs) in the diet-induced obese C57BL/6J mice.

• METHODS: Fifty-four mice were randomly divided into two groups which were fed a high-fat diet for 19wk. One group mice were lavaged LOM by the dosage of 80mg/kg daily at the same time. The obese mice were selected and divided into diet-induced obesity (DIO) group, diet-induced obesity and lomerizine (DIO+LOM) group. The mice in the control (CON) group were fed a basal diet. The ultrastructural changes of RGCs were detected by transmission electron microscope. The cellular apoptosis was detected by TUNEL. The laser scanning confocal microscope was used to measure intracellular calcium ion concentration.

• RESULTS: Compared with the CON group, the RGCs in

DIO group showed smaller and condensation of nuclear chromatin and increased electron density of the cytoplasm, whereas the changes in DIO+LOM mice were obviously diminished. TUNEL staining showed that the number of apoptosis cells in the ganglion cell layer (GCL) increased in DIO group and the percentage of apoptotic cells was much higher than that in the CON groups ( $P < 0.01$ ). The DIO + LOM group mice showed fewer apoptosis cells and the percentage of apoptotic cells in this group were significantly decreased than the DIO mice ( $P < 0.05$ ). The Laser scanning confocal microscope detection showed  $Ca^{2+}$  staining intensity of RGCs in DIO group increased and its staining intensity ratio was significantly higher than in CON group ( $P < 0.01$ ), the  $Ca^{2+}$  staining intensity and its staining intensity ratio in DIO + LOM group were significantly decreased than the DIO group ( $P < 0.01$ ).

• CONCLUSION: Lomerizine has neuroprotective effects on damage of retinal ganglion cells in diet-induced obesity mice, which may be related to the attenuation of intracellular  $Ca^{2+}$  overload.

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

Citation: Bai X, Zhao J, Zhao WQ, et al. Neuroprotective effects of lomerizine on retinal ganglion cells in the diet-induced obese C57BL/6J mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14(4): 584-587

### 摘要

目的:探讨洛美利嗪(LOM)对高脂饮食诱导的 C57BL/6J 肥胖小鼠视网膜神经节细胞(RGCs)凋亡的保护作用。

方法:小鼠 54 只随机分为两组,高脂饲料喂养 19wk,其中一组同时每天按 80mg/kg 给予 LOM 灌胃。筛选出肥胖组(DIO)和肥胖+洛美利嗪组(DIO+LOM),对照组(CON)小鼠给予基础饲料。至第 19wk 末,应用透射电镜观察各组小鼠 RGCs 的超微结构改变,采用 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:透射电镜结果显示,与 CON 组比较,DIO 组小鼠 RGCs 体积变小,细胞质分布紊乱,核染色质发生固缩,而 DIO+LOM 组小鼠 RGCs 的形态学改变较 DIO 组明显减轻。TUNEL 法检测结果显示,与 CON 组比较,DIO 组小鼠 GCL 层可见较多的凋亡细胞,其细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ ),DIO+LOM 组 RGCs 的凋亡率与 DIO 组比较显著降低( $P < 0.05$ )。激光共聚焦结果显示,与 CON 组比较,DIO 组小鼠 RGCs 内  $Ca^{2+}$  荧光染色明显增强,其荧光

染色强度比值显著升高( $P<0.01$ ),而DIO+LOM组RGCs内 $Ca^{2+}$ 荧光染色强度较DIO组有明显下降( $P<0.01$ )。

**结论:**洛美利嗪对肥胖引起的RGCs的损伤和凋亡具有保护作用,其机制可能与减轻细胞内 $Ca^{2+}$ 超载有关。

**关键词:**肥胖;视网膜神经节细胞;凋亡;钙离子浓度;洛美利嗪

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.04.03

**引用:**白霞,赵剑,赵文青,等.洛美利嗪对膳食诱导的C57BL/6J肥胖小鼠视网膜神经节细胞凋亡的保护作用.国际眼科杂志2014;14(4):584-587

## 0 引言

近些年的研究表明,肥胖和超重除可导致心血管、营养代谢<sup>[1]</sup>、糖尿病、癌症、生殖<sup>[2,3]</sup>等方面的疾病外,眼部并发症<sup>[4]</sup>的出现也同样受到了医务工作者和研究者的广泛关注。以往研究显示,高脂饮食诱导的肥胖型小鼠视网膜变性的改变很大程度上体现为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的凋亡<sup>[5,6]</sup>,其凋亡的机制可能与细胞内钙离子(calcium ion,  $Ca^{2+}$ )超载有关。洛美利嗪(lomerizine, LOM)作为一种新型钙离子通道阻断剂,可通过减少 $Ca^{2+}$ 内流,从而减少谷氨酸兴奋毒性损伤而起到神经保护作用<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨LOM对肥胖型小鼠视网膜变性过程中对RGCs凋亡的保护作用,为防治肥胖引起的视网膜神经损伤提供一定的实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康,雄性C57BL/6J小鼠63只,6周龄,体重(16±2)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。54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:盐酸硫酸胺、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)℃,室内相对湿度(52±5)%,昼夜比12:12(h)。洛美利嗪(美国Sigma公司),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),透射电镜(日立H-600),激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司),震荡切片(美国WPI公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组与给药** 小鼠54只,随机分为两组,均高脂饲料喂养19wk,每周测量体重一次。其中一组同时每天按80mg/Kg体重给予LOM灌胃。至19wk末,两组小鼠分别按体重由高至低排序,体重增长位于上游前1/3的小鼠为肥胖倾向小鼠,即肥胖组(DIO)和肥胖+洛美利嗪组(DIO+LOM)。对照组(CON)小鼠( $n=9$ )给予基础饲料。

**1.2.2 透射电镜观察视网膜超微结构** 取各组小鼠3只,迅速摘除眼球,置于2.5%戊二醛溶液中固定。做超薄切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色,电镜下观察视网膜神经节细胞超微结构。

**1.2.3 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4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片(厚度为6μm)。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,细胞核呈棕黄色着染

表1 100g基础饲料和高脂饲料的成分构成

饲料成分	基础饲料	高脂饲料
标准粉	35.0	16.0
麸皮	14.0	17.0
大豆粉	20.0	20.0
玉米粉	24.0	13.0
鱼粉	5.0	5.0
酵母粉	5.0	1.0
鱼肝油	1.0	1.0
猪油	-	20.0
酪蛋白	-	7.0

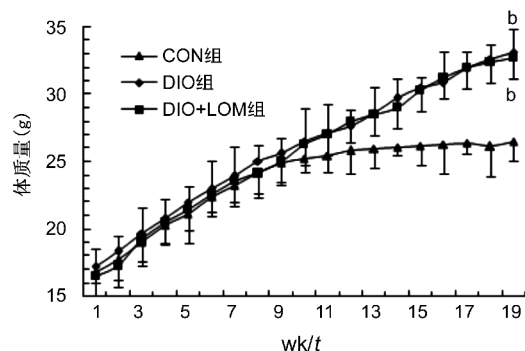


图1 各组小鼠体质量的变化 <sup>b</sup> $P<0.01$  vs CON组。

者为阳性,蓝色着染者为阴性。每个标本随机抽取3张切片,在每张待测视网膜切片上,以视网膜后极部中点为起点,至近角膜缘视网膜止点处,将视网膜分为三等份,即中央区、中间区及周边区,每张切片均在中间区视网膜随机取5个高倍视野,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。

**1.2.4 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度** 各组取3只小鼠麻醉后,立即取出眼球,轻柔分离视网膜,并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℃~39℃。将含有视网膜标本的琼脂块置于震荡切片机上,以50μm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℃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±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,各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组与DIO+LOM组小鼠体质量显著高于CON组小鼠(均 $P<0.05$ );到实验19wk结束时,DIO组与DIO+LOM组小鼠体质量仍显著高于对照组(均 $P<0.01$ ),而DIO组与DIO+LOM组小鼠体质量无显著性差异( $P>0.05$ ),如图1所示。

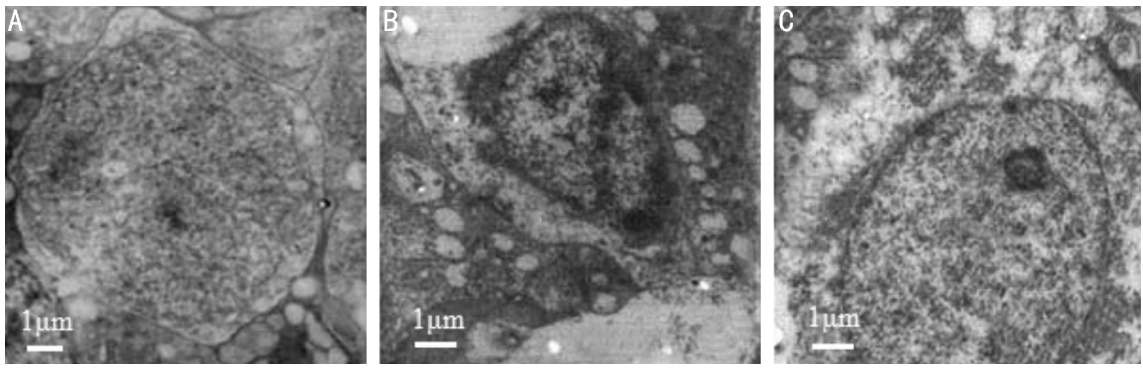


图2 各组小鼠 RGCs 的超微结构改变 (×10000) A:CON 组;B:DIO 组;C:DIO+LOM 组。

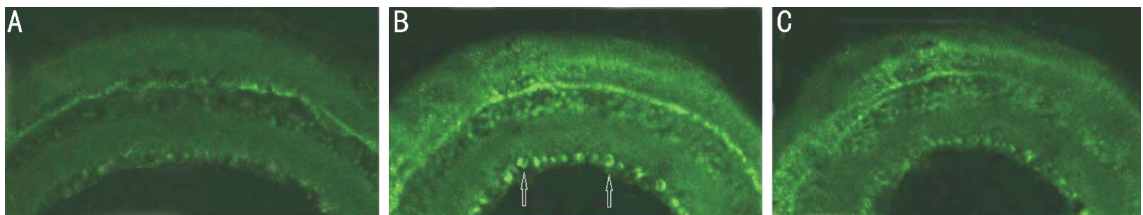


图3 激光共聚焦检测各组小鼠 RGCs 内 Ca<sup>2+</sup> 荧光染色强度 A:CON 组;B:DIO 组;C:DIO+LOM 组; ↑:Ca<sup>2+</sup> 荧光染色强度增高的 RGCs。

**2.2 透射电镜下视网膜神经节细胞超微结构改变** DIO 组小鼠视网膜超微结构的改变主要体现为,RGCs 体积变小,细胞质分布较紊乱,核膜皱缩、增厚,核染色质固缩,线粒体肿胀,嵴缺失,而 DIO+LOM 组小鼠视网膜多数 RGCs 凋亡征象明显减轻,细胞体积接近正常大小,核膜较清晰,只有少数细胞内可见线粒体肿胀、线粒体嵴模糊、变短,如图 2。

**2.3 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 层可见较多的黄色着染的凋亡细胞,DIO+LOM 组黄色着染的凋亡细胞数量与 DIO 组相比明显减少,CON 组的 RGCs 偶见黄色着染者,大多数为蓝色着染。利用图像分析系统计数并计算各组的 RGCs 凋亡指数。与 CON 组比较,DIO 组 RGCs 的凋亡指数显著升高( $P<0.01$ ),而 DIO+LOM 组 RGCs 的凋亡指数与 DIO 组比较明显降低( $P<0.05$ ),DIO+LOM 组与 CON 组之间比较,凋亡指数亦有显著差异( $P<0.05$ ),见表 2。

**2.4 各组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的浓度** 与 CON 组比较,DIO 组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光染色强度明显增强( $P<0.01$ ),DIO+LOM 组小鼠视网膜神经节细胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光染色较 DIO 组明显降低( $P<0.01$ ),与 CON 组比较,亦有显著差异( $P<0.01$ ),见图 3,表 3。

**3 讨论**

大量流行病学调查和科学研究结果表明,肥胖可引起多种眼部疾病,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。其中对糖尿病型视网膜病变的研究发现,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<sup>[8-10]</sup>。视网膜神经节细胞是视网膜中最后一级神经元,它的输出信号代表了信息在视网膜中处理的最终结果,故 RGCs 的损伤很可能严重影响清晰视觉的形成,甚至可导致患者失明,因此揭示肥胖症患者 RGCs 凋亡损伤的机制,采取针对性的预防和治疗措施,对减轻肥胖症导致的视觉损害具有重要的意义。

表 2 各组小鼠 RGCs 凋亡指数的比较  $\bar{x} \pm s$

组别	n	凋亡指数(%)
CON 组	6	1.2±0.4
DIO 组	6	6.7±1.2 <sup>b</sup>
DIO+LOM 组	6	3.6±0.7 <sup>c,e</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs CON 组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs DIO 组; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs CON 组。

表 3 各组小鼠 RGCs 内 Ca<sup>2+</sup> 荧光染色强度比值  $\bar{x} \pm s$

组别	n	Ca <sup>2+</sup> 荧光染色强度比值
CON 组	6	1064.26±52.07
DIO 组	6	1454.23±175.36 <sup>b</sup>
DIO+LOM 组	6	1223.08±83.66 <sup>b,d</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs CON 组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs DIO 组。

本研究发现,给予 C57BL/6J 小鼠高脂饮食 19wk 后,肥胖组小鼠视网膜神经节细胞超微结构发生了明显改变,其细胞体积变小,细胞质分布紊乱,核膜皱缩、增厚,核染色质固缩,线粒体肿胀,嵴缺失。TUNEL 结果显示,DIO 组小鼠视网膜 GCL 层可见较多黄色着染的凋亡细胞。其 RGCs 的凋亡率为 6.7%±1.2%,明显高于对照组。这些结果表明,肥胖确实可以造成 RGCs 的凋亡和损伤,此结论与以往研究结果相一致。

RGCs 凋亡损伤主要是由于缺血、缺氧等因素引起其轴浆运输阻断,神经营养因子缺乏,造成原发性损伤,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 Ca<sup>2+</sup> 内流。Ca<sup>2+</sup> 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,故大量内流的 Ca<sup>2+</sup> 最终导致 RGCs 的继发性损伤。亦有研究表明<sup>[11]</sup>,在 RGCs 凋亡的机制中,细胞内 Ca<sup>2+</sup> 超载是谷氨酸兴奋毒性引起神经细胞死亡的中心环节。在本研究中,应用激光共聚焦显微镜检测了 RGCs 内 Ca<sup>2+</sup> 的浓度,结果发现,DIO 组小鼠胞内 Ca<sup>2+</sup> 荧光

染色强度明显增强,这一结果提示, $\text{Ca}^{2+}$ 内流引起的胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 超载可能参与了肥胖个体RGCs的凋亡过程。因此我们设想,应用某种钙通道的阻断剂,是否可以减少肥胖个体RGCs膜对钙离子的通透性,降低细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度,从而发挥对视网膜神经节细胞的神经保护作用,缓解肥胖症患者视觉的损伤呢?

洛美利嗪,作为一种新型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂,可同时抑制电压门控性和配体门控性 $\text{Ca}^{2+}$ 通道,而且临床观察发现,LOM对血压、心率的影响非常轻微,因此本研究探讨了LOM对肥胖小鼠视网膜神经节细胞的凋亡保护作用,并揭示其作用机制。对肥胖小鼠应用LOM,可明显减轻RGCs的凋亡征象,细胞体积接近正常大小,核膜较清晰,只有少数细胞内可见线粒体肿胀、线粒体嵴模糊、变短,其细胞凋亡率与单纯肥胖组相比,亦明显下降。激光共聚焦检测结果显示,应用LOM的肥胖小鼠RGCs内的 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光染色强度显著降低,这些结果均提示,LOM确实可通过减少细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度,减轻钙超载,起到对RGCs的神经保护作用。当然,LOM的神经保护作用也可能跟以下因素有关:(1)增加眼部血液循环;(2)减少 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,拮抗谷氨酸的兴奋毒性;(3)减少磷酸酶的表达、减少氧化应激反应,使巨噬细胞的数量增加及影响caspase-3表达等。

综上所述,肥胖可引起RGCs的凋亡损伤,应用LOM可降低细胞的凋亡程度和数量,起到神经保护作用,其作用机制可能与减少细胞膜对 $\text{Ca}^{2+}$ 的通透性,减少 $\text{Ca}^{2+}$ 内流作用有关。这一实验结果可为预防和治疗因肥胖引起的视网膜神经细胞的损伤提供一个新的思路。但LOM是通

过改变哪一种 $\text{Ca}^{2+}$ 通道通透性而起作用,具体机制如何以及临床如何应用尚需进一步深入研究。

#### 参考文献

- 1 Amundson DE, Djurkovic S, Matwyoff GN. The obesity paradox. *Crit Care Clin* 2010;26(4):583-596
- 2 Reis LO, Dias FG. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. *Reprod Sci* 2012;19(8):778-785
- 3 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
- 4 Cheung N, Wong TY. Obesity and eye diseases. *Surv Ophthalmol* 2007;52(2):180-195
- 5 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
- 6 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
- 7 Ito Y, Nakamura S, Tanaka H, et al. Lomerizine, a  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, protects against neuronal degeneration within the visual center of the brain after retinal damage in mice *CNS. Neurosci Ther* 2010;16(2):103-114
- 8 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
- 9 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
- 10 Szabadi K, Szabo A, Kiss P, et al. PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int* 2014;64:84-91
- 11 Brandt SK, Weatherly ME, Ware L, et al. Calcium preconditioning triggers neuroprotection in retinal ganglion cells. *Neuroscience* 2011;172:387-397