

# 高脂诱导肥胖小鼠的视网膜变性及其与氧化应激的关系

白霞<sup>1</sup>, 马玉东<sup>2</sup>, 孟凡鑫<sup>1</sup>, 施蓓<sup>1</sup>

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目(No. 30800920); 辽宁省教育厅科研基金资助项目(No. L2010558)

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>(110024)中国辽宁省沈阳市, 沈阳医学院奉天医院 ICU 科

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: 2011-09-19 修回日期: 2011-10-27

## Relationship between oxidative stress and retinal degeneration in obese mice fed with high-fat diet

Xia Bai<sup>1</sup>, Yu-Dong Ma<sup>2</sup>, Fan-Xin Meng<sup>1</sup>, Bei Shi<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 30800920); Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department, China (No. L2010558)

<sup>1</sup>Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Department of ICU, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, 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: 2011-09-19 Accepted: 2011-10-27

## Abstract

• **AIM:** To investigate the relationship between retinal degeneration caused by high-fat diet induced obesity and oxidative stress in C57BL/6 mice.

• **METHODS:** Mice were fed a high-fat diet for 19 weeks and then divided into diet induced obesity-resistant (DIO-R) group and diet induced obesity (DIO) group, control group mice were fed a basal diet at the same time. The retinal ultrastructural changes were detected by light and transmission electron microscope. The cellular apoptosis was detected by TUNEL. Oxidative indices were detected by biochemical methods.

• **RESULTS:** The retinal and ONL thicknesses in DIO group were thinner than in control and DIO-R groups ( $P < 0.01$ ). The photoreceptors in DIO group showed characteristic features of apoptosis and necrosis; the photoreceptor disk membranes were disordered and some of them were dissolved and fractured; the retinal ganglion cell in DIO group showed smaller and condensation of nuclear chromatin and increased electron density of the cytoplasm. TUNEL staining showed apoptosis cells in ONL in DIO group increased and the percentage of

apoptotic cells was much higher than in control and DIO-R groups ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the level of malondialdehyde (MDA) increased ( $P < 0.01$ ) and the activity of superoxide dismutase (SOD) decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in DIO group.

• **CONCLUSION:** High-fat diet induced obesity may cause retinal degeneration and cellular apoptosis in C57BL/6 mice, which may be related with oxidative stress in some extent.

• **KEYWORDS:** obesity; retinal degeneration; oxidative stress; mice

Bai X, Ma YD, Meng FX, *et al.* Relationship between oxidative stress and retinal degeneration in obese mice fed with high-fat diet.

*Guoji Yanke Zazhi( Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2076-2078

## 摘要

**目的:** 探讨高脂饮食建立的 C57BL/6 小鼠肥胖模型的视网膜变性的超微结构改变及其与氧化应激的关系。

**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, 同时对照组小鼠给予基础饲料。应用光镜、透射电镜及 TUNEL 法检测 3 组小鼠视网膜超微结构的改变及凋亡情况, 并应用生化方法检测视网膜的氧化和抗氧化指标。

**结果:** 与对照组及 DIO-R 组比较, DIO 组小鼠视网膜及外核层 (ONL) 变薄 ( $P < 0.01$ ); 感光细胞出现凋亡及坏死, 其外段视盘膜排列紊乱, 部分溶解、断裂, 神经节细胞体积变小, 细胞质分布紊乱, 核染色质固缩; TUNEL 法检测结果显示, 在 ONL 层可见较多的凋亡细胞, 其细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ )。与对照组比较, DIO 组小鼠视网膜匀浆丙二醛 (MDA) 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力显著下降 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 高脂诱导的肥胖可导致 C57BL/6 小鼠视网膜变性及细胞凋亡, 其机制可能与氧化应激有一定关系。

**关键词:** 肥胖; 视网膜变性; 氧化应激; 小鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.12.005

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

## 0 引言

迄今为止, 全世界肥胖患者已超过 10 亿。肥胖患者常伴有肥胖引发的各种并发症, 如高血压、糖尿病等。随着对肥胖并发症的研究进展, 发现多种眼部疾病也与肥胖相关<sup>[1]</sup>。临床研究证实, 肥胖患者患视网膜变性的几率增加<sup>[2]</sup>。目前, 肥胖相关的视网膜变性的动物实验研究较少, 肥胖与视网膜变性的相关性也存在争议, 其发病机制尚不清楚。众所周知, 氧化应激 (oxidative stress, OS) 参与许多慢性进行性疾病的发生和发展, 肥胖患者常伴随 OS

的增加<sup>[3-5]</sup>。故我们旨在通过高脂饮食建立 C57BL/6 小鼠肥胖模型,检测其视网膜变性的超微结构改变及视网膜 OS 指标的变化,并探讨二者之间的关系。

## 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  $16 \pm 2$ g,购自上海西普尔-毕凯实验动物有限公司,合格证号:SCXK(鄂)200320005。27 只高脂饮食,9 只给予基础饲料(构成见表 1),另外,高脂饲料中每千克添加: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  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 。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)。TUNEL 试剂盒(德国 Merck 公司),SOD 和 MDA 试剂盒(南京建成生物工程公司)。

## 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的前 1/3 小鼠判定为肥胖倾向(DIO)小鼠,体质量增长位于下游的后 1/3 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 光镜及透射电镜观察视网膜超微结构** 分别取各组小鼠 3 只,迅速摘除眼球,置于 40mL/L 多聚甲醛中固定,石蜡切片(厚度为  $6\mu\text{m}$ ),HE 染色,光镜下观察视网膜的结构并测量各层厚度;另取各组小鼠 3 只,迅速摘除眼球,置于 25g/L 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,电镜下观察视网膜超微结构。

**1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡** 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者为阳性,蓝色着染者为阴性。光镜下( $\times 200$  倍)连续计数外核层(ONL)5 个视野 100 个感光细胞数和阳性细胞数,并计算其所占的百分比,即为细胞凋亡率。

**1.2.4 视网膜组织中 MDA 和 SOD 含量的测定** 各组取 3 只小鼠,分离视网膜,按照南京建成生物工程公司 SOD 和 MDA 试剂盒说明进行操作。

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,采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,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。显著性检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 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无显著性差异( $P > 0.05$ ,图 1)。

**2.2 光镜下视网膜组织形态** 对照组及 DIO-R 组小鼠 HE 染色结果显示,视网膜各层组织排列整齐,未见异常改变,而 DIO 组小鼠视网膜变薄,尤以感光细胞层变薄为主,视网膜各层排列比对照组及 DIO-R 组紊乱(图 2,3)。

**2.3 透射电镜下视网膜超微结构的改变** DIO 组小鼠视网膜超微结构的改变主要发生在感光细胞体、外段视盘及 GCL。DIO 组小鼠视网膜 ONL 层中可见感光细胞空泡变性,核浓染、固缩,核膜完整或部分破裂,其外段视盘膜排

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	35.0	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

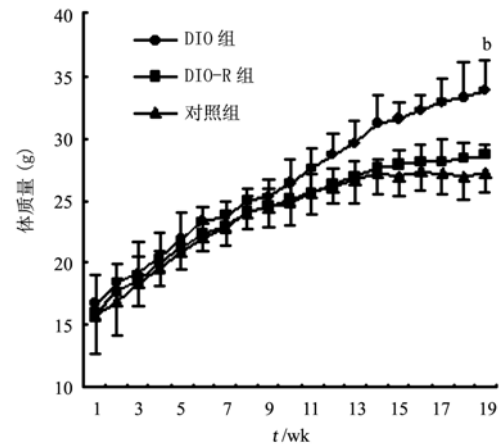


图 1 各组小鼠体质量的变化 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组和 DIO-R 组。

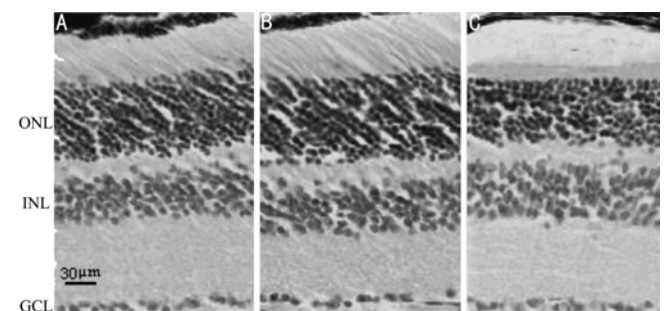


图 2 各组小鼠视网膜组织结构(HE  $\times 400$ ) A: 对照组; B: DIO-R 组; C: DIO 组。注: GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层。

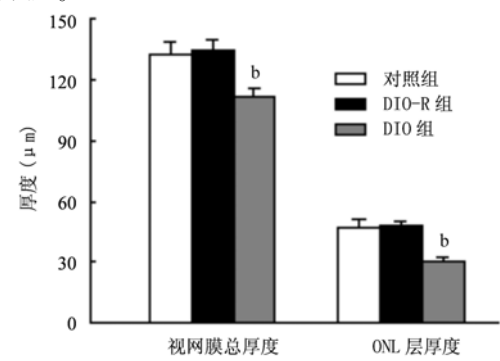


图 3 各组小鼠视网膜总厚度及 ONL 层厚度比较 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组和 DIO-R 组。

列紊乱,部分溶解、断裂。GCL 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-R 组与对照组小鼠视网膜超微结构均未见明显改变,由于两组小鼠视网膜组织结构类似,故图中只显示了对照组(图 4)。

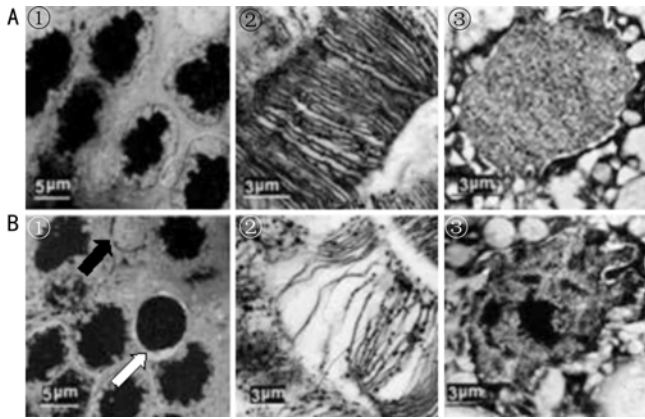


图4 视网膜感光细胞体和外段及神经节细胞的超微结构 A:对对照组 ①感光细胞体(×4000);②感光细胞外段(×10000);③神经节细胞(×12000);B:DIO组 ①感光细胞体(×4000);②感光细胞外段(×10000);③神经节细胞(×12000);➤:坏死细胞;➤:凋亡细胞。

表2 各组小鼠视网膜组织匀浆 MDA 和 SOD 水平  $\bar{x} \pm s$

组别	n (眼)	MDA ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	SOD ( $\text{kU/g prot}$ )
对照组	6	4.52 ± 1.21	55.62 ± 9.98
DIO-R 组	6	10.27 ± 2.13 <sup>b</sup>	64.33 ± 11.23 <sup>b</sup>
DIO 组	6	9.86 ± 1.75 <sup>b</sup>	40.39 ± 7.65 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

**2.4 TUNEL 法检测视网膜细胞凋亡情况** DIO 组小鼠视网膜 ONL 层见较多棕黄色着染的凋亡细胞,而 INL 和 GCL 细胞凋亡不明显。对照组和 DIO-R 组小鼠视网膜除偶见棕黄色着染者外,绝大多数细胞为蓝色着染。对照组、DIO-R 组及 DIO 组小鼠视网膜 ONL 细胞凋亡率分别为 1.3% ± 0.5%, 1.5% ± 0.5% 和 15.7% ± 1.3%。与对照组和 DIO-R 组比较,DIO 组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ )。

**2.5 小鼠视网膜组织匀浆 MDA 和 SOD 的变化** 与对照组比较,DIO-R 及 DIO 组小鼠视网膜组织 MDA 含量明显升高( $P < 0.01$ ),DIO-R 组 SOD 活力显著增强( $P < 0.01$ ),而 DIO 组 SOD 活力明显降低( $P < 0.05$ ,表 2)。

### 3 讨论

近年来,高脂饮食在人们饮食结构中所占的比例越来越重,从而使得脂代谢紊乱、肥胖等疾病发病率逐步增高,导致严重的心脑血管病变,严重影响人民健康。随着研究的进展,人们发现肥胖、脂代谢紊乱对视网膜亦有不良影响。在发达和发展中国家,视网膜变性已成为致盲的一个主要原因<sup>[6]</sup>。本研究应用高脂饮食建立 C57BL/6 小鼠肥胖模型,采用光镜、透射电镜和 TUNEL 法检测了肥胖小鼠视网膜超微结构的改变和细胞凋亡率。我们发现,肥胖小鼠视网膜总厚度变薄,以感光细胞层变薄为主,视网膜各层排列亦比对照组和 DIO-R 组小鼠紊乱。视网膜 ONL 层中可见较多的感光细胞空泡变性、核浓染、核固缩、核膜破裂等凋亡和坏死表现。感光细胞外段视盘膜排列紊乱,部分出现了溶解、断裂。凋亡的 GCL 体积变小,细胞质分布不均,核膜皱缩、增厚,核染色质固缩,线粒体肿胀,嵴部分缺失。TUNEL 法检测结果显示,视网膜 ONL 层可见较多的棕黄色着染的凋亡细胞,与对照组和 DIO-R 组比较,肥胖小鼠视网膜感光细胞凋亡率显著升高。实验结果表明,

高脂饮食建立的肥胖小鼠模型确实存在视网膜变性的超微结构改变。那么,肥胖是如何导致视网膜神经元的变性坏死呢?众所周知,在生物体中,氧化还原状态通过氧化和抗氧化酶的表达和调控来精细地调节细胞内的稳态。机体活性氧(reactive oxidative species, ROS)产生过多或/和机体抗氧化能力下降,ROS 清除不足,导致 ROS 在体内增多并引起细胞氧化损伤的病理过程,称为 OS。OS 主要是通过损伤的 DNA 碱基、蛋白质氧化产物、脂质过氧化产物等造成一系列损伤,诱发细胞凋亡,甚至生物膜溶解和细胞坏死。视网膜内外节是体内含长链不饱和脂肪酸最高的组织,内节含有丰富的线粒体,具有较高的氧张力,易受自由基攻击。MDA 是自由基与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的主要代谢产物,常被用来间接反应机体的自由基代谢的变化,对细胞具有严重的损伤作用。SOD 是体内最主要的抗氧化酶之一,是氧自由基的清除剂,可保护细胞免受损伤,对维持自由基代谢平衡起重要作用。MDA 和 SOD 的测定相互配合,MDA 含量的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度,而 SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力。本研究结果显示,DIO 小鼠视网膜组织中 MDA 的含量明显增加,而 SOD 的活力明显降低,这一结果表明,DIO 小鼠视网膜中已存在氧化和抗氧化系统的失衡,视网膜组织细胞已受到自由基攻击。肥胖本身涉及多种机制诱导分子氧产生自由基,如上调肾素血管紧张素系统,导致超氧阴离子产生增加,同时可增加巨噬细胞摄取低密度脂蛋白(LDL),增强脂蛋白氧化。此外,肥胖也伴随体内抗氧化防御机制的减弱,如我们所观察到 SOD 活力的降低,进而导致肥胖患者 OS 增加,参与肥胖相关血管并发症的发生。有研究表明,视网膜血管直径与肥胖直接相关,肥胖早期就可引起眼底血管的异常<sup>[7]</sup>。另外,肥胖常伴有脂代谢紊乱,Leung 等<sup>[8]</sup>研究显示,高密度脂蛋白(HDL-C)水平升高与视网膜动脉及静脉的狭窄程度相关。微血管的改变可能引起视网膜组织的缺血、缺氧,从而导致视网膜神经细胞的变性和坏死。总之,本研究证实了高脂饮食建立的肥胖小鼠模型的确存在视网膜变性的超微结构改变,其发病机制可能与机体的 OS 状态相关。视网膜变性的发病机制十分复杂,肥胖相关的视网膜病变的机制有待于进一步的研究发现。

### 参考文献

- Cheung N, Wong TY. Obesity and eye diseases. *Surv Ophthalmol* 2007;52(2):180-195
- Johnson EJ. Obesity, lutein metabolism, and age-related macular degeneration: a web of connections. *Nutr Rev* 2005; 63(1): 9-15
- Meigs JB, Larson MG, Fox CS, et al. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: The framingham offspring study. *Diabetes Care* 2007;30(10):2529-2535
- 沈兴平,李娟,严钟德.肥胖 2 型 DM 患者血清 E-选择素水平与氧化应激的关系. *中国病理生理杂志* 2006;22(10): 2040-2043
- 沈兴平,邹森彪,吴豪杰,等.肥胖患者氧化应激和脂肪细胞因子变化. *细胞与分子免疫学杂志* 2008;24(7):721-723
- 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
- Cheung N, Saw SM, Islam FM, et al. BMI and retinal vascular caliber in children. *Obesity Silver Spring* 2007;15(1):209-215
- Leung H, Wang J, Roehchina E, et al. Dyslipidaemia and microvascular disease in the retina. *Eye* 2005;19(8):861-868