

电针对透镜诱导型近视豚鼠脉络膜血流和内皮素-1 及其受体表达的影响

於 亭¹, 魏慧霞¹, 田庆梅², 纪海峰¹, 宋继科^{1,3,4}, 解孝锋²

引用: 於亭, 魏慧霞, 田庆梅, 等. 电针对透镜诱导型近视豚鼠脉络膜血流和内皮素-1 及其受体表达的影响. 国际眼科杂志 2021;21(8):1333-1338

基金项目: 山东省自然科学基金(No.ZR2020QH314); 山东省医药科技发展计划项目(No.2019WS570)

作者单位:¹(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学;
²(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学附属眼科医院;
³(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学眼科研究所;
⁴(250002) 中国山东省济南市, 山东省中西医结合眼病防治重点实验室 山东省高校中西医结合眼病防治技术(强化)重点实验室

作者简介: 於亭, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 屈光不正、眼底病。

通讯作者: 解孝锋, 男, 主任医师, 研究方向: 中西医结合眼底病. yankeboshi@126.com

收稿日期: 2020-12-03 修回日期: 2021-07-05

摘要

目的: 观察透镜诱导型近视豚鼠脉络膜毛细血管密度的变化, 探讨脉络膜内皮素-1(ET-1)、内皮素受体 A(ETAR) 及受体 B(ETBR) 的表达变化及电针治疗机制。

方法: 将 54 只豚鼠随机分为正常对照组(NC 组)、透镜诱导组(LIM 组)和电针+透镜诱导组(LIM+EA 组)。NC 组正常饲养, 不干预; LIM 组和 LIM+EA 组右眼配戴-6.00D 透镜片, 建立近视模型。造模 2、4wk 测量各组豚鼠屈光度、眼轴和脉络膜毛细血管密度, 实时荧光定量 PCR(q-PCR)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫组化检测各组豚鼠脉络膜 ET-1、ETAR 和 ETBR mRNA 及蛋白表达水平。

结果: 造模 2、4wk 后, 与 NC 组相比, LIM 组和 LIM+EA 组近视屈光度和眼轴均增加(均 $P < 0.001$); LIM+EA 组与 LIM 组相比, 屈光度和眼轴均减小(均 $P < 0.05$)。造模 2、4wk 后, 与 NC 组相比, LIM 组脉络膜毛细血管密度均降低($P < 0.001$), 脉络膜 ET-1、ETAR 及 ETBR mRNA 和蛋白水平均增加(均 $P < 0.05$); 而 LIM+EA 组与 LIM 组相比, 脉络膜毛细血管密度升高($P < 0.01$), 脉络膜 ET-1、ETAR 及 ETBR mRNA 和蛋白水平均降低。

结论: 在透镜诱导型近视豚鼠中, 随着屈光度和眼轴的增长脉络膜血流减少, 而电针可能通过神经调控改善了脉络膜的血流, 影响了血管剪切力, 下调 ET-1 及其受体含量以延缓近视的发生发展。

关键词: 电针; 透镜诱导型近视; 脉络膜血流; 血管剪切力; 内皮素-1

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.8.05

Effect of electroacupuncture on choroidal blood flow and the expression of endothelin-1 and its receptor in lens-induced myopic guinea pigs

Ting Yu¹, Hui-Xia Wei¹, Qing-Mei Tian², Hai-Feng Ji¹, Ji-Ke Song^{1,3,4}, Xiao-Feng Xie²

Foundation items: Shandong Province Natural Science Foundation (No. ZR2020QH314); Shandong Province Pharmaceutical Technology Development Plan Project (No.2019WS570)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China; ³Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China; ⁴Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases in Universities of Shandong, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiao-Feng Xie. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. yankeboshi@126.com
Received: 2020-12-03 Accepted: 2021-07-05

Abstract

• **AIM:** To observe the changes of the vessel density of choriocapillaris in lens-induced myopia in guinea pigs, and to explore choroidal endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor A (ETAR) and receptor B (ETBR) expression changes and the effect of electroacupuncture.

• **METHODS:** Fifty-four guinea pigs were randomly divided into normal control (NC), lens-induced myopia (LIM) and LIM+electroacupuncture (LIM+EA). The NC group was fed normally without intervention and the right eye in LIM group and LIM+EA group was covered with a -6.00D lens to establish a myopia model. At 2 and 4wk, the refraction, axial length and the vessel density of choriocapillaris in groups were measured. The expression and protein content of ET-1, ETAR and ETBR mRNA in groups were detected by the real-time fluorescent quantitative PCR (quantitative polymerase chain reaction, q-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry.

• **RESULTS:** At 2 and 4wk, compared with the the NC

group, refraction and axial length in LIM group and LIM+EA group had significantly increased (all $P < 0.001$). Compared with the LIM group, the refraction and axial length in LIM+EA group were decreased (all $P < 0.05$). At 2 and 4wk, compared with the NC group, the vessel density of choriocapillaris was decreased ($P < 0.001$) and the ET-1, ETAR and ETBR mRNA and protein levels in choroid were increased (all $P < 0.05$) in LIM group. At 2 and 4wk, compared with the LIM group, the vessel density of choriocapillaris was decreased ($P < 0.01$) and the ET-1, ETAR and ETBR mRNA and protein levels in choroid were increased in LIM+EA group.

• **CONCLUSION:** In LIM guinea pigs, the choroidal blood flow decreased with the increased of refraction and axial length, which may affect ET-1 and its receptors through vascular shear force during the development of myopia. At the same time, electroacupuncture can improve choroidal blood flow through neuromodulation and affects the vascular shear stress to down-regulate the content of ET-1 and its receptor to delay the development of myopia.

• **KEYWORDS:** electroacupuncture; lens-induced myopia; choroidal blood flow; vascular shear stress; endothelin-1

Citation: Yu T, Wei HX, Tian QM, *et al.* Effect of electroacupuncture on choroidal blood flow and the expression of endothelin-1 and its receptor in lens-induced myopic guinea pigs. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2021;21(8):1333-1338

0 引言

目前我国已成为世界第一近视大国,并且近视已成为世界范围内的主要公共卫生问题。Holden 等^[1]预测,到2050年,将有47.58亿近视患者(占世界人口的49.8%)和9.38亿高度近视患者(占世界人口的9.8%)。目前造成近视的原因尚不明确^[2],对近视的治疗仍以矫正视力的方法为主,但现有的治疗方法尚不能解决近视增长率逐年增加的问题^[3]。近视的发生发展主要与眼轴过度增长相关,其中脉络膜作为视网膜和巩膜之间的高度血管化层,其独特位置可将视网膜信号传递至巩膜,在近视的发展中起重要作用^[4]。动物实验^[5]及临床研究^[6-7]也已证实脉络膜与近视的发生发展密切相关。近来在近视研究中发现,与正常对照相比,在眼轴大于26mm的高度近视患者中内皮素-1(endothelin-1, ET-1)的血清浓度发生改变,提示ET-1可能参与近视发展,但其机制尚未完全明确^[8]。而脉络膜作为眼内高度血管化组织可能受到血管收缩因子ET-1的影响参与近视发生发展。针刺疏通经络、调畅气血,使经脉之气血旺盛通达^[9]。大量临床实践证明,针刺治疗近视相比其他治疗方案显示出更加显著效果^[10-14],但目前针刺治疗近视,仍多停留在临床研究水平,且其效应机制不清楚。本研究拟建立透镜诱导型近视豚鼠模型,探讨近视发展过程中豚鼠脉络膜毛细血管血流密度和脉络膜ET-1及其受体表达变化,并通过电针干预治疗初步阐释其对近视的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 选用雄性健康英国种三色短毛豚鼠(济



图1 豚鼠透镜诱导模型。

南西岭角生物科技有限公司),体质量100~120g,实验动物入组前均排除白内障、角膜病变、近视等眼病。饲养条件:室温保持22℃~25℃,予以12h/12h的昼夜节律,环境光照300Lx。实验期间所有豚鼠自由摄食、进水,并给予富含维生素的饲料及新鲜蔬菜等以补充维生素C。实验中严格遵守视觉与眼科动物研究协会原则,并且经山东中医药大学动物伦理委员会审核批准。

1.1.2 **主要仪器及试剂** 10g/L 盐酸环喷脱酯滴眼液(爱尔康中国眼科产品有限公司,北京);4g/L 盐酸奥布卡因(日本参天制药株式会社,日本);组织/细胞RNA快速提取试剂盒、反转录试剂盒(含基因组去除剂)、化学修饰热启动实时荧光定量PCR试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(思科捷科学仪器有限公司,山东);ET-1、ETAR、ETBR试剂盒(江莱生物科技有限公司,上海);ET-1一抗(博奥森生物技术有限公司,北京);ET-1二抗(思科捷科学仪器有限公司,山东);荧光倒置显微镜(Leica DM IL LED);带状光检影镜(苏州六六视觉科技股份有限公司);眼科超声诊断仪(Quantel Medical Ophthalmology公司,法国);光学相干断层扫描仪(SpectralisHRA+OCT,海德堡公司,德国);Elx800酶标仪(BioTek,美国);针灸针(华佗牌苏州医疗用品厂有限公司),电子诊疗仪(华佗牌SDZ-V型,苏州医疗用品厂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 **造模及分组** 45只豚鼠,随机均分为正常对照(normal control, NC)组、透镜诱导(lens-induced myopia, LIM)组、电针+透镜诱导(lens-induced myopia+electroacupuncture, LIM+EA)组,每组15只。NC组豚鼠正常饲养,不干预;LIM组豚鼠使用医用胶带将-6.00D透镜片配戴于豚鼠右眼,以建立近视模型,左眼不干预,见图1;LIM+EA组在右眼透镜诱导近视,左眼不干预,同时给予双侧合谷穴和太阳穴针刺,每天固定于上午9:00开始电针治疗,干预30min,早、晚巡视,及时发现脱落及脏的镜片,清洗干净后及时戴上,左眼为自身对照不干预。电针参数:连续波,频率2Hz,强度2mA,脉冲长度0.1s。

1.2.2 **检影验光** 各组豚鼠于2、4wk行带状检影验光检查。检查前结膜囊内用10g/L 盐酸环喷脱酯滴眼液滴眼3次,每次1滴,间隔10min,滴眼后30min由同一验光师在暗室中进行检影验光,屈光度为垂直和水平两条主子午线检验的平均值。

1.2.3 **A超检测** 眼轴长度由眼科A超测量,检查前以4g/L 盐酸奥布卡因滴眼液进行表面麻醉。眼科超声诊断仪参数设置:前房传播速度1557m/s,玻璃体传播速度

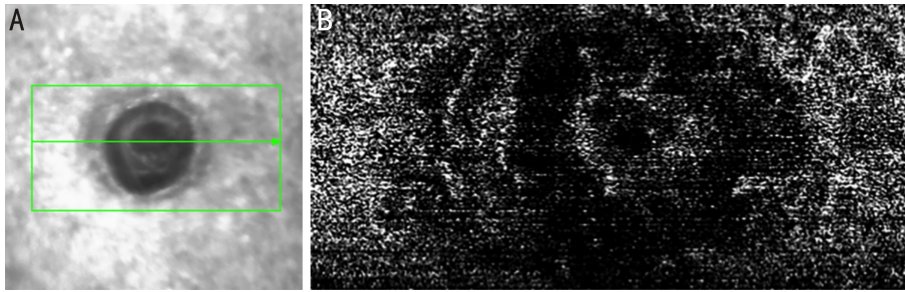


图2 OCTA 图像 A:以视盘为中心,选择 1.5mm×3mm 大小进行检测;B:脉络膜毛细血管层血管造影图像。

表 1 ET-1、ETAR 和 ETBR 引物序列

基因	引物序列
ET-1	上游引物 5'- TGATTTTCCCCCTGCTGTTGGTGA -3'
	下游引物 5'- GGGGGCGTGAGAGGGGCTCTTC -3'
ETAR	上游引物 5'- AGCCTTGCCCTTGAGACCTTAT -3'
	下游引物 5'- CCCGATGCCCTGAACACGA -3'
ETBR	上游引物 5'- CTCCGCCTCACAAATGCCACAGAA -3'
	下游引物 5'- TCCCGATGATGCCTAACACGAACA -3'
GAPDH	上游引物 5'- CTGACCTGCCGCTGGAGAAACC -3'
	下游引物 5'- ATGCCAGCCCCAGCGTCAAAAAGT -3'

1 540m/s, 晶状体传播速度 1723m/s。测量时探头垂直角膜平面,且尽可能对准瞳孔中心,不压迫角膜,取图像较稳定、清晰且晶状体后囊膜和视网膜双峰均高于基线为确定图像,每眼重复测量 10 次,取平均值。整个过程均由同一技师操作完成。

1.2.4 OCTA 检查 各组豚鼠于 2、4wk 行 OCTA 检查。检查前结膜囊内用 10g/L 盐酸环喷脱酯滴眼液滴眼 3 次,每次 1 滴,间隔 10min,滴眼后 30min 进行检测。由一人将豚鼠固定于 OCT 颌架合适位置,另一人按照设备使用方法对豚鼠眼球后极部进行扫描。选择 870nm 波长,以视盘中心为中心,选择 1.5mm×3mm 大小进行拍摄。脉络膜毛细血管定义为 Bruch 膜至膜下 20 μ m,选取图像质量大于 30 的图像,使用 Image J 1.8.0 软件进行测量。首先截取图片,然后将图片二值化(图 2B),分析血流面积(图 2 中白色高亮部分)与全部面积的比值。每只豚鼠测量 3 次,取平均值。测量过程均由两位医师在 OCT 检查室内进行操作完成。

1.2.5 q-PCR 造模 2、4wk 后每组随机选取 3 只豚鼠,麻醉致死取出右眼眼球,沿角巩膜缘剪开,去除角膜、虹膜、晶状体等眼前节组织,剥离玻璃体,使用虹膜刮去除视网膜,获取脉络膜组织。提取总 RNA,逆转录为 cDNA,采用 q-PCR 技术检测 ET-1、ETAR 和 ETBR mRNA 表达水平,以 GAPDH 为内参基因。利用 DNASTar 7.0 软件设计引物序列,并由上海生工生物工程股份有限公司合成,见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对结果进行分析,将 NC 组目的基因的相对表达量设置为 1。

1.2.6 ELISA 检测 造模后 2、4wk,每组取 3 只豚鼠,麻醉致死分离右眼脉络膜组织。使用液氮研磨,按质量体积比(20mg:200 μ L)加入含苯甲基磺酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride,PMSF)的放射免疫沉淀法缓冲液裂解液(radio immunoprecipitation assay buffer,RIPA),充分匀浆直至裂解完全,14000r/min 离心 4min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。按照酶联免疫吸附实验(enzyme-linked

immunosorbent assay,ELISA)试剂盒步骤检测 ET-1、ETAR 和 ETBR 蛋白表达水平。

1.2.7 免疫组化检测 造模 4wk 后,每组取 3 只豚鼠,麻醉致死在 12:00 方向用墨水做标记,分离右眼球,剔除多余组织,置于眼球固定液中固定 24h 后进行石蜡包埋。于视神经前 0.5mm 处进行 5 μ m 切片,梯度乙醇水化,超纯水浸泡 5min,水浴锅加柠檬酸钠抗原修复液(95 $^{\circ}$ C 15min)进行抗原修复,PBS 清洗。正常山羊血清封闭,依次加入一抗(1:100)、二抗(1:200)进行孵育,DAB 显色(1min 22s),苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片。显微镜下观察、拍照。以细胞质内出现淡黄色或深棕色颗粒沉积者为染色阳性反应。各组豚鼠随机选取 5 张切片,每张切片在 20 倍镜下随机采集视野。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS21.0 进行分析,计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组在不同时间点屈光和眼轴比较用重复测量方差分析并行正态性检验及方差齐性检验,若存在时间差异或组间差异则进行组间两两比较,采用 LSD-*t* 检验。脉络膜血流密度、ET-1、ETAR 和 ETBR mRNA 及蛋白表达水平比较采用单因素方差分析进行整体比较,若差异有统计学意义,则进一步采用 LSD-*t* 检验进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 屈光度和眼轴 各组右眼屈光度在不同时间点比较,差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 1230.509, P_{\text{时间}} < 0.001; F_{\text{组间}} = 737.843, P_{\text{组间}} < 0.001; F_{\text{组间}\times\text{时间}} = 222.284, P_{\text{组间}\times\text{时间}} < 0.001$)。造模后 2、4wk,与 NC 组右眼相比,LIM 组、LIM+EA 组右眼近视屈光度均增加(均 $P<0.001$)。造模后 2、4wk,与 LIM 组右眼相比,LIM+EA 组右眼近视屈光度减小(均 $P<0.01$),见表 2。

各组右眼眼轴在不同时间点比较,差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 1463.554, P_{\text{时间}} < 0.001; F_{\text{组间}} = 52.529, P_{\text{组间}} < 0.001; F_{\text{组间}\times\text{时间}} = 15.150, P_{\text{组间}\times\text{时间}} < 0.001$)。造模后 2、4wk,与 NC 组右眼相比,LIM 组、LIM+EA 组右眼眼轴均增加(均 $P<0.001$)。

表2 造模2、4wk后豚鼠屈光度和眼轴比较

时间	组别	屈光度(D)		眼轴长度(mm)	
		右眼	左眼	右眼	左眼
造模前	NC组	3.05±0.42	3.05±0.48	7.97±0.03	7.97±0.05
	LIM组	3.03±0.51	3.05±0.54	7.96±0.03	7.95±0.05
	LIM+EA组	3.03±0.49	3.03±0.58	7.98±0.04	7.97±0.04
造模2wk	NC组	2.2±0.48	2.1±0.43	8.22±0.03	8.23±0.02
	LIM组	-4.23±0.43 ^b	2.23±0.53	8.36±0.05 ^b	8.24±0.03
	LIM+EA组	-3.63±0.49 ^{b,d}	2.23±0.56	8.32±0.03 ^{b,c}	8.23±0.02
造模4wk	NC组	1.63±0.41	1.75±0.24	8.40±0.04	8.40±0.05
	LIM组	-5.88±0.49 ^b	1.63±0.50	8.57±0.06 ^b	8.41±0.04
	LIM+EA组	-2.55±0.48 ^{b,d}	1.73±0.46	8.51±0.03 ^{b,c}	8.41±0.05

注:^b $P<0.001$ vs NC组;^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ vs LIM组。

表3 造模2、4wk后豚鼠脉络膜ET-1、ETAR、ETBR蛋白表达水平

时间	组别	ET-1	ETAR	ETBR
造模2wk	NC组	39.44±0.45	2.31±0.11	1.72±0.01
	LIM组	51.99±4.75 ^b	3.16±0.40 ^a	2.42±0.29 ^a
	LIM+EA组	42.07±1.65 ^d	2.67±0.32	1.76±0.06 ^d
造模4wk	NC组	41.19±0.35	2.43±0.17	1.86±0.18
	LIM组	65.43±5.07 ^b	3.66±0.18 ^b	2.67±0.14 ^b
	LIM+EA组	46.37±5.56 ^d	2.50±0.15 ^d	2.10±0.27 ^c

注:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs NC组;^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ vs LIM组。

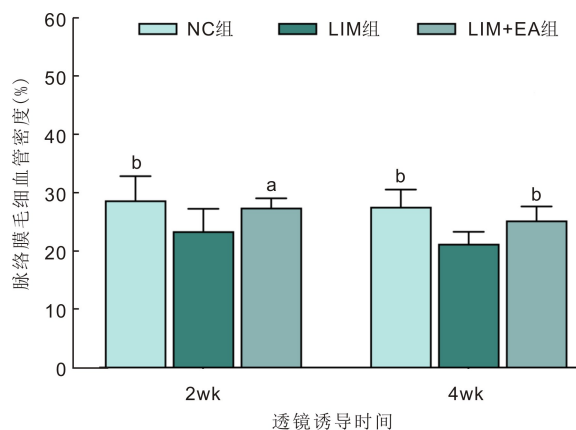


图3 造模2、4wk时豚鼠脉络膜毛细血管密度 ^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs LIM组。

造模后2、4wk,与LIM组右眼相比,LIM+EA组右眼眼轴均减小($P<0.05$, <0.01),见表2。

2.2 脉络膜毛细血管密度 OCTA结果表明,造模2、4wk后,各组脉络膜毛细血管密度比较,差异均有统计学意义(2wk: $F=5.645$, $P<0.05$;4wk: $F=16.563$, $P<0.001$)。造模2、4wk后,与NC组(2wk:28.74%±4.11%,4wk:27.64%±2.91%)相比,LIM组右眼脉络膜毛细血管密度降低(2wk:23.43%±3.9%, $P<0.01$;4wk:21.29%±2.17%, $P<0.001$)。造模2、4wk后,与LIM组相比,LIM+EA组右眼脉络膜毛细血管密度升高(2wk:27.66%±1.43%, $P<0.05$;4wk:25.28%±2.39%,均 $P<0.01$)。造模2、4wk后,与NC组相比,LIM+EA组差异均无统计学意义($P>0.05$),见图3。

2.3 ET-1和ETAR及ETBR mRNA表达水平 PCR结果表明,不同时间点各组右眼脉络膜中ET-1、ETAR、

ETBR mRNA表达水平比较,差异均有统计学意义(2wk: $F_{ET-1}=15.086$, $P_{ET-1}<0.01$; $F_{ETAR}=7.331$, $P_{ETAR}<0.05$; $F_{ETBR}=9.368$, $P_{ETBR}<0.05$;4wk: $F_{ET-1}=17.844$, $P_{ET-1}<0.01$; $F_{ETAR}=37.084$, $P_{ETAR}<0.001$; $F_{ETBR}=20.153$, $P_{ETBR}<0.05$)。造模2、4wk后,与NC组相比,LIM组ET-1、ETAR、ETBR mRNA表达水平升高(均 $P<0.05$);与LIM组相比,LIM+EA组ET-1、ETAR、ETBR mRNA表达水平降低(2wk:ETAR, $P>0.05$;其余均为 $P<0.05$);与NC组相比,LIM+EA组ET-1、ETAR、ETBR mRNA表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$),见图4。

2.4 ET-1和ETAR及ETBR蛋白表达水平 ELISA结果表明,不同时间点各组右眼脉络膜中ET-1、ETAR、ETBR蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义(2wk: $F_{ET-1}=15.464$, $P_{ET-1}<0.01$; $F_{ETAR}=6.098$, $P_{ETAR}<0.05$; $F_{ETBR}=15.988$, $P_{ETBR}<0.01$;4wk: $F_{ET-1}=25.829$, $P_{ET-1}<0.01$; $F_{ETAR}=49.759$, $P_{ETAR}<0.001$; $F_{ETBR}=12.391$, $P_{ETBR}<0.01$)。造模后2、4wk,与NC组相比,LIM组右眼脉络膜中ET-1、ETAR、ETBR蛋白表达水平升高(均 $P<0.05$);与LIM组相比,LIM+EA组ET-1、ETAR、ETBR蛋白表达水平降低(2wk:ETAR, $P>0.05$;其余均为 $P<0.05$);与NC组相比,LIM+EA组ET-1、ETAR、ETBR蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$),见表3。

2.5 免疫组化检测脉络膜ET-1蛋白 造模后4wk可见,ET-1免疫阳性反应呈棕色,脉络膜胞质内表达。NC组中脉络膜ET-1免疫反应呈棕色,且血管排列整齐有序;LIM组中脉络膜ET-1免疫反应较强,着色较深,且血管排列紊乱不齐;LIM+EA组中脉络膜ET-1免疫反应呈棕色,且血管排列相对整齐,见图5。

3 讨论

豚鼠属于哺乳动物,由于其屈光状态、正视化机制与

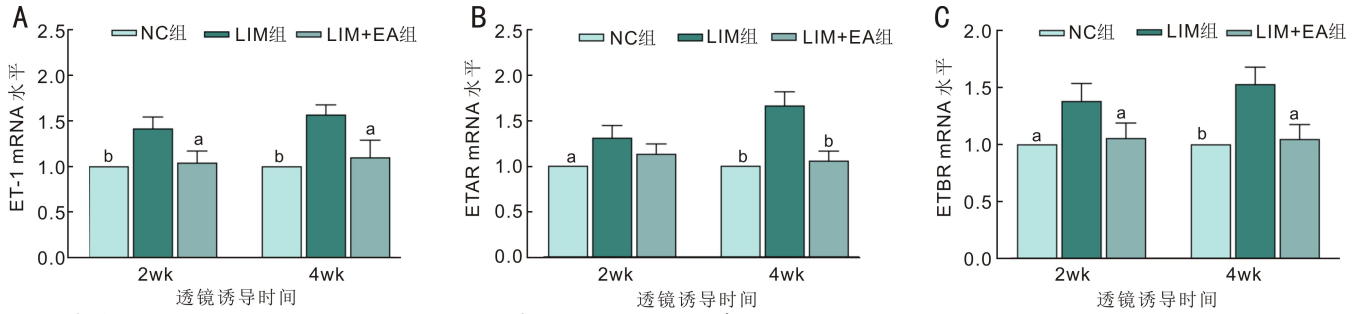


图4 造模2、4wk时ET-1、ETAR、ETBR mRNA表达水平 ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs LIM组。

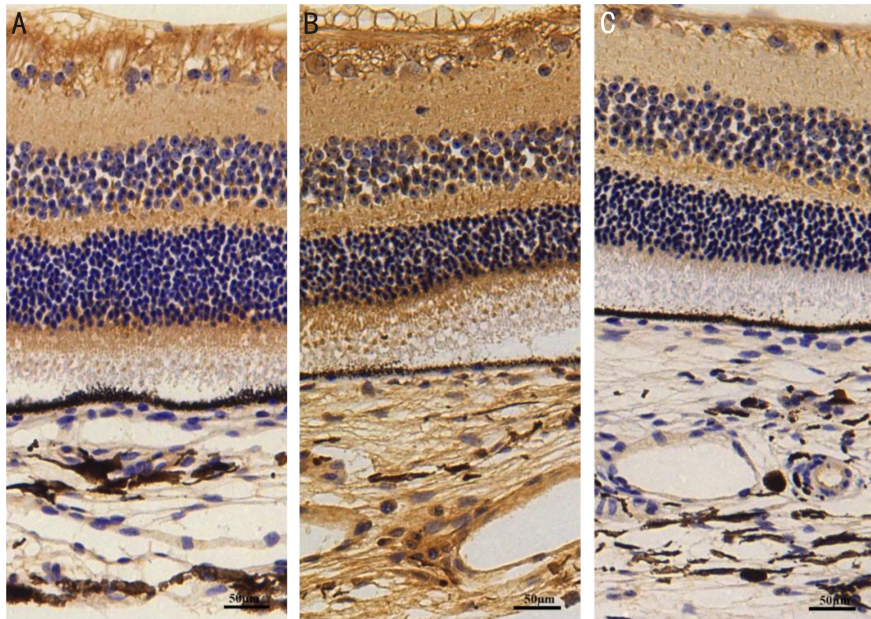


图5 造模后4wk时ET-1蛋白在脉络膜中的表达 A:NC组;B:LIM组;C:LIM+EA组。

人类相似,常用于制作近视模型^[10-11],并且豚鼠透镜诱导型模型已广泛应用于近视的实验研究。本实验采用负透镜诱导豚鼠制备近视模型,研究模拟人眼在近距离工作状态下近视发生发展中的作用,为本研究奠定了模型基础。

ET-1 是于 1988 年首次从猪主动脉内皮细胞的培养上清液中分离出来一种有效的血管收缩剂^[15],是评估眼内血流动力学的有用标志,在角膜上皮、睫状体、脉络膜以及视网膜血管内皮细胞中均有表达^[16]。近来,有研究报道发现 ET-1 含量在高度近视儿童和青少年血清中含量发生改变^[8]。与眼轴小于 26mm 的近视患者相比,在眼轴大于 26mm 的患者中发现 ET-1 血清浓度显著降低,并且 ET-1 浓度与眼轴长度呈弱负相关,提示 ET-1 的水平变化可能影响近视发展^[8]。ET-1 属于内源性血管收缩因子,是评估眼内血流动力学的有用标志物,并且 ET-1 在眼内分布广泛,脉络膜中水平最高^[17]。ET-1 主要通过 ETAR 和 ETBR 结合而发挥血管收缩作用^[8]。研究发现 ET-1 可以通过调节眼收缩,以调节视网膜血流^[8]。而豚鼠作为无视网膜血管哺乳动物^[18],其血液以及氧气供应的主要来源是脉络膜^[4]。研究已发现,向健康男性注射 ET-1 后会降低脉络膜的血流^[19]。并且越来越多的证据也表明近视发展过程中脉络膜血流会降低^[6,20-21]。提示 ET-1 可能会通过影响脉络膜血流参与近视的发生发展。而在本研究中我们发现,在近视发展过程中,随着脉络膜毛细血管密度

降低,血流下降的同时 ET-1 表达水平明显上调,符合我们的猜测。

在解剖学上,脉络膜是由毛细血管和中大血管组成,其中血管是不断暴露于脉动血流和压力引起的各种类型的血动力中,而作为与血液直接接触的单层,血管内皮细胞承受着大部分流体剪切应力^[22]。剪切力可以通过刺激血管扩张剂的产生对血管内皮产生保护作用^[23],并且研究发现剪切力的变化会改变 ET-1 的表达^[24]。先前已有研究报道,脉络膜毛细血管的血流与近视程度负相关^[25]。此外,Zhang 等^[5]在近视豚鼠中发现,随着近视程度的加深脉络膜血流逐渐降低,而 Gupta 等^[20]在人类高度近视眼中也发现脉络膜血管成分的减少。Al-Sheikh 等^[6]研究发现与正常组相比,在近视眼中脉络膜毛细血管血流面积显著降低。Milani 等^[26]在高度近视患者中也发现,脉络膜毛细血管灌注区减少,脉络膜毛细血管密度降低。提示脉络膜毛细血管密度与近视密切相关。本实验也证实了在近视发展中脉络膜毛细血管密度降低。而脉络膜血流的减少会影响血管剪切力,这可能会影响 ET-1 的表达。在本研究中发现,随着近视的发生发展脉络膜变薄,ET-1 及其受体表达水平明显上调,可能是 ET-1 通过与 ETAR 和 ETBR 结合引起了脉络膜血管的收缩,导致脉络膜血流降低影响近视的发展。

目前对于近视的治疗手段十分有限,而针刺在临床^[12-13]和动物^[10-11]中已证实可以改善近视发展,但具体

机制尚未明确。有研究发现针刺后可以降低眼周血管平滑肌紧张度,解除睫状肌痉挛,加快血流速度,改善消除缺血和缺氧状态,而有利于眼缓解视疲劳症状^[12]。因此,我们猜测电针可以改善脉络膜血液循环。

脉络膜主要是处于交感神经和副交感神经调控之下^[27]。目前研究发现哺乳动物和鸟类的脉络膜主要分布三种神经纤维:(1)来自翼腭神经节(pterygopalatine ganglion, PPG)和睫状神经节产生的副交感神经纤维;(2)来自颈上神经节产生的交感神经纤维;(3)来自三叉神经节的感觉纤维。其中哺乳动物中的 PPG 是从面部核运动复合物的唾液上核(superior salivatory nucleus, SSN)接收输入的^[28]。Linder^[29]在出血性低血压兔子中发现,面部神经刺激可使脉络膜血流升高。先前的研究也表明,下丘脑支核的血液压力敏感位点可输入到 SSN 的脉络膜神经元,由 SSN-PPG 通路介导部分对脉络膜血管舒张性补偿^[27]。此外,有研究发现电针刺激大鼠脉络膜血管的副交感神经节前纤维细胞体的 SSN,可使眼底血流增加^[30]。提示,电针可通过 SSN-PPG 通路提高近视发展中的脉络膜血流。因此,我们猜测电针干预治疗后,通过 SSN-PPG 通路改善了脉络膜的血流,影响了血管剪切力下调 ET-1 及其受体含量,延缓近视的发生发展。本研究中,我们也观察到电针干预后脉络膜毛细血管血流密度上升,改善了脉络膜血流,下调 ET-1 及其受体含量。然而,具体信号分子及发展机制尚未完全明确,仍需进一步研究。其中,脉络膜血流将是我们今后研究的重点,不断探索电针治疗近视与脉络膜血流变化之间的内在相关性,为近视的治疗提供有效的分子生物学基础。

参考文献

- 1 Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology* 2016;123(5):1036-1042
- 2 Ang M, Wong CW, Hoang QV, et al. Imaging in myopia: potential biomarkers, current challenges and future developments. *Br J Ophthalmol* 2019;103(6):855-862
- 3 Prousalis E, Mataftsi A, Ziakas N, et al. Interventions to control myopia progression in children; protocol for an overview of systematic reviews and meta-analyses. *Syst Rev* 2017;6(1):188
- 4 Zhou X, Zhang S, Zhang GY, et al. Increased choroidal blood perfusion can inhibit form deprivation myopia in Guinea pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(13):25
- 5 Zhang S, Zhang GY, Zhou X, et al. Changes in choroidal thickness and choroidal blood perfusion in Guinea pig myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(8):3074
- 6 Al-Sheikh M, Phasukkijwatana N, Dolz-Marco R, et al. Quantitative OCT angiography of the retinal microvasculature and the choriocapillaris in myopic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(4):2063
- 7 Wang Q, Chan S, Yang JY, et al. Vascular density in Retina and choriocapillaris as measured by optical coherence tomography angiography. *Am J Ophthalmol* 2016;168:95-109
- 8 Powierza K, Żelazowska-Rutkowska B, Sawicka-Powierza J, et al. Endothelin-1 serum concentration is lower in children and adolescents with high myopia, a preliminary study. *J Clin Med* 2020;9(5):1327
- 9 张鸿升,魏卫兵,周宾宾,等.电针干预脊髓损伤大鼠受损节段缺氧诱导因子 1 α 、血管内皮生长因子的表达. *中国组织工程研究* 2020;24(11):1701-1707

- 10 吴姗姗,魏慧霞,郭滨,等.电针对负透镜诱导型近视豚鼠睫状肌中表皮生长因子及其受体表达的作用. *眼科新进展* 2020;40(4):318-322
- 11 田庆梅,宋继科,钱继存,等.针刺对实验性近视豚鼠巩膜 MMP-2及 TIMP-2 表达的影响. *中华中医药杂志* 2019;34(5):2046-2050
- 12 陶晓雁,茹凯,郎松,等.针刺眼周奇穴治疗青少年近视疗效观察. *上海针灸杂志* 2010;29(10):643-645
- 13 张雪,张庆莲.针刺治疗青少年近视 52 例. *长春中医药大学学报* 2007;23(1):56
- 14 Yu Z, Wang X, Zhao X, et al. The effectiveness and safety of acupuncture for patients with myopia: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020;99(23):e20410
- 15 Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:851-876
- 16 Salvatore S, Vingolo EM. Endothelin-1 role in human eye: a review. *J Ophthalmol* 2010;2010:1-10
- 17 Chakravarthy U, Douglas AJ, Bailie JR, et al. Immunoreactive endothelin distribution in ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(5):2448-2454
- 18 Cringle S, Yu DY, Alder V, et al. Oxygen consumption in the avascular guinea pig retina. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 2):H1162-H1165
- 19 Polak K, Petternel V, Luksch A, et al. Effect of endothelin and BQ123 on ocular blood flow parameters in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(12):2949-2956
- 20 Gupta P, Thakku SG, Saw SM, et al. Characterization of choroidal morphologic and vascular features in young men with high myopia using spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 2017;177:27-33
- 21 Devarajan K, Sim R, Chua J, et al. Optical coherence tomography angiography for the assessment of choroidal vasculature in high myopia. *Br J Ophthalmol* 2020;104(7):917-923
- 22 Rapoport RM, Merkus D. Endothelin-1 regulation of exercise-induced changes in flow: dynamic regulation of vascular tone. *Front Pharmacol* 2017;8:517
- 23 Tsou JK, Gower RM, Ting HJ, et al. Spatial regulation of inflammation by human aortic endothelial cells in a linear gradient of shear stress. *Microcirculation* 2008;15(4):311-323
- 24 Ziegler T, Bouzourène K, Harrison VJ, et al. Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(5):686-692
- 25 Su L, Ji YS, Tong NT, et al. Quantitative assessment of the retinal microvasculature and choriocapillaris in myopic patients using swept-source optical coherence tomography angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2020;258(6):1173-1180
- 26 Milani P, Montesano G, Rossetti L, et al. Vessel density, retinal thickness, and choriocapillaris vascular flow in myopic eyes on OCT angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2018;256(8):1419-1427
- 27 Reiner A, Fitzgerald MEC, Del Mar N, et al. Neural control of choroidal blood flow. *Prog Retin Eye Res* 2018;64:96-130
- 28 Ten Tusscher MP, Klooster J, Baljet B, et al. Pre- and post-ganglionic nerve fibres of the pterygopalatine ganglion and their allocation to the eyeball of rats. *Brain Res* 1990;517(1-2):315-323
- 29 Linder J. Effects of facial nerve section and stimulation on cerebral and ocular blood flow in hemorrhagic hypotension. *Acta Physiol Scand* 1981;112(2):185-193
- 30 郭恒岳.电针刺激对大鼠跟腱血流的影响. *国外医学(中医中药分册)* 2004;26(6):359-360