

# 形觉剥夺性近视豚鼠巩膜形态及 TGF- $\beta_2$ 表达的变化

周凌霄, 张林, 王理论, 杨建刚

作者单位:(710077) 中国陕西省西安市, 西安医学院附属医院眼科

作者简介:周凌霄,女,硕士,住院医师,研究方向:屈光不正、斜弱视。

通讯作者:杨建刚,男,博士,副主任医师,副教授,主任,研究方向:青光眼、白内障. zhoulingxiao0520@163.com

收稿日期:2010-12-14 修回日期:2011-02-14

## Changes of sclera structure and expression of TGF- $\beta_2$ in form deprivation myopia of guinea pig

Ling-Xiao Zhou, Lin Zhang, Li-Lun Wang, Jian-Gang Yang

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jian-Gang Yang, Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. zhoulingxiao0520@163.com

Received: 2010-12-14 Accepted: 2011-02-14

### Abstract

• AIM: To observe the structure changes of sclera and determine the expression of TGF- $\beta_2$  in the sclera of the model.

• METHODS: A facemask was worn on the right eyes of guinea pigs to develop form deprivation myopia. Before and after experiment, refraction was measured using retinoscope, and the ocular axial was determined by A-scan ultrasonography. Morphologic alterations of the posterior sclera were observed by light microscope. The expression of TGF- $\beta_2$  in the posterior sclera was determined by immunohistochemistry.

• RESULTS: Posterior sclera of myopic eyes became thinner, and collagen fibres were disordered, fibers diameters were dissimilarity, the space between the fibres was larger, the parallel structure was illegible. The immunohistochemistry showed that expression of TGF- $\beta_2$  in model eyes were lower than control eyes ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Covering eyes with facemasks is effective, simple and convenient in making myopic model. The sclera of the model eye appeared degeneration. TGF- $\beta_2$  plays an important role in the course of development in form deprivation myopia.

• KEYWORDS: form deprivation myopia; guinea pig; sclera; TGF- $\beta_2$

Zhou LX, Zhang L, Wang LL, et al. Changes of sclera structure and expression of TGF- $\beta_2$  in form deprivation myopia of guinea pig. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(4):602-604

### 摘要

目的:观察形觉剥夺性近视豚鼠巩膜组织学改变和 TGF- $\beta_2$  在巩膜中的表达。

方法:用头套形觉剥夺右眼的方法诱导近视动物模型,实验前后检测豚鼠双眼屈光状态及眼轴长度。HE 染色观察后极部巩膜形态学改变,免疫组织化学法对 TGF- $\beta_2$  在巩膜内的表达进行定性及半定量测定。

结果:实验组巩膜变薄、胶原纤维排列紊乱,粗细不均,纤维间隙变大,纤维走向不一,板层结构不清;巩膜 TGF- $\beta_2$  表达明显下调。

结论:形觉剥夺性近视眼的巩膜产生一系列的退行性改变, TGF- $\beta_2$  是形觉剥夺性近视形成的重要因素之一。

关键词:形觉剥夺性近视;豚鼠;巩膜;TGF- $\beta_2$

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.04.012

周凌霄,张林,王理论,等.形觉剥夺性近视豚鼠巩膜形态及 TGF- $\beta_2$  表达的变化. 国际眼科杂志 2011;11(4):602-604

### 0 引言

人类近视的发病机制仍不清楚,而其已经成为全球发生率最高的屈光不正,且仍在逐年提高。由于高度近视并发症的严重性,近年来对于近视发生、发展机制的研究也就成为了热点,而形觉剥夺性近视动物模型的建立为探索近视发病机制开辟了新途径。以往实验表明,不论是人类近视眼还是动物模型近视眼,巩膜都会出现明显的病理学改变,这是导致眼轴增长、屈光改变的结构基础<sup>[1]</sup>。TGF- $\beta$  是一类多功能的细胞因子,生物学活性以 TGF- $\beta_2$  为主,可能通过调节细胞外基质使巩膜重塑,从而导致眼轴长短的改变<sup>[2]</sup>。我们通过对形觉剥夺性近视眼中巩膜的形态学和 TGF- $\beta_2$  表达的研究,以探讨近视的发病机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 随机选用健康三色豚鼠 10 只(西安交通大学动物实验中心),均为 2 周龄,雌雄不限,排除眼疾,复方托吡卡胺散瞳排除先天性近视。TGF- $\beta_2$  兔多克隆抗体、羊抗兔 IgG 抗体、SABC 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒,购自北京博奥森公司。YZ 24 型带状光检影镜,苏州六六视觉科技股份有限公司;天津迈达 ODM-2000 型 A/B 型超声诊断仪;共焦显微镜。

1.2 方法 采用单眼遮盖法,右眼作为实验眼,左眼作为对照眼。根据豚鼠头部大小选用 6 号乳白色半透明无毒乳胶气球,依照豚鼠头部形状剪制成头套,暴露出动物的左眼、双耳及口鼻。此时动物右眼即被半透明面罩形觉剥夺。

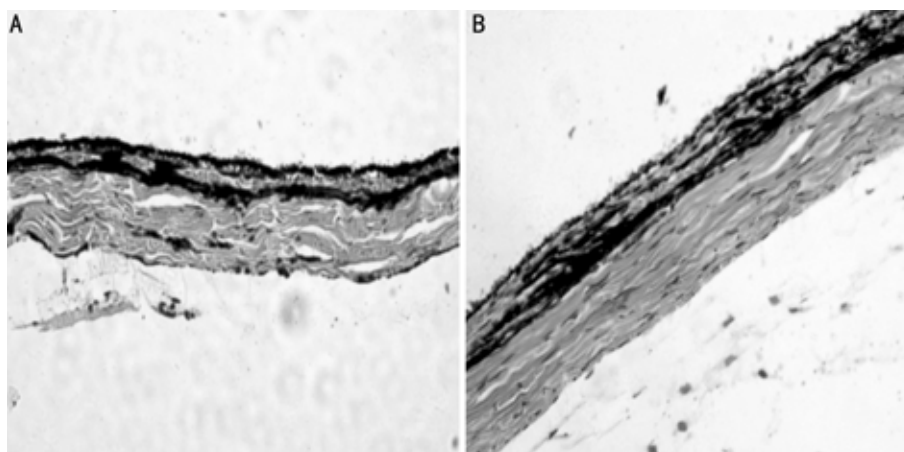


图1 豚鼠巩膜改变(HE ×200) A:实验组;B:对照组。

实验过程中3次/d检查面罩的位置,以确保其完全遮盖实验眼和完全开放对照眼,并且要随着动物的生长及时调整头套的大小,以免对动物造成压迫和伤害。自然光条件下饲养,实验时间共6wk。所有测量选用单盲法,在不知分组的情况下,由一名专业技术人员和一名助手完成并记录数据,实验设计者不参与测量工作。屈光度测量:分别于实验前后用10g/L复方托吡卡胺为实验眼和对照眼散瞳,5min 1滴,共3次。暗室条件下进行双眼带状光检影镜检影验光。工作距离为1m,水平及垂直子午线上检影,测得的柱镜度数均以半量折合计入球镜度数。眼轴长度测量:分别于实验前后用倍诺喜对实验眼和对照眼进行局部麻醉,5min 1滴,共3次,随后对实验动物进行眼轴长度的测量。测量时将A超诊断仪自动模式改为手动模式,并重新设置超声在眼球内不同介质的传播速度:前房和玻璃体(1540m/s),晶状体(1645m/s)。测量时将探头对准动物瞳孔中心,并垂直于角膜平面,出现较理想的波形便进行标记,每眼测量3次,取平均值。测量结束后,过量100g/L水合氯醛腹腔注射处死实验动物,迅速取出眼球,弃去眼前节,每组随机取出2只眼球以150g/L甲醛在4℃冰箱固定48h,逐级乙醇脱水,常规石蜡包埋。以6μm厚度连续切片,行HE染色后光学显微镜下观察巩膜形态学改变。另切片,常规梯度乙醇脱蜡,按SABC免疫组化试剂说明书操作,修复抗原,100mL/L正常血清封闭30min,滴加TGF-β<sub>2</sub>一抗(兔多克隆抗体)于4℃过夜;加生物素二抗于37℃持续20min;加SABC于37℃持续20min,DAB显色8min,苏木素复染,乙醇脱水,透明,中性树胶封片,光镜下观察。阴性对照用PBS代替一抗。TGF-β<sub>2</sub>阳性染色为巩膜成纤维细胞胞质内棕色不定形物质。油镜下于巩膜区随机选取10个视野,分别计阳性细胞数后取平均值。

统计学分析:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达,运用统计软件SPSS 11.5软件包进行处理,两组间比较采用 $t$ 检验,方差不齐时使用秩和检验,取 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 屈光状态及眼轴长度的变化** 开始时实验眼和对照眼均为中度远视眼,远视度数在+4.00D左右,眼轴长度在7.3mm左右。干预前组间、组内屈光度及眼轴长度差异无显著统计学意义( $P > 0.05$ )。对实验组眼形觉剥夺6wk后,实验组眼呈现明显近视改变,近视度数在-5.50D

表1 形觉剥夺性近视豚鼠屈光度和眼轴长度的变化  $\bar{x} \pm s$

指标	分组	形觉剥夺前	剥夺后6wk
屈光度(D)	实验组	4.12 ± 0.29	-5.27 ± 1.17 <sup>a</sup>
	对照组	4.1 ± 0.21	3.7 ± 0.33
眼轴长度(mm)	实验组	7.27 ± 0.16	8.41 ± 0.16 <sup>a</sup>
	对照组	7.27 ± 0.14	7.74 ± 0.12

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs对照组。

左右,眼轴长度在8.4mm左右;而对照眼变化不大,仍为远视眼,远视度数在+3.50D左右,眼轴长度7.6mm左右,符合动物生长的一般规律。实验组与对照组组间屈光度、眼轴长度差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,表1)。

**2.2 巩膜改变** 光镜下实验眼巩膜胶原纤维排列紊乱,粗细不均,纤维间隙变大,纤维走向不一,板层结构不清,胶原纤维部分或完全溶解,有纤维断裂现象,而对照组未见上述改变(图1)。

**2.3 TGF-β<sub>2</sub>表达** 实验组和对照组巩膜内均有TGF-β<sub>2</sub>表达,实验组TGF-β<sub>2</sub>表达(3.4 ± 0.44个/10HP)明显低于对照组(9.3 ± 1.15个/10HP, $t = 13.554$ , $P < 0.05$ ,图2)。

## 3 讨论

豚鼠眼在解剖结构、生物构成及生理功能方面都与人类有相似之处,并且2周龄豚鼠对形觉剥夺敏感<sup>[3]</sup>。这可能与幼年豚鼠眼球发育不完全、对外界因素的变化敏感有关,这也从侧面提示正常的视觉信息的阻断可能诱导了近视的形成。我们发现,豚鼠经过6wk的形觉剥夺,实验眼的轴平均延长了1.14mm,比对照眼延长了0.67mm,且平均造成了-9.00D的相对近视改变;对照眼未做特殊处理,眼轴亦有0.47mm延长,产生了近-0.50D的相对近视。我们认为,对照组的轴眼延长及屈光改变可能为豚鼠眼球正常的生长发育造成的。而实验组研究中对实验动物造成了-9.00D的近视度数,与其它国内外研究相比较<sup>[4]</sup>,这可能是由于自行设计的头套对实验眼遮盖较完全,并且基本消除了遮盖物脱落及眼睑缝线松脱对诱导实验的影响。

TGF-β<sub>2</sub>在细胞外基质代谢中可抑制蛋白酶的合成,刺激蛋白酶抑制剂的合成,能够促进细胞外基质中各种成分如胶原蛋白、纤维连接蛋白和蛋白多糖的表达,抑制其降解,从而调节巩膜或纤维细胞的增殖和细胞外基质的构

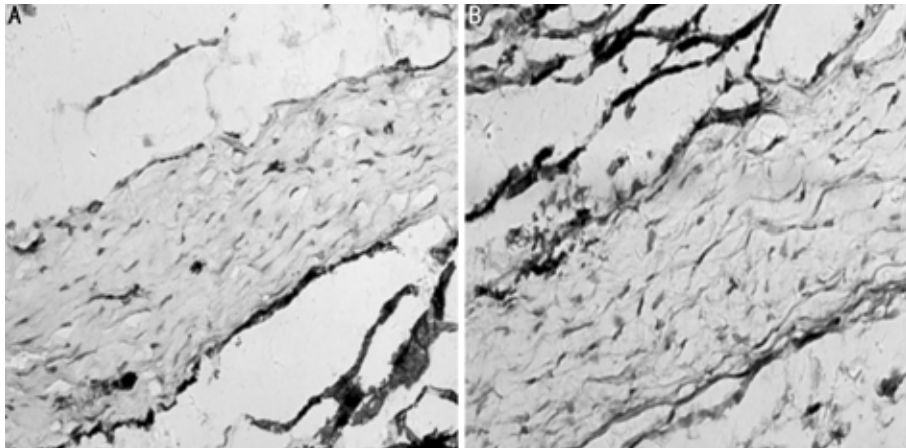


图2 豚鼠巩膜 TGF- $\beta_2$  的表达(SABC  $\times 200$ ) A:实验组;B:对照组。

成。我们发现,形觉剥夺性近视豚鼠后极部巩膜中 TGF- $\beta_2$  的表达显著下调。由此可以推测,在近视形成过程中,随着 TGF- $\beta_2$  的显著下调,使得细胞外基质合成分泌减少,降解增加,巩膜变薄,抵抗力降低,从而导致眼轴延长<sup>[5]</sup>。在今后的研究中,如果能对 TGF- $\beta_2$  在实验性近视模型巩膜中的表达进行定量,并探讨其是否与近视的进展有相关性,将可以进一步证明以上推断。

#### 参考文献

1 Christensen AM, Wallman J. Evidence that increased scleral growth underlies visual deprivation myopia in chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

1991;32(7):2143-2150

2 谢坤鹏,吕勇. TGF- $\beta_2$  对体外培养豚鼠巩膜成纤维细胞的影响. *眼科新进展* 2006;26(6):428-431

3 胡文政,褚仁远,张利能. 豚鼠实验性近视眼巩膜的羟脯氨酸含量改变. *眼科新进展* 2001;21(5):321-322

4 Rada JA, Nickla DL, Troilo D. Decreased proteoglycan synthesis associated with form deprivation myopia in mature primate eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2050-2058

5 Obata H, Kaburaki T, Kato M, *et al.* Expression of TGF-beta type I and type II receptors in rat eyes. *Curr Eye Res* 1996;15(3):335-340