

胰岛素样生长因子-1 在斜视儿童眼外肌及血清中的表达

陶利娟, 罗瑜琳, 王平, 王曦琅, 郭燕, 谭艺兰

基金项目: 湖南省科技计划立项项目 (No. 2010SK3075)

作者单位: (410007) 中国湖南省长沙市, 湖南省儿童医院眼科

作者简介: 陶利娟, 女, 毕业于南华大学, 主任医师, 主任, 研究方向: 斜弱视、屈光、小儿眼整形。

通讯作者: 陶利娟. tlj823@sina.com

收稿日期: 2013-03-21 修回日期: 2013-07-19

Expression and significance of insulin-like growth factor-1 in extraocular muscle and serum of children with strabismus

Li-Juan Tao, Yu-Lin Luo, Ping Wang, Xi-Lang Wang, Yan Guo, Yi-Lan Tan

Foundation item: Science and Technology Support Plan Project of Hunan Province, China (No. 2010SK3075)

Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China

Correspondence to: Li-Juan Tao. Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China. tlj823@sina.com

Received: 2013-03-21 Accepted: 2013-07-19

Abstract

• AIM: To explore the expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in extraocular muscle and serum of children with normal eye position and strabismus, in order to further understand the correlation between pathogenesis of strabismus and IGF-1.

• METHODS: Children were divided into 3 groups according to the position of eye and the type of strabismus as follow: concomitant esotropia group (67 cases), concomitant exotropia group (129 cases) and normal eye position group (23 cases). For each group of the children, the extraocular muscle were cut out and frozen for detecting the expression pattern of IGF-1 by means of immunohistochemistry and Western-blot. We also used ELISA to measure the serum level of IGF-1.

• RESULTS: (1) Result detected by immunohistochemistry: IGF-1 was expressed mainly in the cytoplasm of extraocular muscle cells, small amount of IGF-1 was expressed in the extracellular matrix. The expression of IGF-1 in extraocular muscle of normal eye position group was significantly more than that of concomitant esotropia

group and concomitant exotropia group ($P < 0.05$). (2) Result detected by Western blot: compared with concomitant esotropia group and concomitant exotropia group, the expression of IGF-1 in normal eye position group was significantly increased ($P < 0.05$). (3) The difference of serum level of IGF-1 among normal eye position group, concomitant esotropia group and concomitant exotropia group was not statistically significant ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: The occurrence of simple abnormal eye position such as concomitant esotropia and concomitant exotropia in children may has few association with the level of IGF-1 in serum, but be associated with the expression of IGF-1 in extraocular muscle. It suggests that injecting IGF-1 into extraocular muscle may be a potential application for curing strabismus.

• KEYWORDS: insulin-like growth factor-1; concomitant esotropia; concomitant exotropia; extraocular muscle

Citation: Tao LJ, Luo YL, Wang P, et al. Expression and significance of insulin-like growth factor-1 in extraocular muscle and serum of children with strabismus. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1543-1546

摘要

目的: 探讨正常眼位及斜视儿童眼外肌、血清中胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 的表达差异, 以期进一步认识斜视发病机制与 IGF-1 的相关性。

方法: 根据患儿的眼位情况及斜视类型分组: 共同性内斜视组 67 例 86 眼, 共同性外斜视组 129 例 183 眼, 正常眼位组 23 例 23 眼, 运用免疫组织化学、免疫印迹及 ELISA 法分别检测各组儿童眼外肌及血清中 IGF-1 的含量, 并行统计学分析。

结果: (1) 免疫组织化学检测结果显示: IGF-1 在眼外肌细胞中主要表达在胞浆, 细胞外基质中有少量的表达。正常眼位组眼外肌中 IGF-1 含量明显多于共同性内斜视组及共同性外斜视组 ($P < 0.05$)。 (2) 免疫印迹法检测结果显示: 正常眼位组与共同性内斜视组、共同性外斜视组相比较, 眼外肌中 IGF-1 含量明显增多 ($P < 0.05$)。 (3) 正常眼位组、共同性内斜视组、共同性外斜视组儿童血清中 IGF-1 含量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论: 共同性内斜及共同性外斜等儿童常见单纯眼位异常的发生, 可能与眼球血供中 IGF-1 含量的多少相关性不

大,其影响在于控制眼球运动的眼外肌局部 IGF-1 含量的多少,提示应用 IGF-1 在眼外肌局部注射对于治疗斜视等眼外肌相关疾病具有潜在的应用前景。

关键词:胰岛素样生长因子-1;共同性内斜视;共同性外斜视;眼外肌

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.08

引用:陶利娟,罗瑜琳,王平,等.胰岛素样生长因子-1在斜视儿童眼外肌及血清中的表达.国际眼科杂志 2013;13(8):1543-1546

0 引言

斜视是与双眼视觉功能和眼球运动功能密切相关的疾病,是严重威胁儿童视功能发育及美观的常见眼病之一,其发病率高,在我国儿童斜视的发病率约为1%~5%^[1]。近年来,越来越多的学者开始重视儿童斜视的治疗,斜视的病因及类型很多,目前绝大多数的斜视最终都需要依靠手术来矫正^[2]。然而对于年龄较小的患儿,因术前检查不合作无法较好地设计手术量,不可避免地影响手术的成功率;对于部分复杂类型及度数较大的斜视,单次手术难以完全矫正眼位,家长难以接受孩子面临多次手术的风险及并发症,为临床上斜视的治疗带来困难。因此,从分子水平进一步研究斜视的发病机制,探索新的治疗手段是国内外眼科学者关注的焦点。目前,国内外眼科专家对儿童斜视的发病、诊断及治疗做了大量的研究工作,Chen等^[3]研究发现,增加外源性胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)能在短时间内显著提高幼年鸡的眼外肌收缩力,且肌纤维的横截面积增大。Anderson等^[4]研究局部应用不同剂量的IGF-1对眼外肌的作用,发现10 μ g和25 μ g的剂量均能显著地增强成年兔眼外肌的肌力。以上研究结果提示,IGF-1可能作为一种力学敏感因子影响眼外肌的收缩力,并参与斜视的发病。本研究拟通过比较临床上斜视儿童眼外肌中IGF-1的表达差异,探讨IGF-1在斜视发病中的作用及意义,力求为预防和治疗斜视提供一定的临床依据。

1 对象和方法

1.1 对象 随机选取2009-03/2012-10我院斜视手术治疗的196例269眼患儿及因确诊视网膜母细胞瘤需接受眼球摘除的23例23眼患儿。纳入标准为:(1)年龄4~12岁;(2)临床确诊为共同性内斜、共同性外斜患儿或不伴有斜视的视网膜母细胞瘤患儿;(3)临床有手术指征,内斜视患儿接受至少一条外直肌缩短术,外斜视患儿接受至少一条内直肌缩短术,视网膜母细胞瘤患儿接受眼球摘除术。排除标准为:(1)伴随其他眼前、后节疾病的患儿;(2)高度的屈光不正、屈光参差及重度弱视患儿;(3)已接受过斜视矫正手术的患儿。根据患儿的眼位情况及斜视类型分组:共同性内斜视组67例86眼,共同性外斜视组129例183眼,正常眼位组23例23眼。

1.2 方法 入院后行常规眼部检查,包括远近视力、裂隙灯、眼底、眼压、屈光度、眼位及视功能等检查,依据术前检查结果及诊断分别行相应的手术治疗。术中分别截取共

同性内斜视患儿部分外直肌,共同性外斜视患儿部分内直肌以及视网膜母细胞瘤患儿眼球摘除术后的部分内、外直肌,将所截除的肌肉做好标记,部分立即保存到-80℃冰箱,部分放入4%福尔马林溶液内固定、梯度沉糖后备用。此外,所有患儿术前均采集清晨空腹外周静脉血2mL,室温静置,24h内分离血清并分装,于-20℃冰箱保存备用。

1.2.1 免疫组织化学法检测眼外肌中 IGF-1 蛋白的表达 将预先沉糖后的组织取出进行冰冻切片,用0.01mol/L PBS洗涤2次,每次5min,然后用含500mL/L甲醇及3mL/L H₂O₂的PBS孵育35min,去除内源性的过氧化物酶及红细胞,再用含有终浓度为0.5mL/L Triton X-100的5mL/L BSA,室温下封闭2h,加入多克隆兔抗人IGF-1抗体(Abcam公司,1:2000,用PBS稀释),4℃冰箱孵育过夜,0.01mol/L PBS清洗3次后,用生物素化羊抗兔IgG孵育60min,辣根过氧化物酶标记的亲合素AB液孵育60min,0.01mol/L PBS清洗3次后即可染色,为排除非特异性染色,阴性对照组用0.01mol/L PBS替代一抗,其余步骤相同。DAB-H₂O₂显色,显微镜下控制反应强度,贴片风干后,常规脱水、透明、封片,显微镜下观察照相。

1.2.2 免疫印迹法检测眼外肌中 IGF-1 蛋白的含量 将保存在-80℃冰箱备用的眼外肌组织取出,加入裂解液冰上匀浆后,超低温离心,取上清加loading buffer后,沸水变性,电泳转膜后,将膜用0.01mol/L PBS洗涤2次,每次5min,用含有终浓度为0.5mL/L Tween-20的脱脂奶粉,室温下封闭2h,加入多克隆兔抗人IGF-1抗体(Abcam公司,1:2500,用PBS稀释),4℃冰箱孵育过夜,0.01mol/L PBS清洗3次后,加入HRP的二抗,室温下孵育2h。加入ECL化学发光试剂盒,暗室显影定影,结果扫描后分析。

1.2.3 ELISA 法测定血清中 IGF-1 的含量 使用ELISA试剂盒,先将IGF-1抗体(Abcam公司,1:1500,用PBS稀释)与固相载体连接,在96孔板上孵育30min,加入0.01mol/L PBS洗涤3次,然后加入受检血清,常温下孵育2h,用0.01mol/L PBS洗涤3次;加入酶标抗体室温孵育1h,使固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合,0.01mol/L PBS再洗涤3次,彻底洗掉未结合的酶标抗体,最后加底物孵育30min,使用酶标仪检测最终数据。

统计学分析:采用SPSS 13.0统计学软件对数据进行处理,计量资料数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常眼位与斜视患儿眼外肌中 IGF-1 蛋白表达的免疫组织化学法结果 免疫组织化学检测结果显示,IGF-1在眼外肌细胞中表达部位主要为胞浆,细胞外基质中有少量的表达。手术截取的正常眼位组眼外肌中IGF-1含量较为丰富(图1A)。与正常眼位组相比,共同性内斜视组截取的外直肌中,肌细胞IGF-1的含量明显减少($P<0.05$;图1B,图2);共同性外斜视组截取的内直肌与正常眼位组相比较,肌细胞IGF-1的含量同样明显减少($P<0.05$;图1C,图2);共同性内斜视组与共同性外斜视组相比较,肌细胞IGF-1的含量略多,差异无统计学意义($P>0.05$;图1B,C,图2)。

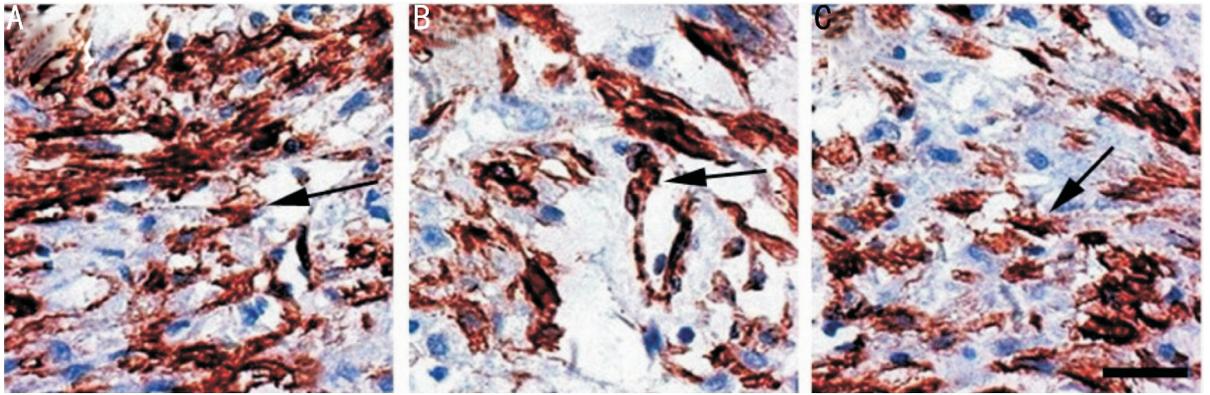


图1 免疫组织化学法检测各组患儿眼外肌中 IGF-1 表达 (Bar=50 μ m) A:正常眼位组; B:共同性内斜视组; C:共同性外斜视组(箭头示 IGF-1 表达阳性)。

2.2 正常眼位与斜视患儿眼外肌中 IGF-1 蛋白表达的免疫印迹法检测结果 免疫印迹法检测结果显示,手术截取的正常眼位组眼外肌中 IGF-1 含量较为丰富;共同性内斜视组截取的外直肌、共同性外斜视组截取的内直肌较正常眼位组截取的眼外肌比较,肌细胞中 IGF-1 的含量均明显减少($P<0.05$,图3);共同性内斜视组与共同性外斜视组相比较,肌细胞 IGF-1 的含量略少,差异无统计学意义($P>0.05$,图3)。

2.3 正常眼位与斜视患儿血清中 IGF-1 含量的 ELISA 法结果 将酶标仪测得各组数据对照标准曲线,计算出各组血清中 IGF-1 的含量(图4)。正常眼位组患儿血清中 IGF-1 含量为 14.45 ± 1.33 ng/mL,共同性内斜视组患儿血清中 IGF-1 含量为 13.50 ± 2.17 ng/mL,共同性外斜视组患儿血清中 IGF-1 含量为 13.63 ± 1.85 ng/mL。各组间 IGF-1 含量的差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

眼外肌的重要功能是调节眼球的精确运动,为了维持双眼视功能的一致性并优化视野,眼外肌的力量必须以一种相互协调的方式来精确调节。当眼外肌力量调节的精确平衡被打破时,通常就会发生斜视甚至影响视功能^[5,6]。目前对于斜视的治疗主要采用的是手术矫治,除此以外,肉毒杆菌毒素已是临床常用的斜视治疗手段和补充方法^[7-9]。近年来,在流行病学研究、临床治疗研究以及发病机制的基础研究方面,IGF-1 在儿童斜视发病过程中的作用及机制已日益成为人们关注的焦点。

IGF-1 能提高骨骼肌肌力,促进骨骼肌增生,加速受损骨骼肌的恢复,目前已在运动医学领域广泛研究并证实^[10]。眼外肌作为一种特殊的骨骼肌,有研究证明,当 IGF-1 的轴突运输出现障碍时,很可能导致斜视的出现^[11-13]。在本研究中,我们对内源性的 IGF-1 尤其感兴趣,并把研究重点放在正常眼位及不同类型斜视儿童眼外肌及血清中 IGF-1 的含量上,发现正常眼位组儿童眼外肌中的 IGF-1 含量明显高于共同性内斜视组及共同性外斜视组,但各组别儿童血清中 IGF-1 含量的差异无统计学意义。IGF-1 是肌源型生长因子之一,其对肌肉的作用机制为:通过有丝分裂激活的蛋白肌酶介导肌卫星细胞增生和通过磷脂酰肌醇-3 激酶介导的信号促进肌纤维蛋白

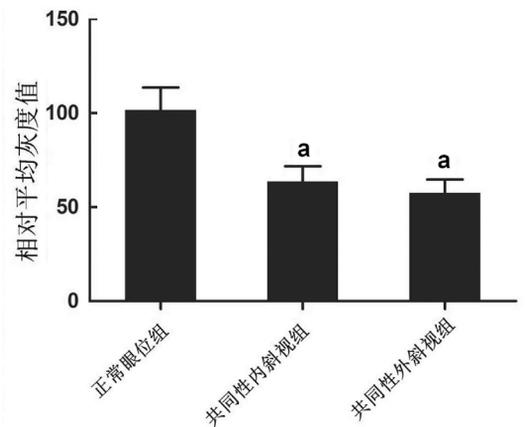


图2 免疫组化法检测各组眼外肌中 IGF-1 表达的相对平均灰度值 ^a $P<0.05$ vs 正常眼位组。

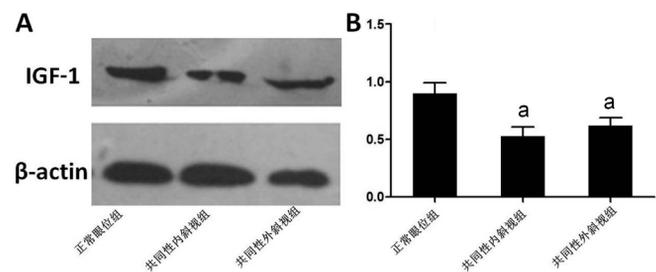


图3 免疫印迹法检测各组患儿眼外肌中 IGF-1 表达 A:电泳条带图; B:灰度相对比值柱状图(^a $P<0.05$ vs 正常眼位组)。

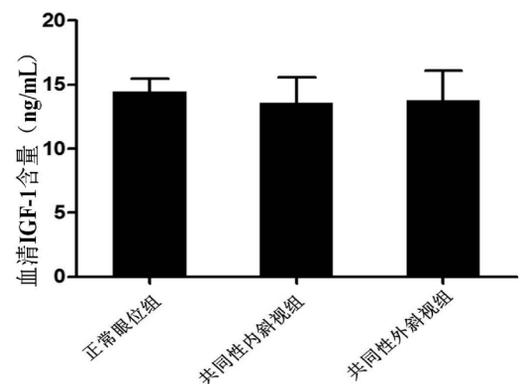


图4 ELISA 法检测各组患儿血清中 IGF-1 含量。

合成和葡萄糖摄取,从而增强肌肉的收缩力,促进肌纤维发育^[14,15]。综合本实验的结果,结合国内外文献报道,我们推测共同性内斜及共同性外斜等儿童常见单纯眼位异

常的发生,可能与眼球血供中 IGF-1 含量的多少相关性不大,其影响在于控制眼球运动的眼外肌局部 IGF-1 含量的多少。共同性内斜视患儿外直肌中 IGF-1 含量较正常眼位儿童明显减少,与外直肌力量相对较弱,临床表现为眼位向内偏斜相一致;同样,共同性外斜视患儿内直肌中 IGF-1 含量较正常眼位儿童明显减少,与内直肌力量相对较弱,临床表现为眼位向外偏斜相吻合。

此研究结果进一步说明,眼外肌中 IGF-1 的含量与眼外肌力量调节的精确平衡密切相关,IGF-1 可能是斜视形成机制中的重要调控分子之一,目前临床尚缺乏能通过保守治疗增加眼外肌肌肉力量的药物。本研究结果提示应用 IGF-1 在眼外肌局部注射对于治疗斜视等眼外肌相关疾病具有潜在的应用前景,然而其作用的具体机制及可能产生的副作用仍需进一步研究。

参考文献

- 1 赵堪兴. 我国斜视显微手术的探索. 中华眼科杂志 2011;47(11):961-963
- 2 Engel JM. Adjustable sutures; an update. *Curr Opin Ophthalmol* 2012;23(5):373-376
- 3 Chen J, von Bartheld CS. Role of exogenous and endogenous trophic factors in the regulation of extraocular muscle strength during development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(10):3538-3545
- 4 Anderson BC, Christiansen SP, Grandt S, et al. Increased extraocular muscle strength with direct injection of insulin-like growth factor-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(6):2461-2467
- 5 Spencer RF, Porter JD. Structural organization of the extraocular muscles. *Rev Oculomot Res* 1988;2:33-79

- 6 Nabie R, Azadeh M, Andalib D, et al. Anchored versus conventional hang-back bilateral lateral rectus muscle recession for exotropia. *J AAPOS* 2011;15(6):532-535
- 7 Couser NL, Lambert SR. Botulinum toxin a treatment of consecutive esotropia in children. *Strabismus* 2012;20(4):158-161
- 8 Gardner R, Dawson EL, Adams GG, et al. The use of Botulinum toxin to treat strabismus following retinal detachment surgery. *Strabismus* 2013;21(1):8-12
- 9 Maya JF, de Liaño RG, Catalán MR, et al. Botulinum toxin treatment in patients up to 3 years of age who have esotropic Duane retraction syndrome. *Strabismus* 2013;21(1):4-7
- 10 李云霞,陈世益. 胰岛素样生长因子与骨骼肌再生. 中华创伤外科杂志 2001;17(11):701-703
- 11 Li T, Wiggins LM, von Bartheld CS. Insulin-like growth factor-1 and cardiotrophin 1 increase strength and mass of extraocular muscle in juvenile chicken. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(5):2479-2486
- 12 Li T, Feng CY, von Bartheld CS. How to make rapid eye movements "rapid": the role of growth factors for muscle contractile properties. *Pflugers Arch* 2011;461(3):373-386
- 13 Ruas JL, White JP, Rao RR, et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 2012;151(6):1319-1331
- 14 Singleton JR, Feldman EL. Insulin-like growth factor-1 in muscle metabolism and myopathies. *Neurobiol Dis* 2001;8(4):541-554
- 15 Philippou A, Halapas A, Maridaki M, et al. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007;7(3):208-218

科技期刊对论文题目的要求

题名,是论文的总纲,是能反映论文最主要的特定内容的最恰当、最简明的词语的逻辑组合。

首先,题名应准确得体。应以最恰当的词语反映论文的特定内容,把论文的主题明白无误地告诉读者,并且使之起到画龙点睛、启迪读者阅读兴趣的作用。题名的用词十分重要,它直接关系到读者对论文取舍的态度,务必字字斟酌。题名不能使用笼统和华而不实的词语,一般也不用主、谓、宾齐全的完整句子,而用以名词性词组做中心语的偏正词组并切忌写成标语口号似的“题名”。

其次,题名应简短精练。GB/T 7713-1987 规定,论文题名一般不超过 20 个汉字。在拟定题名或编辑加工时,应删去多余的词语,避免存在无用的字和词。这是为了醒目,便于记忆和引用。使用简短的题名而语意未尽时,或系列工作分篇报道时,可借助于副题名,以补充题名之不足。

第三,题名应便于检索。题名所用的词语必须有助于选定关键词和编制题录、索引等二次文献,以便为检索提供特定的实用信息。这就要求题名中一定要有反映论文特定内容的关键词,关键词多一些更好。

第四,题名应容易认读。题名中应当避免使用数学公式、化学结构式,以及非共知共用的缩略词、首字母缩写字、字符、代号等。

摘自《科学技术期刊编辑教程》