

形觉剥夺性近视豚鼠视网膜形态学观察及 TGF- β_2 表达

周凌霄¹, 王理论², 张林³

作者单位:¹(710077)中国陕西省西安市,西安医学院第一附属医院眼科;²(716000)中国陕西省延安市,延安大学附属医院眼科;³(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介:周凌霄,硕士,主治医师,研究方向:屈光不正、斜弱视。

通讯作者:张林,女,在读博士研究生,副主任医师,副教授,研究方向:角膜病、青光眼、白内障、眼科美容整形和眼眶肿瘤。

Zhanglinxjtu@163.com

收稿日期:2014-09-03 修回日期:2014-10-22

Structure changes of retina and expression of TGF- β_2 in the retina in form deprivation myopia of guinea pigs

Ling-Xiao Zhou¹, Li-Lun Wang², Lin Zhang³

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China;

²Department of Ophthalmology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China; ³Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Lin Zhang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. Zhanglinxjtu@163.com

Received:2014-09-03 Accepted:2014-10-22

Abstract

• **AIM:** To observe the structure changes of retina and determine the expression of TGF- β_2 in retina model. At the same time to clarify the function of TGF- β_2 in form deprivation myopia 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 ocular axial was determined by A-scan ultrasonography. Morphologic alternations of the retina were observed by light microscope. The expression of TGF- β_2 in the retina was determined by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** Retina of myopic eyes became thinner, and inner nuclear layer of retina had few layers, nuclear of outer nuclear layer became smaller and circular, at the same time, they arranged in disorder. The immunohistochemistry results showed that expression of TGF- β_2 in model eyes was lower than that in control eyes ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Covering eyes with facemasks is effective, simple and convenient in making myopic

model. The retina of the model eye appears degeneration. TGF- β_2 plays an important role in the course of development in form deprivation myopia.

• **KEYWORDS:** form deprivation myopia; retina; TGF- β_2

Citation: Zhou LX, Wang LL, Zhang L. Structure changes of retina and expression of TGF- β_2 in the retina in form deprivation myopia of guinea pigs. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1950-1952

摘要

目的:观察形觉剥夺性近视豚鼠视网膜组织学改变和 TGF- β_2 在视网膜中的表达,为阐明 TGF- β_2 在形觉剥夺性近视中的重要作用提供实验依据。

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 染色后观察后极部视网膜形态学改变,通过免疫组化对 TGF- β_2 在视网膜内表达进行定性及半定量测定。

结果:实验组视网膜变薄,且内核层的胞核层数较对照眼少,视网膜外核层细胞核变小、变圆,排列不均,视细胞层外节内节排列紊乱。免疫组化检查示实验组视网膜 TGF- β_2 表达明显下调。

结论:头套遮盖效果明显,是一种诱导形觉剥夺性近视简便、稳定的方法。形觉剥夺性近视眼的视网膜产生了一系列的退行性改变。TGF- β_2 可能是最终导致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;视网膜;TGF- β_2

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.09

引用:周凌霄,王理论,张林.形觉剥夺性近视豚鼠视网膜形态学观察及 TGF- β_2 表达.国际眼科杂志 2014;14(11):1950-1952

0 引言

近视目前是人类发生率最高的一种屈光不正,200多年来人们不断对近视的发生和发展进行着探索。但是令人遗憾的是,随着人类文明的进展,近视发病率逐年增加,发病年龄有逐渐减小的趋势,而且人们提出的多种假说仍然不能真正揭示近视的发病原因和发病机制,所以直到今天也没有确切有效的控制近视发生和发展的方法。

“局部视网膜调控机制”认为局部视网膜信号的变化,导致巩膜薄弱、眼轴延长,最终引起了近视发生^[1,2]。TGF- β 是一类多功能的细胞因子,它通过自分泌或旁分泌形式,在调节细胞增殖、分化、ECM 形成、创伤修复等过程中起着重要作用。潘红卫等^[3]在研究中发现 TGF- β_1 可以促进体外培养的巩膜成纤维细胞增殖和 DNA 合成,得出了它的表达下调可能在近视发生过程中发挥重要作用的结论。在 TGF- β 家族中,TGF- β_2 在信号转导系统

表1 两组屈光度及眼轴长度的比较结果

组别	屈光度(D)				眼轴长度(mm)			
	形觉剥夺前	剥夺 6wk	Z/t	P	形觉剥夺前	剥夺 6wk	t	P
实验组	4.125±0.29	-5.275±1.17	Z=-3.819	<0.01	7.270±0.16	8.408±0.16	-15.863	<0.01
对照组	4.1±0.21	3.7±0.33	t=3.236	<0.01	7.270±0.14	7.736±0.12	-8.185	<0.01
Z/t	t=0.218	Z=-3.807			t=-0.002	t=10.528		
P	>0.05	<0.01			>0.05	<0.01		

中占主导地位^[4],在笔者的既往研究中发现,形觉剥夺豚鼠巩膜组织中 TGF- β_2 的表达明显下调,巩膜变薄,结构紊乱^[5],本研究旨在通过对形觉剥夺性近视眼中视网膜的形态学和 TGF- β_2 表达的研究,进一步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 2 周龄三色豚鼠共 10 只,雌雄不限,排除眼疾。试剂选用 TGF- β_2 兔多抗隆抗体,羊抗兔 IgG 抗体;SABC 免疫组化试剂盒,DAB 显色试剂盒,购自北京博奥森公司;其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 形觉剥夺性近视动物模型的建立 采用单眼遮盖法,右眼作为实验眼,左眼作为对照眼。依照豚鼠头部形状将 6 号乳白色半透明无毒乳胶气球剪制成头套并固定,暴露出动物的左眼、双耳及口鼻。实验过程中定时检查面罩的位置,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。饲养动物于自然光条件下共 6wk。

1.2.2 屈光度及眼轴长度测量 所有测量均选用单盲法,在不知分组的情况下,由同一名专业技术人员完成屈光度及眼轴测量,一名助手记录数据,实验设计者不参与测量工作。(1)屈光度测量:分别于实验前后用 10g/L 复方托吡卡胺滴眼液点双眼,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。所测得的柱镜度数以半量折合计入球镜度数。(2)眼轴长度测量:盐酸奥布卡因滴眼液点双眼后进行眼轴长度的测量。测量时 A 超诊断仪选择手动模式,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/sec),晶状体(1645m/sec),出现较理想的波形便进行手动标记,每眼测量 3 次,取平均值。

1.2.3 形态学观察 上述测量结束后,过量 10% 水合氯醛腹腔注射处死实验动物,迅速摘除眼球,弃眼前节,随机每组取出 2 只眼球以 15% 甲醛,4℃ 冰箱固定 48h,逐级酒精脱水,常规石蜡包埋。以 6 μ m 厚度连续切片,HE 染色,使用 Olympus 普通双目光学显微镜观察视网膜形态学改变。

1.2.4 免疫组织化学检测视网膜内 TGF- β_2 表达 与上述方法相同制取切片,常规梯度酒精脱蜡。按试剂说明书操作,修复抗原,10% 正常血清封闭 30min,滴加 TGF- β_2 一抗(兔多克隆抗体)后于 4℃ 过夜;37℃ 加生物素二抗持续 20min;加 SABC 37℃ 持续 20min,DAB 显色 8min,苏木素复染,酒精脱水,透明,中性树胶封片。阴性对照用 PBS 代替一抗。TGF- β_2 阳性染色为胞浆内见棕色不定形物质。使用 Olympus 普通双目光学显微镜 400 倍镜下观察,在每眼视网膜区域随机选取 10 个视野,分别计数阳性细胞,计算平均值。

统计学分析:运用统计软件 SPSS 18.0 软件包进行处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表达,两组间比较采用 *t* 检验,方差不齐时使用秩和检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 实验前后的屈光状态及眼轴长度的变化 本研究开始时,动物的实验眼和对照眼均为中度远视眼,远视度数约为 +4.00D,眼轴长度约为 7.3mm。干预前两组组间、组内屈光度及眼轴长度差异无显著统计学意义。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 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、眼轴长度差异均可见显著统计学意义(表 1)。

2.2 光镜观察 光镜下实验组与对照组相比,实验组视网膜变薄,内核层的胞核层数明显减少,外核层细胞核较小、较圆,排列不均匀,视细胞层内外节排列紊乱。而对照组视网膜未见上述改变(图 1,2)。

2.3 视网膜内 TGF- β_2 表达情况 TGF- β_2 在实验组和对照视网膜内均有表达,在神经上皮和感光细胞外段较为集中,实验组阳性细胞计数明显少于对照组。说明实验组(4.62±0.74)视网膜内 TGF- β_2 表达低于对照组(13.75±1.83),差异有统计学意义($t=13.06, P<0.05$,图 3,4)。

3 讨论

本研究选择 2 周龄幼年豚鼠是由于豚鼠眼在解剖结构、生物构成及生理功能方面与人类较为相似,并且该年龄段豚鼠仍处于视觉发育高峰期,对形觉剥夺十分敏感^[6]。豚鼠经过 6wk 的形觉剥夺,实验眼的轴长平均延长了 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,与其他国内外研究相比较^[7],这可能是由于自行设计的头套适合实验动物的颜面发育,对实验眼遮盖效果良好,并且很少出现遮盖物脱落,将原有形觉剥夺方法对诱导实验的影响大幅度降低。

在所有的关于近视发病机制的学说中,“局部视网膜调控机制”引起了广泛的关注。即视网膜接受外界视觉信息刺激,启动视网膜-视网膜色素上皮层(RPE)-脉络膜信号转导系统,局部视网膜信号被转化为调控巩膜细胞外基质重塑的信号,引起巩膜细胞外基质主动重塑,导致后极部巩膜组织过度丢失及进行性变薄,眼轴不断向后延伸,脉络膜视网膜承受的机械性张力进行性增加以致脉络膜视网膜受损,最终表现为近视眼视功能减退及并发症发生^[1,8]。有研究证实,使用半视野散光镜片对小鸡眼球一半视野进行形觉剥夺,发现只有形觉剥夺区域出现过度生长^[9],破坏视网膜的眼球巩膜软骨细胞增生受到抑制,单纯遮盖的眼球巩膜软骨细胞增殖明显活跃^[10],还有对某些特定基因敲除动物模型的研究^[11,12]都证实了视网膜局部信号的改变在近视发生发展中起到了重要的作用。

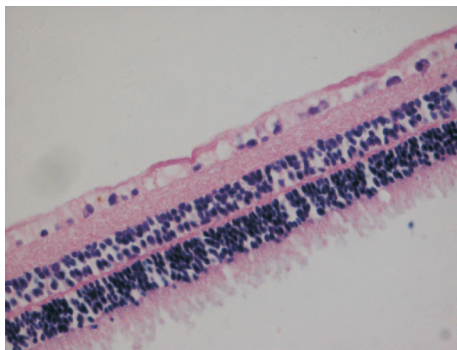


图1 实验组视网膜(HE,×400)。

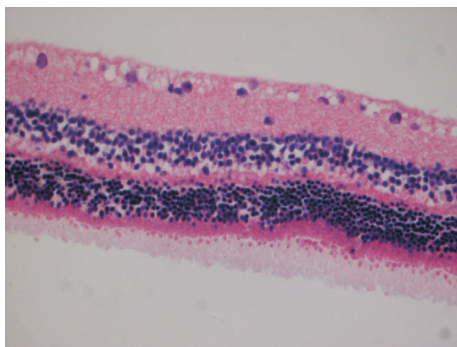


图2 对照组视网膜(HE,×400)。

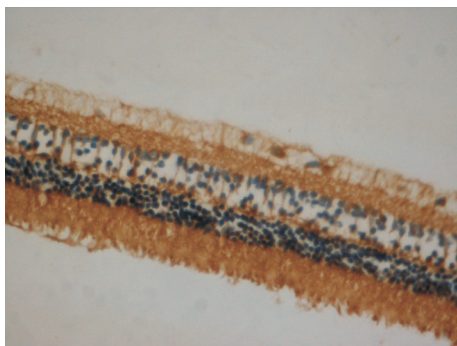


图3 实验组视网膜内TGF-β₂表达情况(SABC,×400)。

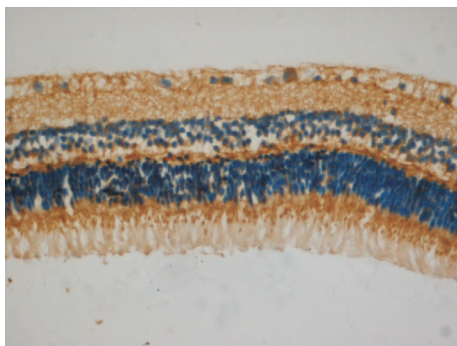


图4 对照组视网膜内TGF-β₂表达情况(SABC,×400)。

TGF-β可双向调节细胞的生长、分化,对不同的类型和来源的细胞的作用也有所不同,在TGF-β多种生物学功能中,抑制生长为其一般效应。TGF-β也有调节细胞外基质合成的作用,它可增强I型胶原的转录、翻译,增加成纤维细胞、平滑肌细胞中弹性蛋白的合成和释放,促进成纤维细胞合成透明质酸,此外还能促进合成纤维粘连蛋白、整合素等其他蛋白多糖。TGF-β同时还可以减少基质的降解,抑制蛋白酶水解酶合成,增加蛋白酶抑制剂的分泌从而使细胞外基质沉积,调节巩膜或纤维细胞的增殖和细胞外基质的构成,作为巩膜生长过程的启动因子发

挥作用^[13]。研究已经证实TGF-β的3种亚型存在于动物及人眼球各部分组织,TGF-β₂为主要生物活性成分。巩膜表达TGF-β受体TβR I、TβR II,说明巩膜是TGF-β发挥作用的部位,TGF-β与巩膜成纤维细胞上相应受体结合发挥作用,可能是影响形觉剥夺性近视发生发展的机制之一。

在近视的发生发展过程中,眼轴延长伴随着巩膜的变薄,但并非仅由于巩膜的机械性伸展,还伴有巩膜组织的合成减少及降解增加^[14],左韬等^[15]发现TGF-β能够促进体外培养的大鼠巩膜成纤维细胞的增殖,并呈量效关系,驱动细胞进入G₂/M期,从而得出了TGF-β的表达下调可能在近视发展过程中起到了重要作用的结论。笔者曾经的研究发现,经过6wk的形觉剥夺,实验豚鼠巩膜组织中TGF-β₂的表达明显下调,巩膜组织胶原纤维排列紊乱,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^[5]。

本实验中发现形觉剥夺性近视豚鼠视网膜中TGF-β₂的表达出现显著下调。由此可以推测:在近视形成过程中,可能由于视网膜TGF-β₂的显著下调,与巩膜TGF-β受体结合减少,导致细胞外基质的分泌减少,同时降解增加,细胞外基质组织结构不规则,巩膜变薄,抵抗力降低,从而导致眼轴延长,产生轴性近视。在今后的研究中,如果能对TGF-β₂及其下游蛋白、酶类等实验性近视模型巩膜中的表达进行定量,并考查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 sclera growth underlies visual deprivation myopia in chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(7):2143-2150
- 2 朱玉广,刘双珍. 视网膜神经递质系统在形觉剥夺性近视中的调控作用. *眼科新进展* 2003;23(2):138-141
- 3 潘红卫,曾骏文. TGF-β₁对小鼠巩膜成纤维细胞增殖和细胞周期的影响. *眼科研究* 2005;23(3):232-234
- 4 谢坤鹏,吕勇. TGF-β₂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
- 5 周凌霄,张林,王理论,等. 形觉剥夺性近视豚鼠巩膜形态及TGF-β₂表达的变化. *国际眼科杂志* 2011;11(4):602-604
- 6 陈敏洁. 视网膜 Sonic hedgehog 信号通路在豚鼠形觉剥夺性近视眼模型中的作用机制研究. 复旦大学 2012
- 7 Rada JA, Achen VR, Roda KG. Decreased proteoglycan synthesis associated with form-deprivation myopia in mature primate eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(8):2050-2058
- 8 文丹,刘双珍,毛俊峰,等. MK801对近视视网膜NO-cGMP信号通路的调控. *中南大学学报(医学版)* 2012;37(7):737-741
- 9 Stone RA, Pendrak K, Sugimoto R, et al. Local patterns of image degradation differentially affect refraction and eye shape in chick. *Curr Eye Res* 2006;31(1):91-105
- 10 刘丽,周跃华. 视网膜对形觉剥夺性近视鸡巩膜MMP-2的调控. *眼科新进展* 2006;26(11):831-835
- 11 Jackson CR, Ruan GX, Aseem F, et al. Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision. *J Neurosci* 2012;32(27):9359-9368
- 12 徐超立,吴建峰,毕宏生. 多巴胺在近视发生发展中的作用. *眼科新进展* 2014;34(1):86-90
- 13 Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *Clin Invest* 1992;90:1-7
- 14 McBrien NA, Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Prog Retin Eye Res* 2003;2(3):307-338
- 15 左韬,马贤德,张祝强,等. bFGF、TGF-β、NGF、IGF-I对大鼠巩膜成纤维细胞增殖影响实验研究. *辽宁中医药大学学报* 2014;16(9):13-16