

BMP-2 在 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视眼巩膜中表达的变化

张 玉, 杨 先, 姜丽萍, 刘桂波, 王双双

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 81300790); 山东省自然科学基金项目 (No. BS2010SF009)

作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学附属医院眼科
作者简介: 张玉, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 小儿斜视与弱视。

通讯作者: 杨先, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 视光学与斜视弱视. yangxian_zhao@126.com

收稿日期: 2015-12-11 修回日期: 2016-02-25

Role of bone morphogenetic protein-2 in sclera remodeling of form deprivation myopic eyes in C57BL/6 mice

Yu Zhang, Xian Yang, Li-Ping Jiang, Gui-Bo Liu, Shuang-Shuang Wang

Foundation items: the National Natural Science Foundation of China (Youth Foundation, No. 81300790); Natural Science Foundation of Shandong Province (No. BS2010SF009)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Xian Yang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. yangxian_zhao@126.com

Received: 2015-12-11 Accepted: 2016-02-25

Abstract

• **AIM:** To identify the presence change of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in sclera of form deprivation myopic (FDM) eyes in C57BL/6 mice and to investigate its role in sclera remodeling.

• **METHODS:** A total of 64 C57BL/6 mice which were 3 ~ 4wk were randomized into FDM-21d group ($n=16$), a normal control group ($n=16$); FDM-28d group ($n=16$) and a normal control group ($n=16$). FDM models were established by sutured 0.5mL PCR plastic caps to the skin surrounding the right eye for 21 days and 28 days in experimental group, and the fellow eyes served as the self-control eyes. Diopter and axial length of all eyes was tested by retinoscopy optometry and vernier calipers before and after the form deprivation. As the models established, the sclera of the mice were obtained and hematoxylin and eosin (H-E) staining were used for observing the morphological change in the tissue. Immunohistochemical staining and fluorescence quantificational real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR) were applied to investigate the expression of BMP-2 protein and mRNA.

• **RESULTS:** After 21 and 28d, the diopter of the deprived eyes was $-1.60 \pm 1.03D$ and $-3.10 \pm 1.19D$ and the axial length was prolonged by $16 \pm 12\mu m$ and $21 \pm 13\mu m$ respectively. The differences were statistically significant, compared to self-control eyes and to normal control groups ($P < 0.05$). After stained by H-E, the sclera from the deprived eyes became thinner and the sequence of collagenous fiber disappeared. The results from the immunohistochemical staining and QRT-PCR showed that mRNA and protein of BMP-2 decreased significantly, and the differences were statistically significant, compared to self-control eyes and to normal control groups ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The expressions of the BMP-2 in sclera down-regulate significantly in FDM eyes, which suggests that BMP-2 may play an important role in sclera remodeling during myopia development.

• **KEYWORDS:** C57BL/6 mice; bone morphogenetic protein-2; form-deprivation myopia; sclera

Citation: Zhang Y, Yang X, Jiang LP, *et al.* Role of bone morphogenetic protein-2 in sclera remodeling of form deprivation myopic eyes in C57BL/6 mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(3):423-427

摘要

目的: 观察 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视 (form-deprivation myopia, FDM) 巩膜中 BMP-2 表达的变化, 研究其在巩膜重塑中发挥的作用。

方法: 选择 3 ~ 4 周龄的 C57BL/6 小鼠 64 只, 以随机数字表法随机分为形觉剥夺 21d 组 (16 只)、同龄对照组 (16 只); 形觉剥夺 28d 组 (16 只)、同龄对照组 (16 只)。形觉剥夺前后对所有小鼠进行带状光剪影验光检测小鼠眼球的屈光状态, 游标卡尺测量小鼠的眼轴长度, 造模后分别于 21d 和 28d 取小鼠的巩膜组织, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠巩膜组织形态学变化, 用荧光定量 RT-PCR 和免疫组织化学检测各组小鼠巩膜 BMP-2 mRNA 和其蛋白的表达水平。

结果: 小鼠形觉剥夺 21d 和 28d 后, 剥夺眼分别诱导出 $-1.60 \pm 1.03D$ 和 $-3.10 \pm 1.19D$ 的相对近视, 眼轴分别拉长 $16 \pm 12\mu m$ 和 $21 \pm 13\mu m$, 与自身对照组和正常对照相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HE 染色行巩膜形态学观察, 可观察到剥夺眼巩膜变薄, 胶原纤维排列紊乱。荧光定量 RT-PCR 和免疫组织化学结果显示实验眼 BMP-2 mRNA 和蛋白的表达明显下调, 与自身对照和正常对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: C57BL/6 小鼠形觉剥夺眼巩膜中 BMP-2 呈下调趋势, BMP-2 可能参与了近视发展过程中的巩膜重塑作用,

其具体机制有待进一步研究。

关键词: C57BL/6 小鼠;骨形态发生蛋白;形觉剥夺性近视;巩膜

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.3.05

引用:张玉,杨先,姜丽萍,等. BMP-2 在 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视眼巩膜中表达的变化. 国际眼科杂志 2016;16(3):423-427

0 引言

目前普遍认为,近视的发生受遗传和环境等多因素的综合影响^[1],但确切的发病机制仍不清楚。在近视的发展过程中,巩膜胶原聚集减少,降解增加,这些改变导致巩膜干重的下降,以及巩膜后极部胶原纤维平均直径变小,胶原纤维分布紊乱^[2]。关于巩膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的改变已经有了相关的研究,McBrien^[3]发现 BMP/TGF- β 信号通路有调控巩膜 ECM 的作用。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族中的一员。BMPs 超家族在细胞的许多功能当中发挥着重要的调节作用,其与多种组织的形态发育和细胞外基质重塑相关,被称为“体形态发生蛋白”。研究证明, BMP-2 可以促进体外培养的人类巩膜成纤维细胞(human scleral fibroblasts, HSFs)中 ECM 的合成^[4]。王青等^[5]发现豚鼠近视模型中,14d 后近视眼巩膜中 BMP-2 的表达明显下降。Liu 等^[6]发现 BMP2K 基因异常与高度近视密切相关,说明 BMP-2 与近视的发生发展密切相关。本文通过建立 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视模型,研究 BMP-2 在巩膜中的变化,探讨其在巩膜重塑中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 3~4 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 64 只(购自常州卡文斯实验动物有限公司,由青岛大学医学院实验中心饲养),体质量 10~13g,排除患有眼疾及双眼屈光参差 $<1.5D$ 的小鼠,每笼 4 只,室温控制在 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$,光照/黑暗周期为 14h/10h,室内控制照明调节在 250~350Lu。给予小鼠专用饲料,并每日给予新鲜蔬菜水果,自由饮水,动物的饲养及处理经青岛大学医学院动物伦理委员会审批通过。

1.1.2 主要试剂与仪器 带状光剪影镜(苏州六六)、兔抗鼠多克隆抗体 BMP-2(BA0585-1)购于武汉博奥森公司,SP 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司,Ver. 3.0 型 RNA PCR 试剂盒(100 次量)购于大连宝生物试剂公司,SYBY(日本, TaKaRa)、实时荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf),PCR 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠形觉剥夺性近视模型的建立 64 只 3~4 周龄雄性近交系 C57BL/6 小鼠,随机分为形觉剥夺组($n=32$)和正常对照组($n=32$):(1)形觉剥夺组选取右眼为剥夺眼,佩戴 0.5mL EP 管盖子,左眼作为自身对照眼,依据形觉剥夺时间 21d、28d 不同时间建立近视动物模型。(2)正常对照组,在颈部佩戴塑料项圈,双眼不做任何处理,年龄与实验组相同。小鼠用 5% 枸橼酸芬太尼注射液以 4mg/kg 麻醉后,将 0.5mL EP 管盖子用 5-0 缝线缝 4~6 针在小鼠眼周,被遮眼能瞬目,不压迫眼球,颈部佩戴项圈,防止小

鼠将眼罩抓脱。每天用棉签擦拭小鼠对侧眼及眼周,防止感染,每天 3 次检查小鼠眼罩是否掉针,脱落,以保证小鼠被遮眼一直处于被遮状态。诱导 21d 和 28d 后,分别检查所有动物的屈光度和眼轴长度,并取巩膜组织进行检测。

1.2.2 屈光度及眼轴长度的测量 小鼠在清醒的状态下,用复方托吡卡胺散瞳,每 5min 1 次,连续 3 次后,验光由有经验的验光师在暗室条件下,手持带状光检影镜检测屈光度,每只小鼠测 3 次,取平均值并记录屈光值(D)。脱颈法处死小鼠后,迅速取出眼球,在显微镜下去除多余筋膜及肌肉组织,用生理盐水冲洗后,用电子游标卡尺测量眼轴的长度(角膜的前顶点到眼球后极部之间的直线距离),精确到 0.01mm,测量 3 次后取平均值并记录。

1.2.3 标本的处理 所有操作均在显微镜观察下在冰床上进行,取出眼球后,用眼科镊和眼科剪剥离眼球周围筋膜,沿角膜缘将眼球剪开,去除眼球内的玻璃体,并将视网膜和脉络膜分离,取巩膜组织,随机各组取 6 只小鼠眼球置于 4% 甲醛固定 48h,行常规 HE 染色及免疫组织化学染色,各组另 10 只小鼠眼球的巩膜组织置于 500mL Trizol 液中,并立即震荡充分裂解后,保存于 -80°C 以提取 RNA,进行实时荧光定量 PCR 反应。

1.2.4 HE 染色观察小鼠巩膜组织形态学变化和免疫组织化学染色法检测 BMP-2 蛋白的表达 在各个实验组中取 6 只小鼠眼球,予以常规石蜡包埋,所有组织块于后极部以 $3\mu\text{m}$ 的厚度连续切片 4 张,一张用于苏木素-伊红(HE)染色,1 张用做阴性对照,2 张用于免疫组织化学染色:(1)石蜡切片置于 60°C 温箱中烤片过夜;(2)行常规梯度酒精脱蜡至水;(3)高压抗原修复:0.01mol/L 柠檬酸钠溶液 500mL 于高压锅中煮沸后,放入石蜡切片,中火至冒气,再改为小火 2min,然后冷却至室温,蒸馏水冲洗 3 遍;(4)3% H_2O_2 室温孵育 15min,蒸馏水冲洗,PBS 漂洗 3min $\times 3$ 次;(5)正常山羊血清工作液封闭,室温孵育 15min,倾去血清,勿洗,滴加 1:100 稀释兔抗鼠多克隆抗体 BMP-2 单克隆抗体工作液, 37°C 湿盒孵育 2h;(6)滴加生物素化二抗工作液,室温孵育 15min,PBS 漂洗 5min $\times 3$ 次;(7)滴加 PV-6001 工作液,室温孵育 15min,PBS 漂洗 5min $\times 3$ 次;(8)DAB 显色 5min,在显微镜下掌握染色程度,自来水冲洗终止染色;苏木素复染细胞核 10s,1% 盐酸酒精分化脱色,自来水洗 1 遍;(9) 60°C 温箱中烤干后,树胶封固,显微镜下观察、拍片。光镜下分别观察各组标本中 BMP-2 的显色程度、分布范围及密度,以细胞核或细胞浆染成棕黄色为阳性。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析检测图像,用平均光密度值表示 BMP-2 的相对蛋白表达量。以 PBS 代替一抗为阴性对照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测小鼠巩膜中 BMP-2 mRNA 表达 提取总 RNA:从 -80°C 冰箱内取出冻存的小鼠巩膜组织,用 Trizol 法提取总 RNA。目的基因应用 primer design 基因分析软件设计引物,并由 TaKaRa 生物公司合成。BMP-2 上下游引物分别为:5'-TGACTGGATCGTGGCACCTC-3', 5'-CAGAGTCTGCACTATGGCATGGTTA-3',产物片段长为 156bp;内参 β -action 上、下游引物分别为:5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3', 5'-GACTCATCGTACTCTCTGCTTGC-3',产物长度 301bp。常规提取总 RNA,采用紫外分光光度计分别测定光密度 OD260

表1 各组小鼠 FDM 后屈光度和眼轴长度的变化 $\bar{x} \pm s$

时间	组别	眼数	屈光度(D)	眼轴长度(mm)
FDM21d	正常对照眼	16	3.04±0.53	3.134±0.032
	自身对照眼	16	3.01±1.26	3.137±0.028
	实验眼	16	1.45±1.15 ^{a,c}	3.155±0.032 ^{a,c}
FDM28d	正常对照眼	16	2.48±0.67	3.241±0.041
	自身对照眼	16	2.45±0.54	3.243±0.038
	实验眼	16	-0.57±0.28 ^{b,e}	3.271±0.041 ^{b,e}

注:^a $P<0.01$,^b $P<0.01$ vs 自身对照眼;^c $P<0.05$,^e $P<0.05$ vs 正常对照眼。

表2 正常对照组与 FDM 自身对照眼及实验眼小鼠巩膜 BMP-2

平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

时间	眼数	正常对照眼	自身对照眼	实验眼
FDM 21d	6	0.662±0.029	0.627±0.006	0.215±0.022 ^{a,c}
FDM 28d	6	0.748±0.010	0.714±0.011	0.198±0.020 ^{b,d}

注:^a $P<0.05$ vs 自身对照眼;^c $P<0.05$ vs 正常对照眼;^b $P<0.01$ vs 自身对照眼;^d $P<0.01$ vs 正常对照眼。

与 OD280, OD260 与 OD280 比值在 1.8~2.0 之间,表明提取的 RNA 蛋白污染少,纯度较好。逆转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 BMP-2 目的基因, Syber Green 荧光定量 PCR 检测:PCR 热循环参数为 95℃ 30s, 95℃ 5s, 然后第二步反应 60℃ 30s, 95℃ 15s, 进行 40 个循环, 于每个循环的第二步(95℃ 15s)收集荧光信号。扩增结束后, 进入分析结果界面, 以 β -actin 作为内参照基因, 与对照组相比较得到目的基因的相对定量值 RQ ($RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

统计学分析:应用统计学 SPSS 17.0 软件对结果进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验眼与自身对照眼相比采用配对样本 t 检验, 实验眼及自身对照眼与正常对照组相比采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠屈光度和眼轴长度结果 实验前, 正常对照组、自身对照组以及实验组的平均屈光度数为 4.31 ± 1.35 、 3.71 ± 1.14 、 4.22 ± 1.47 D, 实验前屈光度均无统计学差异 ($P>0.05$)。形觉剥夺 21d 后, 实验眼较自身对照眼偏向近视方向 -1.50 D, 与自身对照和正常对照眼屈光度比较, 差异均有统计学意义 ($t = -12.275, P = 0.000$; $t = -13.971, P = 0.000$), 实验眼的眼轴也较自身对照眼和正常眼明显延长, 差异均有统计学意义 ($t = 5.723, P = 0.011$; $t = 6.118, P = 0.007$)。随着形觉剥夺时间的延长, 剥夺 28d 后, 实验眼相对自身对照眼偏向近视约 -3.0 D, 实验眼与自身对照眼 ($t = -14.832, P = 0.000$) 及正常对照眼 ($t = -16.123, P = 0.000$) 相比均产生明显的近视。眼轴长度增长了 $21 \pm 13 \mu\text{m}$, 实验眼与自身对照及正常对照相比组间差异有统计学意义 ($t = 5.437, P = 0.012$; $t = 7.812, P = 0.002$)。形觉剥夺前后各组的实验眼、自身对照眼和正常对照眼屈光状态和眼轴长度的变化见表 1。

2.2 各组小鼠光镜下巩膜的改变 小鼠正常眼后极部各层组织 HE 染色见图 1, 可以观察到小鼠巩膜成纤维细胞核染成蓝紫色, 呈长梭型, 细胞外基质为粉红色, 对照眼巩膜自赤道部向后极部巩膜逐渐增厚, 而实验眼缺乏这种特征。各组小鼠眼后极部结构见图 2, 形觉剥夺 21d 时, 可

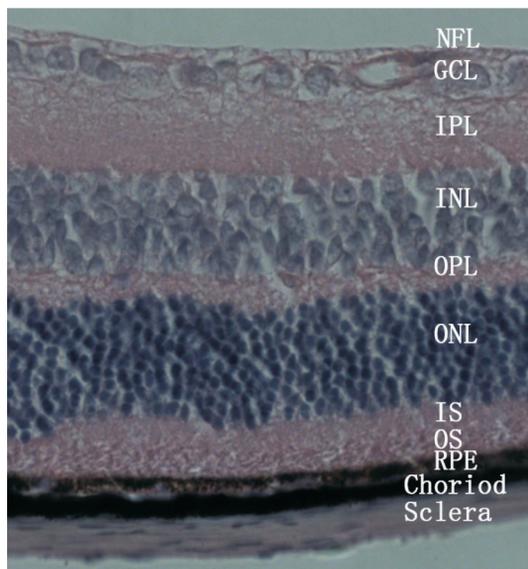


图1 小鼠正常眼后极部各层结构 HE 染色 ($\times 400$) 从上到下依次为: NFL: 神经纤维层 (nerve fibre layer); GCL: 神经节细胞层 (ganglion cell layer); IPL: 内丛状层 (inner plexiform layer); INL: 内核层 (inner nuclear layer); OPL: 外丛状层 (outer plexiform layer); ONL: 外核层 (outer nuclear layer); IS: 内节 (inner segment); OS: 外节 (out segment); RPE: 视网膜色素上皮层 (retinal pigment epithelium); Choriod: 脉络膜; Sclera: 巩膜。

以观察到实验眼分别与自身对照眼及正常眼相比较巩膜变薄, 成纤维细胞排列紊乱; 形觉剥夺 28d 后, 实验眼分别与自身对照眼及正常眼相比较可以观察到巩膜变薄, 胶原纤维紊乱、粗细不均, 成纤维细胞之间的间隙变大。

2.3 各组小鼠免疫组织化学染色结果 BMP-2 阳性蛋白表达于正常小鼠视网膜神经节细胞、内核细胞层、外核细胞层、内外节细胞及巩膜细胞的胞浆中, 呈棕黄色颗粒状, 胞核呈现蓝色。成纤维阳性细胞内胞浆染成深棕色, 染色明显。在小鼠形觉剥夺 21d 后 BMP-2 表达逐渐下调, 胞浆着色减弱; 形觉剥夺 28d 后, 成纤维细胞着色最浅。用图像分析软件 Image proplus 6.0 检测 BMP-2 蛋白表达的程度, 用平均光密度值表示 (表 2), 其值越大说明染色越深, BMP-2 蛋白表达越高; 反之表示染色越浅, 说明 BMP-2 蛋白表达量小。形觉剥夺 21d 实验眼分别与自身对照眼及正常对照眼相比差异有统计学意义 ($t = -4.461, P = 0.012$; $t = -5.521, P = 0.007$), 随着形觉剥夺时间的延长, 形觉剥夺 28d 实验眼染色越浅, 与自身对照眼及正常眼相比, 差异有统计学意义 ($t = -9.907, P = 0.000$; $t = -8.025, P = 0.000$, 图 3)。

2.4 各组小鼠巩膜 BMP-2 mRNA 的表达 根据荧光定量 RT-PCR 结果显示, 各组巩膜组织均有 BMP-2 mRNA 的表达。形觉剥夺 21d 后, 可观察到实验眼 BMP-2 mRNA 的表达量为 0.432 ± 0.041 , 与自身对照组 (0.872 ± 0.032) 和正常对照组 (0.913 ± 0.026) 相比, BMP-2 mRNA 的表达呈下调趋势, 差异有统计学意义 ($t = -4.465, P = 0.016$; $t = -4.827, P = 0.011$)。近视诱导 28d 时, 实验眼 BMP-2 mRNA 表达量为 0.376 ± 0.025 , 与自身对照组 (0.926 ± 0.013) 和正常对照组 (0.972 ± 0.016) 相比明显减少, 差异有统计学意义 ($t = -5.179, P = 0.009$; $t = -7.016, P = 0.002$; 图 4)。

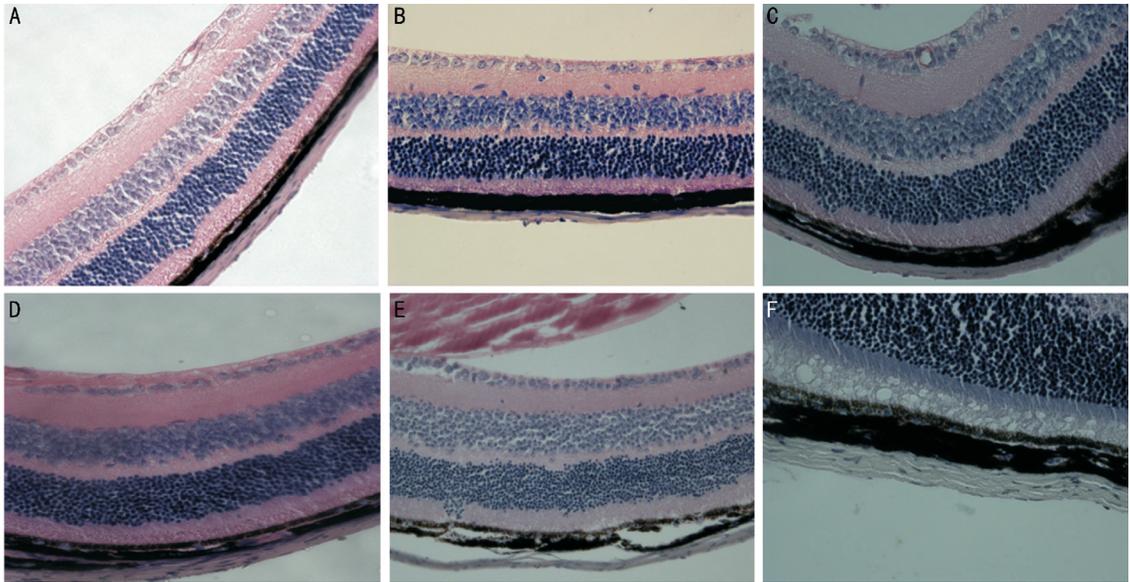


图2 各组小鼠巩膜 HE 染色图片 (×400) A:形觉剥夺 21d 自身对照眼;B:形觉剥夺 21d 实验眼;C:21d 正常对照眼;D:形觉剥夺 28d 自身对照眼;E:形觉剥夺 28d 实验眼;F:28d 正常对照眼。

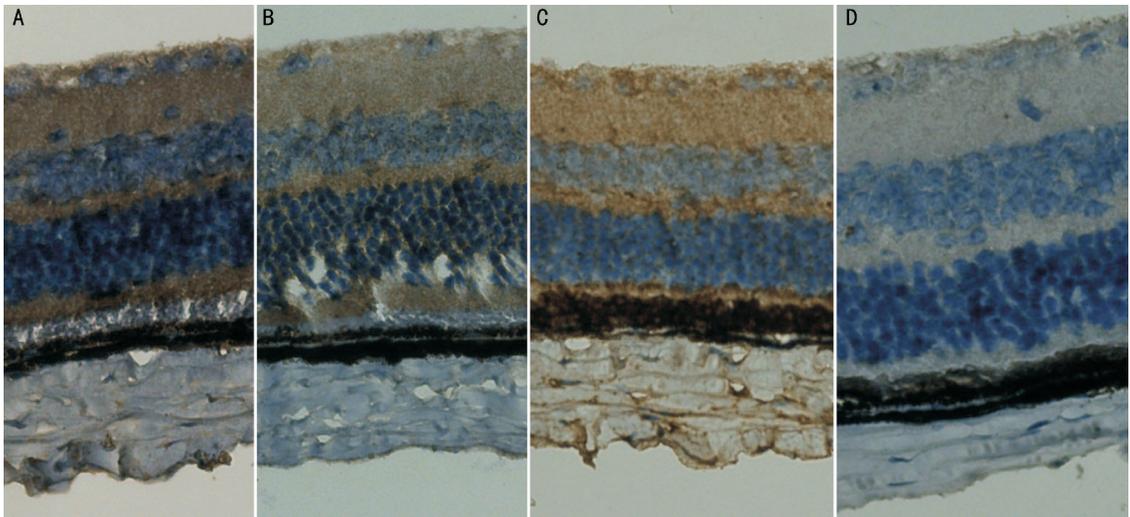


图3 各组小鼠免疫组织化学染色图片 (×400) A:FDM 21d 组自身对照眼;B:FDM 21d 组实验眼;C:FDM 28d 组自身对照眼;D:FDM 28d 组实验眼。

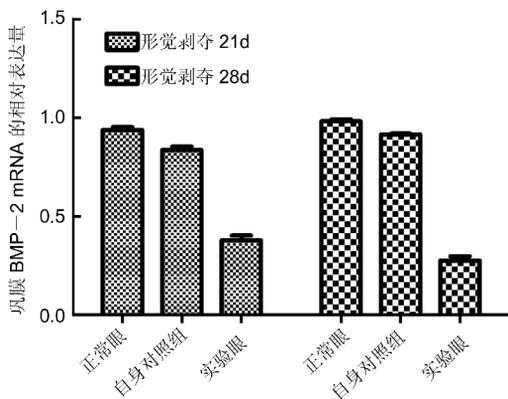


图4 各组 C57BL/6 小鼠巩膜中 BMP-2 mRNA 的表达 实验眼分别与自身对照眼及正常眼比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

在眼球正常发育过程中,巩膜成纤维细胞及其分泌的 I 型胶原等细胞外基质成分共同构成细胞外壁,维持眼球

组织完整并决定眼轴长度^[7]。在以往的研究中发现,哺乳动物模型眼典型的巩膜改变是厚度变薄,这种减少主要是胶原蛋白 I 合成减少、蛋白聚糖降解增加共同造成的, III 型胶原和 IV 型胶原的含量并不受影响,这种改变导致巩膜胶原纤维组成成分的改变,而后者直接影响胶原纤维直径,是小直径的胶原纤维增加的原因,本研究发现形觉剥夺后巩膜较对侧眼变薄,胶原纤维排列紊乱,粗细不均,间隙变大,以形觉剥夺 4wk 尤为明显,可能由于 FDM 眼胶原纤维合成的紊乱而新的胶原纤维又尚未生成,成纤维细胞密度降低,巩膜变薄,引起巩膜生物力学特性的改变,最终导致眼轴的延长。

以往大量的研究证明,近视的发生是大量异常信息的作用下,视网膜上的信号直接到达巩膜,发生近视,然而胡延宁等^[8]将已知有关近视的生长因子、激素和神经传递因子同人类视网膜色素上皮细胞和脉络膜黑色素细胞的研究中发现,上述细胞含有几乎所有的受体,据此可以推测是由视网膜将信号传递给色素上皮和脉络膜,由其再产生下一级活性物质(二级信号),再作用于巩膜。

现认为,TGF- β 介导的巩膜成纤维细胞的激活是发生巩膜重塑的重要原因^[9-11]。而 BMPs 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族最大的成员,能够调节多种细胞功能,是 TGF- β 家族中多效的调节因子,本研究发现 B6 小鼠视网膜和巩膜中均存在 BMP-2,FDM 眼视网膜和巩膜中 BMP-2 表达量明显下降,表明 BMP-2 在巩膜重塑过程中起到重要作用。

BMP-2 是肝素结合型细胞因子,在角膜中能调节成纤维细胞的凋亡^[12],在体外细胞培养中,BMP-2 能促进巩膜成纤维细胞增殖,并呈剂量依赖性^[13]。王青等^[14]发现 BMP-2 在豚鼠的后巩膜中有表达,并且 FDM 眼后巩膜部的 BMP-2 表达明显下降。本研究发现 BMP-2 在 C57BL/6 小鼠的视网膜和巩膜中均有表达,并呈下降趋势。提示 BMP-2 可能是近视的相关信号因子,参与了巩膜重塑的过程。本实验与其他实验不同的是:本实验首次验证了小鼠的视网膜和巩膜中存在 BMP-2,而且采用小鼠作为近视模型,最大的优点是小鼠的基因表达谱明确,和人类基因有 90% 基因同源,其眼球的 cDNA 文库同人类的极其相似,这就为今后在分子和基因水平研究近视提供了模型基础。

本实验中,我们参考 Wu 等^[15]的实验方法,采用给小鼠佩戴眼罩的方法诱导近视模型,用离体测量的方法测量小鼠的眼轴长度,褚仁远等已经用离体测量眼轴长度的方法说明了形觉剥夺眼轴随着遮盖时间的延长而延长,证明了小鼠眼轴长度离体测量的可行性^[16-18]。对于本实验过程中出现的剥夺眼和自身对照眼均趋向近视方向发展,我们认为可能是由于长时间的光照引起的,Zhou 等^[19]将 B6 小鼠给予不同的光照时间,结果发现光照时间最长的小鼠更易发生轴性近视。吴晓敏等用 13d 的 C57BL/6 小鼠按照黑暗/光照周期分为 18/6,12/12,6/12 组,结果发现随着光照时间的延长,小鼠眼球向近视方向发展,晶状体变薄,玻璃体腔变长,后极部巩膜直径变小,又将小鼠分别置于光照强度为 125、250、375Lu 条件下饲养 14d 后发现,光照强度不会影响小鼠眼球正常的屈光发育,然而这与国外学者的研究不相符。Karouta 等^[20]研究发现,形觉剥夺近视小鸡分别用 15 000Lu 和 500Lu 照射,近视程度呈明显降低趋势。目前光照的强度和屈光状态之间的关系目前仍不确定,有待进一步的研究。

另外,在本研究发现以往小鼠造模过程中,大多采用 8% 水合氯醛(40mg/kg)麻醉小鼠。然而水合氯醛可以引起小鼠晶状体混浊,这种混浊可能与小鼠眼球外突、眼睑不能闭合和角膜干燥有关^[21],然而在近视造模的整个阶段,需要晶状体和角膜保持透明,以检测小鼠剥夺前和剥夺后双眼的屈光状态,因此水合氯醛不适合用于小鼠近视模型的制备。而枸橼酸芬太尼具有镇痛的作用^[22],我们采用 5% 枸橼酸芬太尼注射液以 4mg/kg 麻醉小鼠后,可以达到较好的效果,能够顺利完成小鼠造模过程,并且不会引起小鼠晶状体混浊、角膜干燥等。

总之,本研究发现 C57BL/6 小鼠视网膜和巩膜中均存在 BMP-2,并且小鼠形觉剥夺眼中巩膜 BMP-2 呈下降趋势,提示 BMP-2 可能参与了 FDM 后巩膜重塑过程,但其信号通路的具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- 1 Goldschmidt E, Jacksen N. Genetic and environmental effects on myopia development and progression. *Eye (Lond)* 2014;28(2):126-133
- 2 杨蓓,刘桂香.豚鼠短期形觉剥夺引起近视屈光度眼轴及巩膜改变. *国际眼科杂志* 2009;9(10):1871-1875
- 3 McBrien NA. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta. *Exp Eye Res* 2013;114(9):128-140
- 4 Hu J, Cui D, Yang X, et al. Bone morphogenetic protein-2: a potential regulator in scleral remodeling. *Mol Vis* 2008;14(12):2373-2380
- 5 王青,刘筱楠,薛美兰,等.骨形态发生蛋白在形觉剥夺性近视眼后巩膜中的表达变化. *中华实验眼科杂志* 2013;(12):1105-1109
- 6 Liu HP, Lin YJ, Lin WY, et al. A novel genetic variant of BMP2K contributes to high myopia. *J Clin Lab Anal* 2009;23(6):362-367
- 7 McBrien NA, Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(3):307-338
- 8 胡诞宁,McCo SA. 视网膜色素上皮-脉络膜在近视发病中的作用. *眼视光学杂志* 2000;02(4):197-200
- 9 Rada JA, Johnson JM, Achen VR, et al. Inhibition of scleral proteoglycan synthesis blocks deprivation. Induced axial elongation in chicks. *Exp Eye Res* 2002;74(2):205-215
- 10 陈博宇,王超英,马景学,等.转化生长因子- β_2 对实验性近视眼后极部巩膜成纤维细胞力学特性的影响. *中华实验眼科杂志* 2011;29(4):296-301
- 11 Jobling AI, Gentle A, Metlapally R, et al. Regulation of scleral cell contraction by transforming growth factor. beta and stress: competing roles in myopic eye growth. *J Biol Chem* 2009;284(4):2072-2079
- 12 Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, et al. Effect of PDGF, IL-1 alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis; expression of the platelet. Derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(7):1364-1372
- 13 Hu J, Cui D, Yang X, et al. Bone morphogenetic protein-2: a potential regulator in scleral remodeling. *Mol Vis* 2008;14(12):2373-2380
- 14 王青,刘筱楠,薛美兰,等.骨形态发生蛋白在形觉剥夺性近视眼后巩膜中表达的变化. *中华实验眼科杂志* 2013;31(12):1105-1109
- 15 Wu PC, Tsai CL, Gordon GM. Chondrogenesis in scleral stem/progenitor cells and its association with form-deprived myopia in mice. *Mol Vis* 2015;21(2):138-147
- 16 潘红卫,曾骏文. TGF- β 在形觉剥夺性近视巩膜内表达. *广东医学* 2006;27(10):1448-1450
- 17 钱宜珊,褚仁远.小鼠形觉剥夺性近视眼模型 Sonic hedgehog 信号通路的表达及干预研究. *复旦大学博士学位论文* 2008
- 18 忽俊,周晓东,龚红华.提前光刺激与形觉剥夺诱导近视模型的形态及超微结构比较. *中华眼科杂志* 2005;41(10):896-899
- 19 Zhou X, An J, Wu X, et al. Relative axial myopia induced by prolonged light exposure in C57BL/6 mice. *Photochem Photobiol* 2010;86(1):131-137
- 20 Karouta C, Ashby RS. Correlation between light levels and the development of deprivation myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;56(1):299-309
- 21 曹研群,于慧敏,尚蕾.麻醉诱导的小鼠晶状体突发性浑浊. *解剖学杂志* 2013;36(3):279-281
- 22 Minami K, Hasegawa M, Nakamura A, et al. Morphine, oxycodone, and fentanyl exhibit different analgesic profiles in mouse pain models. *J Pharmacol Sci* 2009;111(1):60-72