

# 血管内皮生长因子-A<sub>165</sub>对形觉剥夺性近视豚鼠巩膜重塑的影响

彭庆生<sup>1</sup>,高洪莲<sup>2</sup>,孙瑞婷<sup>1</sup>,张凤一<sup>1</sup>,王磊<sup>1</sup>,李童<sup>1</sup>,张磊<sup>1</sup>

引用:彭庆生,高洪莲,孙瑞婷,等.血管内皮生长因子-A<sub>165</sub>对形觉剥夺性近视豚鼠巩膜重塑的影响.国际眼科杂志 2023; 23(9):1454-1460

作者单位:(256600)中国山东省滨州市,滨州医学院附属医院<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>医学研究中心

作者简介:彭庆生,滨州医学院在读硕士研究生,研究方向:近视防控。

通讯作者:张磊,博士,主任医师,主任,教授,硕士研究生导师,研究方向:近视防控、神经眼科. zhangleisd@263.net

收稿日期:2023-04-14 修回日期:2023-07-27

## 摘要

**目的:**探讨玻璃体腔内注射血管内皮生长因子-A<sub>165</sub>(VEGF-A<sub>165</sub>)对形觉剥夺性近视(FDM)豚鼠巩膜重塑的影响。

**方法:**健康3周龄三色豚鼠120只随机分为6组,每组20只,其中空白组不做任何干预,FDM组仅建立FDM模型,PBS组建立FDM模型前玻璃体腔内注射PBS缓冲液2.5μL,1ng组、5ng组、10ng组建立FDM模型前玻璃体腔内分别注射VEGF-A<sub>165</sub>1、5、10ng。用半透明气球遮盖豚鼠右眼14d建立FDM模型,造模前后测量豚鼠右眼屈光度和眼轴长度,造模14d后采用高效液相色谱法检测视网膜中多巴胺(DA)含量,用RT-PCR、Western blot法检测巩膜中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)、转化生长因子(TGF)-β1、TGF-β2、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的mRNA和蛋白表达情况。

**结果:**造模前,各组豚鼠右眼屈光度和眼轴长度均无显著差异( $P>0.05$ )。造模14d后,与空白组相比,FDM组豚鼠右眼近视度数升高,眼轴增长,视网膜中DA含量减少,巩膜中MMP-2、TGF-β2、α-SMA表达量均增加,TIMP-2、TGF-β1表达量均减少( $P<0.01$ );与FDM组相比,1ng组、5ng组、10ng组豚鼠右眼近视度数均降低,眼轴增长趋势均减缓,视网膜中DA含量均增加,巩膜中MMP-2、TGF-β2、α-SMA表达量均减少,TIMP-2、TGF-β1表达量均增加( $P<0.01$ ),且随着玻璃体腔注射VEGF-A<sub>165</sub>浓度的升高,豚鼠右眼近视度数逐渐升高,眼轴逐渐延长,视网膜中DA含量逐渐减少,巩膜中MMP-2、TGF-β2、α-SMA表达量均逐渐增加,TIMP-2、TGF-β1表达量均逐渐减少。

**结论:**玻璃体腔内注射VEGF-A<sub>165</sub>可以增加FDM豚鼠视网膜中DA含量,影响巩膜中MMP-2、TIMP-2、TGF-β1、TGF-β2、α-SMA的表达,抑制巩膜重塑,其中1ng VEGF-A<sub>165</sub>效果最明显。

**关键词:**血管内皮生长因子;形觉剥夺性近视;巩膜重塑;多巴胺;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶抑制剂-2;转化生长因子-β;α-平滑肌肌动蛋白

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.9.06

## Effect of vascular endothelial growth factor-A<sub>165</sub> on scleral remodeling of guinea pigs with form-deprivation myopia

Qing - Sheng Peng<sup>1</sup>, Hong - Lian Gao<sup>2</sup>, Rui - Ting Sun<sup>1</sup>, Feng - Yi Zhang<sup>1</sup>, Lei Wang<sup>1</sup>, Tong Li<sup>1</sup>, Lei Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

**Correspondence to:** Lei Zhang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China. zhangleisd@263.net

Received:2023-04-14 Accepted:2023-07-27

## Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of the intravitreal injection of vascular endothelial growth factor-A<sub>165</sub>(VEGF-A<sub>165</sub>) on the scleral remodeling of guinea pigs with form - deprivation myopia (FDM).

• **METHODS:** A total of 120 tricolor guinea pigs, aged three weeks, were randomly divided into 6 groups, with 20 in each group. The blank group did not undergo any intervention. In the FDM group, only the FDM model was established. In the phosphate buffer saline (PBS) group, 2.5 μL of PBS was injected into the vitreous cavity before establishing the FDM model. In the 1ng group, 5ng group, and 10ng group, VEGF-A<sub>165</sub> was injected into the vitreous cavity at concentrations of 1, 5 and 10ng, respectively, before the establishment of the FDM model. The FDM model was established by covering the right eyes of guinea pigs with translucent balloons for 14d. The diopter and axial length of the right eyes were measured before and after covering. After 14d, the content of dopamine (DA) in retina was measured by high performance liquid chromatography. Additionally, the mRNA and protein expression levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase - 2 (TIMP - 2), transforming growth factor (TGF) - β1, TGF - β2 and α-smooth muscle actin (α-SMA) in sclera were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot.

• **RESULTS:** Before covering, there were no significant differences in the diopter and axial length of the right eyes of guinea pigs in all groups ( $P>0.05$ ). After 14d of modeling, when compared with the blank group, FDM

group showed an increase in the degree of myopia in the right eye, a prolongation of the axial length, a decrease in the content of DA in the retina, and an increase in the expression of MMP-2, TGF- $\beta$ 2 and  $\alpha$ -SMA in the sclera. Conversely, the expression of TIMP-2 and TGF- $\beta$ 1 were decreased ( $P < 0.01$ ). However, in comparison to the FDM group, the degree of myopia in the 1ng, 5ng, and 10ng groups of guinea pigs decreased, the growth trend of axial length slowed, the content of DA in the retina increased, and the expression of MMP-2, TGF- $\beta$ 2 and  $\alpha$ -SMA in the sclera decreased. Furthermore, the expression of TIMP-2 and TGF- $\beta$ 1 in the sclera increased ( $P < 0.01$ ). As the concentration of intravitreal injection of VEGF- $A_{165}$  increased, the degree of myopia in the right eye of guinea pigs gradually increased, and the axial length gradually prolonged. The content of DA in the retina gradually decreased, the expression of MMP-2, TGF- $\beta$ 2, and  $\alpha$ -SMA in the sclera gradually increased, while the expression of TIMP-2 and TGF- $\beta$ 1 decreased gradually.

• **CONCLUSION:** Intravitreal injection of VEGF- $A_{165}$  can increase the content of DA in the retina of FDM guinea pigs, affect the expression of MMP-2, TIMP-2, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and  $\alpha$ -SMA in the sclera, and inhibit scleral remodeling of guinea pigs. Notably, the VEGF- $A_{165}$  at the concentration of 1ng showed the most significant efficacy.

• **KEYWORDS:** vascular endothelial growth factor; form-deprivation myopia; scleral remodeling; dopamine; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2; transforming growth factor- $\beta$ ;  $\alpha$ -smooth muscle actin

**Citation:** Peng QS, Gao HL, Sun RT, *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor- $A_{165}$  on scleral remodeling of guinea pigs with form-deprivation myopia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(9):1454-1460

## 0 引言

近视是全世界主要的公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。全球约有 26.20 亿人患有近视, 3.99 亿人患有高度近视, 据估计到 2050 年, 全球将有近 47.58 亿近视患者, 其中高度近视患者达到 9.38 亿<sup>[2]</sup>。近视, 尤其是高度近视不仅会导致模糊的视觉, 还将极大地增加眼部病变的风险, 引发脉络膜新生血管、视网膜萎缩、视网膜脱离和视神经病变等疾病<sup>[3-4]</sup>。目前高度近视已成为全球人口视力损伤的主要原因之一<sup>[5]</sup>。因此, 采取有效的防控措施对于预防近视发生和减少向高度近视进展至关重要。

目前研究表明, 眼轴增长是引发近视的主要原因<sup>[6]</sup>, 而巩膜重塑变薄与眼轴延长显著相关, 其不仅是眼轴增长的主要机制, 还是近视发生时的重要改变<sup>[7-8]</sup>, 因此巩膜重塑可能是控制近视的关键靶点。而巩膜重塑主要依赖于其细胞外基质成分的改变, 受多种因子调控<sup>[9]</sup>, 主要包括基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶抑制剂-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, TIMP-2)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta$  及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 等重要因子。视网膜中

的多巴胺 (dopamine, DA) 是一种重要的神经递质, 在视觉信息传递和屈光发育调节中发挥关键作用<sup>[10-11]</sup>, 其活性改变可以通过视网膜-巩膜级联机制影响巩膜重塑, 进而调节眼球的生长发育, 被认为是近视的终止信号<sup>[12-13]</sup>。而血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)- $A_{165}$  具有直接和间接的神经营养和神经保护作用<sup>[14]</sup>, 可以保护视网膜神经元<sup>[15]</sup>, 体内外均能促进 DA 神经元的存活和功能恢复<sup>[16-17]</sup>, 故推测其在玻璃体腔内注射后可以作用于视网膜神经元, 调节视网膜中 DA 的活性, 进而影响巩膜重塑。本研究通过遮盖豚鼠右眼建立形觉剥夺性近视 (form-deprivation myopia, FDM) 模型, 探讨玻璃体腔内注射 VEGF- $A_{165}$  对 FDM 豚鼠巩膜重塑的影响及其对近视的干预作用, 从而为近视防控提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **实验动物及分组** 选取健康 3 周龄英国短毛三色豚鼠 120 只 (济南金丰实验动物有限公司), 雌雄不限, 体重 150~200g。采用随机数字表法将豚鼠分为空白组、FDM 组、PBS 组、1ng 组、5ng 组、10ng 组, 每组 20 只。自然照明环境下 12h/12h 昼夜循环, 自由饮水摄食, 维持温度为 22℃~25℃, 湿度为 50%~70%。本研究通过滨州医学院附属医院伦理委员会审批 (批准号: 20220128-77), 实验动物的使用严格遵循滨州医学院动物管理委员会的相关规定。

1.1.2 **主要试剂与仪器** 主要试剂: 重组人蛋白 VEGF- $A_{165}$  (美国 R&D Systems 公司); 复方托吡卡胺滴眼液 (参天制药中国有限公司); 组织 RNA 快速提取试剂盒 (艾科瑞生物工程有限公司); 兔抗鼠 MMP-2 (A6247)、TIMP-2 (A16439)、TGF- $\beta$ 1 (A16640)、TGF- $\beta$ 2 (A3640)、 $\alpha$ -SMA (A1011) 多克隆抗体 (中国 ABclonal 股份有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京碧云天生物科技有限公司)。主要仪器: 带状光检影镜 (苏州六六视觉科技有限公司); A 型超声 (法国 Quantel 公司); 高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 **动物模型建立** 空白组豚鼠不做任何干预; FDM 组、PBS 组、1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠均用修剪出左眼、双耳和口鼻的半透明无毒气球遮盖右眼处理, 分笼饲养, 每天光照与黑暗周期为 12h/12h, 连续遮盖 14d 建立形觉剥夺性近视豚鼠模型。

1.2.2 **药物干预** 遮盖前根据分组在 PBS 组、1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠右眼玻璃体腔内分别注射 PBS 缓冲液 2.5 $\mu$ L、重组人蛋白 VEGF- $A_{165}$  1、5、10ng<sup>[16-17]</sup>, 其中 VEGF- $A_{165}$  均溶于 2.5 $\mu$ L 的 PBS 缓冲液中。玻璃体腔注射前 1d 使用妥布霉素滴眼液滴右眼。舒泰肌肉注射麻醉, 聚维酮碘消毒豚鼠结膜囊及眼表后用生理盐水冲洗干净, 显微镜下用眼科镊固定眼球, 注射器垂直巩膜进针, 避开晶状体推进约 2~3mm 后注射, 停留 10s 后用眼科镊轻轻夹住针孔辅助拔出针头, 观察有无液体流出, 结膜有无红肿, 氧氟沙星眼膏涂眼, 半透明无毒气球遮眼。术后 3d 内观察右眼有无炎症, 氧氟沙星眼膏涂眼 (每日 3 次)。

1.2.3 **眼部生物学参数测量** 造模前后分别测量各组豚鼠

右眼的屈光度和眼轴长度。测量屈光度前,用复方托吡卡胺滴眼液滴右眼散瞳,待瞳孔充分散大后使用带状光检影镜测量屈光度,由经验丰富的检影师验光,根据工作距离以等效球镜度(球镜度+1/2柱镜度)进行数据分析,连续测量5次计算平均值作为该眼的屈光度。测量眼轴长度前,用盐酸丙美卡因滴眼液行角膜表面麻醉,待药物生效后应用眼部A超测量眼轴长度,选择手动模式连续测量5次计算平均值,精确到0.01mm。

**1.2.4 标本收集** 造模结束后,注射凝血剂处死豚鼠,摘取右眼眼球,于冰上快速取其视网膜和后极部巩膜,保存于-80℃冰箱。

**1.2.5 高效液相色谱法检测视网膜中 DA 含量** 取各组豚鼠视网膜称重,每 mg 组织样本加入新鲜配制的匀浆液 20μL (H<sub>3</sub>ClO<sub>4</sub> 0.1mol/L, EDTA Na<sub>2</sub> 0.1mmo/L, 内标物 DHBA), -40℃ 冷冻匀浆 (2mm 氧化锆珠, 60Hz, 30s, 4次); 低温离心 (20000r/min, 30min, 4℃) 后取上清保存于-80℃冰箱。测样前取出再次离心 (20000r/min, 30min, 4℃) 后取上清液上机检测。色谱柱: Thermo Acclaim Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) 2.1 \* 100mm C<sub>18</sub> 2.2μm, 柱温 40℃; 流动相: 含 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 90mmo/L, 柠檬酸 50mmo/L, OSA 1.7mmo/L, EDTA 50μmol/L 和乙腈 4.5%。所有数据均由 Chromeleon 6.9 色谱工作站采集与分析, 以内标法计算目标物浓度。

**1.2.6 RT-PCR 法检测巩膜中 MMP-2、TIMP-2、TGF-β2、TGF-β1、α-SMA mRNA 的表达** 取各组豚鼠巩膜, 在低温研磨仪中充分研磨后, 根据试剂盒说明书中的纯化步骤提取巩膜总 RNA, 随后将 RNA 反转录成 cDNA, 反应程序: 42℃ 孵育 2min, 37℃ 孵育 15min, 85℃ 加热 5s, 以 4℃ 降温结束。以 GAPDH 为内参 (引物序列见表 1), 进行 PCR 扩增, 反应程序: 95℃ 预变性 1min, 95℃ 变性 10s, 60℃ 延伸 30s, 循环 40 次, 记录 Ct 值, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup>

法计算各目的基因相对表达量。

**1.2.7 Western blot 法检测巩膜中 MMP-2、TIMP-2、TGF-β2、TGF-β1、α-SMA 蛋白的表达** 根据分组将豚鼠巩膜置于不同的研磨管中, 加入裂解液和蛋白酶抑制剂后于低温研磨仪中研磨 5min, 转移至 EP 管, 置于 4℃ 中静置 30min, 低温离心 30min (4℃, 12000r/min), 取上清液于新的 EP 管中, 采用 BCA 浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 剩余上清液中加入 5×loading buffer, 恒温金属浴中 98℃ 煮 5~10min, 蛋白样品经电泳、转膜后, 室温条件下加入 5% BSA 封闭 2h, 加入对应的一抗稀释液 (抗体的稀释方法参照其说明书选取稀释溶液与最佳浓度), 于 4℃ 冰室摇床上孵育过夜, TBST 冲洗 3 次×15min, 室温条件下加入二抗孵育 1h, TBST 冲洗 4 次×15min, 化学发光法显影, Image J 软件分析灰度值。

统计学分析: 使用 SPSS 26.0 统计学软件进行分析。所有数据经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 经 Levene 检验符合方差齐性, 均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据总体比较采用单因素方差分析, 组间相互比较采用 LSD-t 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 眼部生物学参数** 造模前, 各组豚鼠右眼均呈现远视状态, 各组豚鼠右眼屈光度、眼轴长度差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。造模 14d 后, 与空白组相比, FDM 组豚鼠右眼屈光度变为负值, 眼轴显著延长, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与 FDM 组相比, PBS 组豚鼠右眼屈光度、眼轴长度未发生明显变化 (均  $P > 0.05$ ), 而 1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠右眼向近视偏移程度均减轻, 眼轴长度均较短 (均  $P < 0.01$ ), 其中 1ng 组豚鼠右眼近视偏移程度和眼轴长度均低于 5ng 组和 10ng 组, 5ng 组豚鼠右眼屈光度和眼轴长度均低于 10ng 组, 三组间两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
GAPDH	5'-GTCGTTGTGGATCTGACCT-3'	5'-TGCTGTAGCCGAATCATTG-3'
MMP-2	5'-ACAACCTTTGAGAAGGACGGCA-3'	5'-TCTGTTCATAGTCCTCGGTGGT-3'
TIMP-2	5'-TGGAACGACATCTATGGCA-3'	5'-CCAGGGCACAATGAAGTCAC-3'
TGF-β2	5'-GTTTGACGTTTCGGCAATGGA-3'	5'-ACAGCCATTCTCCTTCTGCTC-3'
TGF-β1	5'-CCCAGTGATACCCAGAGTG-3'	5'-GACCCATCCCGTTGATTTCC-3'
α-SMA	5'-TATGTGGCTATTCAGGCGGT-3'	5'-CAAAGGAATAGCCTCGCTCG-3'

表 2 各组豚鼠造模前后右眼屈光度和眼轴长度比较

组别	屈光度 (D)		眼轴长度 (mm)	
	造模前	造模后	造模前	造模后
空白组	3.88±0.34	2.25±0.35	7.578±0.114	7.662±0.094
FDM 组	3.75±0.35	-2.96±0.37 <sup>b</sup>	7.590±0.113	8.173±0.056 <sup>b</sup>
PBS 组	3.83±0.44	-2.83±0.30 <sup>b</sup>	7.515±0.179	8.135±0.120 <sup>b</sup>
1ng 组	3.83±0.49	1.29±0.33 <sup>d</sup>	7.580±0.091	7.777±0.094 <sup>d</sup>
5ng 组	3.71±0.37	-0.96±0.37 <sup>d,f</sup>	7.563±0.103	7.908±0.056 <sup>d,e</sup>
10ng 组	3.79±0.49	-1.88±0.26 <sup>d,f,h</sup>	7.583±0.101	8.020±0.087 <sup>d,f,g</sup>
F	0.129	255.288	0.315	31.932
P	0.985	<0.01	0.900	<0.01

注: <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs FDM 组; <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 1ng 组; <sup>g</sup> $P < 0.05$ , <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 5ng 组。

**2.2 高效液相色谱法检测视网膜中 DA 含量** 造模 14d 后,空白组、FDM 组、PBS 组、1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠右眼视网膜中 DA 含量分别为  $108.737 \pm 8.297$ 、 $58.623 \pm 6.547$ 、 $61.383 \pm 7.900$ 、 $98.202 \pm 6.170$ 、 $84.535 \pm 11.470$ 、 $72.275 \pm 6.863$ ng/g, 差异有统计学意义 ( $F = 37.555$ ,  $P < 0.01$ )。与空白组相比,FDM 组豚鼠右眼视网膜中 DA 含量明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与 FDM 组相比,PBS 组豚鼠右眼视网膜中 DA 含量未发生明显变化 ( $P > 0.05$ ),而 1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠右眼视网膜中 DA 含量均增加(均  $P < 0.01$ ),其中 1ng 组增加较 5ng 组明显,5ng 组增加较 10ng 组明显,三组间两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 RT-PCR 法检测巩膜中相关基因的表达** 造模 14d 后,与空白组相比,FDM 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量均增加,TGF- $\beta$ 1、TIMP-2 mRNA 相对表达量均减少,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与 FDM 组相比,PBS 组豚鼠右眼巩膜中各目的基因的相对表达量未发生明显变化(均  $P > 0.05$ ),而 1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量均减少,TGF- $\beta$ 1、TIMP-2 mRNA 相对表达量均增加(均  $P < 0.01$ ),其中 1ng 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量均低于 5ng 组和 10ng 组,TGF- $\beta$ 1、TIMP-2 mRNA 相对表达量均高于 5ng 组和 10ng 组(均  $P < 0.01$ ),5ng 组豚鼠右眼巩膜中 TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量均低于 10ng 组,TGF- $\beta$ 1、TIMP-2 mRNA 相对表达量均高于 10ng 组(均  $P < 0.01$ ),但 5ng 组和 10ng 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2 mRNA 相对表达量差异无统计学意义 ( $P = 0.353$ ),见表 3。

**2.4 Western blot 法检测巩膜中相关蛋白的表达** 造模 14d 后,与空白组相比,FDM 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量均增加,TIMP-2、TGF- $\beta$ 1 蛋白相对表达量均减少,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与 FDM 组相比,PBS 组豚鼠右眼巩膜中各蛋白相对表达量未发生明显变化(均  $P > 0.05$ ),而 1ng 组、5ng 组、10ng 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量均减少,TIMP-2、TGF- $\beta$ 1 蛋白相对表达量均增加(均  $P < 0.01$ ),其中 1ng 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量均低于 5ng 组和 10ng 组,TGF- $\beta$ 1、TIMP-2 蛋白相对表达量均高于 5ng 组和 10ng 组(均  $P < 0.01$ ),5ng 组豚鼠右眼巩膜中 TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量均低于 10ng 组,TGF- $\beta$ 1、TIMP-2

蛋白相对表达量均高于 10ng 组(均  $P < 0.05$ ),但 5ng 组和 10ng 组豚鼠右眼巩膜中 MMP-2 蛋白相对表达量差异无统计学意义 ( $P = 0.610$ ),见图 1。

### 3 讨论

近年来,近视的病因及机制一直是眼科研究的热点,尽管具体的机制目前仍不清楚,但多数研究认为眼轴长度的异常增加是引发近视的主要原因,巩膜细胞外基质重塑是眼轴增长的主要机制<sup>[7-8,18]</sup>。当巩膜重塑发生时,其细胞外基质中胶原降解增加、蛋白聚糖合成减少、成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,巩膜原纤维组装紊乱,巩膜生物力学变弱,巩膜逐渐变薄和延伸,眼轴随之延长,近视也逐渐发展<sup>[9,19]</sup>。由此可见,巩膜重塑在近视的发生和发展中起着关键作用,可能是近视机制的一个关键靶点。

巩膜重塑是一个受多因素调控的动态过程,其中局部缺氧是该过程的主要诱因。研究表明,缺氧可以调控巩膜重塑相关因子的活动,引起细胞外基质中胶原含量的下降和肌成纤维细胞的转分化,最终导致巩膜重塑<sup>[20-21]</sup>。同时,MMP-2 在该过程中也发挥重要作用,其含量的增加不仅可使巩膜中 I 型胶原的降解增加,使胶原纤维逐渐变细,引起巩膜重塑,近视的启动也依赖于 MMP-2 的表达增加<sup>[22-23]</sup>;而 TIMP-2 是 MMP-2 的内源性抑制因子,可使巩膜中胶原的降解减少,两者之间的失衡可引起巩膜细胞外基质代谢异常,胶原蛋白水平下降,从而导致细胞外基质重塑<sup>[24-25]</sup>。 $\alpha$ -SMA 在巩膜重塑中也发挥关键作用,其具有细胞收缩特性,可以促进近视发生时巩膜的变薄和延伸,同时  $\alpha$ -SMA 表达量的增加标志着肌成纤维细胞的转分化和细胞应力的增加<sup>[26-27]</sup>。TGF- $\beta$  在调节细胞外基质成分的转换中发挥重要作用,不仅可以调节成纤维细胞的转化和胶原蛋白的含量,还可以特异性调节巩膜细胞的收缩特性,影响  $\alpha$ -SMA 的表达<sup>[26]</sup>,其中 TGF- $\beta$ 1 不仅可以促进巩膜成纤维细胞的增殖,还可调控 I 型胶原的合成,增加基质中胶原的含量<sup>[28]</sup>,而 TGF- $\beta$ 2 主要调节基质中成纤维细胞的增殖<sup>[29]</sup>,可以呈剂量依赖性地促进大鼠巩膜中成纤维细胞的增殖,使巩膜增厚<sup>[30]</sup>。综上所述,MMP-2、TIMP-2、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA 在调控巩膜细胞外基质重塑中发挥关键作用,因此通过测定上述指标的表达,可以有效观察巩膜重塑情况。现已有大量研究表明,随着近视的发生,巩膜中 MMP-2、TGF- $\beta$ 2、 $\alpha$ -SMA 的表达增加<sup>[9,26]</sup>,TIMP-2、TGF- $\beta$ 1 的表达降低<sup>[24,28]</sup>,这与本研究中 FDM 组豚鼠右眼巩膜中各种因子的表达一致,均代表着近视性巩膜重塑的建立。

表 3 造模后各组豚鼠巩膜中相关基因的表达

组别	MMP-2 mRNA	TIMP-2 mRNA	TGF- $\beta$ 2 mRNA	TGF- $\beta$ 1 mRNA	$\alpha$ -SMA mRNA
空白组	0.331 $\pm$ 0.039	2.628 $\pm$ 0.036	0.372 $\pm$ 0.039	3.032 $\pm$ 0.091	0.246 $\pm$ 0.028
FDM 组	1.002 $\pm$ 0.067 <sup>b</sup>	1.001 $\pm$ 0.044 <sup>b</sup>	1.001 $\pm$ 0.052 <sup>b</sup>	1.003 $\pm$ 0.085 <sup>b</sup>	1.001 $\pm$ 0.044 <sup>b</sup>
PBS 组	1.017 $\pm$ 0.053 <sup>b</sup>	1.058 $\pm$ 0.072 <sup>b</sup>	0.967 $\pm$ 0.030 <sup>b</sup>	1.021 $\pm$ 0.071 <sup>b</sup>	0.964 $\pm$ 0.042 <sup>b</sup>
1ng 组	0.450 $\pm$ 0.043 <sup>d</sup>	2.276 $\pm$ 0.101 <sup>d</sup>	0.528 $\pm$ 0.048 <sup>d</sup>	2.489 $\pm$ 0.133 <sup>d</sup>	0.517 $\pm$ 0.045 <sup>d</sup>
5ng 组	0.744 $\pm$ 0.053 <sup>d,f</sup>	1.665 $\pm$ 0.095 <sup>d,f</sup>	0.701 $\pm$ 0.067 <sup>d,f</sup>	1.730 $\pm$ 0.112 <sup>d,f</sup>	0.746 $\pm$ 0.072 <sup>d,f</sup>
10ng 组	0.716 $\pm$ 0.049 <sup>d,f</sup>	1.282 $\pm$ 0.048 <sup>d,f,h</sup>	0.819 $\pm$ 0.063 <sup>d,f,h</sup>	1.343 $\pm$ 0.060 <sup>d,f,h</sup>	0.893 $\pm$ 0.054 <sup>d,f,h</sup>
<i>F</i>	177.890	539.829	139.550	457.243	214.688
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs FDM 组;<sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 1ng 组;<sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 5ng 组。

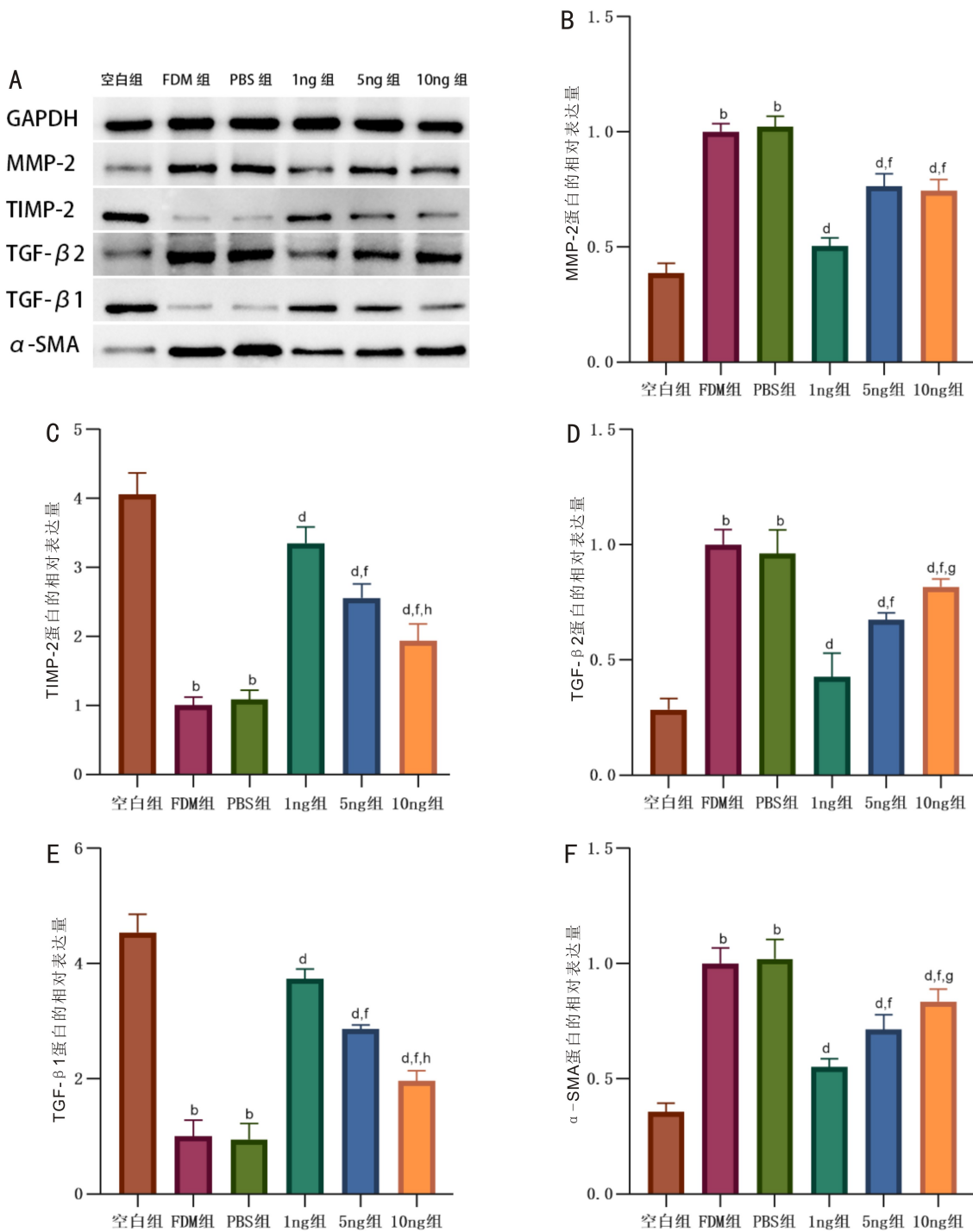


图1 造模后各组豚鼠巩膜中相关蛋白的表达 A:Western Blot 电泳图;B:MMP-2 蛋白相对表达量( $F=99.230, P<0.01$ );C:TIMP-2 蛋白相对表达量( $F=94.752, P<0.01$ );D:TGF-β2 蛋白相对表达量( $F=49.873, P<0.01$ );E:TGF-β1 蛋白相对表达量( $F=121.672, P<0.01$ );F:α-SMA 蛋白相对表达量( $F=56.915, P<0.01$ )。<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 空白组;<sup>d</sup> $P<0.01$  vs FDM组;<sup>f</sup> $P<0.01$  vs 1ng组;<sup>g</sup> $P<0.05$ ,<sup>h</sup> $P<0.01$  vs 5ng组。

视网膜中的 DA 是传递视觉信息的视网膜-巩膜信号级联的起点,与眼球的屈光发育息息相关<sup>[13]</sup>。研究表明,DA 活性的改变可以影响视网膜与其色素上皮层中的信号通路,进而影响脉络膜和巩膜之间的信息传递,最终通过巩膜的细胞外基质重塑调节眼睛的生长发育<sup>[12,20]</sup>。同时,VEGF 已经被证明是一种潜在的治疗中枢神经系统疾病的药物,可以通过营养 DA 神经元,增加神经递质 DA 的分泌<sup>[17,31]</sup>,其中 VEGF-A<sub>165</sub> 是主要的同种型,在海马神经节、背根神经节和视网膜神经元中均具有神经保护作用,对神经元具有直接的抗细胞毒性作用<sup>[15-16]</sup>。所以我们推

测 VEGF-A<sub>165</sub> 在眼内可以增加视网膜中 DA 的活性,对巩膜重塑产生影响,从而干扰近视发展。本课题组前期研究发现,玻璃体腔内注射抗 VEGF 药物(康柏西普)会降低 FDM 豚鼠视网膜中 DA 含量,促进近视发展<sup>[32]</sup>,间接证明了 VEGF 对视网膜中 DA 含量的影响。

本研究通过玻璃体腔内注射 VEGF-A<sub>165</sub>,验证其对 FDM 豚鼠巩膜重塑的影响,以及对 FDM 的干扰效果。Beazley-Long 等<sup>[16]</sup> 研究发现,玻璃体腔内注射 10ng VEGF-A<sub>165</sub> 对大鼠视网膜神经元具有神经保护作用,可减少视网膜神经节细胞和内核层细胞凋亡;同时, Meng

等<sup>[17]</sup>研究提出,VEGF对DA神经元的保护作用具有剂量依赖性,在1ng/mL组和10ng/mL组中,1ng/mL组的神经保护作用更强。因此,本研究采用了3种不同剂量(1、5、10ng)进行注射,探究不同剂量VEGF对FDM豚鼠巩膜重塑的作用是否也会有差异。结果显示,与FDM组相比,VEGF-A<sub>165</sub>处理组豚鼠视网膜中DA含量均增加,这与Sheikh等<sup>[31]</sup>研究结果一致,该研究表明VEGF对DA神经元具有保护作用,本研究进一步证明了这种神经保护可以作用于视网膜DA神经元,增加视网膜中DA的含量。同时,本研究发现,1ng组、5ng组、10ng组豚鼠近视程度均降低,眼轴增长趋势明显减缓,巩膜中MMP-2、TGF-β2、α-SMA表达量均减少,TIMP-2、TGF-β1表达量均增加,而Yu等<sup>[9]</sup>和Jobling等<sup>[26]</sup>研究认为,近视恢复期豚鼠巩膜中MMP-2、TGF-β2、α-SMA表达的降低以及TIMP-2、TGF-β1表达的升高,代表着基质中胶原含量的升高、巩膜厚度的增加等,这些均提示近视性巩膜重塑受到抑制。因此,本研究结果表明VEGF-A<sub>165</sub>可以增加视网膜中DA含量,对巩膜重塑产生抑制作用,抑制近视进展。Lin等<sup>[33]</sup>研究表明,玻璃体腔内注射DA主要通过调节巩膜发育抑制近视发展,而本研究结果提示巩膜细胞外基质的增加会抑制近视的发展,间接证明了视网膜与巩膜之间的级联信号在近视发生发展中的作用,同时还提出了一种可以提高视网膜中DA浓度的方法,即玻璃体腔内注射VEGF-A<sub>165</sub>。

此外,本研究发现,随着VEGF-A<sub>165</sub>剂量的增加,近视偏移程度加重,视网膜中DA含量逐渐减少,巩膜中MMP-2、TGF-β2、α-SMA表达量均逐渐增加,TIMP-2、TGF-β1表达量均逐渐减少,但巩膜中MMP-2在5ng组与10ng组中的表达无显著差异。分析其原因是由于巩膜缺氧时缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)主要被激活<sup>[21]</sup>,引起巩膜重塑相关因子的改变,而缺氧时MMP-2的上调依赖于HIF-2α的表达而不是HIF-1α的表达<sup>[34]</sup>,且房水中MMP-2浓度达到一定范围时与VEGF-A呈负相关<sup>[35]</sup>,但具体机制还需进一步探讨。本研究中,增加VEGF-A<sub>165</sub>的剂量反而会减弱对豚鼠巩膜重塑的抑制作用,其中1ng剂量的抑制效果最好。推测其可能的机制主要有以下两种:(1)视网膜中DA含量的降低导致了这种结果。由于DA主要通过影响巩膜的发育和重塑调控近视的发生发展<sup>[12]</sup>,且降低视网膜中DA的含量会促进近视发展<sup>[32]</sup>,因此本研究中玻璃体腔注射VEGF-A<sub>165</sub>剂量增加引起视网膜中DA含量相对降低,可能通过级联信号减弱对巩膜重塑的抑制作用,从而发挥对近视的促进作用;而视网膜中DA含量由1ng组到10ng组逐渐减少的原因,可能是由于VEGF-A<sub>165</sub>对DA神经元的作用在低剂量下获益最大<sup>[17]</sup>导致的;(2)VEGF-A<sub>165</sub>过量可能透过血-视网膜屏障直接作用于脉络膜<sup>[36]</sup>,诱导病理性血管生成,使脉络膜毛细血管被血栓阻塞<sup>[37]</sup>,进而减少了脉络膜血流灌注,加重了巩膜的缺氧<sup>[20]</sup>,从而相对性地促进了5ng组与10ng组豚鼠巩膜细胞外基质的重塑。但对于以上两种推测的验证,还需通过对VEGF-A<sub>165</sub>作用机制的进一步研究阐明。

本研究通过在FDM豚鼠玻璃体腔内注射不同剂量的VEGF-A<sub>165</sub>,发现均会增加视网膜中DA含量,对豚鼠巩膜重塑起到抑制作用,抑制FDM进展。其机制可能是VEGF-A<sub>165</sub>通过营养和保护视网膜DA神经元,增加视网

膜中DA的活性,进而通过信号级联抑制巩膜重塑,从而发挥对近视的抑制作用,但具体的发生机制还需进一步实验研究。同时本研究发现,1、5、10ng VEGF-A<sub>165</sub>对巩膜重塑的抑制作用存在差异,其中1ng效果最好,5ng次之,10ng最差。本文不足之处在于仅观察了3种剂量VEGF-A<sub>165</sub>作用的差异,对于更小或更大浓度梯度是否还会存在差异,以及0.5ng或2ng是否会有比1ng具有更好的效果等问题尚不明确,因此还需在此研究基础上进一步探讨VEGF-A<sub>165</sub>作用的最佳剂量范围,准确把握剂量差异对个体造成的影响,从而为以后VEGF-A<sub>165</sub>用于临床近视防控提供实验基础。

#### 参考文献

- Dolgin E. The myopia boom. *Nature* 2015;519(7543):276-278
- 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
- Landreneau JR, Hessemann NP, Cardonell MA. Review on the myopia pandemic: epidemiology, risk factors, and prevention. *Mo Med* 2021;118(2):156-163
- Du R, Xie SQ, Igarashi-Yokoi T, et al. Continued increase of axial length and its risk factors in adults with high myopia. *JAMA Ophthalmol* 2021;139(10):1096-1103
- 魏瑞华, 张红梅, 刘盛鑫, 等. 加强我国儿童青少年近视的科学预防与控制. *眼科新进展* 2023;43(1):1-6
- Bremond-Gignac D. Myopia in children. *Med Sci (Paris)* 2020;36(8-9):763-768
- Brown DM, Kowalski MA, Paulus QM, et al. Altered structure and function of murine sclera in form-deprivation myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2022;63(13):13
- Boote C, Sigal IA, Grytz R, et al. Scleral structure and biomechanics. *Prog Retin Eye Res* 2020;74:100773
- Yu Q, Zhou JB. Scleral remodeling in myopia development. *Int J Ophthalmol* 2022;15(3):510-514
- Zhou XT, Pardue MT, Iuvone PM, et al. Dopamine signaling and myopia development: what are the key challenges. *Prog Retin Eye Res* 2017;61:60-71
- Landis EG, Chrenek MA, Chakraborty R, et al. Increased endogenous dopamine prevents myopia in mice. *Exp Eye Res* 2020;193:107956
- Huang YK, Chen X, Zhuang J, et al. The role of retinal dysfunction in myopia development. *Cell Mol Neurobiol* 2023;43(5):1905-1930
- Brown DM, Mazade R, Clarkson-Townsend D, et al. Candidate pathways for retina to scleral signaling in refractive eye growth. *Exp Eye Res* 2022;219:109071
- Theis V, Theiss C. VEGF-A stimulus for neuronal development and regeneration in the CNS and PNS. *Curr Protein Pept Sci* 2018;19(6):589-597
- Foxton R, Osborne A, Martin KR, et al. Distal retinal ganglion cell axon transport loss and activation of p38 MAPK stress pathway following VEGF-A antagonism. *Cell Death Dis* 2016;7(5):e2212
- Beazley-Long N, Hua J, Jehle T, et al. VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A *in vivo* and *in vitro*. *Am J Pathol* 2013;183(3):918-929
- Meng XY, Huang AQ, Khan A, et al. Vascular endothelial growth factor-loaded poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles with controlled release protect the dopaminergic neurons in Parkinson's rats. *Chem Biol Drug Des* 2020;95(6):631-639
- 刘奇奇, 高洪莲, 刘蓓, 等. 康柏西普对豚鼠形觉剥夺性近视的干预作用及相关机制分析. *眼科新进展* 2020;40(8):722-726

19 Ouyang XL, Han YY, Xie YF, *et al.* The collagen metabolism affects the scleral mechanical properties in the different processes of scleral remodeling. *Biomedicine Pharmacother* 2019;118:109294

20 Wu H, Chen W, Zhao F, *et al.* Scleral hypoxia is a target for myopia control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(30):E7091-E7100

21 Zhao F, Zhang DK, Zhou QY, *et al.* Scleral HIF-1 $\alpha$  is a prominent regulatory candidate for genetic and environmental interactions in human myopia pathogenesis. *EBioMedicine* 2020;57:102878

22 She M, Li B, Li T, *et al.* Modulation of the ERK1/2-MMP-2 pathway in the sclera of Guinea pigs following induction of myopia by flickering light. *Exp Ther Med* 2021;21(4):371

23 Zhao F, Zhou QY, Reinach PS, *et al.* Cause and effect relationship between changes in scleral matrix metalloproteinase-2 expression and myopia development in mice. *Am J Pathol* 2018;188(8):1754-1767

24 Liu HH, Kenning MS, Jobling AI, *et al.* Reduced scleral TIMP-2 expression is associated with myopia development; timp-2 supplementation stabilizes scleral biomarkers of myopia and limits myopia development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(4):1971-1981

25 Qian LF, Zhao H, Li XX, *et al.* Pirenzepine inhibits myopia in Guinea pig model by regulating the balance of MMP-2 and TIMP-2 expression and increased tyrosine hydroxylase levels. *Cell Biochem Biophys* 2015;71(3):1373-1378

26 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

27 Hu D, Jiang JH, Ding BY, *et al.* Mechanical strain regulates myofibroblast differentiation of human scleral fibroblasts by YAP. *Front Physiol* 2021;12:712509

28 Jiang B, Wu ZY, Zhu ZC, *et al.* Expression and role of specificity protein 1 in the sclera remodeling of experimental myopia in Guinea pigs.

*Int J Ophthalmol* 2017;10(4):550-554

29 Chen BY, Chen W, Han BY, *et al.* Effect of TGF- $\beta$ 2 on the mechanical properties of posterior scleral fibroblasts in experimental myopia. *Biomed Res Int* 2022;2022:6193876

30 左韬, 马贤德, 张祝强, 等. bFGF、TGF- $\beta$ 、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

31 Sheikh MA, Malik YS, Xing ZK, *et al.* Polylysine-modified polyethylenimine (PEI-PLL) mediated VEGF gene delivery protects dopaminergic neurons in cell culture and in rat models of Parkinson's Disease (PD). *Acta Biomater* 2017;54:58-68

32 邱宇, 高洪莲, 于睿, 等. 抗血管内皮生长因子玻璃体内注射对形觉剥夺性近视豚鼠视网膜中多巴胺水平的影响. *眼科新进展* 2022;42(2):113-117

33 Lin Z, Chen X, Ge J, *et al.* Effects of direct intravitreal dopamine injection on sclera and retina in form-deprived myopic rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008;24(6):543-550

34 Wu WJ, Su YC, Hu CX, *et al.* Hypoxia-induced scleral HIF-2 $\alpha$  upregulation contributes to rises in MMP-2 expression and myopia development in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2022;63(8):2

35 Wong CW, Yanagi Y, Tsai ASH, *et al.* Correlation of axial length and myopic macular degeneration to levels of molecular factors in the aqueous. *Sci Rep* 2019;9:15708

36 Deissler HL, Sommer K, Lang GK, *et al.* Transport and fate of aflibercept in VEGF-A165-challenged retinal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2020;198:108156

37 Julien S, Kreppel F, Beck S, *et al.* A reproducible and quantifiable model of choroidal neovascularization induced by VEGF A165 after subretinal adenoviral gene transfer in the rabbit. *Mol Vis* 2008;14:1358-1372