

引文格式:丁美华,吴建峰,叶翔,张月英,郭大东,毕宏生. 透镜诱导型近视肾阳虚豚鼠巩膜 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 的表达[J]. 眼科新进展,2015,35(11):1005-1010. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2015. 0275

【实验研究】

透镜诱导型近视肾阳虚豚鼠巩膜 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 的表达[△]

丁美华 吴建峰 叶翔 张月英 郭大东 毕宏生

作者简介:丁美华,女,1990年4月出生,山东德州人,2013级在读硕士研究生。研究方向:屈光不正及白内障。联系电话:18254169209;E-mail:dingmeihua 1990@163.com

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81303081、81173440);山东省科技发展计划(编号:2011GGB14097、2013GSF11857);山东省自然科学基金青年基金项目(编号:ZR2014HP059);山东省医药卫生科技发展计划(编号:2011HD014);济南市高校自主创新计划(编号:201102061)

作者单位:250014 山东省济南市,山东中医药大学(丁美华,吴建峰,张月英);250002 山东省济南市,山东中医药大学附属眼科医院,山东中医药大学眼科研究所(叶翔,郭大东,毕宏生)

通讯作者:毕宏生, E-mail: hongshengbi@126.com

Received date: May 28, 2015
Accepted date: Jul 24, 2015

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81303081, 81173440); Science and Technology Development Plan of Shandong Province (No: 2011GGB14097, 2013GSF11857); Natural Science Foundation of Shandong Province (No: ZR2014HP059); Development Project of Medicine and Health Science Technology of Shandong Province (No: 2011HD014); Independent Innovation Project of Jinan Universities (No: 201102061)

From the Shandong University of Traditional Chinese Medicine (DING Mei-Hua, WU Jian-Feng, ZHANG Yue-Ying), Jinan 250014, Shandong Province, China; Eye Hospital Affiliated to Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (YE Xiang, GUO Da-Dong, BI Hong-Sheng), Jinan 250002, Shandong Province, China

Responsible author: BI Hong-Sheng, E-mail: hongshengbi@126.com

Expression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 in sclera of Kidney-Yang Deficiency syndrome myopic guinea pigs induced by lens

DING Mei-Hua, WU Jian-Feng, YE Xiang, ZHANG Yue-Ying, GUO Da-Dong, BI Hong-Sheng

【Key words】 Kidney-Yang Deficiency syndrome; lens-induced myopia; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of metalloproteinase-2; guinea pig

【Abstract】 Objective To explore the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in posterior sclera of lens-induced myopic guinea pigs with Kidney-Yang Deficiency syndrome (KYDs).

Methods Seventy-two three-week-old male pigmented guinea pigs were randomly divided into the normal group, wearing lens group (WL group), and KYDs and wearing lens group (KYDs + WL group), 24 cases in each group. The KYDs + WL group was intraperitoneally injected hydrocortisone with a dose of 10 mg · kg⁻¹, while the normal group and WL group were treated with isodose saline at the same time once daily for 2 weeks. Since the third week, the right eyes of the WL group and KYDs + WL group were covered with -10.0 D lens for 2 weeks, while the both eyes of normal group were without any intervention. The refraction and axial length were measured before and after wearing lens. The expressions of MMP-2 and TIMP-2 in posterior sclera were assayed by real-time PCR, ELISA and immunohistochemistry. Results Compared with the normal group, the myopic diopters were increased ($t = 18.760, P = 0.000$), and the axial lengths were longer ($t = -2.709, P = 0.013$), and the expressions of MMP-2 were increased at both the gene and protein levels ($t = -2.134, P = 0.045; t = -6.315, P = 0.000$), and the expressions of TIMP-2 were decreased at both the gene and protein levels in the WL group ($t = 4.637, P = 0.000; t = 6.062, P = 0.000$). Compared with the WL group, the myopic diopters were higher ($t = 3.026, P = 0.006$), and the axial lengths were longer ($t = -2.144, P = 0.044$), and the expressions of MMP-2 were increased at both the gene and protein levels ($t = -4.094, P = 0.001; t = -6.291, P = 0.000$), and the expressions of TIMP-2 were decreased at both the gene and protein levels in KYDs + WL group ($t = 5.524, P = 0.000; t = 3.951, P = 0.001$). Conclusion Under the induction of lens, the eyes of KYDs guinea pigs tend to be more myopic than that of normal guinea pigs. The Kidney-Yang Deficiency constitution is probably associated with the occurrence and development of myopia.

【关键词】 肾阳虚;透镜诱导型近视;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-2抑制剂;豚鼠

【摘要】 目的 探讨负透镜诱导型近视肾阳虚豚鼠巩膜基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)及其抑制剂基质金属蛋白酶-2抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)的表达。方法 选取72只3周龄雄性英国种三色短毛豚鼠,随机分为正常对照组、戴镜组和肾阳虚+戴镜组,每组各24只。肾阳虚+戴镜组每日腹腔注射氢化可的松注射液,剂量10 mg · kg⁻¹,正常对照组和戴镜组则给予等量生理盐水,每天1次,连续2周。第3周起,戴镜组、肾阳虚+戴镜组右眼均戴-10.0 D透镜,戴镜2周,正常对照组不作任何干预。戴镜前后分别进行眼轴长度及屈光度的测量;SYBRgreen I实时荧光定量PCR检测后极部巩膜MMP-2及TIMP-2 mRNA的表达变化;ELISA和免疫组织化学检测后极部巩膜MMP-2及TIMP-2蛋白表达的变化。结果 与正常对照组比较,戴镜组右眼近视屈光度增高($t = 18.760, P = 0.000$),眼轴延长($t = -2.709, P = 0.013$),后极部巩

膜 MMP-2 mRNA 及蛋白表达明显增加($t = -2.134, P = 0.045; t = -6.315, P = 0.000$), TIMP-2 mRNA 及蛋白表达明显降低($t = 4.637, P = 0.000; t = 6.062, P = 0.000$)。与戴镜组比较,肾阳虚 + 戴镜组右眼近视屈光度增高($t = 3.026, P = 0.006$),眼轴更长($t = -2.144, P = 0.044$),后极部巩膜 MMP-2 mRNA 及蛋白表达均增加($t = -4.094, P = 0.001; t = -6.291, P = 0.000$), TIMP-2 mRNA 及蛋白表达均降低($t = 5.524, P = 0.000; t = 3.951, P = 0.001$)。结论 在负透镜诱导下,肾阳虚豚鼠较正常豚鼠近视程度更加严重,肾阳虚体质与近视的发生发展可能有密切联系。

近年来,近视的患病率逐年攀升,低龄化趋势越来越严重^[1],已成为全球范围内导致视力残疾的首要病因^[2],预防青少年近视并探讨其发病相关因素已刻不容缓。近视的中医辨证以虚证为主,且彭耀崧等^[3]认为随着近视屈光度的不断增加,虚损呈气虚、阴虚、阳虚、肝肾虚的规律发展,与传统中医理论中的“久病必虚”“久病伤肾”理论相一致。张辽^[4]对 942 例近视患者问卷调查发现,近视眼患者的体质特点多为阳虚质、平和质和气虚质,其中阳虚体质者最多。但是,目前探讨近视与虚证体质关系的基础研究尚属空白。因此,本研究采用氢化可的松注射液和负透镜诱导制作肾阳虚豚鼠近视模型,研究肾阳虚近视豚鼠屈光度和眼轴长度的变化特点,并探讨其发病机制,为进一步阐释虚证与近视的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 取 3 周龄雄性健康英国种三色短毛豚鼠 72 只(购自河南康达实验动物有限公司),体质量 150 g 左右,随机分为 3 组,正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组,每组各 24 只,饲养温度保持在 20 ℃ 左右,控制 12 h/12 h 的昼夜节律,自由饮食。实验开始前对眼部疾病进行筛查,以排除白内障、先天性近视、角膜病等常见眼病。

1.2 动物模型

1.2.1 肾阳虚模型 肾阳虚 + 戴镜组于每日上午 8:00 - 10:00 腹腔注射氢化可的松注射液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 国药集团容生制药有限公司),每日 1 次,剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 2 周;正常对照组和戴镜组于同一时间腹腔注射等量的生理盐水,其余不作任何处理。注药前后注意观察豚鼠的一般状况,包括体质量、毛发色泽及大小便等。肾阳虚豚鼠的一般表现为体质量下降,消瘦,脱毛,倦怠懒动,腹部潮湿,畏寒肢冷,喜蜷缩在一起,小便清长,呈典型的肾阳虚表现。且有研究表明,在不作任何处理的情况下,肾阳虚症状能够维持至少 15 d^[5-6]。

1.2.2 近视模型 从第 3 周开始,戴镜组、肾阳虚 + 戴镜组右眼均戴 -10.0 D 透镜,戴镜 2 周,左眼不戴镜作为自身对照眼,正常对照组不作任何处理。戴镜前后分别进行屈光度及眼轴长度的测量。

1.3 屈光度及眼轴长度的测量 豚鼠双眼结膜囊内滴 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸环喷托酯滴眼液(美国爱尔康公司)3 次,每次间隔 5 min。由同一位验光师在暗室用带状光检影镜进行检影(工作距离保持 0.5 m),

屈光度为垂直及水平两条主要子午线检测值的均数。测量眼轴时用盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社)滴眼行眼球表面麻醉,A 型超声(法国 Quantel Medical 公司)探头垂直于角膜平面,对准瞳孔中心,连续测量 10 次,剔除明显偏离的数值,取平均值。设置 A 型超声在不同介质中的传播速度,前房为 $1557 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$,玻璃体为 $1540 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$,晶状体为 $1723 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[7]。

1.4 血液样本的收集及检测 在豚鼠深度麻醉状态下,将其仰卧固定,触及第 3 ~ 4 肋间隙心尖搏动最强处,穿刺取血, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 ℃ 离心 20 min 分离血清,将上清液贮存在 -20 ℃ 冰箱中待测。采用放射免疫法测定豚鼠血清中的激素水平,游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)、游离甲状腺素(free tetraiodothyronine, FT4)试剂盒由北京北方生物技术研究所提供,雌二醇(estradiol, E2)、睾酮(testosterone, T)试剂盒由天津九鼎医学生物工程有限公司提供,仪器使用上海核辐射光电仪器有限公司生产的放射免疫 γ 计数器,具体操作按照说明书要求进行。血清中 FT3、FT4、E2 和 T 含量是评价肾阳虚动物模型造模成功的客观指标^[2-3]。

1.5 实时荧光定量 PCR 取出眼球,沿角巩膜缘剪开,去除角膜、虹膜、晶状体、玻璃体、脉络膜及视网膜,用直径 7 mm 的角膜环钻钻取后极部巩膜,称质量,液氮速冻, -80 ℃ 保存备用。引物序列由上海生物工程股份有限公司合成。MMP-2 上游引物: 5'-GGAATGCCATCCCTGATAACCT-3', 下游引物: 5'-TTCCAAACTTCACGCTCTTGAGA-3', 产物大小为 126 bp; TIMP-2 上游引物: 5'-GAAGAGCCTGAACCA-CAGGTACC-3', 下游引物: 5'-TTCTGTGACCCAGTC-CATCCA-3', 产物大小为 118 bp; β -actin: 上游引物: 5'-ACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATG-3', 下游引物: 5'-CTCGGCCGTGGTGGTGAAGTGTAGC-3', 产物大小为 284 bp。

巩膜组织总 RNA 的提取采用 RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(德国 Qiagen 有限公司), -80 ℃ 冰箱保存备用。紫外分光光度计(北京凯奥公司)测量 RNA 的光密度值(OD),得出 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8 ~ 2.0。cDNA 的合成是用 Transcriptor first strand cDNA synthesis kit(美国 Roche 公司), 0.5 μg RNA 模板, 1 μL 寡聚糖(dt)₁₈ 引物, 4 μL 5 倍缓冲液, 0.5 μL RNase 抑制剂, 2 μL dNTP, 0.5 μL 反转录酶, 55 ℃ 孵育 30 min, 85 ℃ 酶失活 5 min, -20 ℃ 贮存备用。

采用 LightCycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 仪

(美国 Roche 公司)检测 MMP-2 和 TIMP-2 的 mRNA 含量。PCR 的反应总体积为 20 μ L,包括 LightCycler 480 SYBR Green I Master(美国 Roche 公司)10 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L,DEPC 水 8 μ L。PCR 反应条件为:预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min,变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,共 40 个循环,最后 45 $^{\circ}$ C 冷却 10 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,以 β -actin 为内参,对各组豚鼠后极部巩膜 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 的 mRNA 相对表达量进行定量分析。

1.6 免疫组织化学检测 用 40 g \cdot L⁻¹多聚甲醛行豚鼠心脏灌注后,摘除眼球,投入 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定 24 h,石蜡包埋,沿眼球前后极轴方向进行连续切片,切片厚约 4 μ m。脱蜡至水,PBS 冲洗 3 次;体积分数 5% 山羊血清室温封闭 30 min;滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜(MMP-2:兔多克隆抗体,1 : 500 稀释;TIMP-2:小鼠单克隆抗体,1 : 20 稀释),第 2 天复温 45 min,滴加二抗(武汉博士德生物工程有限公司),室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染细胞核,光学显微镜(日本尼康公司)下观察阳性表达。

1.7 ELISA 从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱内取出巩膜组织,置于研钵内,在液氮环境下将其研磨成粉末状,根据质量体积比(1 : 10)加入磷酸盐缓冲液(pH = 7.4),然后将匀浆液 3000 r \cdot min⁻¹、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清液用于分析 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 的蛋白水平表达,具体实验操作步骤按照试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司)说明书进行。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计分析。研究数据经 *W* 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。注药后,正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组豚鼠 FT3、FT4、T 及 E2 激素水平的改变采用配对 *t* 检验,但各组之间 E2 激素水平差异的比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验;正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组屈光度、眼轴长度、后极部巩膜中 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 mRNA 和蛋白表达的差异比较均采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾阳虚动物模型的确立 实验开始前,正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组血清中各激素的含量差异无统计学意义(*F* = 0.697,*P* > 0.05);注射氢化可的松注射液 2 周后,肾阳虚 + 戴镜组血清中 FT3、FT4 和 T 的浓度明显下降(*t* = 5.062、3.645、3.592,均为 *P* < 0.01),E2 浓度明显上升(*t* = -5.400,*P* < 0.01),而正常对照组和戴镜组血清中 FT3、FT4 和 T 的浓度是明显上升的(正常对照组 *t* = -4.333、-4.027、-4.678,戴镜组 *t* = -3.946、-4.315、-6.645,均为 *P* < 0.01),E2 浓度虽然也呈上升趋势(*t* = -2.743、-2.800,均为 *P* < 0.05),但相比之下,肾阳虚 + 戴镜组上升更为明显(*t* = 2.801、2.832,均为 *P* < 0.05,见图 1)。豚鼠体征符合肾阳虚症状。

Figure 1 Concentrations of FT3(A),FT4(B),T(C) and E2(D) in serum of guinea pigs in each group. Normal:Normal group;WL:Wearing lens group;KYDs + WL:Kidney-Yang deficiency syndrome and Wearing lens group 各实验组豚鼠血清中游离三碘甲状腺原氨酸(FT3,图 A)、游离甲状腺素(FT4,图 B)、睾酮(T,图 C)和雌二醇(E2,图 D)含量。Normal:正常对照组;WL:戴镜组;KYDs + WL:肾阳虚 + 戴镜组

2.2 屈光度及眼轴长度的变化 戴镜前各组之间的屈光度、眼轴长度比较差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)。戴镜 2 周后,正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组屈光度和眼轴长度的差异均有统计学意义(*F* = 302.363、13.068,均为 *P* < 0.01);与正常对照组比较,戴镜组右眼近视屈光度增高(*t* = 18.760,*P* = 0.000),眼轴明显延长(*t* = -2.709,*P* = 0.013);与戴镜组比较,肾阳虚 + 戴镜组右眼近视屈光度增高(*t* = 3.026,*P* = 0.006),眼轴更长(*t* = -2.144,*P* = 0.044);但正常对照组、戴镜组及肾阳虚 + 戴镜组自身对侧眼屈光度及眼轴长度比较,差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05,见表 1)。

2.3 巩膜 MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 的表达 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算正常对照组、戴镜组和肾阳虚 +

表 1 戴镜前及戴镜 2 周后各组豚鼠屈光度及眼轴长度

Table 1 Refraction and axial lengths before and after wearing lens for 2 weeks in each group ($\bar{x} \pm s$)

| Time | Group | Refraction(φ /D) | | Axial length(L/mm) | |
|----------------|-----------|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | Left | Right | Left | Right |
| Before wearing | Normal | 2.98 \pm 0.54 | 2.97 \pm 0.51 | 8.37 \pm 0.23 | 8.41 \pm 0.14 |
| | WL | 2.89 \pm 0.52 | 2.90 \pm 0.60 | 8.41 \pm 0.12 | 8.38 \pm 0.12 |
| | KYDs + WL | 2.89 \pm 0.43 | 2.90 \pm 0.48 | 8.36 \pm 0.11 | 8.38 \pm 0.11 |
| After wearing | Normal | 1.64 \pm 0.48 | 1.68 \pm 0.48 | 8.64 \pm 0.16 | 8.64 \pm 0.11 |
| | WL | 1.57 \pm 0.28 | -2.32 \pm 0.12 * | 8.63 \pm 0.15 | 8.75 \pm 0.05 * |
| 2 weeks | KYDs + WL | 1.76 \pm 0.18 | -2.98 \pm 0.51 # | 8.59 \pm 0.06 | 8.84 \pm 0.05 # |

Note:Normal:Normal group;WL:Wearing lens group;KYDs + WL:Kidney-Yang deficiency syndrome and wearing lens group. Compared with normal group, * *P* < 0.01; Compared with WL group, #*P* < 0.05

戴镜组 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 mRNA 的相对表达量,将正常对照眼结果标准化为 1,戴镜组及肾阳虚 + 戴镜组右眼分别与标准化后的正常对照眼比较得到目的基因的相对表达量。正常对照组、戴镜组及肾阳虚 + 戴镜组与自身对侧眼后极部巩膜 MMP-2、TIMP-2 mRNA 表达的比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组后极部巩膜 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 mRNA 的表达,差异均有统计学意义($F = 20.036, 51.762$, 均为 $P < 0.01$);与正常对照组相比,戴镜组右眼后极部巩膜 MMP-2 mRNA 的表达显著增加($t = -2.134, P = 0.045$),TIMP-2 mRNA 表达则显著降低($t = 4.637, P = 0.000$);与戴镜组相比,肾阳虚 + 戴镜组右眼后极部巩膜 MMP-2 mRNA 表达明显增加($t = -4.094, P = 0.001$),TIMP-2 mRNA 表达明显降低($t = 5.524, P = 0.000$)(图 2)。

2.4 巩膜 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白水平的表达

MMP-2 主要定位表达在巩膜成纤维细胞胞浆中,细胞核无着色。正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组阳性表达分别为浅黄色、棕黄色和深棕黄色,并且戴镜组阳性细胞表达数量明显高于正常对照组,而肾阳虚 + 戴镜组阳性细胞表达数量明显多于戴镜组。TIMP-2 主要定位表达在巩膜成纤维细胞胞浆中,细胞核无着色。正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组阳性表达分别为深棕黄色、棕黄色和浅黄色,并且戴镜组阳性细胞表达数量明显少于正常对照组,而肾阳虚 + 戴镜组阳性细胞表达数量明显少于

戴镜组(图 3)。为了验证免疫组织化学的结果,本研究采取 ELISA 进一步检测了 MMP-2 及 TIMP-2 蛋白水平的表达,结果表明正常对照组、戴镜组和肾阳虚 + 戴镜组后极部巩膜 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 的表达,差异均有统计学意义($F = 79.458, 50.870$, 均为 $P < 0.01$);与正常对照组相比,戴镜组后极部巩膜 MMP-2 的表达明显增加($t = -6.315, P = 0.000$),TIMP-2 的表达明显降低($t = 6.062, P = 0.000$);而与戴镜组相比,肾阳虚 + 戴镜组后极部巩膜 MMP-2 的表达显著增加($t = -6.291, P = 0.000$),TIMP-2 的表达显著降低($t = 3.951, P = 0.001$;见图 4)。

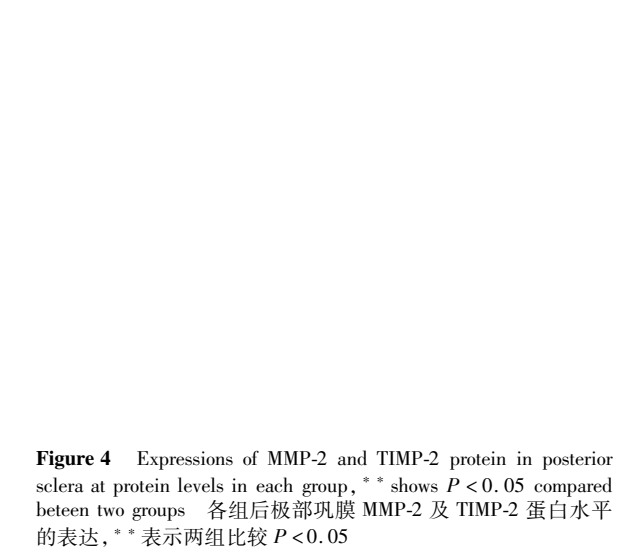
Figure 2 Expressions of MMP-2 mRNA and TIMP-2 mRNA in posterior sclera in each group, ** shows $P < 0.05$ compared between two groups 各组后极部巩膜 MMP-2 及 TIMP-2 的 mRNA 的相对表达, ** 表示两组比较 $P < 0.05$

Figure 3 Expressions of MMP-2 and TIMP-2 in posterior sclera in each group 各组 MMP-2 及 TIMP-2 在后极部巩膜中的表达

3 讨论

中医对于近视早有记载,《目经大成·近视五十二》首次提到“近视”,称其为“真火不明真气弱,真

阴一点亦危哉”,“脾肾虚损,泄不已,因而近视”。中医认为近视乃过用目力,劳瞻竭视,或禀赋不足、先天遗传所致,其病机主要为肝肾两虚,精血不足,以致神光衰微,光华不能远及,或者心阳衰弱,神光不



得发越于远处^[8]。中医体质学则认为,体质禀承于先天,得养于后天,其状态能够反映正气的强弱,决定发病与否,体质的差异会导致人类对近视等疾病有着易感性、倾向性,从而构成了这些疾病发生的背景或基础^[9-10]。现代研究表明,近视的中医辨证分型以虚证为主,尤以肾阳虚、脾气虚和肝肾阴虚者最为多见,其中肾阳虚为其主要症型之一,具有较高的屈光度及黄斑病变发生率^[2]。由此可见,近视的发生发展与人的体质状态是密切相关的,具有中医虚证体质的人似乎更容易发生近视,本研究也佐证了这一点:采用氯化可的松注射液腹腔注射和负透镜诱导的方法制作肾阳虚豚鼠近视模型,豚鼠呈典型的肾阳虚表现,出现一系列类似“耗竭”的现象:拱背、眯眼、畏寒、反应迟钝、被毛疏松、消瘦、尿液白浊,血液中 FT3、FT4 及 T 激素水平下降,E2 激素水平明显上升,符合肾阳虚的病理特点;肾阳虚近视豚鼠与正常豚鼠比较,近视屈光度明显增加,眼轴长度明显延长,这表明肾阳虚体质较正常体质近视程度相对严重。

巩膜重塑在近视的发生发展过程中起关键调控作用,这一过程有赖于调节其合成与代谢的酶之间的动态平衡,其中以 MMP-2 最为重要。MMP-2 是由巩膜成纤维细胞以酶原形式分泌,在特定环境下氨基末端水解后活化,主要功能是降解巩膜细胞外基质,包括蛋白多糖、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、变性胶原等,尤其是巩膜 I 型胶原,导致巩膜变薄^[11],发生轴性近视。而 TIMP-2 能够特异性地与 MMP-2 结合,并抑制其活性^[12-13]。Rada 等^[14]通过对形觉剥夺性近视小鸡研究发现,近视眼后极部巩膜 MMP-2 活性明显高于对照眼,当去除巩膜组织内的 TIMP-2 时,对照眼 MMP-2 活性增高程度明显高于剥夺眼,这表明 MMP-2 和 TIMP-2 之间的平衡在近视眼巩膜重塑中起十分重要的作用。本研究发现,肾阳虚近视豚鼠后极部巩膜 MMP-2 mRNA 及蛋白的表达水平明显高于正常近视豚鼠,而其抑制剂 TIMP-2 的表达则明显低于正常近视豚鼠,这可能是导致肾阳虚体质豚鼠较正常豚鼠近

视程度严重的重要分子机制。

有研究发现,高度近视患者血清中性激素的水平明显不同于非近视者;近视患者无论男女,血清中 T 水平均明显高于对照组;并且男性近视患者血清中 E2 水平也明显升高,黄体酮激素水平明显降低^[15]。这表明性激素水平和近视可能存在一定的关联,性激素由性腺分泌入血液循环,随性激素结合蛋白到达靶组织,结合该部位相应的性激素受体,通过非基因调控或者基因调控发生作用。还有研究发现,雌激素、雄激素受体广泛存在于眼部前后节各组织中,包括泪腺、结膜、角膜、晶状体、视网膜、脉络膜等^[16-18]。因此,推测肾阳虚体质豚鼠近视程度相对严重也可能是由于血清中 E2、T 等性激素水平的改变导致,但由于激素之间的关系较为复杂,究竟是性激素水平的改变起主要作用还是多种激素水平变化共同作用的结果,这些激素是如何调控与近视相关的酶或者因子导致近视程度进一步加重,仍需进一步探讨。

总之,本研究发现肾阳虚豚鼠经负透镜诱导后,近视屈光度更高,眼轴更长,这与中医临床对于体质与近视关系的认识基本相符,而后极部巩膜 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2 的表达变化可能是其主要分子机制,这一发现为进一步探讨近视与虚证关系的本质奠定了基础。

参考文献

- 1 You QS, Wu LJ, Duan JL, Luo YX, Liu LJ, Li X, et al. Prevalence of myopia in school children in greater Beijing: the Beijing Childhood Eye Study [J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92 (5) : e398-e406.
- 2 谢红莉,谢作楷,叶景,杨新军,瞿佳. 我国青少年近视现患率及相关因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90 (7) : 439-442.
- 3 彭耀崧,王幼生,詹敏,黄小瑛. 高度近视辨证分型与眼部病变的关系探要[J]. *中医药学刊*, 2004, 22 (12) : 2233-2234.
- 4 张辽. 近视患者中医体质研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- 5 Lu X, Xiong Z, Li J, Zheng S, Huo T, Li F. Metabonomic study on 'Kidney-Yang Deficiency syndrome' and intervention effects of Rhizoma Drynariae extracts in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2011, 83 (3) : 700-708.
- 6 Huang D, Yang J, Lu X, Deng Y, Xiong Z, Li F. An integrated plasma and urinary metabonomic study using UHPLC-MS: intervention effects of Epimediumkoreanum on 'Kidney-Yang Deficiency syndrome' rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 76 (3) : 200-206.
- 7 Lu F, Zhou X, Jiang L, Fu Y, Lai X, Xie R, et al. Axial myopia induced by hyperopic defocus in guinea pigs: A detailed assessment on susceptibility and recovery [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89 (1) : 101-108.
- 8 张守康,王志强. 青少年近视眼的中医药治疗现状[J]. *中国民间疗法*, 2006, 14 (5) : 63-65.
- 9 杨寅,梁远波,王济,林仲,张妍,郑燕飞,等. 299 例中小学生中医兼夹体质与近视相关性分析[J]. *安徽中医药大学学报*, 2014, 33 (3) : 13-15.
- 10 丁宇炜. 中医体质学研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2010, 31 (2) : 71-75.
- 11 龙琴. MMP-2 在长波光诱导新生豚鼠近视化模型巩膜胶原代谢中的作用机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- 12 Wang X, Xu G, Fan J, Zhang M. Mechanical stretching induces matrix metalloproteinase-2 expression in rat retinal glial (Muller) cells [J]. *Neuroreport*, 2013, 24 (5) : 224-228.
- 13 Zhuang H, Zhang R, Shu Q, Jiang R, Chang Q, Huang X, et al. Changes of TGF- β 2, MMP-2, and TIMP-2 levels in the vitreous of patients with high myopia [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252 (11) : 1763-1767.

引文格式:魏丽娟,张金嵩,李福祯,周利晓. 利鲁唑对脂多糖诱导眼内炎中谷氨酸代谢的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(11):1010-1013. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0276

【实验研究】

利鲁唑对脂多糖诱导眼内炎中谷氨酸代谢的影响[△]

魏丽娟 张金嵩 李福祯 周利晓

作者简介:魏丽娟,女,1985年10月出生,河南人,主治医师,在读博士。联系电话:15903671142;E-mail:wlijua@163.com

About WEI Li-Juan: Female, born in October, 1985. Attending doctor. Tel: 15903671142; E-mail: wlijua@163.com

收稿日期:2015-04-02

修回日期:2015-06-09

本文编辑:周志新

[△] 基金项目:国家自然科学基金联合项目(编号:U1304812)

作者单位:450052 河南省郑州市,郑州大学第五附属医院眼科(魏丽娟,周利晓);450052 河南省郑州市,郑州大学第一附属医院眼科(张金嵩,李福祯)

通讯作者:张金嵩, E-mail: jszhang2@hotmail.com

Received date: Apr 2, 2015

Accepted date: Jun 9, 2015

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: U1304812)

From the Department of Ophthalmology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University (WEI Li-Juan, ZHOU Li-Xiao), Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University (ZHANG Jin-Song, LI Fu-Zhen), Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Responsible author: ZHANG Jin-Song, E-mail: jszhang2@hotmail.com

Effects of riluzole on glutamate metabolism in endophthalmitis induced by lipopolysaccharide

WEI Li-Juan, ZHANG Jin-Song, LI Fu-Zhen, ZHOU Li-Xiao

[Key words] lipopolysaccharide; endophthalmitis; riluzole; glutamate; Müller cell

[Abstract] Objective To explore the effects of riluzole on glutamate (Glu) metabolism in endophthalmitis induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: BSS group (Group 1), LPS inoculated group (Group 2), LPS inoculated with riluzole treatment group (Group 3), 35 cases in each group. The right eyes of rats in group 2 and group 3 were injected with LPS, and the BSS rats received intravitreal injections of balanced salt solution, respectively. Intraperitoneal injections of riluzole were given to the rats in group 3 before and after LPS inoculation, once daily during the next three days. The levels of Glu in the vitreous humor and retinal glutamine synthetase (GS) expression were investigated. **Results** The concentration of Glu increased after endophthalmitis induced by LPS. The levels of Glu in vitreous of group 1, 2, 3 at 6 hours after modeling were $(15.32 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $(49.51 \pm 4.15) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(49.81 \pm 2.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, there was no statistical difference between group 2 and group 3, but there were statistical differences between above two groups and group 1 (both $P < 0.05$). The concentration of Glu in the vitreous humor peaked at 48 hours, then gradually decreased, group 2 slightly increased at 5 days, then gradually decreased. At each time points after 6 hours, the concentration of Glu in the vitreous humor of group 3 were all lower than those of group 2 (all $P < 0.05$), but were higher than those of group 1 (all $P < 0.05$). The expression of GS in group 2 increased, which mainly expressed in ganglion layer and inner nuclear layer. There were statistical differences in the expression of GS at 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours between group 2 and group 3 (all $P < 0.05$), the group 3 were lower than group 2, but still higher than group 1. **Conclusion** Riluzole can decrease the content of Glu in the vitreous humor of endophthalmitis induced by LPS, inhibit the müller cells activation, which suggests that riluzole may play the protective role in the endophthamitis.

【关键词】 脂多糖; 眼内炎; 利鲁唑; 谷氨酸; Müller细胞

【摘要】目的 观察利鲁唑对脂多糖诱导大鼠眼内炎中谷氨酸 (glutamate, Glu) 代谢的影响。**方法** 将SD大鼠随机分为3组, 每组35只, 1组为生理盐水对照组, 2组为眼内炎组, 3组为眼内炎利鲁唑干预组。2组、3组通过玻璃体内注射大肠杆菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 建立大鼠眼内炎模型, 3组腹腔注射利鲁唑进行干预。紫外分光光度计法检测玻璃体中Glu含量的变化, 免疫组织化学方法测定谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 在视网膜组织的表达变化及分布。**结果** LPS诱导眼内炎后玻璃体内Glu浓度均显著增高。造模后6h玻璃体内Glu浓度即较对照组明显增加, 1组玻璃体Glu浓度为 $(15.32 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2组为 $(49.51 \pm 4.15) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3组为 $(49.81 \pm 2.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2组和3组差异无统计学意义, 二者与1组相比差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。玻璃体内Glu浓度于48h达高峰后逐渐下降。2组在5d时Glu浓度较之前出现小幅回升 $(297.59 \pm 1.03) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 然后逐渐下降。6h后的各时间点, 3组玻璃体Glu浓度均明显低于2组, 差异均有统计学意义。

14 Rada JA, Brenza HL. Increased latent gelatinase activity in the sclera of visually deprived chicks [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(8):1555-1565.

15 Chen ZT, Wang LJ, Liao YT, Shih YF, Lin LL. Polymorphisms in steroidogenesis genes, sex steroid levels, and high myopia in the Taiwanese population [J]. *Mol Vis*, 2011, 17(16):2297-2310.

16 Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, Farber DB. Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene

expression [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(9):1906-1911.

17 时青云, 闫琦. 雌孕激素与免疫作用的相互关系研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2000, 17(1):71-73.

18 Suzuki T, Kinoshita Y, Tachibana M, Matsushima Y, Kobayashi Y, Adachi W, et al. Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea [J]. *Curr Eye Res*, 2001, 22(1):28-33.