

引文格式:蔡丽,周炼红,易贝茜,梁晓翠,叶美红. 提前光照刺激对早产近视小鼠视网膜中 caspase-3 表达的影响[J]. 眼科新进展,2017,37(9):819-823. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2017. 0207

【实验研究】

# 提前光照刺激对早产近视小鼠视网膜中 caspase-3 表达的影响<sup>△</sup>

蔡丽 周炼红 易贝茜 梁晓翠 叶美红

作者简介:蔡丽,女,1992年2月出生,江西九江人,硕士。主要研究方向:儿童眼科学。联系电话:13237100173;E-mail:422105329@qq.com;ORCID:0000-0003-2524-3407

About CAI Li:Female,born in February, 1992. Master degree. Tel:13237100173;E-mail:422105329@qq.com;ORCID:0000-0003-2524-3407

收稿日期:2017-04-26  
修回日期:2017-05-21  
本文编辑:方红玲

△基金项目:湖北省科技支撑计划项目(编号:2015BCA311)

作者单位:430060 湖北省武汉市,武汉大学人民医院眼科

通讯作者:周炼红,E-mail:zlh681102@aliyun.com;ORCID:0000-0002-0431-0706

Received date:Apr 26,2017  
Accepted date:May 21,2017

Foundation item:Science and Technology Support Project of Hubei Province(No:2015BCA311)

From the Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Responsible author: ZHOU Lian-Hong, E-mail: zlh681102@aliyun.com;ORCID:0000-0002-0431-0706

## Effects of early lighting exposure on the expression of retinal caspase-3 in animal model of premature myopia

CAI Li,ZHOU Lian-Hong,YI Bei-Xi,LIANG Xiao-Cui,YE Mei-Hong

**[Key words]** prematurity;myopia;apoptosis;caspase-3

**[Abstract] Objective** To observe the apoptosis of retina and the expression of caspase-3 in mice with premature myopia and to explore the pathogenesis of premature myopia. **Methods** Together 60 newborn C57BL/6J mice were selected and divided randomly into three groups ( $n=20$ ):P6 group (opening the eyelid on day 6 after birth),P10 group (opening the eyelid on day 10 after birth) and normal group (opening the eyelid naturally). The right eyes of mice in the P6 and P10 group were subjected to lighting exposure,and the left eyes were left untreated serving controls with its right eyes;while the eyes in the normal group open naturally without any treatment. Then the refraction was checked on day 15 through retinophotoscopy,and ocular axial length was measured by micrometer with electronic digital display. TUNEL assay was used to determine retinal apoptosis. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of caspase-3 in mice retina. **Results** The right eyes developed significant myopia in the P6 group [ $(-7.55\pm0.15)$ D] and P10 group [ $(-5.25\pm0.10)$ D],while the eyes in the normal group did not suffer from myopia,and there was significant difference in the three groups ( $P<0.05$ ). The average axial length of right eyes in the P6 group [ $(2.49\pm0.08)$ mm] and the P10 group [ $(2.51\pm0.03)$ mm] was shorter than that in the normal group [ $(2.58\pm0.04)$ mm],with significant difference ( $P<0.05$ ). Immunohistochemistry showed that the expression of caspase-3 had a dramatically increase in ganglion cell layer and inner nuclear layer of retina of mice in P6 group and P10 group. TUNEL results showed that brown-stained positive apoptotic cells appeared in ganglion cell layer in the P6 and P10 group,while Western blot showed that the expression of caspase-3 protein in mouse retina in P6 group (gray value 52.70%) and P10 group (gray value 35.76%) was upregulated. **Conclusion** Early lighting exposure can induce premature myopia of mice,and the earlier the mice receive light,the higher the relative degree of myopia is;meanwhile during the process of premature myopia,ganglion cells and nuclear layer cells suffer apoptosis,as well as caspase-3 protein involves in the occurrence of apoptosis.

【中图分类号】 R774

【关键词】 早产儿;近视;凋亡;caspase-3

【摘要】 目的 观察早产近视小鼠视网膜的凋亡情况以及 caspase-3 蛋白的表达变化,探讨早产近视的发病机理。方法 选取实验用新生 C57BL/6J 小鼠共 60 只,随机分成 3 组(P6 开睑组、P10 开睑组和自然开睑组),每组各 20 只。P6 开睑组和 P10 开睑组分别于新生 6 d 龄和 10 d 龄处理右眼,使其睁眼接受提前光照,左眼为自身对照不作处理,自然开睑组小鼠眼脸待 P14 时自然睁开。所有小鼠于 P15 检影验光获得双眼屈光度数,采用电子数显千分尺测量眼轴长度,TUNEL 法检测各组小鼠视网膜细胞的凋亡,免疫组织化学方法和 Western-blot 检测小鼠视网膜中 caspase-3 蛋白的表达。结果 P6 开睑组小鼠形成了 $(-7.55\pm0.15)$ D 的相对近视,P10 开睑组小鼠形成了 $(-5.25\pm0.10)$ D 的相对近视,自然开睑组小鼠未形成相对近视,三组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );P6 开睑组右眼眼轴长度 $(2.49\pm0.08)$ mm 及 P10 开睑组小鼠右眼眼轴长度 $(2.51\pm0.03)$ mm 均明显短于自然开睑组右眼眼轴长度 $(2.58\pm0.04)$ mm,三组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。免疫组织化学结果显示:caspase-3 阳性细胞主要表达于 P6 开睑组和 P10 开睑组小鼠视网膜内核层和神经节细胞层。TUNEL 结果显示,P6 开睑组和 P10 开睑组小鼠视网膜神经节细胞层可见棕黄色凋亡细胞。Western-blot 结果显示 caspase-3 蛋白 P6 开睑组(灰度值 52.70%)和 P10 开睑组(灰度值 35.76%)小鼠视网膜中的表达量上调。结论 提前光照刺激可诱导小鼠形成相对近视,接受光照的时间越早,小鼠形成的相对近视度数越高;提前光照刺激小鼠近视形成过程中,神经节细胞和内核层细胞发生凋亡,caspase-3 蛋白参与凋亡的发生。

近年来围产医学技术发展迅速,使得早产儿的存活率获得较大程度提高,但与足月儿相比,早产儿提早离开母体环境,视觉系统发育还未成熟,加上受低体质量、吸氧等因素影响,出现视觉系统异常或相

关眼病的几率明显增高。有研究发现,早产儿与足月儿的屈光发育特点存在明显差异,表现为早产儿正视化过程相对更短<sup>[1]</sup>,发生近视的年龄相对更早,发生率也显著高于同龄足月儿<sup>[2-3]</sup>,并更易形成屈光不正、屈光参差和斜视、弱视。目前早产儿近视发病机制尚不明确,因早产所致视觉外环境的改变对早产儿近视的影响研究也少见报道。本研究通过提前光照刺激建立早产近视小鼠模型,探究细胞凋亡在早产近视形成中的作用,为早产儿近视的发病机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 YZ24 带状光检影镜及眼科显微器械均购于苏州六六视觉科技公司,数显电子千分尺(精确度 0.001 mm)购于上海三量量具厂,兔抗人 caspase-3 多克隆抗体、SABC 试剂盒、DAB 染色剂、TUNEL 试剂盒均购于武汉博士德公司。

1.2 动物模型制作及分组 随机选取实验用新生 4 d 龄 C57BL/6L 小鼠共 60 只,雌雄比为 2 : 1,体质量 (2.58 ± 0.24) g,购于武汉大学医学部动物实验中心,饲养环境标准清洁级别,温度 18 ~ 25 ℃。分别设为 P6 开睑组、P10 开睑组和自然开睑组,每组各 20 只,P6 开睑组小鼠均于新生 6 d 龄手术分离右侧上、下眼睑使之提前睁眼接受光照,左眼自身对照不作处理;P10 开睑组于 10 d 龄人工开启右侧眼睑,自然开睑组待 14 d 龄时眼睑自然睁开。所有小鼠均置于室内日光灯照明,光照与黑暗周期 12 h : 12 h 环境中分笼饲养,于 P15 进行乙醚麻醉,暗室内检影验光获得双眼屈光度数;摘除全部小鼠的眼球,电子数显千分尺和图像分析法测量眼轴长度,随即去除角膜和玻璃体,用于 TUNEL 检测、caspase-3 免疫组织化学染色和 Western-blot,定量检测视网膜中 caspase-3 的表达。本实验中由于采用新生小鼠,实验起始时共饲养 80 余只,实验中死亡 10 只,但仅选取符合本实验条件的 60 只。

1.3 Caspase-3 免疫组织化学染色 将视网膜石蜡切片行二甲苯脱蜡和梯度乙醇水洗,微波抗原修复,体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 25 min 阻断内源性过氧化物酶,体积分数 3% BSA 室温封闭 30 min。滴加一抗 50 μL,湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 5 min × 3 次,切片稍甩干后滴加与一抗相应种属的二抗 (HRP 标记) 50 μL,室温孵育 50 min, PBS 洗涤 5 min × 3 次,滴加 SABC,室温 30 min。PBS 洗涤 5 min × 5 次,滴加 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,蒸馏水冲洗切片终止显色。苏木紫复染,脱水封片,显微镜镜检。对阳性细胞率和阳性表达强度予以量化评分,即免疫组织化学评分 (IHS)。表达水平 = 染色强度评分 × 阳性细胞比评分。具体方法如下:每组随机选取切片 3 张,在每张切片上随机选 3 个视野,免疫

组织化学染色强度计分:0 分判为阴性,1 分判为弱阳性,2 分判为中度阳性,3 分判为强阳性。阳性细胞所占百分比计分:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞占 1% ~ 10% 为 1 分,11% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 80% 为 3 分,81% ~ 100% 为 4 分。取各组平均数作为该蛋白表达的统计数据。应用 HIS 评分可代表 caspase-3 蛋白在视网膜细胞中的表达水平。

1.4 TUNEL 检测 将视网膜石蜡切片进行脱蜡处理。室温下将 1 g · L<sup>-1</sup> TritonX-100 和 1 g · L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠溶液滴加于切片的标本区域通透 8 min,充分洗涤后室温下静置 30 min。按每张切片 50 μL 的使用量配制 TUNEL 反应液,滴加于切片后湿盒孵育 60 min,阴性对照切片则滴加 PBS 溶液。滴加体积分数 3% 甲醇双氧水溶液,避光阻断 15 min,PBS 溶液充分洗涤后用体积分数 20% 山羊血清封闭 20 min。每张切片滴加适量过氧化氢酶溶液,37℃ 避光孵育 30 min,PBS 充分洗涤。滴加新配制的 DAB 溶液,于显微镜下掌握显色时间,苏木紫复染,脱水封片,显微镜镜检。细胞核棕黄染色者即为阳性细胞。

1.5 Western-blot 检测 配制裂解液并研磨视网膜组织,BCA 法测定蛋白浓度,每例样品取 40 μg 总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,封闭液室温封闭 1 h,除去封闭液后加入稀释的兔抗人 caspase-3 后 4 ℃ 过夜,洗涤后加入稀释好的 HRP-抗兔抗体溶液中室温孵育 30 min,经 TBST 洗涤后在 ECL 混合液中反应后于暗室曝光显影。以 GAPDH 蛋白为上样量参照。使用 AlphaEaseFC 软件处理系统对目标条带的灰度值进行分析。

1.6 统计学方法 本研究统计学处理采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,配对 *t* 检验分析小鼠双眼屈光度数及眼轴长度,组间比较采用方差分析;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 早期光暴露对小鼠屈光状态的影响 正常小鼠屈光度的变化过程为自远视逐渐向正视或近视发展。P6 开睑组于 6 d 龄接受提前光照,与自身对照左眼相比,诱导形成了相对近视;P10 开睑组右眼于 10 d 龄接受光照,也形成了相对近视;而自然开睑组右眼无相对近视形成;三组间相对近视屈光度比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.05,见表 1)。

表 1 各组小鼠双眼屈光度测量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | <i>n</i> | 右眼(°D)       | 左眼(°D)       | 相对近视(°D)     | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|---------|----------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|
| P6 开睑组  | 20       | 31.40 ± 0.25 | 38.95 ± 0.36 | -7.55 ± 0.15 | 18.42      | < 0.01     |
| P10 开睑组 | 20       | 33.86 ± 0.27 | 39.11 ± 0.32 | -5.25 ± 0.10 | 14.25      | < 0.01     |
| 自然开睑组   | 20       | 39.10 ± 0.35 | 39.16 ± 0.22 | -            | 0.32       | > 0.05     |

2.2 各组小鼠眼轴长度的比较 P6 开睑组小鼠右眼的眼轴长度与自身对照左眼比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05);P10 开睑组小鼠右眼眼轴长度与左眼比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05);自然开睑组双眼眼

轴长度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ,见表2)。

| 表 2 各组小鼠双眼眼轴长度的比较 <span style="float:right">(<math>\bar{x}\pm s</math>)</span> |          |                     |                     |            |            |
|--|----------|---------------------|---------------------|------------|------------|
| 组别   | <i>n</i> | 右眼眼轴( <i>l</i> /mm) | 左眼眼轴( <i>l</i> /mm) | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| P6 开睑组   | 20       | 2.49±0.08           | 2.54±0.07           | 2.567      | <0.05      |
| P10 开睑组  | 20       | 2.51±0.03           | 2.55±0.05           | 1.980      | <0.05      |
| 自然开睑组  | 20       | 2.58±0.04           | 2.59±0.02           | 1.308      | >0.05      |

**2.3 Caspase-3 蛋白免疫组织化学定量分析** 免疫组织化学染色观察到 P6 开睑组、P10 开睑组小鼠视网膜中 caspase-3 蛋白表达明显增强,呈棕黄色,主要表达于视网膜内核层细胞和神经节细胞层,表达部位主要为胞浆,余少量表达于胞核。自然开睑组视网膜 caspase-3 蛋白表达不明显。caspase-3 蛋白在 P6 开睑组、P10 开睑组和自然开睑组视网膜中的表达逐渐降低,HIS 评分分别为 4.889 分、2.889 分和 0.444 分,差

异有统计学意义( $P<0.05$ ,见图1)。

**2.4 TUNEL 结果** P6 开睑组小鼠右眼视网膜可见较多棕黄色凋亡阳性细胞核,主要表达于神经节细胞层,内核层也可见少量表达。P10 开睑组小鼠右眼视网膜神经节细胞层和内核层可见少量凋亡阳性细胞核表达。自然开睑组小鼠右眼仅见神经节细胞层个别阳性细胞核(图2)。

**2.5 Western-blot 检测结果** Western-blot 检测 caspase-3 蛋白的表达水平,结果显示 P6 开睑组、P10 开睑组及自然开睑组 caspase-3/GAPDH 灰度值比分别为 52.70%、35.76% 和 22.50%,表达水平呈逐渐下降趋势,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。而三组左眼视网膜中 caspase-3 蛋白的表达量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ,见图3)。

图 1 Caspase-3 蛋白免疫组织化学染色结果(×400)。A:P6 开睑组;B:P10 开睑组;C:自然开睑组

图 2 TUNEL 法检测各组小鼠视网膜细胞的凋亡情况(×400)。A:P6 开睑组;B:P10 开睑组;C:自然开睑组

3 讨论

早产是致使儿童视觉系统发育异常及多种相关眼病发生的高危因素。研究证实,无论有无早产儿视网膜病变的病史,早产儿近视的发生率均明显高于足月儿,且正视化过程也呈提前化趋势<sup>[14]</sup>。对于

早产儿来说,眼球的屈光发育受多种因素影响,除先天遗传因素外,外环境中适宜的视觉刺激也尤为重要。本研究通过控制小鼠提早接受光照的时间,发现提前光照环境对小鼠的屈光度产生影响。

已有研究显示,C57BL/6J 小鼠出生后双眼闭合,视网膜各层结构分化发育尚不成熟,直至 14 d 龄

图3 Western-blot 检测各组 caspase-3 蛋白的表达量

自然睁眼时视网膜形态结构及血管发育才基本完善,其视网膜生后发育阶段的特点与人早产儿视网膜发育过程相似<sup>[5-6]</sup>。因此我们利用此特点,于小鼠正常睁眼前人工开启眼睑,使小鼠眼球接受提前光照<sup>[7]</sup>。本研究中提前接受光照的小鼠均形成了较高的相对近视,不同时期提前光照所致近视的屈光度数也有明显差异,表现为日龄越小、越早睁眼的小鼠形成的相对近视屈光度数越高,P6 开睑组小鼠其右眼屈光度为( $31.40 \pm 0.25$ )D,与自身对照左眼相比,形成了( $-7.55 \pm 0.15$ )D 的相对近视。P10 开睑组也诱导形成了( $-5.25 \pm 0.10$ )D 的相对近视。正常日龄下自然睁眼的小鼠双眼屈光度无明显变化,这也与早产儿近视发病的流行病学调查结果相符合,表现为出生体质量越小、胎龄越小的早产儿,近视发病率及程度也越高。本实验结果显示,开睑越早形成的相对近视越高,说明不同时期的视网膜对于光照的敏感性有所差异,由于近视眼的形成过程涉及多种复杂生物信号的调控,我们推测光照其自身属性参数可能作为某种促进或调控因素作用于眼球,影响某些因子的分泌,产生网状分子生物学作用,推动形成了近视的发生。

90 年代 XU 等<sup>[8]</sup>在病理性近视发病机制的研究中,曾提出细胞凋亡可能是发生机制之一。此后研究者在多种实验性近视动物模型眼中均反映近视与视网膜细胞异常凋亡具有密切相关性,以视网膜光感受器细胞、外核层、内核层及神经节细胞层多见凋亡发生<sup>[9-10]</sup>,超微结构下表现为不同程度的细胞膜异常收缩破裂、线粒体肿胀、染色质不规则聚集等凋亡特征。细胞凋亡是一种由细胞内基因编码调控的主动自杀过程,在凋亡的执行和效应过程中,caspases 介导的级联反应起着关键性作用,当效应 caspases 被激活后,细胞内的靶物质被快速大量水解,诱导细胞发生不可逆的死亡。其中 caspases-3 是多种凋亡途径下游中执行死亡程序的关键蛋白酶,又被称作“杀手蛋白”,不仅反映细胞的凋亡水平,还反映凋亡启动因素的存在<sup>[11]</sup>。本研究利用 TUNEL 技术,在 P6 开睑组和 P10 开睑组小鼠右眼中均检测到视网膜细胞的异常凋亡,主要分布在神经节细胞层和内核层,而自然开睑组视网膜凋亡细胞不明显,说明当视网膜提前接受光照刺激,早产小鼠近视眼形成过程中伴随着视网膜的异常细胞凋亡现象。

本实验通过免疫组织化学染色发现,在 P6 开睑组和 P10 开睑组小鼠视网膜组织中 caspase-3 蛋白表

达明显增强,呈棕黄色,主要表达于视网膜内核层细胞和神经节细胞层,免疫组织化学评分值均明显高于自然开睑组,差异有统计学意义。这与 TUNEL 检测结果中显示的视网膜细胞凋亡位置相吻合。同样,Western-blot 检测结果显示,P6 开睑组和 P10 开睑组小鼠视网膜中 caspase-3 蛋白表达上调,明显高于自然开睑组,表现为小鼠接受提前光照的时间越早,caspase-3 的表达量越高。说明 caspase-3 蛋白在早产近视小鼠模型近视眼视网膜细胞凋亡中扮演重要角色。提前光照刺激小鼠近视形成过程中,视网膜中 caspase-3 蛋白表达量明显增加,导致神经节细胞层和内核层细胞发生凋亡损伤,凋亡机理可能与 caspase-3 蛋白表达上调有关。以往在探讨近视发生与细胞凋亡关系的研究中,多以形觉剥夺性近视和离焦性近视研究为主。毛俊峰等<sup>[12]</sup>发现在形觉剥夺性近视眼视网膜中 caspase-3 蛋白的活性增加、表达量上调,内核层和外核层细胞发生明显凋亡,caspase-3 蛋白参与凋亡的发生。刘双珍等<sup>[13]</sup>进一步向形觉剥夺性近视眼玻璃体内注射 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO,可使鸡缝合眼视网膜细胞的凋亡率下降,caspase-3 蛋白的活性和表达也呈下调趋势,并且随着 Ac-DEVD-CHO 剂量增大,抑制视网膜细胞凋亡的作用也明显增强,表明抑制凋亡“杀手蛋白”caspase-3 的表达可有效改善和减少视网膜细胞的凋亡,为实验性近视的研究提供了基础实验依据和治疗的新思路,但对于保护早产儿视网膜细胞是否有效仍待更加深入的研究。

综上所述,提前光照刺激方法可建立早产近视模型,同时提前开睑小鼠视网膜 caspase-3 蛋白表达量明显增加,在神经节细胞层和内核层均可观察到细胞的凋亡损伤,提示 caspase-3 的高表达可能是促进早产近视小鼠视网膜细胞凋亡的原因之一。但是否存在除过早接受光照刺激外的其他因素作用于眼球,调控和推动着屈光向近视发展;同时早期视网膜部分细胞的凋亡是近视形成的伴随因素还是结果尚不十分清楚。今后将针对早产儿近视的具体分子机制进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] COOK A, WHITE S, BATTERBURY M, CLARK D. Ocular growth and refractive error development in premature infants with or without retinopathy of prematurity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(12): 5199-5207.
- [2] SAUNDERS KJ, MCCULLOCH DL, SHEPHERD AJ, WILDINSON AG. Emmetropisation following preterm birth [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(9): 1035-1040.
- [3] REPKA MX. Refraction and keratometry in premature infants [J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88(7): 853-854.
- [4] 田明星, 周炼红, 罗琪. 0~6 岁早产儿和正常儿童屈光状态的比较研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2015, 51(7): 505-509.
- [5] TIAN MX, ZHOU LH, LUO Q. A study of refractive state in premature infants without retinopathy of prematurity and full-term children at the age of 0 to 6 [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2015, 51(7): 505-509.
- [6] GOLE GA, BROWNING J, ELTS SM. The mouse model of ox-

xygen-induced retinopathy; a suitable animal model for angiogenesis research[J]. *Doc Ophthalmol*, 1990, 74(3): 163-169.

[6] 忽俊,周晓东,龚红华,刘坤,万谨,余振珏,等. 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[J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(10): 896-899.

HU J, ZHOU XD, GONG HH, LIU K, WANG J, SHE ZY, *et al*. Comparison on morphology and ultrastructure of two kinds of myopic models[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2005, 41(10): 896-899.

[7] 忽俊,周晓东,龚红华,余振珏,肖虹蕾,周国民. 提前视觉刺激及高浓度氧对小鼠屈光状态的影响[J]. *眼视光学杂志*, 2005, 7(4): 242-244.

HU J, ZHOU XD, GONG HH, SHE ZY, XIAO HL, ZHOU GM. The effects of premature visual exposure and hyperoxia on the refraction of mice[J]. *Chin J Optometr Ophthalmol*, 2005, 7(4): 242-244.

[8] XU GZ, LI WW, TSO MO. Apoptosis in human retinal degenerations[J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1996, 94(5): 430.

[9] 赵宏伟,梁静南,罗灵,聂闻,白风华,刘怡. 离焦诱导豚鼠近视眼视网膜超微结构及凋亡研究[J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(11): 1946-1949.

ZHAO HW, LIANG JN, LUO L, NIE C, BAI FH, LIU Y. Retinal apoptosis and ultrastructural features of defocus-induced myopia in guinea pigs[J]. *Int Eye Sci*, 2014, 14(11): 1946-1949.

[10] XIAO H, FAN ZY, TIAN XD, XU YC. Comparison of form-deprived myopia and lens-induced myopia in guinea pigs[J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, 7(2): 245-250.

[11] MAZUMDER S, PLESCA D, ALMASANA. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 414(1): 13-21.

[12] 毛俊峰,刘双珍,文丹,谭星平,付春燕. Caspase-3 在形觉剥夺性近视视网膜中的表达意义[J]. *国际眼科杂志*, 2005, 5(1): 66-69.

MAO JF, LIU SZ, WEN D, TAN XP, FU CY. Expression of retinal caspase-3 in form-deprivation myopia[J]. *Int Eye Sci*, 2005, 5(1): 66-69.

[13] 刘双珍,毛俊峰,文丹,谭星平,付春燕. Caspase 3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 对实验性近视眼视网膜细胞凋亡的治疗[J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(5): 428-433.

LIU SZ, MAO JF, WEN D, TAN XP, FU CY. The treatment of retinal apoptosis by caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO in experimental myopia[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2005, 41(5): 428-433.



(上接第 818 页)

会导致神经营养因子的表达下调,包括脑源性神经营养因子和神经生长因子<sup>[11]</sup>。此外,神经生长因子还可调节轴突生长和突触活动,但具体机制不清<sup>[5]</sup>。本研究发现糖尿病状态下,视网膜突触素表达明显降低,进而说明突触活动已受抑制,因而突触数量明显降低。应用神经生长因子治疗后,氧化应激程度降低,突触素表达上升。这提示神经生长因子可能通过抑制氧化应激提高了视网膜突触数量。

综上所述,本研究发现神经生长因子可通过降低糖尿病视网膜氧化应激,抑制视网膜细胞凋亡,恢复视网膜突触数量。提示神经生长因子可能通过氧化应激途径参与糖尿病视网膜突触可塑性的变化。这一发现对研究糖尿病视网膜病变的发病机制提供了新的方向。但因糖尿病视网膜病变发病机制复杂,神经生长因子对糖尿病视网膜病变的作用可能涉及众多途径,因此神经生长因子对糖尿病视网膜突触可塑性的影响及机制仍需进一步深入探讨。

参考文献

[1] WHITING DR, GUARIGUATA L, WEIL C, SHAW J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94(3): 311-321.

[2] ILHA J, CUNHA NB, SOUZA DFD, JAEGER M, NASCIMENTO

PSD, KOLLING J, *et al*. The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(6): 1046-1055.

[3] WANG R, YANG J, PENG L, ZHAO J, MU N, HUANG J, *et al*. Gardenamide A attenuated cell apoptosis induced by serum deprivation insult via the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Neuroscience*, 2014, 286: 242-250.

[4] LEBRUNJULIEN F, BERTRAND MJ, DE BO, STELLWAGEN D, MORALES CR, DI PA, *et al*. ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75 NTR non-cell-autonomous signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3817-3822.

[5] CUNHA C, BRAMBILLA R, THOMAS KL. A simple role for BDNF in learning and memory[J]? *Front Mol Neurosci*, 2010, 3(1): 1.

[6] RESNIKOFF S, PASCOLINI D, ETYA' ALE D, KOCUR I, PARARAJASEGARAM R, POKHAREL GP, *et al*. Global data on visual impairment in the year 2002[J]. *Bull World Health Organ*, 2004, 82(11): 844-851.

[7] SOFRONIEW MV, HOWE CL, MOBLEY WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24(24): 1217.

[8] SIMONIAN NA, COYLE JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(6): 83-106.

[9] HOU S, SHEN PP, ZHAO MM, LIU XP, XIE HY, DENG F, *et al*. Mechanism of mitochondrial connexin43's protection of the neurovascular unit under acute cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): E679.

[10] D' CRUZ TS, WEIBLEY BN, KIMBALL SR, BARBER AJ. Post-translational processing of synaptophysin in the rat retina is disrupted by diabetes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44711.

[11] OZAWA Y, SASAKI M, TAKAHASHI N, KAMOSHITA M, MIYAKE S, TSUBOTA K. Neuroprotective effects of lutein in the retina[J]. *Curr Pharm Design*, 2012, 18(1): 51.