

引文格式:刘奇奇,高洪莲,刘蓓,李欣蒙,于睿,张磊.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[J].眼科新进展,2020,40(8):722-726. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0164

【实验研究】

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[△]

刘奇奇 高洪莲 刘蓓 李欣蒙 于睿 张磊

作者简介:刘奇奇(ORCID:0000-0003-4783-7492),女,1992年11月出生,山东东营人,在读硕士研究生。研究方向:屈光不正。E-mail:13001523776@163.com

通信作者:张磊(ORCID:0000-0001-9716-8819),男,1976年6月出生,山东滨州人,博士,硕士研究生导师,眼科主任。E-mail:zhangleisd@263.net

收稿日期:2019-10-16

修回日期:2019-12-16

本文编辑:盛丽娜

△基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2016WS0022)

作者单位:256600 山东省滨州市,滨州医学院附属医院眼科[刘奇奇(2017级硕士研究生),刘蓓,李欣蒙(2018级硕士研究生),于睿(2018级硕士研究生),张磊];256600 山东省滨州市,滨州医学院附属医院临床医学实验室(高洪莲)

【摘要】 目的 探讨抗新生血管生长因子融合蛋白康柏西普(Conbercept)球结膜下注射对豚鼠形觉剥夺性近视的干预作用及其可能的作用机制。**方法** 普通级3周龄断乳花色豚鼠48只随机分为空白对照组、单纯手术组、生理盐水组、Conbercept组,每组各12只。其中空白对照组豚鼠不作处理,单纯手术组、生理盐水组、Conbercept组使用眼睑缝合法遮盖右眼,生理盐水组、Conbercept组分别在缝合时、缝合后7 d右眼球结膜下注射0.05 mL生理盐水、0.5 mg(0.05 mL)Conbercept。记录各组眼睑缝合前及缝合后7 d、14 d时的眼轴长度、屈光度,并取后极部巩膜组织采用RT-PCR、Western blot方法检测各组豚鼠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)- β 1、TGF- β 2 mRNA和蛋白表达情况。**结果** 眼睑缝合后7 d、14 d,单纯手术组较空白对照组豚鼠右眼眼轴长度、屈光度均增加,MMP-2、TGF- β 2 mRNA和蛋白相对表达量均增加,TGF- β 1、TIMP-2相对表达量均减少,差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.05$);单纯手术组与生理盐水组各指标相比差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。眼睑缝合后7 d,与生理盐水组相比,Conbercept组眼轴长度、屈光度及TIMP-2、TGF- β 1 mRNA和蛋白相对表达量差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),MMP-2、TGF- β 2 mRNA和蛋白相对表达量均减少,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);眼睑缝合后14 d时,与生理盐水组相比,Conbercept组眼轴长度、屈光度及MMP-2、TGF- β 2、TGF- β 1 mRNA和蛋白相对表达量差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。**结论** 0.5 mg Conbercept球结膜下注射可延缓豚鼠形觉剥夺性近视形成,且可能是通过调节巩膜中的MMP-2、TGF- β 1、TGF- β 2表达而发挥作用。

【关键词】 康柏西普;形觉剥夺性近视;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

【中图分类号】 R778

近视已成为全球第二大致盲原因。在东亚、东南亚地区,青少年近视患病率高达80%~90%,其中高度近视患病率为10%~20%^[1]。高度近视增加了白内障、青光眼、视网膜脱离、黄斑变性等病理性眼病的患病率,这将预示着由病理性近视引起的低视力和失明人口数量的增加。最近有关近视的Meta分析结果显示,到2050年全球将有一半人口患有近视,因此,控制近视发生、发展成为当务之急^[2-3]。目前对于近视治疗效果较好且应用最为广泛的药物是硫酸阿托品,它是一种M受体阻滞剂,虽然低剂量阿托品正在试用于临床^[4-6],但是其用于预防、治疗近视相应的机制及可能产生的远期副作用尚不明确,远期临床价值有待进一步研究;还有一些处于试验阶段的药物,如7-甲基黄嘌呤、酮咯酸氨丁三醇等,但是治疗效果及副作用还需进一步研究^[7-8]。目前研究已表明,近视主要是眼轴增长引起的,巩膜细胞外基质重塑在眼轴增长过程中起关键作用,而基质金属蛋白酶-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)之间的失衡可造成细胞外基质重塑^[9-10]。转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 主要是通过调节成纤维细胞与肌成纤

维细胞之间的转化以及调节MMP-2、TIMP-2水平,进而影响细胞外基质合成和分泌的^[11-12]。因此,MMP-2、TIMP-2、TGF- β 可能是参与近视形成的关键因子。本课题组前期实验发现,适量康柏西普(Conbercept)球结膜下注射对角膜中MMP-2、TGF- β 等因子具有调节作用,且对正常角膜无明显副作用^[13]。本研究主要通过眼睑缝合法建立豚鼠形觉剥夺性近视模型,探讨0.5 mg Conbercept球结膜下注射对豚鼠形觉剥夺性近视形成的干预作用,并分析其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通级3周龄断乳花色豚鼠48只(山东省滨州市济南西岭角生物科技有限公司提供),体质量150~200 g,雌雄不限,裂隙灯下排除眼病,于滨州医学院附属医院动物房饲养,采用日光灯予以照明,明暗周期12 h/12 h,喂养环境温度维持于22~28℃,湿度50%,自由摄食、进水。实验动物的使用符合滨州医学院动物管理委员会制定的动物福利伦理规定。

1.1.2 主要试剂与仪器 组织RNA快速提取试剂盒、RNA逆转录试剂盒、PCR反应试剂盒均购自青

浩赛科技股份有限公司;兔抗鼠 MMP-2 多克隆抗体(ab97779)、兔抗鼠 TIMP-2 多克隆抗体(ab180630)、兔抗鼠 TGF- β 2 多克隆抗体(ab102118)、山羊抗兔 IgG(H+L)(ab6721)均购自英国 Abcam 公司;兔抗鼠 TGF- β 1 多克隆抗体(21898-1-AP)、兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体(10494-1-AP)均购自 Proteintech 中国公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒均购自北京碧云天生物科技有限公司;5 \times 蛋白上样缓冲液购自大连美仑公司。荧光定量 PCR 仪购自美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 采用随机数字表法将 48 只豚鼠分为空白对照组、单纯手术组、生理盐水组、Conbercept 组,每组 12 只。其中,空白对照组:双眼不进行任何干预;单纯手术组:为保证豚鼠正常觅食,左眼不做干预,仅缝合右眼眼睑;生理盐水组:缝合右眼眼睑,并在缝合时、缝合后 7 d 给予右眼球结膜下注射 0.05 mL 生理盐水;Conbercept 组:缝合右眼眼睑,并在缝合时、缝合后 7 d 给予右眼球结膜下注射 0.5 mg(0.05 mL)Conbercept(成都康弘生物科技有限公司)。所有术眼术后均给予氧氟沙星眼膏涂眼预防感染。

1.2.2 眼部生物学参数测量 分别在眼睑缝合前、缝合后 7 d、缝合后 14 d 测量各组豚鼠右眼屈光度和眼轴长度。测量后使用手持裂隙灯观察角膜、结膜等组织,直接检眼镜观察眼后段。其中,屈光度测量前均使用复方托吡卡胺滴眼液滴右眼,每 15 min 滴 1 次,共 3 次,由同一位检影验光经验丰富的专业临床检影师使用带状光检影验光,连续检影 5 次,取其平均值。眼轴长度测量前均使用盐酸丙美卡因滴眼液滴右眼,行角膜表面麻醉,由同一位经验丰富的专业临床技师使用眼部 A 超测量仪测量眼轴长度,连续测量 5 次,取其平均值。

1.2.3 标本收集 每组分别随机抽取眼睑缝合后 7 d、14 d 豚鼠各 6 只,使用颈椎脱臼法处死豚鼠后,摘取右眼眼球,于冰块上快速取后极部巩膜,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.2.4 RT-PCR 检测巩膜中 MMP-2、TIMP-2、TGF- β 2、TGF- β 1 mRNA 的表达 按照组织 RNA 快速提取试剂盒说明书提取巩膜中 RNA,紫外分光光度计测定所提取 RNA 浓度,然后反转录合成 cDNA。以 GAPDH 为内参,根据 NCBI 所提供基因序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成引物序列。按照 2 \times SYBR Green qPCR Mix 说明书设置 PCR 反应条件,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。RT-PCR 引物序列:GAPDH 上游引物:5'-CATCAAGAAGTGGTGAAGCAG-3',下游引物:5'-CAGCGTCAAAAGTGGAAGAATG-3';MMP-2 上游引物:5'-TGCCTGACCCTCTGTTGCT-3',下游引物:5'-CAGGAGCTGTTGCTGAGGT-3';TIMP-2 上游引物:5'-

GATGTCGGTGGGAAGAAGGA-3',下游引物:5'-CAATGAAGTCACAGAGGGTGTATG-3';TGF- β 2 上游引物:5'-GTGGTGATCAGAAAAGT-3',下游引物:5'-CATGCTCCAGCACAGAAGTT-3';TGF- β 1 上游引物:5'-TGATAACCTGGATGCCGTTG-3',下游引物:5'-TGCTTCCAAACTTCACGCTCT-3'。

1.2.5 Western blot 检测各蛋白表达 收集各组豚鼠巩膜后于冰上研磨并加裂解液裂解 15 min,转移至 EP 管,4 $^{\circ}$ C 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 15 min,BCA 法测定蛋白浓度,加入 5 \times 蛋白上样缓冲液煮沸 15 min,经电泳、转膜后,50 g \cdot L $^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(MMP-2、TIMP-2、TGF- β 1 稀释度均为 1:1000;TGF- β 2 稀释度为 1:500;GAPDH 稀释度为 1:5000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 冲洗 3 次 \times 10 min,加入二抗室温孵育 2 h,TBST 冲洗 3 次 \times 10 min,化学发光法显影,Image Lab 软件分析灰度值。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用多组间单因素方差分析,两组间均数采用 LSD- t 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 眼部生物学参数 48 只豚鼠右眼眼睑缝合前均呈远视状态,4 组间豚鼠右眼眼轴长度、屈光度差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。眼睑缝合后各组豚鼠角膜、结膜、视网膜等组织均未见明显异常。眼睑缝合后 7 d、14 d,单纯手术组、生理盐水组、Conbercept 组豚鼠眼轴长度、屈光度与空白对照组相比,差异均具有统计学意义(均为 $P<0.05$),且单纯手术组与生理盐水组比较,右眼眼轴长度($P_{7d}=0.704$; $P_{14d}=0.382$)、屈光度($P_{7d}=0.596$; $P_{14d}=0.927$)差异均无统计学意义。眼睑缝合后 7 d,Conbercept 组与生理盐水组比较,右眼眼轴长度、屈光度差异均无统计学意义($P=0.105$ 、 0.723);眼睑缝合后 14 d,两组豚鼠右眼眼轴长度、屈光度差异均具有统计学意义(均为 $P<0.001$)。见表 1。

2.2 RT-PCR 检测结果 眼睑缝合后 7 d、14 d,单纯手术组与生理盐水组比较,MMP-2、TIMP-2、TGF- β 2、TGF- β 1 的 mRNA 表达差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$);单纯手术组与空白对照组比较,MMP-2、TGF- β 2 mRNA 相对表达量均增多,TIMP-2、TGF- β 1 mRNA 相对表达量均减少,差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$);Conbercept 组与生理盐水组比较,MMP-2、TGF- β 2 mRNA 相对表达量均减少,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$),两组间 TIMP-2 mRNA 相对表达量差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。眼睑缝合后 7 d,Conbercept 组与生理盐水组比较,TGF- β 1 mRNA 相对表达量差异无统计学意义($P=0.124$),眼睑缝合后 14 d,两组间 TGF- β 1 mRNA 相对表达量差异具有统计学意义($P=0.007$)。见表 2。

表 1 各组豚鼠不同时间点右眼眼轴长度、屈光度比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	眼轴长度/mm			屈光度/D		
	缝合前	缝合后 7 d	缝合后 14 d	缝合前	缝合后 7 d	缝合后 14 d
空白对照组	7.575 ± 0.033	7.607 ± 0.028	7.660 ± 0.026	5.15 ± 0.34	3.71 ± 0.18	2.02 ± 0.35
单纯手术组	7.570 ± 0.015	7.730 ± 0.014 *	7.806 ± 0.021 *	5.05 ± 0.17	-0.43 ± 0.11 *	-2.75 ± 0.11 *
生理盐水组	7.564 ± 0.024	7.733 ± 0.012 *	7.814 ± 0.016 *	5.12 ± 0.23	-0.40 ± 0.11 *	-2.76 ± 0.11 *
Conbercept 组	7.563 ± 0.033	7.720 ± 0.056 *	7.750 ± 0.017 * [△]	5.11 ± 0.32	-0.38 ± 0.09 *	-1.43 ± 0.30 * [△]
F 值	0.426	119.924	115.458	0.228	2690.650	869.162
P 值	0.736	0.000	0.000	0.876	0.000	0.000

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与生理盐水组相比,[△] $P < 0.001$

表 2 各组豚鼠不同时间点各因子 mRNA 相对表达量

($\times 10^{-3}, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-2 mRNA		TIMP-2 mRNA		TGF- β 2 mRNA		TGF- β 1 mRNA	
	缝合后 7 d	缝合后 14 d	缝合后 7 d	缝合后 14 d	缝合后 7 d	缝合后 14 d	缝合后 7 d	缝合后 14 d
空白对照组	2.64 ± 0.34	3.76 ± 0.49	4.94 ± 0.27	3.30 ± 0.22	2.46 ± 2.88	3.40 ± 0.25	6.48 ± 1.64	6.44 ± 1.14
单纯手术组	71.17 ± 23.66 *	108.43 ± 9.26 *	3.00 ± 0.10 *	1.07 ± 0.15 *	34.67 ± 2.51 *	63.33 ± 5.51 *	3.60 ± 0.10 *	2.90 ± 0.32 *
生理盐水组	66.33 ± 11.67	111.33 ± 3.71	3.03 ± 0.25	1.03 ± 0.25	36.33 ± 4.51	61.33 ± 5.51	3.77 ± 0.15	3.10 ± 0.52
Conbercept 组	38.76 ± 3.25 [△]	25.57 ± 0.75 [△]	3.23 ± 0.15	1.40 ± 0.61	9.17 ± 4.62 [△]	9.57 ± 0.58 [△]	2.33 ± 0.21	0.87 ± 0.05 [△]
F 值	28.190	559.927	76.303	44.537	202.320	301.740	11.487	33.522
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000

注:与空白对照组相比,* $P < 0.01$;与生理盐水组相比,[△] $P < 0.05$

2.3 Western blot 检测结果 Western blot 检测结果显示,眼睑缝合后 7 d、14 d,单纯手术组与空白对照组比较,MMP-2、TGF- β 2 蛋白表达量均增多,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$),TIMP-2、TGF- β 1 蛋白表达量均减少,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$);Conbercept 组与生理盐水组比较,MMP-2、

TGF- β 2、TGF- β 1 蛋白表达量均减少,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$),TIMP-2 蛋白表达量差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);单纯手术组与生理盐水组比较,MMP-2、TGF- β 2、TIMP-2、TGF- β 1 蛋白表达量差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。见图 1。

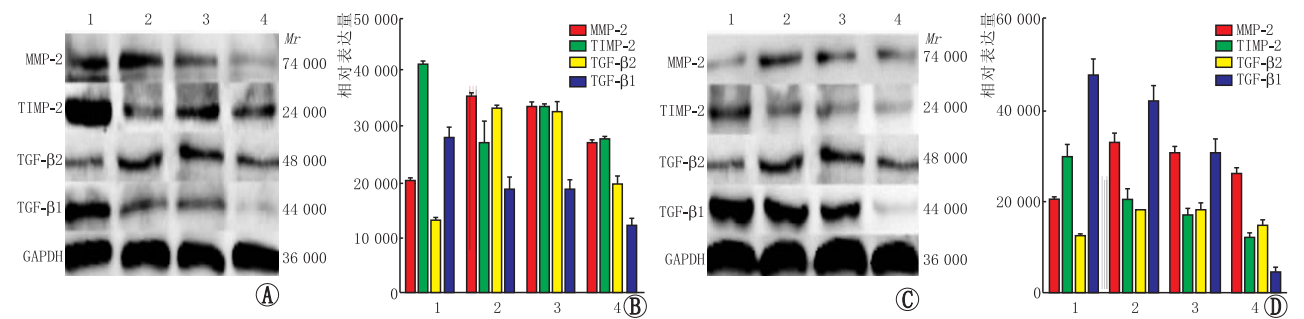


图 1 各组不同时间点各因子蛋白表达情况 A:缝合后 7 d 时 Western blot 电泳图;B:缝合后 7 d 时各因子蛋白相对表达量;C:缝合后 14 d 时 Western blot 电泳图;D:缝合后 14 d 时各因子蛋白相对表达量。1:空白对照组;2:单纯手术组;3:生理盐水组;4:Conbercept 组

3 讨论

目前眼科学者们大多认可近视主要是由眼轴增长引起的,巩膜细胞外基质重塑是眼轴增长的主要机制。MMP-2 因可降解巩膜中主要成分 I 型胶原而受到关注,它可使巩膜胶原降解增加,进而使巩膜变薄;TIMP-2 是 MMP-2 的抑制因子,可降低巩膜中胶原的降解;正常情况下两者处于动态平衡状态,当两者平衡打破,巩膜细胞外基质代谢发生异常,导致巩膜细胞外基质重塑^[14-15]。有研究表明,缺氧引起巩膜成纤维细胞转化和胶原形成,可造成巩膜细胞外

基质重塑,进而影响近视形成,且抗缺氧药物可抑制近视形成^[16]。肌成纤维细胞特异性表达的 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),是细胞外基质合成的主要细胞,TGF- β 是一种调节成纤维细胞与肌成纤维细胞转化的重要因子。以往研究证明,TGF- β 2 可上调 MMP-2 表达,高水平 TGF- β 1 可诱导 TIMP-2 表达^[11-12]。因此,MMP-2、TIMP-2、TGF- β 作为调控细胞外基质重塑的重要因子,可能参与近视的形成过程。国内外已有大量实验研究证明,近视形成过程中伴随着 MMP-2、TIMP-2、TGF- β 等因子活性的改变,以及外源性应用调节 MMP-2、TIMP-

2、TGF- β 活性的药物可影响近视形成过程^[17-18]。

Conbercept 是由中国研发的一种抗新生血管生长因子融合蛋白,是一种由 VEGFR1 的 2 号决定簇和 VEGFR2 的 3 号、4 号决定簇与人免疫球蛋白 G 的 Fc 段结合形成的人源化重组融合蛋白,可与 VEGF-A、VEGF-B 和胎盘生长因子(PIGF)的所有亚型结合,由于在 Fab 段添加了 VEGFR-2 的 4 号决定簇,因此较其他抗新生血管生成的药物,如雷珠单抗、贝伐单抗、阿柏西普等对 VEGF 表现出更高的结合力^[19]。目前,Conbercept 主要应用于减少 VEGF 生成以预防、治疗眼部新生血管形成及黄斑部水肿等疾病^[20-21]。既往研究发现,贝伐单抗能够直接或间接影响 TGF- β 、MMP-2、 α -SMA 表达及低剂量抗 VEGF 药物联合伊马替尼治疗可促进形成正常血管,改善缺氧状态,玻璃体内注射阿柏西普、雷珠单抗可影响眼内 TGF- β 、MMP 表达水平^[22-23],同时本课题组在 Conbercept 对兔角膜 PRK 术后 Haze 形成影响的研究中证实,Conbercept 同样可影响角膜中的 TGF- β 、MMP-2、 α -SMA 表达^[13]。因此,本实验主要为研究 Conbercept 是否对巩膜中 MMP-2、TGF- β 、TIMP-2 有调节作用,进而影响形觉剥夺性近视形成过程,结果表明,Conbercept 也可调节巩膜中 MMP-2、TGF- β 1、TGF- β 2 表达水平,进而影响形觉剥夺性近视形成过程。

本实验结果显示,球结膜下注射 0.05 mL 生理盐水、0.5 mg Conbercept 对角膜、结膜、视网膜等组织均无明显副作用;单纯缝合眼睑后 7 d,便可诱导形成相对近视,此时巩膜中 MMP-2、TGF- β 2 相对表达量均显著提高,TIMP-2、TGF- β 1 相对表达量均显著降低,这与 Zhao 等^[9]、张兰兰等^[24]的研究结果一致;球结膜下注射生理盐水对形觉剥夺性近视形成过程无明显影响;0.5 mg Conbercept 球结膜下注射后 7 d,与生理盐水组比较,眼轴长度、屈光度差异虽无统计学意义,但 MMP-2、TGF- β 2 相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),表明球结膜下注射 0.5 mg Conbercept 7 d 后(即眼睑缝合后 7 d)已对巩膜中近视形成相关因子 MMP-2、TGF- β 2 产生抑制作用;眼睑缝合后 14 d 时,Conbercept 组与生理盐水组比较,眼轴长度、屈光度均显著降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),表明 0.5 mg Conbercept 对形觉剥夺性近视形成产生抑制作用,同时伴有 MMP-2、TGF- β 2 相对表达量降低。本实验中眼睑缝合后 14 d 时,Conbercept 组中 TGF- β 1 相对表达量低于生理盐水组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与以往刘蓓等^[13]实验证实的 Conbercept 对 TGF- β 1 产生抑制作用相一致。缝合后 7 d、14 d,Conbercept 组与生理盐水组比较,TIMP-2 相对表达量差异均无统计学意义,可能是由于 Conbercept 对 TIMP-2 表达无调节作用或 Conbercept 对 TIMP-2 的作用浓度或作用时间不足。本实验结果表明,0.5

mg Conbercept 球结膜下注射后 7 d 便可对形觉剥夺性近视形成过程中巩膜中的 MMP-2、TGF- β 2 表达产生抑制作用,注射后 14 d 时对形觉剥夺性近视形成中眼轴长度、屈光度产生抑制作用。但是本实验只是从生物学测量角度表明 0.5 mg Conbercept 对形觉剥夺性近视形成有抑制作用,从 mRNA、蛋白水平验证 Conbercept 对 MMP-2、TGF- β 2、TGF- β 1 表达有抑制作用,其作用的信号通路尚不明确。因此,我们需进一步研究 Conbercept 作用的具体信号通路,为以后抑制近视形成提供新的思路以及预测 Conbercept 用于治疗近视可能带来的副作用,同时此次实验只是研究证明 0.5 mg Conbercept 对形觉剥夺性近视产生抑制作用,还需在此实验基础上进一步研究 Conbercept 对形觉剥夺性近视形成产生抑制作用的最佳浓度、剂量及时间,为以后 Conbercept 用于临床控制近视形成提供实验基础。

参考文献

- [1] MORGAN I G, FRENCH A N, ASHBY R S, GUO X, DING X, HE M, *et al.* The epidemics of myopia: Aetiology and prevention[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 62: 134-149.
- [2] HOLDEN B A, FRICKE T R, WILSON D A, JONG M, NAIDOO K S, SANKARIDURG P, *et al.* Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050 [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123 (5): 1036-1042.
- [3] DOLGIN E. The myopia boom [J]. *Nature*, 2015, 519 (7543): 276-278.
- [4] JOACHIMSEN L, BOHRINGER D, GROSS N J, REICH M, STIFTER J, REINHARD T, *et al.* A pilot study on the efficacy and safety of 0.01% atropine in german school children with progressive myopia [J]. *Ophthalmol Ther*, 2019, 8 (3): 427-433.
- [5] SACCHI M, SERAFINO M, VILLANI E, TAGLIABUE E, LUCARELLI S, BONSIGNORE F, *et al.* Efficacy of atropine 0.01% for the treatment of childhood myopia in European patients [J]. *Acta Ophthalmol*, 2019, 97 (8): e1136-e1140.
- [6] QIAN L, ZHAO H, LI X, YIN J, TANG W, CHEN P, *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 [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71 (3): 1373-1378.
- [7] VUTIPONGSATORN K, YOKOI T, OHNO-MATSUI K. Current and emerging pharmaceutical interventions for myopia [J]. *Br J Ophthalmol*, 2019, 103 (11): 1539-1548.
- [8] LUU C D, FOO H, CREWITHER S G, GREWITHER D P. Effects of a non-steroidal (ketorolac tromethamine) and a steroidal (dexamethasone) anti-inflammatory drug on refractive state and ocular growth [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2001, 29 (3): 175-178.
- [9] ZHAO F, ZHOU Q, REINACH P S, YANG J, MA L, WANG X, *et al.* Cause and effect relationship between changes in scleral matrix metalloproteinase-2 expression and myopia development in mice [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188 (8): 1754-1767.
- [10] LIU H H, KENNING M S, JOBLING A I, MCBRIEN N A, GENTLE A. Reduced scleral TIMP-2 expression is associated with myopia development: TIMP-2 supplementation stabilizes scleral biomarkers of myopia and limits myopia development [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (4): 1971-1981.
- [11] JIA Y, YUE Y, HU D N, CHEN J L, ZHOU J B. Human aqueous humor levels of transforming growth factor-beta2: Association with matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of matrix metalloproteinases [J]. *Biomed Rep*, 2017, 7 (6): 573-578.
- [12] CHEN B Y, WANG C Y, CHEN W Y, MA J X. Altered TGF-beta2 and bFGF expression in scleral desmocytes from an experimentally-induced myopia guinea pig model [J]. *Grav-*

- ses Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251(4):1133-1144.
- [13] 刘蓓, 张磊, 刘玉震, 高洪莲, 隋文君. 康柏西普对兔眼准分子激光角膜切削术后角膜上皮雾状混浊的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(2):94-100.
LIU B, ZHANG L, LIU Y Z, GAO H L, SUI W J. Effects of conbercept on haze formation after photorefractive keratectomy in rabbit eyes[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(2):94-100.
- [14] CAMPBELL I C, HANNON B G, READ A T, SHERWOOD J M, SCHWANER S A, ETHIER C R. Quantification of the efficacy of collagen cross-linking agents to induce stiffening of rat sclera[J]. J R Soc Interface, 2017, 14(129):20170014.
- [15] JIA Y, HU D N, ZHU D, ZHANG L, GU P, FAN X, et al. MMP-2, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 protein levels in human aqueous humor: relationship with axial length[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(6):3922-3928.
- [16] WU H, CHEN W, ZHAO F, ZHOU Q, REINACH P S, DENG L, et al. Scleral hypoxia is a target for myopia control[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(30):E7091-E7100.
- [17] XI L Y, YIP S P, SHAN S W, SUMMERS-RADA J, KEE C S. Region-specific differential corneal and scleral mRNA expressions of MMP2, TIMP2, and TGFβ2 in highly myopic-astigmatic chicks[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):11423.
- [18] LI T, ZHOU X, LI B, JIANG B. Effect of MT3 on retinal and choroidal TGF-β2 and HAS2 expressions in form deprivation myopia of guinea pig[J]. J Ophthalmol, 2017, 2017:5028019.
- [19] MAO J, ZHANG C, LIU C, SHEN L, LAO L, SHAO Y, et al. The efficacy of intravitreal conbercept for chronic central serous chorioretinopathy[J]. J Ophthalmol, 2019, 2019:7409426.
- [20] DE OLIVEIRA D J, DE ANDRADE G C, NOVAIS E A, FARAH M E, RODRIGUES E B. Fusion proteins for treatment of retinal diseases: aflibercept, ziv-aflibercept, and conbercept[J]. Int J Retina Vitreous, 2016, 2:3.
- [21] CAI S, YANG Q, LI X, ZHANG Y. The efficacy and safety of aflibercept and conbercept in diabetic macular edema[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12:3471-3483.
- [22] LAZZARA F, FIDILIO A, PLATANIA C, GIURDANELLA G, SALOMONE S, LEGGIO G M, et al. Aflibercept regulates retinal inflammation elicited by high glucose via the PIGF/ERK pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 168:341-351.
- [23] FOROOGHIAN F, KERTES P J, ENG K T, ALBIANI D A, KIRKER A W, MERKUR A B, et al. Alterations in intraocular cytokine levels following intravitreal ranibizumab[J]. Can J Ophthalmol, 2016, 51(2):87-90.
- [24] 张兰兰, 刘琼, 于健, 唐晓娟, 徐静. 转化生长因子-β(TGF-β)影响豚鼠巩膜成纤维细胞增殖和α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达的研究[J]. 眼科新进展, 2016, 36(11):1011-1015.
ZHANG L L, LIU Q, YU J, TANG X J, XU J. Effects of TGF-β on cellular proliferation and α-SMA expression in guinea pig scleral fibroblasts[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2016, 36(11):1011-1015.

Effects of Conbercept on the form-deprivation myopia in guinea pigs and its related factors

LIU Qiqi¹, GAO Honglian², LIU Bei¹, LI Xinmeng¹, YU Rui¹, ZHANG Lei¹

1. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

2. Clinical Medical Laboratory of Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Corresponding author: ZHANG Lei, E-mail: zhangleisd@263.net

[Abstract] Objective To investigate the effect of subconjunctival injection of anti-angiogenic growth factor fusion protein, Conbercept, on the form-deprivation myopia in guinea pigs and its underlying mechanisms. **Methods** All of 48 healthy guinea pigs (male or female) of 3 weeks old were taken. The guinea pigs were randomly divided into control group, unilateral lid fusion group, normal saline solution group and Conbercept group. Guinea pigs in the control group left untreated, and the unilateral lid fusion group, normal saline solution group and Conbercept group were treated to cover the right eye with eyelid suture. The right eye were performed with subconjunctival injection of 0.05 mL normal saline solution in the normal saline solution group, while 0.5 mg (0.05 mL) Conbercept for the Conbercept group at the time of eyelid suture and 7 days after eyelid suture. Then the diopter and axial length were recorded before and 7 days and 14 days after injection, and the sclera was collected at the posterior pole for RT-PCR and Western blot to detect mRNA and protein expression levels of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2), tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 (TIMP-2), and transforming growth factor-β (TGF-β). **Results** Seven days and 14 days after eyelid suture, when compared with the control group, the length of the eye axis and diopter of the right eye of guinea pigs in the unilateral lid fusion group were increased; the relative expression levels of MMP-2, TGF-β2 mRNA and protein were increased, and the relative expression levels of TGF-β1 and TIMP-2 were decreased, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). There were no statistically significant differences in all variables between the unilateral lid fusion group and normal saline solution group (all $P > 0.05$). Seven days after eyelid suture, compared with the normal saline solution group, there were no statistically significant differences in the axial length, diopter, and relative expression of TIMP-2, TGF-β1 mRNA and protein in the Conbercept group (all $P > 0.05$), but the relative expression levels of MMP-2 and TGF-β2 mRNA and protein decreased, and the differences were statistically significant (both $P < 0.05$). At 14 days after eyelid suture, compared with normal saline solution group, the axial length, diopter and relative expression levels of MMP-2, TGF-β2, TGF-β1 mRNA and protein in the Conbercept group were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Subconjunctival injection of 0.5 mg Conbercept can delay the formation of form-deprivation myopia in guinea pigs, which is achieved possibly by regulating the expression of MMP-2, TGF-β1 and TGF-β2 in the sclera. **Conclusion** Subconjunctival injection of 0.5 mg conbercept can delay the formation of form-deprivation-myopia in guinea pigs, possibly by regulating the expression of MMP-2, TGF-β1 and TGF-β2 in the sclera.

[Key words] Conbercept; form-deprivation myopia; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2; transforming growth factor β