

引文格式: 邓柔, 张曦文, 杨轲, 路雪婧. 针刺对形觉剥夺性近视豚鼠巩膜形态及组织中 HIF-1 α 、SOD、MDA 水平的影
响[J]. 眼科新进展, 2023, 43(4): 260-265. doi:10.13389/j.cnki.rao.2023.0053

【实验研究】

针刺对形觉剥夺性近视豚鼠巩膜形态及组织中 HIF-1 α 、SOD、MDA 水平的影响[△]

邓 柔 张曦文 杨 轲 路雪婧

作者简介:邓柔 (ORCID:0000-0002-5760-9381), 女, 1996 年 2 月出生, 重庆人, 在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治眼病及视功能保护的研究。E-mail: 1053655809@qq.com
通信作者:路雪婧 (ORCID: 0000-0001-5324-4736), 女, 1972 年 2 月出生, 四川德阳人, 博士, 研究员, 主任医师。研究方向: 中医药防治眼病及视功能保护的研究。E-mail: luxuejing@cdutcm.edu.cn

收稿日期:2022-10-31
修回日期:2023-02-15
本文编辑:盛丽娜
△基金项目:国家自然科学基金项目(编号: 82174444); “杏林学者”学科人才科研提升计划项目(编号: YXRC2020003)
作者单位:610072 四川省成都市, 成都中医药大学[邓柔 (2020 级硕士研究生), 张曦文 (2019 级博士生), 杨轲 (2020 级硕士研究生)]; 610072 四川省成都市, 成都中医药大学眼科学院, 中医药眼病防治与视功能保护四川省重点实验室(路雪婧)

【摘要】 目的 探究针刺对形觉剥夺性近视(FDM)豚鼠巩膜组织形态特点及巩膜组织中缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平的影响。**方法** 选取普通级 3 周龄健康三色豚鼠 72 只, 随机分为空白组、模型组和针刺组(各 24 只)。用半透明气球作为眼罩分别固定于模型组和针刺组豚鼠右眼及头面部建立 FDM 模型, 左眼充分暴露作自身对照; 针刺组在豚鼠模型建立当天起, 于每日相同时间对豚鼠进行针刺和电针干预治疗, 空白组豚鼠不做任何干预。记录每组豚鼠造模前、造模后 2 周及 4 周的眼轴长度和屈光度。造模后 4 周处死豚鼠, 光学显微镜下观察巩膜形态变化, Western blot 检测各组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达, 比色法测定各组豚鼠巩膜中 SOD 活力和 MDA 含量。**结果** 造模后 2 周和 4 周, 与空白组比较, 模型组及针刺组豚鼠遮盖眼近视屈光度及眼轴长度均明显增加(均为 $P < 0.05$); 与模型组比较, 针刺组豚鼠遮盖眼近视屈光度减小, 眼轴增长明显减缓(均为 $P < 0.05$)。造模后 4 周, 与空白组比较, 模型组豚鼠巩膜厚度明显变薄, 胶原纤维分布稀疏, 有明显纤维空隙且排列不规则; 与模型组相比, 针刺组豚鼠巩膜层增厚, 与胶原纤维分离程度较小且排列更加规则。造模后 4 周, 与空白组相比, 模型组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 针刺组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。造模后 4 周, 与空白组相比, 模型组豚鼠巩膜中 SOD 活性显著降低, MDA 含量显著提高(均为 $P < 0.01$); 与模型组相比, 针刺组豚鼠巩膜中 SOD 活性显著升高, MDA 含量显著降低(均为 $P < 0.05$)。**结论** 针刺治疗可通过调节 FDM 豚鼠巩膜中 HIF-1 α 、SOD 及 MDA 的表达, 改善巩膜缺氧及抗氧化应激状态, 延缓近视的发生发展。

【关键词】 形觉剥夺性近视; 豚鼠; 针刺; 巩膜; 缺氧诱导因子 1 α ; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

【中图分类号】 R778

近视是最常见的屈光不正, 其中高度近视易引发黄斑病变、视网膜脱离、视网膜下新生血管、脉络膜萎缩及其他并发症, 导致不可逆性的视觉损害^[1]。流行病学预测结果显示, 到 2050 年, 世界近视人口总数将达 47.58 亿^[2], 近视已经成为世界范围内一个严峻的社会、经济及公共卫生问题。因此, 建立有效、安全的干预措施对预防近视和控制近视的发生发展是十分必要的。

巩膜是维持眼部形状和完整性的结构框架。目前多数学者认为近视的发展与巩膜重塑有关^[3]。Wu 等^[4]研究认为, 巩膜缺氧为近视发生发展中巩膜重塑至关重要的调节因素, 且多伴有缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的表达升高^[5-7]。此外, 氧化应激也是促进近视形成的重要因素^[8-11]。眼部组织光氧化损伤^[12]、血管缺血/再灌注^[13]等可触发产生活性氧自由基在视网膜、脉络膜中大量聚集, 诱导脂质过氧化反应, 是导致近视产生的重要原因。针刺疗法是中国传统医学的重要组成部分, 在治疗眼部疾病方面有着悠久的历史, 当代学者通过研究也已证实针刺能调节眼局部气血阴阳, 疏通经络, 调整眼部病理状

态, 改善近视的发生发展^[14-16]。本研究的目的是探索针刺是否通过调节形觉剥夺性近视(FDM)豚鼠巩膜组织中 HIF-1 α 、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)的表达来延缓近视的发生发展, 以丰富近视形成的机制, 并为针刺治疗近视提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 普通级 3 周龄健康三色豚鼠 72 只, 体重 160 ~ 200 g, 雌雄各半, 购于成都恩斯维尔生物科技有限公司(生产许可证号: SCXK 陕 2017-002)。将豚鼠饲养于成都中医药大学动物实验室, 全部动物都饲养在温度(24 \pm 2)℃、空气相对湿度约为 50% 的条件下, 光照按正常昼夜节律设定为 12 h 光照(光照强度为 500 lux)/12 h 黑暗, 实验过程中豚鼠除自由获取饲料与饮水以外, 还每日定时给予新鲜蔬菜以确保豚鼠维生素 C 摄入充足。豚鼠适应性饲养 3 ~ 7 d 后, 随机分为空白组、模型组和针刺组(各 24 只); 实验前排除患有角膜炎、结膜炎等眼部疾病者。整个实验过程对豚鼠的处置均严格

遵循《关于实验教学中实验动物的伦理学研究》^[17]一文提出的原则,并经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(实验动物福利伦理审核申请备案编号:2021-39)。

1.1.2 主要试剂与仪器 HIF-1 α 抗体(novusbio)、 β -actin 抗体(abclonal)、羊抗兔 IgG(H + L)(affinity)、SOD 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);华佗牌针灸针及 SDZ-II 型脉冲电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司);带状光检影镜及镜片箱(苏州六六视觉科技股份有限公司);SW-1000 眼科 A 型超声诊断仪(天津市索维电子科技有限公司);Spectra MAX Plus384 酶标仪(美谷分子仪器有限公司生产);Pannoramic 250 数字切片扫描仪(3DHISTECH, 匈牙利);V2.0 GIS 机箱控制软件(天能集团)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 采用形觉剥夺法建立 FDM 模型^[18]。模型组及针刺组豚鼠右眼均以半透明气球作为眼罩固定于头面部,左眼作为自身对照眼予充分暴露,造模时间分别为 2 周和 4 周;造模后以豚鼠近视屈光度增加、眼轴增长,即达到“相对近视”判定为近视造模成功。造模期间豚鼠正常摄食、进水,每天 3 次检查眼罩有无脱落,一旦发现脱落,立即重新固定;空白组豚鼠不做任何处理。

1.2.2 针刺组干预方式 针刺组豚鼠造模当天即接受针刺及电针干预治疗,参照 1992 年版豚鼠针灸穴位图谱^[19]定位及针刺方法,针刺取“太阳”“合谷”“肝俞”“神庭”“百会”“大椎”,采用 0.25 mm \times 13.00 mm 一次性针灸针,“太阳”向后斜刺 2 mm,“合谷”直刺 3 mm,“肝俞”直刺 8 mm,“神庭”向上横刺 2 mm,“百会”向前斜刺 2 mm,“大椎”直刺 15 mm,平补平泻,得气后“百会”“大椎”加电针干预,频率为 2 Hz,强度为 2 mA,每天 1 次,每次 30 min,持续 4 周;整个过程均由同一针灸师操作完成。模型组及空白组豚鼠不予针刺干预。

1.2.3 各组豚鼠眼生物学测量 造模前及造模后 2 周、4 周各组豚鼠均行生物学测量。测量前所有豚鼠均行散瞳验光,每次测量前均使用 5 g \cdot L⁻¹复方托吡卡胺滴眼液每隔 5 min 滴眼 1 次,共 4 次;瞳孔充分散大后用带状光检影镜于暗室检影验光检测屈光度,每眼连续测定 3 次,取其平均值。屈光度使用等效球镜记录,即为球镜度数 + 1/2 柱镜度数。采用 A 型超声诊断仪测量眼轴长度,先用 4 g \cdot L⁻¹盐酸奥布卡因滴眼液滴眼 2 次行表面麻醉,将 A 型超声探头在角膜表面呈垂直角度对准瞳孔中心,获得理想波形,记录眼轴长度,连续测 5 次,去掉明显偏差值并取其平均值,全过程由同一技师进行操作。

1.2.4 取材方式 造模后 4 周,腹腔注射过量 100 g \cdot L⁻¹ 水合氯醛处死所有豚鼠,摘除右眼眼球并放置于冰块上保存,快速环状剪开角膜缘,去除眼前

节、玻璃体及其他组织,剥离出巩膜用于后续实验。

1.2.5 HE 染色观察各组豚鼠巩膜组织病理学变化 每组随机选取 6 只豚鼠右眼巩膜组织将其固定于体积分数 10% 中性甲醛溶液中,经全自动脱水机脱水后进行修剪,石蜡包埋后行组织切片(厚度为 3 μ m),脱蜡至水,放入苏木精染色液中 15 min,自来水冲洗,盐酸酒精分化处理 10 s,然后清洗,再放入 50 $^{\circ}$ C 的温水中返蓝,再洗,放入体积分数 85% 的酒精 5 min,伊红染色液染色 5 min,梯度酒精脱水,封片后进行镜检。先于光学显微镜 100 倍下观察每张切片局部组织,然后于 400 倍下观察巩膜组织着色情况以及巩膜组织结构病理特点。

1.2.6 Western blot 检测各组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白相对表达量 每组随机选取 6 只豚鼠右眼巩膜组织,提取巩膜中的蛋白质,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,各组取 50 μ L 蛋白,按 4 : 1 的比例加入 5 \times Loding buffer,混匀后置热循环仪中 95 $^{\circ}$ C 15 min, - 80 $^{\circ}$ C 保存。上样、电泳、转膜,体积分数 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。一抗(HIF-1 α 稀释度为 1 : 1000, β -actin 稀释度为 1 : 100 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,二抗(稀释浓度为 1 : 5000)室温孵育 2 ~ 3 h,洗膜。采用化学发光试剂进行曝光、显影。定影后行凝胶图像分析,采用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 曝光扫描条带,结果用目的蛋白相对表达量(目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白积分光密度/内参积分光密度)表示。

1.2.7 各组豚鼠巩膜中 SOD 活力及 MDA 含量的检测 取每组剩余豚鼠右眼巩膜组织,采用比色法检测氧化因子 SOD 活力和 MDA 含量。根据 SOD 检测试剂盒说明书,在 96 孔板上设置测定孔和空白对照孔,再将样本和试剂充分混合,搅拌均匀后于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min,在波长 450 nm 处酶标仪读数, SOD 活力按试剂盒说明书公式计算。根据 MDA 检测试剂盒说明书设置测定管和空白管,加入试剂后,涡旋混匀器混匀,95 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,取出后流水冷却,4000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min 后取上清,在波长 532 nm 处使用酶标仪测定吸光度,MDA 含量参照试剂盒说明书公式计算。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数之间的比较用 One-Way ANOVA 检验,方差齐用 LSD 检验,方差不齐则用 Tamhane's T^2 检验。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组豚鼠屈光度变化 造模前,空白组、模型组和针刺组豚鼠双眼屈光状态均为远视,各组豚鼠双眼间屈光度比较差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);各组豚鼠间相比,左眼、右眼屈光度差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。造模后 2 周和 4 周,

随造模时间延长,空白组豚鼠双眼和模型组、针刺组豚鼠的自身对照眼(左眼)远视度数均逐渐降低,为豚鼠逐渐正视化过程,但相同时间点各组之间差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。造模后2周和4周,与空白组比较,模型组及针刺组豚鼠遮盖眼(右眼)近视屈光度均明显增加(均为 $P<0.05$);与模型组比较,针刺组豚鼠遮盖眼近视屈光度均减小(均为 $P<0.05$)(表1)。

表1 不同时间点各组豚鼠双眼屈光度变化

时间	豚鼠 /只	屈光度/D		<i>t</i>	<i>P</i>
		右眼	左眼		
造模前					
空白组	24	3.57 ± 0.95	3.58 ± 0.90	-0.039	0.969
模型组	24	3.55 ± 0.92	3.25 ± 0.99	1.092	0.281
针刺组	24	3.51 ± 0.99	3.53 ± 1.04	-0.071	0.944
造模后 2 周					
空白组	24	2.33 ± 0.89	2.41 ± 0.99	-0.268	0.790
模型组	24	-1.33 ± 0.97▲	2.17 ± 1.04	-12.054	0.000
针刺组	24	-0.17 ± 1.02▲△	2.36 ± 1.03	-8.577	0.000
造模后 4 周					
空白组	24	1.68 ± 0.92	1.72 ± 1.10	-0.142	0.887
模型组	24	-3.77 ± 0.96▲	1.59 ± 1.04	-18.490	0.000
针刺组	24	-2.86 ± 0.88▲△	1.75 ± 1.03	-16.705	0.000

注:与同时时间点空白组相比,▲ $P<0.05$;与同时时间点模型组相比,△ $P<0.05$ 。

2.2 各组豚鼠眼轴长度变化 造模前,空白组、模型组和针刺组豚鼠双眼间眼轴长度比较差异无统计学意义($P>0.05$);各组豚鼠间相比,左眼、右眼眼轴长度差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。造模后2周和4周,随造模时间延长,空白组豚鼠双眼和模型组、针刺组豚鼠的自身对照眼眼轴长度均略有延长,但相同时间点各组之间差异均无统计学意义(均

为 $P>0.05$)。造模后2周和4周,与空白组比较,模型组及针刺组豚鼠遮盖眼(右眼)眼轴长度均明显延长(均为 $P<0.05$);与模型组比较,针刺组豚鼠遮盖眼眼轴长度均较短(均为 $P<0.05$)(表2)。

表2 不同时间点各组豚鼠双眼眼轴长度变化

时间	豚鼠 /只	眼轴长度/mm		<i>t</i>	<i>P</i>
		右眼	左眼		
造模前					
空白组	24	7.66 ± 0.11	7.65 ± 0.12	0.304	0.762
模型组	24	7.65 ± 0.10	7.66 ± 0.12	-0.256	0.799
针刺组	24	7.63 ± 0.12	7.62 ± 0.11	0.222	0.825
造模后 2 周					
空白组	24	7.83 ± 0.12	7.84 ± 0.11	-0.252	0.802
模型组	24	8.15 ± 0.11 [▲]	7.78 ± 0.11	11.664	0.000
针刺组	24	7.97 ± 0.13 ^{▲△}	7.81 ± 0.11	4.593	0.000
造模后 4 周					
空白组	24	7.93 ± 0.10	7.90 ± 0.12	0.977	0.334
模型组	24	8.31 ± 0.08 [▲]	7.90 ± 0.12	13.958	0.000
针刺组	24	8.11 ± 0.12 ^{▲△}	7.88 ± 0.11	6.665	0.000

注:与同时时间点空白组相比,▲ $P<0.05$;与同时时间点模型组相比,△ $P<0.05$ 。

2.3 各组豚鼠巩膜形态变化 造模后4周光学显微镜下观察:空白组豚鼠的巩膜组织染色可见成纤维细胞核为蓝紫色,梭形或长圆形,细胞外基质为粉红色;巩膜的厚度和形态正常,巩膜内胶原纤维排列规则,走行正常,直径均匀,内含少量血管、神经、纤维细胞和色素细胞,未见明显病理变化。与空白组比较,模型组豚鼠巩膜厚度明显变薄,胶原纤维分布稀疏,有明显纤维空隙且排列不规则。与模型组比较,针刺组豚鼠巩膜层增厚,与胶原纤维分离程度较小,且排列更加规则(图1)。

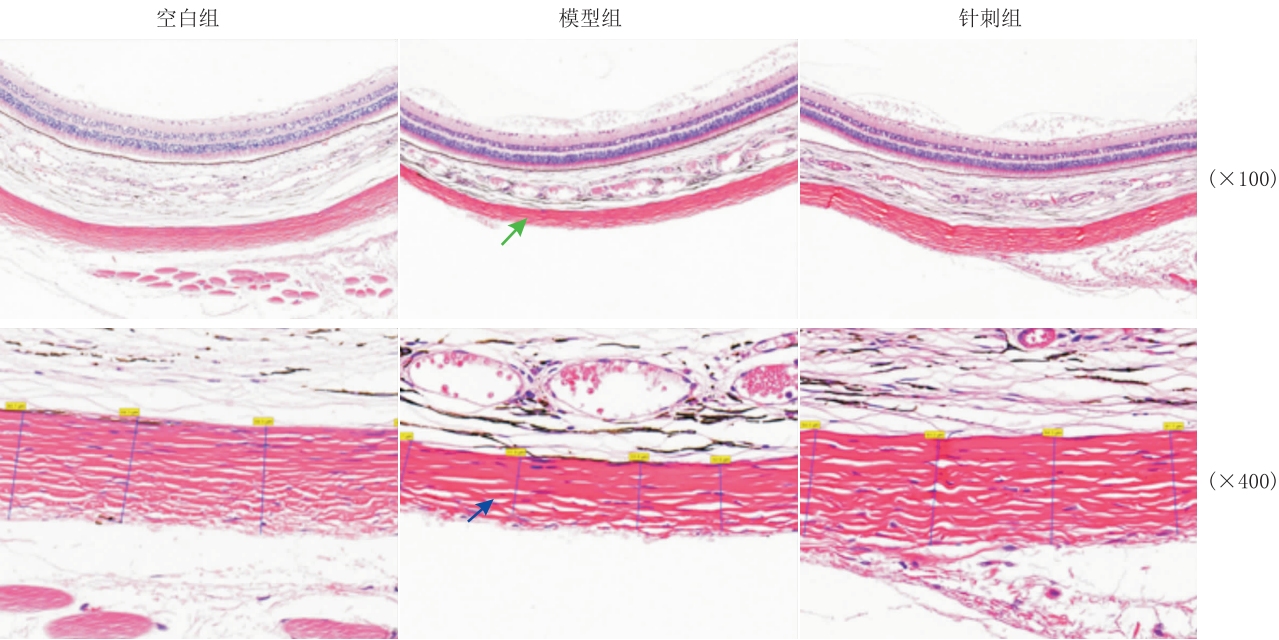


图1 HE染色示各组豚鼠巩膜组织形态 绿色箭头示巩膜层变薄,黄色示巩膜层具体厚度,蓝色箭头示纤维排列疏松。

2.4 各组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达 Western blot 检测结果显示,造模后 4 周,与空白组比较,模型组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达水平显著增高($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)(图 2)。

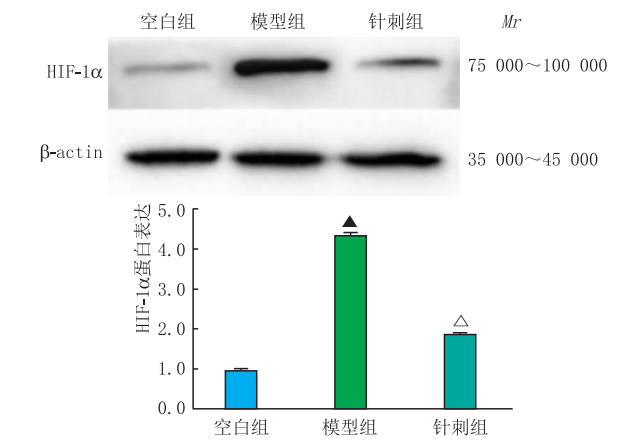


图 2 Western blot 检测各组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达 与空白组相比,▲ $P < 0.01$;与模型组相比,△ $P < 0.01$ 。

2.5 各组豚鼠巩膜中 SOD 活力和 MDA 含量 造模后 4 周,与空白组相比,模型组豚鼠巩膜中 SOD 活性明显降低,MDA 含量显著升高(均为 $P < 0.01$);与模型组相比,针刺组豚鼠巩膜中 SOD 活性明显增强,MDA 含量明显降低(均为 $P < 0.05$)(表 3)。

组别	SOD 活性/(U · mgprot ⁻¹)	MDA 含量/(nmol · mgprot ⁻¹)
空白组	60.871 ± 12.364	3.078 ± 0.968
模型组	37.224 ± 8.190 **	6.125 ± 1.985 **
针刺组	50.418 ± 10.574 [#]	4.161 ± 1.452 [#]
F	7.619	6.146
P	0.005	0.011

注:与空白组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$ 。
mgprot 表示毫克蛋白。

3 讨论

在当前的近视实验研究中,研究人员以动物为基础构建了多种近视模型来探讨近视的发病机制,其中豚鼠屈光状态、正视化机制类似于人类,因此是近年来国内外使用最广泛的近视研究动物模型之一^[20-21]。目前,根据造模方式不同实验性近视动物模型主要有两种,即 FDM 模型(缝合眼睑或用半透明眼罩遮盖造模)和光学离焦性近视(LIM)模型(给动物配戴负球镜片)^[18]。研究表明,豚鼠对形觉剥夺高度敏感,是较为理想的实验性近视动物模型^[22],因此本实验选取豚鼠为实验对象,采用半透明眼罩遮盖豚鼠右眼的造模方式。本实验结果显示,形觉剥夺可以使豚鼠被剥夺眼较自身对照眼近视度数及眼轴长度均明显增加,屈光状态迅速从远视向近视转变,与以往研究结果一致^[23]。本研究针

刺干预后,豚鼠被剥夺眼近视度数减小且眼轴增长减缓,表明针刺可以通过延缓 FDM 豚鼠近视屈光度和眼轴长度的增长来延缓近视形成与发展。

HIF-1 α 是一种重要的转录因子,在低氧反应中调节基因表达^[24];SOD 是活性氧清除酶系统的重要保护酶,在维护细胞活性氧代谢的平衡中起重要作用;MDA 作为机体脂质过氧化的最终产物,反映了细胞受自由基攻击的严重程度;在生理状态下,三者作为维持氧稳态的主要调节因子对巩膜及其他生理组织具有保护作用。病理状态下,HIF-1 α 表达水平升高,是造成巩膜缺氧而致近视的重要因素^[4,25],脉络膜血流量是巩膜氧气和营养供应的主要来源,改善脉络膜血液灌注^[26]、玻璃体注射抗缺氧药物(红景天苷或芒柄花素)^[4]及电针干预^[27]可通过下调 HIF-1 α 表达进而改善巩膜缺氧延缓近视的发展。在关于近视氧化应激的研究中,Liu 等^[28]实验研究发现,兔在氧化应激状态时,抗氧化能力降低,影响线粒体中氧化磷酸化作用的发挥,释放大氧自由基,促使巩膜细胞发生凋亡,诱导近视性巩膜生长;高度近视的豚鼠巩膜组织中,也发现 SOD 活力降低及 MDA 含量增加^[29];同时大量研究表明,多数抗氧化相关的微量元素不足也与近视的发展之间存在关联,如锌(Zn)、硒(Se)、 α -生育酚(维生素 E)、抗坏血酸(维生素 C)等元素在抗氧化过程和巩膜的生化重建中起重要作用^[30-33]。这表明巩膜缺氧及氧化应激损伤参与了近视的形成与发展,而改善巩膜缺氧及抗氧化应激能有效缓解这一现象。本研究结果显示,随着近视的进展,模型组豚鼠巩膜中 HIF-1 α 蛋白表达增加、MDA 含量增高、SOD 活性降低,进一步证实了巩膜缺氧及氧化应激机制参与了近视的形成;而针刺可通过抑制 HIF-1 α 蛋白表达,增强巩膜组织中 SOD 活性,降低 MDA 表达,延缓近视的发生发展。

近视,中医称之为“目不能远视”“能近怯远症”“近觑”等,最早见于《诸病源候论》,皇甫谧《针灸甲乙经》中“远视不明,承光主之”是针刺治疗近视最早的记载。在近视病因病机方面,《银海精微》中阐述了“血虚气不足”而致近视的观点;《审视瑶函》《景岳全书》及《目经大成》等皆提出近视的形成与“阳气不足”有关。因此,结合病因病机,在针刺治疗的选穴上应当以生发阳气、调补气血为主,同时参考针刺治疗近视的循经与取穴规律“多选阳经,多选眼周穴位”的特点^[34],本研究取神庭、百会、大椎、太阳、合谷和肝俞穴,以探讨针刺对豚鼠近视的调控作用。其中督脉穴(神庭、百会、大椎)鼓动阳气,使阳气升发于目,神光有所发越;太阳穴能疏通眼部经气,缓解睫状肌疲劳和痉挛,促进眼动脉血液循环;阳明经多气多血,合谷是阳明经之原穴,又位关口,是调理人体气机之大穴,通过调气,可达理血活血之功效;肝俞为肝之背俞穴,刺激后能增强肝脏藏血和调节

血量的功能,使气血上注于目,血量丰富而增加眼中含氧量从而目有所养。肝俞穴配伍产生协同增效作用,使经络疏通,气血阴阳调和,目系得以濡养而光华发越,神光及远。

本研究结果表明,在形觉剥夺后,FDM模型组豚鼠近视屈光度增加、眼轴增长、巩膜形态发生病理性改变,逐渐形成近视,这一变化可能与巩膜组织中HIF-1 α 大量积聚及SOD活性降低,MDA含量升高密切相关。而针刺可通过抑制HIF-1 α 表达而改善巩膜缺氧;同时针刺可增强巩膜组织中SOD活性,减少MDA蓄积,提高氧自由基的清除能力以改善巩膜氧化应激状态。因此,针刺作为一个便捷、安全、接受程度高的治疗方式,有可能成为防控近视的有效手段,但其作用的具体机制尚未完全明确,仍需进一步探索和研究。

参考文献

- [1] IKUNO Y. Overview of the complications of high myopia[J]. *Retina*, 2017, 37(12): 2347-2351.
- [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] GARCIA M B, JHA A K, HEALY K E, WILDSOET C F. A bio-engineering approach to myopia control tested in a guinea pig model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(3): 1875-1886.
- [4] 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.
- [5] ZHAO F, ZHANG D, ZHOU Q, ZHAO F, HE M, YANG Z, et al. Scleral HIF-1 α is a prominent regulatory candidate for genetic and environmental interactions in human myopia pathogenesis[J]. *EBioMedicine*, 2020, 57: 102878.
- [6] PAN M, GUAN Z, REINACH P S, KANG L, CAO Y, ZHOU D, et al. PPAR γ modulates refractive development and form deprivation myopia in Guinea pigs[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 202: 108332.
- [7] YU Q, ZHOU J B. Scleral remodeling in myopia development[J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(3): 510-514.
- [8] CHAN T C, WILKINSON BERKA J L, DELIYANTI D, HUNTER D, FUNG A, LIEW G, et al. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis and treatment of retinal diseases[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 201: 108255.
- [9] UNG L, PATTAMATTA U, CARNT N, WILKINSON-BERKA J L, LIEW G, WHITE A J R. Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131: 2865-2883.
- [10] FRANCISCO B M, SALVADOR M, AMPARO N. Oxidative stress in myopia[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 750637.
- [11] LIU T X, WANG Z. Biomechanics of sclera crosslinked using genipin in rabbit[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(3): 355-360.
- [12] NOUROOZ-ZADEH J, PEREIRA P F. 2-isoprostanes, potential specific markers of oxidative damage in human retina[J]. *Ophthalmic Res*, 2000, 32(4): 133-137.
- [13] MCCORD J M. Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation[J]. *J Free Radic Biol Med*, 1986, 2(5-6): 307-310.
- [14] 吴姗姗, 魏慧霞, 郭滨, 殷学伟, 刘德政, 郭大东, 等. 电针对负透镜诱导型近视豚鼠睫状肌中表皮生长因子及其受体表达的作用[J]. *眼科新进展*, 2020, 40(4): 318-322.
- [15] WU S S, WEI H X, GUO B, YIN X W, LIU D Z, GUO D D, et al. Effect of electroacupuncture on expression of epidermal growth factor and its receptor in ciliary muscle of lens-induced myopic guinea pigs[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2020, 40(4): 318-322.
- [16] 田庆梅, 宋继科, 钱继存, 李洋, 吴姗姗, 毕宏生. 针刺对实验性近视豚鼠巩膜 MMP-2 及 TIMP-2 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5): 2046-2050.
- [17] TIAN Q M, SONG J K, QIAN J C, LI Y, WU S S, BI H S. Effects of acupuncture on the expression of MMP-2 and TIMP-2 in experimental myopia guinea pig[J]. *Chin J Trad CHN Med Pharm*, 2019, 34(5): 2046-2050.
- [18] SHA F, YE X, ZHAO W, XU C L, WANG L, DING M H, et al. Effects of electroacupuncture on the levels of retinal gamma-aminobutyric acid and its receptors in a guinea pig model of lens-induced myopia[J]. *Neuroscience*, 2015, 287: 164-174.
- [19] 李小媚, 舒安利, 肖素军, 周阳. 关于实验教学中实验动物的伦理学研究[J]. *中国医学伦理学*, 2014, 27(6): 876-878.
- [20] LI X M, SHU A L, XIAO S J, ZHOU Y. Research on animal ethics in the experimental teaching[J]. *Chin Med Ethics*, 2014, 27(6): 876-878.
- [21] NICKLA D L, YUSUPOVA Y, TOTONELLY K. The muscarinic antagonist MT3 distinguishes between form deprivation and negative lens-induced myopia in chicks[J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40(9): 962-967.
- [22] 李辞蓉, 华兴邦, 周浩良, 宋大鲁, 胡元亮. 豚鼠针灸穴位图谱的研制[J]. *上海针灸杂志*, 1992(2): 28-30.
- [23] LI C R, HUA X B, ZHOU H L, SONG D L, HU Y L. Development of atlas of acupuncture point in guinea pig[J]. *Shanghai J Acup Mox*, 1992(2): 28-30.
- [24] TSUBOTA K. Anti-aging approach for ocular disorders: from dry eye to retinitis pigmentosa and myopia[J]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 2017, 121(3): 232-248.
- [25] SRINIVASALU N, MCFADDEN S A, MEDCALF C, FUCHS L, CHUNG J, PHILIP G, et al. Gene expression and pathways underlying form deprivation myopia in the guinea pig sclera[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(3): 1425-1434.
- [26] XIAO H, FAN Z Y, TIAN X D, XU Y C. Comparison of form-deprived myopia and lens-induced myopia in Guinea pigs[J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, 7: 245-250.
- [27] HOWLETT M H, MCFADDEN S A. Form-deprivation myopia in the guinea pig (*Cavia porcellus*) [J]. *Vision Res*, 2006, 46(1-2): 267-283.
- [28] WARBRICK I, RABKIN S W. Hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) as a factor mediating the relationship between obesity and heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Obes Rev*, 2019, 20(5): 701-712.
- [29] 曾迎新, 邓宇, 冀美琦, 秦亚丽, 金明. 形觉剥夺性高度近视豚鼠巩膜形态改变及缺氧诱导因子-1 α 和氧自由基在高度近视中的作用[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(8): 723-727.
- [30] ZI Y X, DENG Y, JI M Q, QIN Y L, JING M. Changes of scleral morphology in guinea pigs with form deprivation high myopia and effects of hypoxia inducible factor-1 α and oxygen free radical in high myopia[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2019, 39(8): 723-727.
- [31] ZHOU X, ZHANG S, YANG F, YANG Y, HUANG Q, HUANG C, et al. Decreased choroidal blood perfusion induces myopia in guinea pigs[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(15): 30.
- [32] 於亭, 宋继科, 魏慧霞, 田庆梅, 纪海峰, 毕宏生, 等. 电针干预后透镜诱导型近视豚鼠巩膜形态改变及缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和脯氨酰羟化酶2 (PHD-2)表达的变化[J]. *眼科新进展*, 2021, 41(2): 125-129.
- [33] YU T, SONG J K, WEI H X, TIAN Q M, JI H F, BI H S, et al. Morphological changes of the sclera after electroacupuncture intervention and the expression of hypoxia inducible factor-1 α and proline hydroxylase domain-2 in sclera of lens-induced myopic guinea pigs[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2021, 41(2): 125-129.
- [34] LIU T X, WANG Z. Biomechanics of sclera crosslinked using genipin in rabbit[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(3): 355-360.
- [35] ZI Y, DENG Y, ZHAO J, JI M, QIN Y, DENG T, et al. Morphologic and biochemical changes in the retina and sclera induced by form deprivation high myopia in guinea pigs[J]. *BMC Ophthalmol*, 2020, 20(1): 105.
- [36] FEDOR M, SOCHA K, URBAN B, SOROCZYŃ S K A J, MATYSKIELA M, BORAWSKA M H, et al. Serum concentration of zinc, copper, selenium, manganese, and Cu/Zn ratio in

- children and adolescents with myopia[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 176(1):1-9.
- [31] RONG S, WANG C, HAN B, FENG P, LAN W, GAO Z, et al. Iontophoresis-assisted accelerated riboflavin/ultraviolet A scleral cross-linking: a potential treatment for pathologic myopia[J]. *Exp Eye Res*, 2017, 162:37-47.
- [32] LAGRÈZE W A, SCHAEFFEL F. Preventing myopia [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2017, 114(35-36):575-580.
- [33] COOPER J, TKATCHENKO A V. A Review of current concepts of the etiology and treatment of myopia[J]. *Eye Contact Lens*, 2018, 44(4):231-247.
- [34] 王加旺, 宋继科, 毕宏生. 针刺治疗青少年近视的概况[J]. *中国中医眼科杂志*, 2019, 29(4):335-338.
- WANG J W, SONG J K, BI H S. Acupuncture on adolescent myopia[J]. *CHN J Chin Ophthalmol*, 2019, 29(4):335-338.

Effects of acupuncture on the scleral morphology and levels of hypoxia-inducible factor-1 α , superoxide dismutase and malondialdehyde in the scleral tissues of form-deprivation myopic guinea pigs

DENG Rou¹, ZHANG Xiwen¹, YANG Ke¹, LU Xuejing²

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan Province, China
2. Eye School of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Sichuan Province Ophthalmopathy Prevention & Cure and Visual Function Protection with Traditional Chinese Medicine Laboratory, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Corresponding author: LU Xuejing, E-mail: luxuejing@cdutcm.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effects of acupuncture on scleral morphological characteristics and the levels of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the scleral tissues of guinea pigs with form-deprivation myopia (FDM). **Methods** Seventy-two conventional healthy three-week-old Britain guinea pigs were included and randomly divided into the blank group, model group, and acupuncture group (24 in each group). Translucent balloons were used as eye masks fixed on the right eye, head, and face of guinea pigs in the model group and the acupuncture group to establish the FDM model, while the left eye was fully exposed as the self-control. The guinea pigs in the acupuncture group were treated with acupuncture and electro-acupuncture at the same time every day since the establishment of the model, while guinea pigs in the blank group did not receive any intervention. The axial length and diopter of guinea pigs in each group were recorded before, 2 weeks and 4 weeks after modeling. The guinea pigs were sacrificed after 4 weeks of modeling. The change in scleral morphological characteristics were observed by light microscopy. The protein expressions of HIF-1 α in the sclera of guinea pigs were detected by Western blot. The activity of SOD and content of MDA were determined by the colorimetric method. **Results** At 2 weeks and 4 weeks after modeling, compared with the blank group, the myopia diopter and axial length of the covered eyes of guinea pigs in the model group and the acupuncture group significantly increased (all $P < 0.05$); compared with the model group, the myopia diopter of the covered eyes decreased and axial length of the covered eyes showed a significant slowdown in the increase in the acupuncture group (all $P < 0.05$). At 4 weeks after modeling, compared with the blank group, the sclera layer of guinea pigs in the model group significantly thinned, with sparse collagen fibers, obvious spaces between fibers, and irregular arrangement of fibers; compared with the model group, the scleral layer of guinea pigs in the acupuncture group were thickened, closer to the collagen fibers, and more regularly arranged. Compared with the blank group, the expression of HIF-1 α protein in the sclera of guinea pigs in the model group significantly increased ($P < 0.01$); compared with the model group, the expression of HIF-1 α protein in the sclera of guinea pigs in the acupuncture group significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the SOD activity significantly decreased, and MDA content significantly increased in the sclera of guinea pigs in the model group (both $P < 0.01$); compared with the model group, the SOD activity significantly increased, and MDA content significantly decreased in the sclera of guinea pigs in the acupuncture group (both $P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture can regulate the expressions of HIF-1 α , SOD and MDA in guinea pigs with FDM so as to relieve the scleral hypoxia and oxidative stress, and slow down the occurrence and development of myopia.

[Key words] form-deprivation myopia; guinea pigs; acupuncture; sclera; hypoxia-inducible factor-1 α ; superoxide dismutase; malondialdehyde