

豚鼠镜片诱导型近视眼中 RAR- β 表达的变化

林惠玉, 李 兵

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 林惠玉, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 近视眼的发病机制。

通讯作者: 李兵, 女, 教授, 主任医师, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病、临床视光学。jzslibingv@yahoo. com. cn

收稿日期: 2010-06-18 修回日期: 2010-08-03

Expression of RAR- β in the lens induced myopia in guinea pig

Hui-Yu Lin, Bing Li

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Bing Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. jzslibingv@yahoo. com. cn

Received: 2010-06-18 Accepted: 2010-08-03

Abstract

• AIM: To investigate the retinoic acid receptor- β (RAR- β) expression in guinea pig eyes and study the relationship between the RAR- β expression and experimental myopia.

• METHODS: Fifty guinea pigs were randomized into the normal control group ($n = 10$), defocus I group ($n = 20$) and defocus II group ($n = 20$). Guinea pigs in the defocus groups wore -10.00D lenses on the right eyes: defocus I group, wore lens for 14 days, and defocus II group for 28 days. The left eyes didn't wear lenses as self-control eyes. The refraction and axial length were measured before and after wearing lenses respectively. The protein expression of RAR- β in retina was detected by immunohistochemistry and Western blot. RT-PCR was used to observed the level of RAR- β mRNA in retina.

• RESULTS: Compared with the control eyes, the lens-worn eyes of defocus I and II groups became myopic and elongated ($P < 0.05$, respectively), and the degree of myopia was lower and axial length was shorter in group I than those of group II ($P < 0.05$). The protein expression and the mRNA level of RAR- β in retina of the defocus groups increased significantly ($P < 0.05$), while decreased significantly in choroid and sclera ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Expression of RAR- β in guinea pig may play a role in the lens induced myopia.

• KEYWORDS: myopia; guinea pig; retinoic acid receptor- β

Lin HY, Li B. Expression of RAR- β in the lens induced myopia in guinea pig. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(9): 1677-1679

摘要

目的: 研究豚鼠镜片诱导型近视眼视网膜、脉络膜及巩膜中 RAR- β 的表达变化。

方法: 3~4 周龄花色豚鼠 50 只随机分成 3 组, 空白对照组 10 只, 离焦 I 组和离焦 II 组各 20 只。I 组和 II 组豚鼠左眼作为自身对照眼, 右眼戴 -10.00D 凹透镜, 分别戴镜 14, 28d 后除去镜片, 建立近视离焦模型。镜片诱导型近视模型建立后分别处死实验组和对照组豚鼠, 应用免疫组织化学、Western blot 和 RT-PCR 技术检测 RAR- β 的蛋白和 mRNA 表达变化。

结果: 在豚鼠视网膜、脉络膜、巩膜内均有 RAR- β 存在; RAR- β 蛋白及 mRNA 表达量在离焦组视网膜中明显增高 ($P < 0.05$), 而在脉络膜及巩膜中明显下降 ($P < 0.05$)。

结论: RAR- β 可能参与豚鼠镜片诱导型近视眼的发生发展。

关键词: 近视眼; 豚鼠; 视黄酸核受体- β

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.012

林惠玉, 李兵. 豚鼠镜片诱导型近视眼中 RAR- β 表达的变化. 国际眼科杂志 2010; 10(9): 1677-1679

0 引言

目前常用的近视动物模型主要有两类, 即形觉剥夺型近视 (form deprivation myopia, FDM) 和镜片诱导型近视 (lens induced myopia, LIM)^[1]。这两种近视动物模型都说明屈光状态的发育依赖视觉, 视觉环境异常可促使视网膜释放一些信使来影响眼球生长。其中, 视黄酸 (retinoic acid, RA)^[2,3] 和视黄酸受体 β (retinoic acid receptor- β , RAR- β)^[4,5] 是调节实验性近视眼发生发展的重要信息分子, 但作用机制尚不清楚。RAR- β 在哺乳动物 LIM 的作用报道较少。我们前期研究工作中已成功建立豚鼠离焦诱导型近视眼模型, 戴 -10.00D 诱导镜 14d 和 28d 分别诱导出 (-5.51 \pm 1.90)D 和 (-8.69 \pm 2.46)D 的相对近视, 随戴镜时间的延长近视程度加深。在本实验中我们将研究 RAR- β 在诱导眼中的表达变化, 探讨 RAR- β 的表达在哺乳动物镜片诱导性近视眼形成中的作用, 从而为实验性近视发病机制的研究提供一条思路。

1 材料和方法

1.1 材料 选用 3~4 周龄健康三色豚鼠 50 只, 雌雄不限, 体质量 180~220g, 由辽宁医学院实验动物中心提供。YZ24 带状光检影镜 (苏州六六视觉公司)、US2000 A 超仪 (日本 Nidek)、PCR 扩增仪 (英国 Techne)、RAR- β 兔多克隆抗体 (美国 Santa Cruz)、兔 Envision 试剂盒 (北京中杉金桥)、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (大连宝生物)。

1.2 方法 将 50 只豚鼠随机分成 3 组, 离焦 I 组 ($n = 20$, 右眼戴诱导镜, 左眼不戴作为对照, 诱导 14d); 离焦 II 组 ($n = 20$, 右眼戴诱导镜, 左眼不戴作为对照, 诱导 28d); 空白对照组 (10 只 20 眼, $n = 20$, 除检查外不做任何干预)。将 -10.00D 诱导镜粘贴在豚鼠右眼周围皮毛上, 作

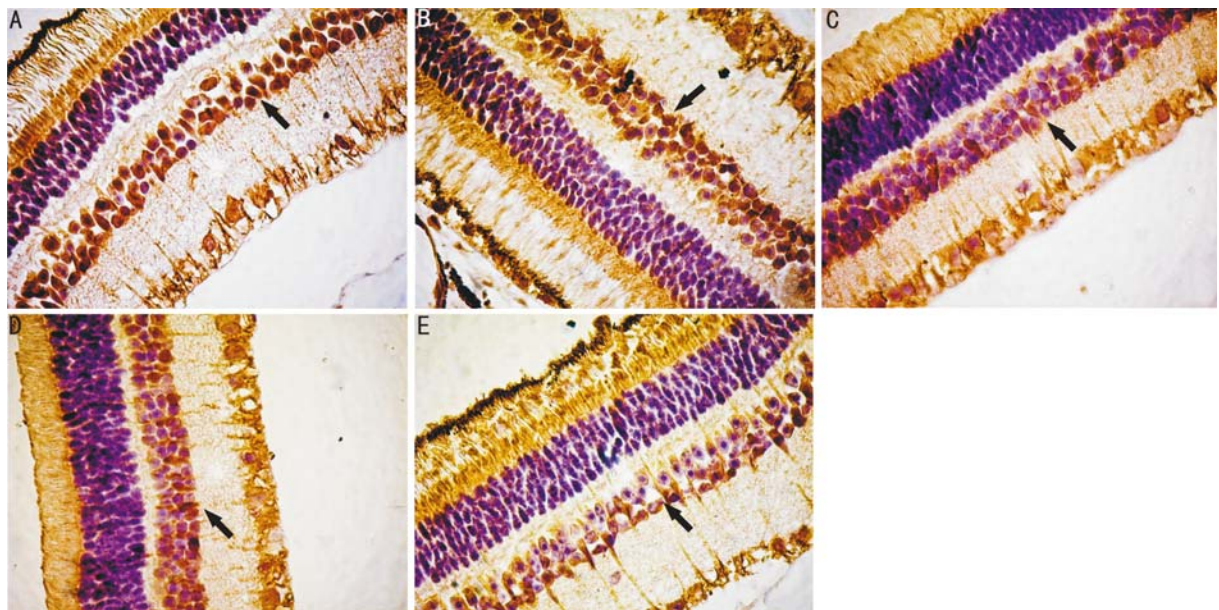


图1 豚鼠视网膜内核层 RAR-β 蛋白的表达 (Envision ×400) A: II组离焦眼强阳性(箭头);B: I组离焦眼;C:空白组;D: I组对照眼;E: II组对照眼。

为离焦实验眼。饲养温度维持在 20℃ ~ 25℃, 湿度 40% ~ 60%, 自然光照。白天隔 2h 观察豚鼠 1 次, 如镜片脏, 用棉签通过环形 kt 板镜框预留的小孔清洗镜片; 如镜片脱落则及时固定。采用单盲法设计, 所有检测人员均不知实验动物的具体分组和干预措施。

1.2.1 RAR-β 蛋白表达的检测 动物模型制作结束时, I, II 组各随机选择 5 只豚鼠, 空白对照组随机选择 3 只, 深度麻醉处死, 摘取眼球浸入 40g/L 多聚甲醛固定液中固定 24h, 组织脱水, 石蜡包埋, 5μm 连续切片, 切取眼球后极部组织, 常规脱蜡至水, 微波抗原修复, 染色步骤按 Envision 试剂盒内说明书进行, 一抗工作浓度为 1:50, 用已知阳性表达片为阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。应用 CIAS-1000 细胞图像分析系统软件进行图片分析, 每个实验组随机选取 3 张切片, 每张切片随机选取 5 个有阳性表达的视野, 对 RAR-β 免疫组织化学染色结果进行平均灰度值的半定量检测, 取其平均值。另 I, II 组各随机选择 6 只豚鼠, 空白对照组随机选择 3 只, 深度麻醉处死豚鼠, 迅速摘取眼球, 无菌操作, 冰台上用显微剪沿角巩膜缘剪开, 去除眼前段组织和玻璃体, 快速分离出视网膜、脉络膜及巩膜组织, 置于灭菌的 1.5mL 离心管中, 标号液氮速冻后移入 -80℃ 冰箱冻存。取出冻存的视网膜、脉络膜及巩膜组织, 加入细胞裂解液, 充分剪碎组织后, 匀浆。取蛋白样品 20μg, 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质。转膜, 封闭, 加抗体 (一抗和二抗浓度 1:1000), 洗膜, 显色。GeneTools 软件分析系统分析目的条带灰度值。

1.2.2 RAR-β mRNA 表达的检测 提取总 RNA: 取出冻存的各组视网膜、脉络膜及巩膜组织, Trizol 法提取总 RNA。RAR-β 和豚鼠 β-actin 引物如下: RAR-β 上游 5'-ACAC CACGAATTCCAGTGTCT-3', 下游 5'-AGGCAGATGGC ACTGAGAAG-3', 扩增片段长度 379bp; β-actin 上游 5'-G AGACGAAGCCCAGAGCA-3', 下游 5'-CGAAGTCCAGG GCAACAT-3', 扩增片段长度 507bp, 引物由上海生工生物公司合成。以提取的总 RNA 为模板反转录出 cDNA, 10μL 反应体系。PCR 扩增体系 20μL, 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 28 个反应循

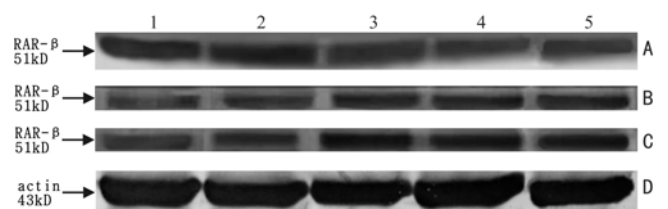


图2 RAR-β 蛋白电泳, 1: 离焦 II 组实验眼; 2: 离焦 I 组实验眼; 3: I 组自身对照眼; 4: II 组对照眼; 5: 空白对照组 A: 视网膜; B: 脉络膜; C: 巩膜; D: actin。

环, 72℃ 最后延伸 10min。扩增产物经 15g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶分析系统摄像, 经 GeneTools 软件分析图像并计算目的基因 mRNA 相对含量。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 for Windows 行统计学处理, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验前后组内差异比较行配对 *t* 检验, 组间差异行单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAR-β 蛋白的表达 由于石蜡切片中脉络膜、巩膜组织脱片, 免疫组化法只检测视网膜 RAR-β 蛋白的表达情况。视网膜视细胞、内核层、神经节细胞的胞核阳性表达 RAR-β 蛋白, 呈棕黄色或棕色颗粒, 其中以内核层表达最明显 (图 1)。I 组和 II 组离焦眼、对照眼、空白对照组测得的内核层 RAR-β 表达平均灰度值分别为 152.24 ± 4.93 , 145.19 ± 5.18 , 165.25 ± 5.32 , 166.45 ± 6.12 , 163.00 ± 4.95 (测得的平均灰度值愈大表明蛋白的表达量愈小)。结果显示, I 组和 II 组离焦眼内核层 RAR-β 蛋白表达量增高, 与对照眼及空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); II 组离焦眼内核层 RAR-β 蛋白的表达量高于 I 组 ($P < 0.05$)。另 Western Blot 法分析, 与对照眼及空白对照组相比, RAR-β 蛋白在 I 组和 II 组离焦眼视网膜表达增强 ($P < 0.05$); 而在离焦眼的脉络膜和巩膜的表达下调 ($P < 0.05$, 图 2)。I 组和 II 组离焦眼 RAR-β 蛋白表达也有差异, 在视网膜中 II 组比 I 组表达强 ($P < 0.05$); 在脉络膜和巩膜中, II 组比 I 组表达少 ($P < 0.05$)。

2.2 RAR-β mRNA 的表达 I 组和 II 组离焦视网膜 RAR-β mRNA 表达增强, 脉络膜及巩膜 RAR-β mRNA 表达减弱, 与对照眼和空白对照组相比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 I 组相比, II 组 RAR-β mRNA 在视网膜、脉络膜、巩膜中的变化更明显 ($P < 0.05$, 图 3)。

3 讨论

FDM 和 ILM 的发生机制存在根本差别。FDM 在视神经切断后仍能发生, 可为持续光照及羟多巴胺等药物所抑制, 因此与中枢关系较少, 是视网膜源的局部变化。LIM 则会被视神经切断所抑制, 其发生与中枢有关。人类很少出现形觉剥夺型近视, 镜片诱导型近视与人类近视眼原型比较相似, 因此我们采用镜片诱导法进行研究。视觉环境调控眼轴的发育, 视网膜通过释放一些信使来影响眼的生长, RA 作为一种信使调控实验性近视的发生发展。RA 不仅在胚胎早期眼和视网膜感光细胞的分化发育中起重要作用, 又能有效调控多种近视相关转录因子的基因表达。RA 对巩膜纤维层细胞外基质具有调节作用, RA 能明显抑制体外培养人成纤维细胞的生长^[6]。RA 的多种效能须通过其细胞核受体的介导才能发挥作用, 在视黄酸受体中, RAR-β 是由 RA 诱导产生并受 RA 自身调节, RAR-β 涉及 RA 信号的活性, 是 RA 信号转导的重要分子^[7], RAR-β 及其介导的信号传递是 RA 作用的重要环节。敲除 RAR-β 基因的鼠实验眼显著变小^[8]。许军等^[2,5]发现, 小鸡后极部巩膜中有 RAR-β 的表达。形觉剥夺 2wk 后巩膜 RAR-β mRNA 的表达增高, 且鸡巩膜细胞培养发现 RA 可诱导巩膜成纤维细胞和软骨细胞 RAR-β 的表达, RA 对成纤维细胞的增生具有抑制作用。形觉剥夺鸡眼后极部巩膜纤维层中 RAR-β mRNA 水平与基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 呈正相关, 与组织金属蛋白酶抑制剂 2 (TIMP-2) 呈负相关, RAR-β 参与了巩膜纤维层细胞外基质的降解过程^[5]。在哺乳动物 FDM 的研究中, 吕勇等^[4]也发现形觉剥夺使豚鼠后极部视网膜、脉络膜和巩膜的 RAR-β mRNA 表达增强, 视网膜 RAR-β 的变化可能早于屈光度和眼轴的变化, 间接提示 RAR-β 的变化并非源于眼球生长的变化, RAR-β 可能参与豚鼠 FDM 的形成, 其变化受 RA 变化的诱导。

我们发现, 镜片离焦诱导近视眼中 RAR-β 含量发生改变, 且 II 组离焦眼组织 RAR-β 表达变化较 I 组明显。我们前期实验对各组豚鼠戴镜前后眼屈光度进行检验验光, II 组离焦眼近视程度比 I 组重, RAR-β 的变化方向与近视程度发展一致, 提示 RAR-β 可能参与了离焦型近视眼的形成和发展, RAR-β 是离焦型近视发生发展的信号因子。我们的研究视网膜 RAR-β 蛋白和 mRNA 表达增强, 这与国内外学者的研究结果一致。但是脉络膜和巩膜的 RAR-β 表达降低, 这与其他研究者的报告相反。我们前期结果显示, 视网膜、脉络膜及巩膜中 RA 的水平均升高。RA 含量随视觉环境的改变而发生变化, 在视网膜上 RAR-β 的表达方向与 RA 的变化一致, 进一步提示其表达受 RA 变化的诱导。而在脉络膜和巩膜中, RAR-β 的表达方向却和 RA 的变化方向相反, 提示 RA 及 RAR-β 在离焦型近视眼中的作用机制与形觉剥夺型近视眼不同, 可能与中枢调节有关; 也提示 RA 不仅是通过与 RAR-β 结合调控近视发生发展, 可能还有某种目前尚不可知的途径。

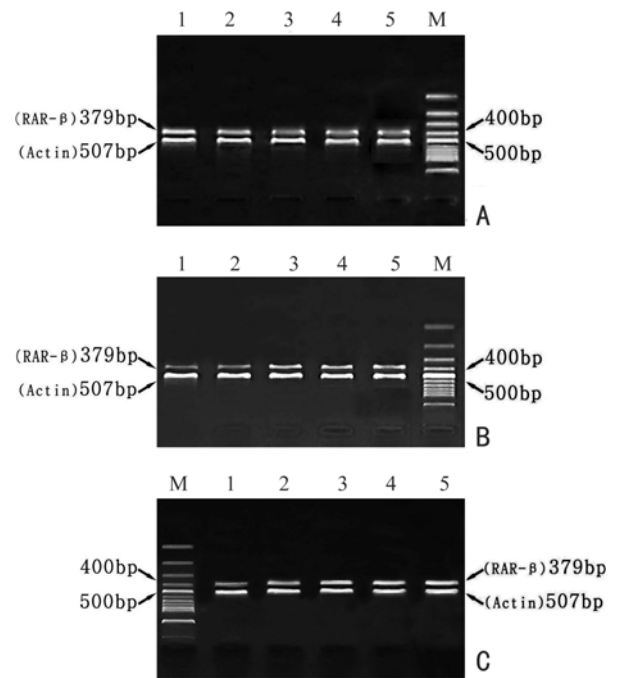


图 3 RAR-β mRNA 的表达, M: Marker; 1: 离焦 II 组实验眼; 2: 离焦 I 组实验眼; 3: I 组自身对照眼; 4: II 组自身对照眼; 5: 空白对照组 A: 视网膜; B: 脉络膜; C: 巩膜。

RAR-β 的表达变化在近视中确切机制尚需要进一步的实验研究。在胚眼发育过程中, 视网膜、脉络膜、巩膜存在一连串环环相扣的联系, 所以视觉信号的传递及其引发的一系列生化变化都不是孤立的。一个细胞表面有几十甚至上千种不同的受体同时与细胞外基质中的不同信号分子起作用, 这些信号分子共同作用的影响比任何单个信号所起的作用都强得多, 所以细胞必须对多种信号进行协调综合。不同信号分子间的不同组合, 会使细胞产生不同的综合性反应, 因此今后研究 RA 及 RAR-β 在近视中的作用机制, 应该将其与其他近视相关信号因子相结合, 探讨它们之间的联系, 以弄清楚近视的发生机制, 为近视的预防和治疗带来希望。

参考文献

- 1 吴君舒, 钟兴武, 聂昊辉, 等. 光学离焦和形觉剥夺对幼恒河猴正视觉过程的影响. 眼科学报 2004; 20(2): 118-122
- 2 许军, 赵江月, 王洪学, 等. 形觉剥夺下雏鸡视网膜、脉络膜和巩膜中全反视黄酸含量的变化. 国际眼科杂志 2007; 7(3): 677-681
- 3 Troilo D, Nickla DL, Mertz JR, et al. Change in the synthesis rates of ocular retinoic acid and scleral glycosaminoglycan during experimentally altered eye growth in marmosets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(5): 1768-1777
- 4 吕勇, 张金嵩, 闫磐石, 等. RAR-β 在豚鼠形觉剥夺性近视眼中的表达. 眼科研究 2006; 24(4): 411-414
- 5 许军, 陆博, 马立威, 等. 形觉剥夺下雏鸡后极部巩膜中 MMP-2 / TIMP-2 及 RARβ 表达变化. 中国实用眼科杂志 2010; 28(1): 84-89
- 6 崔冬梅, 高岩, 任亚林, 等. 全反式视黄酸对体外培养人巩膜成纤维细胞的抑制作用. 国际眼科杂志 2008; 8(12): 2397-2400
- 7 Liao WL, Wang HF, Tsai HC, et al. Retinoid signaling competence and RARbeta-mediated gene regulation in the developing mammalian telencephalon. *Dev Dyn* 2005; 232(4): 887-900
- 8 Zhou G, Strom RC, Giguere V, et al. Modulation of retinal cell populations and eye size in retinoic receptor knockout mice. *Mol Vis* 2001; 7: 253-260