

## · 实验研究 ·

# 豚鼠进展性近视眼巩膜中 Smad3 和 I 型胶原的动态表达变化

姜波 吴章友 朱子诚 胡威 展欣

230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院眼科

通信作者:吴章友,Email:wzy2360@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.003

**【摘要】** 背景 巩膜重塑过程中导致眼轴的伸长是轴性近视进展的主要病理机制之一。研究证实转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 参与巩膜重塑过程,而 Smad3 是 TGF- $\beta_1$  的下游信号转录基因之一,探讨其在近视眼巩膜重塑过程中的作用对于近视发病机制和防治研究具有重要意义。目的 研究近视眼巩膜重塑过程中 Smad3 和 I 型胶原的表达情况,探讨 TGF- $\beta_1$ -Smad3-Collagen I 信号途径在近视眼巩膜胶原重塑中的作用。

**方法** 将出生后 7 d 的豚鼠 75 只任意分为空白对照组(25 只)和形觉剥夺性近视(FDM)组(50 只)。FDM 组豚鼠采用半透明乳胶遮盖左眼的方法制备单眼 FDM 模型,右侧未遮盖眼作为自身对照。FDM 组分别遮盖 2、4、6 周,另一组动物遮盖 4 周后去遮盖 1 周,分别于遮盖前及上述时间点采用检影法测量各组豚鼠双眼屈光度,采用 A 型超声手动模式测量豚鼠眼轴长度。于上述时间点分别处死 5 只豚鼠并制备巩膜组织切片,分别采用免疫组织化学法及逆转录 PCR 法检测各组豚鼠巩膜组织中 Smad3 和 I 型胶原蛋白及其 mRNA 的相对表达量。**结果** 遮盖前空白对照组与 FDM 组豚鼠屈光度均为远视状态,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),空白对照组豚鼠远视屈光度逐渐下降,而 FDM 组豚鼠在遮盖前,遮盖 2、4、6 周及遮盖 4 周后去遮盖 1 周屈光度从(+2.09±0.31)D 逐渐改变为(-1.23±0.69)、(-4.17±0.59)、(-7.07±0.56)和(-4.30±0.58)D,眼轴长度从(5.93±0.39)mm 逐渐改变为(6.62±0.36)、(7.30±0.34)、(7.99±0.32)和(7.21±0.36)mm,与空白对照组比较,遮盖后各时间点 FDM 组豚鼠近视度明显升高,眼轴测量值明显增加,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。与自身对照组比较,遮盖 2 周、4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时 FDM 组近视度均明显升高,眼轴明显增长,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。遮盖前空白对照组与 FDM 组豚鼠后极部巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白及其 mRNA 相对表达量的差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ ),FDM 组豚鼠遮盖 2、4、6 周及遮盖 4 周后去遮盖 1 周巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白及其 mRNA 相对表达量均明显低于空白对照组和自身对照组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。豚鼠巩膜组织中 I 型胶原蛋白与 Smad3 蛋白及其 mRNA 相对表达量均呈明显正相关(蛋白: $r=0.993, P<0.05$ ; mRNA: $r=0.954, P<0.05$ )。**结论** FDM 豚鼠模型眼随着遮盖时间的延长近视度明显增加,眼轴明显增长,豚鼠巩膜组织中 Smad3 和 I 型胶原的表达相应减弱,且 Smad3 和 I 型胶原表达量的变化趋势高度一致。Smad3 和 I 型胶原可能通过 TGF- $\beta_1$ -Smad3-Collagen I 信号途径参与近视眼巩膜重塑过程的调控。

**【关键词】** 形觉剥夺;近视;巩膜/代谢;疾病进展;转化生长因子  $\beta_1$ -Smad3-I 型胶原信号通路;动物模型;豚鼠

**基金项目:** 安徽省自然科学基金项目(1508085MH188);安徽省卫生厅科学基金项目(13zc040、13zc046)

## Dynamic expression changes of Smad3 and type I collagen in sclera of progressive myopia in guinea pigs

Jiang Bo, Wu Zhangyou, Zhu Zicheng, Hu Wei, Zhan Xin

Department of Ophthalmology, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China

Corresponding author: Wu Zhangyou, Email: wzy2360@126.com

**【Abstract】** **Background** Sclera remodeling process in axial elongation is one of the main pathological mechanisms of axial myopia progression. Studies confirmed that transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) participates in the sclera remodeling process, and Smad3 is one of TGF- $\beta_1$  downstream signal gene transcriptive factors, so to explore its role in sclera remodeling process of myopic eyes is of great significance for pathogenesis and prevention research of myopia. **Objective** This study was to investigate the expressions of type I collagen and Smad3, a TGF- $\beta_1$  downstream target, in sclera of form deprivation myopic (FDM) eyes and explore the impact of TGF- $\beta_1$ -Smad3-type I collagen signaling pathway on collagen remodeling in myopic sclera. **Methods** Seventy-five 1-week-old guinea pigs were randomly divided into normal control group (25 guinea pigs) and FDM group (50 guinea pigs). Monocular FDM was induced by occluding the left eyes of guinea pigs in FDM group with translucent latex balloons for 2, 4, 6 weeks,

respectively, and consecutive occluding for 4 weeks followed by uncovering for 1 week (4/-1 weeks). The refractive power was detected by retinoscopy and axial length was measured with A-type ultrasound. Immunohistochemistry and reverse transcription-PCR were employed to detect the dynamic expressions of type I collagen and Smad3 protein and mRNA in the sclera of guinea pigs with emmetropia and experimental myopia, and the relationship between collagen I and Smad3 levels was analyzed. **Results** The refraction was hypermetropic in both normal control group and FDM group before occluding of eyes ( $P > 0.05$ ), and the hypermetropic power was gradually reduced over time in the normal control group. In the FDM group, the refractive power was gradually changed from  $(+2.09 \pm 0.31)$  D before occluding to  $(-1.23 \pm 0.69)$ ,  $(-4.17 \pm 0.59)$ ,  $(-7.07 \pm 0.56)$  and  $(-4.30 \pm 0.58)$  D, and the axial length was increased from  $(5.93 \pm 0.39)$  mm to  $(6.62 \pm 0.36)$ ,  $(7.30 \pm 0.34)$ ,  $(7.99 \pm 0.32)$ , and  $(7.21 \pm 0.36)$  mm at weeks 2, 4, 6, and 4/-1 after occluding, respectively, indicating significant differences in refractive power and axial length over time in the FDM group from normal control group and self-control group (all at  $P < 0.05$ ). The expressions of Smad3 and type I collagen protein and mRNA in the sclera of the FDM group was significantly lower than those of the control group and self-control group in various time points (all at  $P < 0.05$ ). The positive correlation were found in the expression of Smad3 on the myopic sclera with that of type I collagen in both protein and mRNA levels (protein:  $r = 0.993$ ,  $P < 0.05$ ; mRNA:  $r = 0.954$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The myopic power and ocular axis increase dependent upon occluding time, and the expressions of Smad3 and type I collagen in the sclera are correspondingly weakened in FDM eyes. A consistent expression trend is found between Smad3 and type I collagen, suggesting Smad3 and type I collagen participate in the regulation of sclera remodeling in myopia by TGF- $\beta_1$ -Smad3-Collagen I signaling pathway.

**[Key words]** Form-deprivation; Myopia; Sclera/metabolism; Disease progression; TGF- $\beta_1$ -Smad3-Collagen I signaling pathway; Disease models, animal; Guinea pigs

**Fund program:** Natural Science Foundation of Anhui Province (1508085MH188); Science Foundation of Anhui Provincial Health Bureau (13zc040, 13zc046)

近视的发病率在全球屈光性疾病中居首位, 统计数据表明亚洲及东南亚地区大学生中近视患病率为 80% ~ 90%, 其中约 20% 是高度近视<sup>[1-2]</sup>。中国近视发病率仅次于日本, 占世界近视总人数的 33%<sup>[3]</sup>。因此, 对近视进行病因学研究, 探讨其发病机制, 从病因学的水平上防治近视是眼科工作者亟待解决的问题。目前认为近视的发病是遗传因素与环境因素共同作用的结果<sup>[4]</sup>, 而近视眼巩膜重塑导致的眼轴伸长是高度近视进展的主要病理机制。随着分子生物学研究的不断发展, 已发现许多生物活性分子在近视眼后极部巩膜重塑中发挥重要作用。研究证实转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 的 3 种亚型 (TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$  和 TGF- $\beta_3$ ) 在近视眼巩膜重塑中均发挥重要作用, 其中 TGF- $\beta_1$  是目前研究的热点<sup>[5-6]</sup>。已有研究证实 Smad3 是 TGF- $\beta_1$  下游的信号转录基因, 且与 I 型胶原的合成及降解存在一定的关系<sup>[7-8]</sup>, 其在近视进展过程中与 TGF- $\beta_1$  是否存在相互作用尚不清楚。为了进一步探讨近视眼巩膜中 Smad3 的表达及其与 I 型胶原合成和降解的关系, 本研究建立豚鼠形觉剥夺性近视 (form deprivation myopia, FDM) 模型, 研究豚鼠 FDM 形成的不同时段巩膜内 Smad3 表达的动态变化及其与 I 型胶原基因表达变化的关系, 探讨 Smad3 在近视眼进展过程中的可能作用和机制, 为进一步开展近视信号传导通路的研究提供实验依据和

新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 取出生后 7 d 健康有色豚鼠 75 只, 体质量为 100 ~ 140 g, 在安徽医科大学附属省立医院实验动物中心室饲养, 饲养环境为 12 h 自然照明/12 h 黑暗环境, 以每天上午 8:00 为起始时间, 自由饮水, 并给予富含维生素的饲料及新鲜蔬菜等, 室内温度为 22 °C。实验程序依照《实验动物管理与使用指南》(2016 年 5 月出版)。本研究方案经安徽医科大学实验动物伦理委员会审查批准 (伦审号: LLSC20150115)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 抗鼠 Smad3 抗体 (1:150) (AD082529, 北京博奥森生物技术有限公司); 抗鼠 I 型胶原抗体 (1:150) (AA56131, 上海拜力生物科技有限公司); 通用型二抗试剂盒 (PV-6000) (K155922D, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。A 型超声 (AL-100, 日本 TOMEY 公司); YZ24 带状光检影镜 (苏州六六视觉科技股份有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 FDM 模型的建立和分组** 将 75 只豚鼠任意分为空白对照组 (共 25 只, 随机分为 5 个组, 每组 5 只) 和 FDM 模型组 (50 只, 随机分为 5 个组, 每组 10 只)。采用 6 号半透明乳胶气球套住 FDM 组豚鼠头

部,剪去右眼、鼻唇部及耳部部位的气球以暴露这些部位,左眼用气球遮盖 2、4、6 周及遮盖 4 周后去遮盖 1 周以制备单眼 FDM 模型,用订书机将气球头套于颈部对折固定,防止眼罩滑落及旋转。遮盖眼为 FDM 组,对侧未遮盖眼为自身对照组。空白对照组不做任何处理。

**1.2.2 各组豚鼠屈光度及眼轴长度检测** 参照文献[9-10]的方法分别于遮盖前,遮盖 2、4、6 周及遮盖 4 周后去遮盖 1 周各取 5 只豚鼠,采用复方托吡卡胺滴眼液点眼充分扩瞳,在暗室内采用带状光检影法验光,精确到 0.01 D;采用质量分数 0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉,采用 A 型超声以手动模式测量双眼眼轴长度(即角膜顶点到眼球后极部玻璃体视网膜界面的距离),连续测量 3 次,取其平均值,精确到 0.01 mm,均由经验丰富的专人测量并记录。

**1.2.3 各组豚鼠眼巩膜组织的组织病理学观察** 于遮盖前,遮盖 2、4、6 周及遮盖 4 周后去遮盖 1 周采用质量分数 1% 戊巴比妥钠过量麻醉法处死空白对照组各 5 只豚鼠及 FDM 组各 10 只豚鼠,摘取双眼眼球置于冰块上,去除眼前节组织。切取以视神经为中心、直径 6 mm 范围内的巩膜组织,剔除视神经组织,置于质量分数 40% 多聚甲醛溶液内 4 ℃ 保存 30 min,然后脱水,石蜡包埋,4 μm 厚切片,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察巩膜组织着色情况。

**1.2.4 免疫组织化学法检测豚鼠巩膜中 Smad3 和 I 型胶原蛋白的表达** 取各组豚鼠眼石蜡切片,体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 5 min 以阻断内源性过氧化物酶,PBS 或 TBS 冲洗;滴加相应一抗,37 ℃ 孵育 60 min,PBS 漂洗 3 次,每次 2 min;滴加相应二抗,37 ℃ 孵育 20 min,PBS 漂洗 3 次,每次 2 min,DAB 显色。阴性对照以 PBS 替代一抗,评价者遵循双盲原则,用 Image Pro Plus 6.0 软件任意选取各组后极部巩膜 10 个部位进行图像扫描,以细胞质中出现棕黄色染色为阳性反应,用平均吸光度(A)值表示 Smad3 和 I 型胶原蛋白的相对表达量。

**1.2.5 逆转录 PCR 法检测豚鼠巩膜中 Smad3 和 I 型胶原 mRNA 的表达** 各组豚鼠处死及组织获取方法同 1.2.4。各时间点各组均取 5 只眼球巩膜组织于液氮下研磨。根据制造商说明提取巩膜组织,提取总 RNA,置于总 RNA PCR 管(无 RNase 酶)中,PCR 仪上加热及冰浴,逆转录为 cDNA,于 -80 ℃ 保存备用。引物的核苷酸序列见表 1,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,模板的量为 0.5 μl,引物的量为 1.0 μl。扩增条件为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,72 ℃ 退火及延

伸 40 s,共 35 个循环。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,分别吸取 PCR 扩增产物 3 μl 并加入 6 倍加样缓冲液 1 μl,混匀,分别将 3 μl 混合液和 Marker 加入电泳孔中,利用凝胶成像系统观察并拍照,计算各目的基因的灰度值。实验重复 3 次,取其平均值。以 β-actin 作为内参照,计算各目的基因的相对表达量。目的基因相对表达量 = 目的基因条带灰度值/β-actin 基因条带灰度值。

表 1 各目的基因引物序列及产物长度

| 目的基因    | 引物序列(5'-3')            | 产物长度(bp) |
|---------|------------------------|----------|
| β-actin | F:GCTCTATCCTGGCCTCACTC | 400      |
|         | R:GGGTGAGGACTTCCTCTAA  |          |
| I 型胶原   | F:ACAAGCGATTACACACCCAA | 239      |
|         | R:TTAGTTTCTGCCTCTGCCT  |          |
| Smad3   | F:CCCAGCACACAGTAACTTGG | 486      |
|         | R:ATGCGTGTCACTGGTAGAC  |          |

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用均衡分组协方差研究设计,FDM 组与空白对照组豚鼠左眼遮盖不同时间后眼球屈光度、眼轴长度、I 型胶原和 Smad3 蛋白及其 mRNA 相对表达量的总体比较采用两因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。FDM 组遮盖眼与自身对照眼间眼球屈光度、眼轴长度及巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白及其 mRNA 相对表达量的比较均采用配对 *t* 检验。FMD 组豚鼠巩膜组织中 Smad3 与 I 型胶原蛋白及其 mRNA 表达量的关系评估采用 Pearson 线性相关分析,并对相关系数进行假设检验。采用双侧检验法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组豚鼠不同时间点眼球屈光度及眼轴长度比较** 豚鼠出生时双眼呈远视状态,眼轴较短,遮盖 2、4、6 周及遮盖 4 周后去遮盖 1 周 FDM 组豚鼠屈光度均为近视状态,而空白对照组豚鼠远视屈光度逐渐下降。FDM 组和空白对照组不同时间点屈光度值和眼轴长度总体比较差异均有统计学意义(屈光度: $F_{\text{分组}} = 285.22, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 843.59, P = 0.00$ 。眼轴长度: $F_{\text{分组}} = 65.55, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 394.10, P = 0.00$ ),与空白对照组豚鼠眼比较,FMD 组豚鼠遮盖 2 周、遮盖 4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时左眼近视屈光度值均明显增加,眼轴明显增长,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ) (表 2,3)。与 FDM 组自身对照眼比

较,遮盖前遮盖眼屈光度值和眼轴长度无明显改变,差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),遮盖 2 周、遮盖 4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时遮盖眼近视度数均明显增加,眼轴明显增长,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(表 4,5)。

**表 2 FDM 组与空白对照组在造模前后不同时间点屈光度比较( $\bar{x}\pm s, D$ )**

| 组别    | 样本量 | 不同时间点屈光度值  |                         |                         |                         |                         |
|-------|-----|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|       |     | 遮盖前        | 遮盖 2 周                  | 遮盖 4 周                  | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周          | 遮盖 6 周                  |
| 空白对照组 | 5   | +2.19±0.29 | +1.39±0.26              | +0.62±0.24              | +0.56±0.40              | -0.14±0.25              |
| FDM 组 | 10  | +2.09±0.31 | -1.23±0.69 <sup>a</sup> | -4.17±0.59 <sup>a</sup> | -4.30±0.58 <sup>a</sup> | -7.07±0.56 <sup>a</sup> |

注: $F_{\text{分组}}=285.22, P=0.00; F_{\text{时间}}=843.59, P=0.00$ . 与各自时间点空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) FDM:形觉剥夺性近视

**表 3 空白对照组与 FDM 组不同时间点眼轴长度比较( $\bar{x}\pm s, mm$ )**

| 组别    | 样本量 | 不同时间点眼轴长度 |                        |                        |                        |                        |
|-------|-----|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|       |     | 遮盖前       | 遮盖 2 周                 | 遮盖 4 周                 | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周         | 遮盖 6 周                 |
| 空白对照组 | 5   | 5.93±0.34 | 6.22±0.32              | 6.50±0.31              | 6.49±0.31              | 6.80±0.28              |
| FDM 组 | 10  | 5.93±0.39 | 6.62±0.36 <sup>a</sup> | 7.30±0.34 <sup>a</sup> | 7.21±0.36 <sup>a</sup> | 7.99±0.32 <sup>a</sup> |

注: $F_{\text{分组}}=65.55, P=0.00; F_{\text{时间}}=394.10, P=0.00$ . 与相应时间点空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) FDM:形觉剥夺性近视

**表 4 自身对照组与 FDM 组不同时间点屈光度值比较( $\bar{x}\pm s, D$ )**

| 组别    | 不同时间点屈光度值         |                      |                      |                              |                      |
|-------|-------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
|       | 遮盖前<br>( $n=10$ ) | 遮盖 2 周<br>( $n=10$ ) | 遮盖 4 周<br>( $n=10$ ) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>( $n=10$ ) | 遮盖 6 周<br>( $n=10$ ) |
| 自身对照组 | +2.11±0.32        | +1.28±0.29           | +0.48±0.27           | +0.39±0.29                   | -0.33±0.26           |
| FDM 组 | +2.09±0.30        | -1.23±0.69           | -4.17±0.59           | -4.30±0.58                   | -7.07±0.56           |
| $t$ 值 | 0.19              | 12.38                | 29.22                | 29.00                        | 50.33                |
| $P$ 值 | >0.05             | 0.00                 | 0.00                 | 0.00                         | 0.00                 |

注:FDM:形觉剥夺性近视(配对  $t$  检验)

**表 5 自身对照组与 FDM 组不同时间点眼轴长度比较( $\bar{x}\pm s, mm$ )**

| 组别    | 不同时间点眼轴长度         |                      |                      |                              |                      |
|-------|-------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
|       | 遮盖前<br>( $n=10$ ) | 遮盖 2 周<br>( $n=10$ ) | 遮盖 4 周<br>( $n=10$ ) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>( $n=10$ ) | 遮盖 6 周<br>( $n=10$ ) |
| 自身对照组 | 5.87±0.36         | 6.24±0.34            | 6.58±0.31            | 6.60±0.34                    | 6.97±0.35            |
| FDM 组 | 5.92±0.39         | 6.62±0.36            | 7.30±0.34            | 7.21±0.36                    | 7.99±0.32            |
| $t$ 值 | -0.32             | -2.47                | -5.94                | -5.09                        | -7.54                |
| $P$ 值 | >0.05             | 0.03                 | 0.00                 | 0.00                         | 0.00                 |

注:FDM:形觉剥夺性近视(配对  $t$  检验)

## 2.2 各组豚鼠不同时间点巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白表达变化

FDM 组、自身对照组及空白对照组豚鼠巩膜成纤维

组织中均可见 I 型胶原和 Smad3 蛋白分子表达,均呈棕色染色;随着 FDM 时间的延长,巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白分子表达强度均减弱(图 1,2)。各组豚鼠在不同时间点巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白的相对表达量总体比较,差异均有统计学意义(I 型胶原: $F_{\text{时间}}=153.73, P=0.00$ ; Smad3: $F_{\text{时间}}=87.87, P=0.00$ );空白对照组与 FDM 组中 I 型胶原和 Smad3 蛋白表达量的总体比较,差异均有统计学意义(I 型胶原: $F_{\text{分组}}=85.91, P=0.00$ ; Smad3: $F_{\text{分组}}=153.73, P=0.00$ ),其中遮盖 2 周、遮盖 4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时 FDM 组豚鼠巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 蛋白的表达量显著低于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(表 6,7)。遮盖前 FDM 组 I 型胶原和 Smad3 蛋白的表达与自身对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),遮盖 2 周、遮盖 4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时 FDM 组 I 型胶原和 Smad3 蛋白的表达量均明显低于自身对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(表 8,9)。

**表 6 空白对照组与 FDM 组 I 型胶原蛋白相对表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 I 型胶原蛋白相对表达量 |                          |                          |                             |                          |
|-------|--------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|       | 遮盖前<br>( $n=5$ )   | 遮盖 2 周<br>( $n=5$ )      | 遮盖 4 周<br>( $n=5$ )      | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>( $n=5$ ) | 遮盖 6 周<br>( $n=5$ )      |
| 空白对照组 | 0.945±0.011        | 0.933±0.025              | 0.911±0.011              | 0.905±0.040                 | 0.904±0.018              |
| FDM 组 | 0.928±0.016        | 0.743±0.012 <sup>a</sup> | 0.552±0.014 <sup>a</sup> | 0.533±0.011 <sup>a</sup>    | 0.402±0.019 <sup>a</sup> |

注: $F_{\text{分组}}=85.91, P=0.00; F_{\text{时间}}=153.73, P=0.00$ . 与各自时间点空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) FDM:形觉剥夺性近视

**表 7 空白对照组与 FDM 组 Smad3 蛋白的相对表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 Smad3 蛋白相对表达量 |                          |                          |                             |                          |
|-------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|       | 遮盖前<br>( $n=5$ )    | 遮盖 2 周<br>( $n=5$ )      | 遮盖 4 周<br>( $n=5$ )      | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>( $n=5$ ) | 遮盖 6 周<br>( $n=5$ )      |
| 空白对照组 | 0.801±0.023         | 0.795±0.030              | 0.781±0.015              | 0.777±0.019                 | 0.769±0.013              |
| FDM 组 | 0.797±0.038         | 0.543±0.010 <sup>a</sup> | 0.378±0.010 <sup>a</sup> | 0.369±0.014 <sup>a</sup>    | 0.350±0.018 <sup>a</sup> |

注: $F_{\text{分组}}=36.26, P=0.00; F_{\text{时间}}=87.87, P=0.00$ . 与各自时间点空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) FDM:形觉剥夺性近视

**表 8 自身对照组与 FDM 组不同时间点 I 型胶原蛋白相对表达量比较( $\bar{x}\pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 I 型胶原蛋白相对表达量 |                     |                     |                             |                     |
|-------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
|       | 遮盖前<br>( $n=5$ )   | 遮盖 2 周<br>( $n=5$ ) | 遮盖 4 周<br>( $n=5$ ) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>( $n=5$ ) | 遮盖 6 周<br>( $n=5$ ) |
| 自身对照组 | 0.972±0.016        | 0.922±0.023         | 0.909±0.011         | 0.899±0.017                 | 0.893±0.015         |
| FDM 组 | 0.928±0.016        | 0.743±0.012         | 0.552±0.014         | 0.533±0.011                 | 0.402±0.019         |
| $t$ 值 | 3.85               | 6.57                | 15.57               | 13.21                       | 16.56               |
| $P$ 值 | >0.05              | 0.00                | 0.00                | 0.00                        | 0.00                |

注:FDM:形觉剥夺性近视(配对  $t$  检验)

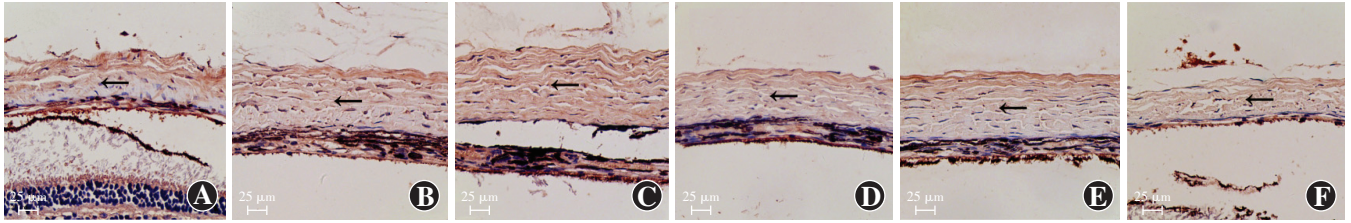


图 1 各组豚鼠后极部巩膜中 I 型胶原的表达及分布 (DAB ×400, 标尺 = 25 μm) A: 空白对照组可见后极部巩膜中有 I 型胶原的表达, 呈棕色染色 (箭头) B: 自身对照组后极部巩膜中有 I 型胶原的表达, 呈棕色染色 (箭头) C: FDM 组遮盖 2 周时后极部巩膜中 I 型胶原的表达较空白对照组和自身对照组减弱 (箭头) D: FDM 组遮盖 4 周时后极部巩膜中 I 型胶原的表达减少 (箭头) E: FDM 组遮盖 4 周后去遮盖 1 周豚鼠后极部巩膜中 I 型胶原表达量减少 (箭头) F: FDM 组遮盖 6 周时豚鼠后极部巩膜中 I 型胶原表达量减少 (箭头)

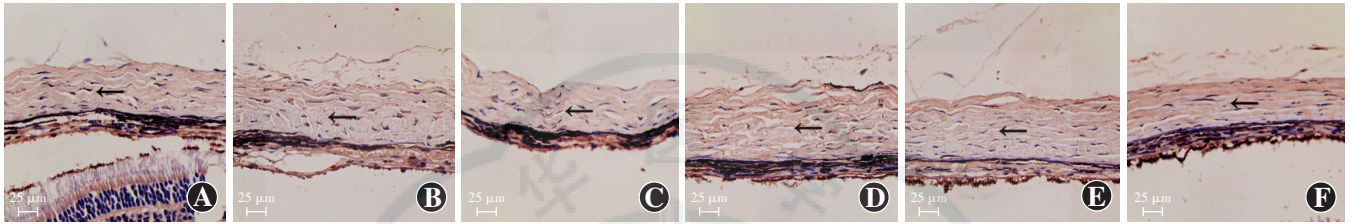


图 2 各组豚鼠后极部巩膜中 Smad3 的表达分布 (DAB ×400, 标尺 = 25 μm) A: 空白对照组豚鼠后极部巩膜中为 Smad3 阳性表达, 呈棕色表达 (箭头) B: 自身对照组豚鼠后极部巩膜中为 Smad3 阳性表达, 呈棕色表达 (箭头) C: FDM 组遮盖 2 周时可见豚鼠后极部巩膜中 Smad3 阳性表达, 表达强度较空白对照组和自身对照组减弱 (箭头) D: FDM 组遮盖 4 周可见豚鼠后极部巩膜中 Smad3 阳性表达强度减弱 (箭头) E: FDM 组遮盖 4 周后去遮盖 1 周可见豚鼠后极部巩膜中 Smad3 阳性表达减弱 (箭头) F: FDM 组遮盖 6 周时豚鼠后极部巩膜中 Smad3 阳性表达强度减弱 (箭头)

表 9 自身对照组与 FDM 组不同时间点 Smad3 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 不同时间点 Smad3 蛋白相对表达量 |              |              |                      |              |
|-------|---------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|
|       | 遮盖前 (n=5)           | 遮盖 2 周 (n=5) | 遮盖 4 周 (n=5) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周 (n=5) | 遮盖 6 周 (n=5) |
| 自身对照组 | 0.789±0.041         | 0.773±0.016  | 0.765±0.043  | 0.759±0.014          | 0.755±0.012  |
| FDM 组 | 0.797±0.038         | 0.543±0.010  | 0.378±0.010  | 0.369±0.014          | 0.350±0.018  |
| t 值   | 1.79                | 4.16         | 6.75         | 6.38                 | 5.81         |
| P 值   | >0.05               | 0.01         | 0.03         | 0.00                 | 0.04         |

注: FDM: 形觉剥夺性近视 (配对 t 检验)

### 2.3 各组豚鼠不同时间点后极部巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 mRNA 的表达变化

FDM 组、自身对照组及空白对照组豚鼠的后极部巩膜组织中均有 I 型胶原和 Smad3 mRNA 的阳性表达, 呈棕色染色, FDM 组随着造模时间的延长, 豚鼠后极部巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 mRNA 的表达逐渐减弱 (图 3, 4)。各组豚鼠在造模前后不同时间点后极部巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 mRNA 的相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (I 型胶原:  $F_{\text{分组}} = 726.00, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 1399.95, P = 0.00$ 。Smad3:  $F_{\text{分组}} = 682.18, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 1364.20, P = 0.00$ ), FDM 组遮盖 2 周、遮盖 4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时后极部巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 mRNA 相对表达量均低于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 10, 11)。FDM 组遮盖前豚鼠后极部巩膜组织中 I 型胶原和 Smad3 mRNA 的相对表

达量与自身对照组接近, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 遮盖 2 周、遮盖 4 周、遮盖 4 周后去遮盖 1 周及遮盖 6 周时 FDM 组 I 型胶原和 Smad3 mRNA 的相对表达量均明显低于自身对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 12, 13)。

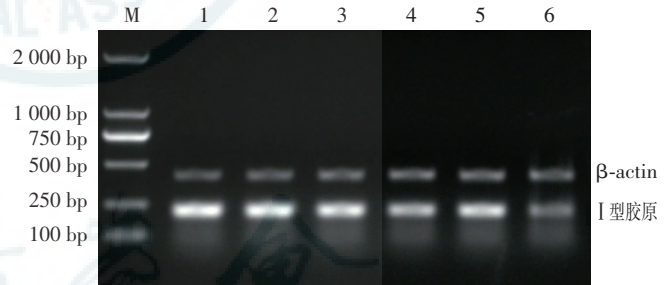


图 3 各组豚鼠巩膜中 I 型胶原 mRNA 表达强度变化电泳图 M: 标准蛋白相对分子质量 1: 空白对照组 2: 遮盖前 3: 遮盖 2 周 4: 遮盖 4 周 5: 遮盖 4 周后去遮盖 1 周 6: 遮盖 6 周

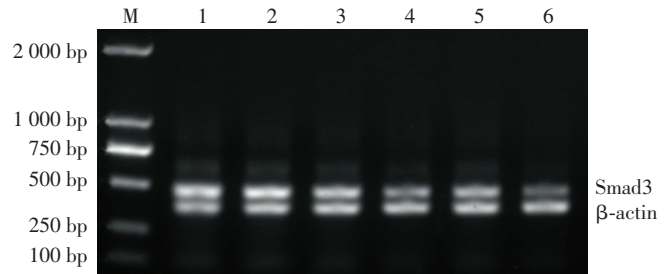


图 4 各组豚鼠巩膜中 Smad3 mRNA 表达强度变化电泳图 M: 标准蛋白相对分子质量 1: 空白对照组 2: 遮盖前 3: 遮盖 2 周 4: 遮盖 4 周 5: 遮盖 4 周后去遮盖 1 周 6: 遮盖 6 周

**表 10 空白对照组与 FDM 组不同时间点 I 型胶原 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 I 型胶原 mRNA 相对表达量 |                 |                 |                         |                 |
|-------|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|       | 遮盖前<br>(n=5)           | 遮盖 2 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>(n=5) | 遮盖 6 周<br>(n=5) |
| 空白对照组 | 1.343±0.012            | 1.315±0.025     | 1.300±0.008     | 1.294±0.034             | 1.291±0.013     |
| FDM 组 | 1.314±0.044            | 1.167±0.033     | 0.921±0.015     | 0.908±0.009             | 0.775±0.020     |

注:  $F_{\text{分组}} = 726.00, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 1399.95, P = 0.00$ . 与各自时间点空白对照组比较,  $^a P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) FDM: 形觉剥夺性近视

**表 11 自身对照组与 FDM 组不同时间点 I 型胶原 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 I 型胶原 mRNA 相对表达量 |                 |                 |                         |                 |
|-------|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|       | 遮盖前<br>(n=5)           | 遮盖 2 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>(n=5) | 遮盖 6 周<br>(n=5) |
| 自身对照组 | 1.342±0.043            | 1.322±0.013     | 1.320±0.009     | 1.301±0.023             | 1.299±0.010     |
| FDM 组 | 1.314±0.044            | 1.167±0.033     | 0.921±0.015     | 0.908±0.009             | 0.775±0.020     |
| $t$ 值 | 30.79                  | 9.43            | 22.43           | 35.18                   | 47.75           |
| $P$ 值 | >0.05                  | 0.00            | 0.00            | 0.00                    | 0.00            |

注: FDM: 形觉剥夺性近视 (配对  $t$  检验)

**表 12 空白对照组与 FDM 组不同时间点 Smad3 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 Smad3 mRNA 相对表达量 |                 |                 |                         |                 |
|-------|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|       | 遮盖前<br>(n=5)           | 遮盖 2 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>(n=5) | 遮盖 6 周<br>(n=5) |
| 空白对照组 | 0.981±0.012            | 0.967±0.025     | 0.942±0.008     | 0.935±0.034             | 0.921±0.013     |
| FDM 组 | 0.964±0.017            | 0.871±0.024     | 0.628±0.015     | 0.630±0.002             | 0.519±0.016     |

注:  $F_{\text{分组}} = 682.18, P = 0.00; F_{\text{时间}} = 1364.20, P = 0.00$ . 与各自时间点空白对照组比较,  $^a P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD- $t$  检验) FDM: 形觉剥夺性近视

**表 13 自身对照组与 FDM 组不同时间点 Smad3 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

| 组别    | 不同时间点 Smad3 mRNA 相对表达量 |                 |                 |                         |                 |
|-------|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|       | 遮盖前<br>(n=5)           | 遮盖 2 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周<br>(n=5) | 遮盖 4 周后去遮盖 1 周<br>(n=5) | 遮盖 6 周<br>(n=5) |
| 自身对照组 | 0.965±0.043            | 0.955±0.013     | 0.942±0.009     | 0.933±0.023             | 0.916±0.010     |
| FDM 组 | 0.964±0.017            | 0.871±0.024     | 0.628±0.015     | 0.630±0.002             | 0.519±0.016     |
| $t$ 值 | 5.61                   | 9.61            | 18.83           | 37.00                   | 42.89           |
| $P$ 值 | >0.05                  | 0.00            | 0.00            | 0.00                    | 0.00            |

注: FDM: 形觉剥夺性近视 (配对  $t$  检验)

## 2.4 FDM 组豚鼠后极部巩膜组织中 Smad3 和 I 型胶原表达量变化的关系

FDM 组豚鼠巩膜组织中 I 型胶原蛋白表达量与 Smad3 蛋白表达量呈高度正相关 ( $r = 0.993, P < 0.05$ ), I 型胶原 mRNA 相对表达量与 Smad3 mRNA 相对表

达量间呈高度正相关 ( $r = 0.954, P < 0.05$ ) (图 5, 6)。

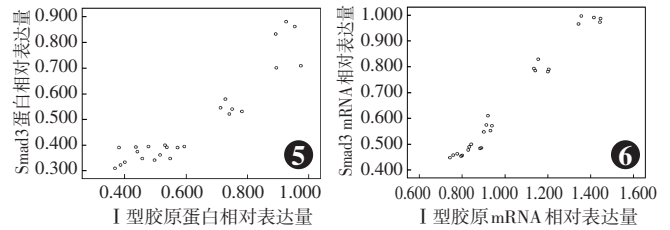


图 5 I 型胶原蛋白相对表达量与 Smad3 蛋白相对表达量散点图  $r = 0.993, P < 0.05$  (Pearson 线性相关分析,  $n = 25$ ) 图 6 I 型胶原 mRNA 相对表达量与 Smad3 mRNA 相对表达量散点图  $r = 0.954, P < 0.05$  (Pearson 线性相关分析,  $n = 25$ )

## 3 讨论

以往研究表明, 巩膜重塑在近视的发生和发展进程中起到至关重要的作用, 近视发展进程中最主要的形态变化是眼轴过度伸长<sup>[11-12]</sup>。巩膜中含量最多的是胶原纤维, 占巩膜净重的 90%, 主要有 I、III 及 IV 型胶原纤维, I 型胶原纤维在巩膜中所占比例最大, 因此在近视巩膜重塑过程中主要是 I 型胶原纤维表达减少<sup>[13]</sup>。研究证实, TGF- $\beta$  在维持巩膜的正常形态和功能中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。在近视发展过程中, 巩膜组织中 TGF- $\beta$  的 3 种亚型 (TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$  和 TGF- $\beta_3$ ) 表达量均下降<sup>[15-16]</sup>。籍雪颖等<sup>[17-18]</sup>研究证实 Smad3 是 TGF- $\beta_1$  的一个下游因子, 其可能通过 TGF- $\beta_1$ -Smad3-结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 通路调控巩膜重塑, 从而在近视发展过程中发挥作用。然而, Smad3 的表达与 I 型胶原合成及降解的关系仍不十分清楚。

本研究中结果显示, 与自身对照组和空白对照组比较, FDM 组豚鼠眼近视度明显升高, 眼轴明显伸长, 与朱子诚等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。随着遮盖时间的延长, FDM 组豚鼠的眼球近视屈光光度数逐渐增加, 同时伴有眼轴长度的逐渐延长, 证实 FDM 的形成主要是眼轴的异常增长。

有研究表明, 在近视巩膜重塑过程中, 随着近视度数的加深, TGF- $\beta_1$  和 I 型胶原的表达也逐渐下降, 且两者之间存在一定的关联<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, 随着遮盖时间的延长, 豚鼠后极部巩膜组织中 Smad3 和 I 型胶原蛋白及 mRNA 表达量均呈逐渐下降的趋势, 这表明随着近视度数的加深, 巩膜中 Smad3 和 I 型胶原的表达量逐渐下降, 与籍雪颖等<sup>[18]</sup>和 Liu 等<sup>[20]</sup>的研究结果相一致。随着遮盖时间的不断延长, 近视度及眼轴测量值均增加, Smad3 和 I 型胶原的表达量随之逐渐下降, 但在遮盖 4 周后去遮盖 1 周时 Smad3 和 I 型

胶原的表达量与遮盖 4 周时比较接近,即下降速度减慢,推测遮盖可使豚鼠的近视度升高和眼轴伸长,从而导致巩膜中 Smad3 和 I 型胶原的表达逐渐下降。

总之,本研究的结果进一步验证了 Smad3 表达于豚鼠实验性近视巩膜模型的巩膜组织中,且随着遮盖时间的延长和近视度数的加深,FDM 眼巩膜组织中 Smad3 蛋白及基因表达量均呈逐渐下降的趋势,且 I 型胶原与 Smad3 在 FDM 眼巩膜重塑过程中表达的动态变化一致,推测 I 型胶原和 Smad3 在近视巩膜重塑过程中可能存在一定联系。关于 TGF- $\beta_1$ 、I 型胶原和 Smad3 在近视巩膜重塑过程中的确切关系及作用机制还有待进一步研究。本研究结果为近视发病机制及防治研究提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] He M, Xiang F, Zeng Y, et al. Effect of time spent outdoors at school on the development of myopia among children in China: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2015, 314(11): 1142-1148. DOI: 10.1001/jama.2015.10803.
- [2] McMonnies CW. Clinical prediction of the need for interventions for the control of myopia[J]. Clin Exp Optom, 2015, 98(6): 518-526. DOI: 10.1111/exo.12212.
- [3] 宋胜仿, 李华. 近视流行病学调查研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(3): 453-454. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.023.  
Song SF, Li H. Progress of epidemiologic study of myopia[J]. Int J Ophthalmol, 2011, 11(3): 453-454. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.023.
- [4] Guo L, Yang J, Mai J, et al. Prevalence and associated factors of myopia among primary and middle school-aged students: a school-based study in Guangzhou[J]. Eye (Lond), 2016, 30(6): 796-804. DOI: 10.1038/eye.2016.39.
- [5] Meng B, Li SM, Yang Y, et al. The association of TGF $\beta_1$  genetic polymorphisms with high myopia: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20355-20367.
- [6] Tarzeman R, Jiang G, Larjava H, et al. Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(1): e0115524 [2017-01-22]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584940. DOI: 10.1371/journal.pone.0115524.
- [7] 李杨, 王德文, 宋良文, 等. TGF $\beta_1$  对肺成纤维细胞中转录因子 SP1、AP1 和 Smad3-Smad4 活性的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(6): 679-682.  
Li Y, Wang DW, Song LW, et al. Effects of TGF $\beta_1$  on the transcriptional activity of SP1, AP1 and Smad3-Smad4 in lung fibroblasts[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2005, 21(6): 679-682.
- [8] Tarzeman R, Jiang G, Larjava H, et al. Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(1): e0115524 [2017-01-09]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584940. DOI: 10.1371/journal.pone.0115524.
- [9] Wang Q, Xue ML, Zhao GQ, et al. Form-deprivation myopia induces decreased expression of bone morphogenetic protein-2, 5 in guinea pig sclera[J]. Int J Ophthalmol, 2015, 8(1): 39-45. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.01.07.
- [10] 朱子诚, 张金嵩. 豚鼠形觉剥夺性近视中视网膜 Stat3 活性蛋白的表达[J]. 安徽医学, 2009, 30(8): 860-862. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2009.08.007.  
Zhu ZC, Zhang JS. Effects of form-deprivation on expression of P-Stat3 in the retina of guinea pigs[J]. Anhui Med J, 2009, 30(8): 860-862. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2009.08.007.
- [11] Lu F, Zhou X, Jiang L, 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. DOI: 10.1016/j.exer.2009.02.019.
- [12] Zou L, Liu R, Zhang X, et al. Upregulation of regulator of G-protein signaling 2 in the sclera of a form deprivation myopic animal model[J]. Mol Vis, 2014, 20: 977-987.
- [13] Gentle A, Liu Y, Martin JE, et al. Collagen gene expression and the altered accumulation of scleral collagen during the development of high myopia[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 16587-16594. DOI: 10.1074/jbc.M300970200.
- [14] Wu PC, Tsai CL, Gordon GM, et al. Chondrogenesis in scleral stem/progenitor cells and its association with form-deprived myopia in mice[J]. Mol Vis, 2015, 21: 138-147.
- [15] Jobling AI, Nguyen M, Gentle A, et al. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression[J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18121-18126. DOI: 10.1074/jbc.M400381200.
- [16] Jobling AI, Wan R, Gentle A, et al. Retinal and choroidal TGF-beta in the tree shrew model of myopia: isoform expression, activation and effects on function[J]. Exp Eye Res, 2009, 88(3): 458-466. DOI: 10.1016/j.exer.2008.10.022.
- [17] 籍雪颖, 张金嵩, 朱子诚, 等. Smad3 信号通路及其靶基因 CTGF 在豚鼠巩膜成纤维细胞的表达[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(10): 920-922.  
Ji XY, Zhang JS, Zhu ZC, et al. Expression of Smad3 signal way and CTGF in scleral fibroblasts of guinea pigs[J]. J Fourth Mil Med Uni, 2009, 30(10): 920-922.
- [18] 籍雪颖, 张金嵩, 王艳婷, 等. Smad3 信号通路及结缔组织生长因子在豚鼠西平抑制形觉剥夺性近视中的作用机制[J]. 中南大学学报: 医学版, 2009, 34(4): 349-355.  
Ji XY, Zhang JS, Wang YT, et al. Mechanism of Smad 3 signaling pathway and connective tissue growth factor in the inhibition of form deprivation myopia by pirenzepine[J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2009, 34(4): 349-355.
- [19] Li M, Yuan Y, Chen Q, et al. Expression of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway and its regulatory role in type I collagen with TGF- $\beta_1$  in scleral fibroblasts from an experimentally induced myopia guinea pig model[J/OL]. J Ophthalmol, 2016, 2016: 5126560 [2017-01-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4877496. DOI: 10.1155/2016/5126560.
- [20] Liu H, Xiang N, Zhang H. Influence of high level TGF-beta1 on scleral thickness[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2007, 27(5): 601-604. DOI: 10.1007/s11596-007-0532-0.

(收稿日期: 2017-03-22)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)