

视网膜 Sigma-1 受体拮抗剂对豚鼠形觉剥夺性近视形成的抑制作用及其机制

陈媛媛¹ 谢伏娟² 李海波¹ 关宇欣¹ 毛俊峰¹

¹中南大学湘雅医院眼科中心 眼科学湖南省重点实验室,长沙 410008;²中南大学湘雅医院手术部,长沙 410008

通信作者:毛俊峰,Email:mao_junfeng@163.com

【摘要】 目的 研究视网膜 Sigma-1 受体拮抗剂 N,N-二乙基-2-(4-甲氧基-3-苯乙氧基苯基)乙胺盐酸盐(NE-100)在豚鼠形觉剥夺性近视(FDM)形成中的调控作用及其机制。方法 选取健康 21 日龄三色豚鼠 85 只,采用随机数表法将其分为正常对照组、眼遮盖 14 d 组和眼遮盖 11 d 组,每组 12 只,其中正常对照组不予遮盖,眼遮盖 14 d 组用自制半透明眼罩连续遮盖豚鼠右眼 14 d 作为 FDM 模型组,眼遮盖 11 d 组同法连续遮盖右眼 11 d 后去遮盖 3 d。将剩余 49 只豚鼠采用随机数表法随机分为 FDM 组 10 只、FDM+NE-100 6 μg 组 12 只、FDM+NE-100 60 μg 组 10 只、FDM+NE-100 600 μg 组 9 只和 FDM+生理盐水组 8 只。根据分组, FDM 眼每天接受球周注射 NE-100 6 μg 、60 μg 、600 μg 和生理盐水各 100 μl 。采用红外偏心自动验光仪测定眼球屈光度;采用 A 型超声仪测量眼轴长度;采用角膜曲率计测量角膜曲率。采用免疫组织化学染色和 Western blot 法检测视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达分布;采用高效液相色谱电化学法测定神经视网膜的多巴胺含量。结果 各组间豚鼠屈光度和眼轴长度总体比较,差异均有统计学意义($F=147.81, 160.10, P<0.01$),其中与正常对照组比较,眼遮盖 14 d 组和眼遮盖 11 d 组豚鼠遮盖眼相对近视度数明显加深,眼轴明显延长,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与眼遮盖 14 d 组比较,眼遮盖 11 d 组相对近视度数明显较低,眼轴较短,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。正常对照组豚鼠 Sigma-1 蛋白表达于视网膜神经节细胞(RGCs)、光感受器内节及少量内核层细胞;与正常对照组比较,眼遮盖 14 d 组豚鼠 RGCs 及光感受器内节 Sigma-1 蛋白染色增强,内核层 Sigma-1 染色阳性细胞明显增多,内、外丛状层也可见 Sigma-1 染色阳性细胞, Müller 细胞染色尤为明显,在视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达量明显升高。与眼遮盖 14 d 组比较,眼遮盖 11 d 组遮盖视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达量明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。FDM+NE-100 6 μg 、60 μg 和 600 μg 组豚鼠近视屈光度均低于 FDM 组,其中 FDM+NE-100 60 μg 、600 μg 组豚鼠近视屈光度均低于 FDM+NE-100 6 μg 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。FDM+NE-100 60 μg 组视网膜多巴胺质量分数为(0.74 \pm 0.09) ng/mg,高于 FDM 组的(0.57 \pm 0.10) ng/mg,差异有统计学意义($t=15.18, P<0.01$)。结论 视网膜 Sigma-1 受体拮抗剂对豚鼠 FDM 形成有抑制作用,这一调控作用与其引起视网膜多巴胺含量升高有关。

【关键词】 Sigma-1 受体;形觉剥夺;近视;视网膜;多巴胺;豚鼠

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2017JJ2373)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200615-00433

Inhibiting effect of retinal Sigma-1 receptor antagonist on the form deprivation myopia in guinea pigs and its mechanism

Chen Yuanyuan¹, Xie Fujuan², Li Haibo¹, Guan Yuxin¹, Mao Junfeng¹

¹Eye Center of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; ²Operation Department of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: Mao Junfeng, Email: mao_junfeng@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the role and mechanism of retinal Sigma-1 receptor antagonist N,N-diethyl-2-[4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)phenyl]ethanaminehydrochloride (NE-100) in the formation of form deprivation myopia (FDM) in guinea pigs. **Methods** Eighty-five 21-day-old guinea pigs were selected, and 36 of them were randomly divided into normal control group, occluded 14-day group and occluded 11-day group, with 12 in each group. The right eyes of guinea pigs in the occluded 14-day group were covered with translucent eye shield for consecutive 14 days, and guinea pigs in the occluded 11-day group were treated in the same way for consecutive 11 days plus 3 days without cover, and guinea pigs in the normal control group were not covered. The other 49 guinea pigs were randomly divided into FDM group ($n=10$), FDM+NE-100 6 μg group ($n=12$), FDM+NE-100 60 μg group ($n=10$), FDM+NE-100 600 μg group ($n=9$), and FDM+saline group ($n=8$). The right eyes in each group received 100 μl peribulbar injection of NE-100 6 μg , 60 μg and 600 μg or saline once a day according to grouping. Ocular refraction and axial dimensions were measured using eccentric infrared photorefractor and A-scan ultrasonography, respectively. Corneal curvature was measured with keratometer. Immunohistochemical staining and Western blot were

used to detect the expression levels of Sigma-1 receptor protein, and retinal dopamine content was evaluated by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. This study was approved by an Ethics Committee of the Department of Laboratory Animal Science of Central South University (No. 2020sydw0084). The use and care of experimental animals followed the Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals in China. **Results** There were statistical significant differences in diopter and axial length among the normal control group, occluded 14-day group and occluded 11-day group ($F=147.81, 160.10$; both at $P<0.01$). Compared with the normal control group, the relative myopia was the deepest and the axial length was the longest in the occluded 14-day group, then the occluded 11-day group, showing significant differences between them (all at $P<0.05$). In the normal control group, Sigma-1 protein was mainly expressed in retinal ganglion cells (RGCs), photoreceptor inner segment and the inner nuclear layer. In the occluded 14-day group, Sigma-1 protein staining was enhanced in RGCs and photoreceptor inner segment. Sigma-1 staining positive cells in the inner nuclear layer were increased significantly and were also seen in the inner and outer plexiform layers, especially in Müller cells, in which the expression levels of Sigma-1 receptor protein were significantly increased. Compared with the occluded 14-day group, the Sigma-1 receptor protein expression levels in the retina of the occluded 11-day group was significantly decreased ($P<0.01$). The diopters of guinea pigs in the FDM+NE-100 6 μg , 60 μg and 600 μg groups were lower than those in the FDM group, and the diopters of FDM+NE-100 60 μg and 600 μg guinea pigs were lower than those in the FDM+NE-100 6 μg group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). The dopamine content in the retina of the FDM+NE-100 60 μg group was (0.74 ± 0.09) ng/mg, which was significantly higher than (0.57 ± 0.10) ng/mg in the FDM group, with a significant difference between them ($t=15.18, P<0.01$). **Conclusions** Sigma-1 receptor antagonist inhibits FDM formation, which may be associated with the elevation of dopamine content in retina.

[Key words] Sigma-1 receptor; Form deprivation; Myopia; Retina; Dopamine; Guinea pig

Fund program: Natural Science Foundation of Hunan Province (2017JJ2373)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200615-00433

Sigma-1 受体是在豚鼠克隆的一种细胞内分子伴侣, 主要位于线粒体相关的内质网膜, 具有调节内质网应激、神经递质、离子通道活性等生理功能^[1]。Sigma-1 受体表达于大多数视网膜神经元和胶质细胞, 在视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 层表达最为丰富, 在 Müller 细胞、光感受器细胞、双极细胞、无长突细胞均有表达^[2-3]。研究发现, Sigma-1 受体激活后与多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 结合, 抑制突触间隙的多巴胺向细胞内转运, 造成细胞外多巴胺浓度升高^[4]。目前的研究证实, 视网膜多巴胺参与近视, 尤其是形觉剥夺性近视 (form deprivation myopia, FDM) 的形成过程^[5-6]。本课题组先前的研究发现, FDM 豚鼠视网膜中多巴胺含量下降, 腹腔内注射左旋多巴能够通过升高视网膜多巴胺含量抑制 FDM 形成^[7]。另有研究发现, FDM 豚鼠视网膜中多巴胺及其代谢产物含量下降, 调控视网膜多巴胺含量能够影响豚鼠 FDM 的形成^[8]。目前尚不清楚视网膜 Sigma-1 受体是否参与近视的形成, 基于上述研究结果, 我们推测视网膜 Sigma-1 受体可能通过调节视网膜多巴胺含量而参与近视的形成。本研究拟探讨视网膜 Sigma-1 受体在豚鼠 FDM 形成和恢复过程中的变化, 并通过球周注射 Sigma-1 受体特异性拮抗剂 N,N-二乙基-2-(4-甲氧基-3-苯乙基氨基苯基) 乙胺盐酸盐 (N,N-dipropyl-2-[4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)-phenyl]-ethylaminemonohydrochloride, NE-100) 观察其对

FDM 形成及视网膜多巴胺含量的影响, 研究视网膜 Sigma-1 受体在豚鼠 FDM 形成中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取健康 21 日龄三色豚鼠 85 只 (中南大学实验动物学部提供), 体质量 140~170 g, 雌雄不限。本研究经中南大学实验动物学部伦理委员会批准 (批文号: 2020sydw0084), 实验动物的使用和喂养完全遵循中国科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔多克隆 Sigma-1 受体抗体 (ab151288)、鼠抗兔 GAPDH 多克隆抗体 (ab181603)、羊抗兔二抗 (ab97051) (美国 Abcam 公司); Sigma-1 受体选择性拮抗剂 NE-100 (SML0631, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 超敏两步法免疫组织化学检测试剂盒 (PV-0023)、BCA 蛋白定量试剂盒 (C05-02001) (北京博奥森生物技术有限公司)。ARK-510A 电脑验光角膜曲率计 (日本尼德克公司); MD-2400S 眼科 A/B 型超声诊断仪 (天津迈达医学科技股份有限公司); 艾沃斯-V8 数字式照度计 (武汉中测宏图测量仪器有限公司); KF-PRO-005 全自动数字病理切片扫描仪 (宁波江丰生物信息技术有限公司); Waters 2695 型高效液相色谱仪、Waters uBondapak C18 反相色谱柱 (美国沃特世公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组处理 实验分为 2 个部分进行,第 1 部分纳入豚鼠 36 只,采用随机数表法分为正常对照组、眼遮盖 14 d 组和眼遮盖 11 d 组,每组 12 只,其中正常对照组不予遮盖,眼遮盖 14 d 组用自制半透明眼罩连续遮盖豚鼠右眼 14 d 作为 FDM 模型组,眼遮盖 11 d 组同法连续遮盖右眼 11 d 后去遮盖 3 d,评估视网膜 Sigma-1 受体在豚鼠 FDM 形成及恢复过程中的变化。另取 49 只豚鼠,采用随机数表法将其分为 FDM 组 10 只、FDM+NE-100 6 μg 组 12 只、FDM+NE-100 60 μg 组 10 只、FDM+NE-100 600 μg 组 9 只和 FDM+生理盐水组 8 只,研究阻断视网膜 Sigma-1 受体活性对豚鼠 FDM 眼球屈光发育的影响。依据上述不同 NE-100 的作用结果,将 NE-100 60 μg 作为多巴胺测定实验最适药物剂量,并比较 FDM+NE-100 60 μg 组与 FDM 组豚鼠实验眼视网膜中多巴胺质量分数的差异。

1.2.2 豚鼠 FDM 模型的制作 在本课题组以前 FDM 模型制作方法^[7,9]的基础上制作豚鼠 FDM 模型。以右眼为遮盖眼,以乳胶手套为材料制作半透明遮盖眼罩,用系带固定于豚鼠头部。每日清洗眼罩 1 次,保持其清洁。分笼饲养,每天光照与黑暗周期为 12 h/12 h,7:00—19:00 为连续室内日光灯照明时间,每天采用数字式照度计测量笼内豚鼠眼水平面的光照度,控制在 480~520 lx。按照预定实验时间,采用电脑验光角膜曲率计测定眼球相对屈光度和角膜曲率半径(精确到 0.01 mm),A 型超声仪测量眼轴长度(精确到 0.01 mm),每眼测量 3 次,取平均值,评估眼球屈光状态变化。于遮盖后 14 d,腹腔内注射过量戊巴比妥钠处死豚鼠,摘除眼球。

1.2.3 免疫组织化学染色法检测视网膜 Sigma-1 受体蛋白表达分布 正常对照组、眼遮盖 14 d 组和眼遮盖 11 d 组各任意选取 3 个标本,用 2.5 ml 一次性注射器针头在角膜扎 2~3 个孔,将眼球置于质量分数 10% 中性甲醛中固定,石蜡包埋,制作 5 μm 厚眼球石蜡切片,用于免疫组织化学染色,一抗为兔多克隆 Sigma-1 受体抗体,工作浓度为 1:100。参照免疫组织化学检测试剂盒步骤进行显色,采用全自动数字病理切片扫描仪扫描切片并采集、保存图像。

1.2.4 Western blot 法检测视网膜 Sigma-1 受体蛋白的表达 正常对照组、眼遮盖 14 d 组和眼遮盖 11 d 组每组各 9 个标本用于 Western blot 检测。取豚鼠视网膜神经上皮层标本,称量后剪碎。按 1:10 体积比加入细胞裂解液匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 000 $\times g$ 离心 15 min,取上清液,

-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取蛋白样品 25 μg ,一抗为兔多克隆 Sigma-1 受体抗体,工作浓度为 1:500。采用 BandsScan 5.0 图像分析软件对目的条带进行灰度分析,以 GAPDH 为内参,计算 Sigma-1 受体蛋白的相对表达量。Sigma-1 受体蛋白相对表达量 = Sigma-1 受体条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值。

1.2.5 NE-100 给药方式 NE-100 使用时新鲜配制,以生理盐水为溶剂。参照 Jiang 等^[9]的方法,采用盐酸奥布卡因滴眼液点眼局部麻醉,采用 30G 一次性注射器于每天 9:00 给豚鼠实验眼球周注射 100 μl NE-100,每天 1 次,连续 14 d。NE-100 的注射量分别为 6、60 和 600 μg ,以球周注射 100 μl 生理盐水作为对照。

1.2.6 高效液相色谱电化学法测定神经视网膜多巴胺含量 FDM 组和 FDM+NE-100 60 μg 组每组各 10 个标本用于神经视网膜多巴胺含量测定。取豚鼠视网膜神经上皮层标本,称量后液氮保存。色谱条件: Waters uBondapak C18 反相色谱柱(150 mm \times 3.9 mm, 5 μm),流动相为水相(每 500 ml 含 B_8 1.25 g、 KH_2PO_4 6.8 g、EDTA 18 mg, pH=3.3),有机相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{乙腈}}=78:19:3$,流速为 0.75 ml/min,工作电压为 0.7 V,进样量为 10 μl 。多巴胺的保留时间为 6.2 min。计算神经视网膜内多巴胺质量分数(ng/mg)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示。采用随机分组单因素干预多水平研究设计,各组间豚鼠角膜曲率半径、眼球屈光度、眼轴长度和视网膜 Sigma-1 受体蛋白相对表达量总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。FDM 组与 FDM+NE-100 60 μg 组豚鼠实验眼视网膜多巴胺质量分数比较采用独立样本 *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组眼球屈光状态的变化

各组间豚鼠屈光度和眼轴长度总体比较,差异均有统计学意义($F=147.81$ 、 160.10 ,均 $P<0.01$),其中与正常对照组比较,眼遮盖 14 d 组和眼遮盖 11 d 组豚鼠遮盖眼相对近视度数明显加深,眼轴明显延长,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与眼遮盖 14 d 组比较,眼遮盖 11 d 组相对近视度数明显较低,眼轴较短,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。各组间豚鼠角膜曲率半径总体比较差异无统计学意义($F=0.80$, $P>0.05$)(表 1)。

表 1 各组豚鼠实验眼角膜曲率半径、屈光度及眼轴长度的比较 (mean±SD)

Table 1 Comparison of corneal curvature radius, diopter and axial length among different groups (mean±SD)

组别	眼数	角膜曲率半径 (mm)	屈光度 (D)	眼轴长度 (mm)
正常对照组	12	3.54±0.04	+1.54±0.54	7.94±0.06
眼遮盖 14 d 组	12	3.56±0.05	-2.83±0.75 ^a	8.37±0.07 ^a
眼遮盖 11 d 组	12	3.55±0.04	-1.25±0.58 ^{ab}	8.18±0.04 ^{ab}
<i>F</i> 值		0.80	147.81	160.10
<i>P</i> 值		>0.05	<0.01	<0.01

注:与各自正常对照组比较,^a*P*<0.05;与眼遮盖 14 d 组比较,^b*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验)

Note:Compared with the normal control group,^a*P*<0.05;compared with the occluded 14-day group,^b*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

2.2 各组豚鼠实验眼视网膜 Sigma-1 受体蛋白表达

免疫组织化学染色结果显示,Sigma-1 受体蛋白表达于正常豚鼠的多数 RGCs 和光感受器内节以及少量内核层细胞,呈淡黄色染色。遮盖 14 d 组遮盖眼视网膜 Sigma-1 受体蛋白在 RGCs 及光感受器内节染色明显增强,内核层细胞 Sigma-1 受体蛋白阳性细胞明显增多,内、外丛状层均可见 Sigma-1 受体蛋白阳性表达,栅栏状排列的 Müller 细胞染色尤为明显。与遮盖 14 d 组比较,遮盖 11 d 组遮盖眼视网膜 Sigma-1 受体蛋白在 RGCs、光感受器内节阳性染色强度明显减弱,内核层仅存在少量 Sigma-1 受体蛋白阳性细胞,内、外丛状层及栅栏状排列的 Müller 细胞无明显染色(图 1)。Western blot 检测发现,正常对照组、遮盖 14 d 组和遮盖 11 d 组豚鼠遮盖眼中 Sigma-1 受体蛋白相对表达量分别为 0.13±0.04、0.42±0.11 和 0.17±0.06,总体比较差异有统计学意义(*F*=36.78,*P*<0.01),其中遮盖 14 d 组遮盖眼视网膜 Sigma-1 蛋白相对表达量较正常对照组明显升高,遮盖 11 d 组遮盖眼视网膜 Sigma-1 受体蛋白相对表达量明

显降低,差异均有统计学意义(均 *P*<0.01)(图 2)。

2.3 不同剂量 NE-100 干预组眼屈光度变化及视网膜多巴胺质量分数比较

不同 NE-100 干预组豚鼠实验眼角膜曲率半径总体比较差异无统计学意义(*F*=0.38,*P*>0.05);各组豚鼠实验眼屈光度和眼轴长度总体比较差异均有统计学意义(*F*=27.51、24.04,均 *P*<0.01)。与 FDM 组比较,FDM+NE-100 6 μg、60 μg 和 600 μg 组实验眼屈光度绝对值逐渐下降,眼轴长度逐渐缩短,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);FDM+生理盐水组与 FDM 组实验眼屈光度和眼轴长度变化差异均无统计学意义(均 *P*>0.05)(表 2)。FDM 组和 FDM+NE-100 60 μg 组豚

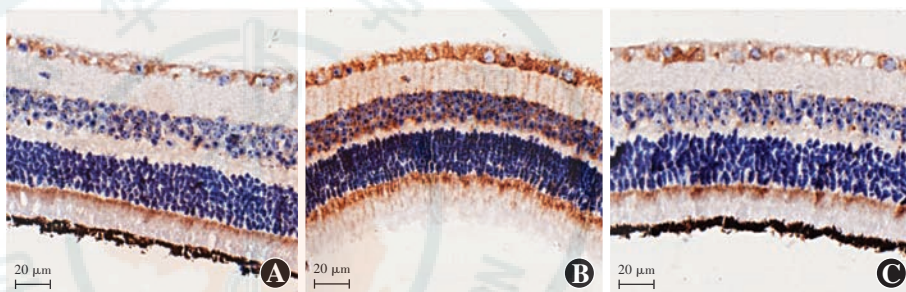


图 1 免疫组织化学染色法检测不同眼遮盖组豚鼠视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达 (DAB ×400, 标尺=20 μm) A:正常对照组豚鼠实验眼视网膜不同细胞中 Sigma-1 受体蛋白表达呈淡黄色 B:眼遮盖 14 d 组豚鼠实验眼视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达细胞增多,染色增强 C:眼遮盖 11 d 组豚鼠实验眼视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达细胞少于眼遮盖 14 d 组,染色强度减弱

Figure 1 Expression of Sigma-1 receptor protein in the retina of guinea pigs in different groups by immunohistochemical staining (DAB ×400, bar=20 μm) A:The retinal Sigma-1 receptor protein in different cells of guinea pig eyes of the normal control group was pale yellow B:The number of cells expressing Sigma-1 receptor protein in the retina of guinea pig eyes in the occluded 14-day group was increased and the staining was enhanced C:The number of cells expressing Sigma-1 receptor protein in the retina of guinea pig eyes in the occluded 11-day group was less than that in the occluded 14-day group, and the staining intensity was weaker

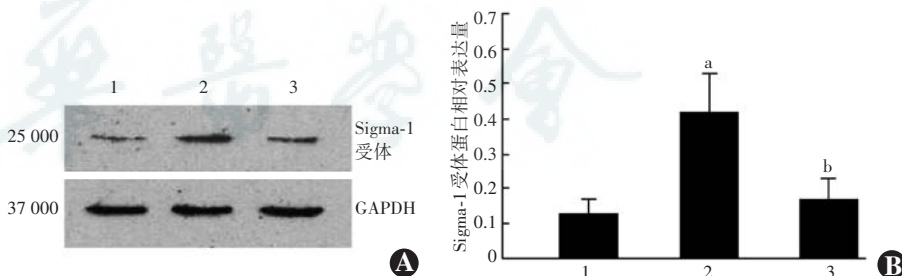


图 2 Western blot 法检测不同眼遮盖组豚鼠视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达量 A:视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达电泳图 眼遮盖 14 d 组视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达条带强于正常对照组和眼遮盖 11 d 组 GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶 B:各组视网膜中 Sigma-1 受体蛋白相对表达量比较 *F*=36.78,*P*<0.01。与正常对照组比较,^a*P*<0.01;与眼遮盖 14 d 组比较,^b*P*<0.01(单因素方差分析,LSD-*t* 检验,*n*=9) 1:正常对照组;2:眼遮盖 14 d 组;3:眼遮盖 11 d 组

Figure 2 Expression levels of Sigma-1 receptor protein in the retina of guinea pigs in different groups by Western blot A:Electrophoretogram of Sigma-1 receptor protein expression The Sigma-1 receptor protein expression bands in the retina of the occluded 14-day group were stronger than those of the normal control group and the occluded 11-day group GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B:Quantitative comparison of the relative expression levels of Sigma-1 receptor protein in the retina of the three groups *F*=36.78,*P*<0.01. Compared with the normal control group,^a*P*<0.01; compared with the occluded 14-day group,^b*P*<0.01 (One-way ANOVA, LSD-*t* test, *n*=9) 1: Normal control group; 2: The occluded 14-day group; 3: The occluded 11-day group

鼠实验眼视网膜中多巴胺质量分数分别为 (0.57 ± 0.10) ng/mg 和 (0.74 ± 0.09) ng/mg, 组间比较差异有统计学意义 ($t = 15.18, P < 0.01$) (图 3)。

表 2 各组豚鼠实验眼屈光相关指标比较 (mean±SD)
Table 2 Comparison of refractive parameters of guinea pigs among different groups (mean±SD)

组别	眼数	角膜曲率半径 (mm)	屈光度 (D)	眼轴长度 (mm)
FDM 组	10	3.55±0.04	-2.75±0.72	8.35±0.07
FDM+NE-100 6 μg 组	12	3.54±0.05	-1.58±0.76 ^a	8.25±0.08 ^a
FDM+NE-100 60 μg 组	10	3.56±0.04	-0.35±0.67 ^{ab}	8.12±0.06 ^{ab}
FDM+NE-100 600 μg 组	9	3.54±0.05	-0.28±0.57 ^{ab}	8.11±0.05 ^{ab}
FDM+生理盐水组	8	3.56±0.06	-2.63±0.69	8.34±0.08
F 值		0.38	27.51	24.04
P 值		>0.05	<0.01	<0.01

注:与 FDM 组比较,^a $P < 0.05$;与 FDM+NE-100 6 μg 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) FDM:形觉剥夺性近视;NE-100: N, N-二乙基-2-(4-甲氧基-3-苯乙氧基苯基)乙胺盐酸盐

Note: Compared with the FDM group, ^a $P < 0.05$; compared with the FDM+NE-100 6 μg group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) FDM: form deprivation myopia; NE-100: N, N-dipropyl-2-[4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)-phenyl]-ethylaminemmonohydrochloride

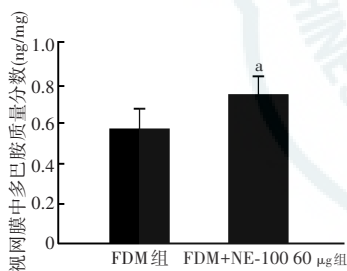


图 3 FDM 组与 FDM+NE-100 60 μg 组豚鼠实验眼视网膜中多巴胺质量分数比较 与 FDM 组比较,^a $P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 10$) FDM:形觉剥夺性近视;NE-100: N, N-二乙基-2-(4-甲氧基-3-苯乙氧基苯基)乙胺盐酸盐

Figure 3 Comparison of dopamine contents in retina of guinea pigs between the FDM group and the NE-100 60 μg group Compared with the FDM group, ^a $P < 0.01$ (Independent-samples t test, $n = 10$) FDM: form deprivation myopia; NE-100: N, N-dipropyl-2-[4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)-phenyl]-ethylaminemmonohydrochloride

3 讨论

研究发现, Sigma-1 受体在大鼠、小鼠、人、猴等哺乳动物视网膜中分布广泛, RGCs、光感受器细胞、双极细胞及 Müller 细胞等均有表达, 尤其是 RGCs^[3]。本研究发现, 豚鼠中 Sigma-1 受体蛋白主要表达在 RGCs、光感受器内节细胞及少量内核层细胞, FDM 引起视网膜中 Sigma-1 受体蛋白表达量升高, Sigma-1 受体蛋白阳性细胞明显增多, Müller 细胞中 Sigma-1 受体

蛋白表达增强更为明显, 豚鼠短期遮盖后去遮盖眼近视程度降低, 视网膜 Sigma-1 受体蛋白表达也减弱, 接近正常对照眼水平。由此可见, 豚鼠 FDM 形成及恢复过程中视网膜 Sigma-1 受体蛋白表达发生相应变化, 尤其是内核层细胞。以上结果表明视网膜 Sigma-1 受体激活在眼罩遮盖诱导豚鼠 FDM 形成过程中可能起促进作用。

本研究还通过球周注射 Sigma-1 受体拮抗剂 NE-100 验证视网膜 Sigma-1 受体蛋白是否能影响豚鼠 FDM 的形成过程, 结果发现注射后可引起遮盖眼近视程度降低、眼轴延长幅度变小, 表明 NE-100 对 FDM 的形成有抑制作用, 但 NE-100 并不能完全阻止豚鼠 FDM 的形成, 其中 60 μg 剂量的 NE-100 对 FDM 的抑制作用更为明显。结合豚鼠 FDM 形成及恢复过程中视网膜 Sigma-1 受体蛋白的表达变化, 表明视网膜 Sigma-1 受体拮抗剂在豚鼠 FDM 形成过程中具有抑制作用。

DAT 是位于多巴胺能神经元突触前膜的一种跨膜蛋白, 可将多巴胺从细胞外迅速转运到突触前神经元胞质内, 维持神经元内外多巴胺的稳态。无多巴胺结合时 DAT 处于向外构象, 与多巴胺结合后 DAT 转变为向内构象, 把多巴胺转运到细胞质内, 再恢复为向外构象^[10]。Hong 等^[4] 研究发现, 激活的 Sigma-1 受体能与 DAT 结合, 促进 DAT 转变为向外构象, 加快细胞外多巴胺向细胞内转运的过程, 进而降低视网膜多巴胺含量, 促进 FDM 形成。本研究结果发现, 球周注射 NE-100 可引起豚鼠视网膜多巴胺含量升高, 表明 NE-100 对 FDM 的抑制作用可能与视网膜多巴胺含量的升高有关。NE-100 抑制 FDM 形成可能与其拮抗视网膜 Sigma-1 受体, 从而减慢 DAT 转变为向外构象, 导致细胞外多巴胺向细胞内转运减少有关。此外, 视网膜 DAT 自身也参与 FDM 的形成, Zhao 等^[11] 用 ^{99m}Tc-TRODAT-1 SPECT DAT 显像技术研究发现豚鼠 FDM 视网膜 DAT 数量减少, 这与 FDM 视网膜多巴胺合成、代谢降低相适应。

多巴胺是视网膜中一种重要的神经递质, 与眼球的屈光发育及近视形成密切相关。多巴胺的合成源于酪氨酸, 酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 是合成多巴胺的限速酶。新合成的多巴胺被转运至多巴胺能神经元的突触囊泡, 光照能刺激其释放到突触间隙, 作用于突触前后膜及突触外的多巴胺受体, 完成多巴胺能信号传递。DAT 又把突触间隙中的多巴胺转运回细胞内, 重新进入突触囊泡或被单胺氧化酶代谢成 3,4-二羟基苯乙酸 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)。研究表明, 视网膜多巴胺是近视的一个抑

制信号,豚鼠、鸡等 FDM 的视网膜多巴胺及其代谢产物 DOPAC 均降低^[7,12],腹腔内注射左旋多巴或玻璃体腔内注射多巴胺均能有效抑制 FDM 形成^[7,13]。FDM 视网膜中多巴胺含量下降与 TH 降低、多巴胺合成减少有关^[14-16],此外本研究提示形觉剥夺引起视网膜 Sigma-1 受体激活也是一个因素,可能与 Sigma-1 受体激活引起 DAT 构象变化,进而导致细胞外多巴胺向细胞内转运加快有关。

综上所述,本研究结果表明形觉剥夺能引起豚鼠 FDM 视网膜 Sigma-1 受体表达增强,球周注射 Sigma-1 受体拮抗剂 NE-100 能抑制 FDM 形成,且这一作用与其引起视网膜多巴胺含量变化有关。视网膜 Sigma-1 受体激活是否通过引起 DAT 构象变化,导致 FDM 视网膜多巴胺含量下降,仍有待进一步研究加以证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hayashi T. Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs [J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127 (1) : 2-5. DOI:10.1016/j.jphs.2014.07.001.
- [2] Smith SB, Wang J, Cui X, et al. Sigma 1 receptor: a novel therapeutic target in retinal disease [J]. Prog Retin Eye Res, 2018, 67 : 130-149. DOI:10.1016/j.preteyeres.2018.07.003.
- [3] Mavlyutov TA, Guo LW. Peeking into Sigma-1 receptor functions through the retina [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 964 : 285-297. DOI: 10.1007/978-3-319-50174-1_19.
- [4] Hong WC, Yano H, Hiranita T, et al. The sigma-1 receptor modulates dopamine transporter conformation and cocaine binding and may thereby potentiate cocaine self-administration in rats [J/OL]. J Biol Chem, 2017, 292 (27) : 11250-11261 [2020-06-01]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28495886/. DOI:10.1074/jbc.M116.774075.
- [5] Zhou X, Pardue MT, Iuvone PM, et al. Dopamine signaling and myopia development; what are the key challenges [J]. Prog Retin Eye Res, 2017, 61 : 60-71. DOI:10.1016/j.preteyeres.2017.06.003.
- [6] 沙芳, 吴建峰. 近视相关胆碱与多巴胺信号通路研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32 (5) : 457-461. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.05.015.
- [7] Sha F, Wu JF. Research progress of choline and dopamine signaling pathways related to myopia [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32 (5) : 457-461. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.05.015.
- [8] Mao J, Liu S, Qin W, et al. Levodopa inhibits the development of form-deprivation myopia in guinea pigs [J]. Optom Vis Sci, 2010, 87 (1) : 53-60. DOI:10.1097/OPX.0b013e3181c12b3d.
- [9] Luo X, Li B, Li T, et al. Myopia induced by flickering light in guinea pig eyes is associated with increased rather than decreased dopamine release [J]. Mol Vis, 2017, 23 : 666-679.
- [10] Jiang L, Zhang S, Chen R, et al. Effects of the tyrosinase-dependent dopaminergic system on refractive error development in guinea pigs [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59 (11) : 4631-4638. DOI:10.1167/iops.17-22315.
- [11] Lohr KM, Masoud ST, Salahpour A, et al. Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease [J]. Eur J Neurosci, 2017, 45 (1) : 20-33. DOI:10.1111/ejn.13357.
- [12] Zhao J, Qu X, Qi Y, et al. Study on retinal dopamine transporter in form deprivation myopia using the radiopharmaceutical tracer 99mTc-TRODAT-1 [J]. Nucl Med Commun, 2010, 31 (10) : 910-915. DOI: 10.1097/MNM.0b013e318333decc0.
- [13] Stone RA, Cohen Y, McGlenn AM, et al. Development of experimental myopia in chicks in a natural environment [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (11) : 4779-4789. DOI:10.1167/iops.16-19310.
- [14] Gao Q, Liu Q, Ma P, et al. Effects of direct intravitreal dopamine injections on the development of lid-suture induced myopia in rabbits [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006, 244 (10) : 1329-1335. DOI:10.1007/s00417-006-0254-1.
- [15] Bergen MA, Park HN, Chakraborty R, et al. Altered refractive development in mice with reduced levels of retinal dopamine [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (10) : 4412-4419. DOI:10.1167/iops.15-17784.
- [16] Huang F, Zhang L, Wang Q, et al. Dopamine D1 receptors contribute critically to the apomorphine-induced inhibition of form-deprivation myopia in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59 (6) : 2623-2634. DOI:10.1167/iops.17-22578.
- [17] Mao J, Liu S. Different roles of retinal dopamine in albino Guinea pig myopia [J]. Neurosci Lett, 2017, 639 : 94-97. DOI:10.1016/j.neulet.2016.12.061.

(收稿日期:2020-06-15 修回日期:2021-04-29)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

广告目次

- 瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二
 洛冠(注射用普罗碘铵) 江苏吴中医药集团有限公司……前插页
 纯视二代(治疗用绷带镜) 博士伦(上海)贸易有限公司……前插页
 同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页
 尼目克司(醋甲唑胺片) 杭州仟源保灵药业有限公司……前插页
 中华医学期刊 APP 中华医学会杂志社……后插页
 中华医学期刊全文数据库 中华医学会杂志社……后插页
 欧蓝(人工晶状体) 天津高视晶品医疗技术有限公司……封三
 迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底