

负透镜诱导豚鼠离焦性近视眼视网膜组织中补体 C1q 和 C3 的表达

高婷婷 阳雪 龙琴

【摘要】 背景 高度近视严重危害视功能,探究其发病机制有助于疾病的预防和治疗,是眼科领域的重要研究方向之一。补体系统参与病理性近视的发生和发展,但近视眼视网膜中补体成分的变化研究较少。

目的 观察负透镜诱导豚鼠离焦性近视发生时视网膜组织中补体 C1q 和 C3 表达的变化。**方法** 将 12 只出生 3 d 的有色豚鼠按随机数字表法分为正常对照组和透镜诱导组,透镜诱导组豚鼠的左眼用 -10 D 聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)镜片缝合在眼周皮肤 4 周以诱导近视眼模型,作为透镜诱导眼,右眼用平光 PMMA 以同样的方法进行缝合作为对侧对照眼,正常对照组的右眼作为正常对照眼。诱导后 4 周测量各组豚鼠的屈光度,过量麻醉处死豚鼠并分离视网膜,采用 Western blot 法检测各组豚鼠视网膜中 C1q 和 C3 蛋白的表达。

结果 实验后 4 周,透镜诱导眼、正常对照眼和对侧对照眼平均等效球镜屈光度(SE)分别为 (-1.21 ± 0.71) 、 $(+2.46 \pm 0.75)$ 和 $(+1.75 \pm 0.50)$ D,3 个组间比较差异有统计学意义 ($F = 51.55, P = 0.69$),正常对照眼与对侧对照眼间豚鼠的平均 SE 差异无统计学意义 ($q = 2.62, P = 0.08$),而透镜诱导眼豚鼠的平均 SE 明显高于对侧对照眼,差异有统计学意义 ($q = 10.92, P < 0.01$);透镜诱导眼、对侧对照眼和正常对照眼视网膜组织中 C1q 和 C3 蛋白的表达量明显不同,差异均有统计学意义 (C1q: $F = 8.810, P = 0.003$; C3: $F = 14.490, P < 0.001$),其中透镜诱导眼视网膜中 C3 和 C1q 蛋白表达明显高于对侧对照眼,差异均有统计学意义 (C1q: $q = 4.14, P = 0.01$; C3: $q = 4.71, P = 0.005$),而对侧对照眼视网膜中 C1q 和 C3 蛋白表达与正常对照眼间差异均无统计学意义 (C1q: $q = 1.61, P = 0.27$; C3: $q = 2.82, P = 0.07$)。 **结论** 离焦性近视发生过程中存在视网膜组织的补体活化状态,补体过度活化可能参与近视的发生。

【关键词】 补体成分蛋白; 视网膜; 近视/病理生理学; 眼屈光; 新生豚鼠; 动物模型; 离焦

Expressions of complement factors C1q and C3 in retina with negative lens-defocused myopia in guinea pigs

Gao Tingting, Yang Xue, Long Qin. Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: Long Qin, Email: longqinbj@hotmail.com

[Abstract] Background High myopia is seriously harmful to visual function. To explore the mechanism of high myopia is significant for the prevention and treatment. Complement proteins C1q and C3 have emerged as critical mediators of synaptic refinement and plasticity, however, their effects in retina on myopia remain elusive. **Objective**

This study was to investigate the expressions of complement factors C1q and C3 in the retina with negative lens-defocused myopia in guinea pigs. **Methods** The use and care of animals complied with the application of Peking Union Medical College Hospital Laboratory Animal Welfare Ethics Committee. Twelve 3-day-old pigmented guinea pigs were assigned randomly to the lens-defocused group and the normal control group. The left eyes were covered by -10 D PMMA lens for 4 weeks as the defocused eye group, and the right eyes were covered using 0 D PMMA lens in the same way as the fellow control eye group. The right eyes of the normal guinea pigs were used as the normal control eye group. The refractive diopter of guinea pigs was examined by retinoscopy. The animals were sacrificed at the fourth week and the expressions of complement C1q and C3 in the retinas of guinea pigs were detected by Western blot.

Results The diptors were (-1.21 ± 0.71) D, $(+2.46 \pm 0.75)$ D and $(+1.75 \pm 0.50)$ D in the defocused eye group, normal eye group and the fellow eye group at the fourth week, showing a significant difference among the groups ($F = 51.55, P = 0.69$), and diptors were insignificantly different between the normal eye group and fellow eye group ($q =$

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.010

基金项目:国家自然科学基金项目(81070755)

作者单位:100730 北京,中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院眼科

通信作者:龙琴,Email:longqinbj@hotmail.com

2.62, $P=0.08$). However, the diopters of the defocused eye group were significantly higher than those of the fellow eye group ($q=10.92, P<0.01$). The expressions of C1q and C3 proteins in the retinas were significantly different among the defocused eye group, fellow eye group and normal eye group (C1q: $F=8.810, P=0.003$; C3: $F=14.490, P<0.001$), and expression levels of C1q and C3 proteins in the defocused eye group were significant higher than those of the fellow eye group (C1q: $q=4.14, P=0.01$; C3: $q=4.71, P=0.005$); while no significant differences were found between the fellow eye group and the normal eye group (C1q: $q=1.61, P=0.27$; C3: $q=2.82, P=0.070$).

Conclusions The expression levels of C1q and C3 up-regulate in the retinas with lens-defocused myopic animal model. Excessive complement activation in retinas may be involved in the development of myopia.

[**Key words**] Complement system proteins; Retina; Myopia/physiopathology; Refraction, ocular; Guinea pigs, newborn; Disease model, animal; Defocus

近视包括单纯性近视和病理性近视,中国中小学近视的发病率分别为 23.74% 和 20.81%,有逐年升高的趋势^[1]。近视的发生与遗传背景和环境因素有关^[2],但其确切的发病机制仍在不断的探索和完善过程中。本课题组既往的研究发现,病理性近视患者血清补体成分 C3 和总补体 CH50 水平升高,血清补体 C3 水平是病理性近视患者发生脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的主要危险因素之一,提示补体系统参与病理性近视的发病机制^[3]。近视动物模型为人类近视的病因和发病机制研究提供了极有价值的途径。研究证实,在视觉发育的过程中人为干扰正常的视觉反馈可改变动物的正视化进程,从而诱导近视的发生^[4],在这一进程中,视网膜成为接受异常视觉信号的首要环节,并通过释放或改变某些化学物质,最终导致近视的发生^[4-6]。本研究观察负透镜诱导豚鼠离焦性近视发生时视网膜组织中补体 C1q 和 C3 表达的变化,旨在进一步探讨近视发生与补体系统的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

出生 3 d 的健康雌性有色豚鼠(短毛英国种)12 只,体质量 70~90 g(中国医学科学院动物研究所提供),在自然照明环境下饲养。实验动物的管理和使用遵照动物伦理学要求。

-10.00 D 聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)镜片(直径为 11.50 mm,内弧曲率为 9.61 mm,外弧曲率为 25.03 mm)、平光 PMMA 镜片(北京京德嘉润贸易公司);兔抗小鼠补体 C1q 单克隆抗体(ab71940)、兔抗小鼠补体 C3 单克隆抗体(ab11871)(英国 Abcam 公司);羊抗兔 IgG 抗体(074-1516,美国 KPL 公司);增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)检测试剂盒(美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠离焦性近视模型的建立 将 12 只豚鼠按随机数字表法分为透镜诱导组($n=6$)和正常对照组($n=6$)。透镜诱导豚鼠左眼配戴 -10.00 D PMMA 镜片 4 周作为近视诱导眼组,右眼为以同样的方法佩戴平光 PMMA 镜片作为对侧对照眼组。透镜诱导组豚鼠所佩戴的 2 种 PMMA 镜片外形无法区分,分别标记,操作者不被告知佩戴镜片的具体屈光度。操作者在乙醚局部麻醉下剪除豚鼠眼眶周围的体毛,对眼睑及眼周皮肤消毒后用 5-0 缝线通过透镜边缘预设孔将 PMMA 镜片缝合于豚鼠眼周皮肤。研究期间发现缝线断裂或镜片脱落时及时重新缝合。正常对照组豚鼠不进行任何处理。

1.2.2 豚鼠屈光度的检测 豚鼠戴镜 4 周时用质量分数 0.5% 托吡卡胺滴眼液点眼 4 次,每次间隔 10 min,在睫状肌麻痹的状态下行带状光检影验光。验光结果用等效球镜屈光度(spherical equivalent, SE)(球镜屈光度加 1/2 散光度)表示,正常对照组豚鼠的右眼作为正常对照眼。

1.2.3 Western blot 法检测豚鼠视网膜中 C1q 和 C3 的表达量 豚鼠戴镜后 4 周经腹腔注射致死剂量的苯巴比妥钠注射剂处死豚鼠,立即摘除双侧眼球,用显微剪沿角巩膜缘 1.5 mm 剪开,去除角膜、晶状体、玻璃体及锯齿缘,保留视网膜组织,放入研钵中,在液氮冷冻状态下研磨成粉末,将粉末移入 1.5 ml 离心管中,加入 1 ml 裂解液(8 mol/L 尿素、质量分数 4% CHAPS 0.04 g、质量分数 1% DTT)重悬,振幅 21% 超声振荡 60 s,然后 14 000 $\times g$ 13 000 r/min 离心 10 min,上清液转入 1.5 ml 离心管,4 $^{\circ}C$ 冰箱保存。将 5 倍上样缓冲液(质量分数 2% SDS、pH 6.8 的 80 mmol/L Tris-HCl、体积分数 15% 甘油、体积分数 0.1% 溴酚兰)与相同体积总蛋白混合后以沸水加热 5 min,质量分数 15% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后将凝胶中的蛋白质经半干转移至硝酸纤维膜 1.5 h,将转移后的

硝酸纤维膜置于 37 ℃ 封闭液中封闭 2 h, PBST 漂洗 2 ~ 3 次后在膜上分别滴加兔抗小鼠 C1q (1 : 50) 或抗 C3 (1 : 50) 抗体, 4 ℃ 反应 12 h, 用 PBS 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 5 000), 室温摇床孵育 1 h, 再次洗膜后用 ECL 法显影, 用兔抗小鼠 GAPDH (1 : 200) 作为内参照, 将 C1q 或 C3 条带的吸光度 (A) 值与相应内参照 GAPDH A 值的比值作为目的蛋白在豚鼠视网膜中的表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 和 GraphPad Prism 5 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素干预随机分组三水平实验设计, 正常对照眼组、透镜诱导眼组和对侧对照眼组屈光度的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间的多重比较采用 SNK-*q* 检验; 视网膜组织中 C1q 和 C3 蛋白的表达量组间均数经 Levene 检验方差齐 (C1q: $P=0.59$; C3: $P=0.14$), 3 个组间总体差异比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 离焦性近视动物模型的诱导情况

戴镜后 4 周, 正常对照眼平均屈光度为 $(+2.46 \pm 0.75)$ D, 透镜诱导眼的平均屈光度为 (-1.21 ± 0.71) D, 对侧对照眼的 SE 屈光度为 $(+1.75 \pm 0.50)$ D, 3 个组间比较差异有统计学意义 ($F=51.55, P=0.69$), 其中透镜诱导眼豚鼠的近视度高于对侧对照眼 (2.96 ± 0.86) D, 2 个组间的差异有统计学意义 ($q=10.92, P < 0.01$), 而正常对照眼组与对侧对照眼组间豚鼠的平均屈光度差异无统计学意义 ($q=2.62, P=0.08$) (表 1)。

表 1 戴镜后 4 周透镜诱导眼组和正常对照眼组的屈光度、C1q 和 C3 的表达

组别	n	屈光度 (D) $\bar{x} \pm s$	C1q 蛋白表达		C3 蛋白表达	
			$\bar{x} \pm s$	95% CI	$\bar{x} \pm s$	95% CI
透镜诱导眼组	6	-1.21 ± 0.71^a	0.62 ± 0.10^a	0.12-1.12	1.19 ± 0.30^a	0.24-2.13
对侧对照眼组	6	$+1.75 \pm 0.50$	0.36 ± 0.20	0.07-0.65	0.82 ± 0.12	0.16-1.48
正常对照眼组	6	$+2.46 \pm 0.75$	0.26 ± 0.13	0.05-0.47	0.60 ± 0.06	0.12-1.08
F	51.550	8.810	8.810		14.490	
P	<0.001	0.003	0.003		<0.001	

注: 与各自的对侧对照眼组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK-*q* 检验) CI: 可信区间

2.2 各组豚鼠视网膜组织中 C1q 和 C3 蛋白的表达量比较

SDS-PAGE 电泳结果显示, C1q 与抗体反应后显示出的条带相对分子质量为 26 000, C3 显示出的条带相对分子质量为 187 000。戴镜后 4 周透镜诱导眼、对侧对照眼和正常对照眼豚鼠视网膜组织中 C1q 和 C3 蛋白的表达量明显不同, 差异均有统计学意义 (C1q: $F=8.810, P=0.003$; C3: $F=14.490, P < 0.001$), 其中透镜诱导眼组豚鼠视网膜组织中 C3 和 C1q 表达明显高于对侧对照眼组 (C1q: $q=4.14, P=0.01$; C3: $q=4.71, P=0.005$), 而对侧对照眼组视网膜组织中 C1q 和 C3 蛋白表达与正常对照眼组间差异均无统计学意义 (C1q: $q=1.61, P=0.27$; C3: $q=2.82, P=0.07$) (图 1, 表 1)。

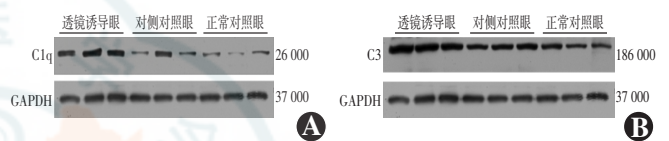


图 1 Western blot 法检测的各组豚鼠眼视网膜中目的蛋白表达的电泳图 A: C1q 蛋白在豚鼠视网膜中的表达 B: C3 蛋白在豚鼠视网膜中的表达 GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

3 讨论

本研究探讨了近视发生过程中视网膜组织是否存在补体系统的活化状态, 结果显示豚鼠负透镜诱导离焦性近视发生时存在视网膜组织中补体 C1q 和补体 C3 的表达升高, 进一步提示近视发生和发展过程中存在补体系统的参与。

高度近视与人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA)-DQB1 相关^[7-8], HLA 是一种强抗原系统, 具有免疫识别与调控功能, 多种与 HLA 相关的疾病均表现为自身免疫性疾病, 如 Graves 病、重症肌无力、多发性硬化症等^[9-10]。此外, 国外文献报道病理性近视患者存在血清中循环免疫复合物含量的增高以及抗胶原抗体的阳性^[9,11], 因此推测近视可能是一种免疫介导的胶原代谢紊乱性疾病, 研究发现的病理性近视血清补体成分增高的状态支持这一假设^[3]。在机体内影响免疫状态的因素中, 炎症往往是最常见、最重要的原因。补体系统作为机体内重要的生物反应系统, 参与体内多种病理生理过程, 是炎症反应的中心环节。正常情况下, 补体以非活性形式存在, 激活后可发挥作用, 体内存在 3 条补体激活途径: 经典途径、补体旁路途径和凝集素途径^[12]。C3 是体内最丰富的补体蛋白, 对于 C3 分子的裂解是补体活化的中心事件, 所有 3 条途径均涉及 C3, 干预 C3 活化可在一定程度上影响疾病的发展^[13]。补体 C1q 是补体经典激活途径

的初始蛋白,除启动经典激活途径外,通过 C1q 蛋白分子的胶原样区域调节成纤维细胞与细胞外基质的黏附功能是其重要功能之一^[13-15]。本研究发现,离焦性近视眼视网膜中补体 C1q 和 C3 蛋白表达的升高不仅进一步支持近视发生与补体系统活化的相关性,而且初步提示补体经典激活途径的参与。

补体系统由 30 余种蛋白分子所组成,与体内存在精细而复杂的各种机制相互作用。大量研究表明,许多补体成分均可影响基质金属蛋白酶的水平^[16-17],而基质金属蛋白酶系统的失衡已被证实与近视的发生密切相关,是后巩膜扩张、眼轴延长最重要的蛋白酶系统之一^[18]。与细胞外基质和基质金属蛋白酶系统失衡有关的全身性疾病,如冠心病、系统性红斑狼疮等以及多种眼部疾病,如年龄相关性黄斑变性、青光眼等经研究与补体系统作用也具有明显的相关性^[19-20]。除了基质金属蛋白酶系统,多种生长因子,如碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子等同样被证明与近视发生明显相关,与基质金属蛋白酶系统一起,被称为“近视信使”,而补体系统对上述因子同样具有调控作用^[21]。在视觉发育的过程中,视网膜接受异常视觉干扰刺激后发生局部微环境改变,导致补体系统活化,进一步影响基质金属蛋白酶系统的功能,从而导致近视发生。

本研究结果提示,豚鼠离焦性近视眼视网膜组织中存在补体的活化状态和补体经典激活通路的参与,但本研究仍存在不足。首先,本研究为透镜诱导的离焦性近视动物模型,为消除透镜缝合产生局部炎症反应所可能导致的包括补体系统等炎症因子的改变这一混杂因素,设计了 3 个组进行比较,即透镜诱导眼、自身对照眼和正常对照眼,结果显示对侧对照眼和正常对照眼视网膜组织中 C3 蛋白表达水平差异虽无统计学意义,但存在差异趋势,由于本研究样本量较小,存在随机误差,如增加样本量,不排除出现差异有统计学意义的可能,同时也提示本研究透镜缝合及愈合过程中存在局部补体系统参与的炎症反应上调现象;其次,本研究仅为蛋白水平的检测,所测蛋白仅涉及补体系统中的 2 种成分,时间点为近视已经形成之后,尚不能明确补体系统的活化是近视发生的原因或结果。因此应在此基础上加大样本量,采用动态观测手段,观察实验性近视模型不同时间点的补体水平,同时增加相关“近视信使”的检测,从而探讨近视发生时补体活化的上游和下游调控机制。

参考文献

[1] 李华. 青少年近视的发病率调查及原因分析[J]. 医学信息, 2012,

- 25(6): 334-335. doi:10.3969/j.issn.1006-1959.2012.06.379.
- [2] 陈静. 近视病因与发病机制的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(4): 376-379. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.04.022.
- [3] Long Q, Ye J, Li Y, et al. C-reactive protein and complement components in patients with pathological myopia[J]. *Optom Vis Sci*, 2013, 90(5): 501-506. doi:10.1097/OPX.0b013e31828daa6e.
- [4] Smith EL 3rd, Hung LF, Arumugam B. Visual regulation of refractive development: insights from animal studies[J]. *Eye (Lond)*, 2014, 28(2): 180-188. doi:10.1038/eye.2013.277.
- [5] Dong F, Zhi Z, Pan M, et al. Inhibition of experimental myopia by a dopamine agonist: different effectiveness between form deprivation and hyperopic defocus in guinea pigs[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 2824-2834.
- [6] Huang J, Qu XM, Chu RY. Expressions of cellular retinoic acid binding proteins I and retinoic acid receptor- β in the guinea pig eyes with experimental myopia[J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(2): 131-136. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2011.02.04.
- [7] Zejmo M, Czepita D, Miklaszewicz A, et al. Associations between high myopia and class II HLA [J/OL]. *Acta Ophthalmol*, 2010, 88(7): e281[2014-11-17] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.17553768.2009.01724.x/abstract>; jsessionid=111E539720F255394056FB1906D436CB.f04t04. doi:10.1111/j.1755-3768.2009.01724.x.
- [8] 李寿玲, 季碧霞, 褚仁远, 等. 病理近视与人类白细胞抗原-DQB1 基因的关联性研究[J]. 中华眼科杂志, 2001, 37(4): 263-266. doi:10.3760/j.issn.0412-4081.2001.04.007.
- [9] Płoski R, Szymański K, Bednarczuk T. The genetic basis of Graves' disease[J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(8): 542-563. doi:10.2174/138920211798120772.
- [10] Cree BA. Multiple sclerosis genetics[J]. *Handb Clin Neurol*, 2014, 122: 193-209. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00042-X.
- [11] Lazuk AV, Slepova OS. Study of immune reactions to collagen in patients with myopia[J]. *Vestn Oftalmol*, 1995, 111(2): 14-16.
- [12] Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms[J]. *J Immunol*, 2013, 190(8): 3831-3838. doi:10.4049/jimmunol.1203487.
- [13] Ricklin D. Manipulating the mediator: modulation of the alternative complement pathway C3 convertase in health, disease and therapy[J]. *Immunobiology*, 2012, 217(11): 1057-1066. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.016.
- [14] Nayak A, Pednekar L, Reid KB, et al. Complement and non-complement activating functions of C1q: a prototypical innate immune molecule[J]. *Innate Immun*, 2012, 18(2): 350-363. doi:10.1177/1753425910396252.
- [15] Bordin S, Ghebrehiwet B, Page RC. Participation of C1q and its receptor in adherence of human diploid fibroblast[J]. *J Immunol*, 1990, 145(8): 2520-2526.
- [16] Gonzalez JM, Franzke CW, Yang F, et al. Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(2): 838-849. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.024.
- [17] Speidl WS, Kastl SP, Hutter R, et al. The complement component C5a is present in human coronary lesions in vivo and induces the expression of MMP-1 and MMP-9 in human macrophages in vitro[J]. *FASEB J*, 2011, 25(1): 35-44. doi:10.1096/fj.10-156083.
- [18] Frost MR, Norton TT. Alterations in protein expression in tree shrew sclera during development of lens-induced myopia and recovery[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 322-336. doi:10.1167/iovs.11-8354.
- [19] Khandhadia S, Cipriani V, Yates JR, et al. Age-related macular degeneration and the complement system[J]. *Immunobiology*, 2012, 217(2): 127-146. doi:10.1016/j.imbio.2011.07.019.
- [20] Ren L, Danias J. A role for complement in glaucoma? [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 703: 95-104. doi:10.1007/978-1-4419-5635-4_7.
- [21] Qing X, Koo GC, Salmon JE. Complement regulates conventional DC-mediated NK-cell activation by inducing TGF- β 1 in Gr-1 + myeloid cells[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(7): 1723-1734. doi:10.1002/eji.201142290.

(收稿日期: 2014-12-27)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)