

负透镜诱导豚鼠视网膜中 γ -氨基丁酸及其受体的表达

沙芳 赵雯 徐超立 王玲 张小燕 吴建峰 毕爱玲 郭大东 毕宏生

【摘要】 背景 研究表明,抑制性氨基酸神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)在近视的发生和发展过程中发挥关键作用,GABA 及 GABA 受体拮抗剂对近视发生的抑制作用已被证实,但相关作用机制的研究鲜见报道。目的 探讨负透镜诱导性近视(LIM)豚鼠视网膜中 GABA 及其受体亚型表达的变化,探讨 GABA 及 GABA 受体拮抗剂抑制近视发生的机制。方法 采用随机数字表法将 40 只 3 周龄健康三色短毛豚鼠随机分为正常对照组和模型组。正常对照组取右眼作为正常对照眼,模型组右眼佩戴-10 D 透镜 4 周以诱导近视模型作为实验眼,左眼不戴镜作为对照眼。分别于造模前及造模后 4 周用 A 型超声法和带状光检影法测量各组豚鼠的眼轴长度和屈光度;于造模后 4 周断颈法处死豚鼠并分离视网膜,采用高效液相色谱分析(HPLC)法检测豚鼠视网膜中 GABA 含量的变化,采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测豚鼠视网膜中 GABA 受体 mRNA 的相对表达量。结果 造模后 4 周,模型组实验眼、正常对照眼和模型组对照眼屈光度分别为 (-3.39 ± 0.70) 、 (1.03 ± 0.68) 和 (0.77 ± 0.64) D,模型组实验眼近视屈光度较正常对照眼和模型组对照眼均明显增大,差异均有统计学意义($t = -16.382, -17.113$, 均 $P < 0.05$);模型组实验眼、正常对照眼和模型组对照眼眼轴长度分别为 (8.62 ± 0.08) 、 (8.31 ± 0.05) 和 (8.32 ± 0.05) mm,模型组实验眼眼轴较正常对照眼和模型组对照眼明显延长,差异均有统计学意义($t = 10.981, 15.838$, 均 $P < 0.05$);豚鼠正常对照眼、模型组实验眼、模型组对照眼视网膜中 GABA 含量分别为 (14.83 ± 1.20) 、 (18.63 ± 1.58) 和 (15.74 ± 0.96) $\mu\text{mol/g}$,模型组实验眼视网膜中 GABA 含量明显高于正常对照眼和模型组对照眼,差异均有统计学意义($t = -6.045, 6.876$, 均 $P < 0.05$);模型组实验眼视网膜中 GABA_A受体、受体 GABA_C受体 mRNA 的相对表达量明显高于正常对照眼,差异均有统计学意义($t = -3.211, -2.532$, 均 $P < 0.05$);模型组实验眼视网膜中 GABA_A受体、受体 GABA_C受体 mRNA 的相对表达量明显高于模型组对照眼,差异均有统计学意义($t = 2.512, 5.645$, 均 $P < 0.05$),而 3 个组间 GABA_B受体 mRNA 的相对表达量差异无统计学意义($F = 2.676, P > 0.05$)。结论 LIM 豚鼠视网膜中 GABA 及 GABA_A受体 mRNA、GABA_C受体 mRNA 表达上调,而 GABA_B受体 mRNA 表达无显著变化。

【关键词】 近视/透镜诱导性; γ -氨基丁酸; γ -氨基丁酸受体; 视网膜

Expressions of retinal γ -aminobutyric acid and its receptors in retina of guinea pig eyes after lens induction

Sha Fang, Zhao Wen, Xu Chaoli, Wang Ling, Zhang Xiaoyan, Wu Jianfeng, Bi Ailing, Guo Dadong, Bi Hongsheng. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, China

Corresponding author: Bi Hongsheng, Email: hongshengbi@126.com

【Abstract】 **Background** Researches showed that gamma aminobutyric acid (GABA), an inhibitory amino acid neurotransmitter, plays a critical role in myopia refractive development. The inhibitory roles of GABA and its receptors antagonists have been confirmed. However, the study on whether GABA participates in the mechanisms of lens-induced myopia (LIM) in guinea pigs is rare. **Objective** The aim of this study was to explore the alteration of expression of GABA and its three receptor subtypes in the retinas of guinea pigs with LIM. **Methods** Three-

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.006

基金项目:国家自然科学基金项目(81173440,81303081);山东省科技发展计划项目(2011GGH21835,2011GGB14097);山东省医药卫生科技发展计划项目(2011HD014);济南市高校自主创新计划项目(201102061)

作者单位:250002 济南,山东中医药大学[沙芳(2012 级硕士研究生)、赵雯、徐超立、王玲、吴建峰];250001 济南,山东中医药大学第二附属医院眼科(张小燕);250002 济南,山东中医药大学附属眼科医院 山东中医药大学眼科研究所(毕爱玲、郭大东、毕宏生)

通信作者:毕宏生, Email: hongshengbi@126.com

week-old healthy guinea pigs were randomized into the normal control group and the model group. The right eyes of the guinea pigs in the normal control group served as the normal control eyes, and the right eyes of the guinea pigs in the model group monocularly fitted with -10 D lens as the experimental eyes, and the fellow eyes of the model group were used as the self-control eyes. The refraction and axial length of eyes were measured by A-sonography and streak retinoscopy before and 4 weeks after modeling. The guinea pigs were sacrificed at the fourth week after modeling, and the retinas were isolated. GABA content in the retinas was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the relative expression levels of subtypes of GABA receptors were detected by real-time PCR. All the results were compared among the groups. All experimental protocols and animal handling procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, and were in accordance with the statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the use of animals. **Results** At the fourth week after modeling, the mean diopter of the model eyes was (-3.39 ± 0.70) D, which was significantly higher than (1.03 ± 0.68) D of the normal control eyes and (0.77 ± 0.64) D of the self-control eyes in the model group ($t = -16.382, -17.113$, both at $P < 0.05$). The mean axial length of the experimental eyes was (8.62 ± 0.08) mm, which was increased in comparison with (8.31 ± 0.05) mm of the normal control eyes and (8.32 ± 0.05) mm of the self-control eyes in the model group ($t = 10.981, 15.838$, both at $P < 0.05$). The GABA contents were (14.83 ± 1.20) , (18.63 ± 1.58) and (15.74 ± 0.96) $\mu\text{mol/g}$ in the normal control eyes, experimental eyes and self-control eyes in the model group, showing significant differences between the experimental eyes and normal control eyes or self-control eyes ($t = -6.045, 6.876$, both at $P < 0.05$). The relative expression levels of GABA_A and GABA_C receptors mRNA in the retinas were significantly increased in the experimental eyes compared with the normal control eyes ($t = -3.211, -2.532$, both at $P < 0.05$) and the self-control eyes in the model group ($t = 2.512, 5.645$, both at $P < 0.05$). However, no significant difference was seen in the relative expression of GABA_B receptors mRNA among the three groups ($F = 2.676, P > 0.05$). **Conclusions** The expressions of GABA as well as the mRNA of GABA_A and GABA_C receptor up-regulate, but there is no obvious alteration in the expression of mRNA of GABA_B receptor in the LIM eyes.

[Key words] Myopia/lens-induced; Gamma aminobutyric acid; Gamma aminobutyric acid receptor; Retina

负透镜诱导的近视动物模型与人类近视有较多相似之处^[1-2], 因此对透镜诱导性近视 (lens-induced myopia, LIM) 的研究有助于加深我们对近视的认识。近视的病理机制涉及视网膜、巩膜、脉络膜和视觉中枢信号传导途径的改变, 其中视网膜信号通路在近视中起关键作用^[3]。研究表明, 视网膜上有多种神经递质参与近视的发展^[4-6], 其中抑制性神经递质 γ -氨基丁酸 (gamma aminobutyric acid, GABA) 在近视的发生和发展中发挥着关键作用^[7-8]。GABA 与视网膜上 GABA_A、GABA_B、GABA_C 3 种受体亚型相结合参与视觉的发育过程, 其中 GABA_C 受体在视网膜上主要分布于双极细胞, GABA_A 受体分布于所有视网膜神经细胞的突触前膜及突触后膜, GABA_B 受体分布于无长突细胞和视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 突触后膜。目前, 关于近视患者视网膜 GABA 的研究多采用小鸡作为动物模型, 对 GABA 在豚鼠近视发病中作用的研究鲜见报道。豚鼠作为哺乳动物, 眼球结构和生理与人类更为接近^[9], 本研究检测 LIM 豚鼠视网膜 GABA 及其受体表达的变化, 为进一步探讨人类近视的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

3 周龄健康英国种三色短毛豚鼠 40 只 (河南康达实验动物有限公司), 体质量约为 150 g, 经眼部检查排除白内障、角膜病变、近视等眼部疾患。采用随机数字表法将豚鼠随机分为正常对照组 20 只和模型组 20 只。正常对照组不作任何处理, 取右眼为正常对照眼; 模型组右眼佩戴 -10 D 透镜诱导 4 周为实验眼, 左眼不作任何处理, 作为对照眼。本研究经山东中医药大学眼科研究所伦理委员会批准, 实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 有关动物使用的声明。

1.2 豚鼠屈光度及眼轴长度的测量

实验前及造模 4 周时采用带状光检影法对各组豚鼠的双眼进行屈光度测定, 检影由同一验光师完成。检查前用质量分数 1% 盐酸环喷托酯滴眼液 (美国爱尔康公司) 点眼扩瞳, 5 min 点眼 1 次, 连续 4 次, 点眼后 30 min 进行测定, 屈光度为垂直和水平 2 条主子午线检影结果的平均值。采用眼科 A 型超声 (法国 Quantel Medical 公司) 行眼轴长度的测量, 根据参考文

献[1]进行参数重设置,前房传播速度为 1 557 m/s,玻璃体传播速度为 1 540 m/s,晶状体传播速度为 1 723 m/s。A 型超声探头垂直于角膜顶点进行测量,手动模式连续测量 10 次,取平均值。测量前用盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社)点眼行眼球表面麻醉,前后均由同一技师操作。实验前配对 *t* 检验法证实正常对照组豚鼠左右眼间及模型组豚鼠模型眼与对照眼间屈光度及眼轴长度的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),故纳入右眼进行研究。

1.3 高效液相色谱分析法检测豚鼠视网膜中 GABA 含量

1.3.1 标准品及样品制备

精密称取 GABA 标准品适量,置于 25 ml 量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至刻度,作为贮备液。负透镜诱导后 4 周断颈处死各组豚鼠,快速摘除眼球,用显微剪沿角巩膜缘剪开,去除角膜、晶状体及玻璃体,取出视网膜,液氮速冻,放入 -80°C 冰箱保存。正常对照组、模型组各取 10 只豚鼠视网膜,采用高效液相色谱分析(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测视网膜中 GABA 含量,其余视网膜用实时荧光定量 PCR 法检测 GABA 受体 mRNA 的相对表达。HPLC 法检测前将样品取出,准确称量,冰上匀浆后放入 1.5 ml EP 管中,按质量(mg):体积(μl)为 1:10 的标准加入 0.4 mol/L 高氯酸,离心半径 10 cm, 4°C 条件下 10 000 r/min 离心 20 min,取上清。参照马晓丽等^[10]的方法进行标准品及样品的衍生化实验,以 0.4 mol/L 高氯酸溶液作为阴性对照,对照品的衍生方法同前。最后将标准品和样品用 0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 检测。

1.3.2 色谱条件

采用 Ultimate 3000 型高效液相色谱-紫外检测器(德国戴安公司)及 Waters C18(2.1 mm \times 150.0 mm, 3 μm)色谱柱。流动相 A:称取 12.6 g 三水合乙酸钠,加水 925 ml,溶解后用冰醋酸调至 pH 6.5,然后加乙腈 75 ml,混匀,用 0.22 μm 滤膜过滤。流动相 B:甲醇-乙腈-水体积比为 20:60:20。流速 0.8 ml/min,检测波长为 254 nm,进样量为 1 μl ;柱温为 35°C 。梯度洗脱:0 min,0% B;6 min,6% B;15 min,9% B;19 min,45% B;26 min,100% B;30 min,0% B。

1.3.3 标准曲线的绘制

精密吸取标准品,分别稀释为倍比质量浓度 86.05、172.10、258.15、344.20、430.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。按以上色谱条件进样,以峰面积 *Y* 为纵坐标,标准品浓度 *X* 为横坐标进行回归计算,得到回归方程与线性关系为 $Y = 18.370X + 5.629$ ($r = 0.999$)。根据标准曲线,由峰面积计算各组视网膜中 GABA 含量($\mu\text{mol}/\text{g}$)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测视网膜中 GABA 受体 mRNA 的相对表达

1.4.1 引物设计与合成

根据 PubMed Nucleotide GenBank 中提供的豚鼠 GABA 受体和 β -actin mRNA 序列,应用 DNASTar 引物设计软件设计引物。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。GABA_A 受体上游引物:5'-AGGAGGACCATCCCTTCGAGTAT-3',下游引物:5'-AAGAAATAGAAGTGGCCAACAGTGA-3',产物大小为 172 bp;GABA_B 受体上游引物:5'-GCTACTATGACAGCACCAAGGATGA-3',下游引物:5'-AAAGGACAGACAGACAACAGCGAGG-3',产物大小为 185 bp;GABA_C 受体上游引物:5'-AAGAGTCTCCTGGGCATCACGA-3',下游引物:5'-CTTCCGCTCCTTCCGCTCCTG-3',产物大小为 199 bp。 β -actin 上游引物为:5'-ACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATG-3',下游引物为:5'-CTCGGCCGTGGTGGTGAAGTGTAGC-3',产物大小为 284 bp。

1.4.2 总 RNA 提取及第 1 链 cDNA 的合成

用 TRIpure(北京艾德莱生物科技有限公司)常规提取视网膜组织样品的 RNA, -80°C 保存备用。微量紫外分光光度计(北京凯奥公司)测量 RNA 的吸光度(*A*)值,计算出波长为 260 nm 与 280 nm 处的 *A* 值比为 1.8~2.0。转录子第 1 链 cDNA 合成试剂盒(美国 Roche 公司)进行 cDNA 的合成,总 RNA 模板 2.0 μl ,寡聚糖(dT)₁₈引物 1.0 μl ,5 倍缓冲液 4.0 μl ,RNase 抑制剂 0.5 μl ,dNTP 2.0 μl ,RNase 0.5 μl ,加 DEPC 水至总体积 20.0 μl , 55°C 孵育 30 min, 85°C 逆转录酶失活 5 min,冰上冷却后 -20°C 保存备用。

1.4.3 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 测定视网膜中 GABA 受体 mRNA 的表达

采用 LightCycler[®] 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司)检测 GABA 受体 mRNA 含量。PCR 总体积为 20.0 μl , LightCycler 480 SYBR Green I Master(美国 Roche 公司)10.0 μl ,cDNA 模板 1.0 μl ,上下游引物各 0.5 μl ,DEPC 水 8.0 μl 。PCR 程序为: 95°C 预变性 10 min,然后 95°C 变性 10 s, 63°C 退火 10 s, 72°C 延伸 20 s,共 45 个循环,最后 45°C 冷却 10 s。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法,以 β -actin 为内参,反应结束后用计算机自带软件对视网膜 GABA_A、GABA_B、GABA_C 受体 mRNA 的相对表达量进行定量分析,将正常对照眼结果标准化为 1,其他各组标准化后的值与正常对照眼比较得到基因相对表达量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(软件序列号:4625180487,授权码:25437F4725C0882CFCDA,美国

SPSS 公司)进行统计分析。本研究测试指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组多因素多水平实验设计,豚鼠正常对照眼、模型组实验眼和模型组对照眼在造模前后的屈光度、眼轴长度变化的差异比较均采用重复测量两因素方差分析;豚鼠正常对照眼、模型组实验眼和模型组对照眼视网膜中 GABA 含量的差异比较及视网膜中 GABA_A、GABA_B、GABA_C 受体 mRNA 相对表达量的差异比较均采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠眼屈光度及眼轴长度的变化

对各组造模前后的屈光度和眼轴长度进行比较,结果显示各组间屈光度和眼轴长度明显不同,差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 64.643, 41.969$, 均 $P < 0.05$);造模前后屈光度和眼轴长度的差异均有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 730.751, 648.502$, 均 $P < 0.01$);各组和造模前后时间点间均存在交互作用 ($F_{\text{交互作用}} = 74.283, 32.269$, 均 $P < 0.05$)。模型组实验眼造模前后屈光度和眼轴长度差异均有统计学意义 ($t = 20.918, -15.776$, 均 $P < 0.01$);正常对照眼造模前后屈光度和眼轴长度差异均有统计学意义 ($t = 16.884, -24.776$, 均 $P < 0.05$),模型组对照眼造模前后屈光度和眼轴长度差异均有统计学意义 ($t = 10.264, -11.278$, 均 $P < 0.05$)。造模后 4 周,与正常对照眼比较,模型组实验眼近视屈光度增加,眼轴变长,差异均有统计学意义 ($t = -16.382, 10.981$, 均 $P < 0.05$);模型组实验眼近视屈光度和眼轴长度均明显大于模型组对照眼,差异均有统计学意义 ($t = -17.113, 15.838$, 均 $P < 0.05$);正常对照眼与模型组对照眼间屈光度及眼轴长度的差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 1)。

表 1 造模前及造模后 4 周各组豚鼠屈光度及眼轴长度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	造模前		造模后	
		屈光度 (D)	眼轴长度 (mm)	屈光度 (D)	眼轴长度 (mm)
正常对照眼	20	4.17 ± 0.44	7.93 ± 0.06	1.03 ± 0.68 ^{ab}	8.31 ± 0.05 ^{ab}
模型组实验眼	20	4.14 ± 0.66	7.94 ± 0.07	-3.39 ± 0.70 ^c	8.62 ± 0.08 ^c
模型组对照眼	20	4.24 ± 0.55	7.95 ± 0.06	0.77 ± 0.64 ^{ab}	8.32 ± 0.05 ^{ab}

注:屈光度: $F_{\text{分组}} = 64.643, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 730.751, P < 0.01; F_{\text{交互作用}} = 74.283, P < 0.05$ 。眼轴长度: $F_{\text{分组}} = 41.969, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 648.502, P < 0.01; F_{\text{交互作用}} = 32.269, P < 0.05$ 。与造模后各自的模型组实验眼比较, ^a $P < 0.05$;与各自组内造模前比较, ^b $P < 0.05, ^c P < 0.01$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

2.2 各组豚鼠视网膜中 GABA 含量的变化

豚鼠正常对照眼、模型组实验眼、模型组对照眼视网膜匀浆中 GABA 含量分别为 (14.83 ± 1.20) 、 (18.63 ± 1.58) 和 $(15.74 \pm 0.96) \mu\text{mol/g}$, 3 个组的总体比较差异有统计学意义 ($F = 24.236, P < 0.01$), 其中正常对照眼与模型组对照眼比较, 视网膜中 GABA 含量的差异无统计学意义 ($t = -1.686, P > 0.05$), 与正常对照眼比较, 模型组实验眼视网膜中 GABA 含量明显升高, 差异有统计学意义 ($t = -6.045, P < 0.05$); 模型组实验眼视网膜中 GABA 含量亦明显高于模型组对照眼, 差异有统计学意义 ($t = 6.876, P < 0.05$) (图 1, 2)。

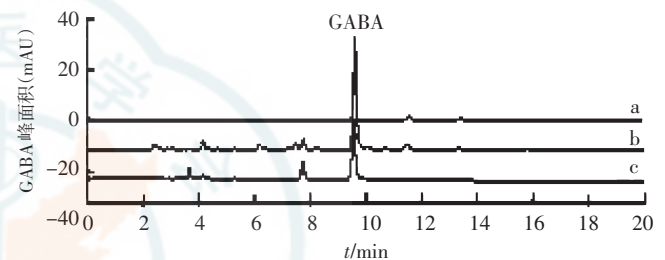


图 1 豚鼠视网膜中 GABA 检测的 HPLC 色谱图 a: 阴性对照; b: 样品; c: 标准品 GABA: γ -氨基丁酸

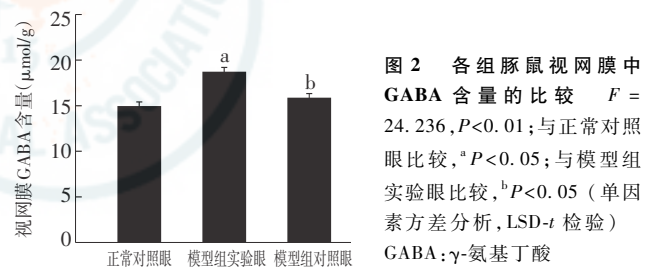


图 2 各组豚鼠视网膜中 GABA 含量的比较 $F = 24.236, P < 0.01$; 与正常对照眼比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组实验眼比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) GABA: γ -氨基丁酸

2.3 豚鼠视网膜中 GABA_A、GABA_B 及 GABA_C 受体 mRNA 的相对表达

正常对照眼、模型组实验眼及模型组对照眼视网膜中 GABA_A 受体、GABA_C 受体 mRNA 的相对表达量差异均有统计学意义 ($F = 6.134, 5.106$, 均 $P < 0.05$); 与正常对照眼比较, 模型组实验眼视网膜中 GABA_A 受体、GABA_C 受体 mRNA 的相对表达量均增加, 差异均有统计学意义 ($t = -3.211, -2.532$, 均 $P < 0.05$); 模型组实验眼视网膜中 GABA_A 受体、GABA_C 受体 mRNA 的相对表达量均明显高于模型对照眼, 差异均有统计学意义 ($t = 2.512, 5.645$, 均 $P < 0.05$), 但正常对照眼与模型对照眼间视网膜 GABA_A 受体、GABA_C 受体 mRNA 的相对表达量差异均无统计学意义 ($t = -0.122, -0.514$, 均 $P > 0.05$), 而正常对照眼、模型组实验眼及模型组对照眼间 GABA_B 受体 mRNA 的相对表达量差异无统计学意义 ($F = 2.676, P > 0.05$) (表 2)。

表 2 各组豚鼠造模后 4 周视网膜中 GABA_A、GABA_B 及 GABA_C 受体 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	GABA _A 受体 mRNA	GABA _B 受体 mRNA	GABA _C 受体 mRNA
正常对照眼	10	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00	1.00±0.00 ^a
模型组实验眼	10	1.14±0.11	1.07±0.14	1.27±0.07
模型组对照眼	10	1.01±0.12 ^a	0.99±0.08	1.05±0.10 ^a
F		6.134	2.676	5.106
P		0.016	0.087	0.013

注:与模型组实验眼比较,^aP<0.05(单因素方差分析,LSD-t 检验)

GABA:γ-氨基丁酸

3 讨论

GABA 是脊椎动物中枢神经系统和视网膜上广泛分布的抑制性神经递质,参与神经系统的生长发育,并与学习、记忆、视觉可塑性等功能有关^[11-12]。GABA 由谷氨酸脱羧酶催化 L-谷氨酸脱羧产生,其受体分为 GABA_A、GABA_B 和 GABA_C,且在脊椎动物视网膜上均有表达。GABA_A受体与 GABA_C受体属于离子型受体,形成配体门控 Cl⁻通道;GABA_B受体属于 G 蛋白耦联受体,伴有 K⁺和 Ca²⁺通道^[11]。其中,GABA_C受体在中枢神经中主要分布在视网膜上且含量丰富^[13],与视网膜视觉信号传递密切相关。GABA_A受体是异聚物五聚体,由 5 个亚基围绕 Cl⁻通道结合而成,其亚基包括 α₁₋₆、β₁₋₄、γ₁₋₃、δ、ε、θ和π;GABA_C受体为 GABA_A受体的亚型,完全由 ρ亚基组成^[14]。因此,GABA_A受体与 GABA_C受体在结构与功能方面有很高的相似性。本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 LIM 豚鼠视网膜中 3 种 GABA 受体亚型表达的变化,发现豚鼠近视眼视网膜中 GABA_A受体和 GABA_C受体 mRNA 的表达变化一致,提示 2 种受体在近视发生和发展过程中可能具有近似的作用。

Chebib 等^[14]采用给小鸡佩戴-15 D 透镜的方法建立 LIM 模型,证实玻璃体腔注射顺式和反式 3-ACBPBA (GABA_C受体拮抗剂)能阻止近视发展,抑制玻璃体腔前后径增长,且抑制近视的效果呈剂量依赖性。Stone 等^[7]研究发现,玻璃体腔注射 GABA_A、GABA_B及 GABA_C受体拮抗剂均能抑制小鸡形觉剥夺性近视(form-deprivation myopia, FDM)模型眼轴的生长,只是作用效果有所不同:GABA_A受体拮抗剂抑制近视主要体现在抑制眼球赤道部增长,而抑制眼轴增长的作用微弱;GABA_C受体拮抗剂抑制近视呈现对眼轴、赤道部增长的同等抑制效应;GABA_B受体拮抗剂抑制近视主要作用于眼轴。另有研究显示,GABA 能药物可影响 LIM 小鸡巩膜成纤维细胞 DNA 和黏多糖的

含量,GABA 拮抗剂可通过巩膜机制阻止近视发展^[8]。本研究采用 HPLC 法检测到的视网膜 GABA 含量升高与实时荧光定量 PCR 检测的 GABA_A受体、GABA_C受体 mRNA 表达变化趋势相一致,提示 GABA 受体的表达与 LIM 豚鼠近视的发展密切相关,也意味着通过抑制 GABA 受体可能能够对豚鼠近视的发展产生抑制作用,该结果支持了在其他动物模型研究中发现的 GABA 受体拮抗剂可抑制近视的结论。但是,实验中还发现近视眼视网膜 GABA_B受体 mRNA 的表达无明显变化,推测可能与造模方式、造模时间或实验动物的种属差异等因素有关。另外,3 种 GABA 受体亚型在视网膜上的分布不同^[7,13],且不同部位的视网膜细胞所行使的功能各异^[15-16],因此 3 种 GABA 受体亚型在近视中所起的作用可能也不尽相同;GABA 3 种受体亚型在视网膜所占比例不同,GABA_B受体仅占 25%^[17],产生的影响可能较其他 2 种受体弱,以致实验检测不到其在近视眼中的明显变化;GABA_B受体参与近视的发生和发展也许并非通过视网膜信号通路,GABA 参与近视的发展也可能是通过巩膜机制^[18]或视觉中枢^[19]来发挥作用的。

近年来,还有研究将视网膜电图(electroretinogram, ERG)用于近视眼视网膜功能的评估,并发现 ERG 与眼轴长度、视网膜厚度以及近视程度有一定的相关性^[20-21]。临床研究表明,近视眼 ERG 的 b 波振幅降低幅度与近视程度有关^[22];动物实验则发现,GABA 受体,尤其是 GABA_A受体和 GABA_C受体的变化可对 ERG 的 a 波及 b 波产生影响^[23]。结合本研究结果,模型组实验眼视网膜 GABA_A受体与 GABA_C受体表达的增高可能导致 ERG 的 b 波振幅降低,即抑制 GABA_A受体与 GABA_C受体表达可能增加 b 波振幅。Kapousta-Bruneau^[24]的研究却发现,大鼠视网膜 GABA_A与 GABA_C受体拮抗剂对 ERG 的 b 波作用相反,荷包牡丹碱(GABA_A受体拮抗剂)增加 b 波振幅,而 3-APA(GABA_C受体拮抗剂)降低 b 波振幅。分析原因,首先可能是由于物种和动物模型的差异;其次,导致 2 种受体拮抗剂作用效果相反的原因可能是 GABA_A受体与 GABA_C受体的电生理反应不同^[13]。虽然 GABA_A受体与 GABA_C受体都属于离子型受体^[11],但与 GABA_A受体相比,GABA_C受体活化和失活很慢^[25-26];在分子水平,GABA_C受体单通道电导较低,平均开放时间较长^[27]。以上特性可能导致 GABA_A受体与 GABA_C受体在 ERG 中产生作用的效果不同,同时也提示近视眼视网膜 GABA_A受体与 GABA_C受体表达

变化可能与两者对正常动物模型 ERG 的影响效果不一致。由此可见, GABA_A受体与 GABA_C受体在视网膜信号通路中发挥关键作用。本研究结果也支持这一理论,但近视相关的神经递质及受体变化的先后顺序并不明确,是神经递质变化导致相应受体表达变化,还是受体变化导致神经递质分泌变化? 两者的先后顺序关系还需进一步验证。根据实验结果可基本概括出 GABA 在豚鼠 LIM 中可能的作用机制是:异常视觉信号的输入→视网膜抑制性神经递质 GABA 分泌增加及 GABA_A受体、GABA_C受体表达上调→激活视网膜信号通路→远视离焦性近视产生。总之,探讨与近视相关的神经递质具有重要的价值,抑制性神经递质 GABA 及其受体在近视眼视网膜作用机制中具有重要作用,为近视的临床防治研究提供了新的思路。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Ganesan P, Wildsoet CF. Pharmaceutical intervention for myopia control[J]. *Expert Rev Ophthalmol*, 2010, 5(6): 759-787. doi:10.1586/eop.10.67.
- [3] Stone RA, Pardue MT, Iuvone PM, et al. Pharmacology of myopia and potential role for intrinsic retinal circadian rhythms[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 114: 35-47. doi:10.1016/j.exer.2013.01.001.
- [4] McBrien NA, Jobling AI, Truong HT, et al. Expression of muscarinic receptor subtypes in tree shrew ocular tissues and their regulation during the development of myopia[J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 464-475.
- [5] McCarthy CS, Megaw P, Devadas M, et al. Dopaminergic agents affect the ability of brief periods of normal vision to prevent form-deprivation myopia[J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(1): 100-107. doi:10.1016/j.exer.2006.09.018.
- [6] Yang JW, Xu YC, Sun L, et al. 5-hydroxytryptamine level and 5-HT2A receptor mRNA expression in the guinea pigs eyes with spectacle lens-induced myopia[J]. *Int J Ophthalmol*, 2010, 3(4): 299-303. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2010.04.05.
- [7] Stone RA, Liu J, Sugimoto R, et al. GABA, experimental myopia, and ocular growth in chick[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(9): 3933-3946. doi:10.1167/iovs.02-0774.
- [8] Christian PG, Harkin DG, Schmid KL. GABAergic agents modify the response of chick scleral fibroblasts to myopic and hyperopic eye cup tissues[J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(2): 172-187. doi:10.3109/02713683.2013.834941.
- [9] Zhou X, Ye J, Willcox MD, et al. Changes in protein profiles of guinea pig sclera during development of form deprivation myopia and recovery[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2163-2174.
- [10] 马晓丽, 赵东升, 孙自增, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定新疆金鸡菊中游离氨基酸[J]. *中成药*, 2012, 34(12): 2447-2449.
- [11] Chebib M, Hinton T, Schmid KL, et al. Novel, potent, and selective GABA_C antagonists inhibit myopia development and facilitate learning and memory[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328(2): 448-457. doi:10.1124/jpet.108.146464.
- [12] Heimel JA, van Versendaal D, Levelt CN. The role of GABAergic inhibition in ocular dominance plasticity[J]. *Neural Plast*, 2011, 2011: 391763 [2013-11-24]. <http://www.hindawi.com/journals/np/2011/391763/>. doi:10.1155/2011/391763.
- [13] Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21(1): 16-19.
- [14] Chebib M, Gavande N, Wong KY, et al. Guanidino acids act as rho1 GABA(C) receptor antagonists[J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(10): 1704-1711. doi:10.1007/s11064-009-9968-x.
- [15] Bertolesi GE, Hehr CL, McFarlane S. Wiring the retinal circuits activated by light during early development[J]. *Neural Dev*, 2014, 9(1): 3 [2014-02-07]. <http://www.neuraldevelopment.com/content/9/1/3>. doi:10.1186/1749-8104-9-3.
- [16] Mills SL, Tian LM, Hoshi H, et al. Three distinct blue-green color pathways in a mammalian retina[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(5): 1760-1768. doi:10.1523/JNEUROSCI.3901-13.2014.
- [17] Friedman DL, Redburn DA. Evidence for functionally distinct subclasses of gamma-aminobutyric acid receptors in rabbit retina[J]. *J Neurochem*, 1990, 55(4): 1189-1199. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb03124.x.
- [18] Christian PG, Harkin DG, Schmid KL. GABAergic agents modify the response of chick scleral fibroblasts to myopic and hyperopic eye cup tissues[J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39(2): 172-187. doi:10.3109/02713683.2013.834941.
- [19] Leventhal AG, Wang Y, Pu M, et al. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys[J]. *Science*, 2003, 300(5620): 812-815.
- [20] Kader MA. Electrophysiological study of myopia[J]. *Saudi J Ophthalmol*, 2012, 26(1): 91-99. doi:10.1016/j.sjopt.2011.08.002.
- [21] Westall CA, Dhaliwal HS, Panton CM, et al. Values of electroretinogram responses according to axial length[J]. *Doc Ophthalmol*, 2001, 102(2): 115-130. doi:10.1023/A:1017535207481.
- [22] Kawabata H, Adachi-Usami E. Electrophysiological changes of photopic function in myopia[M]//Tokoro T. *Myopia Updates*. 1998: 388-393.
- [23] Delgado LM, Vielma AH, Kähne T, et al. The GABAergic system in the retina of neonate and adult Octodon degus, studied by immunohistochemistry and electroretinography[J]. *J Comp Neurol*, 2009, 514(5): 459-472. doi:10.1002/cne.22023.
- [24] Kapusta-Bruneau NV. Opposite effects of GABA(A) and GABA(C) receptor antagonists on the b-wave of ERG recorded from the isolated rat retina[J]. *Vision Res*, 2000, 40(13): 1653-1665. doi:10.1016/S0042-6989(00)00028-6.
- [25] Qian H, Dowling JE, Ripps H. A single amino acid in the second transmembrane domain of GABA rho subunits is a determinant of the response kinetics of GABA_C receptors[J]. *J Neurobiol*, 1999, 40(1): 67-76. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199907)40:13.0.CO;2-4.
- [26] Chang Y, Weiss DS. Channel opening locks agonist onto the GABA_C receptor[J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(3): 219-255. doi:10.1038/6313.
- [27] Johnston GA. GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1996, 17(9): 319-323.

(收稿日期:2014-06-21)

(本文编辑:刘艳)