

负透镜诱导豚鼠离焦性近视眼巩膜胶原密度及形态学改变

龙 琴 艾凤荣 李 莹

Collagen density and morphologic change of sclera in guinea pigs with negative lens-defocused myopia

Long Qin, Ai Fengrong, Li Ying. Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract Objective The development of the eye refractive state could be manipulated with spectacle lenses, and it is commonly associated with the changes in collagen structure of sclera. The aim of present work was to investigate whether defocus through negative lens alters the density and morphology of sclera collagen in guinea pigs. **Methods** The negative lens-defocused myopia was induced by monocularly defocusing by -10 D lens in the right eyes of 20 newborn guinea pigs weighted 70 - 90 grams. The fellow eyes of the guinea pigs were as self-control. Other 10 normal guinea pigs were as normal control. After 28 days of defocusing, the diopter was examined by retinoscopy. Ten model eyes and 5 normal eyeballs were enucleated and the scleral sample was dissected for Van Gieson staining and transmission electronic microscopy examination. **Results** On the 28 days, the mean diopter value was (-1.28 ± 0.39) D, showing a significant change in comparison with the fellow eyes $(+4.67 \pm 1.01)$ ($P < 0.05$), and the considerably difference was found in mean difference value of both eyes between lens-defocused group and normal control group ($P < 0.05$). The collagen density of sclera at the posterior region of model eyes were significantly lower, and the collagen fibrillar diameter was significantly thinner in posterior sclera in the model eyes compared with fellow eyes ($P < 0.01$). The positive correlation was revealed between refractive status and collagen density ($r = 0.84, P < 0.01$). However, no significant difference was found in the density and fibrillar diameter of anterior sclera in the model eyes compared with fellow eyes ($P > 0.05$), and no significant difference was revealed in refractive status, collagen density fibrillar diameter in fellow eyes compared with normal control eyes ($P > 0.05$). The collagen staining was weaker in model eyes than the fellow eyes and normal eyes. The collagen fibers were thinner and presented the irregular arrangement in the model eye under the transmission electronic microscope. **Conclusion** The lower collagen density and thinner fibrillar diameter in the posterior sclera imply that collagen accumulation is preferentially reduced at the posterior region of sclera in defocused eye.

Key words experimental myopia; defocus; sclera; collagen

摘要 目的 探讨新生豚鼠负透镜诱导离焦性近视发生时巩膜胶原密度和形态的变化。 **方法** 30 只新生有色豚鼠随机分成透镜诱导组(单眼 -10.00 D 透镜诱导)和正常对照组(无处理组),第 28 天测量屈光度,眼球冰冻切片行 Van Gieson 胶原染色,以锯齿缘为界分别分析前后部巩膜胶原密度;并进行电镜扫描观察巩膜胶原纤维直径。 **结果** 新生豚鼠 28 d 透镜诱导组诱导眼的平均球镜等值屈光度低于对侧眼 ($P < 0.01$);诱导眼后部巩膜胶原染色光密度值低于对侧眼 ($P < 0.01$);诱导眼和对侧眼屈光度差值与后部巩膜胶原染色光密度差值呈正相关 ($r = 0.84, P < 0.01$);诱导眼后部巩膜胶原纤维直径小于对侧眼 ($P < 0.01$);诱导眼前部巩膜胶原密度和胶原直径与对侧眼相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);新生豚鼠 28 d 诱导组对侧眼各项指标与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 新生豚鼠负透镜诱导离焦性近视时后部巩膜胶原密度减少,伴胶原直径的减小,影响胶原代谢的机制尚需进一步研究。

关键词 实验性近视; 离焦; 巩膜; 胶原

分类号 R 778.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0449-04

本课题为国家自然科学基金资助(30600692)

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

通讯作者:龙琴(Email:longqinbj@hotmail.com)

近视包括单纯性近视和病理性近视,并有逐年上升的趋势,对其发病机制和防治手段的探讨一直是眼科学研究的重点和热点。动物模型对于研究近视的发生原因和过程提供了极有价值的途径。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诱导近视^[1-2]。在用于实验性近视的动物中,豚鼠具有生长发育快、成熟周期短、易饲养、易检查等特点,目前已有多项研究将豚鼠作为实验性近视的模型动物,成功诱导出形觉剥夺性和离焦性近视模型^[3-5],然而,巩膜作为近视发生过程中眼内所有调控机制的最终靶组织,是否能较好地模拟人类巩膜的变化对于评价近视模型的质量不可或缺。由于巩膜90%的成分是胶原,本实验通过观察负透镜诱导下离焦性近视豚鼠巩膜胶原密度和形态的改变进一步评价豚鼠作为离焦性近视动物模型的可靠性。为提高诱导敏感性,本研究采用新生豚鼠作为实验动物。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选用出生3 d,体重为70~90 g的健康新生有色豚鼠(短毛英国种)30只,由中国医学科学院动物所提供,在自然照明室内环境下饲养。

1.1.2 主要试剂及仪器 0.1%天狼猩红(Direct Red 80,美国Fluka Chenika公司);PMMA镜片(屈光度为-10.00 D,镜片直径为11.50 mm,光学区直径为8.50 mm,基弧为7.61 mm,内弧曲率半径为9.61 mm,外弧曲率半径为25.03 mm,北京京德嘉润贸易公司提供);免疫组织化学图像扫描系统(IMS图像分析系统,医学图像分析软件,上海申腾信息技术有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 豚鼠离焦性近视模型的建立 应用随机数字表法将新生豚鼠随机分为2组,透镜诱导组(20只)和正常对照组(10只)。透镜诱导组豚鼠取右眼佩戴PMMA镜片(-10.00 D)。具体方法:新生豚鼠麻醉后,剪除眼眶周围的体毛,采用双面贴膜将镜片固定于豚鼠实验眼正前方皮肤,上下方留出2个缝隙,以免镜片附着水蒸汽,影响视觉质量。每日通过预留的缝隙用棉签清洗镜片。

1.2.2 屈光度的检查 所有实验动物在第28天时睫状肌麻痹状态下用带状光检影验光,结果用等值球镜屈光度表示(球镜屈光度加1/2散光度)。

1.2.3 Van Gieson 胶原染色法(VG法)观察豚鼠前后部巩膜胶原密度 在实验28 d时给予致死剂量的苯巴比妥钠处死动物(透镜诱导组10只,正常对照组5只),摘除眼球,清除巩膜外组织,用液氮预冷的异戊烷速冻,标记后置于干冰中送入-80℃冰箱中保存。待样本收集完全后,将眼球做冰冻切片,厚度为5 μm。采用新鲜配制的Van Gieson溶液(0.1%天狼猩红和

苦味酸饱和水溶液以1:9混合,过滤后使用)染色10 min,弃去染液,用95%乙醇急速分化6 s,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固后观察。每只眼球随机取3张靠近眼球中央断面切片,以锯齿缘为界,随机分别选取前部巩膜(锯齿缘前)和后部巩膜(锯齿缘后)相等面积的3个区域进行图像扫描,用平均光密度值表示该样本区域巩膜胶原相对密度。

1.2.4 巩膜电镜标本的制备 第28天时给予致死剂量的苯巴比妥钠处死动物(透镜诱导组10只,正常对照组5只),迅速摘除眼球,去除角膜及巩膜外组织,以锯齿缘为界将巩膜分为前后2部分,分别标记后用25 mL/L戊二醛溶液固定24 h以上,将巩膜切成1 mm × 1 mm × 1 mm的组织块,磷酸盐缓冲液漂洗、锇酸固定、脱水、包埋、切片,透射电镜观察,每个组织块随机取3张切片,每张切片取3个相等面积视野观察。本实验的结果评价遵循双盲原则。

1.3 统计学方法

采用SPSS 11.5统计学软件对数据进行分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。透镜诱导组的诱导眼与对侧对照眼及正常对照眼的屈光度、巩膜胶原密度和胶原直径的比较采用单因素方差分析;透镜诱导组与正常对照组双眼屈光度差值比较采用独立样本的t检验。胶原密度与近视程度的相关性采用Pearson直线相关分析。统计学检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 负透镜诱导离焦性近视动物模型的建立

负透镜诱导组对侧眼第28天时平均球镜等值屈光度与正常对照组双眼平均球镜等值屈光度相比,差异无统计学意义($F = 0.25, P > 0.05$)(表1)。第28天负透镜诱导组诱导眼的平均球镜等值屈光度低于对侧眼,比较差异有统计学意义($t = 17.51, P < 0.01$)(表2)。

表1 实验第28天透镜诱导组对侧对照眼和正常对照组双眼屈光度、巩膜胶原密度和胶原纤维直径比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The refractive status, collagen density and collagen diameter of contralateral eyes from lens-defocused group and normal control group on the 28th days($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Refractive status(D)	Collagen density(OD value)		Collagen diameter(nm)	
			Posterior sclera	Anterior sclera	Posterior sclera	Anterior sclera
Contralateral eye	10	+4.67 ± 1.01	6.30 ± 1.09	4.35 ± 1.05	64.36 ± 11.77	57.80 ± 9.16
Normal right eye	5	+4.80 ± 0.91	6.27 ± 1.30	4.30 ± 0.95	70.57 ± 8.36	50.23 ± 10.76
Normal left eye	5	+5.05 ± 1.08	6.84 ± 1.46	4.37 ± 0.94	66.35 ± 8.82	56.15 ± 9.49
F		0.25	0.37	0.21	0.55	0.43
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

(One-way ANOVA)

2.2 负透镜诱导离焦性近视眼巩膜胶原密度改变

VG 法染色后,胶原纤维呈红黄色,经图像分析,透镜诱导组对侧眼 28 d 前后部巩膜胶原染色光密度值分别与正常对照组双眼前后部巩膜胶原染色光密度值比较,差异均无统计学意义 ($F = 0.21, F = 0.37, P > 0.05$) (表 1)。透镜诱导组第 28 天诱导眼后部巩膜胶原染色光密度值低于对侧对照眼后部巩膜胶原染色光密度值 ($t = 9.23, P < 0.01$) (表 2, 图 1-4)。透镜诱导组第 28 天诱导眼和对侧对照眼前部巩膜胶原密度值比较差异无统计学意义 ($t = 0.12, P > 0.05$) (表 2)。

表 2 实验第 28 天透镜诱导组诱导眼和对侧对照眼屈光度、巩膜胶原密度和胶原纤维直径比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The refractive status, collagen density and collagen diameter of lens-defocused eyes and contralateral eyes in lens-defocused group on 28 days ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Refractive status (D)	Collagen density (OD)		Collagen diameter (nm)	
			Posterior sclera	Anterior sclera	Posterior sclera	Anterior sclera
Defocused eye	10	-1.28 ± 0.39	3.10 ± 0.77	4.30 ± 1.04	49.02 ± 9.35	52.29 ± 12.43
Contralateral eye	10	+4.67 ± 1.01	6.30 ± 1.09	4.35 ± 1.05	64.36 ± 11.77	57.80 ± 9.16
t		17.51	9.23	0.12	7.46	0.25
P		<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05

(Student's t test)

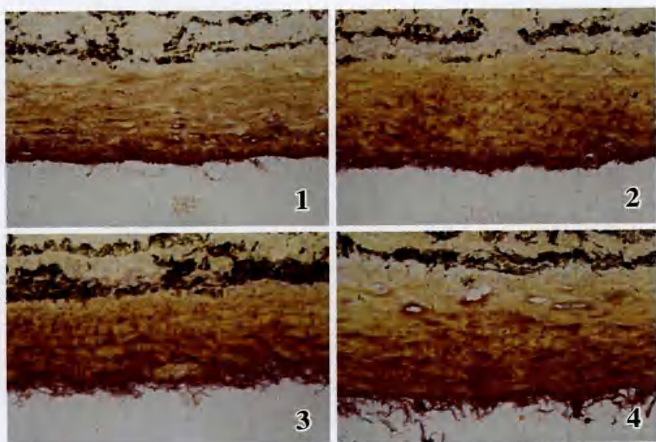


图 1 透镜诱导组诱导眼后部巩膜胶原呈红黄色 (VG × 400) 图 2 透镜诱导组对侧眼胶原染色强于透镜诱导组 (VG × 400) 图 3 正常对照组左眼后部巩膜胶原染色接近于诱导组对侧眼 (VG × 400) 图 4 正常对照组右眼后部巩膜胶原染色与正常左眼染色强度接近 (VG × 400)

Fig. 1 Collagen of posterior sclera show the red staining in model eye (VG × 400) Fig. 2 The staining is stronger in the collagen of posterior sclera in fellow eye (VG × 400) Fig. 3 Collagen staining of posterior sclera for right eye in normal control animal (VG × 400) Fig. 4 The collagen staining is similar to fellow eye in the left eye of normal control animal (VG × 400)

2.3 透镜诱导组诱导眼与对侧对照眼后部巩膜胶原表达量差值与屈光度差值相关性分析

由以上实验结果可知,负透镜诱导第 28 天诱导眼较对侧对照眼增加了 (-5.94 ± 0.98) D 近视度,诱导眼后部巩膜胶原染色光密度值较对侧对照眼低 (3.20

± 0.73) D, 由于透镜诱导未明显改变豚鼠前部巩膜胶原染色光密度,因此选择后部巩膜的胶原染色光密度与屈光度进行相关分析。分析后发现,透镜诱导组第 28 天诱导眼与对侧眼后部巩膜的胶原染色光密度差值与相应屈光度差值呈正相关 ($r = 0.84, P < 0.01$) (图 5)。

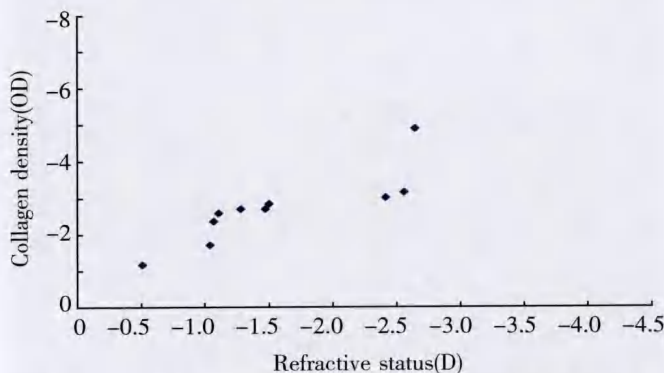


图 5 透镜诱导组实验第 28 天诱导眼和对侧对照眼屈光度差值与后部巩膜胶原密度差值的相关性分析 ($r = 0.84, P < 0.01$)

Fig. 5 The correlation analysis between the refractive status and collagen density in lens-defocused group on 28 days ($r = 0.84, P < 0.01$)

2.4 透镜诱导组和正常对照组巩膜透射电镜下超微结构的变化

经透射电镜观察发现,透镜诱导组和正常对照组前部巩膜以及透镜诱导组对照眼和正常对照组后部巩膜胶原纤维排列规则;而透镜诱导组诱导眼后部巩膜胶原纤维分散、粗细不均。经统计学分析,透镜诱导组对侧眼第 28 天前部巩膜胶原纤维平均直径分别与正常对照组双眼前后部巩膜胶原纤维平均直径比较,差异均无统计学意义 ($F = 0.43, F = 0.55, P > 0.05$) (表 1)。透镜诱导组诱导眼后部巩膜胶原纤维平均直径小于对侧对照眼,差异有统计学意义 ($t = 7.46, P < 0.01$)。透镜诱导组诱导眼与对侧对照眼前部巩膜胶原纤维平均直径相比,差异无统计学意义 ($t = 0.12, P > 0.05$) (表 2, 图 6-9)。

3 讨论

哺乳类动物的巩膜组织由纤维母细胞和与眼球壁平行的不同直径的胶原纤维束堆积而成。相关研究显示,近视的发生往往伴有巩膜胶原含量的减少和胶原纤维直径及构成的改变^[6-7]。研究发现,树鼠形觉剥夺性近视眼可见后部巩膜胶原代谢变化,遮盖眼胶原含量的特异性指标羟脯氨酸水平明显低于对照眼,提示该处的胶原含量减少^[8];此外,McBrien 等^[9]对树鼠进行形觉剥夺性近视研究中发现,形觉剥夺可明显影响巩膜胶原纤维的直径分布,出现显著的后部外层巩

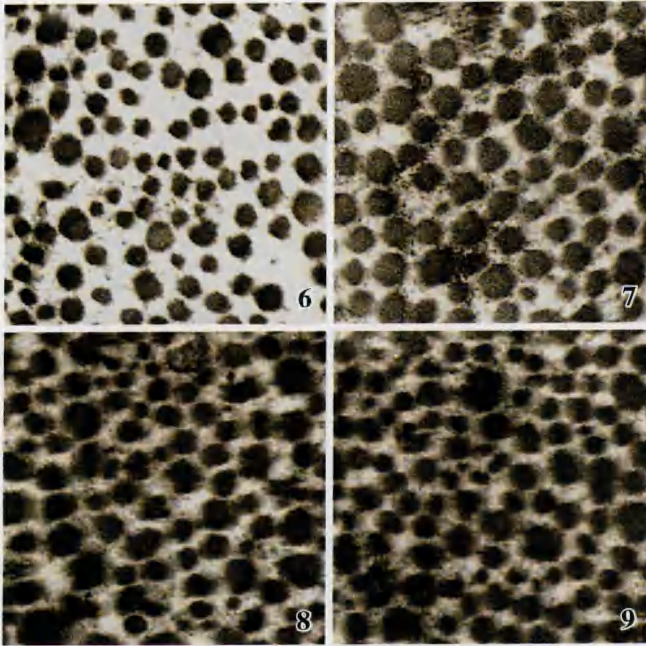


图6 透镜诱导组诱导眼后部巩膜胶原纤维直径粗细不均且较分散($\times 30\ 000$) 图7 透镜诱导组对侧眼胶原纤维粗于诱导眼,排列规则($\times 30\ 000$) 图8 正常对照组左眼后部巩膜胶原纤维形态与诱导组左眼接近($\times 30\ 000$) 图9 正常对照组右眼后部胶原纤维形态与正常左眼相近($\times 30\ 000$)

Fig. 6 Collagen fibers at the posterior sclera is uneven in model eye under the TEM($\times 30\ 000$) Fig. 7 Collagen fibers of posterior sclera in the fellow eye present the thicker diameter and regular arrangement under the TEM($\times 30\ 000$) Fig. 8 Collagen fibers of posterior sclera in the right eye show the order arrangement and even diameter in normal control group($\times 30\ 000$) Fig. 9 Collagen fibers at the posterior sclera in left eye are good arrangement in normal control group($\times 30\ 000$)

膜胶原纤维直径减小,而胶原纤维直径和眼球大小之间存在显著负相关性,由于直径较大的巩膜胶原纤维数量可代表胶原的成熟度和抗拉伸能力,因此可以解释含有相对较多的小直径胶原纤维的发育期巩膜易于延展,发生近视^[10]。最近的研究证明,采用一定方法增加巩膜胶原的交联可以显著增加巩膜的抗拉伸力从而有可能抑制近视的发生^[11-12]。由于树鼠在国内来源困难,因此国内曾采用幼鸡作为近视模型动物,但鸡与人类巩膜构成的差异常使实验结果产生偏差^[10,13]。2000年国内开始采用豚鼠作为实验动物,已成功地建立豚鼠形觉剥夺和透镜诱导近视模型^[3-5,14],对于豚鼠离焦性近视动物模型眼巩膜胶原的变化尚未见报道。

由于胶原变化在近视发生中的重要作用,检测胶原含量十分必要。除了可以通过检测巩膜的干重和厚度来推知巩膜胶原的含量外,由于羟脯氨酸是巩膜胶原的主要成分,因此,还可以通过检测巩膜中羟脯氨酸的含量来推知巩膜中胶原的含量。VG法能较便捷、直观地反映胶原的组织学分布和密度,近年来被广泛应用于间质组织纤维化相关性疾病,如心肌炎、动脉粥

样硬化、高血压性心肌病变等的研究中^[15],此外, Van Gieson 染液对 I 型胶原这一巩膜中含量最多的胶原成分较好的识别特性使其适合于本实验研究。

本研究结果显示,负透镜诱导下离焦性近视豚鼠诱导眼近视发生时伴有后部巩膜胶原密度减少,胶原密度的减少与近视度的增加呈正相关;除胶原密度改变外,离焦性近视的发生同样伴有后部巩膜胶原直径的减小,即小直径胶原的数量增加,而前部巩膜不受影响,以上研究结果与采用树鼠和豚鼠作为形觉剥夺性近视实验动物的研究相一致^[9,16]。由于胶原成分占巩膜总干重的 90% 左右,因此本结果不仅证明离焦性近视发生过程中同样存在巩膜组织的重塑,而且后部巩膜胶原比前部巩膜更易发生变化的现象不仅为临床上所见的病理性近视巩膜葡萄肿常发生于后部巩膜提供了分子水平的依据,而且进一步证明豚鼠的巩膜具备良好的模拟人类巩膜的基础,可作为研究近视乃至病理性近视的实验动物。

参考文献

- Hess RF, Schmid KL, Dumoulin SO, et al. What image properties regulate eye growth[J]? *Curr Biol*, 2006, 16(7): 687-691
- Zhu X, Wallman J. Temporal properties of compensation for positive and negative spectacle lenses in chicks[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(1): 37-46
- Lu F, Zhou X, Zhao H, et al. Axial myopia induced by a monocularly-deprived facemask in guinea pigs: A non-invasive and effective model [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 628-636
- 闫磐石, 张金嵩, 郭浩轶. 转化生长因子- β_2 在豚鼠形觉剥夺性近视中的表达[J]. *眼科研究*, 2007, 25(3): 168-170
- 欧阳朝祐, 褚仁远, 胡文政. 豚鼠西平对豚鼠透镜诱导性近视眼的作用[J]. *中华眼科杂志*, 2003, 39(6): 348-351
- 谭佳, 刘双珍, 邓志宏, 等. 实验性近视眼后极部巩膜胶原和蛋白多糖水平的改变[J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6(3): 609-611
- Frost MR, Norton TT. Differential protein expression in tree shrew sclera during development of lens-induced myopia and recovery[J]. *Mol Vis*, 2007, 6(13): 1580-1588
- Siegrwart JJ, Jr, Strang CE. Selective modulation of scleral proteoglycan mRNA levels during minus lens compensation and recovery[J]. *Mol Vis*, 2007, 4(13): 1878-1886
- McBrien NA, Cornell LM, Gentle A. Structural and ultrastructural changes to the sclera in a mammalian model of high myopia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(10): 2179-2187
- 龙琴, 褚仁远. 巩膜细胞外基质及基质金属蛋白酶在近视发展中作用的研究进展[J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(11): 1047-1049
- Wollensak G, Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glycerinaldehyde[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(4): 651-656
- Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties after collagen crosslinking of sclera using glycerinaldehyde[J]. *Acta Ophthalmol*, 2008, 86(8): 887-893
- Schippert R, Brand C, Schaeffel F, et al. Changes in scleral MMP-2, TIMP-2 and TGF β -2 mRNA expression after imposed myopic and hyperopic defocus in chickens[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 710-719
- Lu F, Zhou X, Zhao H, et al. Axial myopia induced by a monocularly-deprived facemask in guinea pigs: A non-invasive and effective model [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 628-636
- Kiernan JA. Collagen type I staining [J]. *Biotech Histochem*, 2002, 77(4): 231
- 高岩, 崔冬梅, 吴开立, 等. 形觉剥夺性近视豚鼠巩膜形态学观察[J]. *眼科研究*, 2006, 24(3): 244-247

(收稿: 2009-02-10 修回: 2009-04-06)

(本文编辑: 刘艳)