

豚鼠巩膜组织 M4 受体的表达

高岩 曾骏文 仇爱华 刘桂香

Expression of M4 receptor in sclera of normal guinea pigs

Gao Yan, Zeng Junwen, Qiu Aihua, Liu Guixiang. Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China

Abstract Objective Researches showed that muscarinic cholinceptor and its antagonist are closely related to the pathogenesis of myopia, but its target tissue and distribution and subtype are under clear. Present study aimed to detect the expression and distribution of M4 receptor in normal sclera of guinea pigs. **Methods** Twenty-one normal 4-week-old triad color guineas were selected in this study. Expression and distribution of M4 receptor protein in sclera were detected using immunohistochemistry and Western blot in 7 eyes, respectively. The expression of M4 receptor mRNA in sclera was detected by RT-PCR. **Results** The M4 receptor was detected in normal sclera, showing the brown granula in cytoplasm and cytomembrane. The receptor at mRNA level was detected in normal guineas sclera with the amplification product at 221 pb. No relevant product was detected in negative control. M4 receptor at protein level was detected in normal guineas sclera with signal band at 38 000, but no response signal was detected in negative control sample. **Conclusion** M4 receptor is expressed in normal guineas sclera.

Key words guinea pig; sclera; M4 receptor

摘要 目的 检测 M4 受体在豚鼠巩膜组织中的表达与分布。**方法** 4 周龄三色豚鼠 21 只,取 7 只动物眼球制备石蜡切片,免疫组织化学法检测后极部巩膜组织 M4 受体的表达与分布;其余动物分别提取眼巩膜组织 mRNA 和蛋白,RT-PCR 和 Western blot 法检测 M4 受体 mRNA 和蛋白质的表达。**结果** 免疫组织化学染色显示,豚鼠巩膜组织有 M4 受体表达;豚鼠巩膜组织表达 M4 受体 mRNA,扩增产物约为 221 bp,阴性对照未见扩增产物。Western blot 检测显示豚鼠巩膜组织有免疫活性的 M4 受体表达明显,相对分子质量为 38 000。阴性对照组无阳性表达条带。**结论** 豚鼠巩膜组织有 M4 受体蛋白表达。

关键词 豚鼠; 巩膜; M4 受体

分类号 R 772.3 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0765-04

近年的研究发现,毒蕈碱样胆碱能受体(M受体)及其拮抗剂与近视的发生密切相关,非选择性 M 受体拮抗剂阿托品可有效抑制近视的发生发展^[1],但其确切的作用部位及参与的受体亚型至今尚不明确。进一步的研究发现,选择性 M4 受体拮抗剂 Himbacine 能延缓鸡形觉剥夺性近视的发展^[2],M4 受体可能参与近视的形成与发展。已有研究证明,人及树鼯眼组织中包含有多种 M 受体亚型^[3-4]。对豚鼠巩膜组织 M4 受体表达的报道甚少。本研究从 mRNA 和蛋白水平揭示豚鼠巩膜组织 M4 受体的表达及分布,报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

4 周龄三色豚鼠 21 只(购自中山大学实验动物中心),雌雄各半,体重 1 300 ~ 1 500 g;采用随机数字表法将动物随机分为 3 组,每组 7 只,分别用于免疫组织化学、RT-PCR 及 Western blot 检测。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法检测 M4 受体蛋白的表达
取 7 只豚鼠眼球制备石蜡切片,以 SP 法检测巩膜组织中 M4 受体的表达。(1)将石蜡切片放入 60 ℃ 恒温箱中烘烤 20 min,脱蜡、水化,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗 5 min × 3 次。(2)去除切片周围多余的液体,加 3% H₂O₂-甲醇,室温下孵育

作者单位:266003 青岛大学医学院附属医院眼科(高岩、刘桂香); 510060 广州,中山大学中山眼科中心(曾骏文);266200 即墨市人民医院眼科(仇爱华)

通讯作者:曾骏文(Email:zeng163net@163.net)

10 min,以封闭内源性过氧化酶活性,PBS 漂洗 5 min × 3 次。(3)抗原热修复。PBS 漂洗 5 min × 3 次。(4)去除多余液体,滴加正常山羊血清,20 °C 室温中孵育 20 min,以减少非特异性染色。(5)甩去多余血清(勿洗),滴加小鼠抗人 M4 单克隆抗体(工作浓度为 1:50)(美国 Chemicon 公司),4 °C 过夜。(6)24 h 以后,以 PBS 充分冲洗后,滴加二抗(工作浓度为 1:200),37 °C 湿盒中孵育 60 min。(7)PBS 充分冲洗后;滴加三抗,37 °C 湿盒中孵育 30 min。(8)PBS 洗涤 5 min × 3 次。(9)DAB 显色 5 ~ 10 min,光学显微镜下观察,直至满意的染色浓度出现。(10)PBS 充分洗涤后,苏木素复染 2 min,盐酸乙醇分化。(11)PBS 洗涤,系列乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察。阴性对照以 PBS 代替一抗,余步骤同上。

1.3 RT-PCR 检测 M4 受体 mRNA 的表达

1.3.1 RT-PCR 引物的设计与合成 通过 [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov),获取 cDNA 序列,采用 Primer 3 在线引物设计软件,获得最佳 PCR 引物(广州达安基因公司合成)。RT-PCR 引物序列:M4 上游引物:5' CTCTGGGCGCCTGCTATC 3', M4 下游引物:5' GTCTCTGTGGTGGA CAG 3',扩增片段长度为 221 bp。

1.3.2 RNA 的提取和逆转录 10% 水合氯醛处死 7 只动物,用 7 mm 环钻钻取后极部巩膜,显微镜下小心剥离巩膜层,用 Trizol 一步法分别提取组织总 RNA,紫外分光光度计法和 agarose 胶电泳(美国 Sigma 公司)鉴定并确定 RNA 浓度。2.5 U 无 RNA 酶的 DNA 酶 I(美国 Invitrogen 公司)37 °C 作用 30 min,4 mmol/L 乙二胺四乙酸 65 °C 下作用 10 min,以清除基因组 DNA 的污染。反应体系 20 μL,按 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录。

1.3.3 PCR 扩增 25 μL PCR 反应体系,内含 10 倍 PCR 缓冲液、10 mmol/L 的脱氧核糖核苷酸(dNTP)、10 μmol/L 上游及下游引物、1 μL 逆转录反应液及 1.25 U TaqDNA 聚合酶。扩增参数:95 °C 2 min 预变性;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 45 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物电泳,紫外光下立体成像。 β -actin 作为内参照。

1.4 Western blot 检测 M4 受体蛋白水平的表达

标本收集及保存同上,采用抽提缓冲液提取巩膜组织蛋白^[5],紫外分光光度计进行蛋白定量,保存于

-20 °C。SDS-PAGE 电泳用 12% 的分离胶,电压开始为 120 V,指示剂前沿进入浓缩胶后升高至 140 V。电转至 PVDF 膜上,350 mA,2 h。5% 脱脂奶粉-TBST (TBS,0.1% Tween-20)阻断液中孵育 1 h 后转至含有 M4 抗体(2 μg/mL)的阻断液中孵育 1 h。洗膜后在含有辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体(1:2 000)和抗生物素抗体(1:1 000)的双抗阻断液中孵育 1 h。将 PVDF 膜与 10 mL LumiGLO(0.5 mL LumiGLO 发光试剂,0.5 mL 过氧化物酶,9 mL 去离子水)作用 1 min。沥干后保鲜膜包裹,暗室内 X 光片曝光,显影、定影处理。曝光后的 PVDF 膜用淬灭液处理后再进行 M4 的检测。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 M4 受体蛋白在豚鼠巩膜的表达

豚鼠后极部巩膜组织石蜡切片中可见 M4 受体存在于豚鼠巩膜及脉络膜组织。阴性对照组巩膜组织中无棕黄色着色(图 1)。

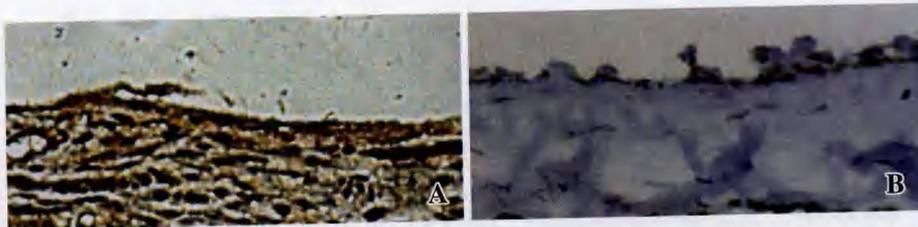


图 1 豚鼠后极部巩膜组织免疫组织化学法检测 M4 受体($\times 500$) A: 巩膜及脉络膜组织可见胞浆内棕色颗粒 B: 阴性对照组无棕黄色着色
Fig.1 Detect of M4 receptor by immunohistochemistry($\times 500$) A: M4 receptor is detected in normal sclera of guineas, showing brown granulae in cytoplasm B: No M4 receptor positive cell is detected in negative control sample

2.2 RT-PCR 检测 M4 受体 mRNA 在豚鼠巩膜的表达

RT-PCR 结果发现豚鼠巩膜组织均表达 M4 受体 mRNA,扩增产物的大小为 221 bp 左右。由于 M 受体的基因中没有内含子,因此来自基因组 DNA 的扩增产物将与 cDNA 的扩增产物同样大小,阴性对照无扩增产物,说明标本在 DNA 酶处理之后无剩余的基因组 DNA 的污染(图 2)。

2.3 Western blot 检测 M4 受体蛋白在豚鼠巩膜的表达

豚鼠巩膜组织蛋白的 Western blot 检测显示:抗人 M4 受体胞浆环(i3 环)表位的单克隆抗体能识别豚鼠 M4 受体蛋白,相对分子质量为 38 000,且抗体特异性较高,与其他受体间无交叉免疫反应。豚鼠巩膜组织 M4 受体免疫反应活性表达明显。而巩膜组织蛋白,以 PBS 代替一抗的阴性对照组,无阳性表达条带(图 3)。



图 2 豚鼠眼巩膜组织 M4 受体 mRNA 水平的表达

Ladder: DNA 分子量标准 RT + : M4 受体 mRNA 表达阳性 RT - : M4 受体 mRNA 表达阴性

Fig. 2 The expression of M4 receptor at mRNA level in normal sclera of guineas Ladder: DNA macular marker RT + : positive expression of mRNA of M4 receptor RT - : absent expression of mRNA of M4 receptor

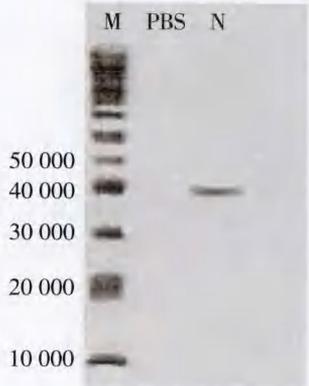


图 3 豚鼠眼巩膜组织 M4 受体蛋白水平的表达 M: 分子标记 N: 正常巩膜组织

Fig. 3 The expression of M4 receptor at protein level in normal sclera of guineas M: molecular marker N: normal sclera

3 讨论

本研究分别从 mRNA 和蛋白水平研究豚鼠巩膜组织 M4 受体的表达, RT-PCR 检测到豚鼠巩膜组织有 M4 受体 mRNA 表达, 扩增产物的大小和其他文献报道一致, DNA 测序结果显示为 M4 受体。免疫组织化学及 Western blot 检测也表明豚鼠巩膜组织上有 M4 受体蛋白的表达。证明豚鼠后极部巩膜组织有 M4 受体的表达。免疫组织化学阳性切片中同时显示, 脉络膜组织亦存在 M4 受体阳性表达, 且表达强度高于巩膜组织, 可能是豚鼠脉络膜组织 M4 受体表达量较高。

无论是在出生后眼球的正常发育还是在近视的发展过程中, 巩膜在决定眼球的形状和大小并进而影响眼球的屈光状态中均起着重要作用^[6]。近视动物模型和人类近视眼的巩膜均表现胶原纤维的合成代谢减少而分解代谢增加, 巩膜细胞外基质糖胺多糖合成和硫化减少^[7]。这些改变最终导致胶原纤维直径变小, 巩膜进行性变薄难以阻挡眼压引起的机械变形力, 出现眼轴延长。因此研究认为, 近视的形成是巩膜主动塑形的结果^[8]。但实验性近视眼巩膜改变的确切机制仍不明确。

目前毒蕈碱样胆碱能机制参与视觉控制眼球生长, 特别是实验诱导形觉剥夺性近视的形成已达成共识。大量实验证明, 非选择性 M 受体拮抗剂阿托品^[1,9]、选择性 M1 受体拮抗剂哌仑西平^[10]、选择性

M4 受体拮抗剂 Himbacine^[2] 以及近来报道的非选择性 M 受体拮抗剂 Oxyphenonium 均能有效抑制近视的形成^[11], 但它们的确切作用机制至今仍不清楚。研究发现, 大多数视网膜无长突细胞(视网膜胆碱能系统主要的乙酰胆碱来源)的破坏, 并不影响鸡实验性近视的进展, 阿托品仍可阻止其近视发展^[12]。因此认为近视发生发展过程中视网膜 M 受体并未参与作用, M 受体信号可能是通过巩膜、视网膜色素上皮、脉络膜调节眼球的生长。

在对非选择性 M 受体拮抗剂阿托品和选择性 M1 受体拮抗剂 PR 的进一步研究中发现, 阿托品作为非选择性 M 受体拮抗剂, 与各亚型 M 受体具有相同的亲和力^[13]; PR 作为选择性 M1 受体拮抗剂, 与理论值相比, 其阻止实验诱导性近视的发生发展需相对较高的剂量, 推测其影响眼球增长并非仅通过 M1 受体介导, 可能同时有其他胆碱能受体亚型的参与^[14-15]; 体外实验显示 PR 与 M4 受体亲和力仅较 M1 受体低 4 倍 (pKi; 7.30: 7.97)。Cottrill 等^[2] 研究发现, 选择性的 M4 受体拮抗剂 Himbacine 可有效延缓鸡形觉剥夺性近视的发生和发展, 推测 Himbacine 通过 M4 受体机制抑制近视的发展, M4 受体可能参与近视的形成。因此 M4 受体拮抗剂延缓近视发展的机制可能是通过作用于巩膜 M4 受体调节巩膜成纤维细胞的胶原和基质金属蛋白酶的合成与降解, 从而进一步调控巩膜细胞外基质的合成与降解, 延缓近视的发展。

本研究结果显示, 豚鼠巩膜组织具有 M4 受体表达, 为研究 M4 受体在哺乳动物近视形成过程中的作用及进一步证实 M4 受体参与了近视形成奠定了解剖基础, 并为研究 M4 受体拮抗剂抑制近视的有效性及其作用机制提供依据。且豚鼠与人类具有相同的巩膜结构, 经历相似的近视巩膜变化, 因此作为一种可靠的近视模型对研究人类近视的形成具有重要的参考价值。但迄今为止, M4 受体在近视发生发展过程中确切的作用部位和作用机制仍未明确, 尚待进一步的研究探讨。

参考文献

- 1 Tigges M, Iuvone PM, Fernandes A, et al. Effects of muscarinic cholinergic receptor antagonists on postnatal eye growth of rhesus monkeys [J]. *Optom Vis Sci*, 1999, 76 (6): 397-407
- 2 Cottrill CL, Truong HT, McBrien NA. Inhibition of myopia development in chicks using himbacine: a role for M4 receptors [J]? *Neuroreport*, 2001, 12 (11): 2453-2456
- 3 Gil DW, Krauss HA, Bogardus AM, et al. Muscarinic receptor subtypes in human iris-ciliary body measured by immunoprecipitation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38 (7): 1434-1442
- 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 Rickers M, Schaeffel F. Dose-dependent effects of intravitreal pirenzepine on deprivation myopia and lens-induced refractive errors in chickens [J]. *Exp Eye Res*, 1995, 61(4): 509 - 516

6 Cui W, Bryant MR, Sweet PM, et al. Changes in gene expression in response to mechanical strain in human scleral fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78 (2): 275 - 284

7 McBrien NA, Lawlor P, Gentle A. Scleral remodeling during the development of and recovery from axial myopia in the tree shrew [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(12): 3713 - 3719

8 Rada JA, Nickla DL, Troilo D. Decreased proteoglycan synthesis associated with form deprivation myopia in mature primate eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(8): 2050 - 2058

9 Lee JJ, Fang PC, Yang IH, et al. Prevention of myopia progression with 0.05% atropine solution [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2006, 22(1): 41 - 46

10 Leq H, Cheng NN, Wu W, et al. Effects of pirenzepine ophthalmic solution on form deprivation myopia in the guinea pig [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118 (7): 561 - 566

11 Luft WA, Ming Y, Stell WK. Variable effects of previously untested muscarinic receptor antagonists on experimental myopia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (3): 1330 - 1338

12 Fischer AJ, Miethke P, Morgan IG, et al. Cholinergic amacrine cells are not required for the progression and atropine mediated suppression of form-deprivation myopia [J]. *Brain Res*, 1998, 794: 48 - 60

13 Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, 30: 633 - 673

14 Goin JC, Nathanson NM. Subtype-specific regulation of the expression and function of muscarinic acetylcholine receptors in embryonic chicken retinal cells [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(4): 964 - 972

15 Le Q, Lu Y, Chu R. The effects of pirenzepine on the expression of type I and type IV muscarinic receptor in the guinea pigs [C/OL]. // ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale. <http://www.arvo.org/eweb/startpage.aspx?site=am.2005>

(收稿:2008-12-06 修回:2009-06-30)

(本文编辑:尹卫靖)

· 短篇论著 ·

硅油-RMN3 与眼前段组织的生物相容性研究

程 鹤 张少冲 贾万程

硅油-RMN3(Oxane HD)是一种新型的相对密度大于水的玻璃体替代物,比重为 1.02,由硅油和氟化石蜡混合而成。国外一些临床试验显示硅油-RMN3 与普通硅油具有类似的眼部并发症,但国内外尚未见相关的实验报道。本研究探讨硅油-RMN3 与眼前段组织的生物相容性,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 纯种健康新西兰大白兔 12 只(中山眼科中心动物实验中心提供),雌雄各半,体重 2.3 ~ 2.6 kg。采用随机数字表法分为实验组(9 只)与对照组(3 只),均以右眼为手术眼。再按术后 4、8、12 周分 3 个亚组,实验组每个亚组 3 只眼,对照组每个亚组 1 只眼。术前常规裂隙灯、检眼镜及眼压检查排除眼部疾病。

1.2 手术方法 动物麻醉后做上方角膜缘穿刺口,抽出房水约 0.15 mL,实验组注入 0.15 mL Oxane HD,对照组注入等量平衡盐溶液(BSS)。术后每日裂隙灯及 Schiötz 眼压计检查,持续 1 周,之后每周 2 次,持续 1 个月至实验结束。术后 2、4、8、12 周行角膜内皮照相。分别于术后 4、8、12 周处死动物,完整摘除眼球,标记眼球上下方位,固定、脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,行光学显微镜观察。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,术前实验组与对照组角膜内皮细胞计数和眼压比较采用独立样本的 *t* 检验,实验组不同时间点角膜内皮细胞计数和眼压的比较采用单因素方差分析,术后各时间点与术前值的两两比较采用 Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床观察 实验组所有兔眼内 Oxane HD 油滴均保持单一,未见乳化现象,油滴无明显缩小。7 只兔眼角膜均保持透明,未见角膜后膜形成及新生血管长入,2 只兔术后 1 周内角膜轻度混浊及水肿,水肿消退后未见角膜后膜及新生血管形成。部分实验眼有轻度眼前节炎症反应,术后 3 d 内均恢复。虹膜未见后粘连。晶状体均呈进行性轻至中度混浊。

2.2 组织学检查结果 对照组角膜各层组织结构正常(图 1)。实验组术后角膜各层组织结构完整,基质纤维排列整齐,未见血管及炎性细胞。术后 4 周角膜内皮细胞出现空泡变性,至 12 周时角膜内皮细胞排列稀疏,细胞核固缩(图 2-4)。对照组房角开放(图 5),实验组术后 4 周有 1 只眼下方房角开始出现部分粘连,至 12 周所有眼的下方房角紧密粘连(图 6-8),但上方房角仍保持开放。观察期虹膜与睫状突未见明显病理改变。

2.3 实验组和对照组角膜内皮细胞计数及眼压比较 术前实验组与对照组的角膜内皮细胞密度和眼压比较见表 1。

表 1 术前实验组与对照组角膜内皮细胞计数和眼压比较($\bar{x} \pm s$)

分组	内皮细胞密度(个/mm ²)	IOP(mmHg)
实验组	2 617 ± 272	17.383 ± 2.213
对照组	2 450 ± 132	17.350 ± 1.463
<i>t</i>	1.001	0.606
<i>P</i>	0.340	0.454

(Student *t* 检验)

2.4 实验组术前及术后不同时间角膜内皮细胞密度和眼压的比较 实验组术前,术后 2、4、8、12 周各角膜内皮细胞密度

作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心[(程鹤,研究生,现在奉贤区中心医院眼科,上海 201400)、张少冲];201400 上海,奉贤区中心医院眼科(贾万程)

通讯作者:程鹤(Email:chheyi@sina.com)