

胞内视黄醛结合蛋白在豚鼠离焦诱导型近视眼中的表达

崔冬梅 聂玉红 高岩 吴开力 杨晓 邓江云 曾骏文

Expression of CRALBP in lens-induced myopia of guinea pigs

Cui Dongmei, Nie Yuhong, Gao Yan, Wu Kaili, Yang Xiao, Deng Jiangyun, Zeng Junwen. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Abstract Objective Researches showed that cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) involved in the visual cycle in mammal. However, whether CRALBP is related to the pathogenesis of experimental myopia is under clear. This study was to investigate the protein expression of CRALBP in lens-induced myopia in guinea pigs. **Methods** Lens-induced myopia model was created by wearing -8.00 D concave spherical lenses in 10 right eyes of 3- or 4-week-old guinea pigs, and the fellow eyes were as control eyes. The refraction of guinea pigs was detected before wearing of lens and on the 11th day after wearing of lens, and axial length of two groups was measured using A ultrasound. The protein expression of CRALBP was detected in retina, choroids and sclera by immunohistochemistry and Western blotting methods. **Results** After 10 days of lenses wearing, the average diopter of the right eyes of guinea pigs was -3.17 D, showing a significant difference in comparison with control eyes ($P > 0.01$). However, there were no significant difference in axial length between these two groups ($P > 0.05$). There was less brown particles of CRALBP in retina and sclera and more positive particles in chroid in control eyes, and the positive particles in retina and chroid were significantly increased in model eyes. The Western blotting assay showed that the protein expression of CRALBP was significantly decreased in the posterior sclera and increased in retina and choroids in lens-induced myopic eyes of guinea pigs. **Conclusion** CRALBP may play a role in the lens induced myopia and scleral remodeling.

Key words cellular retinaldehyde binding protein; refraction; lens-induced myopia

摘要 目的 探讨胞内视黄醛结合蛋白(CRALBP)在豚鼠离焦诱导型近视眼中的表达。**方法** 选取3~4周龄有色豚鼠10只,右眼戴-8.00 D透镜,左眼不戴镜作为对照眼。戴镜前和戴镜后第11 d分别测量眼轴长度和屈光度;通过免疫组织化学和蛋白质免疫印迹的方法检测 CRALBP 在豚鼠诱导近视眼和对照眼的视网膜、脉络膜和巩膜中的表达。**结果** 戴镜后第11 d,模型眼与戴镜前相比屈光度平均增加了-3.17 D,与对照眼比较差异有统计学意义($P < 0.01$);眼轴长度在两组眼之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组织化学结果显示,与对照眼相比,诱导近视眼的 CRALBP 在巩膜中的表达明显降低,在脉络膜和视网膜中的表达升高。Western blot 结果和免疫组织化学结果一致,CRALBP 在诱导近视眼巩膜中的表达明显降低。**结论** CRALBP 可能在豚鼠诱导近视眼的发生以及巩膜重塑中起一定作用。

关键词 胞内视黄醛结合蛋白; 屈光度; 离焦诱导型近视

分类号 R 778.101 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0091-04

近视是当今人类最常见的眼病之一,实验性的近视模型为研究近视的发病机制提供了一个良好的平台。近来的研究表明,视黄酸在哺乳动物实验性近视眼的视网膜、脉络膜和巩膜中的含量增加,而胞内视黄

醛结合蛋白(cellular retinaldehyde binding protein, CRALBP)是一种维生素 A 类结合蛋白,能与 11-cis 视黄醇结合,参与视循环通路,CRALBP 在鸡的视网膜、脉络膜和巩膜中均有表达^[1],但是 CRALBP 是否参与实验性近视的发生和发展尚未见相关文献报道。我们建立豚鼠离焦诱导型近视眼模型,观察 CRALBP 在诱导近视眼中的表达变化。

本课题为国家自然科学基金资助(30572005)

作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室

通讯作者:曾骏文 (Email: zengj163net@163.net)

1 材料与方 法

1.1 动物模型的建立

选取 3~4 周龄健康有色豚鼠共 10 只(中山大学北校区动物中心提供),雌雄不限,体重 150~200 g。-8.00 D 透镜由广州视域光学有限公司提供(PMMA 硬性接触镜,镜片直径为 15 mm,光学区直径为 10.5 mm,基弧为 9.64 mm、9.0 mm)。所有豚鼠右眼戴 -8.00 D 透镜,左眼不戴镜为对照眼。接触镜每日清洁 1 次以防止透镜污染引起的剥夺性近视。

1.2 屈光度测量

戴镜前和戴镜后第 11 d 由同一验光师验光。验光前先给予结膜囊内滴 1% 复方托吡吡胺滴眼液 3 次,每次间隔 10 min,待瞳孔散大后行带状光检影,在工作距离 0.5 m 处以 0.5 D 的间隔分别进行水平和垂直子午线上的检影,散光以半量等效球镜计算。

1.3 眼球超声生物测量

于戴镜前和戴镜后第 11 d 拆除眼镜时行眼球超声生物测量。豚鼠大腿外侧肌内注射盐酸氯胺酮和氯丙嗪(1:1,75~100 mg/kg)麻醉,结膜囊内滴 0.1% 丁卡因表面麻醉后,用眼科 A 型超声仪(无锡康宁医疗电子设备有限公司生产的 KN1800A 超仪,探头频率 10 Hz)测定双眼眼轴长度(取角膜内皮面到眼球后极部玻璃体视网膜界面的距离),以自动模式连续测量 10 次,计算平均值,精确到 0.01 mm。

1.4 CRALBP 的检测

取豚鼠的眼球用 OCT 包埋后,做冰冻切片,切取后极部的球壁组织。行免疫组织化学染色,鼠抗人 CRALBP 抗体(美国 ABR 公司)工作浓度为 1:1 000。用 PBS 代替一抗做空白对照。结果判定标准:以细胞中出现棕黄色颗粒为阳性。显微镜下观察,拍照。

1.5 蛋白质免疫印迹法检测 CRALBP

制作的动物模型在进行检影验光及测量眼轴长度后处死。在显微镜下分离出眼球后极部视网膜、脉络膜、巩膜,在样本中加入裂解液,冰上用显微剪刀充分剪碎,然后用细胞超声仪超声,12 000 r/min 4℃ 离心 1 h,弃沉淀,取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。然后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,4℃ 孵育一抗(鼠

抗人 CRALBP 抗体,1:5 000 稀释)过夜,二抗为辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物有限公司),ECL 化学发光法曝光。

1.6 统计学方法

实验各组数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析,对照眼与实验眼间各检测指标的差异比较行配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 豚鼠戴镜前后眼屈光状态和眼轴长度

实验前双眼间屈光度和眼轴长度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。戴 -8.00 D 透镜组的豚鼠眼,其实验前后屈光度的变化与对照眼相比差异有统计学意义($P < 0.01$),而实验前后的眼轴长度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 豚鼠戴镜前后屈光度和眼轴的差值的比较
Table 1 The differences of refraction and axial length of guinea pigs before and after wore lens

Group	n	Refraction (Δ D)	Axial length (Δ mm)
Model	10	-3.17 \pm 0.40	0.32 \pm 0.24
Control	10	0.38 \pm 1.63	0.29 \pm 0.20
<i>t</i>		-5.197	0.271
<i>P</i>		0.002	0.791

(Paired *t* test)

2.2 CRALBP 在豚鼠眼球壁各层的表达

对照眼免疫组织化学染色视网膜内棕色颗粒较少,脉络膜内见大量棕色颗粒,巩膜内纤维间以及细胞间亦可见棕色染色(图 1A);而诱导近视眼的 CRALBP 在巩膜中的表达明显降低,仅有少量染色,在视网膜和脉络膜中的表达则升高,尤其是视网膜的表达明显升高,可见到大量棕色颗粒(图 1B)。空白对照组 CRALBP



图 1 免疫组织化学法检测 CRALBP 在豚鼠眼球壁各层的表达($\times 400$) A:CRALBP 在对照眼球壁的表达 B:CRALBP 在诱导近视眼眼球壁的表达 C:免疫组织化学检测阴性对照组 CRALBP 无表达

Fig. 1 The expression of CRALBP in the eyewalls of guinea pigs ($\times 400$) A: expression of CRALBP in eyewall of control eyes B: expression of CRALBP in eyewalls of model eyes C: negative control

在视网膜、脉络膜和巩膜中均无表达(图 1C)。

2.3 Western blot 分析 CRALBP 在豚鼠眼球壁各层的表达

CRALBP 在对照眼视网膜、脉络膜以及巩膜中的表达相近,在脉络膜中的表达稍高;在诱导近视眼视网膜中的表达明显升高,脉络膜中的表达也有所升高,但在巩膜中的表达却明显降低(图 2,3)。

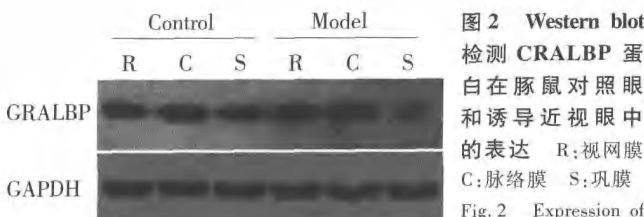


图 2 Western blot 检测 CRALBP 蛋白在豚鼠对照眼和诱导近视眼中的表达 R:视网膜 C:脉络膜 S:巩膜

Fig.2 Expression of CRALBP in model eyes and control eyes of guinea pigs by Western blot R: retina C:choroid S:sclera

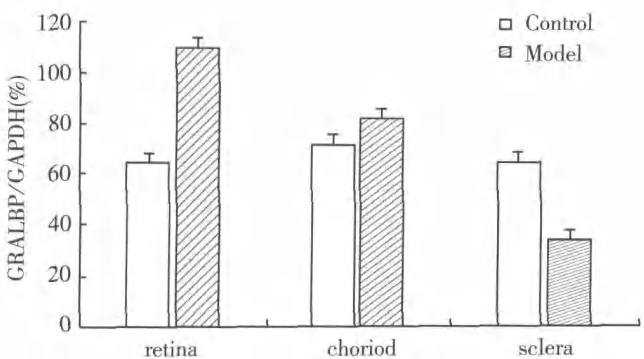


图 3 CRALBP 在豚鼠对照眼和诱导近视眼中表达的相对定量

Fig.3 The quantitation of CRALBP in model and control eyes of guinea pigs

3 讨论

研究发现多数哺乳类动物包括人类在内,婴幼儿眼睛大多处于远视状态,随着眼的生长发育,其屈光状态逐渐趋向正视。目前,被选择用以制造离焦型近视的动物模型主要有鸡、树鼠、猴等^[2-4]。豚鼠近几年才被应用于近视的研究,其眼球结构和正视化机制与人类相似。本实验采用 3~4 周的豚鼠即相当于人的青少年时期。

当今研究近视多使用两类动物模型,即形觉剥夺性近视(form deprivation myopia, FDM)和镜片诱导性近视(lens induced myopia, LIM)。既往研究表明 FDM 和 LIM 是本质上完全不同的两类近视,FDM 的形成主要在于视网膜的局部变化,与视中枢的关系不大;而 LIM 的发生则与视中枢的作用有关。在 FDM 视网膜的影像是连续的离焦,在 LIM 影像是最终聚焦在视网

膜上的^[5]。所以 LIM 更接近于人的近视状态。

本实验结果显示给 3~4 周龄豚鼠配戴 -8.00 D 的透镜可以诱导其屈光状态呈近视。McFadden 等^[6]给豚鼠戴 -4.00 D 的透镜,10 d 后诱导 -2.98 D 的近视,而欧阳朝祐等^[7]用 -10 D、-20 D 透镜给豚鼠在 11 d 内分别诱导平均为 -3.77 D 和 -2.01 D 的相对近视,与本实验的结果基本一致。

CRALBP 是含 316 个氨基酸、相对分子质量为 36 000 的水溶性的维生素 A 类结合蛋白,在人类由 RLBP1 基因编码。CRALBP 和 11-cis 视黄醇有着很高的亲和性,其主要作用和视觉有关。现已有报道证明 CRALBP 在睫状体、角膜、松果体腺、视神经以及大脑中表达,偶尔也会在虹膜中表达。很多证据表明 CRALBP 参与了视锥视杆视循环,在光异构化后对 11-cis 视黄醇的再生起着重要的作用^[8]。而且 CRALBP 在视循环通路中是 11-cis 视黄醇的主要受体,通过 11-cis 视黄醇脱氢酶促进 11-cis 视黄醇向 11-cis 视黄醛的转化^[9],它和其他视循环组成之间的分子机制尚不清楚,11-cis 视黄醛和 CRALBP 解离释放到视网膜色素上皮胞浆膜或者其他蛋白中的机制亦尚不清楚。缺乏 CRALBP 基因小鼠的视杆色素细胞再生受损、视锥细胞介导的光敏感反应延迟。其特征性改变为视杆和视锥细胞的暗适应延迟^[10]。在人类高度近视眼中,往往其暗适应时间也是延长的。本研究结果显示,与对照眼相比,豚鼠诱导近视眼视网膜和脉络膜中的 CRALBP 表达增高,而巩膜的 CRALBP 表达却明显降低。这说明 CRALBP 很可能参与了离焦诱导型近视的形成和发展,但是 CRALBP 在其中的作用及其机制如何,尚有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Fischer AJ, Wallman J, Mertz JR, et al. Localization of retinoid binding proteins, retinoid receptors, and retinaldehyde dehydrogenase in the chick eye [J]. J Neurocytol, 1999, 28: 597 - 609
- 2 Troilo D, Gottlieb MD, Wallman J. Visual deprivation causes myopia in chicks with optic nerve section [J]. Curr Eye Res, 1987, 6: 993 - 999
- 3 Siegwart JT, Jr, Norton TT. The time course of changes in mRNA levels in tree shrew sclera during induced myopia and recovery [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 2067 - 2075
- 4 Zhong XW, Ge J, Deng WG, et al. Expression of pax-6 in rhesus monkey of optical defocus induced myopia and form deprivation myopia [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117: 722 - 726
- 5 Morgan IG. The biological basis of myopic refractive error [J]. Clin Exp Optom, 2003, 86: 276 - 288
- 6 McFadden SA, Howlett MH, Mertz JR. Retinoic acid signals the direction of ocular elongation in the guinea pig eye [J]. Vision Res, 2004, 44: 643 - 653
- 7 欧阳朝祐, 胡文政, 褚仁远, 等. 凹透镜对豚鼠眼生长及屈光发展的影响 [J]. 眼科研究, 2002, 10: 391 - 393
- 8 Saari JC, Crabb JW. Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) [J]. Exp Eye Res, 2005, 81: 245 - 246

9 Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, et al. Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation [J]. *Neuron*, 2001, 29: 739 - 748

10 Burstedt MS, Forsman-Semb K, Golovleva I, et al. Ocular phenotype of bothnia dystrophy, an autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with an R234W mutation in the RLBP1 gene [J]. *Arch Ophthalmol*,

2001, 119: 260 - 267

(收稿: 2008-04-08 修回: 2008-12-22)

(本文编辑: 高 红)

· 临床经验 ·

周边板层及中央穿透角膜移植联合 IOL 植入术临床观察

陈 钧 张庆华 董冰松

对全角膜病变伴白内障行角膜移植 + 白内障摘出人工晶状体(IOL)植入术能彻底清除病灶, 保存眼球壁及前房角的解剖生理结构, 减少角膜散光和排斥反应, 避免多次手术造成的角膜内皮损伤。我们自 1999 年 2 月 ~ 2006 年 6 月行带巩膜环的板层联合穿透角膜移植 + 白内障囊外摘出 + IOL 植入术, 取得良好效果, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 全角膜病变伴白内障患者 16 例, 其中男 13 例, 女 3 例; 年龄 22 ~ 53 岁。角膜溃疡后 7 例, 爆炸伤多发性角膜异物 3 例, 酸碱性烧伤后 6 例。其中粘连性角膜白斑 3 例, 伴假性胬肉或新生血管膜 3 例, 睑球粘连 5 例。所有病例病变均累及角膜缘, 视力为光感 ~ 手动/眼前, 光定位正常。

1.2 方法

1.2.1 供体植片的制备 眼球周围阻滞麻醉, 角膜缘后 3 ~ 4 mm 缝合支撑环。于供体角膜缘处剪开球结膜, 在原病变范围的基础上扩大 0.5 mm, 沿角膜缘后 1 ~ 1.5 mm 垂直切开板层巩膜, 制成周边带前板层巩膜角膜, 中央为直径 7 mm 全层角膜的植片, 湿房保存备用。

1.2.2 制作植床及 IOL 植入 角膜缘后 1 ~ 1.5 mm 做垂直板层巩膜切开, 约 1/2 ~ 2/3 巩膜厚度, 切除前板层角膜巩膜病变, 直径 6.5 mm, 通过后弹力层和内皮细胞层可看到前房者可沿角膜后弹力层穿刺入前房, 新福林散瞳, 黏弹剂维持前房, 白内障前囊环形撕囊后水分离。对于软核性白内障者, 常规吸出混浊晶状体, 囊袋内植入 IOL, 然后切除中央全层角膜。对后弹力层和内皮层混浊或粘连性角膜白斑并硬性白内障者, 切除板层病变后钻切全层角膜, 分离粘连组织, 切除中央混浊的角膜, 形成移植孔, 于开放状态下行白内障囊外摘出术, 植入 IOL。

1.2.3 前房黏弹剂的注入 用植片覆盖植床。植床角膜后弹力层环状断面行 8 ~ 16 针间断缝合。修剪植片巩膜环, 植片与植床巩膜间断缝合 24 针。林格氏液重建前房。

2 结果

16 眼术后视力均提高, 达 0.05 ~ 0.15 者 5 眼, 0.2 以上者 11 眼。植片与植床愈合平整, 植片透明, 板层间紧密贴附, 前房形成良好。5 例睑球粘连完全松解, 眼球转动自如, 穹隆加深。无一例眼压升高。术后 1 个月 13 例植片透明, 3 例半透明;

3 例假性胬肉复发, 但无睑球粘连; 3 例出现角膜新生血管, 侵入植片与植床间为局限树枝状; 3 例轻微上皮型排斥反应, 及时治疗均控制, 植片恢复透明。所有病例均无感染复发和继发感染。

3 讨论

角膜移植和白内障摘出联合手术可减少手术次数及并发症, 但因原发病和手术的复杂性, 处理不当易造成青光眼等并发症。以往文献报道直径 8 mm 的供体植片对于病灶范围大于 8 mm 者采用单纯小口径穿透角膜移植术效果较满意^[1]。随着手术技术的发展, 目前手术引起的供体角膜内皮损伤和其他并发症明显减少, 使全角膜移植手术成为一种有效的复明手术, 但由于大植片携带较多的抗原量, 排斥反应发生率高。本组病例术后角膜移植成活率高, 无排斥反应发生, 主要是采用了中央穿透联合周边板层移植的方法, 中央植片具有活性的角膜内皮细胞, 能维持透明, 周边在尽可能切除角膜病变的同时保留部分深层角膜组织, 尽管部分损伤了睫状前血管分支形成的角膜缘浅层血管网, 但不伤及前睫状动脉分支, 可对植片提供更充分的血液供应; 且周围为板层角膜植片, 无异体内皮细胞, 提供了相对免疫赦免状态, 故排斥反应少^[2-5]。

大口径穿透角膜移植术后继发性青光眼是仅次于免疫排斥反应的严重并发症。因植孔近角膜缘, 难以避免广泛的前房角损害或缝合所造成的虹膜嵌顿、前粘连, 从而引起继发性青光眼。本手术方法在较完整地切除角膜病变组织时, 既保持了中央瞳孔区透明, 有良好的光学效果, 又能最大限度地保留健康角膜组织和周边房角结构。

参考文献

1 赵东卿, 孙秉基, 王印其. 亚全穿透角膜移植的临床应用 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2000, 18(2): 107 - 108

2 Caporossi A, Traversi C, Simi C, et al. Closed-system and open-sky capsulorhexis for combined cataract extraction and corneal transplantation [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2001, 27: 990 - 993

3 Senoo T. Combined surgery with deep lamellar keratoplasty [J]. *Semin Ophthalmol*, 2001, 16: 126 - 136

4 陈钧, 董冰松, 吴京. 板层和穿透性联合角膜移植术的临床观察 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2003, 21(4): 252 - 254

5 Nardi M, Giudice V, Marabotti A, et al. Temporary graft for closed-system cataract surgery during corneal triple procedures [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2001, 27: 1172 - 1175

(收稿: 2008-04-03 修回: 2008-08-10)

(本文编辑: 尹卫靖)