

M4受体阻滞剂MT3抑制豚鼠形觉剥夺性近视的探讨

李涛¹, 周晓东^{1*}, 李炳¹, 罗秀梅¹, 龚哲平²

(1. 复旦大学附属金山医院, 上海 201508; 2. 上海市蒙山中学, 上海 201508)

【摘要】 目的 探讨高度选择性M4受体阻滞剂MT3对豚鼠形觉剥夺性近视的抑制作用及其潜在作用机理。方法 3周龄豚鼠随机分为三组: 对照组、形觉剥夺组、形觉剥夺+MT3组。实验前后使用带状光检影测量屈光度, A超测量眼生物学参数, RT-PCR检测视网膜和脉络膜中TGF- β 2的mRNA相对表达量。结果 与对照组右眼相比, 形觉剥夺+MT3组豚鼠右眼形成了(-1.44 ± 0.50)D相对近视(右眼-左眼), 玻璃体腔和眼轴长度分别延长(0.10 ± 0.02)mm和(0.14 ± 0.07)mm($P=0.001, P<0.001, P<0.001$), 但近视量、玻璃体腔和眼轴长度增加量均显著小于单纯形觉剥夺组($P<0.001, P<0.001, P<0.001$)。单纯形觉剥夺可引起视网膜和脉络膜TGF- β 2的mRNA相对表达量下调($P<0.001, P=0.014$); 而玻璃体腔注射MT3可导致形觉剥夺视网膜和脉络膜TGF- β 2的mRNA相对表达量上调($P<0.001, P<0.001$)。结论 MT3能抑制豚鼠形觉剥夺性近视的形成, 其可能通过上调视网膜和脉络膜中TGF- β 2的mRNA水平而发挥作用。

【关键词】 M4受体阻滞剂; MT3; 形觉剥夺性近视; TGF- β 2; 豚鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0403-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.013

Preliminary study of the inhibitory effect of selective M4 muscarinic receptor antagonist MT3 on form deprivation myopia in guinea pigs

LI Tao¹, ZHOU Xiao-dong^{1*}, LI Bing¹, LUO Xiu-mei¹, GONG Zhe-ping²

(1. Jinshan Hospital of Fudan University; 2. Shanghai City Mengshan Middle School, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the inhibitory effect of highly selective M4 receptor antagonist MT3 on the form deprivation myopia in guinea pigs and its potential mechanism. **Methods** Thirty-two healthy male guinea pigs were randomly divided into three groups: control group, form deprivation group, and form deprivation + MT3 group, 8 animals in each group. Refraction was measured by retinoscopy after cycloplegia before and after the experiment. The ocular biological dimensions were measured by A-scan ultrasound. RT-PCR was used to detect the relative expression of TGF- β 2 mRNA in the retina and choroid. **Results** Compared with the right eyes of control group, the right eyes of form deprivation + MT3 group developed relative myopia of -1.44 ± 0.50 D (right-left eye) ($P=0.001$). The vitreous chamber depth and axial length of the right eyes were significantly prolonged by 0.10 ± 0.02 mm and 0.14 ± 0.07 mm ($P<0.001, P<0.001$), respectively, but the increases of myopia and axial length were significantly smaller than that of the form deprivation group ($P<0.001, P<0.001, P<0.001$). Down-regulation of relative mRNA expression of TGF- β 2 in retina and choroid was found in the form deprivation group ($P<0.001, P=0.014$) compared with the right eyes of the control group, while up-regulation of relative mRNA expression of TGF- β 2 in retina and choroid was found in the form deprivation + MT3 group ($P<0.001, P<0.001$). **Conclusions** MT3 can inhibit the development of form deprivation myopia in guinea pigs, which may play an important role by the regulation of TGF- β 2 mRNA level in the retina and choroid.

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(13ZR1405800); 上海市卫生局青年基金(2013-121)。

[作者简介] 李涛(1983-), 男, 硕士, 研究方向: 眼视光学。Email: litao13013@sina.com

[通讯作者] 周晓东(1963-), 男, 主任医师, 硕士生导师。Email: xdzhou2005@163.com

【Key words】 M4 receptor antagonist; MT3; Form deprivation myopia; TGF- β 2; Guinea pigs

Corresponding author: ZHOU Xiao-dong. E-mail: xdzhou2005@163.com

近视已成为世界上最常见的眼科疾病之一,目前已报道有多种药物可以抑制实验性近视的形成和发展。有研究表明,高度选择性 M4 受体阻滞剂 MT3 能有效抑制小鸡^[1,2]和树鼩^[3]的形觉剥夺性近视。但其具体作用机制未见相关报道。TGF- β 是一类多功能的细胞因子,生物学活性以 TGF- β 2 为主,其在形觉剥夺性近视形成过程中发挥重要作用^[4]。本研究通过建立豚鼠形觉剥夺性近视模型,探讨 MT3 对豚鼠形觉剥夺性近视的抑制作用,进而阐述 TGF- β 2 在形觉剥夺性近视中的表达变化以及 MT3 的潜在作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级 3 周龄英国种短毛三色雄性豚鼠 32 只,购自上海市松江区松联动物养殖场【SCXK(沪)2012-0008】,体重为 140~150 g,按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。在复旦大学附属金山医院动物房【SYXK(沪)2010-0098】中饲养 4 周,保持室温在 20~26℃,湿度 50%,采用日光灯照明,光照周期 12 h:12 h;自由摄食、进水。

1.2 实验分组

24 只豚鼠随机分为三组:①对照组:8 只,双眼不进行任何干预,正常开放饲养 4 周;②形觉剥夺组:8 只,右眼形觉剥夺 4 周,根据李涛等^[5]的方法建立形觉剥夺性近视模型;③形觉剥夺+MT3 组:8 只,右眼形觉剥夺 4 周,同时每 2 d 进行玻璃体腔注射 1 次 MT3 (0.1 mg/瓶,日本 Peptide Institute 公司)。玻璃体腔注射方法:使用 25 μ L 微量注射器于豚鼠右眼上方角膜缘后 1 mm 处进针注入 10 μ L (10 μ mol/L) MT3,注射药物剂量和浓度参照既往文献报道^[1]。其余 8 只豚鼠在实验前处死,并取材和测量视网膜和脉络膜 TGF- β 2 的 mRNA 水平。

1.3 眼生物学参数测量

分别在实验前和实验干预 4 周后进行如下眼生物学参数测量:

1.3.1 屈光度测量

右眼使用睫状肌麻痹剂复方托吡卡胺滴眼液(参天制药有限公司,中国),每 5 min 滴 1 次,共 4 次,30 min 后进行带状光检影验光(YZ24 型,中国苏州六六公司),由验光经验丰富的检查者检影(散

光以半量计入球镜)。

1.3.2 眼轴长度测量

应用 Super SW1000 眼科 A 超测量仪,A 超频率为 11 MHz,测量前先行角膜表面麻醉,测量时探头对准角膜中心并垂直于角膜平面。A 超测量眼轴、前房深度和晶体厚度,每次测量 5 次取平均值,精确到 0.01 mm,眼轴平均值减去前房深度平均值和晶体厚度平均值得出玻璃体腔长度平均值。

1.4 标本收集

分别于实验前(3 周龄)和实验干预 4 周(7 周龄)时,处死豚鼠,摘取右眼。在冰块上快速分离视网膜和脉络膜,随后保存于 -80℃ 冰箱。

1.5 RT-PCR

按照 TRIzol RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书操作,提取视网膜和脉络膜组织总 RNA,紫外分析测定所抽提 RNA 的浓度。根据 Invitrogen 公司的 M-MLV 操作说明书进行,均为 RNase-free 操作,合成 cDNA。根据 Genbank 中的基因序列,以 Primer 5.0 软件设计特异性引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。TGF- β 2 引物序列如下:Forward primer:5'-TACCGTTACTGTG-GCTACTGG-3';Reverse primer:5'-TAATTTGGACAG-GATCTGACCG-3'。PCR 反应条件:预发性 95℃,2 min;之后每一步发性 95℃,15 s;退火延伸 60℃,30 s;共进行 45 个循环;每次在延伸阶段 60℃ 读取吸光值。拷贝 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。以 GAPDH 为内参,引物序列如下:Forward primer:5'-AAAGGCATCTTGGGCTACACCG-3';Reverse primer:5'-ATGAGGTCCACCACCCTGTTG-3'。

1.6 统计分析

使用 SPSS 11.6 统计学软件分析,GraphPad Prism 5 软件绘图。实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行正态性检验。组间比较采用 One-way ANOVA 检验,两两比较采用 Bonferroni 法;组内比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性的标准。

2 结果

2.1 眼生物学参数变化

24 只豚鼠均呈远视状态,3 组间豚鼠右眼和组内豚鼠双眼间屈光度、眼轴长度、前房深度、晶体厚

度及玻璃体腔长度差异均无显著性(所有 $P > 0.05$)。经过 4 周实验干预后,3 组间豚鼠双眼生物学参数见表 1。与对照组右眼相比,形觉剥夺组右眼诱导出(-5.44 ± 1.05) D 相对近视(右眼 - 左眼),玻璃体腔和眼轴长度分别延长(0.45 ± 0.02) mm 和(0.38 ± 0.04) mm($P < 0.001, P < 0.001, P < 0.001$);形觉剥夺 + MT3 组豚鼠右眼形成了

(-1.44 ± 0.50) D 相对近视,玻璃体腔和眼轴长度分别延长(0.10 ± 0.02) mm 和(0.14 ± 0.07) mm($P = 0.001, P < 0.001, P < 0.001$),但近视量、玻璃体腔和眼轴长度增加量显著小于单纯形觉剥夺组($P < 0.001, P < 0.001, P < 0.001$)。而 4 周实验干预后,3 组间前房深度和晶体厚度差异无显著性($P = 0.329, P = 0.088$)。

表 1 4 周实验结束后豚鼠右眼和左眼屈光度和眼生物学参数

Tab. 1 Ocular refraction and biometric dimensions of the right and left eyes in the guinea pigs at the end of 4-week treatment period						
组别 Groups	眼别 Eye	屈光度/D Refraction	眼轴长度 Axial length /mm	前房深度/mm Anterior chamber depth	晶体厚度/mm Lens thickness	玻璃体腔长度/mm Vitreous chamber depth
对照组 Control group	右眼 Right eye	1.94 ± 0.38	8.29 ± 0.06	1.27 ± 0.06	3.40 ± 0.04	3.42 ± 0.04
	左眼 Left eye	1.88 ± 0.34	8.30 ± 0.06	1.27 ± 0.06	3.39 ± 0.04	3.44 ± 0.06
形觉剥夺组 Form deprivation group	右眼 Right eye	-3.00 ± 0.72	8.60 ± 0.03	1.22 ± 0.06	3.35 ± 0.04	3.83 ± 0.05
	左眼 Left eye	2.44 ± 0.34	8.22 ± 0.03	1.23 ± 0.04	3.40 ± 0.06	3.38 ± 0.04
形觉剥夺 + MT3 组 Form deprivation + MT3 group	右眼 Right eye	0.38 ± 0.35^{ab}	8.42 ± 0.06^{ab}	1.24 ± 0.05	3.40 ± 0.06	3.58 ± 0.03^{ab}
	左眼 Left eye	1.81 ± 0.36	8.28 ± 0.08	1.22 ± 0.03	3.38 ± 0.05	3.48 ± 0.04

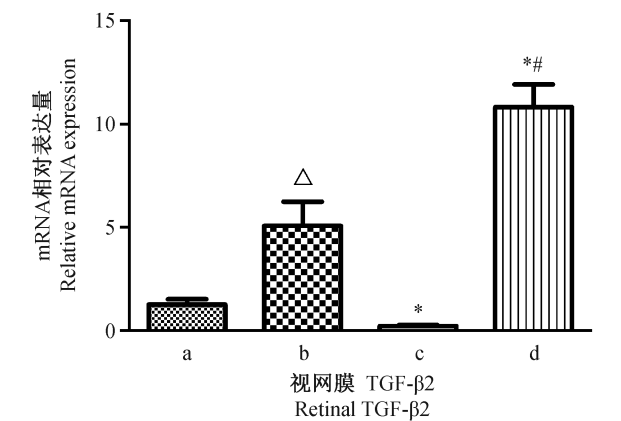
注:^a $P < 0.05$,与对照组相比;^b $P < 0.05$,与形觉剥夺组相比。
Note. ^a $P < 0.05$, compared with the control group; ^b $P < 0.05$, compared with the form deprivation group.

2.2 TGF-β2mRNA 相对表达量变化

为了解 TGF-β2 的 mRNA 水平变化规律,我们首先对 3 周龄豚鼠进行了视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量检测。随着豚鼠成长,视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量显著增加(见图 1 和 2)。7 周龄豚鼠视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量显著高于 3 周龄豚鼠($P < 0.001, P < 0.001$)。经过 4 周单纯形觉剥夺后,与对照组右眼相比,形觉剥夺组右眼视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量下调($P < 0.001, P = 0.014$);而玻璃体腔注射 MT3 可以引起形觉剥夺眼视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量上调($P < 0.001, P < 0.001$)(见图 1、2)。

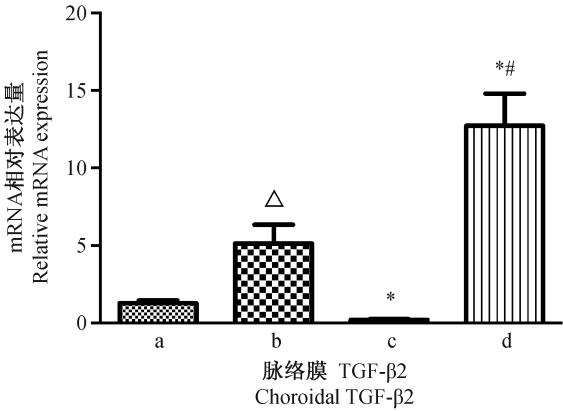
3 讨论

本研究发现高度选择性 M4 受体阻滞剂 MT3 能显著抑制豚鼠形觉剥夺性近视,减少玻璃体腔和眼轴长度的延长量。在形觉剥夺联合玻璃体腔注射 MT3 组的豚鼠右眼中,与正常对照组和单纯形觉剥夺组右眼相比,其视网膜和脉络膜的 TGF-β2 mRNA



注:a,3 周龄组;b,7 周龄正常对照组;c,形觉剥夺组;
d,形觉剥夺 + MT3 组。Δ:与 3 周龄组相比;
*:与对照组相比;#:与形觉剥夺组相比。
图 1 各组间视网膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量
Note. A: 3-week group; b: 7-week control group;
c: Form deprivation group; d: Form deprivation + MT3 group.
Δ: Compared with the 3-week group; *: Compared with the control group; #: Compared with the form deprivation group.

Fig. 1 Relative mRNA expression of retinal TGF-β2 among different groups.



注:a,3 周龄组;b,7 周龄正常对照组;c,形觉剥夺组;
d,形觉剥夺 + MT3 组。△:与 3 周龄组相比;
*:与对照组相比;#:与形觉剥夺组相比。

图 2 各组间脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量

Note. A: 3-week group; b: 7-week control group;
c: Form deprivation group; d, Form deprivation +
MT3 group. △: Compared with the 3-week group;
*: Compared with the control group; #: Compared
with the form deprivation group.

Fig. 2 Relative mRNA expression of choroidal
TGF-β2 among the different groups.

相对表达量显著上调。

既往研究表明非选择性 M 受体阻滞剂阿托品^[6]、消旋山莨菪碱^[7]、环喷托酯^[8]以及选择性 M1/M4 受体阻滞剂哌仑西平^[9]等能够抑制形觉剥夺性近视,但这些药物会引起不同程度的瞳孔散大、调节麻痹等副作用。而 MT3 作为高度选择性 M4 受体阻滞剂,其对 M4 受体的亲和力是 M1 受体的 102 倍^[10],能够使用最小剂量直接作用于目标受体,减少因结合其他亚型 M 受体(如 M3 等)而产生的副作用。McBrien 等^[1]报道 MT3 能有效抑制小鸡的形觉剥夺性近视以及预防近视伴随的脉络膜变薄。抑制作用最大的为玻璃体腔注射 10 μmol/L 的 MT3,随后是 2.5 μmol/L,抑制作用最小的则是 250 nmol/L。这说明玻璃体腔注射 MT3 的抑制效应具有剂量依赖性,玻璃体腔中 MT3 的注射浓度越大,对形觉剥夺性近视的抑制作用越强。Nickla 等^[2]发现 MT3 能抑制小鸡的形觉剥夺性近视,但对离焦性近视没有抑制作用。Arumugam 等^[3]证实了 MT3 对哺乳动物树鼠的形觉剥夺性近视也具有抑制作用。本研究根据 McBrien 等^[1]的报道,对豚鼠采取玻璃体腔注射 10 μM 的 MT3,发现 MT3 能减少约 74% 的相对近视量。这说明 MT3 对豚鼠形觉剥夺性近视同样具有抑制作用。

但 MT3 对形觉剥夺性近视产生抑制效应的机制未见相关报道。既往研究表明 TGF-β2 作为多功能的细胞因子,在动物实验性近视形成中具有重要作用,但关于 TGF-β2 的表达变化规律仍有争议。Honda 等^[11]发现小鸡的近视眼中视网膜和脉络膜的 TGF-β2 的蛋白和 mRNA 水平是减少的。周凌霄等^[12]发现豚鼠形觉剥夺性近视的视网膜 TGF-β2 表达下调。然而,Seko 等^[13]和 Kusakari 等^[14]发现在小鸡的近视眼中,视网膜、脉络膜和巩膜中 TGF-β2 含量是增加的。在树鼠的近视模型中,视网膜中 TGF-β2 的蛋白和 mRNA 水平未发生显著变化^[15],而巩膜中 TGF-β2 的 mRNA 表达是减少的^[16]。

本研究发现 3 周龄的豚鼠视网膜和脉络膜中均存在 TGF-β2 表达,随着豚鼠的自然生长,其 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量也随之增加。形觉剥夺可引起豚鼠视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量下调,这与 Honda 等^[11]和周凌霄等^[12]的结果一致。TGF-β2 能诱导纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)的产生,使得纤溶酶原激活物(PA)活性下降。PA 不仅能够直接降解细胞外基质(ECM),还可激活其下游的基质金属蛋白酶(MMP),影响 ECM 降解。形觉剥夺时,TGF-β2 活性下降,导致 PAI-1 的合成下降,PA 活性增加,引起 MMP 活性增加,从而发挥其蛋白水解酶功能使 ECM 过度降解,引起巩膜组织重塑^[17]。而 MT3 则可导致豚鼠形觉剥夺眼视网膜和脉络膜 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量上调,我们推测 MT3 可能通过上调形觉剥夺眼视网膜和脉络膜中 TGF-β2,进而诱发一系列信号通路变化,减少巩膜组织重塑,维持巩膜生物力学性能,抑制形觉剥夺性近视的形成。此外,我们发现形觉剥夺联合玻璃体腔注射 MT3 组中,视网膜和脉络膜中 TGF-β2 的 mRNA 相对表达量均高于正常对照组,但仍形成了形觉剥夺性近视,说明在形觉剥夺性近视的形成过程中,TGF-β2 可能并非唯一变化的细胞因子,还有其他信号通路参与近视的发生发展。

综上所述,高度选择性 M4 受体阻滞剂 MT3 能抑制豚鼠形觉剥夺性近视的形成,其可能通过上调视网膜和脉络膜中 TGF-β2 的 mRNA 水平而发挥作用。

参 考 文 献

[1] McBrien NA, Arumugam B, Gentle A, et al. The M4 muscarinic antagonist MT-3 inhibits myopia in chick: evidence for site of action [J]. Ophthal Physiol Opt, 2011, 31(5): 529–539.
[2] Nickla DL, Yusupova Y, Totonelly K. The muscarinic antagonist

- MT3 distinguishes between form deprivation- and negative lens-induced myopia in chicks [J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40(9): 962–967.
- [3] Arumugam B, McBrien NA. Muscarinic antagonist control of myopia: evidence for M4 and M1 receptor-based pathways in the inhibition of experimentally-induced axial myopia in the tree shrew [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9): 5827–5837.
- [4] McBrien NA. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 114: 128–140.
- [5] 李涛, 周晓东, 崔心瀚, 等. 豚鼠眼形觉剥夺后恢复期的生物学参数变化规律探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(06): 51–56.
- [6] Diether S, Schaeffel F, Lambrou GN, et al. Effects of intravitreally and intraperitoneally injected atropine on two types of experimental myopia in chicken [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(2): 266–274.
- [7] 杨颖, 李涛, 陈志, 等. 球结膜下注射不同浓度消旋山莨菪碱液对雏鸡形觉剥夺近视眼轴的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(4): 297–300.
- [8] Li T, Zhou XD, Chen Z, et al. Effects of cyclopentolate on form deprivation myopia in guinea pigs [J]. *Open J Ophthalmol*, 2015, 5: 10–18.
- [9] Cotttriall CL, McBrien NA, Annies R, et al. Prevention of form-deprivation myopia with pirenzepine; a study of drug delivery and distribution [J]. *Ophthal Physiol Opt*, 1999, 19(4): 327–335.
- [10] Liang JS, Carsi-Gabrenas J, Krajewski JL, et al. Anti-muscarinic toxins from *Dendroaspis angusticeps* [J]. *Toxicon*, 1996, 34(11–12): 1257–1267.
- [11] Honda S, Fujii S, Sekiya Y, et al. Retinal control on the axial length mediated by transforming growth factor-beta in chick eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(12): 2519–2526.
- [12] 周凌霄, 王理论, 张林. 形觉剥夺性近视豚鼠视网膜形态学观察及 TGF- β 2 表达 [J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(11): 1950–1952.
- [13] Seko Y, Shimokawa H, Tokoro T. Expression of bFGF and TGF-beta 2 in experimental myopia in chicks [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36(6): 1183–1187.
- [14] Kusakari T, Sato T, Tokoro T. Visual deprivation stimulates the exchange of the fibrous sclera into the cartilaginous sclera in chicks [J]. *Exp Eye Res*, 2001, 73(4): 533–546.
- [15] Jobling AI, Wan R, Gentle A, et al. Retinal and choroidal TGF-beta in the tree shrew model of myopia: isoform expression, activation and effects on function [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(3): 458–466.
- [16] Jobling AI, Nguyen M, Gentle A, et al. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18121–18126.
- [17] 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.

[收稿日期] 2015-12-09