

电针对负透镜诱导型近视豚鼠视网膜中 MMP-3 和 TIMP-3 及 Col3 α 1 表达的影响

刘一洁¹, 郝琪¹, 卢秀珍², 吴秋欣², 毕宏生²

引用: 刘一洁, 郝琪, 卢秀珍, 等. 电针对负透镜诱导型近视豚鼠视网膜中 MMP-3 和 TIMP-3 及 Col3 α 1 表达的影响. 国际眼科杂志, 2024, 24(9): 1373-1380.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82104937); 山东省中医药科技项目 (No.M-2023010); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (No. 202207020770); 国家重点研发计划项目 (No.2021YFC2702103, 2021YFC2702100)

作者单位: ¹(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学; ²(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学附属眼科医院山东省眼病防治研究院 山东省中西医结合眼病防治重点实验室 山东省高校中西医结合眼病防治技术(强化)重点实验室

作者简介: 刘一洁, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 斜视、弱视与屈光学。

通讯作者: 吴秋欣, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合眼科临床与基础研究. wuqiuxin@163.com; 毕宏生, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 山东省眼病防治研究院院长, 山东中医药大学附属眼科医院院长, 研究方向: 中西医结合临床眼科疾病、白内障与视光学研究. hongshengbi@163.com

收稿日期: 2023-12-21 修回日期: 2024-07-29

摘要

目的: 探讨电针对负透镜诱导型近视豚鼠视网膜中基质金属蛋白酶(MMP)-3、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-3 和 III 型胶原 α 1(Col3 α 1) 表达的影响。

方法: 将 80 只豚鼠随机分为正常对照组、负透镜诱导型近视组、电针干预组和假穴组, 每组 20 只。正常对照组不做任何干预, 负透镜诱导型近视组、电针干预组和假穴组, 右眼均配戴 -6.0 D 透镜, 左眼不戴镜。戴镜同时电针干预组在合谷穴与太阳穴给予电针刺激, 假穴组豚鼠在假穴位进行干预。造模前, 造模 2、4 wk 检影验光检测屈光度, A 超检测眼轴长度, HE 染色观察视网膜组织结构变化, 定量聚合酶链反应(Q-PCR) 和蛋白免疫印迹(WB) 检测视网膜中 MMP-3、TIMP-3、Col3 α 1 mRNA 和蛋白表达的情况。

结果: 造模 2、4 wk, 负透镜诱导型近视组与正常对照组相比眼轴长度均明显增加(均 $P < 0.05$), 屈光度均明显降低(均 $P < 0.05$); 与负透镜诱导型近视组相比, 电针干预组干预后眼轴长度均减少(均 $P < 0.05$), 屈光度均增加(均 $P < 0.05$)。HE 染色显示, 正常对照组豚鼠视网膜组织各层分界明显, 排列规则; 负透镜诱导型近视组视网膜厚度、内外核层厚度及细胞数量减少, 排列不规则; 电针干预组视网膜整体结构较为完善, 排列较规则, 组织各层形态结构未出现明显异常。Q-PCR 和 WB 检测结果显示, 负透镜诱导型近视组视网膜中 MMP-3、TIMP-3 和 Col3 α 1 mRNA 及蛋白表达均比正常对照组明显升高(均 $P < 0.05$); 而电针干预组干预后视网膜中 MMP-3、TIMP-3 和 Col3 α 1 mRNA 及蛋白表达均较负透镜诱导型近视组明显降低(均 $P < 0.05$)。

结论: 电针能够延缓负透镜诱导型近视豚鼠眼轴增长, 下调负透镜诱导型近视豚鼠视网膜中的 MMP-3、TIMP-3 及 Col3 α 1 mRNA 及蛋白表达。

关键词: 负透镜诱导型近视; 电针; 基质金属蛋白酶-3 (MMP-3); 金属蛋白酶组织抑制剂-3 (TIMP-3); III 型胶原 α 1 (Col3 α 1); 视网膜

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.9.05

Effects of electroacupuncture on the expression of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and collagen type III alpha 1 in the retina of guinea pigs with negative lens - induced myopia

Liu Yijie¹, Hao Qi¹, Lu Xiuzhen², Wu Qiuxin², Bi Hongsheng²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.82104937); Program of Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Shandong Province (No.M-2023010); Shandong Province Medical and Health Technology Development Plan Project (No. 202207020770); National Key Research and Development Program of China (No. 2021YFC2702103, 2021YFC2702100)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Therapy; Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Shandong Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Eye Disease Prevention and Treatment Technology (Enhanced), Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Wu Qiuxin. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Therapy; Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Shandong Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Eye Disease Prevention and Treatment Technology (Enhanced), Jinan 250002, Shandong Province, China. wuqiuxin@163.com; Bi Hongsheng. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Therapy; Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases, Jinan 250002, Shandong Province, China. hongshengbi@163.com

Received: 2023-12-21 Accepted: 2024-07-29

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of electroacupuncture on the expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and collagen type III alpha 1 (Col3α1) in the retina of guinea pigs with lens-induced myopia.

• **METHODS:** A total of 80 guinea pigs were randomly divided into the normal control (NC) group, negative lens-induced myopia (LIM) group, electro-acupuncture (EA) group, and sham group, with 20 guinea pigs in each group. The NC group did not receive any intervention, the LIM, EA and the sham groups were all wearing -6.0 D lens in the right eye and no lens in the left eye. The EA group was given electroacupuncture stimulation at Hegu Point and temple, and guinea pigs in the sham group were given intervention at false points. The refraction was measured by optometry, the axial length was measured by A-ultrasound, and the changes in retinal tissue structure were observed by HE staining. Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) and western blot (WB) were used to detect the expression of MMP-3, TIMP-3, and Col3α1 at mRNA and protein levels before modeling and at 2 and 4 wk after modeling.

• **RESULTS:** The axial length of the negative LIM group was significantly increased compared with the NC group at 2 and 4 wk after modeling (all $P < 0.05$), and the diopter was significantly decreased (all $P < 0.05$); the axial length of the eye in the EA group was decreased compared with the negative LIM group (all $P < 0.05$), and the diopter was increased (all $P < 0.05$). HE staining showed that the boundaries of retinal tissue in the NC group were obvious and arranged regularly. The retinal thickness, the thickness of the inner and outer nuclear layers, and the number of cells were reduced and irregularly arranged in the negative LIM group. The overall structure of the retina in the group EA was relatively perfect, the arrangement was more regular, and the morphological structure of each layer of the tissue did not appear obvious abnormalities. Q-PCR and WB detection results showed that the mRNA and protein relative expression levels of MMP-3, TIMP-3, and Col3α1 in the negative LIM group were significantly higher than those in the NC group (all $P < 0.05$); the expression levels of the EA group was significantly decreased after intervention compared with the negative LIM group (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Electroacupuncture can delay axial growth in negative LIM guinea pigs, and downregulate negative LIM induced expression of MMP-3, TIMP-3, and Col3α1 in the retina.

• **KEYWORDS:** negative lens - induced myopia; electroacupuncture; matrix metalloproteinase-3 (MMP-3); tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 (TIMP-3); collagen type III alpha 1 (Col3α1); retina

Citation: Liu YJ, Hao Q, Lu XZ, et al. Effects of electroacupuncture on the expression of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and collagen type III alpha 1 in the retina of guinea pigs with negative lens-induced myopia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(9):1373-1380.

0 引言

近视已经成为世界性的公共卫生问题,其发病率逐年上升。预计到2050年,近视人群约占世界人口的50%,高度近视人群约占人口的10%^[1]。中国是世界上人口最多的国家,近视的发病率也受到高度关注^[2]。近视不但会影响视觉质量,还会增加视网膜脱离、脉络膜新生血管、黄斑变性等各种眼部疾病发生的风险。近视的发生受多种因素影响,主要是环境及遗传因素的影响,探索其发病机制有助于疾病的预防和治疗。因此,积极干预和控制近视的发生发展,探讨近视的发生机制是非常有必要的,也是当前国际研究的重点。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是细胞赖以生存的微环境,主要由蛋白聚糖、胶原蛋白、弹性蛋白和其他蛋白质构成,其他成分包括生长因子、免疫介质和细胞外蛋白酶^[3],这些成分的变化可能会导致ECM重塑。在视网膜中,ECM分为光感受器间基质和视网膜ECM,ECM的改变会影响视网膜的功能^[3]。一些病理条件可能会引起细胞和ECM成分相互作用的改变,破坏视网膜稳态,导致近视、青光眼、视网膜变性等多种眼病的产生^[4-5]。视网膜作为感知视觉信号的第一站,在近视病因中起着重要作用,但其具体机制尚未完全明确。

细胞外蛋白水解和基质转化是组织稳态的核心过程,主要的基质降解酶是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族的成员。MMPs是细胞外蛋白水解和基质转化的关键介质,其活性在组织微环境中具有广泛的意义^[6]。MMPs的蛋白水解活性受到金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)的调节,故MMPs与TIMPs水平之间的良好调节平衡被认为是健康组织稳态的关键,而这种平衡在病理过程中可能被打破。针灸在防治近视方面有较好的疗效^[7-12],但其对近视视网膜影响的分子机制研究较少。电针是一种将针灸与电脉冲设备相结合的技术,在临床治疗中应用广泛。本研究旨在通过建立负透镜诱导型近视豚鼠模型,探讨电针干预对负透镜诱导型近视豚鼠视网膜中MMP-3、TIMP-3以及Ⅲ型胶原α1(collagen type III alpha 1, Col3α1)mRNA和蛋白表达的影响,阐明电针干预影响视网膜功能的可能机制,为电针干预防控近视提供理论依据,为青少年近视防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 80只2周龄健康三色豚鼠(济南金丰实验动物有限公司),体质量 115 ± 10 g,雄性。入组前排除角膜病、白内障、先天性近视等眼部疾病,将符合条件的豚鼠随机分四组:正常对照组、负透镜诱导型近视组、电针干预组和假穴组,每组20只。实验豚鼠饲养于山东中医药大学眼科研究所动物房,室温保持25℃,控制12/12h的昼夜节律,自由饮食。实验豚鼠的饲养和使用均得到山东中医药大学眼科研究所实验室动物管理和使用委员会批准,遵循视觉与眼科动物研究协会关于眼科研究动物实验的要求。

1.1.2 主要试剂和仪器 1%盐酸环喷托酯滴眼液(爱尔康,美国);1%盐酸奥布卡因滴眼液(参天制药株式会社,日本);SRAReasy细胞/组织RNA提取盒(山东思科捷

科学仪器有限公司);反转录试剂盒、ChamQTM Universal SYBR® qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);放射免疫沉淀测定缓冲液(Radio Immunoprecipitation Assay, RIPA,山东思科捷科学仪器有限公司);苯基甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF,山东思科捷科学仪器有限公司)。针灸针(0.20 mm×25 mm,苏州医疗用品厂有限公司,“华佗牌”);电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司,型号:SDZ-II型,“华佗牌”);YZ24 带状光检影镜(苏州六六视觉科技股份有限公司);眼科 A 超(Quantel Medical 公司,法国);荧光显微镜(日本尼康)。

1.2 方法

1.2.1 造模及处理方法 正常对照组豚鼠不做任何干预。负透镜诱导型近视组、电针干预组和假穴组,右眼均配戴-6.0 D 透镜,左眼不戴镜(图 1),电针干预组戴镜同时在合谷穴与太阳穴给予电针刺激,假穴组豚鼠在假穴位进行干预。通过配戴负透镜的方法使物像聚焦于视网膜后方,引起眼轴代偿增长而形成近视。每天早晚巡视两遍,观察豚鼠精神状态和眼镜配戴情况,若有异常及时处理,以免影响造模。若负透镜诱导型近视组豚鼠眼轴长度较正常对照组明显增加,屈光度明显降低,表明近视诱导成功,本实验 60 只豚鼠造模均成功。

电针干预组豚鼠采用电子针疗仪在两侧太阳穴(外眼角后方颞窝,沿皮下向后下斜刺 2-3 mm)和合谷穴(前肢第 1、2 掌骨之间,直刺 3 mm)给予强度 2 mA,脉冲长度

0.1 s,频率 2 Hz 连续波刺激(图 2)。每天 1 次,每次 30 min,时间固定于上午 9:00-12:00^[13]。

假穴组豚鼠刺激臀部两侧远离传统经络的位置。刺激频率及时间同电针干预组。

1.2.2 观察指标 造模前,造模 2、4 wk 时使用 1% 盐酸环喷托酯滴眼液散瞳,每次 1 滴,间隔 5 min,滴眼 4 次后等待 30 min 进行检查。带状光检影在暗室中进行,工作距离为 50 cm,将水平和垂直两条主子午线的平均值作为最终屈光度值,连续测量 5 次,取平均值。据参考文献[14]进行 A 超参数设置:前房、玻璃体腔、晶状体中的传播速度分别为 1557、1 540、1 723 m/s。A 超测量前使用 1% 盐酸奥布卡因滴眼液给予眼表面麻醉。A 超探头垂直于角膜顶点进行测量,利用不同介质中传播速度的差异,通过不同介质的波长确定眼轴的长度,连续测量 10 次,取平均值。以上操作均由同一眼科专业技师完成。

1.2.3 HE 染色观察视网膜组织结构变化 造模 2、4 wk 后,各组随机选取 4 只 100 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉处死,摘取眼球在无菌生理盐水中进行冲洗并剔除眼周组织,立即置于眼球固定液中固定 24 h,然后进行常规脱水、石蜡包埋、切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,观察每只豚鼠造模视网膜的生理形态结构变化。

1.2.4 Q-PCR 检测 MMP-3 和 TIMP-3 及 Col3α1 mRNA 的表达情况 造模 2、4 wk 后,各组随机选择 8 只豚鼠解剖分离出视网膜,选用改良组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒提取视网膜组织总 RNA,然后进行逆转录合成 cDNA,

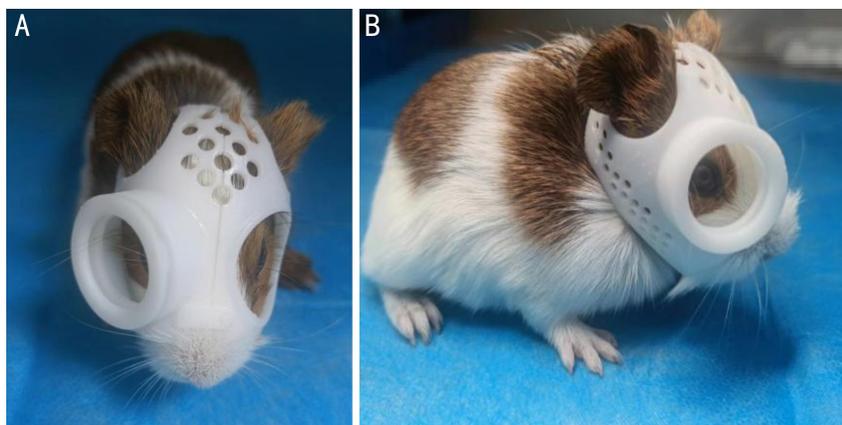


图 1 豚鼠近视模型正侧面观 A:正面;B:侧面。



图 2 电针干预组刺激豚鼠双侧太阳穴和合谷穴。

采用 Q-PCR 技术检测各组视网膜中 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 的 mRNA 表达。应用 DNASTar 软件设计 MMP-3、TIMP-3、Col3α1 基因的引物序列,引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对各组豚鼠视网膜中 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 的 mRNA 相对表达量进行定量分析。每组设 3 个重复。

1.2.5 WB 检测 MMP-3 和 TIMP-3 及 Col3α1 蛋白质的表达情况 造模 2、4 wk 后,各组随机选择 8 只豚鼠分离视网膜组织,并按 10 mg:100 μL 的质量体积比加入 PMSF 和 RIPA 后充分吹打混匀,电动匀浆 6 min,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液至新无菌 EP 管中,在冰浴条件下进行超声破碎 10 min(工作 15 s,暂停 10 s),5 000 r/min 离心 5 min。取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组视网膜中总蛋白浓度。将目标蛋白在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上电泳分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidenedifluoride, PVDF)上进行印迹。用 5% 脱脂奶粉封闭膜后,4℃ 下分别孵育 β-actin (1:5 000, bioss, 北京, 中国)、Col3α1 (1:500, bioss, 北京, 中国)、TIMP3 (稀释度 1:2 000, abclonal, 武汉, 中国) 和 MMP-3 (稀释度 1:500, bioss, 北京, 中国) 过夜,用 1×TBST 缓冲液洗膜 2-3 次后,4℃ 下孵育二抗(稀释度 1:5 000, Sparkjad, 济南, 中国) 1 h,再次洗膜后,将印迹与增强化学发光(ECL)溶液(illipore Corporation, Billerica, MA01821, USA)反应,并暴露于 Fusion-fx7 成像系统(Vilber Lourmat Lourmat, Marne-la-Vallee, France)上。使用计算机软件确定每个条带的相对强度,每组设 3 个重复。

统计学分析:采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素

方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠造模前后屈光度比较 各组豚鼠造模前屈光度比较差异无统计学意义($P>0.05$),造模 2、4 wk 屈光度比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。造模 2、4 wk 负透镜诱导型近视组、电针干预组、假穴组与正常对照组相比屈光度明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);电针干预组屈光度较负透镜诱导型近视组、假穴组升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);假穴组与负透镜诱导型近视组相比屈光度差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.2 各组豚鼠造模前后眼轴长度比较 各组豚鼠造模前眼轴长度比较差异无统计学意义($P>0.05$),造模 2、4 wk 眼轴长度比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。造模 2、4 wk,负透镜诱导型近视组、电针干预组、假穴组眼轴长度与正常对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),电针干预组与负透镜诱导型近视组、假穴组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),负透镜诱导型近视组与假穴组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.3 各组豚鼠造模后不同时间视网膜 HE 染色结果 HE 染色结果显示,造模 2、4 wk,正常对照组豚鼠视网膜组织各层分界明显,结构清晰、完整,排列规则,未见水肿及异常改变,细胞结构未见异常改变;负透镜诱导型近视组、假穴组视网膜组织各层形态结构出现异常变化,视网膜变薄,内核层(inner nuclear layer, INL)、外核层(outer nuclear layer, ONL)厚度及细胞数量减少,排列不规则,出现细胞水肿等异常改变;电针干预组视网膜组织各层形态结构未出现明显异常,接近正常对照组,各层细胞排列较整齐,细胞数量未出现明显减少,未出现细胞水肿等异常改变(图 3)。

表 1 Q-PCR 反应各基因的引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(dp)	退火温度(℃)
GAPDH	TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG	196	60
	CTGTTGCTGTAGCCGAAGTCAT		
MMP-3	CAGTTCGTGTTCTCCTGTGTATGC	96	60
	AGCCCTGTGAATGCCCTGTATG		
TIMP-3	GACTCAACTACCGCTACCACCTG	120	60
	AGCCGAAGTTGGAGAGCATGTC		
Col3α1	TTGCGTGTGCCACTCAGGATC	136	60
	GACAGGAGCAGCGTGAAG		

表 2 各组豚鼠造模前后屈光度比较 ($\bar{x}\pm s, D$)

分组	造模前	造模 2 wk	造模 4 wk
正常对照组	1.33±0.91	-1.03±0.41	-1.75±0.61
负透镜诱导型近视组	1.32±0.89	-4.42±0.51 ^a	-5.70±0.78 ^a
电针干预组	1.45±0.76	-2.08±0.31 ^{a,c}	-3.88±1.01 ^{a,c}
假穴组	1.44±0.91	-5.08±1.43 ^{a,c}	-5.88±0.89 ^{a,c}
<i>F</i>	0.04	11.30	12.78
<i>P</i>	0.99	<0.05	<0.05

注:正常对照组不做任何干预;^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 负透镜诱导型近视组;^b $P<0.05$ vs 电针干预组。

表 3 各组豚鼠造模前后眼轴长度变化 ($\bar{x}\pm s, mm$)

分组	造模前	造模 2 wk	造模 4 wk
正常对照组	7.67±0.06	8.03±0.04	8.17±0.02
负透镜诱导型近视组	7.71±0.07	8.17±0.04 ^a	8.38±0.06 ^a
电针干预组	7.75±0.08	8.09±0.03 ^{a,c}	8.24±0.03 ^{a,c}
假穴组	7.71±0.06	8.19±0.04 ^{a,c}	8.38±0.08 ^{a,c}
<i>F</i>	0.85	15.94	17.97
<i>P</i>	0.48	<0.05	<0.05

注:正常对照组不做任何干预;^a $P<0.05$ vs 正常对照组;^c $P<0.05$ vs 负透镜诱导型近视组;^b $P<0.05$ vs 电针干预组。

2.4 各组豚鼠造模后不同时间视网膜中 MMP-3 和 TIMP-3及 Col3α1 mRNA 的表达情况 造模 2、4 wk,与正常对照组相比,负透镜诱导型近视组、电针干预组和假穴组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 mRNA 表达均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与负透镜诱导型近视组相比,电针干预组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 mRNA 表达均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),而假穴组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$);与电针干预组相比,假穴组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 mRNA 表达均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4,图 4。

2.5 各组豚鼠造模后不同时间视网膜中 MMP-3 和 TIMP-3及 Col3α1 蛋白的表达情况 造模 2 wk,与正常对照组相比,负透镜诱导型近视组、电针干预组和假穴组

MMP-3、TIMP-3和 Col3α1 的蛋白表达均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);造模 4 wk,与正常对照组相比,负透镜诱导型近视组、假穴组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 的蛋白表达均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);电针干预组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 的蛋白表达均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

造模 2、4 wk,与负透镜诱导型近视组相比,电针干预组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 的蛋白表达均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),而负透镜诱导型近视组与假穴组比较 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 的蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);与电针干预组相比,假穴组 MMP-3、TIMP-3 和 Col3α1 mRNA 水平表达均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5,图 5。

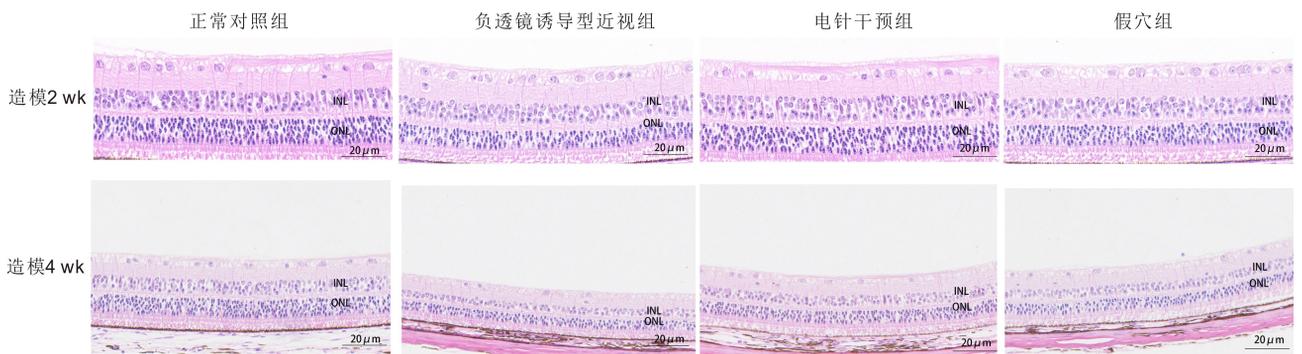


图 3 各组豚鼠造模后不同时间视网膜 HE 染色结果。

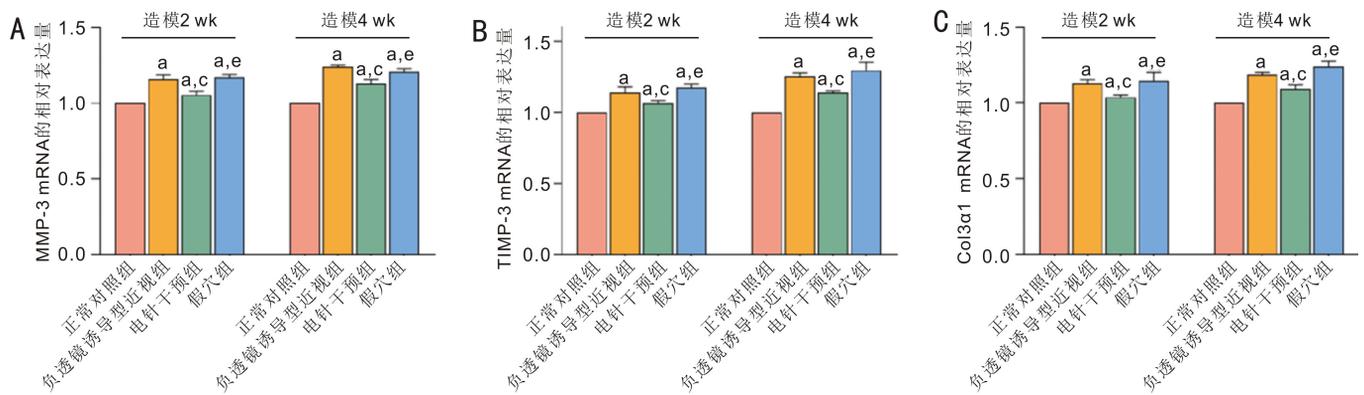


图 4 各组豚鼠造模后不同时间视网膜中 MMP-3 和 TIMP-3 及 Col3α1 mRNA 的表达情况 A: MMP-3; B: TIMP-3; C: Col3α1; ^a $P<0.05$ vs 正常对照组; ^b $P<0.05$ vs 负透镜诱导型近视组; ^c $P<0.05$ vs 电针干预组。

表 4 各组豚鼠造模后不同时间视网膜中 MMP-3 和 TIMP-3 及 Col3α1 mRNA 的相对表达量 $\bar{x} \pm s$

分组	造模 2 wk			造模 4 wk		
	MMP-3	TIMP-3	Col3α1	MMP-3	TIMP-3	Col3α1
正常对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
负透镜诱导型近视组	1.16±0.02 ^a	1.14±0.03 ^a	1.13±0.02 ^a	1.24±0.01 ^a	1.25±0.02 ^a	1.19±0.01 ^a
电针干预组	1.03±0.02 ^{a,c}	1.07±0.01 ^{a,c}	1.04±0.01 ^{a,c}	1.13±0.02 ^{a,c}	1.14±0.01 ^{a,c}	1.05±0.03 ^{a,c}
假穴组	1.17±0.02 ^{a,c}	1.17±0.02 ^{a,e}	1.08±0.02 ^{a,e}	1.21±0.02 ^{a,c}	1.30±0.05 ^{a,c}	1.24±0.03 ^{a,e}
<i>F</i>	47.56	29.17	15.32	110.50	52.69	55.58
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:正常对照组不做任何干预; ^a $P<0.05$ vs 正常对照组; ^b $P<0.05$ vs 负透镜诱导型近视组; ^c $P<0.05$ vs 电针干预组。

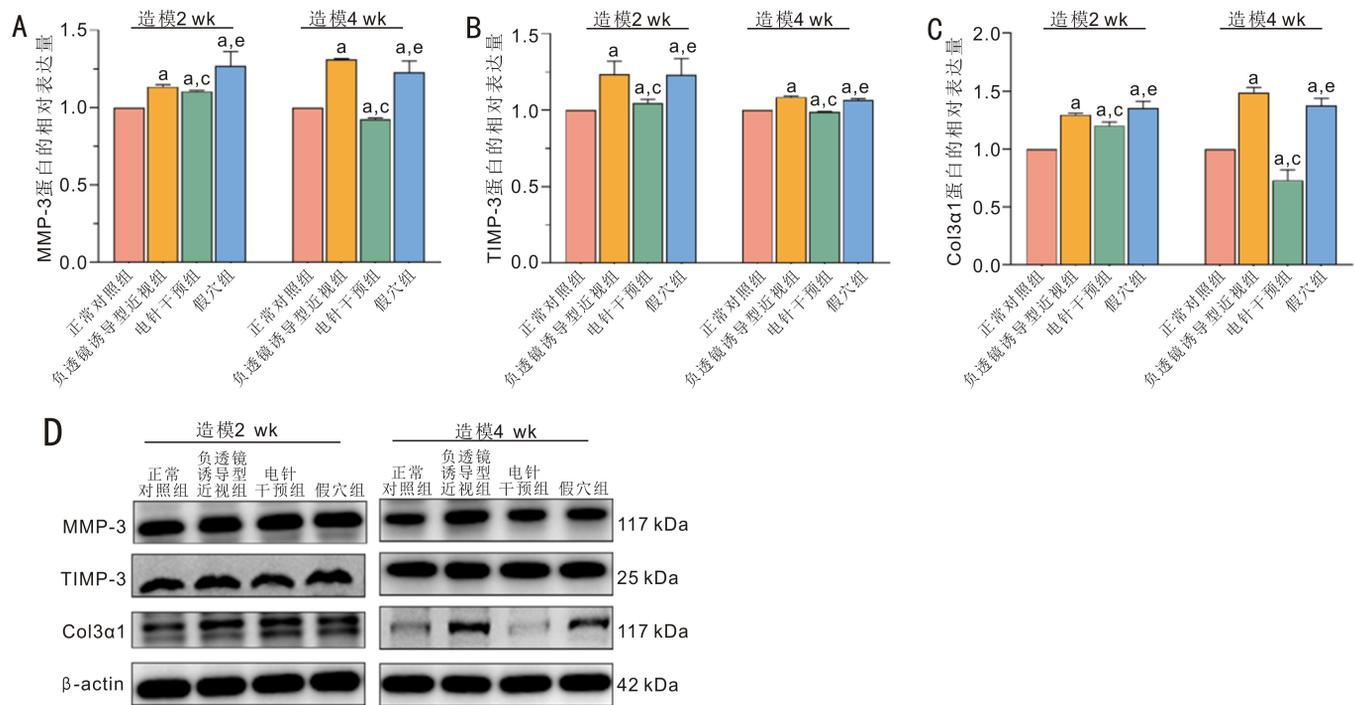


图5 各组豚鼠造模后不同时间视网膜中MMP-3和TIMP-3及Col3α1蛋白的表达情况 A: MMP-3; B: TIMP-3; C: Col3α1; D: WB检测结果; * $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^a $P < 0.05$ vs 负透镜诱导型近视组; ^c $P < 0.05$ vs 电针干预组。

表5 造模后不同时间视网膜中MMP-3和TIMP-3及Col3α1蛋白的相对表达量 $\bar{x} \pm s$

分组	造模 2 wk			造模 4 wk		
	MMP-3	TIMP-3	Col3α1	MMP-3	TIMP-3	Col3α1
正常对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
负透镜诱导型近视组	1.13±0.01 ^a	1.24±0.07 ^a	1.29±0.01 ^a	1.31±0.01 ^a	1.09±0.01 ^a	1.49±0.03 ^a
电针干预组	1.10±0.00 ^{a,c}	1.05±0.02 ^{a,c}	1.20±0.03 ^{a,c}	0.93±0.01 ^{a,c}	0.99±0.01 ^{a,c}	0.73±0.08 ^{a,c}
假穴组	1.27±0.08 ^{a,e}	1.23±0.09 ^{a,e}	1.35±0.05 ^{a,e}	1.23±0.06 ^{a,e}	1.06±0.01 ^{a,e}	1.37±0.05 ^{a,e}
<i>F</i>	16.89	9.75	57.76	74.72	147.10	103.50
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:正常对照组不同任何干预; ^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 负透镜诱导型近视组; ^e $P < 0.05$ vs 电针干预组。

3 讨论

《灵枢·邪气脏腑病形》中记载:“十二经脉,三百六十五络,其气血皆上于面而走窍,其精阳气上走于目而为睛”。人体的气血主要通过经络运行,上达于头面部而分别汇入各个孔窍之中,双目得到濡养故能视。针刺相应穴位可改善血流状态,缓解视疲劳,治疗假性近视,提高近视患者视力^[15-16]。针刺能够改善颈内动脉和眼动脉的血流循环从而解除血管壁平滑肌的痉挛恢复血管的舒缩功能,增加眼部血液供应,同时针刺也可延缓视网膜细胞的凋亡^[17]。电针干预刺激可引起神经兴奋,改变局部血流量^[18]。针刺在近视防治方面有较好的效果,但其治疗机制尚不完全清楚。视网膜是一个具有众多细胞的精细层状结构,通过多种分子途径处理复杂的视觉信号。研究表明近视是双侧特发性视网膜前黄斑纤维化病变的危险因素^[19],ECM成分的改变可能会扰乱视网膜微环境,引起视网膜ECM重塑或视网膜纤维化^[4],影响视网膜正常生理功能,促进近视的发展。

在本研究中,造模2、4 wk负透镜诱导型近视组豚鼠眼轴长度较正常对照组明显增加,屈光度明显降低,表明近视诱导成功。给予电针干预后,眼轴明显下降,屈光度明显升高,说明电针干预可有效控制近视度数和眼轴的增长。此外,为了验证穴位刺激的疗效,我们还增加了假穴位(臀部两侧远离传统经络的位置)作为假穴组。

MMPs是一类蛋白降解酶,几乎可以降解所有的ECM成分,如纤连蛋白、层黏连蛋白、胶原纤维和透明质酸等。这些蛋白酶的活性受到其抑制剂TIMPs的严格调节。TIMPs不仅可以抑制各种MMPs的活性,还可以影响细胞形态、细胞生长、细胞凋亡和生长因子的产生,这些功能都可能影响近视发展^[20]。MMPs在体内的功能取决于它们与TIMPs之间的局部平衡^[21]。MMP-3是一种锌依赖性内肽酶,不仅能够催化多种胶原、ECM和非胶原基底膜蛋白的降解,还能切割前肽单元以激活其他MMPs,对于正常和病变组织中的基质降解和重塑至关重要^[22]。TIMP-3不仅能够诱导黑色素瘤细胞、视网膜色素上皮细

胞和乳腺癌细胞的凋亡^[23-24],还能调节视网膜、脉络膜血管系统发育,抑制眼部血管生成^[25],影响 ECM 稳态。长期以来,MMPs 和 TIMPs 之间的平衡一直被认为是组织健康的关键指标,在健康和病变组织的 ECM 转换中起着关键作用,但在涉及 ECM 降解的各种过程中,MMPs 与 TIMPs 水平间的变化关系是复杂而又矛盾的^[26]。在许多肿瘤领域,MMPs 可以降解 ECM,并从 ECM 中释放生长因子,促进血管生成,刺激癌细胞的迁移和侵袭^[27-28]。与正常组织相比,MMPs 几乎在所有癌症中的表达和激活都有所增加,但在许多癌症中,血清或癌细胞中的 TIMPs 水平经常上调,而不是下调。为了解释这种现象,人们提出了内稳态假说^[28],即 TIMPs 表达量的增加可能是对 MMPs 表达量增加的代偿性反应,最大限度抵消和抑制 MMPs 介导的 ECM 降解。在本研究中,造模 2、4 wk,负透镜诱导型近视组豚鼠视网膜中 MMP-3、TIMP-3 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调。这与既往研究相一致^[29],即在近视发展早期,豚鼠睫状肌中 MMP-3、TIMP-3 的表达上调。但可能由于视网膜和睫状肌结构不同,在造模 4 wk 后,睫状肌形态发生病变,细胞合成细胞因子功能受阻,相关因子表达水平降低。本研究结果与内稳态假说相一致,即负透镜诱导型近视组豚鼠视网膜 TIMPs 表达量的增加可能是 MMPs 水平升高引起 ECM 强烈降解的代偿反应,用以限制 MMPs 过度上调所造成的损害。此外,本研究还发现,造模 2、4 wk,电针干预组豚鼠视网膜中 MMP-3、TIMP-3 mRNA 和蛋白的表达均低于负透镜诱导型近视组,说明电针干预可影响近视豚鼠视网膜中 MMP-3、TIMP-3 mRNA 和蛋白的表达,延缓近视的发展。

ECM 受到胶原和非胶原蛋白酶的重塑,包括金属蛋白酶和纤溶酶/纤溶酶原家族。胶原合成和降解之间的平衡是决定 ECM 积累程度的重要因素^[30]。胶原纤维是巩膜中最丰富的成分,占其净重的 90%,主要由胶原 I、III 和 IV 形成。有研究表明,Col3 α 1 参与心脏和肝的纤维化过程^[31-32]。纤维化病变包括成纤维细胞过度活化、胶原纤维和 ECM 蛋白过度沉积^[33]。成纤维细胞存在于身体的许多组织中,通常处于相对静止状态,主要负责 ECM 的产生和周转^[34]。其产生的分化细胞——肌成纤维细胞,参与组织修复和组织损伤的过程,是许多病理情况下的重要细胞。肌成纤维细胞持续存在于组织中,通过增加基质合成和组织收缩导致组织纤维化。在本研究中,造模 2、4 wk,负透镜诱导型近视组、假穴组豚鼠视网膜中 Col3 α 1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调,提示近视导致视网膜纤维化的产生,并引起视网膜组织发生重塑。电针干预组豚鼠视网膜中 Col3 α 1 mRNA 和蛋白的表达均低于负透镜诱导型近视组,表明电针干预能够恢复或改善受损视网膜的生理功能。与既往研究相比^[12,29],本研究设立了假穴位,能更好的说明太阳穴和合谷穴穴位刺激的作用与效果。据此,我们推测,在近视状态下,Col3 α 1 mRNA 和蛋白表达量增加并参与视网膜纤维化过程,影响视网膜正

常的生理功能,电针干预可通过下调 Col3 α 1 mRNA 和蛋白的表达,改善视网膜的生理功能,减少纤维化。

综上所述,视网膜形态结构的异常可影响近视的发生与发展。我们的研究表明,负透镜诱导型近视组豚鼠视网膜中 MMP-3、TIMP-3 和 Col3 α 1 mRNA 和蛋白的表达上升,可能会影响视网膜组织的生理功能,导致组织重塑,并出现纤维化;电针干预会减缓负透镜诱导型近视组豚鼠眼轴的增加,并显著下调视网膜中 MMP-3、TIMP-3 和 Col3 α 1 mRNA 和蛋白的表达,从而延缓近视的发展。本研究为青少年近视防控提供了新思路,但仍需进一步探索电针在近视发展过程中通过调节 MMP-3、TIMP-3 和 Col3 α 1 发挥作用的具体机制。

参考文献

- [1] Medina A. The cause of myopia development and progression: Theory, evidence, and treatment. *Surv Ophthalmol*, 2022, 67 (2): 488-509.
- [2] Dong L, Kang YK, Li Y, et al. Prevalence and time trends of myopia in children and adolescents in China: a systemic review and meta-analysis. *Retina*, 2020,40(3):399-411.
- [3] Al-Ubaidi MR, Naash MI, Conley SM. A perspective on the role of the extracellular matrix in progressive retinal degenerative disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013,54(13):8119-8124.
- [4] Bao B, Liu JP, Li TL, et al. Elevated retinal fibrosis in experimental myopia is involved in the activation of the PI3K/AKT/ERK signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*, 2023,743:109663.
- [5] Reinhard J, Wiemann S, Hildebrandt S, et al. Extracellular matrix remodeling in the retina and optic nerve of a novel glaucoma mouse model. *Biology*, 2021,10(3):169.
- [6] de Almeida LGN, Thode H, Eslambolchi Y, et al. Matrix metalloproteinases: from molecular mechanisms to physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 2022, 74 (3): 712-768.
- [7] Yu T, Xie X, Wei H, et al. Electroacupuncture improves choroidal blood flow to inhibit the development of lens-induced myopia in guinea pigs. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022,2022:3286583.
- [8] 黄宗安,王炜,朱振富.角膜塑形镜联合中医针灸治疗青少年轻中度近视的临床观察. *实用防盲技术*, 2019,14(2):52-56.
- [9] Huang Q, Yang Y, Huang H, et al. Clinical study on acupuncture acupoints around the eyes in treating myopia in children and adolescents: a study protocol. *Medicine*, 2020,99(43):e22659.
- [10] Han R, Kong XH, Zhao F, et al. Auricular acupressure for myopia prevention and control in children and its effect on choroid and retina: a randomized controlled trial protocol. *Trials*, 2021,22(1):387.
- [11] Yang ZH, Hao JW, Liu JP, et al. Electroacupuncture alleviates ciliary muscle cell apoptosis in lens-induced myopic guinea pigs through inhibiting the mitochondrial signaling pathway. *Int J Ophthalmol*, 2023, 16(12):1942-1951.
- [12] 於亭,魏慧霞,田庆梅,等.电针对透镜诱导型近视豚鼠脉络膜血流和内皮素-1 及其受体表达的影响. *国际眼科杂志*, 2021,21(8):1333-1338.
- [13] 李辞蓉,华兴邦,周浩良,等.豚鼠针灸穴位图谱的研制. *上海针灸杂志*, 1992,2:28-30.

- [14] 吴姗姗, 魏慧霞, 郭滨, 等. 电针对负透镜诱导型近视豚鼠睫状肌中表皮生长因子及其受体表达的作用. 眼科新进展, 2020, 40(4):318-322.
- [15] 邓国涛, 刘祥开, 钟伟友, 等. 眼动参数变化与近视伴视疲劳关系的研究. 湖北医药学院学报, 2020, 39(3):221-223.
- [16] 周倩倩, 王继红, 王荣荣, 等. 针灸对低度青少年近视短期效果的临床观察. 中华中医药学刊, 2021, 39(2):211-214.
- [17] 祁玉麟, 陈念芝, 李杰, 等. 针刺对感光细胞凋亡模型鼠视网膜小胶质细胞活性的影响. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6):1321-1324, 后插8.
- [18] Kubota T, Mori H, Morisawa T, et al. Influence of electroacupuncture stimulation on skin temperature, skin blood flow, muscle blood volume and pupil diameter. *Acupunct Med*, 2020, 38(2):86-92.
- [19] Hikichi T, Trempe CL. Risk of bilateral idiopathic preretinal macular fibrosis. *Eye (Lond)*, 1995, 9 (Pt 1):64-66.
- [20] 彭庆生, 高洪莲, 孙瑞婷, 等. 血管内皮生长因子-A165对形觉剥夺性近视豚鼠巩膜重塑的影响. 国际眼科杂志, 2023, 23(9):1454-1460.
- [21] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 2010, 141(1):52-67.
- [22] Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol*, 2003, 4(6):216.
- [23] Martin del Campo SE, Latchana N, Levine KM, et al. MiR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression; *in vivo* effects of miR-21 inhibitor. *PLoS One*, 2015, 10(1):e0115919.
- [24] Kmiecik AM, Pula B, Suchanski J, et al. Metallothionein-3 increases triple-negative breast cancer cell invasiveness via induction of metalloproteinase expression. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0124865.
- [25] Ebrahem Q, Qi JH, Sugimoto M, et al. Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(9):6117-6123.
- [26] Jia Y, Hu DN, Sun J, et al. Correlations between MMPs and TIMPs levels in aqueous humor from high myopia and cataract patients. *Curr Eye Res*, 2017, 42(4):600-603.
- [27] Poruk KE, Firpo MA, Scaife CL, et al. Serum osteopontin and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 2013, 42(2):193-197.
- [28] Singh RD, Haridas N, Patel JB, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer. *Indian J Clin Biochem*, 2010, 25(3):250-259.
- [29] 郝一宪, 李士玲, 魏慧霞, 等. 电针干预对透镜诱导型近视豚鼠睫状肌中MMP-3、TIMP-3及Col3 α 1表达的影响. 眼科新进展, 2021, 41(8):706-711.
- [30] Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(1):107-114.
- [31] Zou T, Zhu M, Ma YC, et al. MicroRNA-410-5p exacerbates high-fat diet-induced cardiac remodeling in mice in an endocrine fashion. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8780.
- [32] Chen X, Li XF, Chen Y, et al. Hesperetin derivative attenuates CCl₄-induced hepatic fibrosis and inflammation by Gli-1-dependent mechanisms. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76:105838.
- [33] Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, et al. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med*, 2013, 5(167):167sr1.
- [34] Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*, 2007, 257:143-179.