

文章编号:1004-7220(2018)02-0157-06

# 实验性高度近视眼巩膜胶原及弹性模量的变化

王聪聪, 谢永芳, 王国辉

(潍坊医学院 生物科学与技术学院, 山东 潍坊 261053)

**摘要:**目的 探讨实验性高度近视眼巩膜组织的胶原及弹性模量的变化,进一步明确高度近视眼的发生机制。**方法** 1月龄新西兰大白兔20只随机单侧眼球眼睑缝合建立高度近视眼动物模型,另一侧眼球为正常对照眼,建模60d后,测量眼轴长度确定建模成功;获取不同部位巩膜组织(前部、赤道部和后部巩膜),一部分巩膜制成巩膜条带,用Instron 5544试验机检测巩膜的弹性模量,一部分巩膜组织固定后进行HE染色观察巩膜结构,一部分巩膜组织固定后通过电镜观察胶原原纤维,一部分巩膜组织匀浆检测羟脯氨酸浓度,确定胶原含量。**结果** 随着月龄增加,巩膜组织弹性模量和胶原含量不断增加,胶原原纤维的直径不断增大。高度近视眼后部巩膜的弹性模量、羟脯氨酸含量明显小于正常眼,且胶原原纤维的直径小于正常眼,而前部和中部巩膜未见明显差异。**结论** 在高度近视发生过程中,后部巩膜发生重塑,胶原原纤维的排布和胶原含量发生变化,导致后部巩膜生物力学性能降低,容易发生扩张和变形,进而引起近视。研究结果为后续以胶原为靶点,在生长发育早期防治高度近视眼奠定基础。

**关键词:**高度近视; 巩膜; 胶原; 弹性模量

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.02.011

## Changes in the Scleral Collagen and Elastic Modulus in Experimental High Myopia

WANG Congcong, XIE Yongfang, WANG Guohui

(College of Biological Science and Technology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To investigate changes in the collagen expression and elastic modulus in scleral tissues of experimental high myopia, so as to further explain the mechanism of high myopia. **Methods** Twenty one-month-old New Zealand white rabbits were monocularly treated by eyelid suturation randomly to build an experimental high myopia eye model. Eyes without such operation were set as the normal control. After 60 days, the experimental high myopia eye models were successfully established by measuring the eye axis. The eyeballs were obtained to assess three regions of the sclera (anterior, equatorial, and posterior area). The three regions of the scleral tissues were separately divided into four groups. The first group was made into scleral strips for elastic modulus measurement using an Instron5544. The second group was hematoxylin-and-eosin stained for observation of the scleral structures. The third group was used for electron microscopy to observe the size distribution of collagen fibrils. The last group was homogenized, and the concentration of hydroxyproline was measured to determine the collagen content. **Results** The elastic modulus, collagen content, and diameters of the collagen fibrils of each scleral region increased with age. The posterior sclera of high myopia had looser collagen fibril ar-

收稿日期:2017-07-18; 修回日期:2017-09-25

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2017PA011),山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0069)

通信作者:王国辉,副教授,E-mail:wanguohui1983@163.com

rangement, less hydroxyproline concentration, and lower elastic modulus than the normal eyes. However, there was no significant difference as for the anterior and equatorial sclera. **Conclusions** The remodeled posterior sclera of high myopia has a looser collagen fibril arrangement, less collagen, and lower elastic modulus, which easily causes expansion and deformation and thus lead to high myopia. The research findings provide the theoretical guidance for high myopia prevention by targeting the collagen during early development.

**Key words:** high myopia; sclera; collagen; elastic modulus

北京大学中国健康发展研究中心 2016 年发布的《国民视觉健康》计数据显示,我国青少年近视发病率已高居世界第一,患有高度近视的总人口高达  $(2.90 \sim 3.04) \times 10^7$ ,关于近视眼的防治和研究工作应该引起社会各方面的高度重视。高度近视,又称病理性近视或进行性近视,其形成过程伴随巩膜的主动重塑,可进一步发展引起后巩膜葡萄肿和致盲,有些还不得不进行后巩膜加固手术。因此,弄清巩膜塑形改变的生物力学机制并提出相关防治措施十分必要。

人在出生后的生长发育时期,眼球逐渐正视化,在此过程中眼球不断生长,其结构和功能不断完善,视力的发展也不断完善并趋于稳定。近视多发生在儿童及青少年时期,这一时期正处在巩膜的生长发育时期,是眼球的正视化阶段,也是近视眼防治的最佳时期。在生长过程中,巩膜结构和生物力学特性会发生变化<sup>[1]</sup>,巩膜的正常生长发育决定眼球的结构和功能不断完善。巩膜的组织结构主要由胶原纤维构成。目前研究认为,高度近视眼的形成是巩膜重塑的结果,而巩膜胶原重构是巩膜重塑和高度近视眼发生的基础,但高度近视眼发生机制和胶原重构机制尚不明确<sup>[2]</sup>。本文采用眼睑缝合法建立高度近视眼动物模型,通过检测巩膜结构、生物力学特性和胶原表达,进一步明确高度近视眼的发生机制,为后续以胶原为靶点,在生长发育早期防治高度近视眼奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 高度近视眼动物模型的建立

取 1 月龄新西兰大白兔,通过眼睑缝合法建立形觉剥夺性高度近视眼模型<sup>[3]</sup>,术后喂养 60 d,检测诱导后兔眼眼轴长度,确定诱导结果。

### 1.2 巩膜组织获取

正常 1 月龄新西兰大白兔设为 1 月龄组,高度

近视眼模型诱导 60 d 后的实验眼设为实验组,正常对照眼设为 3 月龄组。经耳缘静脉空气栓塞处死新西兰大白兔,摘取双眼眼球,PBS 缓冲液清洗干净,放入盛有 PBS 缓冲液的培养皿中。用眼科剪及眼科镊除去角膜、筋膜、眼外肌等多余组织。剪开眼球,剥离巩膜组织,分割为前部、赤道部和后部巩膜。部分巩膜切成  $3 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  条带,于 PBS 缓冲液中浸润后,在 Instron 5544 试验机上进行单向拉伸破坏实验,计算巩膜弹性模量;部分巩膜组织用 4% 多聚甲醛固定,常温保存,以备制作组织切片进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色;部分巩膜组织切成  $1 \text{ mm}^3$  组织块,用戊二醛固定,4 °C 保存以备制作超薄切片进行透射电镜观察;部分巩膜组织电子天平称重后 -70 °C 保存以备匀浆,检测羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 浓度,确定胶原含量。

### 1.3 巩膜组织弹性模量测定

将制作好的巩膜条带在 Instron 5544 试验机进行实验,预拉伸实验设置预循环载荷为 50 mN,预循环速度为  $2 \text{ mm/min}$ ,实验终止条件为载荷大于 52 mN,进行 5 次,经过预循环,能够得到重复性较好的数据和稳定的载荷-变形曲线。预循环后进行拉伸破坏实验,加载速度  $5 \text{ mm/min}$  逐渐增加载荷,实验终止条件为载荷大于 5 N,直至试件被拉断。根据计算机输出的载荷-变形数据,计算巩膜弹性模量<sup>[4]</sup>。

### 1.4 巩膜组织 HE 染色

巩膜组织经过 4% 多聚甲醛固定后进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,制作组织切片。行常规 HE 染色,中性树脂封片后通过显微镜在 400 倍下进行观察拍照。

### 1.5 巩膜组织透射电镜观察

巩膜组织用 4% 戊二醛固定 24 h,磷酸缓冲液清洗后,用 1% 锇酸行后固定,经磷酸缓冲液充分漂

洗后丙酮梯度脱水,用 Epon 812 环氧树脂浸透并包埋组织块。制作超薄电镜切片,醋酸双氧铀和柠檬酸双染后在透射电镜下观察拍照。

### 1.6 巩膜组织胶原含量确定

巩膜的主要含量是胶原,而 Hyp 是胶原组织的主要成分之一,胶原以外的其他蛋白,除弹性蛋白含少量 Hyp 外(约 1%),均不含 Hyp。因此,Hyp 含量是组织胶原含量的特异性指标,测定 Hyp 含量能确定组织中的胶原含量。将收集的巩膜组织样本进行匀浆,然后根据 Hyp 检测试剂盒说明书要求依次完成操作,通过酶标仪在 550 nm 检测吸光度,并计算 Hyp 浓度,进而确定巩膜组织中的胶原含量。

### 1.7 统计学分析

实验数据均以均值  $\pm$  标准差表示,所有数据采用 SPSS 14.0 统计学软件进行处理和统计学分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 高度近视眼眼轴变化

测量高度近视眼动物模型建立前后实验动物眼轴长度。高度近视眼动物模型建立之前,实验动物双眼眼轴无明显的差异,但 60 d 眼睑缝合诱导高度近视眼后,实验组与对照组眼轴比较,眼轴长度相对延长了 ( $0.58 \pm 0.15$ ) mm,此差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明成功建立了高度近视眼动物模型(见图 1)。

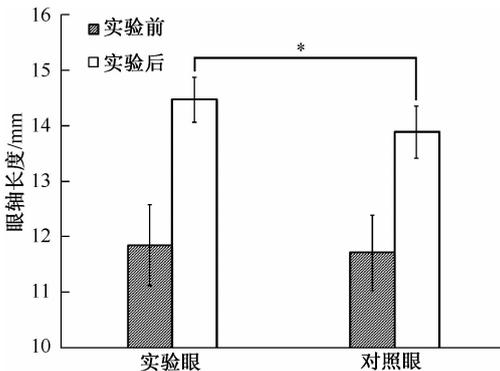


图 1 实验性高度近视眼模型建立前后兔眼的眼轴变化 ( $n = 6, * P < 0.05$ )

Fig. 1 Length of ocular anteroposterior axis before and after establishment of the experimental high myopia eye model

### 2.2 巩膜弹性模量变化

图 2 所示为根据 Instron 5544 试验机输出数据计算所得的各组巩膜弹性模量。60 d 后实验动物对照眼和实验眼前部、赤道部、后部巩膜弹性模量均显著增加( $P < 0.05$ ),前部巩膜和赤道部巩膜之间的弹性模量无明显差异( $P > 0.05$ ),而实验眼后部巩膜的弹性模量明显小于对照眼( $P < 0.05$ )。

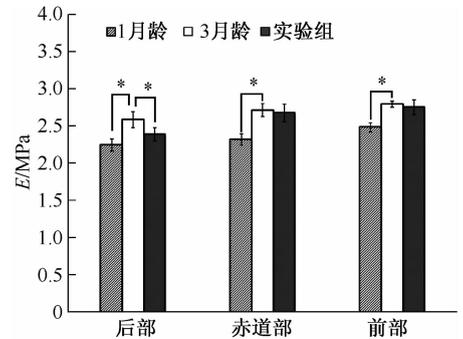


图 2 不同月龄及高度近视眼巩膜组织弹性模量 ( $n = 6, * P < 0.05$ )

Fig. 2 Elastic modulus of the sclera in different age groups and experimental high myopia eye group

### 2.3 电镜观察胶原纤维变化

透射电镜观察不同月龄巩膜组织的胶原原纤维(见图 3)。1 月龄组:胶原原纤维直径较小,前部、赤道部、后部的粗、细纤维比例(单位面积)分别为 2:1、1:1、1:1;3 月龄组:胶原原纤维直径增大,前部、赤道部、后部的粗、细纤维比例(单位面积)分

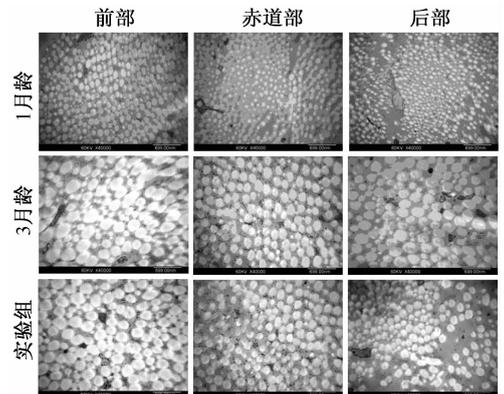


图 3 不同月龄及高度近视眼巩膜组织胶原原纤维电镜图片 ( $60 \text{ kV}, \times 40000$ )

Fig. 3 Electron microscope images of the collagen fibrils of the sclera in different age groups and experimental high myopia eye group

别为2:1、2:1、2:1;实验组:胶原原纤维直径增大,前部、赤道部、后部的粗、细纤维比例(单位面积)为2:1、2:1、2:1。

图4对比了不同月龄及高度近视眼巩膜胶原原纤维的平均直径。巩膜组织胶原原纤维可根据直径大小分为粗纤维和细纤维,胶原原纤维的直径和数量随月龄增加而改变,且不同部位之间存在差异。各组中,后部巩膜的胶原原纤维直径均小于前部和赤道部巩膜,不同部位巩膜之间单位面积上胶原原纤维数量大致相同。因此,后部巩膜胶原原纤维排布较疏松。近视眼组,前部和赤道部巩膜的胶原原纤维直径较对照组无明显差异,而后部巩膜胶原原纤维直径较对照组小。由此可见,近视眼发生时,后部巩膜胶原原纤维会发生变化,推测可能是高度近视眼后部巩膜生物力学性能小于正常眼的原因。

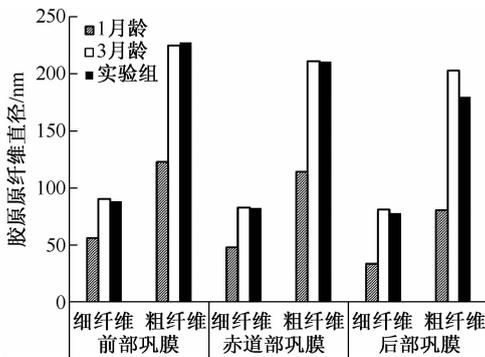


图4 不同月龄及高度近视眼巩膜胶原原纤维平均直径

Fig. 4 Average diameters of scleral collagen fibrils in different age groups and experimental high myopia eye

## 2.4 HE 染色观察巩膜结构变化

如图5所示,1月龄巩膜组织中的成纤维细胞呈不规则分布,数目较多,且纤维束较细;相比于1月龄组,3月龄组巩膜成纤维细胞的数目减少,纤维束增多且变粗;但是相比于3月龄组,实验组成纤维细胞较多,纤维束较细。1月龄、3月龄和实验组巩膜组织在前部、赤道部、后部的单位面积巩膜成纤维细胞数目之比分别为10:5:6、10:4:5、10:5:6。

## 2.5 巩膜组织中胶原含量变化

通过酶标仪检测得到各组巩膜组织 Hyp 含量,经统计学分析,各部分巩膜组织 Hyp 含量随月龄增加而增加( $P < 0.05$ ),近视眼组前部和赤道部巩膜

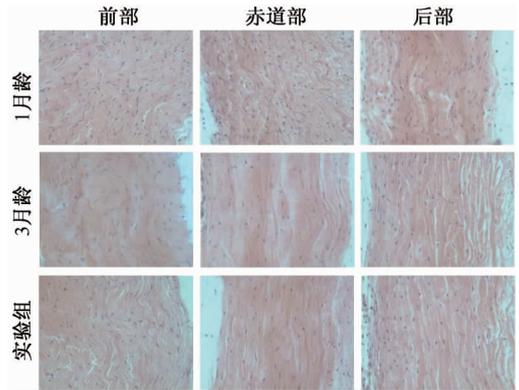


图5 不同月龄及高度近视眼巩膜组织 HE 染色 ( $\times 400$ )

Fig. 5 HE staining of the sclera in different age groups and experimental high myopia eye group

的 Hyp 含量与对照组相比无明显差异,近视眼组后部巩膜的 Hyp 含量小于对照组( $P < 0.05$ ),说明在高度近视眼发生过程中,后部巩膜的胶原含量减少(见图6)。

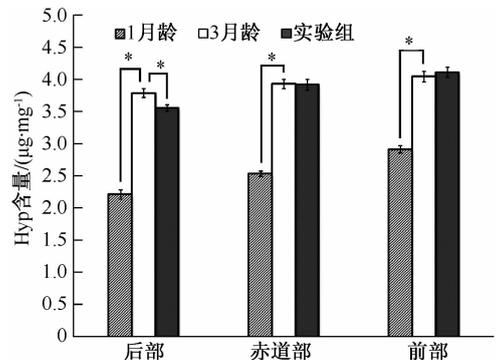


图6 不同月龄及高度近视眼巩膜组织 Hyp 含量 ( $n = 6, * P < 0.05$ )

Fig. 6 Hydroxyproline content of scleral tissues in different age groups and experimental high myopia eye group

## 3 讨论

高度近视眼发生时,眼球的过度扩张是在巩膜的参与下形成,巩膜是高度近视眼发生时眼内所有调控机制的最终靶组织。巩膜的生物力学特性与高度近视眼密切相关<sup>[5]</sup>。Neville 等<sup>[6]</sup>结合巩膜的解剖结构、功能和近视发展过程中巩膜组织生物力学性能、生物化学变化等方面,对近视的发生、发展进行综合分析,阐述了巩膜在高度近视眼发生、发展过程中的作用。研究发现,在近视的发展过程中,巩膜的生物学结构和功能发生变化,基质蛋白

的合成减少、降解增多, 基质金属蛋白酶及其抑制因子之间动态平衡遭到破坏, 引起巩膜基质蛋白的降解吸收, 巩膜变薄, 眼轴伸长, 从而导致近视的发生、发展。对动物实验性近视模型和人类近视眼的巩膜组织进行研究发现, 巩膜组织细胞外基质代谢异常, 整合素及受体表达异常, 胶原纤维类型和分布改变, 代谢增加, 合成减少, 胶原纤维直径变小, 使巩膜组织结构发生变化, 引起巩膜的重塑, 巩膜逐渐变薄, 生物力学性能降低, 在眼内压的作用下, 眼轴延长, 引发高度近视眼<sup>[7-11]</sup>。本实验研究发现, 通过眼睑缝合法可以使实验眼的眼球直径相延长, 说明成功建立了高度近视眼动物模型, 诱导结果与以往研究结论一致<sup>[3]</sup>。通过检测眼球不同部位巩膜的弹性模量发现, 在生长过程中巩膜组织的弹性模量不断增大, 实验性高度近视眼后部巩膜的弹性模量明显小于正常巩膜, 而前部和赤道部巩膜的弹性模量未发生明显变化, 说明在高度近视发生过程中, 仅后部巩膜的生物力学性能降低, 易于发生变形, 引起巩膜发生扩张, 进而引起近视。

巩膜是高度近视眼发生时调控的靶组织, 而胶原是调控的靶蛋白。研究发现, 高度近视眼巩膜胶原含量水平在后部巩膜明显低于对照眼<sup>[12]</sup>; 在高度近视眼早期, 后部巩膜的胶原 I mRNA 水平降低<sup>[8]</sup>; 在近视的恢复过程中, 胶原分泌增多, 基质金属蛋白酶水平下降, 其特异性组织抑制剂水平上升<sup>[10]</sup>; 同时, 胶原酶减少, 基质金属蛋白酶抑制剂表达恢复正常水平<sup>[13]</sup>。在高度近视眼的发生及恢复过程中, 涉及大量特定基因的表达变化, 进而引起巩膜的重塑<sup>[14]</sup>。巩膜生物力学特性发生改变, 其原因可能是胶原纤维的变化<sup>[15]</sup>。研究表明, 增加巩膜组织内胶原纤维的交联作用, 能够提高巩膜组织的抗拉伸能力, 可以抑制高度近视眼的发展<sup>[16-17]</sup>。本研究发现, 巩膜组织中含有大量直径不均一的胶原原纤维, 后部巩膜胶原原纤维排布比前部和赤道部巩膜疏松, 在生长过程中胶原原纤维的平均直径和胶原含量不断增加, 实验性高度近视眼后部巩膜的胶原原纤维平均直径和胶原含量明显小于正常巩膜, 且胶原原纤维排列较疏松; 而前部和赤道部巩膜的胶原原纤维平均直径和胶原含量未发生明显变化, 说明在高度近视发生过程中, 后部巩膜发生重塑, 胶原原纤维的排布和胶原含量会发生变化,

导致后部巩膜生物力学性能降低, 容易发生扩张和变形。

巩膜成纤维细胞是组成巩膜的主要细胞成分。巩膜成纤维细胞合成和分泌胶原蛋白、弹性蛋白等胞外基质, 生成胶原纤维、网状纤维和弹性纤维, 构成眼球外壁, 维持巩膜的生物学结构功能和生物力学特性, 并决定眼轴的长度<sup>[18]</sup>。在巩膜的生长发育及高度近视发生过程中, 巩膜成纤维细胞生物学功能和生物力学特性发生改变<sup>[19]</sup>, 影响胶原的表达, 从而使巩膜组织胶原的含量及胶原纤维结构发生变化。巩膜成纤维细胞胶原及细胞因子的表达伴随在巩膜的生长发育、巩膜的重塑以及近视发生等过程中。本研究发现, 在巩膜早期生长和高度近视发生过程中, 不同部位巩膜组织中单位面积巩膜成纤维细胞数量减少, 这一过程必然涉及胶原种类、含量及相关调控因子等分子水平的变化, 巩膜成纤维细胞不断分泌胞外基质, 使得巩膜胶原纤维和生物力学性能发生变化。关于巩膜成纤维细胞胶原表达的调控机制需要进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 郝爽, 邓爱军, 王国辉. 巩膜胚后发育过程中巩膜组织结构及生物力学特性变化 [J]. 医用生物力学, 2015, 30(1): 21-24. HAO S, DENG AJ, WANG GH. Changes of scleral structures and biomechanical properties in the process of sclera post embryonic development [J]. J Med Biomech, 2015, 30(1): 21-24.
- [2] BALDIVIA S, LEVY A, HEGDE S, et al. A novel organ culture model to quantify collagen remodeling in tree shrew sclera [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166644.
- [3] 田海霞, 王超英, 陈维毅, 等. 利用后巩膜加固术治疗家兔近视眼后成纤维细胞生物力学性能变化 [J]. 医用生物力学, 2010, 25(3): 190-194. TIAN HX, WANG CY, CHEN WY, et al. Biomechanical properties of fibroblasts after posterior scleral reinforcement treatment for rabbit experimental myopia [J]. J Med Biomech, 2010, 25(3): 190-194.
- [4] CHEN WY, WANG XJ, WANG CY, et al. An experimental study on collagen content and biomechanical properties of sclera after posterior sclera reinforcement [J]. Clin Biomech, 2008, 23(1): 17-20.
- [5] 陈维毅, 李晓娜, 高志鹏. 眼力学研究进展 [J]. 医用生物力学, 2016, 31(4): 340-346. CHEN WY, LI XN, GAO ZP. Advances in ocular biomechanics [J]. J Med Biomech, 2016, 31(4): 340-346.

- [ 6 ] MCBRIEN NA, GENTLE A. Role of sclera in the development and pathological complications of myopia [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22(3): 307-338.
- [ 7 ] MCBRIEN NA, CORNETT 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.
- [ 8 ] GENTILE A, LIU Y, MARTIN JE, *et al.* Collagen gene expression and the altered accumulation of scleral collagen during the development of high myopia [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 16587-16594.
- [ 9 ] SIEGWART JT, 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(7): 2067-2075.
- [10] SIEGWART JT, NORTON TT. Steady state mRNA levels in tree shrew sclera with form-deprivation myopia and during recovery [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(6): 1153-1159.
- [11] WANG KK, METLAPALLY R, WILDSOET CF. Expression profile of the integrin receptor subunits in the guinea pig sclera [J]. *Curr Eye Res*, 2017, 42(6): 857-863.
- [12] SIEGWART JT, NORTON TT. Regulation of the mechanical properties of tree shrew sclera by the visual environment [J]. *Vison Res*, 1999, 39(2): 387-407.
- [13] RADA JA, PERRY CA, SLOVER ML, *et al.* Gelatinase A and TIMP-2 expression in the fibrous sclera of myopic and recovering chick eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(13): 3091-3099.
- [14] GUO L, FROST MR, SIEGWART JT, *et al.* Scleral gene expression during recovery from myopia compared with expression during myopia development in tree shrew [J]. *Mol Vis*, 2014, 20: 1643-1659.
- [15] GRITZ R, SIEGWART JT. Changing material properties of the tree shrew sclera during minus lens compensation and recovery [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(3): 2065-2078.
- [16] WOLLENSAK G, SPOERL E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2004, 30(3): 689-695.
- [17] WOLLENSAK G, LOMDIA E, DITTER DD, *et al.* Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2005, 83(4): 477-482.
- [18] RADA JA, SHELTON S, NORTON TT. The sclera and myopia [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(2): 185-200.
- [19] 陈维毅, 王超英, 张全有, 等. 实验性近视眼巩膜成纤维细胞黏弹性研究 [J]. *医用生物力学*, 2007, 22(1): 26-29.  
CHEN WY, WANG CY, ZHANG QY, *et al.* Viscoelastic properties of scleral fibroblasts in experimental myopia [J]. *J Med Biomech*, 2007, 22(1): 26-29.