

## 形觉剥夺性近视视网膜细胞的凋亡及 c-myc 的表达

文 丹,刘双珍\*,毛俊峰,谭星平

(中南大学湘雅医院眼科,长沙 410078)

[摘要] 目的:研究形觉剥夺性近视眼(FDM)中视网膜细胞的凋亡及 c-myc 蛋白在视网膜的表达。方法:孵化 2 d 的雏鸡,右眼眼睑缝合 4、8、12 周后检影验光,眼底视网膜照片和光镜观察,TUNEL(TdT-mediated biotin-dUTP nick-end labelling,TUNEL)检测及流式细胞术检测视网膜的凋亡细胞,免疫组织化学及流式细胞术定量测定 c-myc 蛋白的表达。结果:12 周时缝合眼中出现漆裂纹样眼底改变,视网膜内、外核层发现凋亡细胞,出现明显凋亡峰。8、12 周视网膜 c-myc 蛋白表达高于对照组。结论:鸡眼近视形成伴眼底改变时,视网膜细胞出现凋亡,c-myc 在近视视网膜细胞的凋亡过程中发挥重要作用。

[关键词] 形觉剥夺性近视; 视网膜; 细胞凋亡; 流式细胞术; c-myc 蛋白

[中图分类号] R778.11 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)02-0236-05

## Apoptosis and c-myc protein expression in the retinal of form-deprivation myopia

WEN Dan, LIU Shuang-zhen\*, MAO Jun-feng, TAN Xing-ping

(Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Objective** To study the apoptosis of retina and the expression of c-myc protein in form-deprivation myopia. **Methods** Two-day-old chickens were sutured with right eyelid for 4, 8 and 12 weeks. After measurement of refraction, the eyeballs were observed by light microscope and taken photos. Retinal apoptotic cells were measured by TUNEL staining and flow cytometry. C-myc protein were examined by immunohistochemistry and flow cytometry. **Results** Lacquer crack lesions were found in sutured eyes at 12 weeks. Apoptotic cells were observed in retinal outer and inner nuclear layer of the sutured eyes at 12 weeks and obvious peak of apoptosis was observed in sutured eyes at 12 weeks. The expression of c-myc protein was significantly more than control eyes at 8 and 12 weeks. **Conclusion** The apoptosis of retinal was present in form-deprivation myopia with the degeneration of retina. C-myc protein plays an important role in retinal apoptosis of myopia.

**Key words:** form-deprivation myopia; retina; apoptosis; flow cytometry; c-myc protein

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(2):0236-05]

病理性近视由于眼球前后径变长,后极部扩张,导致眼底发生一系列如豹纹状眼底及漆裂纹样等改变,严重影响视功能,成为青壮年主要的致盲疾病之一。由于人类近视的眼球标本难以获得,本研究采用眼睑缝合法,建立鸡形觉剥夺性近视眼(FDM)动物模型<sup>[1]</sup>,研究病理性近视眼视网

膜细胞的凋亡,探讨凋亡在病理性近视中所扮演的角色,以期为病理性近视改善眼底病变,提高视功能提供抗凋亡途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物分组及近视模型建立 健康海

兰鸡雏(购于湖南省畜牧兽医研究所)孵化后第2天随机分为3组,每组15只,单眼缝合,另一眼作自身对照。室内饲养,自然昼夜周期,室温 $24\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。于4周(I组),8周(II组)和12周(III组)时分别剪开眼睑,在暗室内由验光师在自然瞳孔状态下检影验光,断头处死,摘眼球,用游标卡尺测定眼球外径(前后径、水平径、垂直径)。

用刀片把测量后的眼球沿赤道部切成前后两段,除去玻璃体及前段,将后段放入盛有PBS的平皿中,用数码相机在自然光下拍照。再将眼球后段沿水平径经视神经切成两半,一半放入10%甲醛溶液固定,另一半用于制作流式细胞术检测所需的细胞样品。

**1.2 光镜检查** 标本置于10%甲醛中固定48h,经各级酒精脱水,石蜡浸透包埋,做后极部 $4\text{ }\mu\text{m}$ 连续切片,HE染色,光镜观察。

**1.3 TUNEL技术和流式细胞术检测视网膜细胞凋亡** 细胞凋亡原位检测试剂盒购于武汉博士德公司,实验步骤根据说明书进行。切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶。蛋白酶K消化后,在末端脱氧核苷酸转移酶作用下把地高辛标记的脱氧尿苷酸连接到凋亡细胞DNA的3'-OH末端,再用生物素化地高辛抗体放大信号,DAB显色。苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片,光镜观察。以试剂盒内的胸腺切片作阳性对照,以双蒸水代替TdT作阴性对照。细胞核呈褐色判断为阳性。小心剥离另一半眼球后段的视网膜,PBS漂洗后放入盛有适量PBS的平皿中,剪碎组织块,吸管吹打,0.25%胰蛋白酶消化,200目筛网过滤,1000 r/min离心5 min,去上清,PBS洗涤细胞,分成2份:一份用70%冷乙醇固定,上机前离心去除固定液,PBS洗涤,调整细胞浓度为 $10^6$ 个/mL,碘化丙啶染色,EPICS XL流式细胞仪检测视网膜细胞凋亡率,Lysis II软件分析结果;另一份用于c-myc蛋白测定。

**1.4 免疫组织化学染色和流式细胞术检测 c-myc 蛋白含量** c-myc多克隆抗体及SABC试剂盒购于武汉博士德公司。染色步骤按SABC试剂盒内说明书进行,c-myc多克隆抗体工作浓度为1:100。以已知c-myc阳性表达的胃癌组织作阳性对照,以双蒸水代替一抗作阴性对照。结果判定以细胞浆出现棕黄色染色为阳性,根据着色深浅以“+++”表示极强阳性,“++”表示强阳性,“+”表示阳性,“-”表示阴性。另一份视网膜细胞悬液用4%多聚甲醛固定,离心弃固定液,PBS洗涤,调整细胞浓度为 $10^6$ 个/mL,0.2% Triton X-

100通透后,水浴离心,弃上清,沉淀分别按组加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 一抗(c-myc多克隆抗体)。另设一组以 $100\text{ }\mu\text{L}$ PBS代替一抗作为上机时的空白对照组,室温放置30 min后,冷PBS洗涤2~3次,加FITC标记的二抗 $100\text{ }\mu\text{L}$ ,PBS洗涤除去未结合的多余荧光抗体,上机检测c-myc蛋白表达情况,Bios Consort软件处理数据。

**1.5 统计学处理** 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS10.0统计软件进行数据处理,比较各组屈光度、眼球前后径、视网膜细胞凋亡率、c-myc蛋白表达用 $t$ 检验,分析视网膜细胞凋亡率与c-myc蛋白表达变化的关系用直线回归分析, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 屈光度与眼球外径的变化** 眼睑缝合4,8和12周后,与同组对照眼相比,缝合眼屈光度明显增加( $P<0.05$ ),眼球外径也明显增加( $P<0.05$ )。并且随眼睑缝合时间的增加,屈光度和眼球外径也明显增加( $P<0.05$ )。

**2.2 视网膜大体标本** 鸡眼底视网膜灰白色无血管,视盘在颞侧偏下方,栞膜由该处向眼内突出。III组有7只缝合眼中以栞膜为中心视网膜上出现向赤道部呈灰白色线性延伸的漆裂纹样病变,发生率为46.7%(图1)。I和II组缝合眼中未发现眼底病变。

**2.3 光镜检查** 光镜观察结果:缝合眼与自身对照眼相比,感光细胞层变薄,光感受器细胞外节伸长,视网膜色素上皮细胞(RPE)排列紊乱,毛刷状突起变短,突起间隙宽窄不一(图2)。漆裂纹样病变区可见视网膜内陷,外丛状层和内核层变薄,光感受细胞层萎缩甚至几乎消失,局部RPE细胞堆积,突起消失,Bruch膜连续性破坏(图3)。

**2.4 视网膜凋亡细胞检测** 第三组缝合眼视网膜的内、外核层发现散在的TUNEL染色阳性的凋亡细胞核,呈棕黄色或棕褐色(图4)。而在I,II组的缝合眼及各组所有未缝合眼的视网膜中均未见凋亡细胞。流式细胞仪检测各组视网膜细胞凋亡率,第三组缝合眼出现明显的凋亡峰,凋亡率为4.42%,与其自身对照眼相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。I,II组的缝合眼视网膜细胞凋亡率与自身对照眼比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ,表2)。

**2.5 视网膜 c-myc 蛋白表达** 免疫组织化学染色发现各组(I,II和III)对照眼视网膜c-myc蛋白表达均为阴性。各组缝合眼视网膜c-myc蛋

白表达为: I 组视网膜各层 c-myc 蛋白表达阴性; II 组视网膜的感光细胞内外节有少量 c-myc 蛋白表达阳性(+), 微弱着色, 呈淡黄色。III 组视网膜感光细胞内外节 c-myc 蛋白表达明显增强(+++), 呈棕黄色, 以感光细胞内节最明显, 外核层的部分细胞核也有着色(图 5)。流式细胞仪

定量分析 c-myc 蛋白表达, I 组缝合眼与自身对照眼相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), II, III 组缝合眼与自身对照比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。随眼缝合时间的增加, I ~ III 组缝合眼 c-myc 蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ , 表 3)。

表 1 各组屈光度及眼球外径的比较( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	眼别	屈光度(D)	眼球外径(mm)		
			前后径	水平径	垂直径
I	对照	+0.70 ± 0.34	10.35 ± 0.21	12.90 ± 0.04	12.85 ± 0.12
	缝合	-10.23 ± 2.15*	11.75 ± 0.22*	13.93 ± 0.20*	13.81 ± 0.27*
II	对照	+0.69 ± 0.29	12.53 ± 0.12	15.46 ± 0.15	15.39 ± 0.15
	缝合	-15.57 ± 2.52* $\Delta$	13.96 ± 0.26* $\Delta$	16.78 ± 0.15* $\Delta$	16.64 ± 0.21* $\Delta$
III	对照	+0.65 ± 0.45	13.80 ± 0.31	16.87 ± 0.33	17.03 ± 0.03
	缝合	-17.01 ± 3.29* $\#$	15.33 ± 0.41* $\#$	18.97 ± 0.03* $\#$	18.60 ± 0.10* $\#$

与同组对照组, \*  $P < 0.05$ ; 与 I 组缝合眼比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 II 组缝合眼比较, #  $P < 0.05$

表 2 各组视网膜细胞凋亡率的比较( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	凋亡率(%)	
	缝合	对照
I	0.30 ± 0.08	0.31 ± 0.12
II	0.45 ± 0.17	0.37 ± 0.15
III	4.42 ± 1.83*	0.35 ± 0.09

与自身对照眼比较, \*  $P < 0.05$

表 3 各组视网膜细胞 c-myc 蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	c-myc 蛋白(%)	
	缝合	对照
I	1.42 ± 0.36	1.45 ± 0.48
II	2.28 ± 0.89* $\Delta$	1.56 ± 0.72
III	7.62 ± 2.06* $\Delta$ #	1.54 ± 0.67*

与自身对照眼比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 I 组缝合眼相比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 II 组缝合眼比较 #  $P < 0.05$

2.6 视网膜细胞凋亡与 c-myc 蛋白表达变化关系  
视网膜细胞凋亡率与 c-myc 蛋白表达的直线回归方程为:  $\hat{Y} = -0.958 + 0.726X$  (图 6)。视网膜细胞凋亡率与 c-myc 蛋白成直线回归关系。



图 1 第 III 组缝合眼眼底漆裂纹样病变  
Fig.1 Lacquer crack lesions in Group III sutured eye

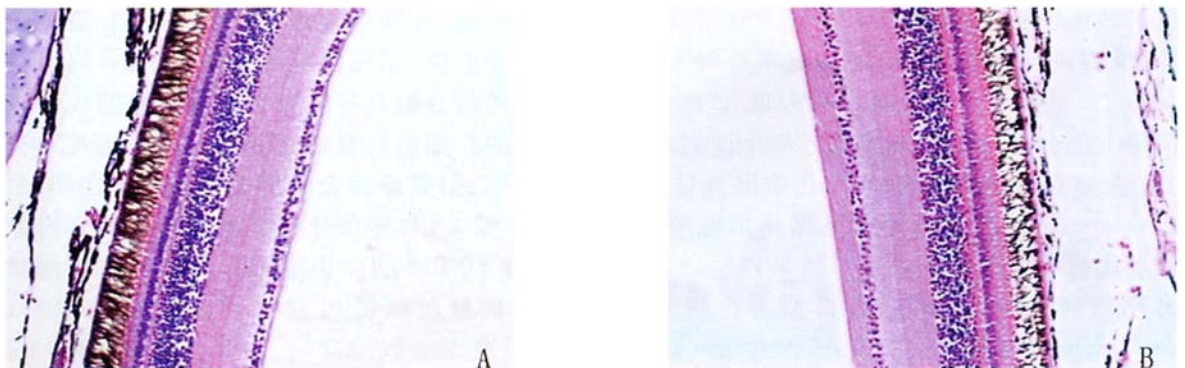


图 2 光镜下视网膜(HE × 100) A 对照眼; B 缝合眼  
Fig.2 Retina under microscope eyes(HE × 100) A Control eye; B Sutured eye

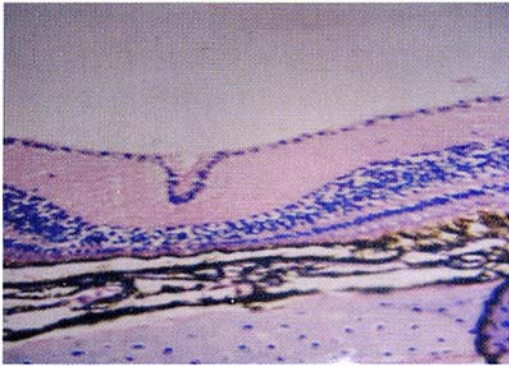


图3 缝合眼视网膜漆裂纹样病变区( HE × 100 )  
Fig.3 Lacquer crack lesions in retina of sutured eyes ( HE × 100 )

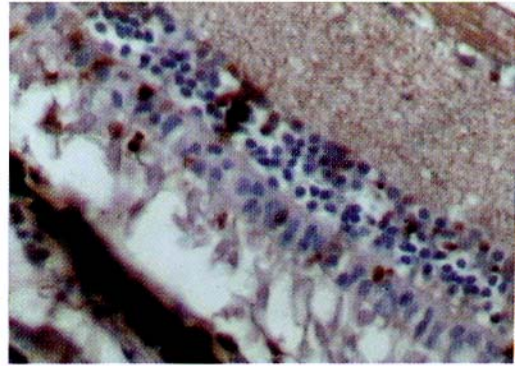


图4 第Ⅲ组缝合眼视网膜外核层、内核层发现散在的 TUNEL 染色阳性凋亡细胞核( × 400 )  
Fig.4 The positive apoptosis cell nucleus with TUNEL staining expressed in the ONL and INL of Group III sutured eye ( × 400 )

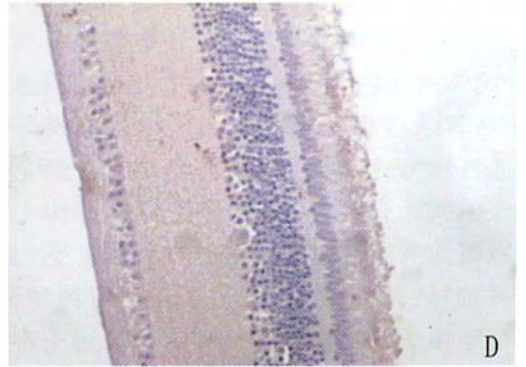
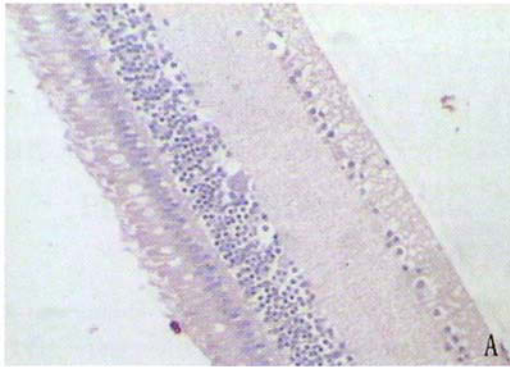


图5 A : c-myc 在第 I 组缝合眼视网膜上为阴性表达( × 200 ) ; B : c-myc 在第 II 组缝合眼视网膜上光感受细胞层为阳性( + )表达,其他各层为阴性( × 200 ) ; C : c-myc 在第 III 组缝合眼视网膜上光感受细胞层为强阳性( + + + )表达,其他各层为阴性( × 200 ) ; D : c-myc 在对照眼视网膜上为阴性表达( × 200 )  
Fig.5 A : c-myc protein express negative in Group I sutured eye( × 200 ) ; B : c-myc protein express positive in PRL( + ), other layers were negative ( × 200 ) ; C : c-myc protein express powerful positive in PRL( + + + ), other layers were negative( × 200 ) ; D : c-myc protein express negative in control eye 's retina( × 200 )

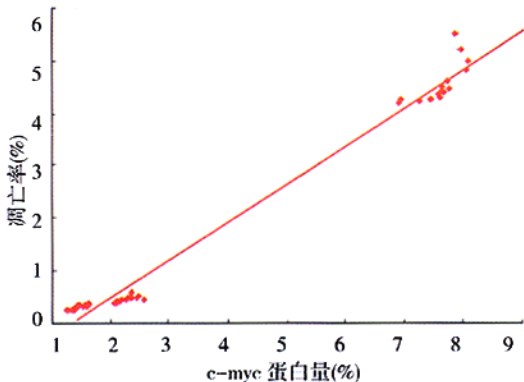


图6 视网膜细胞凋亡率与 c-myc 蛋白含量的直线回归图  
Fig.6 The graph of linear regression about retinal apoptosis rate and c-myc protein level

### 3 讨 论

对鸡的 FDM 研究显示眼睑缝合 4, 8 周时, 视网膜未见病理性近视的眼底改变; 而 12 周时出现以栉膜为中心视网膜上灰白色线性延伸, 这与 Hirata 等<sup>[2]</sup>所描述的漆裂纹样病变相同。而 Hirata 等研究中缝合眼 8 周就出现上述病变可能与鸡种不同有关。人类近视与 FDM 不仅在眼球轴性增长有高度相似性, 而且在病理性眼底改变中也有较好的一致性, FDM 为研究病理性近视的眼底改变提供了良好的实验模型。而漆裂纹样病变在第



Ⅲ组缝合眼发生率为46.7%,高于韩梅等<sup>[3]</sup>报道的人类高度近视中35.2%的漆裂纹发生率,这可能与鸡眼形觉剥夺后近视的屈光度远高于人类高度近视眼屈光度有关。

Xu等<sup>[4]</sup>在研究人近视视网膜变性时发现,在摘除的人病理性近视眼球中,视网膜光感受细胞层存在凋亡,细胞凋亡可能是近视视功能下降的重要原因。Pruett<sup>[5]</sup>也发现在病理性近视导致的视网膜巩膜葡萄肿中,大量的光感受细胞发生凋亡。本研究中建立FDM模型12周时伴随大体标本出现病理性近视眼底改变——漆裂纹的同时,视网膜的内、外核层发现散在的TUNEL染色阳性的凋亡细胞,流式细胞仪检测出现明显的凋亡峰,凋亡率为4.42%。这证实了之前对病理性近视视网膜细胞凋亡的推断。TUNEL染色阳性的凋亡细胞散布在内外核层,说明在近视时不仅是感光细胞,可能还有其他细胞也发生了凋亡。

细胞凋亡是在基因控制下的细胞自我消亡过程,机制尚未完全阐明。研究表明与细胞增殖和癌变有关的原癌基因和抑癌基因都参与了对细胞凋亡的调控。原癌基因*c-myc*位于人8q24,由3个外显子和2个内含子组成,它的表达与细胞增殖、分化和凋亡相关。*c-myc*的主要作用是参与转录,而在转录过程中可以是激活启动而诱导细胞周期进程和分化,也可以是抑制启动而阻止细胞分化产生凋亡,这与*c-myc*蛋白分子结构中诱导增殖和凋亡的活性结构区重叠有关<sup>[6]</sup>。它给予细胞2种选择:增殖或凋亡;至于发生何种情况,取决于细胞接受的其他信号。如有生长因子存在或*bcl-2*基因表达等,增殖就占优势;而与基因*p53*等相互作用,则促进凋亡的发生<sup>[7]</sup>。本实验中流式细胞测定的视网膜细胞的凋亡率与*c-myc*蛋白定量分析成直线回归关系,*b*值为0.726,呈正相关。第4、8周时伴随低*c-myc*蛋白含量,视网膜凋亡率低,散点均集中在直线回归图中左下角;12周时随*c-myc*蛋白含量明显增高,凋亡率也明显增加,这说明*c-myc*蛋白在病理性近视的视网膜细胞凋亡中扮演重要角色。而8周时缝合眼在

TUNEL定性及流式细胞定量中均未见明显细胞凋亡,而*c-myc*的免疫组织化学及流式细胞分析中均有阳性表达;12周时视网膜细胞凋亡及*c-myc*表达均阳性,在排除不同试验方法的误差后,这可能正是*c-myc*双重性的较好体现。在8周时没有其他凋亡信号的影响,*c-myc*的作用可能是以促进增殖占优势而不是凋亡。12周时凋亡占明显优势,这可能是有其他诱导凋亡的信号传递,导致*c-myc*促凋亡活性结构区域功能加强,细胞发生凋亡。至于是何种诱导凋亡的信号和*c-myc*协同导致视网膜细胞的凋亡还须进一步试验研究。

高度近视在8~12周出现病理性眼底改变,视网膜细胞出现凋亡,严重影响视功能。如果在这个阶段从细胞凋亡调控途径入手,予以有效的药物或基因干预,将会为近视的治疗,视功能的提高提供新思路。

#### 参考文献:

- [1] Wiesel TN, Raviola E. Myopia and eye enlargement after neonatal lid fusion in monkeys [J]. *Nature*, 1977, 266 (5597):66-68.
- [2] Hirata A, Negi A. Lacquer crack lesions in experimental chick myopia [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998, 236(2):138-145.
- [3] 韩梅,陈松,王兰惠,等.高度近视眼的啉啉青绿血管造影[J].中华眼底病杂志,2001,17(3):201-203.
- [4] Xu GZ, Li WW, Tso MO, et al. Apoptosis in human retinal degenerations [J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1996, 94:411-430.
- [5] Pruet RC. Complications associated with posterior staphyloma [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 1998, 9(3):16-22.
- [6] Ohmori Y, Tanabe J, Takada S, et al. Functional domains of *c-Myc* involved in the commitment and differentiation of murine erythroleukemia cells [J]. *Oncogene*, 1993, 8(2):379-386.
- [7] 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学[M].北京:军事医学科学出版社,2002.84-86.

(本文编辑 郭征)