

# 血管内皮生长因子-B对形觉剥夺性近视豚鼠视网膜中多巴胺水平的影响

姜俊,高洪莲,孙瑞婷,孙昕,彭庆生,张守宽,张磊

(滨州医学院附属医院眼科,山东 滨州 256600)

**摘要:**目的 研究玻璃体腔注射血管内皮生长因子-B(vascular endothelial growth factor-B, VEGF-B)对形觉剥夺性近视(form-deprivation myopia, FDM)豚鼠视网膜中多巴胺(dopamine, DA)水平的影响。方法 随机选取健康的3周龄豚鼠147只,雌雄不限,随机分为7个组,每组21只。空白组双眼不予干预,其余6组使用半透明乳胶气球套头遮盖豚鼠右眼14d建立FDM模型。造模前对PBS组、0.25 ng组、2.5 ng组、25 ng组、50 ng组右眼玻璃体腔注射PBS缓冲液2.5  $\mu$ L、VEGF-B 0.25 ng、2.5 ng、25 ng、50 ng。遮盖前后分别测量造模眼屈光度与眼轴长度,14d后采用免疫荧光法检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)阳性细胞数量、免疫印迹法检测视网膜TH的蛋白表达情况、HE染色观察视网膜血管内皮细胞核数、高效液相色谱法测定DA与3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)的含量及DA代谢率。结果 造模前,7组豚鼠右眼屈光度与眼轴长度均无显著差异( $P>0.05$ )。造模完成后与空白组相比,FDM组、PBS组屈光不正向近视侧偏移,眼轴增长,TH、DA、DOPAC含量均降低( $P<0.05$ );与FDM组相比,0.25 ng组、2.5 ng组、25 ng组、50 ng组豚鼠遮盖眼近视程度均降低,眼轴增长趋势被抑制,TH、DA、DOPAC表达量均增加( $P$ 均 $<0.05$ ),随着VEGF-B浓度的升高,眼轴增长所受抑制程度逐渐增加,近视程度逐渐减轻,TH等检测指标的表达水平均逐渐升高。7组豚鼠视网膜DA代谢率、视网膜内血管内皮细胞核数差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 玻璃体腔注射VEGF-B可使FDM豚鼠视网膜中的DA含量升高、眼轴增长程度减轻,从而抑制FDM豚鼠的近视发展,且不会诱导新生血管生成,其中50 ng组VEGF-B对DA的促进作用更明显。

**关键词:**血管内皮生长因子-B;形觉剥夺性近视;多巴胺;视网膜;酪氨酸羟化酶

中图分类号:R774.1

文献标志码:A

## Effect of vascular endothelial growth factor-B on the dopamine level in the retina of guinea pigs with form-deprivation myopia

JIANG Jun, GAO Honglian, SUN Ruiting, SUN Xin, PENG Qingsheng, ZHANG Shoukuan, ZHANG Lei  
(Ophthalmology Department, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256600, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of intravitreal injection of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B) on the level of dopamine (DA) in the retina of form-deprivation myopia (FDM) guinea pigs. **Methods** A Total of 147 healthy 3-week-old guinea pigs, male or female, were selected and randomly divided into 7 groups, with 21 guinea pigs in each group. The eyes of guinea pigs in the blank group were not intervened, and the right eyes of the guinea pigs in other 6 groups were covered with translucent latex balloon for 14 days to establish the FDM model. After preparation, 2.5  $\mu$ L of PBS buffer and VEGF-B at concentrations of 0.25 ng, 2.5 ng, 5 ng and 50 ng were intravitreally injected into the right eye of the guinea pigs in the PBS group as well as the groups of 0.25 ng, 2.5 ng, 25 ng and 50 ng. Ocular refraction and axial length were recorded in both eyes of each animal before and after modeling. After 14 days, immunofluorescence was used to detect the number of tyrosine hydroxylase positive cells; Western blotting was used to detect the expression of TH protein in the retina; HE staining was used to observe the number of retinal vascular endothelial cell nuclei; and high performance liquid chromatography was used to determine DA and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid

(DOPAC) content and DA metabolic rate. **Results** Before modeling, there was no significant difference in the diopter and axial length of the right eye among the 7 groups ( $P>0.05$ ). After modeling, compared with the blank group, refractive error was shifted to the myopic side in the FDM and PBS groups, the axes of the eyes grew, and the TH, DA, and DOPAC levels were reduced ( $P<0.05$ ). Compared to the FDM group, the guinea pigs in the VEGF-B groups (0.25 ng, 2.5 ng, 25 ng and 50 ng) exhibited a decrease in myopia progression and inhibition of axial elongation, accompanied by increased expression levels of TH, DA, and DOPAC (all  $P<0.05$ ). As the concentration of VEGF-B increased, there was a gradual enhancement in the suppression of axial growth and reduction in myopia severity while observing a progressive elevation in TH expression and other indicators. There was no significant difference in the metabolic rate of DA and the number of retinal vascular endothelial cell nuclei among the 7 groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The intravitreal injection of VEGF-B can enhance retinal DA levels and inhibit axial elongation, thereby effectively suppressing myopia development in FDM guinea pigs without inducing neovascularization. Notably, the impact of VEGF-B on DA was particularly pronounced in the 50 ng group.

**Key words:** Vascular endothelial growth factor-B; Form deprivation myopia; Dopamine; Retina; Tyrosine hydroxylase

未矫正的屈光不正视力受损的重要因素之一,严重者甚至会导致失明<sup>[1-2]</sup>。随着近年来电子屏幕使用时间的延长,近视的发病率逐年升高且呈低龄化趋势<sup>[3]</sup>。统计结果显示,年龄特异性是近视发展中最具影响力的预测因子,近视的低龄化,会大幅增加患者后续发展为高度近视的风险<sup>[4]</sup>。据估计,至2050年近视( $SE \leq -0.75D$ )将会影响世界上约一半的人口<sup>[5]</sup>。近视的高患病率已成为亟待解决的公共卫生问题,其具体发病机制至今未明,尚未发现有效控制近视发生发展的手段。多巴胺(dopamine, DA)在视网膜中参与介导视觉信号和屈光发育等过程<sup>[6]</sup>,3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)是DA的代谢产物。光刺激在屈光性近视、DA的合成与释放、限速酶酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的激活过程中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>,因此形觉剥夺(剥夺光刺激)是研究屈光发育的重要模型。相关研究也已证实血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)和血管内皮生长因子-B(vascular endothelial growth factor-B, VEGF-B)对多巴胺能神经元的存活与营养均发挥着积极作用<sup>[8-12]</sup>。VEGF-B在视神经保护、视网膜色素上皮层抗凋亡、抑制血管渗漏等方面发挥着积极作用<sup>[8,13-15]</sup>。本课题组前期研究证明,豚鼠玻璃体腔注射抗VEGF药物会减少视网膜中DA的含量,导致形觉剥夺性近视(form-deprivation myopia, FDM)进一步发展;注射VEGF-A165会增加视网膜中的DA含量,抑制FDM的发展,但到达一定浓度VEGF-A165存在诱导新生血管产生的不良反应<sup>[16-17]</sup>,而VEGF-B因启动子区不含缺氧反应元件也不受缺氧转录诱导,拥有极小的正

常血管生成活性,不良反应相较于VEGF-A小,且能通过血管内皮生长因子受体1(vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1)抑制过度的血管生成,有较大的研究价值<sup>[9,18]</sup>。本研究将继续深入探讨不同剂量下,VEGF-B对FDM豚鼠视网膜DA水平的影响,为近视防控领域提供新思路和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

取健康3周龄豚鼠151只,体质量规格为150~200g,购于济南金丰实验动物有限公司,许可证号:SCXK(鲁)2023008。4只豚鼠被排除,其中1只在造模期间麻醉后死亡,2只在造模结束后因眼内炎死亡,1只在造模结束后因玻璃体注射VEGF-B并发白内障无法正常验光排除,最终纳入本实验的FDM豚鼠共147只。饲养环境为12h/12h昼夜循环,温度22℃~25℃,相对湿度为50%~70%,2~3只豚鼠一笼,每日定时更换新笼,豚鼠能自由活动、摄水摄食。本研究涉及的动物实验过程及伦理问题经滨州医学院附属医院伦理委员会审批(20231208-15)。

#### 1.1.2 主要试剂及仪器设备

重组人蛋白VEGF-B(美国MedChemexpress公司)、TH兔单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司)、Bouin's固定液(福建Phygene公司)、兔抗鼠GAPDH多克隆抗体(武汉Proteintech公司)、带状光检影镜(苏州六六视觉科技有限公司)、冰冻切片机(德国Leica公司)、正置荧光显微镜(日本Olympus公司)、高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher公司)、抗荧光衰减封片剂(含DAPI)

(北京 Solarbio 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 实验分组及动物模型的建立

采用随机数字表法将豚鼠随机分为空白组、FDM 组、PBS 组、0.25 ng 组、2.5 ng 组、25 ng 组和 50 ng 组( $n$  均 = 21)。参考文献[19-20]的方法,选择豚鼠使用半透明乳胶气球套头遮盖右眼,遮盖时间持续 14 d,建立 FDM 动物模型(眼轴增长约 0.57 mm、屈光度增加约 -5.45 D)。其中空白组豚鼠不予干预,其余 6 组均使用半透明乳胶气球套头遮盖右眼,每日定时更换饲养笼具、清洁头套并适时修剪。

### 1.2.2 药物干预

造模前 1 天,使用妥布霉素滴眼液滴右眼(3 次/d)。遮盖前进行玻璃体腔注射,显微镜下使用有齿镊固定眼球,微量注射器与颞侧角膜缘后 1 mm 垂直巩膜进针,针头向眼球壁倾斜 20° 进针约 3 mm 后注射给药,所有注射眼均为右眼,注射的 VEGF-B 均溶于 2.5  $\mu$ L 的 PBS 缓冲液中。注射前称量豚鼠体质量,根据体质量给予相应体积的 50 g/L 水合氯醛腹腔注射来进行麻醉处理,使用聚维酮碘对眼表进行消毒,后用生理盐水冲洗两次。根据文献选择注射浓度与注射体积<sup>[16, 21]</sup>,依分组在显微镜下使用微量注射器分别注射 PBS 缓冲液 2.5  $\mu$ L,对应剂量的 VEGF-B 0.25、2.5、25、50 ng。注射完毕后注射眼眼部涂抹氧氟沙星眼膏预防感染。术后 3 d 内,继续涂氧氟沙星眼膏,3 次/d,每日观察注射眼是否存在炎症情况。

### 1.2.3 眼部生物学参数测量

遮盖前与遮盖后 14 d 分别测量豚鼠的屈光度和眼轴长度。用复方托吡卡胺滴眼液散瞳,待睫状肌充分麻痹后,使用带状光检影镜测量屈光度,以等效球镜度加工作距离算作一次计数;使用盐酸丙美卡因滴眼液滴右眼进行角膜表面麻醉,使用眼部 A 超手动模式下测量豚鼠眼轴长度,精确至 0.01 mm。以上结果均连续测量 5 次计算平均值作为最终结果计数。

### 1.2.4 豚鼠眼球标本收集

待造模结束,眼球生物学参数测量后,注射凝血剂处死豚鼠,使用高压消毒后的器械,完整取出右眼眼球,剔除多余的结缔组织与眼外肌,保留视神经和完整的眼球于小型液氮罐中待用。

### 1.2.5 豚鼠眼杯标本制备

每组随机抽取 6 只豚鼠,将清理好的眼球至于 5 mL EP 管中,固定液固定 24 h。固定完成后,置于冰上,显微镜下去除角膜、虹膜、晶状体、玻璃体等部

位后将眼球从中间切开制成眼杯。依次将制作好的眼杯放入 100、200 和 300 g/L 的蔗糖溶液中梯度脱水各 12 h,脱水后包埋,实验级锡纸包裹。标记后 -80  $^{\circ}$ C 冻存待用。

### 1.2.6 免疫荧光法检测豚鼠视网膜中 TH 的阳性细胞数

将包埋好的眼杯置于冰冻切片机中, -20  $^{\circ}$ C 速冻、切片(切片厚度为 9  $\mu$ m),制备冰冻切片。将切片黏附于载玻片上丙酮冲洗 15 min;洗涤 3 次;3 g/L Triton X-100 漂洗 10 min;洗涤 3 次;封闭 30 min,滴加一抗,4  $^{\circ}$ C 过夜。次日,组织复温 30 min;洗涤 3 次;暗室中滴加二抗,温室孵育 1 h;洗涤 3 次后封片。使用正置荧光显微镜( $\times 10$  目镜 &  $\times 40$  物镜视野)拍照、观察视网膜中 TH 阳性细胞并计数。

### 1.2.7 HE 染色观察视网膜中血管内皮细胞核数

同免疫荧光法制作多张 9  $\mu$ m 切片,后使用苏木素试剂盒染色,随机选取 6 张(每眼一张)切片于正置显微镜下观察豚鼠视网膜情况,并对观察到的内皮细胞核数进行计数。

### 1.2.8 免疫印迹检测视网膜中 TH 蛋白的表达

每组随机选取 6 只豚鼠,将清理好待用的完整眼球于冰上解剖,剥离出视网膜迅速冷冻于小型液氮罐中临时储存。收集剥离出的豚鼠视网膜于研磨管中,在其中加入裂解液及蛋白酶抑制剂后置于匀浆仪中裂解。裂解后于 4  $^{\circ}$ C 低温环境静置 30 min,将静置后的组织转移至新的 EP 管中,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min。离心后,转移上清于新的 EP 管中,加入缓冲液后煮沸 10 min。电泳、转膜、封闭后,加入一抗,4  $^{\circ}$ C 过夜。次日,取出条带,置于摇床上冲洗 3 次,加入二抗,室温孵育 2 h,冲洗 3 次。化学发光法显影,使用 ImageJ 软件分析曝光后各组灰度值,使用 GAPDH 作为内参,重复 3 次,计算分析 TH 蛋白相对表达量。

### 1.2.9 高效液相色谱电化学检测法测定视网膜中 DA 及 DOPAC 的含量

每组随机抽取 6 只豚鼠,将清理好的眼球冰上分离,取出视网膜并称重,每 mg 样品加入 20  $\mu$ L 匀浆液; -40  $^{\circ}$ C 匀浆 4 次;20 000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 30 min,取上清液上机检测。使用 HPLC-ECD 系统检测分析视网膜组织中的 DA 和 DOPAC 含量。Chromleon 6.9 色谱工作站采集并分析数据,以内标法计算目标物浓度。

## 1.3 统计学处理

采用软件 SPSS 27.0 软件进行统计学分析。

Shapiro-Wilk 法检验正态分布,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间数据经 Levene 法检验方差齐性。总体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 眼部生物学参数结果

各组数据均符合正态分布,方差齐( $P$ 均>

0.05)。遮盖前,7组豚鼠双眼屈光度和眼轴长度差异均无统计学意义( $P$ 均>0.05)。遮盖14 d后,FDM组与PBS组眼球屈光度和眼轴长度差异无统计学意义( $P>0.05$ );FDM组与空白组相比,屈光状态变为近视且眼轴长度增加,差异有统计学意义( $P$ 均<0.05);4组注射组与FDM组相比向近视侧偏移程度、眼轴增长程度均减轻,差异有统计学意义( $P$ 均<0.05)。其中50 ng组的近视减轻程度最明显,眼轴长度最短。见表1。

表1 各组豚鼠造模前后屈光度和眼轴长度比较

Table 1 Comparison of refraction and axial length in each group after modeling

组别	屈光度/ <i>D</i>		眼轴长度/mm	
	遮盖前	遮盖后	遮盖前	遮盖后
空白组	3.57±0.31	2.10±0.33	7.61±0.04	7.68±0.03
FDM组	3.52±0.38	-1.97±0.47 <sup>a</sup>	7.60±0.05	8.12±0.04 <sup>a</sup>
PBS组	3.47±0.28	-1.92±0.32 <sup>a</sup>	7.57±0.03	8.09±0.05 <sup>a</sup>
0.25 ng组	3.48±0.41	-1.28±0.31 <sup>ab</sup>	7.61±0.04	7.96±0.07 <sup>ab</sup>
2.5 ng组	3.53±0.38	0.07±0.45 <sup>ab</sup>	7.61±0.04	7.87±0.05 <sup>ab</sup>
25 ng组	3.57±0.31	0.93±0.31 <sup>ab</sup>	7.58±0.03	7.78±0.06 <sup>ab</sup>
50 ng组	3.52±0.29	1.13±0.36 <sup>ab</sup>	7.61±0.07	7.75±0.05 <sup>ac</sup>
<i>F</i>	0.190	286.378	2.007	176.384
<i>P</i>	0.979	<0.001	0.072	<0.001

注:<sup>a</sup>与空白组相比, $P<0.01$ ;<sup>b</sup>与FDM组相比, $P<0.01$ ;<sup>c</sup>与FDM组相比, $P=0.02$ 。

### 2.2 免疫荧光检测结果

显微镜下观测各组豚鼠视网膜结构、厚度均正常,TH表达呈绿色点状荧光(图1、图2左侧)。各组数据均符合正态分布,方差齐( $P$ 均>0.05)。空白组、FDM组、PBS组、0.25 ng组、2.5 ng组、25 ng组、50 ng组豚鼠视网膜TH阳性细胞数分别为(32.33±4.55)、(7.83±1.72)、(8.33±1.51)、(11.83±2.04)、(15.33±1.51)、(19.33±1.97)、(21.67±2.73)个。单因

素方差分析结果显示,各组间整体差异有统计学意义( $F=72.164, P<0.001$ )。FDM组与空白组相比,阳性细胞数明显变少( $P<0.001$ );0.25 ng组与FDM组相比差异无统计学意义( $P>0.999$ );2.5 ng与FDM组相比差异有统计学意义( $P=0.021$ );25 ng组及50 ng组与FDM组比较差异有统计学意义( $P<0.001$ )。

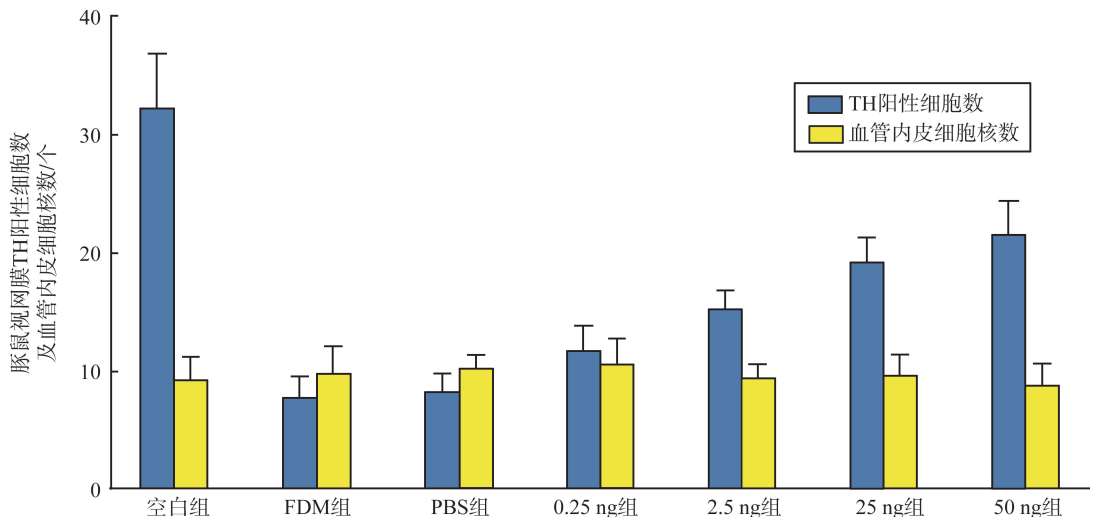
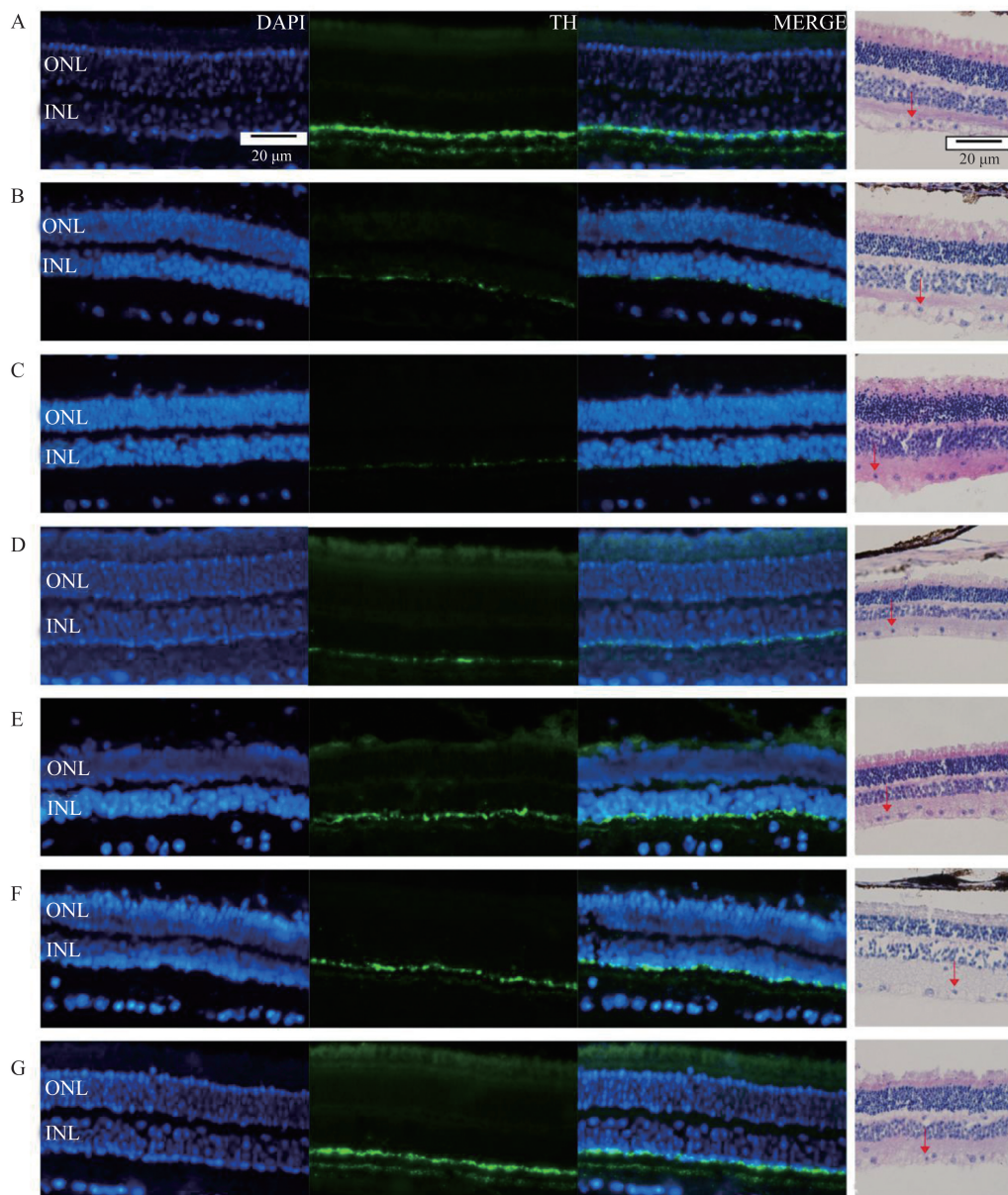


图1 TH阳性细胞数及血管内皮细胞核数

Figure 1 The number of TH positive cells and vascular endothelial cell nucleus



ONL=视网膜外核层,INL:视网膜内核层。

图2 造模后各组豚鼠视网膜中 TH 阳性细胞的表达(左侧)及造模后各组豚鼠视网膜 HE 染色结果(右侧,×400)

A:空白组;B:FDM 组;C:PBS 组;D:0.25 ng 组;E:2.5 ng 组;F:25 ng 组;G:50 ng 组。

Figure 2 The expression of TH+ cells (the left side) and the HE staining results (the right side) of the retinas of guinea pigs in each group after modeling(×400)

A: blank group; B: FDM group; C: the PBS group; D: 0.25 ng group; E: 2.5 ng group; F: 25 ng group; G: 50 ng group.

### 2.3 HE 染色观察结果

豚鼠视网膜 HE 染色结果显示,7 组各切片视网膜排列整齐,未见或偶见血管内皮细胞分布在内界膜内(图 1、图 2 右侧)。各组数据均符合正态分布,方差齐( $P$ 均 $>0.05$ )。7 组豚鼠视网膜内界膜内血管内皮细胞核数分别为 $(9.33 \pm 1.86)$ 、 $(9.83 \pm 2.32)$ 、 $(10.33 \pm 1.03)$ 、 $(10.67 \pm 2.16)$ 、 $(9.50 \pm 1.05)$ 、 $(9.67 \pm 1.75)$ 、 $(8.83 \pm 1.84)$ 个。空白组与其余 6 组相比,阳性细胞核数差异无统计学意义( $F=0.719$ ,  $P=0.637$ )。

### 2.4 免疫印记检测结果

各组数据均符合正态分布,方差齐( $P$ 均 $>0.05$ )。造模结束后,FDM 组与空白组相比,TH 蛋白相对表达量明显减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ );FDM 组与 PBS 组蛋白表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ );与 FDM 组相比,0.25 ng 组、2.5 ng 组、25 ng 组、50 ng 组 TH 蛋白表达量明显升高,差异有统计学意义(均  $P<0.05$ ),且随着浓度的升高,TH 相对表达量也呈升高趋势( $F=35.507$ ,  $P<0.001$ )。TH 蛋白条带图及相对表达量见图 3。

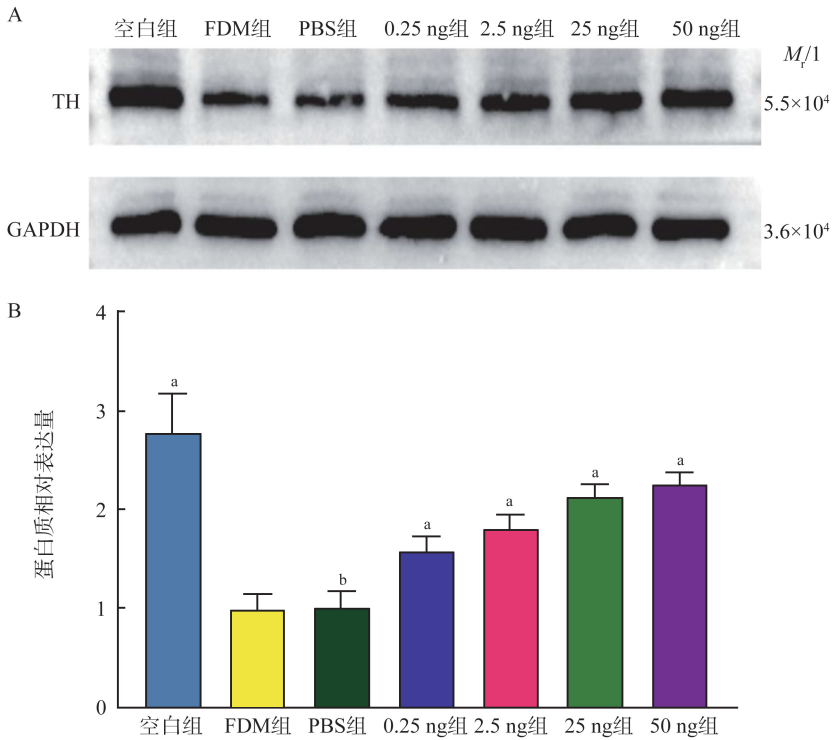


图3 造模后各组豚鼠TH蛋白条带图(A)及相对表达量(B)

<sup>a</sup>与FDM组相比  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>与FDM组相比  $P = 0.8189$ 。

Figure 3 The protein bands (A) and the relative expression (B) of TH in guinea pigs from each experimental group after modeling

<sup>a</sup> $P < 0.05$  compared to FDM group; <sup>b</sup> $P = 0.8189$  compared to FDM group.

## 2.5 高效液相色谱电化学检测结果

各组数据均符合正态分布,方差齐( $P$ 均 $> 0.05$ )。遮盖14 d后,FDM组、PBS组与空白组相比,DA与DOPAC含量明显降低,差异均有统计学

意义( $P$ 均 $< 0.05$ );0.25 ng组、2.5 ng组、25 ng组、50 ng组与FDM组相比,DA与DOPAC水平均升高( $P$ 均 $< 0.05$ ),7组DA代谢率(DOPAC/DA)差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表2。

表2 各组豚鼠视网膜中DA、DOPAC的含量及DA代谢率比较

Table 2 Comparison of DA and DOPAC and the metabolic rate of DA in the retina of guinea pigs in each group

组别	DA/(ng/g)	DOPAC/(ng/g)	DA代谢率
空白组	126.733±5.318	93.605±4.217	0.739±0.017
FDM组	61.447±5.036 <sup>a</sup>	45.448±3.624 <sup>a</sup>	0.740±0.006
PBS组	64.705±3.323 <sup>a</sup>	47.139±2.988 <sup>a</sup>	0.728±0.016
0.25 ng组	78.687±4.986 <sup>ab</sup>	57.809±3.876 <sup>ab</sup>	0.735±0.012
2.5 ng组	94.507±5.142 <sup>ab</sup>	69.914±4.262 <sup>ab</sup>	0.740±0.009
25 ng组	100.487±2.360 <sup>ab</sup>	74.449±2.352 <sup>ab</sup>	0.741±0.015
50 ng组	106.587±3.497 <sup>ab</sup>	79.710±3.696 <sup>ab</sup>	0.748±0.013
<i>F</i>	174.572	142.443	1.231
<i>P</i>	$< 0.001$	$< 0.001$	0.314

注:<sup>a</sup>与空白组相比, $P < 0.01$ ; <sup>b</sup>与FDM组相比, $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

近年来,近视发病率逐年升高<sup>[22]</sup>,尤其是东南亚地区,受近视困扰最为严重<sup>[23]</sup>。学者们针对近视

病理学与退行性病变等方面进行了诸多考量,提出了百余种假设,但其具体发病机制尚未明确<sup>[24]</sup>。眼部发育是一个复杂的过程,在视觉引导调节眼部生长发育的过程中,视网膜是重要的调节器,产生多种关键因子和神经递质,其中DA在光视觉信息传递

和屈光发育的调节过程中扮演着关键的角色,被认为是近视发展停止的信号<sup>[7,25-27]</sup>。根据开环理论的逻辑进行预测,在视觉信号被剥夺的情况下,调控视网膜成像与眼轴生长的某些神经递质、信号分子释放改变,近视的发展非常快,其中DA与此过程联系最为紧密<sup>[28-30]</sup>。目前猴、鸡、小鼠、豚鼠等实验动物已成功建立FDM模型,综合考量实验动物的视觉发育周期、眼球生物学参数、易得性与配合度后,本课题组采用三色豚鼠建立FDM模型<sup>[19-20]</sup>。

DA属儿茶酚胺类神经递质,在视网膜发育、光视觉信号传导、细胞凋亡与氧化应激等过程中发挥着重要作用<sup>[31-32]</sup>。DA的合成是通过DA能神经元摄取酪氨酸后,在TH的催化作用下先转化为中间产物左旋多巴,再经过催化反应生成DA,该反应中的限速酶是TH。DOPAC是DA在单胺氧化酶的催化作用下生成的代谢物,同时也是反映DA释放量的一个重要标记物。DA分为D1类受体(dopamine receptor 1, D1)与D2类受体(dopamine receptor 2, D2)。两类受体对腺苷酸环化酶的影响不同,发挥着不同的作用,有研究表明DA本身通过D2受体可以抑制VEGF-A诱导的下游蛋白的磷酸化从而发挥一定的抗血管生成作用<sup>[33-34]</sup>。玻璃体腔DA及其受体激动剂,如阿扑吗啡,已被证实可以抑制FDM的进展<sup>[17,35]</sup>。不仅如此,DA在视网膜中还通过相关受体参与眼轴的生长发育、视觉信号传递等活动,FDM模型中视网膜内DA的合成和DOPAC的相关改变也已在恒河猴(猕猴)中得到了证实<sup>[36-37]</sup>。目前掌握的屈光手术、OK镜、离焦镜、框架眼镜等近视防控、治疗的手段虽有成效,但并不能完全抑制近视的发生发展,而对视网膜信号因子发挥治疗作用的治疗药物中期望较高的VEGF-A,其对DA能神经元的神经保护作用已被证实<sup>[38]</sup>。此外,VEGF-B在大鼠帕金森模型中对中脑DA神经元提供保护<sup>[39]</sup>。本课题组前期研究发现,在FDM豚鼠模型中VEGF-A165对视网膜中的DA与DOPAC含量有积极影响,能够有效降低形觉剥夺对视力造成的损伤,但由于VEGF-A165存在诱导血管通透性、引发新生血管等不良反应,其挽救近视的效果并非与注射浓度呈正相关<sup>[40]</sup>。有研究发现VEGF-B仅通过VEGFR-1充当诱饵受体调节VEGF-A/VEGFR-2促进正常血管生成与细胞分裂,并抑制异常性的过度血管生成,且可能与VEGF-A存在一定竞争关系<sup>[18,41-42]</sup>;早产儿视网膜病变模型中抗VEGF药物可以通过VEGFR-2受体及后续通路抑

制视网膜外的病理性血管生成,同时促进视网膜外周无血管区的正常血管发育增加视野<sup>[43]</sup>。由此推测玻璃体腔注射VEGF-B兼具VEGF-A165的视网膜DA保护作用,同时不会诱发过量胞外Ca<sup>2+</sup>内流激活相关因子增加血管通透性,无过多不良反应,玻璃体腔注射VEGF-B理论上是有价值与治疗前景的治疗选择。

本研究探讨4种剂量下VEGF-B对视网膜中DA和DOPAC含量的变化与FDM模型近视程度的影响,分别为0.25 ng组、2.5 ng组、25 ng组、50 ng组。实验结果表明,7组豚鼠视网膜内界膜中血管内皮细胞核数无明显差距,即在给定浓度范围内(0~50 ng)VEGF-B在视网膜中无血管生成作用,这与VEGF-B启动子序列不含缺氧反应元件、不受缺氧转录诱导相吻合。与空白组相比,FDM组豚鼠屈光状态由远视变为近视状态,眼轴长度明显延长,视网膜中DA和DOPAC的含量均明显降低,但DA/DOPAC比值不变,TH的阳性细胞数明显减少、TH相对表达量降低;与FDM组相比,PBS组各项指标差异无统计学意义。与FDM组相比,0.25 ng、2.5 ng、25 ng、50 ng,4组均会引起遮盖眼近视程度降低,眼轴延长幅度减小,TH阳性细胞数增加、TH相对表达量升高,且4组注射组视网膜中DA和DOPAC的含量均升高,DOPAC/DA仍不变,由此可知,视网膜中DA水平升高是由DA生成增加(TH表达也相对增加)导致,而非代谢减少导致。2.5 ng组相较于0.25 ng组,视网膜DA与DOPAC含量、TH阳性细胞数、相对表达量均增加;25 ng组相较于2.5 ng组,视网膜DA与DOPAC含量、TH阳性细胞数、相对表达量同样有所增加;而值得注意的是,在50 ng剂量下,各指标结果与25 ng组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),这与Falk等<sup>[38]</sup>研究的外源性VEGF-B于中脑多巴胺能神经元TH阳性细胞表达结果一致。显然,在FDM模型中,玻璃体腔注射VEGF-B对视网膜内DA水平的影响是呈浓度依赖性的,浓度更高的50 ng组治疗效果更令人满意,但25 ng组趋势更明显,作用效率更高。由此可知,VEGF-B的作用效率并非与剂量呈完全正相关,因此找到最佳剂量,不同时机下选择最适宜的治疗剂量才是研究玻璃体腔注射VEGF-B治疗近视发生发展的关键。

综上所述,本研究证明,VEGF-B在FDM豚鼠模型中可抑制近视的发展与眼轴的延长,使视网膜DA含量升高且在实验给定浓度内不诱导新生血

管,其作用机制可能是增加视网膜 DA 的分泌产生,对 FDM 豚鼠的视网膜 DA 神经元有支持与营养作用,使其在形觉剥夺时受到更低的影响。VEGF-B 的作用通路相对单一,药效相较于 VEGF-A 更易调控,是更有竞争力的药物选择。本研究的局限性在于,对不同亚型的 VEGF-B 没有进一步区分,仅观察了 4 种剂量下 VEGF-B 作用的差异,对应的氧化应激指标也并未继续深入研究,如谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶等关键细胞内抗氧化剂;磷脂酶 C $\gamma$  和蛋白激酶 B 通路、丝裂原活化蛋白激酶、肌醇 1, 4, 5-三磷酸等通路;细胞外信号调节激酶 (ERK, 包括了两种异构体 ERK1 和 ERK2) 的磷酸化等方面的具体作用机制探究并未深入。最后,在本文给定的 VEGF-B 浓度变化内的结果进行分析,推测最佳剂量应介于 25~75 ng 之间。本研究为后续相关 VEGF 类药物的视网膜神经元保护作用以及近视防控领域提供了新思路和实验基础。

## 参考文献:

- [1] Harb EN, Wildsoet CF. Origins of refractive errors: environmental and genetic factors[J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2019, 5: 47-72. doi: 10.1146/annurev-vision-091718-015027.
- [2] Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010[J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(5): 614-618.
- [3] Foreman J, Salim AT, Praveen A, et al. Association between digital smart device use and myopia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Digit Health*, 2021, 3(12): e806-e818.
- [4] Han XT, Liu C, Chen YX, et al. Myopia prediction: a systematic review[J]. *Eye*, 2022, 36(5): 921-929.
- [5] Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050[J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(5): 1036-1042.
- [6] Zhou XT, Pardue MT, Iuvone PM, et al. Dopamine signaling and myopia development: what are the key challenges[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2017, 61: 60-71. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.06.003.
- [7] Landis EG, Park HN, Chrenek M, et al. Ambient light regulates retinal dopamine signaling and myopia susceptibility[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(1): 28.
- [8] 雍海溟, 宋强, 张水华, 等. 血管内皮生长因子-B 在弱视大鼠眼优势柱可塑性中的神经保护作用[J]. *宁夏医学杂志*, 2021, 43(12): 1057-1061, 1225.
- [9] YONG Haiming, SONG Qiang, ZHANG Shuihua, et al. The neuroprotective effect of vascular endothelial growth factor-B on the plasticity of dominant column in amblyopic rats[J]. *Ningxia Medical Journal*, 2021, 43(12): 1057-1061, 1225.
- [9] Caballero B, Sherman SJ, Falk T. Insights into the mechanisms involved in protective effects of VEGF-B in dopaminergic neurons[J]. *Parkinsons Dis*, 2017: 4263795. doi:10.1155/2017/4263795.
- [10] Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, et al. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease[J]. *Brain Res*, 2005, 1053(1/2): 10-18.
- [11] Tian YY, Tang CJ, Wang JN, et al. Favorable effects of VEGF gene transfer on a rat model of Parkinson disease using adeno-associated viral vectors[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 421(3): 239-244.
- [12] Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, et al. The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of in vitro and in vivo Parkinson's disease model[J]. *Brain Res*, 2005, 1038(1): 1-10.
- [13] 彭越, 高宇, 王云飞, 等. VEGF 在糖尿病视网膜病变发病机制中的作用[J]. *医学信息*, 2021, 34(5): 36-39.
- [13] PENG Yue, GAO Yu, WANG Yunfei, et al. The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *Journal of Medical Information*, 2021, 34(5): 36-39.
- [14] 孙俊, 余欢, 黄守约. 血管内皮生长因子对青光眼的视神经保护机制的研究进展[J]. *诊断学理论与实践*, 2021, 20(3): 290-293.
- [14] SUN Jun, YU Huan, HUANG Shouyue. Advances in study on mechanism of protective effect of vascular endothelial growth factor on optic nerve in glaucoma[J]. *Journal of Diagnostics Concepts & Practice*, 2021, 20(3): 290-293.
- [15] 赖诚, 李明新. 血管内皮生长因子-B 对高糖环境下人视网膜色素上皮细胞凋亡的保护作用[J]. *眼科新进展*, 2020, 40(5): 430-434.
- [15] LAI Cheng, LI Mingxin. Protective effect of vascular endothelial growth factor-B on apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells-19 in high glucose environment[J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2020, 40(5): 430-434.
- [16] 孙瑞婷, 高洪莲, 张凤一, 等. 血管内皮生长因子-A165 对形觉剥夺性近视豚鼠视网膜中多巴胺水平的影响[J]. *眼科新进展*, 2023, 43(10): 775-780.
- [16] SUN Ruiting, GAO Honglian, ZHANG Fengyi, et al. Effects of vascular endothelial growth factor-A165 on the

- dopamine level in the retina of guinea pigs with form-deprivation myopia[J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2023, 43(10): 775-780.
- [17] 邱宇, 高洪莲, 于睿, 等. 抗血管内皮生长因子玻璃体内注射对形觉剥夺性近视豚鼠视网膜中多巴胺水平的影响[J]. *眼科新进展*, 2022, 42(2): 113-117.  
QIU Yu, GAO Honglian, YU Rui, et al. Effect of intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor on the dopamine level in the retina of guinea pigs with form deprivation myopia[J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2022, 42(2): 113-117.
- [18] Lee C, Chen RY, Sun GL, et al. VEGF-B prevents excessive angiogenesis by inhibiting FGF2/FGFR1 pathway [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 305.
- [19] 周桂梅, 兰长骏, 廖萱. 实验性近视豚鼠模型研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2023, 23(3): 430-434.  
ZHOU Guimei, LAN Changjun, LIAO Xuan. Advances in experimental myopic guinea pig models[J]. *International Eye Science*, 2023, 23(3): 430-434.
- [20] 黄颖, 邸悦, 乔彤. 豚鼠与人眼球结构及生物学参数的比较研究进展[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2023, 23(2): 180-184.  
HUANG Ying, DI Yue, QIAO Tong. Comparison of eyeball structure and biological parameters between guinea pig and humans[J]. *Chinese Journal of Ophthalmology and Otorhinolaryngology*, 2023, 23(2): 180-184.
- [21] Falk T, Zhang SL, Sherman SJ. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2009, 4: 49. doi:10.1186/1750-1326-4-49.
- [22] Medina A. The cause of myopia development and progression: theory, evidence, and treatment [J]. *Surv Ophthalmol*, 2022, 67(2): 488-509.
- [23] Hashemi H, Fotouhi A, Yekta A, et al. Global and regional estimates of prevalence of refractive errors: systematic review and meta-analysis [J]. *J Curr Ophthalmol*, 2018, 30(1): 3-22.
- [24] de Jong PTVM. Myopia: its historical contexts [J]. *Br J Ophthalmol*, 2018, 102(8): 1021-1027.
- [25] 张凤一, 高洪莲, 邱宇, 等. 多巴胺对氧诱导视网膜病变小鼠视网膜新生血管的影响 [J]. *眼科新进展*, 2023, 43(1): 25-29.  
ZHANG Fengyi, GAO Honglian, QIU Yu, et al. Effect of dopamine on retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy mice [J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2023, 43(1): 25-29.
- [26] Chen P, Xu LJ, Zhang J, et al. Up-regulation of SorCS1, an important sorting receptor, in the retina of a form-deprivation rat model [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(3): 395-405.
- [27] Thomson K, Karouta C, Ashby R. Form-deprivation and lens-induced myopia are similarly affected by pharmacological manipulation of the dopaminergic system in chicks [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(12): 4.
- [28] Medina A, Greene PR. Progressive myopia and lid suture myopia are explained by the same feedback process: a mathematical model of myopia [J]. *J Nat Sci*, 2015, 1(6): e121.
- [29] Wang M, Schaeffel F, Jiang B, et al. Effects of light of different spectral composition on refractive development and retinal dopamine in chicks [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(11): 4413-4424.
- [30] 王新钰, 高丽芬, 路晖, 等. 帕金森疾病的相关视网膜表现 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2024, 38(2): 156-162.  
WANG Xinyu, GAO Lifan, LU Hui, et al. Related retinal manifestations in Parkinson's disease [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2024, 38(2): 156-162.
- [31] Sakshi, Swain BC, Das AK, et al. Z-scan analysis and theoretical studies of dopamine under physiological conditions [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2022, 271: 120890. doi:10.1016/j.saa.2022.120890.
- [32] 王晗, 李书鹏, 姜玉华, 等. 谷胱甘肽对多巴胺诱导的GH4细胞凋亡的保护作用 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49(11): 48-52, 73.  
WANG Han, LI Shupeng, JIANG Yuhua, et al. Glutathione protects GH4 pituitary lactotrope tumor cells from apoptosis induced by dopamine [J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2011, 49(11): 48-52, 73.
- [33] Chakroborty D, Sarkar C, Yu HM, et al. Dopamine stabilizes tumor blood vessels by up-regulating angiopoietin 1 expression in pericytes and Kruppel-like factor-2 expression in tumor endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(51): 20730-20735.
- [34] Sarkar C, Ganju RK, Pompili VJ, et al. Enhanced peripheral dopamine impairs post-ischemic healing by suppressing angiotensin receptor type 1 expression in endothelial cells and inhibiting angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(1): 97-107.
- [35] Gao QY, Liu Q, Ma P, et al. Effects of direct intravitreal dopamine injections on the development of lid-suture induced myopia in rabbits [J]. *Albrecht Von Graefes Arch Fur Klin Und Exp Ophthalmol*, 2006, 244(10): 1329-1335.
- [36] Stone RA, Lin T, Laties AM, et al. Retinal dopamine

- and form-deprivation myopia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(2): 704-706.
- [37] Iuvone PM, Tigges M, Fernandes A, et al. Dopamine synthesis and metabolism in rhesus monkey retina: development, aging, and the effects of monocular visual deprivation[J]. Vis Neurosci, 1989, 2(5): 465-471.
- [38] Falk T, Gonzalez RT, Sherman SJ. The Yin and Yang of VEGF and PEDF: multifaceted neurotrophic factors and their potential in the treatment of Parkinson's Disease [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(8): 2875-2900.
- [39] Yue X, Hariri DJ, Caballero B, et al. Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2014, 258: 385-400. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.038.
- [40] Sun RT, Peng QS, Zhang FY, et al. Effect of vascular endothelial growth factor 165 on dopamine level in the retinas of guinea pigs with form-deprivation myopia[J]. PeerJ, 2023, 11: e16255. doi:10.7717/peerj.16255.
- [41] Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation [J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 84: 100954. doi:10.1016/j.preteyeres.2021.100954.
- [42] Zajkowska M, Lubowicka E, Malinowski P, et al. Plasma levels of VEGF-A, VEGF B, and VEGFR-1 and applicability of these parameters as tumor markers in diagnosis of breast cancer[J]. Acta Biochim Pol, 2018, 65(4): 621-628.
- [43] Sauer L, Chandler M, Hartnett ME. Extending peripheral retinal vascularization in retinopathy of prematurity through regulation of VEGF signaling [J]. Am J Ophthalmol, 2024, 260: 190-199. doi:10.1016/j.ajo.2023.12.008.

(编辑:房红娟)

读者·作者·编者

## 正文中参考文献的标注

按文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编码,并将序号置于方括号中。可根据具体情况分别按下述3种格式之一标注。a. 薛社普等<sup>[1]</sup>指出棉酚从体内排泄缓慢。b. 麦胶敏感性肠病的发病有3种机制参与<sup>[2,4-6]</sup>。c. 间质细胞cAMP含量测定方法见文献[7]。正文指明原始文献作者姓名时,序号标注于作者姓名右上角(如例a);正文未指明作者或非原始文献作者时,序号标注于句末(如例b);正文直接提及文献序号将之作为语句的组成部分时,不用角码标注(如例c)。

(本刊编辑部)