

左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫视网膜 c-fos 表达的影响

梁韬,黎荣,林兴,张士军,蒋伟哲,黄仁彬*

(广西医科大学药学院,南宁 530021)

[摘要] 目的:研究左旋多巴甲酯(LDME)对剥夺性弱视猫视网膜细胞凋亡情况以及 c-fos 表达及其分布的特点,并探讨其作用机制。方法:健康 2 周龄幼猫 30 只随机分成 6 组:模型对照组及正常对照组,左旋多巴阳性对照组,LDME 低、中、高剂量组,每组 5 只。除了正常组,各组幼猫于 4 周龄时单纯缝合左眼建立剥夺性弱视,12 周后打开缝合眼并开始给药,每天灌胃 LDME 20,40,80 mg·kg⁻¹,阳性组为左旋多巴 40 mg·kg⁻¹,正常组与模型组为等量生理盐水,持续 30 d。TUNEL 法检测视网膜细胞的凋亡情况,经原位杂交技术、免疫组化检测视网膜中 c-fos mRNA 和 c-fos 蛋白的表达。结果:与模型对照组比较,LDME 明显减少弱视猫视网膜组织的细胞凋亡指数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著上调 c-fos mRNA 在视网膜中的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),同时增加 c-fos 免疫阳性细胞数量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:左旋多巴甲酯有效地保护剥夺性弱视造成的视网膜损伤,其机制可能与抑制细胞凋亡以及促进 c-fos 表达有关。

[关键词] 左旋多巴甲酯;剥夺性弱视;视网膜;细胞凋亡;c-fos;猫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0194-04

[doi] 10.11653/syfj2013080194

[收稿日期] 20121011(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30760285);广西研究生教育创新计划项目(2011105981002M173)

[第一作者] 梁韬,硕士生,从事抗弱视药和生化药理学研究,Tel: 13481000982,E-mail:303991542@qq.com

[通讯作者] * 黄仁彬 博士,教授,博士生导师,从事抗弱视药和生化药理学研究,Tel:0771-5339805,E-mail: huangrenbin518@163.com

应,而且炎症过程中可产生大量的 O²⁻,O²⁻可引起细胞器单位膜脂质过氧化,使 MDA 明显增高,并进而导致细胞的毒性反应,加重溃疡的形成。本研究发现柴胡皂苷可显著提高胃黏膜损伤大鼠血清 SOD 水平,降低 MDA 水平,推测其另一保护胃黏膜机制可能与抗氧自由基损伤有关。

[参考文献]

[1] 谢东浩,蔡宝昌,安益强,等.柴胡皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J].南京中医药大学学报:自然科学版,2007,23(1):63.
[2] 刘云海,陈永顺,谢委,等.柴胡总皂苷抗内毒素活性研究[J].中药材,2003,26(6):423.
[3] 郑建伟,许丹娜.不同制备方法配制的小柴胡汤药效比较研究[J].中药材,2007,30(6):708.
[4] 孙海龙,孙运海,孙运群,等.柴胡舒肝散加味治疗胃十二指肠球部溃疡 54 例临床观察[J].中医药学报,2008,36(5):59.
[5] 李长安.柴胡桂枝汤加减治疗功能性消化不良 40 例[J].实用中医内科杂志,2011,25(6):68.
[6] 仇亚男,沈明勤,林剑军,等.平胃舒胶囊对大鼠胃黏

膜损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):203.
[7] 李备,潘永全,刘华蓉,等.黄连总碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用及其机制研究[J].中成药,2006,28(1):72.
[8] 江涛,唐春萍,陈艳芬,等.高良姜总黄酮对大鼠实验性胃溃疡模型的影响[J].中药材,2009,32(2):260.
[9] Wang Shuai, Bao Yong-rui, Diao Yun-Peng, et al. Evaluation of gastric ulcer model based on gray-scale image analysis [J]. Afr J Biotechnol, 2011, 5(11):1285.
[10] 舒劲,李喜香,吴国泰,等.制萎扶胃浓缩丸对 CAG 模型大鼠胃分泌功能和胃黏膜组织形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):173.
[11] 刘男,张颖丽,张善玉,等.朝药关苍术提取物对无水乙醇致小鼠胃黏膜损伤的影响[J].中国民族医药杂志,2010,16(3):41.
[12] 赵红晔,曹军,王月飞,等.溃疡平对乙酸性胃溃疡大鼠胃黏膜血流量及血清 ET-1,NO 含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):213.

[责任编辑 李玉洁]

Effects of *L*-dopa Methyl Ester on the c-fos Expression in Retina of Monocular Deprivation Cats

LIANG Tao, LI Rong, LIN Xing, ZHANG Shi-jun, JIANG Wei-zhe, HUANG Ren-bin*

(Pharmaceutical college, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To study the effects of *L*-dopa methyl ester (LDME) on the apoptotic cells the expression of c-fos mRNA, and c-fos positive cells in retina of monocular deprivation cats, then explore its mechanism on amblyopia. **Method:** Thirty normal cats were randomly divided into 6 groups (5 cats in each group): low dose (LDME_L), medium dose (LDME_M), and high dose of *L*-dopa methyl ester (LDME_H), positive control group (PC), normal control group (NC) and model contro (MC). The kittens in each group were visually deprived by suturing the lids of the left eyes to establish the monocular deprivation amblyopia, then eye was opened and treated with drug after 12 weeks. LDME (20, 40, 80 mg·kg⁻¹), *L*-dopa (40 mg·kg⁻¹) and saline were given to the corresponding animals for 30 days. The TUNEL assay was used to detect apoptosis in retina, and the in situ hybridization and immunohistochemistry techniques were used to detect the expression of c-fos mRNA and c-fos protein. **Result:** Compared to the model control group, LDME significantly lessened the apoptotic index in retina ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and markedly up-regulated the expression of c-fos mRNA in retina ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), meanwhile, elevated the amount of c-fos positive cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Levodopa methyl ester can effectively improve the retinal damage caused by deprivation amblyopia, and the mechanisms may be linked to inhibiting apoptosis and up-regulating the expression of c-fos.

[Key words] *L*-dopa methyl ester; monocular deprivation amblyopia; retina; apoptosis; c-fos; cat

弱视是一种从视网膜神经细胞至视中枢的视觉传导系统以及视觉通路全领域的功能异常引起的临床症候群。弱视的发病率较高,而在医疗条件缺乏地区则更高^[2]。本课题组在治疗常用药物左旋多巴结构基础上,合成了新的化学物质左旋多巴甲酯(LDME),它具有水溶高、吸收快、易通过血脑屏障等优点。本文观察左旋多巴甲酯及左旋多巴对猫剥夺性弱视的治疗作用及其对弱视眼视网膜 c-fos 及其基因表达的影响,探索 LDME 对剥夺性弱视的作用,为弱视预防和治疗开辟新的途径。

1 材料

1.1 仪器 2235 型包埋机(German Leitz),2235 型病理组织切片机(Germany Leitz),DMR+550 型病理图像分析仪(Germany Leica Co. Ltd),CX41 型生物显微镜(Olympus)。

1.2 药品与试剂 左旋多巴(广西河丰药业有限责任公司,批号 20110916),盐酸左旋多巴甲酯(广西医科大学新药研究开发中心自制,批号 20110418,纯度 99.0%),c-fos mRNA 原位杂交检测试剂盒(Boster,批号 201103),anti-c-fos(武汉 Boster,批号 27261),DAB 显色试剂盒(北京中杉金

桥生物技术有限公司,批号 673767A),二抗兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 K106910D)。

1.3 动物 初生幼猫(2 周龄)30 只,体重 300 g 左右,雌雄兼用,由广西医科大学实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK(桂)2009-0002。

2 方法

2.1 模型建立 初生幼猫(2 周龄),30 只常规检查双眼,确认外眼、屈光间质以及眼底无异常。随机分为 6 组(每组 5 只):左旋多巴甲酯梯度组:高剂量组(LDME_H)、中剂量组(LDME_M)、低剂量组(LDME_L)、左旋多巴阳性对照组(PC)、正常组(NC)、模型组(MC)。于 4 周龄时参照 Hubel^[1]经典实验方法对各组幼猫进行麻醉后的左眼单纯上下睑缝合建立剥夺性弱视,12 周后打开缝合眼并开始给药,每天灌胃左旋多巴甲酯 20,40,80 mg·kg⁻¹,阳性对照组给左旋多巴 40 mg·kg⁻¹,正常组及模型组均给与等量生理盐水,每天 1 次持续 30 d。动物饲养温度控制在 26~32℃,湿度控制在 85%,明暗交替时间为 12/12 h,符合医学实验动物环境设施要求条件。

2.2 动物的取材 在给药后 31 d 时(各组猫均在取材前 2 d 置于黑暗环境下饲养,之后恢复正常视觉环境下 2~3 h),腹腔注射适量的 25% 乌拉坦进行深度麻醉,将插管插入左心室后切开右心房形成出路,先快速灌注 4 ℃ 生理盐水 250 mL,再灌注入 DEPC 处理过的 4% 多聚甲醛 500 mL。在冰盒上分离出左眼视网膜(弱视眼),浸入上述 4% 的多聚甲醛液中后固定 6 h,常规逐级脱水,二甲苯透明后,浸蜡包埋,切片厚度为 6 μm,以上标本全部置于适当条件下保存,然后进行细胞凋亡检测和 c-fos 免疫组化实验以及 c-fos mRNA 原位杂交检测。实验步骤按试剂盒使用说明进行。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,c-fos 免疫阳性细胞数比较用配对 *t* 检

验,c-fos mRNA 吸光度(*A*)计算比较采用单因素方差分析,组间均数差异的两两比较采用 LSD-*t* 检验,*P* < 0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 对剥夺性弱视猫左侧视网膜中细胞凋亡的影响 在光镜下观察到 TUNEL 阳性细胞染色呈棕褐色,主要表达在神经元核膜和胞浆。不同剂量 LDME 对弱视眼细胞凋亡调节的影响,相应层表现为 TUNEL 阳性细胞染色变浅,密度减少,其凋亡表达水平降低。其中 LDME_H 有较明显的抗凋亡作用 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),表现为对神经细胞的保护作用以及降低细胞凋亡表达水平。治疗各组与模型对照组比较,其 TUNEL 阳性细胞反应强度及神经细胞数密度降低 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 1。

表 1 左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫左侧视网膜中细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	外胞核层细胞数量		内核层细胞数量	
		个/mm ²	<i>A</i> /mm ²	个/mm ²	<i>A</i> /mm ²
对照	-	24.59 ± 8.72	58.94 ± 12.35	41.56 ± 11.08	148.78 ± 23.51
模型	-	278.91 ± 41.57 ²⁾	668.49 ± 53.14 ¹⁾	318.56 ± 43.71 ¹⁾	1140.45 ± 108.75
左旋多巴	40	60.32 ± 27.45 ⁴⁾	144.57 ± 27.26	63.47 ± 21.38 ⁴⁾	227.46 ± 37.95 ³⁾
左旋多巴甲酯	20	116.41 ± 25.37	279.03 ± 40.54 ³⁾	182.64 ± 30.55 ³⁾	653.85 ± 50.87
	40	57.83 ± 18.26 ³⁾	138.62 ± 24.11	60.85 ± 20.19 ⁴⁾	217.84 ± 32.65 ³⁾
	80	26.42 ± 9.04 ⁴⁾	63.34 ± 16.49 ⁴⁾	46.32 ± 18.62 ⁴⁾	165.82 ± 28.49 ⁴⁾

注:与对照组比较¹⁾*P* < 0.05,²⁾*P* < 0.01;与模型组比较³⁾*P* < 0.05,⁴⁾*P* < 0.01(表 2~3 同)。

3.2 对剥夺性弱视猫左侧视网膜 c-fos mRNA 表达的影响 正常对照组视猫视网膜 c-fos mRNA 阳性表达活跃,在 ONL,INL 层密度较高。对比正常对照组,模型对照组弱视猫视网膜 c-fos mRNA 杂交水平在各层均减少 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。与模型对照组相比,给药各组(PC,LDME_L,LDME_M,LDME_H) c-fos mRNA 杂交阳性细胞数量在 ONL,INL 层均有增加 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),其中以 LDME_H 组表达水平最高。见表 2。

表 2 左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫

左侧视网膜 c-fos mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	左侧视网膜 c-fos mRNA 表达的影响	
		外胞核层	内核层
对照	-	724.39 ± 46.25	145.72 ± 28.54
模型	-	168.12 ± 40.76 ²⁾	37.06 ± 10.91 ¹⁾
左旋多巴	40	653.61 ± 39.42 ³⁾	104.63 ± 30.15 ³⁾
左旋多巴甲酯	20	498.57 ± 41.08	75.38 ± 25.43 ³⁾
	40	657.43 ± 42.83 ³⁾	106.17 ± 28.61 ⁴⁾
	80	710.25 ± 43.56 ⁴⁾	136.58 ± 31.25 ⁴⁾

3.3 对剥夺性弱视猫左侧视网膜 c-fos 的影响 光镜下观察到正常幼猫视网膜中的棕黄色 c-fos 阳性细胞,多见于外核层和内核层,其他层相对较少。模型对照组弱视猫视网膜中 c-fos 阳性细胞表达率明显低于正常对照组,而给药各组的 c-fos 阳性表达率均高于模型对照组 (*P* < 0.01 或 *P* < 0.05)。与正常对照组比较,左旋多巴甲酯高剂量组 c-fos 免疫阳性细胞表达率在 ONL,INL 层均少于正常组对照组,两者比较未见统计学差异。见表 3。

4 讨论

本实验发现,模型对照组弱视眼 ONL,INL 层均发生了严重的细胞凋亡,体现为 TUNEL 阳性细胞数量的增加,可能是视觉剥夺导致视觉敏感期内 ONL,INL 层神经细胞的发育障碍。经左旋多巴甲酯治疗后能够有效控制细胞凋亡。左旋多巴甲酯脂溶性好,易通过血脑屏障,从而提高视网膜内 dopamine 含量,其效价优于同剂量的左旋多巴。

研究表明:即刻早期基因(如 c-fos)可将细胞外

表3 左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫左侧视网膜 c-fos 的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	外胞核层细胞数量 个/mm ²	阳性表达率 /%	内胞核层细胞数量 个/mm ²	阳性表达率 /%
对照	-	616.58 ± 54.26	63.85	127.56 ± 38.27	58.47
模型	-	125.67 ± 51.73 ¹⁾	9.57	24.12 ± 11.29 ²⁾	10.12
左旋多巴	40	556.71 ± 41.55 ³⁾	53.85	91.65 ± 50.31 ⁴⁾	47.68
左旋多巴甲酯	20	518.42 ± 42.43 ³⁾	32.76	68.29 ± 38.41	30.51
	40	559.25 ± 43.35 ³⁾	54.13	92.57 ± 43.56 ⁴⁾	48.09
	80	587.35 ± 41.62 ⁴⁾	60.32	110.48 ± 29.36 ⁴⁾	54.36

的信号传递转换成神经细胞功能持续变化的特性。由于 c-fos 基因的基础表达较低,实验需预先将动物经暗环境处理后恢复正常视觉刺激,诱导 c-fos 蛋白的快速表达。本实验观察到在 ONL, INL 层神经细胞中可有 c-fos 基因和 c-fos 蛋白表达,提示了视网膜在视觉发育过程中有其重要作用。视网膜作为视觉信号的初级接收器,接受外界刺激后相关区域细胞容易启动 c-fos 基因快速反应进程,在短时间内做出反应并翻译其表达产物 c-fos 蛋白,通过影响视网膜内靶基因的转录率而把外界信号和基因的变化偶联起来,在信息及传导过程中起着胞核内第三信使的重要作用,从而为参与此后视皮质中中枢神经元功能活动的调控和视觉发育的可塑性提供触发条件^[9-11]。

左旋多巴甲酯可以对弱视造成的视网膜结构和功能损伤有改善作用,深层机制有待进一步探究,其可能是由于左旋多巴甲酯经过转化后进入到弱视猫视网膜相应的细胞中,其中间产物多巴胺在该区域中累积后,于神经元间释放谷氨酸,激活其内的 NMDA 受体,从而加速了 Ca²⁺ 内流,解除了“关闭”状态中 c-fos mRNA 的活性,促使其进入该细胞后调节并诱导胞核内转录后于胞浆翻译 c-fos 蛋白并与其他活性因子结合,介导和调控系列反应,恢复并启动视觉的初级通路。深层机制有待进一步探究。

[参考文献]

- [1] Hubel D H, Wiesel Y N. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens[J]. *Physiol*, 1970, 206(2): 419.
- [2] Simons K. Amblyopia characterization, treatment, and prophylaxis[J]. *Surv Ophthalmol*, 2005, 50(2): 123.

- [3] Kaczmarek L, Chaudhuri A. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity[J]. *Brain Res Rev*, 1997, 23(3): 237.
- [4] Kholodenko R, Kholodenko I, Sorokin V, et al. Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism [J]. *Cell Res*, 2007, 17(2): 151.
- [5] Jinmao Chen, Jinnan Yang, Shaochun Lin, et al. Caspase-3 mRNA expression in rats with apoptosis of retinal photoreceptor cells [J]. *Neural Regen Res*, 2007, 2(5): 267.
- [6] 卢静,戴体俊,曾因明. c-fos 基因表达的相关机制及和意义[J]. *国外医学:麻醉学与复苏分册*, 2004, 25(5): 273.
- [7] 周清,陈剑,刘珏,等. 视觉发育可塑性关键期后弱视大鼠视皮质 c-fos 的表达 [J]. *广东医学*, 2007, 28(10): 1594.
- [8] 黎荣,梁韬,林兴,等. 左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫视皮层 17 区神经细胞的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 74.
- [9] 刘珏,陈剑,周清,等. c-fos 蛋白在单眼斜视性弱视成年大鼠视皮质神经元的表达 [J]. *暨南大学学报:医学版*, 2010, 31(2): 163.
- [10] Hughes P. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system [J]. *Pharmacol Rev*, 1995, 47(1): 133.
- [11] Vanessa B, Francisco S G. c-fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat [J]. *Behavi Brain Res*, 2006, 170(1): 52.

[责任编辑 李玉洁]