

DOI:CNKI:11-3495/R.20110524.1329.003

· 药理 ·

## 左旋多巴甲酯对斜视性弱视猫视皮层 神经生长因子表达的影响

李勇文, 林兴, 张士军, 黎荣, 蒋伟哲, 黄仁彬\*  
(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的:观察左旋多巴甲酯对幼猫斜视性弱视的治疗作用及其对视皮层 17 区神经生长因子(NGF)表达的影响。方法:正常幼猫 30 只随机分成 6 组:正常对照组、模型对照组、阳性对照组及左旋多巴甲酯低、中、高剂量组每组 5 只,于 4 周龄时行眼外直肌切除术造成人工斜视(正常对照组除外),经图形视觉诱发电位(PVEP)确定形成弱视后,ig 左旋多巴甲酯 20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>, 阳性对照组 ig 左旋多巴 40 mg·kg<sup>-1</sup>, 正常对照组及模型组均 ig 等量生理盐水。观察 PVEP 的变化及应用免疫组织化学法测定各组视皮层 17 区 NGF 的差异。结果:模型对照组与正常对照组相比, PVEP 的 P100 波潜时延迟, 波幅降低, 免疫阳性细胞数量明显减少( $P < 0.05$ ); 治疗组和模型对照组相比, P100 波潜时缩短, 波幅增大, 免疫阳性细胞增加( $P < 0.05$ )。结论:敏感期内斜视性弱视幼猫视皮层 17 区 NGF 的表达减弱;左旋多巴甲酯干预治疗后, NGF 表达明显增加, 弱视眼 PVEP 明显改善;左旋多巴甲酯能促进实验幼猫弱视眼的视功能改善。

[关键词] 左旋多巴甲酯;斜视性弱视;神经生长因子;视皮层;幼猫

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)14-0123-04

## Effects of *L*-dopa Methyl Ester on Expression of Nerve Growth Factor in Neurons of Visual Cortex of Cats with Strabismic Amblyopia

LI Yong-wen, LIN Xing, ZHANG Shi-jun, LI Rong, JIANG Wei-zhe, HUANG Ren-bin\*  
(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of the *L*-dopa methyl ester (*L*-DME) on the pattern visual evoked potentials (PVEP) and expression of NGF in neurons of the visual cortex of kittens with strabismic amblyopia, and explore the therapeutic effect of *L*-dopa methyl ester on amblyopia and its action mechanism. **Method:** Thirty normal kittens were randomly divided into 6 groups: normal control, model control group, positive control (*L*-dopa, 40 mg·kg<sup>-1</sup>), low dose of *L*-dopa methyl ester (20 mg·kg<sup>-1</sup>), medium dose of *L*-dopa methyl ester (40 mg·kg<sup>-1</sup>), and high dose of *L*-dopa methyl ester (80 mg·kg<sup>-1</sup>). The surgery for producing iatrogenic convergent strabismus was performed on 4 week old kittens (normal control group excluded). After the confirmation of the development of amblyopia by pattern visual evoked potential, *L*-dopa methyl ester, *L*-dopa and normal saline

[收稿日期] 20101227(010)

[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(2008105981007D27)

[第一作者] 李勇文, 博士, 副教授, 硕导, 主要从事抗弱视药和生化药理学研究, Tel: 0771-5358014, E-mail: liyongwen99@163.com

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

[网络出版时间] 2011-05-24 13:29

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110524.1329.003.html>

were given to the corresponding animals respectively. The PVEP of amblyopia eyes was observed after one month, and the technique of immunohistochemical determination was used to detect the expression of nerve growth factor (NGF). **Result:** Compared with the normal control group, the P100 wave latency delay and the amplitude of PVEP were decreased in the model control group and the number of positive cells in the model control group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the model control group, P100 wave latency was shortened and amplitude increased and immune-positive cells in the treatment group increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** *L*-dopa methyl ester can significantly improve conduction and sensory function in model of strabismic amblyopia kittens. The mechanism may be related to the increased amount of *L*-dopa methyl ester into the cerebral cortex and regulation of the expression of NGF.

[**Key words**] *L*-dopa methyl ester; strabismic amblyopia; nerve growth factor; visual cortex; kitten

弱视是影响儿童视力的主要疾病之一,不及时治疗可以导致终身视力低下,其形成与出生后早期的视环境不良或影响视觉发育的多种因素有关,其发病机制尚在探索。20 世纪 90 年代起,国内外学者对药物治疗弱视进行了许多临床性的研究,目前临床上多采用左旋多巴治疗,取得了一定效果。然而,左旋多巴存在副作用多、耐受性差、效果不稳定等缺点。本实验组经过对左旋多巴进行结构得到左旋多巴甲酯(*L*-DME),克服了左旋多巴的缺点,具有脂溶性增加、吸收快、易进入血脑屏障的特点。视觉发育的可塑性与多种细胞功能调节因子相关。神经生长因子(NGF)是神经营养因子的一种,研究发现局部应用 NGF 能逆转弱视幼猫视皮层眼优势柱的偏移,改善弱视眼的视功能<sup>[1]</sup>。

本研究采用免疫组织化学法检测使用左旋多巴甲酯治疗斜视性弱视幼猫视皮层 17 区神经生长因子(NGF)表达的变化以及对视觉电生理的影响,探讨左旋多巴甲酯对弱视眼视功能的影响及治疗效果。

## 1 材料

**1.1 动物** 初生家养幼猫(4~6 周龄)30 只,体重约 300~350 g。普通级,动物合格证号 SCXK(桂)2009-0002,由广西医科大学动物实验中心提供。

**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 20080910;盐酸左旋多巴甲酯(*L*-DME),广西医科大学新药研究开发中心自制,批号 20050819,纯度 99.80%;SABC 免疫组化试剂盒(批号 1809),ANTI-NGF 蛋白抗体和 DAB 显色试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

**1.3 仪器** 4590 型包埋机:日本 SAKURA FINETECHNICAL CO. LTD;2235 型病理组织切片机:德国

Leitz;DMR + 550 型病理图像分析仪:德国莱卡公司。

**1.4 动物模型建立及分组** 雌雄不分,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,即正常组(NC)、模型组(MC)、阳性对照组、*L*-DME 低、中、高剂量组。除正常对照组外,其余于 4 周龄时行眼外直肌切除术以造成人工斜视,饲养 1 月,经图形视觉诱发电位(PVEP)确定形成弱视后,ig *L*-DME 20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>,阳性对照组 ig 左旋多巴 40 mg·kg<sup>-1</sup>,NC 及 MC 均 ig 等量生理盐水,每天 1 次,连续 30 d。

**1.5 NGF 的免疫组化染色步骤** ①载玻片防脱片剂处理:Poly-Lysine 浸泡 10 min,捞片置烤箱 58~60 °C 30~60 min。②切片厚 6 μm,常规脱蜡至水。③蒸馏水新鲜配置 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温 5~10 min 灭活内源性酶。水洗 3 次。④热修复抗原:将切片浸入 0.01 mol·L<sup>-1</sup>枸橼酸钠盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾,间隔 5~10 min,反复 1~2 次。冷却后 0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗涤 2 次。⑤抗原修复液 1 滴加在切片上,室温 20 min 后,0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗涤 2~3 次。⑥滴加正常山羊血清封闭液,室温放置 20 min。甩去多余液体,不洗。⑦滴加适当稀释的兔抗 NGF 抗体(1:1 000),置湿盒内孵育,4 °C 过夜。0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗 2 min × 3 次。⑧滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37 °C 20 min;0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗 2 min × 3 次。⑨滴加试剂 SABC,20~37 °C 20 min。0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗 5 min × 4 次。⑩DAB 室温显色 10 min,苏木素轻度复染,封片。显微镜观察。

**1.6 免疫阳性细胞的观察与计数** 在光学显微镜下,视皮质 17 区免疫阳性神经元细胞胞核呈深褐色,胞浆及胞核同时着色,轴突、树突近端着色或着

色浅淡。阴性细胞经苏木素轻度复染后,胞核呈浅蓝色。在视皮质Ⅱ/Ⅲ,Ⅳ,Ⅴ/Ⅵ层分别随机选取不重叠的3个视野,计算每个视野中阳性细胞数,取其平均值,然后换算成每平方毫米阳性细胞的个数,即该层阳性细胞的密度。

**1.7 统计学处理** 细胞胞浆呈棕黄色者为阳性细胞。每张切片随机选出不重叠的3个视野进行计算机显微图像分析,计算每个视野中的阳性细胞数,换算成阳性细胞的密度。各组间阳性细胞数比较及各组幼猫PVEP结果比较采用SPSS13.0软件进行*t*检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 幼猫PVEP情况** 典型的PVEP由三相复合波组成,第一个波为较小的负相波,峰时约在75 ms,称为 $N_{75}$ ;第二个波为大而稳定的正相波,峰时约在100 ms,称为 $P_{100}$ ;第三个波为负相波,该波欠稳定,易受多种因素影响,其峰时约在135 ms,称为 $N_{75-135}$ 。

表1 各组猫PVEP检查( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	$N_{75}$ 峰潜时 /ms	$P_{100}$ 峰潜时 /ms	左眼/右眼 振幅比值	$N_{75-135}$ 峰潜时 /ms
正常对照	-	67.00 ± 2.05	110.1 ± 9.02 <sup>1)</sup>	0.85 ± 0.16 <sup>2)</sup>	89.43 ± 7.72
模型对照	-	63.20 ± 2.82	120.90 ± 19.12	0.49 ± 0.09	152.64 ± 5.49
左旋多巴	40	51.70 ± 5.03	97.60 ± 8.93 <sup>1)</sup>	0.71 ± 0.07	125.94 ± 8.39 <sup>1)</sup>
左旋多巴甲酯	20	52.50 ± 5.68	101.00 ± 16.24 <sup>1)</sup>	0.61 ± 0.05	143.23 ± 9.11 <sup>1)</sup>
	40	51.30 ± 3.89	95.90 ± 13.50 <sup>1)</sup>	0.78 ± 0.12	120.50 ± 9.83 <sup>1)</sup>
	80	44.60 ± 3.34	79.40 ± 18.50 <sup>2)</sup>	0.84 ± 0.11	98.58 ± 5.76 <sup>2)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表2同)。

**2.2 Nissl染色光镜观察** Nissl染色中,视皮质神经元的尼氏小体呈深蓝色,细胞核淡蓝色。在40倍光镜下,正常对照组结构容易辨认,能够清楚的区分出视皮质4层结构:自外向内依次为分子层(Ⅰ)、外层(Ⅱ/Ⅲ)、颗粒层(Ⅳ)及内层(Ⅴ/Ⅵ),神经元分布均匀,染色均一。以此作为原位杂交分层计数的基础。

**2.3 左旋多巴甲酯对斜视性弱视幼猫视皮质NGF表达影响** NGF在5组幼猫视觉系统的变化规律具有特点。经免疫细胞化学SABC技术处理后,组织切片在光学显微镜下,以视皮质尼氏(Nissl)染色片作为对照,可观察到NGF免疫阳性蛋白存在于视皮质17区的2~6层。NGF免疫阳性神经元呈棕褐色,细胞核浆同时着色,在锥体细胞可见突触近端着色。实验结果显示在视觉发育的敏感期内,与正常对照组比较,模型对照组内源性NGF免疫阳性细胞数量在各层均减少,两者有显著的差异( $P < 0.01$ );

这3个波又称为NPN复合波,是临床上最主要观察和分析的波形。PVEP的命名法是按照反应波的极向及各自的平均峰时而定,因此依次命名为 $N_{75}$ , $P_{100}$ , $N_{75-135}$ 。PVEP的 $P_{100}$ 成分是NPN复合波的代表成分,其振幅最高且最稳定,而且其峰时在个体间或个体内的变异很小,是临床评价的最常用指标。

从表1中可知, $N_{75}$ , $P_{100}$ ,左右眼振幅比值, $N_{75-135}$ 各组间均有不同程度的差异。在 $P_{100}$ 组中,MC组潜时延长,与正常组比较有显著差异且有统计学意义;治疗后各组与模型组比较,潜时均有不同程度缩短,阳性对照组、高、中、低剂量组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。对于左右眼振幅比值,正常组的比值是0.85,斜视组为0.49,两者相比有显著的统计学差异( $P < 0.01$ );经用药物治疗后左右眼振幅比值均有所恢复,弱视眼振幅升高,以高剂量组最为显著,与模型对照组比较( $P < 0.01$ )。见表1。

各治疗组与模型对照组比较,内源性NGF免疫阳性细胞数量在各层均增加,除左旋多巴甲酯低剂量组在Ⅲ,Ⅴ,Ⅵ外,其余差异均有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );左旋多巴甲酯组与左旋多巴组相比较,NGF免疫阳性细胞数量在各层呈上升趋势,且高剂量组在Ⅲ,Ⅵ与左旋多巴组相比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。见表2。

## 3 讨论

NGF可促进神经细胞的存活、增殖、分化及功能表达,在视觉发育的可塑性方面起着重要作用<sup>[1-4]</sup>。应用免疫细胞化学SABC技术检测不同时限的斜视幼猫内源性的NGF的变化,发现在敏感期内进行单眼斜视及剥夺,可引起视觉系统三级神经元及其突触的内源性NGF免疫阳性细胞数量减少,而敏感期末进行单眼斜视及剥夺猫未出现单眼斜视和剥夺的生物效应<sup>[5]</sup>。在敏感期内,给予单眼剥夺猫外源性NGF后,促进了双眼连接功能的恢复,有效的预防了

表 2 各组幼独苗视皮质 17 区 NGF 免疫阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

个/mm<sup>2</sup>

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	II	III	IV	V	VI
正常对照	-	430 ± 63 <sup>2)</sup>	371 ± 57 <sup>2)</sup>	525 ± 495 <sup>2)</sup>	245 ± 43 <sup>2)</sup>	412 ± 35 <sup>2)</sup>
模型对照	-	310 ± 44	289 ± 51	391 ± 28	175 ± 27	330 ± 47
左旋多巴	40	359 ± 45 <sup>1)</sup>	336 ± 376 <sup>1)</sup>	433 ± 45 <sup>1)</sup>	212 ± 40 <sup>1)</sup>	370 ± 43 <sup>1)</sup>
左旋多巴甲酯	20	357 ± 40 <sup>1)</sup>	3 326 ± 626	429 ± 36 <sup>1)</sup>	202 ± 52	367 ± 41
	40	367 ± 49 <sup>1)</sup>	347 ± 40 <sup>2)</sup>	456 ± 42 <sup>2)</sup>	230 ± 22 <sup>2)</sup>	376 ± 41 <sup>2)</sup>
	80	385 ± 47 <sup>2)</sup>	360 ± 380 <sup>2)</sup>	466 ± 34 <sup>2)</sup>	234 ± 23 <sup>2)</sup>	381 ± 35 <sup>2)</sup>

单眼剥夺和人工斜视的影响。这表明 NGF 在敏感期内参与了视觉系统的可塑性变化<sup>[6]</sup>。研究发现 NGF 可阻止斜视所造成的视皮质双眼细胞的减少,局部应用 NGF 可逆转弱视猫视皮质眼优势柱的偏移,改善弱视眼的视功能<sup>[7]</sup>。本实验结果显示在视觉发育的敏感期内,模型对照组与正常对照组比较,模型对照组内源性 NGF 免疫阳性细胞数量在各层均减少,两者有显著的差异 ( $P < 0.01$ ),这说明视觉环境的紊乱影响内源性 NGF 的产生,进一步证明 NGF 对视觉系统的发育起重要作用。

视皮层的发育、可塑性、视觉系统信息的传递和调控是由大量神经递质参与完成的<sup>[8]</sup>。多巴胺是其中一种重要的神经系统活性递质,也是视网膜内的主要神经递质。多巴胺可直接参与敏感期视皮层的发育,使发生早期类凋亡的视皮质神经元得到恢复或重塑,从而强化或延长视觉系统的敏感性和可塑性<sup>[9]</sup>。本实验显示,治疗后斜视性弱视视皮质神经元 NGF 的表达得到一定的恢复。说明左旋多巴甲酯治疗在一定程度上起到解除视皮质主动抑制的作用,使与斜视眼有关的视皮质部分对视觉刺激产生的兴奋性活动增强,从而促进了神经活动依赖性的 NGF 合成和释放。其可能的机制:①延长或重建人视觉系统敏感期。②降低视神经细胞的功能阈,提高其活性,减少中枢对弱视眼的抑制。左旋多巴是多巴胺的一种前体,能通过血脑屏障并在大脑内脱羧转化为多巴胺,通过中间神经元及其他递质发挥调节作用。左旋多巴甲酯结构上左旋多巴相似,其作用机制应该相似<sup>[10-11]</sup>。

本研究显示弱视发病与中枢神经系统发育和可塑性变化密切相关,敏感期内斜视性弱视模型对照组视皮质 17 区 NGF 的表达减弱,经左旋多巴及左旋多巴甲酯治疗后,NGF 表达明显增加,PVEP 中 P100 波波幅增高、潜伏期缩短。证实左旋多巴及左旋多巴甲酯降低神经细胞的功能阈值,恢复视觉系统的敏感性的效能,左旋多巴甲酯治疗组与阳性对

照组相比较,左旋多巴甲酯治疗组各层阳性细胞分布密度均比阳性对照组高,在一些层上具有统计学意义,显示其对弱视治疗作用的重要价值。

[参考文献]

[1] 彭彤. 神经生长因子生物学效应的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(3): 203.

[2] 邵立功. 弱视模型视觉神经系统的神经生长因子表达特征研究[J]. 海军总医院学报, 2006, 19(4): 212.

[3] 毛俊峰, 刘双珍, 秦文娟. 左旋多巴对豚鼠形觉剥夺性近视形成的影响[J]. 眼科研究, 2009, 27(4): 257.

[4] Hannila S S, Kawaja M D. Nerve growth factor mediated collateral sp routing of central sensory axons into deafferented of the dorsal hom is enhanced in the absence of the p75 neurotrophin in receptor [J]. Comp Neurol, 2005, 486 (4): 331.

[5] Shao Li-gong. Studies on the expression of NGF in the visual system of kitten amblyopia model [J]. J Naval Gen Hosp, 2006, 19(4): 212.

[6] 邵立功, 郭静秋. 不同时限单眼斜视和剥夺猫视觉系统的神经生长因子表达研究 [J]. 眼科, 2000, 9(3): 181.

[7] 邵立功, 郭静秋. 不同时限单眼斜视和剥夺模型猫视觉系统神经元的神经营养因子-3 表达机理研究 [J]. 中国斜视与小儿眼科杂志, 1999, 7(4): 175.

[8] Carmignoto G, Cane Ha R, Candeo P, et al. Effect of nerve growth factor on neuronal plasticity of the kitten visual cortex [J]. Physiol, 1993, 464: 343.

[9] Reis R A M, Ventura A M, Kubrusly R C, et al. Dopaminergic signaling in the developing retina [J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1): 181.

[10] 郑煜, 黎晓新, 牛兰俊. 左旋多巴对形觉剥夺性弱视猫视皮质 17 区神经生长因子的影响 [J]. 眼科研究, 2009, 27(11): 989.

[11] 于湛, 胡聪, 梁敏. 猫斜视性弱视治疗前后视皮质 17 区神经生长因子的表达 [J]. 中国实用眼科杂志, 2004, 22(3): 229.

[责任编辑 聂淑琴]