

# 左旋多巴对形觉剥夺性弱视猫视皮层 17 区神经生长因子的影响

郑煜 黎晓新 牛兰俊 于文贞 董建强

## Effects of levodopa on nerve growth factor in visual cortex of kitten

Zheng Yu, Li Xiaoxin, Niu Lanjun, Yu Wenzhen, Dong Jianqiang. Department of Ophthalmology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

**Abstract Objective** Nerve growth factor (NGF) is thought to be one of regulating factors of cellular function during the visual plasticity period. Levodopa is a neurotransmitter in central nerve system. Its mechanism of improving the visual function in amblyopia is unclear. Present study was to observe the role of levodopa in treating monocular deprived amblyopia and explore the effects of levodopa on the expression of NGF in visual cortex. **Methods** The animal models of monocular form deprived amblyopia were established in the right eyes of 12 4-week-old domestic cats by suturing the eyelid for 2 weeks and then the left eyes were reverse sutured. The 6 cats from models received 20 mg/kg of levodopa by oral administration. Other 6 normal cats were as normal controls. Pattern VEP (P-VEP) was recorded to check the visual acuity of the cats. The cell number density of NGF expression in visual cortex area 17 was detected and calculated by immunocytochemistry and expressed as positive number/field.

**Results** The amplitude of  $P_{100}$  of P-VEP was significantly declined in monocular deprived eyes compared with fellow eyes and normal eyes in 2 weeks after monocular deprivation ( $P < 0.01$ ). However, after administration of levodopa, the amplitude of  $P_{100}$  recovered to normal 2 weeks later, presenting a insignificant difference between levodopa treating group and normal group ( $P > 0.05$ ). The latency of  $P_{100}$  was followed the same pattern between two groups. The NGF positive cells were decreased in monocular deprived group compared with normal group and levodopa group ( $80.23 \pm 9.54$  vs  $111.83 \pm 7.49$ ,  $80.23 \pm 9.54$  vs  $118.06 \pm 12.37$ ,  $P < 0.01$ ), but no significant difference in NGF positive cells was found between normal group and levodopa group ( $111.83 \pm 7.49$  vs  $118.06 \pm 12.37$ ,  $P = 0.94$ ). **Conclusion** Levodopa is supposed to accelerate the recovery of visual function in amblyopic cat by enhancing the NGF expression in visual cortex area 17 during the critical period of visual development.

**Key words** levodopa; deprived amblyopia; nerve growth factor; visual cortex

**摘要 目的** 观察左旋多巴对猫形觉剥夺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** 18 只 4 周龄幼猫分为正常组、单眼剥夺组、左旋多巴组,每组 6 只。通过单眼眼睑缝合制备形觉剥夺弱视模型,观察不同干预条件下各组视觉诱发电位(P-VEP)的  $P_{100}$  波幅及波幅,应用免疫组织化学法测定各组视皮层 17 区 NGF 的差异。**结果** 单眼剥夺组剥夺眼  $P_{100}$  波幅延长,波幅降低,与正常组及对侧眼比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),左旋多巴组双眼 P-VEP 各指标与正常组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。剥夺组视皮层 NGF 免疫阳性细胞密度为  $80.23 \pm 9.54$ ,正常组为  $111.83 \pm 7.49$ ,2 组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );左旋多巴组为  $118.06 \pm 12.37$ ,与正常组比较差异无统计学意义( $P = 0.94$ )。**结论** 敏感期内剥夺性弱视幼猫视皮层 17 区 NGF 的表达减弱。左旋多巴干预治疗后,NGF 表达明显增加,弱视眼 P-VEP 明显改善,左旋多巴能促进实验猫弱视眼的视功能改善。

**关键词** 左旋多巴;形觉剥夺性弱视;神经生长因子;视皮层

**分类号** R 777.4<sup>4</sup> **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-0988-04

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(nerve growth factor, 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

猫视皮层眼优势柱的偏移,改善弱视眼的视功能<sup>[1]</sup>。中枢神经递质左旋多巴是近十多年来国内外临床较为关注的弱视新疗法,但其提高视功能的确切机制尚未明确,相关的基础研究报道少。本研究采用免疫组织化学法检测使用左旋多巴治疗形觉剥夺性弱视猫视皮层 17 区 NGF 表达的变化以及对视觉电生理的影响,探讨左旋多巴对弱视眼视功能的影响及治疗效果。

作者单位:100044 北京大学人民医院眼科〔郑煜,研究生,现在汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心 515041〕、黎晓新、牛兰俊、于文贞,实验室(董建强)

通讯作者:黎晓新 (Email: drlixiaoxin@yahoo.com.cn)

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康 4 周龄家猫 18 只(由北京 大学人民 医院实验动物中心提供),雌雄不限,体重 350 ~ 550 g。按随机数字表法随机分为正常组、单眼剥 夺组、左旋多巴组各 6 只。

**1.1.2 主要试剂及仪器** Anti-NGF 抗体(美国 Abcam 公司);Envision 免疫组织化学试剂盒(丹麦 Dako 公 司);DAB 显色试剂盒(北京中衫生物科技有限公 司);左旋多巴片(思利巴,中国)。Leica Qwin standard 图像 分析系统、石蜡切片机(美国 Leica 公司);Nikon 双 目自动照相显微镜(日本);RETIport32 视觉电生理 仪(德国罗兰公司)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的制备** 单眼剥夺组及左旋多巴组 幼猫均于速眠新麻醉下,一侧眼剪除上下睑缘皮肤各 1 ~ 1.5 mm,进行睑缘粘合术缝合 1 只眼,造成形觉剥 夺。所有手术幼猫均缝合右眼。3 组动物置于同等光 照环境下自然饲养。于 6 周龄时,单眼剥夺组和左旋 多巴组开放剥夺眼,视觉电生理确认弱视形成<sup>[2]</sup>。而 后反缝合对侧眼,模拟临床的常规遮盖治疗,继续喂养 至 8 周龄,左旋多巴组则在喂养中添加给予口服左旋 多巴每日 20 mg/kg。实验过程中动物的使用遵循 ARVO 标准。

**1.2.2 视觉诱发电位(pattern visual evoked potential, P-VEP)的记录** 应用罗兰电生理仪 RETIport32 系统 记录 P-VEP。麻醉下固定猫,调整受检眼,使视网膜中 央区对准视屏中央视标。采用棋盘反转刺激,距离 50 cm,刺激的空间频率 0.3 cpd,时间频率 1 Hz,记录 时间 300 ms,叠加 64 次。所有实验动 物分别测左右眼,第 6 周和第 8 周各 进行 1 次 P-VEP 记录。

**1.2.3 标本的制备及 NGF 免疫组织 化学染色** 动物饲养至 8 周龄,末次 记录 P-VEP 后,深度麻醉处死动物。 4% 多聚甲醛灌注,取剥夺眼同侧视皮 层 17 区部位脑组织固定,石蜡包埋、 切片。载玻片经防脱处理。切片常规 脱蜡,PBS 液漂洗。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温灭 活内源性酶,滴加正常山羊血清封闭 液室温孵育 20 min,去血清滴加稀释的兔抗猫 NGF 抗 体(1:2 000),4 ℃ 过夜。滴加生物素化二抗(用 Envision 试剂盒中的 ChemMateTME nVision +/HRP 工作

液)室温孵育 20 min。以上各步骤间均用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。DAB 室温显色,镜下控制显色时间, 水洗终止反应。苏木素复染,逐级乙醇脱水,二甲苯透 明,中性树脂封片。光镜下观察、摄像,并进行计算机 图像分析。

**1.2.4 免疫阳性细胞计数** 3 组内每只幼猫各选视 皮层 17 区连续切片 5 张,每张切片选 5 个视野。应用 图像分析系统 400 倍光镜视野下测定视皮层 17 区 NGF 的表达的数密度和阳性细胞比例,数密度用免疫 阳性细胞数/视野表示。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,测定结果 均以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组猫左右眼间(弱视模型眼与对照 眼)P-VEP P<sub>100</sub> 波振幅和隐含值的比较采用配对 *t* 检 验;3 个组干预后不同时间的 P<sub>100</sub> 波振幅和隐含值的总 体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验;各组视皮层 NGF 免疫阳性细胞率以百分 数表示,组间的比较采用  $\chi^2$  检验。*P* < 0.05 为差异有 统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 P-VEP P<sub>100</sub> 波振幅的变化

正常组波形规则,有明显波峰。单眼剥夺组、左旋 多巴组在形觉剥夺 2 周后,剥夺眼 P<sub>100</sub> 波振幅与对侧 眼及正常对照眼相比明显降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。开放剥夺眼 2 周后,单眼剥夺组原剥夺 眼 P<sub>100</sub> 波振幅有所升高,但仍低于对侧眼及正常对照 眼,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。而左旋多巴组原 剥夺眼 P<sub>100</sub> 波振幅恢复明显,与正常对照组及对侧眼 比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)(表 1)。

表 1 3 个组猫 P<sub>100</sub> 波振幅值比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The comparison of amplitude of P<sub>100</sub> among 3 groups( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Amplitude of P <sub>100</sub> at 6-week kittens		t	P	Amplitude of P <sub>100</sub> at 8-weeks kittens		t	P
		Right eyes	Left eyes			Right eyes	Left eyes		
Normal	6	10.12 ± 2.00	10.77 ± 1.60	-0.54	0.3	14.90 ± 3.22	13.88 ± 1.94	0.70	0.25
MD	6	7.84 ± 2.22 <sup>c</sup>	9.15 ± 2.14	-2.22	0.02	9.18 ± 2.52 <sup>f</sup>	14.31 ± 2.93	-2.38	0.03
Levodopa	6	7.93 ± 2.74 <sup>c</sup>	11.15 ± 2.27	2.24	0.03	13.35 ± 4.60	14.45 ± 3.39	-0.45	0.32
F		6.10				6.43			
P		0.01				0.01			

<sup>c</sup>*P* < 0.01 vs 6 weeks normal group, <sup>f</sup>*P* < 0.01 vs 8 weeks normal group (Paired *t* test, One-way ANOVA, LSD-*t* test)

### 2.2 各组 P<sub>100</sub> 波隐含值的变化

6 周龄时单眼剥夺组与左旋多巴组的剥夺眼 P<sub>100</sub> 波隐含值较对侧正常眼或正常组明显延长,差异有统

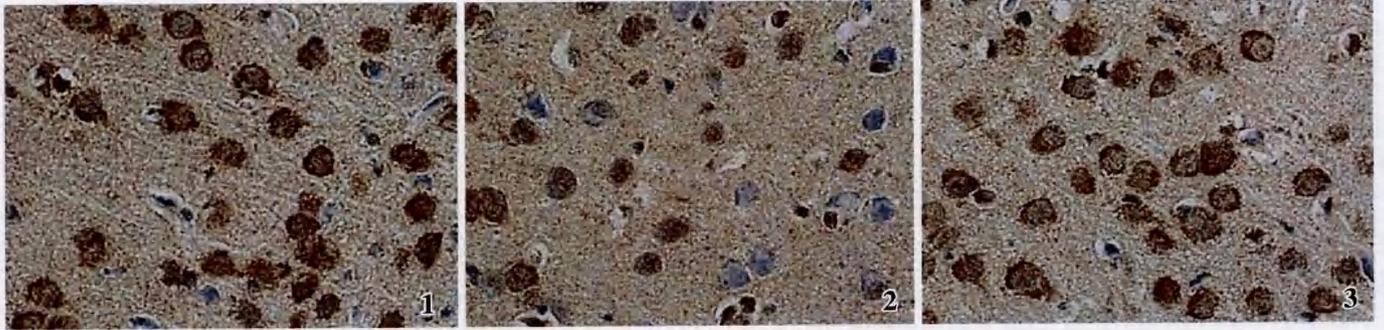


图1 正常组视皮层 17 区 NGF 免疫组织化学染色 (×400) 图2 形觉剥夺组视皮层 17 区 NGF 免疫组织化学染色 (×400)  
图3 左旋多巴组视皮层 17 区 NGF 免疫组织化学染色 (×400)

Fig. 1 Immunohistochemical staining of visual cortex in normal kitten shows the positive response for NGF (×400) Fig. 2 Immunohistochemical staining of visual cortex in monocular deprived kitten shows fewer brown staining cells, indicating NGF is obviously decreased in comparison with normal kitten (×400) Fig. 3 Immunohistochemical staining of visual cortex in levodopa treating kitten shows the NGF is expressed in most cells (×400)

计学意义 ( $P < 0.01$ )。开放剥夺眼 2 周后, 2 组  $P_{100}$  波隐含值缩短, 但单眼剥夺组弱视眼仍较正常组或左旋多巴组原剥夺眼  $P_{100}$  波隐含值延长, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

表 2 3 组猫的  $P_{100}$  波隐含值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The comparison of latency of  $P_{100}$  among 3 groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Latency of $P_{100}$ at 6-week kittens			t	P	Latency of $P_{100}$ at 8-week kittens			t	P
		Right eyes	Left eyes				Right eyes	Left eyes			
Normal	6	88.16 ± 4.07	87.00 ± 4.29	0.36	0.36	81.00 ± 3.35	82.67 ± 5.92	-0.88	0.20		
MD	6	95.50 ± 5.54 <sup>b</sup>	88.00 ± 6.48	2.15	0.03	89.08 ± 1.43 <sup>c</sup>	82.30 ± 1.43	4.36	0.003		
Levodopa	6	96.50 ± 5.28 <sup>b</sup>	88.33 ± 2.94	-2.75	0.02	80.83 ± 6.43	80.16 ± 7.90	0.18	0.42		
F		4.96				7.33					
P		0.02				0.00					

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs 6 weeks normal group, <sup>c</sup>  $P < 0.01$  vs 8 weeks normal group (Paired t test, One-way ANOVA, LSD-t test)

2.3 NGF 免疫组织化学结果

各组视皮层切片光镜下可见 NGF 免疫阳性蛋白存在于视皮层 17 区 II ~ VI 层。NGF 免疫阳性细胞呈棕褐色, 胞核、胞浆均着色, 神经突触近端着色 (图 1 ~ 3)。光镜下可见单眼剥夺组视皮层 17 区 NGF 免疫阳性细胞着色淡, 阳性神经元数目 ( $80.23 \pm 9.54$ ) 及比例均较正常组 ( $111.83 \pm 7.49$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ ), 左旋多巴组 NGF 阳性细胞密度 ( $118.06 \pm 12.37$ ) 与正常组比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.94$ ) (表 3)。

表 3 各组视皮层 NGF 免疫阳性细胞率比较 (%)

Table 3 The positive rate of immunoreactive cells for NGF in visual cortex in 3 groups (%)

Group	n	Immunoreactive rate
Normal	6	64.27
MD	6	48.04 <sup>c</sup>
Levodopa	6	63.47 <sup>d</sup>

$\chi^2 = 8.73$ , <sup>c</sup>  $P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 0.005$ , <sup>d</sup>  $P = 0.94$  vs normal group ( $\chi^2$  test)

3 讨论

视皮层的发育、可塑性调节、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。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, 在视网膜和视皮层中含量较高, 主要存在于无长突细胞及内网层中。在视皮层 17 区存在着多巴胺通路, 可直接参与敏感期视皮层的发育, 也可以介导调节某些受体的活性, 使发生早期类凋亡的视皮层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>[3]</sup>。视觉可塑性、敏感度、色觉、

视力等均受到多巴胺的影响。多巴胺可影响水平细胞感受野的特性以及水平细胞间的缝隙连接, 改变节细胞的反应, 并影响视锥和视杆细胞的光适应活动, 参与脑的视成像过程, 在视觉发育中起着重要作用<sup>[4]</sup>。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, 口服吸收后能通过血-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 (如儿茶酚胺等) 发挥调节作用。研究指出左旋多巴可以增强神经兴奋性, 解除、缓解或降低对弱视眼的皮质抑制, 逐渐增强弱视眼的视觉功能。P-VEP 是基础研究中用于探讨弱视机制及观察药物疗效的重要指标<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, 左旋多巴组弱视眼  $P_{100}$  波波幅增高、隐含值缩短, 与对侧眼及正常组相比, 差异均无统计学意义。而剥夺组经开放弱视眼, 并反缝合对侧眼治疗, 虽然其  $P_{100}$  波波幅及隐含值

有所改善,但与对侧眼及正常组相比,差异仍有统计学意义。P-VEP 的变化提示联合左旋多巴治疗后,升高了视觉系统多巴胺的含量<sup>[5-6]</sup>,改善视皮层对视觉信号的敏感性,提高了视皮层神经元活性。由于视神经细胞的功能阈降低、活性增强,中枢对弱视眼的抑制减少,因此能促进弱视眼的视功能恢复,显示左旋多巴对弱视治疗有重要价值。

NGF 广泛存在于神经组织和周围靶组织,是调节神经元生长、支持神经元存活,促进其分化和维持功能的一种生物活性因子。在视觉系统发育、调控及延长视皮层神经元可塑期起着重要的作用。可促进神经细胞的存活、增生、分化、成熟及功能表达,并按特定的时空顺序作用于相应的神经细胞群,发挥其神经营养作用<sup>[6-7]</sup>。NGF 作用于前脑基部的胆碱能神经,这种胆碱能神经能发出纤维投射至视皮层而控制视皮层神经元的神经活动,是维持外侧膝状体、视皮层投射系统的解剖发育及生理功能的关键因子<sup>[8]</sup>。研究显示脑室灌注 NGF 后,可阻断单眼剥夺后眼优势柱的移动效应,影响发育过程中眼优势柱的形成,并延长眼优势柱的可塑性关键期<sup>[9-10]</sup>。Carmignoto 等<sup>[13]</sup>对视觉发育关键期内单眼视觉剥夺弱视猫,使用微泵将 NGF 注入侧脑室,经细胞内记录发现视皮层 17 区神经元经 NGF 处置后,其眼优势柱与正常对照组比较无差异,外侧膝状体视觉剥夺眼输入层神经元也未见皱缩,认为 NGF 可诱导单眼剥夺弱视幼猫视皮层的眼优势塑性变化、拮抗剥夺效应。在视觉系统起着调节经验依赖性突触的连接和修饰及对视皮层投射系统的发育、维持正常生理功能均具有重要作用<sup>[11]</sup>。本研究应用免疫组织化学技术对敏感期内剥夺组、左旋多巴组与正常组视觉系统内源性 NGF 变化进行检测,结果显示:敏感期内剥夺组视觉系统 NGF 免疫阳性细胞数量较正常组明显减少,差异有统计学意义;左旋多巴组与正常组比较差异无统计学意义。剥夺组 NGF 免疫阳性细胞数量减少,这说明视环境的紊乱导致视觉系统三级神经元及其突触机能低下,丧失或削弱了 NGF 对视觉系统平衡发育的调节和趋化作用,影响了内源性 NGF 的产生。也进一步证明 NGF 对视觉系统的发育和可塑性调节起重要作用。从实验动物自身 NGF 的变化及视环境紊乱对 NGF 的产生及对突触生长的趋化生物效应的影响,显示 NGF 在敏感期对视觉系统发育具有参与及诱导其调节可塑性变化的重要作用;左旋多巴组视皮层神经元 NGF 的表达得到一定的恢复,提示左旋多巴在一定程度上起到解除视皮层主动抑制的作用,使弱视眼相关的视皮层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。这可能是左旋多巴治疗弱视的作用机制之一。

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,敏感期内剥夺性弱视视皮层 17 区 NGF 的表达减弱,经左旋多巴治疗,NGF 表达明显增加,P-VEP 中 P<sub>1</sub>波波幅增高、潜伏期缩短。证实了左旋多巴降低神经细胞的功能阈值,恢复视觉系统的敏感性的效能,显示了其对弱视治疗不可忽视的作用。NGF 作为一种调控神经细胞功能的生物活性因子,在视觉系统发育及可塑性调节方面有着重要的作用。

## 参考文献

- 1 Fiorentini A, Berardi N, Maffei L. Nerve growth factor preserves behavioral visual acuity in monocularly deprived kittens [J]. *Vis Neurosci*, 1995, 12: 51 - 55
- 2 Schmidt KE, Singer W, Galuske RA. Processing deficits in primary visual cortex of amblyopic cats [J]. *J Neurophysiol*, 2004, 91 (4): 1661 - 1671
- 3 Mohan K, Dhankar V, Sharma A. Visual acuities after levodopa administration in amblyopia [J]. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2001, 38 (2): 62 - 67
- 4 Crewther SG, Crewther DP. Amblyopia and suppression in binocular cortical neurones of strabismic cat [J]. *Neuroreport*, 1993, 4: 1083
- 5 吴小影,刘德林,罗瑜琳,等.左旋多巴对形觉剥夺性弱视鼠 VEP 及视网膜多巴胺含量的影响[J]. *眼科研究*, 2009, 27: 549 - 553
- 6 毛俊峰,刘双珍,秦文娟,等.左旋多巴对豚鼠形觉剥夺近视形成的影响[J]. *眼科研究*, 2009, 27: 257 - 260
- 7 Hannila SS, Kawaja MD. Nerve growth factor-mediated collateral sprouting of central sensory axons into deafferented of the dorsal horn is enhanced in the absence of the p75 neurotrophin in receptor [J]. *Comp Neurol*, 2005, 486 (4): 331 - 343
- 8 Starkey GD, Petratos S, Shipham KA, et al. Neurotrophin receptor expression and responsiveness by postnatal cerebral oligodendroglia [J]. *Neuroreport*, 2001, 12 (18): 4081 - 4086
- 9 Tu S, Debski EA. Neurotrophins, but not depolarization, regulate substance P expression in the developing optic tectum [J]. *J Neurobiol*, 2001, 48 (2): 131 - 149
- 10 Berrardi N, Cellerino A, Domenici L, et al. Monoclonal antibodies to nerve growth factor affect the postnatal development of the visual system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (2): 684 - 688
- 11 Domenici L, Fontanesi G, Cattaneo A, et al. Nerve growth factor (NGF) uptake and transport following injection in the developing rat visual cortex [J]. *Vision Neurosci*, 1994, 11: 1093
- 12 Lodovichi C, Berardi N, Pizzorusso T, et al. Effects of neurotrophins on cortical plasticity: same or different [J]? *J Neurosci*, 2000, 20 (6): 2155 - 2165
- 13 Carmignoto G, CaneHa R, Candeo P, et al. Effect of nerve growth factor on neuronal plasticity of the kitten visual cortex [J]. *J Physiol*, 1993, 464: 343 - 360

(收稿:2008-12-17 修回:2009-09-30)

(本文编辑:尹卫靖)