维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2004)06-0784-02

# 单眼视觉剥夺大鼠视网膜细胞色素氧化酶的活性变化

鄢秀菊,刘 刚,周兰新

(重庆医科大学第二临床学院眼科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究单眼剥夺大鼠视网膜细胞色素氧化酶(CO)的活性变化。方法:2 周龄大鼠行单眼睑缘黏合,制作单眼视觉剥夺动物模型;DAB 法观察大鼠视网膜铺片的组织化学反应情况,光学显微镜下分四个象限计数高、中、低 CO 活性视网膜节细胞数,间接反应视网膜细胞 CO 活性变化。结果:视网膜 CO 阳性细胞数在剥夺眼与非剥夺眼之间存在显著差异($P<0.01$);非剥夺眼与正常对照组两眼间差异无显著性($P>0.05$)。结论:在视觉发育敏感期内单眼剥夺,可造成大鼠剥夺眼视网膜 CO 阳性节细胞数下降;提示剥夺性弱视可能存在视网膜的异常。

【关键词】弱视;视觉剥夺;细胞色素氧化酶

【中国图书分类法分类号】R774.1+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-02-13

## Change of cytochrome oxidase activity in retina of monocular deprived rats

*YAN Xiuju, et al*

(*Department of Ophthalmology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the changes of cytochrome oxidase (CO) activity in retina of monocular deprived rats. *Methods*: Deprived amblyopia rat model were established by suturing the eyelids of observed eye of 14 days old rats for one month. The retina stretched preparation were processed with CO histochemical reaction and the number of CO positive retina ganglion cells were studied under light microscope. *Results*: The number of CO positive retina ganglion cells decreased in deprived eyes compared with control eyes ($P<0.01$). *Conclusion*: During the developmental sensitive period of visual system, monocular depriving could induce the decrease of the number of CO positive retina ganglion cells of the deprived eye of rats.

【Key words】Amblyopia; Visual deprivation; Cytochrome oxidase

弱视主要是在视觉发育敏感期内,由于各种影响视觉发育的眼病和/或视环境的不良,使双眼视长期紊乱,导致视觉系统神经元功能、形态和神经生化机制异常。其确切病机和病损至今仍不十分清楚。弱视存在视中枢损害的结果屡见报道,并得到组织学证实[1]。但是弱视眼是否存在视网膜损害一直是一个有争论的问题。有关剥夺性弱视的视网膜形态学及组织学方面的研究鲜有报道。本实验旨在应用细胞色素氧化酶组织化学技术来观察弱视眼的视网膜神经节细胞中细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase,CO)的活性变化情况,从而了解视觉剥夺对视网膜神经元功能的影响。

## 1 材料和方法

作者介绍:鄢秀菊(1955- ),女,主任医师,副教授,主要研究方向:斜弱视的发病机理及治疗。

### 1.1 动物与试剂

健康 14 日龄 Wastar 大鼠 28 只,雌雄不限,由本校实验动物中心提供。

主要试剂细胞色素 C 及 DAB 为 Sigma 公司产品

### 1.2 动物模型的建立

动物随机分为两组:正常组与单眼剥夺组各 14 只。剥夺组经 1% 戊巴比妥钠液腹腔麻醉后严格消毒,进行睑缘黏合术缝合一眼,上下睑黏连造成视觉剥夺。剥夺眼别:右眼。两组动物分别在同等自然光照环境下饲养至 45 日龄

### 1.3 标本制备

动物在 1% 戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉下,打开胸腔暴露心脏和升主动脉,以 12 号针头左心室穿刺,输液式灌注生理盐水约 150ml,4% 多聚甲醛 PBS(0.1mol/L,pH 7.4)约 250ml 经心灌注固定。球结膜标记后摘取双眼球,4% 蔗糖磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗,剪去角膜,小心剥取整个视网膜,在 12 点、3 点、6 点、9 点处各剪一小口,划分四个象限。小心清除残余的玻璃体,稍干后作细胞色素氧化酶反应。

### 1.4 组织化学反应

反应步骤[2]为:0.1mol Tris-盐酸缓冲液(pH 7.4)漂洗

维普资讯 http://www.cqvip.com



2 次;0.3% 氯化钴 Tris－盐酸缓冲液(pH 7.4)预浸;0.1 mol Tris－盐酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 2 次;0.1 mol 蔗糖磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗 2 次;入孵育液中约 40min;0.1 mol 磷酸缓冲液(4℃)漂洗 2 次,终止反应。装片、干燥、封片。孵育液配方为:0.1 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液 90ml,细胞色素 C30mg,DAB50mg,蔗糖 4g。

1.5 观察指标

光学显微镜下观察大鼠的组织化学反应情况。参照文献方法[2]计数各象限高、中、低 CO 活性节细胞密度。

## 2 结 果

### 2.1 大鼠视网膜节细胞 CO 组织化学反应

大鼠视网膜呈淡黄半透明,CO 组化反应后呈灰黑色,视网膜血管走行清晰,可见视网膜神经纤维束由周边呈放射状向视乳头集中。低倍镜下 CO 活性节细胞分布不均匀,视网膜中央较周边多,鼻、颞侧未见明显差异;高倍镜下见 CO 活性节细胞多为多角形,大小不一,胞浆内显示灰黑色的 CO 反应产物,胞核居中,不显色,部分节细胞的突起显 CO 反应。

### 2.2 大鼠视网膜 CO 活性节细胞密度

正常组及单眼剥夺组大鼠视网膜的四个象限 CO 活性节细胞平均密度及标准差见表 1。正常组与剥夺组对应象限视网膜 CO 活性节细胞平均密度双眼间行配对 $t$ 检验;剥夺组大鼠非剥夺眼分别与正常组两眼间比较,采用成组 $t$ 检验。结果发现:正常组视网膜各象限左、右眼差异均无显著性($P>0.05$);剥夺组颞上、颞下、鼻下象限双眼间差异有显著性($P<0.01$),鼻上象限双眼无显著性差异($P>0.05$)。剥夺组非剥夺眼分别与正常组双眼比较,各象限均无显著性差异($P>0.05$)。

### 2.3 视网膜高 CO 活性节细胞密度

两组大鼠视网膜的四个象限高 CO 活性节细胞平均密度及标准差见表 2。结果发现:正常组双眼间及与剥夺组非剥夺眼之间各象限均无显著差异($P>0.05$);剥夺组剥夺眼与非剥夺眼之间均有显著差异($P<0.01$)。

**表 1 正常及单眼剥夺组大鼠视网膜 CO 活性节细胞密度(个/mm²)**

| 视网膜分区 | 正常组 | | | 剥夺组 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 左眼($n=14$) | 右眼($n=14$) | $P$ 值 | 左眼($n=14$) | 右眼($n=14$) | $P$ 值 |
| 颞上 | 9.15±1.03 | 9.14±1.20 | $P>0.05$ | 9.10±1.09 | 7.78±1.22 | $P<0.01$* |
| 颞下 | 9.14±1.17 | 9.14±0.98 | $P>0.05$ | 9.13±1.15 | 7.01±1.14 | $P<0.01$ |
| 鼻上 | 8.98±1.01 | 9.01±1.03 | $P>0.05$ | 8.87±1.16 | 8.63±0.99 | $P>0.05$* |
| 鼻下 | 9.04±1.04 | 9.03±1.12 | $P>0.05$ | 8.99±0.95 | 7.09±1.00 | $P<0.01$* |

注:* 为剥夺组非剥夺眼与与正常组双眼相比较 $P>0.05$

**表 2 正常及单眼剥夺组大鼠视网膜 CO 活性节细胞密度(个/mm²)**

| 视网膜分区 | 正常组 | | | 剥夺组 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 左眼($n=14$) | 右眼($n=14$) | $P$ 值 | 左眼($n=14$) | 右眼($n=14$) | $P$ 值 |
| 颞上 | 3.31±0.76 | 3.38±0.71 | $P>0.05$ | 3.40±0.79 | 2.61±0.57 | $P<0.01$* |
| 颞下 | 3.58±0.81 | 3.55±0.79 | $P>0.05$ | 3.60±0.82 | 2.63±0.54 | $P<0.01$* |
| 鼻上 | 3.30±0.83 | 3.28±0.82 | $P>0.05$ | 3.29±0.83 | 1.87±0.62 | $P<0.01$ |
| 鼻下 | 3.09±0.72 | 3.10±0.69 | $P>0.05$ | 3.11±0.75 | 2.42±0.58 | $P<0.01$* |

注:* 为剥夺组非剥夺眼与与正常组双眼相比较 $P>0.05$

## 3 讨 论

细胞色素氧化酶作为电子传递链的末端酶,它可催化还原型细胞色素 C 氧化,区域性 CO 活性反映了局部组织能量代谢变化,这种变化与神经元的功能密切相关。已经证实,局部结构的 CO 活性高低与此处的功能活性程度正相关,与用组织化学方法显示的 $Na^+$—$K^+$—ATP 酶活性一致。因此,CO 的水平可间接反映神经元的功能状态。近年,国内外研究者用 CO 法研究视网膜,取得了令人满意的效果[3,4]。

弱视是小儿眼科领域内受到广泛关注的一个问题,但是,其确切病机和病损至今仍不十分清楚。多年来人们一直在临床和基础从不同的角度进行研究。近年来,研究者更倾向于应用免疫组化分子生物学等技术在更深层次了解弱视的神经系统变化,从而使得弱视的发病机理逐渐明朗化。(下转第 794 页)

维普资讯 http://www.cqvip.co



原过敏,尤其是对螨、灰尘、早春花粉、夏季花粉和晚秋花粉的过敏性较高。66 例哮喘患者中,58 例均对不同类型的吸入性变应原过敏,其中有 22 例同时对食入性变应原也过敏,这与重庆地区的地理环境和人民生活条件的改善分不开,重庆地区属亚热带地区,常年平均气温较高,适宜螨虫及花草等生长,加上人们生活水平日益提高,食入异体蛋白的种类逐渐增加,为过敏体质的人群发生变态反应性疾病提供了基础。同时,通过该研究我们可以为每一个患者制定相应的脱敏治疗方案,对食入性变应原过敏者应尽量避免食入相应的食物,预防和减少支气管哮喘的发作,最后达到治愈的目的。

本研究还作了支气管哮喘患者对两类变应原阳性分布的分析,发现支气管哮喘患者对吸入性变应原常常以 2～3 种过敏为主,而对食入性变应原以单种过敏多见,两者之间差异具有显著性,且对食入性变应原过敏者均伴有吸入性变应原过敏,这提示我们在日常生活中如果发现哮喘患者对一种变应原过敏,最好不要轻易放弃其它过敏原的寻找,应该到医院进行过敏原皮试,便于确定过敏原的种类,有利于制定相应的治疗方案。

## 参 考 文 献

[1] 孙宝清,赖克方,李靖,等.广州地区支气管哮喘患者常见吸入过敏原调查分析[J].中华微生物和免疫学杂志,2001;21(4):46－47.

[2] 中华医学会呼吸病分会哮喘学组.慢性支气管炎临床诊断及疗效判断标准[J].中华结核和呼吸杂志,1980;3(1):61.

[3] 中华医学会呼吸病分会.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗、疗效判断标准及教育和管理方案)[J].中华结核和呼吸杂志,1997;20(5):261－263.

[4] 叶任高,陆再英.实用内科学[M].北京:人民卫生出版社,2001(5 版):32－41.

[5] 张 庆,刑志俐,田 伟.晚发老年哮喘患者皮肤过敏原试验和血清 IgE 水平测定分析[J].中华实用医学,2002;4(6):1－2.

(上接第 785 页)上世纪 60 年代基于 Hubel 与 Wiesel 的经典视觉研究工作,学术界认为"弱视的病变位于视中枢"。弱视眼是否存在视网膜损害一直是一个有争论的问题。

冯蕴伟[5]等对 60 例弱视儿童进行检查,发现弱视眼黄斑光敏感度(macular light sensitivity, MLS)下降,并发现有相对性传入性瞳孔缺陷(RAPD)的存在;MLS 的降低反应了视锥细胞及其 X 型神经节细胞介导的 X 神经通道的障碍;而 RAPD 也提示视网膜水平的损害部位可能在视网膜 X 型神经节细胞及其轴突水平。用多焦视网膜电图(m－ERG)对单眼性弱视视网膜损害进行研究[6],结果 9 例单眼弱视的患者,以自身对侧非弱视眼为对照,其 m－ERG 表现为:二阶 kernel 反应的 1 环的振幅密度明显低于对侧眼,2～5 环的振幅密度值与对侧眼无差异,一阶 kernel 反应的各环的振幅密度与对侧眼无差异,一、二阶 kernel 反应的各环的峰潜时与对侧眼均无差异;以上结果提示视网膜感光细胞层无明显受损,视网膜内层及神经节细胞层有异常改变。

本实验发现:在大鼠视觉发育敏感期内,行睑缘黏合,造成单眼视觉剥夺,可引起大鼠剥夺眼视网膜 CO 阳性节细胞数减少。这提示:形觉剥夺性弱视的病变不只是位于视觉中枢,在视网膜水平也有损害,与视觉电生理的研究结果一致。视网膜的异常改变在剥夺性弱视发病中的作用,以及这种改变与视觉中枢受损的关系尚有待进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] Von Nooden GK, Granford ML. The lateral geniculeus in human strabismic amblyopia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992;33:2729.

[2] 贾莉君,蒋幼芹,吴振中,等.急性高眼压致大鼠视网膜节细胞细胞色素氧化酶活性降低[J].眼科研究,1995;13(4):228－231.

[3] Siskova A, Wilhelm J. The effects of hyperoxia, hypoxia, and ischemia/reperfusion on the activity of cytochrome oxidase from the rat retina[J]. Physiol Res, 2001;50(3):267－273.

[4] Wang AG, Lee CM, Wang YC, et al. Up—regUlation of cytochrome oxidase in the retina folowing optic nerve injury[J]. Exp Eye Res, 2002;74(5):651－659.

[5] 冯蕴伟,李维业,刘玉华.儿童弱视黄斑阈值和瞳孔传入功能的研究[J].中华眼科杂志,1997;33(2):113－116.

[6] 杨 蕾,严 良,陆 豪.单眼弱视多焦视网膜电图的初步研究[J].眼科新进展,2002;22(4):256－258.