DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.021
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0561-04

论著

斜视性弱视猫视中枢神经元细胞色素氧化酶活性变化

郑 汉,阴正勤,伍宛苏 (第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038)

提 要:目的 观察斜视对猫外侧膝状体神经元和视皮层神经元发育的影响。方法 采用细胞色素氧化酶技术,测定斜视猫外侧膝状体各投射层细胞及视皮层第Ⅳ细胞层细胞的细胞色素氧化酶活性,了解其功能与形态学的关系。结果 3只斜视猫斜视眼投射到同侧外侧膝状体A_1层细胞的细胞色素氧化酶活性降低,而投射到对侧外侧膝状体A层细胞的酶活性未见降低;斜视猫双侧视皮层17区第Ⅳ层发生交替柱状酶活性未见降低。结论 在视觉发育可塑性敏感期内产生的斜视性弱视损害了外侧膝状体和视皮层17区Ⅳ层神经元的功能。

关键词:斜视;猫;外侧膝状体;视皮层;细胞色素氧化酶
中图法分类号:R345.99;R777.41 文献标识码:A

Change of cytochrome oxidase activity in neurons of the central nervous system in strabismic amblyopic cats

ZHENG Han, YIN Zheng-qin, WU Wan-su (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of strabismus on the development of the neurons in lateral geniculate nuclei (LGN) and visual cortex in cats. Methods The activity of cytochrome oxidase of the neurons in projecting lamina A and A_1 of LGN and of the lamina Ⅳ of visual cortex was studied with histochemical technique in strabismic amblyopia cats. Results The cytochrome oxidase activity in the neurons of lamina A_1 of the ipsilateral projecting side of LGN was decreased and no change was found in the contralateral projecting side. In the neurons of lamina Ⅳ cells of area 17 in 2 sides of visual cortex, the activity of cytochrome oxidase was decreased due to the change of the dark and light reactive columns. Conclusion Our findings suggest that the artificial squint during the postnatal development of visual sensitivity can affect the cytochrome oxidase activity in the neurons of LGN and visual cortex.

Key words: strabismus; cat; lateral geniculate nuclei; visual cortex; cytochrome oxidase

目前儿童弱视的发病率在国外报道为2%~2.4%,国内报道为2%~4%,少数地区还高于此数,因此弱视是目前小儿眼科领域内广泛关注的一个问题。而临床上斜视性弱视又占弱视的大多数,但斜视性弱视的发病机制目前尚不完全清楚。本实验旨在应用细胞色素氧化酶组织化学技术来观察视中枢斜视眼相关投射层细胞的功能状况,从而了解其形态学特征。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

选用市售家猫,生后3~4周龄,雌雄兼用。主要试剂细胞色素C及DAB为Sigma公司产品。

1.2 斜视猫模型制备

幼猫10只,生后3~4周在3%戊巴比妥钠全麻下(30~40 mg/kg)行左眼外直肌及上下斜肌剪断术,造成其内斜。同龄对照猫5只一起人工饲养6~12个月。取材前运用Sherman照像法测得成年猫的水平斜视度为10~35°垂直斜视度为5~10°。

1.3 验猫外侧膝状体及视皮层17区的取材

成年猫行过量3%戊巴比妥钠(80 mg/kg)深度全麻,剪开胸腔经心尖穿刺行心脏灌注全身固定,灌注液顺序为0.1%肝素的平衡液700 ml;1%多聚甲醛0.25%戊二醛0.1 mol/L pH 7.4的磷酸缓冲液1 000 ml;5%葡萄糖500 ml;灌注温度均为35℃。灌注完毕后立即开眶取出双眼球待用,开颅取出左右半球;剥出外膝体,分离17区置同一固定液中后固定2 h,再放入20%蔗糖的0.1 mol/L pH 7.4磷酸缓冲液中待用。

1.4 组织化学反应

备用的外膝体及17区组织以新鲜配制的0.1 mol/L pH 7.4

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770258)
作者简介:郑 汉(1963-),男,湖北省广水市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事斜弱视、白内障方面的研究。电话:(023)68754000-73083
收稿日期:2000-01-24;修回日期:2000-05-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

磷酸缓冲液反复冲洗，振荡组织切片，片厚 100 μm。将切片在暗室环境下37 ℃细胞色素C孵育液中孵育 1～2 h。每隔30 min检查1次切片反应情况，当切片出现清晰的深浅对比反应带时即终止其反应，用 0.1 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液冲洗 3 次，装片、干燥、封片。孵育液的配方为：0.1 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液 90 ml，细胞色素 C 15～30 mg，DAB 50 mg，蔗糖 4 g，过氧化氢酶 20 μg/ml。

1.5 观察指标

我们观察了3只斜视猫及1只正常猫的外膝体及17区的组织化学反应情况。

1.5.1 外膝体 猫的外膝体分为A、A_1及C三层，A层接受对侧视网膜的投射，A_1层接受同侧视网膜的投射，C层为综合投射。我们通过观察A层及A_1层细胞的细胞色素氧化酶成色反应产物的密度情况来判断A层及A_1层细胞的功能情况。

1.5.2 17区的观察 视皮层17区共有六层细胞，其中第Ⅳ细胞层是接受外膝体纤维投射的主要细胞层，我们观察该层细胞的细胞色素氧化酶反应产物密度情况。

2 结果

2.1 外膝体

①正常猫双侧外膝体A层与A_1层细胞色素氧化酶反应产物密度均匀一致，见图1。②斜视猫同侧（左侧）投射层A_1层的反应产物密度较其上方的A层（接受健眼投射层）有明显的减弱现象，见图2。③对侧外膝体A层未见反应产物密度下降，见图3。

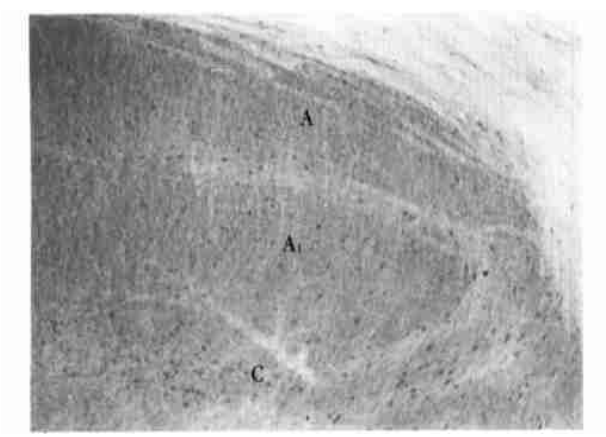


图1 正常猫左侧外膝体细胞色素氧化酶活性情况
A层与A_1及C层反应物均匀一致

Fig 1 Cytochrome oxidase activity of LGN in normal cat
The products in lamina A and lamina A_1 were well-distributed

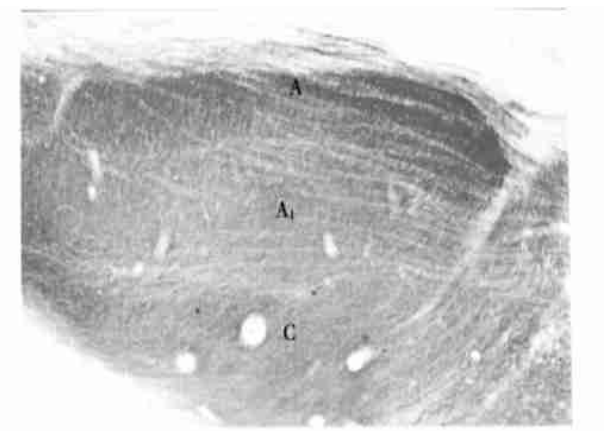


图2 斜视猫左侧外膝体细胞色素氧化酶活性情况
A_1层活性明显降低，A及C层未见降低

Fig 2 Cytochrome oxidase activity of left LGN in strabismic amblyopic cat
The activity in lamina A_1 decreased

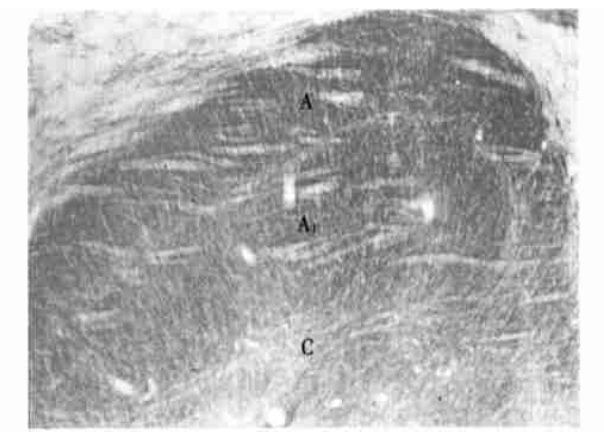


图3 斜视猫右侧外膝体细胞色素氧化酶活性情况
A层与A_1层活性基本一致，C层未见降低

Fig 3 Cytochrome oxidase acitivity of right LGN in strabismic amblyopic cat
The activity in lamina A and lamina A_1 were alinost consistent

2.2 视皮层17区

正常猫的双侧视皮层17区可以看到第Ⅳ层细胞连贯致密的细胞色素氧化酶反应产物带，见图4。斜视猫中观察到这种反应带不连贯，且有深浅相间的现象，见图5。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

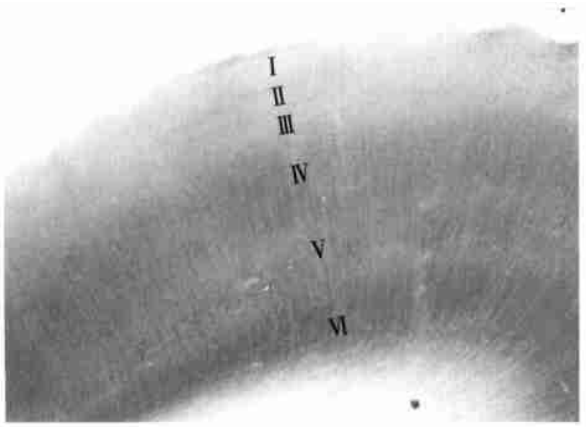


图 4　正常猫视皮层 17 区细胞色素氧化酶活性情况
第Ⅳ层细胞及第Ⅵ层细胞的反应产物呈一条均匀致密的连续带, 其余各层反应产物较稀疏

Fig 4　Cytochrome oxidase acitivity in area 17 of visual cortex of normal cat
The products in lamina Ⅳ were seen as a continuous, well-distributed

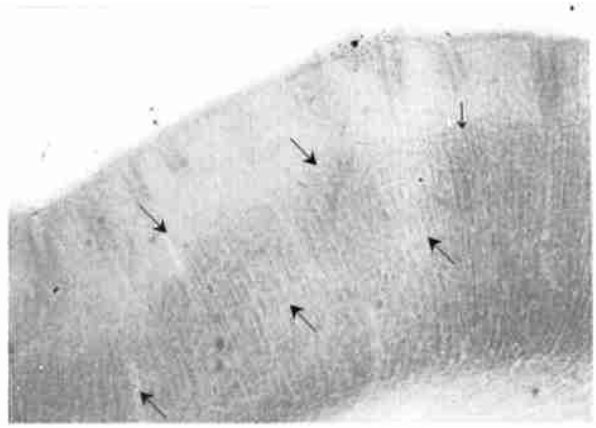


图 5　斜视猫视皮层 17 区细胞色素氧化酶活性情况
第Ⅳ层细胞的反应产物带变得不连贯, 被明暗交替的反应柱(如箭头所示)所代替

Fig 5　Cytochrome oxidase activity in area 17 of visual cortex of strabismic amblyopic cat
Products in Ⅳ was discontinous and replaced by dark and light reactive cloumns

3　讨论

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"。斜视对视觉系统神经元的损害在电生理研究领域已被广泛证实[1~3]。这些功能改变的结构基础却不清楚。斜视的形态学研究方面: Lowel[4] 1994 年运用^{3}H-脯氨酸标记法观察到了斜视猫 17 区眼优势柱变窄。Tychsen[5] 1996 年发现斜视猫视皮层第Ⅳ细胞层电生理及细胞色素氧化酶功能下降。Horton[6] 1996 年在 1 例 79 岁的自幼调节性内斜视的人尸检中运用细胞色素氧化酶技术未发现视皮层眼优势柱的变化。阴正勤[7] 1997 年报道了斜视可影响猫外膝体及视皮层 Y 通路的系统表面抗原活性。Murphy[8] 1998 年运用细胞色素氧化酶技术未发现斜视猴视皮层眼优势柱的变化。细胞色素氧化酶系由于参与能量代谢而涉足细胞或神经元膜电位的维持、细胞成份的合成、神经元内的快速轴浆运输等功能。功能活跃的神经元耗能多, 神经元内的细胞色素氧化酶功能也越强。Vong-Riley、Horton、Murphy 等[6,8,9] 将其应用于视觉中枢神经元的细胞功能观察, 取得了满意的效果。

3.1　外膝体

作为视觉信息中转站的外膝体, 其发育和功能表现出对正常视觉环境和视觉经验高度的敏感性。电生理的研究已证实了图形剥夺对外膝体 Y 通道的损害情况。形态学研究也多次证实图形剥夺及斜视可引起外膝体投射层细胞的萎缩。Von-Riley[9] 应用细胞色素氧化酶技术首次对图形剥夺猫及眼球摘除猫的外膝体进行了细胞功能的观察。结果发现视觉发育敏感期内的单眼缝合猫投射到双侧外膝体神经元酶活动功能均降低, 但同侧投射的 A_1 层比对侧投射的 A 层反应降低要明显的多。

本实验在斜视眼同侧的投射层 A_1 层观察到了较明显的酶反应降低现象, 但在对侧外膝体的投射层 A 层却未观察到酶反应降低现象, 双侧健眼投射层未见到反应扩展现象, 该结果说明斜视对外膝体的损害程度只限于同侧的 A_1 层, 且视轴剥夺(斜视)与形觉剥夺产生的外膝体神经元功能损害机制不同。

3.2　视皮层 17 区

Hubel 和 Wiesel 全面从生理学形态学方面提示了猫等动物视皮层的眼优势柱构筑规律。即视皮层是以单位柱结构为功能构筑单元, 虽同时接受双眼投射, 但每一个功能柱只对一侧的投射产生优势反应, 即为眼优势柱。17 区的这种优势柱是左右眼交替而规律地排列着的, 每一个柱宽 0.5 mm。这种结构在猫出生时还不够完备。电生理的研究结果提示猫视皮层发育的可塑性敏感期为出生后到 4 月龄, 这个时期的任何异常视觉环境均可能导致其发育上和功能上的损害。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本实验在斜视猫的17区第Ⅳ层细胞层发现了交替柱状细胞酶反应降低现象，这些柱宽约500 μm，与Vong-Riley在剥夺猫17区观察到的结果相吻合，也和猫的眼优势柱结构相吻合。交替反应柱中反应产物密度正常的柱为正常对照眼优势投射柱，而反应产物密度降低的柱则为斜视眼的优势投射柱。该结果提示我们电生理在斜视猫上发现的视皮层功能降低确有其细胞生物学结构基础。

参考文献：

[1] Arden G B, Wooding S L. Pattern ERG in amblyopia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(1): 88—92.

[2] 阴正勤，方谦逊. 儿童弱视的图形视觉诱发电位分析[J]. 中华眼科杂志, 1989, 24(5): 268—270.

[3] Yin Zhengqin, Pei Xing. Changes in P-ERG and P-VEP during the postnatal development of kittens with artificial squint[J]. Chinese J Physiol Scim, 1989, 5(2): 170—181.

[4] Lowel S. Ocular dominance colum development: strabismus the spacing of adjacent columns in cat visual cortex[J]. J Neurosci, 1994, 14(12): 7 451—7 468.

[5] Tychsen L, Burkhalter A. Functional and structural abnormalities in visual cortex in early childhood strabismus[J]. Klin Monatsbl Augenheilkd, 1996, 208(1): 18—22.

[6] Horton J C, Hocking D R. Pattern of ocular dominance columns in human striate cortex in strabismic amblyopia[J]. Vis—Neurosci, 1996, 13(4): 787—795.

[7] Yin Z Q, Crewther S G. Cat-301 immunoreactivity in the lateral geniculate nucleus visual cortex of the strabismic amblyopic cat [J]. Aust N Z J Ophthalmol, 1997, 25(suppl 1): S107—109.

[8] Murphy K M, Jones D G. Spacing of cytochrome oxidase blobs in visual cortex of normal and strabismic monkeys[J]. Cereb Cortex, 1998, 8(3): 237—244.

[9] Vong Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry [J]. Brian Res, 1979, 171(1): 11—23.

（编辑 王 红）

（上接560页）

~40 Gy，中位剂量32 Gy，肿瘤边缘剂量为处方剂量的50%~80%，采用Varian 2300C/D型直线加速器6 MV-X线照射。

1.4 摆位重复性验证方法

通过摆位框架将靶点中心精确地置于直线加速器等中心，分别在固定面罩的前面和两侧激光灯投影点作细线十字标记，每次治疗摆位后观察激光灯指示点与所作标记之偏差。多靶点照射时验证第一靶点。

2 结果

临床治疗效果较为满意，3例舌根癌患者治疗过程中肿瘤明显消退，疼痛有所缓解，治疗结束后2周左右疼痛明显减轻。1例颈部推管内肿瘤复发外侵，治疗后局部变软，肿胀减轻。2例喉癌、2例甲状腺癌术后咽喉内复发经治疗两周后肿块缩小2/3，疼痛明显减轻。对上述8例患者分别进行了3~6摆位重复性验证，摆位重复精度每次摆位各向激光指示点与第一次摆位标记点之误差均< 3 mm。摆位重复准确率达100%。

3 讨论

立体定向放射治疗，具有定位治疗精确，靶区剂量集中，对周围组织损伤小，局部高剂量照射能产生较强生物效应等优势，在肿瘤治疗中得到广泛的应用[2,3]。在此项技术的开展中，精确的定位和重复摆位是保证治疗效果、减轻周围组织损伤的关键环节之一。但由于定位头环和体部框架是分别为头部和躯干病变设计的，无法直接用于口咽和颈部肿瘤的定位治疗。颈部由于活动度大，定位和重复准确摆位比较困难。我们利用改进体部框架法，进行CT定位和摆位治疗，达到了固定和精确重复摆位的要求，并取得了较满意的治疗效果，扩大了X-刀的治疗范围，为颈部肿瘤的治疗开创了一个新的方法。

采用体部框架面罩固定法对口咽和颈部肿瘤进行X-刀治疗，我们有如下几点体会：①对现有体部框架要作一改进：在框架底部头枕四角外侧分别钻孔，插入螺杆，以供固定面罩之用。②由于颈部活动度大，其摆位精度较头部头环固定稍差，为减小这一误差，需要加强面罩固定的强度，通常需采用3层面罩进行固定。特别注意下颏和鼻部成型，上述部位轮廓较分明，是保证固定重复精度的主要环节。同时由于患者躯干大部分于框架之外，应选择软垫等物支持，并使患者有足够舒适度，以保证减少动度。③由于体部定位框架体积较大，照射弧的范围受到一定限制，在治疗前应先行模拟摆位和投照，以避免机头与定位框架发生碰撞或射线受到阻挡，疗程中要注意及时修正治疗方案。

关键词：口咽部；颈部；肿瘤；立体定向放射治疗
中图法分类号：R815 文献标识码：B

参考文献：

[1] 戴建荣，胡逸民. X线立体定向治疗靶点位置精确度分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 1996, 5(2): 107—110.

[2] Cmelak A J, Cox R S, Adler J R, *et al*. Radiosurgery for skull base malignancies and nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 37(5): 973—974.

[3] Blomgren H, Lax I, Naslund I, *et al*. Stereotactic high dose fraction radiation therapy of extracranial tumors using an accelerator. Clinical experience of the first thirty-one patients[J]. Acta Oncol, 1995, 34(6): 861—870.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net