

HRP-SA、ALP-SA等)对固相的非特异结合。在杂交分析中引入多次信号放大的目的是为了本底的增加,改进信/噪比。这要求测定试剂的浓度以及它们与固相的反应时间的最佳化,或许应用化学计量学(chemometrics)可使这种最佳化实验更方便。

本分析系统与其他镧系元素发光分析系统比较有几大优点:①灵敏度非常高,这是因为把二次酶放大、PCR扩增、镧系元素螯合物固有优点以及时间分辨和波长分辨测量技术集为一体;②分析系统非常简捷,全过程操作一管到底,不需要电泳、Southern转移和膜杂交等复杂费时的步骤,分析快速,易于自动化;③试剂的有效期长;④安全无污染,抗干扰能力强,环境改变和猝灭体对荧光特征发射影响极小。这些优点使本分析系统进入常规应用成为可能,具有很大发展潜力和实用价值。已用于前列腺癌早期诊断,具有临床意义^[7]。

参 考 文 献

1 O'Sullivan PJ, Burke M, Soini AE, et al. Synthesis and evaluation of

phosphorescent digo-nucleotide probes for hybridization assays. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(21): 114.

2 Wu M, Lakowicz JR, Geddes CD, et al. Enhanced lanthanide luminescence using silver nanostructures: opportunities for a new class of probes with exceptional spectral characteristics. *J Fluoresc*, 2005, 15(1): 53-59.

3 Johansson MK, Cook RM, Xu J, et al. Time gating improves sensitivity in energy transfer assays with terbium chelate/dark quencher oligonucleotide probes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(50): 16451-16455.

4 Campbell CN, Gal D, Cristler N, et al. Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. *Anal Chem* 2002, 74(1):158-162.

5 宋娜玲,赵启仁,李美佳,等.酶放大镧系元素发光时间分辨荧光分析中关键试剂的研究. *中华医学研究杂志*, 2006, 6(12):1321-1323.

6 ZHONG Wei-de, HE Hui-chan, BI Xue-cheng, et al. cDNA macroarray for analysis of gene expression profiles in prostate cancer. *Chin Med J*, 2006, 119(7): 570-573.

7 Ylikoski A, Elomaa A, Ollikka P, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (TruPoint) for nucleic acid detection. *Clin Chem*, 2004, 50(10): 1943-1947.

(收稿日期: 2007-01-08)

实验性近视眼视网膜多巴胺神经系统研究进展

赵娟 刘兴党

【摘要】近视眼是一种最常见的屈光不正。动物实验模型主要包括形觉剥夺性近视和离焦性近视两种,应用的实验动物主要为鸡和哺乳类。视网膜多巴胺系统与视觉经验对出生后眼球生长发育的调控密切相关,而视网膜多巴胺转运体的变化可能更为直接地反映了突触间隙多巴胺的变化。

【关键词】近视;模型;动物;视网膜;受体,多巴胺;多巴胺转运体;放射性核素显像

【中图分类号】R-332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-4114(2007)02-0073-04

Study and development of retinal dopamine nervous system in experimental myopia

ZHAO Juan, LIU Xing-dang

(Department of Nuclear Medicine, Hua Shan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040, China)

【Abstract】 Myopia is the most familiar ametropia. Animal experimental models include form deprivation myopia and defocus myopia. Experimental animals we often use are chicken and mammals. The retinal dopamine system and vision experience have close relations with the regulation of eyeball's growth after birth, while the change of dopamine transporter may reflect the change of dopamine in the synaptic cleft more directly.

【Key words】 Myopia; Models, animal; Retina; Receptor, dopamine; Dopamine transporter; Radionuclide imaging

近视眼是一种最常见的屈光不正。随着现代社

会的文明化进程,近视眼的发病率不断增长,成为当今世界范围内发病率最高的一种眼病,WHO已把它列入亟待解决的致盲性眼病之一。近期统计

数据表明,我国近视眼发病人数已达到3.6亿,青少年近视发病率位居世界第二。近视眼的防治正在受到越来越广泛的关注。本文就实验性近视眼动物模型的制备方法、视网膜多巴胺能神经系统的作用、视网膜 DAT 核素示踪研究作一综述

1 动物模型的制备方法

1.1 动物实验模型

有两种主要的动物实验模型,即形觉剥夺性近视(form deprivation myopia)和离焦性近视(defocus myopia)。形觉剥夺性近视是指用缝合眼睑或戴弥散镜片严重破坏而动物的形体觉所引起的近视。离焦性近视是指强迫动物近视或戴负球镜片而使物体聚焦于视网膜后方,从而引起调节和眼轴延长,造成近视^[1,2]。

形觉剥夺性近视与离焦性近视是本质上完全不同的两类近视。形觉剥夺性近视在视神经切断后仍能发生,可为持续光照及羟多巴胺等药物所抑制,因此与中枢关系较少,是视网膜源的局部变化。离焦性近视则会被视神经切断后所抑制,并且不能被持续光照及羟多巴胺等药物所抑制,其发生与中枢有关^[2]。此外,让动物戴正球镜片,同样可造成视网膜上模糊影像,却能引起远视,说明动物能根据离焦影像在视网膜前方或后方改变轴长,使影像移到视网膜上,此称为正视化过程^[1]。此两类近视的发生在时间上有明显差别,离焦性近视的发生明显较快。此外,破坏昼夜节律能够抑制离焦性近视的发生,却不影响形觉剥夺性近视;保持昼夜节律的措施则相反。这进一步证实了两者间有本质上的差别^[3]。

1.2 实验动物

应用的实验动物主要为鸟类(鸡)和哺乳类[主要为树鼠(tree-shrew)及猿猴等灵长类]动物^[1]。研究层次从开始的器官及物理性指标(屈光、轴长等)逐步向组织层次(视网膜、巩膜等)及生化指标深入;也发现了一些可能影响近视发生发展的生物物质与信使,并开始将其结果应用于临床。

鸡因为生长周期短,易于饲养及进行实验,因此在近视动物实验研究中应用较多。但鸡的眼球结构与哺乳类有根本上的区别,例如鸡的巩膜有软骨层,近视时主要是软骨层的增厚引起眼轴主动扩展。而哺乳类动物则是巩膜薄弱引起的眼轴被动扩

展,两者正好相反。此外,鸡的调节肌肉不是平滑肌而是横纹肌,没有毒蕈碱受体,却有烟碱受体,与哺乳类的调节机制和神经支配也完全不同。因此,如果将鸡的研究结果机械地搬用于人类,必然会得出许多错误结论。

哺乳类实验动物与人类较接近,其研究结果较接近临床。近年哺乳类动物在近视研究中的应用得到加强,除原已习用的树鼠外,还有恒河猴、短尾猴、绒猴、小鼠等,且已建立了各种基因工程改造动物的模型,因此较有前途^[4]。国内则已成功地建立了豚鼠的实验性近视模型,且已用于发病机制及药物治疗的研究^[5]。

但是,在将动物实验结果应用于临床时,研究者对人类与实验动物的物种差异(尤其是鸡与哺乳类的差异)和年龄差异(实验动物多为幼年动物,人类近视高发年龄为青少年期)认识不足、对两类本质不同的近视的差异理解不足(形觉剥夺性近视在人类极为罕见,仅偶见于个别幼年高度睑下垂及屈光介质混浊者;绝大多数人类近视较接近于离焦性近视),也导致了一些错误认识。今后如将动物实验结果应用于临床时,应注意上述三种差异可能造成的影响,尽量选用青少年哺乳类动物的离焦性近视模型,以提高动物实验研究的实用价值。

2 视网膜多巴胺能神经系统作用的研究

2.1 视网膜多巴胺(dopamine, DA)及受体的相关研究

DA是脊椎动物视网膜的主要神经活性物质之一,主要由无长突细胞分泌,其代谢活动与视觉系统许多神经生理活动有关,起着神经递质和调质的作用。在正常生理条件下,视网膜DA通过D1和D2受体在视觉发生时参与光耦联和转导作用并控制眼球内节律,进而影响正常眼球生长和发育调控。D1受体介导DA的作用,降低视网膜对光的反应,有光整合作用。D2受体在光感受器和色素上皮细胞层集中分布,调节DA的释放,在视网膜局部形成反馈环路,说明局部视网膜机制参与形觉剥夺性近视的调控。近视状态下DA受体数目增多,可能与近视导致DA水平下降有关。从DA与众多神经活性物质的相互作用而言,DA可能是视网膜细胞间相互反馈的信使,DA神经元释放DA到光感受器和视网膜色素上皮(retinal pigment ep-

ithelium, RPE)上的 DA 受体, 通过与 D2 受体结合引起光感应视网膜细胞运动, DA 是从视网膜到 RPE 的转导媒介, 此外 DA 又通过 D2 受体抑制腺苷酸环化酶的酶活性, 降低 cAMP 水平, 反馈抑制 DA 的释放。因此, 肯定了 DA 在视网膜所起的神经-激素作用。

Stone^[6]利用高效液相色谱与电化学检测技术, 观察了鸡单眼形觉剥夺后视网膜 DA 及其代谢产物二羟苯乙酸(dihydroxy-phenyl acetic acid, DOPAC)的水平, 发现形觉剥夺性近视的视网膜 DA 与 DOPAC 水平下降了 30%, 说明形觉剥夺性近视眼轴的增长与视网膜 DA 水平的降低有关, 给予 DA 受体激动剂能抑制眼球的异常增长, 但将 DA 受体激活剂阿朴吗啡(apomorphine)与 DA 受体抑制剂氟哌啶醇合用时则对剥夺性眼无明显作用。氟哌啶醇本身也可以抑制剥夺眼的眼轴延长, 这说明视网膜上的 DA 本身可能也并非调节眼球生长的最终因素, 而是参与了一系列将视觉活动与出生后的眼球生长相联系的复杂过程。Schaeffel 等^[2]利用局部遮盖法引起鸡的局部近视性眼球变化后, 检测近视视网膜区域的 DA 水平, 发现局部剥夺性近视伴有局部 DA 水平的改变。形觉剥夺性近视中虽发现了视网膜 DA 水平的改变, 但视网膜 DOPAC 与 DA 的比值仍然保持正常; 酪氨酸羟化酶是视网膜 DA 合成的限速酶, 其活性的变化可反映 DA 合成水平, 已证实形觉剥夺导致酪氨酸羟化酶活性的降低^[9]。

从以上实验结果足以得出以下结论: 视网膜 DA 系统与视觉经验对出生后眼球生长发育的调控密切相关。在形觉剥夺引起的异常眼球生长过程中, 视网膜 DA 水平的改变并不是由于其代谢状况的异常, 而是由于其合成水平的降低。

目前, 更多的研究致力于探讨 DA 是通过何种机制影响眼球的生长。结膜下注射多巴胺受体激活剂阿朴吗啡, 抑制了眼轴过度增长和近视的形成, 但眼轴赤道径的增长不受影响^[1]。形觉剥夺性近视的视网膜 DA 受体为超敏状态, 形觉剥夺可能破坏了 RPE 和脉络膜的屏障, 导致视网膜上调巩膜增长的信号分子轻易通过而使巩膜过度生长, 而 DA 能阻止这种改变。阿朴吗啡通过 D2 受体机制作用于视网膜或 RPE 层, 抑制形觉剥夺性近视的形成。DA 系统与出生后眼球生长调节过程中存在相互联系, 在形觉剥夺性近视形成以及异常眼球增长中

DA 起了重要作用。体外培养的结果表明, 阿朴吗啡抑制了 RPE 细胞对巩膜软骨细胞的生长刺激作用^[7], 由此推测, 阿朴吗啡通过 D2 受体机制减少 RPE 细胞产生或释放具有刺激巩膜细胞生长作用的某些因子, 或是减弱巩膜软骨细胞对这些因子的反应性。

除阿朴吗啡外, 其他与 DA 受体有关的药物也被证实影响形觉剥夺性近视, 但 DA 究竟以何种途径调控眼球的生长尚未找到满意的答案。

2.2 视网膜多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 的研究

DAT 位于多巴胺神经元突触前膜上, 它的主要功能是将突触间隙的 DA 递质迅速重摄入突触前膜的 DA 囊泡。因此, DAT 可以有效控制突触间的 DA 水平。DAT 的变化可能更直接地反映了突触间隙的 DA 变化。国内、外研究表明, 脑纹状体内 DAT 的变化比 DA 受体的变化更敏感地反映 DA 神经元的功能。另有研究表明, 对 DAT 的测量可直接反映突触前膜 DA 能神经末梢的数量的变化^[8]。

由于视网膜 DA 水平的下降仅发生在形觉剥夺的晚期^[9], 因此推测其原因可能为视网膜退变所致, 而形觉剥夺后不久 DA 释放率的显著变化可能是 DA 调节眼球生长的信号。DA 的释放率是通过检测玻璃体中 DA 的浓度而得到的, 后者与视网膜细胞外 DA 的浓度差异极小, 均约占总视网膜 DA 的 1/8, 因此视网膜细胞外 DA 浓度亦可代表 DA 的释放率, 且其与眼的生长调节关系可能比总视网膜 DA 的浓度更为密切^[10]。由视网膜间质弥散的 DA 水平控制着眼轴的生长, 而不是整个视网膜 DA, 后者主要指储存在细胞内的 DA。视网膜细胞外 DA 的水平不仅受控于细胞内 DA 浓度, 而且当 DA 被释放到突触间隙后, 约 1/3 被位于突触前膜的 DAT 迅速重新摄取, 因此 DAT 也可调控突触间隙 DA 的有效浓度, DAT 的变化可更为直接地反映突触间隙 DA 的变化。

与 DA 受体比较, DAT 的变化可更敏感反映 DA 神经元的功能, 而 2 β -羟甲基-3 β -(4-碘苯基)托烷[2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl) tropame, β -CIT]可与 DAT 高亲和力结合, 可探查 DAT 早期诊断帕金森病。Xi Xiaoqing 等^[11]应用 ¹²⁵I- β -CIT 在实验性近视眼的研究中检测视网膜 DAT 的变化, 结果显示视网膜 DAT 放射性计数存在较大个体差异,

但同一个体的双眼却具有较好相关性；视网膜 DAT 主要分布在 RPE，支持 RPE 参与视觉调控眼球生长的观点，并提示 DAT 可能参与形觉剥夺性近视和透镜诱导性近视的发生。

3 视网膜 DAT 显像的可行性研究

DAT 是目前最为特异性的 DA 能神经元标志物。目前国外研究得比较成功的 DAT PET 显像剂有无托烷环类 (如 ^{11}C -诺米芬辛)、可卡因类 (如 ^{11}C -可卡因)、苯基托品烷类、苯托品类和哌嗪类等，苯基托品烷类显像剂具有较高的亲和力、特异性及较好的显像效果，其品种较多，应用也最为广泛^[12]。Wang 等^[13]在兔眼 PET 显像的研究中，通过 DAT 显像剂 ^{11}C -2 β -羟甲基-3 β -(4-对氟苯基)托烷 (^{11}C -卡芬太尼)首次对兔眼组织的相应受体进行了 PET 及放射自显影显像，他们的实验是将感兴趣区放在了眼睛的前部，包括虹膜睫状体，同时将脑受体显像作为参照，发现 PET 能够显示眼睛的放射性配体，但影像不如脑受体的清晰；结果还表明眼睛前部的 PET 信号不仅反映了虹膜睫状体的放射性配体受体的结合情况，还反映了周围组织的放射性；PET 检查之后立即进行了兔眼球的放射自显影显像，虹膜睫状体、视网膜、脉络膜、巩膜均能够清晰地显示，进一步证实了 PET 的相应数据。研究者认为，目前眼组织研究最大的问题是 PET 4mm 的空间分辨率仍然太大，而小 PET 的空间分辨率是 1.7mm，随着 PET 的空间分辨率的提高，这个问题将会被解决，PET 将会用于眼睛神经受体的体内药代动力学研究。

4 展望

目前国内外对近视的研究主要停留在视网膜 DA 及其代谢产物 DOPAC、酪氨酸羟化酶、多巴胺脱羧酶等水平，而对于 DAT 的研究尚在初步探索中，它在眼科学方面的应用目前几乎为零。希望通过进一步的研究，能揭示近视眼形成过程中 DAT 功能状态的变化及 DAT 在视觉形成和眼球发育生长调控中的作用，为近视的预防和治疗开创一条新的研究途径。

参 考 文 献

- 1 Wildsoet C, Wall man J. Choroidal and scleral mechanisms of compensation for spectacle lenses in chicks. *Vision Res*, 1995, 35 (9): 1175-1194.
- 2 Schaeffel F, Bartmann M, Hagel G, et al. Studies of the retinal dopamine melatonin system in experimental refractive errors in chickens. *Vision Res*, 1995, 35(9): 1247-1264.
- 3 Kee CS, Marzani D, Wallman J. Differences in time course and visual requirements of ocular responses to lenses and diffusers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(3): 575-583.
- 4 Tejedor J, de la Villa P. Refractive changes induced by form deprivation in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (1): 32-36.
- 5 欧阳朝祐, 褚仁远, 胡文政. 豚鼠西平对豚鼠透镜诱导性近视眼的作用. *中华眼科杂志*, 2003, 39(6): 348-351.
- 6 Stone RA, Lin T, Laties AM, et al. Retinal dopamine and from deprivation myopia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(2): 704-706.
- 7 Seko Y, Tanaka Y, Tokoro T. Apomorphine inhibits the growth stimulating effect of retinal pigment epithelium on scleral cells in vitro. *Cell Biochem Funct*, 1997, 15(3): 191-196.
- 8 Filippi L, Manni C, Pierantozzi M, et al. ^{123}I -FP-CIT semiquantitative SPECT detects preclinical bilateral dopaminergic deficit in early Parkinson's disease with unilateral symptoms. *Nucl Med Commun*, 2005, 26(5): 421-426.
- 9 Bartmann M, Schaeffel F, Hagel G, et al. Constant light affects retinal dopamine levels and blocks deprivation myopia but not lens induced refractive errors in chickens. *Vis Neurosci*, 1994, 11 (2): 199-208.
- 10 Ohngemach S, Hagel G, Schaeffel F. Concentrations of biogenic amines in fundal layers in chickens with normal visual experience, deprivation and after reserpine application. *Vis Neurosci*, 1997, 14 (3): 493-505.
- 11 XI Xiaoqing, CHU Renyuan, ZHOU Xingtao, et al. Retinal dopamine transporter in experimental myopia. *Chin Med J*, 2002, 115 (7): 1027-1030.
- 12 唐刚华. PET 药物及其研究现状与进展. *国外医学·放射医学核医学分册*, 1999, 23(5): 193-197.
- 13 Wang WF, Ishiwata K, Kiyosawa M, et al. Investigation of the use of positron emission tomography for neuroreceptor imaging in rabbit eyes. *Ophthalmic Res*, 2004, 36(5): 255-263.

(收稿日期: 2006-09-10)