

## · 实验研究 ·

# AMPK-SIRT1 通路介导的热量限制对成年单眼剥夺弱视小鼠视皮层可塑性的再激活作用

涂艳琼 罗瑜琳 刘政海 吴小影

410008 长沙,中南大学湘雅医院眼科(涂艳琼、吴小影);410007 长沙,湖南省儿童医院眼科(罗瑜琳);421001 衡阳,南华大学应用解剖与生殖医学研究所(刘政海)

通信作者:吴小影,Email:hewuan@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.05.003

**【摘要】 目的** 探讨热量限制对成年单眼剥夺(MD)弱视小鼠视皮层可塑性的调节作用及对弱视治疗的促进作用,并探讨其可能的分子机制。**方法** 采用随机数字表法将 50 只清洁级健康新生昆明小鼠随机分为正常对照组( $n=14$ )、MD+自由进食组( $n=18$ )和 MD+热量限制组( $n=18$ )。选取 MD+自由进食组和 MD+热量限制组小鼠建立 MD 弱视模型,分别以自由进食和热量限制的方式进行饲养。检测各组小鼠视敏度和闪光视觉诱发电位(F-VEP),透射电子显微镜下观察视皮层神经元突触超微结构,Western blot 法检测视皮层中磷酸化腺苷酸激活蛋白激酶  $\alpha$ (p-AMPK $\alpha$ )、沉默信息调节因子 1(SIRT1)蛋白的表达。**结果** 从第 1 周开始,MD+热量限制组小鼠体质量增加的百分比明显低于 MD+自由进食组。与 MD+自由进食组比较,MD+热量限制组小鼠视敏度明显恢复,F-VEP 示 P<sub>100</sub> 波潜伏期缩短、振幅增加,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。与正常对照组相比,MD+自由进食组小鼠视皮层神经元突触间隙明显增宽,差异有统计学意义( $P<0.05$ );MD+热量限制组视皮层神经元突触间隙明显窄于 MD+自由进食组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。MD+自由进食组视皮层神经元突触后致密物厚度明显薄于正常对照组和 MD+热量限制组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。Western blot 检测结果显示,正常对照组、MD+热量限制组和 MD+自由进食组 p-AMPK $\alpha$  蛋白表达水平分别为  $0.89\pm 0.03$ 、 $0.94\pm 0.02$  和  $0.74\pm 0.02$ ,SIRT1 蛋白的表达水平分别为  $0.97\pm 0.11$ 、 $0.95\pm 0.14$  和  $0.58\pm 0.13$ ,差异均有统计学意义( $F=14.57, P=0.00$ ;  $F=23.91, P=0.00$ ),其中 MD+热量限制组较 MD+自由进食组小鼠视皮层中 p-AMPK $\alpha$  及 SIRT1 蛋白的表达显著升高,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** 热量限制能重塑成年 MD 小鼠视皮层神经元突触的超微结构,重新激活视皮层结构可塑性,改善其视觉功能,其机制可能与激活 AMPK-SIRT1 通路有关。

**【关键词】** 热量限制; 成年小鼠; 单眼剥夺; 视皮层; 可塑性

**基金项目:** 湖南省自然科学基金重点项目 (13JJ2010); 湖南省自然科学基金青年基金项目 (14JJ153)

## Reactivation of visual cortical plasticity by caloric restriction mediated by AMPK-SIRT1 pathway from monocular deprivation in adult mice

Tu Yanqiong, Luo Yulin, Liu Zhenghai, Wu Xiaoying

Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410008, China (Tu YQ, Wu XY);

Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Luo YL); Institute of Clinical

Anatomy & Reproductive Medicine, University of South China Medicine School, Hengyang 421001, China (Liu ZH)

Corresponding author: Wu Xiaoying, Email: hewuan@163.com

**[Abstract] Objective** This study was to investigate the effect of caloric restriction on the plasticity of visual cortex in adult monocular deprivation (MD) amblyopic mice, as well as to promote the treatment of amblyopia, and to explore the possible molecular mechanism of this beneficial effect. **Methods** Fifty healthy newborn Kunming mice of clean grade were randomly divided into 3 groups using a random number table method: normal control group ( $n=14$ ), MD+ ad libitum group ( $n=18$ ) and MD+ caloric restriction group ( $n=18$ ). A mouse model of adult MD amblyopia was established, and caloric restriction intervention and ad libitum were performed on MD+ caloric restriction group and MD+ ad libitum group, respectively. The visual acuity and flash visual evoked potential (F-VEP) of each group were detected. The synaptic structure of visual cortex neurons was observed by transmission electron microscope, and the expression of phosphorylated AMP-activated protein kinase- $\alpha$  (p-AMPK $\alpha$ ) and silent information regulator 1 (SIRT1) in visual cortex were detected by Western blot. The animal feeding and use was in accordance

with the standards set by the ARVO. **Results** The weight of mice in MD+ caloric restriction group increased from the beginning of the first week, and was significantly lower than that in the MD+ ad libitum group ( $P < 0.05$ ). Compared with the MD+ ad libitum group, the visual acuity was restored, the latency was shortened, and the amplitude of F-VEP was increased in the deprived eyes of MD+ caloric restriction group (all at  $P < 0.05$ ). Transmission electron microscope observation showed that the width of synaptic gap of visual cortical neurons was significantly narrower, and the thickness of postsynaptic density was significantly thicker in MD+ caloric restriction group than that in the MD+ ad libitum group (both at  $P < 0.05$ ); compared with the normal control group, the synaptic gap was widened and the postsynaptic density was significantly thicker than that in the MD+ ad libitum group (both at  $P < 0.05$ ). Western blot showed that the expression of p-AMPK $\alpha$  in visual cortex in the normal control group, MD+ caloric restriction group and MD+ ad libitum group was  $0.89 \pm 0.03$ ,  $0.94 \pm 0.02$  and  $0.74 \pm 0.02$ , and the expression of SIRT1 was  $0.97 \pm 0.11$ ,  $0.95 \pm 0.14$  and  $0.58 \pm 0.13$ , respectively, showing significant differences among the three groups ( $F = 14.57$ ,  $P = 0.00$ ;  $F = 23.91$ ,  $P = 0.00$ ), the expressions of p-AMPK $\alpha$  and SIRT1 in visual cortex were increased in MD+ caloric restriction group than those in MD+ ad libitum group (both at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Caloric restriction can restore the ultrastructure of synapses and improve the visual cortical plasticity in adult MD mice, so that help to improve visual function. Its mechanism may be related to the activation of AMPK-SIRT1 pathway.

[Key words] Caloric restriction; Adult mice; Monocular deprivation; Visual cortical; Plasticity

**Fund program:** Key Program of Natural Science Foundation of Hunan Province (13JJ2010); Youth Program of Natural Science Foundation of Hunan Province (14JJ3153)

弱视是儿童视觉发育过程中的常见眼病,在全世界儿童的发病率为 2% ~ 5%<sup>[1]</sup>,中国的弱视儿童已超过 1 000 万<sup>[2]</sup>。弱视不仅导致视力低下,还可影响双眼视功能及立体视觉,孩子年龄太小不能很好地配合治疗,而 7 岁以后人类视皮层可塑性基本被“抑制”,治愈率尚不足 18%<sup>[3]</sup>。弱视不伴有通过治疗可使视力发生逆转的器质性病变<sup>[4]</sup>,具体的发病机制目前尚未明确,但普遍认为与视皮层可塑性密切相关,因而寻找重新激活视皮层可塑性的机制能为大龄儿童及成人弱视的治疗提供全新的思路。既往研究发现了大量参与调节视皮层可塑性的分子靶点,如 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)及其受体等<sup>[5-9]</sup>,但因全身给药难以通过血-脑屏障在视皮层达到有效的药物浓度,实验干预多采用视皮层局部定点给药或侧脑室注射的方式,而这些有创性的操作存在造成脑组织损伤的风险,故难以在弱视治疗的临床工作中得到应用。热量限制指在保证不发生营养不良的情况下,限制每日摄取的总热量。自 McCay 等<sup>[10]</sup>发现热量限制能延长大鼠的寿命以来,大量实验已表明热量限制可推迟或降低多种年龄相关性疾病的发病<sup>[11-14]</sup>。此外,热量限制可通过调节下丘脑、海马等脑组织的突触可塑性,改善大脑的认知、学习及记忆等功能<sup>[12]</sup>。Spolidoro 等<sup>[13]</sup>研究发现,热量限制可“重新激活”成年大鼠视皮层的功能可塑性,视皮层解剖结构上是否存在相应的变化呢?热量限制的直接效应是降低机体的能量水平,作用的发挥可能涉及多种能量敏感分子靶点<sup>[14]</sup>,其中腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated

protein kinase, AMPK)和沉默信息调节因子(silent information regulator, SIRT)之间可相互影响,目前已发现 AMPK-SIRT 通路与炎症的调控密切相关<sup>[15]</sup>,该通路是否也参与介导了热量限制对成年视皮层可塑性的再激活效应尚不清楚。本研究旨在从结构和功能上探索热量限制对成年单眼剥夺(monocular deprivation, MD)模型小鼠视皮层可塑性的“再激活”作用,探讨 AMPK-SIRT1 通路是否参与其调控,为大龄弱视患儿及成年弱视患者的治疗提供新的思路及实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级健康新生昆明小鼠 50 只(中南大学实验动物学部提供),雌雄不限,正常环境饲养,室温 20 ~ 26 °C,相对湿度为 40% ~ 70%,12 h 光照/12 h 黑暗交替环境。本实验所有操作均遵循眼科与视觉科学研究联合会制定的有关动物实验规范原则。

**1.1.2 主要试剂** 兔抗小鼠磷酸化腺苷酸激活蛋白激酶 $\alpha$ (phosphorylated AMP-activated protein kinase- $\alpha$ , p-AMPK $\alpha$ )单克隆抗体(1:200)、兔抗小鼠 SIRT1 单克隆抗体(1:200)、HRP-羊抗小鼠 IgM(1:1 000)(武汉博士德生物公司);聚丙烯酰胺凝胶试剂盒、体积分数 2.5% 戊二醛溶液、ECL 荧光染色试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及处理** 健康新生昆明小鼠 50 只,采用随机数字表法将小鼠分为正常对照组( $n = 14$ )、

MD+自由进食组( $n=18$ )和 MD+热量限制组( $n=18$ )。小鼠 35 日龄前均采用适应性喂养,21 日龄构建弱视模型,于 35 日龄剪开剥夺眼缝合的眼睑,根据分组进行饲养至 63 日龄,于 63 日龄时检测各组小鼠视敏度及闪光视觉诱发电位(flash visual evoked potential, F-VEP)。检测结束后以断颈法处死各组小鼠,依据《小鼠大脑立体定位图谱》,参照 Dahlhaus 等<sup>[16]</sup>的方法取小鼠左侧视皮层双眼区组织,透射电子显微镜下观察视皮层神经元突触超微结构,Western blot 法检测 AMPK-SIRT1 通路相关蛋白的表达。

**1.2.2 弱视动物模型的构建** 应用 Maffei 等<sup>[17]</sup>的方法,缝合 21 日龄小鼠右侧眼睑构建 MD 弱视模型,于 35 日龄时剪开缝合的眼睑。小鼠腹腔内注射质量分数 1% 戊巴比妥钠溶液(0.06 g/kg),剪除右眼睑缘周围毛发,并用碘伏消毒,从内眦至外眦剪除上下眼睑组织,宽度为 0.5~1.0 mm,6-0 丝线将上下眼睑组织缝合 2 周,形成视觉剥夺,术毕涂抹红霉素眼膏。术后每日涂抹红霉素眼膏并检查小鼠眼睑缝合处反应,有局部感染、缝线脱落以及角膜损伤者需剔除实验,并及时补充样本。

**1.2.3 热量限制方式** 热量限制组小鼠从 35 日龄起采用隔日饲养,即自由进食 1 d 后禁食 1 d、隔日再自由进食的循环饲养模式,直至饲养至 63 日龄(即行热量限制干预 4 周)。记录各组小鼠每天的进食量和体质量。

**1.2.4 小鼠主观视功能的检测** 所有小鼠饲养至 63 日龄时,利用小鼠的前爪触地反射,参照 Drapeau 等<sup>[18]</sup>提及的视觉平台实验行视敏度检测,操作方法为提起实验小鼠尾巴根部,使小鼠头部距离平台 20 cm,前爪悬空,然后向平台缓慢靠近,记录小鼠胡须或鼻子触碰到平台之前其前爪探爪的时间。30 min 内重复进行 3 次实验,以小鼠前爪在下降过程中探爪的时间百分比为计量指标。

**1.2.5 小鼠客观视功能的检测** 参照 ISCEV 标准,行小鼠 F-VEP 检测。将模型鼠缝合的眼睑缘剪开,置于暗室内使其暗适应 30 min,同时保持相对恒定的室温。1% 戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉实验小鼠后,双眼结膜囊内点复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳。采用全自动视觉电生理检查系统分别在枕骨粗隆、两耳连线与正中交点及同侧耳处放置银针电极。用闪烁光作为刺激光,刺激频率为 1.0 Hz,通频带宽为 0.5~85.0 Hz,分析时间为 250 ms,叠加 60 次。分别检测双眼 F-VEP,检查一眼时,用不透光眼罩完全遮盖对侧眼。记录每次测量结果,包括波潜伏期及振幅,连续测量 3 次,取其平均值。

**1.2.6 视皮层神经元突触超微结构的观察** F-VEP 检测后处死小鼠,迅速取出大脑左侧视皮层双眼区组织,将取得的左侧视皮层双眼区组织经 2.5% 戊二醛、磷酸盐缓冲液配制固定 2 h,质量分数 1% 锇酸固定液固定 3 h,体积分数 50%、70%、90% 乙醇脱水 15 min 后,90% 乙醇、体积分数 90% 丙酮等体积混合脱水 15 min,90% 丙酮脱水 15 min、包埋液包埋,60 °C 烤箱固化,超薄切片机 50 nm 厚切片,质量分数 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色。然后将制备的切片于透射电子显微镜下观察,利用 IPP 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)分析并记录各组小鼠视皮层神经元的突触间隙及突触后致密物厚度。

**1.2.7 Western blot 法检测视皮层中 AMPK-SIRT1 通路相关蛋白含量** 各组小鼠在行 F-VEP 测试后处死,冰上取左侧视皮层双眼区组织,冰上裂解、匀浆,蛋白变性后备用。经聚丙烯酰胺凝胶 90 V 恒压电泳,湿转法转膜后,将目标相对分子质量范围的硝酸纤维素膜进行免疫反应。首先用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,质量分数 10% 脱脂奶粉封闭;去除封闭液,分别浸入兔抗小鼠 p-AMPK $\alpha$  单克隆抗体(1:200)和兔抗小鼠 SIRT1 单克隆抗体(1:200),4 °C 过夜;复温后用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,再浸入 HRP-羊抗小鼠 IgM(1:1 000)孵育 2 h,加 ECL 液显影;最后 Image J 软件(美国 National Institutes of Health 公司)分析吸光度(A)值。以 GAPDH 和  $\beta$ -actin 为内参照,计算 p-AMPK $\alpha$  和 SIRT1 相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量的数据经 W 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示,各组小鼠最后 10 d 平均摄食量、视敏度(探爪成功率)、F-VEP P<sub>100</sub> 波的潜伏期和振幅、视皮层神经元突触间隙及突触后致密物厚度、p-AMPK $\alpha$  蛋白、SIRT1 蛋白的表达比较均采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。MD+自由进食组和 MD+热量限制组不同时间点体质量变化比较采用两因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 热量限制对小鼠体质量的影响

正常对照组、MD+自由进食组和 MD+热量限制组最后 10 d 平均摄食量分别为(12.80 $\pm$ 0.77)、(11.90 $\pm$ 0.62)和(6.30 $\pm$ 0.50)g,差异有统计学意义( $F=30.28, P=0.00$ ),其中 MD+热量限制组小鼠的平均摄食量明显低于 MD+自由进食组,差异有统计学意义( $P<$



0.01)(图1)。随着小鼠日龄的增加,各组小鼠的体质量均有一定的增长,但从第1周开始,MD+热量限制组小鼠的体质量增加的百分比开始明显低于MD+自由进食组,差异有统计学意义 $[(103.33 \pm 2.55)\%$ 与 $(107.67 \pm 4.33)\%$ , $P < 0.05]$ ,且在饲养2周后,MD+热量限制组小鼠的体质量开始趋于稳定,饲养至2周、3周和4周体质量百分比分别为 $(107.25 \pm 4.75)\%$ 、 $(108.08 \pm 5.17)\%$ 和 $(107.83 \pm 3.45)\%$ ,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图2)。

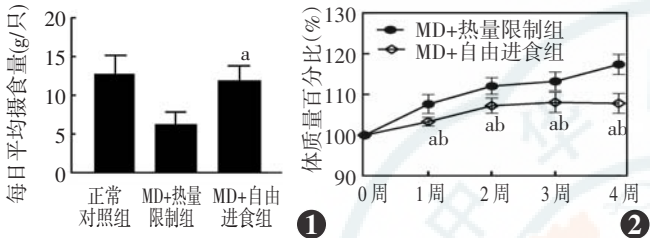


图1 各组小鼠最后10 d平均摄食量检测 与MD+自由进食组比较, $^*P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验) MD:单眼剥夺 图2 MD+自由进食组和MD+热量限制组不同时间点体质量变化 与同时点MD+自由进食组比较, $^*P < 0.05$ (两因素方差分析,LSD-*t*检验) MD:单眼剥夺

### 2.2 各组小鼠视敏度及F-VEP的变化

正常对照组、MD+热量限制组和MD+自由进食组小鼠探爪成功率分别为 $(90.00 \pm 4.22)\%$ 、 $(89.00 \pm 2.94)\%$ 和 $(26.55 \pm 2.52)\%$ ,差异有统计学意义( $F = 172.100, P = 0.000$ ),其中MD+自由进食组小鼠探爪成功率明显低于正常对照组,MD+热量限制组小鼠的探爪成功率较MD+自由进食组明显提高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )(图3)。

正常对照组、MD+热量限制组和MD+自由进食组F-VEP P<sub>100</sub>波的潜伏期分别为 $(71.33 \pm 2.91)$ 、 $(66.57 \pm 6.08)$ 和 $(84.14 \pm 1.67)$  ms,差异有统计学意义( $F = 5.075, P = 0.019$ ),F-VEP P<sub>100</sub>波的振幅分别为 $(13.57 \pm 1.23)$ 、 $(7.75 \pm 0.37)$ 和 $(5.67 \pm 0.92)$  μV,差异有统计学意义( $F = 21.000, P = 0.000$ ),其中MD+自由进食组小鼠F-VEP P<sub>100</sub>波的潜伏期较正常对照组延长,振幅较正常对照组减低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );MD+热量限制组小鼠剥夺眼F-VEP P<sub>100</sub>波潜伏期较MD+自由进食组缩短,振幅较MD+自由进食组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );MD+热量限制组小鼠剥夺眼F-VEP P<sub>100</sub>波潜伏期和振幅与正常对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

### 2.3 各组小鼠视皮层神经元突触超微结构变化

正常对照组、MD+热量限制组和MD+自由进食组

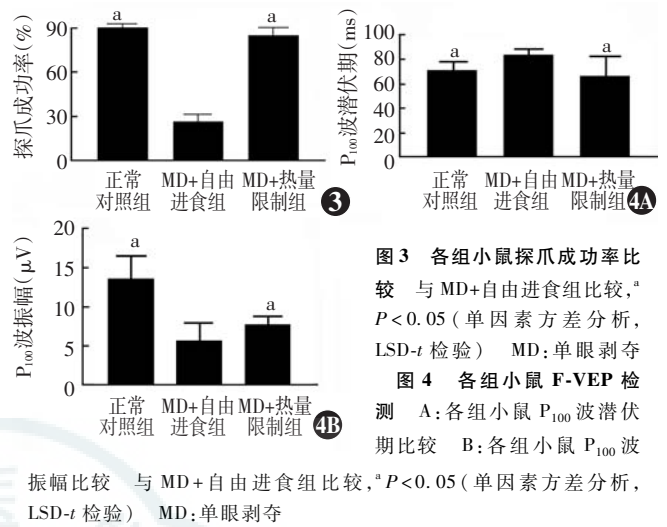


图3 各组小鼠探爪成功率比较 与MD+自由进食组比较, $^*P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验) MD:单眼剥夺 图4 各组小鼠F-VEP检测 A:各组小鼠P<sub>100</sub>波潜伏期比较 B:各组小鼠P<sub>100</sub>波振幅比较 与MD+自由进食组比较, $^*P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验) MD:单眼剥夺

视皮层神经元突触间隙分别为 $(12.43 \pm 0.57)$ 、 $(14.86 \pm 0.83)$ 和 $(19.29 \pm 1.41)$  nm,突触后致密物厚度分别为 $(0.99 \pm 0.05)$ 、 $(0.82 \pm 0.02)$ 和 $(0.74 \pm 0.02)$  nm,差异均有统计学意义( $F = 12.09, P = 0.00$ ;  $F = 35.47, P = 0.00$ ),其中MD+自由进食组小鼠视皮层神经元突触间隙较正常对照组增宽,突触后致密物厚度较正常对照组变薄,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );MD+热量限制组小鼠的视皮层神经元突触间隙较MD+自由进食组明显变窄,神经元突触后致密物厚度较MD+自由进食组明显增厚,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );MD+热量限制组小鼠剥夺眼视皮层神经元突触间隙和神经元突触后致密物厚度与正常对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$ )(图5,6)。

### 2.4 各组视皮层组织中p-AMPKα、SIRT1蛋白的表达比较

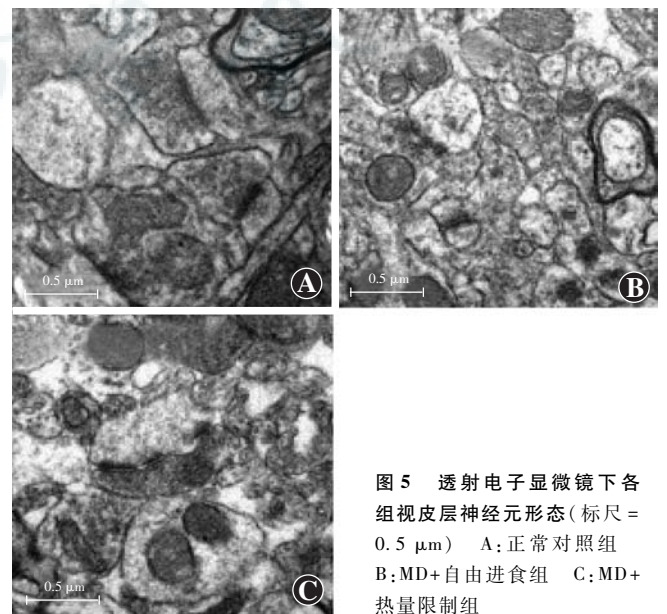


图5 透射电子显微镜下各组视皮层神经元形态(标尺=0.5 μm) A:正常对照组 B:MD+自由进食组 C:MD+热量限制组

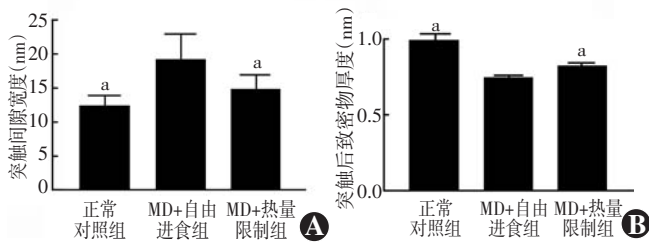


图 6 透射电子显微镜下视皮层神经元突触间隙及突触后致密物厚度检测 A: 各组视皮层神经元突触间隙宽度比较 B: 各组视皮层神经元突触后致密物厚度比较 与 MD+自由进食组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) MD: 单眼剥夺

Western blot 检测结果显示, 正常对照组、MD+热量限制组和 MD+自由进食组 p-AMPK $\alpha$  蛋白表达水平分别为  $0.89 \pm 0.03$ 、 $0.94 \pm 0.02$  和  $0.74 \pm 0.02$ , SIRT1 蛋白的表达水平分别为  $0.97 \pm 0.11$ 、 $0.95 \pm 0.14$  和  $0.58 \pm 0.13$ , 差异均有统计学意义 ( $F = 14.57$ ,  $P = 0.00$ ;  $F = 23.91$ ,  $P = 0.00$ ), 其中 MD+热量限制组小鼠视皮层组织中 p-AMPK $\alpha$ 、SIRT1 蛋白的表达水平较 MD+自由进食组均有显著升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); MD+热量限制组小鼠视皮层组织中 p-AMPK $\alpha$  和 SIRT1 蛋白的表达水平与正常对照组比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 7, 8)。

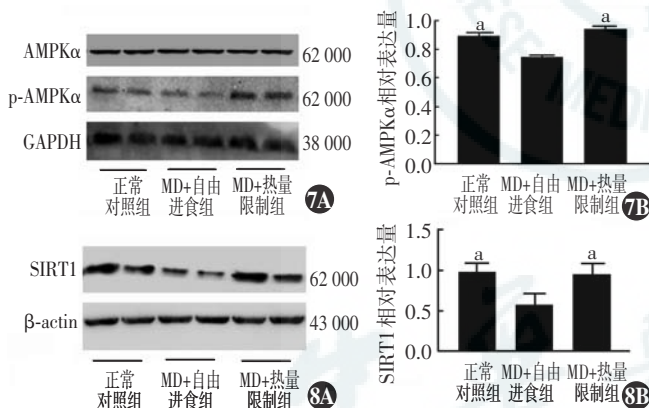


图 7 各组小鼠视皮层组织中 p-AMPK $\alpha$  蛋白的表达比较 A: Western blot 法检测 p-AMPK $\alpha$  蛋白的表达 B: 视皮层组织中 p-AMPK $\alpha$  蛋白表达的定量比较 与 MD+自由进食组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) p-AMPK $\alpha$ : 磷酸化腺苷酸激活蛋白激酶  $\alpha$ ; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; MD: 单眼剥夺 图 8 各组小鼠视皮层组织中 SIRT1 蛋白的表达比较 A: Western blot 法检测 SIRT1 蛋白的表达 B: 视皮层组织中 SIRT1 蛋白表达的定量比较 与 MD+自由进食组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) SIRT1: 沉默信息调节因子 1; MD: 单眼剥夺

### 3 讨论

弱视的发病机制尚未明确, 目前认为病理损害主要在视皮层, 与视皮层的可塑性密切相关。神经系统的分子联系能感知不同的环境经验并做出相应的精细

调节, 这种能力被称为神经系统的可塑性。随着年龄的增长, 神经系统的网络结构发育成熟<sup>[19]</sup>, 限制了突触轴突及树突的生长, 导致可塑性逐渐下降。包括人类在内的哺乳动物视觉系统的发育存在关键期, 在关键期内外界的视觉刺激能够影响视网膜-外侧膝状体-初级视皮层环路中神经冲动的传递<sup>[20]</sup>, 调整神经回路的结构联系, 关键期后外界的视觉刺激不再具有调节视皮层可塑性的作用。因此对低龄弱视儿童行传统的遮盖治疗联合精细目力训练能获得很好的治疗效果, 而关键期后的儿童或成人治疗效果却不佳。小鼠视觉发育的关键期一般认为在生后 19 ~ 32 d<sup>[21]</sup>, 本实验中在 21 日龄时 (即在其视觉发育的关键期内) 缝合了右侧眼睑, 导致小鼠视皮层双眼区的神经细胞对未剥夺眼的刺激感受增强, 而对剥夺眼的刺激感受减弱, 进而使剥夺眼对侧视皮层双眼视区域的神经元的突触功能下降。本实验中, MD 后前爪触地反射成功率显著降低, 剥夺眼 F-VEP P<sub>100</sub> 波潜伏期延长, 波幅下降。此外, 本研究中也证实了在关键期内行 MD 2 周后小鼠视皮层双眼区神经元突触间隙增宽, 突触后致密物变薄, 表明突触结构改变、功能下降, 模型构建成功。

热量限制是一种有计划地减少由食物提供的热量的进食方式, 相对于以往弱视机制研究的干预方法, 属于一种无创的治疗方式。热量限制的研究过去局限于延长寿命, 延缓和预防糖尿病、高血压等许多与衰老相关的疾病。近年来越来越多的研究证实, 热量限制还能改善认知, 预防阿尔茨海默病等许多神经退行性疾病的发生<sup>[22-23]</sup>, 提高突触可塑性及学习、记忆能力<sup>[24]</sup>。本研究通过热量限制干预成年弱视模型小鼠, 比较各组小鼠视敏度、F-VEP、突触的超微结构来评估视皮层的可塑性变化。对于成功构建 MD 弱视模型的成年小鼠, 在给予 4 周的热量限制饲养后, 其视敏度、F-VEP P<sub>100</sub> 波的潜伏期及波幅均接近正常对照组小鼠, 视功能较 MD+自由进食组小鼠明显改善; 透射电子显微镜下观察结果显示, MD+热量限制组小鼠视皮层神经元突触间隙变窄、突触后致密物增厚, 表明热量限制促使视皮层可塑性相关机制重新启动, 使突触功能改善, 视功能恢复。本研究结果与 Spolidoro 等<sup>[13]</sup>的报道基本一致。

目前对于视皮层可塑性终止机制的假说主要包括: (1) 抑制性神经元的发育成熟导致视皮层神经回路中兴奋和抑制达到平衡; (2) 神经营养因子的表达下调导致神经元的寿命缩短; (3) 神经元细胞外基质发育成熟限制并固化了神经回路<sup>[19]</sup>。Spolidoro 等<sup>[13]</sup>研究发现, 短期的热量限制不会引起脑神经生长因子分泌的增加及神经元周围网络结构的改变, 其再激活



视皮层可塑性的机制主要是热量限制导致抑制性神经元  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 合成关键酶 GAD65 的表达下降,使 GABA 能系统功能减弱,打破视皮层回路中兴奋性神经元和抑制性神经元之间的平衡;此外,热量限制能降低组蛋白的乙酰化水平,改变染色体结构状态,增强 DNA 的转录水平,进而调控神经元的功能。本研究着重探讨 AMPK-SIRT1 能量通路参与热量限制对成年视皮层可塑性的再激活作用。AMPK 和 SIRT 均为体内调节能量代谢的关键分子,前者通过磷酸化下游的靶蛋白来调节物质代谢<sup>[21,25]</sup>,后者则是一类依赖于  $NAD^+$  的去乙酰化酶,属于抗衰老酶蛋白家族。热量限制时,机体内的 ADP/ATP、AMP/ATP 比例增高,导致 AMPK 被激活,通过磷酸化凋亡基因可抑制神经元的凋亡。本实验中 MD+自由进食组弱视小鼠视皮层中 AMPK 磷酸化水平下降,视敏度降低,而 MD+热量限制组小鼠视皮层中 AMPK 磷酸化水平显著上调,视敏度及 VEP 相应指标得到恢复,表明 AMPK 磷酸化水平与弱视的形成有关,而热量限制可能通过调节其磷酸化水平,影响视觉功能。此外,磷酸化的 AMPK 能激活 FOX3a、PGC-1 $\alpha$ 、SIRT 等信号通路<sup>[15,26]</sup>,发挥抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡等作用。FOX3a 属于叉头框转录因子家族的成员,具有调节细胞凋亡、调整细胞周期的作用,SIRT 能与之结合形成复合物,增强细胞周期的阻滞及 DNA 修复功能,并减弱 FOXO3 依赖的细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。AMPK-SIRT1 的激活可通过 FOX3a 途径减少神经元的凋亡,使视皮层双眼区保存相当数量的对剥夺眼反应的神经细胞,在去除被剥夺外界视觉经验的因素后,视皮层仍能对剥夺眼的外界刺激形成正常的神经回路,表现出正常的视功能。PGC-1 $\alpha$  是调控细胞代谢的一种核转录酶激活因子,参与调节线粒体的生物合成,能减轻线粒体的工作负荷,阻止线粒体途径介导的细胞凋亡<sup>[29-30]</sup>。AMPK 与 SIRT1 之间可以相互激活,增强效应的发挥:激活的 AMPK 可以通过上调 NAMPT 的表达,使  $NAD^+$  的合成增加,进而激活 SIRT1<sup>[31]</sup>,激活的 SIRT1 能通过增加 LKB1 (liver kinase B1) 的活性来激活 AMPK<sup>[32]</sup>。目前已发现热量限制能激活 AMPK-SIRT1 信号通路<sup>[12,15,33]</sup>,在机体内发挥重要的抗炎、抗氧化应激等作用。本研究中 Western blot 检测结果表明,MD 后自由进食可降低视皮质中 SIRT1 的表达,热量限制显著上调其表达的同时,也逆转了 MD 导致的视觉功能障碍。该研究结果在国内外文献中尚未见报道。

总之,热量限制是一种有效的再激活成年 MD 弱视小鼠视皮层可塑性的无创性干预措施,提示我们在

临床上可以尝试通过限制热量摄入的方式来治疗大龄及成年的弱视患者,但由于本实验中并未细化研究热量限制程度及维持时间与视功能改善的相关性,在临床上难以明确不同程度的弱视患者需要多大程度的热量限制模式、各自需要的维持时间以及恢复正常饮食后能否长期维持该疗效。此外,在进行热量限制治疗时,该如何有效地指导患者制定每日的饮食搭配,才能在限制热量的同时避免患者出现营养不良表现仍需进一步研究。另外,要求患者严格的执行热量限制是需要一定的毅力及自律性的,对患者的依从性要求较高。因此,在未来的研究中,我们需进一步细化对热量限制的研究,寻找可行的营养指导,并深入对其作用机制通路相关药物的研究,寻找能代替这种饮食限制途径并产生类似效应的干预药物。

## 参考文献

- [1] Sturm V. The lazy eye-contemporary strategies of amblyopia treatment [J]. Praxis (Bern 1994), 2011, 100 (4) : 229-235. DOI: 10. 1024/1661-8157/a00442.
- [2] 刘家琦,李凤鸣. 实用眼科学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2000: 690.
- [3] Hoyt CS. Amblyopia; a neuro-ophthalmic view [J]. J Neuroophthalmol, 2005, 25 (3) : 227-231.
- [4] Noorden GK. Mechanisms of amblyopia [J]. Adv Ophthalmol, 1977, 34 : 93-115.
- [5] Krahe TE, Medina AE. Activation of NMDA receptors is necessary for the recovery of cortical binocularity [J]. J Neurophysiol, 2010, 103 (5) : 2700-2706. DOI: 10. 1152/jn. 00442. 2009.
- [6] Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, et al. Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity [J]. J Neurosci, 2010, 30 (1) : 361-371. DOI: 10. 1523/JNEUROSCI. 2233-09. 2010.
- [7] Maya VJF, Sale A, Viegi A, et al. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex [J]. Science, 2008, 320 (5874) : 385-388. DOI: 10. 1126/science. 1150516.
- [8] Maya VJF, Tiraboschi E, Spolidoro M, et al. Serotonin triggers a transient epigenetic mechanism that reinstates adult visual cortex plasticity in rats [J]. Eur J Neurosci, 2011, 33 (1) : 49-57. DOI: 10. 1111/j. 1460-9568. 2010. 07488. x.
- [9] Taha SA, Stryker MP. Ocular dominance plasticity is stably maintained in the absence of alpha calcium calmodulin kinase II (alphaCaMK II) autophosphorylation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102 (45) : 16438-16442. DOI: 10. 1073/pnas. 0508185102.
- [10] McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935 [J]. Nutrition, 1989, 5 (3) : 155-172.
- [11] Pedersen WA, Wan R, Mattson MP. Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems [J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122 (9) : 963-983.
- [12] Fusco S, Pani G. Brain response to calorie restriction [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70 (17) : 3157-3170. DOI: 10. 1007/s00018-012-1223-y.
- [13] Spolidoro M, Baroncelli L, Putignano E, et al. Food restriction enhances visual cortex plasticity in adulthood [J/OL]. Nat Commun, 2011, 2 : 320 [2017-06-09]. <https://www.nature.com/articles/ncomms1323>. DOI: 10. 1038/ncomms1323.
- [14] Burkewitz K, Weir HJ, Mair WB. AMPK as a pro-longevity target [J]. EXS, 2016, 107 : 227-256. DOI: 10. 1007/978-3-319-43589-310.

- [15] 代洁, 张晓明, 林玲, 等. 能量敏感的 AMPK-SIRT1 通路与炎症调控 [J]. 生命科学, 2014, 26 (4) : 548-552. DOI: 10.13376/j.cbbs/2014053.  
Dai J, Zhang XM, Lin L, et al. Energy sensitive AMPK-SIRT1 pathway and the regulation of inflammation [J]. Chin Bulletin Life Sci, 2014, 26(4) : 548-552. DOI:10.13376/j.cbbs/2014053.
- [16] Dahlhaus M, Li KW, van der Schors RC, et al. The synaptic proteome during development and plasticity of the mouse visual cortex [J/OL]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10 (5) : M110.005413 [2017-06-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3098591/. DOI: 10.1074/mcp.M110.005413.
- [17] Maffei A, Nelson SB, Turrigiano GG. Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation [J]. Nat Neurosci, 2004, 7(12) : 1353-1359. DOI:10.1038/nn1351.
- [18] Drapeau E, Dorr NP, Elder GA, et al. Absence of strong strain effects in behavioral analyses of Shank3-deficient mice [J]. Dis Model Mech, 2014, 7(6) : 667-681. DOI:10.1242/dmm.013821.
- [19] 帖晓修, 蒋斌. 重新激活成年动物视皮层发育可塑性的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2012, 43 (6) : 471-474. DOI: 10.3969/j.issn.0559-7765.2012.06.015.
- [20] 王圆月, 刘向玲, 蒯静静, 等. 反转缝合与丰富环境联合干预对成年弱视大鼠视皮层可塑性的再激活作用 [J]. 中国斜视与小兒眼科杂志, 2014, (1) : 5-8, 54.  
Wang YY, Liu XL, Li JJ, et al. Effect of reverse suture combined with enriched environment intervention on the reactivation of ocular dominance plasticity in the visual cortex of monocular form deprived adult rats [J]. Chin J Strabismus Pediatr Ophthalmol, 2014, (1) : 5-8, 54.
- [21] McGee AW, Yang Y, Fischer QS, et al. Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor [J]. Science, 2005, 309(5744) : 2222-2226. DOI:10.1126/science.1114362.
- [22] Mattson MP, Chan SL, Duan W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior [J]. Physiol Rev, 2002, 82(3) : 637-672. DOI:10.1152/physrev.00004.2002.
- [23] Schroeder JE, Richardson JC, Virley DJ. Dietary manipulation and caloric restriction in the development of mouse models relevant to neurological diseases [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802 (10) : 840-846. DOI:10.1016/j.bbadis.2010.04.007.
- [24] Thrassivoulou C, Soubeyre V, Ridha H, et al. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons [J]. Aging Cell, 2006, 5 (3) : 247-257. DOI:10.1111/j.1474-9726.2006.00214.x.
- [25] Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern [J]. Chem Biol, 2012, 19(10) : 1222-1236. DOI:10.1016/j.chembiol.2012.08.019.
- [26] 张红胜, 周玥, 许菲. AMPK, SIRT1 与能量代谢 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(3) : 202-206.  
Zhang HS, Zhou Y, Xu F. AMPK, SIRT1, and energy metabolism [J]. Int J Pathol Clin Med, 2009, 29(3) : 202-206.
- [27] 徐俊, 黄秀兰. SIRT1-FoxO-自噬通路研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, (7) : 901-904. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2014.07.004.  
Xu J, Huang XL. Research progress on SIRT1-FoxO-autophagy pathway [J]. Chin Pharm Bulletin, 2014, (7) : 901-904. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2014.07.004.
- [28] 曹冬梅, 卢建. 叉头框 (Fox) 转录因子家族的结构与功能 [J]. 生命科学, 2006, 18(5) : 491-496.  
Cao DM, Lu J. The structure and function of forkhead (Fox) transcription factor family [J]. Chin Bulletin Life Sci, 2006, 18(5) : 491-496.
- [29] 陈芝芸, 李剑霜, 蒋剑平, 等. 胡柚皮黄酮对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝组织 SIRT1/PGC-1 $\alpha$  通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1) : 100-105. DOI:10.4268/cjcm20140120.  
Chen ZY, Li JS, Jiang JP, et al. Effect of pure total flavonoids from Citrus on hepatic SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway in mice with NASH [J]. CHN J Chin Mater Med, 2014, 39(1) : 100-105. DOI: 10.4268/cjcm20140120.
- [30] Pani G. Neuroprotective effects of dietary restriction: evidence and mechanisms [J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 40 : 106-114. DOI:10.1016/j.semedb.2015.03.004.
- [31] Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity [J]. Nature, 2009, 458(7241) : 1056-1060. DOI:10.1038/nature07813.
- [32] Lan F, Weikel KA, Cacicedo JM, et al. Resveratrol-induced AMP-activated protein kinase activation is cell-type dependent; lessons from basic research for clinical application [J/OL]. Nutrients, 2017, 9(7) : 751 [2017-08-03]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537865/. DOI:10.3390/nu9070751.
- [33] 蒲荣喜, 白川川, 解栋梁, 等. 热量限制通过 AMPK-SIRT1-线粒体通路延缓小鼠骨骼肌衰老 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(6) : 548-552. DOI:10.16016/j.1000-5404.201610056.  
Pu RX, Bai CC, Xie DL, et al. Calorie restriction delays skeletal muscle aging through AMPK-SIRT1-mitochondria pathway in mice [J]. J Third Milit Med Univer, 2017, 39(6) : 548-552. DOI:10.16016/j.1000-5404.201610056.

(收稿日期:2017-09-30 修回日期:2018-02-06)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

## 本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)