

· 实验研究 ·

小鼠视皮层发育过程中常规蛋白激酶 C γ 亚型的动态表达及单眼剥夺对其表达的影响

郝平 王静 韩松 李俊发 傅涛

100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(郝平、王静、傅涛);100730 北京,首都医科大学神经生物学系(韩松、李俊发)

通信作者:傅涛,Email:angelbjtr@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.002

【摘要】 背景 弱视的发生与中枢神经系统可塑性变化有关,我们先前的研究发现 synapsin 参与视皮层的突触可塑性过程,而神经元特异性蛋白——常规蛋白激酶 C γ 亚型(cPKC- γ)可能是 synapsin 的上游激酶之一,其在视觉发育可塑性中是否发挥或如何发挥作用尚未明确。目的 观察随着小鼠发育其视皮层中 cPKC- γ 表达水平的动态变化以及异常视觉经验对 cPKC- γ 表达水平的影响。方法 选取清洁级 C57BL/6 小鼠 36 只,分别于出生后(P)7、14、21、28、35、42 d 各选 6 只小鼠,取其两侧视皮层用于研究正常小鼠随鼠龄增加视皮层中 cPKC- γ 表达水平的变化。另外选取清洁级 C57BL/6 小鼠 24 只以随机数字表法随机分为发育期组和成年期组,每组 12 只。发育期组取 6 只 P14 小鼠行右眼上下睑缝合术以制备单眼剥夺(MD)模型,其余 6 只小鼠不进行干预作为对照,至 P28 取小鼠左右两侧视皮层;成年期组取 6 只 P60 小鼠以同样方法制备 MD 模型,其余 6 只不作干预作为对照,至 P74 取小鼠两侧视皮层。采用 Western bolt 法检测小鼠两侧视皮层内 cPKC- γ 蛋白的表达变化。结果 正常 P7 小鼠可见左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白的微弱表达,表达量的相对值分别为(39.74±11.22)%和(40.78±10.37)%,随鼠龄增加 cPKC- γ 蛋白的表达量逐渐增加;P21 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达量达峰值,分别为(138.68±15.73)%和(138.47±23.48)%,此后随鼠龄增加 cPKC- γ 蛋白的表达量逐渐减少并稳定。不同鼠龄正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达量的总体比较差异有统计学意义($F_{\text{鼠龄}}=57.174, P=0.000$),各组小鼠左侧与右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达量的总体比较差异无统计学意义($F_{\text{左右}}=0.059, P=0.809$)。发育期组 MD 小鼠与成年期组 MD 小鼠间左右侧视皮层中 cPKC- γ 表达量的总体比较差异无统计学意义($F_{\text{鼠龄}}=1.798, P=0.159$),各组 MD 小鼠与正常对照小鼠间左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达量总体比较差异无统计学意义($F_{\text{分组}}=0.104, P=0.749$)。结论 正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达量的变化趋势与视觉发育可塑性关键期相一致;MD 对小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达量无明显影响,但是否对 cPKC- γ 蛋白的活性产生影响仍需进一步研究。

【关键词】 视皮层/生理;神经元可塑性/生理;突触/生理;单眼剥夺;近交系 C57BL 小鼠;常规蛋白激酶 C γ 亚型

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600688);北京市自然科学基金项目(7132057);北京市优秀人才培养计划项目(2010D003034000007);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2015-3-013)

Dynamic expression of conventional protein kinase C- γ with development of visual cortex and effect of monocular deprivation on it in mice Xi Ping, Wang Jing, Han Song, Li Junfa, Fu Tao

Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Ophthalmology & Visual Science Key Lab, Beijing 100730, China (Xi P, Wang J, Fu T); Department of Neurology, Capital Medical University, Beijing 100730, China (Han S, Li JF)

Corresponding author: Fu Tao, Email: angelbjtr@126.com

【Abstract】 **Background** Plasticity of visual system is one of the mechanisms of deprivation amblyopia. Our previous study showed that synapsin plays a role during visual developmental plasticity, and conventional protein kinase C- γ (cPKC- γ) probably is one of upstream kinases of synapsin. However, whether or how the cPKC- γ plays its effects on visual developmental plasticity is below understood. **Objective** This study was to investigate the dynamic expression of cPKC- γ in visual cortex of normal mice and explore the effects of abnormal visual experience on cPKC- γ expression. **Methods** The bilateral visual cortex tissues were obtained from 36 clean C57BL/6 mice at

postnatal (P) 7, 14, 21, 28, 35, 42 days respectively and 6 mice for each for the researching of cPKC- γ dynamical expression in visual cortex over aging. Other 24 C57BL/6 mice were randomized into developmental phase group and adult phase group, 12 for each group. The monocular deprived (MD) models were established by suturing the upper and inferior eyelids in P14 mice for 14 days in 6 mice in the developmental phase group and 6 healthy mice served as controls, and MD models were established in the same way in 6 P60 mice in the adult phase group, and the same aged mice (6 mice) were used as controls. The mice were sacrificed and bilateral visual cortexes were obtained. The expression of cPKC- γ protein in the visual cortex was quantitatively detected using Western blot assay. The study protocol was approved by Ethic Committee of Tongren Eye Hospital. The use and care of the experimental mice followed the ARVO Statement. **Results** The cPKC- γ protein was faintly expressed in visual cortex in normal P7 mice, with the related expressing level of $(39.74 \pm 11.22)\%$ and $(40.78 \pm 10.37)\%$ in the left and right cortex, respectively. The expressing level of cPKC- γ protein was gradually increased over aging, with the peak value of $(138.68 \pm 15.73)\%$ and $(138.47 \pm 23.48)\%$ in P21 mice. A significant difference was found in the expression of cPKC- γ protein in various ages of mice ($F_{age} = 57.174, P = 0.000$), and the expression of cPKC- γ protein was not significantly different between the left and right visual cortexes ($F_{lateral} = 0.059, P = 0.809$). No significant differences were found in the expression of cPKC- γ protein on bilateral visual cortexes among the mice of the developmental phase group and adult phase group ($F_{age} = 1.798, P = 0.159$) or among the MD group and normal control group ($F_{group} = 0.104, P = 0.749$). **Conclusions** The dynamic expression of cPKC- γ in the visual cortex of normal mice presents a consistent trend with the aging and development of visual critical period. MD does not affect the expression of cPKC- γ protein in bilateral visual cortexes. Further researches should be performed in the activity of cPKC- γ protein in MD mice.

[Key words] Visual cortex/physiology; Neuronal plasticity/physiology; Synapses/physiology; Monocular deprive; Mice, inbred C57BL; Conventional protein kinase C- γ

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30600688); Beijing Natural Science Foundation (7132057); Outstanding Talent Cultivation Plan of Beijing (2010D003034000007); High Level Technical Personnel Training Plan of Beijing Municipal Health System (2015-3-013)

研究表明,在人类和哺乳动物中,视皮层神经元在发育期和成年后分别存在经验相关、刺激和强化相关结构和功能的可塑性,即视觉发育可塑性^[1],当人类和哺乳动物接近成年时,视觉系统的可塑性就基本终止了,但有研究显示视觉系统的可塑性在接近成年时是受到了抑制而非终止^[2]。小鼠视觉发育可塑性的关键期约是出生后 4 周,随后视皮层可塑性迅速消失^[3]。一般认为,视觉发育可塑性关键期是由兴奋性突触和抑制性突触发育的不同步造成的,随着突触回路的成熟,关键期即终止^[4]。已有研究证实 N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体、氨基磷酸(aminomethylphosphonic acid, AMPA)受体、细胞外介质、神经营养素等多种物质可调节视皮层神经元的可塑性^[5]。本课题组曾对小鼠视皮层中突触蛋白 synapsin 进行研究,发现 synapsin 参与视皮层的突触可塑性过程^[6-7],而神经元特异性蛋白——常规蛋白激酶 C γ 亚型(conventional protein kinase C- γ , cPKC- γ)可能是 synapsin 的上游激酶之一^[8-9],但 cPKC- γ 在视觉发育可塑性中是否发挥作用及其作用机制目前尚未明确^[10-11]。本研究旨在观察正常发育小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达的动态变化及异常视觉经

验是否对 cPKC- γ 的表达产生影响,探讨 cPKC- γ 是否参与视觉发育可塑性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康新生 C57BL/6 小鼠 60 只(首都医科大学动物部提供),雌雄不限,正常屏障环境饲养,室温 20 ~ 26 °C,相对湿度为 40% ~ 70%, 12 h 光照/黑暗交替环境,符合医学实验动物环境设施要求。实验动物的喂养和使用遵循 ARVO 有关动物使用的条款。本研究经首都医科大学附属北京同仁医院伦理委员会审查批准(伦审号:AEEI-2016-101)。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗鼠 cPKC- γ 单克隆抗体(sc-211,美国 Santa Cruz 公司);鼠抗 β -actin 单克隆抗体(AC-15,美国 Sigma-Aldrich 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠二抗(ZB2301/ZB2305,北京中杉金桥生物技术有限公司);蛋白酶抑制剂(亮肽素、抑胃肽素、抑肽素 A、胰凝乳蛋白酶抑制剂)、磷酸酶抑制剂(KF、冈田酸、焦磷酸钠)、乙基苯基聚乙二醇(nonidet P40, NP-40)、二硫代苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,

EDTA)、乙二醇乙胺醚四乙酸(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)、SDS(美国 Sigma 公司);ECL 反应底物(美国 Bio-Rad 公司);BCA 蛋白定量检测试剂盒(美国 Pierce 公司)。Gel Doc 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

从 60 只小鼠中任意取 36 只正常小鼠,分别于出生后 7、14、21、28、35、42 d 各处死 6 只,以观察不同鼠龄正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达变化;然后采用随机数字表法将其余 24 只小鼠随机分为出生后(postnatal, P)28 d 的发育期组和 P60 的成年期组,每组 12 只小鼠,每组各取 6 只小鼠行右眼单眼形觉剥夺(monocula deprivation, MD)作为发育期 MD 组或成年期 MD 组,每组的其余 6 只小鼠作为正常对照组。发育期组小鼠自生后 14 d 开始行 MD,成年期组小鼠于生后 60 d 开始行 MD,各组小鼠饲养环境相同。于 MD 后 14 d 采取断颈法处死各组小鼠,依据《小鼠大脑立体定位图谱》、参照文献[12]的方法取小鼠两侧视皮层, -80°C 冰箱中冻存备用。

1.2.2 MD 动物模型的制备

小鼠用质量分数 1% 戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉(药物剂量为 0.06 g/kg)后固定于实验台,右眼睑用体积分数 70% 乙醇消毒。剪除睑缘周围毛发,自内眦至外眦剪除上下睑缘组织,宽度为 0.5 ~ 1.0 mm,以生理盐水冲洗,8-0 丝线行上下眼睑缝合。术毕涂抹红霉素眼膏。术后每日涂抹红霉素眼膏并检查局部反应,有局部感染或缝线脱落者剔除并及时补充样本。

1.2.3 Western blot 法检测视皮层组织中 cPKC- γ 蛋白的表达

取 1.2.1 部分保存备用的视皮层组织,加入全细胞裂解液匀浆,用超声法使所有组织细胞全部溶解,用 BCA 法进行总蛋白定量测定,配制成蛋白质量浓度为 4 g/L 的电泳样品, -20°C 保存。取 5 μl (20 μg) 总蛋白,用质量分数 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳结束后,在 400 mA 电流、 4°C 条件下转膜 1 h 至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜上,用质量分数 10% 脱脂奶粉封闭 NC 膜 1 h,以 TTBS (20 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5; 0.15 mmol/L NaCl; 体积分数 0.05% Tween-20)漂洗 3 次,每次 10 min。室温下加入 cPKC- γ (1 : 1 000) 和 β -actin (1 : 10 000) 一抗孵育 1 h, TTBS 漂洗 3 次,每次 10 min;加入 HRP 标记的相应二抗(1 : 4 000)室温孵育 1 h;用 TTBS 漂洗 NC 膜 3 次,每次 10 min。加入 ECL 试剂反应 5 min,保鲜膜包裹,暗室曝光。所得结果均用 Gel Doc 凝胶成像系统扫描,应用 Quantity One 分析软件进行半定量分

析,以 cPKC- γ / β -actin 相对灰度值代表 cPKC- γ 相对表达量。以 P42 小鼠视皮层中 cPKC- γ 的相对表达量作为 100%,计算不同鼠龄小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达量的相对值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据资料经 Levene 检验证实方差齐。采用随机分组多水平协方差研究设计,不同鼠龄正常小鼠双侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白相对表达量变化的总体差异比较、发育期组和成年期组 MD 小鼠和正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用两因素方差分析,组间多重比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同鼠龄的正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达变化

正常小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达水平随鼠龄的增长发生变化, P7 小鼠左右侧视皮层均可见微弱 cPKC- γ 表达条带,随着鼠龄增加其表达强度逐渐增加, P21 小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达最强(图 1)。不同鼠龄的正常小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 表达量的总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{鼠龄}} = 57.174$, $P = 0.000$)。与 P7 小鼠比较, P14、P21、P28、P35、P42 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 表达量均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); P21 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 表达量均明显高于 P14 小鼠,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), P28 和 P35 小鼠左右侧视皮层内 cPKC- γ 表达量与 P14 小鼠接近,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), P42 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 表达量与 P35 和 P28 时比较差异均无统计学意义 (P35: 均 $P = 1.000$; P28: 左侧 $P = 0.176$, 右侧 $P = 1.000$)。不同鼠龄小鼠左右侧视皮层内 cPKC- γ 表达水平总体比较差异无统计学意义 ($F_{\text{左右}} = 0.059$, $P = 0.809$) (表 1)。

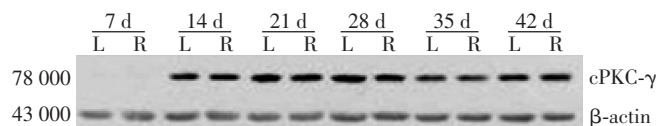


图 1 Western blot 法检测的不同鼠龄正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达量的动态变化 可见 P7 小鼠视皮层中 cPKC- γ 呈微弱表达,随鼠龄增加表达条带增强, P21 小鼠表达条带最强, P28 至 P42 小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达条带逐渐减弱并趋于稳定 L: 左侧; R: 右侧; cPKC- γ : 常规蛋白激酶 C γ 亚型

表 1 发育期正常小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达量的相对值比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

鼠龄	样本量	两侧视皮层中 cPKC- γ 表达量	
		左侧	右侧
P 7	6	39.74 \pm 11.22	40.78 \pm 10.37
P 14	6	118.28 \pm 8.56 ^a	121.01 \pm 15.82 ^a
P 21	6	138.68 \pm 15.73 ^{ab}	138.47 \pm 23.48 ^{ab}
P 28	6	121.25 \pm 24.77 ^{ac}	115.04 \pm 27.21 ^{ac}
P 35	6	100.72 \pm 8.21 ^{ac}	109.01 \pm 16.55 ^{ac}
P 42	6	100.00 \pm 0.00 ^{abcd}	100.00 \pm 0.00 ^{abcd}

注: $F_{鼠龄} = 57.174, P = 0.000; F_{左右} = 0.059, P = 0.809$ 。与 P7 比较, ^a $P < 0.05$; 与 P14 比较, ^b $P < 0.05$; 与 P21 比较, ^c $P < 0.05$; 与 P28 比较, ^d $P < 0.05$ (两因素方差分析, Bonferroni 检验) cPKC- γ : 常规蛋白激酶 C γ 亚型; P: 出生后

2.2 MD 小鼠与正常小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达量的比较

Western blot 法检测显示,发育期正常小鼠与发育期 MD 小鼠、成年期正常小鼠与成年期 MD 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达强度均接近。发育期组 MD 小鼠与成年期组 MD 小鼠间左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达条带强度接近 (图 2)。发育期组 MD 小鼠与成年期组 MD 小鼠间左右侧视皮层中 cPKC- γ 表达量的总体比较差异无统计学意义 ($F_{鼠龄} = 1.798, P = 0.159$), 各组 MD 小鼠与正常对照小鼠间左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达量总体比较差异无统计学意义 ($F_{分组} = 0.104, P = 0.749$) (表 2)。

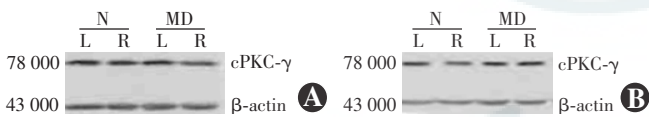


图 2 MD 小鼠与正常对照小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达量的比较 A: 发育期正常小鼠与发育期 MD 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达强度均接近 B: 成年期正常小鼠与成年期 MD 小鼠左右侧视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达条带强度接近 N: 正常对照; MD: 单眼剥夺; L: 左侧; R: 右侧; cPKC- γ : 常规蛋白激酶 C- γ 亚型

表 2 不同鼠龄 MD 小鼠与正常对照小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	发育期小鼠 cPKC- γ 表达量		成年期小鼠 cPKC- γ 表达量	
		左侧	右侧	左侧	右侧
正常对照组	6	1.245 \pm 0.162	1.291 \pm 0.141	1.306 \pm 0.108	1.322 \pm 0.143
MD 组	6	1.224 \pm 0.136	1.287 \pm 0.140	1.285 \pm 0.080	1.208 \pm 0.107

注: $F_{分组} = 0.104, P = 0.749; F_{鼠龄} = 1.798, P = 0.159$ (两因素方差分析) MD: 形觉剥夺; cPKC- γ : 常规蛋白激酶 C γ 亚型

3 讨论

cPKC- γ 是蛋白激酶 C 家族亚型之一,具有神经特异性,主要表达于大脑皮层和脊髓的神经元中^[13]。既

往有研究者用 cPKC- γ 敲除小鼠研究 cPKC- γ 蛋白参与长时程增强效应和长时程抑制效应的作用机制,发现 cPKC- γ 蛋白可能参与神经元可塑性过程,但这种参与过程是非必需的^[11]。神经颗粒素 (neurogranin, Ng) 在神经元可塑性中发挥作用,在高钾环境下, cPKC- γ 是唯一能够磷酸化 Ng 的蛋白激酶,而 Ng 已被证实在神经元可塑性中发挥重要作用^[10]。Synapsin 作为一种突触前神经元特异性蛋白,在神经元增生、轴突分化及突触的成熟过程中起重要作用^[14],而我们的前期研究也已证实 cPKC- γ 与 synapsin 在小鼠脑皮层中存在相互作用^[8-9]。

Roisin 等^[15]采用 Western blot 法对 Wistar 大鼠海马细胞中的 cPKC- γ 进行检测,发现 cPKC- γ 在胚胎期海马皮层中无表达,在 P4 海马皮层中开始表达,在 P7 海马皮层中表达快速增加,直至成年。这与本研究对正常发育期小鼠视皮层中 cPKC- γ 检测所得的表达趋势不一致。本研究结果显示, P7 小鼠视皮层中已有少量 cPKC- γ 表达,之后随着鼠龄增加,视皮层中 cPKC- γ 表达快速增加, P21 小鼠视皮层中 cPKC- γ 表达达高峰,之后随鼠龄增加 cPKC- γ 表达下降并稳定,直至成年,这 2 个结果的不一致可能与出生后不同脑皮层区域的发育和功能有关,也提示 cPKC- γ 在体内和体外表达水平可能不同。

研究已证实小鼠视觉发育关键期在出生后 4 周达高峰^[3],本研究表明,在小鼠视觉发育关键期的视皮层中 cPKC- γ 表达达高峰,之后逐渐下降,提示 cPKC- γ 可能参与视觉发育可塑性的调节过程。此外,小鼠视皮层中 cPKC- γ 蛋白的表达趋势与本研究前期研究所得的 synapsin 磷酸化水平 (p-synapsin) 的发育期表达趋势一致^[7],提示 cPKC- γ 可能通过 synapsin 的磷酸化过程参与视皮层发育。本研究还发现, cPKC- γ 在小鼠视皮层中的表达不受 MD 的影响,考虑其原因可能为: (1) 研究证实 cPKC- γ 在视皮层的发育过程中并不起作用或不起关键作用^[11]; (2) MD 不影响小鼠视皮层中 cPKC- γ 的表达,但是影响 cPKC- γ 的激活水平; (3) 小鼠视交叉神经纤维弥补了 cPKC- γ 的表达变化。

综上所述,本研究发现正常发育期小鼠视皮层中 cPKC- γ 的表达趋势与小鼠视觉发育可塑性关键期及小鼠视皮层中 synapsin 的表达一致,这 2 种因子表达在时空上的重叠进一步提示了小鼠视觉发育可塑性关键期 cPKC- γ 与 synapsin 的相互作用,即 cPKC- γ 可能是 synapsin 的上游激酶之一,可调控 synapsin 的磷酸化状态以及神经递质的释放,从而共同在视觉发育可塑性中发挥作用^[8-9]。由于 cPKC- γ 需进行磷酸化修

饰后才具有活性^[16-18],因此 MD 对 cPKC- γ 的蛋白表达量无明显影响,但 MD 是否对 cPKC- γ 的活性或功能产生影响仍有待进一步研究。

参考文献

[1] Sur M, Nagakura I, Chen N, et al. Mechanisms of plasticity in the developing and adult visual cortex [J]. Prog Brain Res, 2013, 207 : 243-254. DOI:10.1016/B978-0-444-63327-9.00002-3.

[2] Holmes JM, Lazar EL, Melia BM, et al. Effect of age on response to amblyopia treatment in children[J]. Arch Ophthalmol, 2011, 129(11) : 1451-1457. DOI:10.1001/archophthalmol.2011.179.

[3] Gordon JA, Stryker MP. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse [J]. J Neurosci, 1996, 16(10) : 3274-3286.

[4] Kushner SA, Elgersma Y, Murphy GG, et al. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway [J]. J Neurosci, 2005, 25(42) : 9721-9734. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2836-05.2005.

[5] Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, et al. Molecular basis of plasticity in the visual cortex [J]. Trends Neurosci, 2003, 26(7) : 369-378. DOI: 10.1016/S0166-2236(03)00168-1.

[6] Fu T, Su Q, Xi P, et al. Monocular deprivation delays the dynamic changes of phosphorylated synapsin Ia/b at site-1 in contralateral visual cortex of juvenile mice [J]. Neurochem Res, 2015, 40(3) : 524-530. DOI:10.1007/s11064-014-1492-y.

[7] 苏庆, 韩松, 郗平, 等. Synapsin 在正常发育小鼠视皮层的表达 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(5) : 388-391. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.05.002.

Su Q, Han S, Xi P, et al. Expression of synapsin in visual cortex of developing mice [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(5) : 388-391. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.05.002.

[8] Rebas E, Lachowicz L, Lachowicz A. Estradiol modulates the synapsins

phosphorylation by various protein kinases in the rat brain under *in vitro* and *in vivo* conditions [J]. J Physiol Pharmacol, 2005, 56(1) : 39-48.

[9] Zhang N, Yin Y, Han S, et al. Hypoxic preconditioning induced neuroprotection against cerebral ischemic injuries and its cPKC γ -mediated molecular mechanism [J]. Neurochem Int, 2011, 58(6) : 684-692. DOI:10.1016/j.neuint.2011.02.007.

[10] Ramakers GM, Gerendasy DD, de Graan PN. Substrate phosphorylation in the protein kinase C gamma knockout mouse [J]. J Biol Chem, 1999, 274(4) : 1873-1874.

[11] Abeliovich A, Chen C, Goda Y, et al. Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice [J]. Cell, 1993, 75(7) : 1253-1262.

[12] 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 [2016-07-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398567>. DOI: 10.1074/mcp.M110.005413.

[13] Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily [J]. Biochem J, 1998, 332 (Pt 2) : 281-292.

[14] Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, et al. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity [J]. Prog Neurobiol, 2010, 91(4) : 313-348. DOI:10.1016/j.pneurobio.2010.04.006.

[15] Roisin MP, Barbin G. Differential expression of PKC isoforms in hippocampal neuronal cultures; modifications after basic FGF treatment [J]. Neurochem Int, 1997, 30(3) : 261-270.

[16] Johnson LN, Lewis RJ. Structural basis for control by phosphorylation [J]. Chem Rev, 2001, 101(8) : 2209-2242.

[17] Taylor SS, Radzio-Andzelm E. Three protein kinase structures define a common motif [J]. Structure, 1994, 2(5) : 345-355.

[18] Johnson LN, Noble ME, Owen DJ. Active and inactive protein kinases; structural basis for regulation [J]. Cell, 1996, 85(2) : 149-158.

(收稿日期:2016-10-24)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊对一稿两投的处理

作者投稿请勿一稿两投或一稿多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后,稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用,本刊将做出如下处理:(1)在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并在中华医学会系列杂志上通报。(2)向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3)2年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

文章未在公开发表物上发表者、以不同文字分别投往国外期刊和国内期刊以供不同受众者阅读者不属于一稿两投的行为,但本刊严格遵照国际医学期刊编辑委员会《国际生物医学期刊投稿统一要求》(http://www.icmje.org/urm_main.html),属于以不同语言文字二次发表者,请作者在首次接受稿件的期刊发表后1周再另行投稿,并请提供首次发表期刊同意以不同语言发表的同意函。

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1)知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2)医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或1975年赫尔辛基宣言(2005年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

(本刊编辑部)