

· 实验研究 ·

# 丰富环境对成年弱视大鼠视皮层 17 区 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚基的影响

万晓梅 宫华青

山东第一医科大学(山东省医学科学院) 山东省眼科研究所 省部共建-山东省眼科学重点实验室 青岛眼科医院, 青岛 266071

通信作者: 宫华青, Email: hqgong01@163.com

**【摘要】** 目的 研究丰富环境(EE)对关键期后的单眼形觉剥夺性弱视大鼠视皮层 17 区 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚基 2A(NMDA-NR2A)和 NMDA-NR2B 蛋白水平的影响,探讨 EE 对弱视视皮层突触可塑性的影响。方法 选取出生后 2 周龄的 Wistar 大鼠 80 只,按照随机数字表法分为正常对照组和实验组。实验组在整个关键期内行右侧眼睑缝合,制作单眼形觉剥夺(MD)弱视模型。45 日龄时按照随机数字表法将实验组大鼠分为弱视组、标准环境组(SE 组)和 EE 组,其中 SE 组和 EE 组于 46 日龄时打开右侧眼睑。60、75 和 105 日龄时各组取 3 只大鼠,全身麻醉后行多聚甲醛心脏灌注,剪刀于颈部端头,取左侧大脑视皮层 17 区。采用苏木精-伊红染色观察大脑视皮层 17 区的分层,并采用免疫组织化学法检测在关键期后不同时期每组大鼠 NMDA-NR2A 和 NMDA-NR2B 的蛋白在大脑视皮层中的分布及表达。应用 Image-Pro plus 6.0 分析软件对实验产生的阳性反应产物进行累计吸光度(A)值检测。结果 光学显微镜下视皮层 17 区均可见 NMDA-NR2A 和 NMDA-NR2B 染色阳性细胞,多呈圆形或椭圆形,主要位于细胞膜。60、75 和 105 日龄各组大鼠视皮层 17 区 NMDA-NR2A 表达总体比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。各时间点弱视组阳性细胞较正常对照组少;EE 组阳性细胞较正常对照组少,较弱视组多。EE 组 60、75 和 105 日龄 NMDA-NR2A 表达较 SE 组增强,但并未达到正常对照组水平,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。60、75 和 105 日龄各组大鼠视皮层 17 区 NMDA-NR2B 表达总体比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。各时间点弱视组阳性细胞较正常对照组多;60 日龄 EE 组阳性细胞较正常对照组多,75 日龄和 105 日龄和正常对照组接近。EE 组 60 日龄 NMDA-NR2B 在视皮层的表达较 SE 组减弱,但并未达到正常对照组水平,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。EE 组 75 日龄和 105 日龄时 NMDA-NR2B 表达量较 SE 组减弱,与正常对照组比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。结论 视觉系统的可塑性不但存在于视觉发育的关键期以前,且在关键期之后视觉系统的可塑性仍然存在。作为一种非侵入性的干预方法,EE 能通过改变 NMDA-NR2A 和 NMDA-NR2B 在视皮层中的表达使成年弱视大鼠的可塑性得以改善和恢复。

**【关键词】** 弱视; 视皮层; 突触; 丰富环境; N-甲基-D-天冬氨酸受体

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.002

## Effects of enriched environment on the subunits N-methyl-D-aspartate receptors at the 17th area of the visual cortex in adult amblyopia rats

Wan Xiaomei, Gong Huaqing

Qingdao Eye Hospital, State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Shandong First Medical University &amp; Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Gong Huaqing, Email: hqgong01@163.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of enriched environment on the level of NR2A and NR2B subunits of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors which belong to glutamate receptors with excitability at the 17th area of the visual cortex in amblyopia rats after the critical period, and to understand the possible mechanism of synaptic plasticity of the visual cortex in adult amblyopia rats. **Methods** Eighty Wistar rats were divided into normal group and experimental group by random number table. Right eyelids of all rats were sutured through the whole

critical period in order to establish monocular deprivation (MD) amblyopia model. The rats in experimental group were divided into the amblyopia group, standard environment (SE) group and environmental enrichment (EE) group on P45 in random. The sutured right eyelids were opened on P46 in the SE group and EE group. All rats were sacrificed to get the 17th area of the left visual cortex on P60, P75 and P105. Three rats were used at different time points from each group. The I-VI layers of the visual cortex area 17 were observed by using hematoxylin-eosin staining. The expression of NMDA-NR2A and NMDA-NR2B was detected by immunohistochemistry. Integrated optical density of NMDA-NR2A and NMDA-NR2B was detected by using special image analysis software (Image-Pro Plus 6.0). The use of animals complied with Regulation on the Management Experimental Animals from Shandong Eye Institute and Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). **Results** The positive expression of NMDA-NR2A and NMDA-NR2B were observed in the visual cortex. The positive cells were mostly round or elliptical and mainly expressed in cell membrane. The expression of NMDA-NR2A in P60, P75 and P105 from four groups had statistical differences (all at  $P < 0.05$ ). There were less positive cells in amblyopia group and EE group than normal control group on P60, P75 and P105, while there were more positive cells in EE group than amblyopia group. Amblyopia can lead to reduced NMDA-NR2A expression in the visual cortex. The expression of NMDA-NR2A was stronger than that in the amblyopia group by intervention 15 days, 30 days, and 60 days with the rich environments, but did not reach the normal level (all at  $P < 0.05$ ). The expression of NMDA-NR2B in P60, P75 and P105 from four groups also had statistical difference (all at  $P < 0.05$ ). There were more positive cells in amblyopia group than those in normal control group on P60, P75 and P105. There were more positive cells in EE group than normal control group on P60, while there were equal positive cells in EE group and normal control group on P75 and P105. Amblyopia can lead to increase NMDA-NR2B expression in the visual cortex. The expression of NMDA-NR2B was weaker than that in the amblyopia group by intervention 15 days with the rich environments, but did not reach the normal level (all at  $P < 0.05$ ). The expression of NMDA-NR2B after intervention 30 days and 60 days reached the normal levels (all at  $P > 0.05$ ). **Conclusions** The plasticity of visual cortex exists not only in the critical period but also after the critical period of visual development. EE, as a non-invasion method, can improve and recover the synaptic plasticity in visual cortex of adult rats by the expression of NMDA-NR2A and NMDA-NR2B.

**[Key words]** Amblyopia; Visual cortex; Synapse; Enriched environment; N-methyl-D-aspartate receptors  
DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.002

弱视导致患者视力低下,且无法形成健全的双眼视功能,给患者及家庭造成负担。随着社会的进步和生活水平的提高,学龄前儿童视力筛查工作逐步完善,大部分弱视儿童在关键期以前得到精确配镜、遮盖优势眼和弱视训练等治疗。部分经济欠发达地区,视力普查及防治工作相对较落后,弱视未在关键期以前进行筛查和治疗,从而贻误治疗时机,出现大龄青少年和成年弱视患者。人类和哺乳动物接近成年,视觉系统可塑性基本终止。因此,这部分弱视患者往往被放弃治疗。几十年来,对于视皮层可塑性的研究逐步开展。研究表明,N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体在视皮层突触可塑性中起重要作用,关键期后 NMDA 受体功能的下调可能是导致视觉可塑性难以恢复的重要因素<sup>[1]</sup>。丰富环境(environmental enrichment, EE)作为一种非侵入性干预的研究,可显著促进脑部神经的发育和脑损伤的修复。研究发现,大鼠暴露于 EE 下海马区神经元的再生增加。EE 也可诱导成年大鼠神经元再生,其再生数量较标准环境(standard environment, SE)下大鼠多 4 倍<sup>[2]</sup>。本研究

对视觉发育关键期后的成年弱视大鼠进行 EE 干预,应用免疫组织化学法对大鼠视皮层 17 区的 NMDA 受体进行检测,对视觉发育关键期后的突触可塑性机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及其分组** 健康成年 Wistar 大鼠 10 对(青岛市药物检验所实验动物中心),体质量约 300 g,进行交配。将生后 2 周龄的未睁眼幼鼠 80 只,按照随机数字表法分为正常对照组和实验组。所有大鼠均饲养于山东省眼科学重点实验室暨省部共建国家重点实验室培育基地实验动物中心,动物的使用符合美国视觉和眼科研究协会(Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO)关于在视觉和眼科研究中动物使用宣言的规定。

选取生后未睁眼的 2 周龄 Wistar 大鼠 80 只,按照随机数字表法分为正常对照组(20 只)和实验组(60 只)。正常对照组大鼠分别饲养至 60、75 和 105 日龄

时取材。实验组在整个关键期内缝合右侧眼睑,制作单眼形觉剥夺(monocular deprivation, MD)弱视动物模型,于 45 日龄时随机将弱视大鼠分为弱视组、SE 组和 EE 组。弱视组大鼠保持睑裂缝合至 60、75 和 105 日龄取材。SE 组大鼠于 46 日龄打开缝合的右眼并饲养于 SE 至 60、75 和 105 日龄取材。EE 组大鼠于 46 日龄打开缝合的右眼并饲养于 EE 至 60、75 和 105 日龄取材。每组每个时间点 3 只大鼠,取左侧视皮层 17 区。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 兔来源 NMDA-NR2A 多克隆抗体、兔来源 NMDA-NR2B 多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);盐酸氯胺酮注射液(100 mg/ml)、盐酸氯丙嗪注射液(50 mg/ml)(上海禾丰制药有限公司);质量分数 0.5% 爱尔凯因滴眼液(美国 Alcon 公司);质量分数 0.3% 氧氟沙星眼膏(沈阳兴齐制药厂)。手术显微镜(德国 Zeiss 公司);立体定位仪(安徽正华生物仪器设备有限公司,江湾 I 型 C);石蜡切片机(美国 Thermo 公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司);显微齿镊、显微持针器、角巩膜剪、眼科剪(苏州六六医疗器械有限公司);6-0 可吸收缝线(美国 Alcon 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 MD 弱视模型的制作** 按照 120 mg/kg 的剂量,采用氯胺酮和氯丙嗪混合液大鼠腹腔内注射,0.5% 爱尔凯因滴眼液点眼。麻醉后常规消毒,剪除睑缘周围毛发,从内眦部至外眦部剪除上下睑缘各约 1 mm 的皮肤,用 6-0 可吸收缝线对眼行分层对位缝合。所有大鼠均右眼手术。术后每天右眼涂氧氟沙星眼膏预防感染,检查缝线是否脱落。如有脱落及时缝合。

**1.2.2 SE 与 EE 的设置** SE 是根据国家标准实验动物环境要求设置,笼容积为 35 cm×25 cm×20 cm,内置 2~4 只大鼠,笼中不设任何物体,不进行任何形式的干预。EE 是参照 Mora 等<sup>[3]</sup>的方法,采用孔径 1.5 mm 丝网制成的笼子,容积为 120 cm×100 cm×60 cm,内置 8~12 只大鼠,内设孔径 3 mm 的丝网制成的平台和斜坡、不同大小和颜色的球、不同形状的管道、盘子、木块、轮转和秋千等,且每周更换笼内物品和布局。

**1.2.3 取材及标本的处理** 将各组 60、75 和 105 日龄大鼠全身麻醉下行质量分数 4% 多聚甲醛心脏灌注,直至全身组织器官变硬、颈项僵直。将大鼠头部水平放置于江湾 I 型 C 立体定位仪上,参照大鼠脑立体定位图谱<sup>[4]</sup>,取左侧大脑视皮层 17 区,将取下的大脑视皮层 17 区放入 4% 多聚甲醛中固定 24~48 h。流

水冲洗后放于中性固定液中固定 24 h,冲洗 30 min,不同质量分数乙醇梯度脱水,透明液 I、透明液 II 各浸泡 30 min,石蜡 I(熔点 49~53 °C/30 min)、石蜡 II(熔点 58~60 °C/1 h)浸蜡、包埋。包埋后各组织块连续 4 μm 厚冠状切片,烘干后分别行苏木精-伊红染色和免疫组织化学检测。

**1.2.4 视皮层 17 区苏木精-伊红染色** 从烤箱(60 °C/60 min)中取出玻片,分别置于脱蜡液 I、脱蜡液 II、脱蜡液 III 内各浸泡 15 min,无水乙醇、体积分数 95% 乙醇、75% 乙醇各浸泡 30 s,清水漂洗 2 遍,苏木素染色 10 min,水洗 2 遍,伊红染色 1 min,水洗 1 遍,75% 和 95% 乙醇各浸泡 5 s,无水乙醇浸泡 20 s。中性树胶封片,光学显微镜下观察视皮层 17 区分层。

**1.2.5 免疫组化法检测视皮层 17 区 NMDA-NR2A 和 NMDA-NR2B 的蛋白表达** 从烤箱(60 °C/60 min)中取出玻片,分别将玻片置于脱蜡液 I、脱蜡液 II、脱蜡液 III 内各浸泡 15 min 脱蜡;无水乙醇、95% 乙醇、75% 乙醇内各浸泡 3 min 脱水;蒸馏水洗 3 min;0.02 μmol/L PBS 配置的体积分数 3% 过氧化氢,室温 10 min 灭活内源性酶;0.02 μmol/L PBS 洗 3 次,每次 3 min;EDTA 液行抗原修复,微波炉加热至沸腾后断电,反复 2 次,间隔 5~10 min,0.02 μmol/L PBS 洗 3 次,每次 3 min;滴加 5% BSA 封闭液,室温孵育 20 min,去除多余液体;滴加兔抗大鼠 NMDA-NR2A 抗体、兔抗大鼠 NMDA-NR2B 抗体(1:100,一抗),4 °C 孵育过夜。0.02 μmol/L PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温下孵育 20 min,0.02 μmol/L PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加试剂 SABC,室温下孵育 30 min,0.02 μmol/L PBS 洗涤 4 次,每次 5 min;滴加新鲜配制的 DAB,光学显微镜下观察控制显色时间,待阳性细胞呈棕黄色,水洗终止反应;裱片,常规脱水,透明,中性树胶封片。阴性对照用正常羊血清替代一抗孵育,其他步骤相同。采用 NIS-Elements F2.30 显微摄像系统采集图像,每只大鼠任意取 3 张切片。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对采集的图片进行测量,用累计吸光度(A)值表示阳性反应产物。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件(美国 IBM SPSS 公司)进行统计分析。本研究中计量资料的数据经 W 检验,符合正态分布,以 mean±SD 表示。对各组不同时间点的 NR2A 和 NR2B 的表达比较采用两因素分差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 正常大鼠视皮层的组织学表现

苏木精-伊红染色结果显示, 大脑皮层 17 区有典型 6 层结构: 第 I 层为分子层, 细胞很少; 第 II 层为外颗粒层, 可见大量颗粒细胞以及小椎体细胞; 第 III 层为外椎体细胞层, 可见典型大小不等的椎体细胞; 第 IV 层为内颗粒层, 可见密集的星状细胞, 多数小星状细胞; 第 V 层为内椎体细胞层, 可见中型和大型椎体细胞、颗粒细胞、上行轴突细胞。第 VI 层为多形细胞层, 含大量梭形细胞以及少量星形细胞核上行轴突细胞(图 1)。

### 2.2 不同日龄各组大鼠 NMDA-NR2A 在视皮层中的表达比较

光学显微镜下可见 NMDA-NR2A 的阳性反应产物呈棕黄色点状或颗粒状, 视皮层 17 区均可见 NMDA-NR2A 染色阳性细胞, 阳性细胞多呈圆形或椭圆形, 主要位于细胞膜。60、75 和 105 日龄各组大鼠视皮层 17 区 NMDA-NR2A 表达总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 727.896, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 12.447, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 17.971, P = 0.000$ )。NMDA-NR2A 在视皮层的 II ~ III 层、IV 层和 V ~ VI 层均有表达。同一时间点弱视组 NMDA-NR2A 在视皮层中的表达较正常对照组和 EE 组明显减弱, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 同一时间点 EE 组 NMDA-NR2A 在视皮层中的表达较 SE 组增强, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 同一时间点 EE 组较正常对照组减弱, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2 ~ 4, 表 1)。

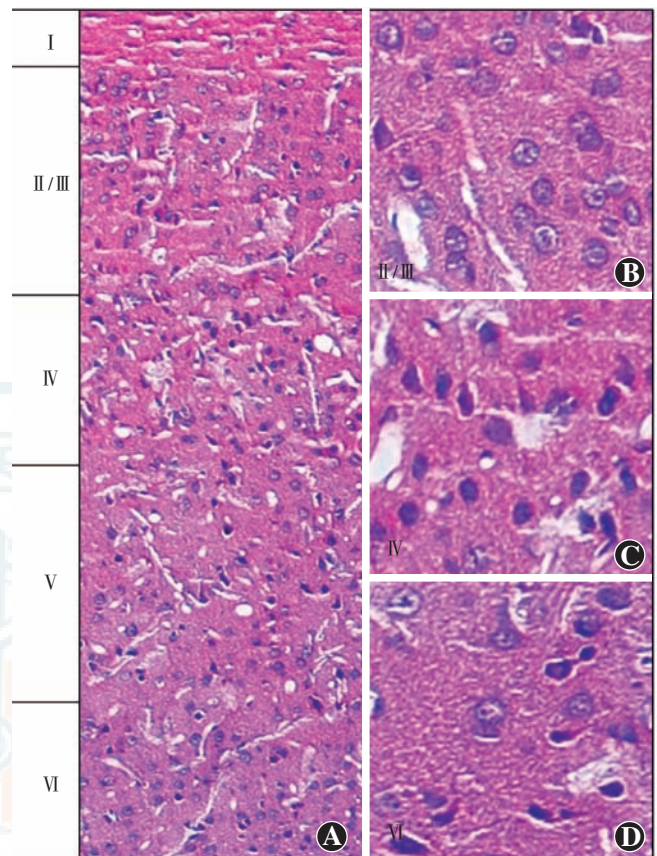


图 1 正常大鼠视皮层 17 区 6 层结构 (HE) A: 大脑皮层 17 区的 HE 染色下的典型 6 层结构: 分子层、外颗粒层、外椎体细胞层、内颗粒层、内椎体细胞层、多形细胞层 ( $\times 100$ ) B: 外颗粒层和外椎体细胞层可见颗粒细胞和大小不等的椎体细胞 ( $\times 400$ ) C: 内颗粒层, 可见密集的星状细胞, 多数小星状细胞 ( $\times 400$ ) D: 多形细胞层含大量梭形细胞和少量星形细胞核上行轴突细胞 ( $\times 400$ )

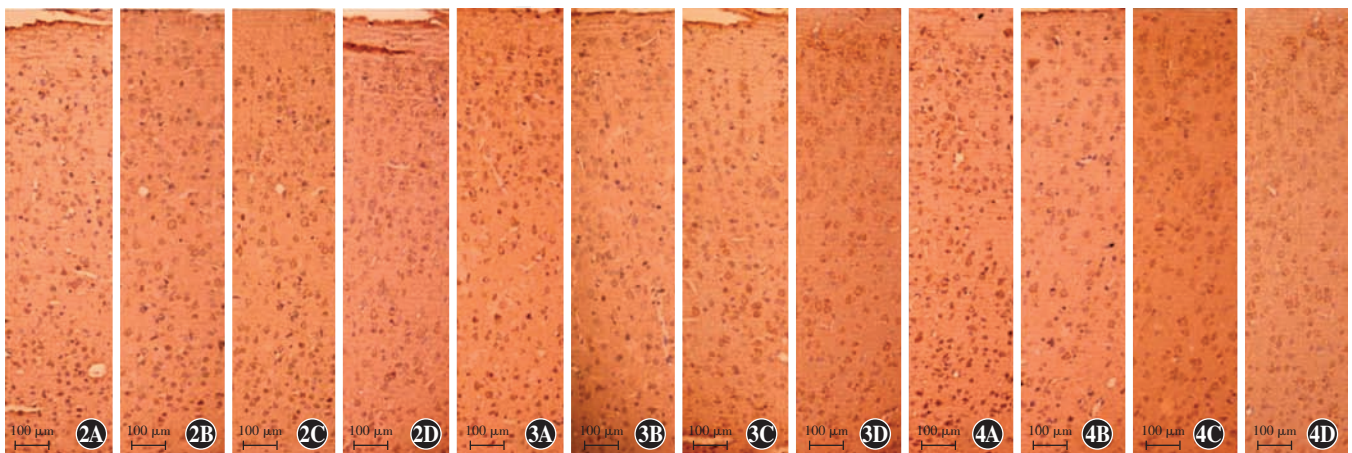


图 2 60 日龄各组大鼠 NMDA-NR2A 蛋白表达的比较 (DAB  $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) A: 正常对照组可见圆形或椭圆形阳性细胞, 呈棕黄色点状或颗粒状 B: 弱视组阳性细胞较正常对照组少 C: SE 组阳性细胞较 EE 组少 D: EE 组阳性细胞较正常对照组少, 较 SE 组、弱视组多 图 3 75 日龄各组大鼠 NMDA-NR2A 蛋白表达比较 (DAB  $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) A: 正常对照组可见圆形或椭圆形阳性细胞, 呈棕黄色点状或颗粒状 B: 弱视组阳性细胞较正常对照组少 C: SE 组阳性细胞较 EE 组少 D: EE 组阳性细胞较正常对照组少, 较 SE 组、弱视组多 图 4 105 日龄 NMDA-NR2A 蛋白表达水平变化 (DAB  $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) A: 正常对照组可见呈圆形或椭圆形阳性细胞, 呈棕黄色点状或颗粒状 B: 弱视组阳性细胞较正常对照组少 C: SE 组阳性细胞较 EE 组少 D: EE 组阳性细胞较正常对照组少, 较 SE 组、弱视组多

**表 1 各组大鼠不同日龄视皮层 17 区 NMDA-NR2A 表达比较 (mean±SD, A)**

组别	样本量	60 日龄	75 日龄	105 日龄
正常对照组	3	172.81±2.45	162.75±6.83	162.58±2.46
弱视组	3	83.98±3.48 <sup>ac</sup>	83.02±3.10 <sup>ac</sup>	83.56±4.66 <sup>ac</sup>
SE 组	3	85.81±4.83 <sup>a</sup>	81.87±5.93 <sup>a</sup>	85.19±5.01 <sup>a</sup>
EE 组	3	95.11±2.09 <sup>ab</sup>	100.56±2.55 <sup>ab</sup>	130.88±5.11 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 727.896, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 12.447, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 17.971, P = 0.000$  与各自时间点正常对照组相比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自时间点 SE 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自时间点 EE 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, Tukey 检验) NMDA: N-甲基-D-天冬氨酸; NR2A: N-甲基-D-天冬氨酸受体 2A 亚基; SE: 标准环境; EE: 丰富环境

### 2.3 不同日龄各组大鼠 NMDA-NR2B 在视皮层中表达的比较

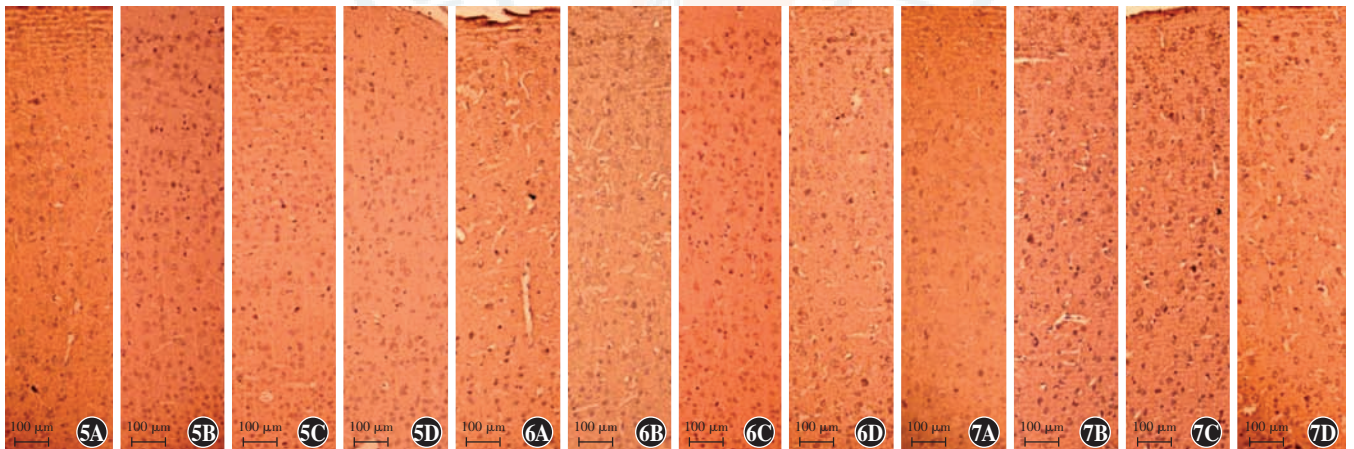
光学显微镜下可见 NMDA-NR2B 的阳性反应产物呈棕黄色点状或颗粒状, 视皮层 17 区均可见 NMDA-NR2B 染色阳性细胞, 阳性细胞多呈圆形或椭圆形, 主要位于细胞膜。60、75 和 105 日龄各组大鼠视皮层 17 区 NMDA-NR2B 表达总体比较, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 713.943, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.128, P = 0.004$ ;

$F_{\text{交互作用}} = 7.316, P = 0.000$ )。同一时间点的弱视组较正常对照组和 EE 组明显增强, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。同一时间点 EE 组较 SE 组表达减弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。60 日龄 EE 组较正常对照组表达增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。75 日龄和 105 日龄 EE 组和正常对照组比较, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 5~7, 表 2)。

**表 2 各组大鼠不同日龄视皮层 17 区 NMDA-NR2B 表达比较 (mean±SD, A)**

组别	样本量	60 日龄	75 日龄	105 日龄
正常对照组	3	127.61±2.79	128.79±6.32	132.80±4.38
弱视组	3	197.12±4.02 <sup>ac</sup>	196.09±2.83 <sup>ac</sup>	194.63±4.41 <sup>ac</sup>
SE 组	3	193.26±2.79 <sup>a</sup>	192.28±3.90 <sup>a</sup>	190.37±3.24 <sup>a</sup>
EE 组	3	153.52±2.74 <sup>ab</sup>	131.61±2.36 <sup>b</sup>	136.44±4.56 <sup>b</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 713.943, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 7.128, P = 0.004; F_{\text{交互作用}} = 7.316, P = 0.000$  与各自时间点正常对照组相比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自时间点 SE 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自时间点 EE 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, Tukey 检验) NMDA: N-甲基-D-天冬氨酸; NR2B: N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基; SE: 标准环境; EE: 丰富环境



**图 5 60 日龄各组大鼠 NMDA-NR2B 在视皮层中的组织学表现 (DAB ×100, 标尺 = 100 μm)** A: 正常对照组可见圆形或椭圆形阳性细胞, 呈棕黄色点状或颗粒状 B: 弱视组阳性细胞较正常对照组和 EE 组多 C: SE 组阳性细胞较 EE 组多 D: EE 组阳性细胞较正常对照组多 **图 6 75 日龄各组大鼠 NMDA-NR2B 在视皮层中的组织学表现 (DAB ×100, 标尺 = 100 μm)** A: 正常对照组可见圆形或椭圆形阳性细胞, 呈棕黄色点状或颗粒状 B: 弱视组阳性细胞较正常对照组和 EE 组多 C: SE 组阳性细胞较 EE 组多 D: EE 组阳性细胞与正常对照组接近 **图 7 105 日龄各组大鼠 NMDA-NR2B 在视皮层中的组织学表现 (DAB ×100, 标尺 = 100 μm)** A: 正常对照组可见棕黄色点状或颗粒状的阳性反应产物, 阳性细胞多呈圆形或椭圆形 B: 弱视组较正常对照组和 EE 组表达增强 C: SE 组较 EE 组表达增强 D: EE 组较正常对照组表达接近

### 3 讨论

正常大鼠的视觉发育过程中, 年龄和视觉经验共同调控着大脑视皮层突触发育的可塑性<sup>[5]</sup>。年龄在关键期以前可能是关键因素, 但在睁眼后, 视觉刺激调控并改变着突触可塑性。视觉发育具有经验依赖性, 异常的视觉刺激可导致视功能破坏, 去除异常的刺激后, 视细胞可以恢复正常, 这一改变在关键期之内比较

明显, 而在关键期后视觉系统的可塑性基本终止, 视觉刺激将很难使视细胞恢复到正常水平, 因此应尽量在视觉发育的关键期前进行弱视治疗。但近年研究表明, 在关键期以后视皮层仍然存在一定程度视觉可塑性, 这种视觉可塑性在一定的视觉刺激以及视觉环境发生改变时很可能被重新激活。

Bonaccorsi 等<sup>[6]</sup>通过建立新的感知学习动物模型, 证明视觉感知学习能成功恢复成年弱视大鼠的视

皮层可塑性。Bochner 等<sup>[7]</sup>研究发现,成人视觉皮层神经可塑性被压抑,且可通过阻断 PirB 的功能得到增强。经长时间黑暗饲养处理后的成年弱视大鼠的视力可恢复<sup>[8]</sup>。解来青等<sup>[9]</sup>研究发现,采用 0.2 mg/ml 氟西汀水溶液喂养成年大鼠 4 周以上以及双眼形觉剥夺 2 周均可有效激活成年大鼠视皮层可塑性。阴正勤等<sup>[10]</sup>通过观察成年大鼠视皮层可塑性再激活后 PTP $\sigma$ 、神经元周围网络及其下游分子 N-cadherin 和  $\beta$ -catenin 的表达变化,证明这些因子的表达可能是成年大鼠视皮层可塑性再激活的重要机制。以上研究为关键期后成年弱视大鼠可塑性的激活提供了重要依据。MD 弱视动物模型是研究哺乳动物大脑视皮层可塑性的经典模型<sup>[11]</sup>。大鼠视觉发育关键期从出生后 14 d 自然睁眼开始,到生后 45 d<sup>[12]</sup>。Monter 等<sup>[13]</sup>在大鼠生后 14 ~ 45 d 进行单眼缝合,成功制作形觉剥夺弱视模型。由于眼的交叉投射,哺乳动物视皮层信号来自于对侧眼<sup>[14]</sup>。MD 后导致视皮层的改变是来自对侧,因此本研究中选择生后 14 ~ 45 d 大鼠缝合右侧眼睑,使大鼠在关键期内形成弱视,在关键期后(生后 46 d)打开右侧眼睑,暴露在不同视觉环境后,取左侧大脑皮层 17 区进行研究,探讨视觉可塑性的恢复情况。

研究证明,EE 可从组织和分子水平来影响中枢神经系统的功能,可增加神经细胞体积、突触数量和树突棘密度,这种影响不仅发生在关键期以前,在关键期以后也可以影响神经元的再生以及突触的改变。Mainardi 等<sup>[15]</sup>研究表明,EE 能增强成年大鼠突触强度,通过改变与谷氨酸和氨基丁酸类神经传递的变化来影响视皮层的可塑性。Tognini 等<sup>[16]</sup>证明 EE 能增加成年弱视大鼠的脑源性神经生长因子在视皮层中的表达。研究发现,EE 作为一种非侵入性方式,在改善中枢神经系统的发展潜力和治疗神经性疾病中发挥重要作用,与神经系统的可塑性密切相关。目前,中国许多儿童游乐设施都是根据 EE 原理构建的,但有关 EE 和弱视的关系目前研究较少。弱视与突触可塑性联系紧密,因此引入 EE 对其进行干预,研究关键期后对弱视大鼠视皮层的影响。大鼠关键期终止时间是生后 45 d,因此在大鼠生后的 46 d 打开缝合的眼睑将其分别暴露于 EE 和 SE 下,于 60、75 和 105 日龄取大鼠视皮层 17 区。本研究证明与 SE 比较,EE 对成年弱视大鼠有显著影响。

视皮层具有经验依赖性,主要依赖于兴奋和抑制之间的平衡,而这种平衡主要受兴奋性受体和抑制性受体的调节,这些受体变化的结合物影响兴奋-抑制平衡以及突触的可塑性<sup>[17]</sup>。兴奋性 NMDA 受体被认

为是突触可塑性的重要因子。在哺乳类动物的神经组织内,功能性的 NMDA 受体至少含 1 个 NR1 亚单位和 1 个 NR2 亚单位。NR1 属于功能亚单位, NR2 属于调节亚单位,通过多种方式共同调节 NMDA 受体复合物的功能活性<sup>[18]</sup>。不同 NR2 亚单位的参与赋予通道复合物不同的电生理特性和药理学特性,改变亚基的组成能够改变受体的功能,从而影响着突触可塑性<sup>[19]</sup>。研究发现,大鼠视皮层中 NR2A 与 NR2B 的表达随生长发育而变化,与视觉发育可塑性关键期的起止与终止在时间上具有一定程度的同步性,提示生后 NR2A 和 NR2B 表达的发育性时间差异可能是视觉发育可塑性调节的重要分子基础<sup>[20]</sup>。研究发现, NR2A/NR2B 比值改变存在于发育期动物,也存在于成年动物,这种经验依赖性的 NMDA 受体组成的变化可能参与并调节成年动物视皮层突触可塑性<sup>[21]</sup>。研究发现,对成年啮齿类动物进行 10 d 的视觉剥夺可减少视皮层 NR2A/2B 的比值<sup>[22]</sup>。

本研究结果显示, NMDA-NR2A 和 NMDA-NR2B 在成年正常大鼠视皮层 17 区中均有表达, NMDA-NR2A 在成年弱视大鼠中表达减弱,而 NMDA-NR2B 的表达逐渐增强,说明 MD 与 NMDA-NR2A 和 NR2B 的表达有密切关系,证明了 NR2A 和 NR2B 亚单位的变化是具有经验依赖性的。与弱视组和 SE 组相比, EE 下饲养的大鼠 NR2A 的表达呈增强趋势,但未恢复正常。NR2B 在视皮层中的表达与 NR2A 截然不同,在弱视大鼠视皮层中表达较正常大鼠增强,经 EE 后其表达逐渐减弱。随着形觉剥夺, NR2A 呈减弱趋势, NR2B 呈增强趋势。经一定条件下的外界经验刺激,可对弱视大鼠的 NR2A 和 NR2B 的表达产生改变。

Quinlan 等<sup>[23]</sup>研究显示,经过黑暗饲养后幼年动物 NR2A/2B 比值在视皮层中表达较低,而将其光照后 2 h, NR2A/2B 比值升高,说明 NR2A/2B 比值的改变具有视觉经验依赖性,而幼年期 NR2A/2B 比值的降低主要由于视觉剥夺引起 NR2A 的表达减弱导致。研究表明,对成年大鼠进行黑暗饲养后, NR2A/2B 比值较正常下降,该下降主要是 NR2B 的表达增加所致<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, MD 使大鼠视皮层的 NR2A 表达减弱, NR2B 的表达增强。本研究结果说明 MD 对大鼠视皮层中 NR2A 和 NR2B 的表达可能与暗室饲养不同。对成年弱视大鼠进行 EE 饲养后导致的 NR2A 增强和 NR2B 减弱,说明在关键期后一定条件下的经验刺激可通过 NR2A/2B 比值的改变来参与成年大鼠视皮层可塑性的再激活,而这种经验依赖性的

改变在成年大鼠中依然存在。

视觉系统的可塑性不仅存在于视觉发育的关键期,且在关键期之后视觉系统的可塑性仍然存在。EE 作为一种非侵入性的干预方法,能改变 NMDA-NR2A 和 NMDA-NR2B 表达使成年弱视大鼠的视皮层可塑性得以改善和恢复。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Lee C, Joo K, Kim MJ, et al. GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors compensate for the inhibitory control of synaptic plasticity during the early critical period in the rat visual cortex [J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(9): 1405-1412. DOI:10.1002/jnr.23604.
- [2] Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment [J]. *Ann Neurol*, 2002, 1: 135-142. DOI:10.1002/ana.10262.
- [3] Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment; structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 55(1): 78-88. DOI:10.1016/j.brainresrev.2007.03.011.
- [4] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 112-120.
- [5] Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, et al. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 783-789. DOI:10.1038/nn878.
- [6] Bonaccorsi J, Berardi N, Sale A. Treatment of amblyopia in the adult: insights from a new rodent model of visual perceptual learning [J]. *Front Neural Circuits*, 2014, 8: 82-89. DOI:10.3389/fncir.2014.00082.
- [7] Bochner DN, Sapp RW, Adelson JD, et al. Blocking PirB up-regulates spines and functional synapses to unlock visual cortical plasticity and facilitate recovery from amblyopia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(258): 258ra140. DOI:10.1126/scitranslmed.3010157.
- [8] He HY, Ray B, Dennis K, et al. Experience-dependent recovery of vision following chronic deprivation amblyopia [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 1134-1136. DOI:10.1038/nn1965.
- [9] 解来青, 徐国旭, 倪勇, 等. 采用视觉电生理法研究氟西汀对成年大鼠视皮层眼优势可塑性的逆转作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(11): 965-970. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.002.  
Xie LQ, Xu GX, Ni Y, et al. The effects of fluoxetine and its mechanism on the restores of visual cortex plasticity in the adult rats by visual electrophysiological research [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(11): 965-970. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.11.002.
- [10] 刘慧, 徐海伟, 余涛, 等. 酪氨酸磷酸酶蛋白受体  $\sigma$  在成年大鼠视皮层可塑性再激活过程中的作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(1): 39-44. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.010.  
Liu H, Xu HW, Yu T, et al. Effect of protein tyrosine phosphatase  $\sigma$  on the reactivation of ocular dominance plasticity in the visual cortex of adult rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(1): 39-44. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.010.
- [11] Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, et al. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex [J]. *Science*, 2002, 298(5596): 1248-1251. DOI:10.1126/science.1072699.
- [12] Rothblat LA, Schwartz ML, Kasdan PM. Monocular deprivation in the rat: evidence for an age-related defect in visual behavior [J]. *Brain Res*, 1978, 158(2): 456-460. DOI:10.1016/0006-8993(78)90689-3.
- [13] Monter VM. Amblyopia decreases activation of the corticogeniculate pathway and visual thalamic reticularis in attentive rats: a 'focal attention' hypothesis [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(3): 805-817.
- [14] Heynen AJ, Yoon BJ, Liu CH, et al. Molecular mechanism for loss of visual cortical responsiveness following brief monocular deprivation [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(8): 854-862. DOI:10.1038/nn1100.
- [15] Mainardi M, Landi S, Gianfranceschi L, et al. Environmental enrichment potentiates thalamocortical transmission and plasticity in the adult rat visual cortex [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(14): 3048-3059. DOI:10.1002/jnr.22461. DOI:10.1002/jnr.22461. DOI:10.1002/jnr.22461.
- [16] Tognini P, Manno I, Bonaccorsi J, et al. Environmental enrichment promotes plasticity and visual acuity recovery in adult monocular amblyopic rats [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34815 [2017-12-03]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034815>. DOI:10.1371/journal.pone.0034815.
- [17] Beston BR, Jones DG, Murphy KM. Experience-dependent changes in excitatory and inhibitory receptor subunit expression in visual cortex [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2010, 2: 138-142. DOI:10.3389/fnsyn.2010.00138. DOI:10.3389/fnsyn.2010.00138.
- [18] Cao Z, Liu L, Lickey M, et al. Virally mediated knock-down of NR2 subunits ipsilateral to the deprived eye blocks ocular dominance plasticity [J]. *Exp Brain Res*, 2007, 177(1): 64-77. DOI:10.1007/s00221-006-0647-8.
- [19] Yoshimura Y, Ohmura T, Komatsu Y. Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience, and NMDA receptor subtype in rat visual cortex [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(16): 6557-6666.
- [20] 于璐, 赵堪兴. NMDA 受体亚单位 NR2A、NR2B 在正常大鼠视皮层中的表达变化 [J]. *眼科研究*. 2008, 26(8): 594-597. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.08.010.  
Yu L, Zhao KX. Expression of NMDA receptor subunit NR2A and NR2B in visual cortex of rats [J]. *Chin Ophthalmol Res*, 2008, 26(8): 594-597. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2008.08.010.
- [21] Kopp C, Longordo F, Luthi A. Experience-dependent changes in NMDA receptor composition at mature central synapses [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(1): 1-9. DOI:10.1016/j.neuropharm.2007.03.014.
- [22] He HY, Hodos W, Quinlan EM. Visual deprivation reactivates rapid ocular dominance plasticity in adult visual cortex [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(11): 2951-2955. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5554-05.2006.
- [23] Quinlan EM, Philpot BD, Hagan RL, et al. Rapid, experience dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex *in vivo* [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(4): 352-357. DOI:10.1038/7263.

(收稿日期:2018-07-13 修回日期:2019-05-18)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

## 本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确,能准确反映文章主题和特定内容,具有可检索性。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜,一般不设副标题,尽量不用标点符号,文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

(本刊编辑部)