

· 实验研究 ·

丰富环境对成年弱视小鼠视觉功能及突触可塑性的影响

罗瑜琳¹ 陶利娟¹ 刘政海² 罗诗诗² 高明² 吴小影³ 涂艳琼³¹湖南省儿童医院眼科,长沙 410007;²南华大学应用解剖与生殖医学研究所,衡阳 421001;³中南大学湘雅医院眼科,长沙 410008

通信作者:罗瑜琳,Email:luoyulin2000@126.com

【摘要】 目的 探讨丰富环境(EE)在调控成年单眼剥夺(MD)弱视小鼠视觉功能恢复过程中的作用及可能的机制。**方法** 采用随机数字表法将 72 只健康新生昆明小鼠分为正常对照组、MD 组、MD+EE 组和 MD+氟西汀组。除正常对照组外,其余各组小鼠于出生后 21 d 缝合右侧眼睑建立 MD 弱视模型,根据分组分别在标准环境和 EE 中饲养 4 周。检测各组小鼠视敏度和闪光视觉诱发电位(F-VEP)。采用免疫组织化学检测各组小鼠视皮层中树突棘修剪相关标记物微管相关蛋白 2(MAP2)的表达变化。Western blot 法检测各组小鼠视皮层中 MAP2、突触囊泡素(SYP)和突触后致密蛋白 95(PSD-95)的表达。**结果** 各组小鼠剥夺眼视敏度总体比较,差异有统计学意义($F=114.632, P<0.001$)。MD 组小鼠剥夺眼视敏度明显低于正常对照组,差异有统计学意义($t=15.480, P<0.001$);MD+EE 组和 MD+氟西汀组小鼠剥夺眼视敏度明显高于 MD 组,差异有统计学意义($t=15.071, P<0.001; t=14.841, P<0.001$)。各组小鼠 F-VEP P₂波潜伏期及振幅总体比较,差异有统计学意义($F=36.510, F=34.140$, 均 $P=0.000$)。与正常对照组比较,MD 组小鼠剥夺眼闪光视觉诱发电位 P₂波潜伏期延长,振幅降低,差异有统计学意义($t=10.220, P=0.000; t=10.090, P=0.000$);与 MD 组比较,MD+EE 组小鼠剥夺眼闪光视觉诱发电位 P₂波潜伏期缩短,振幅增加,差异有统计学意义($t=7.051, P=0.003; t=5.030, P=0.000$)。免疫组织化学染色结果显示,与正常对照组比较,MD 组小鼠剥夺眼对侧视皮层神经元 MAP2 表达明显减少,棕褐色神经元突起难以分辨。MD+EE 组和 MD+氟西汀组视皮层区域可见明显棕褐色神经元突起,但 MAP2 表达强度弱于正常对照组。各组视皮层中 MAP2 蛋白相对表达总体比较,差异有统计学意义($F=18.142, P=0.000$)。MD 组小鼠视皮层 MAP2 相对表达量明显低于正常对照组,差异有统计学意义($t=3.056, P<0.01$);MD+EE 组和 MD+氟西汀组小鼠视皮层 MAP2 蛋白相对表达较 MD 组显著增加,差异有统计学意义($t=2.541, P=0.031; t=2.157, P=0.017$)。各组 SYP 及 PSD-95 蛋白表达量总体比较,差异有统计学意义($F=12.871, 25.060$, 均 $P=0.000$)。与正常对照组比较,MD 组小鼠剥夺眼对侧视皮层中 SYP 和 PSD-95 的相对表达量明显下调,差异有统计学意义($t=6.054, P=0.000; t=8.631, P=0.000$);MD+EE 组小鼠剥夺眼对侧视皮层中 SYP 和 PSD-95 蛋白相对表达明显高于 MD 组,差异有统计学意义($t=2.088, P=0.046; t=3.766, P=0.002$);MD+氟西汀组小鼠剥夺眼对侧视皮层中 SYP 和 PSD-95 蛋白相对表达明显高于 MD 组,差异有统计学意义($t=2.520, P=0.018; t=4.730, P=0.000$)。**结论** EE 可通过上调成年 MD 弱视小鼠视皮层中 MAP2 的表达促进视觉功能恢复,可能与 MAP2 促进突触相关蛋白 PSD-95 及 SYP 的表达,重塑神经可塑性有关。

【关键词】 丰富环境;单眼剥夺;弱视;视皮层;可塑性**基金项目:** 湖南省中医药科研计划课题(201974);湖南省自然科学基金项目(14JJ3153、13JJ2010)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.003

Influence of enriched environment on visual function and synaptic plasticity in adult amblyopic mice¹Luo Yulin, ¹Tao Lijuan, ²Liu Zhenghai, ²Luo Shishi, ²Gao Ming, ³Wu Xiaoying, ³Tu Yanqiong¹Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China; ²Institute of Clinical Anatomy & Reproductive Medicine, University of South China Medicine School, Hengyang 421001, China; ³Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: Luo Yulin, Email: luoyulin2000@126.com

[Abstract] Objective To examine role and possible mechanism of enriched environment (EE) on regulating recovery of visual function in adult monocular deprivation amblyopia mice. **Methods** A total of 72 healthy Kunming mice were divided into normal control group, monocular deprivation (MD) group, MD+EE group and MD+fluoxetine group by random number table. Except for the normal control group, the mice in the other groups were sutured on the right eyelid 21 days after birth to establish MD amblyopia model. the mice were fed in standard environment or EE for 4 weeks according to the group. Visual acuity and flash visual evoked potential (F-VEP) of mice in each group were detected. The distribution of microtubule associated protein 2 (MAP2) in visual cortex of adult amblyopic mice were detected by immunohistochemistry. The expression of MAP2, synaptophysin (SYP) and postsynaptic density protein-95 (PSD-95) protein in visual cortex of adult amblyopic mice were detected by western blot. The experimental protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of Hunan Children's Hospital and conformed to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Results** There was a significant difference in the visual acuity of deprived eye among each group ($F=114.632, P<0.001$). The visual acuity in MD group is lower than that in normal control group, with a significant difference ($t=15.480, P<0.001$). Compared with MD group, visual acuity was restored in MD+EE group and MD+fluoxetine group, with significant differences ($t=15.071, P<0.001; t=14.841, P<0.001$). There was a significant difference in the P₂ latency and amplitude of F-VEP in deprived eye among each group ($F=36.510, P=0.000; F=34.140, P=0.000$). Compare with normal control group, P₂ latency was prolonged and P₂ amplitude of F-VEP was decreased in deprived eye in MD group, with significant differences ($t=10.220, P=0.000; t=10.09, P=0.000$). Western blot assay showed that there was a significant difference in the expression of MAP2 in visual cortex contralateral deprived eye among each group ($F=18.142, P=0.000$). The expression of MAP2 in MD group was significantly lower than that in normal control group ($t=3.056, P<0.01$); Compared with MD group, MAP2 expression was increased in MD+EE group and MD+fluoxetine group ($t=2.541, P=0.031; t=2.157, P=0.017$). There were significant differences in the expression of SYP and PSD-95 in visual cortex contralateral to deprived eye among each group ($F=12.871, P=0.000; F=25.060, P=0.000$). Compared with normal control group, SYP and PSD-95 expression in visual cortex were down-regulated in MD group, with significant differences ($t=6.054, P=0.000; t=8.631, P=0.000$). The expression of SYP and PSD-95 protein in MD+EE group and MD+fluoxetine group were significantly higher than those in MD group (all at $P<0.05$). **Conclusions** EE can recover visual function through up-regulating the expression of MAP2, which can modulate the dendritic branch trim and neural plasticity of visual cortex in adult MD mice.

[Key words] Enriched environment; Monocular deprivation; Amblyopia; Visual cortex; Plasticity

Fund program: Project of Traditional Chinese medicine Science Research Foundation of Hunan Province (201974); Natural Science Foundation of Hunan Province (14JJ3153, 13JJ2010)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.003

弱视是严重损害儿童视力的常见眼病之一。形觉剥夺或双眼相互作用的异常是导致弱视的主要原因,弱视患者不仅视力低于正常水平,双眼视功能及立体视觉也受到严重影响。弱视治疗具有时限性,在视皮层发育关键期内疗效较好,成年视皮层可塑性被抑制,治疗效果不理想^[1-4]。如何重新激活成年视皮层可塑性是解决弱视治疗的关键。本研究拟通过观察丰富环境(environmental enrichment, EE)中饲养的成年单眼剥夺弱视小鼠视觉功能变化,检测视皮层中微管相关蛋白 2 (microtubule associated protein 2, MAP2)、突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 及突触囊泡素 (synaptophysin, SYP) 的表达,探讨 EE 在调控成年弱视小鼠视觉恢复过程中的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康新生昆明小鼠 72 只[湖南省斯莱克景达实验动物有限公司(No. 43004700018257),许可证号:SCXK(湘)2016-0001]。正常摄食、饮水,保持常规室温及湿度。本研究经湖南省儿童医院伦理委员会的批准(审批号:HCHLL-2015-35),实验动物的使用符合《湖南省儿童医院实验动物管理与使用指南》。

1.1.2 主要试剂及仪器 PSD95 小鼠单克隆抗体(sc-28941)、GADPH 小鼠单克隆抗体(sc-137179)(美国 Santa Cruz 公司);SYP-小鼠单克隆抗体(BA3279)、MAP2 小鼠单克隆抗体(BM4473)(武汉博士德公司);乙酸纤维素薄膜(杭州路桥四青生化材料厂)。电泳

仪(北京六一公司);全自动视觉电生理检查系统(法国 MetroVision 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 按照随机数字表法将小鼠分为正常组、单眼剥夺(monocular deprivation, MD)组、MD+EE 组和 MD+氟西汀组,每组 18 只。除正常对照组外,其余各组小鼠于出生后 21 d 缝合右侧眼睑建立 MD 弱视模型。

1.2.2 弱视模型构建 采用 Maffei 等^[5]的造模方法,对 21 日龄小鼠采用单眼缝合法构建弱视模型。体积分数 10% 水合氯醛按照 0.3 ml/100 g 的剂量腹腔内注射麻醉,络合碘消毒右眼周围皮肤,分别剪除右侧上下眼睑缘组织,6-0 可吸收线褥式缝合上下眼睑创缘。清醒后在标准环境下饲养 2 周后剪开眼睑,剔除眼睑自行出现裂缝的小鼠。根据分组分别在标准环境和 EE 中饲养 4 周,行视敏度和闪光视觉诱发电位(flash-visual evoked potential, F-VEP)检测后处死小鼠,取视皮层组织行免疫组织化学和分子生物学检测(图 1)。

EE 饲养方式为参照文献[6]方法,将小鼠置于 1 m³木箱内,其内摆放隧道、各色积木、转轮、小木屋及木梯等玩具,隔天更换玩具或交换位置。标准环境则按国家标准实验动物环境及设施规定的小鼠笼具原则饲养。

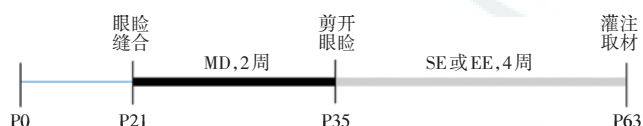


图 1 弱视模型建立及 EE 干预的实验流程 MD:单眼剥夺;SE:标准环境;EE:丰富环境

1.2.3 前爪触地反射实验测定小鼠主观视敏度 参照 Drapeau 等^[7]的方法,提起小鼠尾巴,使头部距平台约 20 cm,前爪悬空,缓慢靠近桌面。若小鼠在胡须或鼻子触碰到桌面前出现探爪动作,则视为探爪成功。30 min 内重复 6 次,以小鼠前爪在下降过程中探爪成功率作为指标。所有小鼠均在 63 日龄时行前爪触地反射实验。

1.2.4 采用 F-VEP 评估小鼠客观视功能 参照 ISCEV 标准^[8],采用全自动视觉电生理检查系统行 F-VEP 检测。各组小鼠置于暗室内使其暗适应 30 min。10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后,分别在枕骨粗隆、两耳连线与正中中线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,检查一眼时遮盖对侧眼。记录每次 P₂波潜伏期和振幅。潜伏期为起点至 P₂波峰的距离,振幅为 N₂波谷至 P₂波峰的距离,连续测量 3 次,取其平均值。

1.2.5 免疫组织化学染色法检测小鼠视皮层中 MAP2 表达 各组小鼠 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后,质量分数 4% 多聚甲醛快速灌注固定,取剥夺眼对侧视皮层双眼区组织行冰冻切片,切片厚度为 30 μm,0.01 mol/L PBS 充分清洗,用质量分数 5% 小牛血清(含质量分数 0.3% Triton X-100)封闭 1 h。将切片置于 MAP2 小鼠单克隆抗体(1:2 000)中 4 ℃ 孵育过夜,0.01 mol/L PBS 充分漂洗;滴加生物素化的羊抗小鼠 IgG(1:200),室温孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 充分漂洗,ABC 复合物(1:200),室温孵育 30 min, DAB 显色,封片。质量分数 5% BSA 代替一抗或二抗作为阴性对照。激光电子显微镜下观察神经元细胞体呈棕褐色为 MAP2 表达阳性细胞。

1.2.6 Western blot 法检测视皮层中 MAP2 和突触相关蛋白 SYP、PSD-95 的表达 分别收集各组 9 只鼠视皮层组织,提取总蛋白。蛋白质变性后行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜;用含 5% 牛血清白蛋白的 TBST 封闭 1 h,用一抗 MAP-2 小鼠单克隆抗体(1:500)、SYP 小鼠单克隆抗体(1:500)、PSD-95 小鼠单克隆抗体(1:1 000)和 GAPDH 小鼠单克隆抗体(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次,每次 5 min;HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000)孵育 1 h, TBST 洗 3 次,每次 5 min,化学发光法检测蛋白质印迹结果;以 GAPDH 为内参照,计算各目的条带相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism6 统计学软件(序列号 GPS-0320559-LFUL-95242)进行统计分析。本研究中计量资料经 Shapiro-wilk 检验符合正态分布,以 mean ± SD 表示。多组数据间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视敏度的比较

各组小鼠剥夺眼视敏度总体比较,差异有统计学意义($F = 114.632, P < 0.001$)。MD 组小鼠剥夺眼视敏度明显低于正常对照组,差异有统计学意义($t = 15.480, P < 0.001$);MD+EE 组和 MD+氟西汀组小鼠剥夺眼视敏度均明显高于 MD 组,差异有统计学意义($t = 15.071, P < 0.001; t = 14.841, P < 0.001$);与 MD+

氟西汀组比较,MD+EE 组小鼠剥夺眼视敏度差异无统计学意义($t=0.238, P=0.816$)(表 1)。

表 1 各组小鼠探爪成功率的比较(mean±SD, %)

组别	样本量	探爪成功率
正常对照组	18	91.73±3.22
MD 组	18	26.55±5.03 ^a
MD+EE 组	18	90.05±8.45 ^b
MD+氟西汀组	18	89.00±5.88 ^b
F 值		114.632
P 值		0.000

注:与正常对照组比较,^a $P<0.001$;与 MD 组比较,^b $P<0.0001$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) MD:单眼剥夺;EE:丰富环境

2.2 各组小鼠剥夺眼 F-VEP 的比较

各组小鼠 F-VEP P_2 波潜伏期总体比较,差异有统计学意义($F=36.510, P=0.000$)。MD 组小鼠剥夺眼 F-VEP P_2 波潜伏期明显长于正常对照组,差异有统计学意义($t=10.220, P=0.000$);MD+EE 组小鼠剥夺眼 F-VEP P_2 波潜伏期明显低于 MD 组,差异有统计学意义($t=7.051, P=0.003$);MD+氟西汀组小鼠剥夺眼 F-VEP P_2 波潜伏期明显低于 MD 组,差异有统计学意义($t=6.049, P=0.002$)。与 MD+氟西汀组比较,MD+EE 组小鼠剥夺眼 F-VEP P_2 波潜伏期差异无统计学意义($t=1.002, P=0.322$)(表 2,图 2)。

各组小鼠 F-VEP P_2 波振幅总体比较,差异有统计学意义($F=34.140, P=0.000$)。MD 组小鼠 P_2 波振幅明显低于正常对照组,差异有统计学意义($t=10.090, P=0.000$);MD+EE 组小鼠 P_2 波振幅明显高于 MD 组,差异有统计学意义($t=5.030, P=0.000$);MD+氟西汀组小鼠 P_2 波振幅明显高于 MD 组,差异有统计学意义($t=5.650, P=0.000$);与 MD+氟西汀组比较,MD+EE 组小鼠 P_2 波振幅差异无统计学意义($t=0.618, P=0.539$)(表 2,图 2)。

表 2 各组小鼠 F-VEP P_2 波潜伏期和振幅的比较(mean±SD)

组别	样本量	潜伏期(ms)	振幅(μV)
正常对照组	18	99.21±4.25	32.14±3.88
MD 组	18	116.8±4.71 ^a	16.71±3.96 ^a
MD+EE 组	18	111.4±3.44 ^b	24.40±3.31 ^{ab}
MD+氟西汀组	18	109.6±3.64 ^b	25.35±3.13 ^{ab}
F 值		36.510	34.140
P 值		0.000	0.000

注:与正常对照组比较,^a $P<0.001$;与 MD 组比较,^b $P<0.0001$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) F-VEP:闪光视觉诱发电位;MD:单眼剥夺;EE:丰富环境

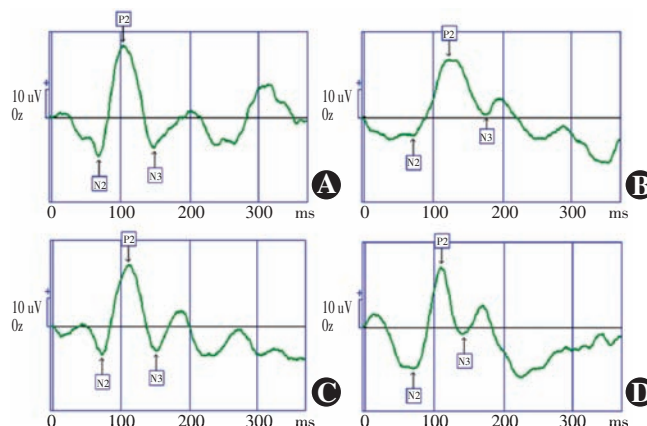


图 2 各组小鼠 F-VEP 检测结果比较 A:正常对照组 B:MD 组 C:MD+EE 组 D:MD+氟西汀组

2.3 各组小鼠剥夺眼对侧视皮层 MAP2 表达的比较

免疫组织化学检测结果显示,正常对照组小鼠视皮层中各层神经元胞体在胞膜下均出现 MAP2 阳性表达,第 2、3、4 层细胞内可见密集、粗大、丛状的 MAP2 免疫阳性的神经元突起。MD 组小鼠剥夺眼对侧视皮层神经元 MAP2 表达减少,棕褐色神经元突起难以分辨。与 MD 组比较,MD+EE 组及 MD+氟西汀组小鼠剥夺眼对侧视皮层区域可见明显棕褐色神经元突起,但表达强度弱于正常对照组(图 3)。

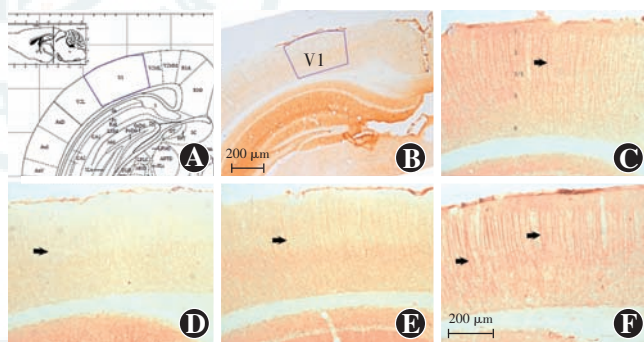


图 3 各组小鼠视皮层中 MAP2 表达的比较(标尺=200 μm) A:小鼠脑图谱中视皮层解剖部位(参照《小鼠脑立体定位图谱》) B:小鼠视皮层的组织病理学表现 C:正常对照组 MAP2 免疫组织化学表现 D:MD 组 MAP2 免疫组织化学表现 E:MD+EE 组 MAP2 免疫组织化学表现 F:MD+氟西汀组 MAP2 免疫组织化学表现 黑色箭头示神经元突起

正常对照组、MD 组、MD+EE 组及 MD+氟西汀组 MAP2 蛋白相对表达量分别为 0.980 ± 0.110 、 0.520 ± 0.099 、 0.820 ± 0.051 和 0.850 ± 0.039 ,各组视皮层中 MAP2 表达总体比较,差异有统计学意义($F=18.142, P=0.000$)。MD 组小鼠 MAP2 表达明显低于正常对照组,差异有统计学意义($t=3.056, P<0.01$);MD+EE 组、MD+氟西汀组小鼠视皮层 MAP2 表达较 MD 组显著增加,差异有统计学意义($t=2.541, P=0.031$; $t=2.157, P=0.017$)(图 4)。

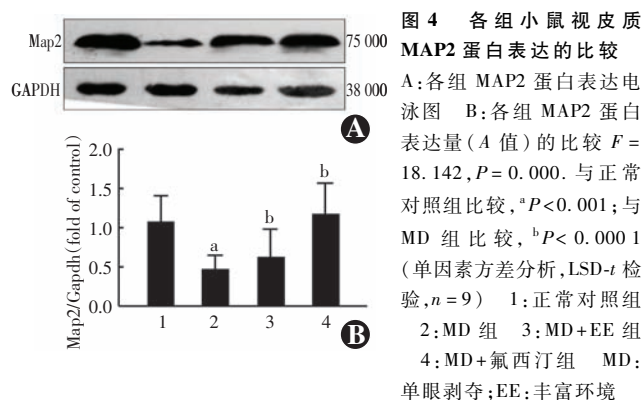


图 4 各组小鼠视皮质 MAP2 蛋白表达的比较 A: 各组 MAP2 蛋白表达电泳图 B: 各组 MAP2 蛋白表达量(A 值)的比较 $F=18.142, P=0.000$ 。与正常对照组比较, $^a P<0.001$; 与 MD 组比较, $^b P<0.0001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=9$) 1: 正常对照组 2: MD 组 3: MD+EE 组 4: MD+氟西汀组 MD: 单眼剥夺; EE: 丰富环境

2.4 各组小鼠剥夺眼对侧视皮层 SYP 和 PSD-95 蛋白表达的比较

正常对照组、MD 组、MD+EE 组及 MD+氟西汀组 SYP 蛋白相对表达量分别为 0.990 ± 0.126 、 0.740 ± 0.059 、 0.820 ± 0.054 和 0.810 ± 0.070 , 各组 SYP 蛋白表达量总体比较, 差异有统计学意义 ($F=12.871, P=0.000$)。MD 组小鼠剥夺眼对侧视皮层 SYP 表达明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t=6.054, P=0.000$); MD+EE 组、MD+氟西汀组小鼠 SYP 表达量明显高于 MD 组, 差异有统计学意义 ($t=2.088, P=0.046$; $t=2.520, P=0.018$); MD+EE 组小鼠 SYP 表达量与 MD+氟西汀组比较, 差异无统计学意义 ($t=0.268, P=0.791$) (图 5)。

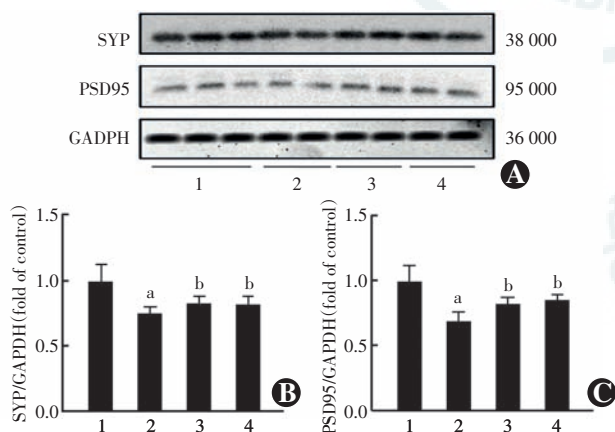


图 5 各组小鼠视皮层中 SYP 和 PSD-95 蛋白表达的比较 A: 各组小鼠视皮层 SYP 和 PSD-95 蛋白表达电泳图 B: 各组 SYP 蛋白表达的比较 $F=12.871, P=0.000$ C: 各组 PSD-95 蛋白表达的比较 $F=25.060, P=0.000$ 与正常对照组比较, $^a P<0.001$; 与 MD 组比较, $^b P<0.0001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=9$) 1: 正常对照组 2: MD 组 3: MD+EE 组 4: MD+氟西汀组 MD: 单眼剥夺; EE: 丰富环境

正常对照组、MD 组、MD+EE 组及 MD+氟西汀组 PSD-95 蛋白相对表达量分别为 0.990 ± 0.116 、 0.680 ± 0.082 、 0.820 ± 0.051 和 0.850 ± 0.039 , 各组 PSD-95 表达

量总体比较, 差异有统计学意义 ($F=25.060, P=0.000$)。MD 组小鼠剥夺眼对侧视皮层中 PSD-95 表达量明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t=8.631, P=0.000$); MD+EE 组、MD+氟西汀组小鼠 PSD-95 表达量明显高于 MD 组, 差异有统计学意义 ($t=3.766, P=0.002$; $t=4.730, P=0.000$)。MD+EE 组小鼠 PSD-95 表达量与 MD+氟西汀组比较, 差异无统计学意义 ($t=0.868, P=0.393$) (图 5)。

3 讨论

本研究中通过 MD 建立弱视小鼠模型, 小鼠视觉发育关键期在出生后 19~32 d^[9-10]。本研究中小鼠 21 日龄时缝合右侧眼睑, 导致小鼠视皮层双眼区的神经细胞在其视觉发育的关键期内感受双眼刺激不均衡, 使该区域神经元突触功能下降, 形成弱视。剪开 35 日龄小鼠眼睑, MD 组小鼠前爪触地反射实验成功率较正常对照组、MD+EE 组均显著降低, P_2 波潜伏期明显延迟, 振幅降低, 视觉功能不能自行恢复。

成年视皮层可塑性终止机制的假说较多, 包括抑制性神经元的发育成熟, 神经营养因子的表达下调及神经元细胞外基质发育成熟, 均涉及视皮层突触功能^[11-13]。突触可塑性指神经元之间突触性连接的变化, 包括突触效能的增强或减弱、受体蛋白分布、突触后信号传导机制改变及神经元间突触分布的数量变化等。MD 造成的突触性抑制在关键期内最为显著, 该现象涉及突触受体、信号分子及神经递质等改变, 也可导致神经突触的形态学异常^[14]。SYP 是突触前囊泡膜的特有成分, 参与突触囊泡的融合、运输及神经递质的包装、储存、并调控其释放, 对钙离子依赖的递质释放具有重要影响, 与突触可塑性密切相关。本研究中 SYP 蛋白在单眼剥夺小鼠视皮质中的表达减少, 提示 SYP 对视皮质神经元可塑性有影响, 可能是参与弱视发病的重要分子机制^[15]。PSD-95 是突触后信号转导和整合的结构基础, 能与 NMDA (N-methyl-D-aspartic acid receptor) 受体信号通路中多种相关分子结合形成信号复合体, 还能影响突触前黏附分子, 发挥调节突触状态、维持突触结构的作用^[16]。本研究中 PSD-95 蛋白同样在 MD 后小鼠视皮质中表达下调, 提示 MD 可能对突触前、后相关蛋白同时产生影响。

视觉发育关键期终止后, 成年动物初级视皮质缺乏足够可塑性是弱视难以治愈的主要原因。最近在动物模型和临床试验中取得的结果改变了成年弱视视皮质可塑性是固定不变的这一认识, 使用特殊的治疗方法, 如给予 NEP1-40^[17]、氟西汀^[18]等药物干预, 能逆转

受限制的成年视皮质可塑性状态,重新激活成年视皮层的可塑性,促进视皮层结构和功能恢复。然而,有创的给药方式和药物的不良反应限制了成年弱视的临床治疗。近年来,国内外对弱视发病机制的研究越来越重视 EE 这一无创干预方式^[19-20]。EE 是研究感觉经验对大脑和行为影响的广泛应用的模型,被定义为复杂的无生命物与社会刺激的复合体^[21]。研究表明,与饲养于标准环境中的猫比较,EE 环境中的猫脑质量增加 7%,体积增大 10%,视皮质增厚,树突棘长度、突触形态及数量也发生改变,推测 EE 可导致神经系统形态结构的变化^[22]。本研究结果显示,与标准环境饲养相比较,EE 饲养的成年弱视小鼠前爪触地反射成功率显著升高,P₂波潜伏期明显缩短,振幅升高,视功能的恢复接近 MD+氟西汀组,提示 EE 对成年弱视小鼠视觉功能恢复有显著促进作用。此外,与 MD+干预组相似,EE 还能上调弱视小鼠视皮质中突触相关蛋白 SYP 及 PSD95 的表达,提示 EE 对视皮质神经元可塑性有明显的调控作用^[23-24]。

MAP2 是神经元树突标志物,为神经元细胞骨架的重要组成部分,主要在神经元胞体、树突和树突棘表达,调节微管蛋白组装,维持神经元骨架结构完整,调控突触可塑性^[25]。本研究结果显示,MD 可下调视皮层中 MAP2 的表达,提示 MAP2 作为重要的突触相关蛋白参与视皮层可塑性的过程。EE 干预可使单眼剥夺成年弱视小鼠视皮质中 MAP2 表达明显提高,且与突触相关蛋白 SYP 及 PSD95 的表达趋势一致,同时小鼠视觉功得到明显改善。我们推测其作用机制可能是 EE 通过复杂的感觉运动和社交刺激,增加了弱视模型小鼠视皮层 MAP2 的表达,调控树突修剪?,促进树突棘发育成熟,调节突触相关蛋白 SYP 及 PSD-95 的表达,重建或修复原突触可塑性功能,促进视觉功能恢复。

利益冲突 本研究所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Webber AL, Wood J. Amblyopia: prevalence, natural history, functional effects and treatment[J]. Clin Exp Optom, 2005, 88(6): 365-375.
- [2] Zhao W, Jia WL, Chen G, et al. A complete investigation of monocular and binocular functions in clinically treated amblyopia[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10682-10689. DOI: 10. 1038/s41598-017-11124-0.
- [3] Webber AL. Amblyopia treatment: an evidence-based approach to maximising treatment outcome[J]. Clin Exp Optom, 2007, 90(4): 250-257. DOI: 10. 1111/j. 1444-0938. 2007. 00164. x.
- [4] 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: 82-90. DOI: 10. 3389/fncir. 2014. 00082.
- [5] 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.
- [6] Baroncelli L, Bonaccorsi J, Milanese M, et al. Enriched experience and recovery from amblyopia in adult rats: impact of motor, social and sensory components[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(7): 2388-2397.
- [7] 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.
- [8] 吴小影, 罗瑜琳, 刘德林, 等. 左旋多巴对单眼形觉剥夺弱视大鼠视觉诱发电位及视皮质神经细胞的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(3): 220-225. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 03. 008.
- [9] Wu XY, Luo YL, Liu DL, et al. Effects of levodopa on visual evoked potential and visual cortex neuron in monocular deprivation rat[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(3): 220-225. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 03. 008.
- [10] Ma Y. Relationship between monocularly deprivation and amblyopia rats and visual system development[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(7): 568-571. DOI: 10. 1016/S1995-7645(14)60095-X.
- [11] 杨柳, 瞿远珍, 李岱, 等. 出生后不同鼠龄大鼠视皮质差异基因表达谱分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(8): 682-687. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 08. 003.
- [12] Yang Y, Qu YZ, Li D, et al. Expression profiles analysis of differential genes in rat visual cortex depending upon postnatal days by microarray[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(8): 682-687. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 08. 003.
- [13] Baroncelli L, Cenni MC, Melani R, et al. Early IGF-1 primes visual cortex maturation and accelerates developmental switch between NKCC1 and KCC2 chloride transporters in enriched animals[J]. Neuropharmacology, 2017, 113: 167-177. DOI: 10. 1016/j. neuropharm. 2016. 02. 034.
- [14] Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. Nature, 2002, 416(6881): 636-640. DOI: 10. 1038/416636a.
- [15] Selten M, van Bokhoven H, Nadif KN. Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders[J]. F1000Res, 2018, 7: 23-34. DOI: 10. 12688/f1000research. 12155. 1.
- [16] Zhou Y, Lai B, Gan WB. Monocular deprivation induces dendritic spine elimination in the developing mouse visual cortex[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4977. DOI: 10. 1038/s41598-017-05337-6.
- [17] 蔺静静. 单眼形觉剥夺弱视治疗前后突触素调节视皮质突触可塑性特征[D]. 新乡医学院, 2015: 43-49.
- [18] 尹若熙, 李树民, 俞腾飞, 等. 突触后致密区蛋白-95 与突触可塑性研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 497-499. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2017. 02. 107.
- [19] Luo Y, Wu X, Liu S, et al. Reactivation of visual cortical plasticity by NEP140 from early monocular deprivation in adult rats[J]. Neurosci Lett, 2011, 494(3): 196-201. DOI: 10. 1016/j. neurolet. 2011. 03. 011.
- [20] 解来青, 徐国旭, 魏晓红, 等. 氟西汀联合对侧眼遮盖对成年大鼠弱视的治疗作用[J]. 眼科, 2017(1): 61-65.
- [21] Levine JN, Chen H, Gu Y, et al. Environmental enrichment rescues binocular matching of orientation preference in the mouse visual cortex[J]. J Neurosci, 2017, 37(24): 5822-5833. DOI: 10. 1523/JNEUROSCI. 3534-16. 2017.
- [22] Sale A, Maya VJF, Medini P, et al. Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(6): 679-681. DOI: 10. 1038/nn1899.
- [23] Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, et al. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments[J]. Brain Res, 1978, 153(3): 563-576.
- [24] Mainardi M, Di GA, Caleo M, et al. Environmental enrichment strengthens corticocortical interactions and reduces amyloid-β oligomers in aged mice[J]. Front Aging Neurosci, 2014, 6: 1-9. DOI: 10. 3389/fnagi. 2014. 00001.
- [25] Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy[J]. Physiol Rev, 2014, 94(1): 189-234. DOI: 10. 1152/physrev. 00036. 2012.
- [26] House IG, House CM, Brennan AJ, et al. Regulation of perforin activation and pre-synaptic toxicity through C-terminal glycosylation[J]. EMBO Rep, 2017, 18(10): 1775-1785. DOI: 10. 15252/embr. 201744351.
- [27] Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2(MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration[J]. J Neurosci Res, 1992, 33(4): 505-512. DOI: 10. 1002/jnr. 490330402.

(收稿日期: 2018-12-04 修回日期: 2019-05-20)

(本文编辑: 杜娟)