

糖尿病小鼠早期视觉功能损伤与初级视觉皮层神经元功能异常的相关性分析

汤浩琼 封利霞 陶天畅 曾义格

安徽医科大学第一附属医院眼科, 合肥 230022

通信作者: 封利霞, Email: lixiafeng@163.com

【摘要】 **目的** 探讨糖尿病小鼠早期视觉功能损伤及其初级视觉皮层神经元的反应特性。 **方法** 将 20 只 SPF 级 7 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠应用随机数字表法随机分为糖尿病组和正常对照组, 每组 10 只。糖尿病组小鼠经腹腔内注射链脲佐菌素诱导建立糖尿病模型。造模前及造模后 1、2、3 周检测小鼠的空腹血糖水平和体质量, 并于造模后 4 周进行腹腔葡萄糖耐量试验以评估糖尿病模型建立情况。造模后 4 周, 采用视网膜电图 (ERG) 分别记录小鼠暗适应下光刺激强度分别为 0.01 、 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 ERG 反应, 并于明适应 10 min 后记录光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 ERG 反应评估小鼠视网膜功能; 采用超广角激光扫描检眼镜检测小鼠的眼底表现; 采用视觉水迷宫检测小鼠光栅辨别截止频率以评估小鼠的视觉功能; 采用在体电生理技术检测小鼠初级视觉皮层 (V1) 神经元的空间频率调谐曲线并统计神经元的最大发放强度、自发放强度、最优空间频率、截止频率、带宽等以评估小鼠的神经元功能。 **结果** 糖尿病组 10 只小鼠均造模成功。造模后 4 周, 糖尿病组小鼠暗适应光强度为 $0.01 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 b 波振幅、光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 a 波和 b 波振幅以及明适应 10 min 后光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 b 波振幅较正常对照组均有下降趋势, 但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。眼底超广角成像检查显示糖尿病组小鼠视网膜未见明显血管改变; 视觉水迷宫检测小鼠光栅辨别能力结果显示, 糖尿病组小鼠截止频率为 $(0.45 \pm 0.06) \text{ c}/\text{d}$, 明显低于正常对照组的 $(0.58 \pm 0.05) \text{ c}/\text{d}$, 差异有统计学意义 ($t = 5.10, P < 0.05$); 在体电生理检查结果显示, 糖尿病组小鼠视觉皮层 V1 区的神经元最大发放强度为 $4.29 (2.60, 8.33) \text{ spikes}/\text{s}$, 明显低于正常对照组的 $7.10 (4.34, 11.6) \text{ spikes}/\text{s}$, 最优空间频率、截止空间频率、带宽分别为 $0.03 (0.02, 0.05)$ 、 $0.07 (0.05, 0.12)$ 和 $0.14 (0.07, 0.22) \text{ c}/\text{d}$, 明显低于正常对照组的 $0.41 (0.03, 0.05)$ 、 $0.10 (0.07, 0.14)$ 和 $0.14 (0.10, 0.26) \text{ c}/\text{d}$, 差异均有统计学意义 ($Z = -4.29, -3.22, -3.19, -2.19$, 均 $P < 0.05$)。 **结论** 在糖尿病早期视网膜血管病变尚未出现时视觉功能即可出现异常, 这种功能异常与视觉皮层 V1 区的神经元功能损伤有关。

【关键词】 糖尿病; 视网膜; 初级视觉皮层; 视觉水迷宫; 视网膜电图; 电生理; 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金 (82371094)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20231017-00137

Correlation analysis between early visual function impairment and neuron function abnormality in diabetic mouse primary visual cortex

Tang Haoqiong, Feng Lixia, Tao Tianchang, Zeng Yige

Department of Ophthalmology, the First Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: Feng Lixia, Email: lixiafeng@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the damage of visual function in the early stage of diabetes mellitus and the response characteristics of primary visual cortex neurons in diabetic mice. **Methods** Twenty 7-week-old SPF grade male C57BL/6J mice were randomly divided into diabetes group and normal control group by the random number table method, with 10 mice in each group. The diabetes model in diabetes group was established by the intraperitoneal injection of streptozotocin. Fasting blood glucose concentration and body mass of mice were measured before and 1, 2 and 3 weeks after modeling, and intraperitoneal glucose tolerance test was performed 4 weeks after modeling to evaluate the establishment of diabetes model. At 4 weeks after modeling, the electroretinogram (ERG) responses of mice were recorded at dark adaptation luminances of 0.01 and $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$, and the ERG response to light adaptation luminance of $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ was recorded 10 minutes after light adaptation to evaluate the retinal

function of mice. The fundus of mice was examined with an ultra-wide field laser scanning ophthalmoscope. The visual function of mice was evaluated via the cutoff frequency of grating discrimination detected by visual water maze. The spatial frequency tuning curves of primary visual cortex (V1) neurons were detected by *in vivo* electrophysiology technique and the maximum firing intensity, self-firing intensity, optimal spatial frequency, cutoff frequency and bandwidth of neurons were calculated to evaluate the neuronal function of mice. The research scheme was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Anhui Medical University (No. LLSC20230419). **Results** The diabetic model was successfully established in 10 mice in the diabetes group. At 4 weeks after modeling, compared with the normal control group, the b-wave amplitudes of mice at a dark adaptation luminance of $0.01 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$, the a- and b-wave amplitudes of mice at a dark adaptation luminance of $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ and the b-wave amplitudes of mice at a light adaptation luminance of $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ after 10 minutes of light adaptation showed a downward trend in diabetes group, but the differences were not statistically significant (all at $P > 0.05$). Ultra-wide field laser scanning ophthalmoscopy showed no obvious vascular changes in the retina of diabetic mice. The results of visual water maze detection showed that the cutoff frequency of diabetes group was $(0.45 \pm 0.06) \text{ c}/\text{d}$, which was significantly lower than $(0.58 \pm 0.05) \text{ c}/\text{d}$ of normal control group ($t = 5.10, P < 0.05$). *In vivo* electrophysiological results showed that the maximum firing intensity of neurons in V1 region in diabetes group $4.29 (2.60, 8.33) \text{ spikes}/\text{second}$, which was significantly lower than $7.10 (4.34, 11.6) \text{ spikes}/\text{second}$ in normal control group ($Z = -4.29, P < 0.05$). The optimal spatial frequency, cutoff spatial frequency and bandwidth were $0.03 (0.02, 0.05)$, $0.07 (0.05, 0.12)$ and $0.14 (0.07, 0.22) \text{ c}/\text{d}$ in diabetes group, which were significantly lower than $0.41 (0.03, 0.05)$ and $0.10 (0.07, 0.14)$, $0.14 (0.10, 0.26) \text{ c}/\text{d}$ of normal control group, and the differences were statistically significant ($Z = -3.22, -3.19, -2.19$; all at $P < 0.05$). **Conclusions** The abnormal visual function may occur in the early stage of diabetes before the appearance of retinal vasculopathy, which is related to the damage of neurons in the V1 region.

[Key words] Diabetes mellitus; Retina; Primary visual cortex; Visual water maze; Electroretinogram; Electrophysiology; Mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82371094)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20231017-00137

近年来,糖尿病的发病率在全球范围内持续上升,我国糖尿病患者数量超过 1.4 亿^[1]。糖尿病会给视觉系统带来损伤,严重者可致盲^[2-3],因此糖尿病的视觉功能损伤一直是眼科和视觉研究关注的热点。但目前研究多集中于糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)所致的视觉损伤,临床上也主要关注视网膜结构和视力已受到影响的 DR 晚期治疗。然而,经眼底激光、眼内抗血管内皮生长因子药物注射和玻璃体视网膜手术等治疗后的糖尿病患者仍可存在严重的视觉功能障碍,部分糖尿病患者的生活质量并未得到明显改善^[4],如何更好地预防和治疗糖尿病患者的视觉功能损伤,提高患者的生活质量,值得深入研究。早期研究发现,糖尿病患者的视觉功能在未发生 DR 时已受到损伤,临床表现为对比敏感度、中心视野、色觉、视网膜电图异常^[5-7]。既往研究表明,此时的糖尿病患者存在神经节细胞复合体层和视网膜神经纤维层厚度变薄及毛细血管密度降低等视网膜结构损害^[8-10]。这些视网膜的形态学异常通常发生在糖尿病模型鼠发病后 10 周,甚至更长时间^[11-12]。然而,糖尿病模型鼠在发病后 2~3 周即发生视觉功能损伤^[13-14],这表明糖尿病早期视觉功能的损伤可能存在视网膜结构和功能异常

之外的其他原因。长期的高血糖状态会对神经细胞产生毒性作用,导致神经纤维萎缩和变性,从而影响周围神经系统的功能^[15];与此同时,长期的高血糖状态也会对中枢神经系统造成影响,导致认知功能障碍和记忆力减退等问题^[16]。磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检查发现存在认知功能障碍的糖尿病患者大脑枕叶灰质体积减小^[17],静息态功能 MRI 检查发现糖尿病患者颞叶和枕叶的自发脑活动减少^[18],其损伤的具体机制仍不明确。空间频率调谐作为图形识别的基础一直被广泛研究^[19],截止频率是一种重要的视觉特征指标,可以精确地量化视觉系统可分辨的最高正弦光栅频率^[20]。本研究探讨糖尿病早期小鼠光栅辨别的截止频率以及初级视觉皮层神经元对不同空间频率的调谐特性,旨在对糖尿病早期视觉功能异常的发生机制进行探讨,为研究糖尿病早期干预治疗方式提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 SPF 级 7 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只(合格证编号:No. 20233333,江苏集萃药康

生物科技股份有限公司),体质量 20~24 g。饲养环境为 12 h/12 h 循环明暗光照,温度为 22~25 ℃,湿度为 40%~70%。实验动物的使用和饲养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。研究方案经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(批文号:LLSC20230419)。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、三溴乙醇(美国 Sigma 公司);复方托吡卡胺滴眼液、盐酸奥布卡因滴眼液[参天制药(中国)有限公司]。罗氏精采血糖仪(德国 Roche 公司);视觉电生理仪(RETI-Port/Scan 21,德国 Roland 公司);超广角激光扫描检眼镜(英国 Optos 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型建立 20 只 7 周龄小鼠适应性喂养 1 周后,采用随机数字表法随机分为糖尿病组和正常对照组,每组 10 只。夜间禁食 10 h 后,糖尿病组小鼠按照 50 mg/kg 剂量腹腔内注射 1% STZ 溶液,正常对照组小鼠腹腔内注射等容量的柠檬酸钠缓冲液。连续注射 5 d,末次注射完成后 1 周取小鼠尾静脉血,用血糖测量仪测量空腹血糖浓度,空腹血糖浓度 ≥ 11.0 mmol/L 的小鼠视为建模成功,纳入实验。造模后 1、2 和 3 周检测小鼠体质量和空腹血糖浓度。于造模后 4 周进行腹腔葡萄糖耐量实验:小鼠禁食 16 h,按照 1 g/kg 剂量腹腔内注射 20% 葡萄糖溶液,取小鼠尾静脉血分别检测注射前和注射后 15、30、60、90、120 min 空腹血糖浓度。

1.2.2 视网膜电图检测小鼠视网膜功能 造模后 4 周,采用视觉电生理仪按标准化操作流程记录视网膜电图(electroretinogram, ERG)波形。检测前小鼠在暗环境下暗适应 12 h,腹腔内注射 1.3% 三溴乙醇(20 ml/kg)进行麻醉,采用复方托吡卡胺滴眼液点眼充分扩瞳,采用盐酸奥布卡因滴眼液点眼行角膜表面麻醉,用棉签轻拭多余水分,当小鼠四肢肌肉松弛、角膜无刺激反应时视为麻醉成功。将小鼠俯卧固定于实验台上,给予保温。作用电极为直径 0.2 mm 金属丝制成的环状电极,置于角膜表面充分接触角膜;参考电极为不锈钢针状电极,插入颊部皮下;接地电极为不锈钢针状电极,插入尾根部背侧皮下。分别记录小鼠暗适应下光刺激强度为 0.01、3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 ERG 波形,并于明适应 10 min 后记录光强度为 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 ERG 波形。全部实验均在暗室红光微弱照射下完成。记录后用罗红霉素眼用凝胶点眼,分析不同刺激光强度下 ERG a、b 波振幅的差异。

1.2.3 超广角激光扫描检眼镜检查小鼠眼底 采用

超广角激光扫描检眼镜拍摄小鼠双眼眼底照片,观察造模后 4 周小鼠视盘结构是否正常、视网膜是否有渗出及出血。检查时使用复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳,腹腔内注射 1.3% 三溴乙醇麻醉小鼠。拍摄完成后用罗红霉素眼用凝胶点眼。

1.2.4 视觉水迷宫检测小鼠视觉行为学 采用视觉水迷宫(visual water maze, VWM)检测小鼠造模后 4 周光栅辨别能力的截止频率以评估小鼠的视觉功能。VWM 的一端设有左右两侧显示器随机显示水平和垂直正弦光栅刺激,小鼠只有在到达显示垂直光栅刺激的一侧方可上岸(图 1)。造模后 1 周,2 个组小鼠每天学习辨认 2 种方向固定低空间频率的正弦光栅刺激,连续 3 d 小鼠辨认正确率达 80% 及以上视为小鼠学会 VWM 任务。造模后 4 周,排除未学会辨别任务的小鼠,分别纳入糖尿病组 9 只、正常对照组 10 只小鼠进行视觉行为学检测。检测时光栅的空间频率随着小鼠正确辨别垂直光栅而不断变大,当小鼠连续 10 次以上不能辨别更高空间频率的光栅时视为小鼠辨别能力达到平台期,取平台期最后 10 个空间频率数值的平均值作为小鼠双眼截止频率值。检查程序和结果分析均采用 Matlab(美国 Mathworks 公司)及心理物理学扩展工具包编写。

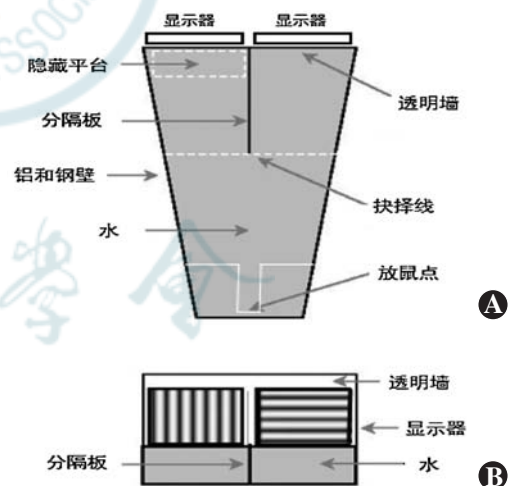


图 1 视觉水迷宫模型图 水迷宫垂直长度为 140 cm,显示器端宽 80 cm、高 55 cm A:俯视图 B:正视图

Figure 1 Visual water maze model The vertical length of water maze was 140 cm, and the display end was 80 cm wide, and the height was 55 cm A: Top view B: Front view

1.2.5 细胞外单细胞记录法检测小鼠初级视觉皮层神经元功能

1.2.5.1 细胞外单细胞记录法 采用电生理学细胞外单细胞记录方法检测造模后 4 周小鼠初级视觉皮层(V1)区神经元对空间频率的调谐特性以评估 V1 区神

经元的功能。检测神经元的空间频率反应曲线时,使用运动的正弦光栅作为视觉刺激,刺激的方位设为该神经元的最佳方位,刺激的呈现时间长短设为该神经元的最佳时间频率,刺激的对比度固定为高对比度 95%,测试的空间频率分别为 0.01、0.03、0.05、0.10、0.21、0.42、0.84 c/d,每个刺激呈现前屏幕显示 0.5 s 的空白刺激(屏幕为平均亮度的灰色)。实验时小鼠采用 1%~1.5% 异氟烷麻醉(气流量为 0.05 L/min)固定于小鼠适配器上,给予保温。将多通道作用电极植入小鼠一侧 V1 区(前囟后 3.5 mm,后囟左 2.5 mm/右 2.5 mm),参考电极植入前囟附近脑区并接地。将 CRT 显示器放置于小鼠植入电极的对侧眼前 30 cm 处,显示视觉刺激。单细胞放电经由胞外电极放大器(美国 DAGAN 公司)放大,然后一路介入窗口甄别器及示波器显示信号波形,另一路经过数据采集卡(美国 National Instruments 公司)数模转换后存入计算机进行后续分析。使用 Plexon Offline Sorter 软件对记录的神经元信号进行分离,再用 MATLAB 程序进行分析。神经元的空间频率调谐曲线采用 log-Gaussian 方程进行拟合,拟合优度 ≥ 0.8 的数据纳入统计。

1.2.5.2 视觉皮层神经元检测指标及定义 (1) 神经元的空间频率调谐曲线采用 log-Gaussian 方程进行拟合: $R(sf) = R_{\max} \times \exp\{-[\log_2(sf) - \log_2(sf_{\text{opt}})]^2 / 2\sigma_{\text{sf}}^2\}$, 其中 R_{\max} 、 sf_{opt} 和 σ_{sf} 为自由变量, R_{\max} 代表神经元拟合曲线最大值, sf_{opt} 代表神经元最佳空间频率, σ_{sf} 代表空间频率高斯波宽。(2) 最佳空间频率 根据曲线拟合结果,将引起神经元产生最大发放时光栅刺激的空间频率记为最佳空间频率。(3) 带宽 将空间频率调谐曲线中最大发放值一半处对应的空间频率差值作为调谐带宽。(4) 截止空间频率 将 0.1 倍 R_{\max} 处对应的高频截止空间频率作为截止空间频率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad prism 8.0 软件进行统计分析,采用 GraphPad prism 8.0 和 MATLAB 程序进行绘图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布者以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。各组小鼠不同眼别 ERG 各振幅比较采用两因素方差分析;各组光栅分辨截止频率比较采用独立样本 t 检验;各组小鼠神经元空间频率调谐特性比较采用 Mann-Whitney U 检验;各组神经元截止频率与带宽的相关性检验采用 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病组小鼠造模后与正常对照组一般情况比较

造模后糖尿病组小鼠出现明显多饮、多食、多尿、体质量降低及精神萎靡,反应迟钝症状;正常对照组小鼠精神佳,反应灵敏。腹腔葡萄糖耐量实验结果显示,糖尿病组小鼠注射葡萄糖溶液后空腹血糖水平相对上升快而下降缓慢。糖尿病组 10 只小鼠均造模成功,2 个组小鼠饲养过程中未出现死亡。

2.2 糖尿病组与正常对照组小鼠 ERG 振幅比较

造模后 4 周,ERG 记录 2 个组小鼠暗适应光强度分别为 0.01、3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 以及明适应 10 min 后光强度为 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的波形见图 2。

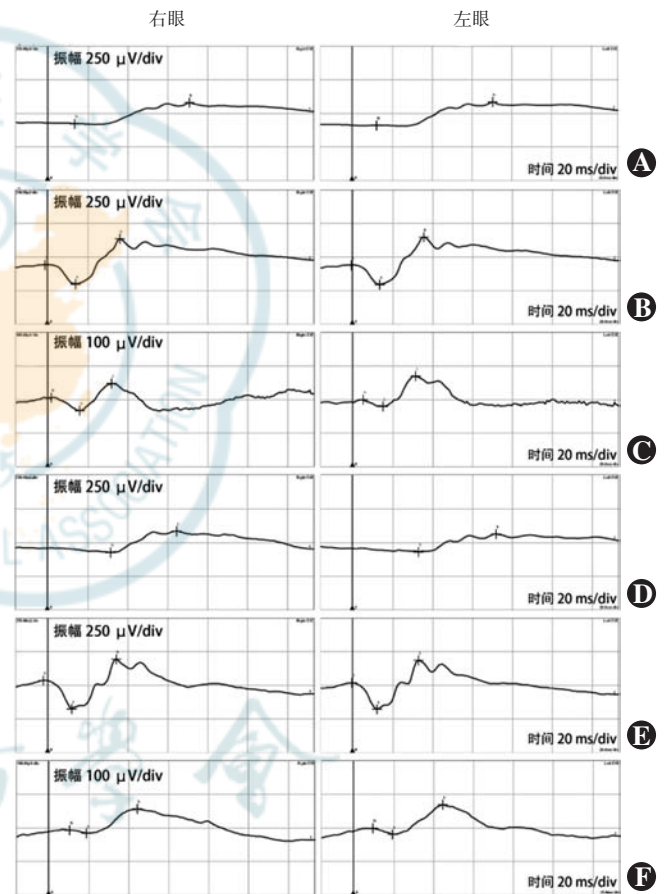


图 2 2 个组小鼠 ERG 波形比较 A: 正常对照组暗适应光强度为 0.01 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 波形 B: 正常对照组暗适应光强度为 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 波形 C: 正常对照组明适应光强度为 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 波形 D: 糖尿病组暗适应光强度为 0.01 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 波形 E: 糖尿病组暗适应光强度为 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 波形 F: 糖尿病组明适应光强度为 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 波形

Figure 2 Comparison of mouse ERG waveform between two groups A: In normal control group, the dark adaptation luminance was 0.01 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ B: In normal control group, the dark adaptation luminance was 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ C: In normal control group, the light adaptation luminance was 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ D: In diabetes group, the dark adaptation luminance was 0.01 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ E: In diabetes group, the dark adaptation luminance was 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ F: In diabetes group, the light adaptation luminance was 3.0 $\text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$

2 个组不同眼别暗适应光强度为 $0.01 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 b 波振幅、光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 a 波和 b 波振幅以及明适应 10 min 后光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 b 波振幅总体比较, 差异均无统计学意义 (暗适应 0.01 b 波: $F_{\text{组别}} = 1.01, P = 0.32; F_{\text{眼别}} = 0.50, P = 0.49$. 暗适应 3.0 a 波: $F_{\text{组别}} = 0.86, P = 0.77; F_{\text{眼别}} = 3.27, P = 0.08$. 暗适应 3.0 b 波: $F_{\text{组别}} = 3.35, P = 0.75; F_{\text{眼别}} = 0.91, P = 0.35$. 明适应 3.0 b 波: $F_{\text{组别}} = 0.31, P = 0.58; F_{\text{眼别}} = 0.85, P = 0.36$)。糖尿病组小鼠暗适应光强度

为 $0.01 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 b 波振幅、光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 a 波和 b 波振幅以及明适应 10 min 后光强度为 $3.0 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 的 b 波振幅较正常对照组均有下降趋势 (表 1)。
2.3 糖尿病组与正常对照组小鼠视网膜情况比较

造模后 4 周, 2 个组小鼠眼底超广角成像检查均可见视盘结构清晰, 未见视网膜出血和渗出 (图 3)。

2.4 糖尿病组与正常对照组小鼠视觉行为学表现比较

VWM 结果显示, 糖尿病组小鼠辨别空间频率的能力更早到达平台期, 糖尿病组光栅分辨截止频率为 $(0.45 \pm 0.06) \text{ c}/\text{d}$, 明显低于正常对照组的 $(0.58 \pm 0.05) \text{ c}/\text{d}$, 差异有统计学意义 ($t = 5.10, P < 0.05$) (图 4)。

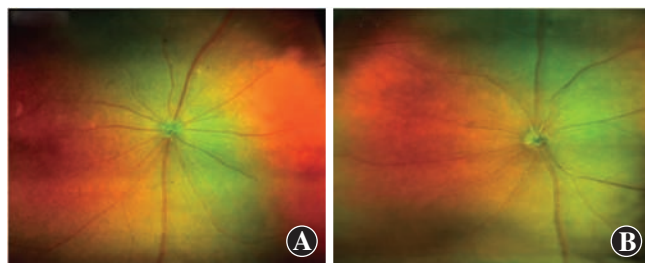


图 3 2 个组小鼠眼底超广角成像检查 A: 糖尿病组 B: 正常对照组
 Figure 3 Ultra-wide field fundus photos of mice in different groups A: Diabetes group B: Normal control group

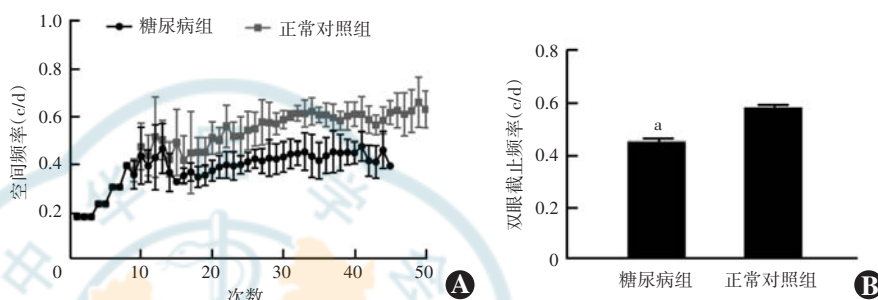


图 4 2 个组小鼠行为学表现比较 A: 小鼠辨别空间频率表现 B: 截止频率比较
 Figure 4 Comparison of mouse behavioral performance between two groups A: Mice spatial frequency discrimination performance B: Comparison of cutoff frequency Compared with normal control group, $^a P < 0.05$ (Independent samples t -test)

2.5 糖尿病组与正常对照组小鼠初级视觉皮层神经元功能比较

2 个组分别记录了 6 只小鼠的在体电生理数据, 其中糖尿病组小鼠共记录到 104 个细胞, 正常对照组共记录到 224 个细胞。实验结果显示, 小鼠 V1 区的神经元对光栅的空间频率具有明显的调谐, 正常对照组和糖尿病组 V1 区的典型空间频率调谐反应见图 5。糖尿病组小鼠 V1 区神经元最大发放强度、最优空间频率、截止空间频率、带宽均显著低于正常对照组, 差异均有统计学意义 ($Z = -4.29, -3.22, -3.19, -2.19$, 均 $P < 0.05$); 糖尿病组神经元自发放强度与正常对照组比较差异无统计学意义 ($Z = -0.67, P = 0.05$) (表 2)。糖尿病组和正常对照组的截止空间频率与带宽均呈强正相关 ($r_s = 0.87, 0.82$, 均 $P < 0.05$) (图 6)。

表 1 2 个组小鼠 ERG 振幅比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{V}$)

Table 1 Comparison of mouse ERG amplitude between two groups ($\bar{x} \pm s, \mu\text{V}$)

组别	样本量	暗适应 0.01 b 波		暗适应 3.0 a 波	
		右眼	左眼	右眼	左眼
正常对照组	10	147.57 ± 37.14	149.24 ± 61.95	173.90 ± 59.57	153.85 ± 49.90
糖尿病组	10	144.41 ± 39.91	120.06 ± 59.35	179.78 ± 54.63	179.78 ± 54.63

组别	样本量	暗适应 3.0 b 波		明适应 3.0 b 波	
		右眼	左眼	右眼	左眼
正常对照组	10	365.10 ± 74.89	375.30 ± 96.46	76.30 ± 22.71	73.87 ± 20.98
糖尿病组	10	344.60 ± 123.84	267.61 ± 136.99	76.54 ± 13.55	65.50 ± 31.71

注: 暗适应 0.01 b 波: $F_{\text{组别}} = 1.01, P = 0.32; F_{\text{眼别}} = 0.50, P = 0.49$. 暗适应 3.0 a 波: $F_{\text{组别}} = 0.86, P = 0.77; F_{\text{眼别}} = 3.27, P = 0.08$. 暗适应 3.0 b 波: $F_{\text{组别}} = 3.35, P = 0.75; F_{\text{眼别}} = 0.91, P = 0.35$. 明适应 3.0 b 波: $F_{\text{组别}} = 0.31, P = 0.58; F_{\text{眼别}} = 0.85, P = 0.36$ (两因素方差分析) ERG: 视网膜电图

Note: Dark adaptation 0.01 b-wave: $F_{\text{group}} = 1.01, P = 0.32; F_{\text{eye}} = 0.50, P = 0.49$. Dark adaptation 3.0 a-wave: $F_{\text{group}} = 0.86, P = 0.77; F_{\text{eye}} = 3.27, P = 0.08$. Dark adaptation 3.0 b-wave: $F_{\text{group}} = 3.35, P = 0.75; F_{\text{eye}} = 0.91, P = 0.35$. Light adaptation 3.0 b-wave: $F_{\text{group}} = 0.31, P = 0.58; F_{\text{eye}} = 0.85, P = 0.36$ (Two-way ANOVA) ERG: electroretinogram

表 2 2 个组小鼠神经元空间频率调谐特性比较 [M(Q₁, Q₃)]

Table 2 Comparison of spatial frequency tuning characteristics of neurons in mice between two groups [M(Q₁, Q₃)]

组别	样本量	最大发放强度 (spikes/s)	自发发放强度 (spikes/s)	最优空间频率 (c/d)	截止空间频率 (c/d)	带宽 (c/d)
正常对照组	224	7.10(4.34, 11.6)	0.40(0.00, 1.60)	0.41(0.03, 0.05)	0.10(0.07, 0.14)	0.14(0.10, 0.26)
糖尿病组	104	4.29(2.60, 8.33)	0.40(0.20, 1.00)	0.03(0.02, 0.05)	0.07(0.05, 0.12)	0.14(0.07, 0.22)
Z 值		-4.29	-0.67	-3.22	-3.19	-2.19
P 值		<0.05	0.50	<0.05	<0.05	<0.05

注: (Mann-Whitney U 检验)

Note: (Mann-Whitney U test)

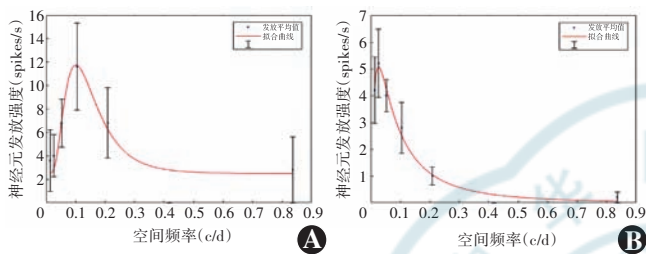


图 5 2 个组小鼠神经元空间频率调谐 A: 正常对照组 B: 糖尿病组

Figure 5 Spatial frequency tuning of neurons in mice A: Normal control group B: Diabetes group

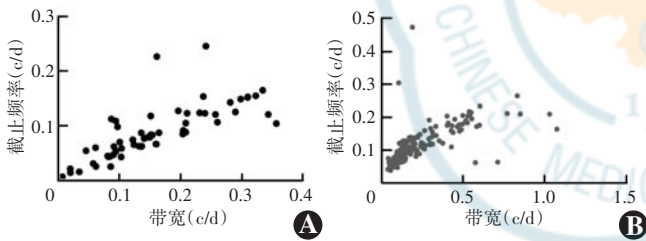


图 6 2 个组神经元截止频率与带宽 Spearman 秩相关分析 糖尿病组和正常对照组的截止频率与带宽均呈强正相关 (r_s = 0.87、0.82, 均 P < 0.05) A: 糖尿病组 (n = 104) B: 正常对照组 (n = 224)

Figure 6 Spearman rank correlation analysis of neuron cutoff frequency and bandwidth There was a strong positive correlation between cutoff frequency and bandwidth in both diabetes group and normal control group (r_s = 0.87, 0.82; both at P < 0.05) A: Diabetes group (n = 104) B: Normal control group (n = 224)

3 讨论

本研究通过小鼠视觉行为学实验发现糖尿病模型小鼠发病后 4 周视觉功能受损, 眼底广角成像结果显示小鼠眼底并无明显异常, ERG 结果显示糖尿病模型小鼠发病后 4 周 ERG 反应较正常同龄小鼠有下降趋势, 但差异无统计学意义。以上结果表明, 糖尿病早期未出现 DR 时视觉功能发生异常, 本研究样本量较小, 这种视觉功能的异常是否早于视网膜功能损伤仍有待进一步探讨。

初级视觉皮层 (V1 区) 在视觉传导通路中是第一个接收视觉信息的大脑皮层区域, 并将这些信息传达

到 18 个以上的其他皮层区域, V1 区的病变或损伤会导致视觉感知的严重丧失^[21]。神经元反应是视觉认知功能的神经基础^[22], 神经电生理技术的进步可使我们在体记录神经元的功能变化, 通过多通道记录 1 次即可记录几十个神经元的同步变化。在视觉神经系统中, 多数神经元对视觉刺激的空间频率具有明显的调谐, 神经元的空间频率调谐曲线反映了神经元对视觉刺激的调谐特性; 在最优空间频率光栅刺激下神经元的反应达到神经元的最大发放强度, 带宽可以定量描述空间频率的调谐程度, 神经元的最佳空间频率和截止空间频率则分别反映神经元的空间频率选择性和空间分辨能力^[23]。本研究结果显示, 造模后 4 周糖尿病组小鼠神经元的最大发放强度变小, 带宽变窄, 而自发发放强度与正常对照组小鼠无明显差异, 反映神经元对不同空间频率刺激的反应不足; 糖尿病组小鼠的截止频率和最优空间频率较正常对照组小鼠低, 表明糖尿病损伤了小鼠 V1 区神经元的空间分辨能力以及空间频率选择性。本研究还对神经元截止频率与带宽的相关性进行了分析, 结果显示 2 个组小鼠的神经元截止频率均与带宽呈正相关, 这表明神经元的空间频率分辨能力对神经元的空间频率调谐程度有明显依赖性。此前也有研究发现糖尿病发病后 2~4 周, 小鼠 V1 区神经元的方位调谐能力受损, 而小鼠视网膜并无结构性异常^[24]。本研究通过 V1 区神经元空间频率调谐反应受损证实糖尿病早期小鼠 V1 区的神经元功能受损。这种损伤可能是由于机体血糖水平的改变会影响血-脑屏障的完整性, 从而带来一系列的神经元微环境改变, 包括渗透压的改变、代谢产物的改变等, 对神经元的生长、分化、突触可塑性、神经递质等产生影响^[25]。质子磁共振波谱研究发现, I 型糖尿病大鼠视皮层代谢产物发生明显变化^[26], 形态学研究也显示糖尿病大鼠视皮层锥体细胞萎缩变性^[27]。这些结构、微环境的改变必然会带来 V1 区神经元功能的变化, 但其功能损伤的确切机制有待研究。

综上所述,在糖尿病早期视网膜血管病变尚未出现时视觉功能即可出现异常,这种异常与视觉皮层 V1 区的神经元功能损伤有关。目前对于糖尿病的眼部并发症多通过眼底激光、手术等手段治疗^[28],但对糖尿病已造成的神经元损伤,特别是视皮层神经元功能损伤尚无有效的治疗手段。如能采用有效手段减缓神经元的变性,提高视皮层及视网膜神经元的活性和功能,将有助于改善糖尿病患者的视觉功能。本课题组下一步将对糖尿病早期 V1 区神经元功能损伤的确切机制进行探讨,为将来针对这种损伤治疗方式的研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 汤浩琼:实施研究、采集/分析数据、统计分析、文章撰写;封利霞:酝酿和设计实验、指导研究、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿;陶天畅:指导研究;曾义格:实施研究

参考文献

- [1] Thomas RL, Halim S, Gurudas S, et al. IDF Diabetes Atlas: a review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018 [J/OL]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107840 [2024-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733978/>. DOI: 10. 1016/j. diabres. 2019. 107840.
- [2] Symes RJ, Liew G, Tufail A. Sight-threatening diabetic eye disease: an update and review of the literature [J/OL]. *Br J Gen Pract*, 2014, 64(627): e678-680 [2024-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25267057/>. DOI: 10. 3399/bjgp14X682033.
- [3] Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: looking forward to 2030 [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1077669 [2024-02-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36699020/>. DOI: 10. 3389/fendo. 2022. 1077669.
- [4] Woodcock A, Bradley C, Plowright R, et al. The influence of diabetic retinopathy on quality of life: interviews to guide the design of a condition-specific, individualised questionnaire: the RetDQoL [J]. *Patient Educ Couns*, 2004, 53(3): 365-383. DOI: 10. 1016/j. pec. 2003. 10. 007.
- [5] Pramanik S, Chowdhury S, Ganguly U, et al. Visual contrast sensitivity could be an early marker of diabetic retinopathy [J/OL]. *Heliyon*, 2020, 6(10): e05336 [2024-02-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33145449/>. DOI: 10. 1016/j. heliyon. 2020. e05336.
- [6] Jia Y, Lin Q, Xiao Y, et al. Are we overlooking the neurodegeneration in the early stage of type 1 diabetes mellitus without visual impairment or diabetic retinopathy: is it probably occurred before retinal vasculature dysfunction? [J]. *Curr Eye Res*, 2023, 48(5): 433-440. DOI: 10. 1080/02713683. 2022. 2152056.
- [7] Yu Q, Xiao Y, Lin Q, et al. Two-year longitudinal study on changes in thickness of the retinal nerve fiber layer and ganglion cell layer in children with type 1 diabetes mellitus without visual impairment or diabetic retinopathy [J]. *Curr Eye Res*, 2022, 47(8): 1218-1225. DOI: 10. 1080/02713683. 2022. 2079142.
- [8] Cao D, Yang D, Huang Z, et al. Optical coherence tomography angiography discerns preclinical diabetic retinopathy in eyes of patients with type 2 diabetes without clinical diabetic retinopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2018, 55(5): 469-477. DOI: 10. 1007/s00592-018-1115-1.
- [9] Salvi L, Plateroti P, Balducci S, et al. Abnormalities of retinal ganglion cell complex at optical coherence tomography in patients with type 2 diabetes: a sign of diabetic polyneuropathy, not retinopathy [J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(3): 469-476. DOI: 10. 1016/j. jdiacomp. 2015. 12. 025.
- [10] Vujosevic S, Midena E. Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and Müller cells alterations [J/OL]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 905058 [2024-02-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23841106/>. DOI: 10. 1155/2013/905058.
- [11] Martin PM, Roon P, Van Ells TK, et al. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(9): 3330-3336. DOI: 10. 1167/iovs. 04-0247.
- [12] Mishra M, Duraisamy AJ, Kowluru RA. Sirt1: a guardian of the development of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2018, 67(4): 745-754. DOI: 10. 2337/db17-0996.
- [13] Kim MK, Aung MH, Mees L, et al. Dopamine deficiency mediates early rod-driven inner retinal dysfunction in diabetic mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(1): 572-581. DOI: 10. 1167/iovs. 17-22692.
- [14] Aung MH, Kim MK, Olson DE, et al. Early visual deficits in streptozotocin-induced diabetic long evans rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(2): 1370-1377. DOI: 10. 1167/iovs. 12-10927.
- [15] Galiero R, Caturano A, Vetrano E, et al. Peripheral neuropathy in diabetes mellitus: pathogenetic mechanisms and diagnostic options [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3554 [2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36834971/>. DOI: 10. 3390/ijms24043554.
- [16] Biessels GJ, Reijmer YD. Brain changes underlying cognitive dysfunction in diabetes: what can we learn from MRI? [J]. *Diabetes*, 2014, 63(7): 2244-2252. DOI: 10. 2337/db14-0348.
- [17] Zhang Y, Zhang X, Zhang J, et al. Gray matter volume abnormalities in type 2 diabetes mellitus with and without mild cognitive impairment [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 562: 1-6. DOI: 10. 1016/j. neutlet. 2014. 01. 006.
- [18] Cui Y, Jiao Y, Chen YC, et al. Altered spontaneous brain activity in type 2 diabetes: a resting-state functional MRI study [J]. *Diabetes*, 2014, 63(2): 749-760. DOI: 10. 2337/db13-0519.
- [19] Shapley R, Lennie P. Spatial frequency analysis in the visual system [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1985, 8: 547-583. DOI: 10. 1146/annurev. ne. 08. 030185. 002555.
- [20] Zhang X, An X, Liu H, et al. The topographical arrangement of cutoff spatial frequencies across lower and upper visual fields in mouse V1 [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7734 [2024-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25583266/>. DOI: 10. 1038/srep07734.
- [21] Resulaj A. Projections of the mouse primary visual cortex [J/OL]. *Front Neural Circuits*, 2021, 15: 751331 [2024-02-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34867213/>. DOI: 10. 3389/fncir. 2021. 751331.
- [22] Angelucci A, Bijanzadeh M, Numminen L, et al. Circuits and mechanisms for surround modulation in visual cortex [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2017, 40: 425-451. DOI: 10. 1146/annurev-neuro-072116-031418.
- [23] Yuan N, Liang Z, Yang Y, et al. Changes of spatial and temporal frequency tuning properties of neurons in the middle temporal area of aged rhesus monkeys [J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 40(4): 2652-2661. DOI: 10. 1111/ejn. 12634.
- [24] Chen H, Wang M, Xia L, et al. New evidence of central nervous system damage in diabetes: impairment of fine visual discrimination [J]. *Diabetes*, 2022, 71(8): 1772-1784. DOI: 10. 2337/db21-0715.
- [25] Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(3): 309-317. DOI: 10. 1038/nn2055.
- [26] Li S, Wang X, Yang J, et al. Metabolic profile of visual cortex in diabetic rats measured with *in vivo* proton MRS [J/OL]. *NMR Biomed*, 2017, 30(11): e3783 [2024-02-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28915340/>. DOI: 10. 1002/nbm. 3783.
- [27] 凌俊辉, 林立国, 钟珠. 糖尿病大鼠大脑皮层脑源性神经营养因子的表达及内锥体神经元的变化 [J]. *广东医学院学报*, 2014, 32(4): 447-449. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-4057. 2014. 04. 008.
- [28] Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies [J/OL]. *JCI Insight*, 2017, 2(14): e93751 [2024-02-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28724805/>. DOI: 10. 1172/jci. insight. 93751.

(收稿日期:2024-05-20 修回日期:2024-06-29)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

