

IGF-1介导的丰富环境对成年弱视小鼠视皮层可塑性的影响

罗瑜琳¹, 罗诗诗², 刘政海², 王曦琅¹, 陶利娟¹, 吴小影³, 涂艳琼³

引用:罗瑜琳,罗诗诗,刘政海,等. IGF-1介导的丰富环境对成年弱视小鼠视皮层可塑性的影响. 国际眼科杂志 2020;20(2):224-229

基金项目:湖南省中医药科研计划课题(No.201974);湖南省自然科学基金青年基金资助项目(No.14JJ3153)

作者单位:¹(410007)中国湖南省长沙市,湖南省儿童医院眼科;²(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学医学院临床应用解剖与生殖研究所;³(410008)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅医院眼科

作者简介:罗瑜琳,毕业于中南大学,博士,副主任医师,研究方向:弱视发病机制的基础及临床研究。

通讯作者:罗瑜琳. luoyulin2000@126.com

收稿日期:2019-03-19 修回日期:2020-01-06

摘要

目的:检测丰富环境干预对单眼剥夺成年弱视小鼠视皮层中IGF-1及其受体的表达变化,初步探讨其对成年弱视小鼠初级视皮层突触可塑性的影响及分子机制。

方法:将正常新生昆明小鼠随机分为正常组(Nor),单眼剥夺+标准环境组(MD+SE),单眼剥夺+丰富环境组(MD+EE),单眼剥夺+氟西汀组(MD+FLX)。在小鼠21日龄时构建单眼剥夺模型,确定模型建立成功后,每组选取18只小鼠按照预先分组放置在标准环境或丰富环境中饲养4wk,单眼剥夺+氟西汀组小鼠饮水中加入氟西汀。通过前爪触地反射实验检测小鼠视敏度,闪光视觉诱发电位检测客观视功能;小鼠处死后取材,使用电镜检测视皮层神经元的突触间隙宽度、突触活性区长度及突触后致密物厚度,Western Blot法检测视皮层中IGF-1、IGF-1R及IGFBP5蛋白表达。

结果:(1)视敏度检测结果:MD+SE组小鼠前爪触地成功率明显低于Nor组($P<0.001$);MD+EE组及MD+FLX组小鼠前爪触地成功率明显高于MD+SE组(均 $P<0.001$);与MD+FLX组比较,MD+EE组小鼠前爪触地成功率无差异($P=0.816$)。(2)闪光视觉诱发电位检测结果:与Nor组比较,MD+SE组小鼠剥夺眼闪光视觉诱发电位P2波潜伏期延长、波幅降低(均 $P<0.01$);丰富环境饲养后,MD+EE组较MD+SE组小鼠剥夺眼闪光视觉诱发电位P2波潜伏期缩短、波幅增加(均 $P<0.01$);与MD+FLX组比较,MD+EE组小鼠剥夺眼闪光视觉诱发电位P2波的潜伏期和波幅变化无差异($P>0.05$)。(3)电镜检测视皮层神经细胞突触超微结构:与Nor组比较,MD+SE组小鼠剥夺眼对侧视皮层神经细胞突触间隙增宽($P<0.01$),突触活性区长度缩短($P<0.01$),突触后致密物厚度变薄($P<0.01$);丰富环境饲养后,MD+EE组小鼠较MD+SE组突触间隙变窄($P=0.0035$),突触活性区长度延长($P<0.01$),突触后致密物厚度增加($P<0.01$),MD+EE组突触超微结构各项指标较MD+FLX组比较无差异($P>0.05$)。(4)

Western blot检测视皮层中IGF-1、IGF-1R及IGFBP5蛋白表达;MD+SE组小鼠IGF-1及IGF-1R蛋白表达明显低于Nor组(均 $P<0.01$);MD+EE组小鼠IGF-1及IGF蛋白的表达明显高于MD+SE组(均 $P<0.01$),然而仍显著低于Nor组(均 $P<0.01$)。各组间小鼠IGFBP5蛋白表达异常无差异($P>0.05$)。

结论:丰富环境能重新激活成年单眼剥夺弱视小鼠视皮层可塑性,改善弱视小鼠视觉功能,其机制可能与调控IGF-1及受体的表达有关。

关键词:胰岛素样生长因子-1;丰富环境;弱视;视皮层;可塑性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.2.06

Effects of IGF-1 mediated enrichment environment on visual cortex plasticity in adult amblyopic mice

Yu-Lin Luo¹, Shi-Shi Luo², Zheng-Hai Liu², Xi-Lang Wang¹, Li-Juan Tao¹, Xiao-Ying Wu³, Yan-Qiong Tu³

Foundation items: Project of Traditional Chinese Medicine Science Research Foundation of Hunan Province (No. 201974); Youth Project of Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 14JJ3153)

¹Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China; ²Institute of Clinical Anatomy and Reproductive Medicine, University of South China Medicine School, Hengyang 421001, Hunan Province, China;

³Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Yu-Lin Luo. Department of Ophthalmology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan Province, China. luoyulin2000@126.com

Received:2019-03-19 Accepted:2020-01-06

Abstract

• AIM: To investigate the effect and possible mechanism of enriched environment on regulating the plasticity of visual cortex in adult monocular deprivation amblyopia mice.

• METHODS: In this experimental study, a total of 72 Kunming mice were randomly divided into control group (Nor), monocular deprivation + standard environment group (MD + SE), monocular deprivation + enriched environment group (MD+EE) and monocular deprivation + fluoxetine group (MD + FLX). MD model of mice were established at postpartum 21d, and then fed the mice

under SE or EE for 4wk. For the mice in MD+FLX group, they were fed by water with fluoxetine. The visual acuity and flash visual evoked potential of mice in each group were detected. Ultrastructural modifications of synaptic junctions in each group were detected using the electronic microscope. We also applied the molecular biology to study the role of enriched environment in visual cortex of adult amblyopic mice whether through regulating the expression of IGF-1, IGF-1R and IGFBP5.

• **RESULTS:** 1) Visual acuity examination: the successful rate of forepaw-reaching reflex in MD+SE group mice is lower than that in Nor group ($P < 0.001$). Compared to MD+SE group, the successful rate of forepaw-reaching reflex improved in MD+EE group ($P < 0.001$) and MD+FLX group ($P < 0.001$). The difference is not significant between the MD+EE group and MD+FLX group ($P = 0.816$); 2) Flash-visual evoked potential examination: compare to the Nor group, the P2 latency was prolonged ($P < 0.01$), and the P2 amplitude was decreased ($P < 0.01$) of flash-visual evoked potential (F-VEP) in the deprived eye in MD+SE group mice; After rearing in enriched environment, the P2 latency was shortened ($P = 0.003$) and P2 amplitude was increased ($P = 0.000$) in the deprived eye detected with F-VEP, which is not significant in P2 latency and amplitude when compare to MD+FLX group ($P > 0.05$); 3) The structural modifications of synaptic junctions examined by electromicrographs: Compare to the Nor group, the synaptic clefts increased ($P < 0.01$), the synaptic active zone shortened ($P < 0.01$), and the thickness of PSD decreased ($P < 0.01$) in MD+SE group mice. After rearing in enriched environment, the synaptic clefts decreased ($P = 0.0035$), the synaptic active zone prolonged ($P = 0.000$) and the thickness of PSD increased ($P = 0.000$) in the visual cortex contralateral to the deprived eye, which is not significant in all of the structural parameters of the synaptic junction in visual cortex when compare to MD+FLX group ($P > 0.05$); 4) IGF-1, IGF-1R and IGFBP5 expression detected by Western-blot: Compare to the Nor group, the IGF-1 and IGF-1R expression in visual cortex contralateral to deprived eye are both down-regulated in MD+SE group ($P < 0.01$; $P < 0.01$). After rearing in enriched environment, the expression of IGF-1 and IGF-1R in MD+EE group was significantly higher than that in MD+SE group ($P = 0.016$; $P = 0.041$), but still lower than that in Nor group ($P = 0.001$; $P = 0.001$). The different expression of IGFBP5 in each group is not significant ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** Environmental enrichment can improve the visual function through reactivating the plasticity of monocular deprivation amblyopia mice. The mechanism is presumed to be related to the expression of IGF-1 and IGF-1R.

• **KEYWORDS:** insulin-like growth factor-1; environmental enrichment; amblyopia; visual cortex; plasticity

Citation: Luo YL, Luo SS, Liu ZH, *et al.* Effects of IGF-1 mediated enrichment environment on visual cortex plasticity in adult amblyopic mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020; 20(2): 224-229

0 引言

弱视是一种严重影响视觉功能的常见儿童眼病。在视觉发育关键期内,患者如果得不到及时治疗,不仅影响视力,还可能导致双眼视觉以及立体视功能损害,严重危害家庭及社会。传统观念认为,超过视觉发育关键期的大龄儿童及成年弱视患者视功能及视皮层可塑性难以逆转,治疗无望。但近年来对弱视的研究使该观点受到新的挑战^[1]。我们的前期研究已经证实,丰富环境可重塑视皮层突触可塑性,改善成年弱视小鼠的视觉功能,然而其潜在的分子机制尚不十分清楚。胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 作为一种神经生长因子,具有神经保护及调控神经系统可塑性的作用,可作为研究视皮层可塑性的指标。本研究在建立成年单眼剥夺弱视模型小鼠的基础上,观察不同饲养环境对弱视小鼠视功能及视皮层可塑性的影响,重点探讨 IGF-1 是否作为可能的关键因子参与弱视的发病,为临床上弱视治疗提供新的可行性思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选取正常新生 21 日龄昆明小鼠 80 只。根据随机数字表法分为 4 组:正常组 (Nor),单眼剥夺+标准环境组 (MD+SE),单眼剥夺+丰富环境组 (MD+EE),单眼剥夺+氟西汀组 (MD+FLX)。所有小鼠采购于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。实验得到湖南省儿童医院伦理委员会的批准(审批号 HCHLL-2015-35),实验动物的处理按照《湖南省儿童医院实验动物管理与使用指南》实施。

1.1.2 主要试剂及仪器 全自动视觉电生理检查系统 (MetroVision, 法国); 2.5% 戊二醛, 1% 锇酸, 日立 H7700 投射电镜; IGF-1 兔多克隆抗体 (ab9572, Abcam, 英国), IGF1-R 兔多克隆抗体 (ab39675, Abcam, 英国), IGFBP5 兔多克隆抗体 (ab125696, Abcam, 英国), TUBULIN 小鼠单克隆抗体 (sc-137179, Santa Cruz 美国); 乙酸纤维素薄膜 (浙江路桥四青生化材料厂); 电泳仪 (北京六一, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建及处理 各模型组 (MD+SE、MD+EE、MD+FLX) 小鼠于出生后 21d 缝合右侧眼睑,建立单眼形觉剥夺弱视模型^[2],在小鼠麻醉状态下,剪除右侧上下眼睑缘组织,然后行褥式缝合。在标准环境 (standard enrichment, SE) 中饲养 2wk 后剪开缝合的眼睑,并对剥夺眼行闪光视觉诱发电位检测正常眼及剥夺眼的 P100 波,剥夺眼的 P100 波幅较正常眼明显下降,潜伏期明显延长,确定建模成功。建模过程中眼睑裂开或闪光视觉诱发电位检测弱视模型失败的小鼠予以剔除,每组保留 18 只小鼠进行后续实验。剪开模型小鼠眼睑后,按预先分组:MD+SE 组在标准环境中饲养,MD+EE 组在丰富环境中饲养,MD+FLX 组在标准环境中饲养,但饮用水中添加氟西汀,4wk 后行视敏度检测及闪光视觉诱发电位检测 (F-VEP) 后处死动物,取左侧视皮层组织为后续检测准备。

1.2.2 环境干预方法 丰富环境条件参照 Baroncelli 等^[3]方法设置,采用 1m³ 的木箱,其垫料上摆放隧道、转轮、小木屋、各色积木及木梯等玩具,玩具隔天更换或交换位置,并定期清洗。MD+EE 组小鼠每天置于该环境装置中 6h 以上,持续 4wk;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要求饲养。

表1 丰富环境对弱视小鼠 F-VEP 和视皮层神经细胞突触超微结构的影响

分组	F-VEP (n = 18)		视皮层神经细胞突触超微结构 (n = 8)		
	潜伏期 (ms)	波幅 (μV)	突触间隙宽度 (nm)	突触活性区长度 (nm)	突触后致密物厚度 (nm)
Nor 组	97.57±6.133	13.57±2.251	12.43±1.512	453.1±37.12	61.38±8.331
MD+SE 组	114.1±11.70	5.667±1.256	19.29±3.729	312.5±20.58	32.0±6.824
MD+EE 组	96.25±9.099	7.750±1.035	14.15±2.133	403.0±53.68	56.5±7.190
MD+FLX 组	99.33±6.496	9.571±2.637	14.86±2.268	461.6±35.23	54±4.309
F	36.510	34.14	8.75	17.03	29.08
P	<0.001	<0.01	0.004	<0.01	<0.01

注:Nor:正常组;MD+SE:单眼剥夺+标准环境组;MD+EE:单眼剥夺+丰富环境组;MD+FLX:单眼剥夺+氟西汀组。

1.2.3 小鼠视敏度检测 小鼠视敏度检测方法参照 Drapeau 等^[4]的描述,即前爪触地反射实验。操作方法^[5]:用黑色的布遮挡小鼠的正常眼,将其从距离平台大约 20cm 处缓慢下降,若小鼠在胡须或鼻子触碰到桌面之前前爪出现探爪动作,则视为探爪成功,重复 3 次,以小鼠探爪成功率作为计量指标。该部分实验检测均由同一实验人员完成,观察与记录均采取盲法。

1.2.4 小鼠剥夺眼 F-VEP 检测 视敏度检测完成后,参照 ISCEV 标准,对每组小鼠的右眼行 F-VEP 检测,操作方法^[6]:小鼠首先置于暗室适应 30min,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(刺激频率 1.0Hz,通频带宽 0.5~85.0Hz)作为刺激光,叠加 60 次。检查时左眼用不透光眼罩完全遮挡,记录每次测量结果,包括 P2 波潜伏期及波幅,潜伏期为起点至 P2 波峰的距离,波幅为 N2 波谷至 P2 波峰的距离,连续测量 3 次,取其平均值。

1.2.5 电镜检测小鼠视皮层神经元突触超微结构 处死小鼠取左侧视皮层双眼区组织,经 2.5%戊二醛、磷酸盐缓冲液固定 2h,1%锇酸固定液固定 3h,体积分数 50%、70%、90%乙醇脱水 15min 后,90%乙醇、体积分数 90%丙酮等体积混合脱水 15min,90%丙酮脱水 15min,包埋液包埋,60℃烤箱固化,超薄切片机 50nm 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,每只小鼠随机观察记录 10 个突触,每组共记录 80 个突触进行图像分析。参照多点平均法^[7]及 Güldner 等^[8]的方法测量并记录各组小鼠视皮层神经元的突触间隙宽度、突触活性区长度及突触后致密物厚度。

1.2.6 Western Blot 法检测小鼠视皮层中 IGF-1、IGF-1R 及 IGFBP5 蛋白表达 分别收集各组小鼠左侧视皮层双眼区组织总蛋白,蛋白质变性后电泳,转移至 PVDF 膜上,用含 5%牛血清白蛋白的 TBST 封闭,用一抗 IGF-1 兔多克隆抗体(1:500)、IGF-1R 兔多克隆抗体(1:500)、IGFBP5 兔多克隆抗体(1:1000)、TUBULIN 鼠单克隆抗体(1:1000),4℃孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 5min,二抗(HRP羊抗兔 IgG,1:1000,Vector)孵育 1h,TBST 洗 3 次,每次 5min,化学发光法检测蛋白质印迹结果。

统计学分析:采用 Graphpad Prism 6 统计学软件进行数据分析。测量的数据经 F 检验证实为正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据之间的比较采用单因素方差分析,使用 LSD-t 法对各组样本均数进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丰富环境对弱视小鼠视敏度的影响 通过检测前爪

触地成功率判断小鼠视敏度,各组 (n = 18) 间小鼠前爪触地成功率比较差异有统计学意义 ($F = 114.632, P < 0.001$)。MD+SE 组小鼠前爪触地成功率 (26.55% ± 4.66%) 明显低于 Nor 组 (91.73% ± 2.98%), 差异有统计学意义 ($t = 15.480, P < 0.001$); MD+EE 组 (90.00% ± 7.86%) 及 MD+FLX 组 (87.43% ± 5.46%) 小鼠前爪触地成功率明显高于 MD+SE 组, 差异有统计学意义 ($t = 15.071, P < 0.001; t = 14.841, P < 0.001$); 与 MD+FLX 组比较, MD+EE 组小鼠前爪触地成功率差异无统计学意义 ($t = 0.238, P = 0.816$)。

2.2 丰富环境对弱视小鼠 F-VEP 的影响 各组小鼠右眼(模型组小鼠剥夺眼)闪光视觉诱发电位检测结果见图 1, 表 1。各组间小鼠 F-VEP 的 P2 波的潜伏期比较差异有统计学意义 ($F = 36.510, P < 0.01$)。MD+SE 组小鼠剥夺眼 F-VEP 的 P2 波的潜伏期较 Nor 组比较明显延长, 差异有统计学意义 ($t = 10.220, P < 0.01$); MD+EE 组及 MD+FLX 组小鼠剥夺眼 F-VEP 的 P2 波的潜伏期较 MD+SE 组比较均明显缩短, 差异有统计学意义 ($t_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 7.051, P_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 0.003; t_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 6.049, P_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 0.002$); 与 MD+FLX 组比较, MD+EE 组小鼠剥夺眼 F-VEP 的 P2 波的潜伏期差异无统计学意义 ($t = 1.002, P = 0.322$); 各组间小鼠 F-VEP 的 P2 波的波幅总体比较差异有统计学意义 ($F = 34.140, P < 0.01$)。MD+SE 组小鼠剥夺眼 F-VEP 的 P2 波的波幅明显低于 Nor 组, 差异有统计学意义 ($t = 10.090, P < 0.01$); MD+EE 组及 MD+FLX 组小鼠剥夺眼 F-VEP 的 P2 波的波幅均明显高于 MD+SE 组, 差异有统计学意义 ($t_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 5.030, P_{MD+EE组 vs MD+SE组} < 0.01; t_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 5.650, P_{MD+FLX组 vs MD+SE组} < 0.01$); 与 MD+FLX 组比较, MD+EE 组小鼠剥夺眼 F-VEP 的 P2 波的波幅差异无统计学意义 ($t = 0.618, P = 0.539$)。

2.3 丰富环境对弱视小鼠视皮层神经细胞突触超微结构的影响 透射电镜下观察各组小鼠左侧(模型组小鼠剥夺眼对侧)视皮层双眼区神经细胞突触超微结构的结果见表 1, 图 2。各组间小鼠视皮层神经细胞突触间隙宽度总体差异有统计学意义 ($F = 8.75, P = 0.004$)。MD+SE 组小鼠视皮层神经细胞突触间隙明显宽于 Nor 组, 差异有统计学意义 ($t = 5.018, P < 0.01$); MD+EE 组及 MD+FLX 组小鼠视皮层神经细胞突触间隙较 MD+SE 组明显缩窄, 差异有统计学意义 ($t_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 3.24, P_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 0.0035; t_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 2.712, P_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 0.0075$)。各组间小鼠视皮层神经细胞突触活性区长度总体差异有统计学意义 ($F = 17.03, P < 0.01$)。MD+SE 组小鼠视皮层

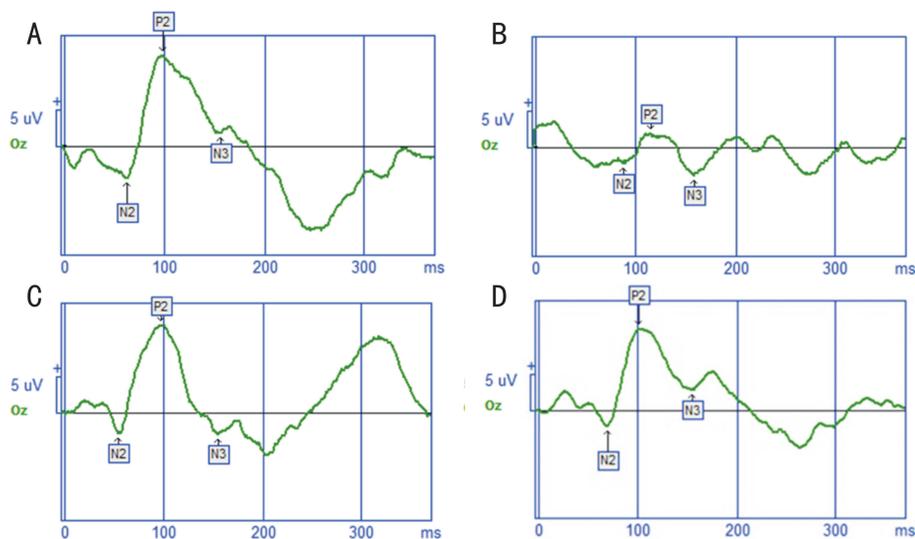


图1 各组小鼠闪光视觉诱发电位 P2 波潜伏期及波幅比较 A: Nor 组; B: MD+SE 组; C: MD+EE 组; D: MD+FLX 组。

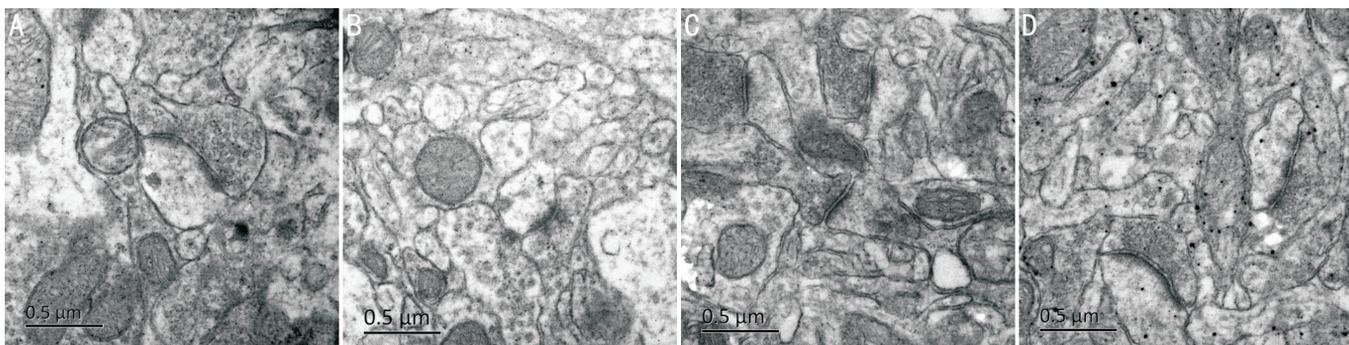


图2 电镜观察各组小鼠视皮层神经细胞突触超微结构 A: Nor 组; B: MD+SE 组; C: MD+EE 组; D: MD+FLX 组。

神经细胞突触活性区长度与 Nor 组比较明显缩短, 差异有统计学意义 ($t = 5.772, P < 0.01$); MD+EE 组及 MD+FLX 组小鼠视皮层神经细胞突触活性区长度与 MD+SE 组比较均增加, 差异有统计学意义 ($t_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 4.805, P_{MD+EE组 vs MD+SE组} < 0.01$; $t_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 6.545, P_{MD+FLX组 vs MD+SE组} < 0.01$)。各组间小鼠视皮层神经细胞突触后致密物厚度总体差异有统计学意义 ($F = 29.08, P < 0.01$)。MD+SE 组小鼠视皮层神经细胞突触后致密物厚度与 Nor 组比较明显变薄, 差异有统计学意义 ($t = 8.609, P < 0.01$)。MD+EE 组及 MD+FLX 组小鼠视皮层神经细胞突触后致密物厚度较 MD+SE 组均增厚, 差异有统计学意义 ($t_{MD+EE组 vs MD+SE组} = 7.181, P_{MD+EE组 vs MD+SE组} < 0.01$; $t_{MD+FLX组 vs MD+SE组} = 6.448, P_{MD+FLX组 vs MD+SE组} < 0.01$)。MD+EE 组与 MD+FLX 组小鼠比较, 视皮层神经细胞突触间隙宽度, 突触活性区长度, 突触后致密物厚度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 丰富环境对弱视小鼠视皮层 IGF-1、IGF-1R 及 IGFBP5 蛋白表达的影响 Western Blot 检测各组小鼠左眼 (模型组小鼠剥夺眼对侧) 视皮层双眼区组织的 IGF-1 及 IGF-1R 蛋白表达见表 2, 图 3, 各组间小鼠视皮层双眼区组织 IGF-1 蛋白表达光密度值总体差异有统计学意义 ($F = 22.00, P < 0.01$)。MD+SE 组小鼠 IGF-1 蛋白表达明显低于 Nor 组, 差异有统计学意义 ($t = 6.598, P < 0.01$); MD+EE 组小鼠 IGF-1 蛋白的表达明显高于 MD+SE 组, 差异有统计学意义 ($t = 2.712, P = 0.016$), 但仍显著低于 Nor 组, 差异有统计学意义 ($t = 3.887, P = 0.001$)。各组间小鼠视皮层双眼区组织 IGF-1R 蛋白表达光密度值总

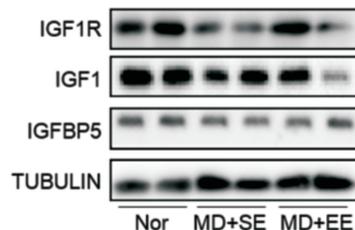


图3 Western-blot 检测各组小鼠视皮层 IGF-1、IGF-1R 及 IGFBP5 蛋白表达。

表2 丰富环境对弱视小鼠视皮层 IGF-1、IGF-1R 及 IGFBP5 蛋白表达光密度值的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

分组	IGF-1	IGF-1R	IGFBP5
Nor 组	1.21 ± 0.126	0.99 ± 0.211	0.97 ± 0.015
MD+SE 组	0.35 ± 0.059	0.41 ± 0.053	0.93 ± 0.104
MD+EE 组	0.62 ± 0.054	0.55 ± 0.063	0.96 ± 0.134
MD+FLX 组	-	-	-
<i>F</i>	22.00	67.31	0.793
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	0.470

注: Nor: 正常组; MD+SE: 单眼剥夺+标准环境组; MD+EE: 单眼剥夺+丰富环境组; MD+FLX: 单眼剥夺+氟西汀组。

体差异有统计学意义 ($F = 67.31, P < 0.01$)。MD+SE 组小鼠 IGF-1R 蛋白表达明显低于 Nor 组, 差异有统计学意义 ($t = 11.4, P < 0.01$); MD+EE 组小鼠 IGF-1R 蛋白表达明显高于 MD+SE 组, 差异有统计学意义 ($t = 3.815, P = 0.041$), 但仍显著低于 Nor 组, 差异有统计学意义 ($t =$

7.582, $P = 0.001$)。各组间小鼠视皮层双眼区组织IGFBP5蛋白表达光密度值总体差异无统计学意义($F = 0.793, P = 0.470$)。

3 讨论

人类和哺乳动物出生以后,视觉系统能够根据周围视觉环境的刺激调整和改变视皮层神经元的结构和突触间联系,称为视皮层的可塑性,发生这一改变的时期称为视觉发育的关键期^[9]。随着年龄的增长,视皮层神经网络结构逐渐发育成熟,限制了神经元突触轴突及树突的生长,可塑性逐渐被抑制。临床上弱视治疗具有显著的时限性,视皮层可塑性关键期内疗效明显,超过关键期的患者采用传统的遮盖疗法效果不佳。因此如何重新激活超越关键期“被抑制”的视皮层可塑性是目前研究的热点和难点。

单眼形觉剥夺弱视模型是目前研究视皮层可塑性的经典模型^[10]。本实验对出生后21d的小鼠行右侧眼睑缝合阻断该侧视觉信息输入,建立单眼剥夺弱视模型。单眼缝合2wk后,我们观察模型小鼠前爪触地反射成功率显著降低,剥夺眼F-VEP P2波的潜伏期延长、波幅下降,证实单眼剥夺弱视小鼠模型建立成功。

丰富环境是研究感觉经验对大脑和行为影响的一个广泛应用的模型,它被定义为“复杂的无生命物与社会刺激的复合体”^[11]。丰富环境不仅提供了多感官刺激和运动的机会,而且赋予了相互间社会性情体验的可能。近年来,丰富环境逐渐被广泛应用于中枢神经系统以及视皮层可塑性机制的研究中^[12]。将正常新生小鼠暴露于丰富环境中让其生长,出生后25d视敏度较标准环境中生长的小鼠增加18%,其视敏度基本接近出生后28d的水平,说明丰富环境显著影响着视觉系统的发育,可加速小鼠视功能的成熟^[13-14]。我们前期研究证实,丰富环境可通过上调成年单眼剥夺弱视小鼠视皮层中MAP2的表达,调控突触相关蛋白PSD-95及SYP重塑视皮层可塑性,从而促进弱视模型小鼠视觉功能的恢复。本实验以氟西汀干预组作为阳性对照,进一步探讨丰富环境重新激活成年视皮层可塑性的分子机制。结果显示,在单眼剥夺弱视小鼠模型建立成功以后,将其饲养于丰富环境中,4wk后应用前爪触地反射实验观察各组小鼠的主观视敏度,显示丰富环境饲养组模型小鼠前爪触地成功率明显高于标准环境饲养组,与正常小鼠及氟西汀干预的弱视模型小鼠比较无明显差异,提示丰富环境明显改善弱视模型小鼠的主观视敏度。我们同时使用F-VEP检测各组小鼠的客观视功能,与标准环境饲养比较,丰富环境中饲养的弱视模型小鼠剥夺眼F-VEP的P2波潜伏期明显缩短,波幅升高,小鼠客观视功能恢复并接近氟西汀治疗组。近来的多项研究结果证实,氟西汀对包括海马^[15]、躯体感觉皮层椎体神经元^[16]、视皮层^[17-18]在内的成年皮层神经元可塑性具有显著的再激活作用,从而为成年弱视治疗提供新的靶点,因此在我们的研究中将氟西汀干预组作为阳性对照。以上实验结果均提示丰富环境可以重新激活成年弱视小鼠的功能可塑性,显著改善视觉功能,其机制可能是通过重塑视皮层神经元突触结构实现的。

以往研究证实,丰富环境可引起正常成年或衰老动物中枢神经系统结构可塑性的变化,包括皮层重量和厚度、神经细胞数量、树突分支及密度、突触数量及突触接触面积等的变化^[19-20]。我们的研究显示,与标准环境相比较,丰富环境饲养条件下的成年弱视模型小鼠,剥夺眼对侧视

皮层突触间隙缩小、突触活性区长度增加、突触后致密物厚度增加;突触超微结构参数与正常小鼠及氟西汀干预的弱视模型小鼠比较无明显差异,提示丰富环境可重新激活成年弱视小鼠的结构可塑性,改变突触结构,促进视皮层视觉电冲动的传导。突触是神经元间信息传递的结构基础,丰富环境干预以后,视皮层神经元突触结构发生适应性变化,突触间隙缩小,加快神经递质到达突触后膜的速度,神经递质失活的可能性降低,增强神经元与效应细胞之间的信息沟通,加强突触传递效能。突触界面活性区长度在一定程度上反映神经元功能活动状态,活性区长度的增加使突触前后膜接触面增加,减少递质向周围间隙扩散,有利于递质与受体更有效结合。PSD是突触后膜上的致密物质,主要含有微管蛋白、肌动蛋白、神经丝蛋白及各种酶,丰富环境饲养后的弱视小鼠视皮层神经元突触后致密物厚度显著增加能反映出突触后膜上受体与离子通道的变化,从而在功能上增强突触的传递效率,改善小鼠视觉功能。

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是胰岛素样生长因子家族中的一员,是由70个氨基酸组成的单链碱性多肽,主要由肝脏合成及分泌,具有广泛的生物学效应。IGF-1的生物学活性受IGF-1受体(IGF-1R)和胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)的调节。血浆中75%的IGF-1都和IGFBP结合形成无活性的复合物,构成IGF-1的储备库。组织中的IGFBP通过阻止IGF-1与其受体结合,抑制IGF-1发挥生物学作用。此外,IGF-1还可穿过血-脑屏障,与广泛分布于脑组织中的IGFBP5结合形成无活性的复合物,游离的IGF-1则分布于脑组织中并与IGF-1R结合而发挥作用^[21]。经典的理论认为,IGF-1与哺乳动物中枢神经系统的发生密切相关,包括调控神经细胞增殖及发生,神经元存活、分化,突触发生,髓鞘形成等^[22]。近年来研究报道,IGF-1不仅能对神经细胞起到保护作用^[23],而且可介导并调控海马以及视皮层可塑性^[24-25],参与学习、记忆及弱视的发病机制。本实验结果证实,IGF-1、IGF-1R及IGFBP5在正常小鼠视皮层组织中均有表达,单眼剥夺后剥夺眼对侧视皮层中IGF-1及IGF-1R表达明显下调,IGFBP5表达无明显变化。丰富环境干预后较标准环境饲养小鼠视皮层中IGF-1、IGF-1R表达明显上调,但并不影响IGFBP5的表达。以上结果均提示丰富环境可能通过直接上调IGF-1及受体IGF-1R表达,介导对成年弱视小鼠视皮层可塑性进行调控,重新激活“被抑制”的视皮层神经环路,改变突触结构,增强突触传递效能,在一定程度上改善弱视小鼠的视觉功能。我们推测IGF-1调控视皮层可塑性机制包括以下几种:(1) IGF-1通过调控葡萄糖代谢及体内血糖水平,调控视皮层组织、细胞及突触对外界感觉刺激的反应;(2) IGF-1作为视皮层中突触及神经细胞活动的重要调质,发挥神经营养因子的作用调控视皮层可塑性;(3) IGF-1通过影响PI3K的表达,调控神经细胞传导及突触蛋白表达,重新激活视皮层可塑性。因此,在未来的研究中,我们将对以上可能机制进行深入探究,力求寻找能适合临床大龄及成年弱视患者治疗的有效性、无创性新方法。

参考文献

- 1 Stryker MP, Lowel S. Amblyopia: new molecular/pharmacological and environmental approaches. *Vis Neurosci* 2018;35:E018
- 2 Luo Y, Wu X, Liu S, et al. Reactivation of visual cortical plasticity by

NEP1-40 from early monocular deprivation in adult rats. *Neurosci Lett* 2011;494(3):196-201

3 Baroncelli L, Bonaccorsi J, Milanese M, et al. Enriched experience and recovery from amblyopia in adult rats: impact of motor, social and sensory components. *Neuropharmacology* 2012;62(7):2388-2397

4 Drapeau E, Dorr NP, Elder GA, et al. Absence of strong strain effects in behavioral analyses of Shank3-deficient mice. *Dis Model Mech* 2014;7(6):667-681

5 涂艳琼, 罗瑜琳, 刘政海, 等. AMPK-SIRT1 通路介导的热量限制对成年单眼剥夺视小鼠视皮层可塑性的再激活作用. *中华实验眼科杂志* 2018;36(5):330-336

6 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. *中华实验眼科杂志* 2011;29(3):220-225

7 罗兰, 陆汉新, 吴馥梅, 等. 突触界面结构参数的定量分析方法. *南京大学学报* 1990;26(4):689-694

8 Guldner FH, Lugham CA. Increase in postsynaptic density material in optic target neuron of the rat suprachiasmatic nucleus after bilateral enucleation. *Neurosci Lett* 1980;17(01):27-31

9 Hensch TK, Quinlan EM. Critical periods in amblyopia. *Vis Neurosci* 2018;35(02):E014

10 Mitchell D, Sengpiel F. Animal models of amblyopia. *Vis Neurosci* 2018;35(11):E017

11 Sampedro-Piquero P, Begega A. Environmental enrichment as a positive behavioral intervention across the lifespan. *Curr Neuropharmacol* 2017;15(4):459-470

12 Ohline SM, Abraham WC. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 2019;145(Pt A):3-12

13 Beaulieu C, Colonnier M. Effect of the richness of the environment on the cat visual cortex. *J Comp Neurol* 1987;266(4):478-494

14 Kozorovitskiy Y, Gross CG, Kopil C, et al. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 2005;102(48):17478-17482

15 Godavarthi SK, Sharma A, Jana NR. Reversal of reduced parvalbumin neurons in hippocampus and amygdala of angelman syndrome model mice by chronic treatment of fluoxetine. *J Neurochem* 2014;130(3):444-454

16 Guirado R, Varea E, Castillo-Gomez E, et al. Effects of chronic fluoxetine treatment on the rat somatosensory cortex: activation and induction of neuronal structural plasticity. *Neurosci Lett* 2009;457(1):12-15

17 Ruiz-Perera L, Muniz M, Vierci G, et al. Fluoxetine increases plasticity and modulates the proteomic profile in the adult mouse visual cortex. *Sci Rep* 2015;5(24):12517

18 解来青, 徐国旭, 张积, 等. 神经元周围网和 Nogo 受体在大鼠视皮层的发育及氟西汀对其的影响. *中华眼科杂志* 2019;55(1):37-45

19 Sale A, Berardi N, Maffei L. Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci* 2009;32(4):233-239

20 Francesca C, Elena P, Laura B, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment on visual cortical development. *PLoS One* 2007;2(5):e475

21 Schneider MR, Wolf E, Hoeflich A, et al. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol* 2002;172(3):423-440

22 Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *Sci World J* 2006;6(1):53-80

23 Chang HC, Yang YR, Wang PS, et al. Insulin-like growth factor 1 signaling for brain recovery and exercise ability in brain ischemic rats. *Med Sci Sport Exerc* 2011;43(12):2274-2280

24 Llorens-Martín M, Torres-Alemán L, Trejo JL. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and-independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behavior. *Mol Cell Neurosci* 2010;44(2):109-117

25 Heimel JA, van Versendaal D, Levelt CN. The role of GABAergic inhibition in ocular dominance plasticity. *Neural Plast* 2011;1(2):391763