文章编号:1000-5404(2010)10-1031-03

论著

大鼠视皮层硫化软骨素粘多糖降解对闪光诱发电位的影响

刘明明,秦 伟,谢汉平,余延基 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

[摘要] **目的** 在视觉发育可塑性关键期终止前后,观察软骨素酶 ABC(chondroitinase ABC, ChABC)降解 Long Evans 大鼠视皮层硫化软骨素粘多糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)后闪光视觉诱发电位(flash visual evoked potential, F-VEP)的变化。**方法** 对出生后 21、35、49 d 正常组及同时间点 ChABC 酶视皮层灌注组大鼠进行 F-VEP 检查。**结果** 正常组大鼠 21、35、49 d,F-VEP 主波的潜时逐渐缩短,分别为[(63.5±10.1),(50.8±6.4),(44.9±6.3) ms,$P<0.05$],波峰值由 21 d 的(15.7±3.8) ms 增加至 35 d 的(26.6±4.0) ms ($P<0.05$), 49 d 较 35 d 稍降低。35、49 d ChABC 酶视皮层灌注组大鼠 F-VEP 主波的潜时分别为(62.5±8.0),(58.4±7.6)ms,较同时间点正常组明显延长($P<0.05$),主波振幅两组间各时间点无明显差异($P>0.05$)。**结论** 在视觉发育可塑性关键期终止前后,降解大鼠视皮层 CSPGs 影响了 F-VEP 的发育变化。

[关键词] 硫化软骨素粘多糖;闪光视觉诱发电位;视皮层;视觉发育
[中图法分类号] R338.25; R338.8; R339.14 **[文献标志码]** A

Effect of CSPGs degradation on flash visual evoked potential in rat visual cortex

Liu Mingming, Qin Wei, Xie Hanping, Yu Yanji (Cneter of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) degradation induced by chondroitinase ABC (ChABC) on the rat flash visual evoked potential (F-VEP) around the end of the critical period of visual development. **Methods** A total of 30 Long Evans rats were randomly divided into 3 groups according to their age of 14, 21 and 35 d. Then in each group, 5 animals served as CSPGs degradation model induced by ChABC microinjection into 5 sites of the rat cortex [750 nL (48 U/ml) for 1 site, for 2 times at a 3-day interval], and the other 5 rats served as normal control and received normal saline microinjection. Immunofluorescence microscopy and laser scanning confocal microscopy were used to determine the establishment of animal model. F-VEPs were evaluated in 7 d after first microinjection. **Results** In the normal rats, the latency of F-VEP main wave became shorter with the increase of their age, the number was [(63.5±10.1),(50.8±6.4),(44.9±6.3) ms, $P<0.05$], whereas the amplitude of F-VEP main wave was first increased from (15.7±3.8) ms to (26.6±4.0) ms at early postnatal days ($P<0.05$) and decreased slightly at postnatal day 49. In the ChABC treated rats, the latency of F-VEP main wave became longer than that of normal rat on postnatal day 35 and 49, the number was (62.5±8.0),(58.4±7.6) ms ($P<0.05$). But there was no obvious change of the F-VEP amplitude between the normal rats and ChABC treated rats. **Conclusion** Around the end of the critical period of visual development, CSPGs degradation has an effect on the development of rat F-VEPs.

[Key words] chondroitin sulfate proteoglycans; flash visual evoked potential; visual cortex; visual development

Supported by the Natural Science Foundation of China (30772350). Corresponding author: Qin Wei, Tel: 86-23-68765880, E-mail: weiqin0707@163.com

人类和哺乳动物的视觉发育是指从胚胎期至出生后的阶段中,视觉神经系统由不成熟状态向成熟完善状态的变化[1]。在外界环境刺激和内在基因调控下,视觉系统可以发生形态的和功能的适应性改变,这种发育的最敏感时期称为视觉发育可塑性关键期[2]。不同动物的视觉发育可塑性关键期的终止时间各不相同,比如大鼠为出生后 35~40 d,人类为 7~10 岁[3]。在可塑性关键期内,由于异常视觉环境造成的弱视大部分可以得到治愈,但在可塑性关键期结束后视功能却很难提高[3],如何重新启动已被抑制的可塑性是解决问题的关键。以往一系列的研究发现,在正常视觉发育过程中,中枢神经系统细胞外基质的重要组成部分硫化软骨素粘多糖(chondroitin solfate proteoglycans,

[基金项目] 国家自然科学基金(30772350)
[通信作者] 秦 伟,电话:(023)68765880, E-mail:weiqin0707@163.com

CSPGs)逐渐增多,抑制了轴突萌芽的结构变化过程[4-6]。在视觉发育早期,闪光视觉诱发电位(flash visual evoked potential,F-VEP)主波的潜时随天龄增加而逐渐缩短[7]。那么,降解大鼠视皮层CSPGs是否对整体动物的F-VEP发育变化有影响呢?为此,本实验采用软骨素酶ABC(Chondroitinase ABC,ChABC)降解大鼠视皮层CSPGs,研究视觉发育可塑性关键期终止前后大鼠F-VEP的变化,以期为儿童弱视的康复增加基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

共使用Long Evans大鼠30只,体质量150~300 g,雌雄不限。分为正常组和CSPGs降解组,每组各15只。正常组和CSPGs降解组均分别在出生后21、35、49 d实验(每时间点各5只,共10眼)。CSPGs降解组每时间点提前一周向视皮层内注射ChABC酶制作成视皮层CSPGs降解大鼠模型。所有动物的使用和处理均遵守第三军医大学实验动物使用规范。

1.2 CSPGs降解组动物模型建立

取15只正常Long Evans大鼠,雌雄不限,按照出生后周龄分为3组:出生后14 d、出生后28 d、出生后42 d,每组5只,共10眼。根据Pizzorusso等[8]的方法,各组大鼠用20%乌拉坦腹腔注射麻醉(0.4 ml/kg),固定在三维立体定位仪上。利用固定在三维微操纵器上的微量注射器围绕一侧初级视皮层的5个点注射ChABC酶。按照大鼠视皮层定位图谱[9]及Pizzorusso等[8]的方法,5个注射位置为:正中线外侧3.7~3.8 mm、人字缝前后0.9~1.0 mm;正中线外侧6.1~6.2 mm、人字缝前后0.9~1.0 mm;正中线外侧4.9~5.0 mm、人字缝前1.9~2.0 mm,每个点注射750 nL ChABC酶(48 U/ml)溶液,在皮层下350 μm和700 μm两个不同深度分别注射375 nL,3 d后在相同的位置重复注射1次,1周后模型成功。

1.3 免疫荧光染色验证模型

参照Pizzorusso等[8]的免疫荧光染色方法:切片放入含3 g/L Triton X-100的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液中,室温(18~25 ℃)下漂洗3次(每次10 min)。50 mg/L正常山羊血清37 ℃条件下封闭30 min后加入bio-WFA(vector公司,1∶200稀释)15 μl,4 ℃过夜。在移入0.1 mol/L磷酸盐缓冲液中,室温漂洗3次。然后加入Cy3-卵白链霉素(vector公司,1∶50稀释)37 ℃孵育30 min。最后用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液漂洗3次后脑片风干,封片。在荧光显微镜及激光共聚焦显微镜下,观察拍照。验证CSPGs降解组Long Evans大鼠视皮层中CSPGs的降解情况。

1.4 F-VEP检测

采用改进的AV ES8000视觉电生理检测系统,参照姚军平等[7]的方法,使用针状电极,导电极插入枕骨粗隆上约0.5 cm头皮下,参考电极置于鼻部皮下,地极置于耳后乳突处。引出的生物信号经放大器和A/D转换进入计算机,在"视觉诱发电位检测软件系统"支持下运行,预先设置的计算机模式为:起始延迟0,采样间隔114 μs,采样点数4 096,平均叠加次数256。闪光刺激参数:时间频率1 Hz。正常组和CSPGs降解组均分别在出生后21、35、49 d检测,同次试验中大鼠左右眼分别检测。

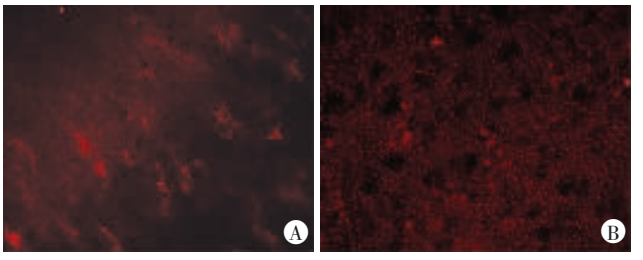
1.5 统计学处理

对主波的幅值和潜时做定量分析。主波的潜时(ms)是指从刺激开始至P1波之间的时间;主波的幅值(μV)是指N1波谷至P1波峰之间差值的绝对值。实验数据应用SPSS 13.0统计软件,应用t检验。

2 结果

2.1 视皮层CSPGs免疫荧光染色

正常组35 d Long Evans大鼠细胞外基质中的CSPGs染色,可见完整结构(图1A);CSPGs降解组35 d Long Evans大鼠细胞外基质中的CSPGs染色,可见正常结构消失,呈现弥漫均匀染色(图1B)。表明,CSPGs降解动物模型的建立方法可靠。



A:正常组出生后35 d;B:CSPGs降解组出生后35 d

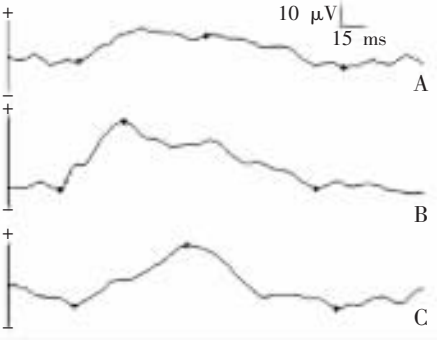
图1 Long Evans大鼠视皮层细胞外基质中的CSPG染色
(免疫荧光 ×200)

2.2 正常Long Evans大鼠F-VEP波形

正常Long Evans大鼠生后21 d时F-VEP主波潜时较长,幅值较低(图2A)。随着视觉经验的增加,35 d大鼠F-VEP主波潜时变短,幅值增高($P<0.05$)(图2B)。至49 d视觉发育可塑性关键期结束时F-VEP主波潜时变短($P<0.05$),幅值轻度下降。

2.3 CSPGs降解后Long Evans大鼠F-VEP波形

从表1中看出,正常组大鼠F-VEP主波的潜时随发育逐渐变短,幅值的变化在35 d达到峰值,之后稍降低;CSPGs降解组Long Evans大鼠F-VEP主波的潜时,在生后35 d和49 d较同天龄正常组大鼠延长($P<0.05$),幅值比较无显著差异($P>0.05$)(图2C)。



A:正常组出生后21 d;B:正常组出生后35 d;C:CSPGs降解组出生后35 d

图2 Long Evans大鼠出生后F-VEP波形

表 1　正常组与 CSPGs 降解组大鼠 F-VEP 主波潜时和幅值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	潜时(ms)			幅值(μV)		
	(n)	21 d	35 d	49 d	21 d	35 d	49 d
正常组	10	63.5 ± 10.1	50.8 ± 6.4[a]	44.9 ± 6.3[a]	15.7 ± 3.8	26.6 ± 4.0[a]	24.1 ± 4.1
CSPGs 降解组	10	63.9 ± 8.1	62.5 ± 8.0[b]	58.4 ± 7.6[b]	16.6 ± 4.2	23.2 ± 4.1	22.3 ± 4.1

a: $P < 0.05$, 与组内 21 d 比较; b: $P < 0.05$, 与正常组比较

3　讨论

F-VEP 是用光刺激视网膜后,通过视路传递,在枕叶视皮层诱发出反应视网膜神经节细胞到视皮层功能状态的电活动,是客观检查视路功能的方法[10]。在记录这些微幅级电冲动时,生理、物理、化学等因素会对其幅值和潜时产生影响。我们在实验中通过控制大鼠的麻醉深度、室温、湿度、电极位置等将客观因素影响降至最低,而且,我们在晚间同一时间进行实验,以排除大鼠白天和夜间的生物节律不同带来的影响。

在视觉发育可塑性关键期内,视觉经验可以修饰、调节突触的结构及功能[11]。随着可塑性关键期的结束,视觉经验输入的增多使视皮层神经元之间的作用和受体亚单位的组成趋于稳定,视觉回路逐渐发育成熟。在正常 Long Evans 大鼠视觉发育早期,本实验结果显示 F-VEP 主波的潜时随天龄增加而逐渐缩短,与既往研究的结论相似[7,12];而主波的峰值在出生后逐渐增高,35 d 达到峰值后出现轻度降低,两者均为视觉传导通路逐渐发育成熟的表现。

CSPGs 为中枢神经系统细胞外基质重要成分之一。在视皮层,CSPGs 密集出现于发育晚期,大鼠生后 22 d,几乎没有神经元被 CSPGs 包绕,至生后 35 d,CSPGs 显著增高,在生后 70 d 达到成年水平[13]。视觉经验对视皮层突触结构和功能可塑性影响的过程中,逐渐增多的 CSPGs 可能影响了轴突萌芽的结构变化[14]。以往研究表明,单眼剥夺可以导致年幼动物眼优势柱的移动,但成年后,这种现象就消失了。但利用 ChABC 酶降解 CSPGs 后,单眼剥夺又会再次引起成年动物眼优势柱的移动[15]。而且,CSPGs 的降解可以使轴突再次萌芽[16]。本实验进一步在整体动物水平上采用 ChABC 酶降解视皮层细胞外基质中的 CSPGs,观察F-VEP 主波潜时及峰值的改变,结果显示:各时间点主波的潜时较正常组出现延迟,在 35 d 和 49 d 的差异有统计学意义,而 21 d 的差异不明显。也就是说,造成了正常组和 CSPGs 降解组大鼠的视觉电生理差异出现在 35 d 以后。结果表明,视觉发育可塑性关键期终止前后,降解大鼠视皮层 CSPGs 影响了其 F-VEP 的发育变化,有关的分子机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] Hubel D H, Wiesel T N. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens[J]. J Physiol, 1970, 206(2): 419 - 436.

[2] Hensch T K. Critical period regulation[J]. Annu Rev Neurosci, 2004, 27: 549 - 579.

[3] 秦伟,阴正勤,翁传煌,等. 大鼠视皮层两类神经元的 NMDA 及 $GABA_A$ 受体介导的突触后电流电学特性研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(8): 714 - 716.

[4] Bradbury E J, Moon L D, Popat R J, *et al*. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. Nature, 2002, 416(6881): 636 - 640.

[5] Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(6): 456 - 468.

[6] Crespo D, Asher R A, Lin R, *et al*. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? [J]. Exp Neurol, 2007, 206(2): 159 - 171.

[7] 姚军平, 王仕军, 阴正勤, 等. 正常 Long Evans 大鼠不同发育阶段闪光视觉诱发电位波形的比较[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1933 - 1935.

[8] Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, *et al*. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex[J]. Science, 2002, 298(5598): 1248 - 1251.

[9] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钏, 译. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 35 - 51.

[10] Nalcaci E, Basar-Eroglu C, Stadler M. Visual evoked potential interhemispheric transfer time in different frequency bands[J]. Clin Neurophysiol, 1999, 110(1): 71 - 81.

[11] Cathala L, Holderith N B, Nusser Z, *et al*. Changes in synaptic structure underlie the developmental speeding of AMPA receptor-mediated EPSCs[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(10): 1310 - 1318.

[12] 翁传煌, 秦伟. MK-801 对视觉发育可塑性关键期内大鼠闪光视觉诱发电位的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(14): 1394 - 1395.

[13] Matthews R T, Kelly G M, Zerillo C A, *et al*. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets[J]. J Neurosci, 2002, 22(17): 7536 - 7547.

[14] Medini P, Pizzorusso T. Visual experience and plasticity of the visual cortex: a role for epigenetic mechanisms[J]. Front Biosci, 2008, 13: 3000 - 3007.

[15] Pizzorusso T, Medini P, Landi S, *et al*. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(22): 8517 - 8522.

[16] Massey J M, Hubscher C H, Wagoner M R, *et al*. Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2006, 26(16): 4406 - 4414.

(**收稿**:2009-12-31;**修回**:2010-01-25)

(编辑　邓强庭)