维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)03-0341-05

正常和剥夺性弱视大鼠视皮质 NOS 阳性神经元的生后发育变化

覃 烈,陶永贤

(重庆医科大学临床学院眼科,重庆 40016)

【摘 要】目的:探讨 NO 参与正常视觉发育可塑性的分子机制及视觉剥夺对 NO 的表达所产生的影响。方法:正常和剥夺性弱视大鼠分别在不同时限(P14~P45)测定视皮质 17 区的 NOS 阳性神经元组织切片下的表达。结果用光镜下计数和计算机图形分析系统得出。结果:正常大鼠视皮质 17 区中的 NOS 阳性神经元,P14 时数量最多,到 P21 时神经元胞体截面积最大,树突分枝最复杂。剥夺对侧与同期正常鼠及剥夺同侧比较无显著性差异。结论:在视觉发育关键期,NOS 在正常发育大鼠及剥夺性弱视大鼠视觉中枢中成短暂的高水平表达。单眼剥夺不会影响 NOS 在皮质 17 区的表达。

【关键词】一氧化氮;视皮质;弱视;视觉剥夺

【中国图书分类法分类号】R774 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-06-21

Postnatal developmental changes of NOS-positive neurons in the visual centres of normal and deprivation amblyopia rats

QIN Lie, et al

(*Department of Ophthalmology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the molecular mechanism of NO participting the plasticity of normal visual development and the effect of visual deprivation on expression of NO. *Methods*: The VC of rats were sliced coronally at the ages from postnatal 14 days(p14) to P45, and the sections were processed for nicotinamide adenine dinucleotide phsphate diaphorase(NADPH-d) histochemical staining. Changes in number, cell body area and total length of dendrites of NOS positive neurons in VC from normal groups and monocular deprivation groups were observed with microscope and analysed by Computer Image Analysis System. *Results*: The number of NOS-positive neurons in VC of normal rats reached a peak at P14, and gradually reduced. The area of neurons are largest, the dendrites of neuones are more compex and longer in P21. *Conclusion*: NOS exhibits a transient expression on the high level. Monocular deprivation has not influenced the expression of NOS in VC.

【Key words】Nitric oxide; Visual cortex; Visual deprivation

一氧化氮(NO),近年来发现的一种气体性信息分子,研究表明[1],其作为逆行信使参与突触前后的相互通讯,从而参与突触的"修剪",因而推测 NO 可能参与视觉中枢突触可塑性发育,并可能影响弱视的发生。通过检测一氧化氮合酶(NOS)可间接反映 NO 的水平,还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-d)组化方法即提供了一种简便且可靠的标记 NOS 阳性神经元及纤维的形态,分布的方法,它已被广泛采用[2]。目前关于 NOS 在正常视觉系统发育的关键期变化规律研究较少;单眼剥夺后剥夺性弱视的视皮质 NOS 阳性神经元的发育变化规律也未见报道。本文利用 NADPH-d 组化方法研究了正常大鼠生后早期视皮质 NOS 阳性神经元的发育变化规律和大鼠在弱视形成过程中 NOS 的变化规律,以探讨 NO 与弱视的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

1.1.1 实验动物分组和动物模型的建立 重庆医科大学实验动物中心提供健康 Wistar 生后 14 天(P14)大鼠 42 只,体重 30g 左右,随机分成 7 组,每组 6 只,标记为 1~7 组。1~4 组为正常组(normal gloup, N);5~7 组为单眼剥夺组

作者介绍:覃 烈(1970-),男,硕士,主要研究方向:斜视和弱视

维普资讯 http://www.cqvip.com

(monocular deprivation group, MD). 5～7 组动物在生后 14 天(刚睁眼之前)即行单眼缝合术。每组 MD 眼别为左右眼各 3 只。18 只动物模型均获成功。各组动物均同室喂养,为自然光环境。第 1 组,第 2、5 组,第 3、6 组,第 4、7 组实验时间分别为 P14、P21、P28、P45。

1.1.2 主要仪器和试剂 ICM－2000B 生物医学计算机图象分析系统(北航)2NADPH－d N1630(sigma)

1.2 实验方法[3]

按 NADPH－d 方法获取标本,并制备冰冻切片,贴片染色。

1.3 计算机图象分析和计数

阳性细胞数是在显微镜下按每张切片 NOS 阳性细胞数统计,计算机图象分析系统分析胞体截面积、树突总长度,用 SAS 统计软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 NOS 阳性神经元的形态描述

各发育期胞体及树突分支均着深蓝色,未见胞核着色(图 7)。神经元树突分支非常清晰(图 3),属于非锥体的双极细胞和多极细胞。另外 17 区还广泛分布有呈"网络"状着色的 NOS 阳性纤维(图 3),其间可见一些散在分布的阳性神经元胞体。

2.2 正常发育大鼠视皮质 17 区 NOS 阳性神经元各层均有分布,但在 2/3 层及 5、6 层最多,而 4 层最少(图 1),而且在发育期各层的分布模式不变。该神经元在 P14 数量最多,以后逐渐下降。经统计,在各层中各年龄组均有统计学差异($P<0.01$),各年龄组 17 区 NOS 阳性神经元总数也有显著性差异 $P<0.01$)见表 1



图 1 P28 剥夺性弱视大鼠剥夺对侧视皮质 17 区 NOS 阳性神经元的分布模式 X120 Ⅱ/Ⅲ层,Ⅴ层和Ⅵ层 NOS 阳性神经元较多,Ⅳ层较少

2.3 经 MD 后,大鼠视皮质 17 区 NOS 阳性神经元的分布模式不变,仍以 4 层最少,2/3 层及 5、6 层最多。经统计,在各层中各年龄组剥夺对侧与剥夺同侧及正常组比较均无统计学差异 $P>0.05$),而且各年龄组剥夺对侧与剥夺同侧、正常组神经元总数比较均无统计学差异 $P>0.05$),见表 1

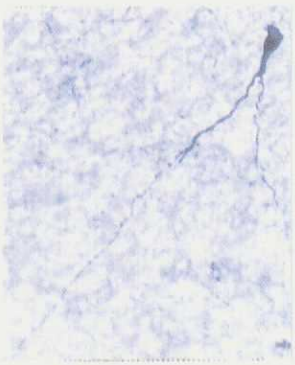


图 2 P14 正常鼠



图 3 P21 正常鼠胞体截面积较大,树突分枝较为复杂



图 4 P21 剥夺同侧

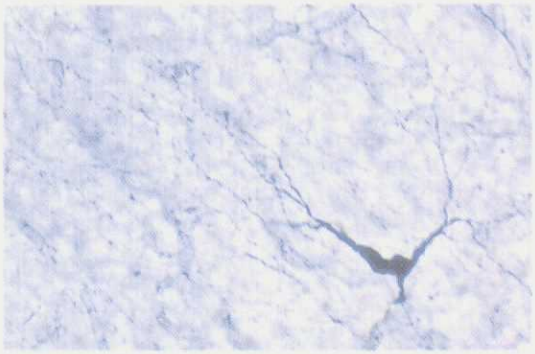


图 5 P21 剥夺对侧(▲)示呈"网络"状着色的阳性纤维

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 大鼠视皮质 17 区各层 NOS 阳性神经元的数量(个/切片,$\bar{x} \pm s$)

生后天数	组	层次 2/3	4	5	6	合计
P14	正常	6.98±1.51	2.03±0.78	5.45±1.19	5.97±1.50	20.32±3.14a
P21	正常	5.18±1.28	1.57±0.74	5.03±1.09	5.05±1.47	16.73±2.83b
	剥夺同侧	5.03±1.19	1.67±0.71	5.0±1.17	5.0±1.60	16.6±2.49b
	剥夺对侧	4.96±0.89	1.60±0.8	4.90±1.37	4.90±1.45	16.3±2.18b
P28	正常	4.35±1.15	1.37±0.76	4.37±0.94	4.72±1.15	14.8±2.22c
	剥夺同侧	4.13±1.01	1.47±0.82	4.2±1.22	4.67±1.24	14.7±2.135c
	剥夺对侧	4.2±1.32	1.43±0.82	4.27±1.02	4.70±1.12	14.63±2.04c
P45	正常	3.52±1.11	0.9±0.73	3.80±1.01	4.03±1.21	12.23±1.45d
	剥夺同侧	3.37±0.93	0.9±0.71	3.60±1.00	4.03±1.50	11.97±1.83d
	剥夺对侧	3.53±1.25	0.83±0.70	3.80±0.96	4.1±1.27	12.33±1.35d

不同字母(a,b,c,d)表示有显著性差异($P<0.01$)

表 2 大鼠视皮质 17 区 NOS 阳性神经元胞体截面积(μm^2)($\bar{x} \pm s$)

组		生后天数 14	21	28	45
	正常鼠	254.16±58.48b	314.26±88.34a	250.54±78.90b	196.78±49.07c
剥夺鼠	剥夺同侧		309.12±71.76d	266.88±67.44e	207.70±49.06f
	剥夺对侧		295.88±76.91g	253.74±65.73h	211.72±52.20i

表 3 大鼠视皮质 17 区各层 NOS 阳性神经元树突总长度(μm/个)($\bar{x} \pm s$)

组		层次 14	21	28	45
	正常鼠	270.56±131.00b	421.86±143.36a	277.68±82.55b	183.80±52.92c
剥夺鼠	剥夺同侧		415.62±159.02d	280.44±115.83e	176.98±73.49f
	剥夺对侧		406.46±128.24g	272.66±97.88h	195.8±60.66i

不同字母(a,b,c,d,e,f,g,h,i)表示同一组内有显著性差异 $P<0.05$)

2.4 正常发育及剥夺弱视大鼠(无 P14)视皮质 17 区各层 NOS 阳性神经元在 P14 时胞体截面积及树突总长度较小,而且以双极或单极细胞为主,树突分支较少(图 2),到 P21 时胞体截面积及树突总长度增加,P21 达峰值,树突分支复杂化程度最高,此时以双极或多极细胞为主,P28 神经元胞体截面积减少,树突分枝简单化(图 6~8);P45 达到最低(图 9~11)。MD 对各期的胞体截面积及树突总长度均无任何影响。经统计,胞体截面积和树突总长度:各年龄组剥夺对侧与剥夺同侧及正常组比较均无统计学差异($P>0.05$)见表 2 及表 3。

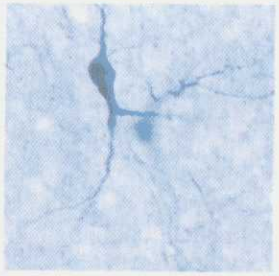


图 6 P28 正常鼠



图 7 P28 剥夺同侧

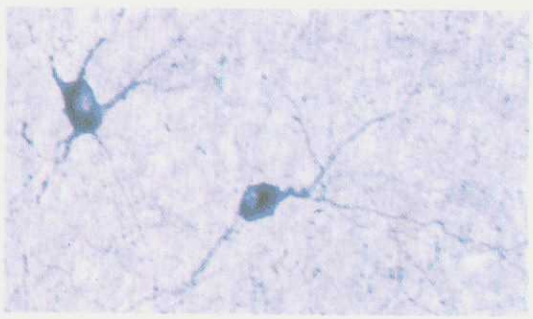


图 8 P28 剥夺对侧

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 9 P45 正常鼠

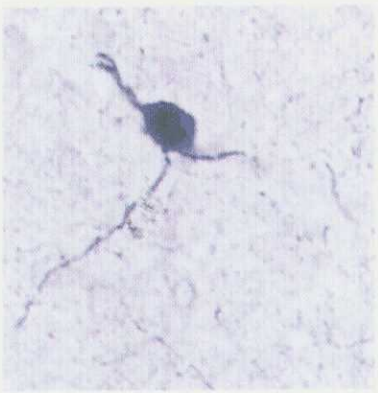


图 10 P45 剥夺同侧



图 11 P45 剥夺对侧

(图 2～图 11X660,以上图显示 NOS 神经元的形态)

3 讨 论

3.1 剥夺性弱视动物模型的建立

鼠类 90% 的视纤维在视交叉中交叉到对侧的视束,故单眼剥夺对侧的视中枢所产生的剥夺效应远大于剥夺同侧。有研究[6]表明 P14～P45 为其视觉发育的关键期。如在此期间进行单眼缝合,会产生剥夺性弱视.故 Montero[7]在 P14～P45 期间进行单眼缝合,得到剥夺性弱视动物大鼠模型。本研究在 P14～P45 期间对大鼠进行单眼缝合,建立起剥夺性弱视动物大鼠模型。

3.2 NO 在视皮质 17 区的作用

从本研究可知,正常和剥夺性弱视大鼠视皮质 17 区 NOS 阳性神经元在Ⅱ/Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ层较多,而Ⅳ层较少,这种分布模式机理目前尚不清楚,但有人认为这是由于 NO 可能在Ⅱ、Ⅲ、Ⅵ层调节着血供,从而促进皮质神经元的发育和成熟[5]。

视皮质投射神经元主要为锥体细胞,释放兴奋性神经递质(如谷氨酸),而局部回路神经元为非锥体细胞,常释放抑制性神经递质(如 GABA),从本研究可以看出,鼠视皮质 NOS 阳性神经元为非锥体细胞,故可推测 NOS 阳性神经元为局部回路神经元,Valtschanoff 等[8]利用 NADPH－d 酶组化和 GABA 免疫组化双标显示鼠大脑皮质 NOS 阳性神经元是 GABA 能神经元的一个亚群,这说明 NO 可能在投射神经元与 GABA 能神经元之间发挥着重要逆行信使作用,在正常发育与剥夺性弱视形成中可能对视觉信息的处理、调控起重要作用。

从本实验看出,正常发育大鼠视皮质 17 区,P14 时细胞数量是最多的,以后逐渐减少,到 P45 时最少。P21 时胞体截面积和细胞树突长度达高峰,以后也降低,这表明了两点(1)正常发育大鼠视皮质 17 区的 NOS 在生后早期呈短暂的高水平表达,它可能在视皮质早期发育和成熟中起作用。(2)NOS 高峰出现在视皮质功能开始分化之前,也即出现在视觉经验依赖的关键期(突触"修剪")之前(正常发育大鼠视皮质功能分化在 P17～P45 之间)。雪貂[9]眼优势柱在 P35～P60 形成,而视皮质 NOS 阳性神经元在 P25～P35 达高峰,以后开始下降,正当雪貂眼优势柱开始形成之时,NOS 活性却下降。这些均说明了 NO 可能与眼优势柱形成无关;可能对依赖视觉经验的突触可塑性方面并不起作用。为了证实这种假设,本研究在关键期对鼠进行视觉剥夺(活性依赖性终止)形成弱视模型,结果表明剥夺对侧与剥夺同侧和同期正常组 NOS 的 17 区表达(细胞数量、胞体截面积、树突长度)无显著性差异($P>0.05$),然而弱视模型的视皮质眼优势柱已发生漂移,这就说明 NO 在视皮质水平不受活性依赖性的视觉经验的影响,它可能不参与眼优势柱的形成。猫眼优势柱在 P21 开始形成,当 P24 时用 NOS 抑制剂(硝基精氨酸,L－NoArg)并不影响眼优势柱的漂移[10]。Cabelli 等[11]认为膝状投射神经元末梢分离进入眼优势柱涉及到脑源性神经生长因子(BDNF)。

参 考 文 献

[1] Snyder SH. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters[J]? Science, 1992; 257(24): 494－496.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[2] Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, et al. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase[J]. Proc Natn Acad Sci USA, 1991;88(17):2811-2814.

[3] 能抗辉,赵经纬,王百忍.还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-D)组化方法超作步骤中各种参数的选择[J].神经解剖学杂志,1996;12(1):79-82.

[4] 包新民,舒期云.大鼠脑立体定位图谱[M].第1版,北京:人民卫生出版社,1991.

[5] Yan XX, Garey LJ, Jen LS. Development of NADPH-diaphorase activity in the rat neocortex. [J]Dev Brain Res, 1994; 79;29-38.

[6] Rothblat LA, Schwartz ML. The effect of monocular deprivation on dendritic spines in visual cortex of young and adult albino rats: evidence for a sensitive period[J]. Brain Res, 1979; 156-161.

[7] Montero VM Amblyopia decreases activation of the corticogeniculate pathway and visual thalamic reticularis in attentive rats: s' focal attention' hypothesis[J]. Neuroscience 1999;91(3):805-17.

[8] Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Kharazia VN, et al. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and clolcalization with GABA[J]. Neuroscience Letters, 1993;157:157-161.

[9] Finney EM, Shatz CJ. Establishment of patterned thalamocortical connections does not require nitric oxide synthase[J]. J Neurosci, 1998;18(21):8826-8838.

[10] Ruthazer ES, Gillespie DC, Dawson TM, et al. Inhibition of nitric oxide synthase does not prevent ocular dominance plasticity in kitten visual cortex[J]. J Physiol, 1996;494(2):519-527.

[11] Cabelli Rj, Hohn A, Shatz CJ. Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NF-4/5 or BDNF[J]. Science, 1995;267:1662-1666.

(上接第 340 页)明显小于白种人,上下前牙突距明显大于白种人,有效下颌长度无显著性差异,但下前面高却明显大于白种人,表明重庆地区男女性上颌基骨均小于白种人,上下前牙均较白人的前突,下颌相对后缩。

总括以上,重庆地区少年儿童头影测量主要矢状结构特征为:男女性上颌基骨均小于成都、上海和白种人,上下前牙较白种人的前突,下颌相对后缩。另外,男性上颌基骨位置较本地区女性及成都、上海地区男性的偏后,下颌基骨比成都的大,上下前牙较上海的前突,下前牙较成都的前突;女性下颌基骨小于上海。

4 结 论

各民族各地区头影测量 McNamara 正常值有一定的差异,应建立当地正常值作为临床和科研工作的依据。本研究的完成,结束了重庆地区口腔界几十年来无头影测量正常值的历史,有利于重庆地区相关临床和科研工作的进行。

参 考 文 献

[1] 罗颂椒.当代实用口腔正畸技术和理论,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社[M].1996;71-85.

[2] McNamara JA. A method of cephalometric evaluation. Am Jortjod[J]. 1984;86;449-469.

[3] 潘晓岗,刘鸿虎,曹惠菊,等.X线头影测量 McNamara 分析法临床应用研究,口腔医学纵横[J]. 1999;15:227-229.

[4] 王艳民,周 力,高 辉,等.成都地区 67 名正常殆青少年 McNamara 头影测量分析[J].华西口腔医学杂志[J]. 2002;20:45-47.

[5] 潘晓岗,刘鸿虎,曹惠菊,等.上海地区 101 名正常殆人群X线头影测量 McNamara 分析[J].上海口腔医学[J]. 1996;5:195-197.