DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.008
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

文章编号:1000-5404(2002)07-0769-03

论著

斜视幼猫发育过程中视皮层神经元 NMDA-R1 的表达

阴正勤,孟晓红,陈 莉 (第三军医大学附属西南医院眼科,重庆 400038)

提 要:目的 本研究希望了解斜视性弱视猫视皮层神经元 N-甲基-D-天门冬氨酸亚基 1(简称 NMDA-R1)的表达减少是在斜视幼猫发育中哪一阶段出现的。方法 幼猫 13 只,其中 6 只于 2 周龄时做一眼外直肌断腱术产生单眼内斜。分为 4 个实验组:2 周龄组,2 只正常幼猫;3 周龄组,2 只正常和 2 只斜视幼猫;5 周龄组,2 只正常和 2 只斜视幼猫;成年组,1 只正常和 2 只斜视性弱视猫。动物均在深度麻醉下经心脏 4%福尔马林灌注后,取初级视皮层冷冻切片,NMDA-R1 单克隆抗体标记后显色,焦油紫复染。结果 ①正常幼猫发育过程中初级视皮层神经元 NMDA-R1 的表达主要在视皮层Ⅱ~Ⅲ层($P<0.05$),3 周龄达峰值,随后逐渐降低,5 周龄时接近成年猫水平。②与同龄正常猫比较斜视幼猫视皮层 NMDA-R1 的表达在斜视术后第 1 周开始减少($P<0.05$),以第Ⅳ层较显著。斜视手术后 3 周与正常猫比较,斜视幼猫视皮层 NMDA-R1 的表达在视皮层各层均降低($P<0.05$),接近成年斜视性弱视猫的表达水平。结论 斜视性弱视猫视皮层神经元 NMDA-R1 的表达减少发生在斜视手术后 1 周。表明 NMDA 中介了外侧膝状体到视皮层的输入。这与视觉电生理实验中发现,斜视性弱视猫视皮层接受弱视眼外膝体输入的减少是一致的。

关键词:NMDA;发育;斜视性弱视;猫
中图法分类号:R394.2;R777.41 文献标识码:A

Expression of NMDA-R1 in developing visual cortex of strabismic kittens

YIN Zheng-qin, MONG Xiao-huong, CHEN Li (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate at which period the NMDA-R1 receptor's distribution is changing in young strabismic amblyopic animals after surgery. Methods Thirteen kittens were used for this study. Five squint kittens had been inflicted to be monocularly esotropic (by tenotomy) at 2 weeks of age, and grew up with a pronounced squint measuring from 15 oto 20o. Two normal kittens were sacrificed 2 weeks after born. One pair of normal and strabismic kittens was sacrificed in 3 weeks of ages, which was 1 week after tenotomy. Another pair of normal and strabismic kittens was sacrificed in 5 weeks of ages. One normal and two strabismic amblyopic cats were sacrificed after 6 months of age. Animals were deeply anaesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde. Cryostat sections of frontal central area P5-P0 were cut to 25 μm thickness. The mouse anti-NMDA-R1 monoclonal antibody (mAb54.1, PharMingen) was used. The positive and the negative controls were used in each test. A computer-assisted systematic morphometric counting procedure was used to enumerate immunopositive cells. Results In normal development the percentage density of NMDA-R1 labeled cells in layer Ⅱ to layer Ⅲ was prominent at 3 weeks of age ($P<0.05$). The reduction of NMDA-R1 labeled cells in visual cortex of strabismic kitten was started 1 week after surgery, predominantly in layer Ⅳ ($P<0.05$). After 3 weeks of surgery, the immunopositive neurons of NMDA-R1 in visual cortex of strabismic animals were decreased at each layer compared with the normalize though adulthood ($P<0.05, 0.01$). Conclusion The NMDA-R1 receptor distribution in young strabismic amblyopic animal is changed following the visual environment variation quickly, implying that the plasticity associated with NMDA-mediated mechanism involve critical period of ocular dominance development.

Key words: NMDA; development; strabismic amblyopism; cats

N-甲基-D-天门冬氨酸(以下简称 NMDA)是哺乳动物中枢神经系统兴奋性神经递质谷氨酸的主要受体之一,有两个亚基 R1 和 R2。研究表明 R1 是 NMDA 受体主要和基本功能部分[1],其在哺乳动物视皮层上表达丰富。在出生后的发育过程中,哺乳动物视皮层存在很大的经验-依赖性(Experience-dependent)可塑性过程。以往的研究表明,正常猫视皮层神经元 NMDA-R1 的表达在Ⅱ~Ⅲ层最强,Ⅳ~Ⅵ层渐减弱。然而,斜视性弱视猫视皮层 NMDA-R1 表达在视皮层各层均较正常猫减少,特别在Ⅳ~Ⅵ层。结果提示,弱视的发生发展过程就是视觉系统在发育可塑性关键期受环境影响神经元突触联系发生重新分布的过程,NMDA 与视觉发育可塑性过程有关,并参与形成弱视视功能损害的病理基础[2,3]。因而,本研究希望了解,斜视性弱视猫视皮层神经元 NMDA 的表达减少发生在斜视性弱视发展过程中的哪一阶段,先出现在哪些层次。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作与取材

幼猫 13 只,其中 6 只幼猫 2 周龄时在麻醉下做一眼外直肌断腱术产生单眼内斜视[4]。术后斜视度为 15°~20°。依动物处死时的年龄分为 4 个实验组:2 周龄组,2 只正常幼猫;3 周龄组(斜视手术后 1 周),2 只正常和 2 只斜视幼猫;五周龄组(斜视手术后 3 周),2 只正常和 2 只斜视幼猫;成年组(6 月龄),1 只正常和 2 只斜视性弱视猫,处死前图形视觉诱发电位检测[5]为单眼弱视。动物均在深度麻醉(巴比妥钠 100 mg/kg)下处死,4%福尔马林加 0.2% 谷氨酸醛(Glutaraldehyde)经心脏灌注固定后,取立体定位对应于视网膜中央投射的 P0~P5 区初级视皮层冷冻切片。切片厚度 25 μm,平铺在明胶玻片上,-70℃保存备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770258);国家教委"留学回国人员科研启动基金"资助项目(97436)
作者简介:阴正勤(1955-),女,山西省平遥市人,博士,主任医师,教授,主要从事小儿眼科/斜弱视和眼底病临床基础方面的研究,发表论文 41 篇。电话:(023)68754401
收稿日期:2001-12-19;修回日期:2002-04-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 免疫组化实验与分析

实验当日，正常猫和斜视性弱视猫的视皮层同步进行免疫组化反应。切片用 NMDA-R1 单克隆抗体（mAb 54.1 PhaMingen 公司，美国）孵育过夜，DAB（Zymed 公司，美国）试剂盒显色，该试剂盒含有与 HRP（Hoseradish Peroxidase）结合的二抗。焦油紫复染后封固。每次实验中，为排除非特异免疫反应，每组各有两张切片，用 IgE 为第一抗体作阴性对照。采用与显微镜相连的计算机行视皮层免疫阳性细胞计数分析。视皮层每张切片计数 3 个区域，每个区域分别计数Ⅱ～Ⅲ，Ⅳ和Ⅴ～Ⅵ层各 250 μm× 250 μm 方格内的免疫阳性细胞和阴性细胞及其百分比。计数为双盲法。统计方法采用方差分析。

2 结果

视皮层 NMDA-R1 单克隆抗体免疫阳性神经元主要是锥体细胞和颗粒细胞。胞内免疫阳性部位主要是胞膜、胞质、轴丘和轴突，而胞核的免疫阳性较弱，见图 1。



图 1 示 **NMDA-R1** 单克隆抗体标记后经焦油紫复染的正常猫视皮层Ⅴ层神经元。黑灰色的细胞为 **NMDA-R1** 免疫阳性细胞，紫色的细胞是阴性细胞 （× 100）

Fig 1 Neurons at layer Ⅴ in visual cortex of normal cat with NMDA-R1 antibody labeling and cresyl violet counterstaining （× 100）

NMDA-R1 immunopositive cells are gray-black in color and the negative ones in purple

共计数了 4 组共 40 张切片的 14 453 个细胞。见正常幼猫发育过程中初级视皮层 NMDA-R1 的表达在视皮层Ⅱ～Ⅲ占优势，并在 3 周龄达高峰（$P<0.05$），5 周龄后渐减少，见图 2。

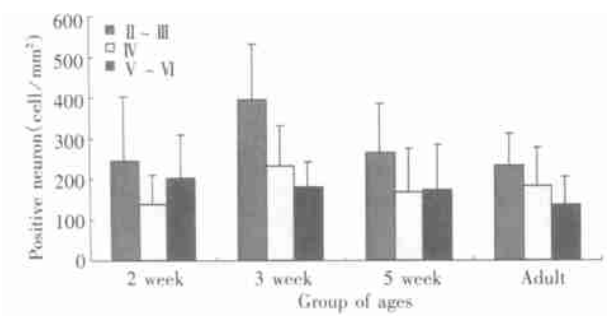


图 2 为正常猫不同年龄阶段视皮层Ⅱ～Ⅲ层，Ⅳ层和Ⅱ～Ⅳ层 **NMDA-R1** 阳性神经元的分布

Fig 2 Distribution of NMDA-R1 immunopositive cells at Ⅱ～Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ～Ⅵ layers of visual cortex of normal cat during development

与同龄正常猫比较斜视幼猫视皮层 NMDA-R1 的表达在斜视术后第 1 周开始减少（$P<0.05$），以第Ⅳ层较显著（图 3A）。斜视手术后 3 周与正常猫比较，斜视幼猫视皮层 NMDA-R1 的表达在视皮层各层均降低（$P<0.05$）（图 3B）。成年斜视性弱视猫视皮层 NMDA-R1 的表达以第Ⅳ层降低非常显著（$P<0.01$）（图 3C）。

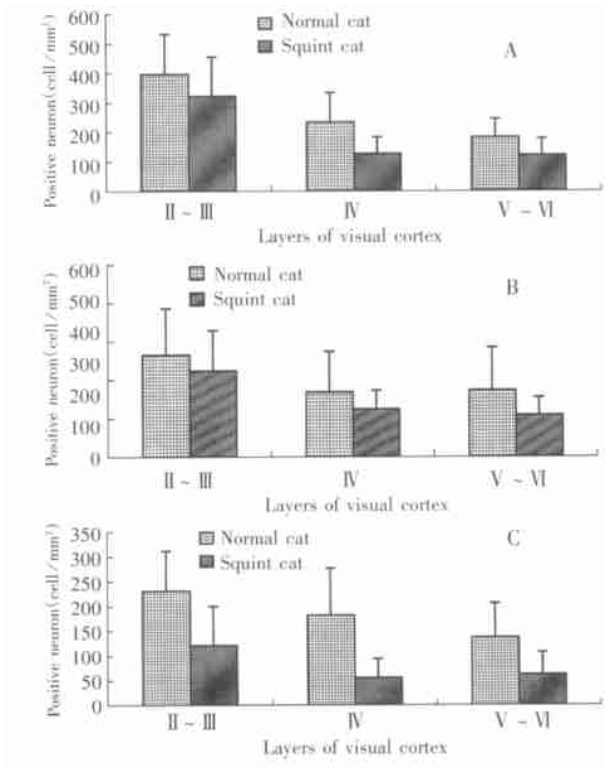


图 3 斜视术后 **1** 周组（**3** 周龄）（图 **3A**），斜视术后 **3** 周组（**5** 周龄）（图 **3B**）和成年斜视组（图 **3C**）中斜视猫与同龄正常猫在视皮层各层次 **NMDA－R1** 阳性细胞密度比较（细胞/ mm²）

Fig 3 Densities of antibody positive neurons (cell/ mm²) in primary visual cortex of normal cat in comparison with those of strabismic cats, at 3 weeks of age 1 week post-operatively (A), at 5 weeks of age 3 weeks post-operatively (B) and adult squint cat group (C)

3 讨论

弱视的发生发展过程，就是视觉系统在发育可塑性关键期受环境影响神经元突触联系发生重新分布的过程[4～6]，在这一过程中神经元突触联系发生了可塑性变化。对中枢神经系统以学习、记忆为代表的突触可塑性机制的研究发现，兴奋性神经递质谷氨酸的受体之一 NMDA 参与了长时程增强效应（LTP）的诱导。LTP 现象是学习、记忆等脑的高级功能的神经基础，是突触可塑性的一种活动依赖性形式[7]。研究显示 NMDA 受体在视皮层神经元的含量丰富，而视皮层神经元突触联系的改变和修饰在出生后早期依赖于视觉经验，因此 NMDA 受体在视皮层可塑性中的作用受到广

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

泛关注[8~10]。

该研究发现, 与正常猫相比, 斜视性弱视猫视皮层神经元 NMDA-R1 的表达减少发生在斜视手术后 1 周, 以第Ⅳ层显著, 这与 Fox 等[11] 的报道是一致的。他们采用电生理记录发现, 小猫关在黑屋饲养 10 d 后, 其视皮层 NMDA 受体的数目开始减少, 且主要在第Ⅳ层。以上结果表明, NMDA-R1 受体在视皮层第Ⅳ层是视觉经验所绝对调控的。在视觉发育可塑性关键期(猫为生后 36 周)左右眼从外侧膝状体向初级视皮层第Ⅳ层的输入开始分化, 眼优势柱亦在视皮层第Ⅳ层随着细胞对视差的敏感性而开始形成。这个时期也是视皮层各层神经元对一眼在与另一眼相比较的情况下选择输入最敏感的时期[8]。文献[12]报道, NMDA 受体神经元比非 NMDA 受体神经元对外侧膝状体抑制敏感, 并对外侧膝状体的抑制有放大作用。这意味着, NMDA-R1 在成年斜视性弱视猫视皮层第Ⅳ层表达显著减少与斜视在其 3 周龄(斜视术后 1 周)干扰眼优势柱形成, 削弱外侧膝状体输入在视皮层第Ⅳ层的双眼竞争有关。本研究表明, NMDA 中介的突触可塑性机制在视觉发育早期参与了视皮层第Ⅳ层外膝体-视皮层输入的调控。阴正勤等[10] 报道斜视性弱视猫 NMDA-R1mRNA R1-a, R1-b 和 R1-1 构型的表达比正常猫减少主要在视皮层第Ⅳ层; R1-3 构型表达增加主要在视皮层第Ⅴ~Ⅵ层, 提示斜视性弱视猫视皮层 NMDA-R1 mRNA 特异构型的转录抑制导致受体蛋白水平表达的改变。表明斜视性弱视视功能损害的结构基础可能在分子水平。

本实验结果显示, 正常猫视皮层 NMDA-R1 的表达在 3 周龄 NMDA 达高峰, 而各年龄阶段中视皮层Ⅱ~Ⅲ层的表达均高于其它层次。这既与视皮层神经元可塑性的关键期相吻合亦表明Ⅱ~Ⅲ层的可塑性较视皮层其它层次更大。哺乳类视觉系统存在精细的突触环路。在视觉活动发生之前, 是由分子内部程序化反应决定环路的早期形成, 但从未成熟回路向构成成年功能的成熟回路转变过程中, 视觉经验起了很大的作用, Ⅱ~Ⅲ层高度特异性水平联系的形成和改变始终与视觉经验相关[12]。Fox[11] 和 Daw[13] 报道 NMDA 受体的功能性变化在视皮层Ⅳ~Ⅵ从 3 周的 50%~60%下降至 6 周的 10%~15%; 而Ⅱ~Ⅲ层的视觉反应仍维持在 70%~80%。Catalano 等[14] 报道猫视皮层发育过程中, NMDA 受体水平在Ⅳ层随发育逐渐降低, 而Ⅱ~Ⅲ层在成年时仍表达丰富, 提示Ⅳ层 NMDA 受体水平下降符合该层眼优势柱形成的完成和关键期的结束, 而Ⅱ~Ⅲ层 NMDA 受体持续高水平与成年时Ⅱ~Ⅲ层神经元突触联系仍有一定的可塑性有关。视皮层Ⅳ层主要轴突重建随着关键期的终止而完成, 而Ⅱ~Ⅲ层水平联系的轴突重建能力一直持续到成年。越来越多的证据表明, 成年后, 某些视觉刺激仍能显著改变Ⅱ~Ⅲ层而不是Ⅳ~Ⅵ层的神经元感受野[15]。Ⅱ~Ⅲ层 NMDA 受体在成年仍维持高水平, 提示Ⅱ~Ⅲ层中 NMDA 受体在调节成年后视皮层神经元突触联系的可塑性中起重要作用。然而, 视觉发育的早期和成年阶段, 在视网膜-视皮层拓扑投射关系依视觉经验重新分布的机制中, NMDA 受体是怎样起作用的仍不清楚。

参考文献:

[1] Nakanishi N, Axel R, Shneider N A. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(6): 8 552—8 556.

[2] Yin Z Q, Crewther S G, Yang M, *et al*. Distribution and localization of NMDA receptor subunit 1 in the visual cortex of strabismic and anisometropic amblyopic cats[J]. Neuroreport, 1996, 7(18): 2 997—3 000.

[3] Stevens C F. NMDA receptors-On to molecular mechanisms[J]. Nature, 1992, 258(2): 18—19.

[4] Crewther S G, Crewther D P, Cleland B G. Convergent strabismic amblyopia in cats[J]. Experimental Brain Research, 1985, 60(1): 1—9.

[5] Yin Z Q, Li C Y, Pe X, *et al*. Development of pattern ERG and Pattern VEP spatial resolution in kittens with unilateral esotropia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(2): 626—634.

[6] Daw N. Visual Development[M]. New York: Plenum Press, 1995. pp139—213.

[7] Collingridge G L, Herron C E, Lester R A J. Frequency-dependent N-methyl-D-aspartate receptor mediated synaptic transmission in rat hippocampus[J]. Journal of Physiology, 1988, 399(2): 301—312.

[8] Kasamatsu T, Imamura K. Roles of N-methyl-d-aspartate rceptors in ocular dominance plasticity in developing visual cortex: re-evaluation[J]. Neurosci, 1998, 82(3): 687—700.

[9] Fox K. Glutamate receptor blockade at cortical synapses disrupts development of thalamocortical and columnar organization in somatosensory cortex[J]. Proc Natl Aced Sci USA, 1996, 93(11): 5 584—5 589.

[10] 阴正勤, 邓泽明, 陈　莉, 等. N-甲基-D-天门冬氨酸-R1 不同 mRNA 构型在斜视性弱视猫视皮层的表达[J]. 中华眼底病杂志, 2000, 16(2): 118—120.

[11] Fox K, Daw N, Sato H, *et al*. The defect of visual experience on development of NMDA receptor synaptic transmission in kitten visual cortex[J]. J Neurosci, 1992, 12(10): 2 672—2 684.

[12] Ruthazer E S, Stryker M P. The role of activity in the development of long-range horizontal connections in area 17 of the ferret[J]. J Neurosci, 1996, 16(7): 7 253—726 917.

[13] Daw N W, Fox K. Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex[J]. J Neurophysiol, 1992, 67(2): 197—202.

[14] Catalano S M, Catherine K. Activity-dependent regulation of NMDAR1 immunoreactivity in the developing visual cortex[J]. J Neurosci, 1997, 17(8): 8 376—8 390.

[15] Das A, Gilbert C D. Receptive field expansion in adult visual cortex is linked to dynamic changes in strength of cortical connections[J]. J Neurophysiol, 1995, 74(3): 779—792.

（编辑　张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net