

# 视觉发育敏感期单眼形觉剥夺大鼠视觉电生理及视皮质超微结构研究

孙晓楠<sup>1,2</sup>, 陶 军<sup>2</sup>, 郝旭红<sup>2</sup>, 徐 丽<sup>2</sup>, 李若溪<sup>2</sup>, 张劲松<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(110005)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第四医院眼科;<sup>2</sup>(110031)中国辽宁省沈阳市,沈阳市第四人民医院眼科

作者简介:孙晓楠,博士,主治医师,研究方向:白内障、弱视。

通讯作者:张劲松,教授,博士研究生导师,研究方向:白内障。

zhangjingsong604@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-07-20 修回日期:2012-10-11

## Study on visual electrophysiological function and ultrastructure in the visual cortex of sensitive period monocular deprivation rats

Xiao-Nan Sun<sup>1,2</sup>, Jun Tao<sup>2</sup>, Xu-Hong Hao<sup>2</sup>, Li Xu<sup>2</sup>, Ruo-Xi Li<sup>2</sup>, Jin-Song Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the 4<sup>th</sup> Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China;<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the 4<sup>th</sup> People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Jin-Song Zhang. Department of Ophthalmology, the 4<sup>th</sup> Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. zhangjingsong604@yahoo.com.cn

Received: 2012-07-20 Accepted: 2012-10-11

## Abstract

• **AIM:** To detect the visual electrophysiological function and observe the ultrastructure in the visual cortex of sensitive period monocular deprivation rats.

• **METHODS:** Totally 20 SD rats of 14-day-old were randomly divided into two groups, ten for each group. Rats of experimental group were sutured unilateral eye as monocular deprivation animal models and reared in the same natural light environment with the control group for 45 days. Both two groups received electrophysiological testing, visual cortex ultrastructure was observed by the transmission electron microscope.

• **RESULTS:** Electrophysiologic study on ocular deprived animal model, F-VEP showed typical NPN wave form in normal rats, P1 wave peak latency was short, wave crest was steep and straight. Detection in ocular deprived rats showed that P1 wave peak latency lengthened obviously, wave crest depressed significantly. Observation of ultrastructure of visual cortical neurons in monocular deprived animals by electron microscope showed that it was destroyed seriously.

• **CONCLUSION:** Monocular deprivation can affect rats'

visual electrophysiological function. It makes F-VEP P1 wave peak latency of model rats obviously lengthen, amplitude of vibration significantly degrades. Monocular deprivation can destroy rats' visual cortex neurons ultrastructure and this change is the morphological basis of monocular deprivation amblyopia.

• **KEYWORDS:** sensitive period of visual development; ultrastructure; visual electrophysiology

**Citation:** Sun XN, Tao J, Hao XH, et al. Study on visual electrophysiological function and ultrastructure in the visual cortex of sensitive period monocular deprivation rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(11):2075-2077

## 摘要

**目的:**检测视觉发育敏感期单眼形觉剥夺大鼠视觉电生理功能,并观察其视皮质超微结构。

**方法:**健康14日龄SD大鼠20只,随机分为两组,实验组及对照组各10只。实验组大鼠缝合封闭单侧眼,制作单眼形觉剥夺动物模型。与对照组在同等自然光照环境下饲养至45日龄。分别对两组鼠进行电生理检测,并使用透射电镜观察两组大鼠视皮质的超微结构。

**结果:**正常大鼠F-VEP呈现典型的NPN波形,P<sub>1</sub>波峰潜时短,波峰陡直。形觉剥夺大鼠F-VEP检测结果:P<sub>1</sub>波峰潜时明显延长,波峰显著降低。电镜观察单眼形觉剥夺动物视皮质神经元的超微结构发现:形觉剥夺动物视皮质中神经元的超微结构受到破坏。

**结论:**单眼形觉剥夺可以影响大鼠视觉电生理的变化,使P波峰的潜时延长,振幅降低,这一改变是形觉剥夺性弱视视觉生理功能改变的体现;单眼形觉剥夺可以引起大鼠视皮质神经元超微结构破坏,这一改变是形觉剥夺性弱视的形态学基础。

**关键词:**视觉发育敏感期;超微结构;视觉电生理

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.09

**引用:**孙晓楠,陶军,郝旭红,等.视觉发育敏感期单眼形觉剥夺大鼠视觉电生理及视皮质超微结构研究.国际眼科杂志2012;12(11):2075-2077

## 0 引言

在视觉发育的敏感期,视觉系统能够根据视觉环境的刺激调整和改变与生俱有的神经联系和突触结构。在此期间,从左右外侧膝状体核来的神经元轴突,彼此竞争与视皮质神经元建立联系,以形成突触(synapse)。这时,从左右眼来的输入保持平衡,那么在皮质细胞下所形成的突触就按正常左右眼的比例进行分配,但如果从左

右眼来的轴突的相对活动有任何变化,则可导致这两眼形成的突触多寡不平衡,于是在生理上也导致两眼的优势不相等<sup>[1]</sup>。视觉系统对形觉剥夺可以产生敏感反应,导致弱视,甚至可使视功能产生不可逆性损害。敏感期内视皮质神经元对单眼剥夺的敏感性最大,单眼剥夺效应发生的最短时限仅在剥夺后4h即可发生,表现为双眼视敏度锐减和视皮质神经元优势柱漂移到非剥夺眼<sup>[2]</sup>。实验研究证实,形觉剥夺性弱视的病变部位在中枢神经系统的视皮质,首先是在初级视皮质水平,在更高的视觉水平这种缺陷被扩大和延伸。接受弱视眼侧的相应视皮质的神经元比接受对侧眼的神经元小18%,应用2-DG技术发现剥夺眼的视皮质区眼优势柱明显萎缩,而健眼的优势柱明显增大,出现眼优势柱向健眼偏移的现象<sup>[3]</sup>。而这一变化,必然有其发生的生理学和形态学基础。

本研究拟在敏感期内对大鼠行单眼形觉剥夺,使用闪光视觉诱发电位(F-VEP)这一技术对单眼形觉剥夺大鼠进行电生理功能检测,并使用透射电镜观察其视皮质神经元超微结构的变化,探讨敏感期内单眼形觉剥夺对模型大鼠视觉电生理功能和视皮质神经元超微结构的影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料 出生14日龄的健康SD大鼠20只,雌雄不限,由中国医科大学实验动物中心提供,标准为清洁级。

1.2 方法 健康14日龄SD大鼠20只,随机分为2组,实验组即单眼形觉剥夺(MD)组10只,对照组即正常大鼠10只。MD组大鼠于生后14d睁眼时,用50g/L水合氯醛(3mL/kg)腹腔注射麻醉,剪去睑缘周围毛发,碘伏消毒,距上下睑缘各1.0mm处剪去皮肤和睑板组织,用6-0丝线间断缝合封闭右眼睑约2~3针,制作单眼形觉剥夺动物模型。创口愈合后,上下睑粘连。对照组不做任何处理。各组大鼠分别在同等自然光照环境下饲养至45日龄。

采用VETS-3型视觉电生理诊断仪,参照ISCEV电生理检查标准<sup>[3]</sup>。检查使用银针电极,记录电极插入枕后隆凸皮下,参考电极置于双眼连线中点皮下,接地电极置于检测眼同侧耳后皮下。采用全视野刺激球,白色闪光刺激,刺激频率3Hz,刺激次数50次,分析时间200ms。检查时将麻醉后的模型大鼠封闭眼打开,固定于实验台上,在暗适应15min后记录F-VEP。检查1眼时,对侧眼用自制不透光黑色眼罩完全遮盖。每只大鼠连续测量至少5次,每次间隔10min,记录稳定波形3次。对实验组及对照组共20只大鼠分别进行检测。每只动物均记录P<sub>1</sub>波峰潜时(ms)和P<sub>1</sub>波振幅(μV),诊断仪自动测量,取3次检查的平均值记录。

上一步电生理记录结束后,将大鼠迅速开胸,经左心室-主动脉插管并切开右心房形成出口,快速生理盐水灌注500mL,接着灌注二钾磷酸钠配制的2.5%戊二醛30min。取脑组织,根据鼠脑立体定位图谱,分离出剥夺眼对侧的视皮质17区,垂直矢状轴切取初级视皮质的脑组织,取材后立即放入2.5%戊二醛(二钾磷酸钠配制,pH=7.4)中,再将标本改切为1mm小块继续固定2h。缓冲液清洗后,1%锇酸固定2h,用双蒸水清洗3次,500mL/L和700mL/L乙醇脱水各30min,800mL/L和900mL/L丙酮脱水各30min,1000mL/L丙酮脱水3次,各10min;Epon812环氧树脂浸透过夜,包埋,恒温箱聚合

表1 正常组及实验组大鼠电生理检测结果比较  $\bar{x} \pm s$

分组	P <sub>1</sub> 波峰潜时(ms)	P <sub>1</sub> 波峰振幅(μV)
正常组	62.87±4.19	32.46±4.18
实验组	82.66±4.16	12.18±1.83
P	<0.05	<0.05

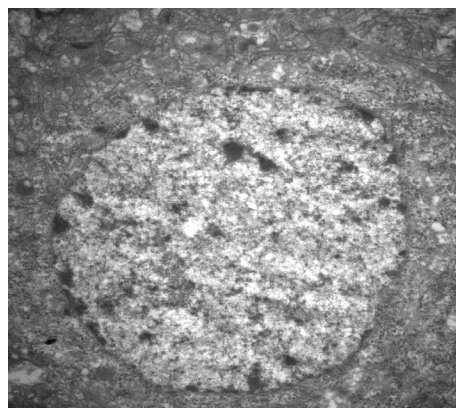


图1 正常大鼠视皮质神经元细胞核结构清晰完整的存在于细胞质中(×15000)。

72h(35℃,45℃,60℃各24h),切片,醋酸铀柠檬酸铅双重染色。日立H-7650透射电子显微镜观察并摄片。

统计学分析:数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组数值比较使用SPSS 11.0统计软件进行单因素方差分析,P<0.05为有统计学差异。

### 2 结果

每只正常SD大鼠F-VEP呈现典型的NPN波形,P<sub>1</sub>波峰潜时短,波峰陡直。单眼形觉剥夺大鼠F-VEP波形出现明显变化,波形变得低而宽,与正常对照组相比较,其P<sub>1</sub>波峰潜时延长,振幅降低。经过统计学处理,单眼形觉剥夺大鼠与正常大鼠的电生理检测差异具有统计学意义(表1)。

透射电子显微镜观察单眼形觉剥夺动物视皮质神经元的超微结构发现:形觉剥夺动物视皮质中神经元的超微结构受到破坏;损伤较重的神经元核的形态尚存在,核周间隙扩大或核膜大部分崩解消失,胞质内容物也大部分崩解,残存少量的粗面内质网及仅有少量扁平囊的高尔基复合体;线粒体肿胀,结构模糊。而正常组鼠视皮质中看不到这些变化(图1~4)。

### 3 讨论

早在1960年代,Hubel和Wiesel就用单眼睑缝合的方法研究了幼猫初级视皮质对图像刺激的反应,开创了弱视研究的新纪元。单眼睑缝合这一模型模拟了因形觉剥夺(如先天性白内障、先天性完全上睑下垂等)而造成的弱视。基础实验和临床试验已经证实:弱视的主要病变位置在于中枢的视皮质,尤其是初级视皮质水平,在更高的视觉水平,这种缺陷被扩大和延伸<sup>[4]</sup>。弱视的视敏度降低,空间分辨率不良,尤其是高空间频率端;色觉、立体视等都存在异常;单眼剥夺引起眼优势柱向健眼偏移并伴有双眼驱动细胞的减少。视觉诱发电位测量的是视皮质对某一特定刺激的平均反应,得到的是数万神经元的总活性。Magos<sup>[5]</sup>研究发现,视皮质的单胺能神经元活动与VEP波形密切相关,并认为VEP检测是一种无创性的、分析单胺能神经元活动的有用工具。一个正常的VEP



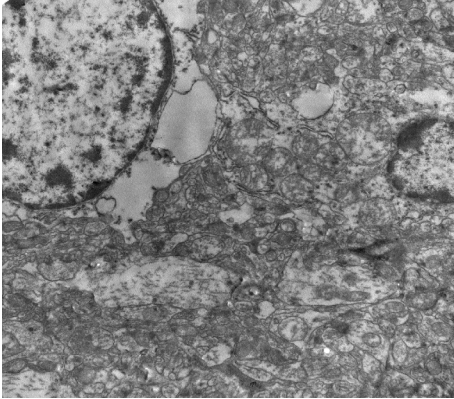


图2 单眼形觉剥夺鼠视皮质神经元细胞核核周间隙扩大,核周细胞质空泡化( $\times 15000$ )。

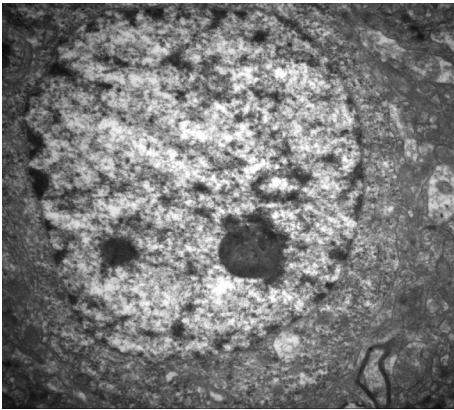


图3 正常大鼠视皮质神经元细胞核核仁完整清晰,线粒体结构完整细胞超微结构大致正常,可以观察到各种细胞器的形态及结构( $\times 15000$ )。

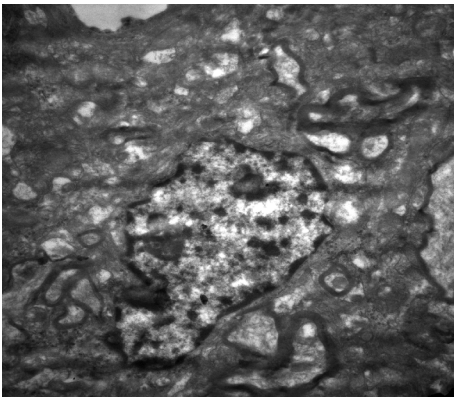


图4 单眼形觉剥夺大鼠视皮质神经元细胞核核仁崩解,染色质边集,线粒体肿胀,溶解,细胞的超微结构严重破坏,无法辨别各个细胞器的形态和结构( $\times 15000$ )。

反应取决于视网膜功能和视路功能的完整。本实验通过对单眼形觉剥夺大鼠进行视觉电生理检测,发现 F-VEP 中  $P_1$  波峰潜时延长,振幅降低。这一结果提示形觉剥夺

使通过剥夺眼传入视中枢的视觉信号减少,两眼输入不平衡,两眼在皮质细胞下形成的突触多寡不平衡,于是在生理上也导致两眼的优势不相等,从而导致大鼠视觉传导通路信号异常,体现为 F-VEP 的波形改变。

单眼形觉剥夺切断了大鼠视觉传导通路。Nissl 在 1982 年报道:切断轴突后,神经元胞体最显著的变化是尼氏体溶解或消失。轴突损伤 1d 开始发生尼氏体溶解,约于 2wk 达最高峰。在此期间,胞体肿胀变圆,核周的尼氏体变细和呈粉末状,最后消失。因而,核周胞质染色很淡。细胞核亦肿胀,远离轴丘而偏位。残留在细胞周缘的一些尼氏体,偏位于核附近形成狭窄的弧形,犹如戴在核上的帽子。越年轻的动物此变化发生越迅速和严重,成年动物则数周或数月后才出现细胞死亡。此种跨神经元作用继续发展下去,则从外侧膝状体投射到相应视皮质的神经元也发生第二级溃变,最常见的变化是该神经元树突棘消失,也可出现因细胞死亡消失而皮质某层变薄。实验在敏感期内长期剥夺可以使视觉系统解剖结构发生显著的变化,特别是视皮质及外侧膝状体突触连接水平变化则更明显。而在敏感期,双眼剥夺效应对视皮质和外侧膝状体细胞的大小仅存在轻微的影响,视皮质眼优势柱形成没有受到显著干扰,且视皮质保持了对视刺激的反应。

本实验观察发现,单眼形觉剥夺大鼠视皮质神经元的超微结构中:损伤较重的神经元核的形态尚存在,核周间隙扩大或核膜大部分崩解消失,胞质内容物也大部分崩解,残存少量的粗面内质网及仅有少量扁平囊的高尔基复合体。线粒体肿胀,结构模糊。而正常组鼠视皮质中看不到这些变化。这提示了单眼剥夺对视皮质神经元的超微结构造成了破坏,视功能损害是剥夺及双眼异常相互作用、双眼竞争机制共同作用的结果,这一损害有其发生的形态学基础。由此,我们可以得出这样的结论,单眼形觉剥夺可以影响大鼠视觉电生理的变化,使 P 波峰的潜时延长,振幅降低,这一改变是形觉剥夺性弱视视觉生理功能改变的体现;单眼形觉剥夺可以引起大鼠视皮质神经元超微结构破坏,这一改变是形觉剥夺性弱视的形态学基础。

#### 参考文献

- 1 蔡浩然. 视觉发育敏感期机理研究的新进展. 中国斜视与小儿眼科杂志 1994;2(3-4):134-136,178-182
- 2 朱晓明,严宏. 视觉发育敏感期的研究进展. 眼视光学杂志 2004;12(6):261-263
- 3 吴乐正,吴德正. 临床视觉电生理. 北京:科学出版社 1999:12
- 4 Kiorpes L, MeKee SP. Neural mechanisms underlying amblyopia. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(4):480-486
- 5 Magos T. Monoaminergic activity acts on the visual evoked potentials. *Neuro Psycho Pharmacol Hung* 2004;6(3):144-152