

单眼慢性阿托品化对视觉发育关键期内大鼠视觉发育的影响

武雅贞, 邢咏新, 严宏

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81100690)

作者单位: (710038) 中国陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院眼科

作者简介: 武雅贞, 第四军医大学眼科学在读硕士研究生, 研究方向: 小儿斜视、弱视。

通讯作者: 严宏, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障、小儿眼病。 yhongb@fmmu.edu.cn; 邢咏新, 副主任医师, 教授, 研究方向: 小儿斜视和弱视。 xfwawa@126.com

收稿日期: 2015-01-06 修回日期: 2015-03-12

Changes of visual development in critical period produced by monocular chronic atropinization in rats

Ya-Zhen Wu, Yong-Xin Xing, Hong Yan

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81100690)

Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong Yan; Yong-Xin Xing. Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. yhongb@fmmu.edu.cn; xfwawa@126.com

Received: 2015-01-06 Accepted: 2015-03-12

Abstract

• AIM: To investigate the changes of visual development produced by monocular atropinization in rats.

• METHODS: Twenty normal SD rats were randomly divided into two groups: control group ($n = 10$) and atropinization (experimental) group ($n = 10$). All the left eyes were selected as the experimental eyes, and the right eyes served as the normal eyes. The left eyes in atropinization group was produced by 1% atropine, 3 times a day and the right eyes in control group was treated with normal saline, 3 times a day. The flash visual evoked potentials (F-VEP) and retinoscopy refraction of the rats' both eyes were detected at five time points: 0, 7, 14, 21, and 28d after atropinization, respectively. After 28d, six rats were randomly selected from both groups and each group had three rats. The expression of the c-fos mRNA was observed in both visual cortexes. Another six rats were chosen for the same test after 2d dark environment with 2h light later. The expression of c-fos mRNA was detected again.

• RESULTS: After 14d anisometropia was observed in experimental group, the difference was 3.9D ($P <$

0.05), F-VEP P1 wave of the rats left in experimental group was reached to 88.9 ± 1.889 ms at 21d, there was statistical difference compared with the right eye ($P < 0.05$). After 28d, c-fos mRNA expression in the left visual cortex of rats in the experimental group was higher than that of the right side, but there was no significant difference. But when underwent 2h light stimulation after in the darkroom 2d, the c-fos mRNA expression in the left visual cortex of rats in the experimental group was 5 times higher than that of the right side, there was a statistically significant difference ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: In the critical period of visual development, monocular chronic atropine in rats can form anisometropia, may delay the transmission of the optic nerve, hinder the normal development of the visual cortex. Monocular atropinization in rats can be used as the model of anisometropia.

• KEYWORDS: atropinization; critical periods of visual development; flash visual evoked potentials; anisometropia; c-fos

Citation: Wu YZ, Xing YX, Yan H. Changes of visual development in critical period produced by monocular chronic atropinization in rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(4):592-595

摘要

目的: 探讨单眼阿托品化对视觉发育关键期内大鼠视觉发育的影响。

方法: 将 20 只出生 14d 的健康 SD 大鼠随机分为实验组和对照组, 每组 10 只, 均选取左眼为干预眼, 右眼作为对照眼。实验组 1% 硫酸阿托品眼用凝胶点左眼, 每日 3 次, 右眼生理盐水点眼, 每日 3 次。对照组大鼠给予生理盐水点双眼, 每日 3 次。在点眼前及点眼后的 7, 14, 21, 28d 分别行闪光视觉诱发电位检查及带状检影法测量屈光度。在点药后 28d, 从实验组和对照组中各随机选取 3 只大鼠, 检测 c-fos mRNA 的表达; 后在实验组与对照组中再各随机选取 3 只大鼠, 放入暗室 2d 后给予 2h 正常饲养环境光线刺激, 再次检测 c-fos mRNA 的表达。

结果: 实验组点药后 14d 产生屈光参差, 两眼相差 3.9D ($P < 0.05$), 实验组大鼠左眼 F-VEP 的 P1 波在点药后 21d 峰值时延长为 88.9 ± 1.889 ms, 与右眼相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。点药后 28d, 实验组大鼠左侧视皮层中 c-fos mRNA 表达较右侧视皮层高, 但无显著差异; 但在放入暗室 2d 后再给予 2h 光线刺激, 实验组大鼠左侧视皮层中 c-fos mRNA 表达为右侧视皮层的 5 倍, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。

结论:在视觉发育关键期内大鼠的单眼慢性阿托品化可形成屈光参差,使视传导发生延迟,阻碍了视皮层的正常发育。大鼠的单眼慢性阿托品化可作为制作屈光参差的研究模型。

关键词:阿托品化;视觉发育关键期;视觉诱发电位;屈光参差;c-fos

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.06

引用:武雅贞,邢咏新,严宏.单眼慢性阿托品化对视觉发育关键期内大鼠视觉发育的影响.国际眼科杂志 2015;15(4):592-595

0 引言

弱视是引起儿童单眼视力受损的常见原因之一,弱视的发病率约为 1.3%~3.6%^[1]。研究已证实,生后视觉发育存在“敏感期”,在此期间视皮层神经元的结构和功能可随环境发生变化,具有经验依赖的可塑性。异常的视觉环境会产生视皮层水平的竞争性抑制,最终导致弱视的发生^[2]。所谓健眼阿托品压抑治疗是治疗单眼弱视的方法之一,其目的是使所谓健眼视网膜上的物像清晰度下降,促进弱视眼的视功能恢复。在视觉发育的关键期内,若持续使用而未定期随诊,有可能对视功能造成严重影响。因此研究单眼慢性阿托品化对视觉发育的影响有助于理解弱视发生的机制、预防应用阿托品治疗弱视所引起的视觉损害。本文应用大鼠模型,观察单眼慢性阿托品化对关键期内大鼠视觉发育的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组及模型建立 出生 14d 健康 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供)20 只,雌雄不限。纳入标准:双眼屈光间质透明,瞳孔等大等圆,对光反应灵敏,眼底检查无异常,屈光状态检查:双眼等效球镜相差小于 1.5D。12h 昼-夜交替光照,不限食水,室温 22℃~25℃ 条件下饲养。实验组 10 只,正常对照组 10 只。实验组:生后 14d SD 大鼠,左眼用 1% 硫酸阿托品眼用凝胶点眼,3 次/d,右眼用生理盐水点眼,3 次/d;对照组大鼠用生理盐水点眼,3 次/d。所用研究对象均连续处理 28d,至生后 42d。

1.1.2 主要仪器及试剂 采用 RETI-scan 系统(Roland Consult,德国)视觉电生理检测仪,Ganzfeld 全视野刺激器来记录闪光视觉诱发电位(Flight-Visual Evoked potential, F-VEP);记录电极和参考电极为丝状银-氯化银电极,接地电极为自制不锈钢针状电极,各电极自身阻抗均小于 5Ω。带状光检影镜(中国苏州六六公司 YZ24 型)、镜片(中国苏州六六公司)。CFX96 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),1% 硫酸阿托品眼用凝胶(沈阳兴齐眼药股份有限公司),戊巴比妥钠(上海行知化工厂),复方托吡卡胺滴眼液(5mL:25mg;武汉五景药业公司),生理盐水,Trizol 和 Superscript III reagents 逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司),SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(日本 Takara 公司),DEPC(Promeg 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 F-VEP 的检测 依据第四军医大学航空航天医学系实验室建立的大鼠 F-VEP 记录标准化方案^[3],分别于点眼前、点眼后的第 0,7,14,21,28d 记录实验组及对照组大鼠双眼 F-VEP。大鼠行腹腔内注射麻醉

(1% 戊巴比妥钠溶液按 0.3mL/100g 体质量给药),实验前给予 5g/L 复方托吡卡胺滴眼液麻痹睫状肌。记录电极置于双耳连线中点,向前刺入皮下 1cm,保持电极与身体长轴平行;参考电极置于颊部皮下,接地电极置于尾部皮下。记录其中一眼时,对侧眼用不透光眼罩遮盖,采用 RETI-scan 系统(Roland Consult,德国)记录 F-VEP,刺激光强 3.0cd/m²,刺激频率 1.3Hz,波形时间 300ms,通频带 1~100Hz,叠加次数 100 次。观测 P1 波的峰时值(ms)和波幅(μV),每只眼测量 3 次计算平均值。两组大鼠实验过程中均能记录到典型 NPN 波形。依据国际临床视觉电生理学会规定对所记录的波形进行标定,波形出现的第一个负向波为 N1 波,紧随 N1 波之后出现的正向波为 P1 波,P1 波其后出现的负向波为 N2 波。本实验对 P1 波的峰时值和振幅的变化情况进行分析。

1.2.2 动物模型的屈光检查 为避免泪液分泌减少及视觉质量的下降,屈光检查均在动物清醒状态下完成。由于大鼠瞳孔较小,影响实验结果,因此实验组右眼及对照组双眼在验光前均先使用复方托吡卡胺滴眼液麻痹睫状肌,每 5min 1 次,共 4 次。30min 后在暗室行带状检影验光。检影时左右眼先后进行,各重复检影 3 次取平均值,以等效球镜记入数值(散光以半量计入球镜)。

1.2.3 动物模型的 c-fos mRNA 表达检测 点药后 28d 从实验组和对照组中各随机选取 3 只大鼠,取视皮层 17 区脑组织,提取总 RNA,应用实时定量多聚酶链反应(qRT-PCR)方法检测 c-fos mRNA 的表达。另取实验组与对照组中再各随机选取 3 只大鼠,放入暗室 2d,然后给予 2h 光线刺激,取视皮层 17 区脑组织,提取总 RNA,检测 c-fos mRNA 的表达。具体步骤如下:(1)取材:大鼠麻醉后断头,依据《大鼠脑立体定位图谱》,开颅后无菌分离出左侧视皮层并投入液氮中速冻。(2)总 RNA 的提取:1)大鼠视皮层组织冰上匀浆后移入含有 Trizol 试剂的 EP 管中混匀,室温静置;2)加氯仿 0.2mL,震荡 15s 后室温静置 3min,4℃,12000g 离心 15min;3)吸取上层水相 0.4mL,移至另一 EP 管中,加 0.4mL 异丙醇,室温 10min,4℃,12000g 离心 10min;4)倒掉上清液,加 75% 乙醇(DEPC 水配置)1mL,震荡充分洗涤沉淀,4℃,7500g 离心 5min;5)中空干燥后沉淀重悬于无 Rnase 水中-70℃ 保存备用。(3)cDNA 合成:应用 Superscript III reagents(Invitrogen)按照试剂盒说明书将所提取 RNA 分别反转录为 cDNA。(4)qRT-PCR:采用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,按照说明书进行荧光实时定量 PCR 反应。引物为:c-fos 上游引物:5'-AGGCTGACTCCTCCCTAGC-3',下游引物:5'-TCTCTGTAATGCACCAGCTCA-3';GAPDH 上游引物:5'-GACAACCTTGGCATCGTGGA-3',下游引物:5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'。以上引物由上海生工生物工程有限公司合成。反应结束后 CFX96 PCR 用计算机自带的软件将样本与标准品对比,并结合内参照(GAPDH)得到大鼠视皮层组织 c-fos mRNA 的相对表达量,靶基因相对表达量:靶基因表达浓度/内参基因表达浓度。

统计学分析:采用 SPSS16.0 软件对数据进行分析,所得数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据资料采用独立 t 检验和 one-way ANOVA, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型 F-VEP 检测结果

2.1.1 P1 波峰时值的比较 点药前,实验组大鼠左眼与右眼的 P1 峰时值分别为 $72.9 \pm 2.095, 72 \pm 2.129$ ms ($t = 0.301, P = 0.766$)。点药后的第 7, 14d, 实验组大鼠左眼的 P1 峰时值与右眼相比,均无明显变化。点药后 21d, 左眼的 P1 峰时值为 88.9 ± 1.889 ms, 较右眼明显延长 ($t = 5.521, P < 0.01$), 与点药前相比, 延长较显著 ($t = 5.673, P < 0.01$)。点药后 28d, 实验组大鼠左眼的 P1 波峰时值为 92.3 ± 1.944 ms, 与点药前相比, 差异有统计学意义 ($t = 6.789, P < 0.01$), 与同期右眼的 P1 波峰时值相比, 具有显著的延长, 差异有统计学意义 ($t = 7.167, P < 0.01$)。随着生后时间的延长, 实验组大鼠右眼在各个时间点的 P1 波峰时值与点药前相比无明显变化, 差异无统计学意义 ($F = 0.202, P = 0.940$); 同时, 与对照组大鼠的左眼 P1 波峰时值相比较, 均无显著变化, 差异无统计学意义见图 1, 2。

2.1.2 P1 波振幅的比较 点药前, 实验组大鼠左右眼 P1 波振幅分别为 $12.505 \pm 3.154, 13.328 \pm 1.967$ μ V, 点药 7d 后, 实验组大鼠左眼 P1 波振幅为 11.224 ± 2.956 μ V, 与点药前相比差异无统计学意义 ($t = 0.090, P = 0.930$), 同时实验组大鼠左眼与对照组大鼠左眼的 P1 波振幅相比也无统计学差异 ($t = 0.300, P = 0.770$)。从点药后的 7 ~ 28d 内, 实验组大鼠左眼的 P1 波振幅较大波动, 但与同期的对照组大鼠左眼 P1 波振幅相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.2 动物模型屈光度检查结果 点药前, 实验组大鼠左右眼屈光度分别为 $7.25 \pm 0.43, 7.10 \pm 0.22$ D (表 1), 点药 7d 后, 实验组大鼠左眼屈光度变化值为 1.00 ± 0.08 D, 与点药前相比无统计学差异 ($t = 1.584, P = 0.130$); 点药 14d 后, 实验组大鼠左眼屈光度与点药前相比有统计学差异 ($t = 4.840, P < 0.001$, 图 4); 实验组大鼠左眼与对照组大鼠左眼的屈光度比较差异也有统计学意义 ($t = 2.450, P = 0.025$)。从点药后的 7 ~ 28d 内, 实验组大鼠左眼的屈光度呈现近视“漂移”现象。

2.3 动物模型 c-fos mRNA 表达的检测结果 对本标本进行 qRT-PCR 检测 (图 5), 点药后 28d, 实验组大鼠左侧视皮层中 c-fos mRNA 表达较右侧视皮层高, 但无显著差异; 但在放入暗室 2d 后再给予 2h 光线刺激, 实验组大鼠左侧视皮层中 c-fos mRNA 表达为右侧视皮层的 5 倍, 有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。而对照组左侧视皮层中 c-fos mRNA 的相对表达量也增加, 与实验组左侧视皮层中 c-fos mRNA 表达量相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

在我国, 弱视是影响儿童视觉发育的主要疾患, 异常的视觉环境输入引起视皮层的竞争性抑制, 导致弱视。本实验通过对大鼠单眼慢性阿托品化来建立一个简单、可靠、重复性高的屈光参差模型, 观察其对视觉发育关键期内大鼠视觉发育的影响。

常用的异常视觉经验对视觉发育影响的动物模型有单眼形觉剥夺、双眼形觉剥夺、人工斜视及暗饲养等^[4]。对于屈光参差性弱视模型, 常用单眼的慢性阿托品化的猫制备^[5]。但是猫的来源及品系不定, 饲养不易, 价格较为昂贵。用猫制备的单眼慢性阿托品化模型成模时间较长, 因为猫的视觉发育敏感期是在生后 4 ~ 16 周龄^[6], 且鉴定

表 1 实验组与对照组大鼠屈光度变化比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s, D$)

时间	实验组左眼	实验组右眼	对照组左眼
点药前	7.25 ± 0.43	7.10 ± 0.22	7.30 ± 0.37
点药后 7d	6.25 ± 0.51	7.03 ± 0.32	7.25 ± 0.31
点药后 14d	2.35 ± 0.69	5.40 ± 0.46	5.90 ± 0.55
点药后 21d	-0.35 ± 0.75	4.60 ± 0.55	4.20 ± 0.34
点药后 28d	-4.00 ± 0.65	3.25 ± 0.50	3.50 ± 0.33

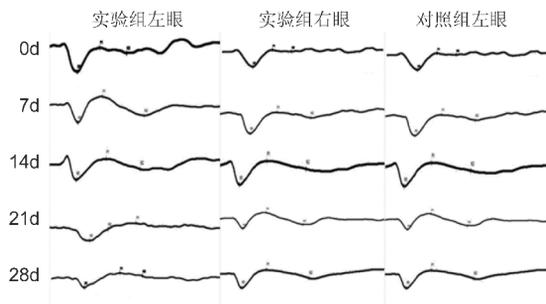


图 1 实验组与对照组大鼠 F-VEP 的波形变化。

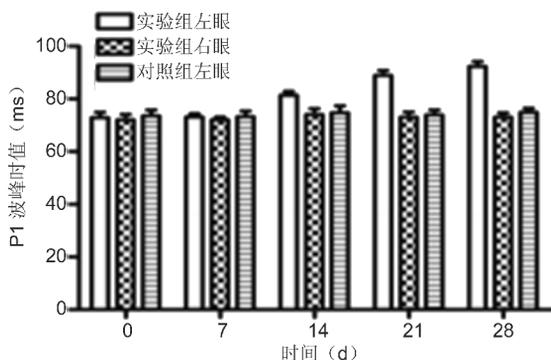


图 2 实验组与对照组大鼠 P1 波峰时值变化。

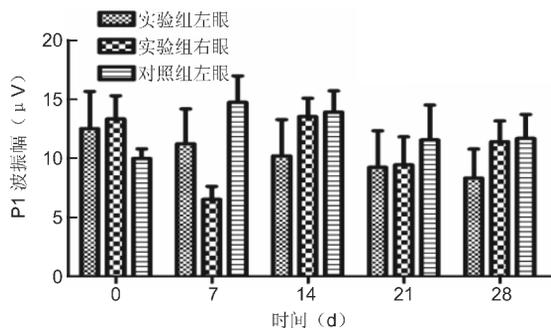


图 3 实验组与对照组大鼠 P1 波振幅值变化。

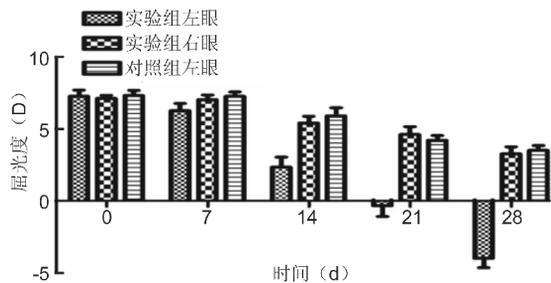


图 4 实验组与对照组大鼠屈光度变化比较。

是否成模需要 VEP 及验光等检测手段, 实验操作难度较大, 死亡率高, 且重复性差。

本实验的模型选用较易获得的 SD 大鼠为建模对象, 品系及来源稳定, 是科学研究常用的实验动物, 质量控制

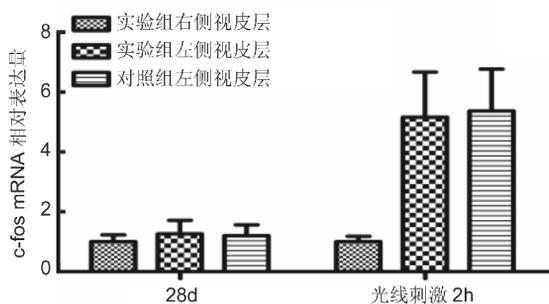


图5 c-fos mRNA在大鼠视皮层的相对表达量。

较为容易。近年来对于异常视觉环境的模型建立多用大鼠来进行相关研究,对于屈光参差这种异常视觉环境模型的建立常用模型是猫单眼慢性阿托品化,用大鼠建立单眼阿托品化后屈光参差模型未见报道。本实验将处于视觉发育关键期内的单眼慢性阿托品化后,长期麻痹睫状肌,产生屈光系统的球面差、色相差和屈光间质的光散射,导致屈光参差的形成。本实验结果显示,单眼阿托品化后21d大鼠的P1波峰时值出现延长直至点药后的28d,P1波峰时值在某一稳定水平波动。研究证实,大鼠的F-VEP测量结果变异性和波动性较大,存在个体差异,本实验在操作过程中通过统一测量时间、保证室内温度恒定适宜、严格控制环境照度等减小环境因素的影响,但大鼠F-VEP的振幅结果仍然存在较大的变异性,而P1峰时值较为稳定,重复测量变异性较小。

对于大鼠检验验光的结果也表明,其度数向近视“漂移”,与实验组的右眼形成明显的屈光参差。所以,在判定屈光参差模型成立的指标上,与猫单眼慢性阿托品化后形成的屈光参差模型一致,从实验结果来看,与其趋势一致,且趋势相同。大鼠视觉发育关键期内单眼慢性阿托品化可制备异常视觉环境下屈光参差的模型。c-fos是一种即刻早期基因,有研究表明,c-fos的表达和突触的发育及可塑性密切相关^[7]。此外,c-fos也常用于观察学习、疼痛、听觉等脑内兴奋性变化的研究中^[8]。c-fos在视觉发育过程中的表达呈现阶段性:在视觉发育关键期开始时,c-fos mRNA表达显著升高,但在视觉发育关键期结束后,c-fos mRNA降低到一个基线水平^[9]。本实验取造模成功后大鼠视皮层脑组织检测c-fos表达显示,实验眼所对应的的视皮层中c-fos mRNA表达有下降趋势,但与正常眼所对应的视皮层c-fos mRNA的表达无明显差异。c-fos作为一个即刻早期基因,它能反映出神经元对外界刺激的

一个反应。既往研究发现,即使是在视觉发育关键期后,给予一个短暂的视觉刺激,正常视皮层会表现出快速的c-fos mRNA表达的升高,此指标可以作为检测神经元传递和活动的指标^[10]。本实验将造模成功的大鼠于暗室饲养2d后给予光刺激发现,对照组c-fos mRNA表达是阿托品眼的5倍,这提示单眼慢性阿托品所造成的异常视觉环境可能导致视皮层神经元发育障碍,最终导致视皮层的神经元传递和活动能力下降。结合本实验F-VEP的结果,P1波在点药后21d峰时值延长,更能表明神经元的功能较差。

综上,大鼠单眼慢性阿托品化后第21d,F-VEP的P1波峰时值延长并形成屈光参差性弱视,且c-fos进一步验证了单眼慢性阿托品所造成的异常视觉环境可能导致视皮层神经元发育障碍,最终导致视皮层的神经元传递和活动能力下降。随着研究的进一步深入,单眼慢性阿托品所造成的异常视觉环境对视皮层神经元的作用会进一步完善。

参考文献

- Birch EE. Amblyopia and binocular vision. *Prog Retin Eye Res* 2013; 33:67-84
- Hooks BM, Chen C. Critical periods in the visual system; changing views for a model of experience-dependent plasticity. *Neuron* 2007;56(2):312-326
- Desantis D. Amblyopia. *Pediatr Clin North Am* 2014;61(3):505-518
- Stewart CE, Moseley MJ, Fielder AR. Amblyopia therapy: an update. *Strabismus* 2011;19(3):91-98
- Kanonidou E. Amblyopia; a mini review of the literature. *Int Ophthalmol* 2011;31(3):249-256
- Barrett BT, Bradley A, Candy TR. The relationship between anisometropia and amblyopia. *Prog Retin Eye Res* 2013;36:120-158
- Calza A, Florenzano F, Pellegrini D, et al. Time-dependent activation of c-fos in limbic brain areas by ocular administration of nerve growth factor in adult rats. *J Ocul Pharmacol Ther* 2011;27(3):209-218
- Kudo K, Takahashi T, Suzuki S. The changes of c-Fos expression by motor cortex stimulation in the deafferentation pain model. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014;54(7):537-544
- Mccormack MA, Rosen KM, Villa-Komaroff L, et al. Changes in immediate early gene expression during postnatal development of cat cortex and cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;12(1-3):215-223
- Rosen KM, Mccormack MA, Villa-Komaroff L, et al. Brief visual experience induces immediate early gene expression in the cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(12):5437-5441