

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.04.002
文章编号: 1005-8982 (2020) 04-0010-06

血管活性肠肽在单眼视觉剥夺性弱视幼猫 外侧膝状体中的表达*

李博, 尹曦敏, 王星, 杨丽源, 陶佳, 邹云春

(川北医学院附属医院 眼科, 四川 南充 637100)

摘要: 目的 比较视觉剥夺性弱视幼猫和正常幼猫外侧膝状体中血管活性肠肽(VIP)的表达差异, 探讨外侧膝状体中VIP在弱视发病中的意义。**方法** 健康3周龄幼猫30只, 排除屈光介质混浊及眼底异常。随机分为对照组和剥夺组, 每组15只, 均饲养在光照充足环境中。麻醉剥夺组幼猫后, 予以黑色不透光眼罩遮盖右眼。定期行图形视觉诱发电位(PVEP)检测。6周龄时经PVEP检测弱视模型复制成功后, 根据猫脑Sinder立体定位图, 切取对照组及剥夺组幼猫的右侧外侧膝状体, 分别行VIP免疫组织化学和VIP mRNA原位杂交。利用数据分析软件统计阳性细胞数和阳性细胞数平均光密度值。**结果** 6周龄时, 剥夺组右眼P₁₀₀波潜伏期较对照组右眼和剥夺组左眼延长($P < 0.05$), 而振幅降低($P < 0.05$)。剥夺组VIP免疫组织化学和VIP mRNA原位杂交的阳性细胞数及阳性细胞平均光密度值降低($P < 0.05$)。**结论** 视觉剥夺导致外侧膝状体中VIP表达下降, VIP减少又影响外侧膝状体中神经元功能的正常表达, 表明VIP在视觉发育中有重要作用。

关键词: 血管活性肠肽; 弱视; 膝状体

中图分类号: R774.7

文献标识码: A

Expression of vasoactive intestinal peptide in the lateral geniculate body of kittens with monocular deprivation amblyopia*

Bo Li, Xi-min Yin, Xing Wang, Li-yuan Yang, Jia Tao, Yun-chun Zou

(Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637100, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the lateral geniculate corpus in the pathogenesis of amblyopia. **Method** Thirty healthy 3-week-old domestic cats that had excluded turbidity of the refractive medium and abnormal fundus were randomly divided into normal control group (15 rats) and monocular deprivation group (15 rats), and were housed in a well-lit environment. After the kittens in monocular deprivation group was anesthetized, the right eye was covered with a black eyepatch, and the regular pattern visual evoked potential (PVEP) detection was performed. The use of PVEP to detect whether the amblyopia model was successfully established was at 6 weeks of age in kittens. The right lateral geniculate bodies of the control group and the deprivation group were excised according to the Sinder stereotactic map of the cat brain, and VIP immunohistochemistry and VIP mRNA in situ hybridization were performed respectively. The average optical density values of positive cells and the number of positive cells were counted using data analysis software. **Result** At 6 weeks of age in kittens, the P₁₀₀ wave latency of the right eye of monocular deprivation group was longer than that

收稿日期: 2019-08-21

* 基金项目: 四川省科技计划项目 (No: 2015JY0263); 四川省教育厅 2013 年度科研项目 (No: 13ZA0215)

[通信作者] 邹云春, E-mail: zychun03@163.com; Tel: 15881774124

of the right eye of the control group ($P < 0.05$), while the amplitude decreased ($P < 0.05$). The number of positive cells and the average optical density of positive cells obtained by VIP immunohistochemistry and VIP mRNA in situ hybridization were decreased in monocular deprivation group ($P < 0.05$). **Conclusion** Visual deprivation amblyopia leads to a decrease in the expression of VIP in the lateral geniculate body, and the reduction of VIP affects the normal functional expression of neurons in the lateral geniculate body, which proves that VIP plays an important role in visual development.

keywords: vasoactive intestinal peptide; amblyopia; geniculate bodies

弱视是造成全世界儿童视力下降的主要疾病之一。近些年来,随着分子生物学、神经生物学等多学科在弱视研究上的广泛应用,其发病机制得到进一步揭示。目前,已知弱视的发生、发展主要与视觉神经系统(主要包括视网膜、外侧膝状体及视皮层)的异常改变紧密相关。弱视患者的视网膜和视皮层中多种神经递质的含量改变,如神经生长因子、脑源性神经营养因子、营养神经素及多巴胺等。血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)作为一种神经递质,由28个氨基酸残基组成,属于分泌素-胰高血糖素家族,广泛分布于中枢神经和肠神经系统中,随后被发现也存在外侧膝状体中^[1]。早前有研究表明,视觉剥夺性弱视幼猫视皮层17区的VIP含量减少,但在外侧膝状体中的变化还未探究^[2]。本实验通过观察视觉剥夺性弱视幼猫外侧膝状体中VIP的表达,探讨VIP对视觉发育的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康3周龄幼猫30只(由川北医学院实验动物中心提供),雌雄、毛色不分,体重约290~360g。排除屈光介质混浊及眼底异常,经检测所有幼猫屈光度约+1.0~+2.0D。饲养在光照充足环境中,室内温度维持在(27±1)℃。5周龄前幼猫不能自主摄取固态食物,每日定时喂养猫奶粉、饮用水共8次。5周龄后保持室内存放充足食物及饮用水。本研究通过川北医学院实验动物伦理委员会批准并接受全程监督。

1.1.2 主要试剂及仪器 柠檬酸(pH=6.0)抗原修复液(武汉Servicebio公司),VIP抗体(美国Fitzgerald公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(武汉Servicebio公司),免疫组织化学试剂盒DAB显色剂(武汉Servicebio公司),焦碳酸二乙酯(美国Amresco公司),兔抗地高辛抗体(美国Jackson公司),探针序列,正向引物:5'-DIG-

TGCATCCGAGTGGCGCTTGATTGG-DIG-3'; 反向引物:5'-DIG-CTGGTTCCATCTTTGTACC TTGCCAAGTAGTG-DIG-3'(武汉Servicebio公司),动物针电极(北京高视远望科技有限责任公司),视觉电生理仪(重庆国特医疗设备有限公司),掌上离心机(武汉Servicebio公司),原位杂交用离心管(美国Axygen公司),成像系统(日本Nikon公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制 30只幼猫随机分为对照组和剥夺组,每组15只。用戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉剥夺组幼猫后,于右眼眶周边对称做4个皮肤固定缝线,每个缝线上做1个小套环(遮盖过程中套环一直存在),使用丝线穿过小套环,再穿过黑色眼罩的4个小孔,打结固定眼罩,保证眼罩不压迫眼球。每周剪断丝线行图形视觉诱发电位(pattern visual evoked potential, PVEP)检测。对所有幼猫行PVEP检测时,3根动物针电极分别刺入前额正中,双耳连线枕部正中及耳尖背部的皮下。相应镜片矫正屈光,调整头部位使视网膜后极部中央与屏幕中央在同一水平线上,PVEP采用棋盘格反转刺激,模式选用0.3cpd,时间频率为1Hz,叠加64次,分别测量剥夺组剥夺眼和未剥夺眼、对照组右眼。6周龄时,通过比较PVEP的P₁₀₀波潜伏期及振幅,证实视觉剥夺组中单眼弱视形成。用戊巴比妥钠深度麻醉剥夺组和对照组幼猫,分离出右侧外侧膝状体,石蜡包埋切片,行免疫组织化学及原位杂交实验研究。

1.2.2 实验方法 免疫组织化学:石蜡切片,常规脱蜡,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,分别加入一抗、二抗,DAB显色,复染细胞核,脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析阳性细胞和阳性细胞平均光密度值。原位杂交:石蜡切片,常规脱蜡,消化,阻断内源性过氧化物酶,预杂交,杂交,杂交后洗涤,滴加封闭液,滴加兔抗地高辛抗体,DAB显色,复染细胞核,脱水封片,显微镜镜检,图像采集分析阳性细

胞和阳性细胞平均光密度值。

1.3 统计学方法

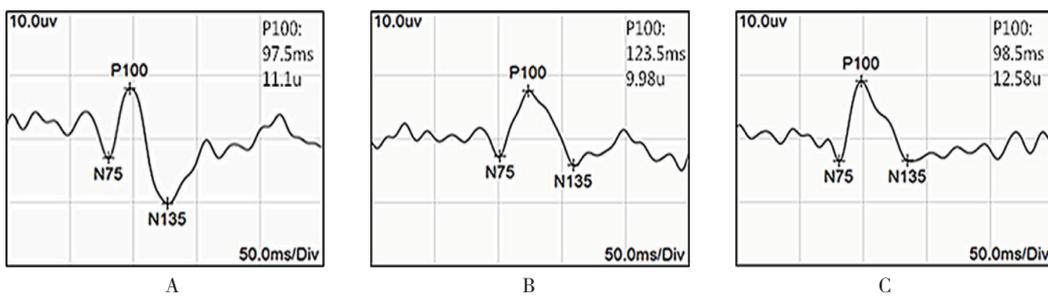
数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 进一步的两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PVEP 结果

对照组幼猫随着年龄增加, P₁₀₀ 波潜伏期逐渐缩

短, 振幅逐渐提高。测试时控制电阻, 可见各组典型 PVEP 波形 (见图 1)。6 周龄时, 对照组右眼、剥夺组右眼和剥夺组左眼潜伏期比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 剥夺组右眼较对照组右眼及剥夺组左眼的潜伏期延长 ($P < 0.05$)。对照组右眼、剥夺组右眼和剥夺组左眼振幅比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 剥夺组右眼较对照组右眼及剥夺组左眼振幅降低 ($P < 0.05$)。在进行单眼遮盖 3 周后 (即 6 周龄时), 剥夺组幼猫右眼已形成单眼视觉剥夺性弱视。见表 1。

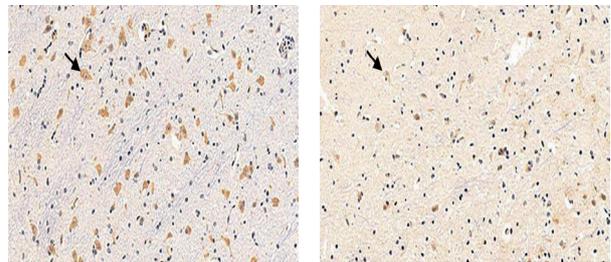


A: 对照组右眼; B: 剥夺组右眼; C: 剥夺组左眼。

图 1 各组幼猫 PVEP 波形图

表 1 各组 P₁₀₀ 波潜伏期和振幅比较 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	P ₁₀₀ 波潜伏期 /ms	P ₁₀₀ 振幅 /u
对照组右眼	96.89 ± 4.48	12.39 ± 1.98
剥夺组右眼	121.31 ± 8.44	9.63 ± 0.84
剥夺组左眼	99.70 ± 2.29	12.09 ± 1.05
<i>F</i> 值	38.872	8.428
<i>P</i> 值	0.000	0.003



对照组 剥夺组

图 2 6 周龄外侧膝状体神经元中 VIP 蛋白的表达 (DAB × 200)

表 2 两组外侧膝状体中 VIP 免疫组织化学结果比较 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	阳性细胞数 / 个	光密度值
对照组	121.78 ± 13.32	4 116.47 ± 1 122.24
剥夺组	53.44 ± 40.98	2 138.07 ± 1 765.78
<i>t</i> 值	4.758	2.837
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 免疫组织化学结果

对每张切片随机选择 5 个视野进行统计分析。可见两组幼猫外侧膝状体神经元中 VIP 呈阳性表达, 位于细胞浆内, 呈棕黄色 - 淡黄色, 细胞核呈蓝色。对照组大部分呈强阳性, 阳性细胞数较多, 剥夺组大部分呈中等阳性到弱阳性, 阳性细胞数较少, 可见两组 VIP 蛋白表达存在差异 (见图 2)。两组阳性细胞数比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 剥夺组较对照组少。两组阳性细胞平均光密度值比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 剥夺组较对照组低。视觉剥夺性弱视幼猫外侧膝状体中 VIP 蛋白表达较正常幼猫降低。见表 2。

2.3 原位杂交结果

对每张切片随机选择 5 个视野进行统计分析。两组幼猫外侧膝状体神经元中均有 VIP mRNA 阳性表

达, 位于细胞浆内, 呈棕黄色 - 淡黄色, 同时与蓝染的细胞核重叠。对照组大部分呈强阳性, 阳性细胞数较多, 剥夺组大部分呈中等阳性到弱阳性, 阳性细胞数较少, 可见两组 VIP mRNA 表达存在差异 (见图 3)。两组阳性细胞数比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 剥夺组较对照组少。两组平均光密度值比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 剥夺组较对照组低见表 3。视觉剥夺性弱视幼猫外侧膝状体中 VIPmRNA 转录水平较正常幼猫下降。见表 3。

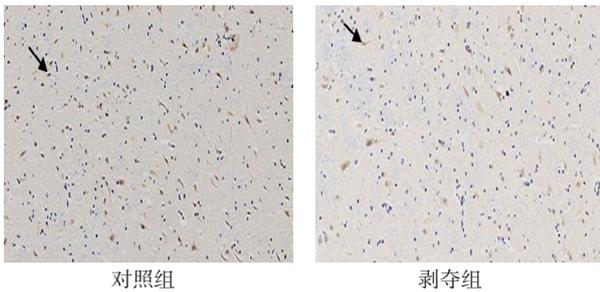


图 3 6 周龄外侧膝状体神经元中 VIP mRNA 的表达 (DAB × 200)

表 3 两组外侧膝状体中 VIP 原位杂交结果比较 (n = 15, $\bar{x} \pm s$)

组别	阳性细胞数 / 个	光密度值
对照组	61.00 ± 20.30	3 061.76 ± 1 595.64
剥夺组	35.00 ± 13.40	1 307.08 ± 623.24
<i>t</i> 值	3.024	2.897
<i>P</i> 值	0.009	0.012

3 讨论

本实验通过 PEVP 来确定剥夺组弱视的形成, 然后用免疫组织化学和原位杂交来检测 VIP 在外侧膝状体中的表达变化。通过实验发现, 幼猫在视觉发育敏感期内, 由于双眼视觉信息的不对等输入, 导致外侧膝状体中 VIP 表达降低; 而 VIP 表达下降又对外侧膝状体正常表达的生理功能造成负面影响, 从而影响视觉发育, 促进弱视的发生、发展。

VIP 最早于 1970 年由猪小肠的甲醇抽提液中经过分离得到, 其具有血管舒张活性, 最初被认为是一种候选胃肠激素。后来发现其广泛分布于大脑皮质、眼内组织中^[3-6], 随后证明在外侧膝状体中也广泛存

在^[1]。VIP 主要作为神经递质起作用^[7], 能够促进神经细胞的有丝分裂, 增加神经细胞突起的数量^[8]; 同时促进前体细胞向神经元分化, 提高成熟神经元的数量^[9]。VIP 还影响血浆中胰多肽、脂联素及胰岛素等代谢调节激素的表达水平, 进而影响细胞代谢^[10]。以往学者认为, 外侧膝状体仅仅作作为视网膜神经传递的接受体, 将来自视网膜的神经纤维束换能后传递至视皮层, 其并不参与视觉功能的编码, 视皮层才是弱视主要的神经系统受损部位。但后来发现外侧膝状体并不是单纯的神经传导中继站, 其参与方向性等精细视觉的形成^[11]。在单眼剥夺性弱视中, 与剥夺眼同侧的外侧膝状体被观察到存在神经元活动减弱^[12]和神经元萎缩^[13]的现象, 同时经弱视侧的外侧膝状体投射到视皮层 17 区、18 区的神经元体积也减小^[14]。而且单眼剥夺性弱视中, 剥夺侧的外侧膝状体中细胞大小的改变与同侧视皮层第 4 层中眼优势柱宽度的减少密切相关^[15]。有研究发现, 外侧膝状体与视皮层一样, 在成年动物中仍然具有经验依赖的可塑性, 其部分功能可以在弱视后得以恢复, 提示外侧膝状体在弱视治疗中也应得到重点关注^[16-18]。可见外侧膝状体在视觉神经系统的发育过程中不仅有神经传导作用, 还有功能编辑作用。研究异常视觉体验对外侧膝状体中 VIP 表达的影响可以论证 VIP 在视觉发育中扮演的重要地位。

对于幼猫, 视觉剥夺的影响程度在出生后 1 个月达到峰值, 到 3 个月龄时, 视觉剥夺对视觉发育的影响几乎为零^[19]。本实验在视觉发育关键期内进行单眼视觉剥夺, 通过 PVEP 检测弱视的形成, 这与目前普遍认为的弱视形成机制和诊断方式相一致。对照组右眼、剥夺组左眼与剥夺组右眼的 P₁₀₀ 波潜伏期和振幅比较有差异, 说明实验组单眼弱视已形成, 其中 P₁₀₀ 波潜伏期延长更能提示视路的传导存在问题; 同时创新性的遮盖方式降低因传统眼睑缝合而增加皮损处感染的风险, 避免定期 PVEP 检测对眼睑皮肤的反复缝合造成诸如角膜刺激、缝线断裂等影响测试的不良后果。

本文分别从蛋白和基因层面证实视觉剥夺对外侧膝状体中 VIP 表达的影响。免疫组织化学结果表明, 在幼猫视觉发育敏感期内的视觉剥夺, 使外侧膝状体接受视网膜的视觉传入信号减弱, 致使外侧膝状体中表达 VIP 的神经元得不到足够的视觉刺激信号, 导致神经元的功能发育异常, 蛋白表达能力降低。原

位杂交实验结果则证明,视觉剥夺还影响外侧膝状体内源性 VIP 的产生,使神经元的细胞器编码、加工蛋白质的能力减弱。已知 VIP 参与细胞内一系列磷酸化偶联反应,与受体结合后,通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine mono phosphate, cAMP)依赖的蛋白激酶途径,促进葡萄糖的磷酸化和糖原分解,增强神经元的营养代谢。VIP 还可以促进腺苷酸环化酶的活化从而增加 cAMP 的作用^[20]。在大脑皮层中, VIP 和去甲肾上腺素相互协同,刺激皮层中 cAMP 的合成;同时 VIP 还加速皮层神经元放电^[21]。cAMP 作为细胞内重要的第二信使,是参与细胞内生物学功能和物质代谢的重要物质,其含量降低会影响细胞内磷酸化等多种胞内活动;同时 VIP 缺乏导致视交叉上核神经元活动节律紊乱^[22]。由此推测,视觉剥夺通过影响外侧膝状体中神经元的发育,致使 VIP 表达下降,而 VIP 减少又使神经元的信号通路发生障碍,细胞内的能量代谢、糖代谢等活动均受到影响;同时神经元间的电传导受阻。所以 VIP 表达下降会导致外侧膝状体神经元功能发育不良,而代谢异常的神经元又影响外侧膝状体功能表达,从而促进弱视的形成。

综上所述,弱视的神经系统病理改变也发生在外侧膝状体;VIP 在视觉发育中扮演着不可或缺的角色;异常视觉体验导致外侧膝状体中 VIP 表达下降是弱视的重要发病机制之一。此结果为下一步对 VIP 外源性干预视觉剥夺性弱视幼猫,探索 VIP 治疗弱视的药理效果提供实验基础。由于方法和实验条件的限制,本实验只研究 VIP 在外侧膝状体中表达的变化,而外侧膝状体中神经元的微观改变有待进一步观察。研究神经元相关细胞器的变化可以进一步明确 VIP 对弱视形成的影响。

参 考 文 献:

- [1] OGAWA-MEGURO R, ITOH K, MIZUNO N. Substance P-, vasoactive intestinal polypeptide-like, and cholecystinin-like immunoreactive fiber projections from the superior colliculus to the dorsal lateral geniculate-nucleus in the rat[J]. *Experimental brain research*, 1992, 89(1): 59-66.
- [2] 王海燕, 张东杲. VIP 在剥夺性弱视猫视皮层 17 区的定位及作用[J]. *眼科新进展*, 2000, 20(2): 146-147.
- [3] FUXE K, HÖKFELT T, SAID S I, et al. Vasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex[J]. *Neuroscience Letters*, 1977, 5(5): 241-246.
- [4] LORÉN I, EMSON P C, FAHRENKRUG J, et al. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain[J]. *Neuroscience*, 1953, 4(12): 1953-1976.
- [5] SAID S I, ROSENBERG R N. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous[J]. *Science*, 1976, 192(4242): 907-915.
- [6] UDDMAN R, ALUMETS J, EHINGER B, et al. Vasoactive intestinal peptide nerves in ocular and orbital structures of the cat[J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1980, 19(8): 878-885.
- [7] TROGER J, KIESELBACH G, TEUCHNER B, et al. Peptidergic nerves in the eye, their source and potential pathophysiological relevance[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 53(1): 39-62.
- [8] 许家军, 路长林, 陈尔瑜. 神经肽的神经营养作用[J]. *生理科学进展*, 1997, 28(3), 280-282.
- [9] BRENNEMAN D E, EIDEN L E. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(4): 1159-1162.
- [10] VU J P, LARAUCHE M, FLORES M, et al. Regulation of appetite, body composition, and metabolic hormones by vasoactive intestinal polypeptide (VIP)[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(2): 377-87.
- [11] PISCOPO D M, EL-DANAF R N, HUBERMAN A D, et al. Diverse visual features encoded in mouse lateral geniculate nucleus[J]. *Journal of Neuroscience*, 2013, 33(11): 4642-4656.
- [12] WIESEL T N, HUBEL D H. Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate[J]. *Journal of Neurophysiology*, 1963, 26(6): 978-993.
- [13] TAKAHATA T, PATEL NB, BALARAM P, et al. Long-term histological changes in the macaque primary visual cortex and the lateral geniculate nucleus after monocular deprivation produced by early restricted retinal lesions and diffuser induced form deprivation[J]. *The Journal of comparative neurology*, 2018, 526(18): 2955-2972.
- [14] GAREY L J, BLAKEMORE C. The effects of monocular deprivation on different neuronal classes in the lateral geniculate nucleus of the cat[J]. *Experimental Brain Research*, 1977, 28(3/4): 259-337.
- [15] SHATZ C J, STRYKER M P. Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation[J]. *The Journal of Physiology Online*, 1978, 281(1): 267-283.
- [16] JAEPEL J, HÜBENER M, BONHOEFFER T, et al. Lateral geniculate neurons projecting to primary visual cortex show ocular dominance plasticity in adult mice[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(12): 1708-1714.
- [17] DUFFY K R, FONG M F, MITCHELL D E, et al. Recovery from the anatomical effects of long-term monocular deprivation in cat lateral geniculate nucleus[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2018, 526(2): 310-323.

- [18] ROSE T, BONHOEFFER T. Experience-dependent plasticity in the lateral geniculate nucleus[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2018, 53: 22-28.
- [19] DUFFY K R, LINGLEY A J, HOLMAN K D, et al. Susceptibility to monocular deprivation following immersion in darkness either late into or beyond the critical period[J]. *J Comp Neurol*, 2016, 524(13): 2643-2653.
- [20] QUIK M, IVERSEN L L, BLOOM S R. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1978, 27(18): 2209-2222.
- [21] FERRON A, SIGGINS G R, BLOOM F E. Vasoactive intestinal polypeptide acts synergistically with norepinephrine to depress spontaneous discharge rate in cerebral cortical neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(24): 8810-8812.
- [22] BROWN T M, COLWELL C S, WASCHEK J A, et al. Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice[J]. *J Neurophysiol*, 2007, 97(3): 2553-2558.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 李博, 尹曦敏, 王星, 等. 血管活性肠肽在单眼视觉剥夺性弱视幼猫外侧膝状体中的表达 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(4): 10-15.