

引文格式:林玲,任京力.胆碱能神经元在闪光刺激增强大鼠初级视皮层可塑性中的作用[J].眼科新进展,2015,35(3):231-234. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0062

【实验研究】

# 胆碱能神经元在闪光刺激增强大鼠初级视皮层可塑性中的作用<sup>△</sup>

林玲 任京力

作者简介:林玲,女,1981年3月出生,湖北房县人,硕士,讲师,主要从事生理学的教学及科研工作。E-mail:linlingshengli@126.com

About LIN Ling: Female, born in March, 1981. Master degree. E-mail: linlingshengli@126.com

收稿日期:2014-04-22  
修回日期:2014-07-20  
本文编辑:付中静

△基金项目:漯河医学高等专科学校2012校级自然科学研究资助项目(编号:2010S07)

作者单位:462002 河南省漯河市,漯河医学高等专科学校生理教研室(林玲);462002 河南省漯河市,漯河医学高等专科学校药理教研室(任京力)

Received date: Apr 22, 2014  
Accepted date: Jul 20, 2014  
Foundation item: Natural Science Research Foundation of Luohe Medical College(No:2010S07)

From the Department, Physiology of Luohe Medical College (LIN Ling), Luohe 462002, Henan Province, China; Department of Pharmacology, Luohe Medical College (REN Jing-Li), Luohe 462002, Henan Province, China

both significantly increased in agonist group (all  $P < 0.05$ ), while decreased in blocker group (all  $P < 0.05$ ). The activity of AchE in agonist group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) and increased in blocker group ( $P < 0.05$ ) compared with the control group. **Conclusion** High-frequency stimulation can make the LTP-like reaction in visual evoked potential. Cholinergic neurons and neurotransmitters contribute to the plasticity induced by flash stimulation in primary visual cortex.

【关键词】 初级视皮层;视觉诱发电位;M受体;胆碱能神经元;胆碱乙酰转移酶;LTP

【摘要】 **目的** 研究胆碱能神经元及递质在大鼠初级视皮层可塑性中的作用。**方法** 36只(36眼)成年SD大鼠随机分为3组:对照组、激动剂组、阻断剂组,每组各12只(12眼)。各组大鼠麻醉、固定后在初级视皮层(V1区)植入记录电极和玻璃微电极、在额叶植入参考电极,术后第7、8、9天于固定时间行紫光闪光刺激1h,第10天行微量注射M受体激动剂卡巴胆碱和M受体阻断剂东莨菪碱,注射后在相同闪光刺激条件下给予一串高频刺激,记录各组高频刺激前后V1区的视觉诱发电位,分析各组视觉诱发电位的幅值和峰时值的变化。检测不同组别大鼠在强直性闪光刺激后初级视皮层中胆碱乙酰转移酶(ChAT)、胆碱酯酶(AchE)活性,Western blot检测不同组别大鼠初级视皮层ChAT含量。**结果** 对照组和激动剂组在接受强直性闪光刺激后视觉诱发电位幅值较之前有显著性升高(均为 $P < 0.01$ ),且峰时值变短(均为 $P < 0.01$ ),阻断剂组幅值和峰时值在刺激前后差异无统计学意义(均为 $P > 0.05$ )。在强直性闪光刺激后,与对照组相比,激动剂组幅值升高( $P < 0.01$ )、峰时值变短( $P < 0.01$ ),阻断剂组幅值降低( $P < 0.01$ )、峰时值变长( $P < 0.01$ )。对不同组别大鼠进行强直性闪光刺激后发现,与对照组相比,激动剂组的ChAT活性明显升高( $P < 0.05$ )、AchE活性降低( $P < 0.05$ );而阻断剂组的ChAT活性明显降低( $P < 0.05$ )、AchE活性升高( $P < 0.05$ );阻断剂组与激动剂组ChAT、AchE活性差异显著(均为 $P < 0.05$ )。ChAT蛋白的表达经Western blot分析发现,与对照组比较,激动剂组有显著性升高( $P < 0.05$ ),阻断剂组有显著性降低( $P < 0.05$ ),阻断剂与激动剂组差异显著( $P < 0.05$ )。

0.05)。结论 强直性闪光刺激能使大鼠闪光视觉诱发电位呈现 LTP 样反应,胆碱能神经元及递质系统参与了闪光刺激致大鼠初级视皮层的可塑性变化。

人和哺乳动物在出生以后,视觉系统能够根据环境的刺激改变原有的突触结构和神经联系,称之为突触可塑性。以往认为,视皮层的可塑性只出现在幼年时期,到成年以后逐渐终止<sup>[1]</sup>,近年的研究发现,成年以后的视皮层仍然具有可塑性<sup>[2-3]</sup>,视觉可塑性可能存在整个生命过程中。关于视觉可塑性的发生机制一直是神经科学研究的热点问题,有研究表明,经典的神经递质乙酰胆碱(Ach)对海马 LTP 有易化作用<sup>[4-5]</sup>,新皮层内胆碱能通路功能降低可能与老年痴呆患者学习记忆能力降低有关<sup>[6]</sup>。目前关于胆碱能神经元及其递质系统在突触可塑性中的作用在学习记忆方面研究相对较多,但对视觉可塑性的作用研究相对较少,为进一步明确视皮层可塑性的机制,本实验在闪光刺激的基础上,结合 M 受体激动剂卡巴胆碱和 M 受体阻断剂东莨菪碱,观察对大鼠初级视皮层闪光视觉诱发电位(flashing visual evoked potential, F-VEP)的影响,检测强直性闪光刺激后胆碱乙酰转移酶(ChAT)和胆碱酯酶(AchE)活性的变化,结合初级视皮层 ChAT 含量的检测,探讨胆碱能神经元及其递质系统在初级视皮层可塑性中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 健康成年 SD 大鼠 36 只(河南省实验动物中心提供),体质量 180 ~ 220 g,雌雄不拘。实验动物分 3 组:对照组、激动剂组、阻断剂组,每组各 12 只。

**1.2 仪器与试剂** 大鼠脑立体定位仪、BL-420F 生物信号分析系统(成都泰盟科技有限公司),高速冷冻离心机(德国贝克曼公司),Power-pac200 电泳仪、Trans-Blot 电泳湿转仪(美国 BIO-RAD 公司),anti-ChAT 抗体(Sigma 公司,USA),M 受体激动剂卡巴胆碱、M 受体阻断剂东莨菪碱、chAT 和 AchE 检测试剂盒、 $\beta$ -actin 均购于北京博奥森生物公司,细胞裂解液及 S-P 试剂盒均购于北京中杉试剂公司。

**1.3 动物手术** 100 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠(0.003 ~ 0.004 mL  $\cdot$  g<sup>-1</sup>),固定于立体定位仪上,暴露颅骨,参照大鼠脑解剖图谱定位初级视皮层 V1 区(前囟向后 7.0 mm,左旁 2.0 mm),分别将记录电极置于 V1 区,参考电极 E1(前囟向前 2.0 mm,右旁 2.0 mm)固定于额叶,两者都以 E2(前囟向前 2.0 mm,左旁 2.0 mm)为参考,各组在 V1 区(与记录电极同侧)植入玻璃微电极作微量注射,牙托粉固定。术后肌注庆大霉素,12 h 亮/12 h 暗环境饲养,充足食物和水供应。

**1.4 闪光刺激** 将已植入电极大鼠置于有机玻璃鼠箱中(60 cm  $\times$  60 cm  $\times$  60 cm),在鼠箱侧壁安装发光二极管(LED,由郑州大学电气工程学院设计提

供)。于术后第 7、8、9 天于固定时间(下午 15:00)给予大鼠紫光闪光刺激 1 h,刺激前经 0.5 h 的暗适应,刺激参数:正电压刺激,串单刺激,叠加 60 次,强度 8.5 V,波宽 9 ms。

**1.5 脑内药物微量注射及脑电信号的采集** 于术后第 10 天激动剂组经微电极注入卡巴胆碱(50  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),阻断剂组注入东莨菪碱(20  $\mu$ g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>),剂量均为 1  $\mu$ L,对照组注入等量的生理盐水。各组大鼠在注射完相应药物后 30 min,在相同闪光刺激条件下,给予一串高频闪光刺激(100 Hz,5 s),同步记录高频刺激前后的 F-VEP,信号采集:高频滤波 10 Hz,时间常数 0.2 s,低通滤波 15 Hz(多道记录仪导联)。

**1.6 脑匀浆 ChAT、AchE 活力的测定** 闪光刺激完成后迅速处死大鼠,在冰盘上断头取脑,取右侧脑组织分离出初级视皮层 V1 区及周围组织用冰生理盐水冲洗,除去血液,滤纸吸干,称脑质量,在冰浴下用玻璃匀浆器研磨加冰生理盐水制成 100 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 组织匀浆,用比色法测定脑组织中 ChAT、AchE 的活力,所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

**1.7 Western blot 分析** 3 组大鼠在腹腔麻醉后快速取出全脑,冰浴分离出初级视皮层,1:10 匀浆,BCA 蛋白定量试剂盒(Novagen)测定蛋白浓度。调节各组蛋白浓度为 110 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,加 2  $\times$  SDS 上样缓冲液,99  $^{\circ}$ C 变性 5 min;每孔中加 10  $\mu$ L 样品,Tris-SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳电转移到硝酸纤维素膜上,用脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(anti-ChAT 抗体),4  $^{\circ}$ C 过夜,倾去一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;分别加入 1:2000 羊抗兔甘油二抗,置于摇床上摇动,室温下 1 h;弃去二抗,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;ECL 发光剂暗室曝光成像、拍照,Image J 软件分析求得平均光密度值(IOD)。在强直性闪光刺激后,测定不同组别大鼠初级视皮层 ChAT 的灰度值,与  $\beta$ -actin 的灰度值对照,用此相对灰度值表示 ChAT 蛋白的表达量。

**1.8 统计学分析** 利用 SPSS 16.0 进行统计分析,正态分布数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,非正态分布数据以 M(P2.5, P97.5)表示。非正态分布的资料比较采用秩和检验,其中多组间比较采用 Kruskal-Wallis 法,组间两两比较采用 Nemenyi 法,同组间刺激前后的比较采用 Wilcoxon 配对法。正态分布的多组间资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用  $q$  检验(Newman-Keuls 法)。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 强直性闪光刺激对不同组别大鼠视皮层 V1 区 F-VEP 幅值的影响** 不同组别大鼠在接受强直性闪

光刺激后,对照组和激动剂组呈明显长时程增强(long-term potentiation, LTP)样反应,说明强直性闪光刺激能诱发大鼠初级视皮层的可塑性变化;而激动剂组的幅值明显高于阻断剂组,可能与胆碱能神经元及其递质的作用有关(图1)。

Figure 1 Changes of the amplitude of F-VEP after high frequency stimulation at V1 area in different groups 不同组别大鼠在强直性闪光刺激前后 V1 区诱发电位主波幅值的变化

2.2 同组大鼠在强直性闪光刺激前后 F-VEP 的幅值和峰时值比较 对照组和激动剂组幅值刺激后较刺激前显著升高(均为  $P < 0.01$ ),峰时值较刺激前显著变短(均为  $P < 0.01$ ),阻断剂组在接受强直性闪光刺激前后差异无统计学意义(均为  $P > 0.05$ ,见表1-表2)。

2.3 不同组别大鼠在强直性闪光刺激前后 F-VEP 的幅值和峰时值比较 在强直性闪光刺激前,3组大鼠 F-VEP 的幅值和峰时值差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ )。强直性闪光刺激后,激动剂组幅值较对照组升高( $D = 153.5, P < 0.01$ )、峰时值变短( $D = 167.1, P < 0.01$ ),阻断剂组幅值较对照组和激动剂组降低(均为  $P < 0.01$ )、峰时值变长(均为  $P < 0.01$ ,见表1-表2)。

表1 不同组别大鼠在闪光刺激前后 F-VEP 幅值比较  
Table 1 Comparison of F-VEP amplitude before and after flash stimulation in different groups of rats ( $U/\mu V$ )

Group	Before stimulation	After stimulation	T	P
Control	14.187(9.267,18.844)	21.163(11.658,28.714)	62.176	<0.01
Agonist	15.012(11.254,20.668)	24.776(12.567,32.149) *	63.981	<0.01
Blocker	15.421(10.647,19.837)	15.125(8.982,19.341) * $\Delta$	11.459	>0.05
H	3.483	10.642	-	-
P	>0.05	<0.01	-	-

Note; means comparison with control group, \*  $P < 0.01$ , means comparison with agonist group,  $\Delta P < 0.01$

2.4 不同组别大鼠在强直性闪光刺激后 ChAT 和 AchE 活性的比较 在强直性闪光刺激后,检测大鼠初级视皮层脑匀浆 ChAT 和 AchE 活性表明,与对照组相比,激动剂组的 ChAT 活性明显升高, AchE 活性降低(均为  $P < 0.05$ ,见表3),而阻断剂组的 ChAT 活性明显降低、AchE 活性升高(均为  $P < 0.05$ )。与激动剂组相比,阻断剂组 ChAT 活性明显降低, AchE

活性升高(均为  $P < 0.05$ ,见表3)。

表2 不同组别大鼠在闪光刺激前后 F-VEP 峰时值比较  
Table 2 Comparison of F-VEP peak latency before and after flash stimulation in different groups of rats ( $t/ms$ )

Group	Before stimulation	After stimulation	T	P
Control	35.915(28.426,42.773)	32.169(26.671,31.714)	61.355	<0.01
Agonist	36.894(24.681,41.744)	30.125(22.021,28.107) *	71.124	<0.01
Blocker	36.014(27.998,43.165)	36.182(28.464,42.558) * $\Delta$	26.772	>0.05
H	4.267	12.854	-	-
P	>0.05	<0.01	-	-

Note; means comparison with control group, \*  $P < 0.01$ , means comparison with agonist group,  $\Delta P < 0.01$

2.5 Western blot 分析 与对照组比较,激动剂组的 ChAT 蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ,图2),阻断剂组的 ChAT 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ )。与激动剂组相比,阻断剂组的 ChAT 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ )。

表3 不同组别大鼠在强直性闪光刺激后 ChAT 和 AchE 活性的比较  
Table 3 Comparison of the activity of ChAT and AchE after flash stimulation in different groups of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	ChAT( Activity/ $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ prot)	AchE( Activity/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ prot)
Control	8.405 $\pm$ 2.319	0.463 $\pm$ 0.038
Agonist	12.022 $\pm$ 2.057 *	0.309 $\pm$ 0.031 *
Blocker	5.236 $\pm$ 1.948 * $\Delta$	0.611 $\pm$ 0.045 * $\Delta$
F	30.972	185.310
P	0.021	0.037

Note; means comparison with control group, \*  $P < 0.05$ , means comparison with agonist group,  $\Delta P < 0.05$

Figure 2 Comparison of the expression of protein ChAT in the primary visual cortex in different groups. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the agonist group,  $\Delta P < 0.05$  不同组别大鼠初级视皮层 ChAT 蛋白表达的比较。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ,与激动剂组比较,  $\Delta P < 0.05$

3 讨论

视觉的发育是一个复杂的过程,大脑皮层能够根据视觉环境调整和改变由遗传决定的功能以及与其他神经元之间的联系,即具有视觉经验依赖的可塑性<sup>[7]</sup>。视觉发育存在关键期<sup>[8]</sup>,是指根据视觉经验调整和改变神经联系和突触结构最敏感的时期,大鼠的视觉发育关键期结束于出生后 55 d<sup>[9]</sup>,人类的视觉发

育关键期可以延长到7~8岁<sup>[10]</sup>,在关键期结束后其可塑性只是被抑制<sup>[11]</sup>,成年哺乳动物的初级视皮层神经元仍然具有可塑性<sup>[12]</sup>。ACh为兴奋性神经递质,与突触可塑性密切相关。大量研究表明,胆碱能神经元及其递质系统与中枢神经系统神经元的可塑性密切相关。研究表明,衰老后记忆相关脑区中胆碱能系统发生严重的退变,胆碱能神经元数目减少、胞体变小、突起变短、突触形成减少<sup>[11]</sup>,ChAT的活性亦减低<sup>[13-14]</sup>,甚至ACh受体表达亦发生下调<sup>[15]</sup>。

本实验室在先前研究闪光刺激对大鼠脑电活动的影响,主要选择白光和绿光,此次选择紫光,结果表明,对照组大鼠在接受一串高频闪光刺激之后,F-VEP的幅值明显升高,呈现LTP样反应,这也与先前的实验结果一致,而且我们也发现紫光比绿光能更显著改变大鼠初级视皮层的脑电活动。为进一步明确成年大鼠初级视皮层可塑性的发生机制,利用药理学手段,在初级视皮层V1区注射M受体激动剂卡巴胆碱后,F-VEP幅值升高较对照组显著( $P < 0.01$ ),峰时值明显变短( $P < 0.01$ ),可能是因为M受体激动剂卡巴胆碱使胆碱能神经元及其递质系统的活性明显增强,释放ACh增多,引起兴奋性突触传递增强,最终使得初级视皮层F-VEP的幅值升高,峰时值变短。在初级视皮层V1区注射M受体阻断剂东莨菪碱后,结果显示大鼠初级视皮层F-VEP的幅值和峰时值与强直性闪光刺激之前并无显著性差异( $P > 0.05$ )。我们认为可能与以下两个方面的因素有关:一方面,强直性闪光刺激能诱发大鼠的初级视皮层可塑性变化,呈现典型的LTP样反应,在此可塑性的形成过程中,其机制是复杂的,可能有ACh及其递质系统,也可能与其他兴奋性递质比如谷氨酸递质及其受体等有关,本实验室先前的研究就表明,AMPA受体及其GLUR2亚基参与了大鼠初级视皮层的可塑性变化<sup>[16]</sup>;另一方面,在初级视皮层注射M受体阻断剂以后,虽然阻断了ACh介导的兴奋性传递,但有其他兴奋性递质介导的兴奋性突触传递仍然在增强,所以最终阻断剂组的幅值和峰时值和刺激前相比并无显著性差异。

中枢ACh是学习记忆的重要神经递质<sup>[17]</sup>,其合成的关键酶是ChAT,ChAT为胆碱能神经元的标志酶,其含量和活性的高低体现了体内ACh的含量<sup>[18]</sup>。AChE是水解ACh的关键酶,脑内AChE活性降低可导致学习记忆活动障碍。ChAT和AChE共同维持着ACh的动态平衡,也是维持哺乳动物正常进行学习记忆的必要条件。在强直性闪光刺激后,初级视皮层脑组织匀浆中ChAT和AChE的活性检测也表明,与对照组相比,激动剂组的ChAT活性明显升高,AChE的活性降低;而阻断剂组的ChAT的活性明显降低,AChE的活性升高。Western blot实验也表

明,在强直性闪光刺激后,激动剂组的ChAT表达较对照组显著升高,而阻断剂组的ChAT的表达则较对照组显著下降,这也与初级视皮层ChAT活性检测结果一致,与电生理实验结果也是一致的。

综合以上实验结果,我们推测,中枢胆碱能神经元及递质系统参与了成年大鼠初级视皮层的可塑性过程。但视皮层的可塑性形成是一个非常复杂的过程,更详细的机理还需要更加深入的研究,这将为以后临床上相关的视觉异常比如:弱视、屈光不正等相关疾病的治疗提供一定的理论参考。

## 参考文献

- Sawtell NB, Frenkel MY, Philpot BD, Nakazawa K, Toneyawa S, Bear MF. NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity in adult visual cortex [J]. *Neuron*, 2003, 38(6): 977-985.
- Vachon P, Voss P, Lassonde M, Leroux JM, Mensour B, Beaudoin G, et al. Reorganization of the auditory, visual and multimodal areas in early deaf individuals [J]. *Neuroscience*, 2013, 15(245): 50-60.
- Buckley KA, Tobey EA. Cross-modal plasticity and speech perception in pre-and postlingually deaf cochlear implant users [J]. *Ear Hear*, 2011, 32(1): 2-15.
- Drever BD, Riedel G, Platt B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav [J]. Brain Res*, 2011, 221(2): 505-514.
- Gu Z, Yakel JL. Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity [J]. *Neuron*, 2011, 71(1): 155-165.
- Ahmed HH, Estefan SF, Mohamd EM, Farrag Ael-R, Salah RS. Does melatonin ameliorate neurochemical changes associated with Alzheimer's disease in ovariectomized rat model [J]? *Indian J Clin Biochem*, 2013, 28(4): 381-389.
- Karmarkar UR, Dan Y. Experience-dependent plasticity in adult visual cortex [J]. *Neuron*, 2006, 52(4): 577-585.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. Critical periods during sensory development [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10(1): 138-145.
- Montandon G, Homer RL, Kinkead R, Bairam A. Caffeine in the neonatal period induces long-lasting changes in sleep and breathing in adult rats [J]. *J Physiol*, 2009, 587(P22): 5493-5507.
- Fox K, Caterson B. Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net [J]. *Science*, 2002, 298(5596): 1187-1189.
- Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, et al. Environmental enrichment in adult hood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(6): 679-681.
- 谢芳, 史学锋, 许丽敏, 张腾月, 王嘉星, 宁玉贤, 等. 猫初级视皮层神经元视觉训练相关的方位调制特性可塑性变化研究 [J]. *眼科新进展*, 2011, 31(7): 601-604.
- Geula C, Nagyikery N, Nicholas A, Wu CK. Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease [J]. *J Neuropath Exp Neur*, 2008, 67(4): 309-308.
- Gill SK, Ishak M, Dobransky T, Haroutunian V, Davis KL, Rylett RJ. 82-kDa choline acetyltransferase is in nuclei of cholinergic neurons in human CNS and altered in aging and Alzheimer disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(7): 1028-1040.
- Ferrari R, Pedrazzi P, Algeri S, Agnati LF, Zoli M. Subunit and region-specific decreases in nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the aged rat brain [J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(1): 37-46.
- 林玲, 刘国良. AMPA受体的GluR2亚基在大鼠初级视皮层可塑性中的作用研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(28): 20-23.
- 李成长, 郭直岳, 黄河, 葛校永, 王然, 徐国川, 等. 尼古丁对小鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2013, 30(9): 716-718.
- 樊敬峰, 王伟斌, 吕佩源, 梁翠萍, 尹昱. 血管性痴呆小鼠海马胆碱乙酰转移酶mRNA表达特征研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(10): 986-988.