

视皮质内的表达，探讨视觉发育敏感期弱视幼猫的视觉可塑性及针刺调节的机理，为临床弱视患者治疗年龄范围的选择提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物选择与分组

4 周龄健康幼猫 16 只（由军事医学科学院实验动物中心提供），雌雄不限。将所有动物随机分为两组：形觉剥夺性弱视组 8 只；针刺治疗组 8 只。

1.2 形觉剥夺性弱视猫模型的建立

满 4 周龄幼猫在 3.5% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉下，自内眦至外眦剪除双侧上下眼睑睑缘各 1 mm 组织，上下眼睑创面间断褥式缝合密闭眼睑。术后每天检查眼睑情况 2 次，发生伤口感染或缝线抓脱导致眼睑闭合不严密而漏光的幼猫弃用。

1.3 针刺治疗

治疗组于术后第一天开始，以 30 号、1 寸的针灸针进行治疗，参照文献[4]，取睛明、承泣、球后、攒竹四穴，各穴交替使用。睛明、球后、承泣直刺 0.5~0.8 寸，攒竹斜刺 0.3~0.5 寸，每天 1 次，10 次为 1 疗程，疗程间隔 2 d，治疗期为 16 周。

1.4 标本获取与制备

将充分麻醉的幼猫头部放在冰盒上，采用断头法从枕寰关节处迅速离断头部，取出全部脑组织并修至全脑 1/3 大小，前至视交叉后止于小脑前端。修块后的脑组织分别经过 10% 蔗糖、20% 蔗糖、30% 蔗糖依次下沉后，冰冻切片 6 张，切片厚度为 10 μm ，2 张 HE 染色，2 张免疫组化染色。HE 染色步骤按常规方法。

1.5 免疫组织化学染色

c-Fos 蛋白免疫组化染色采用亲合素-生物素-过氧化物酶 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 法。链霉素亲合素-生物素-过氧化物酶复合物 (streptavidin biotinperoxidase complex, SABC) 免疫组化试剂盒由展晨公司提供。I 抗为 c-Fos 单克隆抗体 (英国 ABCAM 公司)；II 抗为生物素标记山羊抗小鼠 IgG；III 抗为辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素，DAB 显色。复染、封片，镜检。阴性对照以 Tris-HCL 缓冲液取代 I 抗，阳性对照片由公司提供。细胞膜有棕褐色着色的细胞为阳性细胞。用 Leika Q-Win 图像分析系统在 40 \times 10 倍光镜下检测 c-Fos 蛋白在视皮质内 OclM, OclB 两个区域 II~VI 区单位面积内表达的积分吸光度及数密度。数密度：免疫阳性细胞数/mm²，每张切片随机选取 5 个视野。

1.6 统计学处理

数据采用均数士标准差表示，两组数据间采用独立样本 *t* 检验。全部数据采用统计软件 SPSS 11.0 处理。

2 实验结果

光镜下观察，弱视幼猫针刺组视皮质 OclM, OclB 区内 II~IV 层均可见到阳性表达的神经元，免疫阳性神经元胞核呈深褐色，胞浆及轴突、树突不着色或着色较浅，弱视模型组视皮质内 II~IV 层各层中 c-Fos 免疫阳性神经元密度及阳性细胞百分率都明显低于弱视针刺组 (如图 1、图 2 所示)，弱视模型组和针刺组幼猫视皮质内 c-Fos 蛋白阳性表达细胞的阳性细胞数密度和阳性细胞积分吸光度，如表 1 所示。经统计学分析，两组间阳性细胞数密度比较 $P < 0.05$ ；两组间阳性细胞积分吸光度比较 $P < 0.05$ 。

3 结论

人类和哺乳动物出生后，视觉系统能根据视觉环境的刺激，调整和改变已有的神经联系和突触结



图1 模型组幼猫视皮质 c-Fos 蛋白表达免疫组化染色图 (DAB 染色, ×400)

Fig. 1 c-Fos protein immunohistochemical staining of visual cortex of amblyopia cats in model group (DAB staining, ×400)

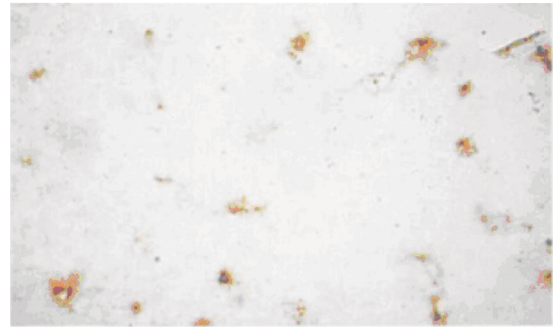


图2 针刺组幼猫视皮质 c-Fos 蛋白表达免疫组化染色图 (DAB 染色, ×400)

Fig. 2 c-Fos protein immunohistochemical staining of visual cortex of amblyopia cats in acupuncture group (DAB staining, ×400)

构, 这一改变发生的最敏感时期称为视觉发育可塑性关键期。在可塑性关键期内, 异常视觉环境可以造成弱视等视功能障碍。不同动物的视觉发育可塑性关键期的开始、高峰和终止时间各不相同。正常幼猫的敏感期一般认为是从出生后的第4周到第4个月, 其中最敏感点是出生后第5周。实验选择出生满4周龄的幼猫行双侧眼睑缝合术, 建立双眼形觉剥夺性弱视猫模型。

实验 c-Fos 蛋白免疫组化染色结果显示: 幼猫视皮质切片上神经细胞均排列成颜色深浅不一的6层结构, 呈现典型的分带状排列; I 层基本无神经元; II, III 层较多; IV 层最为密集; V 层较少。鉴于此, 本实验在观察结果时是按除外 I 层后的 II ~ VI 多层共同的结果进行计数和统计的。

猫的视觉发育可塑性关键期的终止时间在出生后16周, 本实验以满4周龄弱视幼猫作为研究对象。实验结果显示: 弱视猫针刺组视皮质 OclM, OclB 区内 II ~ IV 层均可见到 c-Fos 阳性表达的神经元, 而弱视模型组视皮质内 II ~ IV 层各层中 c-Fos 免疫阳性神经元密度及阳性细胞百分率都明显低于针刺组。表明针刺确能有效地拮抗视觉发育敏感期内的剥夺效应, 抑制可塑期内神经元的退变, 以此来逆转剥夺所造成的损害, 纠正视环境的紊乱, 从而促进神经元和突触的发育, 建立良好的视觉发育模式^[4]。

表1 幼猫视皮质 c-Fos 表达阳性细胞密度和积分吸光度 ($\bar{X} \pm S, n=8$)

Tab. 1 The positive staining cell density and integral absorbance in the visual cortex of amblyopia cats ($\bar{X} \pm S, n=8$)

组别	阳性细胞密度 (细胞数/mm ²)	积分吸光度
弱视模型组	385±35	1.70±0.19
针刺治疗组	158±38*	0.20±0.11*

注: *与模型组相比 P<0.05

[参考文献] (References)

- [1] LOUDON S E, POLLING J R, SIMONSH H J. A preliminary report about the relation between visual acuity increase and compliance in patching therapy for amblyopia[J]. *Strabismus*, 2002, 10(2): 79~82.
- [2] TANAKA S, RIBOT J, IMAMURA K, et al. Orientation-restricted continuous visual exposure induces marked reorganization of orientation maps in early life[J]. *Neuroimage*, 2006, 30(2): 462~477.
- [3] MOWER G D, KAPLAN I V. Immediate early gene expression in the visual cortex of normal and dark reared cats: differences between *fos* and *egr-1*[J]. *Molecular Brain Research*, 2002, 105(1~2): 157~160.
- [4] 林文注. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1994.
LIN W Z. Experimental study of acupuncture [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1994.
- [5] 王洪峰, 王富春, 时岩. 针刺拮抗弱视剥夺效应及其作用机制[J]. *中国临床康复*, 2004, 8 (35): 8036~8037.
WANG H F, WANG F C, SHI Y. Deprivation effect of acupuncture against amblyopia and its mechanism[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2004, 8(35): 8036~8037. (in Chinese)