

大鼠外伤性视神经损伤的闪光电生理特性和 Tau 蛋白及其磷酸化研究

王鹏飞, 申晨, 喻哲昊, 聂祖庆, 李志伟, 文婕, 李萌, 曹霞

引用: 王鹏飞, 申晨, 喻哲昊, 等. 大鼠外伤性视神经损伤的闪光电生理特性和 Tau 蛋白及其磷酸化研究. 国际眼科杂志 2021; 21(4):585-591

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82060306); 昆明医科大学第二附属医院院内科技计划项目 (No.2018yk013); 云南省应用基础研究(昆医联合专项)项目 [No.2017FE467(-057)]; 云南省重点研发计划—科技入滇(国际科技合作专项)项目 (No.2017IB011)

作者单位: (650101) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第二附属医院中心实验室

作者简介: 王鹏飞, 毕业于云南大学, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 研究方向: 神经免疫研究。

通讯作者: 曹霞, 毕业于昆明医科大学, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 神经免疫学. 1244815508@qq.com

收稿日期: 2020-07-06 修回日期: 2021-03-03

摘要

目的: 运用闪光视觉诱发电位 (FVEP) 技术检测外伤性视神经损伤 (TON) 大鼠视觉通路障碍的变化情况, 探究 TON 大鼠视网膜及视神经中 Tau 及其磷酸化蛋白的变化。
方法: 将 30 只 SD 大鼠进行 FVEP 造模, 1wk 后构建 TON 模型, 左眼进行视神经夹持损伤, 右眼进行视神经暴露假手术。TON 模型鼠分别于视神经夹持损伤后 1、3、7、14、28d 进行 FVEP 检测。FVEP 检测完成后处死大鼠, 分离左眼视网膜及视神经, 并采用 Western blot 检测其中 Tau 及其 Ser 396/Ser 404 位点磷酸化蛋白的表达水平。

结果: TON 模型大鼠假手术眼出现典型的 FVEP 波形; 相较于假手术眼, 手术眼各检测时间点 FVEP 的 N2 波发生显著延迟, N2-P2 波振幅发生大幅缩减, 但视神经夹持损伤后各时间点 N2 波潜伏期延迟时间和 N2-P2 振幅缩减差异不明显。TON 大鼠手术眼视网膜总 Tau 含量在夹持损伤 1d 后急剧下降, 7d 时短暂恢复后直至 28d 维持于略低于正常水平; pTau-Ser396/404 的变化与总 Tau 的变化一致, 其中 Ser 396 位点为 Tau 蛋白主要磷酸化位点。TON 大鼠手术眼视神经总 Tau 含量逐渐增多, 夹持损伤 14d 时达到高峰并维持至 28d, pTau-Ser396/404 的变化与总 Tau 的变化类似, 7d 时出现增长并抵达高峰, 其中 Ser 404 位点为主要磷酸化位点。

结论: FVEP 的 N2 及 P2 相关指标可用于检测 TON 大鼠视觉功能障碍水平, TON 大鼠视网膜与视神经 Tau 蛋白水平的变化截然不同, 不同部位 pTau-Ser396/404 的变化跟随总 Tau 含量的变化而变化, 但不同部位 Tau 蛋白主要改变的磷酸化位点不同。

关键词: 外伤性视神经损伤; 闪光视觉诱发电位; 视神经; 视网膜; Tau 蛋白; Tau 蛋白磷酸化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.4.04

Research on flash visual evoked potential and dynamic changes of Tau and its phosphorylation in rat model of traumatic optic neuropathy

Peng-Fei Wang, Chen Shen, Zhe-Hao Yu, Zu-Qing Nie, Zhi-Wei Li, Jie Wen, Meng Li, Xia Cao

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.82060306); The Science and Technology Project of the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University (No.2018yk013); Applied Basic Research of Yunnan Province-Kunming Medical University Joint Project [No.2017FE467(-057)]; Key Research and Development Program of Yunnan Province-Science and Technology Join Dian Special Project (International Cooperation) (No.2017IB011)

Department of Key Laboratory, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Xia Cao. Department of Key Laboratory, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China. 1244815508@qq.com

Received:2020-07-06 Accepted:2021-03-03

Abstract

• **AIM:** To detect the visual dysfunction, and investigate the changes of Tau and its phosphorylated Ser396/Ser404 forms in retinas and optic nerves in traumatic optic neuropathy (TON) model rats by using FVEP technique.

• **METHODS:** Totally 30 SD rats were conducted FVEP electrode implantation. One week later, all rates were implemented TON operation with the optic nerve of left eye crushed and the optic nerve of right eye exposed (sham-operated). FVEP detections were performed respectively in these TON model rats at 1, 3, 7, 14, and 28d post crush, with 5 rats tested at each time point. After FVEP tests were taken, rats were sacrificed and then retinas and optic nerves of left eyes were separated for detecting the expression levels of Tau and pTau-Ser396/404 by Western Blot.

• **RESULTS:** Typical FVEP waves were observed in the sham-operated eyes. Compared to the sham group, the N2 waves were significantly delayed and the amplitude of N2-P2 were greatly reduced at each time point in the operation eyes. However, the differences of N2 wave and the amplitude reduction of N2-P2 were not significant at each time point after crush. The contents of total Tau

protein in retinas of TON rats sharply decreased at 1d post crush, briefly recovered at 7d post crush, and remained a slightly lower level than normal condition till 28d. The changes of pTau - Ser396/404 were consistent with the changes of total Tau in retinas and the Ser396 was the main phosphorylation site. However, the total Tau contents in optic nerves of TON rats increased gradually, and peaked at the 14d post crush and remained till 28d. The changes of pTau - Ser396/404 were similar to the changes of total Tau in optic nerves, which peaked at 7d post crush. However, Ser404 was the main phosphorylation site of Tau in optic nerves.

• **CONCLUSION:** The related indexes of N2 and P2 waves in FVEP can be used to detect the visual dysfunction in TON rats. After TON, the content changes of total Tau in retinas and optic nerves were much different while the changes of pTau - Ser396/404 followed the alterations of total Tau in the two locations. However, the main phosphorylation site of Tau was different according to the locations.

• **KEYWORDS:** traumatic optic neuropathy; flash visual evoked potential; optic nerve; retina; Tau proteins; Tau phosphorylation

Citation: Wang PF, Shen C, Yu ZH, *et al.* Research on flash visual evoked potential and dynamic changes of Tau and its phosphorylation in rat model of traumatic optic neuropathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(4):585-591

0 引言

外伤性视神经损伤 (traumatic optic neuropathy, TON) 是指外力作用导致的视神经功能障碍^[1], 可分为直接性损伤和间接性损伤。直接性损伤指外力直接作用于视神经造成的开放性视神经损伤^[2-3]; 间接性损伤多由于震荡力经头部传递至视神经管, 引发视神经病理性改变, 严重者可导致失明^[3-4]。目前 TON 无特效治疗方法, 可通过视神经管手术减压或皮质类固醇激素改善症状^[5-8]。

TON 除可直接导致视神经轴突损伤外, 还可继发诱导视网膜病变, 进一步加剧患者的视觉障碍^[9]。闪光视觉诱发电位 (flash visual evoked potentials, FVEP) 是评价视觉通路功能的常用方法^[10], 闪光刺激导致的视觉电信号的振幅强弱可反映黄斑的接收功能和参与兴奋的神经元数量; 而电信号的潜伏响应程度可反映神经传导和轴突髓鞘的完整性^[11]。标准 FVEP 电位包含 5 个组份, 含 3 个正向波 P1、P2、P3 和 2 个负向波 N1 和 N2, 其中 N2 和 P2 是成人 FVEP 中最一致和稳健的组份^[12], N2-P2 的振幅变化常被临床运用于监测视神经功能的完整性和预后提示^[13-14], 异常的 N2 和 P2 波形可预测某些严重的退行性疾病^[15]。在大鼠缺血性神经病变模型中, N2-P2 波振幅可用于评估体内视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 的结构和功能, RGC 损失可导致 N2-P2 幅度衰减^[16-17]。同时有报道称颅内高压造成的脑缺血、缺氧和乳酸沉积可减缓神经传导速度, 病理进展与 FVEP 电位潜伏期呈正相关, 且 N2 波潜伏期的延长可作为 TON 预测的良好指标^[18-19]。

Tau 是一种微管相关蛋白, 生理状态下主要分布于细

胞轴突。Tau 通过选择性磷酸化发挥稳定和促进微管形成的功能, 可调节轴突运输; 病理状态下, Tau 通过过度磷酸化发生 Tau 聚集, 分布异常, 毒性增加, 使得稳定微管的能力下降甚至丧失^[20]。近期研究表明, 在小鼠间接性 TON 模型中可出现内角膜水肿引起高眼压和 RGC 丢失等病理变化, 其中 RGC 出现 Tau 过度磷酸化等病变^[21]。在大鼠青光眼模型中, Tau 异常分布于 RGC 的树突中, 视网膜中 Tau 的 Ser 396/404 位表现出过度磷酸化现象^[22]。在阿尔茨海默病转基因小鼠 (3×Tg) 中, 视网膜 Tau 的 Ser 396/404 位点却没有发生过度磷酸化现象, 相反在 Ser 202 和 Thr 205 位点中发生了过度磷酸化^[23]。因此, 对于视网膜轴突受损的 TON 来说, Tau 在其病理进展中发挥了关键作用, 但其磷酸化变化可能与在其他疾病模型中探索出的改变模式有所不同。本研究通过构建大鼠 TON 模型, 运用 FVEP 技术检测大鼠 TON 后视觉通路障碍的变化情况, 并分别探究大鼠 TON 后视神经轴突及视网膜中 Tau 及 pTau-Ser 396/404 的状态变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雌性健康成年 SD 大鼠 30 只 (昆明医科大学实验动物中心提供), 双眼外观正常, 检查双眼屈光间质清, 瞳孔等大等圆, 对光反射灵敏, 眼底无异常, 体质量约 180~200g。动物实验方案考虑了实验动物福利原则, 但因 FVEP 检测对动物麻醉状态敏感, 为提高准确性和可重复性采取手术眼和假手术眼在同一个体上进行实验的策略。本研究经昆明医科大学动物实验伦理审查通过, 本实验操作人员具有云南省实验动物从业资格。

1.1.2 主要试剂及仪器 主要试剂: 一抗: Anti - Tau (phospho S396) Abcam ab109390, Anti - Tau (phospho S404) Abcam ab92676; Anti - Tau (Tau-5) Abcam ab80579; GAPDH Proteintech 10494-1-AP。二抗: Goat Anti - Rabbit IgG (H+L) Antibody KPL (214-1516); Goat Anti - Mouse IgG (H+L) Antibody KPL (214-1806)。蛋白提取试剂盒: MinuteTM Total Protein Extraction Kit for Animal Cultured Cells and Tissues Catalog Number: SD-001/SN-002。蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA, 100× DMSO 储液, bimake), 磷酸酶抑制剂 Cocktail (100× bimake)。其他: EpiZyme 科技 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%), 义齿基托树脂, 盐酸奥布卡因、青霉素 G 钾。主要仪器设备: 瑞沃德脑定位仪、瑞沃德手持钻孔器、眼科罗兰电生理测试仪器 (德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 先将 30 只 SD 大鼠行 FVEP 电极植入, 康复恢复 1wk 后随机分成 5 组, 每组 6 只, 各组大鼠进行 TON 模型构建, 左眼进行视神经夹持, 右眼进行视神经暴露假手术。

1.2.1.1 FVEP 模型构建 (1) SD 大鼠碘伏消毒腹部, 用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射 (0.4g/kg, 约 0.4mL) 进行麻醉, 待大鼠角膜反射消失, 仰卧位无法自主转身, 呼吸深慢, 且用镊子轻夹下肢脚趾无反应时即麻醉成功; (2) 用动物剃毛器进行头部备皮, 碘伏消毒; (3) 将大鼠固定于脑定位仪, 用组织剪于颅顶正中做 3~4cm 切口, 用弯钳钝性分离皮下组织, 用棉签蘸取 3% 双氧水擦去颅骨表面筋膜, 直至清晰辨认前后凶门; (4) 拨动定位仪以前凶为起点向前

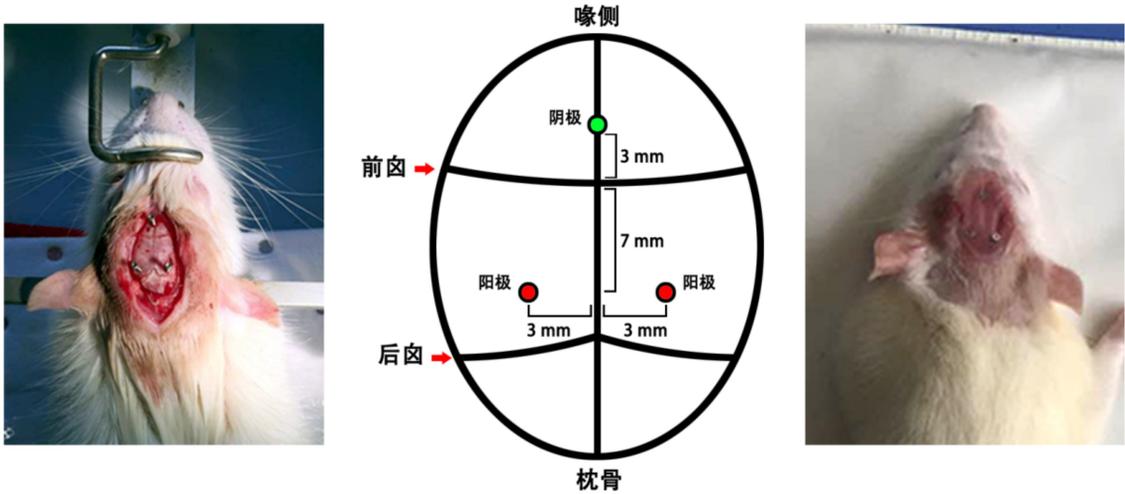


图1 FVEP 电极植入示意图。

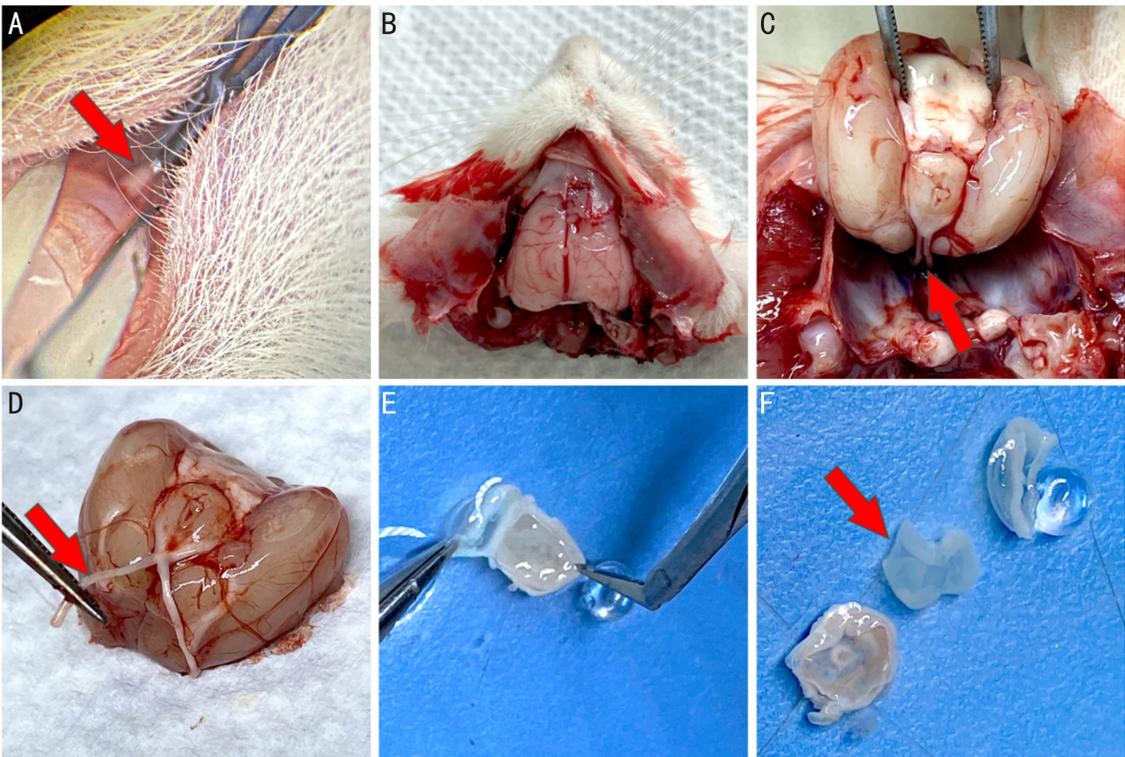


图2 TON 模型构建及视神经视网膜取材示意图 A:TON 视神经夹持示意图,箭头处所示为暴露的视神经;B:摘取眼球后,分离暴露的模型动物大脑;C:缓慢抬起大脑,从颅底抽出视神经,箭头处所示为抽出的视神经;D:取出的完整视神经,箭头处所示为左眼视神经;E:从冠状面分离出眼球角膜、虹膜及晶状体;F:从杯状眼组织中钝性分离出视网膜,箭头处所示为分离出的完整视网膜。

3mm 为阴极电极点,向后 7mm 后左右旁开 3mm 为 2 个阳极电极点(图 1),用转孔机组合 0.8mm 颅骨钻头进行颅骨打孔,用有齿钻头在光滑颅骨表面打磨,便于牙科义齿树脂黏合(图 1 左图);(5)用有齿弯钳夹取 1mm 直径的无菌不锈钢螺丝钉分别拧入 3 个钻孔,深约 2mm;(6)按照 1:1 比例配取牙科义齿树脂,快速混合,用加样枪吸取液态树脂置于手术区域,覆盖至手术切缘为止,待自然凝固后,取下固定中的大鼠(图 1 右图);(7)配制 200 000IU/mL 浓度的青霉素 G 钾,每只大鼠行大腿一次性肌肉注射 200 μ L。术后给予伤口恢复 1wk,期间查看是否有感染迹象。

1.2.1.2 TON 模型构建 (1)大鼠麻醉同前;(2)麻醉成功后,将大鼠取右侧卧位置于手术台上,用拇指和食指固定其头部位置,两指稍用力将眼睑向两边提拉,左眼滴 2~4 滴盐酸奥布卡因进行表面麻醉;(3)解剖显微镜下操作,

剪开左眼外眦约 2mm,环形剪开左眼球结膜,避开大血管,向后方钝性分离眼外直肌,然后提起球结膜向前稍牵拉眼球,暴露视神经 3~4mm(图 2A 箭头所示),用夹持力为 50g 的视神经夹持镊在球后约 2mm 处钳夹视神经 10s 造成夹持损伤,注意避免损伤血管;(4)大鼠右眼为假手术眼,仅分离并暴露视神经,但不行钳夹损伤;(5)确定造成视神经夹持损伤后,将眼球恢复原位,在眼睑上使用红霉素眼膏敷眼,后将大鼠放回笼中,观察呼吸有无异常;(6)术后第 2d 手术眼出现 Marcus-gunn 瞳孔,眼球无明显突出,检眼镜观察眼底无明显出血者为成功模型。

1.2.2 FVEP 测量 TON 模型构建完成后,5 组大鼠依次按夹持后 1、3、7、14、28d 进行 FVEP 检测。FVEP 检测方法:(1)大鼠麻醉后置于黑箱子中进行暗适应约 30min,电热毯保持大鼠体温;(2)检测时,检测眼滴入 1 滴复方托吡卡胺滴眼液扩瞳,对侧眼不透光黑眼罩进行遮罩,连接

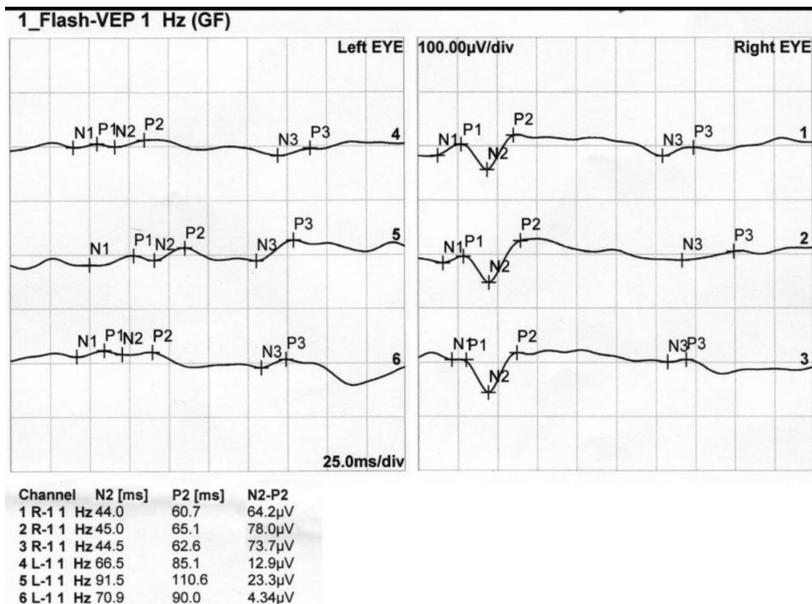


图3 TON模型大鼠FVEP检测结果 左眼:手术眼;右眼:假手术眼。

相应电极,检查电阻情况;(3)眼科罗兰电生理测试仪 FVEP 参数设置:电极电阻低于 5kΩ,频闪强度 3.0cd/(s·m²),1Hz 频闪频率记录有效光刺激 60 次,检测时间 200ms,抽样率 5kHz,刺激响应放大 2 万倍,最高和最低 band-pass 过滤频率分别为 1、100Hz;(4)每个眼球重复测量 3 次,查看 FVEP 检测图像,根据国际电生理标准 (ISCEV) 的标准峰型指导及既往关于大鼠 FVEP 检测波形指导^[24],结合仪器自动峰型识别确定实验大鼠 FVEP 的各项指标。

1.2.3 取材 FVEP 检测完成后将大鼠处死(过量 2% 戊巴比妥钠 2mL 腹腔注射,断颈处死)。分离头部,去皮肤,分离左眼眶处组织,剪断视乳头处神经,取出眼球;从枕骨处正中分离顶骨,暴露大脑,从小脑处切断,用镊子缓慢抬起大脑,暴露并抽取视神经(若视神经管内发生炎性黏连,注意抽取视神经的完整性),剪取左眼视神经(图 2B~D)。取分离的左眼球,置于盛有 PBS 的平板中,用眼科剪在角膜上截一孔,随后沿冠状面剪去角膜、虹膜及晶状体(图 2E),用镊子缓慢钝性分离视网膜(图 2F)。

1.2.4 视神经/视网膜组织蛋白提取 (1)按照蛋白提取试剂盒说明书进行蛋白提取,将视神经/视网膜组织放入试剂盒蛋白裂解液中,迅速依次加入蛋白酶抑制剂 2μL,磷酸酶抑制剂 A 2μL,混匀后加入磷酸酶抑制剂 B 2μL;(2)用电动匀浆器进行冰浴匀浆,高速离心机离心 14 000r/min,4℃,5min;(3)吹吸过滤液,每 200μL 过滤液中加入 100μL 3×loading buffer,10μL DTT,沸水浴 10min。

1.2.5 Western blot 检测 TON 大鼠视神经及视网膜中 Tau 及 pTau-Ser396/404 蛋白水平 (1)按快速制备试剂盒说明书配制 10% PAGE 凝胶;(2)上样并电泳,90V 30min 后 120V 90min,电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳,进行转膜 90V 90min;(3)转膜结束后切取内参及目的条带,于摇床 PBS-Tween 洗膜 5×5min;5% BSA,37℃ 摇床封闭 1h,于摇床 PBS-Tween 洗膜 5×5min;(4)于摇床 4℃ 过夜孵育一抗,GAPDH(1:1000),Anti-Tau(phospho S396)(1:2000),Anti-Tau(phospho S404)(1:2000),Anti-Tau(Tau-5)(1:2000);(5)次日,于摇床 PBS-Tween 洗膜 5×5min;二抗(1:20000)室温摇床孵育 1h,于摇床 PBS-

Tween 洗膜 5×5min;ECL 化学发光试剂显影。蛋白样本检测进行独立 3 次重复实验。运用 Image J 软件进行灰度扫描,经内参校准后进行蛋白表达差异分析。

统计学分析:采用 SPSS 20.0 软件进行数据的统计分析,采用 GraphPad Prism 5 软件制图。计量资料经 Shapiro-Wilk 正态性检验结果均符合正态分布,满足方差齐性,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,手术眼与假手术眼之间的比较采用配对样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差(ANOVA)分析,若差异有统计学意义,采用 Tukey 法或 LSD-*t* 法进行两两比较。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TON 大鼠 FVEP 电生理信号变化 通过观察大鼠 FVEP 电生理图谱发现,各组大鼠 3 次重复测量均一性较好,其中尤以 N2-P2 峰识别性较高,故本研究统计分析围绕 N2 波潜伏期和 N2-P2 波振幅进行,其他指标不予分析。检测结果发现,TON 模型大鼠假手术眼出现了典型的 FVEP 波形,表明仅暴露右眼视神经并不会对 FVEP 的各项指标产生严重影响(图 3);相较于假手术眼,手术眼各检测时间点 FVEP 的 N2 波均发生显著延迟,平均延迟时间为 14.98ms,FVEP 的 N2-P2 波振幅均发生显著缩减,平均缩减 42.85μV(表 1,图 4),且手术眼在检测时间范围内(1~28d)均无法恢复至对侧假手术眼视觉水平。此外,TON 大鼠双眼 N2-P2 波振幅相对值和 N2 波潜伏期相对值在各时间点上总体均不存在显著差异(*F* = 1.023, *P* = 0.400; *F* = 1.619, *P* = 0.176),但 N2 波潜伏期相对值在 3~7d 延迟幅度明显降低(图 5)。以上结果表明大鼠视神经受到外伤性损伤之后视觉障碍加剧,7d 时机体可能发生了 N2 波潜伏期改善,提示大鼠视神经脱髓鞘可能有所缓解。

2.2 TON 大鼠视网膜 Tau 及其磷酸化变化 TON 大鼠视网膜 Tau 及其磷酸化位点 Western blot 检测泳道内可检测到多个条带(与标准蛋白 marker 比对,其阳性条带大小约为 45、55~70、120kDa),均为 Tau 不同单体型,其中 55~70kDa 可见紧密重叠的两条主要 Tau 单体型,故本研究围绕此附近条带进行分析(图 6)。结果显示,夹持损伤后视

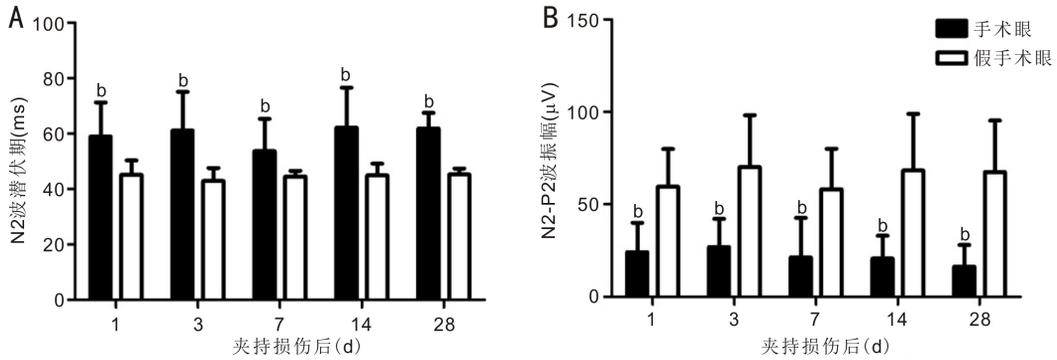


图4 TON后不同时间点手术眼与假手术眼 FVEP 检测结果比较 A: N2 波潜伏期; B: N2-P2 波振幅。^b*P*<0.01 vs 假手术眼。

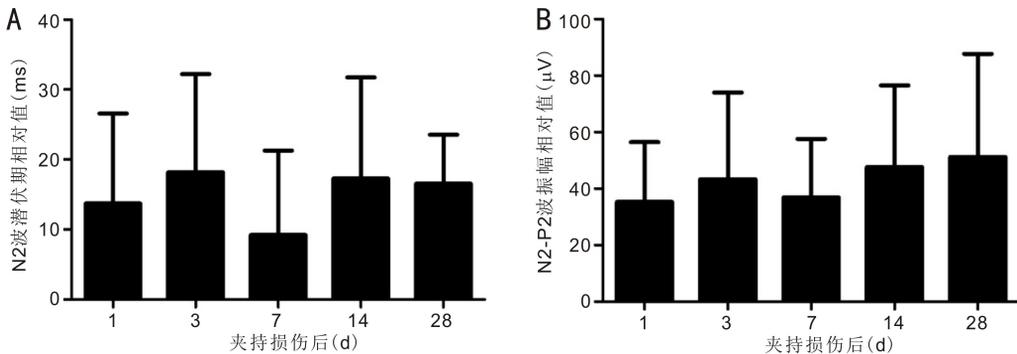


图5 TON后不同时间点手术眼相较于假手术眼 N2 波潜伏期延迟和 N2-P2 波振幅缩减情况 A: N2 波潜伏期相对值; B: N2-P2 波振幅相对值。

表1 TON后不同时间点手术眼与假手术眼 FVEP 检测结果分析

时间	n(只)	N2 波潜伏期				N2-P2 波振幅				$\bar{x} \pm s$
		延迟时间 (ms)	<i>P</i> 正态检验	<i>t</i>	<i>P</i>	振幅缩减 (μV)	<i>P</i> 正态检验	<i>t</i>	<i>P</i>	
D1L-D1R	6	13.72±12.85	0.770	6.04	<0.001	35.31±21.12	0.140	9.45	<0.001	
D3L-D3R	6	18.16±20.05	0.231	6.60	<0.001	43.30±30.72	0.412	7.19	<0.001	
D7L-D7R	6	9.20±12.07	0.144	3.50	0.002	36.90±20.73	0.747	8.16	<0.001	
D14L-D14R	6	17.27±14.47	0.029	4.30	0.001	47.59±28.94	0.368	5.93	<0.001	
D28L-D28R	6	16.56±6.99	0.752	6.254	0.001	51.17±36.54	0.607	3.705	0.010	
<i>F</i>		1.619				1.023				
<i>P</i>		0.176				0.400				

注: D1、D3、D7、D14、D28 分别表示大鼠视神经夹持损伤后 1、3、7、14、28d; L 表示左眼(手术眼), R 表示右眼(假手术眼); 各组数据均满足方差齐性, 且经 Shapiro-Wilk 正态性检验结果均符合正态分布(仅 D14L-D14R 的 N2 波潜伏期差值即延迟时间不符合正态分布, 存在一离群值, 属于稍偏态分布)。

网膜总 Tau 含量显著降低 ($F=8.808, P=0.001$), 其中 1d 内变化不明显, 随后急剧下降, 3d 时达低谷, 7d 时存在一定量的恢复随后继续下降, 直至 28d 稳定至略低于正常水平; pTau-Ser396/404 的含量与总 Tau 的变化一致, 均显著降低 ($F=5.901, P=0.006$; $F=16.543, P<0.001$), 但 pTau-Ser396/404 与总 Tau 含量的相对比率变化则不同, Ser 396 位点在夹持损伤后的磷酸化比率更高 ($F=11.999, P<0.001$), 而 Ser 404 位点的相对磷酸化水平则降低 ($F=8.970, P<0.001$), 表明夹持损伤后视网膜中 Tau 的 Ser 396 位点较 Ser 404 位点更易发生磷酸化。

2.3 TON 大鼠视神经 Tau 及其磷酸化变化 TON 大鼠视神经 Tau 及其磷酸化位点 Western blot 检测较视网膜更难检测, 但条带位置与视网膜结果所示位置一致(图 7)。结果显示, 夹持损伤后视神经中总 Tau 含量呈增多趋势 ($F=9.469, P=0.001$), 14d 时达最高值, 直至 28d 仍处于一种略高于正常水平的状态; pTau-Ser396/404 的变化与总 Tau 的变化大致相同, 其中 pTau-Ser396 表达呈增多趋

势 ($F=6.176, P=0.005$), 而 pTau-Ser404 表达明显增加 ($F=12.419, P<0.001$), 7d 时增长并抵达高峰随后回落至高于正常水平值; pTau-Ser396/404 与总 Tau 含量的相对比率分析显示, Ser 396 位点相对磷酸化程度降低 ($F=37.173, P<0.001$), 而 Ser 404 位点 7d 时表现出相对磷酸化程度增高的现象 ($F=15.088, P<0.001$)。

3 讨论

本研究探讨了 FVEP 技术检测大鼠 TON 后视觉障碍的变化情况, 识别度较高的 N2 及 P2 相关指标可用于监测大鼠视觉功能水平。FVEP 检测结果表明 TON 后大鼠 FVEP 波形明显紊乱, 视觉功能发生严重障碍, 且随着检测时间的持续, 该障碍的状态没有发生逆转, 说明 TON 模型构建对大鼠视觉功能的影响是不能短期自愈的。FVEP 检测结果表明, TON 后 7d 时, 模型鼠的视觉功能发生了小幅度且短暂的改善现象, 分析可能是视神经与视网膜中胶质细胞活化清除受损细胞和部分修复受损轴突髓鞘所致^[25]。值得注意的是, 上述改善未能获得很好的统计学

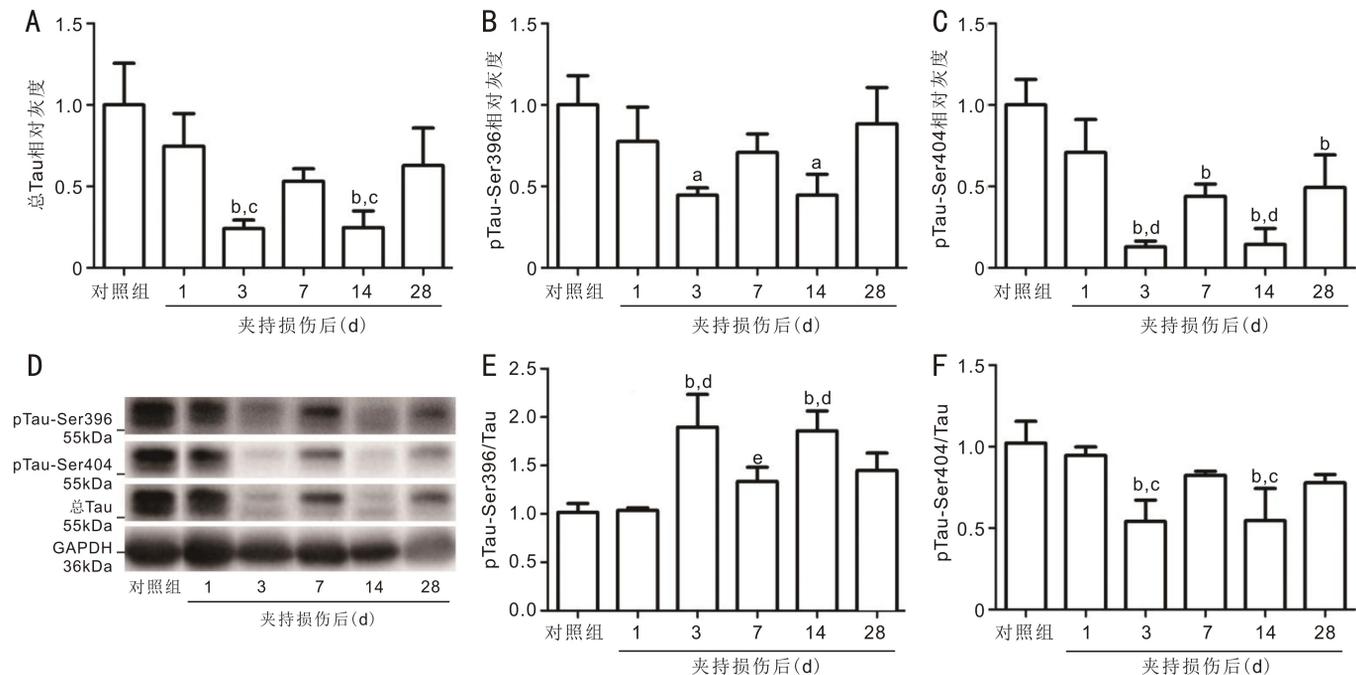


图6 TON后不同时间点大鼠手术眼视网膜Tau及其磷酸化蛋白相对表达情况 对照组:大鼠视神经夹持损伤后1d右眼(假手术眼)视网膜组织。A:视网膜总Tau含量相对于对照组的变化情况;B:视网膜Tau磷酸化位点Ser396含量相对于对照组的变化情况;C:视网膜Tau磷酸化位点Ser404含量相对于对照组的变化情况;D:视网膜总Tau、Tau磷酸化位点Ser396及Tau磷酸化位点Ser404的蛋白电泳图;E:视网膜Tau磷酸化位点Ser396含量与总Tau含量比值相对于对照组的变化情况;F:视网膜Tau磷酸化位点Ser404含量与总Tau含量比值相对于对照组的变化情况。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 夹持损伤后1d; ^e $P < 0.05$ vs 夹持损伤后3d。

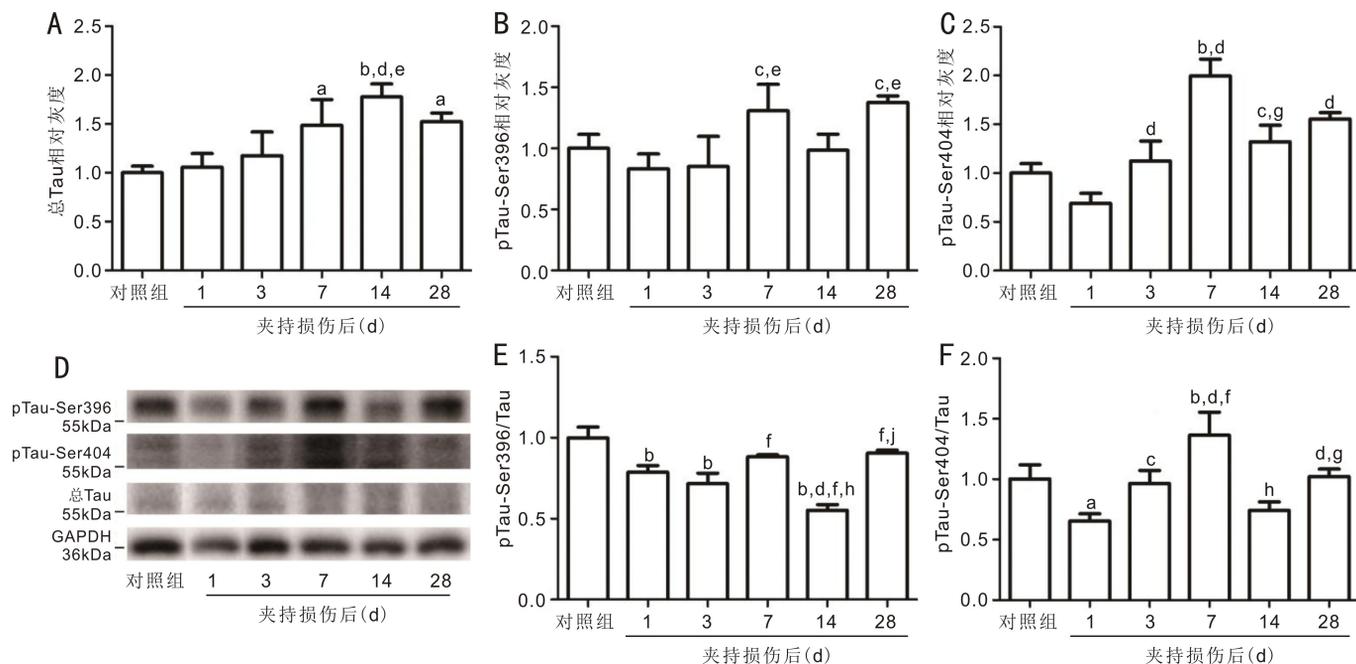


图7 TON后不同时间点大鼠手术眼视神经Tau及其磷酸化蛋白相对表达情况 对照组:大鼠视神经夹持损伤后1d右眼(假手术眼)视神经组织。A:视神经总Tau含量相对于对照组的变化情况;B:视神经Tau磷酸化位点Ser396含量相对于对照组的变化情况;C:视神经Tau磷酸化位点Ser404含量相对于对照组的变化情况;D:视神经总Tau、Tau磷酸化位点Ser396及Tau磷酸化位点Ser404的蛋白电泳图;E:视神经Tau磷酸化位点Ser396含量与总Tau含量比值相对于对照组的变化情况;F:视神经Tau磷酸化位点Ser404含量与总Tau含量比值相对于对照组的变化情况。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 夹持损伤后1d; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 夹持损伤后3d; ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 夹持损伤后7d; ⁱ $P < 0.05$, ^j $P < 0.01$ vs 夹持损伤后14d。

支持,说明改善程度轻微或分组内个体不足导致了检验效能不足,今后进行FVEP检测大鼠TON视觉通路变化情况需要增大分组内个体数目。尽管如此,这种短暂改善并没有持续发生和进一步增强,表明在缺乏外界干预的情况下,TON大鼠视神经的自发修复有限,可能存在完整功能

的神经元发生了进一步凋亡的现象^[26]。

大鼠TON后,1~3d时视网膜中总Tau的含量急剧降低,这表明在神经元受损的早期,视网膜中的神经元胞体死亡或受到干扰难以合成足量的Tau进行微管稳定,存量的Tau逐渐被消耗,这与高血压青光眼模型中的Tau聚集

在视网膜 RGC 胞体内的情况不同^[22]。TON 后 7d 时视网膜 Tau 产生了一定量恢复,说明部分 RGC 已经恢复功能开始正常合成 Tau,这与 FVEP 中观测到的 7d 改善现象一致。与视网膜中总 Tau 含量变化不同的是,视神经总 Tau 的含量却是逐渐增加的,其可能的原因是破损的轴突中多聚化 Tau 的清除机制降低,残留多聚化 Tau 与眼球近端轴突转运来的大量 Tau 在损伤处形成神经纤维缠结^[27]。此外,受损轴突中伴随着 Tau 增多,两个检测位点的磷酸化水平也随之增高。有研究表明,在人类阿尔茨海默病患者的外周血中,Tau 的 Ser396/404 过度磷酸化是潜在的疾病诊断指标之一,因此 TON 后视神经中 pTau-Ser396/404 的增加可能对视神经的修复起到抑制作用^[28]。此外,TON 后视网膜和视神经轴突中 pTau-Ser396 和 404 两个磷酸化位点发挥作用的程度也不同,在视网膜中主要的磷酸化增量位点为 Ser 396,而在视神经中的增量磷酸化位点为 Ser 404,其原因可能是两个磷酸化位点对 Tau 功能影响存在差异;另一种可能是磷酸化次序因素,Ser 396 位点磷酸化后 404 位点才进一步磷酸化。

总的来说,FVEP 技术可在活体状态下对模型动物的视觉通路功能进行无创检测,这是研究某些视网膜或视神经相关疾病损伤的优良终点指标,但是该技术对研究者电极植入和 FVEP 波形的识别有一定的要求,且不同实验项目对分组动物个体数目的要求也会不同。近年来研究者对神经退行性疾病中 Tau 和 Tau 磷酸化等相关指标的兴趣倍增,本研究表明异常的 Tau 聚集和 Tau 过度磷酸化是 TON 后疾病发生发展的重要因素,探索 Tau 与 TON 发展的分子机制和研究视神经微管稳定与 TON 的关系是今后开展治疗视神经损伤的坚实基础。

参考文献

- 1 He ZH, Lan ZB, Xion GA, *et al.* Endoscopic decompression of the optic canal for traumatic optic neuropathy. *Chin J Traumatol* 2016; 19(6): 330-332
- 2 Yu-Wai-Man P. Traumatic optic neuropathy—Clinical features and management issues. *Taiwan J Ophthalmol* 2015; 5(1): 3-8
- 3 Balakrishnan S, Harsini S, Reddy S, *et al.* Imaging review of ocular and optic nerve trauma. *Emerg Radiol* 2020; 27(1): 75-85
- 4 Chen YJ, Liang CM, Tai MC, *et al.* Longitudinal relationship between traumatic brain injury and the risk of incident optic neuropathy: A 10-year follow-up nationally representative Taiwan survey. *Oncotarget* 2017; 8(49): 86924-86933
- 5 Chen HH, Lee MC, Tsai CH, *et al.* Surgical Decompression or Corticosteroid Treatment of Indirect Traumatic Optic Neuropathy: A Randomized Controlled Trial. *Ann Plas Surg* 2020; 84(1S Suppl 1): S80-S83
- 6 Ruiz S, Lim R. Orbital Decompression for Treatment of Acute Visual Loss After Facial Trauma. *J Craniofac Surg* 2019; 30(7): e683-e687
- 7 Sosin M, De La Cruz C, Munding GS, *et al.* Treatment Outcomes following Traumatic Optic Neuropathy. *Plast Reconstr Surg* 2016; 137(1): 231-238
- 8 王莉,李鹏,郭雄.多种药物联合鼠神经生长因子治疗外伤性视神经挫伤. *国际眼科杂志* 2017; 17(11): 2161-2163
- 9 Lee WJ, Hong EH, Park HM, *et al.* Traumatic optic neuropathy-associated progressive thinning of the retinal nerve fiber layer and ganglion cell complex: two case reports. *BMC Ophthalmol* 2019; 19(1): 216

- 10 宁书尧,杨思达.健康学儿童视觉诱发电位的研究. *国际眼科杂志* 2017; 17(7): 1221-1225
- 11 Wang R, Sun Q, Xia F, *et al.* Methane rescues retinal ganglion cells and limits retinal mitochondrial dysfunction following optic nerve crush. *Exp Eye Res* 2017; 159: 49-57
- 12 Odom JV, Bach M, Brigell M, *et al.* ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). *Doc Ophthalmol* 2016; 133(1): 1-9
- 13 Houlden DA, Turgeon CA, Amyot NS, *et al.* Intraoperative Flash Visual Evoked Potential Recording and Relationship to Visual Outcome. *Can J Neurol Sci* 2019; 46(3): 295-302
- 14 Shao WY, Liu X, Gu XL, *et al.* Promotion of axon regeneration and inhibition of astrocyte activation by alpha A-crystallin on crushed optic nerve. *Int J Ophthalmol* 2016; 9(7): 955-966
- 15 Wyatt-McElvain KE, Arruda JE, Rainey VR. Reliability of the Flash Visual Evoked Potential P2: Double - Stimulation Study. *Appl Psychophysiol Biofeedback* 2018; 43(2): 153-159
- 16 Nguyen Ngo Le MA, Wen YT, HO YC, *et al.* Therapeutic Effects of Puerarin Against Anterior Ischemic Optic Neuropathy Through Antiapoptotic and Anti-Inflammatory Actions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60(10): 3481-3491
- 17 Huang TL, Wen YT, Ho YC, *et al.* Algae Oil Treatment Protects Retinal Ganglion Cells (RGCs) via ERK Signaling Pathway in Experimental Optic Nerve Ischemia. *Mar Drugs* 2020; 18(2): 83
- 18 Dai X, Ye S, Chen X, *et al.* Rodent retinal microcirculation and visual electrophysiology following simulated microgravity. *Exp Eye Res* 2020; 194: 108023
- 19 Wang T, Ma S, Guan Y, *et al.* Double function of noninvasive intracranial pressure monitoring based on flash visual evoked potentials in unconscious patients with traumatic brain injury. *J Clin Neurosci* 2016; 27: 63-67
- 20 Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 2017; 133(5): 665-704
- 21 Bernardo-Colón NA, Vest V, Cooper ML, *et al.* Progression and Pathology of Traumatic Optic Neuropathy From Repeated Primary Blast Exposure. *Front Neurosci* 2019; 13: 719
- 22 Chiasseu M, Cueva Vargas JL, Destroismaisons L, *et al.* Tau Accumulation, Altered Phosphorylation, and Missorting Promote Neurodegeneration in Glaucoma. *J Neurosci* 2016; 36(21): 5785-5798
- 23 Chiasseu M, Alarcon - Martinez L, Belforte N, *et al.* Tau accumulation in the retina promotes early neuronal dysfunction and precedes brain pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2017; 12(1): 58
- 24 Santangelo R, Castoldi V, D'Isa R, *et al.* Visual evoked potentials can be reliably recorded using noninvasive epidermal electrodes in the anesthetized rat. *Doc Ophthalmol* 2018; 136(3): 165-175
- 25 Fischer D, Harvey AR, Pernet V, *et al.* Optic nerve regeneration in mammals: Regenerated or spared axons? *Exp Neurol* 2017; 296: 83-88
- 26 Zhang S, Wang D, Huang T, *et al.* Pim-1 Expression in Rat Retina and its Changes after Optic Nerve Crush. *Anat Rec (Hoboken)* 2018; 301(11): 1968-1976
- 27 Means JC, Lopez AA, Koulen P. Estrogen Protects Optic Nerve Head Astrocytes Against Oxidative Stress by Preventing Caspase-3 Activation, Tau Dephosphorylation at Ser (422) and the Formation of Tau Protein Aggregates. *Cell Mol Neurobiol* 2020[Online ahead of print]
- 28 Shi Y, Gu L, Wang Q, *et al.* Platelet Amyloid-β Protein Precursor (AβPP) Ratio and Phosphorylated Tau as Promising Indicators for Early Alzheimer's Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2020; 75(4): 664-670