

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.18.001

· 基础研究 ·

成年期视皮层神经元数量减少降低突触连接*

蓝志达 王兆龙 谢先屹 赵乐文 方伟群[△]

(上海交通大学基础医学院解剖学与生理学系 上海 200025)

摘要 目的:探究成年期视皮层神经元数量减少对突触连接的改变,为解析创伤性脑损伤导致的视觉功能障碍提供实验依据。**方法:**采用立体定位技术,以腺相关病毒(Adeno-associated viruses, AAVs)稀疏感染方式于8周龄 C57BL/6 小鼠初级视皮层(Primary visual cortex, V1)中表达白喉毒素 A 片段蛋白(Diphtheria toxin A, DTA),引发神经元凋亡。4周后,通过免疫荧光染色、高尔基染色及共聚焦显微镜成像,分析视皮层第2-4层神经元数量以及幸存锥体神经元的树突棘形态特征。**结果:**通过注射不同滴度(E+11-13)的DTA表达病毒,成功构建了不同水平(14~85%)的视皮层神经元减少小鼠模型。结果发现低滴度(E+11)DTA表达病毒导致中等程度神经元减少(~18%, $P < 0.01$),模拟了轻度创伤性脑损伤患者的皮层神经元丢失水平(16.5~22.9%),并发现该小鼠锥体神经元的树突棘密度与对照组没有差异,而树突棘成熟比例减少~19% ($P < 0.0001$)。**结论:**成年期视皮层神经元数量减少损害突触连接,可能导致大脑的视觉功能障碍。

关键词:视皮层;神经元;神经元数量;树突棘

中图分类号:Q189;Q42 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)18-3401-06

Neuronal Loss in Adult Visual Cortex Reduces Synaptic Connection*

LAN Zhi-da, WANG Zhao-long, XIE Xian-yu, ZHAO Le-wen, FANG Wei-qun[△]

(Department of Anatomy and Physiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: Exploring the relationship between neuronal loss in adult visual cortex and its consequential changes in synaptic connection provides experimental evidence to elucidate impaired visual function upon traumatic brain injury. **Methods:** The primary visual cortex (V1) of 8-week-old C57BL/6 mice was sparsely infected with adeno-associated viruses (AAVs) encoding diphtheria toxin A (DTA) to induce neuronal apoptosis. Neuronal number and dendritic spine morphology of surviving pyramidal neurons in layers 2-4 of visual cortex were analyzed using immunofluorescence staining, Golgi staining and confocal microscopy after four weeks post-injection. **Results:** Through stereotactic injection of different titers (E+11-13) of DTA-expressing viruses, mouse models were generated with various levels of neuronal loss (by 14~85%) in the adult visual cortex. The results revealed that low-titer (E+11) DTA-expressing AAV led to moderate reduction of neuronal number (by~18%, $P < 0.01$), mimicking the level of neuronal loss in patients with mild traumatic brain injury (16.5~2.9%). In this DTA group, while dendritic spine density of pyramidal neurons did not change in comparison to the control group, the proportion of mature spines reduced by ~19% ($P < 0.0001$). **Conclusions:** Neuronal loss in adult visual cortex impaired synaptic connection and probably compromised visual function in the brain.

Key words: Visual cortex; Neuron; Neuron number; Dendritic spine

Chinese Library Classification(CLC): Q189; Q42 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)18-3401-06

前言

合适数量的神经元是大脑结构稳定和功能完整的基础^[1,2]。在脑发育阶段,神经元过多或过少可导致如巨脑或小头畸形等大脑体积异常^[3],或自闭症和精神分裂症等认知障碍疾病^[4]。在成年阶段,大脑神经元的数量会因神经元死亡而减少,常见于创伤性脑损伤^[5]、脑卒中^[6]和神经退行性疾病^[7]等。然而,成年期神经元的数量变化如何影响大脑功能尚不清楚。

创伤性脑损伤主要由交通事故、跌倒和运动相关的外力挤压所引起^[8],导致受损部位的神经细胞死亡^[9]。枕叶及视皮层是创伤性脑损伤的常见区域,可能导致如畏光、视野缺陷、视觉疲劳和视觉感知异常等功能障碍^[10-13]。因此,研究视皮层神经元数量减少与视功能异常的关系,对于解析伴随创伤性脑损伤的视觉功能障碍具有重要意义。

创伤性脑损伤不仅会导致神经细胞死亡,还伴随幸存神经元的树突棘异常,可能表现出树突棘变性、成熟突触丧失和突

* 基金项目:国家自然科学基金项目(32271023);上海市浦江人才计划项目(22PJ1408900)

作者简介:蓝志达(1997-),男,硕士研究生,主要研究方向:神经生物学,E-mail: 513554817@qq.com

△ 通讯作者:方伟群(1981-),男,研究员,主要研究方向:神经生物学,E-mail: fangwq@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2024-02-06 接受日期:2024-02-28)

触活力障碍等^[14-18]。在视皮层部位的脑创伤中,神经元数量减少是否直接导致突触连接异常及视觉功能障碍尚不清楚,缺乏合适的动物模型是一个重要原因。视皮层创伤的动物模型已有相关报道^[19-21]。在这些研究中,通常采用物理损伤脑组织或激光杀伤细胞的方式造模^[19],除了导致视皮层神经元死亡之外,对其周围的胶质细胞、血管和免疫系统也会造成广泛伤害。再者,以上造模方式诱发轻度脑损伤,通常引起持续性的细胞死亡,伴随长期而复杂的继发性反应,如细胞代谢改变^[21]和神经炎症发生^[24]等,可间接对神经元健康和正常功能产生严重的危害累积效应。因而采用这些模型研究神经元数量减少如何改变视觉功能将无法回避胶质细胞、神经炎症等干扰因素的影响。

本研究构建了一个新型的模拟视皮层损伤的小鼠模型,特异地消融部分神经元,而不直接损伤其周围胶质细胞和血管。我们通过立体定位技术和重组酶 Cre 依赖的病毒体系,在成年小鼠浅层视皮层的部分神经元中,特异性表达白喉毒素 A 片段蛋白(Diphtheria toxin A, DTA),使其快速凋亡。待小鼠经过 1 个月的恢复之后,再通过高尔基染色技术观测未被消融神经元的树突棘形态,并统计成熟及未成熟树突棘的密度及比例。我们的结果揭示神经元数量减少导致同脑区内神经元树突棘成熟度显著下降,提示突触连接弱化可能是视皮层脑损伤伴随视觉障碍的重要原因。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 本文使用的实验动物是 8 周龄的清洁级 C57BL/6 小鼠,体重 20~25 g,购买自上海灵畅生物科技有限公司。小鼠饲养于上海交通大学医学院实验动物中心,可自由饮食和活动。饲养环境温度 25 °C,相对湿度 40~60%,光照每 12 h 明暗交替。实验动物相关操作均符合上海交通大学医学院动物伦理。对照组(CON 组)小鼠数量为 6 只,3 只用于免疫荧光染色,3 只用于高尔基染色。消融组(DTA 组)小鼠数量为 18 只,15 只用于免疫荧光染色(每个病毒滴度 3 只),3 只用于高尔基染色。

1.1.2 主要试剂及仪器 AAV-hSyn-mCherry-P2A-Cre-WPRE 和 AAV-EF1a-mCherry-FLEX-DTA-WPRE 病毒颗粒购自和元生物技术(上海)有限公司;山羊血清购自北京兰博利德商贸有限公司;兔抗小鼠 NeuN 多克隆抗体购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;牛血清白蛋白和山羊抗兔 Alexa Fluor FITC 荧光二抗购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;磷酸缓冲盐粉末(PBS)、Triton X-100 和抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)购自上海碧云天生物技术有限公司;高尔基染色试剂盒(FD Neuro Tech);OCT 包埋剂(Sakura Finetek)。

小鼠脑立体定位仪(68018,深圳瑞沃德);微型手持颅骨钻(78001,深圳瑞沃德);玻璃电极注射泵(R-480,深圳瑞沃德);玻璃微电极拉制仪器(P-97,美国 Sutter);冰冻切片仪(CM1950,德国 LEICA);研究级全玻片扫描系统(VS200,日本 Olympus);共聚焦显微镜(FV3000,日本 Olympus)。

1.2 实验方法

1.2.1 脑立体定位病毒注射 为了减少视皮层神经元数量,本研究采用了病毒联合使用策略(图 1A),消融组以 1:1 比例混

合 AAV-hSyn-mCherry-P2A-Cre-WPRE 和 AAV-EF1a-mCherry-FLEX-DTA-WPRE 后注射,对照组仅注射 AAV-hSyn-mCherry-P2A-Cre-WPRE。小鼠以 5%异氟烷麻醉后,将小鼠头部毛发剔除,接着将小鼠固定于立体定位仪并以 1.5%异氟烷维持麻醉。以碘伏涂抹消毒小鼠头部皮肤后,剪开小鼠头部皮肤暴露颅骨。对右侧初级视皮层(前囟-2.8 mm,旁开 2.5 mm,深度 0.7 mm)对应的颅骨表面使用颅骨钻开孔,再用玻璃电极注射泵以 60 nL/min 速度注射 500 nL 病毒,注射完毕停针 8 min。

1.2.2 组织取样及脑片制备 病毒注射 4 周后,小鼠以 10%戊巴比妥钠深度麻醉,先经心脏灌流 PBS 溶液 20 mL,再灌流 20 mL 的 4%多聚甲醛。断头取脑后放置于 4%多聚甲醛中固定过夜,随后以 30%蔗糖溶液充分脱水至脑组织沉底。以 OCT 包埋剂包埋脑组织,用冰冻切片仪进行厚度为 35 μm 的冠状切片,并将其贴附于载玻片上。挑选含初级视皮层的脑片用于后续免疫荧光染色。

1.2.3 免疫荧光染色 以 PBS 溶液漂洗挑选出的脑片,漂洗后用封闭液(含 5%山羊血清、3%牛血清和 0.4% Triton X-100)室温封闭 2 小时。封闭结束,吸除封闭液,加入兔抗小鼠 NeuN 多克隆抗体一抗液(1:3000),室温放置 2 小时后放 4°C 冰箱孵育过夜。一抗孵育完成后,PBS 溶液充分漂洗 3 次,随后加入 Alexa Fluor FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗液(1:250),室温避光孵育 2 小时后 PBS 充分漂洗 3 次,最后用含 DAPI 的封片剂进行封片。

1.2.4 高尔基染色 病毒注射 4 周后,小鼠以 10%戊巴比妥钠深度麻醉,断头取脑。按照高尔基染色试剂盒(FD NeuroTech)说明书,室温避光条件下以等体积的溶液 A 和溶液 B 混合液浸泡小鼠脑组织,12 小时后更换相同浸泡液,之后连续浸泡 2 周。在 4°C 避光条件下以溶液 C 浸泡脑组织,12 小时后更换相同浸泡液,之后浸泡 2-3 天。用水包埋脑组织,接着于冰冻切片仪上进行厚度为 100 μm 的冠状切片,并将其贴附于凝胶包被的载玻片上。室温避光干燥后,挑选含初级视皮层的脑片用于后续染色。按照说明书进行染色,最后用中性树脂封片。

1.2.5 图像采集与分析 使用研究级全玻片扫描系统 VS200 对脑切片进行荧光成像,观察注射位点病毒表达和 NeuN 免疫荧光染色情况。使用共聚焦显微镜拍摄树突棘形态。利用 ImageJ 软件对图像进行细胞计数、树突棘密度与树突棘成熟度等分析。NeuN+ 神经元计数:每组准备 3 只小鼠,每只小鼠选取 3 张脑切片,以这 3 张脑切片 NeuN+ 神经元个数的均值为该只小鼠的 NeuN+ 神经元计数,数据以每 mm² 浅层视皮层脑组织所含的 NeuN+ 神经元个数呈现(NeuN+ cells/mm²),1 只小鼠为 1 个样本量。树突棘密度与树突棘成熟度分析:每组准备 3 只小鼠,每只小鼠选取 3 张脑切片,每张脑切片选取 3 个锥体神经元,每个神经元选取 2-4 条顶树突(apical dendrite)距离胞体不超过 100 μm 的初级分支(primary branch)进行分析,树突棘密度表示为每 10 μm 树突长度所含树突棘个数(spines/10 μm),树突棘成熟度为成熟树突棘个数占总树突棘个数的百分比(mature spines%),以这 3 个锥体神经元初级分支的分析均值为该脑切片的数据,1 个脑切片为 1 个样本量。

1.3 统计学分析

通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析和作图。数据采用非配对 t 检验进行分析,所有数据用均值±标准差(Mean ± SD)表示, $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 构建成年期视皮层神经元减少小鼠模型

为了特异地减少成年期皮层神经元数量,本研究采用腺相关病毒(Adeno-associated viruses, AAVs)稀疏感染方式于小鼠初级视皮层(Primary visual cortex, V1)部分神经元中表达 DTA

(图 1A)。DTA 具备抑制细胞内蛋白合成的强大能力,极少量的 DTA 表达即可迅速导致细胞凋亡,可高效及特异地消融神经元。对照组注射 AAV-hSyn-mCherry-P2A-Cre-WPRE 病毒。脑片免疫荧光染色及荧光显微镜成像显示病毒注射位置的部分细胞表达红色荧光蛋白 mCherry,且仅分布在 V1 中(图 1B)。此外,这些病毒感染的细胞绝大部分与成熟神经元标记物 NeuN 共标(图 1C)。以上表明 Cre 重组酶特异表达在视皮层的成熟神经元中。基于此,于 V1 中注射 1:1 比例混合的 AAV-hSyn-mCherry-P2A-Cre-WPRE 和 AAV-EF1a-mCherry-FLEX-DTA-WPRE 病毒可构建消融组模型小鼠。

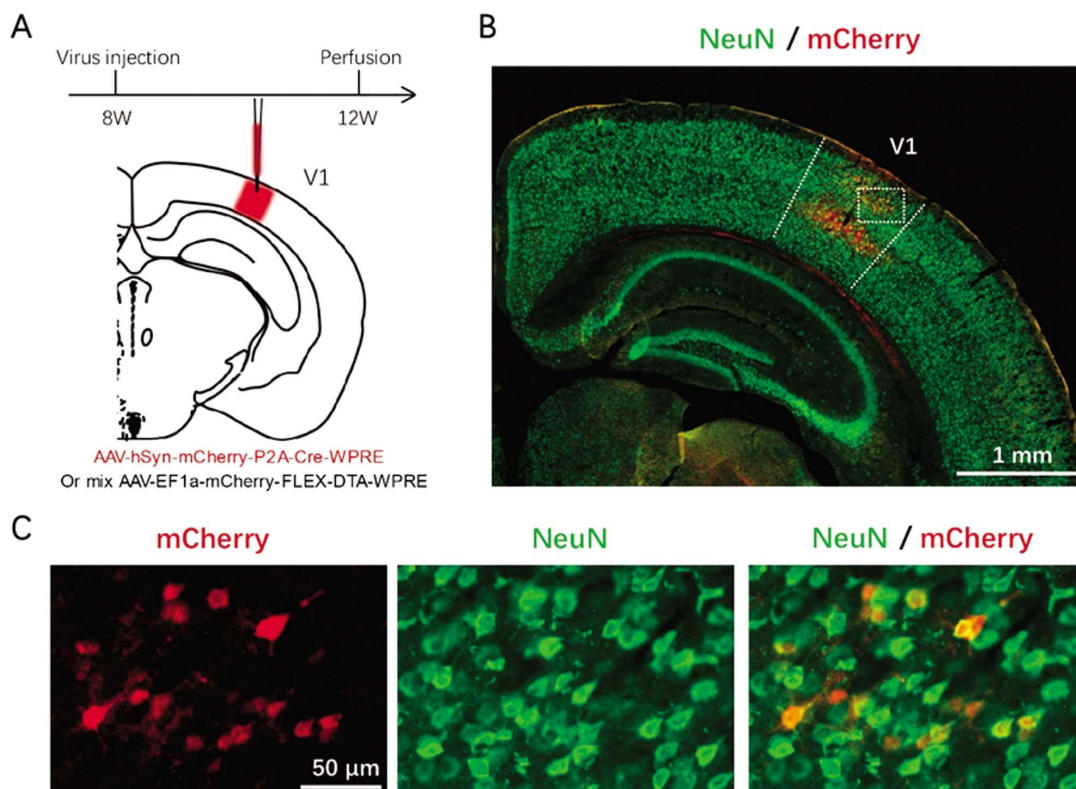


图 1 病毒注射位点及荧光蛋白在 V1 神经元表达示意图

注:A:实验设计和病毒注射位点示意图。B:荧光蛋白 mCherry 的表达局限分布于 V1(比例尺:1 mm)。C:mCherry 和神经元标记物 NeuN 共表达(比例尺:50 μm),放大于(B)中点状方框区域。

Fig.1 Diagram of viral injection site and expression of fluorescent proteins in V1 neurons

Note: A: Experimental design and virus injection at V1. B: Fluorescent protein mCherry expression was restricted to V1 (scale bar: 1 mm).

C: Co-expression of mCherry and neuronal marker NeuN (scale bar: 50 μm). These are magnified images of the dotted square region from (B).

病毒滴度的调整可改变 DTA 表达病毒在视皮层中感染神经元的数量,以此构建不同程度的神经元数量减少小鼠模型。对照组 NeuN+ 神经元分布致密(图 2A),其数量与未注射病毒的小鼠相比无差异($P=0.3106$)。消融组 NeuN+ 神经元分布稀疏,该现象在皮层浅层(第 2-4 层)特别明显(图 2B)。NeuN+ 神经元计数显示低滴度(E+11)消融组小鼠 V1 第 2-4 层 NeuN+ 神经元数量显著少于对照组(DTA vs CON: $1269.44 \pm 69.81/\text{mm}^2$ vs $1545.00 \pm 16.91/\text{mm}^2$, $P < 0.01$)(图 2C)。此外,以对照组(CON E+11)为消融比例基线,随着 DTA 病毒滴度的增加(E+11-13),V1 第 2-4 层神经元被消融的比例逐渐增高,从 $17.84 \pm 4.52\%$ 到 $84.68 \pm 0.79\%$ (图 2D)。因此,后续以低滴度(E+11)消融组小鼠(神经元减少 ~18%)作为模型,研究突触连

接可能的变化。

2.2 视皮层神经元数量的减少降低树突棘成熟比例

树突形态及树突棘密度和成熟度可反映神经元之间突触连接的模式和强度,是大脑神经元活性及功能的重要结构基础。高尔基染色结果显示消融组与对照组锥体神经元的树突分支(branching)复杂度没有差异(图 3A-B)。此外,消融组的树突棘密度与对照组也没有差异(DTA vs CON: 6.78 ± 0.73 vs $6.85 \pm 1.04/10 \mu\text{m}$, $P=0.8840$)(图 3C),然而其树突棘成熟比例显著低于对照组(DTA vs CON: $51.89 \pm 4.82\%$ vs $64.43 \pm 3.82\%$, $P < 0.0001$),降低了 ~19%(图 3D)。以上实验表明,视皮层神经元数量的部分减少,降低了幸存神经元树突棘成熟比例。

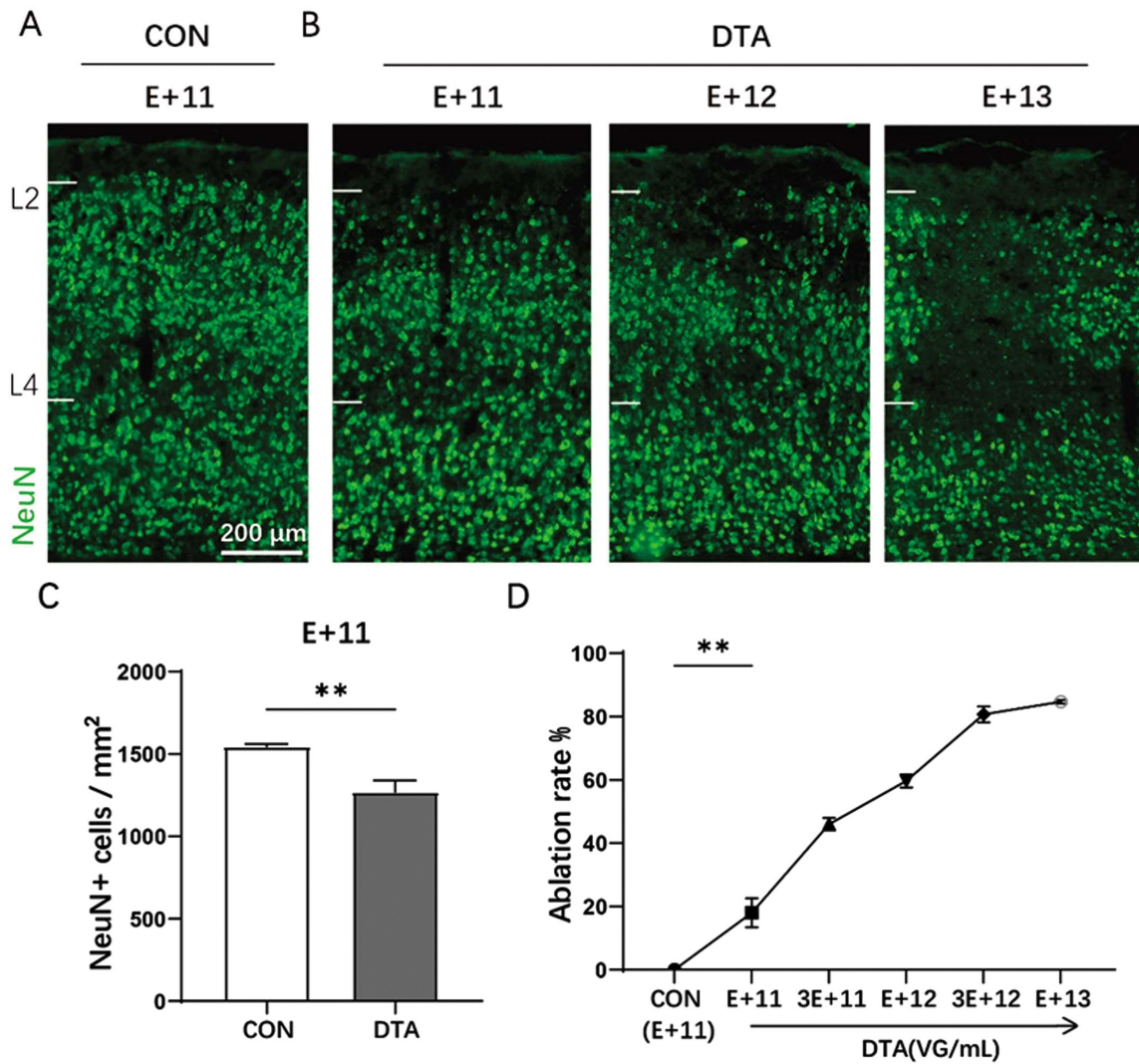


图2 成年期 V1 神经元被不同程度消融的小鼠模型

注:A:E+11 滴度下对照组 NeuN 阳性神经元在 V1 染色情况(比例尺:200 μm)。B:不同滴度下消融组 NeuN 阳性神经元在 V1 染色情况。C:消融组 V1 浅层 NeuN 阳性神经元的计数显著少于对照组。D:神经元消融比例随着 DTA 表达病毒的滴度增加而上升。数据以 Mean ± SD 表示,数据量为 3,**P<0.01。

Fig.2 Adult mouse models with various levels of neuronal ablation in V1

Note: A: NeuN+ neurons in V1 of the control group at a titer of E+11 (scale bar: 200 μm). B: NeuN+ neurons in V1 of the DTA group that received injection of different titers of DTA-expressing viruses. C: DTA expression group exhibited significant neuronal reduction in the upper layers of V1.

D: The rate of neuronal ablation increased with the titers of DTA-expressing AAV viruses. Data were expressed as Mean ± SD, n=3, **P<0.01.

3 讨论

本研究以小鼠为实验对象,通过在视皮层定位注射低滴度的腺相关病毒,表达 Cre 重组酶依赖的白喉毒素 A 片段蛋白(DTA)于部分神经元内,特异性地消融浅层神经元。一项对 17 名轻度创伤性脑损伤患者的研究发现,其皮层神经元损失在 16.5~22.9%范围内^[25]。低滴度(E+11)消融组小鼠表现出部分神经元减少(~18%),与轻度创伤性脑损伤患者的神经元损失程度相近,因此我们将其作为主要研究对象。在本模型中,未表达 DTA 的单个锥体神经元的成熟树突棘比例下降了~19%,而其树突棘密度没有明显改变。由于模型小鼠的神经元数量减少~18%,据此推测成熟和总体树突棘(成熟+不成熟)的密度分别下降~34% $[1-(1-18%) \times (1-19%)=0.34]$ 及~20% $[1-(1-18%) \times (1-2%)=0.2]$ 。这提示视皮层神经元数量的减少显著降低突触连

接密度及强度,可能是创伤性脑损伤导致功能障碍的原因之一。

大脑枕叶皮层损伤在创伤性脑损伤病患中很常见,因而大部分患者伴随视觉功能障碍^[10-13]。目前多数视皮层创伤导致视觉功能异常的动物模型不适合研究神经元数量减少本身(而非胶质细胞、神经炎症等)如何改变视觉功能^[19-22]。本研究利用细胞内表达 DTA 实现特异性消融神经元,主要基于以下三点考虑:1)DTA 具备抑制细胞内蛋白合成的强大能力,极少量的 DTA 表达即可迅速导致细胞凋亡。2)从细胞中释放出来的 DTA 不具毒性,由于没有白喉毒素 B 片段的帮助,其无法进入细胞,因而也不会导致误杀周围的其它细胞。3)通过将 DTA 的表达置于 Cre 重组酶的调控之下,采用双病毒混合注射的方式,既可使 DTA 特异性表达于神经元中,又可实现 DTA 表达病毒的有效稀疏感染,仅杀死小部分神经细胞。以上 DTA 蛋白的特点^[26]

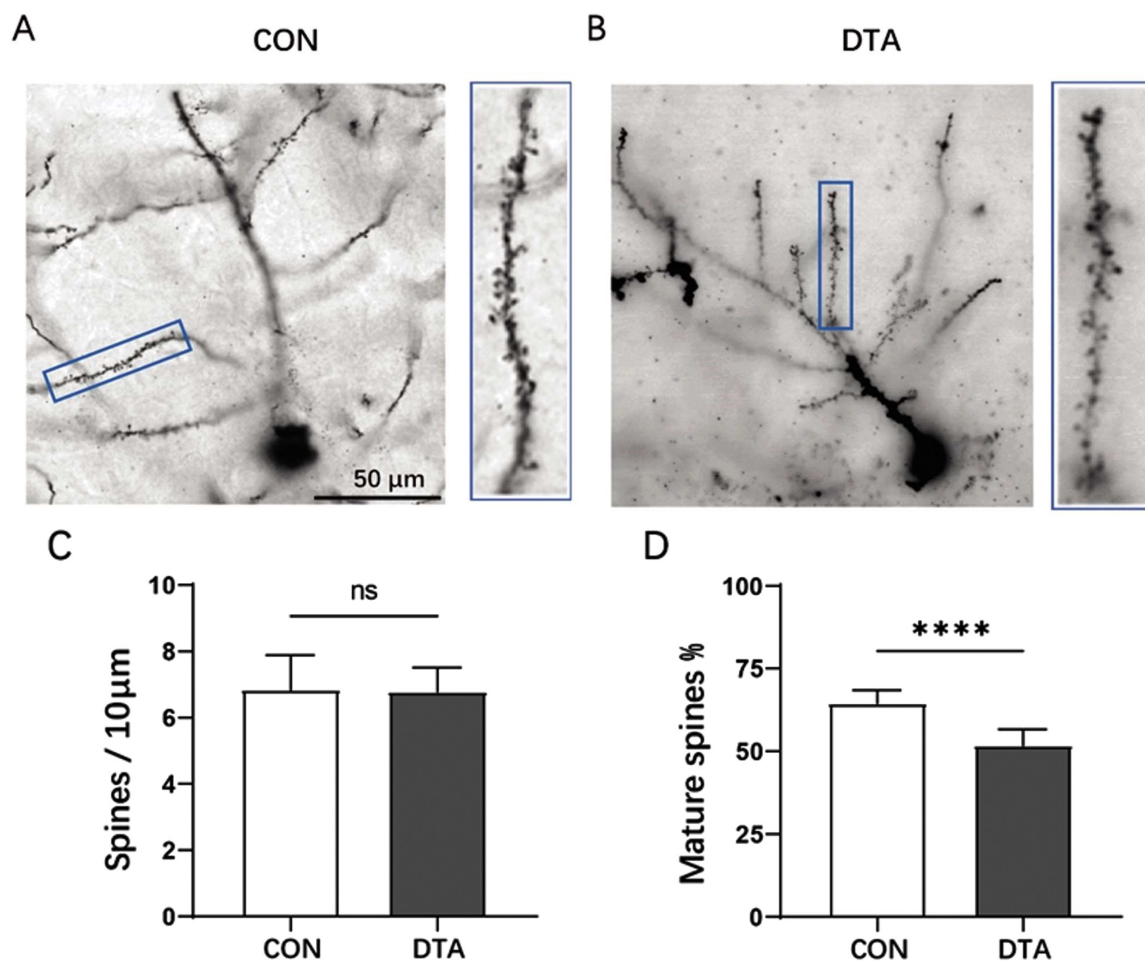


图3 视皮层神经元数量减少降低树突棘成熟比例

注:A-B:对照组和消融组浅层V1锥体神经元的树突形态(比例尺:50 µm)。C:对照组和消融组浅层V1锥体神经元的树突密度没有差异。

D:消融组浅层V1锥体神经元的树突成熟比例显著少于对照组。数据以 Mean ± SD 表示,数据量为9,**** $p < 0.0001$ 。

Fig.3 Reduction of neuronal number in visual cortex decreases the proportion of mature dendritic spines

Note: A-B: Dendritic spine morphology of upper-layer V1 pyramidal neurons in the control and DTA groups (scale bar: 50 µm). C: Dendritic spine density in upper-layer V1 pyramidal neurons was similar in control and DTA groups. D: The proportion of mature spines was significantly reduced in the DTA group. Data were expressed as Mean ± SD, $n=9$, **** $p < 0.0001$.

决定了其在细胞内表达不至于诱发持久及强烈的炎症及免疫反应。综上,本研究的造模方式具有传统物理损伤及激光杀伤等方式所不具备的独特优势,适合用于探究神经元死亡如何改变幸存神经元突触连接。

大脑的正常功能取决于神经元之间合适的突触连接^[27]。一般来说,神经元数量减少应该会降低神经元之间的结构连接,表现为单个神经元的突触密度下降。然而本研究结果显示幸存神经元的树突棘密度没有明显变化,提示神经元之间的突触连接存在补偿机制,可维持合适的连接水平,这应与突触的稳态可塑性(homeostasis plasticity)相关^[28]。另外,本研究显示幸存神经元的树突棘成熟比例下降,可能提示新形成的突触连接成熟较慢/较差,或者旧的突触连接变得更不稳定,或二者兼而有之^[29]。由于树突棘数量及成熟度的调控机制不同^[30],对于神经元数量减少如何差异化地调节它们,仍有待深入研究。本研究构建的动物模型提供了一个机会,可在模拟脑创伤的条件下,探索部分神经元死亡调节周围皮层突触可塑性的分子机制。

综上所述,本研究通过特异性消融成年期视皮层神经元,建立一个模拟创伤性脑损伤中神经元减少的小鼠模型,并初步

观测分析视皮层锥体神经元树突棘的形态改变,为理解创伤性脑损伤引起的视觉功能障碍提供了新的实验支持。

参考文献(References)

- [1] Hofman M A. Evolution of the human brain: when bigger is better[J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2014, 8: 15.
- [2] Heide M, Huttner W B. Human-Specific Genes, Cortical Progenitor Cells, and Microcephaly[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1209.
- [3] Leibovitz Z, Lerman-Sagie T, Haddad L. Fetal Brain Development: Regulating Processes and Related Malformations [J]. *Life (Basel, Switzerland)*, 2022, 12(6): 809.
- [4] Heavner W E, Smith S E P. Resolving the Synaptic versus Developmental Dichotomy of Autism Risk Genes [J]. *Trends in Neurosciences*, 2020, 43(4): 227-241.
- [5] Akamatsu Y, Hanafy K A. Cell Death and Recovery in Traumatic Brain Injury [J]. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2020, 17(2): 446-456.
- [6] Piliipenko V, Dzirkale Z, Rozkalne R, et al. Focal Cerebral Ischemia Induces Global Subacute Changes in the Number of Neuroblasts and Neurons and the Angiogenic Factor Density in Mice [J]. *Medicina*

- (Kaunas, Lithuania), 2023, 59(12): 2168.
- [7] Shu S, Xu S Y, Ye L, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons deficits mediate early emotional dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2023, 48(2): 391-401.
- [8] Najem D, Rennie K, Ribocco-Lutkiewicz M, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers [J]. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 2018, 96(4): 391-406.
- [9] Conti A C, Raghupathi R, Trojanowski J Q, et al. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period [J]. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 1998, 18 (15): 5663-5672.
- [10] Armstrong R A. Visual problems associated with traumatic brain injury [J]. *Clinical & Experimental Optometry*, 2018, 101 (6): 716-726.
- [11] Sen N. An insight into the vision impairment following traumatic brain injury[J]. *Neurochemistry International*, 2017, 111: 103-107.
- [12] Rauchman S H, Zubair A, Jacob B, et al. Traumatic brain injury: Mechanisms, manifestations, and visual sequelae [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2023, 17: 1090672.
- [13] Mundinano I C, Chen J, de Souza M, et al. More than blindsight: Case report of a child with extraordinary visual capacity following perinatal bilateral occipital lobe injury [J]. *Neuropsychologia*, 2019, 128: 178-186.
- [14] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Remodeling dendritic spines for treatment of traumatic brain injury[J]. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(9): 1477-1480.
- [15] Zhao J, Huynh J, Hylin M J, et al. Mild Traumatic Brain Injury Reduces Spine Density of Projection Neurons in the Medial Prefrontal Cortex and Impairs Extinction of Contextual Fear Memory[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2018, 35(1): 149-156.
- [16] Gao X, Deng P, Xu Z C, et al. Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus[J]. *PloS One*, 2011, 6(9): e24566.
- [17] Campbell J N, Low B, Kurz J E, et al. Mechanisms of dendritic spine remodeling in a rat model of traumatic brain injury [J]. *Journal of Neurotrauma*, 2012, 29(2): 218-234.
- [18] Warling A, Uchida R, Shin H, et al. Putative dendritic correlates of chronic traumatic encephalopathy: A preliminary quantitative Golgi exploration[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2021, 529(7): 1308-1326.
- [19] Frankowski J C, Foik A T, Tierno A, et al. Traumatic brain injury to primary visual cortex produces long-lasting circuit dysfunction [J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 1297.
- [20] Eysel U T, Schweigart G. Increased receptive field size in the surround of chronic lesions in the adult cat visual cortex [J]. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 1999, 9(2): 101-109.
- [21] Girard P, Salin P A, Bullier J. Visual activity in macaque area V4 depends on area 17 input[J]. *Neuroreport*, 1991, 2(2): 81-84.
- [22] Imbrosci B, Eysel U T, Mittmann T. Metaplasticity of horizontal connections in the vicinity of focal laser lesions in rat visual cortex[J]. *The Journal of Physiology*, 2010, 588(Pt 23): 4695-4703.
- [23] Luo Y, Zou H, Wu Y, et al. Mild traumatic brain injury induces memory deficits with alteration of gene expression profile [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10846.
- [24] Yuan M, Wu H. Astrocytes in the Traumatic Brain Injury: the Good and the Bad[J]. *Experimental Neurology*, 2022, 348: 113943.
- [25] Nakagawara J, Kamiyama K, Takahashi M, et al. Cortical neuron loss in post-traumatic higher brain dysfunction using (123)I-iomazenil SPECT[J]. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 2013, 118: 245-250.
- [26] Collier R J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century [J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2001, 39 (11): 1793-1803.
- [27] Chidambaram S B, Rathipriya A G, Bolla S R, et al. Dendritic spines: Revisiting the physiological role [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2019, 92: 161-193.
- [28] Whitt J L, Petrus E, Lee H K. Experience-dependent homeostatic synaptic plasticity in neocortex [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 78: 45-54.
- [29] Parajuli L K, Tanaka S, Okabe S. Insights into age-old questions of new dendritic spines: From form to function [J]. *Brain Research Bulletin*, 2017, 129: 3-11.
- [30] Khanal P, Hotulainen P. Dendritic Spine Initiation in Brain Development, Learning and Diseases and Impact of BAR-Domain Proteins[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2392.