

酪氨酸羟化酶免疫反应神经元 在金黄地鼠视网膜的定位和分布^①

廖八根^② 李海标

(中山医科大学组织胚胎学教研室; 广州, 510089)

摘要 应用免疫组化 ABC法研究了金黄地鼠视网膜酪氨酸羟化酶免疫反应 (TH⁺R)神经元的定位和分布。结果表明 84.6% 的 TH⁺R 神经元是无长突细胞或网间细胞; 15.4% 是移位无长突细胞或视网膜节细胞 (RGC)。TH⁺R 细胞突起主要分布在内网层 (IPL) 的第 1 亚层。TH⁺R 神经元分布于视网膜中央区和周围区, 其密度为 (22.4 ± 1.5) 个 /mm²。颞上区密度最高, 为 (29.1 ± 3.2) 个 /mm²。TH⁺R 无长突细胞多为星形。在节细胞层 (GCL) 的 TH⁺R 细胞均为中小型神经元, 胞体直径约为 7~16 μm, 它们的突起分支在 IPL 的第 1 亚层。荧光素逆行标记结合间接免疫荧光组化的双标研究, 表明金黄地鼠视网膜的 GCL 内, 部分 TH⁺R 神经元是 RGC。TH⁺R RGC 数目约为 (55 ± 7) 个, 约占 GCL 的 TH⁺R 神经元的 45%。

主题词 视网膜神经节细胞 细胞学; 酪氨酸单氧化酶

中图分类号 R 322.81

过去的研究^[1,2]表明视网膜多巴胺 (DA) 能神经元是视网膜无长突细胞 (AC) 和网间细胞 (IPC)。最近有报道^[3]在鸟类视网膜除有酪氨酸羟化酶免疫活性 (TH⁺R) AG-IPG 移位无长突细胞 (DAC) 外, 还有 TH⁺R 视网膜节细胞 (RGC)。RGC 是视网膜唯一传出神经元, 研究它含有什么神经活性物质对阐明视信息在视网膜及视中枢的处理有重要意义。然而有关此方面的研究目前尚少, 且多集中于非哺乳动物的视网膜^[3-5]。TH 是酪氨酸转化成 DA 的限速酶, 常被用作 DA 能神经元免疫组化标记酶。本实验对金黄地鼠视网膜的 TH⁺R 神经元的定位、分布进行了研究, 并着重研究金黄地鼠视网膜是否有 TH⁺R RGC, 以及这些 TH⁺R RGC 的形成、分布、密度等。

1 材料和方法

1.1 材料

金黄地鼠 20 只, 年龄 6~8 周。其中 10 只用于视网膜切片和铺片; 5 只用于荧光素逆行标记; 5 只用于单侧视神经切断术。动物用 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔麻醉后, 打开胸腔, 先用生理盐水左心室灌注, 接着用 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲

液, pH 7.3) 灌注固定, 灌注完毕断头取双侧眼球。视网膜切片和铺片依文献方法^[11]。

1.2 免疫组化学染色

除用 1:3 000 兔抗 TH 抗体 (美国 Eugene Tech 公司) 取代相应的一抗外, 其它依文献方法^[11]。

1.3 荧光素逆行标记结合免疫荧光组化法

金黄地鼠开颅后, 用吸引器吸去覆于上丘上方的大脑皮质, 暴露双侧上丘, 用沾有 3% 粒蓝 (granular blue, 德国 Merk 公司) 的明胶海绵置于上丘表面, 3 d 后取视网膜做 TH 间接免疫荧光组化, 荧光抗体用 1:100 PBS 稀释的罗达明 (RITC, 美国 Cappel 公司) 结合的羊抗兔抗体。粒蓝和 RITC 分别用激发光 400 nm 和 580 nm 的滤光片在 Nikon 荧光镜下观察。

1.4 单侧视神经切断术

于球后 1~2 mm 处切断一侧视神经, 术后存活 2 个月取正常侧和切断侧眼球的视网膜同时做 TH 免疫组化。结果对照分析。

1.5 对照实验

分别用 PBS 和正常兔血清代替一抗外, 其它步骤相同。

1.6 形态计量分析

铺片细胞计数方法参照 Giorgi 等^[6], 即用网格

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1966年生, 男, 硕士, 讲师, 现在广州体育学院运动医学教研室 (广州, 510076)。

测微计进行细胞计数。胞体直径用显微微尺测量。

2 结果

2.1 TH₁R 细胞的形态与类型

绝大多数 TH₁R 细胞胞体位于内核层 (INL) 内缘,少数位于节细胞层 (GCL),而 TH₁R 纤维则主要位于内网层 (IPL) 的第 1 亚层,偶见稀少的突起分布于 IPL 的第 2 3 亚层和外网层 (OPL)(图 1,图 2B)。TH₁R 细胞胞体直径约为 7~20 μm 我们随机观察了 805 个 TH₁R 阳性细胞,胞体位于 INL 的为 684 个,占 84.6%;胞体位于 GCL 的为 121 个,占

15.4%。胞体位于 INL 的 TH₁R 细胞是 AC 或 IPC;而胞体位于 GCL 的为 DAC 或 RGC 常见位于 INL 的 TH₁R 胞体发出 1~3 个细小的主树突伸向并在 IPL 第 1 亚层发枝(图 2B,2C);可见少数胞体发出 2 个方向相反的主树突,然后分枝并伸向 IPL 第 1 亚层形成致密的网丛(图 2D);此外还可见 TH₁R IPC,胞体位于 INL 内缘发出突起伸向并在 IPL 的第 1 亚层分枝,并有串珠状突起从胞体或树突发出伸向 OPL(图 2A)。胞体位于 GCL 的 TH₁R 细胞胞体多为圆形或卵圆形,直径约为 7~16 μm,发出 1~2 支树突伸向并在 IPL 第 1 亚层分枝(图 2E)。

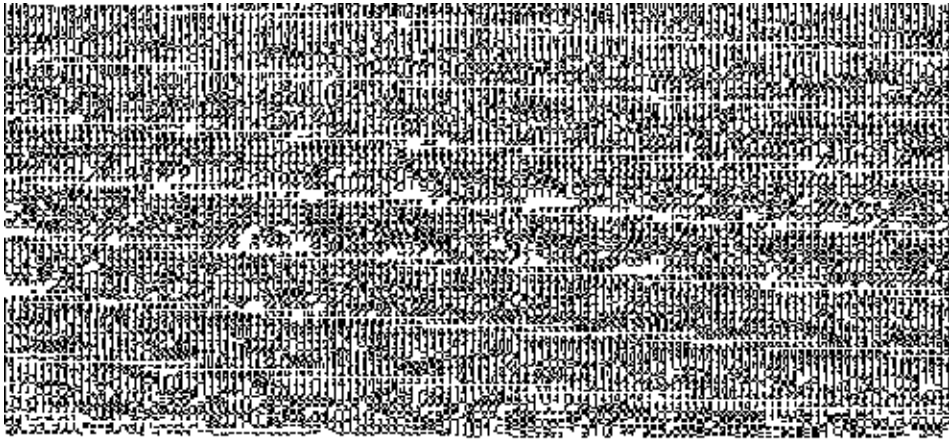


图 1 TH₁R 神经元视网膜切片

无长突细胞(◆);节细胞或移位无长突细胞(◆);TH₁R 纤维(▲)。标尺为 10 μm

图 2 各种形态的 TH₁R 神经元视网膜切片

A 示网间细胞体(◆),TH 阳性纤维(↑)。B 示位于 INL 的 TH 细胞发出单个突起伸入 IPL(▲)。C 示位于 INL 的 TH 细胞发出 3 个突起(▲)伸入 IPL。D 示位于 INL 的 TH 细胞发出 2 个方向相反的突起(▲)。E 示位于 GCL 的 TH₁R 细胞胞体(◆)及突起(▲)。标尺为 10 μm

2.2 TH₁R 细胞的分布和密度

TH₁R 细胞分散分布于视网膜的中央区和周围区,密度为 (22.4 ± 1.5) 个/mm²(表 1) 比较颞

上、颞下、鼻上、鼻下四个区域的 TH₁R 细胞密度,发现颞上区密度最高,为 (29.1 ± 3.2) 个/mm²,与其它区有显著差异 ($P < 0.05$)。

表 1 TH₁R 细胞在视网膜四个区域的平均密度 (个/mm²)

| 视网膜片 | 细胞数 | 整个视网膜 | 颞上区 | 颞下区 | 鼻上区 | 鼻下区 |
|------|------|-------|------|------|------|------|
| 1 | 906 | 21.6 | 28.8 | 18.6 | 19.7 | 20.5 |
| 2 | 871 | 22.9 | 30.9 | 23.1 | 20.9 | 17.6 |
| 3 | 1050 | 22.8 | 27.6 | 22.8 | 20.2 | 19.8 |
| 平均 | 942 | 22.4 | 29.1 | 21.5 | 20.3 | 19.3 |

2.3 TH-I R 细胞树突野形态

绝大多数在 INL 的 TH-I R 无长突细胞为星形, 从胞体发出 3 个或多个主树突, 伸向各个方向; 少数从胞体发出 2 个方向相反的主树突, 再从主树突发出短小突起(图 3)。另外我们跟踪了一些染色好的 TH-I R 细胞, 其树突可长达 290~400 μm 位于 GCL 的 TH-I R 细胞多为圆形或卵圆形, 直径 7~16 μm , 从胞体可发出 1~2 个主树突(图 4)。

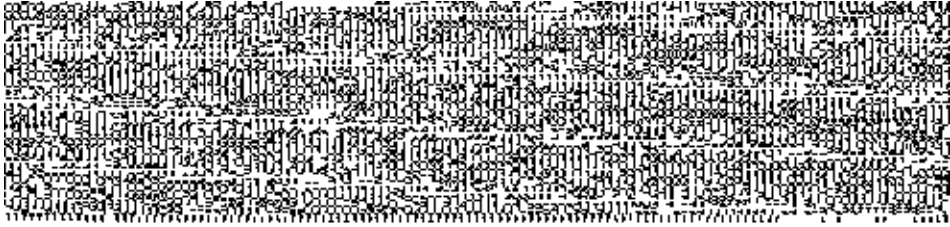


图 3 聚焦在 INL 的视网膜铺片

TH-I R 细胞的胞体(◆)及其突起(▲)



图 4 聚焦在 GCL 的视网膜铺片

位于 GCL 的 TH-I R 神经元胞体(◇)及其突起(▲),



图 5 粒蓝逆行标记结合间接免疫荧光双标视网膜平铺片

A 示 TH-I R AC(◆); B 中同一位置上(◆)未见该细胞有粒蓝标记; C 示 TH-I R RGC(◆), D 中同一位置上可见该细胞有粒蓝标记(◆)

2.5 单侧视神经切断术 TH-I R 细胞数变化

每个正常视网膜的 GCL 有 (12 \pm 28) 个 TH-I R 细胞, 但切断视神经 2 个月后, 切断侧视网膜 GCL 的 TH-I R 细胞数只有 (66 \pm 21) 个, 减少 (55 \pm 7) 个。

2.6 对照组结果

对照组未见阳性反应细胞和突起。

3 讨论

3.1 TH-I R 细胞的类型、分布与密度

2.4 荧光素逆行标记结合免疫组化双标结果

荧光素逆行标记的 RGC 在 400 nm 的滤光片下呈黄绿色, 而 RITC 间接荧光法显示的 TH-I R 细胞在滤光片 580 nm 下呈红色。在双标研究中, GCL 可见三种类型的细胞: 1. 只被粒蓝标记的 RGC; 2. 只有 TH-I R 的 DAC; 3. 既被粒蓝标记又有 TH-I R 的细胞即 TH-I R RGC。后者多为中小型的 RGC, 可见胞体发出 1~2 个主树突(图 5)。

既往研究^[2,7]表明哺乳类动物视网膜 TH-I R 细胞是 AG DAC 和 IPC。本文结果表明 TH 除定位于上述细胞外, 还定位于 RGC, TH-I R AG DAC 和 IPC 形态、分布、密度与以前大鼠和其它哺乳动物视网膜的研究相一致^[7]。

3.2 TH-I R RGC 细胞的形态、分布、密度

以前在各种脊椎视网膜 TH 的定位研究中^[2,7], 均观察到有少部分 TH-I R 细胞的胞体在 GCL, 一般根据未见轴突从阳性细胞体发出, 把它们暂定为 DAC^[2]。最近的研究^[3,5]表明 RGC 含有多种神经活性物质。我们通过荧光素逆行标记结合免疫组化双标技术证明哺乳动物视网膜含有 TH-I R RGC, 其

形态与 Drecher 等^[8]描述的一类中小型 RGC 相似。比较视神经切断侧和正常侧视网膜 GCL 的 TH⁺R 细胞数,估计每个视网膜约有 TH⁺R RGC (55 ± 7) 个,它只占金黄地鼠 RGC 总数 (7 万~8 万)^[9] 的极微小一部分,但却占 GCL 的 TH⁺R 细胞数的 45%。切断视神经 2 个月后虽有极少数 RGC 可存活达 15 个月之久,但绝大部分 RGC 皆死亡^[10],故对 TH⁺R RGC 的数目的估计无多大影响。

3.3 TH⁺R 细胞的功能意义

TH 是 DA 合成的限速酶,但 DA 分别可在多巴胺 β 羟化酶和苯乙醇胺-N-甲基移位酶作用下生成去甲肾上腺素和肾上腺素,故是否全部视网膜的 TH⁺R 细胞均是 DA 能,目前意见尚不一致。纵观有关 TH 定位研究均认为深染色的 TH⁺R 细胞是 DA 能^[2,7]。

研究^[1]已证明 DA 在视网膜信息处理过程中起神经递质和调质作用。电镜观察表明^[1]视网膜 DA 能 AC 只与其它 AC 形成突触联系,通过后者调整视杆通路的信息传递。在硬骨鱼有证据显示 DA 在视网膜起神经调质作用,它主要通过 DA 能 IPC 作用于水平细胞表面的 D₁ 受体,激活腺苷酸环化酶,通过环磷酸腺苷 (cAMP) 抑压水平细胞的对光反应和缩小其感受野。

关于 TH⁺R RGC 的功能目前尚不清楚。我们的结果表明它们是属于中小型 RGC,其树突分枝在 IPL 的第 1 亚层。过去研究^[1]已表明在所有脊椎动物视网膜“撤光”中心的 RGC 的树突分枝在 IPL 的外侧份,而“给光”中心的 RGC 的树突分枝在 IPL 的内侧份。故 TH⁺R RGC 可能是“撤光”中心的 RGC。至于它们的中枢投射及其视信息的中枢处理仍有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 道林·约翰著,吴冰鑫,杨雄里译. 视网膜. 上海:上海医科大学出版社, 1989. 42~96
- 2 Kamp CW. The dopamine system of the retina. In Morgan WH, ed. Retinal Transmitter And Modulators: Models For The Brain, Vol 11. Boca Raton: CRC Press, 1985. 1~31
- 3 Britto LRG, Keyser KT, Hamassaki D, *et al.* Catecholaminergic sub-population of retinal displaced ganglion cells projects to the accessory optic nucleus in the pigeon. *J Comp Neurol*, 1987, 269(1): 107
- 4 Watt CB, Glazebrook PA, Flonack PA. Localization of substance P and GABA in retinotectal ganglion cells of the larval tiger salamander. *Visual Neurosci*, 1994, 11(3): 355
- 5 Brecha N, Jonson D, Bolz J, *et al.* Substance P immunoreactive retinal ganglion cell and their central axons terminal in the rabbit. *Nature*, 1987, 327(6118): 155
- 6 Giorgi PP, Graydon ML. Retinal wholemounts: a simple method for precise mapping. *J Neurosci Methods*, 1987, 22(2): 119
- 7 Mitrofanis J, Vigny A, Stone J. Distribution of catecholaminergic cells in the retina of the rat, guinea pig, cat, and rabbit: independence from ganglion cell distribution. *J Comp Neurol*, 1988, 267(1): 1
- 8 Dreher B. The morphology number distribution and central projects of class 1 retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Res Behav Evol*, 1985, 26(1): 10
- 9 Lau KC, Su KF, Cho EYP. Morphological changes of retinal ganglion cells regenerating axons along peripheral nerve grafts: a lucifer yellow and silver staining study. *Restor Neurosci*, 1991, 3(2): 235
- 10 Linden RC, Esberard EL. Displaced amacrine cells in the ganglion cell layer of the hamster retina. *Vision Res*, 1987, 27(7): 1071
- 11 李雯,李海标. P物质样免疫反应神经元在蟾蜍视网膜的定位和分布. *中山医科大学学报*, 1994, 15(1): 95

(1996-03-14收稿 1996-11-04修回)

LOCALIZATION AND DISTRIBUTION OF TH-IR NEURONS IN HAMSTER RETINA

Liao Bagen Li Haibiao

(Department of Histology and Embrology, Sun Yat-sen
University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The localization and distribution of TH⁺ R neurons in hamster retina was studied with immunohistochemistry ABC method. The results showed that 84.6% TH⁺ R cells were amacrine cells (AC) or interplexiform cells (IPC). 15.4% TH⁺ R neurons were displaced amacrine cells and/or ganglion cells (RGC). The processes of TH⁺ R cells ramified most heavily in sublamina 1 of innerplexiform layer (IPL). TH⁺ R cells were distributed throughout the central and periphery of the retina. The density of TH⁺ R cells was calculated to be 22.4 ± 1.5 cells per mm^2 . The highest density (29.1 ± 3.2 cell/ mm^2) of TH⁺ R cells occurred in superior-temporal retina. The majority of TH⁺ R AC exhibited a satellite appearance. The TH⁺ R cells in GCL were medium to small sized. The diameter of these neurons ranged from 7-16 μm . And their processes ascended to sublamina 1 of IPL. The double label study of fluorescence retrograde tracing combined with TH indirect immunofluorescence histochemical method showed that some TH⁺ R neurons in the GCL of hamster retina were RGC. The number of TH⁺ R RGC was estimated to be 55 ± 7 , representing 45% of the total number of TH⁺ R neurons in GCL.

Subject headings retinal ganglion cell/cytology; tyrosine 3-monoxygenase

(上接第 18 页)

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF HOMOLOGOUS CONJUNCTIVAL TRANSPLANTATION IN SD RATS

Zheng Yongxin Liu Jinling Chen Jiaqi Yang Peizeng

(Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of
Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Immunohistochemical studies were carried out to study the immunological changes in the conjunctival graft in SD rats after homologous conjunctival transplantation. Two peaks of CD₃, CD₄, CD₈ positive cells, macrophages and B cells were observed in the conjunctiva one day and four weeks after conjunctival transplantation. A large number of dendritic cells were also noted four weeks after the transplantation. All of these cells returned to normal levels 12 weeks after the transplantation. The results suggest that homologous conjunctival graft is tolerated by the recipient rats although possible immunological rejection may occur.

Subject headings conjunctiva; organ transplantation; transplantation, homologous/immunology