

P 物质样免疫反应性神经元在蟾蜍 视网膜的定位与分布^①

李 雯^② 李海标

(中山医科大学组织胚胎学教研室, 广州, 510089)

提 要 用免疫组织化学 ABC 方法, 研究 P 物质(SP)样免疫反应性神经元在蟾蜍视网膜的定位与分布。结果表明, 在 580 个免疫反应阳性细胞中, 43% 为 I 型无长突细胞, 41% 为 II 型无长突细胞, 16% 的细胞体位于节细胞层, 暂定为移位无长突细胞。SP 样免疫反应突起分布于内网层的第 1、3、5 亚层, 以第 3 亚层最丛密, 形成一致密的网层, 第 5 亚层次之, 第 1 亚层最稀少, 不形成连续的网层。在视网膜平铺片上, SP 样免疫反应细胞体均匀分布于视网膜中央区和周围区, 其密度为 536 ± 107 个/ mm^2 (平均数 \pm 标准差)。它们的树突野呈对称和非对称两型, 前者的树突野大小为 $500 \sim 700 \mu\text{m} \times 200 \sim 500 \mu\text{m}$, 后者的长突约为 $300 \sim 500 \mu\text{m}$ 。

关键词 P 物质; 免疫组织化学; 视网膜无长突细胞

中图分类号 R338

近年的研究表明, P 物质(SP)在中枢和周围神经系统以及视网膜均起神经递质或神经调质的作用^[1,2]。高压液相色谱分析和放射免疫的研究表明, 脊椎动物视网膜含有 SP 或 SP 样物质^[3]。电生理的研究显示, SP 能促进鱼类和两栖类视网膜的大多数节细胞放电^[2]。迄今, 免疫组织化学的研究表明, SP 样免疫反应物质在大多数脊椎动物视网膜定位于无长突细胞和移位无长突细胞或节细胞^[3~9]。然而, 有关 SP 样免疫反应神经元的细胞分型和它们在视网膜的分布、密度和树突野的研究尚少。

近 10 年的大量研究提示, 至少有 10 余种神经多肽存在于脊椎动物视网膜。要深入了解这些神经多肽在视网膜信息处理中的作用, 需要多学科的综合研究。两栖类视网膜具有分层明显, 细胞较大, 利于进行电生理及其它方面的精细研究之特点, 国际上常用虎蝾螈视网膜为实验模型^[7], 但国内不易获得。作者几年前已开始对蟾蜍视网膜含肽类神经进行较系统的形态学研究^[10,11]。本文是上述

系列研究的一部分, 这些研究将对进一步阐明神经肽在视网膜信息处理中的作用提供重要的形态学资料。

1 材料和方法

1.1 材 料

20 只黑眶蟾蜍, 置于自然昼夜周期饲养。快速断头取眼球, 从角巩缘处切开眼球, 去除晶状体和玻璃体, 将整个眼球后半部置于 4℃ 的 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 7.4) 中固定过夜。然后用 PB 冲洗 3 次, 放入 4℃ 的 5% 蔗糖 PB 液中过夜, 再经 30% 蔗糖 PB 液 2~6h 处置, OCT 包埋剂包埋, 冰冻切片 $16 \mu\text{m}$, 裱于涂有明胶的载玻片上。

1.2 免疫组化染色

室温下将切片用磷酸缓冲液生理盐水 (PBS) 漂洗, 在湿润的切片上滴 10% 正常羊血清孵育 45min, 接着用 1:2 000 大白鼠抗 SP 单克隆抗体 (美国 Pel Freeze Biologicals 公司) 孵育于 4℃ 冰箱过夜。生物素结合羊抗大

① 国家教委博士点基金资助课题

② 第一作者 29 岁, 女, 讲师

鼠血清(美国 Vector Lab)1:200PBS 稀释液于室温孵育2~3h。卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)1:100 PBS 稀释液室温孵育2~3h。上述每次孵育前均用 PBS 洗3次,每次5~10 min。用新鲜配制的二氨基联苯胺(Sigma 公司)和过氧化氢(0.05%)的混合液反应约4 min 显色,经 PBS 漂洗,用9:1的甘油 PBS 封片,光镜下观察。

视网膜平铺片于标本经30%蔗糖液后在室温下分离获得,然后在-20℃冰箱内进行多次冻融。视网膜平铺片的免疫组化染色与切片相同,抗体浓度均成倍增加,所有步骤所需时间均延长5倍。

1.3 细胞计数

用目镜网格和测微标尺(最小刻度为10 μ m)计数细胞和测量细胞大小。以视乳头为轴心,向视网膜鼻、颞、背、腹各侧的中央及外周区取点,计算该点单位面积(0.2 mm²)的细胞数。

1.4 对照实验

抗 SP 单克隆抗体预先用10 μ mol/L 的 SP 抗原吸收过夜(4℃),取其上清液孵育标本,其它步骤不变,结果在对照标本上未见阳性反应的细胞和突起。

2 结 果

本实验以切片检查不同类型的 SP 样免疫反应阳性神经元的百分比,视网膜平铺片检查其分布、密度和形态。

切片观察,SP 样免疫反应(SP-LI)细胞的胞体位于内核层(INL)和节细胞层(GCL),突起分布于内网层(IPL)的第1、3、5亚层,以第3亚层最明显,第5亚层次之,第1亚层最稀少。突起及其分支在第3亚层形成致密的连续网丛,在第1、5亚层呈不连续的点状(图1、图2)。在580个阳性细胞中,41%为 I 型无长突细胞(见讨论),胞体位于 INL 的最内缘(图2A-2C),呈圆形、卵圆形或多边形,直径约为8~12 μ m,常见胞体发出一个粗大的

突起伸入 IPL 的第3亚层,次级突起在此层分支并发出少量细小的突起伸到第5亚层(图2B)。少数胞体可发出几支主树突伸入 IPL 第3亚层并在此发出细小突起分支(图2C)。43%为 I 型无长突细胞,胞体位于 INL 内缘的第2或第3排细胞内,呈卵圆形,直径约8~10 μ m,从胞体发出一支细长的突起伸入 IPL 的外侧即第1、3亚层,并在此形成弥散的点状突起(图2A)。16%的 SP 样免疫反应阳性细胞体位于 GCL(图1B、图2D),胞体多为圆形或卵圆形,直径约为8~10 μ m,有时可见胞体发出突起伸入 IPL 的第5和第3亚层(图2D)。在视网膜平铺片上,观察结果与切片观察一致。大多数 SP 样免疫反应阳性细胞体位于 INL(图3A),少数位于 GCL(图3B),阳性突起主要分布于 IPL 中部,交织成网状(图4A、图4B)。

SP 样免疫反应阳性细胞大致均匀分布于视网膜的中央部和周边部。随机选择13个区域(包括中央部和周边部)的平均细胞密度为536 \pm 107个/mm²(平均数 \pm 标准差),各区之间细胞密度无显著差异($P>0.05$)。在实验中,胞体位于 GCL 的阳性细胞未作统计。

在平铺片上,SP 样免疫反应无长突细胞的树突野基本上可分为两种类型,即对称树突野和非对称树突野。前者可从胞体发出多个突起,突起及其分支从胞体向四周各方向延伸,整个树突野呈圆形或椭圆形(图4A),大小约为500~700 μ m(主轴) \times 200~500 μ m(次轴)。后者从胞体的一侧发出一支粗大的初级突起,突起在细胞的一侧再作进一步的分支,使树突野呈不对称形(图4B),树突野长轴为300~500 μ m。GCL 的 SP 样免疫反应阳性细胞体多为圆形或卵圆形,直径约为8~10 μ m,少数胞体较大,其直径可达13~15 μ m(图3B),胞体发出一个或多个突起伸入 IPL 并在此反复分支。

3 讨 论

3.1 关于 SP 样免疫反应阳性神经元的细胞类型

本实验所见 SP 样免疫阳性细胞体分别位于 INL 最内缘的第1或第2、3排细胞内,和位于 GCL 内,免疫阳性突起分布于 IPL 的第1、3、5亚层,在第3亚层形成一致密的网层。位于 INL 的 SP 样免疫阳性细胞的形态分别与 Wong-Riley^[12]用 Golgi 镀银法在猕猴视网膜所描述的 I 型和 II 型无长突细胞相似。I 型无长突细胞位于 INL 的最内缘,发出一个粗大或多个细小的突起进入 IPL。而 II 型无长突细胞则位于 INL 内缘的第2或第3排细胞内,发出单个细小突起伸入 IPL。

至于位于 GCL 的 SP 免疫阳性细胞,可能是节细胞或移位无长突细胞。在几乎所有脊椎动物的视网膜 GCL 均含有移位无长突细胞^[13]。另外,在视网膜神经肽的定位研究中,GCL 含有免疫反应阳性细胞的现象也很常见,研究者一般根据未见轴突样突起从阳性胞体发出,把它们暂定为移位无长突细胞^[6,7]。然而最近的研究表明,绝大多数位于兔和鸡视网膜 GCL 的 SP 阳性神经元是节细胞^[6,9]。还有研究提示蛙视网膜可含有少量的 SP 样免疫反应阳性节细胞^[14]。本实验所见位于蟾蜍视网膜 GCL 的 SP 阳性神经元是节细胞还是移位无长突细胞仍待进一步研究证实。

3.2 与过去研究工作的比较

关于 SP 样免疫反应物质在蛙、蟾蜍、猕猴、蜥蜴、金鱼、鸽、鸡、兔和猴等动物视网膜的定位研究,已有报道^[3]。本实验所见 SP 样免疫反应无长突细胞的形态及突起在 IPL 的分支与 Eskay^[5]等人在牛蛙视网膜的观察相似,然而 Eskay 等的研究表明 SP 样免疫反应突起分布于 IPL 的第3、4亚层,而本研究则显示 SP 阳性突起分布于 IPL 的第1、3、5亚层,以第3亚层最丛密,第5亚层次之,第1

亚层最稀少。SP 样免疫反应阳性突起分布于 IPL 的1、3、5亚层可能与其功能有关。大量的研究已表明,在脊椎动物视网膜,其 IPL 的内侧区(3~5亚层)与“给光”发放型电活动有关,而外侧区(1~2亚层)与“撤光”发放型电活动有关^[15]。本结果提示 SP 对这两种电活动有影响作用,这与有关 SP 在视网膜信息处理的电生理结果相吻合^[16]。

此外,作者还基于 Wong-Riley 的 Golgi 镀银研究的基础上对 SP 样免疫反应无长突细胞进行分类。本实验还研究了该类神经元在整体视网膜中的分布、密度和树突野的形态,这对进一步阐明 SP 在视网膜信息处理的作用提供有价值的形态学资料。

(本文图见封2)

参 考 文 献

- 1 Aronin N, Marican D, Leeman SE. et al. Substance P. In: Kreiger D, ed. Brain peptides. (in press). New York: Academic Press, 1983. 783
- 2 Brecha NC. Retinal neurotransmitters: Histochemical and biochemical studies. In: Emson PC (ed). Chemical Neuroanatomy. New York: Raven Press, 1983: 85
- 3 Brecha NC, Karten HJ. Identification and localization of neuropeptides in the vertebrate retina. In: Kreiger D, ed. Brain Peptides (in press). New York: Academic Press, 1983. 438
- 4 Brecha NC, Sharma SC, Karten HJ. Localization of substance P-like immunoreactivity in the adult and developing goldfish retina. Neuroscience, 1981, 6: 2737
- 5 Eskay RL, Furness JF, Long RJ. Substance P activity in the bullfrog retina: Localization and identification in several vertebrate species. Science, 1981, 212: 1409
- 6 Brecha NC, Hendrickson A, Floren I. Localization of substance P-like immunoreactivity within monkey retina. Invest Ophthalmol, 1982, 23: 147
- 7 Li HB, Chen NX, Watt CB. The light micro-

scopic localization of substance P and somato-
 statin-like immunoreactive cells in the larval
 tiger salamander retina. *Exp Brain Res*, 1986, 63
 :93

8 Ehrlich D, Keyser KT, Karten HJ. Distribution
 of substance P-like immunoreactive retinal gan-
 glion cells and their pattern of termination in the
 optic trectum of chick (*Gallus gallus*). *J, et al.*
Com Neurol, 1987, 266:222

9 Brecha NC, Johnson D, Boly J, et al. Substance
 P-immunoreactive retinal ganglion cells and
 their central axon terminal in the rabbit. *Nature*,
 1987, 327:155

10 杨惇生, 陈宁欣, 李海标. CCR 样免疫反应神经元
 在蟾蜍视网膜的定位与分布. *中山医科大学学
 报*, 1993, 14(3):188

11 李 雯, 李海标, 许天禄. 神经肽 Y 样免疫反应神
 经元在蟾蜍视网膜的定位与分布. *广东解剖学通
 报*, 1993, 15(1):53

12 Wong-Riley MTT. Synaotic organnization of the
 inner plexform layer in the retina of the larval
 tiger salamander. *J Neurocytol*, 1974, 3:1

13 Ehinger B, Dowling JE. Retinal neurocircuitry
 and transmission. In: Bjorklund A, Hökfelt T,
 Swanson LW, eds. *Handbook of chemical neuro-
 anatomy*. Vol 5. Amsterdam, New York,
 Oxford: Elsevier Sci Pub, 1987. 389~466

14 Kuljis RO, Karten HJ. Substanxce P-containing
 ganglion cells become progressively less de-
 tectable during retinotectal development in the
 frog *rana pipiens*. *Proc Natl Acad Sci USA*,
 1986, 83:5736

15 Wässle H, Boycott BB. Functional architecture
 of the mammalian retina. *Physiological Rev*,
 1991, 71:447

16 Glickman RD, Adolph AR, Dowling JE. Inner
 plexiform circuits in the carp retina; effets of
 cholinergic antagonists, GABA and substance P
 on the ganglion cells. *Brain Res*, 1982, 234:81

(1993-06-14收稿 1993-10-16修回)

LOCALIZATION AND DISTRIBUTION OF SUBSTANCE P-LIKE IMMUNOREACTIVE NEURONS IN THE TOAD RETINA

Li Wen Li Haibiao

(Department of Histology and Embryology Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The localization and distribution of substance P(SP)-like immunoreactive neurons in the toad retina were studied with immunohistochemistry ABC method. The result showed that of 580 SP-like immunoreactive neurons observed, 43% were Type I amacrine cells, 41% of SP-positive cells were classified as Type I amacrine cells, while 16% of SP-positive cells had their cell bodies located in ganglion cell layer(GCL) and were designated as displaced amacrine cells. The SP-immunostaining processes formed a dense band in sublamina 3 of inner plexform layre(IPL), spare immunopositive fibers could also be seen in sublamina 1 and 5 of the IPL. An examination of retinal whole mounts revealed that SP-immunoreactive neurons were distributed throughout the center and periphery of the retina. The density of SP-immunoreactive amacrine cells was calculated to be 536 ± 107 cells per $mm^2(\bar{x} \pm s)$. The dendritic fields of SP-immunoreactive amacrine cells were observed to be either symmetrically or

asymmetrically distributed about their somas. The symmetrical dendritic fields ranged in diameter from 500~700μm by 200~500μm, and the processes forming asymmetrical dendritic fields ranged from 300~500μm in length.

Key words substance P; immunohistochemistry; retinal amacrine cells

.....

·新成果·

腹膜透析改革系列研究

课题负责 李惠群

(中山医科大学附属第一医院肾脏病科,广州,510080)

该成果采用腹膜透析治疗急、慢性肾功能衰竭。在国内我们首次引进技术并进行系列改革和研究,发表论文20多篇,首次进行透析管插植的探索,对提高透析效能,减少透析管引流障碍进行研究,提出合理选择透析液渗透压及保障透析顺利进行的方法,还用中药配合提高疗效。为防治主要透析并发症,又进行了改革透析导管接卸,改良B接头和透析方式的新改革。重点研究腹腔局部防御机能及腹膜炎的防治,提出符合国情又更合理的防治方法,使腹膜炎的发生率从15.3个病人月/次降至22.7个病人月/次,接近国外先进水平。又创立浸玻片培养法监测透析中的细菌性腹膜炎,为早期诊断提供依据,系列研究成果已向全国各省市医院全面推广应用,1993年获广东省科技进步二等奖。

(陈丽芳)

急诊建设与管理

课题负责 黄子通

(中山医科大学附属孙逸仙纪念医院急诊科,广州,510120)

本成果通过分析国内外急诊医学现状,对急诊科建设与管理以及区域性急诊医疗体系建设提出适合国情的可行性设想,急诊科建设及一套综合管理方案已在广州市,广东省及全国广泛应用,取得显著社会效益和经济效益,已实行电脑化管理。本研究提出广州地区急诊医疗体系建设的具体建议,为市政府采用并拨款建成具有广州特色的院前急救模式,急救指挥中心及EMSS的建成,在急救医疗及突发意外、灾难事故的应急救护中发挥了重要作用。“广州模式”为国内公认最适合国内城市急救的EMSS,已为国内外专家广泛关注。在广州模式指导下,广东省以各市为中心的区域性急诊医疗体系已初步建成。本项系列研究成果达国内先进水平,1993年获广东省科技进步三等奖。

(陈丽芳)