

胆囊收缩素免疫反应神经元 在蟾蜍视网膜的定位与分布*

杨惇生 陈宁欣 李海标

(组织胚胎学教研室)

提 要 用免疫组织化学ABC方法研究胆囊收缩素(CCK)免疫反应神经元在蟾蜍视网膜的定位与分布。实验结果表明,在183个免疫反应阳性神经元中,85%为I型无长突细胞,12%为II型无长突细胞,3%的细胞体位于节细胞层,暂定为移位无长突细胞。CCK免疫阳性纤维呈点状散布于内网层的1~5各亚层。在视网膜平铺片上,CCK免疫阳性细胞体均匀分布于视网膜的中央区和周围区,其密度为 30 ± 2.3 个/ mm^2 ,它们的树突野呈对称性和非对称性两型,前者的树突野大小为 $90 \sim 200 \mu\text{m} \times 60 \sim 110 \mu\text{m}$,后者的突起长度约为 $60 \sim 100 \mu\text{m}$ 。

关键词 胆囊收缩素;免疫组织化学;视网膜无长突细胞

中图分类号 R332.9

胆囊收缩素(CCK)是一个具有多种分子形式的肽,存在于胃肠道及神经系统等部位。从脑分离出来的是CCK₈。CCK₈是CCK分子具有生物活性的部分,现已证明,CCK₈在中枢神经系统可有神经递质或调质的作用。CCK在中枢神经系统的总含量高于其他已知的脑肽,这已使它处于脑肽研究中引人注目的地位^[1]。用高压液相色谱分析及放免测定,已发现CCK存在于多个种属动物的视网膜^[2]。但在形态学方面,对视网膜含CCK样物质的神经元的神经研究尚少。迄今,虽对蜥蜴、鸡、蛙、猫几种动物的视网膜含CCK样物质的结构进行了光镜的定位研究^[3~5]。但大多数的研究,只能显示CCK样免疫阳性突起,而不能显示其细胞体。此外,有关CCK免疫反应(CCK-IR)神经元在视网膜中的分布、密度、树突野的大小和形状等尚未进行过研究。

近年来有关视网膜神经肽的研究已揭示,神经肽在视网膜中可能作为调质或介质而影响视网膜的信息加工^[6]。要弄清存在于视网膜中

的详细的形态学研究^[7,8]。本文拟从光镜形态的电生理研究外,还有赖于对有关含肽神经元的神经肽在视觉信息加工中的作用,除了有关学角度,对视网膜CCK-IR神经元进行较详细的研究,为进一步了解CCK在视网膜信息加工中的作用提供重要的形态学基础。

材 料 和 方 法

材 料 黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus schneider*) 20只,置于自然昼夜周期饲养,取材前先置于暗室避光1~2h,取材时快速断头并取出眼球,从角巩缘处切开眼球,去除晶状体和玻璃体。把整个眼球后半部固定于4%多聚甲醛0.1 mol/L磷酸缓冲液(PB, pH7.4) 4℃过夜。固定后用PB冲洗2~3次,然后置入4℃5%蔗糖溶液约24h,再置入30%蔗糖溶液2~4h。其后把视网膜从眼球后半部分离出来,供切片或平铺片使用。用于切片的视网膜被切成小块包埋于37℃、4%的琼脂糖(agarose)的磷酸盐缓冲液(PBS)中,室温下凝结后,振动切片机切片厚50μm,收集于小容器内。

免疫细胞化学步骤 切片及平铺片均采用

* 国家教委博士点基金资助课题,第一作者硕士生,现在澳大利亚国家视觉研究中心攻读博士学位

ABC (avidin biotin-peroxidase complex) 法作免疫细胞化学染色 (ABC 药盒为 Vector 公司产品)。切片用 10% 的正常羊血清孵育 30~60 min 后, 接着用以 1:400 的兔抗 CCK₈ 血清 (INC 产品) 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次后 (每次 10 min), 于含 1:200 生物素结合的羊抗兔血清 (以 PBS 稀释) 中室温下孵育 1~2 h, PBS 漂洗后, 再于 1:100 的 ABC 复合物中室温下孵育 1~2 h, 经 PBS 漂洗后, 用二氨基联苯胺 (DAB) 和过氧化氢 (0.05%) 作呈色反应, 再以 PBS 漂洗, 最后把切片置于载玻片上, 用 9:1 的 PBS:甘油封片。平铺片的程序与上述基本相同, 不同之处有: ①在进行免疫细胞化学步骤之前, 把视网膜置于 -20 °C 冰箱进行多次冻融, ②所有过程的时间均延长 4~5 倍。

对照实验 参照其他作者的报道^[9], 本实验采用置换实验来检查第一抗体的特异性, 即在同等条件下, 以正常兔血清代替兔抗 CCK₈ 血清孵育标本, 其他免疫细胞化学步骤不变。结果在对照标本上, 未见免疫反应阳性的细胞或突起。

细胞计数方法 用网格测微计计数细胞。

结 果

在 183 个 CCK 免疫反应阳性细胞中, 85% 为 I 型无长突细胞 (见讨论), 胞体位于内核层 (INL) 的最内缘 (附图 A, B), 呈圆形、椭圆形或多边形, 直径约为 6~10 μm。胞体可发出 1 个粗大或多个细小的突起伸入内网层 (IPL)。12% 为 II 型无长突细胞 (附图 C), 胞体位于内核层最内缘的第 2 层细胞内, 呈卵圆形, 直径约为 6~8 μm。从胞体发出一个细小的突起伸入内网层的外侧, 并在此形成弥散的点状突起。30% 的免疫及反应阳性细胞体位于节细胞层 (GCL), 胞体圆形或椭圆形, 直径约为 7~10 μm。胞体可发出一个或多个突起伸入内网层 (附图 D)。CCK 免疫阳性纤维呈点状弥散分布于内网层的 1~5 各亚层 (附图 A)。

在视网膜平铺片上, CCK-IR 无长突细胞胞体的分布基本均匀, 密度为 $30 \pm 2.3(\bar{x} \pm s_{\bar{x}})$ 个细胞/mm²。阳性胞体呈圆形、椭圆形或梭形。前者的直径约 8~10 μm, 后者的直径约为 6~7 μm × 12~17 μm。阳性细胞的树突野可呈现两种类型, 即对称性树突野及非对称性树突野。前者可从胞体发出 3~5 支突起 (以 3~4 支为多见), 突起从胞体向四周各方向延伸, 整个树突野呈圆形或椭圆形, 其大小约为 90~200 μm (主轴) × 60~100 μm (次轴); 后者胞体一般发出 1~2 支突起, 突起向胞体的一侧作进一步分支, 使树突野呈不对称形状, 突起长度约为 60~100 μm 之间 (附图 E 和 F)。

讨 论

关于 CCK 样免疫阳性神经元的细胞类型

本实验所见 CCK 免疫阳性细胞体位于内核层最内缘的第 1 和第 2 排细胞内, 和位于节细胞层内, 免疫阳性突起呈点状散布于内网层的 1~5 各亚层内。位于内核层的 CCK 免疫阳性无长突细胞的形态分别与 Wong-Riley 用 Golgi 镀银法在蝶螈视网膜所描述的 I 型和 II 型无长突细胞相似^[10]。I 型无长突细胞位于内核层的最内缘, 发出一个粗大或多个细小的突起进入内网层。而 II 型无长突细胞则位于内核层内缘的第 2 或第 3 排细胞内, 发出单个细小突起伸入内网层。

至于位于节细胞层的 CCK 免疫阳性细胞, 可能是节细胞或移位无长突细胞。几乎在所有脊椎动物的视网膜节细胞层均含有移位无长突细胞^[8], 另外在视网膜神经肽的定位研究中, 节细胞层含有免疫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^[11,12]。然而最近的研究表明, 绝大多数位于视网膜节细胞层的 P 物质阳性神经元是节细胞^[13]。因此, 位于节细胞层的 CCK 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。

与过去研究工作的比较 关于 CCK 样免

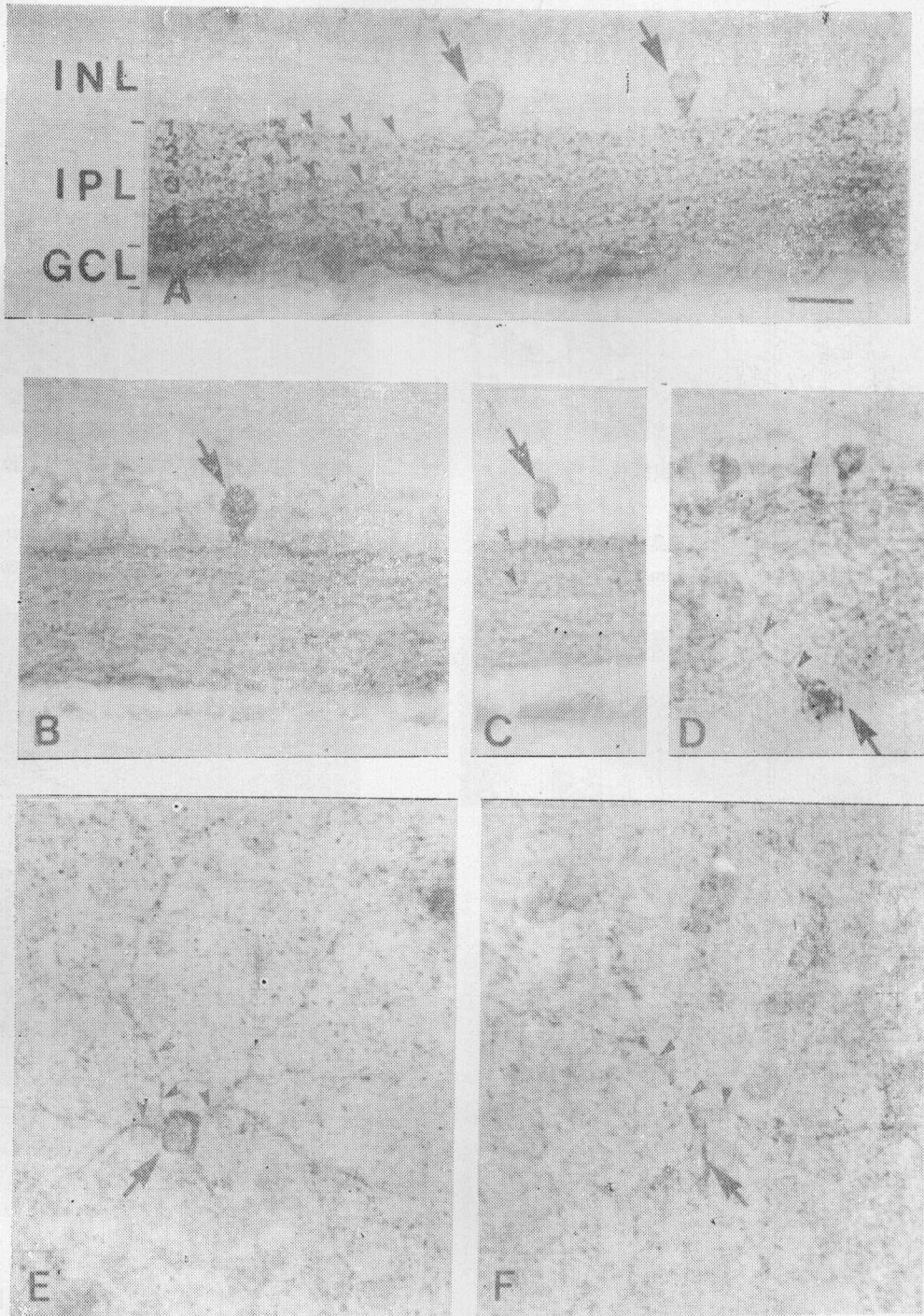
疫反应物质在蛙、蜥蜴、鸡和猫视网膜的定位研究, 已有报道。除在蛙视网膜外, 先前的研究, 只能显示内网层内的 CCK 免疫阳性纤维, 而在内核层或节细胞层均未见阳性细胞体。本实验所见 CCK 样免疫阳性神经元的形态及突起在内网层的分支与 Brecha 等的观察相似^[6]。但 Brecha 等的研究, 仅描述了位于内核层的 CCK 免疫阳性无长突细胞的形态, 其突起分枝只局限于内网层的 1、2 亚层。本研究显示了 CCK 免疫阳性纤维呈点状散布于内网层的 1~5 各亚层, 免疫阳性细胞体可位于内核层和节细胞层。此外, 作者还基于 Wong-Riley^[10] 的 Golgi 镀银研究的基础上, 对 CCK 样免疫阳性无长突细胞进行分类。在过去所有有关 CCK 样免疫阳性神经元, 在视网膜的定位研究中, 均未涉及此类阳性神经元在整体视网膜中的分布、密度和树突野的研究。无疑, 本实验有关此方面的研究, 将为进一步阐明 CCK 在视网膜信息处理的作用提供有价值的形态学资料。

(本文附图 A、B、C、D、E、F 见插图 1)

参 考 文 献

- 林彭新, 吴希为. 胆囊收缩素与惊厥. 生理学进展 1988;19:270
- Eskay RL, et al. HPLC and RIA of cholecystokinin peptides in the vertebrate neural retina. Brain Res 1982;246:315
- Osborne MN, et al. Cholecystokinin and substance P immunoreactivity in retinas of rats, frogs, lizards and chicks. Exp Eye Res 1982;34:639
- Osborne MN. Cholecystokinin in the retina of vertebrates. Ann NY Acad Sci 1985;448:157
- Thier P, Bolz J. Cholecystokinin in the cat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985;26:266
- Brecha N. Retinal neurotransmitters: Histochemical biochemical studies. In: Emson PC (ed). Chemical Neuroanatomy. New York: Raven Press, 1983:85~129
- 李海标, 林文杰. 神经紧张素样免疫反应无长突细胞在鸡视网膜的定位——光镜与免疫电镜研究. 解剖学报 1989;20:384
- Ehinger B, Dowling JE. Retinal neurocircuitry and transmission. In: Bjorklund A, et al. (eds). Handbook of chemical Neuroanatomy. Vol 5. Elsevier Sci Pub BV, 1987:389~466
- Yang CY, Yazulla S. Neuropeptide-like immunoreactive cells in the retina of the larval tiger salamander: Attention to the symmetry of dendritic projection. J Comp Neurol 1986;248:105
- Wong-Riley MTT. Synaptic organization of the inner plexiform layer in the retina of the tiger salamander. J Neurocytol 1974;3:1
- Li HB, et al. The light microscopic localization of substance P- and somatostatin-like immunoreactive cells in the larval tiger salamander retina. Exp Brain Res 1986;63:93
- Watt CB, et al. Localization of enkephalin-like immunoreactive amacrine cells in the larval tiger salamander retina: A light and electron microscopic study. J Comp Neurol 1985;241:171
- Brecha N, et al. Substance P-immunoreactive retinal ganglion cells and their central axon terminal in the rabbit. Nature 1987;327:155

(1992-06-18收稿 1993-03-29修回)



A, B I型CCK免疫反应无长突细胞 蟾蜍视网膜切片, 示I型CCK免疫反应无长突细胞体(↑)位于内核层(INL)最内缘, 胞体可发出一个粗大(图B显示)或1个以上的细小突起伸入内网层 CCK免疫反应纤维(▲)呈点状散布于内网层(IPL)的1~5各亚层。标尺=20μm(下同)

C II型CCK免疫反应无长突细胞 蟾蜍视网膜切片, 示II型CCK免疫无长突细胞体(↑)位于内核层内缘的第一排细胞内, 细小的胞突(▲)伸入内网层外侧

D 节细胞层的CCK免疫反应细胞 蟾蜍视网膜切片, 示CCK免疫阳性胞体(↑)位于节细胞层(GCL), 胞突(▲)伸入内网层

E、F 两种CCK免疫反应细胞的树突野 蟾蜍视网膜平铺片, 分别示有对称性(图E)和非对称性(图F)树突野的CCK免疫无长突细胞