

鲫鱼视网膜明、暗适应状态下 NADPH 黄递酶染色的比较*

叶冰 杨雄里**

(中国科学院上海生理研究所, 中国科学院上海生命科学联合开放研究实验室, 上海 200031)

摘要 在鲫鱼视网膜上考察了明、暗适应两种状态下视网膜细胞的 NADPH 黄递酶染色的不同。在暗适应 5 h 的视网膜中, 视杆和视锥的内段、部分水平细胞呈深度染色。部分无长突细胞和神经节细胞也有染色。此外, Muller 细胞对 NADPH 黄递酶染色呈强阳性。在明适应的视网膜中, 光感受器的内段、神经节细胞的染色则较浅, 而 Muller 细胞和水平细胞则呈阴性反应。此外, 视杆去极化型双极细胞则清楚地被染色。无长突细胞在两种状态下的染色没有显著差异。Muller 细胞, 部分水平细胞和视杆去极化型双极细胞中存在诱导型一氧化氮合成酶, 其诱导与否取决于视网膜的适应状态。

关键词 视网膜细胞 NADPH黄递酶 适应状态 一氧化氮合成酶

近年来, 各种证据表明一氧化氮(NO)是神经系统中的1种新型的信使^[1]。NO可能参与感觉信息的处理^[2]。应用 NADPH 黄递酶(NADPH-d)组织化学和一氧化氮合成酶(NOS)的免疫细胞化学方法, 已在多种动物对 NOS 在视网膜中的分布进行了研究^[3]。但是, 迄今还没有工作考察 NOS 的活性或含量在不同适应状态的视网膜中可能存在的差异。

NADPH-d 组织化学是基于 NOS 的辅因子 NADPH 可将无色的氧化型染料氮四蓝啉还原成可见的、不溶性产物^[4]。神经元中的 NADPH-d 已被证明就是 NOS^[5]。在本工作中, 我们应用 NADPH-d 方法研究了鲫鱼视网膜中 NOS 的分布, 这种分布在明、暗适应状态下出现显著的差异。

1 材料和方法

NADPH-d 组织化学有两种方法。在直接方法中采用 NADPH 来还原染料氮四蓝啉。在间接方法中, 采用 NADP 和适当的底物(如 6-磷酸葡萄糖或苹果酸钠)反应以产生 NADPH。我们同时采用这两种方法, 得到了相似的结果。

将鲫鱼(*Carassius*, 体长 15~20 cm)分成两组, 一组暗适应 5 h, 另一组在 100 lx 的照明下

1995-07-20 收稿

* 国家科学委员会攀登计划项目和美国国立卫生研究院(EY08338, 主要研究者: 杨雄里), 以及人类前沿科学计划组织(HFSP)基金资助项目

** 联系人

明适应 5 h. 以后的各项步骤, 均分别在其相应的照明条件下进行.

将切去虹膜和晶状体而制成的眼杯浸泡在 4℃ 的 4% 多聚甲醛, 0.1 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.4) 中固定 5 h. 然后用 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.4) 冲洗过夜. 再将色素上皮与视网膜分离. 每个视网膜都切成 4 块, 2 块用间接方法处理, 2 块用直接方法处理. 本实验所得数据来自 32 个视网膜.

间接方法的反应液参照 Scherer-Singler 等人的方法^[4]. 其中含: 1 mmol/L NADP, 0.2 mmol/L 氮四蓝唑, 1 mmol/L MnCl₂, 15 mmol/L 苹果酸, 0.2% Triton X-100, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0). 直接方法的反应液如下: 1 mmol/L NADPH, 0.3 mmol/L 氮四蓝唑, 0.2% Triton X-100, 0.1 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0). 视网膜在 37℃ 下反应 4~5 h.

经染色的视网膜包埋于 4% 琼脂糖中. 然后用振动切片机切成 40 μm 厚的切片.

单个细胞的染色深浅用测量光密度的方法而定量化. 光密度由一套图象处理系统 (FG-100-AT, Imaging Technology Inc.) 经由摄像机 (RCA Closed-Circuit Video Equipment) 测量. 共测量了 3 个暗适应视网膜中的 6 个区域和 3 个明适应视网膜中的 8 个区域.

2 结果

由直接方法和间接方法得到的结果在明、暗适应的视网膜中均一致. 但是间接方法的背景染色更浅些^[4]. 因此本文中照片均来自间接方法.

2.1 暗适应视网膜

图 1(a) 为经 NADPH-d 染色的暗适应视网膜的横切面. 在视网膜外端, 视杆和视锥的内段都深染, 但外段和细胞体都不含 NADPH-d (参见图 2). 图 1(b) 显示高倍镜下 1 个视杆 (A) 和 3 个不同形态的视锥 (B, C, D). 这些视锥分别对应于金鱼的长型独立视锥, 短型独立视锥和小型独立视锥.

在外网层 (OPL) 可以清楚地观察到深染的树突. 水平细胞的染色很深, 以致这些细胞的轮廓不易分辨. 根据其染色在内核层 (INL) 的分布可以确定仅靠近 OPL (INL 的远端) 的部分水平细胞对 NADPH-d 染色呈阳性反应. 在 ONL 的内边缘和神经节细胞层 (GCL) 分别有一些含 NADPH-d 的无长突细胞和神经节细胞.

值得注意的是, 在暗适应视网膜中 Muller 细胞对 NADPH-d 染色呈很强的阳性反应. 这些细胞具有典型的梭状胞体和延伸至内界膜 (ILM) 的伸展的末梢. 其突起往外一直伸至外界膜 (OLM).

2.2 明适应视网膜

在明适应条件下, 光感受器内段的染色比暗适应时浅 (图 1(b)). OPL 的染色大大降低. 与暗适应时相反, 水平细胞没有染色 (图 3). 在视网膜内端可见较暗适应时染色浅的神经节细胞. Muller 细胞在明适应视网膜中没有染色.

特别有趣的是, 视杆去极化型双极细胞在明适应后被清楚地染色. 图 4 显示了 1 个典型的例子. 该细胞在内网层 (IPL) 的最内端有 1 个特征性的膨大末梢, 其胞体位于 INL 的远端或中部. 胞体发出一根主树突在 OPL 分出几根次级树突.

2.3 染色的光密度值

为了将组化结果定量化, 我们测量了单个细胞的光密度值 (表 1). 与明适应视网膜相比,

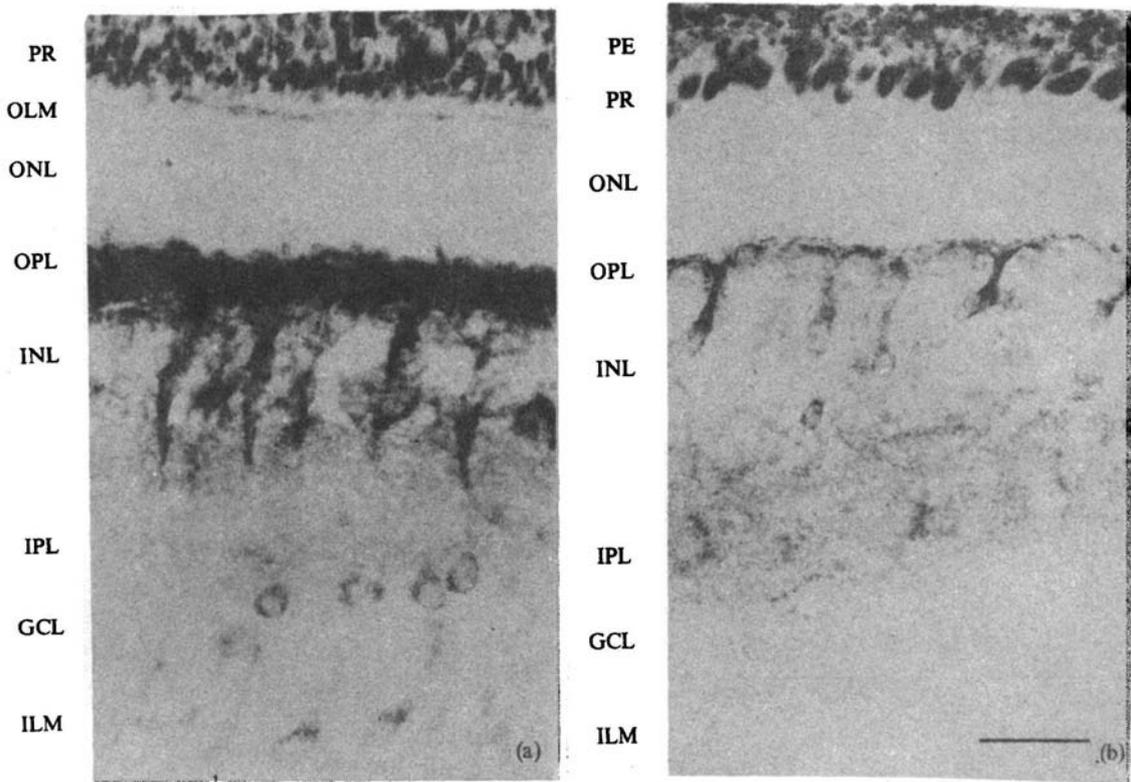


图1 采用 NADPH-d 组织化学方法染色的鲫鱼视网膜横切面

(a)暗适应视网膜. 光感受器内段, 带有伸展末梢的 Muller 细胞, 部分无长突细胞和部分神经节细胞被染色. 一些水平细胞也被强烈地染色. 在外界膜(OLM)可见 1 条被染色的线. 在外核层(ONL)可见一些染色的纤维;
 (b)明适应视网膜. 光感受器内段, 神经节细胞的染色都较暗适应时为浅. 一些双极细胞被染色. 在外网层(OPL)可见一些被染色的树突. Muller 细胞和水平细胞则不含 NADPH-d. PE: 色素上皮; PR: 光感受器;
 OPL: 外网层; INL: 内核层; IPL: 内网层; GCL: 神经节细胞层; ILM: 内界膜; 标尺 = 30 μm

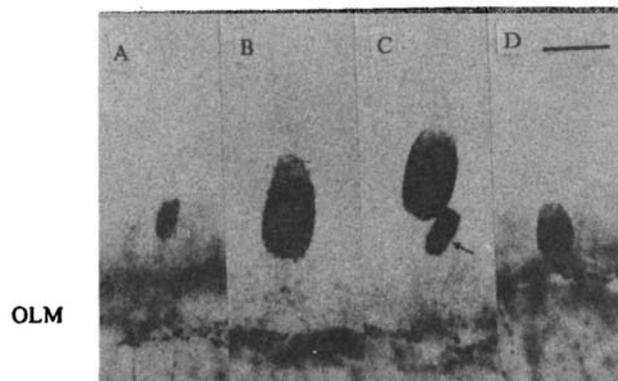


图2 暗适应条件下用 NADPH-d 组织化学染色的光感受器

光感受器仅内段被染色. A 为视杆; B, C, D 为 3 种不同形态的视锥. 箭头所示为连接在 1 个视锥上的视杆.
 OLM: 外界膜. 标尺 = 10 μm

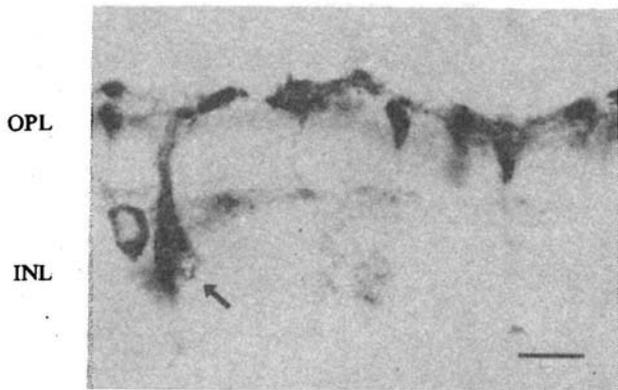


图 3 用 NADPH-d 组织化学方法染色的明适应视网膜

显示水平细胞没有染色. 箭头指示 1 个染色的双极细胞. OPL: 外网层; INL: 内核层. 标尺 = 10 μm

表 1 单个细胞 NADPH-d 染色的光密度值^{a)}

	明适应视网膜	暗适应视网膜
视锥内段	0.588 ± 0.031(14)	1.036 ± 0.092(8)**
视杆内段	0.313 ± 0.047(3)	0.681 ± 0.116(10)**
外核层	0.039 ± 0.009(9)	0.106 ± 0.024(11)**
水平细胞	0.077 ± 0.017(9)	1.671 ± 0.219(6)**
内网层	0.356 ± 0.075(13)	0.936 ± 0.138(10)**
无长突细胞	0.185 ± 0.020(9)	0.215 ± 0.051(5)
神经节细胞	0.176 ± 0.019(8)	0.338 ± 0.034(11)**

a) 所列数据为括号中给出的细胞数的 $M \pm SD$, **为 $P < 0.01$

暗适应视网膜中视杆、视锥、水平细胞、神经节细胞染色的光密度值都显著增高. Muller 细胞和双极细胞的染色的光密度值未显示, 因为 Muller 细胞仅在暗适应视网膜中被染色, 而双极细胞仅在明适应视网膜中被染色. 明、暗适应视网膜中, 无长突细胞的染色无显著差异.

3 讨论

神经元的 NADPH-d 就是 1 种 NOS. Hope 等人^[9] 首先提纯了 NADPH-d, 然后发现用 1 种对 NADPH-d 专一的抗体作免疫印迹 (Western transfer) 可仅标记 1 种 150 ku 的蛋白. 而 NOS 已被证明是 150 ku, 依赖 NADPH 的酶. 他们还发现, 共提纯的 NOS 和 NADPH-d 具有均一性, 且两种酶活性都可为识别 NADPH-d 的抗体所免疫沉淀. 此外, NOS 可被 NADPH-d 的底物氮四蓝唑竞争性抑制. 形态学结果也显示 NOS 免疫反应性和 NADPH-d 染色共存于脑和外周组织^[9]. 当人肾脏细胞被转染 NOS 的 cDNA 后, 这些细胞便

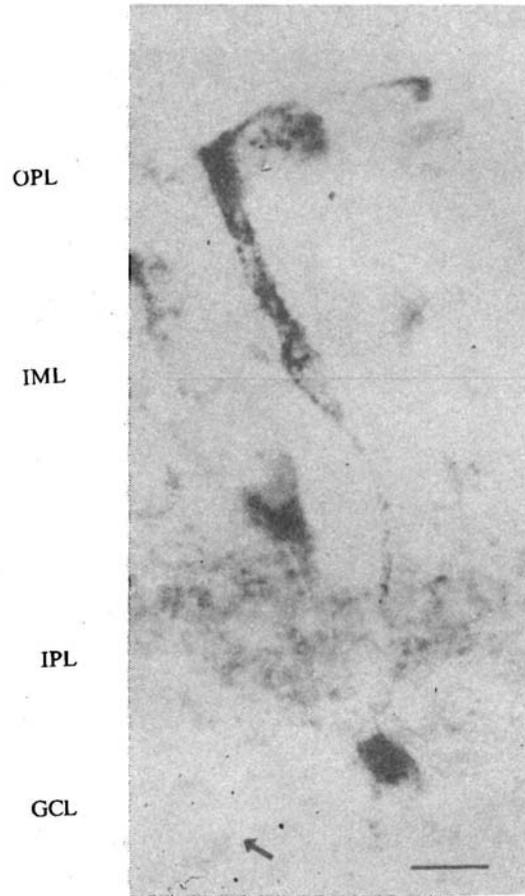


图 4 明适应视网膜中的 1 个染色的双极细胞
该细胞有 1 个位于 IPL 最内部的膨大球状末梢.
这是视杆去极化型双极细胞的典型特征. 图中可见 1 个浅染的神经节细胞 (箭头所示). OPL: 外网层; INL: 内核层; IPL: 内网层; GCL: 神经节细胞层. 标尺 = 10 μm

具有了 NADPH-d 染色特性,而且, NOS 和 NADPH-d 的染色比率提示 NADPH-d 染色完全来自 NOS^[6]。最近的组织化学和免疫细胞化学工作也肯定了 NADPH-d 组化是研究中枢神经系统含 NOS 的细胞的有效方法^[7]。

本工作显示,视网膜中 NADPH-d 染色在明、暗适应两种状态下存在非常显著的不同。部分水平细胞和 Muller 细胞在暗适应时呈深度染色,而在明适应时则不被染色。视杆去极化型双极细胞则相反。

视网膜 NADPH-d 的分布已在几种动物上被研究。例如在哺乳类,无长突细胞和神经节细胞中存在 NADPH-d。也有文献报道 OPL 呈阳性染色反应。最近, Kurenyy 等人用 NADPH-d 组化和 NOS 免疫细胞化学方法观察到,虎蝾螈的光感受器内段、双极细胞和胶质细胞的远端都存在 NOS。然而这些工作都未注意视网膜的适应状态对染色可能产生的影响。Weiler 和 Kewitz^[8] 在鲫鱼上观察到 NADPH-d 染色方法可选择性地染色内网层的一些神经元以及外网层的 H1 水平细胞。但 Muller 细胞未被染色。其结果似介于本工作所描述的明、暗适应状态结果之间。

已经克隆的 NOS 中存在两种亚型^[9]。1 种是组成型 NOS,另 1 种是细胞在某些物质的诱导下合成的诱导型 NOS。在我们的实验中,长时间的适应(5 h)对清楚地区分图 1 所示的暗适应特征是必需的。我们曾经尝试 30 min 的暗适应,发现 INL 细胞的染色较弥散。这提示,视网膜中 Muller 细胞、水平细胞和视杆去极化型双极细胞中的 NOS 可能为诱导型。在组织培养条件下,细胞受到刺激至表达诱导型 NOS 之间的时间间隔是 4~6 h。这与我们人体的结果相类似。

最近有证据表明 NOS 不仅存在于中枢神经系统的神经元中,也存在于胶质细胞中^[10]。星状细胞中存在组成型和诱导型两种 NOS 的活性,小胶质细胞中也存在诱导型 NOS。采用免疫组化和组化方法, Schmidt 等人发现 NOS 和 NADPH-d 不仅在神经元中共存,而且共存于胶质细胞中。Wallace 和 Bisland 肯定了激活的星状细胞中 NADPH-d 即为诱导型 NOS。进而,晚近的工作表明,蝾螈和鱼类视网膜的 Muller 细胞中存在 NOS^[11];患有巨细胞病毒性视网膜炎的艾滋病患者的 Muller 细胞表达诱导型 NOS。在我们的实验中, Muller 细胞在 5 h 暗适应的视网膜中染色,而在明适应以及 30 min 暗适应的视网膜中不染色。这一结果提示这些胶质细胞中含有诱导型 NOS。最近有工作表明,受细胞分裂素和生长因子等物质刺激后 Muller 细胞显示 NOS 活性^[12]。

致谢 感谢 G. Falk 教授对本文初稿所提出的有益建议

参 考 文 献

- 1 Brecht D S, Snyder S H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992, 8: 3~11
- 2 Breer H, Shepherd F M. Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends in Neurosci*, 1993, 16: 5~9
- 3 Brecht D S, Glatt C E, Hwang P M *et al.* Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphoradse. *Neuron*, 1991, 7: 615~624
- 4 Scherer-Singler V, Vincent S R, Kimura H *et al.* Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods*, 1983, 9: 229~234

- 5 Hope B T, Micheal G J, Knigge K M *et al.* Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2 811~2 814
- 6 Dawson T M, Bredt D S, Fotuhi M *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7 797~7 801
- 7 Hashikawa T, Leggio M G, Hattori R *et al.* Nitric oxide synthase immunoreactivity colocalized with NADPH-diaphorase histochemistry in monkey cerebral cortex. *Brain Res*, 1994, 641: 341~349
- 8 Weilker R M, Kewitz B. The marker for nitric oxide synthase, NADPH-diaphorase, co-localizes with GABA in horizontal cells and cells of the inner retina in the carp retina. *Neurosci Lett*, 1993, 158: 151~154
- 9 Bredt D S, Hwang P M, Glatt C E *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991, 351: 714~718
- 10 Murphy S, Simmons M L, Agullo L *et al.* Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends in Neurosci*, 1993, 16: 323~328
- 11 Stone C, Liepe A, Koistinaho J *et al.* Muller cells of salamander and fish contain a nitric oxide synthase-like enzyme. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1994, 35(4): 1 583~1 588
- 12 Goures O, Hicks D, Courtois Y *et al.* Nitric oxide synthase activity in rat retinal Muller glial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1994, 35(4): 1 956~1 961