

北京鸭视网膜移动性无长突细胞的分布

马云飞 陈耀星 王子旭 杨筱珍 荆海霞 林剑波

(中国农业大学 动物医学院,北京 100094)

摘要 利用视神经溃变试验和 Nissl 染色法研究了北京鸭视网膜移动性无长突细胞(dACs)的形态、大小与密度分布。北京鸭 dACs 是位于视网膜节细胞层的小神经元,核深染,胞质很少,细胞体呈圆形或卵圆形,细胞大小均一,平均面积为 $19 \sim 25 \mu\text{m}^2$ 。在视网膜中央有一个 dACs 高密度区即中央高密度区(CA, $3860 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-2}$),dACs 的密度由视网膜中央部向视网膜周边部逐渐降低(TP, 约为 $1780 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-2}$;NP, 约为 $1760 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-2}$)。试验结果表明北京鸭视网膜中央部和周边部的 dACs 大小差异不明显,但 dACs 在节细胞层密度分布不均,呈现由视网膜中央部至周边部密度梯度递减的变化。

关键词 北京鸭; 视网膜; 移动性无长突细胞; 细胞大小; 细胞密度

中图分类号 S 851.723

文章编号 1007-4333(2004)02-0052-05

文献标识码 A

Distribution of displaced amacrine cells in the ganglion cell layer of Beijing duck retina

Ma Yunfei, Chen Yaoxing, Wang Zixu, Yang Xiaozhen, Jing Haixia, Lin Jianbo

(College of Veterinary Medicine, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract The density and size of displaced amacrine cells (dACs) were studied in the retina of Beijing duck (posthatching day 30, P30) by Nissl-staining and retrograde cell degeneration with axotomy of the optic nerve. The dACs of Beijing duck were found in the ganglion cell layer of retina, which had round or oval somata and their somata were small ($19 \sim 25 \mu\text{m}^2$ on average). The karyon was stained homogeneously by cresyl violet. However, one high-density area was observed in the central retinas (CA, $3860 \text{ cells} \cdot \text{mm}^{-2}$). The cell densities in the temporal periphery (TP) and the nasal periphery (NP) were $1780 \text{ cells} \cdot \text{mm}^{-2}$ and $1760 \text{ cells} \cdot \text{mm}^{-2}$ respectively. These results indicate that the size of dACs is no significant difference in the centrality and periphery, but a center-peripheral graduation can be detected in the cell density.

Key words Beijing duck; retina; displaced amacrine cell; cell size; cell density

禽类的视觉十分发达,对光的敏感性很高,光是影响禽类生产性能的主要外界环境因素之一。光刺激主要通过眼球视网膜投射至脑中枢,进而调节其生产性能。形态学研究表明禽类具有十分发达的视顶盖,其视网膜-视顶盖投射呈完全交叉性,不同于哺乳动物不完全交叉性的双侧投射,这提示禽类具有不同于哺乳动物的光信息处理机制,也可能与禽类生产性能受光环境影响明显相关。视网膜是光信息处理的第一站,脊椎动物视网膜主要含有 6 类神

经元,即光感受器(视杆细胞和视锥细胞),双极细胞、水平细胞、网间细胞,无长突细胞和节细胞(retinal ganglion cells, RGCs),其中无长突细胞是视网膜第三级神经元,其胞体通常位于内核层,而有一些无长突细胞移位于节细胞层内被称为移动性无长突细胞(displaced amacrine cells, dACs)。有研究表明 dACs 起局部调节视网膜 RGCs 的作用^[1,2]。因此研究 dACs 的形态结构,对于了解视网膜内的光信息回路,进而阐明视觉形成机理具有重要的意义。

收稿日期:2004-01-06

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(6032014)

作者简介:马云飞,讲师,在职硕士研究生;陈耀星,教授,通讯作者,主要从事神经生物学及生殖免疫学研究工作。E-mail:

yxchen@cau.edu.cn

虽然人们对哺乳动物的 dACs 已有很多研究, dACs 约占节细胞层细胞总数的 20%~30%^[3], 但有关禽类的报道很少, 尤其是北京鸭 dACs 的形态学特征目前尚不清楚。

根据脊椎动物视网膜节细胞层含有 dACs 和 RGCs, 其中 dACs 因没有轴突, 不参与组成视神经, 而 RGCs 有轴突并参与组成视神经, 当切断视神经后, 视网膜节细胞层的 RGCs 因溃变而消失, 仅 dACs 被保留^[4]的特性, 本试验利用视神经溃变试验和 Nissl 染色法研究北京鸭视网膜 dACs 的形态学特征, 为阐明禽类视网膜内的光信息回路和特有视觉机理提供形态学资料。

1 材料与方法

1.1 溃变试验和 Nissl 染色

1 日龄北京鸭 5 只, 小腿部静脉注射戊巴比妥钠(nembutal)混合麻醉剂($0.5 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$), 麻醉后手术切开上眼睑, 用小镊子向下轻压眼球以裸露视神经, 然后切断一侧视神经, 另一侧作对照。实验动物存活 30 d 后, 深麻, 经心脏灌流固定, 注入液体依次为质量浓度 0.75% 的生理盐水(38, 20 mL), 质量浓度 1% 的甲醛溶液(30 mL)。固定后, 取双侧眼球, 剪去角膜, 将晶状体、玻璃体等物质轻轻拽出, 分离视网膜色素层, 再将视网膜(切断视神经的同侧视网膜为试验组, 另一侧视网膜为对照组)置入质量浓度 10% 的甲醛溶液后固定 24 h。将视网膜平展在涂有明胶的载玻片上, 其上盖 1 层光滑硬纸和 2 层滤纸, 再加一载玻片, 用细线捆住。将上述铺片的整体浸入 4% 中性甲醛-纯乙醇(1:9)溶液中固定 24 h, 去掉视网膜上面的几层物质, 再将视网膜铺片浸入 5% 醋酸-纯乙醇溶液中约 1~2 h 后, 按常规 Nissl 染色法, 用 0.1% 克紫染色 2~3 min, 酒精脱水, 二甲苯透明, 树脂胶封片, 光镜下观察。

1.2 数据分析

对上述经 Nissl 染色的视网膜铺片标本的视网膜节细胞层用 40 倍物镜进行显微照相(总放大倍数为 125 倍), 再将每张底片的 5 倍图象描于复印纸上(画出细胞体的外轮廓线)。用计算机进行图象分析(Scion Image 软件), 测量视网膜节细胞层的细胞数量和大小。在每例视网膜铺片标本上, 各测量 35 个单位面积($50.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$)的节细胞层所含的 dACs

数量, 数据用 Microsoft Excel 2000 进行生物学统计处理, 根据其结果绘出视网膜的细胞密度分布图。然后参照每一细胞密度级其所占面积计算出 dACs 的区域密度, 并观察从视网膜中央区至周边部细胞密度和大小变化情况。

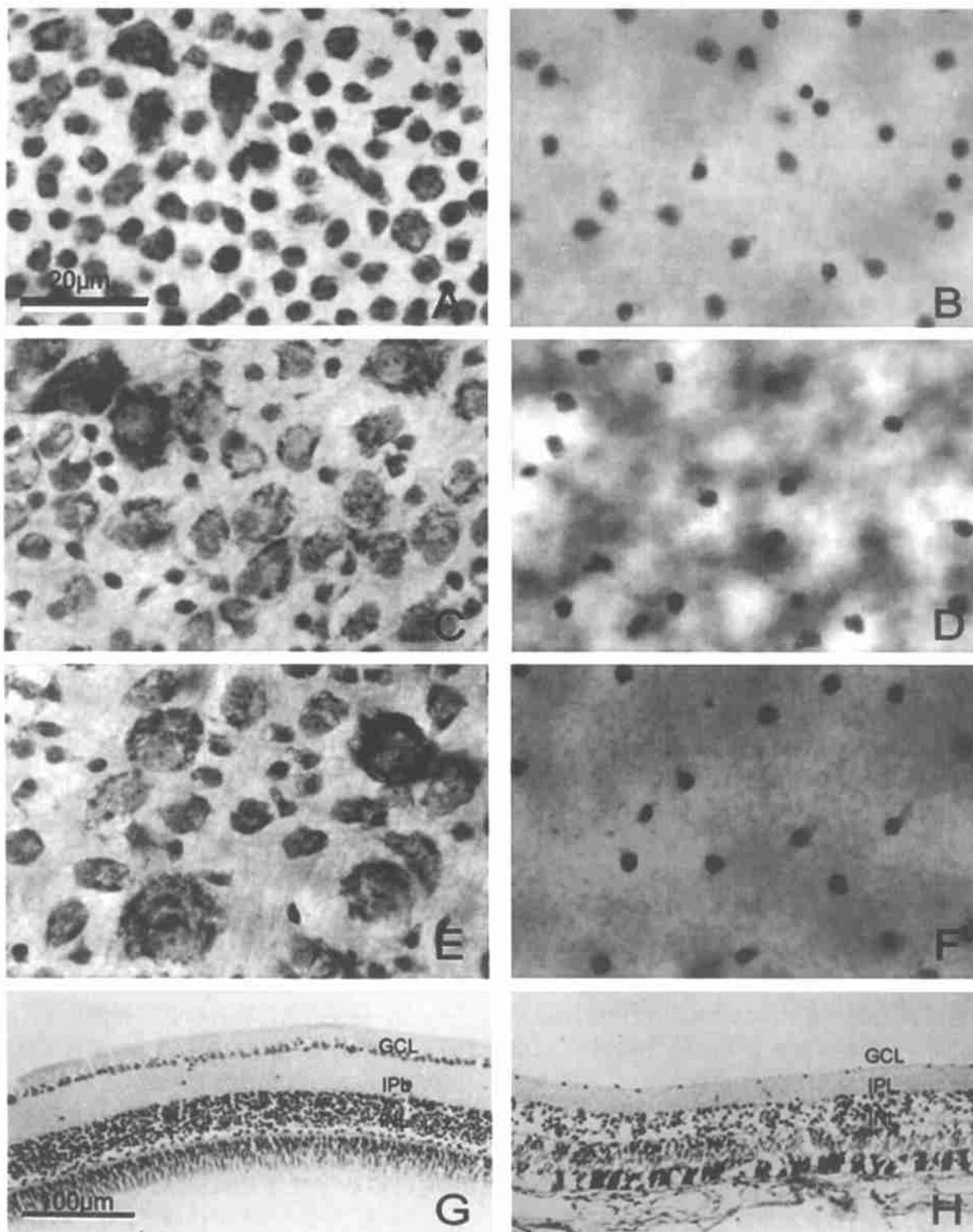
2 结果

2.1 dACs 的形态与大小

比较试验组和对照组的染色结果发现, 对照组视网膜节细胞层的细胞密集、形态多样, 有圆形、椭圆形、多角形等(图 1A、C、E), 细胞大小随视网膜的位置而异(图 1, 2), 在视网膜中央(CA)以小细胞为多, 大小平均为 $47.21 \pm 19.30 \mu\text{m}^2$; 而视网膜周边部的细胞大, 鼻侧视网膜周边部(NP)的细胞面积为 $75.30 \pm 46.96 \mu\text{m}^2$, 颞侧视网膜周边部(TP)的细胞面积为 $142.48 \pm 85.80 \mu\text{m}^2$ (图 2)。试验组视网膜节细胞层仅见散在分布的小神经细胞, 即移动性无长突细胞(dACs), 胞体多呈圆形或卵圆形(图 1B、D、F), 细胞大小均一, 平均面积为 $19 \sim 25 \mu\text{m}^2$ 。其特点是细胞核深染, 胞质很少, 无轴突参与组成视神经, 视网膜中央部和周边部的 dACs 大小差异不明显(图 2), 视网膜中央部 CA: $19.89 \pm 4.69 \mu\text{m}^2$; 视网膜鼻侧周边部 NP: $22.44 \pm 5.91 \mu\text{m}^2$; 视网膜颞侧周边部 TP: $29.69 \pm 4.85 \mu\text{m}^2$ 。

2.2 dACs 的数量与密度分布

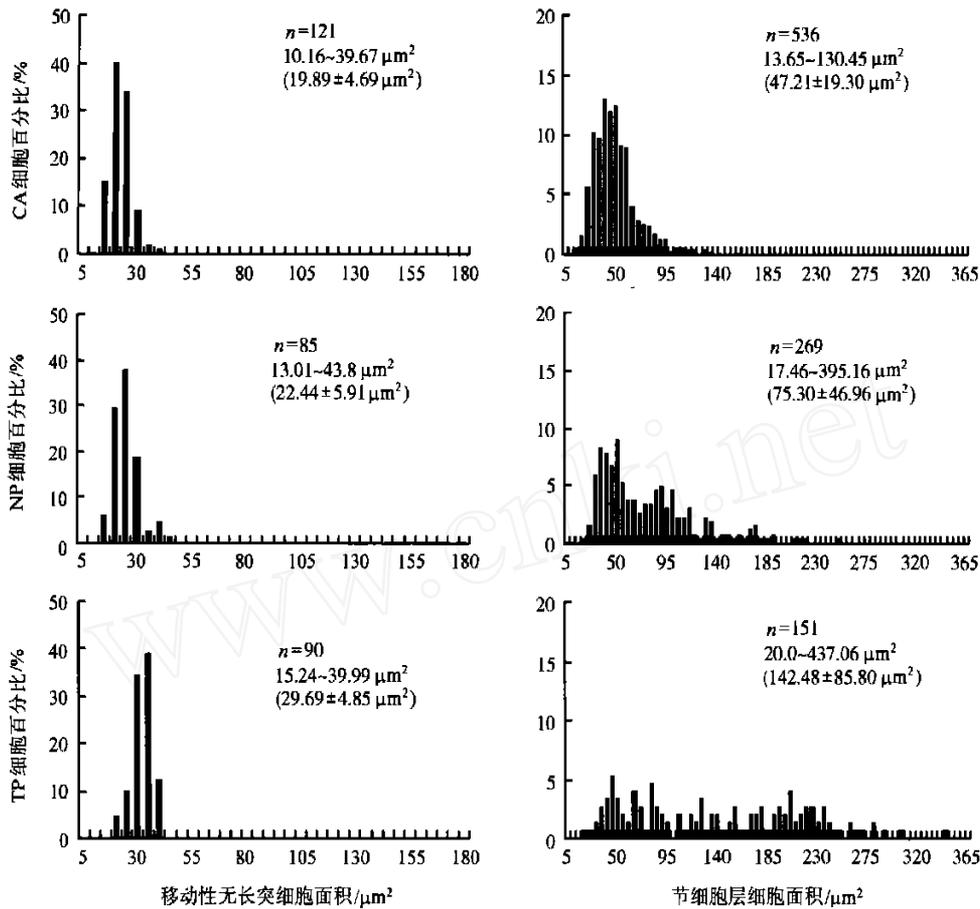
按照类似于测量 RGCs 细胞密度的方法^[5,6], 根据所测 35 个单位面积 dACs 的数量, 计算出每个单位面积 dACs 的密度。结果表明, dACs 在视网膜内分布不均(图 3), 在视网膜中央形成一个 dACs 高密度区即中央高密度区(CA, 约 $3860 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$)。由视网膜中央部向视网膜周边部, dACs 的密度逐渐降低, 在颞侧视网膜周边部和鼻侧视网膜周边部 dACs 的密度很低(TP, 约为 $1780 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$; NP, 约为 $1760 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$), 与高密度区相比, 细胞密度约下降了 50% 以上。对照组视网膜节细胞层细胞密度均很高(CA, 约为 $10660 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$; TP, 约为 $5340 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$; NP, 约为 $5830 \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$)。比较对照组与实验组, dACs 在视网膜不同区域占节细胞层细胞总数的百分比不同(CA, 约为 36%; TP, 约为 33%; NP, 约为 30%)。



A、C、E和G为对照组;B、D、E和H为切断视神经试验组。A~F为视网膜铺片,其中A、B为视网膜中央部;C、D为视网膜鼻侧部;E、F为视网膜颞侧部。G、H为石蜡切片。GCL为节细胞层;INL为内颗粒层;IPL为内网状层。

图1 30日龄北京鸭视网膜节细胞层细胞克紫染色显微图片

Fig. 1 Photomicrographs of cells in the ganglion cell layer of Beijing duck (posthatching days 30) retina by staining of cresyl violet



CA: 视网膜中央部; NP: 鼻侧视网膜周边部; TP: 颞侧视网膜周边部

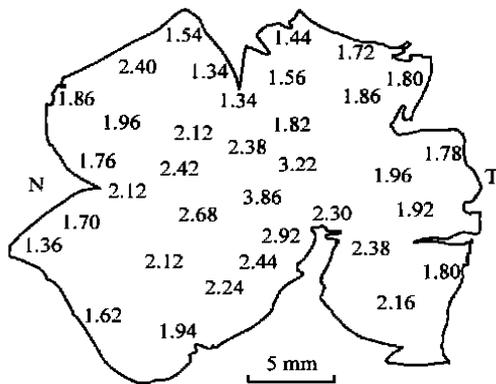
图 2 30 日龄北京鸭视网膜不同大小的移动性无长突细胞和节细胞层细胞 (RGCs + dACs) 的百分率比较

Fig. 2 The comparison of the cell sizes between displaced amacrine cells and cells in the ganglion cell layer (RGCs + dACs) of Beijing duck (posthatching day 30) retina

3 讨论

本试验表明, P30 北京鸭视网膜节细胞层含有 RGCs 和 dACs 2 种神经元胞体, 其中 dACs 的胞体很小, 由视网膜中央部至周边部大小变化不明显, 细胞平均大小为 19 ~ 25 μm², 比 P30 鸡的 dACs^[3] (12 ~ 15 μm²) 略大。据报道, 兔视网膜有 1 个 dACs 高密度区^[7]; 30 日龄鸡有 2 个高密度区, 即 CA (5 800 个 ·mm⁻²) 和 DA (3 200 个 ·mm⁻²), 且由中央部向周边部细胞密度明显降低 (TP, 约为 2 200 个 ·mm⁻²)^[3]; 鸽视网膜 dACs 的密度均很高, 但仍有中央高密度区 (CA, 39 000 个 ·mm⁻²), 周边部 dACs 的密度为 31 000 个 ·mm⁻²^[8]。本试验结果表明, P30 北京鸭视网膜有 1 个 dACs 高密度区, 即 CA (3 860 个 ·mm⁻²), 亦呈现由视网膜中央部至周边部密度梯度递减的变化 (TP, 1 780 个 ·mm⁻²; NP, 1 760

个 ·mm⁻²), dACs 在视网膜不同区域占节细胞层细胞总数的百分比 (CA, 约为 36%; TP, 约为 33%; NP, 约为 30%) 与 P30 鸡 (32%)^[3] 和成年鸡 (30% ~ 35%)^[9] 的试验结果相似, 但比鹌鹑 (20% ~ 30%)^[10] 的略高。这些结果的不同可能是由于动物种属差异引起, 亦可能是动物长期生活环境不同而引起视觉敏锐度不同所致, 因为动物视网膜节细胞的形态结构及其密度分布特点与其动物的栖息环境密切相关; 而且投射至眼球的各种光信息是通过视网膜节细胞传递到脑内不同的一级视觉中枢, 即这些光信息通过不同类型的视网膜细胞来传递的^[11, 12]。根据细胞的大小和树突分支特点, 鼠的 dACs 可分为 6 种类型, 猫分 5 型, 兔和鸽分别有 1 种类型^[3], 有关北京鸭 dACs 的分型有待进一步研究。不同形态的 dACs, 被认为带有不同的视信息^[13], 担负着不同的功能, 对这些细胞从总体进行



数据表示每一视网膜标本中 35 个视网膜节细胞层单位面积 ($50.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) 所含 dACs 的数量 ($10^3 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-2}$)。N: 鼻侧视网膜周边部; T: 颞侧视网膜周边部。

图 3 30 日龄北京鸭视网膜移动性无长突细胞的密度分布

Fig. 3 The density and distribution of displaced amacrine cells in the Beijing duck (posthatching day 30) retina

分类和数量测量对视网膜节细胞结构和功能的研究是十分必要的。

dACs 是特殊的无长突细胞,对 RGCs 起局部调节作用。目前,根据形态学、免疫细胞化学方法可将无长突细胞至少分为 19 种:5 型 GABA, 3 型 NADPH, 1 型 TH(酪氨酸羟化酶), 1 型 P 物质, 1 型多巴胺能, 2 型甘氨酸, 1 型 CCK(胆囊收缩素), 2 型 NPY(神经肽 Y), 2 型 SER(血清激活素) 1 型 CaB(钙结合素)^[14]。GABA 和甘氨酸是灵长类视网膜无长突细胞的主要抑制性的神经递质, GABA 和甘氨酸阳性的无长突细胞与节细胞形成的突触在整个内网层可观察到^[14]。在灵长类视网膜中,小的双层(蓝色敏感的)神经节细胞是积极参与处理短波长敏感视锥信号的。这些神经节细胞成层分布于内网层的内侧和外侧。用细胞内注射荧光黄以及电镜超薄切片法研究周边视网膜这些节细胞的输入突触的起源,发现 84% 的输入突触来自无长突细胞^[15]。dACs 形态类型与生理特性之间的关系有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hayes B P. Cell populations of the ganglion cell layer: displaced amacrine and matching amacrine cells in the pigeon retina[J]. *Exp Brain Res*, 1984, 56: 565 ~ 573

- [2] Koontz M A, Hendrickson L E, Brace S T. Immunocytochemical localization of GABA and glycine in amacrine and displaced amacrine cells of macaque monkey retina [J]. *Vision Res*, 1993, 33: 2617 ~ 2628
- [3] 陈耀星,王子旭. 鸡视网膜移动性无长突细胞的分布[J]. *中国兽医学报*, 2001, 20(4): 373 ~ 376
- [4] Muchnick N, Hibbard E. A avian retinal ganglion cells resistant to degeneration after optic nerve lesion[J]. *Exp Neurol*, 1980, 68: 205 ~ 216
- [5] Chen Y, Naito J. A quantitative analysis of cells in the ganglion cell layer of the chick retina [J]. *Brain Behav Evol*, 1999, 53: 75 ~ 86
- [6] Chen Y, Naito J. Regional specialization of ganglion cell layer of the chick retina[J]. *J Vet Med Sci*, 2000, 62: 53 ~ 57
- [7] Vaney D I, Peich I L, Boycott B B. Matching populations of amacrine cells in the inner nuclear and ganglion cell layers of the rabbit retina[J]. *J Comp Neurol*, 1981, 199: 373 ~ 391
- [8] Binggeli R L, Paule W J. The pigeon retina: quantitative aspects of the optic nerve and ganglion cell layer [J]. *J Comp Neurol*, 1969, 137: 1 ~ 18
- [9] Ehrlich D, Morgan I G. Kainic acid destroys displaced amacrine cells in post-hatch chicken retina[J]. *Neuro Sci*, 1980, 17: 43 ~ 48
- [10] Muchnick N, Hibbard E. Avian retinal ganglion cells resistant to degeneration after optic nerve lesion [J]. *Exp Neurol*, 1980, 68: 205 ~ 216
- [11] 史剑波,徐锦堂,夏潮涌,狄静芳. 豚鼠视网膜正常结构的定量研究[J]. *眼科研究*, 1999, 17(2): 98 ~ 100
- [12] Fukuda Y, Hsiao C F, Watanabe M, et al. Morphological correlates of physiologically identified Y, X, and W cells in cat retina [J]. *J Neurophys*, 1984, 52: 999 ~ 1005
- [13] Wassel H. Sampling of visual space by retina ganglion cells[M]. London: Cambridge Canb University Press, 1986. 19 ~ 30
- [14] Zsefvi J G, Sbanvo T L, and Rtawil M H. Amacrine cells of the anuran retina: morphology, chemical neuroanatomy, and physiology [J]. *Microsc Res Tech*, 2000, 50: 373 ~ 383
- [15] Ghosh K, Grunert U. Synaptic input to small bistratified (Blue-ON) ganglion cells in the retina of a New World monkey, the Marmoset *Callithrix jacchus* [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 413: 417 ~ 428