

牛蛙视网膜诱导型一氧化氮合酶免疫组化定位

郭 玫 陈广文 翟心慧

(河南师范大学生命科学院 新乡 453002)

摘要: 用免疫组织化学方法研究了诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在牛蛙视网膜中的表达。结果显示,在正常状态视网膜中,无长突细胞呈弱阳性反应;节细胞层、双极细胞、水平细胞和光感受器内段呈阴性反应。在暗适应状态下,神经节细胞、内核层的无长突细胞呈强阳性反应;一些双极细胞、水平细胞和光感受器内段呈弱阳性反应。提示 NO 主要在暗适应状态下参与视网膜的信息传递过程。

关键词: 诱导型一氧化氮合酶;视网膜;免疫组织化学

中图分类号: Q952.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)01-06-03

Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase in Bullfrog retina

GUO Mei CHEN Guang-Wen ZHAI Xin-Hui

(College of Life Sciences, Henan Normal University Xinxiang 453002, China)

Abstract: The immunohistochemical method was used to study the expression of Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the bullfrog retina. In normal retina, amacrine cells were weakly labeled, ganglion cells, bipolar cells, horizontal cells and the inner segments of photoreceptors were negative. In dark adaptive retina, both ganglion cells and amacrine cells in inner nuclear layer showed strong iNOS-like immunoreactivity (iNOS-LI), while iNOS-LI was found weakly stained in some bipolar cells, horizontal cells and the inner segments of photoreceptors. The result indicates that NO might participate in visual signal processes mostly at the dark adaptation.

Key words: Inducible nitric oxide synthase; Retina; Immunohistochemistry

一氧化氮(NO)是一种独特的神经信使分子^[1-3],在中枢神经系统中具有广泛作用^[4-6]。大量实验表明,NO不仅参与多种生理功能的调节,而且又是一种神经毒性物质,与许多病理过程有密切关系^[4,7]。NO由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸而产生,运用NOS免疫组织化学技术可准确检测组织内NO的生成部位。近年的研究证实,NOS广泛分布于视网膜上,提示NO可能参与视觉信息的处理^[8,9]。本实验以牛蛙为材料,研究了暗适应和正常状态下视网膜细胞中iNOS的表达,为进一步探讨NO在视觉信息传递中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本的制备 市售牛蛙14只,体长8~12 cm。将其分成两组,一组在正常状态下饲养,另一组暗适应2 h。以探针损毁动物脊髓和脑,迅速分离眼球,在冠状方向上切取后半眼杯,置于4%多聚甲醛中,4℃冰箱内固定2~3 h,然后换入20%蔗糖磷酸缓冲液,4℃冰箱内过夜。

第一作者介绍 郭玫,女,36岁,副教授,学士;研究方向:组织学、胚胎学;E-mail: guomei@fun.21cn.com。

收稿日期:2001-05-23,修回日期:2001-11-20

次日用 OCT 包埋剂包埋,冰冻切片(片厚 14 μm),裱于涂明胶的载玻片上。

1.2 免疫组织化学反应 切片以 ABC 法做免疫组化染色。所用试剂为:一抗——兔抗 iNOS 血清(1:200, Santa),二抗——生物素结合羊抗兔 IgG(1:200, Vector),卵白素-生物素-过氧化物酶复合体(1:100, Vector)。用 DAB/ H_2O_2 呈色 3~5 min,经 PBS 充分清洗后干燥、脱水、透明、中性树胶封片,在光镜下观察、拍照。在对照实验中,以正常羊血清和 PBS 代替兔抗 iNOS 血清,同步进行上述免疫组织化学染色。

2 结果(图版 I)

2.1 视锥视杆层和外核层 视锥视杆层由视锥和视杆的外段和内段组成。实验结果显示:在暗适应视网膜中,内段呈淡黄色的弱阳性反应,外段和胞体呈阴性反应;在正常饲养状态下,视网膜光感受器内、外段均呈阴性反应。

2.2 内核层 在暗适应视网膜中,此层的最外区,个别胞体呈水平方向排列的细胞呈弱阳性反应,根据其胞体的位置、形态和突起的走向可判断它为水平细胞。在此层的中央区一些双极细胞的胞体和突起呈淡黄色的弱阳性反应。在此层的内 1/3 区域,大量的细胞呈较强的阳性反应,标记细胞的胞体形状、大小不等,多为圆形或椭圆形,显然系无长突细胞。被标记的这些细胞呈 2~4 层不规则排列,分深染(棕褐色)和浅染(淡黄色)的两个亚群。在正常饲养状态视网膜中,无长突细胞呈弱阳性反应,且阳性细胞数目明显减少,双极细胞和水平细胞呈阴性。

2.3 节胞层 此层的细胞成分是神经节细胞,其胞体较大,本文观察到在暗适应视网膜中,有一些细胞呈棕褐色强阳性反应。在正常饲养状态下,视网膜的节细胞呈阴性反应。

3 讨论

NO 作用的广泛性和作为信使因子的独特性使之成为 90 年代以来的研究热点之一。由于 NO 的半衰期非常短,很难测定 NO 的含量,因而许多有关 NO 生物学效应的观察都借助于

对 NOS 的研究。

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^[11]。用 NADPH-d 组化方法已观察到许多动物视网膜的光感受器内段、无长突细胞、双极细胞、节细胞和 Müller 细胞有 NOS 表达^[11],表明了 NO 在视觉信息传递过程中的重要性。Blute 等人认为,光感受器内合成的 NO 可能影响水平细胞间的偶联;NOS 阳性无长突细胞合成的 NO 能调节 A II 型无长突细胞的缝隙连接^[12];节细胞中出现 NOS 说明 NO 可能作为逆行信使起着反馈作用^[9]。目前已克隆的 NOS 有三种亚型:nNOS(神经元型)、iNOS(诱导型)、eNOS(内皮型)^[4,10]。与 nNOS 和 eNOS 不同,iNOS 是 Ca^{2+} 非依赖型,它一旦合成就可产生 NO。以往的免疫组织化学研究仅显示了 nNOS 在视网膜上的分布^[9],有关 iNOS 在视网膜中的定位尚未见报道。本实验的结果显示,牛蛙视网膜神经元可表达 iNOS,但阳性神经元的种类、数量和反应强弱由于视网膜的状态不同存在显著差异。暗适应能诱导光感受器内段、水平细胞、少数双极细胞和节细胞等视网膜内外层多种神经元表达 iNOS,从而合成 NO。提示 NO 可能在暗适应状态下参与内层和外层视网膜的信息传递过程。

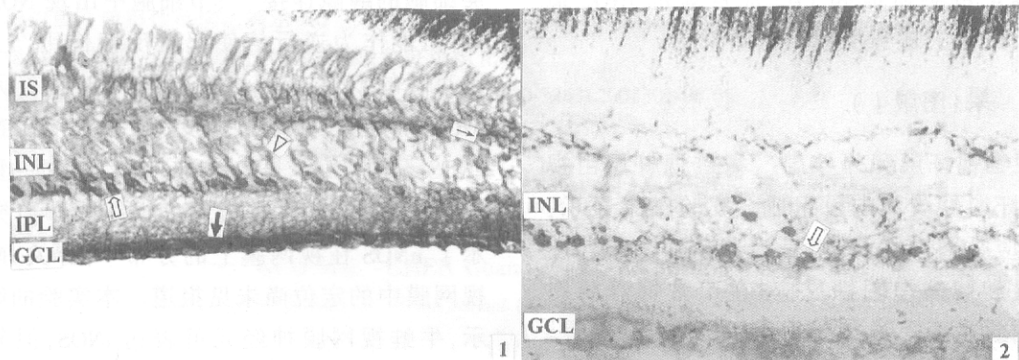
参 考 文 献

- [1] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992, 8: 3~11.
- [2] Schuman E M, Madison D V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 1994, 17: 153~183.
- [3] Meffert M K, Premackand B A, Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release. *Neuron*, 1994, 12: 1 235~1 244.
- [4] 高博,尹桂山. 神经系统中的一氧化氮. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(1): 31~34.
- [5] Valtchanoff J G, Weinberg R J, Kharazia V N et al. Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. *Neurosci Lett*, 1993, 157: 157~161.
- [6] Schuman E M, Madison D V. A requirement for the intercellular messenger NO in LTP. *Science*, 1991, 254: 1 503~

- 1 506.
- [7] 余福林,董新文.一氧化氮与神经疾病.生理科学进展,1996,27(3):274~276.
- [8] Greenstreet E H, Djamgoz M B A. Nitric oxide induces light adaptive morphological changes in retinal neurones. *Neuro Report*, 1994, 6:109~112.
- [9] Blute T A, Mayer B, Eldred W D. Immunocytochemical and histochemical localization of nitric oxide synthase in the turtle retina. *Visual Neurosci*, 1997, 14:717~729.
- [10] 张利群,刘敬忠.一氧化氮合成酶研究进展.国外医学分子生物学分册,1996,18(1):34~35.
- [11] Liepe B A, Stone C, Koistinaho J, Copenhagen D R. Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina. *J Neurosci*, 1994, 14:7641~7654.
- [12] Mills S L, Massey S C. Differential properties of two gap junctional pathways made by A II amacrine cells. *Nature*, 1995, 377:734~737.

郭玫等:牛蛙视网膜诱导型一氧化氮合酶免疫组化定位

图版 I



1. 暗适应状态下,视网膜光感受器内段、水平细胞(↑)、双极细胞(△)呈弱阳性反应,无长突细胞(○)、节细胞(⬇)呈强阳性反应 × 160; 2. 正常饲养状态下,视网膜内核层部分无长突细胞(○)呈弱阳性,其余部分为阴性 × 160; IS:光感受器内段;INL:内核层;IPL:内网层;GCL:节细胞层