

强光照和全黑暗条件下荒漠沙蜥视网膜内 GAP-43 表达的免疫组织化学

司克媛^{①②} 刘忠虎^{②③} 刘重斌^{②④} 孙兰弟^② 王芳春^①
梁桂霞^① 俞诗源^① 王子仁^②

(① 西北师范大学生命科学学院 兰州 730070; ② 兰州大学生命科学学院 兰州 730000;
③ 河南农业大学牧医工程学院 郑州 450002; ④江西井冈山师范学院生命科学系 吉安 343009)

摘要:采用免疫组织化学技术研究了在强光照和全黑暗条件下荒漠沙蜥 (*Phrynocephalus przewalskii*) 视网膜内生长相关蛋白 GAP-43 的表达变化。结果表明,在正常光照条件下,视网膜内 GAP-43 阳性表达部位主要存在于内网层;强光照条件下,GAP-43 免疫染色部位主要出现在内网层、节细胞层和内核层的部分细胞核。在全黑暗条件下,在视纤维层和内网层呈阳性染色,提示视网膜在不同环境条件下 GAP-43 的不同定位,可能与其在相应的环境下参与不同的视觉功能有关。

关键词:荒漠沙蜥;GAP-43;视网膜;免疫组化技术

中图分类号:Q954.33 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)01-108-05

GAP-43 Immunoreactivity in the Retina of *Phrynocephalus przewalskii* Following Exposure to Illumination and Darkness

SI Ke-Yuan^{①②} LIU Zhong-Hu^{②③} LIU Chong-Bin^{②④} SUN Lan-Di^②
WANG Fang-Chun^① LIANG Gui-Xia^① YU Shi-Yuan^① WANG Zi-Ren^②

(① College of Bioscience, Northwest Normal University, Lanzhou 730070;

② School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000;

③ College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

④ College of Life Sciences, Jinggangshan Normal College, Ji'an 343009, China)

Abstract: GAP-43 immunoreactivity (GAP-43 IR) in the retina of *Phrynocephalus przewalskii* following exposure to illumination and darkness was studied. Our results demonstrate that GAP-43 IR is mainly present in the inner plexiform layer (IPL) and the optic fibers layer (OFL) under dark-adapted conditions. GAP-43 IR is observed in the IPL and some cell bodies located in the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL) following illumination. The different expression patterns of GAP-43 following exposure to illumination and darkness suggest that GAP-43 may be differently involved in retinal function.

Key words: *Phrynocephalus przewalskii*; GAP-43; Retina; Immunohistochemistry

基金项目 国家自然科学基金(No. 30170109, 30370163), 甘肃省自然科学基金(No. ZS001-A23-010-Z, ZS031-A25-005-Z)资助项目;

第一作者介绍 司克媛,女,博士研究生,讲师,研究方向:发育生物学,E-mail: siky@nwnu.edu.cn.

收稿日期:2005-07-07,修回日期:2005-11-14

GAP-43 是一种神经元特异性快速转运蛋白,与神经的生长、发育和再生及突触的可塑性有关。脊椎动物成体视网膜内 GAP-43 的分布已有报道,有研究指出 GAP-43 在视网膜中的存在可能与视觉信号传导过程中神经递质的释放有关^[1,2]。

视网膜是参与视觉活动的功能器官,由于视觉活动的复杂性,决定了组成视网膜各种神经元之间突触形成的复杂性和可塑性,研究动物在不同环境条件下,视网膜内神经递质的释放和突触联系变化过程中相关的特异蛋白分子的时空表达变化,对了解视觉功能有一定意义。

蜥蜴的视觉系统因为其特殊的视觉再生能力,其视神经损伤后可以再生,但不能建立正确的视网膜-顶盖投射,已成为神经发育生物学家关注的热点^[3,4]。Rodger 报道一种蜥蜴(*Ctenophorus ornatus*)的视神经损伤后 GAP-43 在视神经中的持续高表达与其再生后视觉不能恢复有关^[5]。到目前为止,国内仅有对蜥蜴亚目(Lacertillia)动物的视网膜结构做过一些形态学的研究^[6]。为了了解动物在不同环境条件下的视觉可塑性及变温类动物的视觉活动特点,本研究在以前的工作基础上^[2],对强光照及全黑暗条件下荒漠沙蜥(*Phrynocephalus przewalskii*)视网膜内 GAP-43 的表达进行了观察,为视网膜内 GAP-43 在不同条件下参与视觉活动的可能机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 荒漠沙蜥采自甘肃省武威地区民勤境内腾格里沙漠边缘。实验用动物自野外捕获后,置于实验室内饲养,驯化 1 周,然后挑选 15 只(体重为 5.59 ± 0.50 g,吻肛长 13.43 ± 0.89 cm),随机分为 A、B、C 3 组,每组 5 只。A 组为正常对照组,光照强度 50~100 lx (HD8366 光照度计),光照周期为 L12:D12; B 组为强光照组,光照由 500 W 的钨卤素灯提供,光照强度 1800~2000 lx,处理时间为 1 周,光照周期为 L12:D12; C 组为全黑暗处理组,处理时间为 1 周。各组动物分别于低温条件下(冰浴)快速摘

取整个眼球,在体视镜下剥离晶体后,固定于 Bouin's 液,4℃冰箱过夜,常规石蜡包埋,连续切片(Leica RM 2235),切片厚度 $5 \mu\text{m}$,选择过瞳孔和眼杯直径的视网膜切面用于免疫组化染色。

1.2 免疫组化染色方法 切片经系列酒精脱水后,用含 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 冲洗,每次 5 min,共 3 次;接着用 EDTA 修复液在微波炉内修复 10 min,冷却恢复至室温后,用 0.01 mol/L PBS 冲洗,然后用甲醇双氧水灭活内源性过氧化物酶。封闭组织内非特异性结合位点用含 10% 脱脂奶粉,10% 的正常羊血清和 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 室温孵育 1 h,接着滴加 1:300 稀释一抗(兔抗 GAP-43,购自 Chemicon 公司),4℃孵育过夜, PBS 冲洗后,加生物素化的二抗(1:300 稀释生物素化羊抗兔 IgG,北京中山生物公司),室温孵育 1 h,之后用 1:250 链霉亲和素辣根过氧化物酶(北京中山生物公司),室温孵育 1 h,最后用 DAB 显色,苏木精对染。阴性对照中用正常羊血替代一抗,封片后 Olympus BH-2 多功能显微镜观察并照相。GAP-43 抗体对蜥蜴组织的特异性已有报道^[5]。

1.3 结果分析 GAP-43 在视网膜纤维层的染色结果用灰度值表示,灰度分析采用北京航空航天大学图像中心与空军总医院医学图像开发组开发的多功能真彩色病理图像分析系统; GAP-43 在视网膜核层的染色结果用阳性细胞数目表示。数据统计时,选择每个动物的视网膜切面中央和边缘区各一段(共 3 段),每段以 $400 \mu\text{m}$ 为单位计数其中的阳性细胞数,其平均值为该个体的阳性细胞数。每个处理组 5 个个体的总平均值即该处理的结果。

2 结果

强光照和全黑暗条件下荒漠沙蜥视网膜内 GAP-43 表达的免疫染色结果见表 1 和图版 I。

2.1 视纤维层 此层是视网膜节细胞纤维,在正常对照和强光照条件下为阴性(图版 I:1, 2);全黑暗条件下 GAP-43 免疫组化染色呈很强

的阳性,灰度分析显示 GAP-43 表达量较同组的内网层高(表 1,图版 I 3)。

2.2 节细胞层 此层是视网膜节细胞层,在正常对照和全黑暗条件下未见 GAP-43 阳性胞体(图版 I :1 3);在强光照条件下,有部分胞体呈 GAP-43 阳性反应,苏木精对染后呈深棕黄色,可以观察到从阳性胞体轴突伸出的纤维(表 1,图版 I 2,→示)。

2.3 内网层 此层在正常对照和强光照条件下 GAP-43 免疫染色为弱阳性,且阳性带集中形成 3 条亚带(表 1,图版 I :1 2);全黑暗条件下此层 GAP-43 免疫染色阳性增强(图版 I 3),灰度分析见表 1。

2.4 内核层 此层在正常对照和全黑暗条件下 GAP-43 免疫染色为阴性(图版 I :1 3),强光照条件下此层内部分胞体为 GAP-43 阳性,经苏木精对染后为深棕黄色,且阳性胞体分散在整个内核层中(图版 I :2,↑示);另外还观察到极少数胶质细胞为 GAP-43 阳性(图版 I :2,粗箭头示)。

2.5 栞膜 本研究发发现荒漠沙蜥视网膜的视乳突部有栞膜伸入玻璃体内,此结构富含色素和血管,且发现在血管壁上有 GAP-43 阳性纤维分布(图版 I 4,↑示)。

表 1 强光照和全黑暗条件下视网膜各层次 GAP-43 免疫组化染色结果($n = 5$)

	视纤维层 (灰度值)	节细胞层 (密度)	内网层 (灰度值)	内核层 (密度)
对照组	-	-	191.1 ± 2.4	-
强光照组	-	24 ± 2	191.1 ± 3.3	26 ± 4
全黑暗组	188.1 ± 3.1	-	189.3 ± 4.5	-

3 讨论

本研究发发现强光照及全黑暗条件下 GAP-43 在视网膜中分布模式有变化,提示 GAP-43 在视网膜中不同层次的表达与强光照及全黑暗两种环境下的视觉功能有关。

正常条件下,视网膜内 GAP-43 的存在可能与视网膜内视觉信号的传导有关,因为发现抑制 GAP-43 的功能可能通过参与膜泡的吞噬影

响去甲肾上腺素的释放^[7,8],强光处理可引起视网膜的损伤,Lopez-Costa 等报道小鼠视网膜经强光照处理后在光感受器外节发现了 GAP-43 阳性,认为可能是视网膜色素细胞受 BDNF、CNTF 作用后诱导光感受器细胞产生的,与视觉损伤的修复有关^[9]。本实验中发现强光照处理后,荒漠沙蜥视网膜内节细胞和内核层部分胞体包括极少数胶质细胞为 GAP-43 阳性。在节细胞中发现 GAP-43 的积累过去仅在豹蛙(*Rana pipiens*)中有报道^[10];而强光照处理后在荒漠沙蜥节细胞中发现 GAP-43 的表达尚属首例;有报道发现内核层中部分 GAP-43 阳性胞体为 TH 阳性的无长突细胞^[11];也有报道表明 GAP-43 可以在胶质细胞中表达^[12],本实验的结果与上述报道一致;尽管对本实验中内核层阳性 GAP-43 胞体的定性还需要用免疫双染的方法,但至少可做下面的推测,大鼠和荒漠沙蜥的视网膜对强光照处理后的不同反应可能与 2 种动物不同的视觉再生能力有关。

郭玫等报道的暗适应能诱导光感受器内节、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诱导性一氧化氮酶,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^[13]。有报道发现大鼠视网膜内 NO 酶和 GAP-43 的表达有一定的关联性^[14]。荒漠沙蜥为昼行性动物,本研究中发现的暗适应条件下,荒漠沙蜥视纤维层内和内核层内的强阳性,可能与黑暗条件下荒漠沙蜥视觉功能的暂时丧失导致的 GAP-43 在上述结构内的大量积累有关。

本研究在荒漠沙蜥视网膜发现栞膜,与报道的北草蜥(*Takydromus septentrionalis*)视盘上发现的结果一致^[6]。其功能是通过玻璃体的弥散作用供给视网膜营养,并通过其体积的改变来调节眼内压。过去有报道表明分布到血管壁的自律神经纤维呈 GAP-43 阳性^[15],而在栞膜内血管壁发现 GAP-43 阳性纤维分布则属于首次报道。

参 考 文 献

[1] McIntosh H, Blazynski C. GAP-43-like immunoreactivity in

- the adult retina of several species. *Brain Research*, 1991, **554**: 321 ~ 324.
- [2] 司克媛, 刘忠虎, 俞诗源等. GAP-43 在锦鲤、荒漠沙蜥和雉鸡视网膜内分布的免疫组化研究. 兰州大学学报, 2005, **41**: 36 ~ 40.
- [3] Lang D M, Romero-Aleman M M, Arbelo-Galvan J, *et al.* Regeneration of retinal axons in the Lizard *Gallotia galloti* is not linked to generation of new retinal ganglion cells. *Journal of Neurobiology*, 2002, **52**: 322 ~ 335.
- [4] Dunlop S A, Tran N, Tee L B G, *et al.* Retinal projections throughout optic nerve regeneration in the Ornate Dragon Lizard, *Ctenophorus ornatus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 2000, **416**: 188 ~ 200.
- [5] Rodger J, Bartlett C A, Harman A M, *et al.* Evidence that regenerating optic axons maintain long-term growth in the Lizard *Ctenophorus ornatus*: growth-associated protein-43 and gefiltin expression. *Neuroscience*, 2001, **102**: 647 ~ 654.
- [6] 张育辉, 贾林芝. 蜥蜴亚目 5 种动物视网膜结构的观察比较. 西北大学学报, 2003, **33**: 475 ~ 478.
- [7] Dekker L V, De Graan P N, Oestreicher A B, *et al.* Inhibitor of noradrenaline release by antibodies to B-50 (GAP-43). *Nature*, 1989, **342**: 74 ~ 76.
- [8] Neve R L, Coopersmith R, Mephie D L, *et al.* The neuronal growth-associated protein GAP-43 interacts with Rabaptin-5 and participates in endocytosis. *The Journal of Neuroscience*, 1988, **18**: 7 757 ~ 7 767.
- [9] Lopez-Costa J J, Goldstein J, Mangeaud M, *et al.* Expression of GAP-43 in the retina of rats following protracted illumination. *Brain Research*, 2001, **900**: 332 ~ 336.
- [10] Soto I, Marie B, Baro D J, *et al.* FGF-2 modulates expression and distribution of GAP-43 in frog retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Journal of Neuroscience Research*, 2003, **73**: 507 ~ 517.
- [11] Kapfhammer J P, Franziska C, Schwab M E. The growth-associated protein GAP-43 is specifically expressed in tyrosine hydroxylase-positive cells of the rat retina. *Developmental Brain Research*, 1997, **101**: 257 ~ 264.
- [12] Yamamoto M, Konda H. Gene expression of a neuronal growth-associated protein, GAP-43, in the paraganglionic carotid body as well as in the autonomic ganglia of normal adult rats. *Neuroscience Letters*, 1990, **117**: 275 ~ 279.
- [13] 郭政, 陈广文, 翟心慧. 牛蛙视网膜诱导型一氧化氮合酶免疫组化定位. 动物学杂志, 2002, **37**: 6 ~ 8.
- [14] Oh Su-Ja, Kim Keun-Young, Lee Eun-Jin, *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase induces increased production of growth-associated protein 43 in the developing retina of the postnatal rat. *Developmental Brain Research*, 2002, **136**: 179 ~ 183.
- [15] Monique S, Marguerite L, Jean-Christophe D. Expression of two neuronal markers, growth-associated protein and neuron-specific enolase, in rat glial cells. *Journal Molecular Medicine*, 1997, **75**: 653 ~ 663.

图 版 说 明

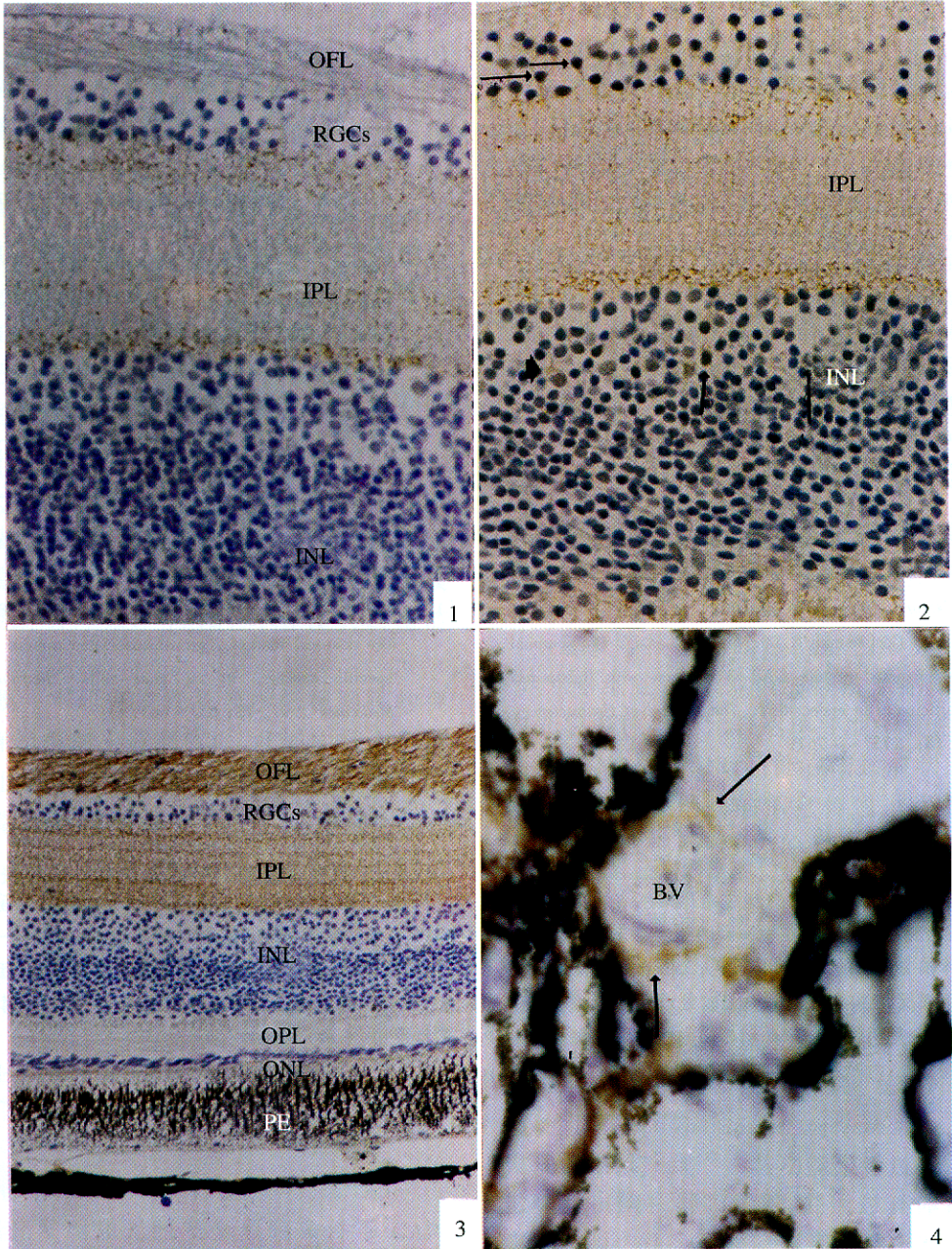
1. 示正常对照视网膜内 GAP-43 免疫组化染色结果。其中在 IPL 层呈阳性, 且在 IPL 主要集中成 3 条亚带, 其余各层呈阴性反应 $\times 100$; 2. 示强光照后 GAP-43 在视网膜内免疫组化染色结果。其中在 IPL 呈阳性反应, RGCs 层内部分细胞体 (\rightarrow 示) 呈阳性, 并可见从阳性胞体轴突伸出的纤维呈棕黄色; INL 层内部分细胞体 (\uparrow 示) 呈阳性, 并观察到极少数胶质细胞呈阳性反应 (粗箭头示); 其余各层呈阴性反应 $\times 100$; 3. 示全黑暗处理后 GAP-43 在视网膜内免疫组化染色结果。其中在视纤维层 (OFL) 和内网层 (IPL) 呈强阳性反应, 其余呈阴性 $\times 50$; 4. 示栉膜内血管 (BV) 壁表面 GAP-43 阳性反应 (\uparrow 示) $\times 200$ 。

OFL: 视纤维层; IPL: 内网层; RGCs: 视网膜节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层; PE: 色素细胞层; BV: 栉膜内血管; OPL: 外网层。

司克媛等: 强光照和全黑暗条件下荒漠沙蜥视网膜内 GAP-43 表达的免疫组织化学
SI Ke-Yuan *et al.*: GAP-43 Immunoreactivity in the Retina of *Phrynocephalus*
prezewalskii Following Exposure to Illumination and Darkness

图版 I

Plate I



图版说明见文后