论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2084-04

牛蛙视网膜内神经肽Y的免疫组织化学研究

赵 霞 (青海大学医学院基础医学部组织学与胚胎学教研室,西宁 810001)

提 要:目的 研究神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)免疫阳性反应在牛蛙视网膜特别是在内网层中的分布及其突触联系。**方法** 免疫荧光组织化学和包埋后胶体金免疫电镜定量分析技术。**结果** 在内核层最内侧区域一类胞体较大的无长突细胞呈较强的NPY免疫阳性反应(NPY-IR),胞体的突起呈3条带状分布。免疫电镜定量分析揭示:NPY-IR无长突细胞与未标记的无长突细胞突起(49.7%)和神经节细胞树突(49.3%)形成突触联系。NPY-IR的无长突细胞突起主要接受双极细胞的突触传入(86%),极少数接受未标记的无长突细胞的突触传入(14%)。**结论** NPY主要分布于牛蛙视网膜的内侧区域,主要接受来自双极细胞的兴奋性神经递质——谷氨酸的调控。

关键词: 视网膜;神经肽Y;无长突细胞;突触联系;胶体金免疫电镜

中图法分类号: R322.91;R329.3;R341 **文献标识码:** A

Immunohistochemical analysis of neuropeptide Y in the Bullfrog Retina

ZHAO Xia (Department of Histology and Embryology, Basic Medicine Unit, Medical College of Qinghai University, Xining, 810001, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution and synaptic connectivity of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity (IR) in Bullfrog retina, *Rana Calesbeiana*, especially in the inner plexiform layer. **Methods** Light microscopy immunofluorescence and post-embedding colloidal gold labeling electron microscopy techniques were employed in this study. **Results** NPY immunoreactivity was associated with a small population of amacrine cell bodies in the inner nuclear layer and cell processes, ramified with 3 distinct bands, in the inner plexiform layer. As for ultrastructure, quantitative analysis showed that NPY-IR amacrine cell processes were most often presynaptic to NPY negative amacrine cell processes (49.7%) and ganglion cell dendrites (49.3%). NPY-IR amacrine cells predominantly received synaptic input from bipolar cell axon terminals (86%), while a few input from other amacrine cell processes (14%). **Conclusion** NPY-IR in Bullfrog retina is mainly distributed in the inner part and predominately receives excitatory glutamate modulation from bipolar cells.

Key word: retina; neuropeptide Y; amacrine cells; synaptic connectivity; post-embedding colloidal gold labeling electron microscopy

神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)是一含36个氨基酸的多肽,在脊椎动物中枢和周围神经系统中具有多种生理功能[1,2]。研究表明,NPY存在于脊椎动物视网膜内,参与视觉信息的调控[2-4]。在大多数脊椎动物,一种或两种类型的无长突细胞呈NPY免疫阳性反应(NPY-IR),其他视网膜神经元是否表达NPY则因不同种动物而有差异。无长突细胞是视网膜内的抑制性中间神经元,γ-氨基丁酸(GABA)和甘氨酸为其神经递质,NPY可能与GABA的释放有关[3,4]。然而,在超微结构水平对NPY-IR无长突细胞突触环路的研究报道极少,且仅见于哺乳动物[3,4]。虽然两栖类动物视网膜内NPY分布的研究已有报道[2],但NPY-IR无长突细胞突触联系的研究迄今尚少见文献报道。研究视网膜内NPY神经元的分布及其联系,对深入理解视网膜中NPY信号的作用和信息传递有重要意义。本研究运用免疫荧光细胞化学和包埋后胶体金免疫电镜技术观察了NPY免疫阳性反应在牛蛙(Rana Catesbeiana)视网膜特别是在内网层中的分布及其突触联系。

1 材料与方法

1.1 光镜免疫组织化学

1.1.1 标本的制备 本实验选用市售牛蛙10只,体长8~12 cm。以探针损毁动物脊髓和脑,迅速分离眼球、冠状切取后半眼杯,置于4%多聚甲醛(0.1 mol/L PB,pH 7.4)中,4 ℃冰箱内固定2~3 h,之后换入20%蔗糖磷酸缓冲液,4 ℃冰箱内过夜。次日用OCT包埋剂包埋,冰冻切片(片厚14 mm),贴裱于涂明胶的载玻片上。

作者简介:赵 霞(1962-),女,山东省济宁市人,副教授,主要从事视网膜结构和功能方面的研究。电话:(0971)6108393, E-mail: zhaoxia6278@hotmail.com

收稿日期:2006-03-15;修回日期:2006-08-11

1.1.2　免疫荧光组织化学　　切片以 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液（PBS，pH 7.4）漂洗 4 次，每次 5 min。加入 1% 正常羊血清 NGS-PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）室温孵育两次，每次 15 min。经 0.3% TritonX-100 37 ℃孵育 30 min 后，以兔抗 NPY 血清（Sigma，1∶2 000）4 ℃孵育过夜。经 0.01 mol/L PBS 充分漂洗后，切片入羊抗兔 IgG-FITC（Jackson Lab.，1∶100）室温孵育 60 min。充分漂洗、封片后，荧光显微镜下观察、拍照。

1.2　电镜免疫细胞化学

1.2.1　标本的制备　　市售牛蛙 6 只。以探针损毁动物脊髓和脑，迅速分离眼球、冠状切取后半眼杯，置于含 4% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛的混合液（0.1 mol/L PB，pH 7.4）中 4 ℃冰箱内固定 30 min。分离视网膜并将其修整成窄的小条，继续在 4% 多聚甲醛液内固定 60 min。PBS 充分漂洗后入 1% OsO_4 液，后固定 15 min，梯度丙酮脱水，Epon 812 包埋。超薄切片机切半薄、超薄片（50～70 nm），收集于镍网上。

1.2.2　包埋后胶体金反应　　参见文献[5]的方法进行。以 0.5% BSA-PBS 漂洗镍网 3 次后，以 10% NGS-PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）室温孵育 2 次，每次 15 min。加入兔抗 NPY 血清（Sigma，1∶1 000）室温孵育过夜。经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次，入胶体金标记羊抗兔 IgG（10 nm，Vector，1∶25）室温孵育 120 min。充分漂洗后，醋酸铀、醋酸铅染色。电镜观察、拍照。

1.2.3　定量分析　　每例动物随机选取视网膜内网层一区域全层拍照，底片经冲洗，放大后，计数 NPY-IR 无长突细胞突起和它的传入与传出联系。鉴于超薄切片树酯上没有非特异性金颗粒附着（表明胶体金反应特异性强，背景干净），无长突细胞突起中含有 3 个以上金颗粒者被确认为 NPY-IR。确认突触性终末的标准如下：①无长突细胞突起富含较小的不规则的突触小泡。②双极细胞轴突终末富含较大的均匀的突触小泡和特征性的突触带。③神经节细胞树突没有突触小泡。

1.3　对照组实验

用 PBS 取代 NPY 一抗同步完成上述免疫荧光和免疫电镜过程，结果均为阴性。

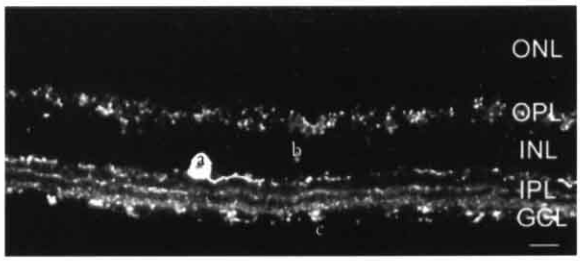
2　结果

2.1　视杆视锥层、外核层和外网层

视杆视锥层由视杆和视锥的外段和内段组成。光镜下未观察到该层呈 NPY-IR，外核层也未见 NPY-IR 的胞体。但外网层（OPL）呈较强的 NPY-IR（图 1）。电镜下部分突起呈较弱的 NPY-IR，由于这些突起的终止部位不易辨析，尚不能判断它们的细胞类型（水平细胞或双极细胞）。

2.2　内核层

内核层（INL）主要由水平细胞、双极细胞和无长突细胞的胞体构成。如图 1 和 2 所示，在此层的外侧区域内，未见 NPY-IR 的胞体。中央区域内偶见胞体较小的细胞呈 NPY-IR（图 1）系双极细胞。在此层的最内侧紧邻内网层区域，可见一类胞体较大的细胞呈较强的 NPY- IR，并见标记细胞从胞体一侧或两侧以水平方向发出突起伸向内网层（图 1）。依其胞体的位置、形态和突起走向判定系无长突细胞。电镜下一些无长突细胞和个别双极细胞的胞体被许多胶体金颗粒标记，未见水平细胞的胞体被颗粒标记。



ONL：外核层；OPL：外网层；INL：内核层；IPL：内网层；GCL：节细胞层　a：无长突细胞；b：双极细胞；c：移位的无长突细胞

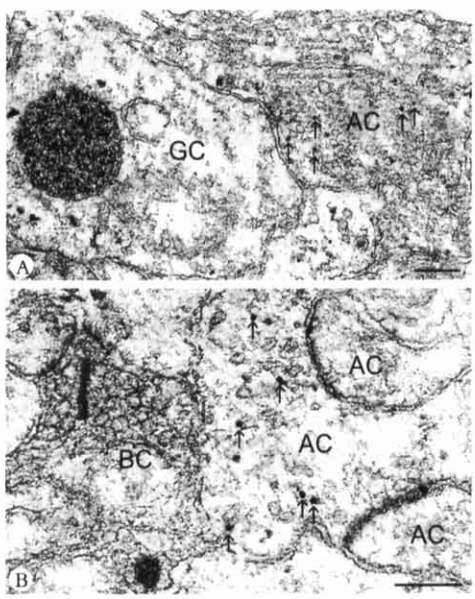
图 1　NPY 免疫阳性反应在牛蛙视网膜中的分布

（免疫荧光显微镜，标尺：40 μm）

2.3　内网层

内网层是视网膜第二和第三级神经元进行信息交换的突触联系区。我们观察到内网层 NPY 免疫阳性反应呈较强的颗粒状并呈特征性的带状分布（图 1）。在该层的内、中和外侧区域内 NPY- IR 呈 3 条带状分布，其中，内、外侧的免疫阳性反应带较中间带强。

电镜下胶体金呈高电子密度的均匀的小球状颗粒，因膜结构保护尚可，金颗粒的亚细胞定位易于辨认，大多数金颗粒与突起中的突触小泡有关。观察显示金颗粒标记（NPY-IR）的无长突细胞突起与未标记的无长突细胞的突起形成突触联系（图 2A）。同时，还与神经节细胞的树突形成突触联系（图 2B）。鉴于所有这些突触联系的突触前膜和后膜上的致密物质较少，厚度相近，均系对称性突触（或Ⅱ型突触）。未见与双极细胞的突起形成突触联系。在部分双极细胞轴突终末的二联体（dyad）处，NPY-IR 无长突细胞的突起为 2 个突触后成分之一，提示 NPY-IR 无长突细胞接受双极细胞的突触传入，偶见极少部分 NPY-IR 无长突细胞突起接受未标记的无长突细胞的突触传入。



A：神经节细胞；B：无长突细胞　AC：无长突细胞；BC：双极细胞轴突终末；GC：神经节细胞；↑：金颗粒

图 2　胶体金标记的无长突细胞和神经节细胞　（透射电镜，标尺：0.1 μm）

视网膜内网层可分为外1/3的a亚层和内2/3的b亚层，前者分为S1和S2两层，后者又分为S3，S4和S5 3层。本研究共分析了内网层中185个NPY-IR无长突细胞突起的传入和传出联系，并对阳性突起在内网层中的分布部位进行了比较，定量分析结果详见表1。86%的传入信息来自双极细胞终末，只有少部分来自其他无长突细胞。从亚层分布看，突触传入在内网层S1，S3和S5亚层较多(16/9/12)，S2和S4较少。NPY-IR无长突细胞传出信息分别到无长突细胞(49.7%)和神经节细胞(49.3%)。亚层分布在b亚层较a亚层多(117/68)，传出到无长突细胞的在S1亚层最多，S5亚层次之，而传出到神经节细胞的在S5亚层最多，S3亚层次之(表1)。

表1 NPY-IR无长突细胞的突触联系

组别	内网层a亚层		内网层b亚层			总计(%)
	S1	S2	S3	S4	S5	
传入						
双极细胞	14	3	8	3	9	37 (86.0)
无长突细胞	2	0	1	0	3	6 (14.0)
合计	16	3	9	3	12	43 (100.0)
传出						
无长突细胞	29	2	17	1	23	72 (49.7)
神经节细胞	15	3	20	2	30	70 (49.3)
双极细胞	0	0	0	0	0	0 (0)
合计	44	5	37	3	53	142 (100.0)
总计	60	8	46	6	65	185

2.4 节细胞层

此层的主要细胞成分是神经节细胞和移位的无长突细胞。光镜下偶见胞体较小的细胞呈NPY-IR(图1)，系移位的无长突细胞。未见胞体较大的神经节细胞呈NPY-IR。

3 讨论

视网膜内NPY免疫阳性反应的分布在哺乳类和两栖类动物已有报道[1-4]。本研究观察到一类胞体较大的无长突细胞呈较强的NPY免疫阳性反应，其胞体的形态学特征和突起在内网层的走向与既往在鱼、蟾蜍的研究结果相符[2]。富有意义的是，该结果与部分哺乳类动物(人和猫)的免疫组化研究报道相似[6,7]。表明在哺乳类和两栖类动物视网膜内有一种特定类型的无长突细胞恒定地呈NPY免疫阳性反应。本研究未观察到其他类型的无长突细胞或神经节细胞呈NPY免疫阳性反应。但有报道示，在大鼠和蜥蜴视网膜内有2种类型的无长突细胞呈NPY免疫阳性反应[4,8]。也有个别报道蟾蜍视网膜Muller胶质细胞表达NPY[9]。这些结果提示视网膜中表达NPY的细胞类型有种系差异。

近年来，NPY-IR无长突细胞突触联系的研究在哺乳动物视网膜有零星报道[3,4]，但两栖类动物迄今尚少见文献报道。因此，两栖类动物NPY-IR无长突细胞的传入与传出联系是否与哺乳动物视网膜完全相似尚需进一步考察。本研究运用高分辨率的包埋后胶体金免疫电镜方法，对牛蛙视网膜内特定类型的NPY-IR无长突细胞的突触联系进行了定量分析。NPY-IR无长突细胞突起主要接受双极细胞的突触传入，表明NPY-IR无长突细胞接受来自双极细胞输入信息的调控，即双极细胞的兴奋性神经递质-谷氨酸的调控。这与哺乳动物同类细胞主要接受其他无长突细胞突触传入的结果不同[3,4]。NPY-IR无长突细胞的传入信息在内网层S1，S3和S5亚层较多(16/9/12)，提示该细胞主要受3种不同类型的双极细胞调控。NPY-IR无长突细胞作为突触前成分主要与未标记的神经节细胞(49.3%)和无长突细胞(49.7%)的突起形成突触联系，表明NPY-IR无长突细胞通过直接和间接途径影响着神经节细胞的功能。该结果与哺乳动物大鼠和豚鼠的报道基本相符[3,4]。NPY-IR无长突细胞与神经节细胞的突触联系在S5和S3亚层最多，提示该细胞通过直接途径主要在内网层b亚层影响着ON型神经节细胞[10]的功能，而与无长突细胞的突触联系多见于S1亚层，提示该细胞通过间接途径主要在视网膜a亚层影响着OFF型神经节细胞[10]的功能。电镜下NPY-IR无长突细胞突起的数目在内网层S1，S3和S5亚层较多(60/46/65)，与本实验观察到的NPY-IR呈三条带状分布相吻合。总之，NPY-IR无长突细胞突触联系的特性表明该细胞在视网膜神经元环路中同时发挥着突触前和突触后调控作用。

NPY在视网膜内可能发挥着神经调质的作用。有研究表明NPY通过抑制细胞内cAMP浓度来调节兔视网膜内的神经元环路[1]。药理学研究证明，内源性运用NPY可以刺激兔视网膜内多巴胺、5-HT和精氨酸的释放[11]。有研究显示NPY受体在大鼠视网膜内有表达[12]。近年，免疫荧光双标实验证实，大鼠和豚鼠的NPY-IR无长突细胞同时表达抑制性神经递质-γ-氨基丁酸(GABA)[3,4]，提示NPY可能与GABA的释放有关。本研究观察到的NPY-IR无长突细胞作为突触前成分形成的所有突触联系均为对称性突触(图3)，表明系抑制性突触，间接提示牛蛙视网膜内此类细胞可能也表达GABA。至于NPY在视网膜内的直接作用和是否调控GABA释放的直接证据尚需进一步深入研究。

参考文献：

[1] BRUUN A, EHINGER B, SUNDLER F, *et al*. Neuropeptide Y immunoreactive neurons in the guinea-pig uvea and retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984, 25 (10): 1113-1123.

[2] BRUUN A, EHINGER B, EKMAN R. Characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in vertebrate retina[J]. Exp Eye Res, 1991, 53 (4): 539-543.

[3] KANG W S, LIM M Y, LEE E J, *et al*. Light- and electron-micro-

scopic analysis of neuropeptide Y-immunoreactive amacrine cells in the guinea pig retina[J]. Cell Tissue Res, 2001, 306 (3): 363 - 371.
[4] OH S J, D'ANGELO I, LEE E J, *et al*. Distribution and synaptic connectivity of neuropeptide Y-immunoreactive amacrine cells in the rat retina[J]. J Comp Neurol, 2002, 446 (3): 219 - 234.
[5] ZHANG J, WANG H Y, YANG C Y. Synaptic organization of GABAergic amacrine cells in the salamander retina[J]. Vis Neurosci, 2004, 21 (6): 817 - 825.
[6] STRAZNICKY C, HISCOCK J. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in neurons of the human retina[J]. Vision Res, 1989, 29 (9): 1041 - 1048.
[7] HUTSLER J J, WHITE C A, CHALUPA L M. Neuropeptide Y immunoreactivity identifies a group of gamma-type retinal ganglion cells in the cat [J]. J Comp Neurol, 1993, 336 (3): 468 - 480.
[8] STRAZNICKY C, HISCOCK J. Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the retina of two Australian lizards[J]. Arch Histol Cytol, 1994, 57 (2): 151 - 160.
[9] ZHU B S, GIBBINS I. Muller cells in the retina of the cane toad, Bufo marinus, express neuropeptide Y-like immunoreactivity[J]. Vis Neurosci, 1996, 13 (3): 501 - 508.
[10] FAMIGLIETTI E V Jr., KANEKO A, TACHIBANA M. Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina[J]. Science, 1977, 198 (4323): 1267 - 1269.
[11] BRUUN A, EHINGER B. NPY-induced neurotransmitter release from the rabbit and chicken retina [J]. Acta Ophthalmol (Copenh), 1993, 71 (5): 590 - 596.
[12] AMMAR D A, HUGHES B A, THOMPSON D A. Neuropeptide Y and the retinal pigment epithelium: receptor subtypes, signaling, and bioelectrical responses[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39 (10): 1870 - 1878.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2006)20-2087-01

个案与短篇

超脉冲 CO_2 激光切痂的临床应用

曾 东,余文林,刘宏伟,程 飚,李 勤 (广州军区广州总医院全军激光整形中心,广州 510010)

1999 - 2003 年我们对 53 例烧伤患者采用激光切痂及植皮手术,均得到满意临床疗效,现报告如下。

1 资料与方法

深度烧伤(深Ⅱ、Ⅲ度)患者共 53 例,所有患者烧伤面积均不足 30%,男性 21 例,女性 32 例,年龄 6 ~ 71 岁,平均 31.6 岁。深Ⅱ度 16 例,Ⅲ度 37 例。

Ultrapulse 5000"C"型超脉冲 CO_2 激光机,可发射连续波及脉冲波 2 种激光,连续波功率从 0.05 ~ 100 W,脉冲波能量 2 ~ 500 mJ,频率 2 ~ 1 000 次/s,功率 1 ~ 100 W。有多种手具配套使用,常用的手具有 0.2、1、3 mm 手具及特殊的 CPG(电脑图形发生器)手具等。Versavac 2 排烟机(air safe smoke filtration system)为超脉冲 CO_2 激光专用的配套排烟机,吸力强,排烟力大,方向性好,可将术中产生的烟雾迅速吸入机内处理掉。

所有烧伤创面分为相同的 2 部分,随机归入超脉冲 CO_2 激光切痂组(实验组)和手术切痂组(对照组)。实验组均采用超脉冲 CO_2 激光切痂,选 0.2 mm 手具,激光连续波发射模式,能流量 6 ~ 8 J,逐行扫描,彻底去除焦痂至正常组织。对照组采用普通手术刀切痂。2 组均于切痂后立即行自体中厚皮片移植术,于移植术后 2 周观察皮片成活率,于移植术后 8 周用 Vancouver 瘢痕指数对创面愈合情况作系列评价。

观察 2 组切痂手术时间和术中出血情况。术后 2 周用网格数格法观测皮片成活面积,计算自体中厚皮片成活率(皮片成活面积/原移植面积 × 100%)。术后 8 周采用单盲法按照温哥华瘢痕评分标准对各组移植后效果进行评分。温哥华瘢痕评估量表(VSS):通常用于增生性瘢痕的描述性评估,采用色素、厚度、血管化程度及柔软度等指标来评定,评分数值为 4 个观察项目的分数总和,量表总分为 15 分,评分越高则表示瘢痕愈严重[1]。

所有数据均应用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,切痂时间,皮片成活率和温哥华瘢痕评分用 t 检验。

2 结果

所有病例切痂顺利,实验组激光切痂基本上无出血,而对照组有不同程度的出血量(30 - 100 ml)。实验组切痂历时(70 ± 30) min,对照组历时(86 ± 25) min,两组间比较有统计学差异($P < 0.05$),激光切痂历时显著短于普通手术刀切痂。烧伤切痂创面植皮术后 2 周皮片成活率实验组(92.66% ± 7.56%),对照组(84.62% ± 8.20%),两组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。切痂创面植皮术后 8 周温哥华瘢痕量表评分实验组(2.76 ± 0.78),对照组(3.12 ± 0.51),两组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 激光切痂优点

Ultrapulse 5000C 型超脉冲 CO_2 激光可控制高峰值功率的

(下转 2090 页)

作者简介:曾 东(1976 -),女,江西省吉安市人,主治医师,主要从事激光在皮肤整形外科的应用方面的研究。电话:13076871687,E-mail:yuyang0341@sina.com

收稿日期:2006-06-30;修回日期:2006-09-30