DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.009
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1815-04

论著

Long Evans和Wistar大鼠视网膜神经节细胞电生理学及形态学特性比较研究

陈中山,阴正勤,王仕军,曾玉晓 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 比较Long Evans大鼠和Wistar大鼠睁眼前后视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)电生理学特性及形态学特征上的差异。方法 取出生后0~31 d Long Evans和Wistar大鼠,各按睁眼时间分为两组,制备视网膜片,行膜片钳全细胞记录,同时行组织切片和细胞内染色,观察形态特征。结果 比较22只Long Evans大鼠和24只Wistar大鼠被动膜学特性和动作电位(action potential, AP)幅度及阈值无显著差异,形态学上除两者视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)含或不含色素颗粒外未见明显区别。结论 Long Evans大鼠因其RPE含色素颗粒,以及在视觉和神经系统等方面的优点,可取代Wistar等白化鼠而作为一种良好的视觉和神经科学研究的实验动物模型。

关键词:大鼠;视网膜色素;色素上皮细胞;电生理学;形态学
中图法分类号:R332.91;R329.24;R338.8 文献标识码:A

Comparison of electrophysiological and morphological properties of retinal ganglion cells in Long Evans and Wistar rats

CHEN Zhong-shan, YIN Zheng-qin, WANG Shi-jun, ZENG Yu-xiao (Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the differences of the electrophysiological and morphological properties of retinal ganglion cells (RGCs) in Long Evans and Wistar rats. Methods Whole cell patch clamp recordings were made from RGCs in the acute retinal slices of Long Evans and Wistar rats aged postnatal 0-31 d. RGCs were stained with Lucifer Yellow diffused into cells during whole-cell recordings for the purpose of morphological study. The sections of rat retinas by HE staining were examined by light microscopy. Results The differences of electrophysiological properties in Long Evans and Wistar rats were not significant. There were pigment granules in retinal pigment epithelial cells of Long Evans but not in those of Wistar rats. Conclusion Long Evans rats can be the good animal model for visual and neural science research in place of Wistar rats.

Key words: rat; retinal pigment epithelial cell; electrophysiology; morphology

视觉科学研究是神经科学研究的一个重要分枝,对于了解高级神经中枢的活动机制、生理功能、病理改变等具有特殊意义。在视网膜的三级神经元中,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)综合了来自光感受器的全部信息,经整合编码后通过视神经传入高级皮层中枢,它是视网膜内惟一向中枢投射的神经元。因此,了解RGCs的电生理学及形态学特征,对进一步认识视觉生理机制有积极意义。

选择一种合适的实验动物作为进行视觉科学研究的模型,是人们一直关注的话题。以往的研究主要采用Wistar、SD等大鼠,其视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial, RPE)不含色素颗粒,Long Evans大鼠作为一种色素眼鼠,与白化鼠相比其视网膜更接近人类的生理状态。

本实验室采用从美国Taconic公司引进的Long Evans大鼠和第三军医大学实验动物中心提供的Wistar大鼠,研究视网膜神经节细胞的电生理和形态学特性,并对两者进行比较,为今后的视觉和神经科学研究、视网膜移植及移植后功能的检测等寻找一种最佳的动物模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

EGTA、HEPES、MgATP、NaGTP、Lucifer Yellow、甲磺酸铯(Sigma,美国),丙酮酸钠(Sagon,上海),乳酸钠、$NaHCO_3$、NaH_2PO_4等(重庆化学试剂厂)。

1.2 主要仪器

膜片钳放大器(Axopatch200B,美国),微操作器(Lid MC-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270457)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270457)
作者简介:陈中山(1976-),男,湖北省宜昌市人,硕士研究生,医师,主要从事视觉发育基础方面的研究。电话:(023)68754403
通信作者:阴正勤,电话:(023)68754401, E-mail: zqyin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-11-04;修回日期:2004-03-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

35A, 日本), 电极拉制器(P-97 Flaming/ Brown 式, 美国), A/ D 转换器(Digidata 1200A/ D, 美国), 玻璃微电极(tw150F-4 型, 美国 WPI 公司), 正置式显微镜带 40× 水镜(Olympus BX51WI, 日本), 红外线摄像头(IR-1000EX, 美国)。

1.3 电生理学记录

1.3.1 记录液的配制[1] 电极内液成分及其浓度(mmol/ L): 甲磺酸铯 120, HEPES 20, EGTA 10, MgATP 2, NaGTP 0.2, 加 NaOH 调整 pH 至 7.2。正常细胞外液的组成(mmol/ L): NaCl 119, KCl 2.5, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.3, $NaHCO_3$ 26.2, NaH_2PO_4 1, 葡萄糖 20, 丙酮酸钠 2, 乳酸钠 4, 充灌 95%O_2+5%CO_2 混合气调整 pH 至 7.2~7.6。

1.3.2 实验动物及视网膜片的制备 采用从美国(Taconic)公司引进的 Long Evans 大鼠 28 只和第三军医大学实验动物中心提供的 Wistar 大鼠 27 只, 体质量 10~120 g, 雌雄不拘, 按照睁眼时间(约出生后 14 d)分为两组: 睁眼前组(P 0~ 13 d); 睁眼后组(P14~31 d)(出生当天记为 P 0 d)。视网膜切片的制备: 乙醚麻醉动物, 快速断头, 迅速摘出眼球, 浸入室温下氧饱和的新鲜细胞外液中, 切除眼球前节, 剥离视网膜, 切成 2~3 片, 以低熔点琼脂糖(熔点 30 ℃)包埋视网膜, 振动切片机将其切成约 200 μm 薄片, 移入室温下氧饱和的细胞外液中备用。应用电极拉制器拉制玻璃毛细管微电极, 拉制好的电极在注入电极内液后测阻抗为 6~10 MΩ。

1.3.3 视网膜神经节细胞全细胞记录 在红外线显微镜下, 调节微操作器, 使电极尖端接近视网膜片表面神经节细胞层, 寻找隐约可见轴突且胞体光泽圆滑的细胞, 利用特定的测试方波电脉冲观察全细胞记录。在得到全细胞膜片(whole cell patch)后立即记录其静息膜电位(resting membrane potential, RMP), 电压钳下给予 2 mV 的超极化脉冲记录输入阻抗(input resistance, IR)。然后电流钳下给予不同强度持续 1 s 的去极化脉冲诱发产生动作电位(action potential, AP), 记录峰值在 0 mV 以上的 AP。去极化脉冲从 10 pA 开始, 以 10 pA 递增, 直至 100 pA, 观察不同刺激强度下 RGCs 的反应。在记录中期及结束后再次观察其 RMP。细胞反应由膜片钳放大器放大后通过 A/ D 转换器转换成数字化数据, 送入计算机, 应用 Axon 公司的 pClamp6.0 软件中的 Clampex 采集数据。

1.4 形态学观察

1.4.1 视网膜组织学观察 取出生后 31 d 内隔天正常 Long Evans 大鼠和 Wistar 大鼠眼球, 去除眼前节, 将眼杯在 10%中性甲醛液中浸泡固定 3 d, 石蜡包埋, 切片 4 μm, 常规行苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察。

1.4.2 RGCs 荧光黄(lucifer yellow, LY)染色 在 RGCs 膜片钳电生理记录的同时, LY 通过记录电极尖端扩散入所记录的细胞内, 染色 10~20 min 后, 缓慢地将记录电极旋出, 即刻将视网膜切片移至 Leica 荧光显微镜下观察, 扫描、拍片, 在图像分析仪上测量细胞直径及树突多少。

1.5 纳入、排除标准

对进行电生理记录的 RGCs 制定以下纳入标准: 记录过程中 RMP 变化< 20%; 初始串联阻抗< 30 MΩ; 去极化脉冲能诱发出 AP 且峰值在 0 mV 以上; 记录时选择隐约可见轴突且胞体光泽圆滑的细胞; 全细胞记录结束电极自细胞内旋出后直流补偿< 5 mV; 记录结束后荧光显微镜下观察细胞直径> 10 μm。

1.6 统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 Axon 公司的 pClamp8.1 软件中的 Clampit 进行数据分析, 用 SPSS10.0 统计软件包行 χ^2 检验、t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 Wistar 和 Long Evans 大鼠电生理学特性比较

本实验中 28 只 Long Evans 大鼠共记录到 56 个 RGCs, 27 只 Wistar 大鼠共记录到 56 个 RGCs。

2.1.1 RMP 和 IR 比较 经统计学分析, 睁眼前和睁眼后两种大鼠的 RMP 和 IR 各自比较有显著差异, 但两种大鼠之间差异并不显著(P> 0.05), 见表 1。

表 1 Wistar 和 Long Evans 大鼠睁眼前后 RMP 和 IR 比较

Tab 1 Comparison of RMP and IR of RGCs during pre- and post-eye-opening between Long Evans and Wistar rats

	n	RMP(mV)	IR(MΩ)
Pre-eye-opening			
Wistar	28	−53.01±4.35	886.30±125.33
Long EvansP	28	−53.21±4.04	866.65±118.78
Post-eye-opning			
Wistar	28	−57.13±5.12	683.31±111.49
Long Evans	28	−57.87±4.34	665.16±159.85

RMP: $F1$= 26.691, $P1$= 0.000, pre-eye-opening *vs* post-eye-opening; $F2$= 0.334, $P2$= 0.565, Wistar *vs* Long Evans; IR: $F1$= 67.566, $P1$ = 0.000, pre-eye-opening *vs* post-eye-opening; $F2$ = 0.590, $P2$ = 0.444, Wistar *vs* Long Evans

2.1.2 AP 类型 RGCs 得到全细胞记录后, 电流钳下给予不同强度的去极化脉冲诱发产生 AP, 根据 AP 波形可分为 3 类: 单峰型、瞬变型和持续型, 与 Wang 等[2] 所记录到的一致。两种大鼠睁眼前后各类型 AP 所占的比例有显著差异, 而两种大鼠之间差异不显著(P> 0.05), 见表 2。

表 2 睁眼前后 Wistar 和 Long Evans 大鼠 RGCs 不同 AP 类型所占比例比较

Tab 2 Comparison of proportions of AP types during pre- and post-eye-opening between Long Evans and Wistar rats

	n	Single firing	Transient firing	Sustained firing
Pre-eye-opening				
Wistar	28	14(50.0)	8(28.6)	6(21.4)
Long Evans	28	13(46.4)	9(32.1)	6(21.4)
Post-eye-opening				
Wistar	28	5(17.9)	10(35.7)	13(46.4)
Long Evans	28	4(14.3)	11(39.3)	13(46.4)

Pre-eye-opening *vs* post-eye-opening: χ^2= 7.064, df= 2, P= 0.029 in Wistar rats; χ^2= 7.544, df= 2, P= 0.023 in Long Evans rats; Wistar *vs* Long Evans: χ^2= 0.096, df= 2, P= 0.953 during pre-eye-opening; χ^2 = 0.159, df= 2, P= 0.924 during post-eye-opening

2.1.3 AP 特性 与睁眼前组比较, 睁眼后两种大鼠 RGCs 的 AP 阈值降低, 幅度升高(P< 0.01), 而同天龄阶段两种大鼠之间无显著性差异(P> 0.05), 见表 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　Wistar 和 Long Evans 大鼠 RGCs AP 幅度和阈值比较

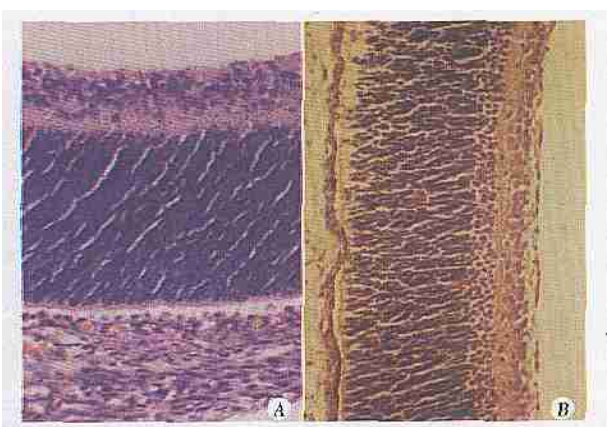
Tab 3　Comparison of amplitude and threshold of AP between Long Evans and Wistar rats

	n	Amplitude(mV)	Threshold(mV)
Pre-eye-opening			
Wistar	28	53.73±3.89	−32.16±4.48
Long Evans	28	54.09±4.34	−32.11±3.74
Post-eye-opening			
Wistar	28	64.62±5.31	−36.44±6.32
Long Evans	28	64.81±5.31	−36.63±5.47

Amp: $F1=159.772$, $P1=0.000$, pre-eye-opening *vs* post-eye-opening; $F2=0.104$, $P2=0.748$, Wistar *vs* Long Evans; Thr: $F1=20.881$, $P1=0.000$, pre-eye-opening *vs* post-eye-opening; $F2=0.006$, $P2=0.938$, Wistar *vs* Long Evans

2.2　Wistar 和 Long Evans 大鼠形态学特性比较

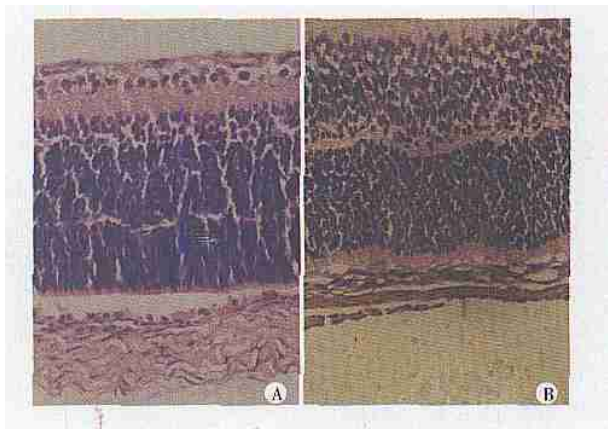
2.2.1　视网膜组织学观察　Wistar 和 Long Evans 大鼠视网膜组织切片(HE 染色, × 200 和× 400)观察, 可见两者网膜发育速度基本一致, 出生后 1~3 d 的大鼠视网膜组织只有视网膜色素上皮层、神经母细胞层、内丛状层及神经节细胞层, RPE 为排列整齐的单层细胞, 可见深染的细胞核, 其中 Wistar 大鼠 RPE 色淡, 细胞不含色素颗粒, 而 Long Evans 大鼠 RPE 层颜色深染, 色素细胞内可见较多的色素颗粒, 分布于细胞的顶部中段; 最内层为神经节细胞层, 细胞呈椭圆形, 大致排列为 2~5 层, 见图 1。出生后 5~9 d 的大鼠视网膜神经母细胞层分化出内、外核层, 但其分界线不明显, 视网膜神经节细胞层大致呈 1~3 层, 较整齐; RPE 层增厚, 胞体增大, Wistar 大鼠 RPE 仍未见色素颗粒, Long Evans 大鼠 RPE 胞内色素颗粒增多。至出生后 13 d, 可见 RPE 层、内外核层、内丛状层和神经节细胞层, 视网膜神经节细胞层大致呈单层, 细胞胞体较大, 染色较淡, 排列较整齐; RPE 胞体增大, Long Evans 大鼠色素颗粒更丰富, 见图 2。至出后 17 d 的大鼠视网膜结构已趋完善, 可分清视网膜的 10 层结构, 但感光细胞的内、外节较正常为短。出生 21 d 的大鼠视网膜光镜所见结构与正常成年鼠基本一致, RPE 的细胞核位于基底部, Long Evans 胞内色素颗粒沉积, 而 Wistar 仍未见色素, 见图 3。



A: Retina of Wistar rats containing single layer of RPE without pigment; B: Retina of Long Evans rats containing single layer of RPE with pigment

图 1　出生后 **1 d** 大鼠视网膜, 只有视网膜色素上皮层、神经母细胞层、内丛状层及神经节细胞层, **RPE** 为排列整齐的单层细胞, 可见深染的细胞核　(HE× 400)

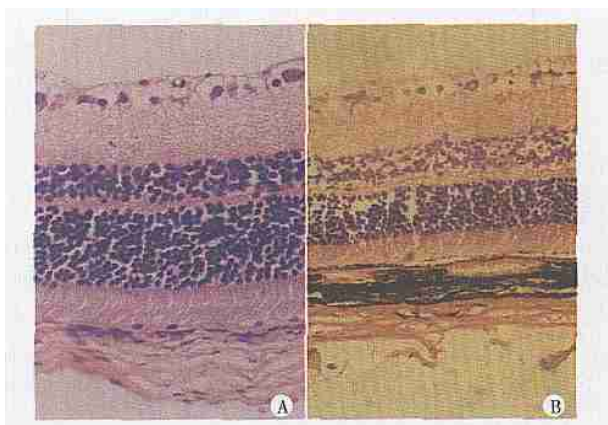
Fig 1　Only RPE layer, neuroblast cell layer, inner plexiform layer, and RGC layer were seen in P1 d rats　(HE× 400)



A: Retina of Wistar rats containing single layer of RPE without pigment yet; B: Retina of Long Evans rats containing single layer of RPE with rich pigment

图 2　出生后 **9 d** 大鼠视网膜神经母细胞层分化出内、外核层, 但其分界线不明显, 视网膜神经节细胞层大致呈 **1~3** 层, 较整齐; **RPE** 层增厚, 胞体增大　(HE× 400)

Fig 2　Inner and outer plexiform layers were differentiated, and RGCs layer showed 1-3 layers; RPE layer became thick and cells augmented in P9 d rats　(HE× 400)



A: Retina of Wistar rats containing single layer of RPE without pigment yet; B: Retina of Long Evans rats containing layer of RPE with deposition of pigment

图 3　至出后 **17 d** 大鼠视网膜结构已趋完善, 可分清视网膜的 **10** 层结构, 与正常成年鼠基本一致　(HE× 400)

Fig 3　The structure of retina became consummate and 10 layers of retina were differentiated in P7 d rats　(HE× 400)

2.2.2　RGCs 荧光黄(lucifer yellow, LY)染色观察　两种大鼠视网膜经 RGCs 经 LY 标记后, 迅速在荧光显微镜下, 进行形态学观察。发现 15 个标记细胞, 细胞染呈金黄色, 呈卵形或圆形, 胞体大小不等, 直径约 10~22 μm, 树突伸入内丛状层, 终止于 ON 或 OFF 亚层, 树突分枝浓密不等, 轴突不明显。Wistar 和 Long Evans 大鼠 RGCs 荧光染色见胞体大小、形态及树突、轴突数量无明显区别, 见图 4。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: RGC of P15 d Wistar rats; B: RGC of P15 d Long Evans rats

图4 视网膜神经节细胞膜片钳全细胞记录的同时，细胞内注入 **Lucifer yellow**，在荧光显微镜下进行形态学观察，细胞染呈金黄色，呈卵形或圆形，可见树突和轴突 （×200）

Fig 4 Lucifer yellow was diffused into RGCs while patch clamp whole cell recordings were adopted and RGCs were observed with a fluorescent microscope. RGCs appeared golden yellow in ovoid or round shape. The dendrites and axons were seen clearly （×200）

3 讨论

研究视觉电生理机制、视网膜色素变性疾病发病机制、视网膜移植等实验研究，对于人类了解视觉形成过程，以及高级神经中枢的活动的生理功能、病理改变等具有重要意义，并对治疗视网膜变性和遗传性疾病提供理论依据，从而最终在临床上攻克这一类疾病。研究工作中选择什么样的动物模型，成了一个很重要的切入点。Wistar、SD 等大鼠是实验研究中最常用的动物标本，因其易于饲养，繁殖力强，体积小，被广泛用于神经科学的研究中。但由于此类大鼠不含色素，而色素在机体的发育代谢及完成各项生理功能中发挥重要作用[3]，因此直接影响了相关方面的研究。人眼 RPE 细胞对视觉功能起着重要的作用[4]，能促进视网膜神经上皮层的发育和生存[5]，它与感光细胞的相互作用对于维持视网膜的正常功能起着重要作用。电镜下可见 RPE 胞浆中含有大量的色素颗粒，颗粒大小约（2～3）μm×1 μm×1 μm，分布于细胞的顶部中段。色素颗粒为一薄膜所保绕，内充以黑色素。色素颗粒的主要作用是捕捉光传导过程中未被光感受器吸收的光子，防止光的散射和反射，从而保证视网膜成像的清晰[6]，因此色素的存在保证了视觉功能的完整形成。

Long Evans 大鼠又称 Hooded rats，该品系最初是由 Dr. Long 和 Dr. Evans 于 1915 年通过 Wistar 白鼠和野生灰鼠杂交获得的。Long Evans 大鼠易于饲养，繁殖力强，对呼吸系统疾病的抵抗力较一般大鼠强，适合手术操作。其双眼位置与普通大鼠比较位于头部两侧偏前，具有较好的同时视，视神经交叉的比例较高，视觉中枢神经元的双眼视觉要好于白化鼠[7,8]，同时 RPE 细胞富含色素颗粒，视觉功能更完备。

本实验研究中比较 Long Evans 和 Wistar 大鼠电生理学特性，RGCs 被动膜学特性和 AP 幅度、阈值在统计学上无显著差异，Long Evans 大鼠 RMP 和 IR 均值较 Wistar 大鼠低，AP 阈值均值低于 Wistar 大鼠，AP 幅度均值高于 Wistar 大鼠，表明 Long Evans 大鼠 RGCs 兴奋性更高，最大放电能力和持续放电能力更强。在研究视网膜移植治疗视网膜色素变性疾病中，RCS（royal college of surgeon）大鼠作为一种遗传性视网膜色素变性大鼠常作为受体，Long Evans 大鼠因其视网膜色素上皮细胞含有色素颗粒是良好的正常视网膜供体[9]，本实验室正在进行视网膜移植相关方面的研究，Long Evans 大鼠被选作正常供体。通过本实验研究和已经完成的相关报道显示的该大鼠在视觉和神经系统等方面的优点，提示它可作为一种良好的视觉和神经科学研究的实验动物模型。

参考文献：

[1] Chen S, Diamond J S. Synaptically released glutamate activates extrasynaptic NMDA receptors on cells in the ganglion cell layer of rat retina[J]. J Neurosci, 2002, 22(6): 2165－2173.

[2] Wang G Y, Ratto G M, Bisti S, *et al*. Functional Functioncl development of intrinsic properties in ganglion cells of the mammalian retina[J]. J Neurophyasiol, 1997, 78(6): 2895－2903.

[3] Minneman K P, Wurtman R J. The pharmacology of the pineal gland[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1976, 16: 33－51.

[4] Frohlich E, Klessen C. Regional differences and post-mortem stability of enzymatic activities in the retinal pigment epithelium[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003, 241(5): 385－393.

[5] Campochiaro P A. Cytokine production by retinal pigmented epithelial cells[J]. Int Rev Cytol, 1993, 146: 75－82.

[6] Schwartzman M L, Masferrer J, Dunn M W, *et al*. Cytochrome P450 drug metabolizing enzymes and arachidonic acid metabolism in bovine ocular tissues[J]. Curr Eye Res, 1987, 6(4): 623－630.

[7] Huot R L, Plotsky P M, Lenox R H, *et al*. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats[J]. Brain Res, 2002, 950(1-2): 52－63.

[8] Phokeo V, Kwiecien J M, Ball A K, *et al*. Characterization of the optic nerve and retinal ganglion cell layer in the dysmyelinated adult Long Evans Shaker rat: evidence for axonal sprouting[J]. J Comp Neurol, 2002, 451(3): 213－224.

[9] Hsiue G H, Lai J Y, Lin P K. Absorbable sandwich-like membrane for retinal-sheet transplantation[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 61(1): 19－25.

（编辑 刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net