

脊椎动物在位视杆色素的漂白 和复生研究的新进展

——纪念 Kühne 关于视色素方面的先驱工作发表 100 周年(下)

刘育民

(上海生理研究所)

IV. 对活体完整眼的研究

RRD 技术的原理是:当一束光(通常是单色光)投射到网膜上,两次通过网膜后,其中很小的一部分(约为入射光的 $1/40,000-1/20,000$)由眼底反射从瞳孔而出,这部分光能被汇集和测量,按这光束为视色素衰减的程度即可测知色素的水平。Rh 在其吸收峰最大吸收率变化的两倍 ($2 \times \Delta A$) 仅约 $0.2A$ 。目前这项技术已能测定 $0.004A$ 的变化,即相当色素浓度的 1.6% ^[15]。这就要在相当低的光线下实现相当高的信噪比。在方法学上和在理论上,涉及 RRD 这项相当复杂技术的各种问题,如散射光的控制和估计,色素密度的测定和推算等,还不能说已完全解决,但目前这个方法用来描述在位色素密度的变化已达到相当可靠的程度。从研究 VP 衰变模式的观点来看,RRD 方法的时间分辨力较差,所以应用受到较大的限制;这方法能检测的最早光生产物是 MIII^[2,15,43,65,67,73]。研究活体在位眼 VP 的主要价值在于能把视色素密度变化与视功能——特别是视阈和适应——相关起来。比较各种动物的漂白-复生动力学无疑会增加我们对视觉机制多样化的了解,而不致惑于实验所造成的任何可能的差别,因为取材于不同动物的实验是决不可能完全相比的。近年来,RRD 方法在眼科研究中日益广泛

地被使用,有助于某些疾病的病因学研究,这转而又为基础研究的某些基本问题提供新线索。在本部份,我们仅对人、猫、大白鼠的 RRD 研究进行讨论,这是因为:(i)对人的研究进行得最深入;(ii)最近才对猫和大白鼠 VP 的漂白-复生动力学进行了精确而富有启示的研究^[15,59,60]。至于别的动物,读者可参考综合报道(如 B1 的第九章)和上述关于猫和鼠的文献,这些文献对早期工作作了详尽的讨论。

A. 人

1. 长时间*光照引起的漂白和复生——虽然 Rh 是人网膜中首先测得的视色素,但活体视色素的漂白和复生动力学的研究首先是在锥细胞进行的^[B1的第九章]。在中央凹,能检测到两种锥细胞视色素,即亲红色素和亲绿色素,第三种锥细胞色素——亲蓝色素,由于量少和中央凹中区的蓝色盲特性,至今未能用 RRD 技术检出。因此在典型的二色觉中央凹,只能检测出一种锥细胞色素,亲红或亲绿色素而不被杆细胞色素所沾染。亲红色素和亲绿色素的漂白复生动力学几乎完全相同,所以在正常的中央凹,混合的锥细胞色素也能作为单一的色素来进行研究。主要归功于 Rushton,锥细胞色素的漂白-复生动力学可为一个简单的单分子反应所描

* 所谓长时间,指除短闪光之外的漂白情况。

述

$$-\frac{dp}{dt} = \frac{I \cdot p}{Q_e} - \frac{1-p}{t_0} \quad (11)$$

式中 p 是未漂白的视色素百分数； I 是漂白光的光强, 通常用 troland (td , 一种视网膜照度单位) 表示； Q_e 是漂白色素至 e^{-1} 所需的光量 (没有复生时), 通常用 $td \cdot \text{秒}$ 表示； t_0 是复生时间常数。漂白光停止时, $I = 0$, 方程式 (11) 简化为复生方程

$$\frac{dp}{dt} = \frac{1-p}{t_0} \quad (11')$$

锥细胞色素的 t_0 为 130 秒左右, Q_e 可由视色素的百分数 p 和漂白时程的点系曲线的起始斜率决定 (见图 19)。 Q_e 是漂白速率的倒数, 因此 $1/Q_e$ 即为光敏度 P_e 。当 Q_e 和 t_0 为已知, 方程式

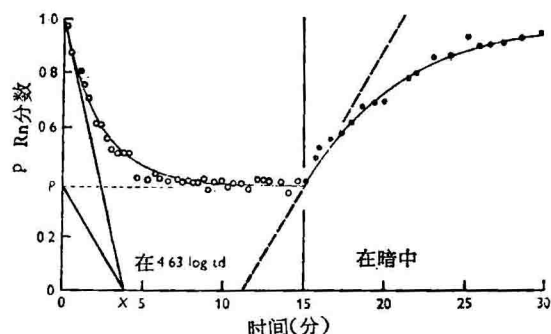


图 19 在体内人活眼 Rh 的漂白(○)和复生(●)的过程, 相对总含量表示(纵坐标)

(0—15 分, 用 $4.63 \log sc.td$ 光适应, 达到平衡状态后, 第 15 分钟撤适应光, 示 Rh 复生过程。通过测定点的线, 均为指数曲线, 时间常数 371 秒。其他解释见正文。(Alpern, 1971)

(11) 可以很好的描述明适应或暗适应过程中任何时刻的锥细胞色素水平及其变化。Alpern 在 1971 年证实上述锥细胞色素的所有性质都适合于 Rh, 只是 Rh 的反应总速度较慢 (约为锥细胞的 $1/3$) 和 P_e 略低, 后者可能是由于杆细胞的汇光作用 (funneling property) 略逊于锥细胞的缘故 (参考文献 [3, 23, 61])。测量 Rh 时, 为了使相对地不为锥细胞色素和 Rh 的衰变产物 MIII 所干扰, (i) 一般采用偏离中央凹 $15-20^\circ$ 的网膜区域, 那里的杆细胞对锥细胞的比例最高, 杆细胞信号为锥细胞沾染可以忽略; (ii) 其次用

波长 $> 550nm$ 的测量光, MIII 的吸收可以忽略 (当漂白光是持续光时, 可以不须注意这一点, 因为在持续漂白过程中, MIII 随即分解)。注意这两点后, 对 Rh 的测量就可信了。Alpern 采用方程式 (11) 的积分式

$$p = P + (p_0 - P)e^{-t/t_0P} \quad (12)$$

其中 p_0 是 $t = 0$ 时的 p 值, P 是 $t = \infty$ 时的 p 值。此方程可描述任何时刻、任何光强 (包括零) 引起的视色素密度 (相对最大值) 随时间的变化。当光强为 I , P 是平衡状态时的 p 值, 可用下式计算

$$P = \frac{I_0}{I + I_0} \quad (13)$$

这里 $I_0 = \frac{Q_e}{t_0} = 4.44 \log td$, 为在平衡状态时漂白一半 Rh 的视网膜照度。使方程 (11) 左侧项为 0, 即可推导出方程 (13)。在黑暗中, $P = 1$ 。关于此方程应用的一个实例示于图 19, $I = 4.63 \log td$, $P = 0.385$ (即平衡状态时的色素百分数)。撤光时, $p_0 = 0.385$, $P = 1$ 。取 $t_0 = 371$ 秒, 在第 15 分钟 (漂白已达平衡) 之前和之后的曲线可分别描述为

$$p = 0.385 + 0.615e^{-t/143} \quad (14)$$

$$p = 1 - 0.615e^{-t/371} \quad (15)$$

符号是实际测量的结果, 可以看到与理论曲线吻合得相当好。根据 Alpern, 普遍动力学方程 (11) 对所有不同程度的漂白都是适用的 (图 20)。人 Rh 的动力学特性与猫和鼠 (见下) 及其他动物 (见 IIIc) 形成鲜明的对照, 它的含义将在下文中讨论。

2. 闪光引起的漂白和复生——若漂白光为闪光, 可出现两种情况: (i) 若闪光如此之短而强以致落于 MRh 存在期间的光子密集簇可以引起多重的量子撞击, 形成异常的分子状态 (光逆化等), 这使方程 (11) 失去普遍适用性, 并导致某些异常的视觉现象。[B1 的第九章, B2 的第九章, 61]。这是一个特殊的研究课题, 不在此详述, 只是在下一节论及杆细胞的暗适应时再略加提及。(ii) 若闪光不是那么短而强, 但仍足以在较短时间内漂白相当量的 Rh, 以致在这个短时间内形成

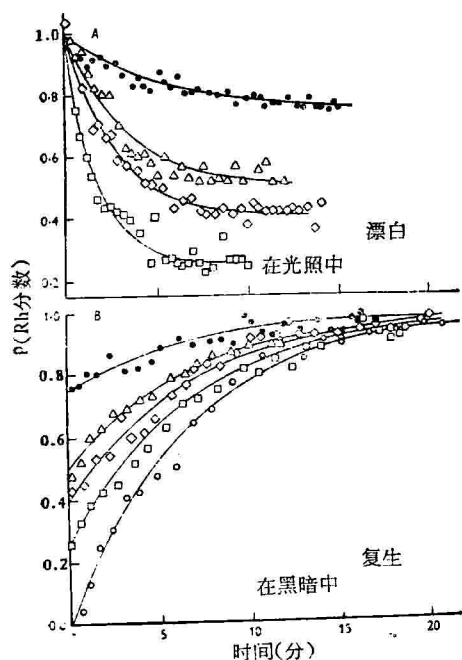


图 20 A. 不同光强漂白体内活眼时 Rh 的变化。
B. 当 Rh 达到五个平衡浓度, 撤光后的复生

各曲线为一次实验, 均符合式 (12), $t_0 = 4.44 \log t_d$; $t_0 = 400$ 秒; 测量光为 555nm 单色光。(Alpern, 1971)

的 MIII 来不及分解因而可被检测得出, 这样也引起在暗适应过程中 Rh 的动力学测定和杆细胞阈值的变化与按式 (11) 所预示的结果有所偏离。

Rushton (1956) 首先推测, 当没有足够的时间允许 MIII 衰变时, 这产物就可能干扰活体

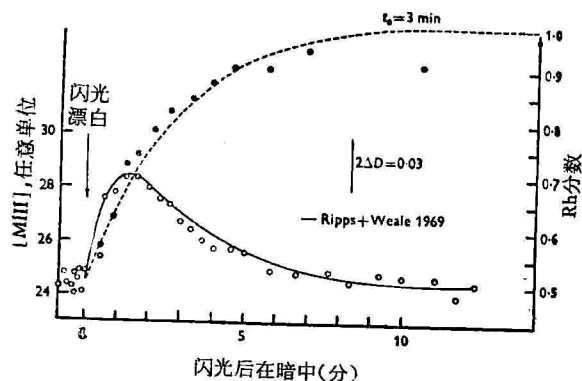


图 21 闪光漂白人体内活眼 Rh 所产生的 MIII (实线和小圆圈, 用左边纵坐标) 的形成和复生以及 Rh 的复生(虚线和黑点, 用右边纵坐标)

其他解释见正文。(Alpern, 1971)

网膜中 Rh 的差别光谱的精确测定。60 年代, Weale 等对 MIII 的检测进行了比较多的研究^[65,75]。最清楚地显示 MIII 的存在, 首先是他和 Ripps 在 1969 年发表的工作。他们推导出同方程 (6) 一样的数学表达式, 来描述 MIII 的形成和衰变, 时间常数分别为 1 分和 2 分。1971 年 Alpern 利用截然不同的技术, 完全证实了 Ripps 和 Weale 的结果。Alpern 的结果示于图 21 (小圆圈), 为了比较, 也列入了 Ripps 和 Weale 的结果 (连续线)。活体中测得的 MIII 形成和衰变的时间常数, 比在 IR 中测定的 k_1 和 k_3 大一些^[13]; 这部分地因为在 Ripps 和 Weale 的简单模式中, k_2 不能被测定 (参见图 18 中的附表)。图 21 还包括暗适应过程中 Rh 复生的测定 (小点..., 用右侧纵坐标), 总体来说是一指数曲线, 时间常数 3 分钟 (虚线), 这还不到长时间漂白后测到的时间常数的一半 (比较图 20 B 中的 $\triangle-\triangle-\triangle$)。为什么闪光所引起的 Rh 复生速度不同于长时间漂白 (更符合自然情况) 的复生速度, 至今尚未进行系统分析; Weale 工作组和 Rushton-Alpern 工作组对 Rh 复生时间常数测定的一些差异, 至少部分地是因为他们所用的漂白光有所不同。此外, 上述研究还指出, 形成的 MIII 仅占被漂白的 Rh 总量的大约 1/3, 即并非全部被漂白的 Rh 衰变为 MIII, 显然一部分 MII 直接衰变为 $Ra^{[2,15,65]}$, 不过后一途径不能直接为 RRD 技术测定, 因为由于晶状体的吸收, 在活体完整眼测量紫外区的吸收率的变化, 即使不是不可能也是很难的。

3. 复生的机制——如上所述, Rushton-Alpern 强调, 不管漂白程度如何, Rh 复生总是遵循着单分子事件。假使 Rh 的复生可以简单地以 11-顺和 Op 的结合来描述, 那么这个复生性质就要求 11-顺 Ra 维持到固定浓度^[68]。比较难设想在体内存在一种使 Ros 中游离生色基团在任何漂白情况下总是稳定在一个水平的机制, 而且似乎也难以与下述事实相一致, 即漂白复生动力学参数是随 Rh 漂白量而变化的 (见 IIIB)。

不能说已确证在很低漂白水平时, 如 $< 5\%$, 人 Rh 复生时间常数仍然不变; 由于 RRD 的固有精度, 这一点在实验上还未被验证。这提示在小量漂白时需要在人 IR 标本进行精细的实验, 因为对 IR 标本的测定可以达到较高的精度。但是纵然允许小量漂白时存在这样的偏离, 人网膜 Rh 的复生在相当大的漂白范围时所显示的指数特性已很不同于许多种动物(蛙、猫、鼠等, 见下文)。

人杆细胞色素复生的另一特性是它依赖于相邻锥细胞的漂白和复生状态。在某些情况下, 复生的锥细胞要阻碍杆细胞 Rh 的复生。这一现象为 Rushton 于 1968 年所发现, 被解释为在争夺色素复生所需的同一生色基团时, 敏捷的锥细胞压倒了杆细胞, 即所谓的杆/锥竞争现象。这现象只能在某种特殊漂白条件下和在锥/杆比例特别高的视网膜部位才能加以揭示。Rushton 用来显示这一现象的巧妙设计, 为应用心理物理学技术研究视色素动力学提供了一个好范例。

4. 视紫红的动力学和杆细胞的敏感性——研究活体视色素与视网膜功能相互关系的最重要方面, 是把视网膜敏感性变化与漂白复生动力学相关起来。经过约 20 年的努力(例见 [B1] 的第九章, 70), Dowling 终于在 1960 年发现了大白鼠的 ERG 阈值升高的对数与被漂白的 Rh 成正比(见图 32 中的直线)。稍后, Rushton 在活体人眼的杆细胞系统和锥细胞系统均找到了相似的关系。图 22 示 Rushton (1961) 在杆细胞单色觉者所进行的一个出色的实验, 小圆圈 (○, 正常人) 和点 (●, 单色觉者) 表示暗适应时复生的 Rh 的百分数 p , 使用右侧坐标; 曲折线段表示适应计记录的阈值变化, 使用左侧坐标。虚线描绘的为正常人的平均暗适应曲线。Rushton 的研究表明, 只要未复生的 Rh 还大于 8%, 杆细胞的阈值就高于锥细胞。因而在 Rh 的复生到达这个程度之前, 视觉就为锥细胞所主导, 即看不到杆细胞暗适应曲线的初始阶段。但在杆细胞单色觉者, 锥细胞对杆细胞的这种阻碍不复存在, 暗适应曲线在高出正常 4 个对数单位

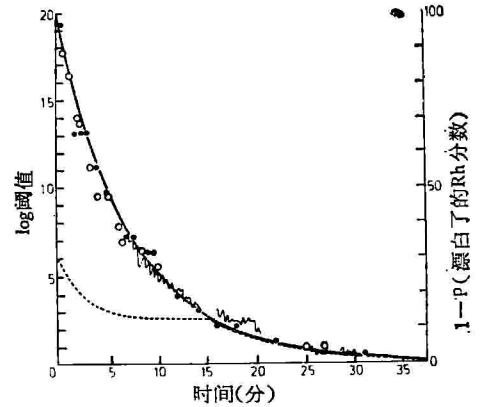


图 22 完全漂白视色素后 Rh 的复生过程(正常人, ○; 杆细胞单色觉, ●; 右纵坐标)和杆细胞单色觉者的暗适应曲线(不规则的曲折线段; 左纵坐标)

虚线为正常人的平均暗适应曲线。其他解释见正文。([B2.3])

时仍然可以被测定。对数阈值的指数下降与 Rh 复生分数上升极其一致。显然视阈与未复生的 Rh 的关系为

$$\log \frac{\Delta I(t)}{\Delta I_0} = \alpha [1 - p(t)] \quad (16)$$

这里, $\Delta I(t)$ 是暗适应过程中的阈值, ΔI_0 是绝对阈, $[1 - p(t)]$ 是 t 时漂白了的 Rh 的百分数, α 是一个比例系数*, 在本实验中是 20 (方程式 (16) 的曲线示于图 28 的虚线)。自 Dowling-Rushton 关系提出以来, 在暗适应的光化学相 (Photochemical phase), 用 PIII 或 b-波为指标, 已在许多种动物得到证实。暗适应的光化学相也被描述为漂白适应 (Bleaching adaptation)。因为实际的光 (明适应或背景适应) 也引起网膜敏感性下降, 为计算漂白后的视阈上升, 假设存在等价背景 (Equivalent background), 这种假设的背景引起的视阈 (即辨增阈, Incremental threshold) 与漂白了的 Rh 量或游离的视蛋白浓度的关系, 应由方程式 (16) 所决定。应该理解, 明适应的失敏作用也应与视色素分解的化学事件有关, 因此可以期望明适应和暗适

* 这个比例因子, 在 Rushton 的不同著作中有所不同, 他未予以解释 (例见 [70]), 杆细胞和锥细胞的这个比例因子相差很大, 各动物之间的差异也很大 (见图 28 和 32)。

应时的网膜敏感性变化,最终可为一个统一的适应理论联系起来。视觉生理中这个最富有理论、寓意深刻的问题,已超出了本文的范围,但在下节论及活体视色素变化与心理物理学的暗适应曲线之间的关系时,将要指出某些特征。

在以上有关段落中我们已经指出,把 MII 或 MIII 浓度与视网膜功能相关起来的尝试尚未取得一致的结论。要理解为什么视网膜敏感性与漂白最终产物——游离的视蛋白浓度相关就更加困难。的确, Dowling-Rushton 关系在许多情况下是不成立的。例如,极短而强的闪光仅漂白约 Rh 的一半,但对视网膜敏感度抑制的程度与虽不那么短而强但产生完全漂白的曝光所引起的敏感度下降程度一样(见 [B1] 的第九章.61)。方程式 (16) 不成立的另一类情况是小量漂白,这已为 Rushton-Spitzer-Powell (1972a) 的实验清楚地表明;实验结果示于图 23,图中, A 和 B 互相衔接,表示阈值对数的变化(用左侧坐标,符号 ●, ○, ▲, △) 和 Rh 复生时间进程(连续曲线,按特有的标尺,即调节方程式 (16) 的 α) 在漂白 99% 到 0.1% 的范围内吻合的情况。未复生视色素的分数 $(1 - p)$ 的标尺竖在暗适应的第 14 分钟,依据与 (12) 类似的方程(见图注),这时 Rh 已恢复到 90%。结果清楚地表明,当漂白超过 10%,暗适应曲线的杆细胞部分与直至复生到最后 $\approx 8\%$ 的 Rh 的曲线仍然吻合得相当好(A图),但当漂白 7%,在暗适应的早期(0—6 分钟),阈值的上升比方程式 (16) 计算的结果要显著得多,而且漂白越少,偏离越大。Rushton 和 Spitzer-Powell (1972, b) 的其他实验表明,这种偏离并不是由于所谓的暗适应神经相(Newral phase)的作用,而是由于某种光生产物,这种产物是真正使视阈升高的物质,可能是 MII (Rushton, 1972)。MII 与视蛋白在暗中约需 5—6 分钟达到平衡,因此在这时期之后,游离视蛋白浓度与 MII 浓度成正比。但达到

MII $\rightleftharpoons$ 游离视蛋白 + 全-反视黄醛
平衡之前, MII 的浓度比方程 (16) 的常数 α 所

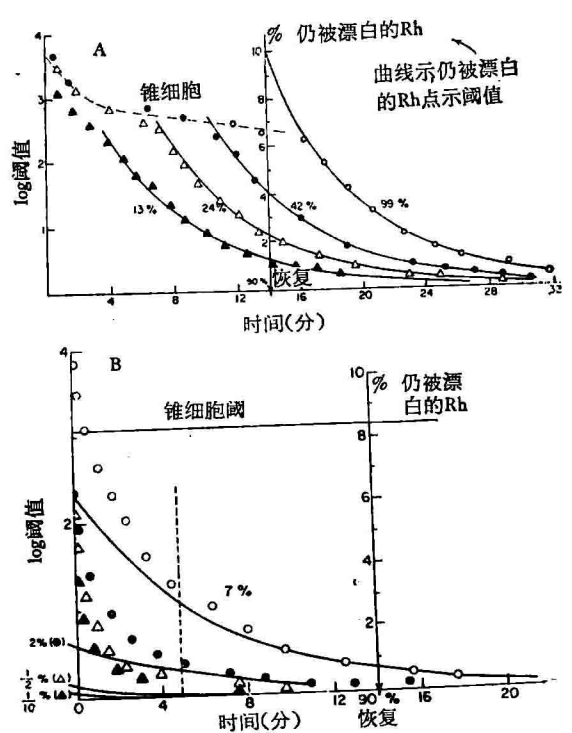


图 23 漂白 Rh 到不同程度(标明在曲线旁)后, Rh 按 $(1 - P) = (1 - p_0)10^{-t/14}$ 计算的复生曲线(坐标竖在暗适应的第 14 分钟的横坐标上,按公式可知其时 Rh 已恢复了 90%,该式实与式 (12) 相同,不过时间单位取分钟和用 10 为底的对数)

(各种小圆圈和三角形示暗适应时阈值的 变化,以对数单位用左边的纵坐标。为了避免拥挤,故一系列曲线用两个连续的 A-B 分图表示。注意当漂白愈少,阈值的变化在暗适应开始 5—6 分钟比按式 (16) 计算的大得多。其他内容见图上的标注和正文。(Rushton 和 Spitzer-Powell, 1972a)

暗示的要高,并且下降得比因供 Rh 复生使视蛋白下降的速度快。这样也许可以解释阈值的变化与方程 (16) 预示值之间的偏离。然而,在 Rushton 和 Spitzer-Powell 研究进行的时候,还不知道 Rh 漂白-复生动力学还可能是被漂白的 Rh 量的函数(见 IVB),而且 RRD 方法固有的不精确性,不足以精确地测量小量漂白时 Rh 的复生曲线。因此目前还不能无保留地全盘接受 Rushton 的解释,但是不论关于视阈和视色素动力学相关理论的最终形式如何, Rushton 的阐述是符合适应理论发展趋势的。现在,我们已可预见建立起明适应和暗适应(当神经机制达到平衡状态后的)视网膜敏感性变化的统一解释。

若用最简单和直观的形式来概括,大体可以说明适应时的失敏作用似乎是与某种使阈值升高的光生产物的释放有关,而暗适应时敏感性的恢复是由于这种物质的清除。总之,在感受器水平敏感性的变化,最终可以与视色素分解和合成动力学相关的物理化学事件来解释。

5. 病态网膜的视紫红动力学——在本部分,我们将介绍某些病态网膜中 Rh 的研究,从而可以看到各种各样的基础研究技术和理论如何渗透到临床研究中去,病理生理研究又如何为阐明视觉生理的基本机制提供新动力。

(1) 先天固定性夜盲: 夜盲是一类具有不同形式杆细胞视觉损害的遗传疾病。最常见的一种叫做先天固定性夜盲,病者的暗视功能即使不是完全丧失,也受到严重损害,但锥细胞视觉正常。RRD 技术问世之前,一般认为这是由于缺少 Rh。在 60 年代,这一猜测已被几个工作所否定,此后更多现代技术的应用对这疾病作了相当深入的探索,其中以 Alpern 等 (1972) 最近进行的一项工作所提供的资料最丰富。

对夜盲眼,许多心理物理学方法测定的暗适应曲线只有锥细胞部分,但图 24 所示的暗适应曲线是用瞳孔反应为指标所测得的。在正常眼,杆细胞和锥细胞的输入都能引起瞳孔收缩。图 24A 的小圆圈 (○) 示完全漂白后正常眼暗适应曲线的两个部分,这是用使瞳孔直径收缩约 0.5mm 的光强而测定的;垂直小长方格为夜盲者的结果,表明杆细胞暗适应曲线部分已完全丧失。图 24B 的实验进一步肯定夜盲者仅有明视功能。图中纵坐标为瞳孔直径变化 ΔD , 横坐标为光强,以高于正常瞳孔反应的绝对阈值的对数表示。

两种符号分别表示两种刺激光,“○”为白,“△”为红,两种光的明视亮度相等。两种符号所表示的关系线完全相同,表示引起瞳孔反应只有锥系统的输入。图 25 表明夜盲者的锥细胞和杆细胞色素的含量和动力学都正常。图的上部,圆圈和点 (○, ●) 是在中央凹测到的混合锥细胞色素,以 $(1-p)$ 表示,用左侧纵坐标。三角 (△) 是暗适应锥细胞相的心理物理

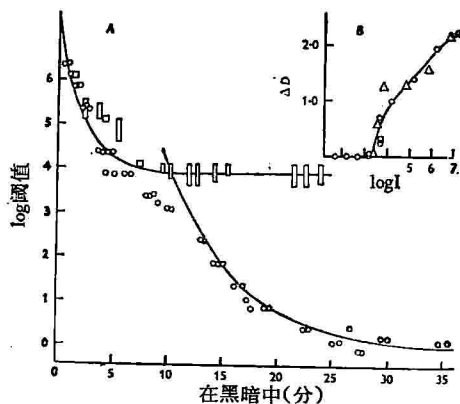


图 24 A. 完全漂白网膜色素后光刺激引起一定大小瞳孔收缩(约 0.5 毫米直径)所测得的暗适应曲线 (正常人, ○: 夜盲症者 II)

两个光滑线系衰减常数为 120 秒和 400 秒的两个指数曲线,示锥细胞和杆细胞的恢复。

B. 刺激光强和瞳孔收缩的关系线

刺激光有两种: 白光 (○) 和红光 (△), 两个光的明视亮度相等。光强, $\log I$, 相对正常人完全暗适应的阈值表示。其他解释见正文。(Alpern 等, 1972)

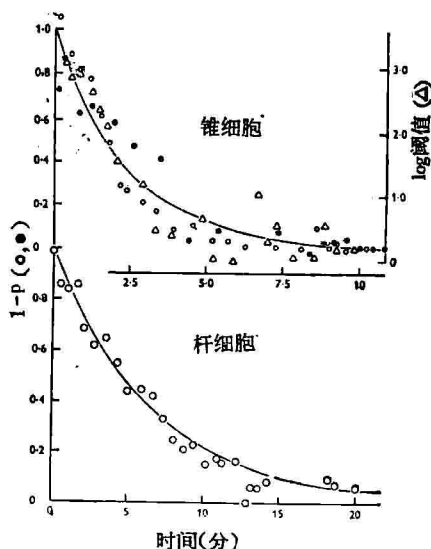


图 25 一个夜盲者视色素的复生,用 $(1-p)$ 表示, (左纵坐标)

上图,中央凹混合锥细胞色素 (○, ●); 下图,杆细胞色素 (○)。实线系根据式 (11') 计算的指数下降曲线,时间常数为 143 秒 (上) 和 400 秒 (下)。上图的 Δ 为中央凹的暗适应阈值的变化,按对数单位表示在右边的纵坐标。横坐标,适应时间,单位分钟。其他解释见正文。(Alpern 等, 1972)

阈值,用右侧纵坐标。视色素密度和视阈的变化均可用时间常数为 143 秒的单一指数曲线来描述 (这实验表明,对锥细胞,方程式 (16) 的

α 为 3^+)。图的下部为杆细胞色素的测定结果 (符号 $\circ$, 衰变常数 400 秒), 但不能作视阈的测定。50 年代的研究表明夜盲眼 ERG 相当异常, 这被认为杆细胞信号似乎在感受器的近心部分某处被阻遏了。但是进一步的实验表明实际情况还要复杂得多。

正常视网膜的 Rh 完全漂白后, 瞳孔沿着与在位 Rh 复生时间进程完全一样的曲线至全暗中的大小。压迫被漂白了的眼使产生瞬时性盲, 可使瞳孔瞬时扩大至暗中的大小。这被认为是传至中脑的漂白信号 (即等价背景光产生的信号) 暂时被阻遏, 从而瞳孔扩大。完全漂白后, 在暗适应过程, 瞳孔大小和未复生的 Rh 百分数的关系可以用下面简单方程表示

$$\Delta D = \Delta D_0(1 - p) \quad (17)$$

ΔD 是暗适应过程中瞳孔直径与完全暗适应的瞳孔直径之差, ΔD_0 (≈ 4.5) 是最大直径差, 单位毫米, 由外推至撤光时的直径而得。根据夜盲是由于杆细胞信号在神经通路某部位被阻遏的观点, 可以期待在漂白之后, 夜盲眼的瞳孔在暗中的恢复要比 Rh 复生快得多。但图 26 的实验表明, 夜盲眼 (两例) 瞳孔大小恢复的时间进程完全和正常人一样: 小点 ($\cdot$) 表示瞳孔直径的恢复, 用左侧纵坐标; 三角 (Δ) 表示 Rh 的复生 (完全漂白后), 用右侧纵坐标。穿行于对两病例的测量值的平滑曲线, 系分别按时间常数为 400 秒 (下) 及 360 秒 (上) 的 Rh 动力学方程而得。色素复生和瞳孔恢复两者吻合得相当好, 这明确地表明方程 (17) 象对正常人一样也适合于这些夜盲者。这又如何解释呢? 在试图提出解释之前, 有必要提及一下 Rushton 的适应理论。

Rushton 提出一种自动增益控制机制 (Automatic gain control, AGC) 来解释适应时的失敏现象; 这个机制的示意图表示在图 27。根据这理论, 神经信号 I 到达视中枢 (17 区和中脑) 先进入 AGC, 后者的输出 V 又反馈到 AGC 使增益达到相当 Weber-Fechner 定律所要求的适应水平。另一方面, 等价背景所产生的杆细胞的漂白信号 B, 不在输入端而是通过反馈进入

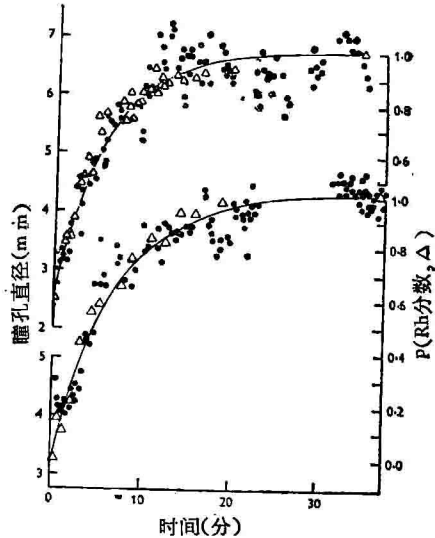


图 26 图的上、下两部分分别两个夜盲者完全漂白视色素后, 在黑暗中瞳孔的恢复过程 (小点, 左纵坐标)。

小三角 (Δ) 为同一受试者经过同样漂白视色素后色素的复生过程 (右纵坐标)。光滑线为 $\tau_0 = 360$ 秒 (上) 和 400 秒 (下) 的指数上升曲线。其他解释见正文 (Alpern 等, 1972)

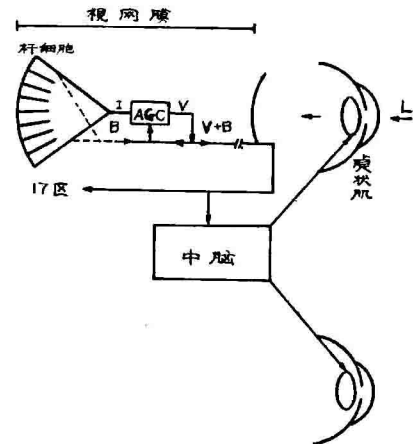


图 27 Rushton 的自动增益控制 (Automatic gain control, AGC) 示意图和瞳孔反射途径示意图

解释见正文

AGC。漂白信号靠衰减增益来调节视敏度, 但自身并不受到调节。这样, 它们就无衰减地被送到中脑, 继而到虹膜。为了解释这个阻遏现象和自然光引起的杆细胞信号的极度衰减, Alpern 等根据另一些细心设计的实验, 认为信号被阻遏在不超过增益输出 V 与漂白信号 B 的汇合处。阻遏必定发生在感受细胞和 ($V + B$)

结合处两者之间,从而使V被阻遏而B信号仍可传导,最大的可能是自动增益控制本身。组织学检查或许可以鉴别这些调节适应敏感性的结构。

(2) Oguchi 病: 先天性夜盲的另一形式叫 Oguchi 病, 其特征是暗适应过程极为缓慢, 但最终的暗视阈接近正常。通常假定暗适应进程的延长是由于 Rh 合成的异常。Carr 和 Ripps (1967) 采用 RRD 技术比较仔细地研究了这种病, 发现 Rh 的密度、光敏性和复生速度完全正常, 即漂白后网膜敏感性变化和 Rh 复生速度完全不一致。这个发现也很难与正常眼视阈的对数和游离视蛋白浓度成正比的观点一致。ERG 和眼球电图 (Electrooculogram) 的研究揭示, Oguchi 眼的 a -波和驻电位 (Standing potential) 正常, 但引导不出暗视 b -波, 即使在已完全暗适应的眼用不破坏适应的极微弱的光也不行^[22]。有意思的是, 同样的网膜电反应在固定夜盲症也观察到, 所不同的是 Oguchi 眼仍能向心地传送视觉信号, 虽然是很有限制的。在这种眼罹病结构有几种可能性, 但似乎位于感受器与双极细胞层之间的某些结构^[22,23]。目前尚无基础来猜测有关结构位于杆细胞信号进入 AGC 之前抑或之后; 研究 Oguchi 眼暗适应的瞳孔反应会有助于判断哪个可能性较大。

(3) 视网膜色素变性 (色素性视网膜炎): 视网膜色素变性也是一种遗传变性疾病, 但不同于固定性夜盲症: (i) 病情呈缓慢发展; (ii) 锥细胞视觉也被波及, 但程度较轻或发展较慢; (iii) 伴有某些色素性的变化。象其他夜盲症一样, 过去 10—15 年也采用了各种现代技术对这种疾病进行了研究, 其中关于 Rh 和视阈的最新研究是由 Ripps 等 (1978) 进行的, 研究对象为视功能有不同程度缺损的一个家族的三名成员和一名慢性维生素 A 缺乏症患者。漂白和复生的测量表明, 患者视网膜 Rh 动力学行为基本正常, 但 Rh 密度和视阈与正常人相比分别有不同程度的下降和上升。图 28 中的三种符号, 表示三名病人的 Rh 下降程度与绝对阈上升的关系。Rh 测自颞侧 15°, 30° 和 45° 部位,

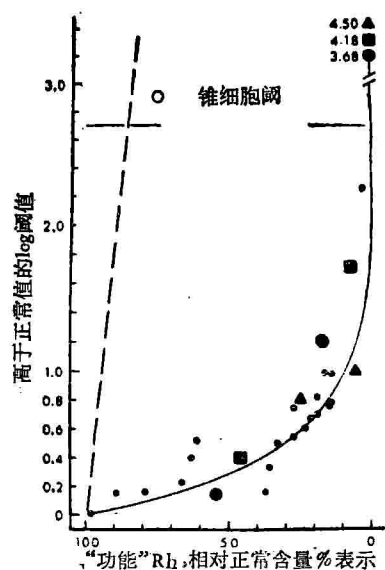


图 28 暗适应网膜视阈的变化和 Rh 含量的关系

前者按超出正常平均绝对阈的对数单位 ($-4.02 \log sc td-sec$) 表示, 后者按正常网膜含量的百分比表示。大圆圈 (○) 为对一维生素 A 缺乏症患者的测定; 其他符号为色素变性病例的测定: 三个大符号为 Ripps 等一文的三病例, 小圆点 (●) 为 Highman 和 Weale (1973) 的病例。连续线为阈增长系数按量子吸收概率而变化的关系线, 虚线为 $\log$ 阈值和漂白了的 Rh 量的线性关系 (Rushton 1961)。其他解释见正文。(Ripps 等, 1978)

以视网膜相应部位正常含量的百分比表示; 绝对阈是选择在测定色素的部位测定的, 用高于相应部位的平均正常阈的对数表示。0% Rh 处标出高于正常的对数阈, 系测自颞侧 15° 处, 在那里用 RRD 技术检测不到 Rh。这些对数阈虽然用高于正常的杆细胞阈来表示, 但实际是由锥细胞决定的。大圆圈 (○) 是一例维生素 A 缺乏症颞侧 15° 的暗视阈, 该网膜部位的 Rh 只减少了 25%, 但伴随的敏感度损失达 2.92 log 单位。这与视网膜色素变性病人的视阈升高同 Rh 含量下降程度间的关系 (连续线) 形成鲜明的对照, 后者需要在 Rh 损失大得多的程度时 (即接近 99.9%) 才会出现这样程度的视阈升高。Highman 和 Weale (1973) 对视网膜色素变性患者的测定数据, 也列入图中 (小点, ●)。若视阈升高系由量子吸收概率的变化所决定, 则关系如图中连续线所示。可以看到, 色素变性病人的数

据(实心符号)大致可用本曲线描绘,这显然不同于漂白后视阈上升与Rh下降的关系(虚线)。目前已很清楚,漂白或维生素A缺乏所引起的视阈升高,要比因量子吸收概率减小所计算的升高大得多,这是因为 ROS 内部分子紊乱所致(见 IVA4)。视网膜色素变性所引起的视阈升高大致可由量子吸收概率的减小来形容,这提示本疾病的发展伴随进行性 OS 变短,但盘膜相对完整。这是否反映 PE 吞噬活动与在 OS 基底新的盘膜合成间的不平衡,仍然是一个猜测。

B. 猫

了解猫视网膜光化学反应的时间进程,对于解释许多电生理实验结果以及探索视色素复生的机制是很有价值的,因为猫是在视觉研究中用得最多的动物之一。猫的瞳孔特别大、眼底反射率高,因而它是使用 RRD 技术的理想对象。1974 年 Bonds 和 Macleod 把反射率测定的精度实际上已提到了这个技术的极限;如果采用平均法,误差仅为色素总量的 $\pm 0.5\%$;但这会损失一些时间分辨能力,所以仍不能测定小量漂白的动力学过程。然而 Bonds 和 Macleod 的研究,毕竟对猫眼 Rh 的漂白和复生过程作了清晰的分析,并且结合有关工作进行了富有启示的讨论。对他们的工作将略加详述。

1. 长时间漂白引起的复生——猫眼缺少锥细胞,故可单独检测 Rh, 其差别光谱的 $\lambda_{\max}$ 为 500nm。在大多数实验中,用不被 Rh 吸收的 $> 690\text{ nm}$ 的深红光作为参考光束,波长 486、500、546nm 三种单色光作为测定光,任意交替使用。采用这三种波长是因为 (i) 486nm 接近 MIII 的 $\lambda_{\max}$, (ii) 500 nm 接近 Rh 的 $\lambda_{\max}$, (iii) 在 546 nm, 对 Rh 的测定不受 MIII 的沾染。图 29A 中,圆圈(O)和连点线(---)是漂白 20 分钟后,分别以 486 和 546nm 单色光测得的复生曲线。断续点(---)是 546nm 光的测定按两种测定光对 VP501 的 Rh 的消光系数归一化之后的结果。两个断点线的重合表明,复生的视色素是 Rh, 未被任何光生产物沾染。复生在开始 15 分钟呈线性变化,随后逐渐下降。这表明猫

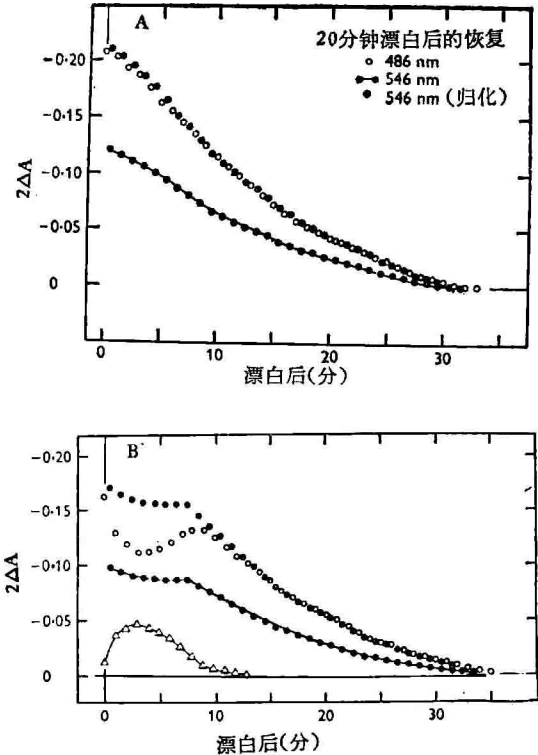


图 29 长时间漂白 (A, $6 \log t_{\Delta} \times 20$ 分钟) 和短时间漂白 (B, 同样强度 1 分钟) 后, 猫活眼在位色素 $2\Delta A$ 的变化

用波长 546 和 486nm 单色光测定的结果分别用 --- 及 ○○○ 表示。未连接的小点(---)为按 $\lambda_{\max}$ 为 501 nm 的 Rh 对 546 和 486 nm 的消光系数的比例 (1.74) 将 --- 正态化的结果。B 的 (Δ - Δ - Δ) 为 (---) 和 (○○○) 之差, 即用 486nm 测定时超出用 546nm 测定的变化。其他解释见正文。(Bonds 和 Mac Leod, 1974)

Rh 的复生速度不象人, 不简单地与尚未复生的视色素的量成正比。简言之, 11-顺 Ra 并不总是过剩的和保持在恒定浓度, 而是以比较缓慢的速度供应着与游离的视蛋白结合, 这可能是受限制于某个酶作用的环节 (即见以下对于鼠的讨论)。

2. 闪光漂白后的复生——(1) 间视紫红的形成和衰变: 图 29B 是 1 分钟漂白后的类似 A 的测定。用 546 nm 单色光 (---), 在恢复约 15% 后的几分钟, 吸收形成平台, 大约在第 9 分钟, 曲线出现转折表示恢复的第二阶段开始, 与长时间漂白后的恢复进程相似。用 486nm 单色光 (○○○), 密度开始迅速增加, 随

后转入下降期,接着在 546 曲线的转折稍后一点又返过来,此后密度又与长时间漂白后同样的速度而增加。显然用 486 nm 测得的曲线表明, Rh 初始的复生为一种强吸收的光生产物暂时所掩蔽。按照前节所述把两个测定按两个单色光对 Rh 的消光系数归一化之后,可见它们(断续点)在 Rh 复生的第二阶段并行,但在第一阶段,对 486 nm 的密度过剩。三角(Δ)表示 486nm 曲线与归一化的 546nm 曲线之差;很清楚,撤除闪光后,吸收较短波长的物质仍然在形成中,漂白后 3 分钟才升至峰值,全部衰变几乎要 10 分钟。更精细的实验表明,这瞬时产物的 $\lambda_{\max}$ 在 460—470nm 之间,它必定是 MIII,其形成和消失的时间进程似乎遵循两个相继的一级反应。猫 MIII 的形成速度大致与鼠相同,但衰减速度要快得多。与人相比,猫 MIII 动力学显然较缓慢,速率大体为人的 1/2。进一步的分析提示,只有一半的 MII 衰变为 MIII,另一半直接衰变为 Ra + Op; 这样,猫的衰变模式与人和蛙相同。

(2) 复生机制: 图 29B 使用 486nm 光测得的数据,表示复生时有 MIII 的干扰,而用 546 nm 的数据表示复生初始阶段是一个缓慢的过程。由于在猫,相当一部分 MII 直接衰变为 Ra 和 Op,这种初始的延迟不能归之于游离视蛋白的缺乏。因为猫不贮存游离 Ra,因此 11-顺 Ra 必定由漂白产物形成。长时间漂白时,11-顺 Ra 的合成能在漂白过程中进行,从而使得一旦撤光后,复生即以其可能高的速度开始(图 29A)。但在闪光漂白后,11-顺 Ra 必须从头开始合成,复生必须等待暗反应完成,因此就延迟了。

3. 漂白动力学——实验表明,漂白的进程与方程式(11)的预测有差别: 较强漂白时,按方程式预示的 Rh 漂白量比实测值大,这可能是由于光逆作

用,因为在人没有明显的光逆作用的漂白光强,在猫可能有一定的重要性,因为猫的 M-Rhs 的衰变比人慢得多。

C. 大白鼠

了解活鼠视色素动力学的意义同猫一样。此外,某些遗传株带鼠有进行性视网膜病变(RCS 种, Royal College of Surgeons),在某些方面这种网膜与某些类型视网膜色素变性的病情发展相似,对于研究这个疾病有帮助。尽管对鼠的 ERG 和离体视色素已进行了大量的工作,但是在 Perlman (1978a, b) 的两个刚发表的工作之前,对鼠视色素活体在位动力学所知甚少。Perlman 主要研究了正常及 RCS 鼠 Rh 的水平、复生及其与暗适应过程的关系。

1. 正常视网膜——鼠视网膜的锥/杆比大体在 1/100 左右,所以 RRD 只能测到 Rh。图 30 的主要部分,示正常鼠的三次漂白-复生循环。箭头示 5 分钟曝光的开始,第一和第三次漂白一部分,第二次漂白完全。复生过程可由一指数曲线表示(连续线),但并不总是如图中所显示的那样好,而且在另一些实验中,开始的 20—40 分钟,复生是以恒定的速度进行的,然后再沿指数时间进程进行。这个状况近似猫(见图 29A),而不象人那样,复生时间常数是单值的

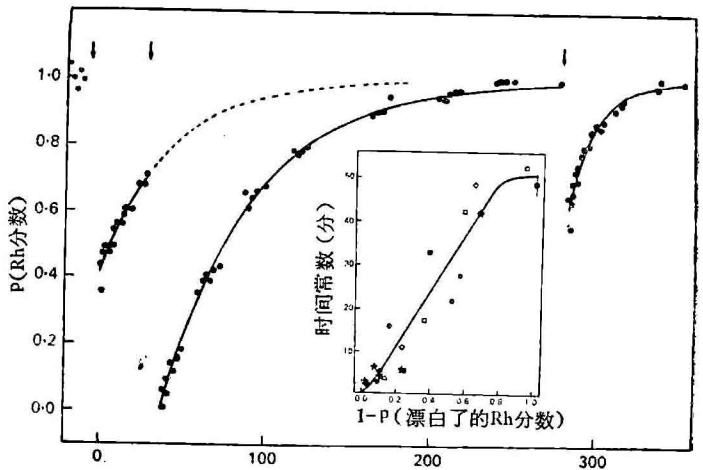


图 30 主图: 正常大白鼠体内在位 Rh 的漂白和复生

箭头示漂白 5 分钟的开始;第一和第三次为部分漂白,第二次漂白完全。实线为符合复生时程的指数上升曲线。插图: 示复生速度依赖于漂白程度的关系,前者以指数曲线衰减常数来表示,不同符号为不同实验的结果。(Perlman, 1978a)

(见图 20),而是决定于被漂白的 Rh 量。复生时间常数和漂白量之间的关系示于图 30 的插图。看来鼠 Rh 复生的机制,大体和猫一样。

Pearlman 也测定了暗适应光化学相未复生的 Rh 百分数与导致 30 μ v ERG 反应的视阈 ($\log I_{30}$) 之间的关系。这将与 RCS 视网膜特征 (图 32) 结合起来一并讨论。

2. 营养障碍的视网膜——RCS 网膜是一种 OS 与 PE 间的更新过程发生障碍的一个进行性的遗传病,出生后 60—80 天病情即发展完全。在病变过程中,b-波敏感性逐渐下降 (图 31),杆细胞顶端和 PE 间有 OS 一样的片层积累,直至全部感受器细胞退化和功能的完全丧失,但锥细胞功能相对无损。RRD 测量结果及用抽提方法的研究表明,病理眼的 Rh 总量大致与正常眼相同,但病理眼完全漂白 Rh 后能复生的 Rh 百分数——“复生性” Rh,随年龄而线性下降,大约到 70 天时为零。“复生性” Rh 代表营养性障碍网膜中尚存的光感受器中能够复生的全部

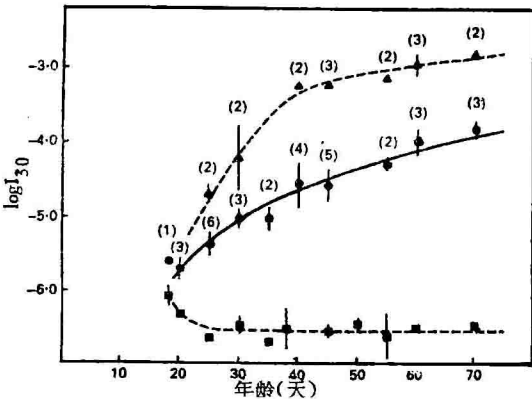


图 31 引起 30 μ v b-波所需光强的对数 ($\log I_{30}$) 和小白鼠年龄的关系

(■) 在黑暗中饲养的正常鼠; (●) 在黑暗中饲养的 RCS 鼠; (▲) RCS 鼠大量漂白后再适应五小时。每个符号上的小纵线示 2 S.E.; 括弧中的数字为所用的动物数。其他解释见正文。(Pearlman, 1978b)

Rh 吗? 营养障碍眼的视阈升高与“复生性” Rh 分数呈方程式 (16) 所表示的那种平行关系吗? 对第一个问题的回答就要求在暗中饲养的鼠的视阈应完全恢复到漂白前的暗适应水平,然而这与实验事实相矛盾。图中方块 (■), 小点

(●) 和三角 (▲) 分别表示在暗中饲养的正常鼠、暗中饲养的 RCS 鼠和大量漂白后再暗适应 5 小时的 RCS 鼠的 $\log I_{30}$ 和年龄的关系。为了进一步研究这问题,把在不同年龄的 RCS 鼠测到的漂白前 (■) 和暗适应结束时 (5 小时, □) $\log I_{30}$ 相对正常鼠阈值所升高的值,与“复生性”或“功能性” Rh 分数的关系示于图 32。“功

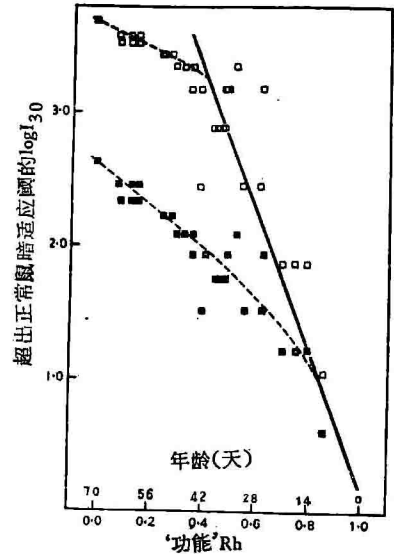


图 32 RCS 鼠于漂白前 (■) 和漂白后再适应五小时 (□) 超出暗适应正常鼠 $\log I_{30}$ 和“功能”Rh 的关系

后者为 RCS 鼠相对正常鼠 Rh 含量表示能够复生的 Rh (横坐标下数字); 相应“功能”Rh 量的 RCS 鼠的年龄是根据 Pearlman (1978a) 的图 9 估计的 (横坐标上的数字)。连续线为正常鼠的 $\log I_{30}$ 和 Rh 含量 (在暗适应的光化学相中) 的关系。通过实测值的大略平均值以虚线表示。其他解释见正文。(Pearlman, 1978b)

能性” Rh 为 RCS 鼠杆细胞里尚存的 Rh, 相对正常鼠 Rh 含量来表示。连续线表示正常鼠 $\log I_{30}$ 与 Rh 含量之间的线性关系, 虚线是病态眼同样测定的平均值。空心方块与实线的吻合提示, 小于 42—45 天的 RCS 鼠, 完全漂白 Rh 后能够恢复的“功能” Rh 高出正常鼠 Rh 水平的 30% 时, 则于暗适应结束时引起一定 ERG 所需的光强与按方程式 (16) 计算的符合, 但在年龄更大的鼠, 当“功能性” Rh 分数低于 30%, $\log I_{30}$ 低于方程式 (16) 的计算, 即暗适应‘结束’时的 ERG 敏感性并不决定于杆细胞。这个

发现并不意外,因为在正常鼠,只有 Rh 水平至少达到完全暗适应水平的 30%, $\log I_{30}$ 与 Rh 的关系才能由方程式(16)表示。当杆细胞 Rh 含量低于初始浓度的 30% 时,ERG 的阈值将由锥细胞决定。

即使在漂白后经过 5 小时的暗适应,引起一定大小的 ERG 反应所需的光强仍高于漂白前(图 31 中▲和●之差以及图 32 中□和■之差),考虑到这一点,Perlman 倾向于认为,在几种可能的解释之中,这是由于杆细胞 Rh 复生不完全。

V. 结束语

在开拓新研究方向的历程中,视觉生理学家驻足回顾,时常会感到瞬息的欣慰,似乎自己已濒于对某些视功能作出某种解释的边缘。但是随着研究的进展,通常出现更加复杂的情况,虽然就整体而论,我们的认识向前逼近了一步。15 年前提出感受器的敏感度是受视色素某些中间产物调节的观点时,就是这种情况。本综

述表明,在过去廿年,为了推进视色素动力学和与适应机制等有关问题的研究,人们已经作出了多么大的努力,然而至今仍不能给予很确切的回答;看来如果没有对视色素漂白-复生过程中分子事件有一个全盘的了解,是不能期待把光感受器功能与视色素具体关联起来的。那么,怎么办?在笔者看来,一方面本综述已暗示了未来研究的某些课题,另一方面还必须期待于新事实的发现和新技术的应用。除视觉科学家本身,这只能有赖于物理化学家、生物化学家、电生理学家协同而持续的努力。急切的读者或许会因而感到失望,但事实上,基础研究的远景通常是不能构画的,新发现从本质上来讲是不能预卜的;寻找真理首先必须遵循实践的道路,因此,作为实验科学家,我们必须返回实验室,努力诉诸于实验。参考文献见本刊第三期本文(上)。

[本文于 1979 年 1 月 5 日收到]

(上接封三)

前列腺素 E_2 的前体,尿激酶的生产,达到了世界先进水平,尿激酶每 1.1—1.2 克可为国家换取二万美元的外汇。在计划生育中棉酚的作用机理,肝癌发生过程中基因转录的调控机理,针刺镇痛的生化机理,一些癌的生化诊断等,都有了初步积累。在农业生产实践中,我国粮食作物远缘杂交的丰富经验,用 DNA 片段杂交假说,利用同功酶的分析在分子水平上初步给予了阐述。

五、生化技术的应用受到更多的重视,有了进一步的发展。对蛋白质,核酸分离分析的一些层析、电泳、免疫技术已在各项研究中发挥了重要作用。同位素和电子显微镜的应用日益普遍。核磁共振技术开始用于组蛋白与核酸的构型与相互作用的研究。荧光偏振和自旋标记顺磁正开始被用于生物膜的研究。紫外差吸收光谱和荧光光谱正在用于蛋白质溶液构象的研究。近年来在国外的生化研究中,电子计算机的应用已极普遍,这次会议中,在蛋白质分子立体化学的自动分析和表达研究中也见使用。

六、自力更生试制仪器有了可喜成果。会议中对高速冷冻离心机,荧光分光光度计、离心快速分析仪等的试制感到极大的兴趣。

七、理论生化的探讨。在“四人帮”横行时,这方面的研究被视为最脱离实际而首当其冲,现在获得了新

生。稳态酶动力学的图论分析、生化反应与耗散结构等研究都是实例。

总之,从这次学术会议反映的情况表明,我国的生化研究正处在积极的恢复过程中,起步是良好的,已经开始取得了一些有水平的成果,许多工作都露出了可喜的苗头。相信通过这次会议的交流,互相学习,共同促进,必将进一步鼓舞广大生化工作者继续努力,为实现八年规划纲要,出人才、出成果,把我国生化和分子生物学的研究工作提高到一个新的水平。

中国生物化学学会的筹备活动是与第三次全国生物化学学术会议的学术交流活动穿插进行的。会议期间首先发动代表们对中国生化学会章程(讨论稿)展开了讨论,在此基础上发展了第一批会员,然后经过充分酝酿,于 1979 年 5 月 27 日民主选举产生了理事会,常务理事,正、副理事长和秘书长,正式宣告成立中国生物化学学会。由王应睐同志任理事长,曹天钦、邹承鲁、梁植权、张尤翔任副理事长,并由曹天钦同志兼任秘书长。

中国生物化学学会这一群众性学术团体的成立,是我国生化界具有历史意义的一件大事,相信今后通过学会组织的各种活动,必将在促进学者之间的相互联系和提高学术界研究水平等方面发挥积极的作用。

(转摘自第三次全国生物化学学术会议及中国生物化学学会成立大会简报)