

金黄仓鼠视觉中枢的甘氨酸免疫阳性神经元*

吴奇久 李俊凤

(中国科学院生物物理研究所, 视觉信息加工开放研究实验室, 北京 100101)

摘要 用免疫细胞化学方法研究了甘氨酸在金黄仓鼠视觉中枢的分布特征, 并应用统计学方法进行了定量分析. 结果表明: 在视皮层中, 除了 I 层以外, 甘氨酸免疫阳性神经元分布在其他各层内, 其平均密度为 $1\ 046/\text{mm}^2$, 占视皮层细胞总数的 23.9%. 上丘浅灰层及视觉层甘氨酸免疫阳性神经元平均密度为 $750/\text{mm}^2$, 占该层细胞总数的 19.5%. 外膝体中甘氨酸免疫阳性神经元密度较低. 甘氨酸免疫阳性神经元包括不同类型的细胞.

关键词 甘氨酸, 免疫细胞化学, 视觉中枢

学科分类号 Q26

甘氨酸 (glycine) 和 γ -氨基丁酸 (GABA) 是高等动物中枢神经系统中两种主要的抑制神经递质^[1~3]. 在这两种递质中, 关于 GABA 在中枢神经系统中的分布已有大量研究, 因为应用 GAD (GABA 的合成酶) 抗血清或直接用 GABA 抗血清均能使 GABA 免疫阳性神经元显示得很清晰. 但是对甘氨酸的代谢所知甚少, 并且没有特异的甘氨酸合成酶, 因此, 不能用显示其合成酶的方法来研究甘氨酸. 加之, 甘氨酸分子极小, 要获得其抗体很困难, 无法用甘氨酸抗血清直接证明甘氨酸的存在, 所以很多研究工作者只得用放射自显影技术来研究组织切片中的甘氨酸神经元^[4~6]. 但是, 此法只能显示注射部位附近的含甘氨酸细胞, 不能了解它们在中枢神经系统中的分布全貌. 1986 年有实验室应用与载体蛋白结合的甘氨酸免疫兔, 获得了甘氨酸抗血清, 因此用免疫细胞化学技术研究甘氨酸神经元成为可能, 并且获得了较好的结果. 这些工作主要是研究脊髓中的甘氨酸神经元^[7]. 尚未见甘氨酸免疫阳性神经元计数及其在视觉中枢分布的报道. 本文应用甘氨酸抗血清研究了视皮层、上丘和侧膝体中甘氨酸神经元的数量、大小、形态及分布特点.

1 材料和方法

金黄仓鼠 8 只, 体重 80~120 g, 用戊巴比妥钠 (sodium pentobarbital) 腹腔麻醉, 先用生理盐水, 接着用含 5% 戊二醛的磷酸缓冲液心脏灌流进行固定. 快速取出脑, 置上述固定液中后固定 24 h, 再移至 20% 蔗糖缓冲液中, 待脑沉底, 作恒冷箱切片, 厚度 $40\ \mu\text{m}$. 取视皮层、上丘、外侧

膝状体部位的切片若干, 用甲酚紫染色, 做正常细胞计数用, 与它们相邻的切片做免疫细胞化学反应. 一抗为兔抗甘氨酸血清 (美国 CHEMICON 公司), 工作浓度 1:600. 免疫细胞化学程序为: 切片用 PBS 漂洗后, 置 NaIO_4 溶液中 20 min, NaBH_4 中 20 min, TNBS 溶液中 (含马血清和 Triton X-100) 反应 2 h. 移至一抗中置 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱 48 h, 在羊抗兔 IgG 中室温下反应 2 h, PAP 中反应 2 h, DAB 显色. 用正常兔血清代替一抗作为对照. 免疫反应阳性细胞计数的方法为: 在光学显微镜下, 用台微尺标定, 测得网目测微尺方格的边长为 $80\ \mu\text{m}$, 则方格的面积为 $6\ 400\ \mu\text{m}^2$. 每只动物视皮层及上丘各层分别随机取 75 个样品区, 计算甘氨酸免疫反应阳性细胞数. 再用统计学方法得出单位面积内平均细胞数和概率为 95% 的置信区间.

2 结果

2.1 甘氨酸免疫阳性神经元形态

根据细胞体的形态分类, 甘氨酸免疫阳性神经元胞体有的呈圆形 (图 1a), 这种细胞占有很大比例. 有的呈梭形 (图 1a), 还有一种胞体切面呈三角形 (图 1c), 即皮层内锥体细胞. 此外, 有些胞体呈椭圆形和多角形 (图 1b). 根据其突起分类, 甘氨酸免疫阳性神经元包括双极神经元 (图 1a), 这种神经元从胞体两端各发出一个主树突, 其主树突多与视皮层表面垂直. 此外还可见到多极神经元 (图 1b), 其胞体发出多个树突向不同方向延伸.

* 中国科学院重大项目“神经科学前沿课题的开拓”资助项目 (9002kp85-2-4).

收稿日期: 1998-03-16, 修回日期: 1998-07-15

锥体神经元从胞体每个角(在切片上为三角形)发出一个主树突,有的主树突延伸很长距离(图1c)。

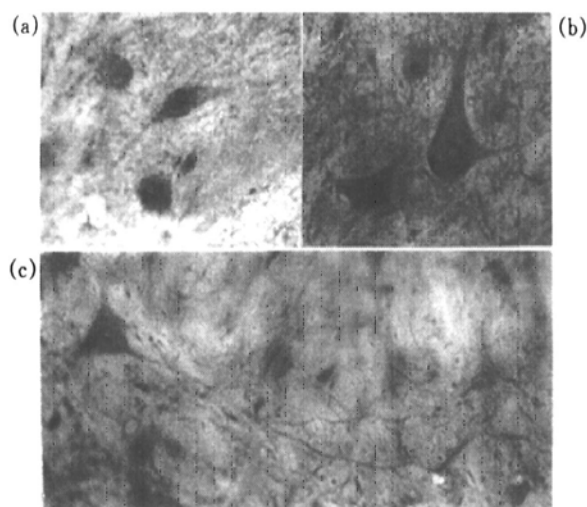


图1 视皮层中甘氨酸免疫阳性神经元

(a) 圆形胞体及梭形胞体; (b) 多形胞体放大倍数: $\times 1600$; (c) 三角形胞体(锥体细胞), 有较长的主树突。

不论在视皮层, 还是上丘、外膝体内的甘氨酸免疫阳性神经元, 其树突显色多不大清晰。

2.2 甘氨酸免疫阳性神经元的大小

视皮层: II层的甘氨酸免疫阳性神经元胞体直径为 $8 \sim 12 \mu\text{m}$ 。III, IV层阳性细胞较大, 胞体直径多为 $12 \sim 20 \mu\text{m}$ 。V, VI层阳性细胞胞体直径约 $10 \mu\text{m}$ 。

上丘: 胞体呈圆形的阳性神经元其胞体直径为 $8 \sim 10 \mu\text{m}$, 个别胞体直径可达 $15 \mu\text{m}$ 。胞体呈椭圆形的阳性细胞其长轴约 $20 \mu\text{m}$ 。阳性锥体神经元较大, 一般为 $20 \mu\text{m}$, 个别阳性锥体神经元胞体可达 $40 \mu\text{m}$ 。

侧膝体: 阳性神经元胞体直径多为 $10 \mu\text{m}$, 偶见免疫阳性大细胞。

2.3 甘氨酸免疫阳性神经元密度及百分比

视觉中枢甘氨酸阳性神经元的统计(表1)。

表1 视觉中枢甘氨酸阳性神经元的统计

		正常细胞	甘氨酸阳性细胞
视皮层	$6400 \mu\text{m}^2$ 中细胞数	$28 \pm 1.4 (P < 0.05)$	$6.7 \pm 0.7 (P < 0.05)$
	密度	$4375/\text{mm}^2$	$1046/\text{mm}^2$
	百分数	100%	23.9%
上丘	$6400 \mu\text{m}^2$ 中细胞数	$24.6 \pm 1.8 (P < 0.05)$	深层: $5.0 \pm 0.53 (P < 0.05)$ 浅层: $4.8 \pm 0.98 (P < 0.05)$
	密度	$3840/\text{mm}^2$	深层: $781/\text{mm}^2$ 浅层: $750/\text{mm}^2$
	百分数	100%	深层: 20.3% 浅层: 19.5%
	外侧膝状体	一些样品区内 ($6400 \mu\text{m}^2$) 甘氨酸阳性神经元为 2~4 个, 大部分样品区内阳性细胞数为 0。无统计意义。	

3 讨 论

用放射自显影方法^[4,5]和用免疫细胞化学技术^[1,8]的研究都证明, 动物脑中含有较多的甘氨酸神经元。这些研究定性地描述了脑中, 特别是脊髓中甘氨酸的分布情况。本文用统计学方法定量地研究了视觉中枢甘氨酸的分布特点, 观察到视觉中枢内甘氨酸免疫阳性神经元占有较大比例, 这与上述研究在脑的其他部位获得的结果是一致的。

一般认为, 大脑皮层中 GABA 神经元都是非锥体细胞, 似乎神经元所含递质与其形态有一定对应关系。本实验观察到的甘氨酸神经元其胞体可呈圆形、梭形、多角形、三角形(锥体细胞)等, 从突起数目来看, 有单极、双极和多极神经元之分。由此可见, 含甘氨酸的神经元与其形态没有固定的

对应关系。

Glycine 与 GABA 都存在于 Golgi 神经元。有的作者认为它们常共存于同一细胞。但也有作者^[3]指出, 这两种抑制性递质虽都共存于同一 Golgi 细胞中, 但其载体并不相同。因此提出, 从生化性质来看, Golgi 细胞可分两类, 一类吸收甘氨酸, 一类吸收 GABA。本实验以及我们以前的研究^[9]表明, 虽然视皮层和上丘中 GABA 及甘氨酸免疫阳性神经元都是约占 20%, 但视皮层 I 层中 GABA 神经元占有很大比例, 而此层几乎见不到甘氨酸阳性神经元, 这表明, 虽然甘氨酸与 GABA 均属中枢神经系统两种重要抑制性神经递质, 但它们的作用可能还是有区别的, 其具体差别有待用电生理方法进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Ghislaine C, Buijs R M, Michel G. Glycine neurons in the brain and spinal cord. Antibody production and immunocytochemical localization. *Brain Res*, 1986, **376** (2): 400~ 405
- 2 Zarfra F C, Aragon L, Olivares N C, *et al.* Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neuroscience*, 1995, **15** (5): 3952~ 3969
- 3 Thomson A M. Glycine modulation of the NMDA receptor/ channel complex. *TINS*, 1989, **12** (9): 349~ 353
- 4 Wilkin G P, Csillay A. Localization of high affinity [³H] glycine transport sites in the cerebellar cortex. *Brain Res*, 1981, **216** (1): 11~ 13
- 5 Ottersen O P, Davanger S, Storm-Mathisen J. Glycine-like immunoreactivity in the cerebellum of rat and *Senegalese baboon* Papio: a comparison with the distribution of GABA-like immunoreactivity and with [³H] glycine and [³H] GABA uptake. *Brain Res*, 1987, **406** (2): 211~ 221
- 6 Suneja S K, Benson C G, Gross J, *et al.* Uptake and release of D-aspartate GABA and glycine in guinea pig brainstem auditory nuclei. *J Neurochemistry*, 1995, **64** (1): 147~ 160
- 7 Curtis D R, Hosli L, Johnston G A R. The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp Brain Res*, 1968, **5** (1): 235~ 258
- 8 Fagg G E, Foster A C. Amino acid neuro-transmitters and their pathway in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*, 1983, **4** (2): 1015~ 1036
- 9 吴奇久, 李俊凤, 韩 戡 (Wu Q J, Li J F, Han J). GABA 神经元在金黄仓鼠视觉中枢的分布. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1990, **6** (4): 550~ 555

Glycine immunopositive Neurons in the Visual Center of the Hamster. WU Qí-Jiu, LI Jun-Feng (*Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Distribution of glycine immunopositive neurons in the visual center of the hamster was studied by immunocytochemical technique, quantitative analysis was made statistically. The results showed that except the layer I, the glycine immunopositive neurons are distributed through all layers of the visual cortex. The mean density is 1 046/mm². An average of 23.9% of the neurons in visual cortex is immunopositive for glycine. The densities of positive glycine neurons in the superficial stratum and deep stratum of superior collicular are 750/mm² and 781/mm² respectively and their percentage are 19.5% in superficial layer and 20.3% in deep layer. Glycine immunopositive neurons of visual center include different type of cells.

Key words glycine, immunocytochemistry, visual center

以 GST 融合蛋白为靶从噬菌体肽库中筛选结合肽

薛沿宁

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

段凌浚 R. J. POMERANTZ

(Division of Infectious Disease, Thomas Jefferson University, PA19107, USA)

摘要 以重组的谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 和目标蛋白的融合蛋白为靶, 通过将其固定于谷胱甘肽琼脂糖凝胶上, 可以方便地从噬菌体肽库中筛选目标蛋白的结合肽. 用此方法筛选到含 WWXF 结构的 HIV-1 病毒蛋白 R (Vpr) 的结合肽, 与经典的将 Vpr 包被于培养板上的筛选方法相比, 此方法具有简便、快速的优点.

关键词 噬菌体展示, GST 融合蛋白, 多肽库, Vpr

学科分类号 Q78

噬菌体展示技术是寻找目标蛋白的结合蛋白或结合肽的有效途径, 从它的建立到现在, 已在各个领域里得到广泛的应用^[1,2]. 在应用噬菌体展示技术时, 一个首要的条件是要选择好目标蛋白. 对目标蛋白的要求除了它的研究意义外, 还必须具备以下条件: a. 足够的量, 以用于多次筛选或称生物

淘洗 (biopanning); b. 高的纯度, 以降低非特异结合; c. 有生物活性, 以得到有生物学意义的结合肽. 然而, 有些有重要意义的蛋白并不容易得到, 如 HIV-1 的病毒蛋白 R (Vpr)^[3], 由于它对宿主细胞功能蛋白, 特别是对细胞周期的影响, 可