

没有得到适度糖基化的表达产物。由于糖基化与非糖基化产物均为分泌表达, 说明了糖基化并非分泌所必需。但在实验中, 很难得到稳定的非糖基化产物, 而糖基化产物相当稳定, 即使将含有该蛋白的发酵液置于室温 2~3 d, 蛋白质未见明显降解。显然糖基化虽并非分泌必需, 但它对蛋白质的稳定有重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Dunford H B. Horseradish peroxidase: structure and kinetics. In: Everse J, Everse K E, Grisham M B, eds. Peroxidases in Chemistry and Biology, 2. Boca Raton: CRC Press, 1991. 1~24
- 2 Hollenberg C P, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. Curr Opin Biotech, 1997, 8 (5): 554~560
- 3 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社 (Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. Methods and Techniques in Biochemistry, Beijing: Advanced Education Press), 1982. 165~166
- 4 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956, 28 (3): 350~356
- 5 Smith A T, Santama N, Daycey S, et al. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. J Biol Chem, 1990, 265 (22): 13335~13343
- 6 Ortlepp S A, Pollard-Knight D, Chiswell D J. Expression and characterisation of a protein specified by a synthetic horseradish peroxidase gene in *Escherichia coli*. J Biotech, 1989, 11 (4): 353~364
- 7 Egorov A M, Gazaryan I G, Savelyev S V, et al. Horseradish peroxidase gene expression in *Escherichia coli*. Annals New York Academy of Sciences, 1991, 646: 35~40
- 8 Egorov A M, Gazaryan I G, Kim B B, et al. Horseradish peroxidase isozyme C: a comparative study of native and recombinant enzyme produced by *E. coli* transformants. Annals New

York Academy of Sciences, 1994, 721: 73~81

High-level Expression of Active Horseradish Peroxidase in Methylotrophic Yeast. JIANG Tai-Jiao, JI Xin-Song, ZHANG Ru-An, HUANG Yan-Hong, WU Xiang-Fu, YUAN Zhong-Yi (Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Expression of active horseradish (*Armoracia rusticana*) peroxidase (HRP) in microbes is necessary not only to gain an insight into its mechanisms, structure and function, and physiological role in plants, but also to supply large quantities of this useful enzyme. Exploiting new approach to express HRP in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, the cDNA coding for mature HRP isozyme C was subcloned into the vector pPIC9. After transformation, the recombinant *P. pastoris* strain which secreted nonglycosylated HRP (about 30 ku) and hyperglycosylated HRP (about 100 ku) was obtained. Through optimization of the growth conditions, the hyperglycosylated HRP as the sole product was secreted into fermentation broth and reached a level of approximately 4~6 mg per ml of culture medium. Remarkably, a certain activity of 2.24 U/ml was determined in the fermentation broth and showed the maximum absorbance at 403 nm.

Key words horseradish peroxidase (HRP), *Pichia pastoris*, hyperglycosylation

金黄地鼠视皮层 17、18 区乙酰胆碱阳性神经元*

李俊凤 吴奇久

(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 利用乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 自身抗体对金黄地鼠视皮层 17、18 区乙酰胆碱阳性神经元及其分布进行免疫学显示并进行量化分析。实验发现, Ach 阳性细胞大部分为非锥体神经元, 也有少量锥体神经元。Ach 阳性神经元在视皮层的 II~VI 层, 主要分布在 II~IV 层。在不同层次中其阳性神经元类型存在某些差异, II~IV 中双极细胞居多, 其他层次中多极细胞占优势。17 区的这类神经元数量较多且集中成垂直于皮层表面的细胞带, 18 区的神经元数量相对较少且多呈分散状态。

关键词 视皮层, 乙酰胆碱, 免疫组织化学, 神经元

学科分类号 Q421

* 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: 1998-10-16, 修回日期: 1999-01-04

乙酰胆碱 (ACh) 是副交感神经及自律神经系统的一种兴奋性神经递质, 它的作用相当广泛, 与学习记忆和非特异性觉醒等都有密切的相关性^[1,2]. 在正常的细胞活动中, 皮层神经元要持续地接受 ACh 的调节, 智力的损伤和组织病理学的改变往往导致皮层中 ACh 的减少^[1]. 体外实验证明, 它除了影响正常细胞的兴奋性外, 尚影响突触的传递以保持各部位功能的协调^[3]. ACh 在视皮层中也有大量存在, 随着视觉研究的发展, 有些作者对视皮层中 ACh 功能进行探讨, 发现 ACh 对视皮层感受野的特性及机能组织有一定影响^[4]. 关于视皮层 17 区和 18 区中 ACh 的形态学定位, 有些作者在研究脑内 ACh 阳性神经元形态学特征时做过一些描述, 他们的研究结果都是用 ACh 的合成酶 (ChAT) 或其水解酶 (AChE) 的抗体免疫组化法获得的, 而且有些结果也不尽一致^[5,6]. 本研究的目的之一是使用高效价的 ACh 自身抗体对视皮层 17 区和 18 区中的 ACh 直接进行定位, 与前人用 ChAT 和 AChE 抗体间接获得的结果进行比较. 另外, 视皮层的 18 区从功能上说是高一级的视皮层区, 本实验的主要目的是比较 17、18 区中 ACh 阳性神经元和数量分布的异同, 探讨结构和功能的统一性.

1 材料和方法

用 10 只成年金黄地鼠 (雌雄各 5 只体重 80~135 g) 为材料. 动物在深度麻醉状态下, 相继用生理盐水和 Zamboni 氏固定液作心脏灌流, 灌流固定液用量为 200~250 ml. 随即将颅骨人字缝后 5.8~8.3 mm 包括 17、18 区的视皮层取下放在

Zamboni 氏固定液中, 4℃ 下固定 12~24 h, 用含 10% 和 20% 蔗糖的 PBS (pH 7.4, 0.01 mol/L) 分别浸泡 12~24 h, 然后用恒冷切片机制成 30~40 μm 的冠状切片, 收集在 PBS 中. 免疫染色用日本群馬大学内分泌研究所提供的 PAP 法^[7], 实验使用的一抗是军事医学科学院生产的兔抗 ACh 血清, 二抗由 Sigma 公司提供. 在对照实验中, 除以生理盐水代替一抗外, 其余步骤同上.

17、18 区 ACh 阳性神经元及正常细胞数量的计算: 用甲酚紫复染免疫反应后的切片; 在光镜下标定目镜网格面积为 400 μm × 400 μm; 每只动物视皮层 17、18 区随机选取 50 个样品区. 分别计数每个目镜网格面积 (即一个样品区) 内的 ACh 阳性细胞和细胞总数, 并用统计学方法得出平均细胞数和概率为 95% 的置信区间及二者的百分比.

2 结 果

2.1 17、18 区的 ACh 阳性神经元

ACh 阳性神经元在金黄仓鼠视皮层 17、18 区的第 II~VI 层都有分布, 第 II~IV 层密度最大 (图 1). 这些神经元的细胞体及其突起非常清晰, 细胞体成圆形, 其直径为 8~11 μm, 它们大部分属于非锥体型双极神经元、多极神经元和少量的双簇神经元、Chandler 神经元. 双极神经元的顶树突大部分垂直于皮层表面, 水平走向的很少. 除此之外, 还发现有极少量锥体型神经元 (图 2), 前人的观察未发现这种现象. 从阳性细胞的染色深浅来看, 它们可以分为两类, 一类染色较深, 可能含 ACh 较多, 另一类染色较浅, 可能含 ACh 较少 (图 3).

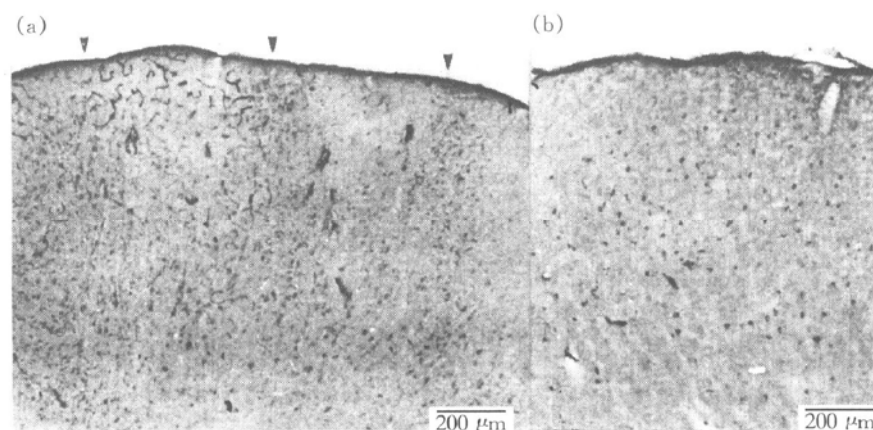


图 1 视皮层 ACh 阳性神经元分布

(a) 视皮层 17 区中 ACh 阳性神经元分布, 集中呈带状. ▼: ACh 阳性神经元细胞带. (b) 视皮层 18 区中 ACh 阳性神经元, 呈散在分布.



图2 17区第V层中的ACh阳性神经元

p: 锥体神经元, m: 多极神经元, b: 双极神经元.

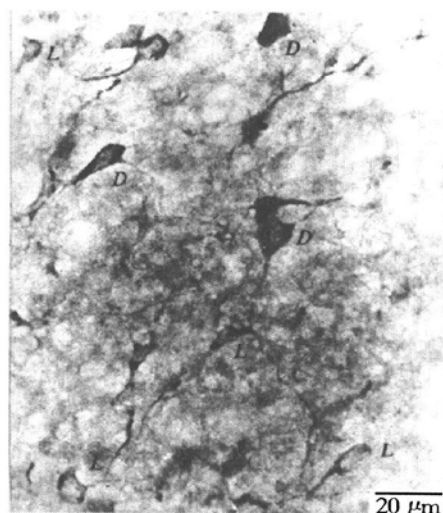


图3 18区第III层的ACh阳性神经元

染色深浅不同的神经元构成明显接触. D: 深染色神经元.

L: 浅染色神经元.

2.2 17、18区ACh神经元形态和数量的某些差异

视皮层17、18区ACh阳性神经元形态学差别主要表现在: 17区II~IV层中细胞类型变化较大, 第II层大部分为多极和双极神经元, 第III层细胞的胞体较小, 突起较短, 呈圆形或椭圆形, 第IV层细胞大部分为双极神经元, 它们象有序的二极管一样排成栅栏状, 具有特别粗大的垂直于皮层表面的顶树突(图4). 18区这些层次中的神经元细胞类型变化并不很大, 主要为双极神经元(图1b). 从细胞的分布看, 17区的细胞多集中呈垂直于皮层表面的带状排列, 而18区的则多数呈分散状态(图1). 就阳性细胞的密度而言, 17区比较密集, 18区比较稀疏(图1). 从实验脑区数理统计的定量

分析看, 前者的细胞数量比后者大约密集3倍(表1).



图4 17区第IV层中的ACh阳性神经元

这些神经元顶树突轴相垂直皮层表面, 排成栅状.

表1 金黄地鼠视皮层17、18区中的ACh阳性神经元和正常神经元数

	400 μm × 400 μm 中神经元数	神经元数 /mm ²	阳性神经元占 正常神经元的 百分比/%
17区ACh阳性 神经元数	30.8 ± 2.8 (<i>P</i> < 0.05)	193	5
18区ACh阳性 神经元数	10.4 ± 2.2 (<i>P</i> < 0.05)	65	2
视皮层正常 神经元数	25 ± 1.2 (<i>P</i> < 0.05)	3906	

3 讨 论

在进行大脑皮层ACh免疫组化研究时, 过去都采用ACh的合成酶ChAT以及水解酶AChE的抗体间接进行. 如果实验条件掌握得好, 它们都能较好地表现ACh的存在部位. 但用这些酶的抗体作为ACh的标志都有各自的不足之处. AChE分布比较广泛, 在某些无神经元分布的组织(如培养的鸡胸细胞)也见存在, 另外, AChE与ACh在某些神经组织中并不成正相关关系, 例如哺乳类小脑中ACh含量较少而AChE含量却较高, 同时有人还发现AChE具有水解多肽的作用, 这些因素都影响着AChE抗体的特异性. ChAT虽是ACh的极好的标志酶, 但在组织中大大超过ACh的合成所需, 在

定量观察时可能会产生某些误差。

关于 17、18 区 Ach 阳性神经元的细胞形态和在皮层各层次中的分布, 我们的观察与前人的结果基本一致, 但也存在某些差别。在我们的实验中, 除观察到视皮层中 Ach 阳性神经元绝大部分为非锥体型神经元外, 还看到了少数锥体型神经元。前人的实验已经证明, 非锥体型神经元的轴索是内域性的, 而锥体型神经元的轴索不是内域性的, 它们也向皮层白质伸展^[8]。说明皮层中的 Ach 神经元不仅与皮层内信息传导有关, 也与信息传出有关。另外, 根据某些生理学家的意见, 形态学上的非锥体和锥体型细胞分别与生理学上的简单型和复杂型、超复杂型细胞相对应^[9]。因此这一结果同时说明, Ach 不但对简单型细胞的生理反应有影响, 可能对复杂型和超复杂型细胞也有一定作用。关于视皮层 17 和 18 区中 Ach 分布的区域性变化, 在前人的工作中基本上未作描述。我们的观察表明, 17 区和 18 区的阳性神经元其细胞密度存在明显差异, 17 区比较密集, 18 区比较稀疏。按生理机能而言, 17 区主要具有识别物像立体结构即识别物体的形状、物体不同明暗等信息的能力, 而 18 区则属处理其他视觉信息的更高级视皮层区, 因此我们认为, Ach 在初级视皮层 17 区可能比在 18 区起着更重要的作用。本实验观察到的另一现象是, 17 区 Ach 阳性神经元呈垂直于皮层表面的间隔距离约为 390 μm 的带状分布, 这些阳性细胞带之间的距离与 1972 年 Hubel 和 Wiesel 报告的视皮层眼优势柱之间的距离 (400 μm) 相近^[10], 这一事实说明也许 Ach 阳性神经元多集中于眼优势柱内。上述这些与前人报告结果的差异是由于实验方法还是由于使用抗体不同引起的尚不能肯定, 但我们认为, 使用 Ach 自身的抗体比间接使用某些酶抗体作为标记物对 Ach 进行定位将更直接、更具有可信性。

参 考 文 献

- 1 Singer W. Central control of visual cortex function. In: Schemm F O, Worden F G eds. *The Neurosciences Fourth Study Program*. Cambridge MA: The MIT Press, 1979. 1093~1100
- 2 Sholz D E, Cohen S, Haidarliu S, *et al.* Differential effect of acetylcholine on neuronal activity and interactions in the auditory cortex of the guinea pig. *Eur J Neurosci*, 1997, **9** (2): 396~409
- 3 Krnjevic K. Transmitters in motor system. In: Brooks VB ed. *The Nervous System, (II), Motor Control*. Baltimore: American

Physiological Society, 1981. 107~154

- 4 Sillito A M, Kemp J A. Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain Research*, 1983, **289**: 143~155
- 5 Houser C R, Crawford G D, Salvaterra P M, *et al.* Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol*, 1985, **234**: 17~34
- 6 Eckenstein F, Thoenen H. Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience Letters*, 1983, **36**: 211~215
- 7 李俊凤, 吴奇久 (Li J F, Wu Q J). 金黄仓鼠视皮层上丘和外侧膝状体中的血管活性肠肽 (VIP) 神经元及其纤维. *动物学报 (Acta Zoologica Sinica)*, 1995, **41** (4): 381~385
- 8 冈村均 (Hitoshi Okamura). 大脑皮质におけるベプチドニューロン. *细胞 (Cell)*, 1986, **18** (3): 8~12
- 9 Kelly J P, Van Essen D C. Cell structure and function in the visual cortex of the cat. *J Physiology (London)*, 1974, **238** (2): 515~547
- 10 Hubel D H, Wiesel T N. The functional architecture in the visual cortex of the stump-tailed Macaque. In: *Proceedings of the Royal Society of London. A Colloquium on Visual Pattern Recognition*. London: The Royal Society of London. 1977. **198**: 1~59

The Acetylcholine immunoreactive Neurons and Their Distribution in the Area 17 and 18 of the Visual Cortex of Hamster. LI Jun-Feng, WU Qi-Jiu (Laboratory of Visual Information Processing Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China).

Abstract Acetylcholine localization was studied immunohistochemically in neurons of the area 17 and 18 in the hamster visual cortex using anti-acetylcholine serum. It was found that the Ach-labeled cells are nonpyramidal neurons primarily and a few pyramidal neurons also exist. These neurons were found to be distributed in layer II ~ VI, concentrated in the layer II ~ IV. The neurons in the area 17 having greater density are arranged to form a columns perpendicular to the surface of the visual cortex and the neurons in the area 18 having smaller density are distributed dispersely. In the different layers of the visual cortex, the type of stained neurons has variation with that the majority of these neurons were bipolar in layer II, IV and the multipolar cells in the other layers.

Key words visual cortex, acetylcholine, immunohistochemistry, neuron