

猫视皮层 17 区一氧化氮合酶阳性神经元的生后发育

蒋斌¹ 丁锦东¹ 周逸峰¹ 寿天德^{1,2,3}

(1. 中国科技大学生命科学学院 神经生物学与生物物理学系视觉研究实验室, 合肥 230027;

2. 复旦大学生命科学学院 生理学与生物物理学系, 上海 200433;

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

摘要 用 NADPH-d 黄递酶组化技术观察了生后不同年龄段猫视皮层 17 区中一氧化氮合酶阳性神经元的生后发育状况。结果显示: 生后 1 周内, 一氧化氮合酶阳性细胞仅出现于皮层的第 5/6 层以及皮质下板(白质)中, 皮质板中极少; 生后 2 周时, 一氧化氮合酶阳性细胞见于 2/3 和 4 层; 在随后的发育中, 2/3 层与 4 层中阳性细胞逐渐增多, 第 5 周时呈现与成年动物相似的分布模式。一氧化氮合酶阳性细胞的发育模式反映了皮质板的形成过程, 即“由内向外”的皮层层层成熟模式; 成年动物的皮层 17 区中一氧化氮合酶阳性细胞远远高于幼年。猫视皮层 17 区中一氧化氮合酶阳性细胞发育的时空表达模式与猫视皮层发育的关键期无明显吻合关系, 推测视皮层中内源性一氧化氮与视皮层的眼优势柱的可塑性无关, 为 Reid 等和 Ruthazer 等的电生理学研究成果提供了形态学证据。

关键词 一氧化氮合酶 生后发育 视皮层 猫

THE POSTNATAL DEVELOPMENT OF NOS POSITIVE NEURONS IN VISUAL CORTEX (AREA 17) OF THE CATS

Jiang Bin¹, Ding Jindong¹, Zhou Yifeng¹, Shou Tiande^{1,2,3}

(1. Vision Research Laboratory, School of Life Science, University of Science and Technology, Hefei 230027;

2. Department of Physiology and Biophysics, Fudan University, Shanghai 200433;

3. Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Abstract In order to investigate whether NO may involve in the plasticity of visual cortex or not, the postnatal development of NOS positive neurons in visual cortex (Area 17) of cats was studied with NADPH-d diaphorase technique. The NOS positive neurons were found in layer 5/6 and subcortical plate by the first postnatal week (PNW 1), but they were distributed to supragranular layers (2/3) and granular layer except layer 1 by PNW 2. The number of NOS positive neurons were increased in layer 2/3 and 4 during the ensuing development. The distribution pattern of NOS positive neurons displayed the same as that in adulthood by PNW 5 and the number of them in visual cortex was higher in adult than in kittens. The temporal and spatial expression pattern of NOS activity in visual cortex did not correlate to the critical period of development of visual cortex obviously, so NO could not be essential for ocular dominance plasticity. This result provided morphological evidence for the electrophysiological results of Reid and Ruthazer.

(Figures 2~ 11 on plate 40)

Key words NOS, postnatal development, visual cortex, cat

一氧化氮(NO)在外周神经系统中是一种有效的血管舒张剂,在中枢神经系统(CNS)中行使使

的作用^[1-3]。在小脑和海马脑片的体外实验中表明,通过突触后兴奋性谷氨酸受体的激活使一氧化氮合酶(NOS)激活,再催化精氨酸分解释放出NO,NO作为逆行信使可改变突触的结合强度^[4-6]。自从神经元中NADPH-d 黄递酶被证明是一种NOS之后,NADPH-d 组化方法即提供了一种简便且可靠的标记NOS阳性神经元的形态学方法^[7]。有人用此方法发现成年猫的视皮层中存在着NOS阳性神经元,它们主要分布于视皮层的2/3、5层及白质中,并在皮层中存在丰富的NOS阳性神经纤维。电生理学证据提示,猫视皮层中NO可能调制皮层细胞的反应,NO及其代谢产物对视觉信号有放大的作用^[8]。

猫在生后视觉发育中存在一个“发育关键期”。视皮层形成诸如感受野特性,眼优势柱,方位柱及空间频率柱等功能组织均在关键期阶段内形成,并受视觉环境的影响。这些功能组织的可塑性的形成需突触前(来自外膝体的投射纤维)与突触后(皮层神经元)神经元的共同参与。用TTX阻断皮层细胞活动^[9]或强化皮层内部抑制作用^[10]以及阻断皮层细胞膜上的NMDA受体的活动^[11]均能防止视皮层的眼优势柱的可塑性。按照Kandel等^[12]的轴突可塑性的模型,突触的变化只有当轴突后的靶细胞觉察到突触前相关输入程度的变化时才会发生。目前认为NO作为逆行信使参与突触前后的相互通讯,因此可以推测NO与视皮层发育的可塑性有关。但Reid等^[13]和Ruthazer等^[14]两个实验组的电生理结果表明NO并不是眼优势柱可塑性所必需的。为了从形态学上提供NO是否参与视皮层眼优势柱可塑性的证据,本文用NADPH-d组化方法观察了生后发育过程中视皮层中的NOS阳性神经元的表达与分布变化,观察了NOS阳性细胞的时空表达模式是否与视皮层发育的关键期相吻合,并与Reid等和Ruthazer等的电生理学结果作了比较,表明形态学与电生理学的结果是一致的。

材料与方 法

材料为生后0.5周(n=5)、1周(n=4)、1.5周(n=3)、3周(n=4)、5周(n=5)、8周(n=4)、10周(n=3)、15周(n=3)及成年(n=4)的猫,用乌拉坦(Urethane)深度麻醉后,经升主动脉依次灌注生理盐水(室温)和磷酸缓冲液(pH 7.4)配制的4%多聚甲醛固定液(4)后,取脑入上述固定液后固定2~4h(4),将脑组织依次经10%、20%、30%蔗糖磷

酸缓冲液浸泡过夜(4),按猫脑定位图谱^[15],从尾端至吻端贯穿视皮层17区,切片相当于Horsley-Clarke的P8-A2水平。切片厚50 μ m,隔三取二,一套用于Nissl染色;一套用于NADPH-d组化反应,即:脑切片用0.1mol/L磷酸缓冲液漂洗后入下列孵育液中0.5~1.2h(37):1mmol/L NADPH(Sigma)、0.5mmol/L 氮蓝四唑(NBT)、0.2% Triton X-100、0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.4)。反应中随时检查反应产物直至显示完整细胞形态和近端树突后,用上述磷酸缓冲液漂洗数次,玻片贴片后,依次施中性红衬染(确定上丘分层)、酒精脱水、二甲苯透明和中性树胶封片,显微镜观察照相。视皮层的切片中,每只动物取15~20张切片,用网格测微尺测定视皮层17区每张切片由背侧至腹侧五个样品区中的NOS阳性神经元数目,取平均值并换算成mm²中的细胞剖面密度;再用同样方法计数视皮层17区的Nissl染色片上的全部神经元剖面密度。

结 果

视皮层17区中各个周龄段均含有NOS阳性神经元。皮层中的NOS阳性神经元可分为两种类型,一类是浓染的,胞体及近端树突均着深蓝色,呈Golgi染色形态,主要分布在第5/6层以及白质中;另一类为淡染细胞,仅染出细胞体,主要分布在2/3层。Mizukawa等^[16]将猫CNS中的NOS阳性细胞的形态分为六种类型,其Type I为浓染的,胞体面积较大(40~60 μ m)、一般具有3~6个长而明显的突起;Type V为中等大小的胞体(20~30 μ m),细胞淡染无明显的突起。因此视皮层中的两种类型细胞分别属于Type I和Type V(Fig. 11)。生后0.5~1周时,浓染的细胞主要位于5/6层和白质中;皮质板中的NOS阳性神经细胞多为淡染细胞,偶尔见到浓染细胞,但皮质板中却含有丰富的NOS阳性神经纤维(Figs. 2, 3)。生后3~5周,2/3层中的NOS阳性细胞数量急剧增加(Fig. 6),且从第5周到成年此层阳性细胞一直处于较高水平(Figs. 7~10)。在生后1.5周时,第4层出现少量淡染阳性细胞,阳性纤维非常丰富(Figs. 4, 5)而与17区相邻的18区中阳性纤维却很少,此点可作为17区和18区的划分界限的标志(Fig. 4)。第3周起,4层NOS阳性细胞处于快速增长期,此趋势一直保持到成年(Figs. 6~10);而第5/6层中的NOS阳性细胞数量在生后的5周前变化不大,5周之后逐渐增多(表1,

Figs 1, 7~ 10)。总的看来,猫视皮层 17 区的 NOS 阳性神经元在生后发育的早期主要位于 5/6 层及白

质中,1~ 5 周明显地向皮质迁移,第 5 周时已形成与成年动物类似的分布模式(Fig. 7)。

表 1 视皮层 17 区 NOS 阳性细胞的生后发育 (Cells/mm², $\bar{x} \pm s$)

生后周龄	n	皮层层次		
		2/3	4	5/6
0.5	5	22.7 ± 8.2 (0.55)		43.4 ± 5.2 (0.97)
1	4	34.3 ± 11.2 (0.79)		40.8 ± 9.1 (0.97)
1.5	3	23.6 ± 2.6 (0.63)	32.4 ± 5.1 (0.88)	36.0 ± 2.7 (1.01)
3	4	42.8 ± 17.5 (1.26)	32.3 ± 13.0 (0.97)	33.0 ± 10.5 (1.12)
5	5	87.2 ± 11.7 (2.89)	42.7 ± 9.2 (1.59)	38.6 ± 2.1 (1.63)
8	4	77.6 ± 5.5 (3.18)	63.7 ± 2.6 (2.88)	52.7 ± 6.8 (2.45)
10	3	74.2 ± 5.5 (3.33)	61.7 ± 4.5 (2.67)	54.6 ± 4.7 (2.51)
15	3	93.4 ± 8.2 (3.86)	77.6 ± 9.2 (3.55)	64.2 ± 3.1 (3.09)
成年	4	126.0 ± 17.4 (5.41)	69.0 ± 4.7 (3.34)	86.0 ± 3.8 (4.23)

括号内数据为 NOS 阳性细胞占皮层各层全部神经元数的百分比(%)

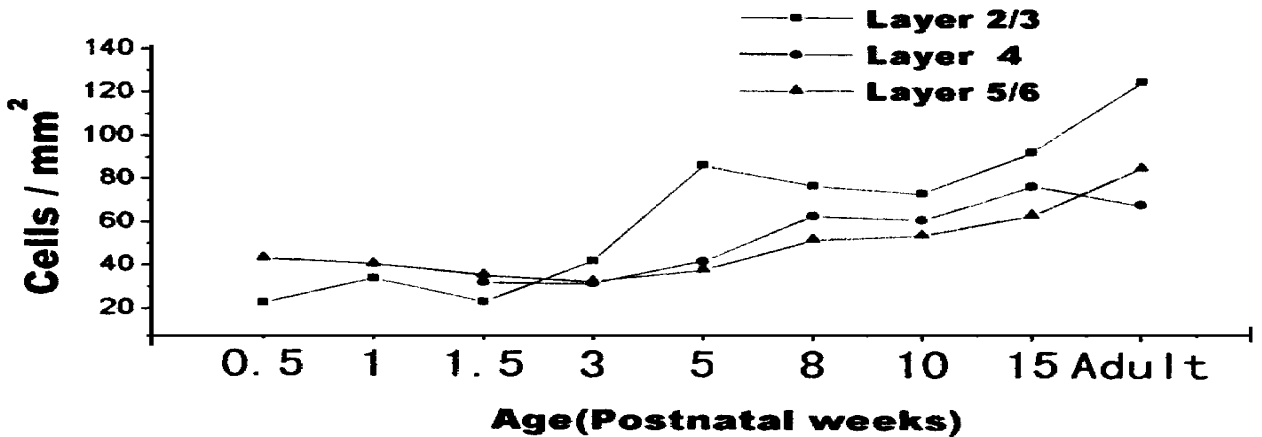


Fig. 1 The postnatal development of NOS positive neurons in the visual cortex (Area 17) of cats

讨 论

用 NADPH 黄递酶组织化学方法的研究发现大鼠、金黄地鼠以及猫的视皮层中存在 NOS 阳性细胞和纤维, NOS 阳性细胞形态各异, 大小不同, 但都属于非锥体细胞。在大鼠视皮层中 NOS 阳性神经元与神经肽 Y 或生长抑素共存或与两者都共存, 而 90% ~ 95% 神经肽 Y 细胞和生长抑素与 GABA 共存^[17]。本文的结果: NOS 阳性神经元的生后时空发育与猫视皮层 17 区中的谷氨酸脱羧酶 (GAD, GABA 神经元的标志酶) 的活性的生后发育趋势非常接近^[18], 它也是在生后的 5~ 6 周时接近成年动物水平, 因此推测 NOS 阳性神经元可能是皮质中的中间抑制神经元; NOS 阳性神经细胞的发育又类似于猫皮层 17 区中的生长抑素阳性细胞的发育模

式^[19], 这些生长抑素神经元在生后的第 8 周即已发育成熟, 从 P60 至成年, 皮层保持较高的细胞数目; 此外与猫皮层的神经肽 Y 细胞的生后发育也基本上一致^[20]。

猫视觉皮层发育的敏感期从生后第 2 周即已开始, 在生后的第 4~ 7 周最为关键, 到第 8 周时即结束。据报道: 猫外膝体的投射纤维在胚胎的第 36 天 (E36) 时进入视皮层的皮质下板 (SP), 在此停留两周后, 于 E48 到出生 (E65) 时开始投射到皮质板中, 在生后一周之内, 外膝体纤维主要投射到皮层 1 层和 5 层, 到生后 3 周末开始回缩至第 4 层中, 从第 4~ 7 周, 这些来自各自眼相互重叠的外膝体纤维逐渐分离而形成眼优势柱。这段时间也正是猫视觉发育的关键期^[21]。由于视皮层中 NMDAR1 受体生后发育中的表达时程与视皮层发育的关键期十分吻

合, 视皮层中 NMDAR1 受体在 2/3 层中一直保持较高水平, 但第 4 层及 5/6 层中却呈现过度的表达, 尤其是第 4 层 NMDAR1 受体在生后第 4~6 周到达最高峰, 第 10 周迅速下降, 成年保持较低水平^[22]。此模式与眼优势柱发育的时程的一致性, 加以又有电生理上的证据^[11], 表明 NMDAR1 受体参与此过程并与眼优势柱的可塑性有关。但从本文的实验结果来看, 第 4 层中 NOS 阳性神经元虽在第 2 周内开始出现, 但在随后的发育中一直保持较高水平, 直至成年, 并没有出现和 NMDA 受体类似的过度表达, 因此推测 NO 可能与视皮层眼优势的可塑性无关, 这可能正是 Reid 等 (1996) 和 Ruthazer 等 (1996) 的电生理结果的形态学证据。

大鼠视皮层中 NOS 阳性细胞在生后发育的第二周即已具备成年动物的分布模式, 但从第三周起其数量呈下降趋势。与大鼠视皮层 17 区中的 NOS 阳性细胞的发育模式不同, 猫在生后的第五周虽具备了成年动物的 NOS 表达模式, 但在随后的发育过程中, 皮层各层中的阳性细胞数量仍呈上升趋势。大鼠视皮层中的 NO 的早期表达可能与视皮层早期神经元的分化以及成熟有关; NO 在猫的早期视皮层中可能具有相似的作用, 而在成年时较高的 NO 表达水平可能与皮层功能的维持有关, 如调节皮层的血流^[23], 而与视皮层眼优势柱发育的可塑性无关。

(收稿 1998-10-14)

本文图 2~11 见版图 40 页

参 考 文 献

- [1] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992; 8: 3~11
- [2] Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 1998; 336: 385~388
- [3] Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TNS*, 1991; 14: 60~67
- [4] Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science*, 1992; 257: 1273~1276
- [5] Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, 1991; 394: 326~328
- [6] Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 1992; 8: 211~216
- [7] Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, et al. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 2811~2814
- [8] Cudeiro J, Rivadulla C, Rodriguez R, et al. Application of L-Arg and L-NO-Arg modify cellular responses in the primary visual cortex of the cat. *Soc Neurosci Abstr*, 1995; 21: 1653
- [9] Reiter HO, Waitzman DM, Stryker MP. Cortical activity blockade prevent ocular dominance plasticity in the kitten. *Exp Brain Res*, 1986; 65: 182~188
- [10] Hata Y, Stryker MP. Control of thalamocortical afferent rearrangement by postsynaptic activity in developing visual cortex. *Science*, 1994; 265: 1732~1735
- [11] Bear MF, Kleinschmidt A, Gu Q, et al. Distribution of experience-dependent synaptic modification in striate cortex by infusion of an NMDA receptor antagonist. *J Neurosci*, 1990; 10: 909~925
- [12] Kandel ER, O'Dell TJ. Are adult learning mechanisms also used for development. *Science*, 1992; 258: 243~245
- [13] Reid SNM, Dawson NW, Czepita D, et al. Inhibition of nitric oxide synthase does not alter ocular dominance shifts in kitten visual cortex. *J Physiol*, 1996; 492: 519~527
- [14] Rutyazer ES, Gillespie DC, Dawson TM, et al. Inhibition of nitric oxide synthase does not prevent ocular dominance plasticity in kitten visual cortex. *J Physiol*, 1996; 492: 519~527
- [15] Tusa RJ, Palmer LA, Rosenquist AC. Multiple cortical visual areas. Visual field topography in the cat. In Woolsey CN ed. *Cortical Sensory Organization Vol 2. Multiple Visual Areas*. Clifton, New Jersey, Humana Press, 1981: 1~31
- [16] Mizukawa K, Vincent SR, McGeer PL, et al. Distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase positive cells and fibers in the cat central nervous system. *J Comp Neurol*, 1989; 279: 281~311
- [17] Vincent SR, Johansson O, Hökfelt T, et al. NADPH-diaphorase: A selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol*, 1983; 217: 252~263
- [18] Fosse VM, Heggelund P, Fonnum F. Postnatal development of glutamatergic, GABAergic, and cholinergic neurotransmitter phenotypes in the visual cortex, lateral geniculate nucleus, pulvinar and superior colliculus in cats. *J Neurosci*, 1989; 9: 426~435
- [19] Hogan D, Bemman NEJ. The development of neuropeptide Y immunoreactive neurons in cat visual cortical areas. *Dev Brain Res*, 1992; 67: 343~369
- [20] Hogan D, Bemman NEJ. The development of somatostatin immunoreactive neurons in cat visual cortical areas. *Dev Brain Res*, 1993; 71: 221~238
- [21] Sheman SM, Spear PD. Organization of visual pathway in normal and visual deprived cats. *Physiol Rev*, 1982; 62: 738~855
- [22] Catalano SM, Chang CK, Shatz CJ. Activity-dependent regula-

tion of NMDAR1 immunoreactivity in the developing visual cortex. *J Neurosci*, 1997; 17: 8376~ 8390

[23] Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during

neural activity: is nitric oxide the missing link? *TINS*, 1993; 16: 206~ 214

Explanation of Figures

- Fig. 2 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 0.5 Bar= 200 μm
- Fig. 3 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 1. Bar= 200 μm
- Fig. 4 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 1.5. arrow indicated the border between A rea 17 and A rea 18 Bar= 200 μm
- Fig. 5 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 1.5 Bar= 200 μm
- Fig. 6 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 3 Bar= 200 μm
- Fig. 7 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 5 Bar= 200 μm
- Fig. 8 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 8 Bar= 200 μm
- Fig. 9 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at PNW 10 Bar= 200 μm
- Fig. 10 NOS positive neurons and fibers in cat visual cortex (A rea 17) at adulthood Bar= 200 μm
- Fig. 11 Type INOS positive neurons (arrow), more processes with rich ramification, and Type V NOS positive neurons (arrow-heads), a clear nucleus but no processes in visual cortex (A rea 17). Bar= 50 μm
- 2/3, 4, 5/6= Layer 2/3, layer 4, layer 5/6 respectively WM, white matter CP, cortical plate