

改良法制作的视网膜切片内核层神经元的形态和电学特性

黄艳明, 杨梅, 袁容娣

引用: 黄艳明, 杨梅, 袁容娣. 改良法制作的视网膜切片内核层神经元的形态和电学特性. 国际眼科杂志 2020;20(5):778-781

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81600758)

作者单位: (400037) 中国重庆市, 中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院眼科

作者简介: 黄艳明, 毕业于中国人民解放军陆军军医大学, 博士, 主治医师, 研究方向: 视网膜变性疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 袁容娣, 毕业于中国人民解放军陆军军医大学, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 视网膜疾病的基础与临床研究. yuanrongdi755633@163.com

收稿日期: 2018-08-11 修回日期: 2020-04-14

摘要

目的: 探讨低温琼脂包埋振动切片机切片法制作的大鼠视网膜切片内核层神经元的形态和基本电生理学特性。

方法: 采用低温琼脂包埋振动切片机切片的方法制作大鼠视网膜切片, 对内核层的神经元进行膜片钳全细胞记录, 同时在胞内液中加入荧光黄观察记录细胞的形态。

结果: 该方法制作的视网膜切片切面平整、细胞活性好、保留了细胞之间的突起联系, 能够根据细胞胞体的大小、位置初步辨别细胞的种类。在视网膜切片上荧光黄显示的细胞形态表明, 双极细胞胞体呈梭形, 突起主要沿纵向延伸; 而水平细胞和无长突细胞胞体圆形或椭圆形、胞体较大, 分别位于内核层的最外层和最内层。水平细胞和无长突细胞的静息膜电位(RMP)和膜电容(Cm)明显高于双极细胞。给予时程40ms, 步阶10mV从-60mV至+40mV的电压刺激, 41.7%的视锥双极细胞和64.7%的无长突细胞表现出内向钠电流和外向钾电流, 其他细胞则只表现出外向钾电流。

结论: 采用低温琼脂包埋振动切片机切片的方法操作简单, 制作的切片质量稳定可靠, 使得在视网膜切片上对包括水平细胞在内的不同内核层神经元进行膜片钳记录成为可能。进一步研究视网膜内核层神经元的电生理学特性, 有助于揭示视觉信号的发生、传导和调控机制。

关键词: 视网膜切片膜片钳; 内核层; 细胞内染色; 全细胞记录

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.5.07

Morphology and electrophysiological properties of neurons in the inner nuclear layer of the rat retina slices prepared by reformed method

Yan-Ming Huang, Mei Yang, Rong-Di Yuan

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81600758)

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China

Correspondence to: Rong-Di Yuan. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China. yuanrongdi755633@163.com

Received: 2018-08-11 Accepted: 2020-04-14

Abstract

• AIM: To investigate the morphology and electrophysiological properties of neurons in the inner nuclear layer (INL) of the adult rat retina slices. The retinal slices were prepared by low-melt agarose embedding and then cutted by vibratome.

• METHODS: Whole cell patch clamp and intracellular staining with Lucifer Yellow were used in this study to study the morphology and electrophysiological properties of the INL neurons in retinal slices.

• RESULTS: Retinal slices prepared in this method possessed a very smooth surface. The cells on the retinal slices maintained very good vitality, and some of the cells even retained their dendritic connections with other cells on the slice. According to the size and location of the cell bodies, neurons in the INL were easy to differentiate. Lucifer Yellow contained in the intracellular solution revealed the morphology of the recorded cell very well. Bipolar cells possessed elongated cell bodies and their processes mainly extended along the vertical direction. Horizontal cells and amacrine cells possessed much bigger and round cell bodies, resided in the outermost and inner most of the INL, respectively. The rest membrane potential and membrane capacitance of horizontal cell and amacrine cell were much higher than that of bipolar cells. Under a voltage step from -60mV to +40mV, 10mV per step, 41.7% of the cone bipolar cells and 64.7% of the amacrine cells exhibited inward sodium current and outward potassium current. Other cells only possessed outward potassium current.

• CONCLUSION: The method of preparing retinal slices was very simple, and the viability of the slices were stable. These facilitated the patch-clamp recording of all the neurons in the INL including horizontal cells. Further investigation of the electrophysiological properties of the neurons in the INL was essential in revealing the mechanism of vision.

• KEYWORDS: retina slice patch clamp; inner nuclear layer; intracellular staining; whole cell recording

Citation: Huang YM, Yang M, Yuan RD. Morphology and electrophysiological properties of neurons in the inner nuclear layer of the rat retina slices prepared by reformed method. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(5):778-781

0 引言

视网膜主要由三层细胞构成,从外至内依次为外核层、内核层(inner nuclear layer, INL)和节细胞层。其中INL的细胞种类复杂,包括水平细胞(horizontal cell, HC)、视杆双极细胞(rod bipolar, RB)、视锥双极细胞(cone bipolar, CB)和无长突细胞(amacrine cell, AC)。且在视觉信息的传递过程中担当承上启下的重要功能,双极细胞将接收的光感受器的信号分流为给光(ON)和撤光(OFF)信号;同时经感光细胞—双极细胞—神经节细胞垂直通路传递的视觉信号在INL的水平细胞和无长突细胞两个水平进行整合;最后通过INL细胞与神经节细胞之间特殊的突触传递,将持续性的分级电位转化为动作电位。因此对INL细胞电生理功能的研究对于揭示视网膜的信息处理机制尤为重要。

由于感光细胞和神经节细胞分别位于视网膜的最外层和最内层,对其电生理功能的记录可在视网膜铺片上进行^[1]。而对处于视网膜中间层的INL细胞如双极细胞^[2]、无长突细胞^[3]的膜片钳记录则只能在视网膜切片上进行。但是至今对水平细胞的膜片钳记录仍然采用酶消化、分离单个细胞的方法^[4-5]。究其原因,可能是由于传统的方法制作的视网膜切片质量欠佳,难以辨认数量相对较少的水平细胞。本研究借用脑片膜片钳技术中振动切片机的方法,加以改进将视网膜用低熔点琼脂包埋后振动切片机切片,制作出形态和活性较好的视网膜切片,对INL的各种神经元进行膜片钳全细胞记录。

1 材料和方法

1.1 材料 选取出生后30d Long Evan's大鼠(来源于陆军军医大学实验动物中心)。常规化学试剂(NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, NaH₂PO₄, 葡萄糖, 乳酸钠)购于重庆北碚化学试剂厂,丙戊酸钠和荧光黄购于上海生工,低熔点琼脂(美国Sigma Aldrich)。玻璃微电极毛胚(北京正天易科贸有限责任公司)。主要设备:膜片钳放大器(美国Axon公司Axopatch200B)、电极控制器(美国Sutter公司P-97 Flaming/Brown式)、荧光显微镜(德国Leica Q550FW)、振动切片机(美国Ted Pella, INC Vibratome 1000)。

1.2 方法

1.2.1 视网膜切片的制作 麻醉并处死出生后30d Long Evan's大鼠,迅速摘出眼球,在细胞外液(NaCl 119mmol/L, KCl 2.5mmol/L, CaCl₂ 2.5mmol/L, MgCl₂ 1.3mmol/L, NaHCO₃ 26.2mmol/L, NaH₂PO₄ 1mmol/L, 葡萄糖 20mmol/L, 丙酮酸钠 2mmol/L, 乳酸钠 4mmol/L)中剥离视网膜,并将其剪成2~3片。该研究中使用的Long Evan's大鼠符合我国微生物控制的要求,实验设计、实验过程及动物处死方法,经过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审核通过,符合动物伦理和动物福利要求。视网膜片展平后使用37℃的3.5%低熔点琼脂凝胶包埋,放置冰袋上迅速冷却凝固后,修整琼脂块,使用瞬间粘合剂将其固定在振动切片机(vibratome 1500, 美国)的载物台上,迅速加入4℃预冷的细胞外液并通混合气体(95% O₂+5% CO₂),将包埋有视网膜的琼脂块切成厚度200μm的切片,用细毛笔将切片转移入通混合气体的细胞外液中保存备用。

1.2.2 记录电极的制备 应用P97电极控制仪(Sutter, 美国)采用三步法拉制玻璃毛细管微电极(WPI, 美国),控制好的电极在注入电极内液(KCl 120mmol/L, HEPES

20mmol/L, EGTA 1mmol/L, MgATP 2mmol/L, NaGTP 0.2mmol/L, 0.02% 荧光黄)后测阻抗为7~10 MΩ。

1.2.3 膜片钳全细胞记录 用细毛笔小心将视网膜切片转移入灌流槽底并用尼龙丝网加以固定,持续氧饱和的细胞外液灌流(3~5mL/min)。采用传统的全细胞膜片钳记录技术,在电压钳模式下,钳制电压-60mV, 10mV 步阶阶跃至+40mV,记录细胞的全细胞电流。在形成全细胞模式后,记录细胞的被动膜学特性,包括静息膜电位(RMP)、膜输入阻抗(IR)、膜电容(Cm)等。信号采集频率为10kHz,滤波频率为2kHz。所用设备为Axopatch 200-B (Axon Instruments, CA, USA),信号采集和分析软件Clampex 10.0和Clampfit10.0。采集记录结束后在荧光显微镜下可以观察、拍摄所记录细胞的形态。

统计学分析:采用SPSS18.0软件进行统计处理。所有计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析作组间差异的比较, LSD-*t* 检验作组内均数的两两比较。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜切片的形态 采用低熔点琼脂包埋振动切片机方法获得的视网膜切片,在400×显微镜下,切面平整层次清晰,组织透光性好,色素上皮细胞、感光细胞及其内外节、INL各种细胞和神经节细胞均清晰可见(图1A)。INL的大部分细胞表面突起隐约可见(图1B箭头所示),且胞体光泽圆滑。在对INL-无长突细胞记录完毕观察细胞形态时(图1C),我们还发现节细胞层有一细胞胞体同时着色(图1D),且可见两细胞之间的突起联系(图1F)。

2.2 内核层神经元的形态 水平细胞:胞体位于INL紧邻外丛状层(outer plexiform layer, OPL)的部位,突起在OPL内水平延伸(图2A)。视杆双极细胞:胞体呈梭形,轴突较长,深达内丛状层(inner plexiform layer, IPL)的最内层,轴突末端呈瘤样膨大(图2B)。视锥双极细胞:分为两种类型,ON型视锥双极细胞轴突较长,轴突末端止于IPL层的内层(图2C);OFF型视锥双极细胞胞体位于INL内层,轴突较短,末端止于IPL的外层(图2D)。无长突细胞:胞体较双极细胞大,位于INL层最内层,突起分支模式多样(图2E、F)。

2.3 内核层神经元的基本电生理学特性 内核层视杆双极细胞、视锥双极细胞、水平细胞、无长突细胞这四种神经元的被动膜学特性检测结果显示,四种神经元的IR值比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);四种神经元的RMP值比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),其中视杆双极细胞组(-47.3 ± 2.76mV)和视锥双极细胞组(-42.3 ± 5.53mV)比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),但视杆双极细胞组与水平细胞组(-51.2 ± 4.25mV)、视锥双极细胞组与无长突细胞组(-59.8 ± 3.15mV)相比RMP值均明显升高,差异具有统计学意义(*P* < 0.05);四种神经元的Cm值检测比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),其中视杆双极细胞组(28.5 ± 6.12pF)和视锥双极细胞组(25.7 ± 3.26pF)相比差异无统计学意义(*P* > 0.05),但视杆双极细胞组与水平细胞组(35.6 ± 4.79pF)、视锥双极细胞组与无长突细胞组(39.3 ± 1.37pF)相比Cm值均明显降低,差异具有统计学意义(*P* < 0.05),见表1。

在同样的步阶电压刺激下,比较INL各种神经元的全细胞电流。水平细胞、视杆双极细胞、部分视锥双极细胞

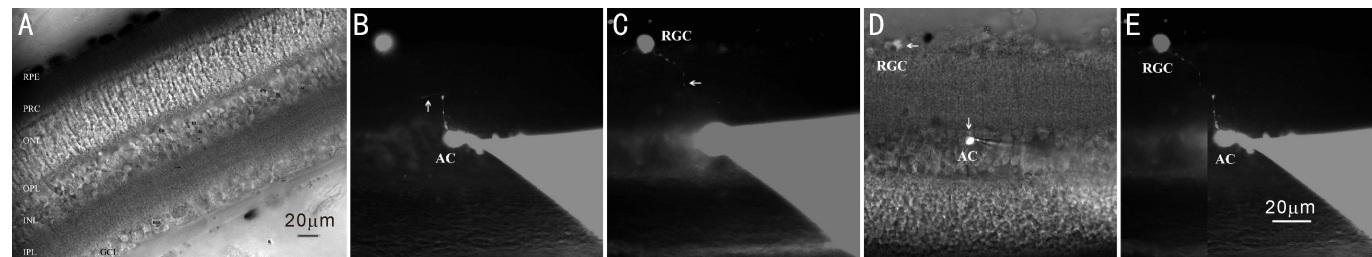


图1 视网膜切片的形态以及切片上细胞之间的突起联系 A:低温琼脂包埋振动切片机制作的视网膜切片切面平整、细胞活性良好,根据细胞胞体的位置和突起形态可以大致区分细胞类型;B:无长突细胞和它的突起;C:神经节细胞层的一个神经节细胞被染色;D:在像差显微镜下看到染色较深的无长突细胞和染色较浅的神经节细胞。E: B和C重叠显示无长突细胞和神经节细胞的突起交叉重叠。RPE:色素上皮层;PRC:感光细胞层;ONL:外核层;OPL:外丛状层;INL:内核层;IPL:内丛状层;GCL:神经节细胞层;RB:视杆双极细胞;CB:视锥双极细胞;HC:水平细胞;AC:无长突细胞;RGC:神经节细胞。

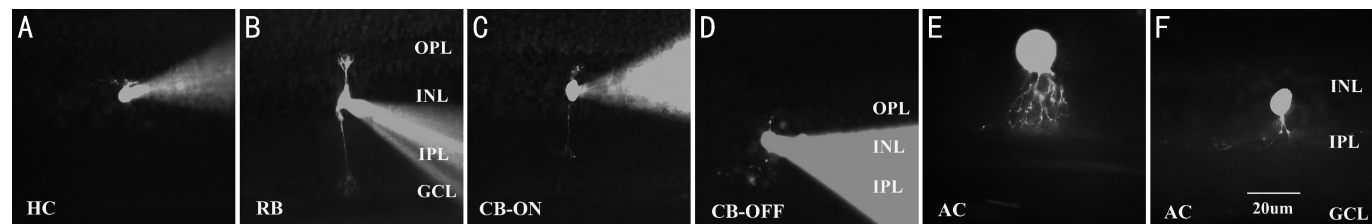


图2 完成膜片钳全细胞记录以后,在荧光显微镜下观察内核层神经元的形态 A:水平细胞;B:视杆双极细胞;C:ON型视锥双极细胞;D:OFF型视锥双极细胞;E,F:无长突细胞。

表1 内核层神经元的被动膜学特性

指标	水平细胞组 (n=7)	视杆双极细胞组 (n=15)	视锥双极细胞组 (n=12)	无长突细胞组 (n=17)	F	P
RMP (mV)	-51.2 ± 4.25 ^a	-47.3 ± 2.76	-42.3 ± 5.53	-59.8 ± 3.15 ^c	2.814	0.032
IR (MΩ)	296 ± 17.8	317 ± 40.3	303 ± 24.5	341 ± 24.1	7.98	0.762
Cm (pF)	35.6 ± 4.79 ^a	28.5 ± 6.12	25.7 ± 3.26	39.3 ± 1.37 ^c	3.54	0.042

注:RMP:静息膜电位;IR:膜输入阻抗;Cm:膜电容。^aP<0.05 vs 视杆双极细胞;^cP<0.05 vs 视锥双极细胞。

(7/12)和部分无长突细胞(6/17)只表达外向钾电流。钳制电位+40mV时,前三类细胞外向钾电流的峰值分别为 820.5 ± 137.4 pA (n=7) (图3A)、648.7 ± 98.3 pA (n=15) (图3B)、672.3 ± 11.5 pA (n=7) (图3C),而无长突细胞的外向钾电流峰值较大可达 2614.5 ± 275.1 pA (n=6) (图3E)。41.7%视锥双极细胞(5/12) (图3D)和64.7%无长突细胞(11/17) (图3F)在同上的步阶电压刺激下,同时表现出外向钾电流和内向钠电流。视锥双极细胞内向电流的峰值为-252.9 ± 48.6 pA (n=5) (图3D),而无长突细胞内向电流峰值达-414.7 ± 73.2 pA (n=11) (图3F)。

3 讨论

以往制作视网膜切片的方法包括滤纸贴附手工切片和简易组织切片机制片^[6]。这两种切片方法也存在以下缺点:(1)可控性和重复性差。(2)刀片直接切割对细胞损伤大。本实验中借用脑片膜片钳实验中振动切片机制片的方法,将视网膜用低熔点琼脂包埋成块,然后振动切片机制成150~200μm的薄片。该方法与上述两种方法比较,制作的视网膜切片切面平整、各层细胞胞体圆滑有光泽,部分细胞的突起隐约可见,且能够初步判断细胞的种类。

Euler等^[7]根据胞体的位置、轴突形态以及轴突末端的位置将大鼠视网膜双极细胞分为10种类型,包括1种视杆双极细胞和9种视锥双极细胞。Golgi镀银染色和免疫组化染色^[8-9]表明视杆双极细胞胞体大多位于内核层靠近外丛状层的部位,轴突较长,深达内丛状层的最内层,末端呈瘤样膨大。内丛状层平均分为五等分,靠近内

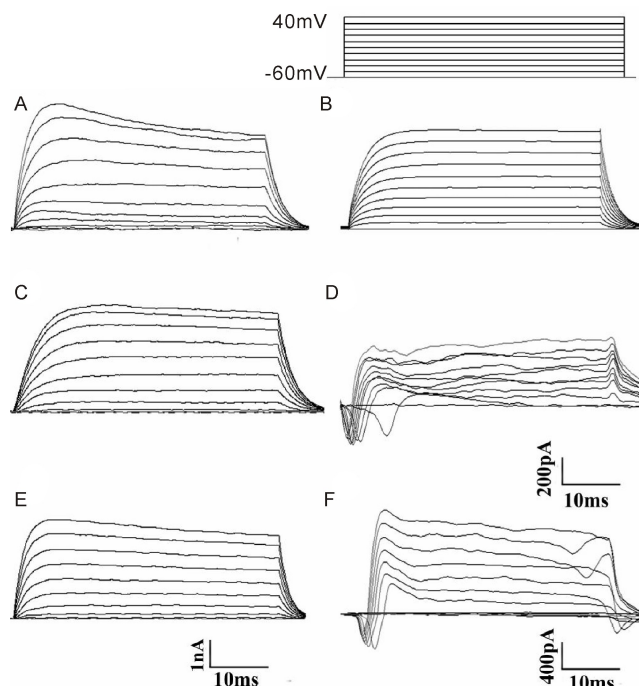


图3 电压钳模式下内核层神经元全细胞电流比较 A:水平细胞;B:视杆双极细胞;C,D:视锥双极细胞;E,F:无长突细胞的全细胞电压。

核层的两等分被称作a亚层,靠近节细胞层的三等分被称为b亚层,分别对应为ON和OFF亚层,视杆双极细胞的轴突末梢终止于b亚层^[10]。在大多哺乳动物的视网膜

中^[11-12],根据轴突末梢的分支模式和终止的部位划分存在9种视锥双极细胞。其中轴突末梢终止于内丛状层b亚层的属于ON型视锥双极细胞,终止于a亚层的属于OFF型视锥双极细胞。在膜片钳记录的胞内液中加入0.02%荧光黄,记录完毕后观察细胞形态,由于双极细胞的轴突主要沿纵向延伸,在视网膜切片上可根据以上标准进一步鉴定记录细胞所属的亚型。在活性较好的视网膜切片上,双极细胞胞体大多成梭形,视杆双极细胞较视锥双极细胞略大,更靠近外丛状层,有时可见较长的轴突深入内丛状层。

大多数脊椎动物视网膜包含两种基本类型的水平细胞,一种是没有轴突的A型水平细胞,含有相对大而分支少的初级树突,另一种是有轴突的B型水平细胞,有较多的树突。在形态和活性较好的视网膜切片上,根据水平细胞位于INL最外层的特点,不难找到水平细胞,但是由于该类细胞的突起只在OPL内横向延伸,故难以在切片上进一步区分A型和B型水平细胞。无长突细胞的分型更为复杂^[13-14],在视网膜切片上难以确切区分其亚型,必须结合免疫组化染色和铺片中的形态来进一步区分。在本实验活性较好的视网膜切片上,水平细胞和无长突细胞胞体较大,呈圆形或椭圆形,前者位于INL的最外层,后者位于INL的最内层。在实验中对INL-无长突细胞记录完毕观察形态时,发现节细胞层有一细胞着色,且可见二者之间的突起联系,这更进一步说明该切片方法在较大程度上保留了细胞之间的突起联系,更接近生理状态。与脑片不同,由于视网膜组织疏松,有些细胞胞体较小,全细胞记录完毕后移走电极通常会把细胞带走,电极保持原位稍影响细胞形态的观察。

在INL神经元中,无长突细胞和水平细胞的RMP和Cm与两种双极细胞有显著差异;而视锥和视杆双极细胞的RMP和Cm没有显著差异。Cm的大小与细胞膜表面积(包括内陷折叠部分)成正比,无长突细胞和水平细胞Cm值较大,这与这两种细胞胞体较大相一致。两种双极细胞在形态和细胞大小方面都比较接近,所以它们的RMP和Cm值接近。INL神经元在时程40ms,步阶10mV从-60mV至+40mV的电压刺激下,水平细胞和视杆双极细胞仅表现出外向钾电流。而41.7%的视锥双极细胞和64.7%的无长突细胞同时表现出内向电流和外向电流。对不同种属动物视网膜水平细胞的研究发现,一种独特的内向整流钾通道可作为水平细胞的电生理标志^[15-16],该电流由超极化电压所诱发,本实验中只设计了去极化电压故未能观察到该标志性电流。电压门控钠通道通常表达于以动作电位作为信号传递方式的神经细胞,而本实验发现在去极化电压刺激下,部分视锥双极细胞和无长突细胞表现出内向电流。这与Pan等^[17]对视锥双极细胞电压门控通道的研究结果一致。越来越多的研究发现,无长突细胞虽然是中间神经元,但是注入电流使其去极化通常能诱发出尖峰样的位电反应(spike-like potential)^[18],本实验中观察到的电压门控的内向电流可能参与该尖峰样电位反应的产生。

本文所采用的方法制作的视网膜切片切面平整、细胞活性好,根据胞体大小、位置等可初步辨认包括水平细胞

在内的各种细胞,便于进行膜片钳全细胞记录。且该方法制作的切片较大程度的保留了细胞之间的突起联系,可用于研究内层细胞的突触后反应和对光反应等。INL的水平细胞、视杆双极细胞、视锥双极细胞和无长突细胞,同为中间神经元,形态和电生理学特性却各异。进一步研究这些细胞的离子通道表达和动力学特征,有助于揭示视网膜信息处理的机制。

参考文献

- Gao L, Han J, Bai J, *et al.* Nicotinic Acetylcholine Receptors are Associated with Ketamine-induced Neuronal Apoptosis in the Developing Rat Retina. *Neuroscience* 2018;376:1-12
- Vielma AH, Schmachtenberg O. Electrophysiological fingerprints of OFF bipolar cells in rat retina. *Sci Rep* 2016;6:30259
- Elgueta C, Leroy F, Vielma AH, *et al.* Electrical coupling between A17 cells enhances reciprocal inhibitory feedback to rod bipolar cells. *Sci Rep* 2018;8:3123
- Sun Y, Jiang XD, Liu X, *et al.* Synaptic contribution of Ca²⁺-permeable and Ca²⁺-impermeable AMPA receptors on isolated carp retinal horizontal cells and their modulation by Zn²⁺. *Brain Res* 2010;1317:60-68
- Kreitzer MA, Birnbaum AD, Qian H, *et al.* Pharmacological characterization, localization, and regulation of ionotropic glutamate receptors in skate horizontal cells. *Vis Neurosci* 2009;26(4):375-387
- Connaughton VP. Zebrafish retinal slice preparation. *Methods Cell Sci* 2003;25(1-2):49-58
- Euler T, Haverkamp S, Schubert T, *et al.* Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 2014;15(8):507-519
- Hellmer CB, Ichinose T. Functional and Morphological Analysis of OFF Bipolar Cells. *Methods Mol Biol* 2018;1753:217-233
- Rogerson LE, Behrens C, Euler T, *et al.* Connectomics of synaptic microcircuits: lessons from the outer retina. *J Physiol* 2017;595(16):5517-5524
- Chalupa LM, Gunhan E. Development of On and Off retinal pathways and retinogeniculate projections. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(1):31-51
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, *et al.* Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 2004;469(1):70-82
- Pignatelli V, Strettoi E. Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol* 2004;476(3):254-266
- Ray TA, Roy S, Kozlowski C, *et al.* Formation of retinal direction-selective circuitry initiated by starburst amacrine cell homotypic contact. *Elife* 2018;7:e34241
- Diamond JS. Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. *Annu Rev Vis Sci* 2017;3:1-24
- Vila A, Whitaker CM, O'Brien J. Membrane-associated guanylate kinase scaffolds organize a horizontal cell synaptic complex restricted to invaginating contacts with photoreceptors. *J Comp Neurol* 2017;525(4):850-867
- Masland RH. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(4):431-436
- Pan ZH, Hu HJ. Voltage-dependent Na(+) currents in mammalian retinal cone bipolar cells. *J Neurophysiol* 2000;84(5):2564-2571
- Boos R, Schneider H, Wässle H. Voltage- and transmitter-gated currents of all-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci* 1993;13(7):2874-2888