

合时的具体作用和卵母细胞的激活机理, fertilin 在顶体反应时是否具有结构上的变化以及  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的糖基在受精时是否具有作用等。

## 摘 要

精子头后部(或赤道区)表面 fertilin 糖蛋白由相关的两个跨膜亚基  $\alpha$  和  $\beta$  构成异二体形式。这两个亚基前体均含有金属蛋白酶区(metalloprotease domain)和整联蛋白配体区(disintegrin domain),属于 ADAMs gene 家族。 $\alpha$  和  $\beta$  前体分别在睾丸和附睾中从上述两区域连接处水解后,得到成熟型亚基。受精时,穿过透明带的顶体反应后精子借助  $\beta$  亚基的 disintegrin 肽段与卵母细胞表面的整联蛋白结合,同时 fertilin 结构发生变化,暴露出  $\alpha$  亚基上潜在的融合肽段(90-111aa),并介导精子与卵母细胞发生质膜融合,最终完成受精过程。

## 参 考 文 献

- [1] Myles DG & P Primakoff. 1997. *Biol Reprod.* 56:320-327.
- [2] Primakoff P. et al., 1987, *J Cell Biol.* 104:141-149.
- [3] Blobel CP. et al., 1992, *Nature.* 356:248-252.
- [4] Myles DG. 1993, *Dev. Biol.* 158:35-45.
- [5] Yanagimachi R. 1994, In *Physiology of Reproduction*. Ed. By Knobil E. & JD Neill. pp. 189-317. Raven Press. New York.
- [6] Evans JP et al., 1995, *J Cell Biol.* 108: 3267-3278.
- [7] Evans JP et al., 1997, *Dev. Biol.*, 187:79-93.
- [8] Evans JP et al., 1997, *Dev. Biol.* 187:94-106.
- [9] Arts EGJM et al., 1997, *Biochem J.* 325: 191-198.
- [10] Diza-Perez E & S Meizel. 1992, *Mol Reprod Dev.* 31:122-130.
- [11] Yuan RY et al., 1997, *J Cell Biol.* 137:105-112.
- [12] Wolfsberg TG et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:10783-10787.
- [13] Wolfsberg TG et al., 1995, *Dev. Biol.* 169:378-383.
- [14] Cowan AE & DG Myles. 1993, *Dev. Biol.* 155:124-133.
- [15] Hunnicutt GR. et al., 1997, *Dev. Biol.* 191:146-159.
- [16] Lum L & Blobel CP 1997, *Dev. Biol.* 191: 131-145.
- [17] Waters SI & JM White. 1997, *Biol Reprod.* 56:1245-1254.
- [18] White JM et al., 1992, *Science.* 258:917-924.
- [19] Rooke J et al., 1996, *Science* 273:1227-1231.
- [20] Perry AC et al., 1994, *Biochem Biophys Acta.* 1207:134-137.
- [21] Cho C et al., 1996, *Genomics.* 34: 413-417.
- [22] Hynes RO et al., 1992, *Cell.* 69:11-25.
- [23] Wolfsberg TG et al., 1995, *J Cell Biol.* 131:(2)275-278.
- [24] Takako Yagami-Hiromasa et al. 1995, *Nature*, 377:652-656.
- [25] Myles DG. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4195-4198.
- [26] Almeida ECA. et al., 1995, *Cell.* 81:1095-1104.
- [27] Sutherland AE et al., 1993, *Development.* 119:1175-1186.
- [28] Muga A et al., 1996, *Biochemistry.* 33: 4444-4448.
- [29] Martin I & JM Ruyschaert. 1997, *FEBS Lett.* 405:351-355.
- [30] Perry ACF et al., 1996, *Biochem.* 307:843-850.

## 用示踪技术研究视神经再生细胞学的新进展

王子仁

(兰州大学生物系 兰州 730000)

鱼类和两栖类成年动物的视神经,作为中枢神经的一部分(来源于胚胎的神经管),已被

电生理学和解剖学的实验证明具有再生的能力<sup>[1,2]</sup>。当其视神经被损伤后,经过 3 至 6 个

月,视神经可再生回到其靶组织——顶盖,形成与正常动物一样的视网膜—顶盖投射。由于鱼类取材方便,易于饲养和繁殖,并且可以在其视网膜和顶盖上进行各种切除和移植手术,所以鱼类的视网膜-顶盖系统已成为研究视神经再生最常用的动物实验模型。

视神经再生中细胞学研究在很大程度上依赖于示踪方法和其他技术的发展。随着神经细胞示踪方法和其他技术的不断发展,结合光镜和电镜技术,对神经细胞整体及其终末的精细结构,神经纤维投射和神经细胞间突触连接构筑的研究更准确翔实,为正常的和再生的视网膜—顶盖投射的形成,中枢神经系统的再生和神经网络的构筑,以及神经功能的研究提供更精确和丰富的基础理论知识。

### 一、视神经再生细胞学研究的简短历史回顾

自从 Sperry 于 1944 年用电生理学的方法证明鱼类的视神经具有再生的能力后,对视神经再生的细胞学研究相继开展。放射自显影的示踪方法很快被用于金鱼视神经再生的研究<sup>[3]</sup>。到本世纪 70 年代,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)被首次用于长距离标记神经元的投射<sup>[4]</sup>,这一方法经不断改良已被广泛地用于神经元的顺行和逆行标记,它既可用于光镜,也可用于电镜研究,为神经细胞超微结构的研究提供了极大的帮助。辣根过氧化物酶示踪技术也很快被直接地和间接地结合免疫组织化学方法用于视神经再生中视网膜—顶盖投射的研究<sup>[5]</sup>。早期的形态学研究纠正了电生理学提出的再生从一开始就遵循正常的视网膜—顶盖投射进行的观点,证明视神经再生的过程与发育的过程相似,分为早期视神经纤维的过度增生和晚期的精确化两个时期,在再生早期有相当一部分神经纤维是沿着错误的路径投射到顶盖上。在晚期的精确化过程中,分布于错误路径和区域的神经纤维消失,形成正常的视网膜—顶盖投射。

上述的方法尽管至今仍被使用,但在同时满足神经细胞学多种研究的需要时都存在一定的局限性。如在同一实验材料中既要研究固定的组织,同时又要研究活体内或组织细胞培养中活的神经细胞;既要研究整装的组织或器官中神经细胞的全貌,同时又要研究切片标本中神经细胞的显微和亚显微结构。而上述方法往往仅能同时完成其中的一两项。

### 二、DiI 及其同族示踪物

在 80 年代中期,一种长链亲脂类的碳花青(carbocyanine)荧光染料 DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate)被首次报道用于神经细胞学的研究。此后其同族示踪物 DiO, DiS 等也相继被研制出来,并很快被应用于神经细胞学的研究。它们的基本化学结构如下图所示(图 1)。

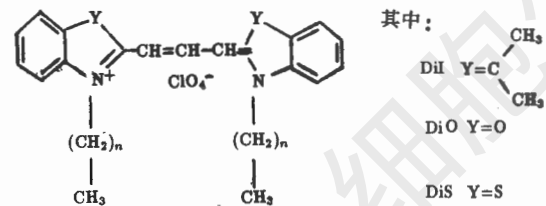


图 1 碳花青染料的化学结构,其中  $n=17$ 。Y 位置的基团决定染料的类型(DiI, DiO 和 DiS)

这些碳花青染料(DiI, DiO 和 DiS)在标记神经细胞中具有的共同特点是:(1)它们标记细胞质膜,对体外培养的神经细胞能明亮地标记细胞体和细长的突起,对生长的神经突起末端生长锥(growth cones)具有的板状伪足和丝状伪足等最精细的结构都能清楚地显示出来。(2)在活体内和已固定的组织中进行顺行和逆行标记,向细胞体注射染料可顺行标记到离细胞体较远的神经细胞突起;也可向细胞突起注射染料经较长距离逆行地标记细胞体。(3)标记物只沿细胞质膜扩展,而不会扩散到相邻的神经细胞。这一点在神经细胞学的研究中极为重要,因为这样就可以显示出单个神经细胞

的形态和传导途径。(4)与其他荧光染料相比,它们可以较长时间保持荧光,组织培养的神经细胞荧光至少可以保持两周,在三周半后标记的荧光减弱成为不可检测的<sup>[6]</sup>。但也有报道,DiI在成体的神经系统中作为一种活体的逆行标记物可保持荧光长达九个月之久<sup>[7]</sup>。

标记已固定的组织与标记活细胞相比,在同样的组织中标记相同的距离所需的时间要长得得多。例如DiI在活体中标记移动速度每天可达6mm,标记四天可以延长到2—3cm。而在已固定的组织中标记相同的距离则需要数周,数月或更长的时间。最近已研制出快速DiI(fast DiI),它在已固定的组织中标记的速度大大加快,原来需要数月才能标记的材料,现在仅需数周即可;但是与活体内标记相比其速度仍然较慢。在已固定的组织中进行标记也具有一定的优点,因为已固定的组织可以保持足够长的时期,可以保证染料标记移动所需的时间,这样就能标记一些处于组织深处的,通常不易直接染色的神经细胞和纤维。另外,在已固定的组织中即使标记很长时间也不会象在活体中那样,由于细胞的作用而内化(internailization),形成一些颗粒而使图像变模糊。在已固定的组织中标记的神经细胞及其突起可以一直保持清晰均一的细胞膜的标记形式。

### 三、DiI类示踪物在视神经再生细胞学研究中的应用

#### 1. 用DiI标记对视神经再生进行更精确的形态学研究

过去用辣根过氧化物酶(HRP)标记早期再生的视神经纤维,通常将染料颗粒放置在视神经中,标记的神经纤维数量较多。由于在视神经损伤位点处发生出芽生长,神经纤维数量增加4—5倍,在顶盖上标记的神经纤维数量大大增加,因此不易分辨单个的神经纤维及其分支。即使用显微注射标记,因标记的神经纤维呈黑色,反差小,不利于观察。

DiI及其同族示踪物通常可溶于纯酒精,

二甲亚砜(DMSO)或其混合物,也可溶于二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)。这种溶液可以象HRP那样直接注射标记,也可将其结晶的染料颗粒放置于组织中标记。我们借助显微微量注射器,每次仅注射1—2nl的染料溶液,这样就可保证标记少数或单个的神经细胞或纤维,可以精确地观察正常的神经纤维在顶盖投射的分布及其终末分支的形态学,特别有利于观察早期再生的视神经纤维在顶盖上的分布。

#### (1) 金鱼正常视神经纤维的形态学研究

主要发现标记的相邻视网膜神经节细胞的轴突(视神经纤维),在顶盖上投射的终末分支相互重叠<sup>[8]</sup>,虽然目前对这种重叠现象与视觉功能之间有什么关系尚不清楚,但是根据生物的结构与功能的关系,可以肯定这种特殊的形态结构与视觉功能之间存在某种联系。另外,用DiI标记的神经纤维的分布路径,投射的位置,终末分支的大小和形态学与其他标记方法所得的结果完全一样。

#### (2) 金鱼视神经再生过程的细胞学研究

在再生早期由于损伤位点处发生出芽生长,神经纤维数量增加,已往的研究认为在前三个月增加了四倍。现在通过DiI标记后,在顶盖的特定区域定量统计结果表明,在六周前再生的神经纤维数量逐渐增多,在第六周最多,增加了4.2倍,此后逐渐减少。表明增加的再生纤维生长速度不同,消失的速度也不同。过去认为,在损伤视神经六周后,视神经纤维经过精确化过程,逐渐形成正常的视网膜-顶盖投射。DiI标记的研究发现,在再生早期,视神经纤维形成的分支的大小(前后轴×背腹轴)较大,主要是近侧端出现探测性侧支。此后因为近侧端的分支逐渐减少,远侧端的分支增多,视神经纤维分支的大小逐渐缩小,变为正常。因此认为在视神经再生早期就存在一种修整的过程,即在再生的视神经纤维到达顶盖后其细胞学形态就开始不断的进行调整。

在再生的晚期,到达顶盖靶区的相邻视神

经纤维的树状分支相互重叠,这一现象是依赖神经传入活性的<sup>[9]</sup>。当用河豚毒素(TTX,钙离子通道的特异阻断剂)处理后,树状分支相互重叠的现象消失,彼此分离。这说明树状分支重叠的结构形成是相邻的神经纤维间相互作用的结果,而这种相互作用又是依赖神经传入活性的。经过 TTX 处理后,再生的视神经纤维的数量较正常再生的情况有所减少,最后形成的树状分支的形态学变得较简单。这表明视网膜—顶盖投射的精确化也是依赖神经传入活性的。

上述研究<sup>[8,9]</sup>同时发现,未到达顶盖靶区,或到达顶盖靶区而未形成终末分支的再生视神经纤维将消失;而到达顶盖靶区并形成树状终末分支的再生视神经纤维最终被保留下来,即使通过不正确的路径到达的也是如此。这表明正确的视网膜-顶盖投射的形成对靶组织的依赖性。

## 2. 结合不同仪器设备和技术研究视神经再生

(1) 双标记 用 DiI 和 DiO 标记的神经细胞及其纤维,当选用合适的荧光素滤光片(如 FITC Zeiss 487709)用荧光显微镜观察时,DiI 和 DiO 分别呈现黄色和绿色。因此可以分别用 DiI 和 DiO 标记分布于不同组织或同一组织不同部位的神经细胞,观察它们在同一靶组织投射图形的分布情况。如在斑马鱼视网膜的不同部位分别用 DiI 和 DiO 标记神经节细胞,观察在发育过程中视神经纤维在同一个视神经,视束和靶组织顶盖中投射分布的情况<sup>[10]</sup>。结果发现,DiO 标记的,绿色荧光的鼻腹侧视网膜神经节细胞的轴突通过视束的背侧支进入顶盖,终止于顶盖的背侧区;而 DiI 标记的,黄色荧光的颞背侧神经节细胞的轴突通过视束腹侧支进入顶盖,终止于顶盖的腹前侧区。在同一顶盖上,绿色荧光标记的神经纤维穿过黄色荧光标记的神经纤维分支占据的前半区顶盖,进入顶盖后半部形成分支。另外,如果切除金鱼的一侧的顶盖后,两个视网膜的神经节细胞的轴突将共同投射到剩余的一个顶盖上,

这时可分别用 DiI 和 DiO 标记两个视网膜相同或不同部位的神经节细胞,观察它们在一个顶盖上投射的分布情况。也可用逆行标记的方法,标记投射于不同靶组织中的神经纤维,追溯它们起源于同一组织或器官内的神经细胞的分布;或标记分布于不同组织的神经细胞,观察它们在同一靶组织上终末树状分支的分布。

(2) 活体内再生的视神经纤维动态的(dynamic)研究 用显微微量注射 DiI 标记金鱼视网膜腹侧的神经节细胞,经过一段时间,待染料顺行标记到顶盖背侧上的神经终末时,将鱼麻醉,打开头骨暴露顶盖,清除其上的脂肪和液体,在顶盖的上方滴加硬骨鱼类 Ringer's 液,用盖玻片覆盖顶盖,在荧光显微镜下观察神经纤维的动态变化。为了进行较长时间的观察,除了用湿纱布包裹鱼的身体并固定于支架上外,还通过小水泵将含有微量麻醉剂的缓冲液入嘴经鳃流出不断循环,使鱼保持安定。间隔不同时间,30—60 分钟,观察拍照,曝光时间 10—20 秒。这样可观察同一部位长达 8 小时之久<sup>[11]</sup>。在荧光显微镜上配备一种制冷的 CCD 照相机,以便取得数字化的图象,可在计算机中储存和分析。结果发现,在正常鱼中没有终末分支的修整,但可见到沿神经纤维的静脉曲张(varicosities)样的运动;在损伤视神经后 2—6 周后,再生的视神经纤维经历了动态的结构变化,包括分支的修整,生长锥的伸展和收缩,也发现沿神经纤维的静脉曲张样运动。

另外,利用激光扫描共焦显微镜的优越性,进行不同剖面的扫描,将信息储存在计算机中进行三维立体的动态研究。结合用依赖钙/调钙蛋白的蛋白激酶 I (calcium/calmodulin-dependent protein kinase I, CaMK I) 处理突触后视顶盖的神经元,研究通过调节突触活性如何控制神经元的生长<sup>[12]</sup>。实验通过定量分析终末分支形态学的动态变化证明,提高突触后 CaMK I 的活性,通过增加分支收缩的比率,阻止了终末树状分支复杂性的发育,提示突触后的 CaMK I 在控制突触前神经纤维的终末

树状分支结构的发育中起一种作用。

上述方法也可用于研究已标记的,培养中的神经细胞的突起及其顶端的生长锥的动态的变化。通过缩时摄影或录像机可以较长时间地观察记录。

(3) 光转换(photoconversion) 通常荧光标记的材料不能用于电镜观察,因而在神经细胞学的研究中存在一定的局限性。DiI 标记的神经组织,经过光转换的方法,可将荧光标记转换为棕色的,具电子密度的二氨基苯胺(di-aminobenzidine, DAB)产物,直接用于光镜和电镜观察<sup>[13]</sup>。通常将荧光标记的组织进行切片,切片置于明胶覆盖的载玻片上。为了增强DAB的穿透性,首先将切片于4℃暗处在1.5-2.0mg DAB/ml Tris-HCl 缓冲液(pH=7.6)中预先放置15-60分钟。然后将载玻片置于配有100瓦水银照明灯和罗丹明滤光片的荧光显微镜下,通过×15或×20的物镜直接照射切片中含荧光标记的区域,用一滴新鲜,冷的2.0mg DAB/ml Tris-HCl 缓冲液置换旧的DAB缓冲液,此后每隔15分钟置换一次DAB缓冲液,同时重新进行聚焦,持续照射30-120分钟,直到在显微镜下可见到棕色的DAB产物为止。最后用琉堇对染,用蒸馏水冲洗干净。进行光镜观察则经脱水,包埋,薄切片后进行观察研究;对于电镜观察,切片需经饿酸重固定,磷酸缓冲液冲洗三次,经常规脱水和树脂Epon 812包埋,经常规染色或不染色进行观察。这样不但可以观察分析标记的神经细胞体和神经突起,而且可以标记到神经细胞内部的细胞器,如内质网和邻近线粒体的微体结构。

DiI 标记的神经组织经光转换还可以结合胶体金技术进行免疫细胞化学的研究。

DiI 类荧光染料通过上述方法可对同一神经组织的细胞进行综合的研究,既可同时进行体内和体外结合的研究,也可同时进行整体的和显微及亚显微结构的细胞学研究。总之,神经细胞学的研究是随着细胞标记物和标记技术的发展而不断深入的。由上述可见 DiI 及其同族标记物结合各种现代生物学的研究技术,在神经细胞学的研究中具有广泛的应用前景,将推动神经细胞学研究的深入发展。

### 参 考 文 献

- [1] Sperry, R. W. 1944, *J. Neurophysiol.*, 7: 57-69.
- [2] Gaze, R. M. 1959, *Q. J. Exp. Physiol.*, 44:290-308.
- [3] Meyer, R. L. 1980, *J. Comp. Neurol.*, 189:273-289.
- [4] Kristensson, K. et al., 1971, *Brain Res.*, 29:363-365.
- [5] Meyer, R. L. et al., 1985, *J. Comp. Neurol.*, 239:27-43.
- [6] Honig, M. G. et al., 1989, *TINS*, 12: 333-341.
- [7] Vidal-Sanz, M. et al., 1988, *Exp. Neurol.*, 102:92-101.
- [8] 王子仁, R. L. Meyer, 1994, *实验生物学报*, 27(2):143-151.
- [9] 王子仁, R. L. 麦耶 1995, *动物学报*, 41(3):291-298.
- [10] Stuermer, C. A. O. et al., 1990, *J. Neurosci.*, 10:3615-3626.
- [11] Danks, A. M. et al., 1994, *J. Comp. Neurol.*, 345:253-266.
- [12] Zou Dong-jing and H. T. Cline, 1996, *Neuron*, 16:529-539.
- [13] Von Bartheld C. S. et al., 1990, *J. Histochem. Cytochem.*, 38(5):725-733.

## 叶绿体遗传转化的研究

范国昌 张中林\*

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

植物细胞中,遗传物质存在于这三个细胞器:细胞核、叶绿体和线粒体。向细胞核中导入外源基因的技术,已经非常普遍的应用于作物

沈桂芳

(中国农科院生物技术研究中心 北京 100081)

改良的基因工程和植物分子生物学的研究及实

\*浙江大学生物科学与技术系博士研究生