

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.02.003

新型视网膜神经节细胞光感受器 参与介导光对多巴胺能无长突细胞活动的调节

张道启

(美国奥克兰大学眼科研究所)

张道启,博士,毕业于中国科学院上海生理研究所;后在美国肯塔基大学生理系做博士后研究工作。曾任济宁医学院生理教研室助教、讲师和美国范德堡大学生物系助理研究员。现任美国奥克兰大学眼科研究所助理教授。研究方向:视网膜神经元及其突触可塑性。

摘要 多巴胺是中枢神经系统中重要的一种神经递质,它参与包括感觉、运动和其它高级脑行为活动的形成和调节;因此,多巴胺的缺乏会导致多种神经系统疾病如巴金森氏综合症和老年痴呆,但是,有关多巴胺释放调节的机制仍然不清楚。释放多巴胺的神经元分布在几个脑区,在这些脑区中,视网膜是研究多巴胺神经元最容易入手的部位。视网膜多巴胺神经元属于一种特殊的无长突细胞,它的多巴胺的释放受外界光和机体内生物钟的调节。借助转基因技术和膜片钳电生理学方法,我们最近几年深入研究了光和生物钟对视网膜多巴胺神经元功能活动调节的机制,其中包括发现了光通过激活新型的黑素视蛋白神经节细胞光感受器来调节视网膜多巴胺细胞的活动。这些进展对我们了解多巴胺和多巴胺神经元的生物学特性及其在疾病的作用具有重要的参考价值。

关键词 视网膜;多巴胺;神经元;生物钟;黑素视蛋白;膜片钳

中图分类号: R339.14 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)04-093-05

Melanopsin ganglion cells mediate light regulation of dopaminergic cell activity in the mammalian retina

ZHANG Dao-Qi

(Eye Research Institute, Oakland University, Rochester, MI 48309, USA)

Abstract: Dopamine is a key neurotransmitter in the CNS and plays vital roles in sensory, motor control, cognition, and motivation. As a result, dopamine deficiency leads to a variety of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. The most accessible dopaminergic neurons of the CNS are located in the vertebrate retina. These neurons are a specialized subpopulation of amacrine cells. It is well known that dopamine release from retinal dopaminergic neurons is regulated by light and biological circadian clock; however, the mechanisms involved are poorly understood. We have sought to understand these mechanisms by taking advantage of genetic approach in combination with patch clamp technique. In particular, we have discovered that light regulates activity of retinal dopaminergic cell through activation of recently discovered melanopsin ganglion cells. The findings reviewed here have provided valuable information for understanding the role of dopamine and neurobiology of dopaminergic neurons in normal and diseased states.

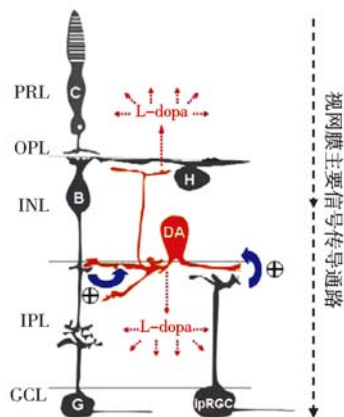
Key words: Retina; Dopamine; Melanopsin; Neuron; Biological circadian clock; Patch clamp

众所周知,视网膜是我们机体中唯一的感光组织;从发育上讲,它属于脑的一部分,因此,对视网膜神经元的结构和功能的研究必将为我们了解脑高级活动的神经机制提供有意义的资料。

视网膜多巴胺神经元是一类特殊的无长突细

胞;与其它无长突细胞不同的是,它们的树突除在内网状层形成神经网络以外,还发出轴突样突起,这些突起穿过内核层后在外网状层分支也形成神经网络(图1),这一由内向外纵行的神经束构成视网膜负反馈神经通路,它将来自视杆和视锥光感受

器的信号通过多巴胺释放从视网膜内部回传到外部。这样,释放后的多巴胺在外、内视网膜经细胞间隙扩散到视网膜的各个部位,作用于几乎所有的神经元及其通路来调节视网膜明、暗适应和控制视网膜生物节律(图1)^[1]。



PRL, 光感受器层;OPL, 外网状层;INL, 内核层;IPL, 内网状层;GCL, 神经节细胞层;C, 视锥细胞;B, 双极细胞;H, 水平细胞;DA, 多巴胺能无长突细胞;G, 神经节细胞;ipRGC, 黑素视蛋白神经节细胞;L-dopa, 多巴胺。

图1 视网膜多巴胺细胞的功能输入和输出示意图

视网膜多巴胺的释放受外界光的影响,即在光照时浓度增加、光暗时减少。我们最近发现,光至少通过两条视网膜神经通路来调节多巴胺的释放;其一是光刺激视杆和视锥光感受器,光感受器产生的电信号经双极细胞进而激活多巴胺细胞;其二是光刺激一类新型的光感受器,这类感受器是一亚类神经节细胞,它们表达光敏感的视蛋白叫黑素视蛋白(melanopsin)^[2],黑素视蛋白将光信号转化为电信号然后通过直接的突触联系激活多巴胺细胞。除此以外,视网膜多巴胺的浓度还受昼夜节律的影响,表现在白天高、夜间低,我们也发现多巴胺细胞表达必需的生物钟基因来控制多巴胺的节律性释放。需要说明的是,以上研究工作已经发表在不同的国际期刊上^[3-7],本文只对它们做一简单概括的介绍;为便于叙述,特制作5幅插图,这些图均为第一次发表。

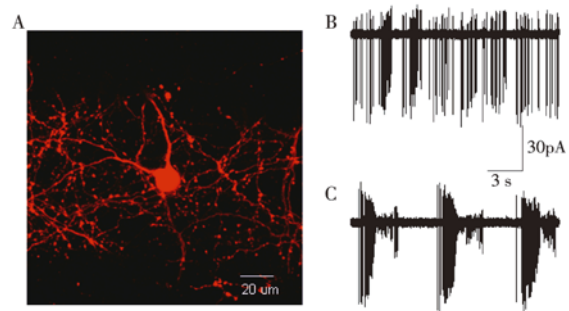
1 转基因动物模型的建立和视网膜多巴胺细胞的膜片钳电生理记录

在整个视网膜中只有约500个多巴胺能无长突细胞,占无长突细胞总数的0.5%,这么小的比例,在正常情况下无法将它们从其它无长突细胞中区分开来,进行电生理学记录。要想达到这一目的,理想的方法是采用转基因技术标记这类细胞。然

后用标记的细胞直接研究光和生物节律对它们生理活动的影响。有鉴于此,我们建立了荧光标记多巴胺神经元的转基因小鼠模型^[4]。在这个模型中,90%的视网膜多巴胺细胞表达红色荧光蛋白(图2A)。我们将分离的视网膜转移到灌流的标本槽,首先在荧光显微镜下利用红色荧光找到荧光标记的细胞,然后转换为红外光,在红外光下进行膜片钳电生理记录。根据不同的目的,我们分别采用细胞外和全细胞膜片钳记录^[3,5];前者主要是在不影响细胞内环境的情况下记录细胞的放电活动(动作电位);后者除记录细胞放电活动外还可研究细胞的突触电位和细胞膜的离子通道电流。

2 视网膜多巴胺细胞的自发放电

和其它部位的脑神经元一样,视网膜多巴胺神经元在没有刺激的情况下也产生自发放电^[5],放电形式表现为单个和簇状放电混合型(图2B)。这就是说,在暗中没有外界刺激的情况下,多巴胺细胞有能力释放多巴胺。那么,多巴胺细胞的自发放电是不是受其它细胞突触传入的影响?为了回答这一问题,我们施加了兴奋性和抑制性突触神经递质受体的阻断剂,发现它们将混合型的自发放电置换为以簇状放电为主的放电形式。换句话说,在正常情况下,其它神经元来的突触传入抑制了自发性簇状放电^[5]。图2C进一步证实了这一结论,我们看到,这一细胞在暗产生单个和簇状混合型自发放电;但是,在我们施加了钙通道离子阻断剂镉离子后,其放电形式由混合型转变成簇状型;其原因是镉离子阻断了突触前末梢上的钙通道,进而抑制了突触前神经递质的释放,结果是降低了对自发放电的抑制,因此,自发放电显示了它原有的内源性特征即簇状放电形式。目前我们正在致力于研究这一内源放电形式产生的离子机制。



A: 红色荧光标记的多巴胺细胞胞体和它的突起。B: 多巴胺细胞在暗中的自发放电。C: 钙离子阻断B图中的单个自发放电。

图2 荧光标记的多巴胺神经元和它们的自发放电

3 视网膜多巴胺细胞显示瞬变和持续两种不同的光反应

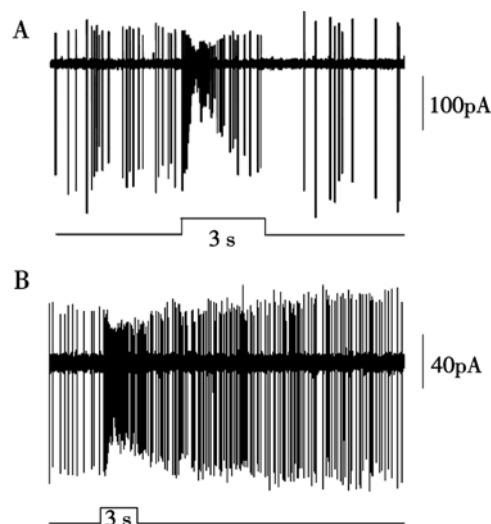
在自发放电的基础上,光照可以增加多巴胺细胞的放电频率^[5]。图 3A 显示,给予 3s 525nm 的闪光,细胞的放电数目迅速增加;但是,这种增加只反应在给光的一瞬间,随着光照时间的延长,放电频率回到基线水平,有时还会减少,因此我们称它为瞬变型细胞^[6]。另外一类的细胞的光反应却不是这样,它也是在给光的瞬间放电频率增加,这种增加在给光的整个过程中维持在一定的高水平,甚至在撤光后还仍然持续一段时间(图 3B),我们称这类细胞叫持续光反应型多巴胺细胞^[3,5]。这一全新的发现提示我们,尽管视网膜多巴胺细胞在形态、大小上无明显差别,但是它们在功能上很有可能不同;具体表现在瞬变型细胞在连续闪光的情况下释放多巴胺,而持续型细胞在背景光下释放多巴胺。如果是这样,它解释了多年来的争端,即有些动物视网膜在连续闪光下多巴胺释放增加;而另外一些动物的视网膜多巴胺水平只对背景光有反应。

4 瞬变型光反应来源于视杆/视锥光感受器

如果经典的视杆和视锥光感受器驱动多巴胺细胞,那么它们的光信号一定经过双极细胞,然后由双极细胞兴奋多巴胺细胞(图 1)。为了探讨这种可能性,我们借用了药理学方法。我们已经知道去极化双极细胞含有代谢型谷氨酸受体,这种受体激活后,该细胞就失去了它们的兴奋性;也就是视杆和视锥细胞的电信号就不能经双极细胞传到多巴胺细胞。因此,我们用代谢型谷氨酸受体激动剂(L-AP4)先激活双极细胞上的代谢型谷氨酸受体,然后再用光刺激视网膜,结果发现,刺激光不能再在多巴胺细胞上产生瞬变型光反应^[5]。这就是说,多巴胺细胞的瞬变光反应是来源于视杆和视锥光感受器细胞。这一研究为光刺激视网膜多巴胺的释放提供了初步的细胞学机制。有趣的是,与瞬变型细胞不同,代谢型谷氨酸受体激动剂不能阻断持续型细胞的光反应,说明持续型多巴胺细胞很少或者不被视杆和视锥光感受器激活^[5]。这一结果引导我们去寻找可以激活持续型多巴胺细胞的光感受器。

5 持续型光反应来源于神经节细胞光感受器

除了视杆和视锥光感受器外,最近在视网膜内发现第三类光感受器细胞,它们是一类视网膜神经



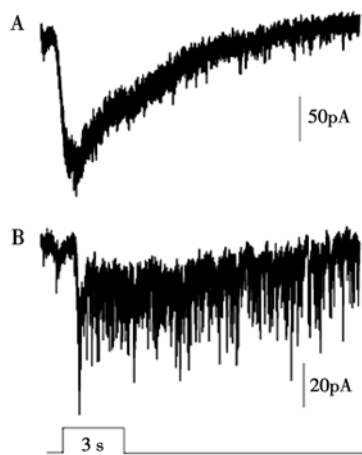
A:多巴胺细胞的瞬变型光反应

B:多巴胺细胞的持续型光反应

每个图下方的矩形符号代表光刺激信号。

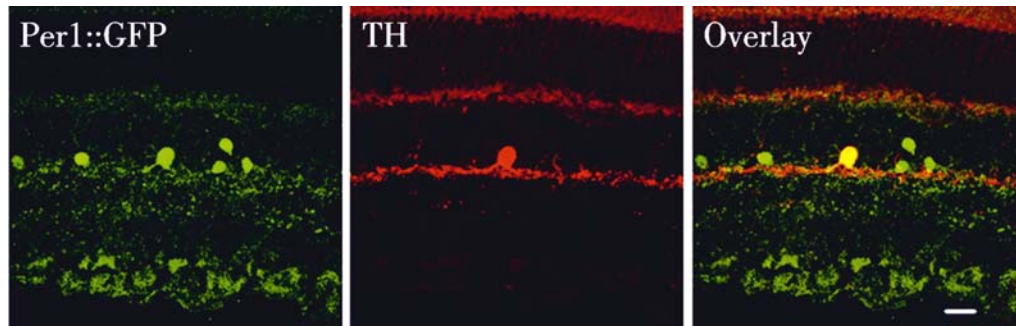
图 3 瞬变和持续光反应型多巴胺细胞

节细胞,这类细胞约占神经节细胞总数的 1%~2%,它们表达吸收光的感光色素黑素蛋白。神经节细胞光感受器对光产生的反应表现为长的潜伏期、持续的去极化、去极化反应在撤光后滞后数秒或达几分钟和最敏感的光波长是 480 nm^[2]。神经节细胞光感受器经视神经束直接投射到下丘脑视交叉上核,控制我们机体的生物钟;它们还投射到顶盖前核,调节我们眼睛的瞳孔对光反射^[8-9]。但是,它们在视网膜内怎么调节视网膜信息的传递一直都不清楚。图 4 是光分别在神经节光感受器(A)和持续型多巴胺细胞(B)上诱导的内向电流。从中我们可以看到,它们对光反应特征非常相似,表现在长的潜伏期和光反应持续在整个光刺激过程和撤光后。这些结果提示了多巴胺细胞接受了神经节细胞光感受器的输入。我们的其它研究进一步证实了这一结论:首先,在光感受器退行性性变的视网膜(视杆和视锥细胞缺失),多巴胺细胞的持续型光反应仍然存在^[3];其次,在敲掉黑素视蛋白基因的视网膜,多巴胺细胞的持续型光反应消失(待发表资料);再者,免疫组织化学显示多巴胺细胞和神经节光感受器有形态上的联系(待发表资料)。所有这些结果提示,神经节细胞光感受器在光照下驱动持续型多巴胺细胞,然后通过多巴胺的释放来调控视网膜的信息传递^[3]。这一新型的视网膜神经通路使我们对视网膜多巴胺的释放和功能有了全新的认识。



A: 神经节细胞上黑素视蛋白的对光反应
B: 多巴胺细胞上黑素视蛋白神经节细胞介导的光反应
图下方的矩形符号代表光刺激信号。

图4 光在黑素视蛋白神经节细胞和持续型多巴胺细胞上诱导的内向电流



左图: Period1 基因驱动的绿色荧光蛋白(Per1-GFP)阳性细胞; 中间图: 多巴胺合成酶(TH)标记的多巴胺细胞;
右图: 前两图重叠(overlay)显示多巴胺细胞表达 Period1 基因。标尺: 20 μm.

图5 Period1 基因在多巴胺细胞内的表达

总之,在过去几年,我们对视网膜多巴胺神经元及其回路进行了详尽的研究。在暗中,多巴胺细胞产生自发性放电,这些放电可以触发少量的多巴胺释放。光照一方面通过传统的神经通路,即视杆和视锥—双极细胞—多巴胺细胞通路,刺激多巴胺释放;另一方面,我们惊喜地发现它还通过一新型的神经节光感受器—多巴胺细胞通路调节多巴胺的释放。除此以外,多巴胺细胞表达生物钟基因,这些基因的昼夜节律变化也参与多巴胺释放的调节。就像一开始提到的,多巴胺细胞构成视网膜负反馈通路,它不仅将视杆和视锥信号由视网膜内部回传到外部;而且还可将视网膜内部神经节光感受器的信息传到外部。释放的多巴胺可作用于视杆和视锥上的 D4 多巴胺受体,调节它们的生物节律;作用于水平细胞上的 D1 受体,抑制水平细胞间的电突触活动,进而调节视网膜中心和周边反

6 视网膜多巴胺细胞表达必要的生物钟基因

除光刺激外,视网膜内源性的生物节律也对多巴胺神经元的活动有调节作用。很重要的一个问题是,控制生物节律的基因是在多巴胺细胞内来直接影响细胞的活动;还是在其他细胞,然后通过信息传递来控制多巴胺神经元的活动^[10]。从这一点出发,我们做了单个细胞反转录聚合酶链反应(RT-PCR)实验,结果发现,大部分多巴胺细胞含有控制生物钟的必需基因,这些基因包括 Period 1 和 2、Cryptochrome 1 和 2、Clock 和 Bmal1^[6]。另外,我们在 Period 1 控制的绿色荧光蛋白转基因动物上发现,Period 1-绿色荧光蛋白表达在视网膜多巴胺细胞内(图 5);而且,它的含量在白天高、夜间低^[7],这一节律变化可能进而控制多巴胺细胞的昼夜节律活动。

应;作用于双极细胞和神经节细胞上的 D1 多巴胺受体,通过调制它们的钠离子通道活动来影响它们的信息传递;作用于无长突细胞上的 D1 多巴胺受体,通过抑制其间的电突触来促使视网膜的暗适应向明适应转换。由此可见,多巴胺作为一重要的神经递质,在介导光和生物钟对视网膜信息传递的调制中起到非常重要的作用。尽管我们取得一些进展,但是还有很多问题尚待解决,比如,神经节细胞光感受器是怎样将信息传递给多巴胺细胞的?瞬变型和持续型多巴胺细胞在形态、生理功能和分子生物学上有何不同?多巴胺细胞内的生物钟基因是怎样控制多巴胺的合成和释放的?我们现在正致力于回答这些问题,希望近期内有一些答案。

志谢:作者由衷地感谢他的同事和合作者对本研究的贡献;部分研究工作得到美国国家卫生研究院的支持。
(下转第 105 页)

mp210~213℃)。

1.2.7 甲磺酸伊马替尼(1)的合成 7(1.20g, 2.43 mmol)溶于 25ml 热乙醇,滴加甲磺酸(0.24g,2.50mmol)乙醇溶液,回流 20 min,减压浓缩至原体积的一半,冷却析晶,过滤,乙醇重结晶,得浅黄色晶体 1(1.28g),收率 89.3%,mp215~219℃。FAB-MS m/z : 590.2 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR(DMSO- d_6 ,400MHz) δ (ppm):2.16(s,3H),2.22(s,3H),2.36(brs,8H),3.53(s,2H),7.20(s,1H),7.53-7.41(m,5H),7.90(d,2H),8.08(d,1H),8.48(m,1H),8.51(d,1H),8.69(dd,1H),8.97(s,1H),9.27(d,1H),10.16(s,1H)。

2 结论

在制备化合物 4 时,采用二氯亚砒代替文献中的三氯氧磷为氯化剂,可重复利用,后处理简便;采用 Na_2CO_3 代替 NaOH 处理过量氯化剂,因碱性弱,不易发生副反应,故产率较高。试剂用量少,可降低成本。

在制备化合物 5 时,采用一锅法,在一个反应器内完成,中间不需要分离处理,节省了人力物力。

在制备化合物 6 时,以水合肼为还原剂,避免了氢气及毒性较大的氯化亚锡,减少了生产中的不安全因素;使用氢氧化钨铁作为催化剂,简便易得,避免使用昂贵的铂或钯,极大降低了原料成本。

本实验方法避免使用昂贵的化学试剂,具有安

全环保、原料价廉易得、可降低成本,以原料 4-甲基-3-硝基苯胺计总收率达 45.7%,适合工业化生产。

参考文献:

- [1] Huang AL, Liu X, Lior Z, et al. Novel process for preparing Imatinib[P]. US:2006149061,2006-07-06.
- [2] Paul WM, Werne RB, Jose FB. Urea derivatives of STI571 as inhibitors of Bcr-Abl and PDGFR kinases[J]. Bioorg Med Chem Lett,2004,14:5793-5797.
- [3] Zimmermann J. Pyrimidine derivatives and processes for the preparation thereof[P]. US:5521184,1996-05-28.
- [4] 李铭东,李东,吉民. 甲磺酸伊马替尼的合成[J]. 中国药理学杂志,2008,43(3):228-229.
- [5] Dusza JP, Albright JD. Substituted pyrazolo(1,5-a)pyrimidines and their use as anxiolytic agents[P]. US:4281000,1981-07-28.
- [6] 陈敦,黄荷香,宋帅娟,等. 甲磺酸伊马替尼的合成[J]. 精细与专用化学品,2007,15(8):23-25.
- [7] 孙继铨,尚志强,陈华. 治疗慢性粒细胞白血病伊马替尼中间体的制备方法[P]. CN:101701015,2010-05-05.
- [8] Kompella AK, Thungathurthi SR, Bhujanga Rao AKS, et al. Novel polymorphic form of Imatinib mesylate and a process for its preparation[P]. WO:2005077933,2005-08-25.
- [9] Kompella AK, Bhujanga Rao AKS, Sreenivas R, et al. Novel phenylaminopyrimidine derivatives as inhibitors of bcr-abl kinase[P]. WO:2006027795,2006-03-16.

(收稿日期 2012-03-03)

(上接第 96 页)

参考文献:

- [1] Witkovsky P, Schutte M. The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas[J]. Visual neuroscience,1991,7(1-2):113-124.
- [2] Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock[J]. Science,2002,295(5557):1070-1073.
- [3] Zhang DQ, Wong KY, Sollars PJ, et al. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008,105(37):14181-14186.
- [4] Zhang DQ, Stone JF, Zhou T, et al. Characterization of genetically labeled catecholamine neurons in the mouse retina[J]. Neuroreport,2004,15(11):1761-1765.
- [5] Zhang DQ, Zhou TR, McMahon DG. Functional heterogeneity of retinal dopaminergic neurons underlying their multiple roles in vision[J]. The Journal of neuroscience; the official journal of the Society for Neuroscience,2007,27(3):692-

699.

- [6] Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, et al. Circadian organization of the mammalian retina[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2006,103(25):9703-9708.
- [7] Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, et al. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina[J]. The Journal of neuroscience; the official journal of the Society for Neuroscience,2003,23(20):7670-7676.
- [8] Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice[J]. Nature,2003,424(6944):76-81.
- [9] Hattar S, Liao HW, Takao M, et al. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity[J]. Science,2002,295(5557):1065-1070.
- [10] Zhang DQ, Zhou T, Ruan GX, et al. Circadian rhythm of Period1 clock gene expression in NOS amacrine cells of the mouse retina[J]. Brain research,2005,1050(1-2):101-109.

(收稿日期 2012-03-15)