

· 实验研究 ·

感光神经节细胞的活体形态特点: 异于视杆、视锥细胞的光感受器

胡彩平 许文俊 金学民

437100 湖北省咸宁市, 湖北科技学院附属咸宁爱尔眼科医院(胡彩平); 450006 郑州市眼科医院(许文俊); 450003 郑州, 河南省人民医院 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所(金学民)

通信作者: 金学民, Email: 2740913223@qq.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2018.05.004

【摘要】 目的 在细胞水平研究活体感光视网膜神经节细胞(ipRGCs)形态特点,其在弯曲视网膜组织内与视杆、视锥细胞的位置关系,及其光感受器光反应信号特点。**方法** 研究 263 个经增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记的活体 ipRGCs,经用膜片钳记录技术复染,通过数码录像记录每个细胞从神经纤维层到内核层形态,分析其细胞体和树突在视网膜内丛状层、神经节细胞层的分布特点,及与弯曲的视网膜几何结构的匹配。对 ipRGCs 与视杆、视锥细胞光感受器的几何位置关系进行重建分析,推测 ipRGCs 系统的视功能。**结果** ipRGCs 树突依视网膜曲度在内丛状层呈严格的 3 个亚层分布,亚层之间无感光树突面存在。每一亚层被稀疏的 ipRGCs 树突网络全覆盖成感光曲面,但对于每个 ipRGCs,其树突在这些特定视网膜内丛状亚层曲面呈随机分布。所有 ipRGCs 树突形成的全视网膜感光三曲面与视杆、视锥细胞呈正交排列。ipRGCs 树突形成的感光曲面与内丛状层的 ON/OFF 功能分层不一致,黑视色素及内在钙钠动作电位离子通道表达水平在单个 M1、M2、M3 细胞呈随机性。M4、M5 细胞形态和功能与传统神经节细胞交叉。**结论** ipRGCs 树突形成的多层全视网膜感光曲面与视杆、视锥细胞在弯曲的视网膜三维空间呈正交排列,单个 ipRGCs 形态、黑视色素及内在钙钠动作电位离子通道表达水平的随机性都提示其具有与视杆、视锥细胞不同的光感受器特点。

【关键词】 感光神经节细胞; 三维形态; 黑视色素; 视网膜; 光感受器

Morphology of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: distinct photoreceptors from rod/cone photoreceptors

Hu Caiping, Xu Wenjun, Jin Xuemin

Hubei University of Science and Technology, Xianning Aier Eye Hospital, Xianning 437100, China (Hu CP); Zhengzhou Eye Hospital, Zhengzhou 450006, China (Xu WJ); Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China (Jin XM)

Corresponding author: Jin Xuemin, Email: 2740913223@qq.com

【Abstract】 Objective This study was to observe the morphology of live intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) at cellular level, and to explore their three-dimensional structure and responses to light in curved retina and the relationship with rod/cone photoreceptors. **Methods** ipRGCs were identified according to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) markers. Two hundred and sixty-three ipRGCs were videoed in mouse whole-mounted retina after strengthening with Lucifer Yellow from patch clamp electrodes. The dendrites and cell bodies were analyzed according to their sublayer-specific localization in inner plexiform layer and ganglion cell layer of curved retina. The relationship with rod/cone system was reconstructed and their functions were speculated. The animal feeding and use was in accordance with the standards set by the ARVO, and the experiment was approved by the Ethic Committee for Experimental Animal of Hubei University of Science and Technology. **Results** The ipRGCs had strictly sublayer-specific localization in three sublayers of retinal inner plexiform layer. Each sublayer occupies full retina and form photosensitive surface, without any intermediate photosensitive dendritic distribution between sublayers. Each ipRGC had randomly dendritic distributions among the three sublayer curves, without the specific ON/OFF stratification. The photosensitive sublayers had absolutely perpendicular assignment related to cone/rod photoreceptors. The expression of melanopsin and spike-producing Ca^{2+}/Na^{+} channels were randomly distributed in M1, M2 and M3 cells. M4 and M5 cells shared the characteristic properties of conventional ganglion cells.

Conclusions In contrast to the rod/cone photoreceptors, ipRGCs form multiple-sublayer photosensitive curved surface, which are perpendicular to rod/cone photoreceptors, their photosensitive melanopsin and intrinsic spike-producing channels randomly occupy these specific sublayers, which suggest their distinct functions from rod/cone photoreceptors.

【Key words】 Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells; Three-dimension morphology; Melanopsin; Retina; Photoreceptor

感光视网膜神经节细胞 (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs) 细胞体和树突中有感光黑视色素的表达, 与传统视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 明显不同。ipRGCs 最早受到关注是由于研究者发现晚期视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 患者在视杆和视锥细胞功能完全丧失的情况下其瞳孔对光反射仍然存在^[1-3]。目前, 对黑视色素分子基础研究的意义仍未完全认识, 限制了该研究结果的应用转化。对眼科临床医生来说, 了解 ipRGCs 整体解剖形态具有重要意义。根据 ipRGCs 的电压敏感钙通道表达比例的不同, 将其分为 M1、M2、M3、M4 和 M5 亚型^[4]。本研究对增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 选择性标记的小鼠 5 种 ipRGCs 形态和电生理结果进行分析, 进一步从 ipRGCs 和视网膜的宏观形态角度分析, 希望能作为桥梁连接视神经基础研究与眼科临床, 推动基础研究成果向临床转化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 用 EGFP 选择性标记 5 种 ipRGCs 的小鼠品系, 该小鼠为黑视色素启动子驱动 Cre 重组酶小鼠与 EGFP 标记 Cre 的转基因小鼠杂交的后代 (购自 Johns Hopkins 大学 ipRGCs 研究实验室 King-Wai Yau 研究组)。取出生后 6 周 ~ 4 个月小鼠用于实验, 实验前小鼠于 12 h 光照/12 h 黑暗循环光照环境中饲养。本研究经湖北科技学院实验动物伦理委员会批准 [批文号: SCXK (鄂) 2015-0018], 实验动物的饲养和使用遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 电极液 (美国 Sigma 公司); 细胞外液成分 (美国 Tocris 公司)。荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司); 膜片钳 (美国 Molecular Device 公司)。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 电极内液成分 A: 120 mmol/L 葡萄糖酸钾、5 mmol/L NaCl、4 mmol/L KCl、10 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸 (hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, HEPES)、2 mmol/L EGTA、4 mmol/L Mg-ATP; 0.3 mmol/L Na-GTP; 7 mmol/L Tris-磷酸肌酸; 质量分数 0.1% 荧光黄; 用 KOH 调节 pH 至 7.3。电极内液成分 B: 120 mmol/L Cs-methanesulfonate、5 mmol/L NaCl、4 mmol/L 氯化四乙铵 (tetraethylammonium chloride, TEACl)、10 mmol/L HEPES、2 mmol/L EGTA、4 mmol/L Mg-ATP、0.3 mmol/L Na-GTP、7 mmol/L Tris-磷酸肌酸、0.1% 荧光黄, 用 CsOH 调 pH 至 7.3。Ca²⁺ 细胞外液:

105.4 mmol/L NaCl、10 mmol/L CsCl、20 mmol/L TEACl、1.24 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L CaCl₂、10 mmol/L HEPES、16 mmol/L 右旋葡萄糖、0.5 mmol/L 左旋谷氨酰胺、0.3 μmol/L 河豚毒素, 用 NaOH 调节 pH 至 7.4。电压片钳控制试验的钾通道阻断外液: 60.3 mmol/L NaCl、57.6 mmol/L TEACl、10 mmol/L CsCl、10 mmol/L BaCl₂、1.24 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L HEPES、16 mmol/L 右旋葡萄糖、0.5 mmol/L 左旋谷氨酰胺, 用 NaOH 调节 pH 至 7.4。用 480 nm 的绿 LED 光源刺激 ipRGCs 的光反应, 刺激时间为 1 s, 2 次刺激的时间间隔 > 5 min。

1.2.2 膜片钳技术检测 ipRGCs 形态变化 所有实验均在每日 9:00 至 17:00 完成, 实验前动物在避光箱中暗适应 12 h。在红光或远红外光下完成细胞的电生理记录及照片拍摄。红光下用 CO₂ 麻醉小鼠后, 切断头部, 迅速取得完整眼球, 在 Ames 培养液内分离视网膜, 切成组织小片, 移入黑暗处培养液保存。视网膜组织自眼球分离后保存在 32 °C、体积分数 95% O₂+ 体积分数 5% CO₂ 的 Ames 培养液中。染色的视网膜组织保持的时间不超过 7 h。采用 PCLAMP 9 软件 (美国 Molecular Devices 公司) 记录 ipRGCs 膜片钳结果。系统电阻为 20 ~ 40 MΩ, 补偿 40% ~ 70%。利用机械电极控制系统制造玻璃电极, 电极阻抗为 6 ~ 8 MΩ。电极内液内加荧光黄复染记录过的细胞。选择 EGFP 标记细胞作膜片钳记录, 树突及细胞体完整的细胞作为典型 ipRGCs。EGFP 选择性标记细胞经膜片钳电极内的荧光黄复染后, 实时记录其形态并录像。部分典型细胞甲醛固定 3 ~ 5 min 后用共轭双焦显微镜观察, 观察时将荧光显微镜的焦点从视网膜神经纤维层向 RGCs 层、内丛状层 ON 区和 OFF 区以及内核层、外丛状层、外核层、感光细胞层分层推进, 获得视网膜水平切面各层次上的 ipRGCs 形态信息。

1.2.3 荧光显微镜下观察 ipRGCs 各亚型细胞分布及三维形态 取 1.2.2 部分分离培养的成活视网膜片, RGCs 层朝上固定于记录皿底部, 保持在 32 °C、含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的 Ames 培养液中, 荧光显微镜聚焦于神经纤维层以观察 EGFP 或荧光黄复染的 ipRGCs 轴突, 将荧光显微镜焦点变化的过程数码录像即可获得每个 ipRGC 的三维形态及在视网膜内的位置关系。

2 结果

2.1 ipRGCs 解剖结构、形态及定位

共分析小鼠内丛状层 ON 区和 OFF 区的 263 个

EGFP 选择性标记的 ipRGCs 活细胞,其中 M1 型 87 个, M2 型 79 个, M3 型 42 个, M4 型 40 个, M5 型 15 个,并可见荧光黄复染后的 M1、M2、M3、M4、M5 细胞的细胞体和树突图片(图 1)。所有细胞形态的判断以 RGCs 的细胞体作为参考平面,其上为神经纤维层,其下近区为内丛状层的 ON 层,远区为 OFF 层。M1 细胞的树突主要在 OFF 层, M2、M4、M5 细胞的树突主要在 ON 层, M3 细胞的树突在两层均有分布。结果显示,在 RGCs 层的 RGCs 的细胞体和树突大小差别较大,形态各异。对于同样大小的细胞体,若树突分支多则树突范围小,树突分支少则树突范围大。荧光显微镜下可见 ipRGCs 的细胞体中荧光素标记的黑视色素, ipRGCs 全体分布模式见图 1A。显微镜聚焦在 RGCs 层后发现绝大部分 ipRGCs 的细胞体聚集于该层,少部分位于内核层。荧光素标记的细胞体大小不一,不同细胞荧光强度不同。各种荧光素标记的细胞体平均分布在 RGCs 层,其轴突可见荧光, ipRGCs 树突主要分布在内丛状层。视网膜最内层可见黑视色素表达,呈强荧光,主要由 ipRGCs 的细胞体、树突近端、轴突及轴突回返支在视网膜神经纤维层构成黑视色素感知网络。小鼠视网膜内可见 ipRGCs 的细胞体呈中等大小,荧光较强,树突分支较少,分布稀疏,占据面积较大,树突直径较细。M4 型 ipRGCs 细胞荧光最弱,细胞体最大,其树突特性与传统的 RGCs 一致,分支多而密,分布范围大。小鼠视网膜内核层可见一定数量的 ipRGCs 的细胞体,荧光较强,但不能确定其是否在内核层形成感光层。凭此形态的动态数码录像能确定

ipRGCs 在视网膜亚层间的定位,特别是在内丛状层各亚层(图 1)。通过改变荧光显微镜焦平面可发现有至少 3 个内丛状层的亚层完全分布有 ipRGCs 树突。根据荧光显微镜焦平面改变显示的 ipRGCs 树突分布层面可清晰地分辨不同类型的 ipRGCs。靠近细胞体的 ON 亚层可见荧光标记的 ipRGCs 的树突分布于相邻的 2 个亚层,而在 OFF 亚层有 1 层 ipRGCs 树突分布。细胞体位于内核层的 ipRGCs 的树突反向分布于内丛状层的同一 OFF 亚层,这 3 层的连接部与分层平面相垂直,未发现斜位于视网膜断面的 ipRGCs 树突面, ipRGCs 树突在每一内丛状层亚层的分布呈明显的分层特性。M1 型 ipRGCs 及其移位到内核层的树突占据 OFF 亚层, M2、M4、M5 型 ipRGCs 分布于 2 个 ON 亚层,激光共轭双焦显微镜下这种严格的分层分布更为清晰(图 1B)。在视网膜神经纤维层可见荧光素标记的 ipRGCs 轴突及一些回返的分支(观察的 263 神经元中, $n=7$),因此至少有 4 层黑视色素感知网络存在于内丛状层和 RGCs 层。

2.2 单个 ipRGC 形态及分布

ipRGCs 细胞体荧光表达强度与其树突接近,黑视色素表达密度与树突相同。M1 型 ipRGCs 及其在内核层的树突分布于 OFF 层,此层树突网络较稀疏, M2、M4、M5 型 ipRGCs 树突分布在 ON 层,但尚无法确定分布在 2 个 ON 层的哪一层,此层树突网络较密, M4、M5 型 ipRGCs 树突与传统的 RGCs 树突分布模式接近。M3 型 ipRGCs 树突分布于 ON 层和 OFF 层。典型 ipRGCs 形态特点为:(1)树突较稀疏,分支较少,树突

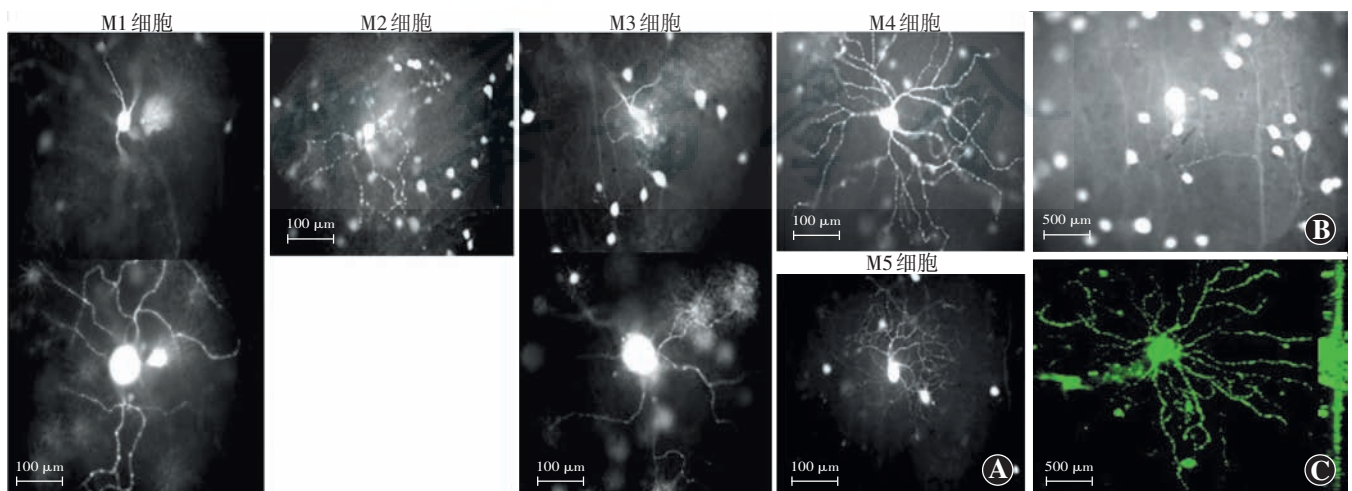


图 1 各种类型的 ipRGCs 形态 A: 荧光显微镜焦点从视网膜的神经纤维层向 RGCs 层、内丛状层 ON 区和 OFF 区以及内核层、外丛状层、外核层、感光细胞层分层推进后获得的视网膜水平切面各层次上的 ipRGCs 形态信息 稀疏且弯曲的片层或不规则形树突(荧光显微镜照片为白色)显示在特定的焦点亚层(ON/OFF 区),以 RGC 细胞体为参照,不同的焦点显示严格的亚层分布。可见 M1、M2、M3、M4、M5 细胞的典型形态。各型细胞分类主要依据其树突在内丛状层特定亚层的分布和分布范围(标尺=100 μm) B: EGFP 表达的 ipRGCs 在膜片钳记录复染前的照片 可见荧光标记的大小不同细胞及其轴突,黑视色素表达密度多样(标尺=500 μm) C: 共轭双焦显微镜下 M2 型 ipRGCs 树突形态特点及亚层分布(标尺=100 μm)

分布面积通常 >0.5 mm, 即达到与人视网膜黄斑区 (1 mm) 同样的范围。(2) 细胞树突呈弯曲片层状, 可在同一平面弯曲多次, 无方向性, 呈不规则网状分布于特定亚层。如 M3 型 ipRGCs 在 ON 层和 OFF 层各有一圆形星状树突结构, 两层间由一发自 ON 层较粗树突分支的垂直杆结构相连, 移位在内核层的 ipRGCs 树突也是反向分布于内丛状层。(3) 不同类型的 ipRGCs 荧光强度不同, M4、M5 型 ipRGCs 黑视素较少。(4) 不同类型的 ipRGCs 树突亚层分布特点有交叉, M1 型 ipRGCs 树突主要位于 OFF 层, 有小树突分支或近端树突分布在 ON 层 ($n = 71/87$)。一些 ON 层 M2 型 ipRGCs 也可见细小树突分支到达 M1 型 ipRGCs 的 OFF 层 ($n = 21/79$)。M1、M2 型 ipRGCs 在解剖上分界模糊。M3 型 ipRGCs 数较少, 部分 ipRGCs 似乎是 M1 和 M2 的中间类型, 不能确定类别。将荧光显微镜聚焦从 RGCs 细胞体至内丛状层 ON 亚层或 OFF 亚层可显示 ipRGCs 树突在内丛状层特定亚层的分布, 每一细胞可分布在 ON 层和/或 OFF 层。(5) 虽然细胞树突在内丛状层每一亚层分布严格分层, 但树突范围很广, 这些特定的亚层曲度与视网膜的整体曲度相一致, 与视杆、视锥感光细胞不同, ipRGCs 系统依从于视网膜的宏观曲度, 它们细小的断面在视网膜的宏观曲面内呈点状、大数量的紧密分布 (图 2)。

2.3 ipRGCs 系统黑视色素表达及钙通道分布特点

在 480 nm 绿光刺激下, ipRGCs 对光反应电流的振幅能反映黑视色素的表达水平。所有的 M1 型和部分 M2 型 ($n = 31/79$)、M3 型 ($n = 27/42$) ipRGCs 反应振幅最高, M4 型和 M5 型 ipRGCs 振幅最低。M1、M2 和 M3 型 ipRGCs 按其钙通道配备至少各分为 2 个亚型, 一类可产生高敏感的、短时程特性的钙动作电位, 另一类产生长时程的钠动作电位信号 (无去极化抑制)。M4 型和 M5 型 ipRGCs 钙通道少, 主要依赖长时程的钠动作电位。光反应振幅最高的 ipRGCs 细胞膜电压依赖的钙通道最多, 一些主要为低电压依赖的钙通道 (T-型), 可产生与钠动作电位相似的钙动作电位, 另一些主要为高电压依赖的钙通道 (图 3)。

2.4 ipRGCs 与视锥杆系统的差异

ipRGCs 分布的层与层之间树突连接

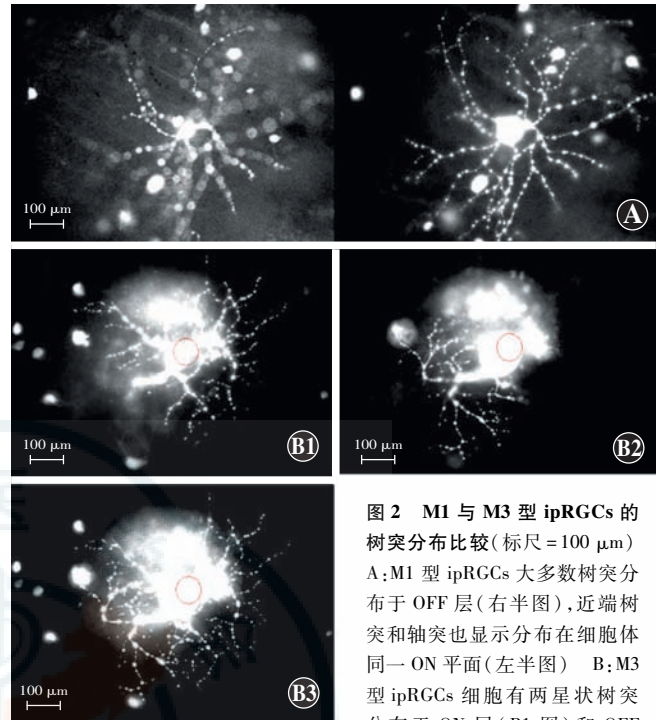


图 2 M1 与 M3 型 ipRGCs 的树突分布比较 (标尺 = 100 μm) A: M1 型 ipRGCs 大多数树突分布于 OFF 层 (右半图), 近端树突和轴突也显示分布在细胞体同一 ON 平面 (左半图) B: M3 型 ipRGCs 细胞有两星状树突分布于 ON 层 (B1 图) 和 OFF 层 (B2 图), OFF 层树突由 ON 层粗大树突发出。B3 为 B1 和 B2 的叠加图。OFF 层和 ON 层面以 ipRGCs 的细胞体作为参照面确定

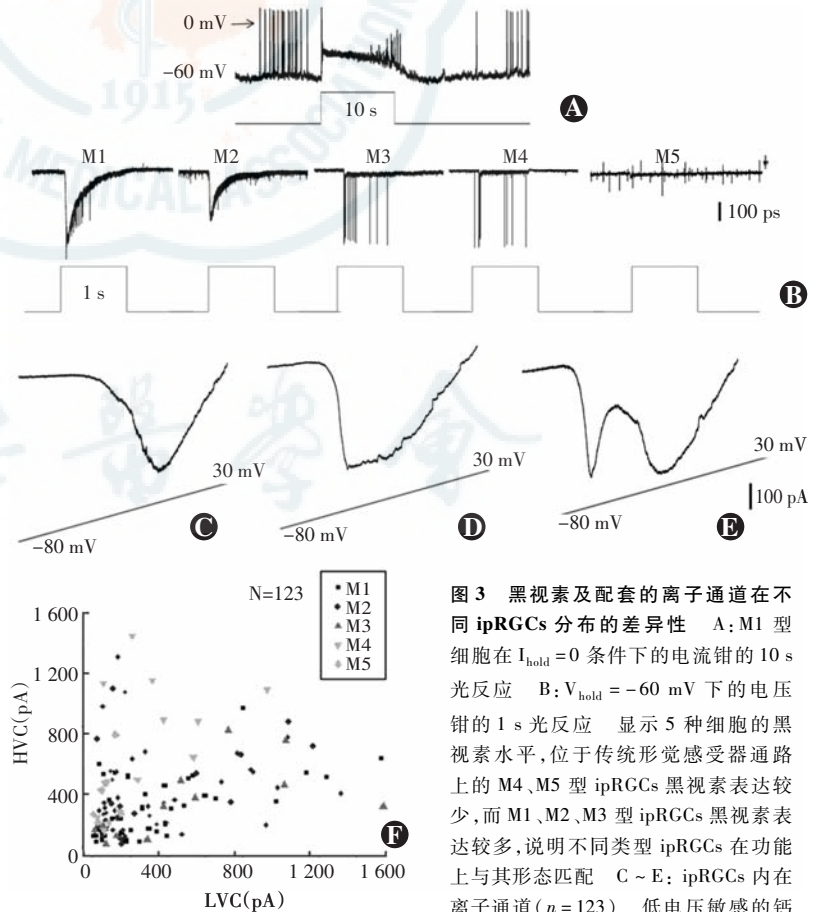


图 3 黑视素及配套的离子通道在不同 ipRGCs 分布的差异性 A: M1 型细胞在 $I_{hold} = 0$ 条件下的电流钳的 10 s 光反应 B: $V_{hold} = -60$ mV 下的电压钳的 1 s 光反应 显示 5 种细胞的黑视素水平, 位于传统形觉感受器通路上的 M4、M5 型 ipRGCs 黑视素表达较少, 而 M1、M2、M3 型 ipRGCs 黑视素表达较多, 说明不同类型 ipRGCs 在功能上与其形态匹配 C ~ E: ipRGCs 内在离子通道 ($n = 123$) 低电压敏感的钙通道 (T-型) 在 ipRGCs 表达较多, M1、M2、M3 型细胞尤其显示这一特点, 可分为 T-型钙通道优势表达组 (D、E) 和弱表达组 (C) F: 5 型 ipRGCs 的钙通道分类 (本组记录的钠电流已被河豚毒素所阻断) HVC: 高电压钙通道; LVC: 低电压钙通道

部位与所占的球面垂直,连接树突极其稀少,可排除该方位感光的可能性。ipRGCs 树突等形成的感光曲面与传统的视锥细胞和视杆细胞垂直,一方面将 ipRGCs 与视杆、视锥细胞区别开来,另一方面与它们形成三维的感光大系统,在几何学上,此两系统呈正交排列。双极细胞触突末端在视网膜内丛状层呈特异性 ON/OFF 多亚层分布,是传统的视杆、视锥双极细胞系统的形态特点。ipRGCs 在 ON/OFF 分层并不像双极细胞那样严格,有些 M1 型细胞树突主要分布在 OFF 层,也有很大一部分小树突分支或近端树突分布在 ON 层(图 3)。在光反应方面,ipRGCs 以 ON 样反应为主,其实不是 ON 反应,它们是动作电位反应,不同于双极细胞的分级 ON 反应。一些 M2 型细胞也可见细小树突分支到达 M1 型细胞的 OFF 层。M3 型细胞树突分布在 ON 和 OFF 两层,其光反应未见 ON-OFF 形式,且细胞数量和形态更像是 M1 和 M2 型细胞的中间类型。ipRGCs 的解剖生理特点将其与双极细胞及 RGCs 区别开来,提示其功能比较特殊。M4 型和 M5 型细胞形态更近似传统 RGCs,树突分枝多而密,树突分支在同一平面的 4 个方位分布更有序。M4 型和 M5 型细胞光反应接受双极细胞的传入也较多,形态上是 ipRGCs 与传统 RGCs 的过渡形式,提示 ipRGCs 与传统视杆、视锥细胞的结构与功能密不可分。

2.5 视网膜光感受器几何结构

视网膜大体解剖结构为分层的类球形组织,传统的视杆、视锥细胞位于视网膜外层,ipRGCs 位于内层。视杆、视锥细胞在外层占据垂直方位的柱形空间,每一细胞定位确定,其镶嵌密度决定了视网膜分辨率的高低,即视力。ipRGCs 在视网膜内侧形成网状类球面,面积较大而网格稀疏,总体分布与视网膜曲度和面积范围相同,每种细胞在特定亚层的分布并未完全限定,提示他们具有特殊的光感知功能(图 4)。

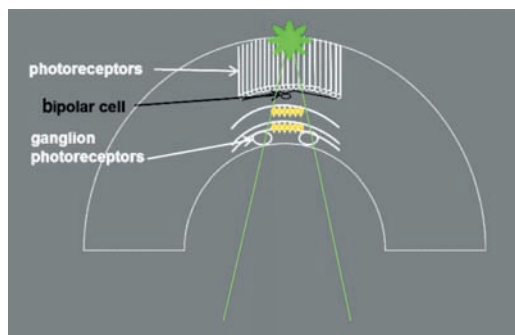


图 4 ipRGCs 组成的感光系统与传统感光系统几何关系模式图
传统的视杆、视锥细胞及双极细胞系统

系统与 ipRGCs 系统呈正交分布。视杆、视锥细胞在视网膜的聚焦曲面上有高分辨率,ipRGCs 在所占据曲面对光呈高敏感反应。两系统组成三维的感光类非球形系统 photoreceptors: 视杆视锥光感受器; bipolar cells: 双极细胞; ganglion: 神经节细胞光感受器

3 讨论

3.1 不同类型 ipRGCs 的特点、分布及其与功能的关系

ipRGCs 的树突分布稀疏,层间分布不甚规则且范围大,树突除了感光外还接受双极细胞和无长突细胞的触突传入^[1]。ipRGCs 的轴突也有黑视色素表达,但到视盘为止^[2]。ipRGCs 低的信号传导速度特点和解剖证据均显示 ipRGCs 是无髓神经纤维^[3]。在灵长类动物中,ipRGCs 是最大的 RGCs^[4]。严格的说,以上特征是 M1 型 ipRGCs 所具有的。到目前为止,已有 M1、M2、M3、M4 和 M5 5 种 ipRGCs 被确定,研究表明 M1 型细胞体长度可达 15 μm ,大部分位于 RGCs 层,有些位于内核层。虽然 M1 型细胞只占全部 RGCs 的 1%,但其树突范围可达 300 μm ,重叠形成一张感受网^[5]。ipRGCs 树突在内丛状层的分层分布是不同亚类的显著特点,M1 型细胞的树突分布在内丛状层的最外层,即 OFF 层,此层 RGCs 通常接受 OFF 双极细胞的传入信息,但 M1 型细胞主要接受 ON 双极细胞的信息输入。M1 型细胞有高水平的黑视色素表达,因此与其他类型的 ipRGCs 相比,M1 型 ipRGCs 有更强的光敏感度,可产生的光反应电流最大^[6]。但 M1 型细胞很容易发生去极化抑制,因此动作电位频率相对较低。黑视色素感光导致的内在光电反应即可产生去极化抑制^[7]。与 M1 型细胞相比,M2 型细胞的细胞体更大,可达 20 μm 且树突分支更规则,范围达 500 μm 。M1 型与 M2 型细胞数量差不多,后者也可覆盖全视网膜,树突分布在 ON 层。M2 型细胞表达的黑视色素比 M1 型细胞约低 90%,产生的光反应电流也约低 90%,但 M2 型细胞产生动作电位的频率高于 M1 型细胞。M2 型细胞突触输入(双极细胞和无长突细胞)传导所占的比重较高^[8]。M3 型细胞树突分布在 ON 层和 OFF 层,占有 ipRGCs 的 10%,其不能覆盖全视网膜,因此推测不属于真的亚类^[9]。M4 型和 M5 型细胞是最近发现的形态学亚类,属于 ON 细胞,M4 型细胞有树突分布范围最大,细胞中黑视色素的表达和树突分支类型与 M2 型细胞相似。M4 型和 M5 型细胞多行使传统视功能,即接受更多双极细胞输入,部分行使 ipRGCs 功能^[10-11]。猕猴视网膜中 ipRGCs 神经元达 3 000 个,占有 RGCs 的 0.2%。ipRGCs 形成网状,分布于除中心凹外的所有视网膜。ipRGCs 的树突环绕中心凹但不进入中心凹,ipRGCs 树突范围很宽广,视网膜周边部 ipRGCs 树突直径可达 1 mm,细胞体即可达 50 μm ,亚类分布与爬行动物类似^[12]。

3.2 新发现的视网膜光感受器 ipRGCs

视网膜是一层包含上亿个神经细胞的球形神经组织,按细胞的形态和位置特征可分成六类,即光感受器、水平细胞、双极细胞、无长突细胞、RGCs 以及新发现的网间细胞,其中只有光感受器才对光敏感,光所触发的初始生物电产生过程即发生在光感受器中。ipRGCs 的发现将光感受器的分布扩大至神经视网膜的全层,ipRGCs 光感受器位于内核层、内丛状层、RGCs 和视神经纤维,整个神经视网膜形成三维光感受器。与初发现时的印象相反,ipRGCs 光感受器也对微弱光敏感,敏感度比视杆细胞强 100 倍^[13],因此 ipRGCs 光感受器参与整个视觉过程,可能大部分反应是归于植物神经系统,仅部分反应被人感知。

3.3 ipRGCs 新光感受器在视网膜中的形态及意义

视杆、视锥光感受器位于视网膜的外层,呈柱形马赛克样分布,有利于外球面的分辨率感知。在人类,这种感知在黄斑部达到顶点,即中心视力。猕猴视网膜中有 3 000 个 ipRGCs 神经元,形成重叠的网样^[14]。ipRGCs 的树突环绕中心凹但不进入中心凹,显示了 2 个系统的不同功能^[15]。ipRGCs 光感受器呈网状,占据视网膜内 4 个亚层,因位于眼屈光系统焦点之外,ipRGCs 树突呈弯曲片层状,可在同一平面弯曲多次,每个 ipRGCs 光感受器呈网状在亚层的分布导致分辨率很差,也不能作为景深的最好分辨位置。ipRGCs 光感受器与传统的视杆、视锥光感受器相比,在空间视力方面无法足够精细,但分布范围达到了视网膜宏观曲度和面积。

3.4 ipRGCs 形态特点

典型 ipRGCs 形态特点:(1)典型的感光神经节细胞树突较稀疏,分支较少。在其分布范围内每一 ipRGCs 有成千上万的视杆、视锥细胞对应分布。即使黑视色素对绿光的敏感度比视杆细胞的强 100 倍^[13,16],未聚焦的光面,在如此稀疏网面上激发的也是随机的电冲动,ipRGCs 的内在电生理有钙和钠 2 种全或无动作电位与之匹配^[17]。(2)ipRGCs 光感受器各网状亚层在解剖上呈分离状态,其链接部分与网状亚层垂直不参与感光,但每个 ipRGCs 光感受器在不同亚层分布有随机性。感光神经节细胞树突亚层分布特点在不同分类有交叉,各类细胞在各亚层分布有随意性。大部分的 M1 细胞有小树突分支或近端树突分布在 ON 层,一些 M2 细胞也可见细小树突分支到达 M1 细胞的 OFF 层,导致 M1 和 M2 细胞在解剖上分界模糊^[18]。M3 细胞数较少,也不覆盖整个视网膜,有很多似乎是 M1 和 M2 的中间类型^[19]。从空间图形感知功

能上无法解释这种单个 ipRGCs 光感受器空间位置的随意性。(3)荧光素标记强度的不一致。有些感光神经节细胞表达黑视素较少,例如 M4 和 M5,不同表达强度的细胞在空间分布上显示随意性。(4)钙和钠 2 种全或无动作电位在各 ipRGCs 光感受器分布有随意性。钙动作电位在有些细胞中占主要地位,在有些细胞中占次要地位,以随机的方式在不同的 ipRGCs 光感受器发挥作用。总之,ipRGCs 形态特点为随机编码提供了优越的条件^[20-23]。

3.5 新视觉模型的提出

ipRGCs 的发现需要新的视觉模型来解释。依据视网膜新感光系统的功能解剖研究结果,以 ipRGCs 形态特点及其随机编码作为基础,我们提出视觉的新模型-时空模型,以眼屈光系统在视网膜全层内调制成的四维光锥为基本感知单位,光锥顶点即为传统的视杆、视锥光感受器成像的焦点,主要负责空间感知,也感知时间。光锥的时间维基底部被视网膜内层 ipRGCs 光感受器所感知,主要编码时间信息。空间信号用三角函数来编码,在视网膜双极细胞表现为 ON、OFF 和 ON-OFF 反应^[24-25]。编码时间信息需应用量子信号-全或无的动作电位(包括钙和钠动作电位),遵循双曲函数。作为一个完美的时空感知系统,空间和时间是作为整体被感知编码的。传统的视杆和视锥系统与 ipRGCs 为正交排列,棒状的视杆视锥类似于排列在球面上的高分辨力的点(有一定厚度的连续球面柱),而 ipRGCs 的树突占据一系列球面并与棒状的视杆视锥方向正交。表达分布有感光色素黑视色素的球面(实为非球曲面)适合感知光锥的时间维基底部,传统的视杆和视锥系统确定外界的空间位置,新发现的 ipRGCs 除感知白天黑夜时间外,也能感知短时程,例如 ms、s、min 等。ipRGCs 光感受器利用钙和钠动作电位发挥作用。动作电位本来在神经元内以随机的方式编码信息,编码方式符合热动力学原理。根据爱因斯坦的相对论,时空不可分,视网膜感觉的也是感知时空四维一体空间。由于时空四维空间的相对性,视网膜编码时空时需有多个坐标系统来平行处理所见的四维时空。这一视网膜信号多通道平行编码的基本原理已被绝大多数视觉生理学家所接受^[26-28]。细胞水平的平行处理包括 ON、OFF、ON-OFF 等通道在不同的视网膜双极细胞中共存,在眼科临床应用中表现为各种视功能检查法,各种方法反映一种或多种平行通道,例如形觉有中心视力和周边视野。我们若试着以新的视觉感知时空模型来分析各项视功能检查,便能从整合眼科学的角度来选择和解释各种眼生理检查,并能在临

床工作中开发出新的检查方法。

参考文献

- [1] Belenky MA, Smeraski CA, Provencio I, et al. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 460(3) : 380-393. DOI:10.1002/cne.10652.
- [2] Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock [J]. *Science*, 2002, 295 (5557) : 1070-1073. DOI:10.1126/science.1067262.
- [3] Hu C, Hill DD, Wong KY. Intrinsic physiological properties of the five types of mouse ganglion-cell photoreceptors [J]. *J Neurophysiol*, 2013, 109(7) : 1876-1889. DOI:10.1152/jn.00579.2012.
- [4] 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. DOI:10.1126/science.1069609.
- [5] Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night [J/OL]. *Nature*, 2002, 415 (6871) : 493 [2017-03-16]. <https://www.nature.com/articles/415493a>. DOI: 10.1038/415493a.
- [6] Østergaard J, Hannibal J, Fahrenkrug J. Synaptic contact between melanopsin-containing retinal ganglion cells and rod bipolar cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (8) : 3812-3820. DOI:10.1167/iov.06-1322.
- [7] Viney TJ, Balint K, Hillier D, et al. Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing [J]. *Curr Biol*, 2007, 17 (11) : 981-988. DOI:10.1016/j.cub.2007.04.058.
- [8] Hoshi H, Liu WL, Massey SC, et al. ON inputs to the OFF layer: bipolar cells that break the stratification rules of the retina [J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (28) : 8875-8883. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0912-09.2009.
- [9] Dumitrescu ON, Pucci FG, Wong KY, et al. Ectopic retinal ON bipolar cell synapses in the OFF inner plexiform layer: contacts with dopaminergic amacrine cells and melanopsin ganglion cells [J]. *J Comp Neurol*, 2009, 517(2) : 226-244. DOI:10.1002/cne.22158.
- [10] Cahill GM, Menaker M. Responses of the suprachiasmatic nucleus to retinohypothalamic tract volleys in a slice preparation of the mouse hypothalamus [J]. *Brain Res*, 1989, 479(1) : 65-75.
- [11] Güldner FH. Synapses of optic nerve afferents in the rat suprachiasmatic nucleus. I. Identification, qualitative description, development and distribution [J]. *Cell Tissue Res*, 1978, 194(1) : 17-35.
- [12] Kim YI, Dudek FE. Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: excitatory synaptic mechanisms [J]. *J Physiol*, 1991, 444 : 269-287.
- [13] Berson DM, Castrucci AM, Provencio I. Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice [J]. *J Comp Neurol*, 2010, 518(13) : 2405-2422. DOI:10.1002/cne.22381.
- [14] Hattar S, Kumar M, Park A, et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 497(3) : 326-349. DOI:10.1002/cne.20970.
- [15] Hattar S, Ecker JL, Dumitrescu ON, et al. Functions and target innervations of distinct subtypes of melanopsin cells [J]. *Holocene*, 2009, 13(1) : 61-72.
- [16] Hoshi H, Liu WL, Massey SC, et al. ON inputs to the OFF layer: bipolar cells that break the stratification rules of the retina [J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (28) : 8875-8883. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0912-09.2009.
- [17] Jusuf PR, Lee SC, Hannibal J, et al. Characterization and synaptic connectivity of melanopsin-containing ganglion cells in the primate retina [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(10) : 2906-2921. DOI:10.1111/j.1460-9568.2007.05924.x.
- [18] Schmidt TM, Taniguchi K, Kofuji P. Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development [J]. *J Neurophysiol*, 2008, 100 (1) : 371-384. DOI: 10.1152/jn.00062.2008.
- [19] Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, et al. Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons [J]. *Curr Biol*, 2003, 13 (15) : 1290-1298.
- [20] Tu DC, Zhang D, Demas J, et al. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells [J]. *Neuron*, 2005, 48(6) : 987-999. DOI:10.1016/j.neuron.2005.09.031.
- [21] Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, et al. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN [J]. *Nature*, 2005, 433 (7027) : 749-754. DOI: 10.1038/nature03387.
- [22] Dacey DM, Peterson BB, Liao HW, et al. Two types of melanopsin-containing ganglion cells in the primate retina: links to dopaminergic amacrine and DB6 cone bipolar cells [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47 (13) : 3111 [2017-05-18]. <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2392948>.
- [23] Do MT, Yau KW. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90 (4) : 1547-1581. DOI: 10.1152/physrev.00013.2010.
- [24] Do MT, Kang SH, Xue T, et al. Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells [J]. *Nature*, 2009, 457 (7227) : 281-287. DOI:10.1038/nature07682.
- [25] Hu CP. Neural coding of green flash in retinal bipolar pathways [J/OL]. *Nature Precedings*, 2012 [2017-06-25]. <http://precedings.nature.com/documents/6786/version/1>.
- [26] Schmidt TM, Kofuji P. Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(2) : 476-482. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4117-08.2009.
- [27] Wong KY, Dunn FA, Graham DM, et al. Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors [J]. *J Physiol*, 2007, 582 (Pt 1) : 279-296. DOI:10.1113/jphysiol.2007.133751.
- [28] Lee JI, Sollars PJ, Baver SB, et al. A herpesvirus encoded deubiquitinase is a novel neuroinvasive determinant [J/OL]. *PLoS Pathog*, 2009, 5 (4) : e1000387 [2016-09-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19381253>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000387.

(收稿日期:2017-08-10 修回日期:2017-12-16)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。