维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞培养及涂片的免疫细胞化学染色

病理生理教研室 李培然 范维珂

中图分类号：R26

1983年以来，免疫细胞化学技术已被广泛应用于细胞生物学，组织胚胎学及肿瘤病理学等领域，成为肿瘤的诊断与鉴别诊断的新工具[1]。

细胞在培养瓶内生长时，常呈二种形式：贴壁生长与悬浮生长。在悬浮生长时，各种细胞均呈圆球形，相互间不易鉴别；即使贴壁生长，细胞间亦往往比较相似；如果从瓶壁脱落，鉴别更为困难。胸腹水中的脱落细胞亦然。为了鉴定该类细胞的组织起源，可用抗中间丝蛋白抗体及免疫细胞化学方法。但培养细胞及涂片的免疫细胞化学染色，可能因固定不佳，形态固缩而脱落，或因特异性丧失而无法定论。所以在进行这类工作时，必须解决下列问题：（1）要保存良好的细胞形态与型特异性抗原，用何种细胞处

CPT引起的血K^+增高减轻地戈辛中毒作用和伴随的室性心律不齐，其他因素如血液动力学改善和交感活性降低也起到重要作用。[14]本文例3在使用CPT时出现肾功不全后仍用地戈辛0.125mgQd或Bid，未发生毛地黄中毒。因此作者认为，当其CPT与地戈辛合用引起Ccr下降时，是否停用地戈辛应具体分析，如Ccr下降不显著，BUN、Cr正常或偏高，血K^+增高，心衰症状改善，可在严密观察下继续使用地戈辛。

通过本文3例临床分析，提示重度心衰，低Na^+血症，显著降低的肾血流量，高肾素活性，低心钠素血症是CPT治疗心衰引起肾衰的危险因素。肾衰的发生及严重程度似与CPT的剂量无关而与疗程的长短呈正相关，惜例数太少，有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 王汉民，等. 中华心血管病杂志. 1990；18(2)：74

[2] 张丽霞，等. 中华肾脏病杂志. 1988；4(2)：103

[3] 高德. 中华肾脏病杂志. 1987；3(1)：50

[4] CREAED MA, et al. Circulation. 1981；64：483

[5] DZAV VJ, et al. AnnIntern Med. 1984；100：772

[6] CLEIAND JGF, et al. Br Heart J. 1985；54：305

[7] PONERS ER, et al. Am Heart J. 1982；1042：1203

[8] Packer M, et al. Ann Intern Med. 1987；101：346

[9] Packer M, et al. J Am Coll Cardiao 1987；10：837

[10] Lenmeier TE, et al. Am J Physio 1977；233：F388

[11] 林传骧. 中华心血管病杂志 1990；18(1)：55

[12] 叶志成，等. 中华心血管病杂志 1984；12：256

[13] 马坚，等. 中国循环杂志 1988；3：80

[14] Gleland JGF, et al. Am Heart J 1986；112：130

（收稿日期 1990-09-25）

维普资讯 http://www.cqvip.com

理方法最佳？（2）抗中间丝单克隆抗体对鉴定该类细胞的组织起源是否具有特异性？（3）何种免疫细胞化学方法较为实用而方便？（4），细胞培养及涂片的免疫细胞化学染色有何特点？为此，我们综合了文献中对细胞培养及涂片的制作特点[2][3]，进行中间丝单抗的免疫细胞化学染色。通过反复多次实践与对比，确定了我们常规应用的方法，现将结果报导于后：

材料与方法

1．标本的制备 取已建株的人体肿瘤细胞株，包括：(1)结肠癌细胞株（SW-480），（2）乳腺癌细胞株（MCF-7），(3)肺癌细胞株（LC-6），(4)星形胶质细胞瘤（U-251），(5)黑色素瘤（M-14），(6）淋巴瘤（B95-8）(均由美国纽约斯隆凯特林癌症中心惠赠)。其中（1）—（5）为贴壁生长细胞，用含0.25%胰酶，0.01%EDTA的PBS(PH7.4)液消化后制成细胞悬液，接种在装有半块盖玻片的指形培养瓶中，用含10%小牛血清的RPMI1640液进行培养。约一周后取出盖玻片，用电扇风干2h。（6）为悬浮生长细胞，将细胞悬液滴在玻片上风干。若细胞量较少，可先行离心（1000rpm)10min浓缩。

已干燥的细胞标本，用冷的缓冲甲醛丙酮固定液固定（4℃，2min)。其配方为 Na_2HPO_4 15mg，KH_2PO_4 120mg，H_2O 30ml，丙酮45ml，40%甲醛25ml。平时保存于4℃，一月内可用。固定后的细胞用PBS洗三次，贮于4℃冰箱内备用，可保存一周。

2．抗体的种类 (1）抗角蛋白（K）单克隆抗体：重庆医科大学研制的[4]AF_2(1:200)，识别高分子量角蛋白。北京生物制品所研制的HK_2(1:100)，识别广范围角蛋白。(2)抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体：重庆医科大学研制的[5]AG_1（1:200)，识别分子量为21Kd的GFAP。(3）抗神经微丝（NF）单克隆抗体：重庆医科大学研制的[6]AN_1（1:200)，识别分子量为200Kd的NF。（4）抗S-100蛋白单克隆抗体：北京生物制品所研制(1:10)，识别分子量为5.8及4.4Kd的S-100α及β。

3．免疫细胞化学方法 用ABC-AEC法，其中链霉亲和素—生物素—过氧化物酶复合物试剂盒（SABC)，上海生物制品研究所；3—氨基—9—乙基卡唑(AEC)显色剂试剂盒，重庆医科大学，步骤为（1）标本先用0.5%曲拉通x-100水溶液处理20min。(2）滴加1:20羊血清或马血清，37℃，30min。(3)吸干羊或马血清，分别加入上述五种单克隆抗体，放湿盒中4℃过夜。(4）滴加生物素化羊抗鼠IgG，37℃孵育30min。(5)滴加SABC试剂37℃孵育30min。(6）用AEC显色剂显色30min，镜下观察，待出现红棕色阳性反应时，水洗终止反应。(7)滴加Mayer氏苏木素复染细胞核3min，水洗5min。(8）用明胶甘油盖片，显微镜下观察结果。在(2)(4)(5)(6）步骤前均用PBS洗三次，每次5min，用滤纸吸干备用。阳性染色者显示红棕色沉淀。

结　果

1．细胞形态 （1）癌细胞SW-480，MCF-7，LC-6主要呈多角形，镶嵌排列成片，癌细胞浆及核大都增多，但大小不一，显示癌细胞的特征（照片1-3)。(2）星形胶质细胞瘤U-251亦显示恶性的形态特征，与癌细胞不同者，它尚有细长的胞浆突起，相互交织，体现了星形细胞的特征（照片4)。(3）黑色素瘤M-14以长圆形及棱形细胞为主，有胞浆突起，但不很长（照片5)。(4）淋巴瘤细胞B95-8则多呈圆形。由此可见，在本法固定后的制片，一般都能保持原来细胞形态的特点。

2．细胞的免疫细胞化学特性 用上述步骤进行免疫细胞化学染色，经用阳性及阴性对照，可以获得背景清晰，阳性明确的染色。表1显示所有癌细胞株均为广范围抗角蛋白单抗（HK_2）阳性，但抗非上皮性(GFAP,NF,S-100)单抗均为阴性。而肺癌（LC-6）还显示抗高分子量角蛋白(AF_2)阳性，而肠癌与乳腺癌显示AF_2阴性。U-251为抗GFAP及抗S-100阳性，但抗K，NF单抗均为阴性。M-14为S-100阳性，而抗K，GFAP，NF均为阴性。B95-8对上述各种单抗均为阴性。说明用本法能显示不同单抗的

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　　培养细胞株的免疫细胞化学染色反应

细胞株	AF_1	HK_1	GFAP	NF	S—100
SW—480	—	卅	—	—	—
MCF—7	—	卅	—	—	—
LC—6	卄	卅	—	—	—
U—251	—	—	卅	—	+
M—14	—	—	—	—	卅
B_{95}—8	—	—	—	—	—

组织特异性。阳性染色的分布主要在细胞的胞浆，符合中间丝蛋白的分布。与组织切片染色相一致。

讨　论

细胞培养或涂片的免疫细胞化学染色在确定细胞的来源以至病变的性质中具有重要价值。但由于方法尚不理想，在使用上颇受限制。本研究参考文献中诸家的优点，通过反复实践，摸索出效果较好的方法，获得成功。方法中主要考虑的是保存细胞的形态及其抗原性。本法采用细胞培养或涂片，可保存细胞的原有形态。若细胞较少需要离心时，以1000rpm 10 min能将细胞形态保存较好；固定剂以冷的缓冲甲醛—丙酮固定剂比用纯酒精或丙酮更好，使细胞形态保持原有特点。与组织切片免疫组化染色不同，涂片或培养细胞是较为完整的，所以要用Triton X-100处理来增加细胞膜对抗体的通透性，但过分处理又会破坏细胞，我们试用时得出应用 0.5% Triton X-100 20min 比较合适。既允许大分子抗体球蛋白进入细胞，又不致使细胞裂解。在上述条件下，我们采用国产的链霉亲和素试剂盒获得组织中中间丝抗原的特异性染色，中间丝蛋白的分布可见于核周，胞浆、胞膜及胞突上，符合在组织中的正常规律，而且在细胞中并不均匀，可能有一定的生物学意义。

参 考 文 献

[1] 范维珂·国外医学临床生物化学及检验学 分册 1987；8：1
[2] Li CY, et al. Am J Clin Path 1984;81:204
[3] Li CY, et al. Am J Clin Path 1987;88:696
[4] 胡军，等. 中国免疫学杂志 1987；3 (5)：258
[5] 殷秀，等. 免疫学杂志 1990；6 (1)：27
[6] 杨青峰，等. 免疫学杂志 1990；6 (2)：92

(收稿日期1990-10-10)