DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.031
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)05-0447-03

技术方法

RT-PCR与免疫组化在自体移植脾组织GAP-43表达检测中的应用

Application of RT-PCR and IHC in the detection of the expression of GAP-43 in transplanted spleen tissue after splenic autotransplantation in rats

张天飞,郭光金,王 林,蒋登金,左艳芳,张集建 (第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究和评价RT-PCR、免疫组化在检测自体脾组织移植术后生长相关蛋白-43(growth associated protein-43,GAP-43)表达的应用和价值。方法 健康Wistar大鼠80只,雌雄不限,体质量100~120 g,随机分为RT-PCR组和免疫组化组,在脾组织移植术后30、60 d取两组移植脾组织,行RT-PCR测定GAP-43 mRNA,免疫组化法测定GAP-43$^+$神经纤维。结果 自体脾组织移植术后30 d,RT-PCR组检测出GAP-43 mRNA,而免疫组化组未测出GAP-43$^+$神经纤维;脾组织移植术后60 d两组均检测出阳性结果,阳性率分别为95%和75%。结论 RT-PCR、免疫组化法均可作为脾组织移植术后神经再生变化过程的检测方法,并有重要价值,但两者各有互补的优缺点。

逆转录聚合酶连反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)和免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)是近年来广泛应用且被证明为行之有效的两种分子生物学技术,均具有高度的敏感性和高度的特异性[1,2],同时各自也存在着不同程度的缺点和不足。本实验通过应用RT-PCR、免疫组化对大鼠自体脾组织移植术后不同时相脾组织中GAP-43 mRNA和神经纤维进行检测和比较,分析两种方法在大鼠自体脾组织移植术后神经再生研究中的优势和不足,为脾脏移植的实验研究提供实验方法参考。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作

1.1.1 动物分组 健康Wistar大鼠80只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量100~120 g,随机分为:①RT-PCR组40只;②IHC组40只。

1.1.2 动物模型制作 两组大鼠以0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,无菌条件下剖腹;实验组大鼠将脾脏切下后取30%脾,切成1 mm×1 mm×1 mm均匀颗粒,植入自身大网膜内。

1.2 GAP-43 mRNA检测(RT-PCR)

1.2.1 标本取材 术后30、60 d取大鼠脾组织(每个时相点各20只),冰冻备用。

1.2.2 引物序列 上游引物:5′-ACAAGGAAAAAGCTCAAAG-3′下游引物:5′-GACGGGGAGTTATCA GTG G-3′

1.2.3 RT-PCR 称取各组脾脏组织约50 mg,采用Tripure试剂(购自)按常规方法提取组织中总RNA。采用M-MLV逆转录试剂盒(Promega公司),按照产品介绍方法将总RNA逆转录cDNA。目的基因引物由上海生物工程技术有限公司合成,各组均以作为内参照。PCR反应条件:94 ℃ 10 min;94 ℃ 30 s 55 ℃ 30 s 72 ℃ 35个循环;72 ℃ 10 min,产物经2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观测,目的片段为292 bp。

1.3 GAP-43+神经纤维的检测(IHC)

1.3.1 标本取材及切片制备 术后30、60 d取大鼠脾组织(每个时相点各20只),置福尔马林溶液中固定后,石蜡包埋、切片,片厚5 μm。

1.3.2 免疫组化染色检测 每只大鼠收集切片5张,行免疫组化ABC法抗GAP-43抗体染色,显示脾组织中GAP-43A+神经纤维,HE轻度复染,吹干切片后,透明树胶封片,显微镜下观察。GAP-43$^+$抗体由美国哈佛大学惠赠。

1.4 统计学处理

分别对各组阳性结果计数,阳性结果统计标准:RT-PCR组电泳出现靶基因扩增条带,同时β-actin阳性;IHC组切片中出现GAP-43阳性染色,阳性对照染色呈阴性。所得数据采用SPSS统计数据包进行χ^2检验。

2 结果

2.1 GAP-43检测结果

RT-PCR组自体脾组织移植术后30 d即可检测出GAP-43 mRNA,自体脾组织移植术后60 d达到较高水平。IHC组自体脾组织移植术后30 d只有1例阳性、自体脾组织移植术后60 d出现GAP-43阳性染色(图1)。

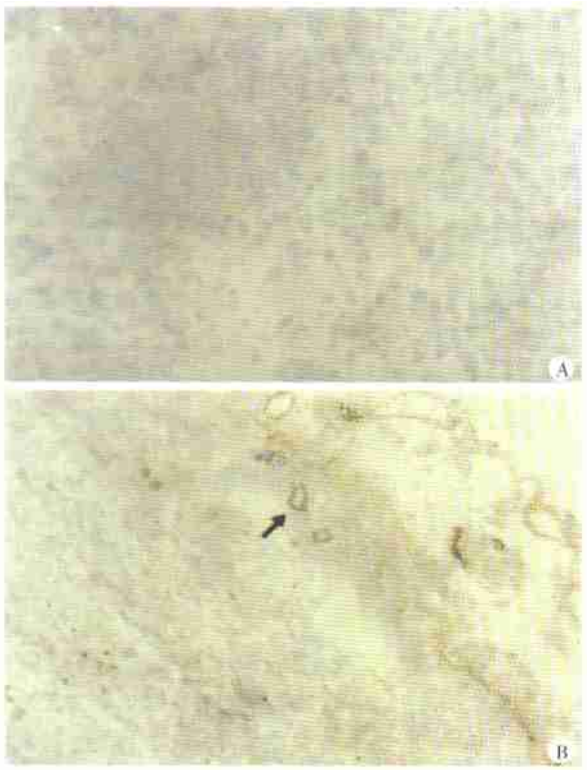
2.2 RT-PCR组、IHC组自体移植术后检测

两种检测方法比较,RT-PCR较IHC敏感,尤其对于早期自体脾组织移植术后标本更敏感($P<0.01$),见表1。

作者简介:张天飞(1964-),男,重庆市璧山县人,实验师,主要从事脾脏移植的实验方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752251

收稿日期:2003-07-07;修回日期:2003-09-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A：30 d(阴性)；B：60 d

图 1 自体脾组织移植术后 GAP-43$^+$ 神经纤维 (ABC×200)

表 1 RT-PCR 组、IHC 组自体脾组织移植术后检测结果

术后时间(d)	例数	RT-PCR 组		IHC 组	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
30	20	12	60	1	5**
60	20	19	95	15	75*

与 RT-PCR 组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

3 讨论

自体脾组织大网膜内移植，作为脾脏损伤后一种最常采用保留脾脏的手术术式，已得到临床外科广泛应用和认可[1,2,3]，移植成功并再生的脾组织能够部分恢复脾脏的免疫功能[4]，而移植脾组织能否存活和发挥免疫功能，神经纤维的再生是至关重要的[5]。因此，早期、准确的检测出神经的再生情况，对于评估自体脾组织移植的实验研究和手术预后十分重要。生长相关蛋白(growth associated protein，GAP-43)是一种神经系统特异性蛋白质，参与神经系统的发育、突触形成和神经再生。在神经系统的发育和损伤再生过程中，常将GAP-43列为神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针[6]。因此，本实验将GAP-43作为自体移植脾组织神经再生的检测指标，试比较RT-PCR和IHC在检测自体移植脾组织手术后神经再生时的优缺点，为临床及实验研究提供理论参考依据。

本实验结果显示：自体脾组织移植手术后30 d，RT-PCR、IHC检测神经再生阳性的检出率分别为60%和5%($P<0.01$)；术后60 d，则分别为95%和75%($P<0.05$)，提示两种检测方法相比较，RT-PCR较IHC敏感，尤其对于自体移植脾组织手术后早期标本更是如此。RT-PCR是通过扩增所测指标的特异性DNA或RNA来检测指标，因此具有高度的特异性和敏感性。国内外许多实验已证实[7,8]，RT-PCR方法的阳性率高于免疫组化检测的阳性率，本研究的结果与之一致。相对于IHC，RT-PCT有显著的优点：① RT-PCR有高度的特异性，RT-PCR是通过核酸碱基配对的原理进行，PCR只会对与引物序列互补的模板进行特异的扩增，因此其特异性大大优于IHC法；② RT-PCR有高度的敏感性。RT-PCR法已达到检测单个分子的能力，而IHC法则达不到，当IHC法结果为阴性时，仍可用RT-PCR来检测特异性mRNA的存在；③ RT-PCR快速、简便，对样品的要求不高，甚至某些陈旧的标本都可以用RT-PCR来检测。但RT-PCR也有明显的缺点：① RT-PCR只能对标本中mRNA的量作动态观察，而不能定性描述。所以对于检测指标与组织或细胞功能的关系不能完全揭示；②从mRNA到蛋白质的合成中间尚有较多的环节，受诸多因素的影响。本研究中，自体移植脾组织手术后60 d标本RT-PCR阳性率为95%，而IHC阳性率只有75%，也可能有此原因。③RT-PCR在操作不当时，也会出现假阳性或假阴性。IHC法是通过抗原抗体特异性结合的原理来检测指标的，与RT-PCR比较，其最大的优点是能够准确定位。本实验中结果表明，GAP-43$^+$ 神经纤维首先出现于包绕移植脾组织的大网膜内，以后随血管进入再生的脾组织中，主要分布于移植脾组织周边部位，呈现向移植脾组织中央部分扩展的趋势，对研究自体移植脾组织手术后神经再生的来源和进一步探讨自体移植脾组织再生与脾脏免疫功能恢复的关系，提供了重要的形态学研究基础。

总之，RT-PCR在自体脾组织移植后神经再生检测中有明显的优势，方法可靠，但也存在着一些不足和问题，而IHC恰好能够弥补RT-PCR的不足，因此，只有综合应用两种检测方法，才能更加准确地观察和描述自体移植脾组织手术后神经再生的情况，更好地指导自体脾组织移植术后乃至其他神经损伤再生的实验研究。

关键词：RT-PCR；免疫组化；自体脾移植

中图法分类号：R446.9；R617；R657.6 文献标识码：B

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] 蔡文琴. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 8, 449.

[2] Marques R G, Petroianu A, Coelho J M, *et al*. Regeneration of splenic autotransplants[J]. Ann Hematol, 2002, 81(11): 622—626.

[3] Leemans R, Manson W, Snijder J A, *et al*. Immune response capacity after human splenic autotransplantation: restoration of response to individual pneumococcal vaccine subtypes[J]. Ann Surg, 1999, 229(2): 279—285.

[4] Marques R G, Petroianu A, de Oliveira M B, *et al*. Bacterial clearance after total splenectomy and splenic autotransplantation in rats[J]. Appl Radiat Isot, 2002, 57(6): 767—771.

[5] Gomez L, Egido R, Guarino G, *et al*. Histologic study of experimental spleen transplant in rats[J]. Minerva Chir, 2000, 55(11): 741—744.

[6] Kato N, Nemoto K, Arino H, *et al*. Influence of peripheral inflammation on growth-associated phosphoprotein (GAP-43) expression in dorsal root ganglia and on nerve recovery after crash injury[J]. Neurosci Res, 2003, 45(3): 297—303.

[7] 喻启玲, 左艳芳. ^{60}Co γ 射线全身照射后大鼠脑 NOS 表达变化及其与神经再生的关系[J]. 局解手术学杂志, 2003, 12(2): 132—134.

[8] 丁 勇, 田嘉禾, 杨武威, 等. PET、RT-PCR、IHC 方法检测肿瘤转移灶的比较[J]. 中国医学影像学杂志, 2002, 10(6): 405—407.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2004)05-0449-03

技术方法

人、猪虹膜色素上皮细胞培养的比较研究

Comparative studies on the culture of human and pig iris pigment epithelial cells

曾玉晓, 王仕军, 刘 勇, 秦 伟, 王艳华, 阴正勤 (第三军医大学西南医院全军眼科中心, 重庆 400038)

提 要: 目的 建立人、猪虹膜色素上皮细胞培养的方法, 比较人、猪虹膜色素上皮细胞形态及生长特性。方法 用酶辅助的显微刮除+酶消化法获得的人、猪 IPE 细胞进行培养, 行组织学观察。结果 原代培养的人、猪 IPE 细胞在形态及生长特性上存在一定的差异, 但随着传代差异减小或无差异。结论 在 IPE 细胞的培养中, 酶消化时间的长短对单层 IPE 细胞的获得和细胞活力的保持非常重要。

临床上一些眼科致盲疾病, 诸如增龄性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD), 因存在视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞功能异常而导致脉络膜新生血管形成, 感光细胞变性, 视力下降。目前认为, 体外培养的自体或同种异体 RPE 细胞进行移植是治疗 ARMD 的有效方法, 许多学者做了这方面的研究[1,2], 结果说明 RPE 自体移植能获得成功, 可以避免免疫排斥反应, 但问题是自体 RPE 细胞很难获取; 而同种异体移植, 免疫排斥反应的发生往往导致移植失败。由于虹膜色素上皮(iridal pigment epithilium, IPE)细胞和 RPE 细胞来源于同一胚层, IPE 细胞在形态、色素生成、吞噬光感受器外节、表达重要的细胞因子及其受体等功能方面与 RPE 细胞具有相似之处, 而且自体 IPE 细胞易获取。因此, IPE 细胞的培养以及探讨代替 RPE 用于自体移植的研究, 近年来已引起重视。因人眼材料紧缺, 国外报道用大鼠、猴[3,4] 作为 IPE 移植的动物模型, 但是我们考虑大鼠眼球小, 作玻璃体切割手术及 IPE 细胞移植时操作非常困难, 猴又难以获取, 造价高; 而获取猪眼非常经济、便利, 眼球大小适合手术操作。本实验在建立 IPE 细胞培养方法的基础上, 比较人、猪 IPE 细胞形态及生长特性, 为下一步进行 IPE 移植研究提供重要的指导意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

自愿捐献的意外死亡的正常成人眼球 5 只, 由本科室眼库提供; 成年家猪眼球 5 只。死后 30 min 内取出眼球。

1.2 眼球处理

人眼用 80 万 U/500 ml 庆大霉素的生理盐水冲洗, 仔细修剪筋膜, 置于 80 万 U/500 ml 庆大霉素的生理盐水中浸泡 15 min, 重复 1 次; 猪眼置于 0.5% 碘伏液中浸泡 15 min, 再用 80 万 U/500 ml 庆大霉素的生理盐水充分冲洗并浸泡 15 min。

1.3 IPE 细胞的分离培养

参照 Hu 等[5] 方法, 将眼球置于玻璃培养皿中, 自眼球赤道部环行剪开眼球, 取角膜面向下沿虹膜根部剪下虹膜, D-Hanks 液洗 3 次, 滴加 0.02% 依地酸(ethylenediaminotetraacetic acid, EDTA)和 0.25% 胰酶联合消化液, 人眼 IPE 细胞 37 ℃第 1 次消化 60 min, 猪 IPE 细胞消化稍短约 40~50 min。在解剖显

作者简介: 曾玉晓(1977—), 女, 四川省自贡市人, 助理实验师。电话: (023) 68754403

通信作者: 阴正勤, 电话: (023) 68754401

收稿日期: 2003-07-17; 修回日期: 2003-11-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net