素对血管功能调控存在双向作用,血管处于收缩或舒张何种状态可能与胰岛素影响血管收缩和舒张机制有关。

参考文献:

[1] Mathias C J, Kimber J R. Postural hypotension: causes, clinical features, investigation, and management[J]. Annu Rev Med, 1999, 50(3): 317-316.
[2] Haffner S M. Metabolic predictor of hypertension[J]. J Hypertens, 1999, 17(Suppl): S23-S28.
[3] Anderson A E, Mark A L. The vasodilator action of insulin implications for the insulin hypothesis of hypertension[J]. Hypertension, 1993, 21(2): 136-141.
[4] Leaderach-Hofmann K, Weidmann P, Ferrari P. Hypovolemia contributes to the pathogenesis of orthostatic hypotension in patients with diabetes mellitus[J]. Am J Med, 1999, 106(1): 50-58.
[5] 沈稚舟, 吴松华, 邵福源 主编. 糖尿病慢性并发症[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 113-131.
[6] 高 妍. 糖尿病与高血压的治疗进展[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(10): 714-716.
[7] 胡靖华, 贾国良. 高浓度胰岛素在心血管系统的非代谢效应[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1999, 15(5): 308-309.
[8] Kawaguchi M, Koshimura K, Murakami Y, *et al*. Antihypertensive effect of insulin *via* nitric oxide production in the Zucker diabetic fatty rat, an animal model for non-insulin-diabetes mellitus[J]. Eur J Endocrinol, 1999, 140(5): 341-349.
[9] Begum N, Song Y, Rienzie J, *et al*. Vascular smooth muscle cell growth and insulin regulation of mitogen-activate protein kinase in hypertension[J]. Am J Physiol, 1998, 275(Part 1): C42-C49.
[10] Zhu Z M, Tepel M, Neusser M, *et al*. Concentration-dependent effect of insulin on calcium influx in vascular smooth muscle cells of normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. Clin Sci, 1993, 85(8): 425-429.

(编辑 潘式文)

文章编号: 1000-5404(2001)04-0467-01

经验与短篇

大鼠肺微血管内皮细胞的G蛋白亚型鉴定

Identification of protein G subtypes in rat pulmonary microvascular endothelial cells

方传彪, 孙耕耘, 葛东强, 杨 青 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

本实验拟在体外培养大鼠肺微血管内皮细胞(RPMVECs)的基础上,用免疫细胞化学S-P法和免疫荧光细胞化学间接法检测RPMVECs膜G蛋白亚型。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM培养干粉(美国GIBICO公司);荧光(FITC)结合的羊抗兔抗体、兔抗大鼠IgG抗体免疫血清(北京中山公司);Gsα、Giα和Gqα兔抗大鼠抗体(IgG)(Santa Cruz Biotechnology. Inc)。

1.2 检测RPMVECs G蛋白亚型方法

1.2.1 免疫细胞化学S-P法 RPMVECs经4%多聚甲醛固定,3%H_2O_2封闭,10%山羊血清孵育后加入1∶150第一抗体(Gsα、Giα和Gqα兔抗大鼠抗体),对照组加入兔抗大鼠IgG免疫血清,4 ℃过夜,PBS漂洗后加入1∶200生物素标记第二抗体,孵育30 min后加入链亲和素-过氧化物酶,PBS漂洗后加入新鲜配制的0.03% H_2O_2/0.05%DAB,显色10 min后终止反应。

1.2.2 免疫荧光细胞化学间接法 RPMVECs经4%多聚甲醛固定,山羊血清+0.3%Triton X-100孵育后加入1∶150的第一抗体,对照组加入兔抗大鼠IgG免疫血清,PBS漂洗后加入1∶150第二抗体(FITC),置荧光显微镜下观察。

2 结果

免疫细胞化学S-P法:RPMVECs分别与Gsα、Giα和Gqα兔抗大鼠抗体结合后染为棕黄色,对照组为阴性。免疫荧光细胞化学间接法:RPMVECs分别与Gsα、Giα和Gqα兔抗大鼠抗体结合后再与FITC标记的羊抗兔抗体结合而呈黄绿色荧光,对照组为阴性。

3 讨论

本实验按文献[1]成功地分离、培养并鉴定RPMVECs。G蛋白存在于细胞膜内侧面,故用Triton X-100增加膜通透性而不改变膜抗原性。

免疫细胞化学S-P法是标记抗体与标本中抗原结合,用PBS洗去未结合成分,然后用辣根过氧化物酶显色。在用第一抗体前,加入制备第一抗体的动物非免疫血清封闭细胞上带电荷基团,除去第一抗体的非特异结合,减少非特异性背景染色[2]。本实验用兔抗大鼠IgG免疫血清替代Gα抗体作为对照。重复4次,结果RPMVECs分别与Gsα、Giα和Gqα兔抗大鼠IgG抗体结合而被染为棕黄色,对照组为阴性。免疫荧光细胞化学间接法是第一抗体与标本结合,然后再与FITC标记的第二抗体结合,阳性结果为发出黄绿色荧光。本实验第一抗体分别为兔抗大鼠IgG抗体。对照组用兔抗大鼠免疫血清替代第一抗体。重复4次,结果RPMVECs分别与Gsα、Giα和Gqα兔抗大鼠IgG抗体结合后,与FITC标记二抗再结合发出黄绿色荧光,对照组为阴性。

本实验表明,RPMVECs存在Gsα、Giα和Gqα 3种G蛋白亚型。为研究G蛋白在信号转导中的作用打下基础。

关键词: G蛋白; 微血管内皮细胞; 鉴定
中图法分类号: R322.13 文献标识码: B

参考文献:

[1] 肖贞良, 孙耕耘, 钱桂生. 肺循环灌注对大鼠肺微血管内皮细胞分离和培养的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(11): 1 053-1 054.
[2] 蔡文琴, 王伯弥 主编. 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. 10-12.

(编辑 汪勤俭)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070334)
作者简介: 方传彪(1965-), 男, 福建省福州市人, 副主任医师, 主要从事急性呼吸窘迫综合征方面的研究, 现在解放军442医院内科, 福州 350015。电话: 13618387156
收稿日期: 2000-10-28; 修回日期: 2001-01-14

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