tance after burns. **Methods**: After the rats were inflicted with 20% TBSA full-thickness skin burns and intraperitoneally injected with endotoxin at a dose of 1 mg/kg, the dynamic changes of serum levels of TNF-α and NO were determined, the alterations of binding activity of insulin receptor (IR) derived from skeletal muscle cytomembrane and its tyrosine protein kinase (TPK) activity were observed and the effects of sodium nitroprusside, a NO donor, on IR TPK activity of *in vitro* skeletal muscle cytomembrane were evaluated *in vitro*. **Results**: After burns in combination with endotoxemia, the serum contents of TNF-α and NO were significantly increased. These changes were more evident and earlier than those in the rats with burns or endotoxemia alone. Moreover, the IR TPK activity was markedly decreased by sodium nitroprusside, which could be ameliorated by hemoglobin, a NO scavenger. **Conclusion**: TNF-α and NO, which are synthesized by many sorts of cells stimulated by endotoxin, interfere IR signal transduction and induce insulin resistance through suppressing the IR TPK activity.

Key words endotoxin; insulin receptor; insulin resistance; tyrosine protein kinase; tumor necrosis factor α; nitric oxide; rat

ABC LSAB和 SP三种免疫组化方法的结果比较

A comparison of ABC LSAB and SP in immunohistochemical staining

李增鹏* 陈 俐 王 东 高奉浔 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科) 重庆,400042

随着抗体制备技术的发展,应用 ABC法检测抗原的种类越长越多,并广泛应用于病理诊断及鉴别诊断和各种科研。近年来抗生物素蛋白链菌素(Streptavidin)应用于免疫组织化学技术[1],建立起了 LSAB(Laballed streptavidin biotin method)和 SP(Streptavidin peroxidase conjugate method)使得免疫组化技术得到更快的发展,促进其在国内诊断病理学及其它各项研究中的应用。我室近年来应用以上三种方法对石蜡切片的临床诊断和科研工作,拟将这三种方法的应用作一比较。

1 材料与方法

1.1 材料

系 1986~1990年间我室已知大肠癌 P21染色阳性的标本,10%福尔马林固定,4μm石蜡切片。

1.2 试剂

所用 P21单克隆抗体和 LSAB试剂盒为 DAKO公司产品,ABC试剂盒和 SP试剂盒为 Zymed公司产品(购自北京中山生物技术公司)。

1.3 方法

用棋盘滴定法检测出第一抗体及各试剂盒的二、三抗体最佳浓度后,按下列步骤进行染色。

ABC法:① 切片常规脱蜡至水洗。② 胰蛋白酶(0.1%)消化切片 37℃ 20 min。③ PBS洗 3× 5 min。④ 3% H_2O_2 10 min后 PBS洗 3× 5 min。⑤ 滴加正常小牛血清(10%) 10 min。⑥ 第一抗体(P21 1∶200) 37℃ 60 min(阴性对照用 PBS代替一抗)。⑦ PBS洗 3× 5 min。⑧ 第二抗体 37℃ 30 min。⑨ PBS洗 3× 5 min。⑩ 第三抗体 37℃ 30 min。⑪ PBS洗 3× 5 min。⑫ DAB显色 5 min。⑬ 水洗、苏木素复染、封片。

LSAB SP法:① 一抗(1∶200) 37℃ 20 min。② 二抗(LSAB 1∶250, SP 1∶450)室温 20 min。③ 三抗(LSAB 1∶250 SP 1∶450)室温 20 min。④ DAB显色、苏木素复染、封片。

2 结果

将 14例大肠癌标本在同一蜡块上用 P21单克隆抗体通过 ABC, LSAB和 SP三种方法进行检测,结果见表 1。

本组染色强度及稀释度结果显示 SP> LSAB> ABC, SP, LSAB同 ABC法相比较为突出,染色背景 SP法与 LSAB两者无明显差异,但同 ABC法比较则染色背景清晰,且没有交叉反应及非特异染色。此外,在对三组观察中,发现 ABC组染色有三例显示交叉反应。(不同种系的 IgG分子结构是相似的,因此抗一种动物的 IgG可能与另一种动物的 IgG起交叉反应。越是种系发生上接近交叉反应越强)。在 14例大肠癌切片中显示强阳性者 SP, LSAB组分别有 7例和 6例, ABC组染色为 0。当三种主工作浓度分别为 SP 1∶450, LSAB 1∶250, ABC 1∶150时,三者结果有明显差异, SP为 1∶450相当于 LSAB 1∶250和 ABC1∶150, SP染色强度和背景均优于 ABC法。在染色时间上 ABC(从滴加正常血清到显色)为 4 h, SP和 LSAB(从滴加正常血清到显色)为 1.5 h。另外,在价格和实用价值上,三种试剂也较有参考意义,按 100μl计 SP试剂也优于 LSAB和 ABC,每张切片按 50μl计, ABC试剂做 300张切片, LSAB试

* 李增鹏,男,40岁,主管技师

(下转 570页)

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

学分册, 1996, 23(5): 287
10 Wada Y, Kataoka H, Yokose S, *et al*. Changs in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. Bone, 1998, 22(5): 479
11 Wergedal J E, David J B. Characterization of cells isolated and cultured form human bone. Proc Soc Exp Biol Med, 1984, 176(1): 60
12 Wlodaski K H. Properties and origin of osteoblasts. Clin orthop, 1990, 252(3): 276

(收稿: 1999-02-26;修回: 1999-07-22)
(编辑 张大春)

Screening and identification of osteoblast clone derived from fetal rabbit calvarial bone *in vitro*

Tang Kanglai, Wu Meiying, Yang Liu, Lu Weizhong, Li Jianfu, Cao Jia, Liu Shengxue (Departiment of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To screen and identify the osteoblastic strain derived from fetal rabbit calvarial bone. **Methods**: Routine cell isolation and culture techniques were used to screen the osteoblastic clone from fetal rabbit calvarival cells. Morphology of cells and chromsome, immunohistochemical technique, were used to identify the cell strain. **Results**: The morphology of primary cells cultured *in vitro* were diversed, suggesting a multiple origin of the cloned cells. The morphology of the cloned cells were uniform. ALP stain and BMP immunochemical stain were strong positive. Calcipoxy stain showed the cell line had osteogenetic property. Chromosome diploid and kept in steady state. **Conclusion**: The osteoblastic strain has the morphological, biological genetical characteristics of osteoblasts.

Key words osteoblasts; cell culture; cell strain; cell clone

(上接 566页)

剂能做 500张切片,而 SP试剂可做切片 900张。由此可见三种试剂和方法在以上几方面有着明显差异和不同,见表 1。

表 1 ABC LSAB和 SP三者的比较

项目	稀释度	阳性率(%)			背景染色	时间(h)	属性	价格
		+	++	+++				(100μl)元
ABC	1∶150	3	97	0	+(-)	4	有	350
LSAB	1∶250	0	95.5	4.5	(-)	1.5	无	225
SP	1∶450	0	94.7	5.3	(-)	1.5	有	235

+: 弱阳性; ++: 阳性; +++: 强阳性

3 讨论

实验结果初步显示 SP法, LSAB法在敏感性,背影清晰度及稀释度等均优于 ABC法。 ABC复合物是将过氧化物酶结合在生物素上,再将该生物素过氧化物酶结合物与过量的卵白素(Avidin)反应而成[2]。 ABC中 A系来自鸡蛋白,它的等电点为 10.5,与组织间有较大的静电相互作用。其糖位结合点易与组织中的某些蛋白结合,尤其某些组织和细胞本身含有生物素者更易结合,另外含过剩标记物的 ABC复合物常带有负电荷,能粘连到组织的带阳电荷的部位。因而它能经常显示出非特异性染色。而 SP和 LSAB是从一种链霉素中分离的蛋白质,不含糖基链[1,3]。分子量为 60 kd,等电点为 5.6~6.7,接近中性,几乎不与组织中的内源性凝集样物质发生非特异性结合。由于其本身的分子量小, ABC复合物分子量大,因而它穿透组织的能力比 ABC复合物大,反应速度快。这即是 SP LSAB不易发生非特异染色,背影更加清晰及稀释度更高的原因。

通过大肠癌石蜡切片中 P21蛋白免疫组化检测,从稀释度、敏感性、非特异性染色、属性和价格等方面对 ABC、LSAB和 SP三种方法进行了比较,结果显示 SP法优于 LSAB和 ABC法而 LSAB法则优于 ABC法。该结果对实际工作中有一定指导意义。

关键词 免疫组化; P21;抗体
中图法分类号 R392-33

参考文献

1 施作榕.链霉菌亲生物素蛋白-生物素酶标免疫组化染色法的初步研究.中国免疫学杂志, 1986, 2(3): 169
2 刘彦仿.免疫组织化学.北京: 人民卫生出版社, 1990. 84~86
3 染英杰,凌启波.一种快速高敏感的免疫组织化学染色-LSAB法.中华病理学杂志, 1993, 22(6): 369

(收稿: 1998-12-05;修回: 1999-03-31)
(编辑 陈聪连)

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