DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.015

大鼠心肌细胞阴离子交换蛋白免疫细胞化学定位的研究

黄 坚* 钱桂生** 李隆贵 夏前明** 张献全** (第三军医大学附属新桥医院心血管内科)重庆,400037

提 要 目的:观察带3样蛋白(AE1)在成年大鼠心肌细胞的免疫细胞化学定位,并对其生物学意义作初步的探讨。方法:采用免疫细胞(组织)化学酶染色法及免疫荧光技术研究带3样蛋白在心肌细胞的定位,第一抗体为红细胞带3蛋白单克隆抗体。结果:免疫化学酶染色显示带3样蛋白存在于成年大鼠心肌细胞膜及膜的皱褶或折入处,免疫荧光法显示带3蛋白单克隆抗体标记了心肌细胞膜和肌纤维横纹结构的部位。结论:阴离子交换蛋白(AE)免疫细胞化学定位表明该蛋白分布于心肌细胞膜及肌纤维横纹结构的部位,这种分布特性提示AE在精确调节细胞内pH神经体液刺激的信号传导及将收缩蛋白和细胞骨架"铆定"到胞膜的过程中起着非常重要的作用。

关键词 阴离子交换蛋白;免疫细胞化学;Cl^-/HCO_3^-交换;免疫荧光技术

中图法分类号 R341;R392.31

阴离子交换蛋白(Anionic exchanger, AE)是一大家族蛋白,广泛分布于脊椎动物细胞,主要存在于浆膜面,具有Cl^-/HCO_3^-交换功能,在调节细胞酸碱平衡、维持细胞内稳定的pH过程中起着非常重要的作用。近年来初步研究表明心肌存在AE,但报道极少[1]。本实验首次采用免疫酶(荧光)细胞(组织)化学技术对AE在心肌细胞的分布进行研究,并对其生物学意义作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 2~3月龄正常Wistar大鼠20只,体重150~250 g,性别不拘。

1.1.2 培养2~3周的正常成年Wistar大鼠心肌细胞。

1.2 主要试剂

带3蛋白单克隆抗体(小鼠Band 3单克隆抗体IgG2a 0.2 ml, Sigma公司)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色试剂盒(S-P kit,福州迈新生物技术开发公司)、液体DAB酶底物显色试剂盒(DAB kit,来源同S-P kit)、FITC连接的羊抗小鼠抗体(北京中山生物技术公司)、HEPES(Sigma公司)、小鼠抗人α-actin单克隆抗体(来源同S-P kit)、DMEM(Gibco公司)。其它试剂均为国产分析纯。

1.3 研究方法及步骤

1.3.1 心肌组织取材 乙醚麻醉大鼠,颈动脉放血致死,剪开前胸壁,D′Hanks液30 ml行主动脉逆行灌注心脏,冲尽残余血液。取左心室游离壁心肌,切成0.3 cm×0.5 cm×0.8 cm大小心肌块,即刻置液氮速冻2 h,作冰冻切片,厚度为14 μm。

1.3.2 心肌细胞培养及鉴定 培养按文献[2,3]方法加以修改。以小鼠抗人α-actin单抗鉴定培养细胞。

1.3.3 染色过程 按S-P试剂盒并略有修改,所有孵育过程均在湿盒内进行。主要步骤如下,以免疫酶化学为例:

1.3.3.1 丙酮固定冰冻切片10 min或取已固定的粘附有培养心肌细胞的玻片。

1.3.3.2 用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)漂洗3次,每次5 min。

1.3.3.3 滴加50 μl过氧化酶阻断溶液(试剂A),以阻断内源性过氧化酶活性,37℃孵育45 min。

1.3.3.4 PBS漂洗3×5 min。

1.3.3.5 滴加50 μl正常山羊血清(试剂B),以减少非特异性背景染色,37℃孵育45 min,吸去多余的液体,不要漂洗。

1.3.3.6 滴加50 μl 1∶40稀释度的带3蛋白单抗,37℃孵育60 min,然后4℃过夜(20 h以上)。

1.3.3.7 PBS漂洗3×5 min。

1.3.3.8 滴加50 μl生物素标记的第二抗体(试剂C),37℃孵育45 min。

1.3.3.9 PBS漂洗3×5 min。

1.3.3.10 滴加50 μl链酶菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液(试剂D),37℃孵育45 min。

1.3.3.11 PBS漂洗3×5 min。

1.3.3.12 滴加100 μl新鲜配制的DAB显色液,镜下观察10 min。

1.3.3.13 自来水冲洗,苏木素复染,中性树胶封片。

阴性对照采用空白对照。

* 黄 坚,男,34岁,主治医师,讲师,博士,现在第四军医大学流行病学教研室 西安,710032

** 全军呼吸内科研究所

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

免疫荧光染色方法加一抗反应步骤同上,以后按下述顺序进行: 滴加 50μl 1∶8稀释度的荧光抗体, 37℃孵育 45 min;倾去存留的荧光抗体, PBS漂洗 3× 5 min;蒸馏水漂洗 1 min,以除去盐结晶;用 50% 缓冲液(0.5 mol/L碳酸盐缓冲液 pH 9.0 ~ 9.5)甘油封片;在 Olympus荧光显微镜下观察、照相. 吸收波长 495 nm,发射波长 530 nm.

1.4 结果分析

在普通光镜或荧光显微镜下观察玻片上心肌组织或细胞 AE染色及分布情况,并照相.

2 结果

2.1 培养细胞的鉴定

倒置显微镜下观察分离及培养的细胞呈矩形或不规则形,横纹清晰可见,小鼠抗人α-actin单抗免疫酶化学染色显示肌纤维部位有棕黄色免疫颗粒沉积,分布与肌纤维排列方向一致. 据上述特点,证实培养细胞为心肌细胞.

2.2 抗体最佳稀释度测定

从表 1可见,第一抗体稀释到 1∶40时阳性结果呈强阳性,背景染色为阴性,表明 1∶40为一抗最佳稀释度.

第二抗体为 S-P试剂盒中生物素标记的二抗(兔抗小鼠),工作液稀释度为最佳稀释度.

2.3 培养细胞 AE免疫酶化学染色

光镜下观察沿细胞膜有棕黄色免疫沉积,呈线状、长条状或斑片状,胞浆中、胞膜皱褶或折入处可见斑点状颗粒沉积. 阴性对照未见免疫沉积物,见图 1. 2

表 1 第一抗体稀释度试验

Tab 1 Optimal dilution test of primary antibody

Dilution concentration of primary antibody	Intensity of specific staining	Intensity of non-specific background-staining
1∶10	ⅢⅢ	++
1∶20	ⅢⅢ	+
1∶40	ⅢⅢ	-
1∶80	++	-
1∶160	+	-
Negative control	-	-

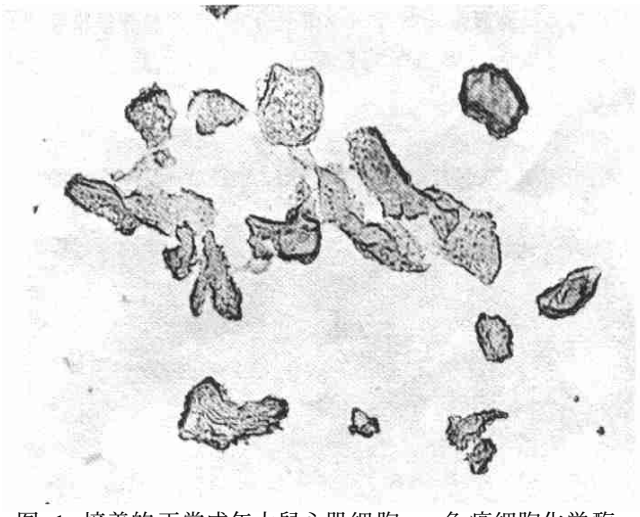


图 1 培养的正常成年大鼠心肌细胞 AE免疫细胞化学酶染色阳性　可见沿胞膜有棕黄色颗粒分布,胞膜皱褶或折入处也见类似颗粒沉积 (ICC/S-P× 400)

Fig 1 Immunocytochemical localization of AE in cultured adult rat cardiomyocytes Light brown immune reaction granules present in the sarcolemma, similar granules seen in the rugae or invaginations of sarcolemma too (ICC/S-P× 400)

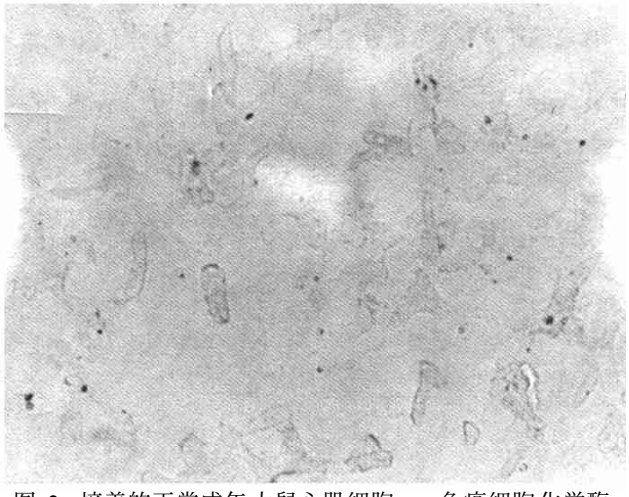


图 2 培养的正常成年大鼠心肌细胞 AE免疫细胞化学酶染色阴性对照　未见棕黄色免疫颗粒沉着 (ICC/S-P× 200)

Fig 2 Immunocytochemical localization of AE in cultured adult rat cardiomyocytes negative control Light brown immune reaction granules not seen (ICC/S-P× 200)

2.4 心肌组织 AE免疫酶化学染色

光镜下观察到阳性着色部分为沿着心肌细胞膜呈粗线条状棕黄色免疫沉积物,不规则,有些部分粗糙、凹凸不平,有些部分变细. 有些心肌细胞膜皱褶处也见到类似免疫沉积物. 核周可见到免疫沉积. 成纤维细胞和心肌间质未见到免疫沉积物. 阴性对照切片未见免疫着色,见图 3. 4

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

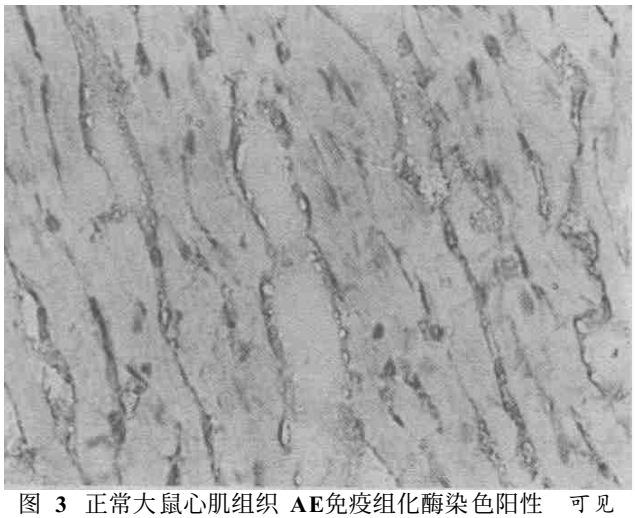


图 3 正常大鼠心肌组织 **AE**免疫组化酶染色阳性 可见沿细胞膜及其皱褶处有棕黄色颗粒沉积 (ICC/S-P+ 苏木精复染× 400)

Fig 3 Immunocytochemical localization of AE in adult rat cardiac tissues Light brown immune reaction granules present in the sarcolemma and its rugae (ICC/S-P+ Haematoxylin× 400)

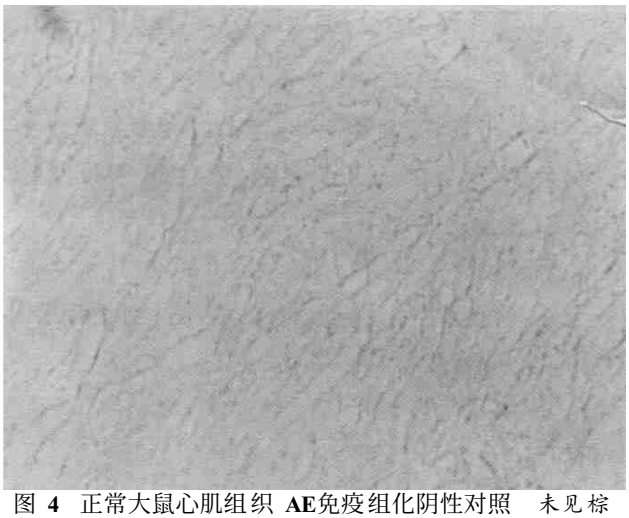


图 4 正常大鼠心肌组织 **AE**免疫组化阴性对照 未见棕黄色免疫颗粒沉积 (ICC/S-P× 200)

Fig 4 Immunocytochemical localization of AE in adult rat cardiac tissues, negative control Light brown immune reaction granules not seen (ICC/S-P× 200)

2.5 培养细胞及心肌组织 AE免疫荧光染色

光镜下可见整个细胞着黄绿色荧光,以胞膜为主;心肌组织切片可见沿胞膜呈线状黄绿色荧光分布,胞浆肌纤维横纹部位可见荧光染色,与横纹排列方向一致,见图 5 6

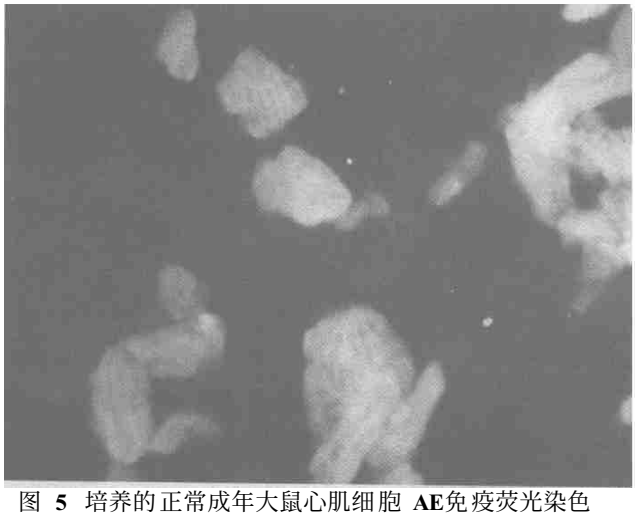


图 5 培养的正常成年大鼠心肌细胞 **AE**免疫荧光染色 可见胞膜着黄绿色荧光 (免疫荧光× 400)

Fig 5 Immunofluorescence staining of AE in cultured adult rats cardiomyocytes Kelly fluorescence present in the sarcolemma (Immunofluorescence staining× 400)

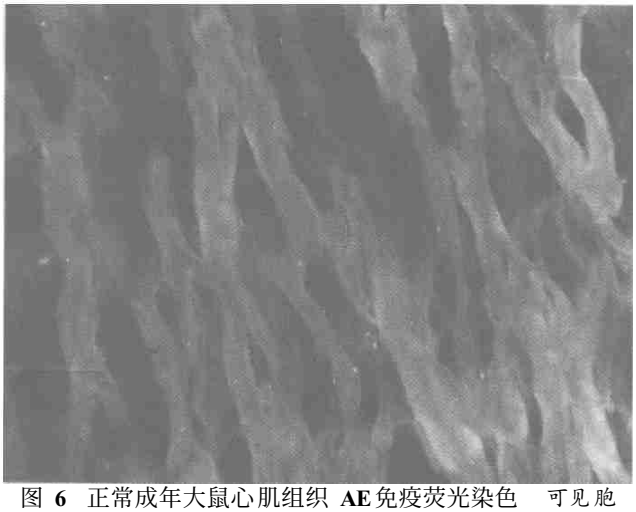


图 6 正常成年大鼠心肌组织 **AE**免疫荧光染色 可见胞膜及肌纤维横纹部位着黄绿色荧光 (免疫荧光× 200)

Fig 6 Immunofluorescence staining of AE in adult rats cardiac tissues Kelly fluorescence present in the sarcolemma and cross striations (Immunofluorescence staining× 200)

3 讨论

免疫细胞(组织)化学方法对细胞或组织内特异抗原的显示、定位具有高度特异敏感的特点。S-P试剂盒中链霉菌抗生物素蛋白(SA)穿透组织的能力比ABC PAP复合物大,反应速度快;SA几乎不与组织中的内源性凝集样物质发生非特异结合,因此 S-P放大系统更为敏感、特异、简便。本实验采用带 3蛋白单克隆抗体作为第一抗体以识别特异的细胞内带 3样蛋白。带 3蛋白是红细胞膜上具有 Cl^-/HCO_3^- 转运功能

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

的一种膜通道蛋白,对红细胞内 pH调节起着重要作用。现已明确它是阴离子交换蛋白基因家族中的一类。已有研究表明心脏存在 AE基因,并有 mRNA表达,归为 AE_3,与脑组织 AE_3不同[4]。AE家族氨基酸序列同源性较高,疏水区域可达 80%[5]。因此,带 3蛋白单抗对心肌 AE抗原决定簇识别具有高度特异性,本实验得以证实。

本实验以免疫酶(荧光)细胞(组织)化学方法证实,心肌组织存在一种带 3样蛋白,主要分布于心肌细胞膜及肌纤维横纹部位,胞核周围也有分布。有研究报道大鼠肾脏髓质髓袢升枝粗段、升降枝细段、致密斑及内髓集合管上皮细胞基底侧膜也存在带 3样蛋白[6],称为 AE_2,具有 Cl^-/HCO_3^- 转运功能[7]。Puceat等[1]用免疫印迹分析证实成年及幼年大鼠心肌细胞膜存在这种带 3样蛋白,而且有两种分子量,各为 80×10^3 u和 120×10^3 u。用间接免疫荧光研究显示它们主要位于肌膜及沿 T管分布,并存在于 Z线。Korichneva等[8]对新生大鼠心肌发育期带 3样蛋白的亚细胞分布作了进一步研究,发现刚出生时主要位于细胞膜,培养 6 d时胞膜、肌丝及胞核均存在带 3样蛋白,认为这是由于培养条件所造成,因为心肌细胞处于发育期,要维持表型,需伸长与邻近细胞通讯,细胞骨架发育增快所致。

本实验表明心脏 AE呈膜性分布,提示它是一种膜蛋白。另有研究初步揭示它是一种膜通道蛋白,具有 Cl^-/HCO_3^- 转运功能[1]。心肌细胞内 pH调节方式主要有三种:① Na^+/H^+ 交换:排 H^+ 使细胞碱化;② Cl^-/HCO_3^- 交换:排 HCO_3^- 使细胞酸化;③ Na^+ 依赖性 Na^+/HCO_3^- 同(内)向转运:排 H^+ 使细胞碱化。排 HCO_3^- 主要取决于非 Na^+ 依赖性 AE的 Cl^-/HCO_3^- 转运功能。正常情况下 AE将细胞内 HCO_3^- 排出,同时将胞外 Cl^- 移入胞内,使细胞内呈酸化趋势;反之,亦可反向转运 Cl^- 和 HCO_3^-,因为 AE具有双向转运功能。心脏 AE的膜性分布允许心肌细胞精确调节细胞内 pH,防止代谢性 CO_2 水化产生的 HCO_3^- 局部聚集。这对于心肌细胞维持正常的兴奋—收缩耦联及心脏舒缩功能具有非常重要的意义。心肌细胞内 pH的维持对细胞信号传导、生长发育、代谢亦具有重要作用。本实验表明沿心肌细胞膜皱褶或折入处存在免疫沉积物,根据 T管的定义即心肌细胞膜内陷形成横小管(T管),故光镜下细胞膜折入处对应于超微结构 T管分布的位置,提示带 3样蛋白可能分布于 T管,但需免疫电镜进一步证实。另有研究表明,Na^+/Ca^{2+} 交换蛋白也沿肌膜和 T管分布[1]。我们知道 T管使细胞与胞外介质之间的离子交换表面延伸,因此离子交换蛋白的这种定位分布可能有重要的生理意义。已有研究提示 T管的作用可能把心室肌的肌原纤维基质分成若干功能单元,这些区域是连接肌原纤维到肌膜和 T管的部分,有人称之为"costameres"[1]。它可能作为心肌细胞功能亚单位发挥传导细胞外信号至细胞骨架及收缩蛋白等靶点的作用。本实验证实 AE分布于肌纤维,提示它像在红细胞一样可能还具有将收缩蛋白和细胞骨架"铆定"到胞膜的作用。

参考文献

1 Puceat M, Korichneva I, Cassoly R, *et al*. Identification of band 3-like protein and Cl^-/HCO_3^- exchange in isolated cardiomyocytes. J Biol Chem, 1995, 270(3): 1315

2 Hoffmann P, Richards D, Heinroth-Hoffmann I, *et al*. Arachidonic acid disrupts calcium dynamics in neonatal rat cardiac myocytes. Cardiovasc Res, 1995, 30(6): 889

3 Tytgat J. How to isolate cardiac myocytes. Cardiovasc Res, 1994, 28(2): 280

4 Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez H A, *et al*. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE_3 anion exchanger from human heart. Circ Res, 1994, 75(4): 603

5 Alper S L. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. Annu Rev Physiol, 1991, 53: 549

6 Alper S L, Stuart-Tilley A, Biemesderfer D, *et al*. Immunolocalization of AE_2 anion exchanger in rat kidney. Am J Physiol, 1997, 273(4 Pt 2): 601

7 Humphreys B D, Chernova M N, Jiang L, *et al*. NH_4Cl activates AE_2 anion exchanger in Xenopus oocytes at acidic pHi. Am J Physiol, 1997, 272(4 Pt 1): 1232

8 Korichneva I, Puceat M, Cassoly R, *et al*. Cl^-/HCO_3^- exchange in developing neonatal rat cardiac cells: Biochemical identification and immunolocalization of band 3-like proteins. Circ Res, 1995, 77(3): 556

(收稿: 1998-12-01;修回: 1999-06-17)

(编辑　王　红)

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

Immunocytochemical localization of anionic exchanger in myocardial cells in rats

Huang Jian, Qian Guisheng, Li Longgui, Xia Qianming, Zhang Xianquan (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To investigate the immunocytochemical localization of band 3-like proteins in adult rat myocardial cells and explore its biological significance. Methods: The localization of band 3-like proteins in the myocardial cells was determined with immunocytochemical enzyme staining and immunofluorescence in the adult rats. Monoclonal antibody against erythroid band 3 proteins was used as the primary antibody. Results: Enzyme staining revealed the presence of band 3-like proteins in the sarcolemma of cultured adult rat myocardial cells and invaginations into the cells. Immunofluorescence demonstrated that the membrane and transversal riblike structures in the myocardial cells were labeled by the monoclonal antibody. Conclusion: The immunocytochemical localization of the band 3-like proteins indicates that the proteins are located in the cell membrane and transversal riblike structures. This characteristic of localization of the proteins suggests that the proteins may play an important role in accurately regulating intracellular pH, signal transduction of neurohormonal stimuli and fixing contractile proteins and cellular skeleton to the membrane.

Key words anionic exchanger; immunocytochemistry; immunofluorescence

左上后牙区纤维性龈瘤伴中心大量骨化 1例报告

A case of ossifying fibrous epulis in left retromaxillary teeth region

陈 泽* 周洪亮** (四川省攀枝花市第二人民医院口腔颌面外科) 攀枝花, 617068

1 临床资料

患者林某,女,42岁,因左上后牙龈区无痛性包块 20年,4年来明显增大入院。专科检查:左颊部稍凹陷,张口不受限。$\frac{1\vdash 578}{}$缺失,$\frac{\vdash 6}{}$Ⅲ度松动。于$\frac{\vdash 67}{}$相应腭侧牙龈为蒂,向口腔凸起一包块,蒂周长约 4.0 cm,质软,包块大小约 6.0 cm× 5.0 cm× 4.0 cm,色泽同正常牙龈组织,表面光滑,质硬,无压痛。穿刺检查:未得任何物。上下颌骨全景片示:$\frac{\vdash 67}{}$牙槽突已消失。在局麻下行左上后牙龈区包块切除术,术中拔除$\frac{\vdash 6}{}$,见牙槽嵴已吸收变平。

病理检查:大体见灰白色椭圆形包块 1个。切面周边灰白,中央为一椭圆黄色、质硬组织,蜂窝状,大小约 3.5 cm× 2.2 cm 镜下示:包块由鳞状上皮被覆,上皮假瘤样增生,皮下主要为纤维组织围绕中央增生,有炎细胞浸润,靠中央处见纤维组织逐渐骨化,中央为大量大小不一,形态不规则,发育成熟的骨小梁,小梁之间见成熟的骨髓。病理诊断:左上后牙区纤维性牙龈瘤伴中心广泛骨化。

2 讨论

本病例病程长,包块大,并且中央广泛骨化,比较少见。牙龈瘤病理上可分为:肉芽性、纤维性、血管性、巨细胞性四种,而大量骨化性龈瘤少见。因此,临床医生要注意鉴别诊断,特别是与异位骨瘤相鉴别。治疗上采用手术切除。本病例术后 3月随访无复发。

关键词 牙龈瘤;上颌

中图法分类号 R739.8

参考文献

1 吴奇光.口腔组织病理学.北京:人民卫生出版社,1997.203~205

2 周树夏.手术学全集:口腔颌面外科卷.北京:人民军医出版社,1996.209~211

(收稿:1999-04-28;修回:1999-07-14)

(编辑 王 红)

* 陈 泽,男,33岁,主治医师

** 病理科

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