DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.01.023

参考文献

1 Chen Zongrong, Feng Jiang, Dong Yan, et al. Inhibitory effect of crude extract of burn eschar on mitochondrial function in rats. J Med coll PLA, 1987, 2(1): 40～45

2 Chen Zongrong, Xiong Ye, Wang Songbao, et al. Inhibition of mitochondrial respiraory function by an organic solvent extraotable component from an extract of burn eschar. Burns, 1991, 17(4): 282～287

3 Dittmer JC, Well MA. Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. Methods in Eezymology, 1969, 14: 482～530

4 Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem, 1959, 234(3): 466～471

5 李健斋. 用酶试剂测定血清甘油三酯(一步终点法). 中华医学检验杂志, 1987, 10: 262～265

6 贾维龙. 血清胆固醇酶法测定的方法学研究. 中华医学检验杂志, 1983, 6(4): 196～201

7 孙传经. 气相色谱分析原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 1979. 233～249

8 Suzuki K, Aoyama H, Izawa Y. Isolation of substance toxic to mitochnodrial function from the burned skin of rats. Burns, 1980, 8: 110～116

9 熊 业 陈宗荣. 烧伤及烧伤焦痂脂类对大鼠肝线粒体脂肪酸含量的影响. 第三军医大学学报, 1992, 14(4): 340～342

10 Daun G. Lipids of mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1985, 822: 1

11 Sparkes BG, Monge G, Marshall SL, et al. Plasma levels of cutaneous burn toxin and lipid peroxides in thermal injury. Burns, 1990, 16(2): 118～122

(收稿: 1993-05-22; 修回: 1993-12-15)

石蜡切片 ARF 免疫组化检测 P_{53} 蛋白的初步报告

王 东 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 630038

抗癌基因 P_{53} 定位于人类染色体 17p13[1]，其等位基因的缺失和突变在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。该基因编码一个 53kd 的核磷蛋白，称为 P_{53} 蛋白。正常情况下 P_{53} 蛋白半衰期很短，且极不稳定，而当其突变时，则与其它蛋白成份形成复合物在细胞核内聚集，从而可以用免疫组化的方法进行检测。但是，目前的 P_{53} 抗体仅适用于冰冻切片，对常规固定、石蜡包埋的组织反应极弱，难以观察，从而限制了它的应用，亦很大程度上困扰了目前的研究。

本文着重介绍一种新的抗原复性液 ARF(Antigen Retrieval Fluid)介导的方法，使得 P_{53} 蛋白免疫组化染色完全适用于常规固定、石蜡包埋的组织。

1 材料与方法

1.1 组织来源

85 例人原发性肝细胞性肝癌和 5 例胆管细胞癌均来源于我校附属西南医院病理科 1987～1992 年存档的石蜡包埋组织。癌组织作常规石蜡连续切片，片厚 5μm，分别做 HE 和免疫组化染色。

1.2 P_{53} 抗体

1.2.1 Pab1801(英国 ICRF, Dr. L. Crawford 惠赠)是人特异的抗 P_{53} 单克隆抗体，能识别人 P_{53} 多肽中位于第 32～73 氨基酸残基之间的抗原决定簇，与野生型和突变型均起反应。工作滴度 1∶5。

1.2.2 CM-1(英国 Dundee 大学, Dr. D. P. Lane 惠赠)为一种抗人 P_{53} 的兔 IgG 多克隆抗体，与野生型 P_{53} 起反应。工作滴度 1∶1000。

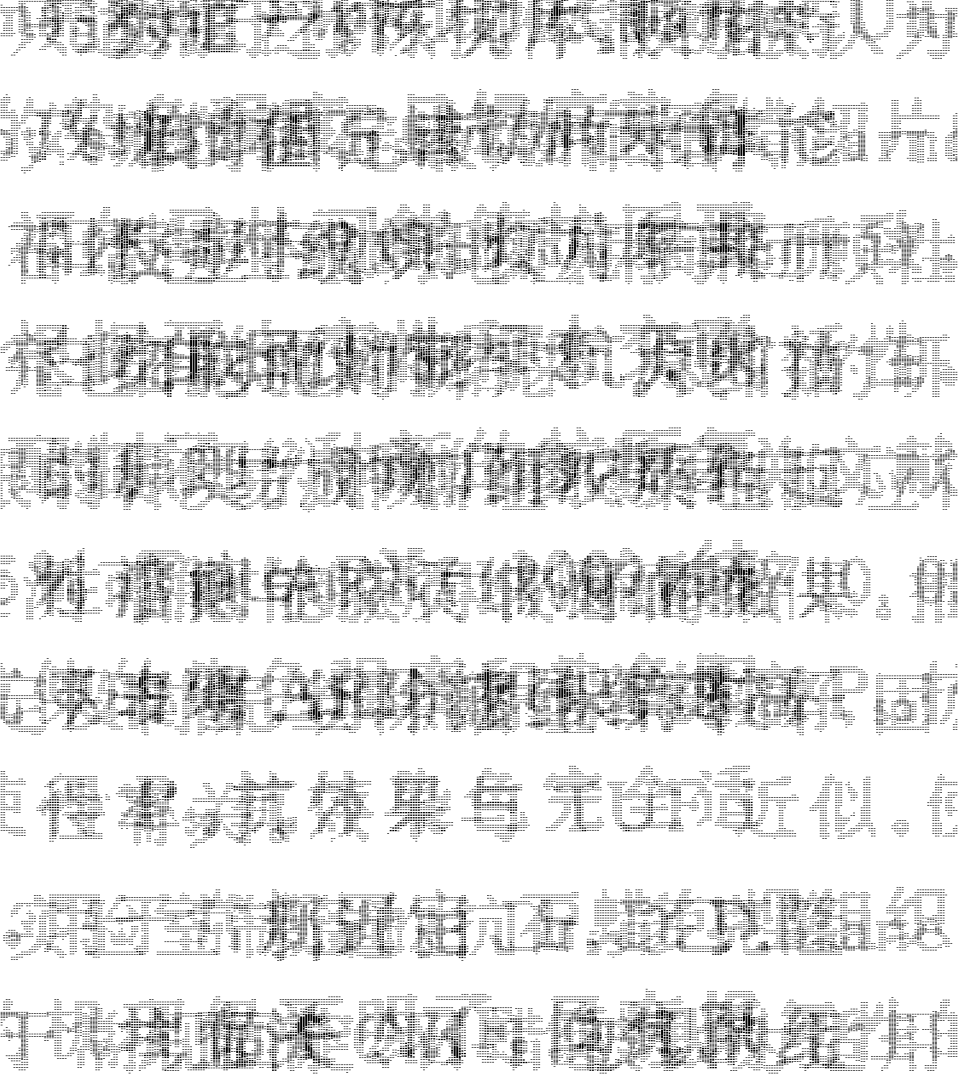
1.2.3 免疫组化染色：应用 Vectastain ABC 试剂盒(Vector Laboratories, Inc)，参照 Shi[2] 和 Ven den Berg 等[3] 报道的提高免疫组化染色强度的方法，改良如下：①载玻片预涂粘贴剂。②石蜡切片 5 μm，室温干燥，常规脱蜡，逐级酒精水化入水。③将切片放入含有 ARF 的带盖玻璃缸中，置于微波炉内。④将微波炉温度调至 95℃，加热 10 min。整个过程也可分 2 次，每次 5 min，间隔 1 min。⑤玻璃缸移出微波炉，室温冷却 15 min。⑥切片用蒸馏水和 PBS 各洗 5 min。⑦0.3% H_2O_2 甲醇液孵育 10～30 min，PBS 振洗 5 min。⑧正常血清孵育 30 min。⑨加单克隆抗体 Pab1801 和多克隆抗体 CM-1，37℃ 1 h，4℃冰箱过夜，PBS 振洗 5 min。⑩生物素化兔抗鼠或羊抗兔孵育 40 min，PBS 振洗 5 min。⑪ABC 液孵育 40 min，PBS 振洗 5 min。⑫DAB 显色。

1.2.4 对照设计：①不用微波炉加热，切片用 0.5% Triton 和 0.1% 胰酶预处理。②用蒸馏水替代 ARF，按上述方法染色。③用 PBS 代替一抗做阴性对照。

2 结果与讨论

组织切片经 Triton 和胰酶预处理 ABC 法免疫组化染色，85 例肝细胞性肝癌中 22 例阳性(25.8%)，5 例胆管细胞癌中 1 例阳性(20%)，但阳性反应很弱(如图 1 和 3 所示)。用 ARF 方法可非常显著地提高染色强度(如图 2 和图 4 所示)。85 例肝细胞性肝癌中 30 例阳性(35%)，5 例胆管细胞癌中 2 例阳性(40%)。以蒸馏水替代 ARF，亦见部分病例染色增强，但远不及 ARF 明显。

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



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

道用含有锌离子的福尔马林固定组织能较好地保存抗原[6]。常规福尔马林固定的组织用锌－福尔马林液重新固定亦能改善免疫反应[7]。ARF 中主要成份为锌离子，推测锌离子可能与抗原蛋白结合形成了可溶性复合物[8]，从而提高了免疫反应强度和检测灵敏度。

目前，微波在病理技术中已得到了广泛的应用，从组织固定到快速组织化学和免疫组化染色，亦见报道用微波炉干燥切片以增强染色强度的方法[9]。但所有这些都是在短时间、低温度条件下进行的。Shi 等[2]首次报道用微波炉加热切片近沸点，而明显提高石蜡切片免疫组化染色强度。关于微波使组织抗原暴露和复性的机理尚不清楚，可能与微波加热对福尔巴林固定的组织中交联蛋白的作用有关。以蒸馏水替代 ARF，未能有效地增强反应强度，提示 ARF 与微波炉加热有协同作用，共同促使组织抗原复性。

关键词 免疫组织化学；P_{53}蛋白

中图法分类号 R392.31

参考文献

1 Isobe M, Emanuel BS, Givol D, et al. Localization of gene for human P_{53} tumour antigen to band 17 p13. Nature, 1986, 320:84

2 Shi Shan-Rong, Key ME, Kalar KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histo and Cytochemistry, 1991, 39:741

3 Vandenberg FM, Baas IO, Polak MM, et al. Detection of P_{53} overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinoma using a novel target unmasking fluid. Am J Pathol, 1993, 142:381

4 Bertek J, Igg R, Gannon J, et al. Gentic and immunochemical analysis of mutant P_{53} in human breast cancer cell lines. Oncogene, 1990, 5:893

5 Barbareschi M, Iuzzolino P, Pennella A, et al. P_{53} protein expression in central nervous system neoplasmas. J Clin Pathol, 1992, 45:583

6 Herman GE, Chlipapa E, Bochenski G, et al. Zinc Formalin fixative for automated tissue processing. J Histotechnol, 1988, 11:85

7 Abbondanzo SL, Allred DC, Lampkin S, et al. Enhancement of immunoreactivity in paraffin embedded tissue by refixation in zinc sulfate-formalin. Proc Annu Meeting US and Canadian Acad Pathol. Boston: March, 1990. 4～9

8 Jones MD, Banks PM, Caron BL. Transition metal salts as adjuncts to formalin for tissue fixation. Lab Invest, 1981, 44:32A

9 Sharma HM, Kauffman EM, McGaughy VR. Improved immunoperoxidas staining using microwave slide drying. Lab Med, 1990, 21:688

（收稿：1993-06-17；修回：1993-12-21）

培养的人表皮细胞异体移植后转归判定的研究

赵阳兵 赵雄飞 黎 鳖 路淑珍 王 旭 （第三军医大学西南医院烧伤研究所）630038

培养的人表皮细胞用于临床，为大面积深度烧伤创面覆盖问题提供了一个新途径。较理想的是培养的自体表皮，移植后无排斥反应，可一步到位。然而自体培养表皮细胞从伤后取材到临床应用至少需时3～4周，不能达到早期覆盖创面的目的。而异体培养表皮则可预先培养，伤后早期即可应用于创面覆盖，不受时间限制。而且以往的研究已发现培养的人表皮细胞异体移植后，临床及组织学均未发现有排异现象，存活期明显延长，可能更具实用性。但因无令人信服的客观证据，培养表皮细胞异体移植后的转归尚存有争议。本研究的目的是对此问题进一步进行判定。

本研究先对38例烧伤和整形病人不同创面移植的93片（每片直径85mm）异体培养表皮进行了探讨，无论是临床观察（最短20 d，最长1年），还是组织学检查均未见明显排斥反应。继而为明确培养表皮细胞异体移植后的确切转归，本研究进一步建立了5种判定方法：①抗 A、B、H 间接酶标葡萄球菌 A 蛋白染色法；②DNA 指纹图谱法；③PCR 扩增片段长度多态性基因位点（pMCT118和 ApoB）；④HLA-DQ。基因位点 PCR 扩增、寡聚核苷酸探针反向打点杂交分型法；⑤PCR 扩增 Y 染色体特异性 DNA 片段。对16例病人不同创面移植的培养异体表皮上采取的27个活检标本进行检查，均发现有供者遗传标志，其中移植后30 d 以上者9个，最长时间为92 d。客观地证明了培养表皮细胞异体移植后的存活时间明显延长。

以往我们的研究曾表明：在表皮细胞移植排斥反应中起核心作用的 HLA-DR 抗原阳性 Langerhans 细胞经体外培养后几乎全部消失，而且这种培养的表皮细胞体外也不刺激异体淋巴细胞增殖。本研究进一步还发现培养表皮细胞的血型 ABH 抗原的表达明显弱于未培养者。因此可以认为，培养表皮细胞的抗原性减弱或消失，是异体移植后存活延长的主要原因。

实验结果还表明，配合分子生物学技术能够更加客观、准确、灵敏地对异体移植细胞的转归做出明确的判定。

关键词 表皮；细胞，培养 ；移植，异体

中图法分类号 R617

• 国家自然科学基金资助项目

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