

文章编号:1005-6947(2008)09-0892-05

· 基础研究 ·

贴壁细胞不同制片方法对膜蛋白光镜免疫组化显示性的影响

李红军¹, 崔文胜², 王永霞³, 李勇莉³, 高福莲³

(1. 新乡医学院第一附属医院 内科, 河南 卫辉 453100; 2. 河南省新乡市卫生学校 解剖教研室, 河南 新乡 453000; 3. 新乡医学院基础医学院 组胚教研室, 河南 新乡 453001)

摘要:目的 探讨贴壁细胞不同制片方法对膜蛋白光镜免疫组化显示性的影响。方法 培养贴壁细胞胃黏膜上皮 GES-1 细胞、胃癌 SGC7901 和胃癌耐药 SGC7901/VCR 细胞, 均制作细胞滴片和爬片; MDR-1 免疫组化染色, 部分甲基绿复染, 半定量分析免疫反应性。结果 在同一制片中, 无论滴片或爬片, 复染标本的每种细胞 MDR-1 的免疫反应性高于未复染者; 对于同一种细胞不论是否复染, 细胞滴片标本的 MDR-1 免疫反应性高于细胞爬片者; 在同一制片和染色的情况下, SGC7901 细胞和 SGC7901/VCR 及 GES-1 细胞的 MDR-1 表达水平有所不同, 但变化趋势一致。结论 贴壁细胞的滴片比爬片有更好的膜蛋白光镜免疫组化显示性。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 892-896]

关键词: 细胞培养技术; 贴壁细胞; 免疫组化; 膜蛋白

中图分类号: R 32

文献标识码: A

Effects of different preparation in anchorage-dependant cells on the immunohistochemical display of membrane protein under light microscope

LI Hongjun¹, CUI Wensheng², WANG Yongxia³, LI Yongli³, GAO Fulian³

(1. Department of Interl Medicine, the First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Weihui Henan 453100, China; 2. Department of Anatomy, Xinxiang Medical School, Xinxiang, Henan 453000, China; 3. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To explore the effects of different preparation in adherent cells on the immunohistochemical display of membrane protein under light microscope. **Methods** Anchorage-dependant cells were cultured which included three groups: Gastric epithelial cell GES-1, gastric cancer cell SGC7901 and gastric cancer cell SGC7901/VCR. The cells were seeded on coverslips or cytopinned on the microscopic slides, and the MDR-1 detected by immunohistochemical method. Some of the specimens were re-stain with methyl green for afterstain. Finally, semiquantitative analysis was carried out. **Results** The MDR-1 immunoreactivity (IR) of specimens with re-stain was higher than that without re-stain in the same cell line and the same preparation, no matter whether the cells were seeded on coverslips or cytopinned on the microscopic slides. As to the same cell line, no matter whether afterstain or not, the MDR-1 IR in the cells cytopinned on the microscopic slides was higher than that in the cells seeded on coverslips. The MDR-1 expression level was different among three group cells, but their tendency of change was consistent in the same preparation and the same re-stain. **Conclusions** The adherent cells cytopinned on the microscopic

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(072102310073)。

收稿日期: 2008-04-15; 修订日期: 2008-08-22。

作者简介: 李红军, 男, 新乡医学院一附院副主任医师, 主要从事内科疾病的基础和临床方面的研究。

通讯作者: 高福莲 E-mail: gfl@xxmu.edu.cn

slides have much better immunohistochemical display of membrane protein than those seeded on coverslips under light microscope.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 892 - 896]

Key words: Cell Culture Techniques; Anchorage-dependant Cells; Immunohistochemistry; Membrane protein

CLC number: R 32

Document code: A

细胞培养应用广泛,免疫组织化学是显示抗原定位的良好手段,两种技术结合在医药卫生研究中的应用很广^[1-7]。在相关著作中,有的免疫组化技术并未涉及培养细胞的标本制作方法^[8];有的将两种技术各成体系独立撰写,而在每一部分均未涉及培养细胞的标本制作方法^[9];即使有的提到了细胞滴片和爬片的制作方法,也未涉及它们在膜蛋白光镜免疫组化显示性方面的优劣^[10]。MDR-1 是 *mdr1* 基因的表达产物,主要分布在细胞膜上,发现于耐药肿瘤细胞。本研究采用培养胃黏膜上皮细胞 GES-1,胃癌细胞 SGC7901 和胃癌耐药细胞 SGC7901/VCR 制作细胞滴片和爬片,用免疫组化法染色,探讨贴壁细胞的滴片和爬片对膜蛋白光镜免疫组化显示性的影响,为贴壁细胞膜蛋白的研究提供标本制作选择的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

胃癌细胞 SGC7901 由本教研室保存;胃癌耐药细胞 SGC7901/VCR 由第四军医大学西京医院消化病研究所樊代明教授等建株并惠赠;人胃黏膜上皮细胞 GES-1 购自北京市肿瘤研究所遗传室。兔抗人 MDR-1 多克隆抗体 [Mdr (H-241) sc-8313, 美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc]; 生物素化的山羊抗兔 IgG, SABC 免疫组化染色试剂盒 (SA2002) 和 DAB 显色试剂盒 (AR1022) (武汉 Boster, Inc); RPMI1640 培养粉 (GIBCO, 美国 Invitrogen Corporation); 小牛血清 (TBD, 天津 H&Y Bio. Co); 甲基绿 (美国 Sigma-Aldrich Co)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 各种细胞生长于含 10% 灭活小牛血清, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素, 100 U/mL 青霉素的 RPMI1640 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养, 0.1% 胰蛋白酶消化传代。SGC7901/VCR 细胞的培养液中加入长春新碱 (VCR) 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以维持其耐药表型, 实验前 2 周停加 VCR。

1.2.2 标本制作

1.2.2.1 细胞滴片 用 0.1% 胰蛋白酶消化对

数生长期细胞至细胞回缩, 培养液终止消化, 轻轻吹打制成细胞悬液, 调节细胞浓度达 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 按 5 $\mu\text{L}/\text{片}$ 或 5 $\mu\text{L}/\text{斑点}$, 将细胞悬液滴涂于铬矾明胶预处理过的载玻片上。4 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 24 h, 40 g/L 多聚甲醛固定 10 ~ 20 min, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分洗涤, 贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。

1.2.2.2 细胞爬片 0.1% 胰蛋白酶消化对数生长期细胞, 传代于置有盖玻片的培养皿中, 常规培养 24 ~ 48 h, 0.01 mol/L PBS 洗涤, 40 g/L 多聚甲醛固定 10 ~ 20 min, 0.01 mol/L PBS 充分洗涤, 中性树胶将盖玻片固定于载玻片上, 贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2.3 SABC 免疫组化 从 -20 $^{\circ}\text{C}$ 取出的细胞滴片或爬片, 用冷风吹干 4 ~ 6 h, 3 mL/L Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 溶液透化处理 10 ~ 15 min; 倾去多余液体, 用 3 mL/L H_2O_2 水溶液封闭内源性过氧化物酶 5 ~ 10 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤; 滴加正常羊血清封闭 15 min; 滴加兔抗人 MDR-1 多克隆抗体 (1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜 (12 ~ 20 h), 室温下复温 1 h; 加生物素化山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG, 1:100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 45 min; 加 SABC (1:100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; DAB 显色, 蒸馏水洗; 将显色后的标本分为一式 2 份, 1 份不行甲基绿复染, 1 份进行甲基绿复染, 自然凉干, 香柏油封片。以 PBS 及正常羊血清代替一抗作为阴性对照。阳性染色呈棕褐色或棕黄色。

1.2.2.4 定量分析 油镜下, 随机观察 500 个细胞, 依据呈色强弱、分布部位和多少, 分级并积分^[11]。分级和积分标准: 阴性 (-), 细胞质和膜均无棕褐色或棕黄色颗粒, 积 0 分; 弱阳性 (\pm), 细胞质内有棕褐色或棕黄色颗粒, 积 1 分; 阳性 (+), 细胞膜上有棕褐色或棕黄色颗粒, 但未聚集成线, 积 2 分; 较强阳性 (++) , 细胞膜上有棕褐色或棕黄色颗粒, 聚集成线, 但未超过细胞周长 1/2, 积 4 分; 强阳性 (+++) , 细胞膜上有棕褐色或棕黄色颗粒, 聚集成线, 超过细胞周长 1/2, 积 8 分。

1.3 统计学处理

计算各级细胞百分率,求积分值;组间差异的显著性分析,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 两种制片的细胞 MDR-1 免疫反应性

各种细胞阳性着色部位主要在胞膜,呈颗粒

状,聚集成线,甚至环绕细胞周,胞质也可见阳性颗粒,滴片较爬片明显(图1)。滴片和爬片的阴性对照均未见阳性着色(图2)。SGC7901/VCR 细胞和 GES-1 细胞的 MDR-1 免疫反应性比较一致,SGC 7901 细胞多数呈阴性或弱阳性,个别细胞强阳性(图3)。

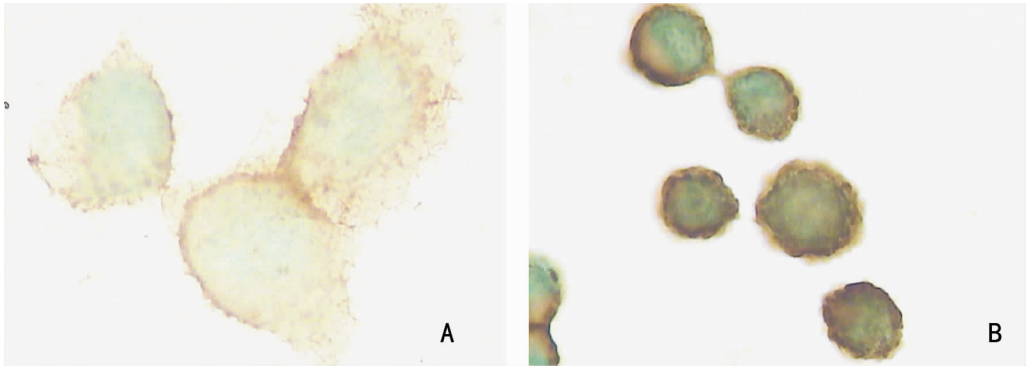


图1 SGC7901/VCR 细胞 MDR-1 免疫反应性 (SABC 23 × 100) A: 细胞爬片; B: 细胞滴片

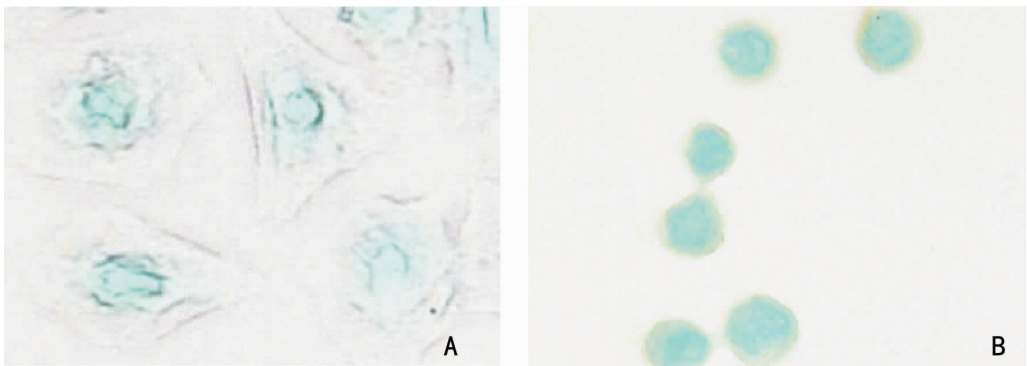


图2 SGC7901/VCR 细胞 MDR-1 免疫反应性阴性对照 (SABC 23 × 100) A: 细胞爬片; B: 细胞滴片

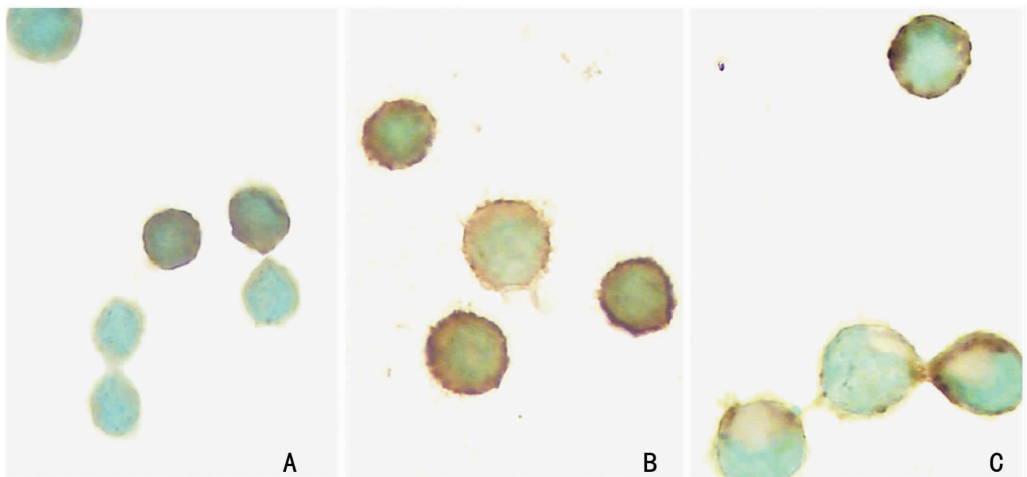


图3 各组细胞滴片 MDR-1 免疫反应性 (SABC 23 × 100) A:SGC7901 细胞; B:SGC7901 /VCR 细胞; C:GES-1 细胞

2.2 两种制片法对细胞 MDR-1 免疫反应性的影响

对 SGC7901 细胞,SGC7901/VCR,GES-1 细胞 MDR-1 免疫反应性的定量(表 1)进行统计学分析显示,无论细胞滴片或爬片,在同一种细胞同一制片方式中,进行了复染标本的 MDR-1 免疫反应性高于未进行复染者 ($P < 0.05$);对于同一种细胞不论是否复染,细胞滴片标本的 MDR-1 免疫反应性高于细胞爬片者 ($P < 0.05$);在同一制片和同一染色的情况下,SGC7901,SGC7901/VCR,GES-1 细胞的 MDR-1 表达水平有所不同,但变化趋势一致,SGC7901/VCR 细胞的 MDR-1 表达水平最高,GES-1 细胞其次,SGC7901 细胞最低(图 4)。

表 1 不同制片和复染与否对各组细胞 MDR-1 免疫反应性的影响

| 制片方式 | 免疫反应性 | SGC 7901 | | SGC7901/VCR | | GES-1 | |
|------|-------|----------|-----|-------------|-----|-------|-----|
| | | 复染 | 未复染 | 复染 | 未复染 | 复染 | 未复染 |
| 细胞滴片 | (-) | 70 | 325 | 0 | 0 | 30 | 180 |
| | (±) | 280 | 120 | 5 | 0 | 60 | 50 |
| | (+) | 90 | 50 | 15 | 5 | 50 | 80 |
| | (++) | 60 | 5 | 50 | 120 | 190 | 135 |
| | (+++) | 0 | 0 | 435 | 375 | 170 | 55 |
| 细胞爬片 | (-) | 370 | 445 | 0 | 40 | 0 | 115 |
| | (±) | 85 | 25 | 190 | 230 | 325 | 290 |
| | (+) | 30 | 15 | 60 | 70 | 110 | 80 |
| | (++) | 10 | 5 | 190 | 95 | 65 | 15 |
| | (+++) | 5 | 10 | 60 | 65 | 0 | 0 |

注:不同制片、复染与否各组细胞随机观察 500 个; 各组间两两构成比的比较,均为 $P < 0.05$

3 讨论

细胞膜是存在于细胞表面的单位膜,主要由蛋白质、类脂和多糖组成。细胞膜功能十分复杂,除对细胞起支持保护作用外,与细胞各种生命活动如细胞识别黏着、运动迁移、免疫应答、物质运输、信号转导、细胞分裂分化、衰老、病变和癌变都有密切关系,是近年来分子生物学研究的新领域。细胞膜蛋白是细胞功能的主要承担者。随着免疫学、分子生物学和蛋白组学的发展,认识和研究细胞膜蛋白的结构和功能仍然是生物科学研究的主题,免疫组化技术则是不可缺少的方法。MDR1 是细胞膜的跨膜蛋白,可主动地将物质由细胞内运输到细胞外。本研究选择 MDR1 为对象,探索贴壁细胞滴片和爬片对膜蛋白的光镜免疫组化显示性的影响,发现对于同一种细胞不论是否复染,细胞滴片的 MDR-1 免疫反应性高于细胞爬片者。提示贴壁细胞滴片对膜蛋白的光镜免疫组化显示性优于细胞爬片。这可能与贴壁细胞滴片的表面积小于爬片使滴片膜抗原的密度高于爬片者有关,也可能是贴壁细胞膜蛋白表达变化的研究多用滴片的原因^[12-14]。

本研究显示在同一制片和同一染色的情况下,SGC7901 细胞,SGC7901/VCR 细胞,GES-1 细胞的 MDR-1 表达水平有所不同,但变化趋势一致;SGC7901/VCR 细胞的 MDR-1 表达水平最高,GES-1 细胞其次,SGC7901 细胞最低。这些细胞的 MDR-1 表达水平差异趋势和对它们在 MDR-1 mRNA 和蛋白质表达水平综合分析得出的结果一致^[15-16],此等结果与标本制作、复染与否的不同属于系统误差有关,提示应该选用同一制片和同一染色才能真实反映不同细胞之间膜蛋白的表达差别。在同一种细胞同一制片方式中,复染标本的 MDR-1 免疫反应性高于未复染者。这是否与复染可以增强阳性着色有关,有待进一步探讨。

参考文献:

[1] 贺荣芳,胡忠良,文继筋. PTEN 基因对胃癌细胞株 SGC7901 生物学行为及血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 2 及 9 表达的影响[J]. 中华病理学杂志, 2007,36(5):324-328.

[2] 季亢挺,张怀勤,杨德业,等. 利用内皮祖细胞制备组织工程血管的实验研究[J]. 心脏杂志,2005,17(5):431-433.

[3] Schmidt T, Wahl P, Wüthrich RP, et al. Immunolocalization

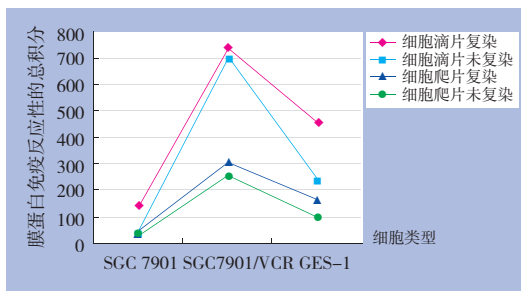


图 4 不同制片和复染与否对各组细胞 MDR-1 免疫反应性积分值的影响

- of phospho-S6 kinases: a new way to detect mitosis in tissue sections and in cell culture [J]. *Histochem Cell Biol*, 2007, 127(2):123-129.
- [4] Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, *et al.* Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75 NTR and apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(1):119-131.
- [5] Kinsey CG, Bussolati G, Bosco M, *et al.* Constitutive and ligand-induced nuclear localization of oxytocin receptor [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(1):96-110.
- [6] Fukuda K, Fujitsu Y, Kumagai N, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinase-3 synthesis in human conjunctival fibroblasts by interleukin-4 or interleukin-13 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(7):2857-2864.
- [7] 周红兵, 樊菁, 任彦顺, 等. HepG2 亚群中细胞角蛋白 19 的表达差异 [J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(1):48-50.
- [8] 贲长恩, 李叔庚. 组织化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 735-773.
- [9] 党双锁. 医学常用实验技术精编 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2004. 1-19, 32-59.
- [10] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995. 144-146.
- [11] 王红梅, 宫瑞瑾, 吴景兰, 等. 8-Br-cAMP 对 Eca-109 细胞 c-myc, wtp53, iNOS 基因和 EGFR 表达的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2003, 38(5):669-672.
- [12] 刘欣春, 朱悦. 人胎儿脊髓神经干细胞的分离培养 [J]. *生理学报*, 2006, 58(4):384-390.
- [13] Oskertizian CA, Zhao W, Min HK, *et al.* Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(6):1162-1168.
- [14] Verschraegen CF, Hu W, Du Y, *et al.* Establishment and characterization of cancer cell cultures and xenografts derived from primary or metastatic Mullerian cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2):845-852.
- [15] 高福莲, 岳保红, 马开颜, 等. 胃上皮永生细胞、胃腺癌细胞和胃腺癌淋巴结转移细胞多耐药基因 1 和 P-糖蛋白的表达 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2006, 41(3):514-517.
- [16] 高福莲, 蔡新华, 马开颜, 等. mdr1 基因在多药耐药相关的几种人胃癌细胞系的表达 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(10):1490-1494.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

近来本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用,为了维护本刊的声誉和广大读者的利益,本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定:凡属原始研究的报告,同语种一式两份投寄不同的杂志,或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿,分别投寄不同的杂志,属一稿两投;一经为两杂志刊用,则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志,以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志,不属一稿两投。但作者若要重复投稿,应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接收到稿回执后满 3 个月未接到退稿通知,表明稿件仍在处理中,若欲投他刊,应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时,应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时,由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实,则立即退稿,对该作者作为第一作者所撰写的论文,2 年内将拒绝在本刊发表;一稿两用一经证实,将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告,对该作者作为第一作者所撰写的论文,2 年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。