

理。在细胞及分子药理学中, 目前已在培养的心肌细胞证实存在肾上腺素能 α - 和 β -受体、胆碱能 M 受体^[18]、前列腺素受体及组织胺 H_1 、 H_2 受体等。培养的心肌细胞也是研究强心甙、抗心律失常药物及保护缺血性心肌损伤的药物, 进行药物筛选的良好工具之一^[19]。

结 语

本文对近年国外心肌细胞培养的研究进展作了概要综述。现已可从人、犬、兔、豚鼠、鼠、鸡等多种动物的胚胎、新生或成年动物的心肌进行细胞培养、形成自发性节律搏动, 利用生物学、形态学、生理、生化等先进手段, 对培养的心肌细胞的生长、发育、代谢、电生理特性以及搏动节律失常、心肌损伤等病理模型进行了深入研究, 为从细胞及分子水平了解心肌的发生、形态、病理及药理等问题, 提供了一个重要的研究工具。

参 考 文 献

- [1] Harary, I. et al., 1960 *Science* 131:1674-1675.
- [2] Vahouny, G. V. et al., 1970 *Science* 167: 1616-1618.
- [3] Chang, T. D. et al., 1972 *Circ Res* 30: 628-633.
- [4] Halbert, S. P. et al., 1973 *Life Science* 13:969-975.
- [5] Thompson, A. et al., 1977 *J Mol Cell Cardiol* 9:945-956.
- [6] Jacobson, S. L. 1977 *Cell Struct Funct* 2:1-9.
- [7] Goshima, K. et al., 1979 *Exp Cell Res* 120: 285-293.
- [8] Mclean, M. J. et al., 1976 *Dev Biol* 50: 134-141.
- [9] Lieberman, M. et al., 1972 *Science* 175: 909-911.
- [10] Horres, C. R. et al., 1977 *J Membrane Biol* 34: 314-329.
- [11] Yoneda, S. et al., 1978 *Cardiovasc Res* 12: 201-211.
- [12] Lieberman, M. et al., eds., 1976 *Developmental and Physiological Correlates of Cardiac Muscle* Reven Press.
- [13] Kobayashi, T. et al. eds., 1978 *Cardiac Adaptation* p. 645-666 University Park Press Baltimore.
- [14] Acosta, D. et al., 1978 *In Vitro* 14: 728-732.
- [15] Laarese, A. V. D. et al., 1979 *Cardiovasc Res* 13: 345-353.
- [16] Friedman, I. et al., 1976 *J Mol Cell Cardiol* 8: 641-650.
- [17] 五岛喜与太 1979 综合临床 28: 58-61.
- [18] Lane, M. A. et al., 1977 *Dev Biol* 57: 254-269.
- [19] Acosta, D. et al., 1980 *In Vitro* 16: 93-96.

环核苷酸的免疫细胞化学

林 仲 翔

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学研究室)

一、引 言

环核苷酸免疫细胞化学技术自 1972 年 Wedner 等^[1,2]建立以来, 已有不少进展。它是以 Coons 等^[3]显示组织内抗原定位的免疫细胞化学技术为基础, 用环核苷酸抗体进行定位的方法。这种方法与亚细胞组分的环核苷酸

生化测定互相配合, 更有利于阐明问题的本质。同一组织或细胞内环核苷酸的定位与定量测定结果共同分析, 有助于从结构与功能的关系上探索环核苷酸在生命活动中的重要作用, 对研究环核苷酸在肿瘤生长的调控作用上更有意义。

免疫细胞化学的方法有许多种^[4], 在环核

苷酸免疫细胞化学中应用较多的是间接免疫荧光技术。用未标记的抗体-酶方法显示环核苷酸定位的研究也有报道^[5,6]。本文着重介绍环核苷酸的免疫荧光细胞化学技术和有关的理论探讨。

二、环核苷酸免疫荧光细胞化学技术

1. 抗体: 本方法的关键是制备有高度特异性的环核苷酸抗体。环核苷酸(cAMP、cGMP)是一种小分子半抗原物质,必须通过2'-O位的取代酰基与大分子蛋白质连接形成的结合物,才能免疫动物产生抗体。一般使用2'-O琥珀酰环核苷酸制备免疫原,这是制备环核苷酸抗体的重要环节。此外,动物的条件和免疫的方法也影响抗体的生产。根据经验,用年龄在半年以内未交配的健康家兔,进行多途径多位点免疫注射,效果较好。以cAMP为例,抗体制备方法如下:^[8]

(1) 试剂 2'-O琥珀酰环腺苷酸(S-cAMP),西德或美国产;牛血清白蛋白(BSA),英国产;碳化二亚胺(EDC, 缩合剂)Merk厂产。

(2) 免疫原的制备^[7] 取10毫克ScAMP, 20毫克BSA,溶于2毫升双蒸水内,加EDC 10毫克,调至pH5.5,置暗处,室温反应18小时。将反应物移入透析袋内,在磷酸盐缓冲盐水(PBS, 0.01M, pH7.4)内透析,4℃, 48小时。产物为ScAMP-BSA结合物, ScAMP/BSA克分子比为5—6/1,冻干后用作免疫原。

(3) 免疫方法 采用家兔。取ScAMP-BSA(1毫克/只)溶于生理盐水(0.5毫升/只)内,与等量全福氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant)研磨制成乳剂,进行背部皮内多点注射和足蹠皮下注射。1—2月后进行加强免疫,以后每间隔2—4周加强免疫注射一次。于每次加强免疫后第7—10天,取耳静脉血制成血清检查抗体。采用羊也可以制备抗cAMP血清^[8]。

(4) 抗体的检查 用cAMP放射免疫测

定法^[7],检查抗体与同位素(³H或¹²⁵I)标记cAMP的结合率。以结合率达50%的抗血清稀释倍数表示效价。经验证明,抗体效价达1:1000的抗血清,用于免疫荧光细胞化学定位,可以显示出cAMP的特异荧光。

无论进行环核苷酸的放射免疫生化测定,还是进行免疫细胞化学定位研究,选择抗体的首要标准是抗体的特异性。除检查抗体与抗原的亲合力外,还需检查抗体与抗原类似物的交叉反应。组织内ATP的含量比环核苷酸高,检查抗体与ATP的交叉反应也很重要。特异性高的抗环腺苷酸抗体,在常规检测中,对ATP和5'-AMP无交叉反应,与其它环核苷酸反应的区别系数为 10^3 — 10^4 。这样的抗体对抗原的亲合力强,在以¹²⁵I为放射源的环核苷酸放射免疫测定中,测定水平可达 10^{-8} — 10^{-9} M^[7]。如用乙酰化方法^[9],测定水平提高100倍。因为抗体对于结构和免疫原(琥珀酰环核苷酸)相近似的乙酰化环核苷酸具有更大的亲合力。最近Rosenberg等^[10]用经过乙酰化处理的新鲜标本进行环核苷酸间接免疫荧光染色,证明乙酰化方法也增强环核苷酸的免疫细胞化学反应。

2. 组织标本的处理: 新鲜组织冷冻后,在低温恒冷箱内制成厚2—6μm的切片。组织应采用骤冷法进行冰冻,并用适宜的固定剂固定切片。丙酮或乙醇固定过的切片,往往不能显示出环核苷酸的特异荧光^[11]。用聚甲醛缓冲溶液作固定剂,可较好地保存组织形态,又不影响cAMP免疫荧光定位^[5]。氯仿—甲醇混合液既有脱脂作用,又能固定蛋白质保持组织结构,也可作为cAMP免疫细胞化学的固定剂^[12]。已知组织内的环核苷酸包括与受体蛋白质结合的和游离的两种形式。在间接免疫荧光染色的洗涤过程中,游离的部分丢失,只有结合环核苷酸得以保存而显示荧光。凡破坏环核苷酸免疫荧光染色的固定剂,很可能是破坏了环核苷酸与受体的结合,使呈游离状态而洗涤丢失;也可能掩盖环核苷酸分子的抗

原决定簇,使不易为抗体识别,因而不显示免疫荧光^[5]。组织内的脂质成分往往导致非特异荧光着色,并阻碍抗体与抗原的接近而影响其反应。氯仿-一甲醇为脱脂性固定剂,可以克服脂质的障碍,促进抗原抗体反应^[13],故效果较好。

3. 环核苷酸的免疫荧光染色步骤: 见表1:

表 1 环核苷酸免疫荧光细胞化学染色步骤(间接法)^[5]

顺序	操 作 程 序
1	取小块新鲜组织,立即投入致冷剂(-70℃)内,骤冷冻结;
2	制成恒冷箱冰冻切片,厚2—6μm,铺在载玻片上,立即吹干;
3	滴加I级抗体(兔抗环核苷酸血清,或其Ig组分),在密闭湿容器内,24℃,反应5—20分钟;
4	PBS洗涤10分钟,换液3次;
5	2%聚甲醛缓冲液内固定2分钟;
6	PBS洗涤3分钟,换液3次;
7	滴加荧光标记的II级抗体(FITC-羊抗兔IgG血清),在密闭湿容器内,24℃,反应5—20分钟;
8	PBS洗涤10分钟,换液3次;
9	甘油-PBS液(1:1)封加盖片。

国外多使用环核苷酸抗血清的Ig组分,或提纯的IgG作为I级抗体,认为这样可以消除非特异荧光^[5]。如有特异性的、高效价抗血清,经过适当稀释后,也可以直接作为I级抗体,进行环核苷酸免疫荧光染色^[12]。由于免疫细胞化学反应的条件不同于放射免疫测定反应的条件,所以需要的抗体浓度比放射免疫测定中的要高。抗体的稀释倍数要经过试验摸索决定。延长抗原抗体的反应时间,可以相应地提高抗体的稀释倍数。原则上,以能充分显示环核苷酸荧光染色图象,又能最大限度减低非特异荧光的抗体稀释度为宜。

对比在不同实验条件下,同一组织或细胞

内环核苷酸荧光染色强度,可反映环核苷酸相对含量及分布的变化。Ortez等^[14]发展了组织内环核苷酸免疫荧光染色的半定量测定法,如与同一组织的生化测定结果结合进行分析,则更有说服力。

三、理论上的探讨^[5]

1. 与受体结合中环核苷酸: Steiner等^[5]认为免疫细胞化学染色显示的是组织内与受体结合中环核苷酸。抗体如何识别出已结合的环核苷酸? cAMP的C₆位氨基(-NH₂)是与受体蛋白质结合的位点^[15]。放射免疫测定的资料表明cAMP抗体对N⁶-丁酰-cAMP和对cAMP有同样的亲和力,但与cGMP的交叉反应却很小(<10⁻⁴)^[7]。cGMP与cAMP不同之处是cGMP的C₆位取代基是酮基(-C=O)而非氨基,其C₂位的取代基为氨基而cAMP C₂位无取代基。这种在嘌呤核上电荷的差别对抗体结合的影响很大。反之,cAMP嘌呤核N₆位增加一个大的无电荷取代基(即N₆-丁酰-cAMP)对抗体的结合却无影响。Steiner等^[5]由此设想,环核苷酸与受体蛋白质的结合和与抗体的结合,二者在空间构型和电物理力上有差别,所以抗体能够识别已与受体蛋白质结合的环核苷酸分子,与之结合。

2. 组织内环核苷酸的抗原决定簇^[5] 在免疫荧光染色过程中,组织内哪些部位上的环核苷酸能被抗体识别而显示荧光呢?这取决于环核苷酸分子的抗原决定簇(即嘌呤核上的特殊取代基和磷酸二酯键)能否被抗体识别。大部分的抗原决定簇能被抗体识别,则可以染出环核苷酸特有的荧光定位图形。如果部分抗原决定簇被掩盖,不能被抗体识别而结合,就不能显示环核苷酸荧光。在分析荧光染色结果时,必须把这种可能性考虑在内。

3. 可溶性cAMP-受体结合物 组织内cAMP与可溶性受体蛋白质的结合物在染色的洗涤过程中可能丢失而不显示荧光;也可能与抗体结合后,沉淀在别的部位。这些问题

表 2 不同试剂对大鼠肝组织内环核苷酸免疫荧光染色的影响*[5]

试剂名称及浓度	荧光染色的强度及分布	
	cAMP	cGMP
PBS	荧光减退	无影响
Mg-ATP($10^{-4}M$)	逆转PBS影响	无影响
MgCl ₂ ($10^{-3}M$)	无影响	核内网状荧光减退, 核仁及胞膜的荧光增强
CaCl ₂ ($10^{-4}M$)	无影响	各部位的荧光都增强
EDTA ($10^{-4}M$)	无影响	核与胞膜的荧光均减弱, 核膜上呈现荧光
EDTA ($10^{-4}M$) + CaCl ₂ ($10^{-4}M$)	无影响	逆转单独用EDTA的效应

* 冷冻切片, 在加 I 级抗体前, 先浸在 PBS 内, 或浸在上述试剂的 PBS 溶液内, 37℃, 保温 30 分钟, 然后按环核苷酸间接免疫荧光染色步骤处理。

在分析免疫细胞化学染色结果时, 都应引起重视。尤其在应用本技术研究激素刺激引起的环核苷酸含量和分布的变化时, 应辅之以环核苷酸的生化测定和 cAMP-蛋白激酶活性的测定。三种结果相比较, 作出判断。新鲜组织切片用固定剂处理, 是否有助于保留 cAMP 可溶性蛋白受体于其原位上, 还有待于探索。

4. 游离的环核苷酸 未经固定的组织切片, 经过免疫荧光染色的洗涤步骤后, 组织内游离的环核苷酸丢失。测定洗涤液内环核苷酸的含量, 即代表丢失的数量。在基础条件下, 机体组织内游离的环核苷酸含量很少^[16]; 经激素刺激后则显著增多, 其含量往往超过最大程度激活蛋白激酶所需的浓度。综合分析 cAMP 生化测定、免疫荧光半定量测定和蛋白激酶活性测定结果, 可以了解其中游离的 cAMP 的相对含量。从理论上讲, 与受体结合的 cAMP 比游离的 cAMP 更重要。因为已知哺乳类体内的 cAMP 只有在与受体结合后, 才发挥其生理作用。

四、应用免疫细胞化学方法研究 cAMP、cGMP 与组织内受体结合的调节机制^[5]

以某些固定剂、PBS、二价阳离子或核苷

酸类试剂处理新鲜组织切片, 均能改变 cAMP 或 cGMP 的免疫荧光染色, 提示上述试剂可能影响环核苷酸与组织内受体的结合。进一步的研究发现, 某些因素只影响 cAMP 而不影响 cGMP 的免疫荧光, 另一些因素的作用则相反(表 2)。PBS 使 cAMP 荧光减退, 减退的程度与 PBS 内 NaCl 浓度正相关, 并有依赖于温度的增减^[5]。Mg-ATP 则逆转 PBS 的上述效应。EDTA、EGTA 和 Ca 离子可影响 cGMP 荧光染色。这些结果提示免疫细胞化学方法可用于研究环核苷酸与组织内受体结合的调节机制。

五、展 望^[5]

环核苷酸免疫荧光染色的可重复性表明它的可靠性。本方法有助于了解异质组织内不同的细胞其环核苷酸相对含量及分布的差别, 对研究在激素刺激前后组织内环核苷酸的变化更为有用。正常细胞转化后或肿瘤细胞逆转后, 细胞内 cAMP 含量有明显变化, 在这个领域中应用环核苷酸免疫细胞化学技术进行研究, 是有待于开展的^[12]。

组织内的 cGMP 免疫荧光, 大量地定位于胞膜和核内, 表明此处有 cGMP 受体蛋白存在。cGMP 在这些部位的作用还不清楚, 很

可能与Ca离子的活动密切相关^[17,18]。Ca离子也是细胞内“第二信使”，因此对细胞内Ca离子的测定、定位和cGMP免疫荧光染色相结合，将有助于阐明cGMP在细胞功能活动中的作用和调控机制。

用免疫荧光细胞化学方法研究环核苷酸与组织内受体结合的调控因素，被认为是最有前途的研究领域^[5]。cAMP、cGMP与各自受体的结合，似乎受到不同的调节。从免疫细胞化学得到的线索，经过生化测定的验证，将有助于了解环核苷酸和其它因素在调节细胞代谢中的作用和相互关系。

发展超微结构的环核苷酸免疫细胞化学技术，可进一步了解环核苷酸的精确定位。光学水平的未标记抗体一酶方法显示环核苷酸定位的工作已见报道^[5,6]，在此基础上发展电镜技术应是不困难的，关键在于寻找适宜的固定方法。超微结构水平的环核苷酸免疫细胞化学研究的开展，有助于阐明(1)cAMP、cGMP在细胞膜上的位置和作用以及与胞质内微管、微丝的关系；(2)在激素分泌活动中，环核苷酸作用在何处；(3)cGMP在核内的精确定位，是在染色质DNA上还是在其支架蛋白质上？光学和电镜水平的研究与环核苷酸的生理学研究相结合，则更有必要。

参 考 文 献

- [1] Wedner, H. J., Hoffer, B. J., et al., 1972. *J. Histochem. Cytochem.*, 20: 293-295.
- [2] Fallon, E. F., Agrawal, R., et al., 1974. *Science*, 184: 1089-1091.
- [3] Coons, A. H., Creech, H. J., et al., 1942. *J. Immunol.*, 45: 159-170.
- [4] Sternberger, L. A. 1974. *Immunocytochemistry (Foundations of Immunology Series)*. pp. 18-56. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J.
- [5] Steiner, A. L., Ong, S-H., et al., 1976. *Cyclic nucleotide immunocytochemistry. Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, Vol. 7, pp. 115-156. Raven Press, N. Y.
- [6] Greene, R. M., Pratt, R. M., et al., 1979. *J. Cell Biol.*, vol. 83, CD. 139.
- [7] Steiner, A. L., Parker, C. W., et al., 1972. *J. Biol. Chem.*, 247: 1106-1113.
- [8] Weinryb, I. 1972. Protein binding assays for cyclic AMP: Radioimmunoassay and cyclic AMP-dependent protein kinase binding assay. In "Methods in Cyclic Nucleotide Research" (M. Chasin, ed.), pp. 29-79. Marcel Dekker, New York.
- [9] Cailla, H. L., Racine-Weisbuch, M. D., et al., 1973. *Anal. Biochem.*, 56: 394-407.
- [10] Rosenberg, E. M., Gary, La Vallee, Peter Weber, et al., 1979. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 913-923.
- [11] Cumming, R., Dickison, S., et al., 1980. *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 54-55.
- [12] 林仲翔, 王代树, 赵孟莲, 高捷, 汪堃仁, 1982. 小鼠艾氏腹水癌细胞内3',5'-环腺苷酸(cAMP)的免疫荧光细胞化学定位和外源性cAMP对癌细胞内cAMP的影响。《实验生物学报》15(1).
- [13] Hartman, B. K., Doris Zide, et al., 1972. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 69: 2722-2726.
- [14] Ortez, R. A. 1978. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 4: 233-244.
- [15] Drummond, G. I., and Powell, C. A. 1970. *Mol. Pharmacol.*, 6: 24-30.
- [16] Beavo, J. A., Bechtel, P. J., et al., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 71: 3580-3583.
- [17] Rasmussen, H. 1970. *Science*, 170: 404-412.
- [18] Berridge, M. J. 1975. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 6: 1-98.

注：上海第二医学院同位素室戴腾昌等及北京中国医学科学院基础所刘景生等报道了cGMP抗血清制备及用乙酰化和非乙酰化放射免疫测定法检查抗体的经验(内部资料)。cAMP抗血清的制备及检查可参考“cAMP放射免疫测定法的建立及测定箱的制备”(徐英杰、林仲翔、刘景生、刘伯春，中国医学科学院年报1980, p. 35-39)。