

cyclin (cyclin E) and G₂ cyclin (cyclin A). It suggested that PTH can accelerate the cell cycle progression in osteoblast-like ROS17/2.8 cells.

Key words: PTH IGF-1 Cell cycle Osteoblast-like cell

胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟

王群* 张国军** 胡大为*** 陈远耀*

(*白求恩医科大学基础医学院病理解剖教研室 **第一临床学院儿科

***第一临床学院肿瘤科 长春 130021)

成年大鼠肝窦内皮细胞的结构和功能研究得较多,但有关胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟以及与先存大血管的关系还了解甚少^[1-3]。我们以前建立了一种新的单克隆抗体,SE-S,它仅特异性识别大鼠肝窦内皮细胞,而与肝动脉、门静脉、中央静脉以及其他组织的内皮细胞和非内皮细胞均无交叉反应^[4],因此,认为这种SE-S抗原与肝窦内皮细胞的特殊功能相关。为了阐明胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟,用免疫组织化学和免疫电镜检测了胎鼠肝脏发育的不同时期SE-S抗原的表达。

材料和方法

1. 动物

购买妊娠14天的Fischer344(F344)(Charles River Japan),分别在妊娠的15-21天行子宫解剖术获得胎鼠,仔细取出其肝脏,并进行组织学检查。部分肝脏固定于冷丙酮中用于免疫组织化学染色,部分肝脏固定于新鲜配制的过碘酸—赖氨酸—多聚甲醛(PLP)溶液中,用于免疫电镜分析,其余的肝脏经液氮冷冻后储存于-80℃,用于免疫荧光染色。

2. 免疫染色

经丙酮固定的肝脏,石蜡包埋、常规脱蜡、水化,0.3% H₂O₂甲醇溶液去除内源性过氧化物酶活性。10%正常羊血清封闭后,第一抗体用兔抗人第八因子相关抗原(FⅧRAg)抗体和兔抗人纤维连接蛋白(FN)抗体,4℃过夜,第二抗体用过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,室温1小时,显色用DAB,以上各步均经TBS 10.05mol/L Tris,0.83% NaCl冲洗,5分钟×3,苏木素复

染,封片。本试验设空白对照和血清替代对照。所用抗体均购自DAKO公司。

用于免疫荧光染色的冰冻切片,丙酮固定,干燥后与SE-S室温温育1小时,TBS漂洗后,与FITC标记的羊抗鼠IgG(DAKO)反应,荧光显微镜观察(Nikon CO, Tokyo)。

为了对表达SE-S抗原的肝窦长度进行定量分析,随机拍摄不同胎龄(15-21天)的肝脏照片,以测量阳性肝窦的长度(每一个胎龄组检测200个肝窦以上)。

3. 免疫电镜分析

肝组织固定于PLP溶液12小时,4℃,TBS冲洗后,制成约50μm厚的肝脏切片,与SE-S抗体室温作用12小时,然后按如前所述的方法进行染色。染色后的切片重新固定于1%锇酸溶液中,系列乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片经枸橼酸铅复染后,电子显微镜观察。

结 果

1. 肝脏发育的组织学特点

在胎龄15天、17天、19天和21天分别检查30个胎肝,组织学观察,15-17天的胎鼠肝脏结构疏松,富有大量的造血细胞和未成熟的肝细胞,H-E染色难以分辨出肝窦结构。利用FN(肝狄氏腔最丰富的细胞外基质成分)免疫反应产物的沉积,在胎龄15天时即可清晰显示出已形成的肝窦样结构,19天时这种结构更加明显,21天的肝脏,呈灶状分布的造血细胞数量减少,肝细胞胞浆丰富,形态近似成熟肝细胞,此时肝窦的排列与成年鼠非常相似。

2. 肝脏发育过程中SE-S抗原的表达特点

(1) 免疫组织化学染色

SE-S 免疫荧光染色显示,胎龄 15 天时,只能观察到散在的肝窦样结构呈现阳性反应,且长度较短,大多数窦腔的整体轮廓不能被免疫反应产物连续性显示出。随着胎肝的发育,表达 SE-S 抗原的肝窦在数量和长度上亦随之增加,并且相互连接导致成熟的肝窦结构形成。在肝脏发育的晚期阶段,SE-S 免疫反应产物沿肝窦呈连续性沉积,关于 SE-S 抗原的表达似乎是随机发生的,与表达 FⅢRAg 的大血管无密切关系。随着胎肝的发育,表达 SE-S 抗原的肝窦长度呈现连续性变化,短(<32 μ m)、中(32—64 μ m)、长(>64 μ m)三类肝窦所占的比例亦随之变化,胎龄 15 天到 21 天,短肝窦所占比例从

87%下降至 41%,而长肝窦则从 0.5%增加至 25%,这说明在胎肝发育过程中,表达 SE-S 抗原的窦内皮细胞延长并形成肝窦结构。

(2) 超微结构分布

免疫电镜分析发现,胎龄 15 天的肝脏即可出现肝窦样结构,SE-S 抗原的免疫反应产物沿窦内皮细胞质膜的胞浆面分布,但此时 SE-S 抗原的表达较成年鼠弱,有时呈现阶段性分布,部分窦内皮细胞完全不表达 SE-S 抗原。随着胎鼠肝脏的发育,表达 SE-S 抗原的窦内皮细胞数量逐渐增加,到胎龄 17 天时,几乎所有的窦内皮细胞均表达 SE-S 抗原,21 天时所有的窦内皮细胞都强阳性表达 SE-S 抗原(图版图 1),肝窦内皮细胞的成熟过程总结于表 1。

表 1 胎鼠肝脏发育过程中肝窦的成熟

肝窦 胎龄	肝窦长度变化		窦内皮细胞表达 SE-S 抗原		
	短(<32 μ m)	长(>64 μ m)	范围	强度	数量
15 天	87%	0.5%	阴性,部分阳性,阳性	弱	少,散在
17 天	69%	5%	几乎全部阳性	较弱	多
19 天	53%	16%	全部阳性	较强	全部
21 天	41%	25%	全部阳性	强,似 成年鼠	全部

讨 论

我们的研究证明,肝窦的形成和成熟是以多灶性的方式发生的,而且与表达 FⅢRAg 的大血管无关,我们最初假设肝窦的发生始于先存的大血管周围区域,通过大血管内皮细胞的延伸扩展而发生的,但 FN 免疫组织化学染色显示,在肝脏发育早期阶段,只有少量的小的肝窦样结构出现,且随机分布。以后,这些管腔延长并相互连接,最终形成肝脏发育晚期所见的肝窦结构。少数大血管表达 FⅢRAg,肝窦样结构的分布与表达 FⅢRAg 的大血管之间无密切关系。综上所述,可认为肝窦结构的形成随机发生于肝实质内,此时胎肝实质主要由造血细胞和未成熟肝细胞组成。

SE-S 抗原位于窦内皮细胞质膜的胞浆面,很可能是一种特异性表达在窦内皮细胞上的受体分子并与其特殊功能相关。因此,我们利用 SE-S 抗原作为窦内皮细胞表型成熟的一个标志。该抗原表达的连续性分析表明,胎龄 15 天时,在小的肝窦样结构中即可见到成熟的窦内皮细胞,免疫电镜观察证明此时窦内皮细胞表达 SE-S 抗原有三种类型,即阴性、部分阳性和阳性,这说明这一时期未成熟窦内皮细胞向成熟型窦内皮细胞的转变是一个连续性过程。17 天以后,所有窦内皮细胞均表达 SE-S 抗原,可以推测,肝窦结构的形成可能始于胎龄第 15 天或更早。随着肝窦样结构的延长,SE-S 抗原的表达增强,范围扩展,在胎鼠发育的晚期(21 天),SE-S 抗原的表达与分布几乎与成年鼠相同,这说明此时肝窦表型的成熟已基本完成。由

于在肝脏发育的晚期阶段,肝造血功能的停止和成熟肝脏特异性功能的出现均为这一时期的特征性表现,所以,窦内皮细胞表型的成熟可认为是肝脏分化的标志之一。

在肝脏发育的晚期阶段,可明显观察到表达 SE-S 抗原的窦内皮细胞与肝细胞直接或密切接触,这是否会促进 SE-S 抗原的表达(即窦内皮细胞的成熟)还有待于进一步研究。目前的研究发现,由肝细胞产生的血管内皮生长因子(VEGF)通过酪氨酸激酶受体 Fl t-1 和 Fl k-1 调节体外培养的窦内皮细胞的增殖与存活^[5],因此,检测这些旁分泌因子的作用对于分析肝脏发育过程中肝窦的形成机理也是十分重要的。

摘 要

为了研究胎鼠肝脏发育过程中肝窦的形成与成熟,用窦内皮细胞表达的一种特异性抗原,SE-S,作为窦内皮细胞表型成熟的标志,通过免疫组织化学和免疫电镜来观察肝脏发育的不

同时期该抗原的表达以及与先存大血管的关系。实验证明,在胎龄 15 天时,即可观察到散在的肝窦样结构呈现阳性反应,而表达第八因子相关抗原的大血管为阴性。随着肝脏的发育,表达 SE-S 抗原的肝窦在数量和长度上亦随之增加,并且与肝细胞直接或密切接触。结果提示,肝窦的形成与成熟似乎是随机发生的,可能始于胚胎发育的第 15 天或更早,与先存大血管无直接相关性;肝细胞可能调节窦内皮细胞的成熟(SE-S 抗原的表达)。

关键词: 肝窦形成 SE-S 抗原 免疫电镜

参 考 文 献

- [1] Naito M, et al., 1977, Amsterdam, j Elsevier/North-Holland Biochemical Press, 497.
- [2] Bankston PW, et al., 1980, *Am. J. Anat.*, 159:1.
- [3] Barbera-Guillem E, et al., 1986, *J. Ultrastr. Mol. Str. Res.*, 97:197.
- [4] 王群等, 1998, 中国免疫学杂志, 14(3):210.
- [5] Yamane A, et al., 1994, *Oncogene*, 9:2683.

ANALYSIS OF THE SINUSOIDS ORGANIZATION AND MATURATION DURING THE DEVELOPMENT OF THE FETAL RAT LIVER

WANG Qun CHEN Yuan Yao

(Department of Pathology, Basic School, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021)

ZHANG Guo Jun

(Department of Paediatrics, The First Teaching Hospital, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021)

HU Da Wei

(Department of Oncology, The First Teaching Hospital, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021)

ABSTRACT

To study the organization and maturation of sinusoids in the fetal rat liver, using SE-S antigen, which specifically expressed in hepatic sinusoidal endothelial cells (SEC), as a marker for the phenotypic maturation, we observed expression of SE-S antigen and association between sinusoids and preexisted large vessels by immunohistochemistry and immunoelectron microscopy during the development of fetal rat liver. Results revealed that there is a sporadic positive reaction in the sinusoid-like lumens of 15-day-old fetus, but negative for preexisted large vessels expressing FVⅧ

RAg. Thereafter, positive sinusoids increased in number and length. A close vicinity of SEC expressing SE-S antigen to the hepatocytes was evident in the later period of development. The results revealed that the organization and mutation of liver sinusoids seem to occur randomly in the liver of 15-day-old fetus or earlier and showed no direct association with the preexisted large vessels. It was suggested that hepatocytes may regulate the maturation (SE-S antigen expression) of SEC during the development of fetal liver.

Key words: Sinusoid organization SE-S antigen Immunoelectron microscopy

缺氧对体外培养大鼠海马神经元 Bcl-2 表达的影响*

丁爱石 王福庄 付群武 周长满** 范明

(军事医学科学院基础医学研究所神经生物室 北京 100850)

Bcl-2 原癌基因蛋白为位于细胞核膜、内质网、线粒体内膜或外膜的膜蛋白,它与抑制编程性细胞死亡(即细胞凋亡),延长细胞生存有关。近年来的研究表明,Bcl-2 基因不但在淋巴系统表达,也在神经系统表达^[1],神经元 Bcl-2 的过多表达能抑制神经元死亡,不仅表现在去除血清和生长因子诱发的凋亡^[2],而且可阻止其他许多因素(如射线、化疗药物和自由基等)诱发的神经元死亡^[3]。此外,Bcl-2 的过多表达亦可抑制包括坏死在内的非凋亡细胞死亡^[4]。目前有关缺氧对体外培养海马神经元 Bcl-2 表达的影响,国内外报道较少。本实验用免疫组化方法,观察 Bcl-2 原癌基因蛋白在体外培养大鼠海马神经元中的表达及缺氧时的影响。

材料和方法

一、神经元培养

按已有的细胞培养方法进行海马神经元分散培养^[5],取新生的 Wistar 大鼠,在无菌条件下分离出双侧海马,用 0.125%胰蛋白酶消化(37℃、30min)分散并制成 5×10^5 /ml 密度的细胞悬液,接种于涂有小牛皮胶的 35mm 塑料培养皿中,每皿 2ml,置 36℃、含 10% CO₂ 的培养箱(美国 FORMA)内进行培养。培养液由 94% Eagle's MEM,5% 马血清和 1% N3 组合液组成。于培养第 3 天在培养液中分别加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷 3μg/ml 以抑制非神经细胞的过度增殖,作用 48h 后更换新鲜培养液,以后每周换液 2 次,每次更换

半液,选择培养 12 天的海马神经元,用于缺氧实验。

二、缺氧实验

取培养 12d 的海马神经元,按实验分为对照和缺氧两组,对照组神经元仍置于 36℃、含 10% CO₂ 的培养箱内继续培养 2、4、28 和 76h,缺氧组神经元移至 2000cm³ 的恒温(36℃)密闭容器内,连续充以无氧气体(90% N₂、10% CO₂),流速为 200ml/min,在缺氧条件下培养 2、4h 后取出,置含 90% 空气、10% CO₂ 的培养箱内继续培养 24 和 72h。

三、形态学观察

用倒置相差显微镜分别观察对照和缺氧培养各组神经元的形态变化,并在倒置相差显微镜(200×)下随机观察并计数 50 个相邻视野(0.16mm²/视野)的活存神经元数作比较。

四、培养神经元的 Bcl-2 免疫组化观察

取对照和缺氧培养的各组海马神经元,经 4% 多聚甲醛固定后,用抗 Bcl-2 抗血清(购于北京中山公司)按 1:500 稀释,并按 ABC 法进行免疫组化染色,用 Ni-DAB-葡萄糖氧化酶系统显色。同时设替代对照(用正常羊血清替代第一抗体),在倒置相差显微镜(200×)下分别观察计数 50 个相邻视野(0.16mm²/视野)中 Bcl-2 免疫反应阳性和阴性神经元数目,计算 Bcl-2 免疫反应阳性神经元所占百分率。并作显微照相和在 CMIAS 真彩色病理图像分析仪(北京航空航天大学与空军总医院共同研制)上用光密度组件对 Bcl-2 免疫反应阳性神经元作平均光密度的色谱分析。

* 国家自然科学基金重点资助课题(NO 39730190)。

** 解放军北京高等医学专科学校解剖学教研室。