

# 免疫组化 CSA 法在检测子宫内膜石蜡切片 整合素 $\alpha v \beta_3$ 中的应用

梁英杰<sup>1</sup>, 李 洁<sup>2</sup>, 赖英荣<sup>1</sup>

(中山大学 1. 中山医学院病理学教研室 2. 附属第一医院生殖医学中心, 广东广州 510089)

**摘要:**【目的】探讨免疫组织化学技术检测子宫内膜整合素  $\alpha v \beta_3$  抗原的方法, 为研究整合素  $\alpha v \beta_3$  在胚胎黏附、着床过程中的作用机制提供方便。【方法】采用免疫组化 LSAB 法和 CSA 法检测妊娠组和非妊娠组子宫内膜整合素  $\alpha v \beta_3$  抗原。【结果】用 CSA 法检测接受胚胎移植治疗的不孕症患者子宫内膜石蜡切片中的整合素  $\alpha v \beta_3$  抗原, 获得了阳性的结果, 妊娠组整合素  $\alpha v \beta_3$  表达明显高于非妊娠组。【结论】CSA 检测法比 LSAB 法敏感性更高, 特别适用于检测组织细胞表达低的抗原, 能够将检测冷冻切片的整合素  $\alpha v \beta_3$  抗体用于检测石蜡切片, 整合素  $\alpha v \beta_3$  表达量与胚胎种植高度正相关。

**关键词:** 免疫组织化学; 整合素  $\alpha v \beta_3$ ; 子宫内膜

中图分类号: R446.8, 71 文献标识码: A 文章编号: 1000-275X(2002)

整合素  $\alpha v \beta_3$  (integrin  $\alpha v \beta_3$ ) 是子宫内膜对胚胎接受性的一个可靠分子指标, 子宫内膜整合素  $\alpha v \beta_3$  表达异常与胚胎种植失败相关。常用的免疫组化 LSAB 法 (Labelled streptavidin-biotin)<sup>[1]</sup> 只能检测冷冻切片中的整合素  $\alpha v \beta_3$  而不能用于石蜡切片, 应用免疫组化 CSA (catalyzed signal amplification) 法<sup>[2]</sup> 则可以解决这一问题, 不仅可以检测冷冻切片而且可以检测石蜡切片中的整合素  $\alpha v \beta_3$  抗原, 丰富了研究标本的来源, 为检测子宫内膜整合素  $\alpha v \beta_3$  抗原, 探讨整合素  $\alpha v \beta_3$  在胚胎黏附、着床过程中的作用机制提供了方便。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本校附属一院生殖医学中心接受胚胎移植治疗的不孕症患者子宫内膜 22 例, 100 mL/L 甲醛固定、常规脱水石蜡包埋, 切片厚 4  $\mu$ m, 载玻片经 APES 处理。对照组: 阳性对照取正常排卵妇女 LH 峰值第 5 天的子宫内膜组织 4 例; 阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗。CSA 试剂盒购自丹麦 DAKO 公司, 一抗整合素  $\alpha v \beta_3$  购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 CSA 法 ①石蜡切片常规脱蜡至水。②30 mL/L  $H_2O_2$  水溶液处理 15 min, 蒸馏水稍洗, PBS 洗 2 min。③正常血清封闭 5 min。④滴加一抗整合素  $\alpha v \beta_3$  (1:500) 4  $^{\circ}C$  孵育过夜后再室温孵育 90 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑤滴加生物素化二抗孵育 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑥滴加 streptavidin-biotin-HRP 复合物孵育 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑦滴加生物素化酪胺试剂孵育 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑧滴加 streptavidin-HRP 孵育 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑨ DAB- $H_2O_2$  显色 5~8 min, 流水冲洗 10 min。⑩ Mayer 苏木素复染细胞核, 中性树胶封片。

1.2.2 LSAB 法 ①石蜡切片常规脱蜡至水。②30 mL/L  $H_2O_2$  水溶液处理 15 min, 蒸馏水稍洗, PBS 洗 2 min。③滴加一抗整合素  $\alpha v \beta_3$  (1:500) 4  $^{\circ}C$  孵育过夜后再室温孵育 90 min, PBS 洗 2 min, 3 次。④滴加生物素化二抗孵育 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑤滴加 streptavidin-biotin-HRP 复合物

孵育 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次。⑥ DAB- $H_2O_2$  显色 5~8 min, 流水冲洗 10 min。⑦ Mayer 苏木素复染细胞核, 中性树胶封片。

## 2 结果

用 LSAB 法检测子宫内膜整合素  $\alpha v \beta_3$  结果均为阴性。CSA 法检测 22 例子宫内膜均表达强弱不同的阳性。整合素  $\alpha v \beta_3$  在子宫内膜腺上皮及腔上皮细胞游离缘胞浆和基质细胞胞浆阳性, 腺上皮及腔上皮细胞着色较基质细胞明显。根据显色深浅不同定为阴性(-)计为 1; 弱阳性( $\pm \sim +$ )计为 2; 阳性(++)计为 3; 强阳性(+++)计为 4, 每张切片计数 5 个高倍视野作免疫组化半定量分析统计。

## 3 讨论

CSA 法是目前最为敏感的免疫组化染色方法, 比 LSAB 法敏感 500~1 000 倍<sup>[2]</sup>。CSA 法是在 LSAB 法的基础上加入生物素化酪胺试剂, 将抗原-抗体复合物信号进一步放大, 因此 CSA 检测法敏感性极高, 特别适用于检测组织细胞表达低的抗原, 也能够将通常只能用于检测冷冻切片的抗体用于检测石蜡切片, 扩大了抗体的适用范围, 也使得用于研究的标本来源更加丰富。CSA 法在加入生物素化酪胺试剂前与 LSAB 法的一抗-二抗-三抗连结成抗原-抗体复合物相似, 所不同的是 LSAB 法中三抗 streptavidin-HRP 不含生物素, 而 CSA 法中第 1 次加入的三抗 streptavidin-biotin-HRP 复合物含有生物素, 接着加入生物素化酪胺试剂后, 在 HRP 的催化下使其生物素沉淀, 该生物素沉淀物与再次加入不含生物素的 streptavidin-HRP 结合成更大的复合物, 使得抗原-抗体复合物进一步放大, 通过 DAB- $H_2O_2$  显色定位, 从而检测出在石蜡切片表达较低的整合素  $\alpha v \beta_3$  抗原。如果检测信号太弱, 可尝试重复依次加入生物素化酪胺试剂和不含生物素的三抗 streptavidin-HRP, 以达到不断放大信号的目的。操作步骤增多, 容易造成脱片, 因此, 裱贴组织切片的载玻片要经 APES(3-氨基丙基三乙氧基硅烷)处理防脱片。此外生物素化酪胺试剂含有组织内存在的生物素, 浓度太高或过多重复加入

收稿日期: 2002-05-29

作者简介: 梁英杰(1962-), 男, 广东广州人, 副主任医师。

都容易引起非特异性染色,应加以注意。利用 CSA 法检测子宫内黏膜石蜡切片中的整合素  $\alpha\beta_3$  抗原,获得了阳性的结果。

参考文献:

[1] 梁英杰, 凌启波. 一种快速高敏感的免疫组织化学染色法-LSAB

法[J]. 中华病理学杂志, 1993, 22(6): 369.

[2] 倪灿荣, 范 淼, 许炳基. CSA 系统在免疫组织化学中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 1999, 15(3): 267.

(编辑 黄小廷)

## 海马养生液延缓衰老作用的实验研究

李文立, 黄俊明, 陈壁锋

(广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300)

**摘要:**【目的】探讨海马养生液延缓衰老的作用。【方法】采用果蝇生存实验及大鼠抗氧化作用实验方法。果蝇喂饲分量的质量分数为 0.78%, 2.33%, 7%, 14%; 老龄大鼠实验剂量为 0.58 g/kg, 1.17 g/kg, 3.50 g/kg。【结果】海马养生液能明显延长果蝇的平均寿命和平均最高寿命, 降低受试大鼠血清中过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)含量, 增高血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力。【结论】海马养生液具有延缓衰老的作用。

关键词: 海马养生液; 果蝇; 大鼠; 寿命; MDA; SOD

中图分类号: R212 文章标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0032-02

海马俗称“水马”, 是名贵的中药材。海马性味甘、温, 入肝、肾经, 具有温肾壮阳、散结消肿、镇静安神之功效<sup>[1-3]</sup>。近年来, 以海马为主要原料配制而成的保健品受到广泛关注。海马养生液主要以海马为君药, 辅以桂圆、罗汉果等中药材, 经现代先进的制备工艺提炼加工成质量可控的液体。本文以果蝇和 SD 老龄大鼠为研究对象, 通过海马养生液对果蝇寿命及对老龄大鼠脂质过氧化作用的试验研究, 探讨海马养生液延缓衰老的作用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

(1) 实验动物: ① Oregon K 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 上海铁道大学医学院提供 ② SD 雄性大鼠, 20 月龄, 体质量(394±54) g, 由广东省医用实验动物场提供。(2) 受试物: 海马养生液, 广东某公司提供。(3) 试剂: SOD 和 MDA 试剂盒, 由南京建成生物工程研究所提供。(4) 仪器: 恒温生化培养箱、日立 MPF-4 型分光荧光光度计、721 型分光光度计。

#### 1.2 方 法

①果蝇生存实验研究: 依《保健食品功能学评价程序和检验方法》<sup>[4]</sup>。受试物喂饲分量的质量分数为 0.78%, 2.33%, 7% 和 14%, 即每 100 g 基础培养基中含有海马养生液 0.78 g, 2.33 g, 7 g 和 14 g。隔天 1 次统计果蝇存活数、死亡数, 直到全部死亡。每组最后死亡的 20 只果蝇存活时间 (*t*/d) 的平均数为该组的最高寿命实验结果。计算平均寿命、最高寿命及半数死亡时间。②大鼠抗氧化作用实验研究: 20 月龄 SD 雄性大鼠按体重随机分为 4 组, 一个蒸馏水对照组和低剂量组(0.58 g/kg)、中剂量组(1.17 g/kg)、高剂量组(3.50 g/kg)。每组 12 只动物。每天以 1 mL/100 g 的剂量灌胃给予受试物。35 d 后杀大鼠采血, 测定大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)含量。具体测定操作方法按使用说明书进行。

#### 1.3 统计分析方法

采用 SPSS10.0 软件包进行统计分析。

## 2 结 果

#### 2.1 海马养生液对果蝇寿命的影响

从表 1、表 2 可见① 雄性果蝇: 0.78% 剂量组平均寿命

表 1 海马养生液对雄性果蝇寿命的影响

( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	<i>n</i> (果蝇)	$w^{1)}/\%$	$m_b^{2)}/\mu\text{g}$	<i>t</i> (半数死亡)/d	<i>t</i> (最高寿命)/d	<i>t</i> (平均寿命)/d
对照组	200	0	756	50	61.3±1.5	48.0±8.1
低剂量	200	0.78	762	55	62.3±0.6	52.3±9.9 <sup>3)</sup>
中剂量 I	200	2.33	744	49	68.2±0.7 <sup>3)</sup>	50.1±12.0
中剂量 II	200	7.00	731	47	67.6±0.9 <sup>3)</sup>	49.7±11.6
高剂量	200	14.0	716	48	60.8±1.7	47.8±9.8
<i>F</i>					188.75	6.016
<i>P</i>					< 0.01	< 0.01

1) 表示质量分数; 2) 表示果蝇的体质量; 3) 表示与对照组比较,  $P < 0.01$

收稿日期: 2002-05-22

作者简介: 李文立(1967-), 女, 辽宁鞍山人, 医学硕士, 主管医师