

固定方式对神经细胞膜 NMDAR1 免疫细胞化学定位的影响

郁毅刚, 徐如祥, 姜晓丹, 柯以铨(第一军医大学珠江医院神经外科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 探讨不同固定方式对神经细胞膜 NMDA 受体 NR1 亚基免疫细胞化学定位结果的影响,并确定 NR1 在膜上的亚细胞定位分布。方法 采用免疫细胞化学 ABC 法观察不同固定方式分组时 NR1 亚基在神经元膜上的定位分布。结果 -20℃纯甲醇和-20℃纯丙酮固定 5 min 组呈现 NR1 典型的细胞膜阳性染色,定位在神经元两极靠近树突起始部及树突干上。4%多聚甲醛及加上 0.5%戊二醛固定 20 min 组呈现染色假阴性。95%乙醇固定 10 min 组呈现细胞膜染色假阴性,细胞核染色假阳性。结论 每种抗原免疫细胞化学检测中都有各自最适合的固定方法。NMDAR1 抗原需要应用缓和的固定方式,-20℃纯甲醇和-20℃纯丙酮 5 min 短时间固定效果最好。NMDAR1 分布于神经元膜两端树突起始部及树突干上。

关键词:神经细胞;细胞培养;N-甲基-D-天冬氨酸受体 NR1 亚基;免疫细胞化学;固定

中图分类号:Q26;R392.12 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)04-0379-03

Effect of fixation methods on immunocytochemical localization of NMDAR1 on cultured cortical neuron membrane

YU Yi-gang, XU Ru-xiang, JIANG Xiao-dan, KE Yi-quan

Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes in subcellular localization of NMDAR1 on cultured cortical neurons in response to different methods for fixation of neuron cells. **Methods** Subcellular localization of NMDAR1 in cultured cortical neurons fixed with different fixatives and procedures was studied by immunocytochemical avidin-biotin peroxidase (ABC) method. **Results** Neurons fixed with -20℃ pure acetone and -20℃ pure methanol for 5 min presented typical positive staining of NR1 subunit located on the polar membrane of the neurons where the dendrites originated and on the stem of the dendrites. The neurons fixed with 4% formaldehyde alone for 20 min or in the presence of 0.5% glutaraldehyde (1:1) for 10 min resulted in false-negative staining. Fixation of the neurons with 95% ethanol for 10 min yielded false-negative staining on the membrane and false-positive staining in the nuclei. **Conclusions** Each antigen may have its specific demand for fixation method in immunocytochemistry, and for NMDAR1 antigen, mild fixation is recommended as by -20℃ pure acetone and -20℃ pure methanol for 5 min. NMDAR1 distributes on the polar membrane of the neurons where the dendrites originate and on the dendritic stem.

Key words: neurons; cell culture; N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1; immunocytochemistry; fixation

N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体是中枢神经系统最主要的兴奋性氨基酸受体,在许多重要的生理和病理过程如 LTP 的产生、缺血性神经元坏死、神经退行性变、癫痫等起着关键作用^[1]。NMDA 受体是由不同亚单位组成的异聚体,现已发现的 NR1 亚单位、4 种 NR2 亚单位和 NR3 亚单位均已被克隆^[2,3]。NR1 是 NMDA 受体复合物的必需功能亚单位,NR2 是调节亚单位,不同比例 NR2 与 NR1 组合形成不同

的 NMDA 受体亚型,产生不同的电生理学及药理学特性^[4]。因此 NR1 亚基的研究具有重要意义。NR1 在神经元膜上的定位分布,是研究 NR1 亚基胞外区结构域三维构象的基础。本研究应用免疫细胞化学方法定位标记,大鼠皮层神经元 NR1 亚基胞外区,探讨不同固定方式对神经元膜的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生 12 h 以内 Wistar 大鼠,雌雄不限,购自军事医学科学院动物中心。

1.1.2 试剂 胎牛血清、马血清、DMEM 粉剂(Gibco 公司,美国),阿糖胞苷(Pharmacia 公司,美国),DAB、牛血清白蛋白、胰蛋白酶、多聚赖氨酸、谷氨酰胺(Sigma 公司,美国),其他试剂均为国产分析纯。兔抗 NMDAR1 多克隆抗体(1:200,Santa Cruz 公司,美

收稿日期:2003-07-05

基金项目:国家自然科学基金(30170961);军队医学十五重点科研基金(01Z054)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30170961) and Medical Science Research Foundation of the Tenth Five-year Plan of the Army (01Z054)

作者简介:郁毅刚(1970-),男,浙江宁波人,1993年毕业于江西医学院,解放军第175医院神经外科主治医师,现为第一军医大学珠江医院神经外科博士生,电话:020-61643270,E-mail:yu-yg@tom.com

国), 生物素化抗羊兔抗体 (1:800, Vector 公司, 美国), ABC 复合物 (1:200, Vector 公司, 美国)。多抗针对大鼠源 NMDAr1 亚基膜外区 N 端 19-318 位氨基酸序列多肽, 与小鼠、人序列有高度保守性。

1.1.3 仪器设备 MCO-15AC 二氧化碳细胞培养箱 (三洋公司, 日本), IX-70 荧光相差显微镜 (Olympus 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 原代皮层神经元培养 无菌条件下切取 75%酒精浸泡 1 min 乳鼠头, 解剖出完整鼠脑, 取皮质, 漂洗, 剪切成 0.5 mm^3 碎块。0.25%胰蛋白酶 37°C 培养箱中消化 30 min, 接种液洗 3 次后混悬, 反复吹打, 收集含单细胞悬液的上清液约 4~5 ml 于培养瓶中。细胞计数, 接种密度 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 于放置浸泡过多聚赖氨酸盖玻片的 35 mm 培养皿, 每皿 2 ml。培养 24 h 待细胞贴壁, 换全液培养 4~5 d, 观察神经元生长良好, 换用阿糖胞苷培养液半液 ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$), 培养 48~72 h 抑制神经胶质细胞及杂细胞生长, 得到相对单纯培养的原代神经细胞。以后每隔 3~4 d 换液 1 次, 每次半量换液。至 12 d 进行免疫细胞化学标记。

1.2.2 细胞固定方法分组 取 18 皿, 按固定方式分为 6 组。第 I 组: 4%多聚甲醛固定 20 min, 第 II 组: -20°C 冰丙酮固定 5 min, 第 III 组: -20°C 冰甲醇固定 5 min, 第 IV 组: 95%乙醇固定 10 min, 第 V 组: 4%多聚甲醛 + 0.5%戊二醛固定 10 min。第 VI 组: 空白对照组, -20°C 冰甲醇固定 20 min, 一抗用 PBS 代替。

1.2.3 免疫细胞化学 ABC 法 DAB 显色 培养细胞用 0.01 mol/L PBS 洗 2 次, 室温固定后。PBS 洗 $3 \times 10 \text{ min}$, 4°C 冰箱过夜, 3% H_2O_2 室温孵育 5~10 min, 抑制内源性过氧化物酶活性。PBS 洗 $3 \times 3 \text{ min}$ 。一抗: NR1 多抗孵育, 4°C 冰箱过夜。PBS 洗 $3 \times 10 \text{ min}$ 。二抗: IgG-Biotin (goat anti-rabbit), 37°C 1 h。PBS 洗 $3 \times 10 \text{ min}$ 。滴加辣根酶标记链霉卵白素 (avidin-HRP), 37°C 30 min。PBS 洗 $3 \times 10 \text{ min}$, 快速在蒸馏水中漂洗 1 遍后, 加入呈色液 (A 液: 0.02% DAB, 0.2% 葡萄糖, 0.04% 氯化铵, 纯水配制, B 液: 0.0007% 的葡萄糖氧化酶, 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 2% 硫酸镍铵) 显色 30 min。快速在蒸馏水中过 1 遍, 0.01 mol/L PBS 洗涤, $3 \times 5 \text{ min}$, 甘油保存于 4°C 冰箱。空白对照实验以 PBS 代替一抗, 其他步骤相同。相差显微镜下观察, 摄影。

2 结果

应用 -20°C 纯甲醇和 -20°C 纯丙酮固定 5 min 组 (II III, 3 组, 图 1, 2), 结果呈现典型的细胞膜染色阳性, 并且 NMDAR1 亚基细胞膜分布主要在神经元两极靠近树突起始部及树突上, 与细胞核平面位置分辨

明显。应用 4%多聚甲醛及加上 0.5%戊二醛固定 30 min 组 (I, V 组, 图 3, 6), 与空白对照组染色阴性 (VI 组, 图 4) 相比, 基本一致, 呈现染色假阴性。而应用 95%乙醇固定 10 min 组 (IV 组, 图 5), 结果呈现出异常的细胞核染色假阳性, 细胞膜染色假阴性。

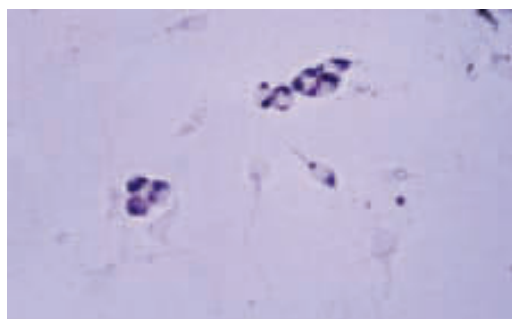


图 1 -20°C 纯甲醇固定 5 min 组染色显示 NR1 膜染色阳性 ($\times 300$)

Fig.1 Samples fixed with -20°C pure methanol for 5 min showing positive staining for NR1 on the membrane ($\times 300$)

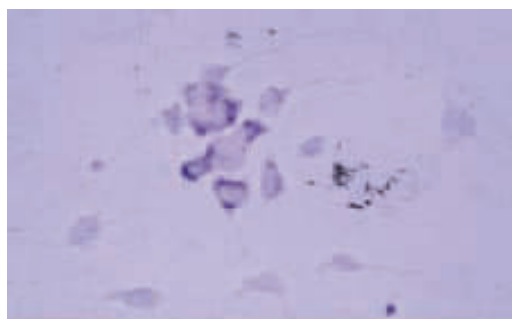


图 2 -20°C 纯丙酮固定 5 min 组染色显示 NR1 膜染色阳性 ($\times 300$)

Fig.2 Samples fixed with -20°C pure acetone for 5 min showing positive staining for NR1 on the membrane ($\times 300$)

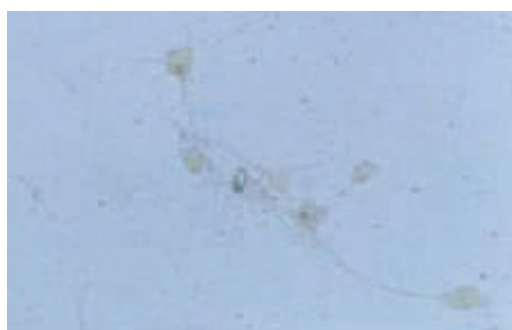


图 3 4%多聚甲醛 + 0.5%戊二醛固定 10 min 组显示 NR1 假阴性 ($\times 300$)

Fig.3 Samples fixed with 4% paraformaldehyde plus 0.5% glutaral (1:1) for 10 min showing false-negative staining for NR1 ($\times 300$)

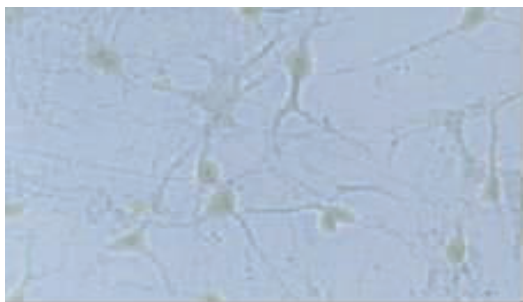


图 4 -20 °C 纯甲醇固定空白一抗对照染色显示 NR1 阴性(x300)

Fig.4 Control samples fixed with -20°C pure methanol using PBS as the primary antibody showing negative NR1 staining (x300)

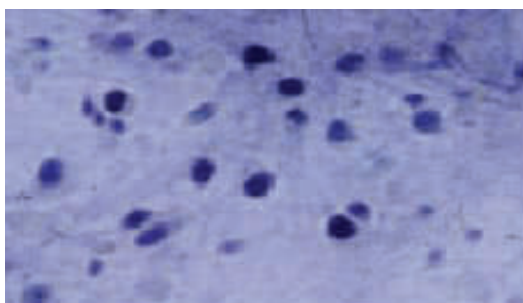


图 5 95%乙醇固定 10 min 组染色显示 NR1 细胞细胞膜染色假阴性、细胞核假阳性(x300)

Fig.5 Samples fixed with 95% ethanol for 10 min showing false-negative staining on the membrane and false-positive in the nuclei(x300)



图 6 4%多聚甲醛固定 20 min 组染色显示 NR1 核染色假阴性(x300)

Fig.6 Samples fixed with 4% paraformaldehyde showing false-negative staining in the nuclei (x300)

3 讨论

免疫细胞化学固定的目的是(1)将抗原固定在原位;(2)保持其抗原性,使抗原能准确可靠地显示出来。一个好的固定剂不但本身不能损害抗原性,还应很好地保持组织、细胞的结构以及允许大分子进入细胞内与抗原结合。然而,目前尚无一种固定剂能完全达到这些要求。而体外培养神经元 NMDA 受体作为膜蛋白,其胞外区结构域更易受到固定方式的影

响,造成空间结构的破坏或遮蔽从而丧失抗原性。因此,在进行免疫细胞化学时,必须根据预显示抗原对固定剂的稳定性和组织结构完整性的要求,选择所要显示抗原最适当的固定方式,最大程度地减少固定对抗原性和组织结构的破坏作用^[5]。

本实验结果表明,培养皮层神经元不同固定方式引起膜 NMDA 受体 NR1 亚基免疫细胞化学染色结果不同。由于其他染色过程同步进行,故由细胞周期变化以及染色条件方面引起的误差可以排除;而主要是由于固定的变化,使抗原的稳定性发生了改变。常规的 4%多聚甲醛组和 0.5%戊二醛组染色出现假阴性,主要原因:(1)醛类固定剂能与组织细胞内蛋白质的许多功能基结合,在相邻蛋白质之间形成稳定的桥键,使细胞膜蛋白和脂类转变成凝胶,抗体转移受到抑制。(2)假若交联发生在特殊抗原的抗体反应位置,抗原抗体结合可被干扰或阻断。(3)交联作用使细胞膜外区 NR1 抗原分子多肽链 N 端 19-318 氨基酸残基拓扑构象发生变化,出现空间障碍使抗体不能与抗原决定簇接触;或者使抗原发生分子间交联,从而遮盖抗原决定簇。(4)醛类作为水溶性固定剂,对于部分易溶于水并且直接暴露在神经细胞膜表面的 NR1 抗原 N 端 19-318 残基有破坏作用,导致抗原性消失^[6]。故免疫细胞化学一般不宜选用甲醛固定。乙醇固定组显示 NR1 神经细胞核染假阳性。作为蛋白质沉淀剂,能较好地保存抗原,但对组织和细胞膜结构,通透性都有明显影响,对形态学干扰大^[7]。冰浴的纯丙酮和纯甲醇固定剂明显优于乙醇和醛类固定剂。结果显示,丙酮和甲醇固定标本的 Nr1 免疫细胞化学染色效果最佳,既可保持良好的形态,又保护 NR1 免疫原性,确保了神经生物学研究中 NMDA 受体免疫细胞化学结果的准确性和可靠性。这主要是由于其固定作用缓和,并且固定时间短,温度低,减少了其对抗原的破坏作用^[8]。固定时间特别要注意,必须最大限度减少固定时间以避免过度固定所造成的损害。

总之,目前尚无一种固定剂能适宜所有免疫细胞化学反应。因此,必须根据目的抗原对固定剂的敏感性和稳定性以及固定对抗原性和组织、细胞结构的破坏作用,选择适当固定方式。对那些预先不知其敏感性和稳定性的抗原,应进行多种固定方式的比较实验,以确定最适宜的固定剂、固定温度和时间,使其最大程度地减少对抗原的破坏作用。否则,会导致结果误差,甚至出现假阴性或假阳性而造成错误结论。

4 结论

NMDAR1 是膜蛋白,染色定位显示 NMDA 受体
(下转 385 页)

- mutant human ovarian carcinoma cells to the cytotoxic effects of cis-diamminedichloroplatinum (II)[J]. *Gynecol Oncol*, 1998, 70(1): 17-22.
- [4] Li YX, Weber-Johnson K, Sun LQ, *et al.* Effect of pentoxifylline on radiation-induced G₂-phase delay and radiosensitivity of human colon and cervical cancer cells [J]. *Radiat Res*, 1998, 149 (4): 338-42.
- [5] Blasina A, Price BD, Turenne GA, *et al.* Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM[J]. *Curr Biol*, 1999, 9: 1135-8.
- [6] 惠周光, 李晔雄, 杨伟志, 等. UCN-01 提高肺腺癌细胞放射敏感性的实验观察[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2002, 11(4): 255-8.
Hui ZG, Li YX, Yang WZ, *et al.* Potentiation of radiosensitivity by 7-hydroxystaurosporine in a pulmonary adenocarcinoma cell line [J]. *Chin J Radiat Cancer*, 2002, 11(4): 255-8.
- [7] 李晔雄, Philippe A Coucke. 己酮可可碱对啞啶拮抗物细胞毒性的影响[J]. *癌症*, 2001, 10(12): 1359-62.
Li YX, Coucke PA. Cytotoxic influence of pentoxifylline on pyrimidine antagonist[J]. *Chin J Cancer*, 2001, 10(12): 1359-62.
- [8] Eley KW, Benedict SH, Chung TD, *et al.* The effects of pentoxifylline on the survival of human glioma cells with continuous and intermittent stereotactic radiosurgery irradiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 54(2): 542-50.
- [9] Strunz AM, Peschke P, Waldeck W, *et al.* Preferential radiosensitization in p53-mutated human tumour cell lines by pentoxifylline-mediated disruption of the G₂/M checkpoint control [J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(8): 721-32.
- [10] Pauwels B, Korst A, Pattyn G, *et al.* Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism *in vitro* [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 57(4): 1075-83.
- [11] Merlin T, Brandner G, Hess RD. Cell cycle arrest in ovarian cancer cell lines does not depend on p53 status upon treatment with cytostatic drugs[J]. *Int J Oncol*, 1998, 13(5): 1007-16.
- [12] Taga M, Shiraishi K, Shimura T, *et al.* The effect of caffeine on p53-dependent radioresponses in undifferentiated mouse embryonal carcinoma cells after X-ray and UV-irradiations [J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2000, 41(3): 227-41.
- [13] Binder AB, Serafin AM, Bohm LJ. Abrogation of G(2)/M-phase block enhances the cytotoxicity of daunorubicin, melphalan and cisplatin in TP53 mutant human tumor cells [J]. *Radiat Res*, 2000, 154(6): 640-9.
- [14] Theron T, Bohm L. Influence of the G₂ cell cycle block abrogator pentoxifylline on the expression and subcellular location of cyclin B1 and p34cdc2 in HeLa cervical carcinoma cells [J]. *Cell Prolif*, 2000, 33(1): 39-50.
- [15] Honess DJ, Andrews MS, Ward R, *et al.* Pentoxifylline increases RIF-1 tumour pO₂ in a manner compatible with its ability to increase relative tumour perfusion [J]. *Acta Oncol*, 1995, 34(3): 385-9.

(责任编辑:段咏慧)

(上接 381 页)

主要分布于神经元膜树突起始部及树突干上。由于其抗原决定簇由膜外 N 端氨基酸序列及三级结构决定,易受固定影响,常规的醛类固定剂易使 NR1 胞外区多肽链拓扑构象改变,出现空间障碍使抗体不能与抗原决定簇接触;或者使抗原发生分子间交联,从而遮盖抗原决定簇,因此需要应用缓和的固定方式, -20℃纯甲醇和-20℃纯丙酮 5 min 短时间固定,最为合适。

致谢:感谢北京军事医学科学院基础所神经生物室阙海萍老师、吕双红博士、林秋霞博士在实验中给予的帮助。

参考文献:

- [1] Yamakura T, Shimoji K. Subunit and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel[J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 59(3): 279-98.
- [2] Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, *et al.* Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor [J]. *Nature*, 1991, 354(6348): 31-7.
- [3] Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, *et al.* Heteromeric NMDA receptor: molecular and functional distinction of subtypes [J]. *Science*, 1992, 256(5060): 1217-21.
- [4] Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function [J]. *Science*, 1992, 258(5082): 597-603.
- [5] 古德全. 固定对免疫组织化学反应的影响 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志(Chin J Histochem Cytochem)*, 1997, 6(1): 78-80.
- [6] Weaver DL, Mitchell J, Leslie KO. Effects of four primary fixatives on the sensitivity of immunocytochemical staining [J]. *J Histotechnol*, 1992, 15(1): 27-9.
- [7] 丁红梅, 刘宝英, 杨光, 等. 免疫细胞化学中不同固定剂对核蛋白检测效果的影响 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2001, 25(4): 290-3.
Ding HM, Liu BY, Yang G, *et al.* Effect of different fixatives on the detection of subcellular localization of nucleoproteins by immunocytochemistry [J]. *Bull Acad Milit Med Sci*, 2001, 25(4): 290-3.
- [8] 陈子馨, 吴敬, 王石麟, 等. 神经免疫组织化学的基本技术 [J]. *中华病理学杂志(J Chin Patbol)*, 1996, 25(6): 385-7.