

不同固定液对内皮细胞形态和 EP4 荧光染色的影响

韩陈陈, 马 旻, 李亦凡, 汪 扬, 魏 伟

摘要 采用 4 种固定液对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 进行固定: ① -20℃ 无水甲醇溶液; ② 新鲜配制 4 g/L 多聚甲醛溶液; ③ 久置 (≥1 个月) 4 g/L 多聚甲醛溶液; ④ 3.7% 甲醛溶液。观察细胞形态和前列腺素受体 4 (EP4) 免疫荧光染色效果。结果表明 3.7% 甲醛溶液固定后进行免疫荧光染色显示大部分细胞维持梭形或不规则多边形, EP4 荧光染色效果较佳; 所以 3.7% 甲醛溶液固定液固定细胞 20 min, HUVECs 形态典型, EP4 的荧光染色效果最佳。

关键词 固定液; 内皮细胞; EP4 受体免疫荧光

中图分类号 R 9-331; R 361.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)09-1372-03

血管内皮细胞是血液与血管壁之间的屏障, 参与炎症反应^[1], 在类风湿关节炎发展过程中起着极为关键的作用, 其分化迁移、增殖等作用增强会促进类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 滑膜血管新生, 导致滑膜炎持续存在和血管翳生成^[2]。前列腺素受体 4 (prostaglandin receptor 4, EP4) 属于 G 蛋白偶联受体^[3], EP4 脱敏在类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的发展中起着重要的作用^[4-5]。前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 作为介导炎症反应的重要介质, 参与调节血管内皮的生成^[6-7]。但 PGE2 是否是通过 EP4 受体起作用及 EP4 受体表达与血管内皮细胞生成的关系仍不清楚。在 EP4 免疫荧光的实验中发现, 固定液对于实验结果的影响至关重要。该研究通过选择不同的固定液, 以期找到既能保持细胞原有形态结构又不影响免疫荧光染色的方法。

2016-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81502123、81330081); 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085QH130); 安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2014A119)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 韩陈陈, 女, 硕士研究生;

魏 伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

马 旻, 女, 博士, 讲师, 责任作者, E-mail: mayang_ahmu@126.com

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 山羊抗兔 EP4 抗体 (英国 Abcam 公司); 兔源的荧光二抗 (美国 molecular probes 公司); 胎牛血清 (美国 HyClone 公司); 胰酶 (南京 Wisent 公司); DMEM (美国 Gibco 公司); DAPI (上海 Beyotime 公司); PBS 缓冲液 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 无水甲醇溶液 (天津星马克科技发展有限公司); 多聚甲醛固体 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醛溶液 (37% ~ 40%) (西陇化工股份有限公司); TritonX-100 (中国 BIOSHARP 公司); BSA (上海 Sigma 公司); IX-70 荧光倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 2306-2 型 CO₂ 培养箱 (美国 SHEL LAB 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVECs) 培养 HUVECs (由安徽医科大学临床药理研究所提供) 以 2×10^6 个/ml 密度接种于细胞培养瓶中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 不同固定方法 待 HUVECs 达到 80% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液稀释细胞至 5×10^4 个/ml, 将细胞以 500 μl/孔接种至 48 孔培养板中, 待第 2 天细胞贴壁后, 吸出培养液进行固定。不同固定方法: ① -20℃ 预冷的无水甲醇溶液, 室温 5 min; ② 新鲜配制的 4 g/L 多聚甲醛溶液, 室温 20 min; ③ 久置 4 g/L 多聚甲醛溶液, 室温 20 min; ④ 3.7% 甲醛溶液, 室温 20 min。0.2% TritonX-100 渗透作用 15 min。

1.2.3 免疫荧光实验 细胞在 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液中封闭 1 h 后加入 EP4 抗体 (稀释比例 1:100), 于 4℃ 在侧摆摇床上缓慢摇动孵育过夜。用 PBS 洗涤液洗涤 3 次后, 再加入稀释好的荧光标记的二抗溶液, 4℃ 侧摆摇床上继续孵育 1 h (避光)。PBS 洗涤液洗涤 3 次后, 加 DAPI 染色 5 min, PBS 洗涤液洗涤 1 次; 尽快在荧光显微镜下观察并拍照。

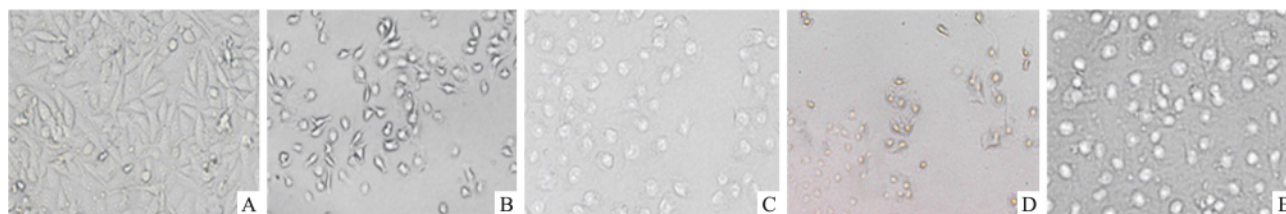


图1 不同固定液对 HUVECs 形态的影响 SP×100

A: 正常培养 HUVECs; B: 无水甲醇溶液; C: 新鲜配制 4 g/L 多聚甲醛溶液; D: 久置 4 g/L 多聚甲醛溶液; E: 3.7% 甲醛溶液

2 结果

2.1 不同固定液对 HUVECs 形态的影响 4 种细胞固定方法中,从 HUVECs 形态上看,以 -20°C 预冷的甲醇和新鲜配制 4% 多聚甲醛对 HUVECs 形态影响较小。见图 1。镜下观察正常培养的 HUVECs 形态良好,多呈现梭形或不规则多边形; -20°C 无水甲醇溶液固定细胞,镜下观察 HUVECs 形态良好多呈现梭形或不规则多边形;新鲜配置的 4 g/L 多聚甲醛固定液固定细胞,镜下观察 HUVECs 大部分呈梭形,部分细胞形态变圆;久置的 4 g/L 多聚甲醛溶液,镜下观察细胞形态大部分变圆、变小;3.7% 甲醛溶液固定液,镜下观察大部分 HUVECs 维持梭形或不规则多边形,只有少数细胞变小。

2.2 不同固定液对 EP4 免疫荧光染色效果的影响

从 EP4 免疫荧光染色结果看,3.7% 甲醛溶液固定,荧光染色效果最好,EP4 受体在胞质和胞膜表达,胞核无表达。见图 2。 -20°C 甲醇固定,荧光显色模糊,EP4 在胞质、胞膜、胞核均有表达;新鲜配置的 4% 多聚甲醛溶液固定,荧光染色效果较好,EP4 大部分在胞质和胞膜表达,只有少数细胞胞核也有表达;久置的 4% 多聚甲醛溶液固定,DAPI 染色后用荧光显微镜观察只有胞核而无胞膜和胞质,未见 EP4 荧光染色,可能是实验过程中固定液破坏了细胞膜导致的;3.7% 甲醛溶液固定,EP4 在胞质和胞膜表达,胞核无表达,荧光染色效果最好。

3 结论

免疫荧光细胞化学技术是根据抗原抗体反应的原理,先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标志物,再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原(或抗体),经过反应,形成的抗原抗体复合物带有荧光素,在荧光显微镜下可分辨出抗原或抗体所在位置及性质^[8]。免疫荧光方法中固定的目的是迅速终止酶的活性,避

免组织细胞结构的解体,将抗原固定在原位,并保持其抗原性;同时使蛋白变性、凝固、沉淀,保持组织细胞原有的形态结构^[9],所以选择最佳固定液尤为重要。对能在免疫荧光实验中正常使用的固定液要求有 3 点^[10]: ① 保持细胞或组织原有的形态;② 保护抗原原有的定位及抗原特性;③ 细胞或组织经处理后具有良好的通透性,可使免疫化学试剂渗入。

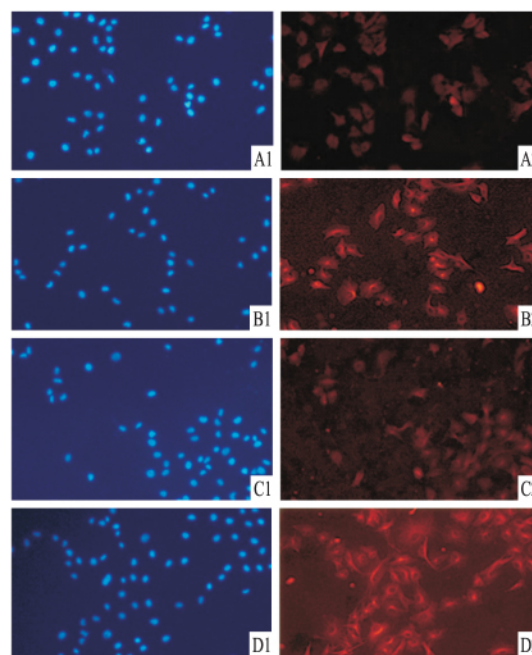


图2 不同固定液对 EP4 受体免疫

荧光染色效果的影响 间接荧光染色×100

A: 无水甲醇溶液固定; B: 新鲜配制 4 g/L 多聚甲醛溶液固定; C: 久置 4 g/L 多聚甲醛溶液固定; D: 3.7% 甲醛溶液固定; 1: DAPI 核染色(蓝色); 2: EP4 受体免疫荧光染色(红色)

本研究结果表明,不同的固定液对 HUVECs 形态和 EP4 荧光染色有较大影响,3.7% 甲醛溶液固定细胞 20 min 对保存 HUVECs 形态和抗原性效果最好。甲醛属于交联固定剂,可使细胞内蛋白之间相互交联保存抗原于原位,因此能较好地保存抗原及组织细胞的形态结构。甲醇固定是通过蛋白变性

作用实现的,更真实地反映出骨架蛋白在细胞的分布。甲醇固定剂是脂溶性的,会损伤细胞的通透性,用甲醇固定后,荧光染色很弱且核区不明显,染色弥散,这可能与甲醇类固定剂对细胞核固定不良且会使蛋白降解有关。多聚甲醛是交联固定剂,能够使细胞内蛋白之间相互交联保存抗原于原位,既能较好地保存组织细胞的形态结构,又能使蛋白质得以固定。但其缺点在于其交联作用可能阻碍抗体的渗透,造成染色模糊^[11]。同时,固定液放置一定时间可发生重聚作用,而且重聚作用的速度取决于 pH 值, pH 值低时聚合加快,使固定效果下降^[12]。因此,本研究根据抗原对固定剂的稳定性和细胞结构完整性的要求,在保持抗原性及细胞形态之间做某些选择,使最大限度地减少固定剂对抗原性和细胞结构的破坏作用。

参考文献

- [1] Gerdes N, Seijkens T, Lievens D, et al. Platelet CD40 exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(3): 482–90.
- [2] Huang M, Qiu Q, Zeng S, et al. Niclosamide inhibits the inflammatory and angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(12): 1023–32.
- [3] Gamil A A, Guo T C, König M, et al. Distribution of EP4 receptor in different Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues [J]. *Dev Comp Immunol*, 2015, 48(1): 143–50.
- [4] Guo T C, Gamil A A, Koenig M, et al. Sequence analysis and identification of new isoform of EP4 receptors in different atlantic salmon tissues (*Salmo salar* L.) and its role in PGE2 induced immunomodulation in vitro [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120483.
- [5] Li N, Zhang L, Tang H. Antagonist of prostaglandin E2 receptor 4 induces metabolic alterations in liver of mice [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(3): 1566–73.
- [6] Namkoong S, Lee S J, Kim Y M, et al. Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cell [J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(6): 588–600.
- [7] Corti F, Finetti F, Ziche M, et al. The syndecan-4/protein kinase C α pathway mediates prostaglandin E2-induced extracellular regulated kinase (ERK) activation in endothelial cells and angiogenesis in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(18): 12712–21.
- [8] Barbierato M, Argentini C, Skaper S D. Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846: 235–46.
- [9] He Z, Campolmi N, Ha Thi B M, et al. Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 3494–511.
- [10] Spector D L. Immunofluorescence localization of nuclear proteins [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011, 2011(10): 1276–80.
- [11] Wang H, Matisse M P. Immunofluorescence staining with frozen mouse or chick embryonic tissue sections [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1018: 175–88.
- [12] Cardoso Nd, Firmiano E M, Gomes I D, et al. Histochemical and immunohistochemical study on endocrine cells (5HT, GAS, and SST) of the gastrointestinal tract of a teleost, the characin *Astyanax bimaculatus* [J]. *Acta Histochem*, 2015, 117(7): 595–604.

Effect of different fixative on endothelial cells morphology and immunostaining of EP4 receptor

Han Chenchen, Ma Yang, Li Yifan, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,*

Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine Ministry of Education,

Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Human umbilical endothelial cells (HUVECs) were fixed by four different fixative, ① cells were fixed with precooled methanol solution (–20℃); ② cells were fixed with fresh preparation of 4 g/L paraformaldehyde solution (PFA); ③ cells were fixed with old 4 g/L PFA solution (more than a month); ④ cells were fixed with 3.7% formaldehyde solution. Cells which were fixed with 3.7% formaldehyde solution maintained fusiform or irregular polygon, and the prostaglandin receptor 4 (EP4) immunostaining effect was the best. We concluded that 3.7% formaldehyde solution for 20 min was suitable for HUVECs immunofluorescence, HUVECs maintain typical cell morphology and the EP4 immunostaining effect was the best.

Key words fixative; HUVECs cell morphology; EP4 immunofluorescence