

应用免疫组织化学法研究 γ -干扰素 在大鼠室管膜中的定位分布*

孙志宏, 欧阳五庆, 杨增歧, 赵友琴, 赵慧英, 胡 格, 陈树林, **李育良**

(西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 用免疫组织化学 SP 法结合葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍铵呈色法, 对正常成年大鼠室管膜上 IFN- γ 的特征和分布进行了研究。结果表明: IFN- γ 免疫反应阳性细胞分布于大鼠侧脑室壁、第三脑室壁、中脑导水管、第四脑室壁的室管膜中。其中侧脑室、第三脑室、第四脑室壁上存在有伸长细胞, 发出基突伸向周围灰质。提示 IFN- γ 可能作为一种新的脑神经肽存在于室管膜中, 参与脑-脑脊液回路的调节。

[关键词] 室管膜; IFN- γ ; 免疫组织化学; 大鼠

[中图分类号] S852.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)02-041-03

动物和人体存在着免疫-神经-内分泌调节网络, 这一网络各组成部分之间的相互作用, 对维持机体正常的生理功能和内环境的稳定起着重要的作用^[1]。参与这一网络活动的物质除神经递质和内分泌激素以外, 还有第三类物质, 即细胞因子, γ -干扰素(IFN- γ)就是其中一种。IFN- γ 不仅具有抗病毒、抗肿瘤的功能, 而且在免疫调节中起重要作用。近年来, IFN- γ 被视为一种新的神经肽和有效的神经递质^[2]。有学者报道^[3,4], 在室管膜的分布有 P 物质、生长抑素神经递质, 但是细胞因子在室管膜上是否分布还未见报道。本试验应用免疫组织化学 SP 法观察了大鼠室管膜内 IFN- γ 免疫反应细胞的分布情况。

1 材料和方法

1.1 试剂

鼠抗 IFN- γ 单克隆抗体(1:2000, 美国 Sigma 公司), 抗鼠 SP 试剂盒(Cat No: Kit-9701, 福州迈新生物技术开发公司), DAB(美国 Sigma 公司)。

1.2 试验动物及组织处理

正常成年 SD 纯系大鼠 5 只(第四军医大学实验动物中心提供), 体重 200~250 g, 雌雄不限, 安静养数天, 给以充足、清洁的饮水和摄食。用质量分数 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉(40 mg/kg 体重), 先经心脏快速灌流 4 生理盐水 100 mL 后, 再灌入约

400 mL 4% 的体积分数 4% 的多聚甲醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液, PB 配制, pH 7.4)。取出脑组织, 置入同样固定液中后固定 12 h, 浸入体积分数 20% 的蔗糖 PB 溶液中, 直至组织沉底。然后做连续冠状冰冻切片, 片厚 40 μ m, 隔 2 取 2, 共制 2 套切片, 其中 1 套用作 IFN- γ 免疫组织化学 SP 染色, 另一套部分用作对照染色, 部分用作尼氏染色并结合 George Paxinos 图谱进行核团定位。

1.3 免疫组织化学 SP 法操作程序

SP 试剂盒由 A、B、C、D 4 种试剂组成。每张切片加 1 滴或 50 μ L 过氧化酶阻断液(A 液), 室温下孵育 30 min。每张切片加 1 滴或 50 μ L 非免疫血清(B 液), 室温下孵育 30 min。每张切片加 1 滴或 50 μ L 第一抗体, 4 $^{\circ}$ C 下孵育 48~72 h。每张切片加 1 滴或 50 μ L 生物素标记的第二抗体(C 液), 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。每张切片加 1 滴或 50 μ L 链亲和素-过氧化物酶液(D 液), 室温下孵育 40 min。各步之间, 切片经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min。加入 DAB 反应液(0.5 g/L DAB, 25 g/L 硫酸镍铵, 2 g/L 葡萄糖, 0.4 g/L 氯化铵和 0.007 g/L 葡萄糖氧化酶, 用 pH 6.2 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液配制)呈色 15~30 min, 蒸馏水洗 2 次, 每次 15 s, 在 10 g/L 明胶的 PBS 混合液中贴片、晾干、脱水、透明、封片。

* [收稿日期] 2000-10-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39770557)

[作者简介] 孙志宏(1968-), 男, 陕西延安人, 讲师, 在职硕士研究生, 现在延安大学生物系工作, 716000。

1.4 对照

用 PBS 或正常牛血清白蛋白替代第一抗体, 做为阴性对照。

2 结果

用 PBS 或正常牛血清白蛋白替代第一抗体, 结果为阴性, 说明本试验显示的阳性结果为特异性。IFN- γ 的免疫反应性室管膜细胞在侧脑室(LV)侧壁(图 1)、第三脑室(V3)侧壁(图 2~3)、中脑导水管(MA)(图 4~5)和第四脑室(V4)侧壁(图 6)上均有分布。

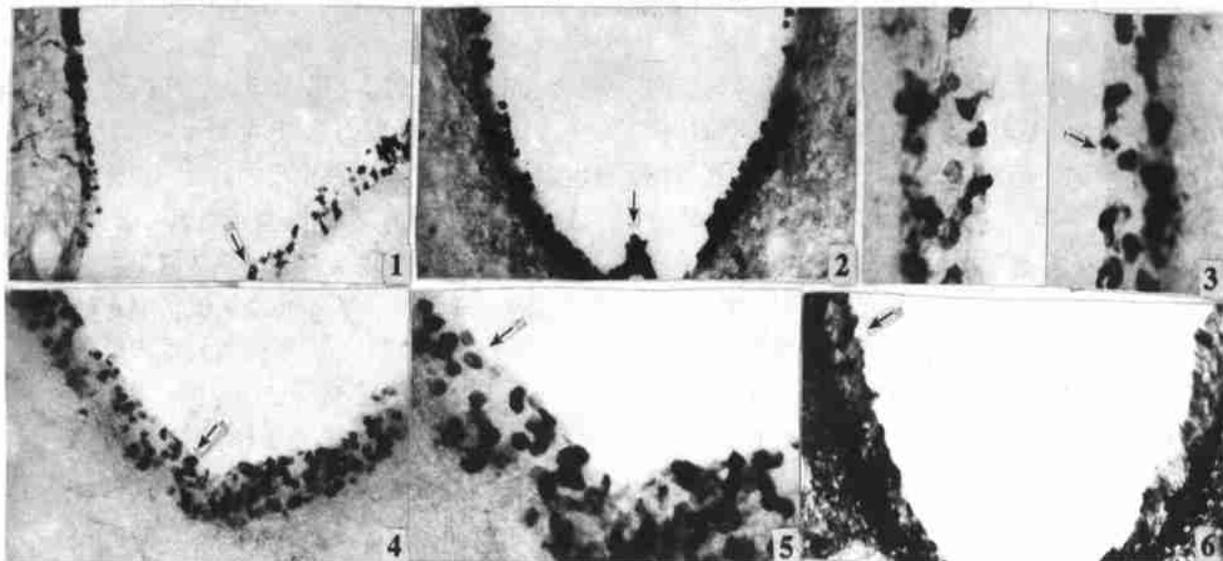
侧脑室 阳性细胞的数量较多, 形态多种, 有卵圆形、锥形、不规则形, 胞质着色较深, 胞核多呈空泡

状, 且多位于细胞中央, 有的阳性细胞似伸长细胞, 有突起伸向周围灰质, 也有的阳性细胞有突起伸向侧脑室。

第三脑室 阳性细胞呈卵圆形、锥形, 有的似伸长细胞, 其突起伸向室管膜下层。

中脑导水管 阳性细胞数量多, 细胞多呈圆形、卵圆形, 胞质着色深浅不一, 可分为强阳性细胞和弱阳性细胞, 强阳性细胞胞质着色深, 而弱阳性细胞胞质着色较深, 胞核呈空泡状, 核多偏位。

第四脑室 阳性细胞数量较少, 但细胞较大, 多呈长椭圆形、柱形, 胞质着色深, 有的阳性细胞似伸长细胞, 其突起明显, 顶突伸向第四脑室, 基突伸向第四脑室周围灰质。



图版 1~6 IFN- γ 在室管膜的分布

图 1 侧脑室室管膜层的分布。×100; 图 2 第三脑室室管膜层的分布。×200; 图 3 第三脑室室管膜层的分布。×400; 图 4 中脑导水管室管膜层的分布。×200; 图 5 中脑导水管室管膜层的分布。×400; 图 6 第四脑室室管膜层的分布。×200

Fig 1-6 Distribution of IFN- γ in the ependyma

Fig. 1. In the ependyma of the lateral ventricle ×100; Fig. 2. In the ependyma of the third ventricle ×200; Fig. 3. In the ependyma of the third ventricle ×400; Fig. 4. In the ependyma of the aqueduct of midbrain ×200; Fig. 5. In the ependyma of the aqueduct of midbrain ×400; Fig. 6. In the ependyma of the fourth ventricle ×200

3 讨论

传统认为, 干扰素由免疫器官的 T 细胞^[5]、NK 细胞^[6]、淋巴细胞、单核细胞、组织细胞产生, 有免疫调节、B 细胞分化抗病毒作用。但目前研究认为某些内分泌腺、中枢神经系统有少数阳性细胞位于下丘脑和中脑背侧背盖, 在外周神经系统的交感神经星状神经节、副交感神经节细胞、脊神经节及肾上腺髓质细胞也有阳性细胞存在^[2,5-7]。因此, Kiefer^[2]认为, IFN- γ 可能为一种新的神经肽和有效的神经递质, 并设想可能参与免疫过程的神经调控。近年来,

由于脑脊液中发现越来越多的激素、神经递质和其他神经活性物质, 人们对直接接触脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 的脑室管壁室管膜细胞, 特别是伸长细胞 (tanycyte), 在脑脊液和脑组织之间的物质转运和化学信号传递中的作用非常关注^[9]。已有学者报道^[5,6]了 SP、SS 免疫阳性细胞在室管膜的分布, 但是细胞因子在室管膜的分布尚未见报道。本实验采用免疫组织化学 SP 法, 首次发现了含 IFN- γ 的免疫反应性室管膜细胞, 尤其是伸长细胞, 特化的室管膜细胞——伸长细胞, 一方面可通过其顶端吸收脑脊液的某些物质, 另一方面通过其

细长的基突,将这些物质释放入脑组织和毛细血管,形成脑脊液和脑组织间的桥梁。目前认为,伸长细胞可能具有合成调节物质的作用,或在脑脊液和血管间起输送物质的作用^[9]。IFN- γ 在室管膜的发现,提示室管膜细胞可能具有合成IFN- γ 的潜在能力,在脑-脑脊液回路中具有重要作用。同时这一结果支持神经系统也能合成和分泌IFN- γ 的观点,为研究神经、免疫、内分泌之间的相互关系,提供了形态学依据。

关于伸长细胞分布区域,不同的神经肽的伸长细胞分布区域有所不同。含SS的免疫反应阳性伸长细胞于下丘脑视前区第三脑室侧壁上,而含SP的免疫反应阳性伸长细胞分布区域较广,其中位于

最后区延髓中央管背侧、背外侧和腹外侧含SP的伸长细胞基突较长,伸至延髓中央管周围灰质的较远部位^[3]。本实验发现含IFN- γ 的伸长细胞主要分布于LV、V3、V4侧壁上,与周围的灰质核团存在着某种联系,其关系如何尚待进一步探讨。

本试验报道了大鼠室管膜IFN- γ 免疫阳性细胞的分布,其他细胞因子在室管膜上有无分布,细胞因子、神经递质及其激素在室管膜上有无共存,还有待进一步研究。

致谢:本文承蒙沈霞芬教授、范光丽教授在组织学观察方面予以热情指导,在此谨表谢意。

[参考文献]

- [1] 朱长庚 免疫-神经-内分泌网络[J]. 解剖学报, 1993, 24(2): 216
- [2] Kiefer R, Keutzbeg GW. Gamma interferon like immunoreactivity in the rat nervous system [J]. Neurosci, 1990, 37(3): 725- 732
- [3] 黄卫, 李海标, 卢光启 P 物质在大鼠室管膜中定位分布的免疫组织化学研究[J]. 解剖学报, 1996, 27(2): 158- 160
- [4] 黄卫, 李海标, 卢光启 生长抑素在大鼠室管膜中定位分布的免疫组织化学和原位杂交的研究[J]. 解剖学报, 1996, 27(4): 383- 385
- [5] Eneroth A, Kristensson K, Lundberg A, et al Interferon- γ -like immunoreactivity in developing rat spinal ganglia neurons in vivo and vitro [J]. J Neurocytol, 1991, 20: 225- 231.
- [6] Lundberg A, Olsson T, van der Meide P H, et al Interferon-gamma-like immunoreactivity in certain neurons of the central and peripheral nervous system [J]. J Neurosci Res, 1989, 24: 451- 456
- [7] Marcucci F, Waller M, Kirchner H, et al Production of immune interferon by murine T-cell clones from long term cultures [J]. Nature, 1981, 291: 79- 81.
- [8] Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark S C. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2 [J]. J Exp Med, 160: 1147- 1169.
- [9] 朱长庚 脑-脑脊液神经体液回路[J]. 神经解剖学杂志, 1988, 4(2): 125

Immunohistochemical study of the localization of IFN- γ in the ependyma of the rat

SUN Zhi-hong, OUYANG Wu-qing, YANG Zeng-qi, ZHAO You-qin,
ZHAO Hui-yang, HU Ge, CHEN Shu-lin, LI Yu-liang

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Using immunohistochemical SP method and visualized with glucose oxidase-DAB-nickel method examine the distribution and characteristics of Interferon- γ (IFN- γ) in normal adult rat ependyma. The results showed that IFN- γ immunoreactive production existed in the wall of the lateral ventricle (LV), the third ventricle (V3), the aqueduct of midbrain (MA) and the wall of the fourth ventricle (V4). These cells belonged to tanycytes and situated in the ependyma of LV, V3, V4. Their basal processes extended into the central gray. The results suggest that IFN- γ may be a novel brain-gut peptide and modulate brain-CSF circuit.

Key words: ependyma; IFN- γ ; immunohistochemistry; rat