

## 牛蛙肥大细胞中类胰蛋白酶的证实

杨冬梅, 许乐仁

(贵州大学动物医学系, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 类胰蛋白酶已被作为人类和某些哺乳动物组织中肥大细胞的标志。为检测蛙科动物肥大细胞胞浆中是否含有类胰蛋白酶, 采用了小鼠抗人类肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 通过间接免疫过氧化物酶技术, 对牛蛙的舌, 肠和脾以及人食道鳞癌组织(用作阳性对照)石蜡切片中的肥大细胞进行染色。首次在 Bouin 氏液固定的牛蛙组织中证实了牛蛙肥大细胞胞浆中类胰蛋白酶的存在, 且单克隆抗体 AA1 与牛蛙肥大细胞中的类胰蛋白酶可获得良好的交叉反应。类胰蛋白酶阳性细胞多位于牛蛙肠黏膜固有层, 少量见于肠绒毛基底部及舌粘膜下腺体周围, 而未见于脾组织中。人食道癌间质中可见多量类胰蛋白酶阳性细胞。研究证实, 与人类肥大细胞相似的是牛蛙肥大细胞也含有这种特有的类胰蛋白酶, 牛蛙有可能是用作肥大细胞生物学的理想实验动物。

**关键词:** 牛蛙; 肥大细胞; 类胰蛋白酶; 免疫组化

**中图分类号:** Q 952; S 917

**文献标识码:** A

类胰蛋白酶(tryptase)是肥大细胞介质中一种重要的中性蛋白酶。它与胰蛋白酶相似, 属丝氨酸蛋白酶家族, 由四个非共价结合的亚单位组成四聚体结构<sup>[1-3]</sup>。Glennner 和 Cohen<sup>[4]</sup>利用胰蛋白酶对肥大细胞进行酶组织化学染色时发现肥大细胞能够被染色, 说明肥大细胞中存在胰蛋白酶样活性物质。Schwartz 等<sup>[5]</sup>在对这些物质进行纯化后发现这些物质 90% 以上具有胰蛋白酶样活性, 故命名为类胰蛋白酶。该酶在肥大细胞中的贮存和表达具有高度选择性, 不能在其它类型细胞中检出, 因此类胰蛋白酶成为鉴定人肥大细胞的特异性标志<sup>[3-5]</sup>。于是小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体及其免疫组化技术<sup>[6-8]</sup>, 以及鉴定人肥大细胞类胰蛋白酶的酶组织化学技术应运而生<sup>[9]</sup>。

Walls 等<sup>[8]</sup>制备出小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 并采用间接免疫过氧化物酶技术鉴定人肥大细胞。用同样的方法在

猪, 牛和羊的组织中获得了良好的交叉反应并证实了这些动物的肥大细胞中类胰蛋白酶的存在<sup>[10-11]</sup>。采用 Harvima 等<sup>[9]</sup>鉴定人肥大细胞的酶组织化学技术也发现猪、牛、绵羊、犬、猫和大鼠等多种哺乳动物的肥大细胞中存在类胰蛋白酶<sup>[12-13]</sup>。这些工作说明了鉴定人肥大细胞的一些组织化学技术也适用于多种动物肥大细胞的研究, 且类胰蛋白酶也是多种动物肥大细胞的特异性标志<sup>[5-13]</sup>。

对蛙科等两栖类动物的肥大细胞已有所研究<sup>[14-16]</sup>。但迄今为止, 尚未见有关这些低等脊椎动物的肥大细胞是否含有中性蛋白酶的研究报道。本实验采用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1, 通过间接免疫过氧化物酶技术对牛蛙(*Rana catesbeiana*)组织中类胰蛋白酶阳性肥大细胞存在的可能性进行了探索性研究。为证实该技术的可靠性, 同时使用人食道癌组织作为阳性对照进行染色效果的比较观察。

收稿日期: 2007-11-02

资助项目: 国家自然科学基金项目(30471325)

作者简介: 杨冬梅(1980-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 从事动物细胞生物学研究。E-mail: ydmneimeng@sohu.com

通讯作者: 许乐仁, Tel: 0851-6838047, E-mail: xuleren@yahoo.com

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1; 生物素标记二抗 IgG; 抗生物素标记 HRP; DAB 显色剂; 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 山羊血清, 均购自 Promab 远泰生物技术有限公司。

### 1.2 组织采集及处理

市售健康牛蛙(500±50) g 5 只, 捣毁延髓处死后迅速取其肠, 舌和脾, 于 10% 中性缓冲甲醛(NBF) 和 Bouin 氏液分别固定, 常规脱水, 透明, 石蜡包埋, 4 μm 切片。另从贵州省人民医院获得人(成年男性)食管癌手术切除组织一份, 处理同上, 以供阳性对照。

免疫组化技术 切片依次经下述处理: ①脱蜡: 二甲苯 I 10 min → 二甲苯 II 10 min。②水化: 100% 酒精 5 min → 95% 酒精 5 min → 75% 酒精 5 min, PBS 洗三次, 各 5 min。③ 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80% 甲醇) 滴加在组织上, 室温 10 min, PBS 洗三次, 各 5 min。④抗原修复: 0.1% 胰蛋白酶 (0.1% CaCl<sub>2</sub>, PH 7.8), 室温 10 min, PBS 洗三次, 各 5 min。⑤正常山羊血清封闭, 室温 20 min, 甩去多余液体。⑥滴加一抗, 4℃ 过夜, PBS 洗三次, 各 5 min。⑦滴加生物素标记二抗, 37℃ 1 h, PBS 洗三次, 各 5 min。⑧滴加抗生物素 HRP, 37℃ 1 h, PBS 洗三次, 各 5 min。⑨ DAB 显色 5~10 min, 镜下控制显色时间, PBS 洗 10 min。⑩苏木素复染 2 min, 盐酸酒精分化。⑪脱水, 透明, 封片, 镜检。阴性对照组切片不加二抗, 其它步骤同。

常规组织化学染色 采用文献[10]中叙述的 0.5% 甲苯胺兰 (0.5 mol·L<sup>-1</sup> HCl) 染色法进行。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化染色

两种固定液固定的人食管癌组织镜检时, 在肿瘤间质中均能观察到许多胞浆为棕黄色的类胰蛋白酶阳性细胞(图版-1)。但 Bouin 氏液固定组切片中的免疫组化染色效果优于 NBF 固定组, 其所染色切片中的类胰蛋白酶阳性细胞较 NBF 固定组的阳性细胞边缘整齐。

在 Bouin 氏液固定的牛蛙组织中, 类胰蛋白

酶阳性细胞胞浆染为棕黄色。类胰蛋白酶阳性细胞主要分布于肠黏膜固有层, 圆形或椭圆(图版-2), 少量见于肠绒毛基部(图版-3)和舌黏膜下腺体周围(图版-4)。阴性对照组切片中细胞胞浆也无着色。NBF 固定的牛蛙被检组织中未能观察到免疫组化染色阳性细胞。

### 2.2 常规组化染色

采用两种固定液固定, 甲苯胺兰染色, 肥大细胞的胞浆均被染成紫红色。在人食管癌间质中, 甲苯胺兰染色阳性细胞的分布与类胰蛋白酶免疫染色阳性细胞的分布相似。而在牛蛙组织中, 除肠黏膜固有层的甲苯胺兰染色阳性细胞的分布与类胰蛋白酶免疫染色阳性细胞的分布比较相似外, 甲苯胺兰染色阳性细胞还遍布舌的黏膜上皮、肌间, 肠黏膜下结缔组织, 以及弥散分布于脾的实质中。

## 3 讨论

研究证实, 人类和几乎所有哺乳动物的肥大细胞胞浆颗粒中都存在类胰蛋白酶<sup>[2-3]</sup>。类胰蛋白酶是肥大细胞中的一种重要的生物活性介质<sup>[1-3]</sup>。因为这一中性蛋白酶仅见于肥大细胞的胞浆颗粒中, 因而成为鉴定人肥大细胞重要的特异性标志<sup>[5-9]</sup>。本研究表明, 利用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1, 通过间接免疫过氧化物酶技术<sup>[7]</sup>首次证实牛蛙肥大细胞胞浆颗粒中也存在类胰蛋白酶, 且小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 可与 Bouin 氏液固定的牛蛙组织石蜡切片中的肥大细胞获得良好的特异性交叉反应。这一研究结果说明, 尽管两栖动物与人类和哺乳动物之间在生物进化水平方面存在着很大的距离, 但它们的肥大细胞也具有人类和哺乳动物肥大细胞的某些重要的共同生物化学性质。蛙科动物肥大细胞胞浆颗粒中不但具有组织胺等生化介质<sup>[14]</sup>, 本实验用小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单抗对牛蛙组织进行免疫组化染色, 首次证实了牛蛙肥大细胞中(主要是肠黏膜固有层的肥大细胞)具有特征性类胰蛋白酶的存在。这一发现为两栖类动物肥大细胞功能和特性的研究提供了依据, 有助于深化对两栖动物肥大细胞生物学的认识。

在本实验的前期工作中, 运用鉴定人肥大细胞类胰蛋白酶的小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单

克隆抗体及其免疫组化技术<sup>[8]</sup>以及酶组织化学技术<sup>[9]</sup>,已经证实了多种哺乳动物的肥大细胞中含有类胰蛋白酶<sup>[10-13]</sup>。本实验又证实低等脊椎动物牛蛙的肥大细胞亦含有类胰蛋白酶,可见,类胰蛋白酶同样可以作为鉴定蛙肥大细胞的特异性标志。在中性缓冲甲醛(NBF)固定的人组织中小鼠抗人肥大细胞类胰蛋白酶单克隆抗体 AA1 可获得良好的免疫染色<sup>[8]</sup>,在多种哺乳动物肥大细胞免疫组化研究中,NBF 固定组织中的肥大细胞也能获得理想的免疫染色<sup>[10-11]</sup>。本研究中,Bouin 氏液固定的牛蛙组织和人食管癌组织进行类胰蛋白酶免疫组化染色时肥大细胞均呈现良好的阳性反应,NBF 固定的人食管癌组织中的肥大细胞也获得了良好的免疫染色效果,而 NBF 固定的牛蛙组织中却未能获得象人组织那样类胰蛋白酶阳性免疫染色。这种对固定液反应的差异的原因还有待探讨。很有可能是牛蛙与人类和哺乳动物的肥大细胞之间存在一定的种属间差异性,甚至有可能其肥大细胞类胰蛋白酶也存在一定的微小差异。

近半个世纪,肥大细胞异质性的研究已成为肥大细胞研究的焦点<sup>[3, 17]</sup>。根据其组织化学、形态学及其分布的明显差异,哺乳动物的肥大细胞仍然被传统地区分为所谓黏膜肥大细胞(mucosal mast cells, MMC)与结缔组织肥大细胞(connective tissue mast cells, CTMC)。前者主要分布在消化道黏膜固有层及肺脏,而后者广泛分布在消化道黏膜下及其他部位的结缔组织中<sup>[17]</sup>。人类的肥大细胞则根据其胞浆颗粒内中性蛋白酶组分的差异,被区分为仅含类胰蛋白酶(tryptase)的所谓 T 肥大细胞(MC<sub>T</sub>),同时含类胰蛋白酶及类糜蛋白酶(chymase)的所谓 TC 肥大细胞(MC<sub>TC</sub>)以及仅含类糜蛋白酶的 C 肥大细胞(MC<sub>C</sub>)。MC<sub>T</sub>相当于黏膜型的肥大细胞,而 MC<sub>TC</sub>和 MC<sub>C</sub>相当于结缔组织型的肥大细胞<sup>[17]</sup>。现已证实了某些动物肥大细胞也有中性蛋白酶的存在,且动物 MMC 和 CTMC 之间也可能存在酶组分的差异<sup>[10-13]</sup>。但对尚未见鱼类和两栖类等低等脊椎动物的肥大细胞是否含有中性蛋白酶的研究报道,更未获得明确的肥大细胞亚型分类的证据<sup>[14-16]</sup>。本研究中人食管癌间质中甲苯胺兰阳性细胞与类胰蛋白酶阳性细胞的分布上的一致性再次证实人组织中的肥大细胞都含有类胰蛋白

酶。而在牛蛙组织中类胰蛋白酶阳性细胞却与甲苯胺兰阳性细胞的分布存在较大差异,甲苯胺兰阳性细胞广泛分布于肠黏膜固有层及黏膜下层;舌的黏膜上皮,肌间及腺体周围,并弥散地分布于脾的实质中。而类胰蛋白酶阳性细胞则主要见于黏膜型肥大细胞(MMC)分布区域;如肠黏膜固有层,少量见于肠绒毛基部及舌黏膜下腺体周围。而在结缔组织型肥大细胞(CTMC)分布区域,如肠黏膜下组织和舌的结缔组织中却未发现类胰蛋白酶阳性细胞。似乎说明并不是所有的牛蛙肥大细胞都含有类胰蛋白酶。很有可能是,牛蛙的 MMC 中含有类胰蛋白酶,而 CTMC 中不含类胰蛋白酶。进一步的研究有可能阐明蛙科动物肥大细胞中性蛋白酶组分的可能差异及其生物学意义,进一步采用小鼠抗人肥大细胞类糜蛋白酶单克隆抗体进行免疫组化染色,检测牛蛙的肥大细胞是否存在 MC<sub>TC</sub>或 MC<sub>C</sub>亚群,或许可从酶组分的角度上发现牛蛙肥大细胞的不同亚型。蛙科动物有可能成为人类和哺乳动物肥大细胞生物学研究,包括肥大细胞中性蛋白酶研究的理想实验动物。

#### 参考文献:

- [1] Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase, An inflammatory mediator [J]. FEBC J, 2006, 273 (9): 1871 - 1895.
- [2] Fiorucci L, Ascoli F. Mast cell tryptase, a still enigmatic enzyme [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61 (11): 1278 - 1295.
- [3] 许乐仁, 江 萍. 肥大细胞的中性蛋白酶 [J]. 解剖科学进展, 2002, 8 (5): 249 - 253.
- [4] Glenner G C, Cohen L A. Histochemical demonstration of species-special trypsin-like enzyme in mast cells [J]. Nature (London), 1960, 185 (3): 846 - 852.
- [5] Schwartz L B, Lewis R A, Seldin D. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells [J]. J Immunol, 1981, 126 (4): 1290 - 1294.
- [6] Schwartz L B. Monoclonal antibodies against human mast cell tryptase demonstrate shared antigenic sites on subunits of tryptase and selective location of the enzyme to mast cells [J]. J Immunol, 1985, 134 (1): 526 - 531.
- [7] Craig S S, Deblois B, Schwartz L B. Mast cells in

- 
- human keloid, small intestine and lung by an immunoperoxidase technique using murine monoclonal antibody against tryptase [J]. *Amer J Pathol*, 1986,124(4):427 - 435.
- [8] Walls A F, Jones D B, Williams J H, *et al.* Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase [J]. *J Pathol*, 1990, 162(1);119 - 126.
- [9] Harvima I T, Naukkarinen A, Harvima R J, *et al.* Quantitative enzyme histochemical analysis of tryptase and chymase-containing mast cells in psoriatic skin [J]. *Arch Dermatol Res*, 1990, 282 (2);428 - 433.
- [10] 江 萍,许乐仁. 绵羊肥大细胞中类胰蛋白酶的证实 [J]. *解剖学报*,1996,27(1);92 - 95.
- [11] Xu L R, Jiang P, Carr M M, *et al.* Identification of porcine and bovine mast cells by an indirect immunoperoxidase technique [J]. *J Acta Zoologica Sinica*, 1997,43(3): 294 - 302.
- [12] 许乐仁. 应用酶组织化学技术证实猫、犬肥大细胞中类胰蛋白酶的存在[J]. *贵州农学院学报*,1992,11 (1)29 - 33.
- [13] 江 萍,许乐仁. 六种动物含类胰蛋白酶肥大细胞的酶组化分析[J], *畜牧兽医学报*, 1997, 28 (5): 416 - 421.
- [14] Baccari G C, Paulis A D, Matteo D L, *et al.* *In situ* characterization of mast cells in the frog *Rana esculenta* [J]. *Tissue Res*, 1998, 292(1): 151 - 162.
- [15] 许乐仁,杨冬梅,欧德渊. 牛蛙肥大细胞的组织化学与形态学[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2007,16(6):669 - 675.
- [16] 杨冬梅,欧德渊,许乐仁. 两栖类动物肥大细胞生物学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2005,24 (8):1 - 6.
- [17] Galli S J. New insights into "The riddle of the mast cells"; Micro-environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity [J]. *Lab Invest*,1990,62(1): 5 - 23.

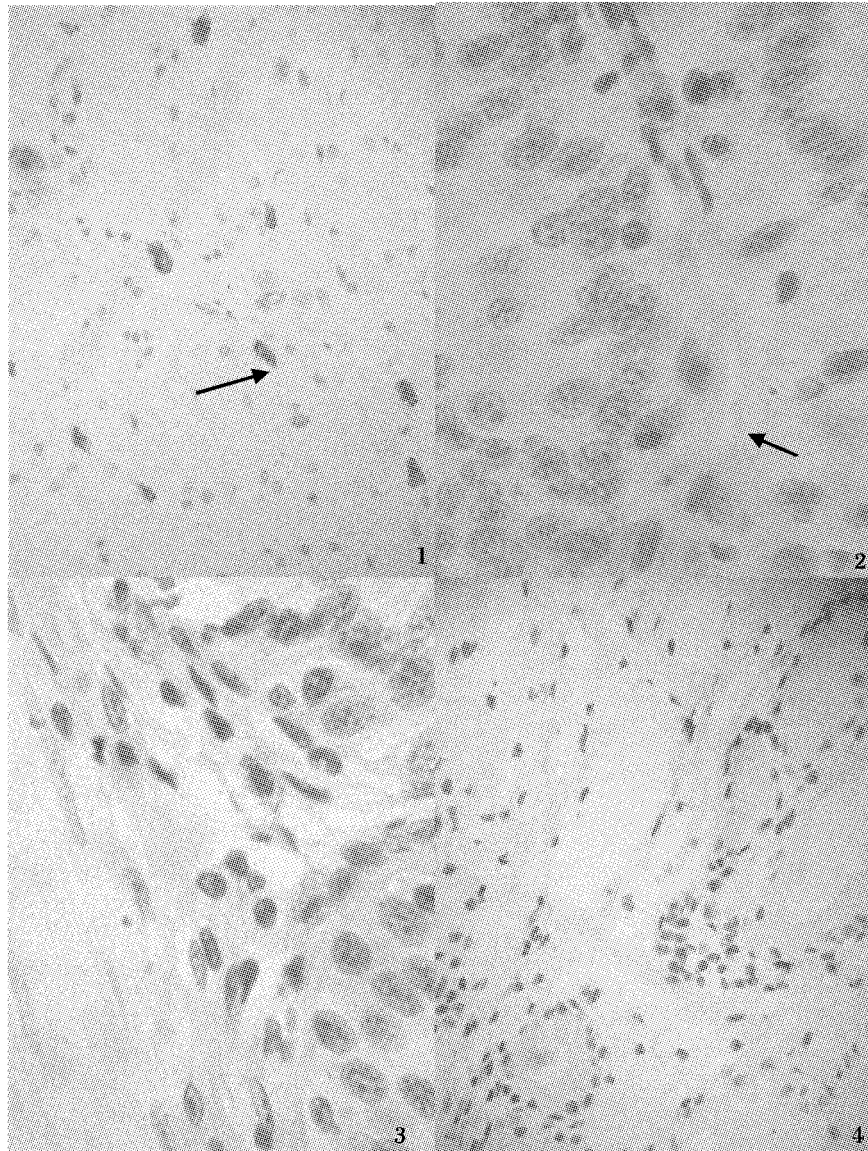
## Identification of tryptase in the mast cells of bullfrog (*Rana catesbeiana*)

YANG Dong-mei, XU Le-ren

(*Department of Animal Medicine, Guizhou University, Guiyang 550025*)

**Abstract:** Tryptase has been considered as a cellular marker of mast cells in the tissues of human and some mammalian species. To detect whether or not frog mast cells contain tryptase in their cytoplasm, a murine monoclonal antibody (AA1), raised against human mast cell tryptase, was used in an indirect immunoperoxidase technique to stain the paraffin sections of intestine, spleen and tongue collected from bullfrogs (*Rana catesbeiana*) and squamous cell carcinoma tissue of esophagus (as a positive control) from an adult man. It was firstly demonstrated that the frog mast cells contain tryptase in their cytoplasm and an excellent cross-reaction of the antibody AA1 with frog mast cell tryptase was obtained from the Bouin's fluid fixed frog tissues. In frog tissue the tryptase-positive mast cells mainly lie in lamina propria of intestine, a little were distributed in the base of intestinal villus and around submucosal glands of tongue and none were found in the spleen. There were lots of tryptase-positive mast cells in the mesenchyme of the human carcinoma tissue of esophagus. In conclusion, like human mast cells, bullfrog mast cells also contain the special enzyme, tryptase and it was likely that bullfrog can be used as an ideal experimental animal for the study of mast cell biology.

**Key words:** bullfrog (*Rana catesbeiana*); mast cell; tryptase; immunohistochemistry



### 图版 Plate

1. 人食管癌间质中的肥大细胞,石蜡切片,Bouin 氏液固定,免疫组化染色,×400; 2. 牛蛙肠固有层中的肥大细胞,圆形或椭圆形,胞浆染为棕黄色。石蜡切片,Bouin 氏液固定,免疫组化染色,×400; 3. 牛蛙肠绒毛基部的肥大细胞,石蜡切片,Bouin 氏液固定,免疫组化染色,×200;4. 牛蛙舌粘膜下腺体周围的肥大细胞,石蜡切片,Bouin 氏液固定,免疫组化染色,×400

1. Mast cells in mesenchyme of human esophagus cancer . Paraffin section of Bouin-fixed, immunostaining, ×400; 2. Bullfrog mast cells in lamina propria of intestine, round or oval, cytoplasm show yellow. Paraffin section of Bouin-fixed, immunostaining, ×400;3. Bullfrog mast cells in base of intestinal villus. Paraffin section of Bouin-fixed, immunostaining, ×400;4. Bullfrog mast cells around glands of tongue under mucosa. Paraffin section of Bouin-fixed, immunostaining, ×200