

β -葡萄糖苷酸酶在豚鼠组织中的分布^{*}

孔小明 程树军 董晓菊 Belkhir Mabrouk

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 利用“后偶合技术”对正常豚鼠主要组织中 β -葡萄糖苷酸酶(β -GCD)的分布与含量进行了研究。结果表明: 肾上腺、脾脏、肝脏、睾丸、卵巢、肾脏和淋巴结的大多数实质细胞中富含 β -GCD。而脑、肺、肌肉、胃肠和胰腺的实质细胞染色较弱。组织中呈深染的细胞为巨噬细胞、肝和肾的实质细胞及某些粘液细胞。该项工作以豚鼠作为动物模型而研究酶代谢紊乱, 提供对该酶正常分布的依据。

关键词 β -葡萄糖苷酸酶; 豚鼠; 酶组织化学

中图分类号 S 852.165

β -葡萄糖苷酸酶(β -GCD EC3.2.1.31)是存在于动物组织细胞溶酶体和内质网中的一种酸性水解酶。该酶在细胞的代谢中能分解葡萄糖苷键, 对类固醇、药物的葡萄糖苷键可以从非还原的末端进行分解(贾长恩, 1996)。采用偶氮偶联法技术, 证实在大鼠包皮腺、脾脏、肝脏、附睾、卵巢、胸腺、肾脏和甲状腺中富含 β -GCD(Hayashi, 1964)。也有人报道(Elizabeth, 1991)某些品系的动物由于先天性缺乏 β -GCD, 导致未降解的糖氨多糖在溶酶体内贮积, 而患有 VI 型粘多糖贮积病。动物的种属和品种不同, 器官组织内 β -GCD 的含量也不同(Edward, 1989)。近年来由于 β -GCD 及其水解产物对炎症发生的作用, 以及在动物胆囊炎和胆结石形成中的作用(Ho, 1985; 孔小明, 1994), 使得这种酶受到研究者的广泛重视。豚鼠作为一种理想的胆囊炎之实验动物模型已被广泛利用(徐长生, 1992), 在动物胆囊炎的酶组织化学研究中, β -GCD 是一种至关重要的酶类, 但这种酶在豚鼠组织中的正常分布却罕有报道, 为此, 进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器设备 葡萄糖醛酸苷萘酚 AS-BI(naphthol AS-BI β -glucuronic acid), 坚牢蓝(fast dark blue R salt), 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol), 由加拿大西部兽医学院提供。2700 型封闭式冰冻切片机(德国 Reichertjung 公司), 轮转式两用切片机(上海切片厂), Olympus 万用显微镜及配套摄像设备。

1.1.2 实验动物 20 只体质量约 300 g 的普通级豚鼠(*Cavia cobaya*, 合格证: 粤检字第 94A42 号); 标准颗粒饲料均购自第一军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 饲养方法及取材 20 只豚鼠饲以标准颗粒饲料, 自由采食和饮水, 供给充足青菜, 观察 1 周末见异常后处死。立即取其肝脏、胆囊、肾脏、肾上腺、心脏、脾脏、胰腺、十二指肠

肠、淋巴结、大脑、小脑、睾丸(卵巢)等组织作冰冻切片,厚度 $(6\pm 1)\mu\text{m}$ 。

1.2.2 β -GCD 组织化学染色 按照 Chayen(卡林, 1974)的后偶合技术染色。

1.2.3 石蜡切片 相同组织以 $\varphi=10\%$ 福尔马林钙固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度 $5\mu\text{m}$, HE 常规染色, 进行对比。

1.2.4 β -GCD 酶活性染色分级判定标准 一: 组织中未见任何酶的反应; +: 酶阳性颗粒呈蓝色云雾状, 均匀或散在分布于组织中; ++: 酶呈云雾状分布, 并有散在细小均匀的颗粒; +++: 酶染阳性颗粒大小不均, 散在分布于组织中, 或较致密地集中于某个区域; ++++: 酶阳性颗粒粗大, 浓染颗粒团块密集分布。

2 结果

肝脏: β -GCD 于肝细胞和枯否氏细胞胞浆中, 其阳性颗粒细小密集, 或溶合聚集为较大的颗粒, 呈雪花状、点状或杆状, 判级为“++ ~ +++”, 有的枯否氏细胞中酶颗粒较肝细胞中致密(+++); 汇管区动脉管壁中酶呈细小颗粒存在, 但血管内膜(+ ~ ++)多于肌层和外膜(+); 静脉管壁和肝小叶中央静脉也有散在云雾状小颗粒存在(+); 小叶间胆管壁呈“+”, 见图版—a。

胆囊: 胆囊壁中散在有阳性颗粒分布, 胆囊粘膜上皮(+ ~ ++)多于肌层(+)和固有层(+), 见图版—b; 胆汁中偶有散在的酶染阳性颗粒。

心肌: 心肌纤维中酶染阳性颗粒细小, 较密集分布或聚集成雪花状(++); 近心内膜处酶染阳性颗粒较心外膜丰富。

肺脏: 支气管粘膜上皮酶染颗粒为“++”, 固有层为“+ ~ ++”, 粘膜肌层蓝色颗粒细小均匀(+), 细支气管及终末支气管粘膜层颗粒大小不均, 判为“+ ~ ++”, 肌层为“+”, 见图版—c; 支气管软骨中, 软骨基质为阴性(-), 而软骨细胞中酶染阳性颗粒粗大(++ ~ +++); 肺泡壁中酶染颗粒较丰富(++ ~ ++++).

脾脏: 脾脏中白髓周边区酶染阳性颗粒丰富为“++”, 白髓中央鞘动脉周围为“++”, 红髓区域中为“+ ~ ++”; 被膜与小梁中酶颗粒稀少为“+”, 见图版—d。

淋巴结: 淋巴结被膜和小梁中酶染阳性颗粒少或缺失(- ~ +); 皮质部: 淋巴小结、副皮质区和皮质淋巴窦内酶颗粒无明显差异, 呈散在的中、小颗粒(+ ~ ++); 髓索酶颗粒较皮质部丰富(++ ~ ++++), 呈散在的、大小不一形态各异的蓝色颗粒。髓窦中为阴性(-)。

胃: 粘膜上皮细胞胞浆中为粗大松散的颗粒(++ ~ ++++), 固有层胃腺细胞中为细小的颗粒, 呈蓝色云雾状(++); 粘膜肌层为细小颗粒(+), 粘膜下层可见微弱蓝色小颗粒(+), 肌层中为细小的颗粒(+), 偶见较大颗粒。

肠道: 小肠粘膜上皮细胞中酶染颗粒呈大小不均散在(++); 杯状细胞中的酶含量呈“++”; 肠绒毛顶端的粘膜上皮细胞中酶颗粒粗大呈索状分布(++ ~ ++++); 固有层中散在有大小不等的阳性颗粒(+ ~ ++); 肠腺上皮细胞中的酶颗粒细小、散在, 呈(+); 肌层和浆膜酶染颗粒细小或呈云雾状(+), 见图版—e。

胰脏: 胰脏的腺泡细胞和胰导管的上皮细胞胞浆内酶染阳性颗粒呈多形态, 大小不均分布(++); 胰岛细胞中的酶染颗粒呈“++”, 导管和间质中酶含量为“- ~ +”。

肾脏: 肾被膜中有细小的蓝色粒存在(+); 皮质部肾小管上皮细胞胞浆中酶染阳性颗粒多呈细小, 或集结成较大的颗粒(++), 近曲小管和远曲小管无明显差异; 肾小球中血管球酶染阳性颗粒呈细小分布(+), 且不均匀, 呈盘曲状或分叶状分布, 球囊壁上皮细胞中酶颗粒较密

集(++); 间质中为阴性或偶有小颗粒分布(-~+); 髓质部、集合管、髓袢支为“++”, 见图版一f.

肾上腺: 被膜为稀疏散在的细小颗粒(+). 皮质部的多形区细胞胞浆中为细小较松散的阳性颗粒, 均较被膜稍丰富(+~++). 束状区细胞胞浆中为细小密集的颗粒(++); 网状区为细小密集或较粗大的颗粒(+++~++++); 皮质部由外向内颗粒逐渐丰富. 髓质部实质细胞胞浆中为粗大的蓝色颗粒(+++~++++), 血窦中有隐约可见的小颗粒(+).

卵巢: 卵巢中酶主要集中于生殖上皮、间质腺细胞的胞浆、卵细胞中和粒性黄体细胞中, 以上细胞中酶染阳性颗粒为粗大、不规则的团块状或较密集的团块状, 均为“++~+++”; 在成熟的卵泡和白膜中的阳性颗粒大小不等为“+~++”; 皮质部的基质, 生长卵泡的卵细胞, 卵巢的外膜, 膜性黄体细胞和闭锁卵泡中酶含量较少(+), 见图版一g.

睾丸: 被膜和睾丸纵隔内的酶颗粒少而稀疏, 为“-~+”; 曲精细管管壁、精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和支持细胞中酶颗粒细小, 呈蓝色云雾状, 判为“++”. 间质中酶染为阴性(-), 但间质细胞的胞浆中酶染颗粒呈粗大的团块状存在(+++~++++), 见图版一h.

脑: 小脑外膜为细小松散的酶颗粒, 皮质分子层为阴性, 浦金野细胞为阳性的细小颗粒(+). 颗粒层为阴性. 大脑和小脑的皮质, 血管周围有细小的酶颗粒分布.

3 讨论

后偶合技术较同时偶合技术(偶氮偶联法)有明显的优越性(Fishman, 1965), 首先它避免了作为偶合剂的重氮化合物对 β -GCD 酶可能存在的抑制作用(Hayashi, 1964); 其次坚牢蓝 R 是较六偶氮胺基品红更为合适的偶合剂, 它不着染组织(或仅为较浅的棕色), 蓝色的 β -GCD 酶颗粒对比强烈, 而且在不同条件下和不同 pH 值下坚牢蓝 R 对酶产物都无抑制作用, 因而偶合反应可在中性 pH 值下进行. 底物葡萄糖醛酸苷萘酚 AS-BI, 具有特异性、稳定性、难溶性, 而且 β -GCD 对其水解速度适宜, 是目前 β -GCD 组化染色的最佳底物. 因此笔者选择 Chayen 氏后偶合技术, 以葡萄糖醛酸苷萘酚 AS-BI 为底物, 在该酶的最适 pH 值条件下(pH4.5)进行孵育反应, 然后在 pH7.4 的缓冲液中以坚牢蓝 R 后偶合.

β -GCD 染色的标准, 单纯用染色反应的快慢和深浅来判定未免太过粗糙. 在组织切片上 β -GCD 阳性颗粒的大小、形态、密集程度不同, 根据这些特点, 笔者制定了 β -GCD 染色结果的定量判别标准. 结果表明: 肾上腺皮质的网状区和髓质实质细胞、睾丸间质腺细胞的胞浆中为“+++~++++”; 肝脏的枯否氏细胞的胞浆中为“+++”; 肝脏的肝细胞, 肺脏支气管、软骨细胞、肺泡壁, 脾脏的白髓周边区, 淋巴结的髓索, 胃肠粘膜顶端的上皮细胞, 卵巢的生殖上皮、间质腺细胞和粒性黄体细胞胞浆中为“++~+++”; 心肌纤维, 支气管粘膜上皮, 脾脏的白髓中央鞘动脉周围髓, 肾上腺束状区的细胞, 胃肠粘膜上皮细胞、杯状细胞、胃腺细胞、肠腺细胞胞浆中为“++”, 胆囊上皮细胞, 细支气管及终末细支气管粘膜上皮, 脾脏的红髓, 淋巴结的皮质, 胰腺的腺泡细胞、导管上皮细胞和胰岛细胞, 卵巢的成熟卵泡、白膜, 睾丸的曲精细管细胞, 肾细管上皮细胞、肾球囊壁上皮细胞、集合管和髓袢支上皮细胞胞浆中为“+~++”; 实质器官的间质和被膜以及管状器官的粘膜下层和肌层为“+”或“-”.

笔者发现胃肠粘膜、胆囊粘膜和一些软骨细胞中 β -GCD 较为丰富, 这可能与该酶参与粘多糖的代谢有关(Fishman, 1956); 该酶在肝脏和肾脏的实质细胞中含量丰富, 可能与 β -GCD

参与药物、类固醇等化合物的代谢有关(贲长恩, 1996); 而在巨噬细胞系统中活性较高, 可能与其参与细胞器的降解、增生等的作用有密切关系(杨景山, 1990)。

Hayashi(1964)曾用偶氮偶联法研究过 β -GCD 在大鼠组织中的分布, 他认为分布于大鼠的脑、睾丸、心肌、十二指肠的 β -GCD 为阴性或酶颗粒局限于个别细胞中。笔者在豚鼠的这些细胞中观察到酶颗粒较为丰富。Hayashi (1964)认为大鼠的肾上腺只有皮质部的网状区酶较丰富, 而笔者观察到肾上腺除皮质部的多形区和被膜以及髓质的血窦中酶含量少外, 其它区域酶含量均很丰富。出现上述差异的原因可能是动物的种属不同, 再就是所用的组化方法不同。

笔者采用的后偶合技术较其它组织化学技术更能准确显示组织中酶的定位, 较组织分级分离技术简便, 易操作; 随着科学技术的进步, 应用计算机图像处理系统能够较理想的统计细胞内阳性颗粒的存在部位和分布面积; 以4-甲基-7-羟香豆素为底物进行荧光组化检测, 敏感性也较好, 但在这些技术未普及和应用于这一领域之前, 笔者制定的判定标准还是能比较准确的判定 β -GCD 在细胞内的含量。

参 考 文 献

- 孔小明, 郑明学, 高作信. 1994. 患结石胆囊上皮组织化学和超微病理学研究. 山西农业大学学报, 14(4): 408 ~ 411
- 杨景山. 1990. 医学细胞化学与细胞生物学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 175
- 卡 林 C F A. 1974. 组织病理学与组织化学技术手册. 孔庆雷, 译. 北京: 科学出版社, 338 ~ 340
- 贲长恩. 1996. 实用酶组织化学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 137 ~ 138
- 徐长生. 1992. 胆色素结石的动物模型及药物防治的实验研究. 中华消化杂志, 2: 34
- Edward H. 1989. Murine mucopolysaccharidosis type VII characterization of a mouse with β -glucuronidase deficiency, J Clin Invest, 83(4): 1 258 ~ 1 266
- Elizabeth F. 1991. Lysosomal storage disease. Annu Rev Biochem, 60: 257 ~ 280
- Fishman W. 1956. Cellul localization of β -glucuronidase in rat tissue. J Histo Cyto Chem, 4: 570
- Fishman W. 1965. A postcoupling technique for β -glucuronidase employing the substrate naphthol AS-BI- β -D-glucosiduronic acid. J Histochem Cytochem, 13(6): 441 ~ 447
- Ho K J. 1985. Human β -glucuronidase; Study on the effects of pH and bile acids in regard to its role in the pathogenesis of cholelithiasis. Biochim Phys Acta, 827: 197
- Hayashi M. 1964. Distribution of β -glucuronidase activity in rat tissues employing the Naphthol AS-BI glucuronide hexazonium pararosanilix method. J Histochem Cytochem, 14: 659 ~ 669

DISTRIBUTION OF β -GLUCURONIDASE ACTIVITY IN GUINEA PIG TISSUES

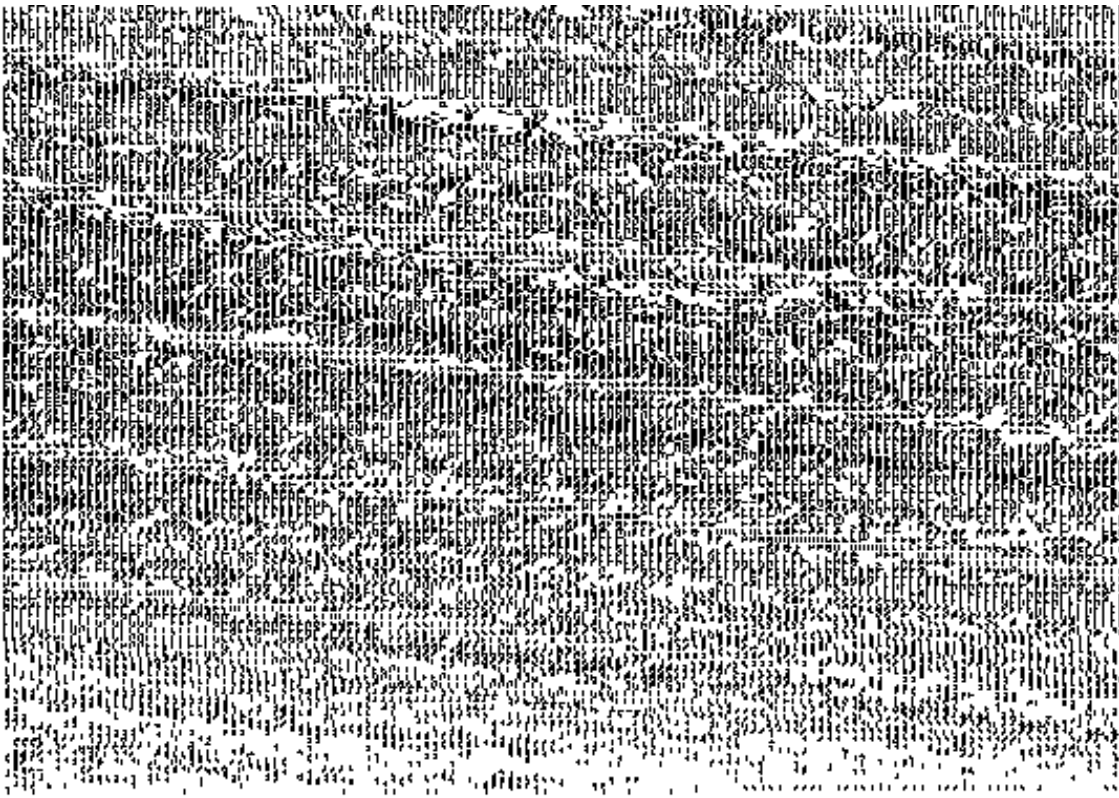
Kong Xiaoming Cheng Shujun Dong Xiaoj B. Mabrouk
(Dept. of Veterinary Medicine South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The histochemical distribution of β -glucuronidase activity in guinea pig tissues was demonstration by postcoupling technique. The present study showed that the enzyme-rich tissues were the liver,

kidney, thyroid, lymph node and ovary. The enzyme-poor tissues were the brain, testis and muscle. Macrophages, parenchymal cells of liver and kidney and several kinds of muciferous cells were intensely stained in histological sections. This study provides information on the normal distribution of β-glucuronidase, which will be useful when using the guinea pig as a model in enzyme metabolism disturbance studies.

Key words β-glucuronidase; guinea pig; histochemistry



图中 a、b、c、d、e、f、g、h 分别为肝脏(× 70)、胆囊(× 70)、肺脏(× 140)、脾脏(× 70)、小肠(× 70)、肾脏(× 70)、卵巢(× 140)和睾丸(× 140)

图版 β- 葡萄糖苷酸酶在豚鼠组织中的分布

【责任编辑 柴 焰】