



视网膜血管铺片技术的改进

徐玉环¹,徐艳峰¹,刘颖¹,黄澜¹,李彦红¹,韩云林¹,邓巍¹,
许庆刚²,秦川¹,朱华¹

1. 中国医学科学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021;
2. 首都医科大学附属北京同仁医院,北京 100730)

【摘要】 **目的** 探讨视网膜血管铺片技术的改进及在实验动物小鼠,大鼠,狗和猴中的应用。**方法** 应用蛋白酶K-胰蛋白酶联合消化法制备视网膜血管铺片,行HE及PAS染色观察血管形态,免疫组化方法观察CD31及VEGF的表达。**结果** 用改进方法制备的视网膜血管铺片,血管网完整,无神经组织残留,可清晰显示血管走向。各级血管形态清晰,血管分支清楚完整,无断裂现象。血管内皮细胞形态清晰。CD31在血管周细胞及内皮细胞均有表达;VEGF主要在内皮细胞表达。**结论** 改进的视网膜血管铺片技术可成功应用于不同实验动物,为视网膜血管性疾病的研究提供了重要途径。

【关键词】 视网膜血管铺片;联合消化法;抗原修复

【中图分类号】R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015)05-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.012

A modification of retinal vascular preparation

XU Yu-huan¹, XU Yan-feng¹, LIU Ying¹, HUANG Lan¹, LI Yan-hong¹,
HAN Yun-lin¹, DENG Wei¹, XU Qing-gang², QIN Chuan¹, ZHU Hua¹

1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China;
2. Beijing Tongren Hospital Capital Medical University, Beijing 100730, China)

【Abstract】 **Objective** To improve the method of retinal vascular preparation and application in experimental animals of mice, rats, dogs and monkeys. **Methods** The retinal vessels were isolated with proteinase K-trypsin digestion technique. The samples were stained by hematoxylin-eosin (HE) and Periodic-Acid Schiff (PAS). The expression of CD31 and VEGF were detected by immunohistochemistry (IHC). **Results** The spread sheets of vascular network are complete, and can clearly show the blood vessels. No nerve tissue residue is left. Different levels of vascular morphology are clear. The vascular branches are clear and complete with no fracture. The cell morphology is intact, and the cell nucleus is clearly displayed. The entire process can be completed in a short time, and has a high success rate. The vascular antigen are successfully retained; Expression of CD31 can be seen in both pericytes and endothelial cells; VEGF is mainly expressed in endothelial cells. **Conclusions** The improved method is successfully applied in different experimental animals. This

[基金项目]国家重点基础研究发展计划(973项目)(2011CB504903)。

[作者简介]徐玉环(1980-),女,初级技师。E-mail: yuhuanxu1109@163.com。

[通讯作者]朱华(1971-),女,主任技师,研究方向:病理与病理生理学。E-mail: zhh@cnilas.org。

approach will provide an important contribution to the retinal vascular disease research.

【Key words】 Retinal vascular preparation; Combined digestion; Antigen retrieval

视网膜是由大脑向外延伸的视觉神经末梢组织,其结构复杂、精细、脆弱而代谢旺盛。其血管属于终末血管系统,任何病理性的破坏和血管梗阻等引起的组织缺氧,均能导致组织坏死,使其丧失感受和传导光刺激的功能。因此血管改变是视网膜病变的重要特点。视网膜血管铺片是研究视网膜血管病变的重要技术。但这项技术的消化时间不宜掌握,展片难度大,很难制备出理想的视网膜血管铺片。国内外学者多采用胰蛋白酶直接消化或胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化制备视网膜血管铺片。在本研究中,我们总结前人经验,不断摸索改进,建立了新的视网膜血管铺片技术,现总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠来源于军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】,SD 大鼠购自中国食品药品检定研究院实验动物资源研究中心【SCXK(京)2012-0001】,SYXK(京)2013-0019。犬购自北京日新科技有限公司【SCXK(京)2011-0007】,恒河猴由中国医学科学院医学实验动物研究所提供【SCXK(京)2014-0011】,SYXK(京)2010-0030。苏木素及伊红 Y 染色液均为国产试剂(益利精细),高碘酸(批号 011108,北京),Schiff(UFG0108,上海),Proteinase K(CALBIOCHEM, cat # 539480),Trypsin 1:250 Porcine Pancreas(AMRESCO, lot # 2861C173),anti-CD31 antibody(ABCAM, ab28364),anti-VEGF antibody(BOSTER, cat#BA0407),兔超敏二步法免疫组化检测试剂(中杉金桥,PV-9001)。正常羊血清工作液(中杉金桥,ZLI-9056),抗体稀释液(中杉金桥,ZLI-9030)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠视网膜血管铺片的制备

大鼠脱颈椎法处死,摘取眼球,固定于 10% 中性福尔马林。

沿距齿缘剪开眼球去除晶状体,用蒸馏水漂洗,以视神经乳头为中心将眼球壁均匀地剪成 4 份,剥离眼球壁视网膜层,再用蒸馏水漂洗。

将剥离出的视网膜放在蒸馏水中 37℃ 孵育 1~2 h,蒸馏水漂洗,孵育后的视网膜放入 1 g/L 的蛋

白酶 K 中,56℃ 消化 13~17 min,去除消化掉的感光层细胞,蒸馏水漂洗,再将视网膜层放入 3% 胰蛋白酶消化液中,37℃ 消化 40~60 min。

用吸管将半透明状的血管网移入蒸馏水中漂洗,用吸管轻轻吹打非透明状区域,直到血管网成透明状,再将吹打成透明状的血管网铺到含多聚赖氨酸的载玻片上,展平,自然干燥。

在消化过程中,蛋白酶 k 消化时,每 5 min 轻柔摇动一次,再以最低完成消化时间为观察起点:蛋白酶 K 消化 13 min 时,肉眼观察,轻柔摇动,若见感光层细胞脱落,即完成第一步消化。若消化不完全,每 2 min 轻柔摇动观察一次,直至感光层脱落。胰蛋白酶消化时,每 10 min 轻柔摇动一次,也是以最低完成消化时间为观察起点,若消化不完全,每 5 min 轻柔摇动观察一次。

1.2.2 不同动物的视网膜在消化酶中的消化时间

在大鼠铺片基础上,我们摸索了 BALB/c 小鼠,犬和恒河猴视网膜血管铺片的消化时间表 1。BALB/c 小鼠眼球小,在剥取视网膜层之前,要将眼球壁均匀剪成 2 份。犬和恒河猴眼球较大,结构特殊,取材后需立即固定 4h,再用锋利的刀片在眼球的上下部各切开一个小口,继续固定 24h。将眼球壁均匀地剪成若干等份,每一等份大小约 0.4 cm × 0.4 cm,再剥离视网膜层。

表 1 不同动物的视网膜在消化酶中的消化时间

Tab.1 The digestive time of different animal retina in digestive enzymes

不同动物 Animals	蛋白酶 K (±2min) Proteinase K.	胰蛋白酶 (±10min) Trypsin
小鼠(Mouse)	18min	60min
大鼠(Rat)	15min	50min
比格犬(Beagle)	12min	40min
猴(Monkey)	10min	30min

1.2.3 视网膜血管铺片 HE 染色

将视网膜血管铺片置于自来水中水化 15 min,苏木素染核 1 min,自来水冲洗,伊红复染 2 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.4 视网膜血管铺片 PAS 染色

PAS 染色方法参照文献^[1]:将视网膜血管铺片置于自来水中水化 15 min,蒸馏水洗 2 次,加入高碘氧化 10 min,蒸馏水速洗 2 次,加入 schiff 试剂反

应 5 min, 自来水流水冲洗 2 min, 苏木素染核 2 min, 自来水返蓝 5 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.2.5 视网膜血管铺片免疫组化染色

免疫组化染色方法参照文献^[2], 略有改变: ①将视网膜血管铺片置于 PBS 中水化 15 min; ②微波中火修复 5 min; ③3% 双氧水封闭 15 min; ④正常羊血清工作液封闭 20 min; ⑤滴加用抗体稀释液稀释的一抗 (CD31 稀释度为 1:50; VEGF 稀释度为 1:200), 室温孵育 1.5 h; ⑥滴加二抗试剂 1, 室温孵育 10 min; ⑦滴加二抗试剂 2, 室温孵育 10 min; ⑧ DAB 显色; ⑨苏木素复染 4 s; ⑩梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

2 结果

2.1 大鼠视网膜血管铺片

经 HE 及 PAS 染色可见: 铺片完整, 清晰显示血管走向。各级血管形态清晰, 血管分支清楚完整, 无断裂现象。细胞形态清晰, 细胞核可清晰显示 (彩插 12 图 1)。

酶消化会造成部分抗原的丢失, 因此需要对抗原进行修复。修复温度太低造成修复不完全, 温度太高又会脱片。经过摸索, 我们发现, 微波中火 5 min 即可将抗原修复。免疫组化结果显示: CD31 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在正常大鼠铺片均有表达; CD31 在血管周细胞及内皮细胞均有表达; VEGF 主要在内皮细胞表达。

2.2 小鼠、狗、猴视网膜铺片

根据大鼠铺片经验, 我们摸索了 BALB/c 小鼠, 犬和恒河猴的视网膜血管铺片消化时间。经 HE 及 PAS 染色, 可见血管网完整, 无神经组织残留。各级血管结构清楚, 大动物小动脉可显示血管壁的平滑肌。毛细血管网由内皮细胞和周细胞组成, 细胞形态清晰, 细胞核结构清楚 (彩插 12 图 2)。

3 讨论

1960 年 Kuwabara^[3] 用胰蛋白酶对视网膜进行消化制备了视网膜血管铺片, 为视网膜血管的研究提供了一种新的手段。1963 年 Ashton^[4] 改进了 Kuwabara 的方法, 用胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化法, 成功制备了猫的视网膜血管铺片。此后又经过各国学者的不断努力^[5-8], 才有了今天的技术基础。

视网膜血管消化铺片技术难度较大: 消化不完全, 铺片不能充分显示出血管。消化过度, 又会造成血管结构不清晰, 甚至断裂, 直接影响对实验结果的观察和分析。蛋白酶 K 是一种高活性蛋白酶, 能快速、有效地裂解组织细胞, 因此在本研究中, 我们选择先用蛋白酶 K 消化掉视网膜感光层细胞。同时, 蛋白酶 K 能穿透细胞膜, 破坏细胞核, 于是我们将视网膜层漂洗后再移入到 3% 胰蛋白酶中进一步消化。应用蛋白酶 K-胰蛋白酶联合消化法, 成功制备了不同实验动物的视网膜血管铺片。

视网膜血管铺片制备过程中, 应注意以下几点: ①眼球的固定: 大、小鼠眼球取材后直接固定于 10% 中性福尔马林 24 h 以上。狗和猴眼球组织结构特殊, 各部分组织结构的软硬度不同, 因此取材后立即固定 4 h, 再用锋利的刀片在眼球的上下部各切开一个小口, 继续固定 24 h。由于固定液易造成视网膜血管的断裂, 因此固定时间最好不超过 72 h。②视网膜的剥离: 视网膜位于眼球壁的内层, 组织比较薄, 而且附着在色素层上, 剥离过程中很容易破碎。因此去除晶状体后, 以视神经乳头为中心, 将眼球壁剪开成若干等份, 轻轻剥离出视网膜。③血管的消化: 消化过程中, 随时注意观察。蛋白酶 K 消化能力极强, 每 5 min 轻微摇动一次, 再以最低完成消化时间为观察起点, 每 2 min 轻柔摇动一次, 待肉眼可见感光层脱落即可终止消化。换成胰蛋白酶消化时, 每 10 min 轻微摇动一次, 再以最低完成消化时间为观察起点, 每 5 min 轻柔摇动一次, 待可见半透明血管网即终止消化。④铺片: 将消化好的血管网漂洗干净, 平铺于含多聚赖氨酸的载玻片上, 不要将载玻片上的水吸干净, 否则未贴壁的血管网漂移, 影响对血管走向的观察。⑤抗原修复: 常规微波修复石蜡切片需要高火 3 min, 中火 5 min, 再低火 3 min。而视网膜血管铺片只需中火 5 min 即可完成抗原修复。

蛋白酶 K-胰蛋白酶联合消化法制备大鼠视网膜血管铺片成功率高, 稳定性好, 同时也适用于不同实验动物, 为视网膜血管性疾病的研究提供了重要途径。

参考文献:

- [1] 李彦红, 朱华, 徐艳峰, 等. 过敏性紫癜兔模型的免疫学改变及机制初探[J]. 中国实验动物学报. 2013, 21(6): 65-69.

(上转第 50 页)

们将呼吸管路接于边孔,而将导丝穿入主孔。在插管确认后撤除导丝、封闭主孔即可直接开始机械通气。在撤除插管时,打开主孔、关闭边孔三通后评估其自主呼吸能力,在确认动物呼吸顺畅后撤除管路。如果状态不良,仅需改变两孔开放状态即可再次开始通气。由于不存在更换接口的问题,也就减少了插管脱出这类失误的可能性。(4)通过主孔插入硬膜外导管(图 1A1),可以清理气道分泌物,进一步提高了手术过程中的安全性。

总之,我们通过选择合适的内窥镜和操作器械,逐步摸索了使用内窥镜辅助进行大鼠气管插管的操作技术,并将其与双接口软质插管结合起来,提高了建立人工气道的安全性、稳定性和易管理性。希望能够对广大从事动物实验的同行有所帮助。

参考文献:

[1] 卢记明,张炳熙. 大鼠气管插管方法学概述[J]. 中国比较医学杂志,2009,(08):76-80.

[2] Fuentes JM, Hanly EJ, Bachman SL, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation in the rat: a comprehensive rodent model of laparoscopic surgery[J]. J Surg Res. 2004, 22(2) : 240 - 248.

[3] Clary EM, O. Hal loran EK, de la Fuente SG, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation of the rat[J]. Lab Anim, 2004, 38(2) : 158 - 161.

[4] 叶明霞,孔利佳. 直视下行大鼠气管插管的方法比较[J]. 中国比较医学杂志,2013,(03):50-52.

[5] 李亚辉,何建国,乔木,等. 直视下行大鼠气管插管的改良方法[J]. 中国实验动物学杂志,2002,(02):123-125.

[6] Nicholson JW, Kinkead ER. A simple device for intratracheal injections in rats[J]. Lab Anim Sci, 1982, 32(5) : 509 - 510.

[7] 李娜,王焱林,王成天,等. 3 种大鼠气管插管方法的比较[J]. 医学新知杂志,2005,(04),20-21

[8] 蒋琦亮,张晓峰,徐美英,等. Airtraq 可视喉镜与 Macintosh 喉镜用于双腔支气管插管的临床研究[J]. 临床麻醉学杂志,2011,(09).

[修回日期] 2015 - 04 - 01

(下接第 53 页)

[2] 朱华,徐艳峰,刘颖,等. 链脲佐菌素诱导糖尿病恒河猴胰岛细胞数量的变化[J]. 中国比较医学杂志. 2012, 22(12): 1 - 3.

[3] Kuwabara T, Cogan DG. Studies of retinal vascular patterns. I. Normal architecture [J]. Arch Ophthalmol. 1960, 64(6) : 904 - 911.

[4] Ashton N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies [J]. Brit J Ophthal. 1963, 47(9) : 521 - 538.

[5] Hammes HP, Lin J, Renner O, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Diabetes. 2002, 51(10) : 3107 - 3112.

[6] Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, et al. Increased ocular levels of IGF - 1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease[J]. J Clin Invest. 2004, 113(8):1149 - 1157.

[7] HuangHuang Q, Wang S, Sorenson CM, et al. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration[J]. Exp Eye Res. 2008, 87(3) : 226 - 241.

[9] Zhu Y, Zhang XL, Zhu BF, et al. Effect of antioxidant N-acetylcysteine on diabetic retinopathy and expression of VEGF and ICAM - 1 from retinal blood vessels of diabetic rats[J]. Mol Biol Rep. 2012, 39(4) : 3727 - 3735.

[修回日期]