

大鼠血管内皮铺片方法的改进

王和枚, 汪海, 袁本利, 阮金秀
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

[关键词] 大鼠; 内皮, 血管; 铺片

[摘要] 以往的内皮铺片法提供了研究内皮细胞的有力工具, 但该方法存在步骤过于烦琐, 制备的内皮铺片质量不稳定等缺点。采用灌流固定, 将内皮剥离后的诸多步骤简化为转膜与烤片 2 步, 不仅大大缩短了时间, 而且使铺片质量大幅度提高, 值得推广。

[中图分类号] R329.33

[文献标识码] A

内皮铺片技术由 Schwartz 等^[1]首次建立, 由于该项技术能较大范围地呈现所要研究血管的内皮并能与免疫组织化学^[2]、原位杂交^[3]、聚合酶链反应、TUNEL 和放射自显影^[1,4]等技术相结合, 已广泛用于内皮细胞基因与蛋白表达、凋亡、损伤和复制等方面的研究, 成为研究血管内皮的有力工具。尽管如此, 在实际工作中, 我们发现此法仍存在许多不足之处, 如步骤过于烦琐, 由于火棉胶溶解不全所致的铺片质量较差等。为此, 我们经过多次摸索, 对此法进行了较大改进, 取得了满意效果。

1 材料与方法

1.1 灌流固定

选择雄性 Wistar 大鼠 12 只, 体重 180~220 g, 随机分为 2 组, 每组 6 只。用戊巴比妥钠麻醉大鼠, 迅速打开胸腔并自左心室插入输液针头, 以 13.3 kPa 的压力灌注 Hanks 平衡盐溶液, 剪开右心房排出溶液。待右心房液体清亮后, 经三通管换稀释的 Karnovsky's 固定液^[5] (含 1.25% 戊二醛和 1% 多聚甲醛的 0.1 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液) 灌注约 5 min, 以观察到四肢出现抽搐为最佳。然后小心分离出主动脉, 置稀释的 Karnovsky's 固定液中固定 4 h 后, 转入 4℃ 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中保存。

1.2 制作内皮铺片

一组动物按经典法^[1]制作内皮铺片 (简称经典组), 另一组 (简称改良组) 动物先按经典法剥离内皮

于火棉胶包被的玻片上, 而后将贴有内皮 (内皮下组织朝上外露) 的火棉胶玻片浸入蒸馏水中数分钟, 使火棉胶膜自玻片自行脱落后, 小心用眼科镊将其转移至 0.5% 明胶包被的玻片上 (包被液由 0.1% 的硫酸铬钾与 1% 明胶混合而成)。转移时, 先于载玻片上滴加 1~2 滴 0.5% 明胶溶液, 然后使内皮下组织贴附明胶液面 (内皮面朝上), 此时液体迅速向四周扩散, 致使火棉胶膜紧贴于明胶玻片上。然后将玻片置温箱烤干。至此, 已使内皮紧贴于玻片上 (内皮面朝上)。将玻片浸入乙醇和乙醚各 50% 的混合液中浸泡约 30 min, 其间换液 2 次。然后将玻片经梯度酒精水化, 温箱风干后备用。

2 结果

经典组内皮铺片如图 1 (Figure 1) 所示, 可见内皮细胞被残存的网状火棉胶覆盖, 铺片质量较差。改良组内皮铺片如图 2 (Figure 2) 所示, 可见画面整洁, 没有火棉胶残存。

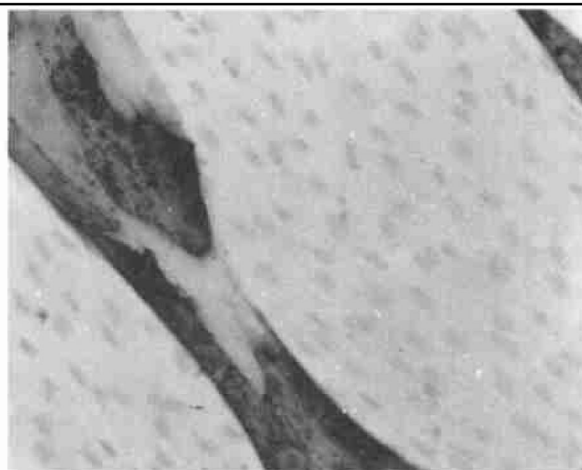


图 1. 经典法制作的内皮铺片 (HE × 200). 有较多火棉胶残存。

[收稿日期] 2001-03-12 [修回日期] 2001-11-08

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目 (G199805112)。

[作者简介] 王和枚, 男, 1969 年出生, 湖南省郴州市人, 助理研究员, 在读博士研究生, 实验病理学专业, 研究方向为毒理病理学、心血管病理学和呼吸毒理学。汪海, 男, 1963 年出生, 江苏徐州人, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, 主持国家 973 项目等多项重大课题研究, 公开发表论文 40 余篇。

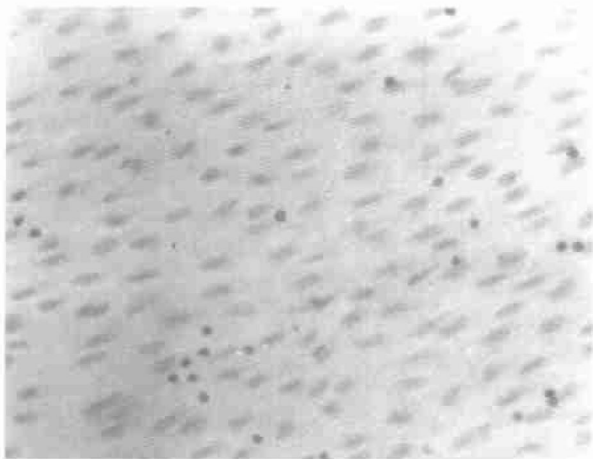


图2. 改良法制作的内皮铺片(HE×200). 无火棉胶残存.

3 讨论

本实验结果,显示按经典法制作的内皮铺片内皮细胞表面被残存的网状火棉胶覆盖,这种残存火棉胶无论怎样延长在乙醇和乙醚混合液中浸泡的时间均难以溶解.可能由于较高浓度的明胶(浓度为10%)覆盖了火棉胶膜,而明胶是不溶于乙醇与乙醚的.我们曾尝试先用温水溶解明胶,但明胶经过10%福尔马林浸泡变性后也难溶于水.而用本文介绍的改良法制作的内皮铺片,内皮表面整洁,未见网状火棉胶残存.实际操作中玻片浸入乙醇和乙醚混合液中约10 min,火棉胶即可溶解较完全.在这里我们将明胶液由10%降至0.5%,从而排除了其对溶解火棉胶的干扰,同时由于采用了烤片法,没有因明胶液浓度降低而导致脱片.

还需要强调的是,在制作火棉胶包被玻片时,16%的火棉胶溶液最好新鲜配制.因配好的火棉胶过久放置后,可因溶剂挥发而致浓度过高.用这种火棉胶溶液包被玻片,干后形成的火棉胶层很易自行剥离.另外,玻片插入火棉胶溶液的时间不宜过

•读者•作者•编者•

短或过长,以1~2 min为宜.涂好的玻片不可吹风晾干,以避免因溶剂挥发过快而致火棉胶剥离.

最后,我们将经典法与改良法作一简单比较,总结于表1.由表1可以看出,改良法将内皮剥离后的几个烦琐步骤简化为转膜与烤片二步,不仅大大节省了时间,同时提高了铺片质量,值得推广应用.

表1. 内皮铺片经典法与改良法之比较.

	经典法	改良法
1. 剥离内皮于火棉胶玻片上	需要	需要
2. 10% 明胶浸润 1 h	需要	不需要
3. 转入 10% 明胶包被载玻片,上夹子,并入 10% 中性缓冲福尔马林中浸泡过夜	需要	不需要,待火棉胶膜自行脱落后转于 0.5% 明胶包被玻片上,烤片
4. 蒸馏水洗涤,梯度酒精脱水	需要	不需要
5. 乙醇、乙醚混合液溶解火棉胶	需时长,溶解不彻底	需时短,溶解彻底
6. 操作全程所需时间	2 天	约 8 h
7. 铺片质量	较差,有火棉胶及明胶残存	较好,无火棉胶及明胶残存

[参考文献]

[1] Schwartz SM, Benditt EP. Cell replication in the aortic endothelium: A new method for study of the problem. *Lab Invest*, 1973, **28** (6): 699-707

[2] 李瑞峰, 闫晓梅, 刘玉梅, 等. 高脂饮食与大鼠在体动脉内皮素合成关系的研究. *山东医科大学学报*, 1999, **37** (1): 24-26

[3] Taguchi J, Murry C, Herren BI, et al. A quantitative method for determination of endothelial mRNA expression in vivo Induction of platelet-derived growth factor by endotoxin. *Am J Pathol*, 1998, **152** (4): 903-912

[4] 胡维诚, 徐明义, 刘玉梅, 等. 高胆固醇血症对鹌鹑在体动脉内皮细胞损伤的定量研究. *山东医科大学学报*, 1993, **31** (3): 185-188

[5] Barbeau ML, Whitman SC, Rogers KA. Probucol, but not MaxEPA fish oil, inhibits mononuclear cell adhesion to the aortic intima in the rat model of atherosclerosis. *Biochem Cell Biol*, 1995, **73**: 283-288

(此文编辑 朱雯霞)

中国动脉硬化杂志编辑部 2001 年度特邀审稿专家

- | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 丁翠芬 | 文格波 | 王 姮 | 王迪浔 | 王笃圣 | 尹卫东 | 叶 平 | 安 靓 |
| 庄一义 | 刘 毅 | 刘乃丰 | 朱禧星 | 关永源 | 吕传真 | 阮秋蓉 | 李立明 |
| 李建军 | 李健斋 | 沃兴德 | 宋剑南 | 吴学思 | 吴移谋 | 肖献忠 | 匡希斌 |
| 杨向红 | 杨英珍 | 罗 敏 | 陈生弟 | 陈孝曙 | 张英珊 | 张 珍 | 张道友 |
| 项坤三 | 范 利 | 周 新 | 周少琴 | 洪嘉玲 | 高广道 | 徐仓宝 | 顾 瑛 |
| 黄达德 | 韩琴琴 | 栗秀初 | 廖二元 | 潘长玉 | 潘敬运 | 詹思延 | 戴爱国 |