

用于脑缺血小鼠海马 SOD1 表达的 改进灌注固定法

李宝红^① 贺旭^① 于培兰^① 马惠苹^① 孙林^① 陈瑞^{①*} 鄢雯^②

(^①首都医科大学生化系细胞与分子生物学教学实验中心 北京 100069;

^②首都医科大学燕京医学院生物化学教研室 北京 101300)

摘要:常规灌注固定法多用于兔和大鼠等较大动物,并存在一些不足。改进了灌注固定法流程、灌注溶液的配方、流速、用量以及灌注装置,将其用于在显微操作下制备的缺血再灌注 C57 BL/6N 小鼠模型,并对其海马进行 H.E 染色和免疫组织化学 SOD1 基因表达。结果显示,改进的灌注固定法使组织切片结构更加清晰,海马免疫阳性神经元定位于胞浆。缺血再灌注组(24 h I/R)海马神经元 SOD1 表达比假手术对照组(sham-o)减少,而高压氧治疗组(24 h HBO)SOD1 表达有所恢复。表明改进的灌注固定法用于缺血再灌注 C57 BL/6N 小鼠海马 SOD1 基因表达效果良好,结果可靠。实验结果提示,高压氧的治疗机制之一可能是通过增加 SOD1 基因表达而实现的。

关键词: C57 BL/6N 小鼠,缺血再灌注,免疫组织化学,超氧化物歧化酶-1(SOD1),高压氧,灌注固定
中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2007)04-70-05

Application of Modified Perfusion Fixation in the Study on the Expression of Copper/zinc Superoxide Dismutase in Mouse Hippocampus after Transient Forebrain Ischemia

LI Bao-Hong^① HE Xu^① YU Pei-Lan^① MA Hui-Ping^① SUN Lin^① CHEN Rui^{①*} YAN Wen^②

(^①Department of Biochemistry and Molecular Biology, Capital Medical University, Beijing 100069;

^②Department of Biochemistry, Capital Medical University Yanjing College, Beijing 101300, China)

Abstract: Routine perfusion fixation has been used in rabbits or rats, but this method has some shortage. An improved perfusion fixation method was used in C57 BL/6N mouse ischemia-perfusion model. Samples were observed with H.E staining and immunohistochemistry staining to study the expression of copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) in hippocampus of C57 BL/6N mouse after transient forebrain ischemia. Results showed that the tissue structure become clearer when the modified perfusion fixation method was used, masculine neurons of hippocampus were located in the cytoplasm. The SOD1 expression level of the ischemia-reperfusion (24 h I/R) group was lower than that of sham-operated (sham-o) control, but that of hyperbaric oxygen treatment (24 h HBO) group almost recovered. These results illustrated that the modified perfusion fixation was good for immunohistochemistry in C57 BL/6N mouse hippocampus after transient forebrain ischemia-reperfusion. The results also indicated that one of the mechanisms of HBO therapy

基金项目 北京市教委基金资助项目(No. KM200510025004);

* 通讯作者, E-mail: chenrui@ccmu.edu.cn 或 chenrui4647@163.com;

第一作者介绍 李宝红,女,学士,实验师,研究方向:短暂前脑缺血再灌注及高压氧治疗机制, E-mail: libaohong9167@sina.com.

收稿日期:2006-09-11,修回日期:2007-05-10

may be achieved by the increase of SOD1 expression level.

Key words :C57 BL/6N mouse ; Ischemia-reperfusion ; Immunohistochemistry ; Copper/Zinc superoxide dismutase 1 (SOD1) ; Hyperbaric oxygen (HBO) ; Perfusion fixation

经心灌注固定法^[1]在临床相关疾病的研究中应用十分广泛,因脑组织较其他组织柔软且更易损伤的特殊性,应用灌注固定法就更为必要。灌注固定法对脑和脊髓组织的快速冲洗固定作用,是浸润固定法不可替代的。有文献^[1]报道,灌注固定法应用于大鼠的动物实验较多见,但对体重只有 18~20 g、大脑动脉环(Willis 环)先天缺陷的 C57 BL/6N 小鼠采用此法的报道却很少。本实验应用经心灌注固定法,快速摘取小鼠脑的海马组织,经 H.E、免疫组织化学染色,观察灌注固定法的应用效果和 C57 BL/6N 小鼠脑缺血再灌注时大脑海马区神经元细胞超氧化物歧化酶-1 (copper/zinc superoxide dismutase-1 SOD1) 表达的改变,以及高压氧治疗对其表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组 将 15 只 18~20 g 重的 C57 BL/6N 雌性小鼠(首都医科大学动物科学部提供,动物使用许可证号为 scxk[京]2000-0012),随机分成三组,每组 5 只。

1.2 脑缺血再灌注动物模型的建立 取健康雌性 C57 BL/6N 小鼠,按文献^[2]方法制备缺血再灌注模型。以 6% 水合氯醛(按 300 mg/kg 计算)腹腔注射麻醉,之后将小鼠仰卧位固定于外科倒置显微镜下,用眼科器械在颈部正中做 1 cm 垂直切口,钝性分离气管两侧结缔组织及肌肉层,即可暴露出颈总动脉及伴行的迷走神经,并将颈总动脉与迷走神经间的结缔组织膜小心分离 6 mm,用备好的无创伤性动脉夹夹闭双侧颈总动脉,造成脑缺血,并准确计时 10 min。然后取下动脉夹,恢复血流,即为再灌注,缝合切口并以青霉素消毒。记录再灌注时间,由血管再通开始至 24 h 动物被处死为止。假手术组(sham-o)也进行同样手术,但不执行颈总动脉夹闭。

1.3 实验动物的处理 24 h 缺血再灌注加高压氧治疗(24 h HBO)组动物于再灌注后 3 h 和 22 h 各进行高压氧治疗一次。治疗方案为:纯氧洗舱 5 min→缓慢匀速升压至 2 个标准大气压后稳压(2 ATA)45 min→缓慢匀速降压 15 min→出舱。24 h 缺血再灌注(24 h I/R)组及 sham-o 组的动物置于常压空气环境中。

1.4 取材 取 24 h I/R 组、24 h HBO 组和 sham-o 组动物各 5 只,分别用 6% 水合氯醛,按 300 mg/kg 行腹腔麻醉,迅速剖开胸部,暴露心脏,用室温生理盐水通过左心尖部,沿升主动脉灌注冲血,同时剪开右心耳,可见右心耳流出液体的颜色逐渐由鲜红色变为淡红色,至基本无色止,换固定液^[3](pH 7.35~7.45 的 PBS、4% Formalin、4% 蔗糖),总液量以动物四肢僵硬为宜,约 30 ml,且要掌握流速先快后慢的原则,即前 15 ml 液体流速快,后 15 ml 则稍慢,总时间不超过 20 min 为好。而后迅速剪开头部皮肤,撬开颅骨,剥离硬、软脑膜,切断各对脑神经出颅根丝,游离并摘取全脑,沿正中裂剖开左右脑并取出左右海马,迅速放入事先准备好的后固定液(改良 Bouin)中固定 24 h。海马组织经上行梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡(56~64℃),包埋、Leica Jung Rm 切片机连续切片,切片厚度 5 μm,贴于 APES 处理过的载玻片上,置于 37℃ 烤箱 1 h,以备免疫组化染色。

1.5 H.E 染色和免疫组织化学染色过程 选 24 h I/R 组、24 h HBO 组和 sham-o 组同等数量的切片,在德国 Leica 公司生产的自动化切片、染片机上进行常规 H.E 染色及免疫组织化学染色。免疫组织化学染色步骤为:切片在室温下与 3% H₂O₂ 反应 20 min(封闭内源性过氧化物酶),滴加 1:20 的正常山羊血清(以 PBST 稀释)常温孵育 20 min。3 组切片都滴加 SOD1 多克隆抗体(工作浓度 1:50,抗体购自 SANTA CRUS 公司),4℃ 过夜,滴加 1:250(以 PBS 稀

释)HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(抗体由中山生物技术有限公司进口分装),室温 30 min,各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤,DAB 显色 4 min,自来水终止反应,滴加 Mayer 苏木精复染 20 s。上行脱水,透明,封片,镜检。于 QWin 图像分析系统(德国 Leica 公司)下拍摄照片,保存结果。

2 结果与讨论

2.1 应用于小鼠海马 H.E 和 SOD1 免疫组织化学染色方面所做的改进

组织固定法可分为离体浸润固定和在体经心灌注固定法。前者是致死动物后将所取组织直接放入固定液中进行固定。而后者是利用体循环和肺循环两个闭合血流回路,将活体动物麻醉后通过两个闭合循环通路快速冲血、固定。有同行认为,离体浸润固定效果肯定,简单易行,但它仅限有一定硬度且形态较易维持的组织,如肝、心和肾等组织,较软组织不适用。众所周知,脑组织位于颅骨内,柔软易变形,而且伴有十几对脑神经根丝进出颅骨,如操作不慎极易造成脑组织的损伤、挤压,从而导致取材失败。先灌注固定使脑组织有一定硬度后再取材,可以避免不必要的损伤,因此选择灌注固定就成为必然。该实验是研究超氧化物歧化酶在脑内海马区的表达,而动物体液中本身就含有许多内源性的过氧化物酶,倘若不用生理盐水冲洗血液就直接取材,势必造成血液污染,形成非特异性染色和假阳性结果。实验结果的真实性、可靠性就无从保障。

经心灌注固定法在中枢神经系统相关疾病的研究中应用十分广泛,它对脑和脊髓组织的快速冲洗固定作用,是任何一种离体固定法都无法替代的。应用免疫组织化学染色法来显示超氧化物歧化酶在小鼠脑内海马区的表达,用灌注固定法更为必要。文献^[1]报道灌注固定法应用于大鼠的动物实验较多见,但对只有 18~20 g、先天大脑动脉环(Willis 环)缺陷的 C57 BL/6N 小鼠采用此法的报道却很少见。

改进的灌注固定法在参考代小思^[1]、陈浩宇^[3]等方法的基础上,对灌注装置、灌注液成

分、灌注速度、用量等方面进行了改进。首先,注射器针头、眼科剪、止血钳等器械尖端均用小于 1 mm 且具有一定硬度的软管包绕,用来防止手术过程中对心肌组织的意外损伤。同时双侧输液瓶的位置均位于动物心脏平面以上 50 cm 的高度,以维持适宜的静液压;配制固定液所用溶剂一改以往仅使用双蒸水的传统,代之以 pH 7.35~7.45 PBS 缓冲液为溶剂,同时加有 4% Formalin、4% 蔗糖用以维持脑细胞的正常渗透压;冲洗液流速控制在 30 滴/min、持续 15 min,固定液流速控制在 20 滴/min、持续 30 min。取材后脑组织再次放入改良的 Bouin 固定液中 12 h,其组分比例为苦味酸:甲醛:冰醋酸 = 15:5:1。这样浸润固定与灌注固定结合,互相补充,相得益彰。所取组织形态完整,结构清晰,且没有内源性过氧化物酶的干扰,即无假阳性的产生,便于 H.E 及免疫组化染色和观察。

实验结果表明,改良的灌注固定法提高了灌注效率,结构更加清晰,结果可靠。将常规用于体积较大动物(兔、大鼠)的灌注固定法经改良后可用于在显微操作下的短暂前脑缺血小鼠模型,并取得良好的结果。这为有关脑组织的各种常规病理形态、免疫组化、原位杂交、原位 PCR 的实验研究提供了一种更加简便、快速、有效可行的方法。

2.2 SOD1 H.E 染色与免疫组织化学染色结果

H.E 染色如图版:1A、2A 和 3A 所示。sham-o 组海马神经元形态结构正常,神经元细胞核大而圆,染色浅。24 h I/R 组阳性细胞数量减少,多数细胞形态不规则,胞浆浓缩,染色质凝集,着色深;24 h HBO 组细胞数量有所恢复,形态结构趋于正常。免疫组织化学染色结果如图版:1B、2B 和 3B 所示。24 h I/R 组海马阳性神经元胞浆 SOD1 表达比 sham-o 组减少,而 24 h HBO 组 SOD1 阳性细胞表达的数量与形态有所恢复。

脑缺血再灌注时,大量增加的自由基可直接攻击生物大分子,如蛋白质和核酸等^[4,5],也参与缺血中枢神经系统的转导通路,对细胞急性坏死及凋亡过程均起重要作用^[6,7]。SOD1 是

人体重要的抗氧化酶之一,是机体抵御超氧阴离子自由基攻击的关键防线。小鼠 SOD1 定位于 16 号染色体(16-B4→ter),分子量 32 000 u。文献报道 SOD 转基因鼠和基因敲除小鼠研究正反两方面结果表明,SOD1 可显著减少缺血脑半球梗塞面积,降低海马区神经元死亡率^[8,9]。该实验结果显示高压氧治疗可使 SOD1 阳性细胞表达有所恢复。

实验结果提示,改进的灌注固定方法在取材小鼠海马进行 H.E 和免疫组织化学实验研究的效果良好。切片染色结果清晰、定位准确,无内源性过氧化物酶的污染,是一种可用于脑组织形态学研究、并值得推广的方法。进一步明确了高压氧治疗机制之一可能是通过增加 SOD1 基因表达而实现的。

参 考 文 献

- [1] 代小思.脑组织局部灌注固定的改良及体会.四川解剖学杂志,2004,12(1):38.
- [2] Yonekura I,Kawahara N,Nakatomi H,et al.A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6N mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004,24(2):151~158.
- [3] 陈浩宇,高亚兵,彭瑞云等.一种改进的大鼠脑组织灌注

- 固定方法.军事医学科学院院刊,2002,26(3):208~212.
- [4] 孙宁,施静.活性氧在脑缺血-再灌注过程中的损伤与保护作用.中国组织化学与细胞化学杂志,2002,11(4):495~500.
- [5] Chan P H.Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001,21(1):2~14.
- [6] Fujimura M,Morita-Fujimura Y,Narasimhan P,et al.Copper-zinc superoxide dismutase prevents the early decrease of apurinic/aprimidinic endonuclease and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 1999,30:2 408~2 415.
- [7] Fujimura M,Morita-Fujimura Y,Noshita N,et al.The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2000,20:2 817~2 824.
- [8] Kinouchi H,Epstein C J,Mizui T,et al.Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase. *PNAS* 1991,88:11 158~11 162.
- [9] Saito A,Hayashi T,Okuno S,et al.Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death after transient focal ischemia by blocking activation of the bad cell death signaling pathway. *J Neurosci* 2003,23(5):1 710~1 718.

图 版 说 明

1A~3A 3 组小鼠海马神经元 SOD1 H.E 染色结果

1A.假手术对照组(sham-o)神经元形态结构正常,细胞核大而圆,染色浅,×20;2A.24 h I/R 组,SOD1 阳性细胞数减少,形态不规则,胞浆浓缩,染色质凝集,着色深,×20;3A.24 h HBO 组,细胞数量有所恢复,形态结构趋于正常,×20。

1B~3B 用免疫组织化学染色方法显示 3 组小鼠海马阳性神经元 SOD1 蛋白的表达

1B.sham-o 组,×20 2B.24 h I/R 组,海马阳性神经元胞浆 SOD1 蛋白表达比 sham-o 组减少,×20;3B.24 h HBO 组,海马阳性神经元 SOD1 蛋白表达的细胞数量和形态有所恢复,×20;箭头表示小鼠海马中 SOD1 免疫阳性神经元。

Explanation of Plate

1A~3A The SOD1 expression in the hippocampus neurons in three groups as revealed by H.E staining

1A.sham-operated(control)group,showing the neurons with normal shape and structure.The nucleus was big and round with light color,×20;2A.24-hour ischemia-reperfusion(I/R)group,showing the decrease of SOD1 masculine neurons population.Most of the neurons showed irregular shape,concentrated cytoplasm,and the the condensed and deeply stained chromatin,×20;3A.24-hour hyperbaric oxygen treatment group(HBO),showing that the number of masculine neurons was recovered and the shape of the neurons almost returned to normal,×20.

1B~3B: The expression of SOD1 protein in the hippocampus immunoreactive neurons in three groups as revealed by immunohistochemistry

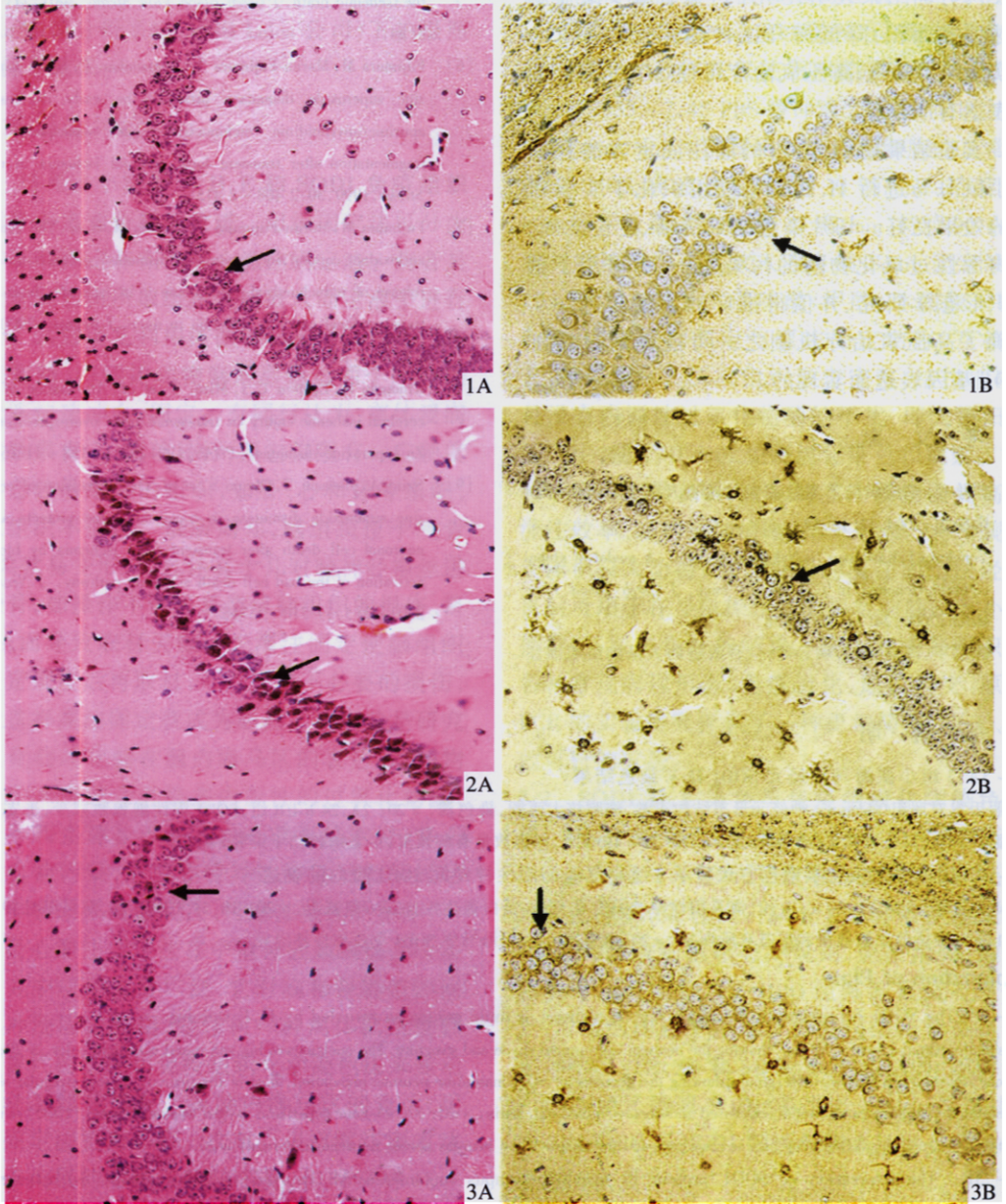
1B.sham-operated(control)group,×20;2B.24-hour ischemia-reperfusion(I/R)group,showing that the expression of SOD1 protein in the immunoreactive neurons of hippocampus was lower than that of sham-o group and that the expression was located in the cytoplasm,×20 3B.24-hour hyperbaric oxygen treatment group.The number and shape of masculine neurons in the hippocampus almost returned to normal.The expressed SOD1 protein was located in the cytoplasm.×20;Arrows showed SOD1 immunoreactive neurons in the hippocampus of the mouse.

李宝红等:用于脑缺血小鼠海马 SOD1 表达的改进灌注固定法

图版 I

LI Bao-Hong *et al.*: Application of Modified Perfusion Fixation in the Study on the Expression of Copper/zinc Superoxide Dismutase in Mouse Hippocampus after Transient Forebrain Ischemia

Plate I



图版说明见文后