文章编号:1000-5404(2007)21-2031-03

论著

明胶墨汁灌注展示大鼠视网膜血管的方法

童建斌,曾乐平,陈 旦,周 瑾,黄菊芳,罗学港 (中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系人体解剖学教研室,长沙 410013)

提 要:目的 对大鼠视网膜墨汁灌注方法进行改良以充分显示微血管。**方法** 78只SD大鼠分两部分进行实验。第一部分中,72只大鼠根据灌注液中明胶的浓度分为纯墨汁组($n=18$)、1%明胶墨汁组($n=18$)、3%明胶墨汁组($n=18$)、5%明胶墨汁组($n=18$)。每组动物根据灌注压强分为90、115、140、165、190、215 mmHg 6个亚组。墨汁从升主动脉进行灌注。用视网膜铺片和切片检测微血管的灌注情况。根据第一部分结果,在第二部分中,6只大鼠先后灌注3%明胶墨汁和5%明胶墨汁各20 ml。用上面相同的方法检测微血管的灌注情况。**结果** 在165 mmHg压强下灌注37 ℃的3%明胶墨汁时,视网膜周边部的血管充填充分,但中央部的血管充填不充分。在215 mmHg压强下灌注37 ℃的5%明胶墨汁时,视网膜周边部的血管充填不充分,但中央部的血管充填充分。在165 mmHg压强下灌注3%明胶墨汁20 ml,再在215 mmHg压强下灌注5%明胶墨汁20 ml能使视网膜中央部和周边部的大小血管都充填充分,且墨汁无外渗、在水溶液中不褪色、灌注血管与周边组织对比明显。**结论** 在165 mmHg恒压下灌注37 ℃的3%明胶墨汁20 ml,再在215 mmHg恒压下灌注37 ℃的5%明胶墨汁20 ml是一种较好的显示大鼠视网膜微血管的形态学方法。

关键词: 墨汁灌注;视网膜;微血管;大鼠
中图法分类号: R322-34; R322.13; R322.91 **文献标识码:** A

Method of gelatin-ink perfusion to visualize rat retinal vessel

TONG Jian-bin, ZENG Le-ping, CHEN Dan, ZHOU Jin, HUANG Ju-fang, LUO Xue-gang (Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To improve the ink perfusion method, thereby enabling it to more completely show the rat retinal microvessels. **Methods** The present study included two parts. The first part comprised of 72 rats that were randomly divided into four groups: only ink group ($n=18$), 1% gelatin-ink group ($n=18$), 3% gelatin-ink group ($n=18$), and 5% gelatin-ink group ($n=18$). The animals of each group were subdivided into 90, 115, 140, 165, 190 and 215 mmHg subgroups, chosen based on their mean arterial pressure. The ink perfusion was performed *via* the ascending aorta, and rat retinal microvessels were subsequently detected in whole-mount retinas and retinal sections. The second part was based on the results of the first part, in which 6 rats were infused sequentially with 20 ml ink plus 3% gelatin and then 20 ml ink plus 5% gelatin. The rat retinal microvessels were detected as that in the first part. **Results** Under the perfusion condition that is 40 ml of 37 ℃ ink plus 3% gelatin and 165 mmHg perfusion pressure, the vessels of the peripheral retina were completely shown, whereas only part of the central retinal vessels was shown. In contrast, the perfusion conditions that is 40 ml of 37 ℃ ink plus 5% gelatin and 215 mmHg perfusion pressure, resulted in the central retinal vessels shown very well, but not the peripheral retinal ones. However, when the animals were first perfused with 20 ml of 37 ℃ ink plus 3% gelatin at 165 mmHg perfusion pressure, and subsequently perfused with 20 ml of 37 ℃ ink plus 5% gelatin at 215 mmHg perfusion pressure, both the central retinal vessels and the peripheral retinal vessels were shown very well, without ink leakage in the retina. In addition, the contrast between vessels and surrounding tissues was distinctly improved. **Conclusion** Perfusing animals with 20 ml of 37 ℃ ink

基金项目: 国家自然科学基金(30100098,30570979);湖南省自然科学基金(04JJY093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100098, 30570979) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (04JJY093)
作者简介: 童建斌(1975-),男,湖南省桃江县人,博士研究生,讲师,主要从事视觉神经生物学方面的研究。电话:(0731)2650422,E-mail:jianbintong@yahoo.com.cn
通讯作者: 黄菊芳,电话:(0731)8836045,E-mail:huangjufang@mail.csu.edu.cn
收稿日期: 2007-06-15;**修回日期:** 2007-09-14

plus 3% gelatin at 165 mmHg perfusion pressure, and subsequently with 20 ml of 37 ℃ ink plus 5% gelatin at 215 mmHg perfusion pressure, is hereby demonstrated as good method for morphological characterization of rat retinal microvessels.

Key words: ink perfusion; retina; microvessel; rat

视网膜血管的改变与许多视网膜疾病密切相关[1],因此操作简便、价格便宜、能准确显示视网膜微血管的形态学方法具有很高的实用价值。墨汁灌注是一种古老的显示视网膜微血管的方法[2,3]。然而墨汁由于其在水溶液中容易褪色、单纯的墨汁灌注对视网膜较大血管的显示不充分,这在一定程度上限制了这一方法的广泛使用。明胶是一种动物蛋白,温度高于40 ℃易溶于水,温度低于30 ℃易凝固成胶冻状物质。Lin 等[4]用墨汁加明胶灌注小鼠脑血管,取得了较好的效果。这表明利用明胶的理化性质,在合适的温度下于墨汁灌注液中加入一定浓度的明胶能取得较好的微血管显示效果。然而我们沿用已有方法[2-10]灌注大鼠后,发现经后固定浸糖等处理的视网膜血管充填均不充分。

本研究选择在合理的温度(37 ℃)下,于墨汁灌注液中加入不同浓度的明胶,并在不同的压强条件下进行灌注,力图寻找一种合适的显示大鼠视网膜微血管最优方法。

1 材料与方法

1.1 动物与实验设计

78 只成年健康 SD 大鼠,雌雄不限,体质量 200 ~ 250 g,由中南大学动物学部提供,分两部分进行实验。在第一部分实验中,72 只大鼠根据灌注液中明胶的浓度分为纯墨汁(北京一得阁墨汁)、1% 明胶墨汁、3% 明胶墨汁、5% 明胶墨汁 4 组,灌注液温度均为 37 ℃,灌注液量均为 40 ml,每组 18 只动物。根据灌注压强,每组又分为 90、115、140、165、190、215 mmHg 6 个亚组,每个亚组灌注 3 只动物。

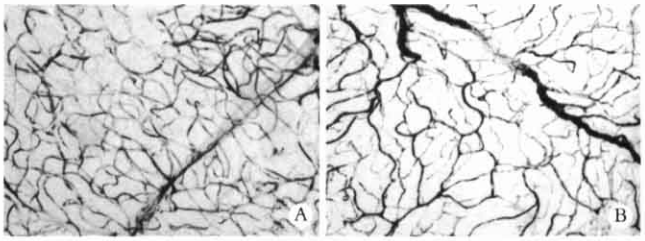
根据第一部分实验的结果,在第二部分实验中,6 只大鼠先在 165 mmHg 恒压下灌注含 3% 明胶的 37 ℃墨汁 20 ml,再在 215 mmHg 恒压下灌注含 5% 明胶的 37 ℃墨汁 20 ml。

1.2 墨汁灌注及视网膜组织的制备

大鼠称重后,以 10% 水合氯醛(0.4 μl/kg)腹腔麻醉。麻醉后暴露胸腔,直视下将 12 号针头自心尖插入升主动脉,并从外围加以结扎固定,同时结扎腹主动脉。在 120 mmHg 恒压下先灌注 37 ℃的生理盐水,直至右心房流出清亮液体,然后在不同压强条件下灌注 37 ℃的含不同明胶浓度的墨汁。在右心房流出墨汁后不久,结扎上腔静脉。当 40 ml 墨汁灌完后,钳夹胸主动脉,并将大鼠在 4 ℃冰箱中放置 50 min,以利于明胶凝固,防止墨汁流失。用眼科剪取眼球,去角膜和晶状体,4% 的多聚甲醛后固定 2 h 后,视网膜铺片直接贴片;将要进行视网膜切片的眼杯经梯度蔗糖溶液脱水,三顿恒低温切片机 -25 ℃切片,片厚 14 μm。取带视神经的视网膜横切片贴片。视网膜铺片和切片在室温下干燥后,常规脱水透明封固。结果在 motic 显微镜下进行观察。

2 结果

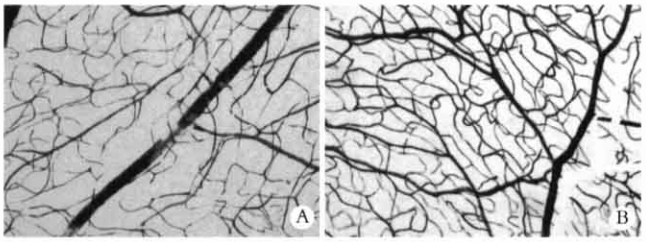
灌注 37 ℃的纯墨汁或 1% 明胶墨汁时,在 90、115、140、165、190 和 215 mmHg 6 种恒压条件下都易灌注,肉眼易见巩膜角膜缘周边的血管黑染。刚取材时光镜下视网膜血管的灌注效果都可以,但组织经后固定、浸糖、干燥、封固等步骤后,视网膜血管的显示都不均一,视网膜中央部和周边部的大小血管充填都不充分。视网膜血管的充填情况都与 165 mmHg 恒压条件下灌注了 1% 明胶墨汁的视网膜的充填情况相似(图 1A 和图 1B)。



A: 中央部; B: 周围部

图 1 165 mmHg 压强下 1% 明胶墨汁灌注的视网膜的光镜观察 (×100)

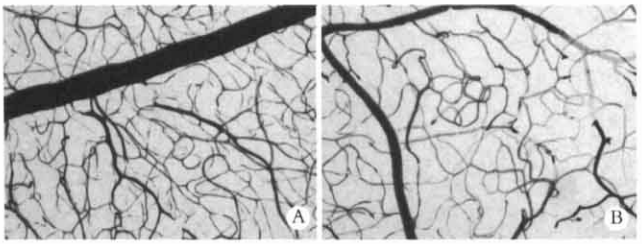
3% 明胶墨汁组在 90 和 115 mmHg 压强条件下灌注时,明胶墨汁难于达到巩膜角膜缘周边的血管;在 140、165、190 和 215 mmHg 压强条件下灌注时,明胶墨汁可达到巩膜角膜缘周边的血管。视网膜经后固定、浸糖、干燥、封固等步骤后光镜观察显示:灌注压强为 140 mmHg 时,视网膜中央部和周边部的血管充填都不充分(图片没显示);灌注压强为 165 mmHg 时,视网膜周边部视网膜微小血管充填充分,显示效果好(图 2B),但中央部许多血管,尤其是大血管,充填不充分(图 2A);灌注压强为 190 mmHg 和 215 mmHg 时,视网膜血管的充填情况与灌注压强为 165 mmHg 时的情况类似。



A: 中央部; B: 周围部

图 2 165 mmHg 压强下 3% 明胶墨汁灌注的视网膜的光镜观察 (×100)

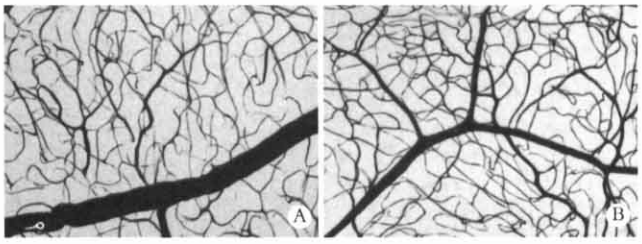
5% 明胶墨汁组在 90、115、140、165 mmHg 压强条件下灌注时，明胶墨汁难于达到巩膜角膜缘周边的血管；在 190 和 215 mmHg压强条件下灌注时，明胶墨汁可达到巩膜角膜缘周边的血管。视网膜经后固定、浸糖、干燥、封固等步骤后光镜观察显示：灌注压强为 190 mmHg 时，视网膜中央部和周边部的血管充填都不充分；当灌注压强为 215 mmHg 时，视网膜中央部的大小血管均充填充分（图 3A），但部分周边部视网膜血管充填不足（图 3B）。



A：中央部；B：周围部

图 3　215 mmHg 压强下 5% 明胶墨汁灌注的视网膜的光镜观察　（×100）

结合 3% 明胶墨汁和 5% 明胶墨汁灌注显示特点，我们先在 165 mmHg 恒压下灌注 3% 明胶墨汁 20 ml，再在 215 mmHg 恒压下灌注 5% 明胶墨汁 20 ml，组织封固后显示中央部和周边部的大小血管均充填充分，且墨汁无渗漏褪色，与背景组织对比强烈，显示效果最佳（图 4A 和 4B）。



A：中央部；B：周围部

图 4　3% 和 5% 明胶墨汁灌注的视网膜的光镜观察　（×100）

3　讨论

视网膜微血管的形态学显示在青光眼、急性眼高压、糖尿病视网膜病等缺血性眼病的研究中具有很重要的价值。良好的显示方法不仅能显示视网膜微血管的全貌，而且还能满足对视网膜进行其他研究的需要。墨汁灌注法是一种古老的显示微血管的方法，广泛应用于脑、骨、视网膜、肌等组织微血管的显示[5-7,9-11]，但其显示效果受墨汁灌注液成分、灌注方法、灌注压强等因素的影响[11]。单纯墨汁灌注后由于易于褪色，基本无法再进行免疫组化双标等其他检测。

为了找到最优的墨汁灌注方法，本实验根据明胶的理化性质及动物的体温特征，灌注温度均为 37 ℃；同时根据大鼠平均动脉压选用在 90、115、140、165、190 或 215 mmHg 的压强条件下分别灌注含 0%、1%、3% 和 5% 明胶的墨汁。结果显示在 165 mmHg 压强下灌注 3% 明胶墨汁时，视网膜周边部的血管充填充分，但中央部的血管充填不充分。在 215 mmHg 压强下灌注 5% 明胶墨汁时，视网膜周边部的血管充填不充分，但中央部的血管充填充分。结合二者的灌注特点，我们率先采用两步灌注法（先在 165 mmHg 恒压下灌注含 3% 明胶的 37 ℃墨汁 20 ml，再在 215 mmHg 恒压下灌注含 5% 明胶的 37 ℃墨汁 20 ml）使视网膜中央部和周边部的大小血管都充填充分，且墨汁无外渗、在水溶液中不褪色、灌注血管与周边组织对比明显，达到了最优的微血管显示效果。在此基础上，若进一步计算微血管的面积，将有利于准确量化疾病条件下视网膜功能性微血管的改变。此外在本实验中，我们率先通过量化墨汁灌注液中明胶浓度、灌注压强和灌注液量，使灌注操作和灌注效果具有很好的重复性，有效地克服了目前明胶墨汁灌注方法在显示视网膜血管时的不足。

总之，明胶墨汁两步灌注法能较好的显示视网膜微血管，此外也具有价格便宜、操作方便、检测容易之特征，是一种较好的视网膜微血管的显示方法。

（致谢：感谢中南大学 Ismail 博士对英文摘要的修改！）

参考文献：

[1] Ben-Nun J, Alder V A, Constable I J, *et al*. The patency of the retinal vasculature to erythrocytes in retinal vascular disease[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990, 31 (3): 464 - 470.

[2] 张正培，陈钦元，余振钰，等. 氧诱导的血管增生性视网膜病变小鼠模型[J]. 眼科研究，2003，21(5)：493 - 496.

[3] 徐洪斌，陈晓隆. 吸氧对新生鼠视网膜的影响及其机制[J]. 中华眼底病杂志，2003，19(5)：306 - 309.

[4] Lin C L, Dumont A S, Calisaneller T, *et al*. Monoclonal antibody against E selectin attenuates subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm[J]. Surg Neurol, 2005, 64(3): 201 - 205.

[5] 张　黎，胡燕华. 新的角膜囊袋法诱生的兔角膜新生血管模型[J]. 眼科研究，2006，24(3)：260 - 262.

[6] 陶圣祥，喻爱喜，郑晓晖，等. 隐神经营养血管复合组织瓣的解剖学研究[J]. 中华创伤骨科杂志，2007，9(3)：248 - 250.

[7] 王天成，张　云，孙春旭，等. 中华墨汁在宫颈癌前哨淋巴结活检示踪中的应用[J]. 中华妇幼临床医学杂志，2006，2(1)：23 - 25.

[8] Taguchi Y, Takashima S, Sasahara E, *et al*. Morphological changes in capillaries in the ischemic brain in Wistar rats[J]. Arch Histol Cytol, 2004, 67(3): 253 - 261.

[9] 李　朗，孙　俊，李　明，等. 加温灌注明胶墨汁制作动物脑血管模型的方法[J]. 中国临床解剖学杂志，2004，22(2)：224.

[10] Barou O, Mekraldi S, Vico L, *et al*. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study [J]. Bone, 2002, 30(4): 604 - 612.

[11] 黄庆愿，史景泉，高钰琪，等. 大鼠心、脑、骨骼肌毛细血管染色方法比较[J]. 第三军医大学学报，2001，23(2)：237 - 239.

（编辑　栾　嘉）