技术方法

文章编号:1000-5404(2011)19-2096-02

RCS大鼠眼球冰冻切片前固定的方法

曾玉晓,陈丽峰,刘 康,徐海伟 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心)

[摘要] **目的** 寻找一种适合于遗传性视网膜色素变性的动物模型皇家外科学院大鼠(royal college of surgeons rat, RCS)眼球冰冻切片前的固定方法。**方法** RCS大鼠5只,麻醉灌注后,5只眼行4%多聚甲醛固定1 h,30%蔗糖脱水过夜;5只眼用福尔马林、酒精、冰醋酸混合固定液(Davidson's Fluid)固定12h后,以5%、10%、20%、30%蔗糖进行梯度脱水各4 h;再行眼杯OCT包埋后冰冻切片。**结果** Davidson's固定后的视网膜组织结构清晰,视网膜各层结构内的细胞排列紧密,无明显裂隙存在,且发生人为视网膜脱离概率低,无自发荧光干扰;相反,采用4%多聚甲醛固定的视网膜组织各层细胞排列较疏松,有一定的裂隙或空泡存在。**结论** Davidson's固定液适用于RCS大鼠视网膜组织的固定,效果优于单纯的4%多聚甲醛固定液。

[关键词] 眼球;冰冻切片;固定;RCS大鼠
[中图法分类号] R361.2 [文献标志码] B

皇家外科学院大鼠(royal college of surgeons rat, RCS)为遗传性视网膜色素变性的经典动物模型,是由于视网膜色素上皮细胞Merker基因缺失,丧失对光感受器细胞外节的吞噬能力,继发性导致视网膜变性的一种常染色体隐性遗传病[1]。由于RCS大鼠视网膜变性后组织变薄,常规方法固定后人为性视网膜脱离概率高、组织结构和形态欠佳,且极易发生脱片,这使得对其行冰冻切片具有相当难度。采用常规的冰冻切片前的固定脱水方法,并不能满足此变性大鼠视网膜切片的实验要求,而进行视网膜下腔细胞移植实验后,需要维持很好的视网膜组织形态,并实时观察荧光标记的细胞,又必须进行冰冻切片,因此本实验旨在探索一种更加适合于变性大鼠视网膜冰冻切片的前固定方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

冰冻切片机(Leica CM1900型),光学显微镜(Olympus BX51)。OCT包埋剂购自Sakura公司,Davidson s固定液由体积分数为10%的中性缓冲甲醛、95%乙醇、冰醋酸和蒸馏水依据体积比2:3:1:3配制而成[2]。

1.2 方法

1.2.1 取材与固定 采用体质量100 g左右的SPF级RCS-p$^+$大鼠5只(黑顶,色素眼,视网膜变性),由美国加利福尼亚大学Beckman视觉中心赠送,第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心饲养繁殖。麻醉后经心脏行生理盐水100 ml灌注再用4%多聚甲醛灌注50 ml,取出眼球,用1 ml空针针头在角巩膜缘扎一小洞,其中5只眼为实验组用福尔马林、酒精、冰醋酸混合固定液(Davidson's Fluid)固定12 h,再以5%、10%、20%、30%蔗糖行进梯度脱水各4 h。5只眼为对照组行常规大鼠眼球固定方法,即4%多聚甲醛固定1 h,30%蔗糖脱水过夜;之后均行筋膜、角膜前节、晶状体、玻璃体和固定液等的去除。

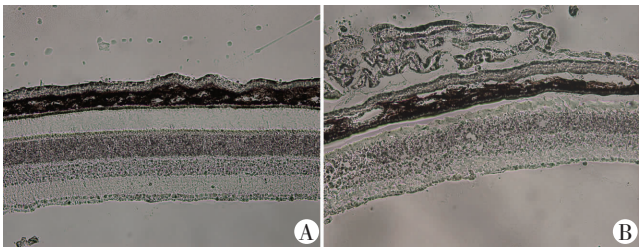
[通信作者] 徐海伟,电话:(023)68754803

1.2.2 包埋 将OCT包埋剂滴入填满眼杯,避免气泡,再放入盛有OCT的塑料小容器里,小心搅匀后4 ℃放置30 min,使包埋剂充分渗透组织,然后放在液氮罐口迅速冷冻[3],置到冰冻切片机里面,30 min后切片。

1.2.3 切片 冷冻箱温度稳定在-22 ~ -20 ℃,切片厚度为10 ~ 12 μm。根据标记的位置选择放在冷冻头上的方向后开始修切组织,到达想要的部位且观察视网膜未脱离牵拉,就可以贴片。

2 结果

Davidson's实验组在光学显微镜下观察到视网膜组织结构清晰,视网膜各层结构内的细胞排列紧密,无明显裂隙或皱褶、空泡存在,且发生人为视网膜脱离概率低,见图1A;免疫荧光染色后仍能保持良好形态,并无自发荧光干扰。尽管对照组视网膜组织结构也较清晰,但相对于实验组而言,各层细胞排列较疏松,有一定的裂隙或空泡存在,见图1B。



A:实验组;B:对照组

图1 普通光学显微镜下RCS-p$^+$大鼠的视网膜组织结构 (×200)

3 讨论

视网膜色素变性疾病的RCS大鼠是研究此类疾病发生、发展或治疗性研究的经典动物模型。在以往的光镜及电镜研究中发现,RCS大鼠出生后外核层厚度逐渐变薄及内核层厚度逐渐变厚,视杆外节的结构紊乱,随后出现内节结构紊乱。细胞体皱缩、消失。在病变发展到中晚期时,由于感光细胞变性死亡出现了

视网膜内层形态重构。因此,获取高质量的组织切片对于视网膜形态结构的研究至关重要。

在我们的实验中发现:采取常规多聚甲醛固定大鼠眼球,虽然能保证视网膜各层次的良好形态,但只适用于普通正常大鼠;对于视网膜本身变性的RCS大鼠,要在病变状态下仍然保持其细胞结构,单纯采用多聚甲醛来固定有所欠佳。所以拟寻求一种混合固定液来满足实验的需求。Moore等[4]报道一种Davidson's混合固定液,对细胞核细节保存更完整;后来Latendresse等[5]阐述Davidson's液对小标本来讲是一种快速固定液,并发现用于石蜡切片前的眼球固定可以得到很好的效果。由此,我们尝试采用Davidson's液固定RCS大鼠眼球并进行冰冻切片,同时与多聚甲醛固定组相比,我们发现经Davidson's液的固定,制片效果好,视网膜组织结构清晰,视网膜各层结构内的细胞排列紧密,无明显裂隙或皱褶、空泡存在,细胞细节更加完整。免疫荧光染色后,背景干净清晰。更为重要的是,明显地降低了视网膜脱离的概率。

我们认为利用Davidson's固定液在RCS大鼠视网膜能够取得制片效果,是因为Davidson's液是福尔马林、酒精、冰醋酸混合,甲醛是能快速渗透组织,但易导致细胞核、细胞质严重凝集,细胞细节被破坏,而冰醋酸有抗皱缩的作用,乙醇安全性好,处理简便,它是通过破坏氢键使蛋白的3级结构得以破坏,不会导致组织的快速皱缩。

参考文献:

[1] Nagar S, Krishnamoorthy V, Cherukuri P, *et al*. Early remodeling in an inducible animal model of retinal degeneration[J]. Neuroscience, 2009, 160(2): 517-529.
[2] 盛婵,王辉,陆姮磊,等. Davidson's固定液用于睾丸和眼球固定的优势[J]. 毒理学杂志,2007, 21(4): 291.
[3] 彭周贵. 一种快速冷冻切片方法制作小鼠眼球切片[J]. 重庆医学, 2010, 39(21): 2969,2987.
[4] Moore K L, Graham M A, Barr M L. The detection of chromosomal sex in hermaphrodites from a skin biopsy[J]. Surg Gynecol Obstet, 1953, 96(6): 641-648.
[5] Latendresse J R, Warbrittion A R, Jonassen H, *et al*. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid[J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(4): 524-533.

(收稿:2011-03-31;修回:2011-05-30)
(编辑 张 维)

(上接2095页)

较无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 病原菌分布

VAP患者痰培养结果:嗜麦芽假单胞菌5例,占29.41%;铜绿假单胞菌3例,占17.65%;大肠埃希菌2例,占11.76%;恶臭假单胞菌2例,占11.76%;金黄色葡萄球菌1例,占5.88%;肺炎克雷伯菌1例,占5.88%;表皮葡萄球菌1例,占5.88%。2例胸片提示VAP。

2.6 治疗及转归

根据细菌药敏结果选择抗生素,同时加强呼吸道管理,并予对症支持治疗,17例VAP患者中,5例治愈或好转,放弃治疗1例,死亡11例。

3 讨论

高龄患者易发生VAP,本组病例提示,患者年龄>70岁,VAP发病率显著增加,这与年龄增大后身体各脏器功能减退,机体免疫功能降低,肺组织的结构、形态发生退行性改变,加上严重的原发基础疾病对自身机体的消耗作用,易发生VAP病变;合并基础疾病越多,发生VAP的风险越大。已有研究认为[4]患者原发病的严重程度对于VAP发生有重要影响。因此,对危重患者应采取积极有效措施治疗原发病。

本组VAP病例,机械通气时间在5d以上的发生率为88%,调查发现,机械通气时间越越长,VAP发生率越高,可能与长时间的机械通气导致气道防御能力下降加上插管表面及气囊周围分泌物滞留、误吸增加等因素有关。

人工气道的建立,破坏了呼吸道正常的生理和自然防御功能,刺激上呼吸道产生分泌物,是VAP发生的高危因素。插管方式对VAP的影响,目前各家研究结果不一致,有研究认为,长期经鼻插管可能吸入鼻窦部的炎性分泌物而造成肺部感染,故应尽量选用经口插管[5]。本组病例经口插管、经鼻插管及气管切开3种人工气道途径相比较VAP发生率无显著差异($P>0.05$),这可能与病例本量小,存在统计学误差有关。

本组报告资料显示,17例VAP患者中,15例患者行下呼吸道分泌物细菌培养,培养结果以G^-杆菌为主,占86.67%。病原菌分布前4位的细菌依次是:嗜麦芽假单胞菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、恶臭假单胞菌。经ICU环境监测,发现其检出的病原菌与患者感染的病原菌相一致。这些细菌都是重要的条件致病菌,也是医院感染的重要细菌,因此应加强监测,增加药敏实验,为临床治疗及医院感染的监测提供依据。

参考文献:

[1] American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4): 388-416.
[2] 谢勇前. 呼吸机相关性肺炎发生的原因分析与护理对策[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(10): 1515-1516.
[3] 钟鸣,诸杜明,朱彪. 早期气管切开对危重患者呼吸机相关性肺炎的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(18): 2768-2770.
[4] 王彦,张淑文,王超,等. 多器官功能障碍综合征患者呼吸机相关性肺炎的危险因素分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(11): 1010-1013.
[5] 景继勇, 兰美娟, 曾妃,等. 综合胸部物理治疗对呼吸机相关性肺炎的预防作用[J]. 中华护理杂志, 2004, 39(2): 100-102.

(收稿:2011-08-04;修回:2011-09-14)
(编辑 张 维)