

牟秋月,陈森耀,黄浙学,等.不同后固定时间对脑组织免疫荧光染色效果的影响[J].江西师范大学学报(自然科学版),2023,47(3):242-245.

MOU Qiuyue, CHEN Senyao, HUANG Zhexue, et al. The effect of different postfixation time on immunofluorescence staining of brain tissue [J]. Journal of Jiangxi Normal University(Natural Science), 2023, 47(3): 242-245.

文章编号:1000-5862(2023)03-0242-04

不同后固定时间对脑组织免疫荧光染色效果的影响

牟秋月,陈森耀,黄浙学,潘永良*,沈俊媛,石依蕾,叶梦凡

(湖州师范学院医学院,浙江省媒介生物学与病原控制重点实验室,浙江 湖州 313000)

摘要:为探讨延长后固定时间是否能改善在体快速灌注固定后脑组织的免疫荧光染色效果,该文用雄性长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)经心脏升主动脉插入灌注针,依次快速灌注4℃生理盐水和质量分数为4%的多聚甲醛溶液,断头取脑,分别浸泡于质量分数为4%的多聚甲醛溶液中固定24 h和72 h后进行30 μm厚冰冻切片和免疫荧光染色,观察并比较后固定24 h和72 h下丘脑室旁核(PVN)OT免疫阳性神经元胞体数量、下丘脑前部(AH)免疫阳性神经纤维密度及其形态学结构。研究表明:后固定72 h组的PVN OT免疫阳性神经元胞体数量以及AH免疫阳性纤维密度均高于后固定24 h组的。与后固定24 h组相比,后固定72 h组的OT免疫阳性神经元胞体形态更加完整,境界更加清晰,神经元核周和突起免疫荧光标记强度更强。且后固定72 h组OT免疫阳性神经纤维形态比后固定24 h组的更清晰、更连续,呈串珠状。在快速灌注固定后延长后固定时间有助于改善免疫荧光染色效果。

关键词:快速灌注;后固定;催产素;免疫荧光;染色效果

中图分类号:R 33 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2023.03.04

具有改善作用。

0 引言

灌注固定可最大程度地保持组织细胞在活体时的状态,防止细胞自溶破坏和保存抗原活性,是提高组织形态学、免疫组织化学和免疫荧光等实验结果准确性的重要手段^[1-2]。在以往的研究中,常用的灌注方式有蠕动泵、注射器和输液器灌注^[1,3-6]。灌注固定持续时间从几分钟至数小时不等^[3,7-8],依据灌注固定时间长短可大致分为快速和慢速灌注固定。虽然快速灌注固定效率较高,但因固定剂和组织作用时间较短而导致固定效果欠佳,进而影响组织形态学观察和抗原免疫反应性检测。而慢速的灌注固定虽然固定效果好,但费时费力,尤其不适合样本量较大的室内和野外实验,并且一些研究也发现固定时间较长会导致抗原与固定剂交联程度过强,影响抗原和相关指标的检测^[9-10]。因此,本文在以往快速灌注的基础上,通过延长固定液后固定时间来探讨后固定时间的改变是否会对染色效果

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性长爪沙鼠8只,体质量为50~70 g,购自浙江省实验动物中心。在快速灌注固定后,根据后固定的时间随机分为后固定24 h组和后固定72 h组2组,每组4只。实验动物的操作、饲养及处死均遵循湖州师范学院实验动物使用规范。

1.2 主要试剂与仪器

0.9% NaCl溶液;多聚甲醛(41533,国药集团化学试剂有限公司);30%蔗糖溶液(10021463,国药集团化学试剂有限公司);OCT冷冻包埋剂(4583, Sakura Finetek Inc, CA, USA);兔抗OT溶液(T-4084, 1:500, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA);Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG(H+L)(A0423, 1:300, 江苏碧云天生物技术有限公司);恒

收稿日期:2022-09-12

基金项目:国家自然科学基金(31672295)和国家级大学生创新创业训练计划(202110347050)资助项目。

通信作者:潘永良(1979—),男,浙江诸暨人,教授,博士,主要从事动物行为神经生物学研究。E-mail:02402@zjhu.edu.cn

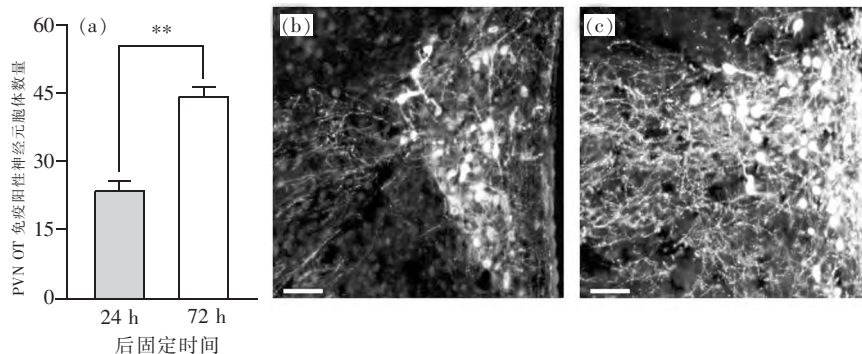
流蠕泵(保定兰格恒流泵有限公司);徕卡 CM1850 冰冻切片机(Leica, Heidelberg, DE, Germany).

1.3 灌流固定

腹腔注射戊巴比妥钠 8 mg/100 g 深麻醉,迅速开胸暴露出心脏,从心尖插入灌注针至升主动脉内,立即剪开右心耳。快速开启蠕泵,先以 $12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度灌注 4°C 生理盐水 5 min,待右心耳流出液体澄清或肝脏颜色变淡,再以 $12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度持续在体灌注 4°C 质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液 5 min,取出脑组织并用质量分数为 4% 的多聚甲醛浸泡后固定,后固定时间分别为 24 h 和 72 h,之后将脑组织置于 4°C 的 30% 蔗糖 PB 溶液进行脱水 2~3 d 至沉底。将脑组织用 OCT 包埋于样品托上进行 $30 \mu\text{m}$ 厚冰冻切片, 4°C 保存。

1.4 免疫荧光染色

在 2 组长爪沙鼠中分别挑选合适脑片于漂片染色装置中, PBS 漂洗 4 次,每次 5 min。用体积分数为 0.3% 的 H_2O_2 室温处理 30 min, PBS 漂洗 4 次,每次 5 min。用体积分数为 10% 的山羊血清封闭液封闭 1 h,在兔抗 OT 抗体(1:500, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA) 4°C 孵育 18 h 后室温孵育 1 h,一抗孵育后,用 0.3% TritonX-100/PBS 漂洗 4 次,每次 5 min,再用 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (1:300, 江苏碧云天生物技术有限公司) 室温孵育 2 h(避光),用 0.3% TritonX-100/PBS 漂洗 4 次,每次 5 min,脑片贴片,待略干后使用防荧光淬灭封片液封片, 4°C 避光保存,在荧光显微镜下观察并拍片。



注:误差线表示标准误,比例尺 = $100 \mu\text{m}$ 。

图1 后固定 24 h 和 72 h 对 PVN OT 免疫阳性神经元胞体数量和形态结构的影响

2.2 OT 免疫阳性神经纤维密度与形态

用非参数 Mann-Whitney U 检验表明,后固定 72 h 组下丘脑前部(AH)中 OT 免疫阳性神经纤维密度显著高于后固定 24 h 组的($z = -2.30, P < 0.05$)(见图 2)。与后固定 24 h 组相比,后固定 72 h 组 OT 神经纤维免疫标记强度更强,且后固定 72 h

1.5 脑区量化

脑区参照 Allen 小鼠脑图谱(<http://atlas.brain-map.org/atlas#atlas=1>),利用荧光显微镜观察,在放大 400 倍条件下量化下丘脑室旁核(PVN) OT 免疫阳性神经元胞体数量以及下丘脑前部(AH)免疫阳性神经纤维密度,并观察比较 2 组不同后固定条件下 OT 神经元胞体和纤维的形态学特征。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析,数据用均值 \pm 标准误表示,符合正态分布数据组间比较采用 t 检验,不符合正态分布则采用非参数检验 Mann-Whitney $U, P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

形态观察和数据分析表明:多聚甲醛后固定 24 h 和 72 h 对 OT 能神经元胞体数量与形态以及纤维密度与形态均具有显著差异。

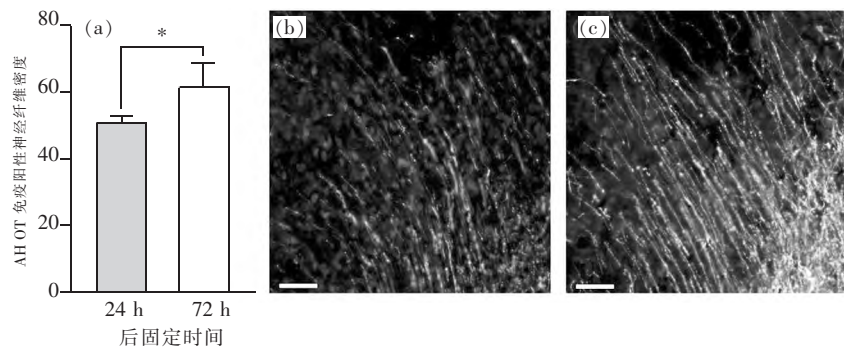
2.1 OT 免疫阳性神经元胞体数量与形态

2 组独立样本 t 检验表明:后固定 72 h 组 PVN OT 免疫阳性神经元胞体数量显著高于后固定 24 h 组的($t = -8.14, P < 0.01$)(见图 1(a))。此外,后固定 72 h 组 PVN OT 神经元胞体分布比后固定 24 h 组的更为密集,境界更为清晰,形态更加完整,并且后固定 72 h 组 OT 神经元核周和突起荧光标记强度显著高于后固定 24 h 组的(见图 1(b)和图 1(c))。

组纤维形态更清晰、更为连续,呈串珠状。

3 讨论

快速灌注固定方法具有省时省力、效率高的优点,为满足取样量大且要求取样时间短的室内和野



注:误差线表示标准误,比例尺 = 100 μm .

图2 后固定24 h和72 h对AH OT免疫阳性神经纤维密度和形态结构的影响

外实验提供了可能,但快速灌注可能会存在因固定作用时间短而影响固定效果,进一步影响组织形态学和抗原检测的问题.本文在以往多聚甲醛在体快速灌注固定的基础上延长后固定时间,探讨后固定24 h和72 h对OT免疫荧光染色效果的影响.

文献[11-12]报道OT主要由PVN和视上核(SON)合成并通过神经末梢经垂体释放到血液,促进乳汁分泌和分娩,PVN OT神经元还可以投射到大脑其他核团以调节生理行为.本文通过观察PVN OT免疫阳性神经元胞体和AH OT免疫阳性神经纤维,发现OT神经元和纤维在这些脑区中的位置分布基本与以往研究结果一致,并且荧光信号强、形态清晰^[13].通过量化PVN OT免疫阳性神经元胞体数量和AH OT免疫阳性神经纤维密度,发现后固定72 h组的OT神经元胞体数量和纤维密度显著高于后固定24 h组的.进一步通过2组间神经元和纤维形态学的观察发现:相比于后固定24 h组,后固定72 h组OT神经元胞体形态更加完整,境界更为清晰,并且神经元核周和突起免疫荧光标记强度更强,纤维更为连续且呈串珠状.这些结果表明:在快速灌注固定的基础上,适当延长后固定时间可获得更好的免疫荧光染色效果.其原因可能与多聚甲醛对组织或细胞的固定原理有关.多聚甲醛通过醛基与碱性蛋白质上的氨基结合形成亚甲桥,从而交联蛋白质形成胶状结构,并且其交联程度与固定时间成正比^[14-15].以往的研究发现多聚甲醛与蛋白质的交联反应发生比较慢^[16],适当延长后固定时间可以减缓组织和细胞的自溶^[9].因此,后固定72 h可能增加了多聚甲醛与溶酶体酶交联反应,减缓了OT能神经元胞体和纤维的自溶.此外,作为一种交联剂,多聚甲醛可使蛋白质分子的氨基之间形成交联网从而使抗原暴露,并且它的作用较为温和,可较好地保存抗原的免疫原性^[17].因此,后固定72 h也可能通过多聚甲醛与OT神经肽间结合形成的交联网使细胞和纤维中的OT抗原表位更好地暴露.

4 结论与展望

良好的固定效果不仅能减少组织细胞的自溶,还能最大程度地保持抗原活性,是确保蛋白检测和形态学观察结果准确性最关键的步骤之一.尤其脑组织的耗氧量很大,代谢速率极快,脑内能源储存有限,缺氧耐受性较其他组织差,蛋白类抗原也更容易发生变性.因此,只有对脑组织进行有效的固定才能获得满意组织标本,为后续免疫组化和荧光等实验奠定良好的基础.本文研究结果表明适当延长后固定时间可明显改善在体快速灌注固定时间不够对免疫荧光染色的影响,减少抗原丢失和获得更佳的胞体和纤维形态结构.也有研究者采用较长时间在体慢速灌注固定的方式来获得固定更加充分的组织.然而,有文献报道过长时间的在体灌注固定不仅费时费液,而且还可能引起多聚甲醛与蛋白质交联程度过高,反而导致较低的抗原阳性检出率^[9-10,18].此外,在组织灌注固定后,需要脱水以去除组织中多余的水分,否则在冰冻时容易形成冰晶,这同样也会影响正常细胞的形态和抗原的检测.质量分数为30%的蔗糖溶液具有较高的渗透压,经它沉底脱水后的组织可有效防止在冷冻时产生冰晶,因此在做冰冻切片时它常被研究者使用.最后,考虑有关在体灌注和后固定时间长度以及比例对抗原免疫性影响的公开报道较少,这需要在将来的研究中进一步探讨.

致谢:感谢湖州师范学院医学院刘婉茹、章志斌和伍爽同学在实验过程中给予的支持和帮助.

5 参考文献

- [1] 黄小雨,刘亚萍,余浩,等.三种小鼠在体灌注方法效果的比较[J].解剖学杂志,2017,40(6):753-754.
- [2] 周磊,范茂丹,史承勇,等.经颈总动脉灌注固定大鼠海马组织30例体会分析[J].医学动物防制,2016,32(8):888-859,946.

- [3] 蔡予琦,吴锦云,吴晓阳,等.小鼠心脏灌流,脑组织解剖与固定[EB/OL]. [2022-06-19]. <https://bio-protocol.org/exchange/protocoldetail?id=1010353&type=1>.
- [4] 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[J].军事医学科学院院刊,2002,26(3):208-209,212.
- [5] 王章敬,李煌元.静脉输液器应用在小鼠体脑组织灌注方法[J].微量元素与健康研究,2014,31(1):9.
- [6] WU Jinyun, CAI Yuqi, WU Xiaoyang, et al. Transcardiac perfusion of the mouse for brain tissue dissection and fixation[J]. Bio-Protocol, 2021, 11(5): e3988.
- [7] 魏小洁.催产素对大鼠切割疼痛痛觉调制的作用及机制[D].长沙:中南大学,2012.
- [8] VINTS K, VANDAEL D, BAATSEN P, et al. Modernization of golgi staining techniques for high-resolution, 3-dimensional imaging of individual neurons[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-14.
- [9] KOUCHMESHKY A, MCCAFFERY P. Use of fixatives for immunohistochemistry and their application for detection of retinoic acid synthesizing enzymes in the central nervous system[J]. Methods in Enzymology, 2020, 637: 119-150.
- [10] SCHMID I, UITTENBOGAART C H, GIORGI J V. A gentle fixation and permeabilization method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification[J]. Cytometry, 1991, 12(3): 279-285.
- [11] ALTHAMMER F, GRINEVICH V. Diversity of oxytocin neurones: beyond mango- and parvocellular cell types? [J]. Journal of Neuroendocrinology, 2018, 30(8): e12549.
- [12] WANG Ping, WANG S C, LIU Xiaoyu, et al. Neural Functions of Hypothalamic Oxytocin and its Regulation[EB/OL]. [2022-06-25]. <https://doi.org/10.1177/17590914221100706>.
- [13] OTERO-GARCIA M, AGUSTIN-PAVON C, LANUZA E, et al. Distribution of oxytocin and co-localization with arginine vasopressin in the brain of mice[J]. Brain Structure and Function, 2016, 221(7): 3445-3473.
- [14] DE MORAES G N, CARVAHO E, MAIA R C, et al. Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 415(2): 203-205.
- [15] TORRES E M, MELDRUM A, KIRIK D, et al. An investigation of the problem of two-layered immunohistochemical staining in paraformaldehyde fixed sections[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2006, 158(1): 64-74.
- [16] KIERNAN J A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde; what they are and what they do[J]. Microscopy Today, 2000, 8(1): 8-13.
- [17] 李冉,杨文理,覃扬,等.不同固定方法对细胞免疫荧光染色结果的影响[J].西部医学,2013,25(11):1608-1610,1615.
- [18] HEWITSON T, WIGG B, BECKER G J. Tissue preparation for histochemistry: fixation, embedding, and antigen retrieval for light microscopy[J]. Methods in Histology Protocols, 2010, 611: 3-18.

The Effect of Different Postfixation Time on Immunofluorescence Staining of Brain Tissue

MOU Qiuyue, CHEN Senyao, HUANG Zhexue, PAN Yongliang*, SHEN Junyuan, SHI Yilei, YE Mengfan

(School of Medicine, Huzhou University, Key Laboratory of Vector Biology and Pathogen Control of Zhejiang Province, Huzhou Zhejiang 313000, China)

Abstract: To explore whether prolonging the post-fixation time can improve the immunofluorescence staining of brain tissue after rapid perfusion fixation in vivo. Male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) are inserted into the perfusion needle through the ascending aorta of the heart, and then rapidly perfused with 4 °C normal saline and 4% paraformaldehyde solution. The brain is decapitated and postfixed in 4% paraformaldehyde solution for 24 h and 72 h respectively. Then 30 μm thick frozen sections are made and immunofluorescence staining is performed to observe and compare the number of OT immunopositive neuronal cells in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, the density of immunopositive nerve fibers in the anterior hypothalamus (AH) and their morphological structure after fixation for 24 h and 72 h. The number of PVN OT immunopositive neuron cell bodies and the density of AH immunopositive fibers in the 72 h postfixation group are higher than those in the 24 h postfixation group. Compared with the 24 h postfixation group, the OT immunopositive neurons in the 72 h postfixation group have more complete cell body morphology, clearer borders, and stronger immunofluorescence labeling intensity around the nucleus and neurites of neurons. Moreover, the morphology of OT immunopositive nerve fibers in the post-fixation group for 72 h is clearer, more continuous and beaded than in the post-fixation group for 24 h. Prolonged post-fixation time after rapid perfusion fixation helps to improve the effect of immunofluorescence staining.

Key words: rapid perfusion; post fixation; oxytocin; immunofluorescence; staining effect

(责任编辑:刘显亮)