

· 基础研究 ·

犬脑组织灌流固定方法的改进

姜润浩, 冷斌, 王斌, 邱凯, 黄新鑫, 刘圣, 祖庆泉*

南京医科大学第一附属医院介入放射科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 本研究对犬经心脏脑组织灌流方法进行改进, 以提高固定效果。方法: 7只比格犬随机分为3组: 对照组1只, 经心脏灌流法3只, 改进灌流法3只。使用改进灌流法的实验犬在麻醉后行全身肝素化, 穿刺股动脉后, 在透视引导下经股动脉将导管插至一侧颈内动脉作为流入道, 开放右心耳作为流出道, 并结扎下腔静脉及腹主动脉, 先灌注生理盐水, 后灌注4%多聚甲醛。灌注结束后取出脑组织进行HE染色与电镜观察。结果: 相比传统经心脏灌流法, 改进灌流法的脑组织细胞自溶现象明显减少, 且更加省液、省时。结论: 改进后的灌流方法提高了犬脑组织固定效果, 是一种可行有效的大动物脑组织灌流固定方法。

[关键词] 犬; 灌流固定; 脑组织; 介入放射

[中图分类号] R361.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)06-821-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20200609

An improved perfusion technique for fixation of canine brain

JIANG Runhao, LENG Bin, WANG Bin, QIU Kai, HUANG Xinxin, LIU Sheng, ZU Qingquan*

Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to modify the transcatheter perfusion method to improve the effects of brain fixation in canines. **Methods:** Seven beagle dogs were randomly divided into three groups: control group ($n=1$), transcatheter perfusion group ($n=3$), and improved perfusion group ($n=3$). Canines in the improved perfusion group were anaesthetized and heparin was administered. The femoral artery access was achieved, then a catheter was inserted into internal carotid artery under fluoroscopic guidance and constituted the inflow, and the right auricle was opened to act as an outflow access. After the ligation of inferior vena cava and abdominal aorta, the brains were perfused with saline followed by paraformaldehyde. Once the perfusion was accomplished, the brains were harvested for HE staining and transmission electron microscopy. **Results:** Compared with the transcatheter perfusion method, the improved perfusion method can significantly reduce the occurrence of cell autolysis, and it is liquid-saving and time-saving. **Conclusion:** The improved perfusion method is more effective than transcatheter perfusion in canine brain tissue fixation, and it is feasible for brain fixation in large animals.

[Key words] canines; fixation perfusion; brain; interventional radiology

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(06): 821-825]

当机体死亡后, 缺氧和二氧化碳蓄积会造成不可逆的细胞结构破坏。固定可以最大程度地将组织结构保持于类似活体的状态, 减少细胞自溶和蛋白抗原丢失, 良好的组织固定也是进行病理学、免

[基金项目] 国家自然科学基金(81501565, 81571777, 81771794)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: njmu_zqq@163.com

疫组化等实验研究的前提。鼠等小动物是目前最常用的实验模式动物之一, 相关的固定方法已经发展得非常成熟^[1-4]。但对于犬、猪等大型实验动物而言, 由于所需灌流液较多, 操作难度较大等问题, 虽然诸多学者进行过尝试, 但仍没有理想的灌注固定方法^[5-9]。鉴于大动物实验研究日益增多, 探索合适的大动物固定方法具有重要意义。

前期本研究团队对犬行经心脏全身灌注获得了较好的脑组织固定效果^[10],能够满足大体病理观察及离体磁共振的研究需求,但在进行透射电镜观察时,仍有较严重的细胞自溶现象。结合介入放射技术,本研究在此灌注方法的基础上进行了一些改进,现将相关方法报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

比格犬7只,体重11.5~14.5 kg,雄性[扬州仪征安利卵生物科技有限公司,许可证号:SCXK(苏)2016-0005]。

外科手术器械,5F穿刺针及血管鞘套件、超滑导丝、5F单弯导管(泰尔茂公司,日本),灌注泵(JG100,四川科仪诚科技有限公司),数字减影血管造影X线机(DSA)(Polyt ron1000,西门子公司,德国),病理切片机(Leica RM 2016,Leica公司,德国),光学显微镜(BX53,奥林巴斯公司,日本),超薄切片机(Power Tome XL,RMC公司,美国),透射电镜(Tecnaï G2 Spirit,FEI公司,美国)等。

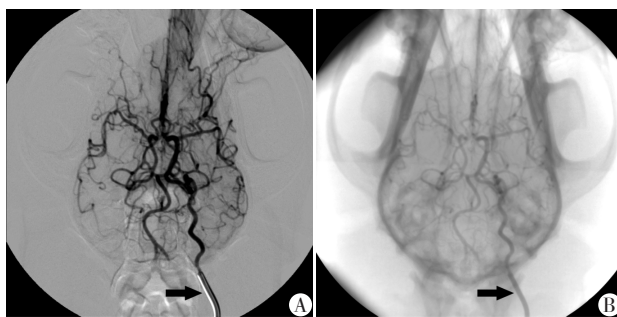
0.9%氯化钠注射液、肝素钠、4%多聚甲醛、4%戊二醛、戊巴比妥钠(北京华业寰宇化工有限公司),欧乃派克造影剂(上海通用电气药业有限公司),苏木素(Sigma公司,美国),芬太尼(北京国药集团)。

1.2 方法

1.2.1 脑组织灌注固定

实验犬随机分为3组:对照组1只,传统经心脏灌注3只(传统法灌注组),改进法灌注3只(改进法灌注组)。其中,对照组不进行灌注固定,仅用于大脑外观形态的对照研究。实验前5 d实验犬进入动物房,适应性饲养,饮食饮水不限。操作前12 h禁食,4 h禁水。所有相关实验操作均遵循美国国立卫生研究院发布的实验室动物使用指南,符合医学伦理学标准。按20~30 mg/kg剂量肌肉注射戊巴比妥钠进行麻醉,按0.03 mg/kg剂量肌肉注射芬太尼用于镇痛。取仰卧位,将实验犬四肢和头部固定于操作台,将犬舌拉出,湿纱布包裹防止窒息。予血压测量,双侧腹股沟区域备皮,消毒铺巾后,分别穿刺股动脉和股静脉,置入5 F血管鞘,建立动脉、静脉通路。经静脉通路推注470 U/kg肝素钠,经动脉血管鞘引入5 F单弯导管,在DSA的引导下插管至颈内动脉上升段后妥善固定,用作流入道(图1)。随后将动物转移至解剖室,打开胸腔腹腔,分离下腔静脉、腹主动脉并挂线,右心耳插入聚乙烯管,用作灌注液流出

道。静脉注射过量戊巴比妥钠进行安乐死。夹闭下腔静脉,结扎腹主动脉。打开灌注泵,设定压力为100 mmHg,排气后通过股动脉留置的导管进行灌注,并计时,先灌注37℃生理盐水,至流出液变清亮后,开始灌注4℃的4%多聚甲醛。灌注完成后,取出脑组织置于4%多聚甲醛中,用于下一步实验。



A:数字减影图片;B:未减影图片。黑色箭头示导管。

图1 导管插至颈内动脉行脑血管造影

Figure 1 The catheter was inserted into the internal carotid artery for cerebrovascular angiography

1.2.2 HE染色

HE染色的操作方法按照Liu等^[11]报道进行,操作步骤简述如下。乙醇梯度脱水,二甲苯组织透明;组织浸入石蜡包埋,使用病理切片机切厚度为5 μm的薄片,将切片附在载玻片上,于60℃烘箱烤3 h;切片脱蜡,浸入苏木素染液染色8 min,水洗3 min返蓝,浸入1%的盐酸乙醇分化10 s,水洗3 min返蓝。乙醇脱水后,树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.3 透射电镜

透射电镜的操作方法按照Cai等^[12]报道进行,操作步骤简述如下。用预冷的剪刀剪下一小块组织,用手术刀修整为大小约1 mm³的组织团块,置入4%戊二醛中固定24 h,1%四氧化二锇中固定2 h。乙醇梯度脱水,环氧丙烷渗透,环氧树脂60℃包埋36 h。用超薄切片机进行切片,0.5%的醋酸铀酰和3%的柠檬酸铅染色,透射电镜观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用SPSS24.0软件进行统计学分析,所有统计数值表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灌注前后脑组织肉眼观察

未进行灌注的脑组织质地柔软,脑组织切片大体观察可见脑沟回处血迹,大脑灰质呈暗红色(图2A)。进行脑组织灌注固定之后,脑组织质地明显变

硬,未见血迹残留,大脑灰质呈淡黄色,白质呈灰白色,两种灌注方法大体观察无明显差异(图2B、C)。

2.2 两种灌注方法耗时和耗液量的比较

两组实验犬的血压、灌注时间及灌注液用量等信息如表1所示。实验结果显示,使用改进法进行脑组织灌注,所需时间约18 min,所需灌注液总量约

为4 733 mL,相较于经心脏全身灌注,灌注时间明显缩短,灌注液的用量也明显减少,差异具有统计学意义。

2.3 两种灌注方法HE染色结果的比较

光学显微镜下观察HE染色结果:传统法灌注组,组织结构清晰,对比度较好,着色均匀,偶见少

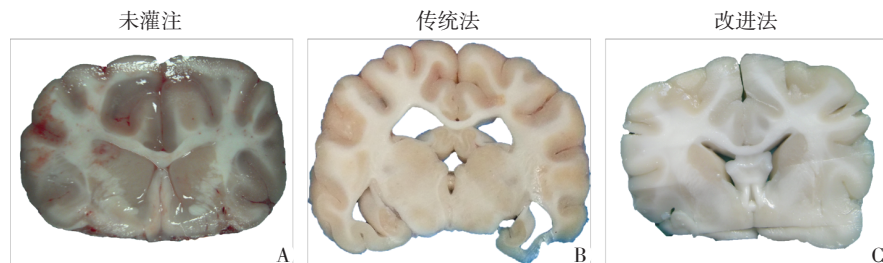


图2 各组脑组织肉眼观察结果
A:对照组犬脑组织切片,脑沟回处可见血迹,大脑灰质呈暗红色;B、C:传统法(B)和改进法(C)灌注后脑组织切片,未见血迹残留,脑组织呈灰白色。

Figure 2 Observation results of brain tissues in each group

表1 传统法灌注组与改进法灌注组的耗时量与耗液量
Table 1 Time-consuming and liquid-consuming of traditional method and modified method ($\bar{x} \pm s$)

指标	传统法灌注组 (n=3)	改进法灌注组 (n=3)
体重(kg)	12.67 ± 1.31	12.5 ± 0.82
平均动脉压(mmHg)	99.67 ± 4.99	97.67 ± 5.67
灌注时间(min)	121.00 ± 4.50	18.00 ± 1.63*
生理盐水灌注液(mL)	9 000.00 ± 408.25	2 900.00 ± 294.39*
多聚甲醛灌注液(mL)	3 666.67 ± 235.70	1 833.33 ± 235.70*

*与传统法灌注组比较, $P < 0.05$ 。

量细胞自溶(图3A、C)。改进法灌注组,组织结构清晰可辨,核质对比度好,色彩鲜艳(图3B、D)。两种灌注固定方法HE染色结果并无明显差异,血管形态均保持较好,无明显受压变形,血管腔内无红细胞残留。

2.4 两种灌注方法电镜结果的比较

透射电镜观察血管超微结构,进一步评价两种灌注固定方法的效果。传统法灌注组,细胞出现了较明显的自溶,组织水肿导致血管腔部分受压变形,细胞形态难以辨认(图4A、C)。改进法灌注组,血管形态保持较好,血管周围的细胞也得到了较好的灌注固定,细胞结构可辨(图4B、D)。

3 讨论

相较于鼠等无脑回动物,比格犬等大动物的脑组织、脑血管解剖结构与人体更为接近,体型也与

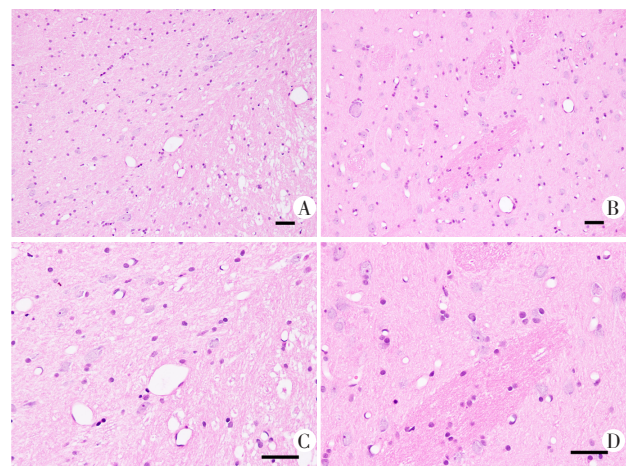
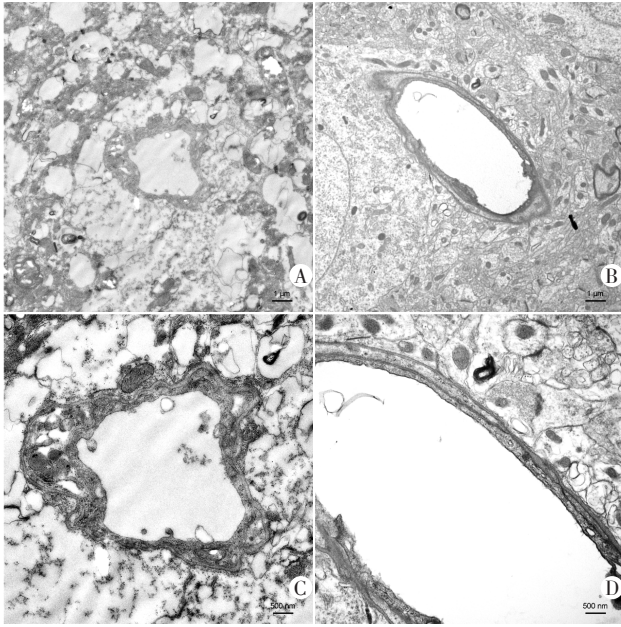


图3 脑组织石蜡切片HE染色结果
A、C:传统法灌注组;B、D:改进法灌注组。标尺=100 μm。

Figure 3 HE staining of brain paraffin sections

临床常用的仪器设备更为匹配,基于大动物的实验成果也更易实现临床转化,所以大动物在临床前研究中具有重要价值^[13-14]。良好的固定可以使细胞内蛋白质迅速变性、保持其抗原性,并抑制细胞内酶的活性,防止细胞自溶,也是诸多实验实施的前提。但截至目前,仍缺乏理想的大动物固定方法。

本课题组对犬脑组织固定方法进行了一些探索。浸泡固定是经典的固定方法,但是其适用范围有限,主要用于体积较小、供血较少的组织,例如外周神经等^[15]。而犬脑组织体积较大且供血丰富,如使用浸泡法,核心部分的组织将无法得到有效固定,所以经血管灌注固定更为合理。前期模拟鼠经



A、C:传统法灌注组;B、D:改进法灌注组。A、B标尺=1 μm;C、D标尺=500 nm。

图4 脑组织透射电镜观察结果

Figure 4 TEM observation results of brain tissues

心脏全身灌注方法,穿刺左心室作为流入道,开放右心耳作为流出道,通过输液器进行灌注,取得了较好的脑组织固定效果,可以满足离体磁共振和病理观察的研究需求。但在进行电镜观察时,仍发现了较明显的自溶现象。电镜样本的制备要求很高,需要在尽可能短的时间内对组织进行固定并取材,细胞自溶可能是大动物全身灌流液体量大、灌流时间过长导致的。

因此,本研究对原先的灌注方法进行了一些改进以提高脑组织的固定效果。比格犬的颈总动脉在背外侧与迷走神经相伴行,且颈内动脉开口位置较高,约在寰椎水平,外科手术剥离相对困难。与外科手术分选颈内动脉相比,血管介入技术作为微创医学技术的代表之一,除进行血管穿刺以外,无需其他侵入性操作,如肌肉切开和血管神经剥离等,能够避免血管神经损伤,创伤更小,操作也更便捷。本研究运用介入放射技术通过导管超选靶血管,并结扎不必要的动静脉,对脑组织进行选择性灌注。

鉴于许多基于比格犬等大动物的脑血管相关实验研究都需要对一侧的颈总动脉、颈内动脉或大脑中动脉进行一些操作,例如损伤血管内皮制备血管狭窄模型,注射血栓、放置金属弹簧圈或保留导管制备血管闭塞模型,机械血栓清除等^[16-19]。对于

上述这些动物模型进行灌注取材时,往往仅有操作对侧的颈动脉系统血管条件较为正常,可供灌注使用。因此,在DSA的引导下,将导管超选至一侧颈内动脉作为流入道,右心耳置管作为流出道,同时结扎下腔静脉与腹主动脉,以避免灌流液流入腹部和下肢。此外,测量了犬股动脉血压,并用灌流泵替代输液器进行灌流,因为灌流时压力的控制非常重要^[4]。压力过大会导致微血管过度扩张,影响实验结果;压力过小会导致灌流不彻底,同样会引起细胞自溶。灌流泵可以设定不同压力来模拟生理情况下的血压,可以最大程度地避免人为因素对实验结果的干扰。本方法在操作过程中有一些问题需要加以注意:首先要对实验犬进行全身肝素化,以便充分地血液灌注;导管超选到位后需要妥善固定,防止导管头端脱出;操作前需要对导管、穿刺针、灌流泵等进行排气,防止气体栓塞影响实验结果;结扎腹主动脉时打结不能过紧,以防影响导管通畅性,可以用注射器抽吸判断导管的通畅情况。

本研究通过对比灌流时间、HE染色、电镜观察来评价灌流固定的效果。结果显示,相较于传统经心脏灌流固定法,改进后的灌流方法可以节约灌流液的用量和灌流时间,因此减少了实验人员与有毒固定液的接触时间,且电镜观察到的细胞自溶明显减少,固定效果明显提高。

同时,本研究也存在一些局限性:①研究的样本数量较少,每个灌流组仅3只实验犬。②仅对脑组织进行了选择性灌流,对多脏器有灌流固定需求的实验,如药物全身毒性研究等,本方法并不适宜。③实验成本较高,相较于输液器或者注射灌流固定,本方法所需要的仪器设备较多,价格昂贵,犬颈内动脉造影必须在大型DSA平台上操作,常规实验室并不配备该仪器,难以实现大范围推广。但对于一些重要的实验样本,通过租借的方式使用本方法进行灌流仍有必要。④本研究中选择的固定液为4%多聚甲醛,并未对不同固定液的固定效果进行探讨,主要是因为免疫组化等实验通常以4%多聚甲醛作为首选固定液。如样本仅用于电镜观察,也可选择戊二醛或者多聚甲醛+戊二醛混合液进行灌流,会更有利于超微结构的固定。也有文献报道,由于冰醋酸可以导致组织膨胀,能抵消多聚甲醛对组织的收缩作用,在多聚甲醛中加入一定量的冰醋酸作为灌流液,会获得更好的灌流固定效果^[20]。各研究者应根据不同的实验需求,合理地选择固定液。

综上所述,本研究证明了经一侧颈内动脉超选

择性脑组织灌注,同时结扎腹主动脉、下腔静脉可以取得良好的脑组织固定效果,相较于传统的经心脏灌注固定更加省时、省液且效果更好,今后该靶向灌注的思路也可在其他一些脏器灌注中进行尝试。

[参考文献]

- [1] 卢文朋,栗世方. 大鼠脑组织灌注固定方法的改进[J]. 医学研究生学报,2014,27(6):627-629
- [2] 姚斌伟,高亚兵,董 霁,等. 脑组织灌注固定脱水后去除冰晶方法的建立及其在微波辐射致脑损伤中的应用[J]. 军事医学科学院院刊,2011,35(5):394-396
- [3] 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
- [4] GAGE G J, KIPKE D R, SHAIN W. Whole animal perfusion fixation for rodents[J]. J Vis Exp,2012,30(65):1-9
- [5] SANTORENEOS S. A technique for *in vivo* vascular perfusion fixation of the sheep central nervous system [J]. J Neurosci Methods,1998,79(2):195-199
- [6] TRACHSELS,PURKABIRI K,LOUP O,et al. High-quality lung fixation by controlled closed loop perfusion for stereological analysis in a large animal model [J]. J Surg Res,2011,166(2):97-102
- [7] MANGER P R. Acquisition of brains from the African elephant(*Loxodonta Africana*):perfusion-fixation and dissection[J]. J Neurosci Methods,2009,179(1):16-21
- [8] GU M Z, DE V S, SCIoT R, et al. Brain perfusion fixation in male pigs using a safer closed system [J]. Lab Anim, 2018,52(4):413-417
- [9] SMOLICH J J, CANALE E, CAMPBELL G R, et al. An improved perfusion technique for fixation of sheep myocardium[J]. Anat Rec,1984,208(4):607-611
- [10] 许晓泉,刘 圣,祖庆泉,等. 在体脑灌注技术在犬脑梗死实验研究中的应用[J]. 江苏医药,2011,37(20):2357-2359
- [11] LIU H, ZHU R, LIU C, et al. Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9050754
- [12] CAI Y Y, LIU X F, CHEN W X, et al. TGF-beta 1 prevents blood-brain barrier damage and hemorrhagic transformation after thrombolysis in rats [J]. Exp Neurol, 2015,266:120-126
- [13] 刘曼菱,赵丽华,张曼玲,等. 胎猪肾脏发育不同时期相关信号分子的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(6):822-828
- [14] 李 楚,任雪洋,李 琳,等. GGTA1/ β 4GalNT2双基因敲除近交系五指山小型猪的建立[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(6):835-840
- [15] KASUKURTHI R, BRENNER M J, MOORE A M, et al. Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration [J]. J Neurosci Methods,2009,184(2):303-309
- [16] RINK C, CHRISTOFORIDIS G, ABDULJALIL A, et al. Minimally invasive neuroradiologic model of preclinical transient middle cerebral artery occlusion in canines [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(37):14100-14105
- [17] 黄惠英,郑 辉,杨 树,等. 建立比格犬颈动脉粥样硬化狭窄模型[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2016,10(7):54-55
- [18] ZU Q Q, LIU S, XU X Q, et al. An endovascular canine stroke model: middle cerebral artery occlusion with autologous clots followed by ipsilateral internal carotid artery blockade [J]. Lab Invest, 2013,93(7):760-767
- [19] BROOKS O W, KING R M, NOSSEK E, et al. A canine model of mechanical thrombectomy in stroke [J]. J Neurointerv Surg, 2019, 11(12):1243-1248
- [20] 李晶晶,朱 鸿,施彩虹. 三种方法对大鼠视网膜固定效果的比较研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2011,31(8):1105-1107

[收稿日期] 2019-07-08