

视网膜石蜡切片法改进及其分子结构与 PMI 关系的研究

栗志,王浩,刘索新,刘慧莹,谭瑞义,盖菁菁,鞠学红

基金项目:中国山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2010HLO43);中国潍坊市科技局立项课题资助项目(No. 200902072)

作者单位:(261053)中国山东省潍坊市,潍坊医学院解剖学教研室

作者简介:栗志,男,硕士,研究方向:神经解剖学。

通讯作者:鞠学红,男,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经解剖学. juxh@wfmc.edu.cn

收稿日期:2011-11-29 修回日期:2012-02-13

Study of the relationship between retinal molecular structure and time of death by improved paraffin section

Zhi Li, Hao Wang, Suo-Xin Liu, Hui-Ying Liu, Rui-Yi Tan, Jing-Jing Gai, Xue-Hong Ju

Foundation items: Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. ZR2010HLO43); Science and Technology Planing Project of Weifang City, China(No. 200902072)

Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China

Correspondence to: Xue-Hong Ju. Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China. juxh@wfmc.edu.cn

Received:2011-11-29 Accepted:2012-02-13

Abstract

• **AIM:** To search for a new better method of making paraffin section in the rat retina, and to explore the relationship between the expression of apoptosis protein Bax and the time of death in retinal cells.

• **METHODS:** According to different time of the death, Wistar rats were randomly divided into 4 groups (group A, 0 hour; group B, 12 hours; group C, 24 hours; group D, 36 hours). After using the new fixative method for rats retina, each group was respectively observed and analyzed by the HE, immunohistochemistry and immunofluorescence; then processed by image analysis and statistical treatment.

• **RESULTS:** Each group of retinal tissue was essentially integrated, the cells form distinct; Each retinal layer became raritas and exhibited pyknosis gradually as time prolonging; the results of variance of immunohistochemistry and immunofluorescence indicated that the expression of Bax in groupA, groupB, groupC rat retinal cells tended to increase with time, but group D reduced; there was a

significant difference between any two groups by analysis of variance ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The new improved method of making paraffin section is better comparatively, possesses of popularization and application value. The expression of apoptosis protein Bax in retinal cells has correlation with postmortem interval (PMI), which provides scientific base for the clinical application of it.

• **KEYWORDS:** retina; paraffin section; apoptosis; Bax; forensic medicine; postmortem interval

Li Z, Wang H, Liu SX, *et al.* Study of the relationship between retinal molecular structure and time of death by improved paraffin section. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(4):618-621

摘要

目的:寻找一种更好的制作视网膜石蜡切片方法,探讨不同时间点视网膜层细胞凋亡蛋白 Bax 表达含量变化与死亡时间的关系。

方法:将 Wistar 大鼠按死后 0, 12, 24, 36h 随机分为 A, B, C, D 四组,各组的眼球标本应用本研究新型改进方法制作石蜡切片后,分别做 HE、免疫组织化学、荧光染色;进行图像分析与统计学处理。

结果:采用改进的石蜡切片制作方法,HE 染色显示死后 0h 各组视网膜组织结构和层次均基本保持完整,细胞形态清晰;随着时间的延长,视网膜各层逐渐发生紊乱并出现核固缩。免疫组织化学、免疫荧光染色结果均显示随着死亡时间的延长,A、B、C 三组 Bax 表达含量依次增多,D 组下降。两两比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论:改进的石蜡视网膜组织切片制作方法较好,值得推广。Wistar 大鼠死后不同时间视网膜层细胞凋亡蛋白 Bax 表达与死亡时间具有相关性,为法医进一步推断死亡时间的研究奠定了基础。

关键词:视网膜;石蜡切片;凋亡;Bax;法医学;死亡时间

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.04.06

栗志,王浩,刘索新,等. 视网膜石蜡切片法改进及其分子结构与 PMI 关系的研究. 国际眼科杂志 2012;12(4):618-621

0 引言

法医学意义上的死亡时间(estimation of the time since death, PMI)是指从死亡发生到法医进行尸体检验时所经过的时间,又称死后经过时间,通常描述为死后多少天或多少小时。既往对 PMI 的研究,多侧重于对尸体现象等方面的宏观指标的观察和测量,受外界因素影响较大,而

且易受观察者的主观经验影响,只能对 PMI 的范围进行粗略推测,结果差异较大。精确、可靠的 PMI 推断一直是法医病理学研究的重点和难点之一。针对上述问题,本研究结合眼球的解剖特点、以往的文献报道^[1-2]及法医病理实践,选取视网膜作为研究对象,探讨视网膜细胞凋亡蛋白 Bax 表达及其与死亡时间的关系,为临床法医精确推断死亡时间的研究提供基础。但视网膜切片制作难度大,本研究通过对视网膜石蜡切片的研究,比较了几种不同固定方法对视网膜的固定效果并加以改进,总结出一种较好的制作视网膜组织切片的方法。现将我们的切片制作方法及推断死亡时间实验分析介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料

成年 Wistar 大鼠 80 只,体质量 260 ~ 300g,购自山东大学医学院实验动物中心,随机分为 A(死后 0h)、B(12h)、C(24h)、D(36h) 四组,每组 20 只。主要仪器:KD-BM 生物组织包埋机(浙江科迪仪器设备有限公司);Leica RM 2235 切片机(德国 Leica 公司)。药品与试剂:DAB 显色试剂盒、PV-9001 试剂盒、BSA 血清封闭液、抗体稀释液、TRITC 标记山羊抗兔 IgG 和 GVA 水溶性封片剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗鼠 Bax 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。中性甲醛液(配方:40% 甲醛 120mL,蒸馏水 880mL,NaH₂PO₄·H₂O 4g,Na₂HPO₄ 13g,pH = 7.2);FAA 固定液(配方:950mL/L 乙醇 85mL;10% 中性甲醛 10mL,冰醋酸 5mL)。

1.2 方法

将 A、B、C、D 四组大鼠脱颈处死,用剪刀分离大鼠眼周围软组织,眼科弯镊从角膜巩膜缘游离球结膜,分离球后组织,将视神经切断取出眼球,并用 7 号注射器针头在角巩膜缘左右对称刺两小孔,快速置入 FAA 固定液中 5 ~ 10min,随即置入中性甲醛液固定 24h。将固定好的眼球放入丙酮 I,2 ~ 5min 后取出在手术显微镜下去除角膜、虹膜、晶状体等进行修剪,同时取颞侧视网膜,然后再将修剪好的组织放入丙酮 II,2 ~ 5min。苯透明 10 ~ 15min。浸蜡 15 ~ 30min,水平切面朝向包埋盒底,58 ~ 60℃ 硬蜡包埋,蜡块冷却后,室温保存待切。用 Leica RM 2235 轮转式切片机切片,厚 4μm,40 ~ 46℃ 水浴、展片,60℃ 烤箱 3h 以上,常规石蜡切片脱蜡至水。

1.2.1 HE 染色检测视网膜组织形态变化

(1) 苏木素染色 5 ~ 10min。(2) 普通水洗。(3) 1mL/L 盐酸乙醇分化 10 ~ 30s。(4) 普通水洗。(5) 1% 氨水返蓝 8 ~ 10s。(6) 自来水洗 5 ~ 10min。(7) 伊红染色 1min。(8) 常规脱水透明中性树胶封片。(9) 显微镜下观察。

1.2.2 免疫组织化学检测视网膜内 Bax 蛋白

(1) 抗原修复 10 ~ 15min。(2) 30mL/L H₂O₂ 孵育 20min。PBS 2min × 3 次。(3) 滴加 Bax 一抗,4℃ 冰箱过夜。(4) PBS 冲洗 2min × 3 次,滴加试剂 1,37℃ 孵育 20min。(5) PBS 冲洗 2min × 3 次,滴加试剂 2 孵育 20min。(6) DAB 染色 1 ~ 2min。(7) 苏木素复染。(8) 常规脱水透明,中性树胶封片。(9) 显微镜下观察。

1.2.3 免疫荧光染色检测视网膜内 Bax 蛋白

(1) 抗原修复 10 ~ 15min。(2) 0.01mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液洗涤后,50mL/L BSA 血清 37℃,封闭 1h。(3) 加入 Bax 一

抗,4℃ 冰箱过夜。(4) 用 0.01mol/L PBS 冲洗,10min × 3 次。(5) 滴加 TRITC 标记的山羊抗兔 IgG。(6) 避光洗涤:避光条件下 37℃ 孵育 60min,0.01mol/L PBS 缓冲液冲洗,连续 3 次,每次 10min。(7) 擦干组织切片周边液体,滴加甘油缓冲液封片。(8) 正置荧光显微镜下观察。采用图像分析软件 IPP6.0 测量各组 Bax 阳性表达平均光密度。

统计学分析:SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,对同一实验组不同时间点数据进行方差齐性检验后,行单因素方差分析及两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织形态学变化

按此改进方法组织切片平整,层次清楚,无皱褶现象,组织连接牢固,颜色均匀,结构清晰。死后视网膜随着时间的延长逐渐发生紊乱,死后 12h 各层间隙缩小,外核层细胞、神经节细胞出现核固缩,24h 各层细胞排列开始溶解疏松,间隙变大,外核层细胞、神经节细胞开始溶解,36h 内、外核及外网层次结构严重紊乱,趋于模糊,视杆细胞溶解(图 1)。

2.2 视网膜内 Bax 蛋白表达

死后 0h 视网膜内、外核层及内、外网层细胞均开始出现少量 Bax 凋亡蛋白表达,细胞浆呈棕黄色。12h 表达持续增多,24h 阳性表达达到高峰,36h 降低。内网层放射胶质细胞(如图 2 箭头方向) Bax 凋亡蛋白持续表达较恒定。测量各组内网层 Bax 阳性表达平均光密度值,分别为 10.02 ± 4.02 , 20.34 ± 4.80 , 32.56 ± 7.90 , 22.34 ± 3.61 ,两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 视网膜内 Bax 蛋白免疫荧光变化

死后 0h 视网膜内、外核层及内、外网层细胞均开始少量表达 Bax 凋亡蛋白,细胞浆呈绿色,12h 表达增多,荧光镜下放射胶质细胞呈圆盘状(如图 3 箭头方向),视杆细胞犹如绿色圆柱状。24h 阳性表达遍布视野,达到高峰。36h 阳性表达有所降低。内网层放射胶质细胞(如图 3 箭头方向) Bax 凋亡蛋白持续表达较恒定,测量各组内网层 Bax 阳性表达平均光密度值,分别为 30.33 ± 3.36 , 58.07 ± 1.05 , 92.23 ± 2.34 , 56.39 ± 2.30 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 视网膜石蜡组织切片的制备

视网膜石蜡组织切片是研究视网膜组织形态结构的一项技术,在法医学、眼科学、病理学等教学科研方面起着举足轻重的作用。良好的视网膜切片能够为其提供可靠的依据基础。由于视网膜结构精细、复杂,各层结构体积不一,软硬程度不同,连接性较差,液体不易渗透,因此制作组织切片难度较大。采用此改进的新型切片制作方法有助于突破这一难题,但需注意以下几点:(1) 先用 FAA 固定液 5 ~ 10min 初步固定,再放入中性甲醛液固定 24h。原理是 FAA 固定液其成分冰醋酸对组织穿透性强,使固定液快速进入眼球内部,使内外渗透压平衡,从而防止视网膜脱离的发生。中性甲醛固定液比较温和,以更好地保存组织中的抗原,有利于免疫组织化学和免疫荧光的染色。(2) 在脱水至丙酮 I 时去除角膜、虹膜和晶状体,可使以后的脱水、透明和浸蜡更彻底,

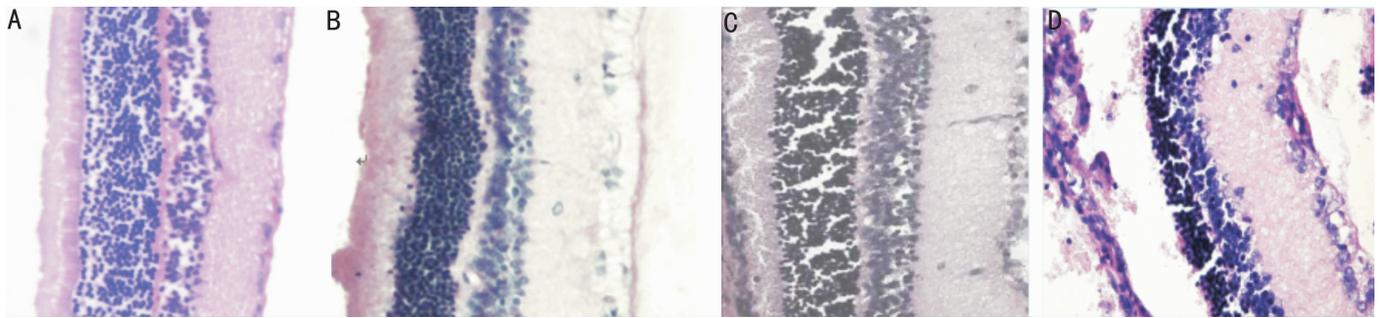


图1 各组视网膜形态结构(HE×400) A: 0h;B: 12h;C: 24h;D: 36h。

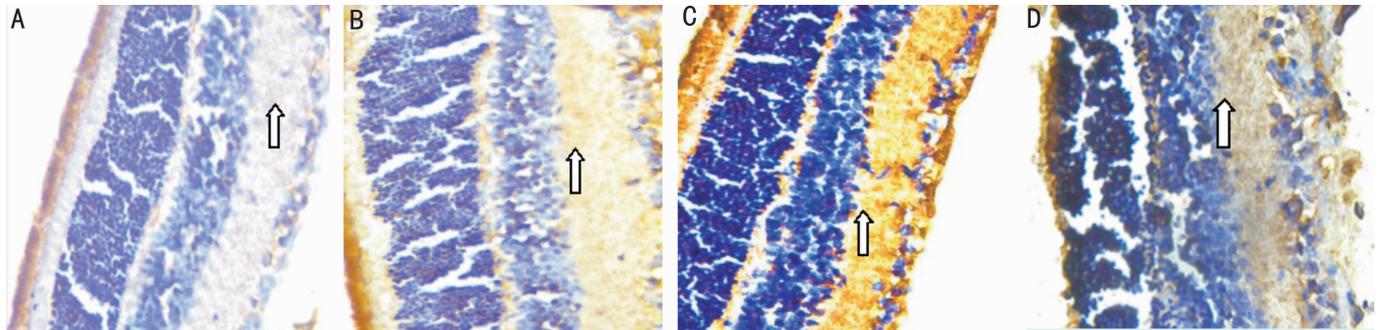


图2 各组视网膜中 Bax 的表达(IHC×400) A: 0h;B: 12h;C: 24h;D: 36h。

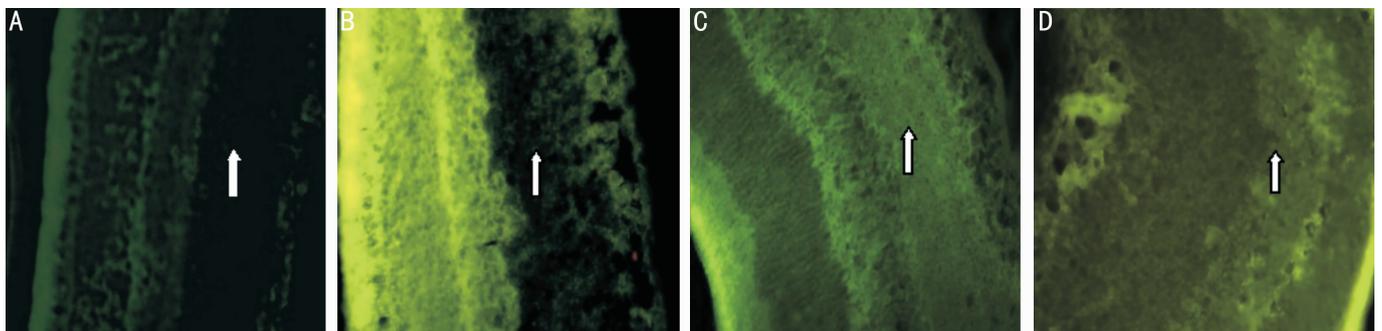


图3 各组视网膜内 Bax 免疫荧光的变华(FI×400) A: 0h;B: 12h;C: 24h;D: 36h。

去除坚硬的晶状体后,更容易得到完整的视网膜切片。(3)严格掌握丙酮脱水时间。一般认为丙酮对组织收缩作用大,但本研究发现丙酮脱水时间快速,不易使视网膜破裂,使视网膜连接牢固、切片完整。(4)为避免眼球受损和凹陷,应选新针头为好,以保证迅速刺破眼球壁。目的是调节点内外压,避免视网膜脱落。(5)操作时要戴口罩,防止苯中毒。(6)切片刀要锋利,最好选用一次性新刀片。

本实验在视网膜切片制作过程中首次应用了 FAA 固定液与中性甲醛固定液,首次应用丙酮与苯进行脱水透明,快速省时,且切片完整,质量较高,各层结构清楚,远优于传统的乙醇脱水二甲苯透明方法,尤其适用于快速法医病理诊断,且可用于组织块太小或太碎、无法使用冰冻切片方法制片时,是制作视网膜切片的较好方法。

3.2 死亡时间与 Bax 凋亡蛋白 死亡时间推断在法医学刑事案件的侦察工作中具有举足轻重、不可替代的作用,为此人们已经历了数个世纪的研究,不断探求新方法、新技术,分别从不同角度寻找最优出路。由于环境温度、检测方法、主观经验等因素不同,其结果差异较大。因此,到目前为止,尚无一种公认的简易实用、准确可靠的方法。利用 DNA 和 mRNA 降解推断死亡时间曾成为研究的热

点,有学者从大鼠视网膜细胞 mRNA 水平进行研究,死后随着时间的延长而逐渐降解,有着类似的降解规律。但有研究认为 mRNA 代谢活跃,易于降解,其稳定性不如蛋白质,不适于作为 PMI 推断的指标。Bax 是一种 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白^[3-6],一般出现在胞浆中,并作为一种细胞损伤和刺激的传感器。一般来说,在胞浆中的 Bax 以单体形式存在,然而在细胞发生凋亡时,与线粒体关联的 Bax 既可能以无活性的单体形式存在,也可能以与线粒体膜结合的大分子量的活性复合物形式存在。鉴于此,本研究从视网膜凋亡蛋白分子角度进行不同时间点视网膜层细胞凋亡蛋白 Bax 表达含量变化与死亡时间的关系的探讨。本研究表明:随着时间的延长,视网膜内、外核层逐渐发生紊乱并出现核固缩。死后 0h,在外核层出现少量 Bax 阳性细胞;死后 12h,内核层出现大量的阳性凋亡细胞;死后 24h,内核层阳性表达高峰。随着时间的延长,Wistar 大鼠死后 0~24h 内不同时间视网膜层细胞凋亡蛋白 Bax 表达含量逐渐增加,特别是内网层放射胶质细胞持续表达稳定,且与 PMI 的线性关系较好,有望可作为 PMI 推断的一种新的基础研究方法。

此外,随着分子生物学、图像分析、免疫组织化学及荧光技术的日益发展,利用视网膜组织推断 PMI 已成为法

医病理学研究的热点,但目前的研究大多数处于实验室阶段^[7-13],且不同研究对象和手段各具其优缺点,得出的数据也有一定差异。免疫组织化学及荧光具有很高的灵敏性,且操作简便,但受影响因素较多。因此,进一步研究发现与PMI高度相关而又不易受到外界环境变化影响的参数指标是法医病理学工作者的重要课题。相信随着研究技术的不断改进,推断PMI的方法一定会得到完善。

参考文献

- 1 Margo CE, Lee A. Fixation of whole eyes: the role of fixative osmolarity in the production of tissue artifact. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233(6): 366-370
- 2 程钧,万磊,刘廷,等. 小鼠视网膜组织石蜡切片制作方法的探讨. *眼科新进展* 2009;29(3):161-164
- 3 Yang LJ, Wang WL. Establishment of the hepatoma cells which express Bax protein stably and highly and observation of its apoptotic phenomena. *Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)* 2002; 23(5): 455-458
- 4 Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ, et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74(4):609-619
- 5 Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994;145(6): 1323-1336

- 6 Willms GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic control on cell death. *Cell* 1993;74(5):777-779
- 7 Inoue H, Kimura A, Tuji T. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci Int* 2002; 130(2-3): 127-132
- 8 Bauer M, Gramlich I, Polzin S, et al. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval pilot study. *Leg Med (Tokyo)* 2003;5(4):220-227
- 9 Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Research. Brain Research Protocols* 2001;8(3):212-218
- 10 Trotter SA, Brill LB, Bennett JP. Stability of gene expression in postmortem brain revealed by cDNA gene array analysis. *Brain Res* 2002;942(1-2): 120-123
- 11 Thaik-Oo M, Tanaka E, Tsuchiya T, et al. Estimation of postmortem interval from hypoxic inducible levels of vascular endothelial growth factor. *J Forensic Sci* 2002; 47(1):186-189
- 12 Chang A, Li PP, Warsh J. cAMP-Dependent protein kinase (PKA) subunit mRNA levels in postmortem brain from patients with bipolar affective disorder (BD). *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 116(1-2): 27-37
- 13 Boy SC, Bernitz H, Van Heerden WF. Flow cytometric evaluation of post-mortem pulp DNA degradation. *Am J Forensic Med Pathol* 2003; 24(2): 123-127