



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103808655 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410059831. 6

(22) 申请日 2014. 02. 21

(71) 申请人 中南大学湘雅医院

地址 410000 湖南省长沙市湘雅路 87 号湘
雅医院高压氧科

(72) 发明人 彭争荣

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 21/00(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

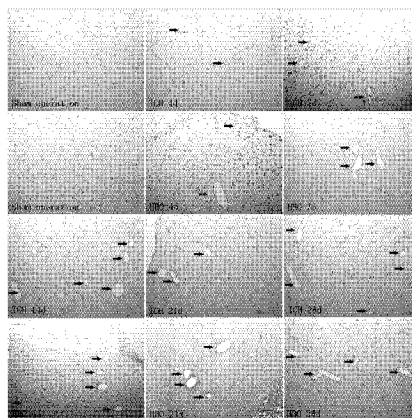
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生
影响的方法

(57) 摘要

一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生影响的方法,将SD大鼠随机分为假手术组(A组)、模型组(B组)和高压氧组(C组)。采用组织切片HE染色显微镜下观察各组大鼠血肿周围脑组织新生血管形成情况;采用免疫组织化学分析方法检测各组大鼠脑内HIF1- α 、VEGF的蛋白表达含量;采用荧光定量RT-PCR方法测定各组大鼠脑组织HIF1- α mRNA、VEGF mRNA的表达水平。



1. 一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生影响的方法,包括以下步骤:

1) 10 % 水合氯醛经腹腔麻醉大鼠后,将大鼠固定在鼠脑立体定位仪上,按无菌操作原则,局部消毒进行造模;

2) 高压氧处理:将高压氧组大鼠在模型制作 3 小时后置于动物舱内,关紧舱门,以 5 ~ 8L/min 氧流量均匀变速加压,加压时间为 15min,当舱内压力达到 0.20MPa 时开始稳压,稳压时氧浓度 85% 以上,稳压 60min 后匀速减压,减压时间为 15min,总治疗时间为 90min,脑出血组和假手术组大鼠也置于动物舱内 90min,不加压,吸空气,三组大鼠均 1 次 /d,连续 4d、7d、14d、21d、28d;

3) 将脑组织置于冰盘上 DEPC 水处理的培养皿上,分离右侧脑组织,取以苍白球(血肿)为中心的基底节部分脑髓质约 100mg 置于冻存管中,浸入液氮后,转移至 -80℃ 保存备用,HE 染色:切片脱蜡至水,梯度酒精脱水,苏木精液染胞核 3min,1% 盐酸酒精分化 30s,1% 氨水反蓝 30s,1% 伊红复染胞浆 1.5min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察血肿周围脑组织新生血管形成情况,进行免疫组织化学分析和免疫荧光定量 RT-PCR。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述免疫组织化学分析步骤包括:切片脱蜡至水,放于 3% H_2O_2 / 甲醇溶液中室温处理 15min,0.01mol/L 的枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复 30min,PBS 洗 5min,滴加正常山羊血清封闭液 37℃ 孵育 30min,甩去多余液体,滴加一抗工作液,4℃ 冰箱孵育过夜,然后滴加生物素化二抗工作液——山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 45min,再滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 30min,DAB 显色 5min,蒸馏水充分冲洗后苏木素轻度复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察结果,HIF1- α 、VEGF 阳性表达为由浅至深棕黄色着色,主要表达定位于细胞浆和细胞膜。在显微镜下对图像进行拍摄再通过图像采集与分析系统获得每组平均光密度值,然后进行比较判定。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于免疫荧光定量 RT-PCR 的具体步骤为:按 Trizol 试剂说明书操作提得各标本总 RNA,并溶解于 20 μ l 去 RNA 酶的灭菌双蒸水中,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,并测定 A260/A280 比值在 1.7 ~ 2.0 之间,说明总 RNA 样品纯度理想,其余放在 -80℃ 冰箱中保存备用,cDNA 的合成严格按照逆转录试剂盒说明书进行操作,逆转录反应体系含 5 $\times$ Buffer 4 μ l,DEPC 处理双蒸水 8.5 μ l,10mmol/L dNTPs 1 μ l, RNA 酶抑制剂 1 μ l,200U/ μ l MMLV 逆转录酶 1 μ l,随机引物 0.5 μ l,50 μ M lOligo(dT) 181 μ l,总 RNA 4 μ l,共 20 μ l。反应条件为 30℃ 10min,42℃ 60min,99℃ 5min,4℃ 5min。-20℃ 保存备用。PCR 反应体系:cDNA 产物 1 μ l,10 μ mol / L 目的基因上下游引物各 0.5 μ l,2 $\times$ Mix 12.5 μ l,10 $\times$ SybrGreen I 1 μ l,灭菌蒸馏水 9.5 μ l,共 25 μ l,PCR 反应条件:94℃ 预变性 2min,94℃ 变性 30s, (β -actin 基因 61℃,VEGF 基因 60℃,HIF- α 基因 63℃) 退火 30s,72℃ 延伸 30s,共 40 个循环,最后 4℃ 冷却。反应在 ABI PRISM 7700 PCR 仪上进行,定量结果以 CT 值给出,计算样本的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值,目的基因各组最终值以内参基因为基准取相对值后再进行比较。

一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生影响的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试验方法,特别是涉及一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生影响的方法。

背景技术

[0002] 脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后新生血管形成增加受损脑组织的供血供氧,有利于脑组织修复。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)可增加脑组织的供氧,改善微循环,促进损伤组织血管再生,促进神经功能恢复。但国内外关于高压氧对脑出血血管新生影响机制的研究较少,机理尚不清楚。

发明内容

[0003] 10 % 水合氯醛经腹腔麻醉大鼠后,将大鼠固定在鼠脑立体定位仪上,按无菌操作原则,局部消毒进行造模;

[0004] 高压氧处理:将高压氧组大鼠在模型制作 3 小时后置于动物舱内,关紧舱门,以 5 ~ 8L/min 氧流量均匀变速加压,加压时间为 15min,当舱内压力达到 0.20MPa 时开始稳压,稳压时氧浓度 85 % 以上,稳压 60min 后匀速减压,减压时间为 15min,总治疗时间为 90min,脑出血组和假手术组大鼠也置于动物舱内 90min,不加压,吸空气,三组大鼠均 1 次 / d,连续 4d、7d、14d、21d、28d;将脑组织置于冰盘上 DEPC 水处理的培养皿上,分离右侧脑组织,取以苍白球(血肿)为中心的基底节部分脑髓质约 100mg 置于冻存管中,浸入液氮后,转移至 -80℃ 保存备用,HE 染色:切片脱蜡至水,梯度酒精脱水,苏木精液染胞核 3min,1% 盐酸酒精分化 30s,1% 氨水反蓝 30s,1% 伊红复染胞浆 1.5min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察血肿周围脑组织新生血管形成情况,进行免疫组织化学分析和免疫荧光定量 RT-PCR。

附图说明

[0005] 图 1 为每组不同时间点脑组织切片 HE 染色图。

[0006] 图 2 为脑组织 HIF1- α 免疫组化染色图

[0007] 图 3 为脑组织 VEGF 免疫组化染色图

具体实施方式

[0008] 下面结合附图对本发明作进一步的详细说明。

[0009] 实施例 1

[0010] 健康清洁级 SD 大鼠 120 只随机分为假手术组(A 组)、模型组(B 组)、高压氧组(C 组),每组 40 只。分别于术后 4d、7d、14d、21d、28d 随机抽取各组大鼠 8 只进行各项检测,每组 5 只进行免疫组化实验;每组 3 只进行荧光定量 PCR 实验。

[0011] 10 % 水合氯醛经腹腔麻醉大鼠后,将大鼠固定在鼠脑立体定位仪上,按无菌操作

原则,局部消毒进行造模;

[0012] 将高压氧组大鼠在模型制作 3 小时后置于动物舱内,关紧舱门,以 5~8L/min 氧流量均匀变速加压,加压时间为 15min,当舱内压力达到 0.20MPa 时开始稳压,稳压时氧浓度 85%以上,稳压 60min 后匀速减压,减压时间为 15min,总治疗时间为 90min[4]。脑出血组和假手术组大鼠也置于动物舱内 90min,不加压,吸空气,三组大鼠均 1 次/d,连续 4d、7d、14d、21d、28d。

[0013] 将脑组织置于冰盘上 DEPC 水处理的培养皿上,分离右侧脑组织,取以苍白球(血肿)为中心的基底节部分脑髓质约 100mg 置于冻存管中,浸入液氮后,转移至 -80℃ 保存备用。

[0014] HE 染色:切片脱蜡至水,梯度酒精脱水,苏木精液染胞核 3min,1% 盐酸酒精分化 30s,1% 氨水反蓝 30s,1% 伊红复染胞浆 1.5min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察血肿周围脑组织新生血管形成情况。

[0015] 免疫组织化学分析:切片脱蜡至水,放于 3%H₂O₂/ 甲醇溶液中室温处理 15min,0.01mol/L 的枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复 30min,PBS 洗 5min,滴加正常山羊血清封闭液 37℃ 孵育 30min,甩去多余液体,滴加一抗工作液,4℃ 冰箱孵育过夜,然后滴加生物素化二抗工作液(山羊抗兔 IgG),37℃ 孵育 45min,再滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 30min,DAB 显色 5min,蒸馏水充分冲洗后苏木素轻度复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察结果,HIF1- α 、VEGF 阳性表达为由浅至深棕黄色着色,主要表达定位于细胞浆和细胞膜。在显微镜下对图像进行拍摄再通过图像采集与分析系统获得每组平均光密度值,然后进行比较判定。

[0016] 免疫荧光定量 RT-PCR:引物委托鼎国昌盛生物技术有限公司合成,具体的引物序列见表 1。按 Trizol 试剂说明书操作提得各标本总 RNA,并溶解于 20 μ l 去 RNA 酶的灭菌双蒸水(DEPC 处理双蒸水)中,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,并测定 A260/A280 比值在 1.7~2.0 之间,说明总 RNA 样品纯度理想,其余放在 -80℃ 冰箱中保存备用。cDNA 的合成严格按照逆转录试剂盒说明书进行操作。逆转录反应体系含 5 $\times$ Buffer 4 μ l,DEPC 处理双蒸水 8.5 μ l,10mmol/L dNTPs 1 μ l,RNA 酶抑制剂 1 μ l,200U/ μ l MMLV 逆转录酶 1 μ l,随机引物 0.5 μ l,50 μ M/L oligo(dT) 18 1 μ l,总 RNA 4 μ l,共 20 μ l。反应条件为 30℃ 10min,42℃ 60min,99℃ 5min,4℃ 5min。-20℃ 保存备用。PCR 反应体系:cDNA 产物 1 μ l,10 μ mol/L 目的基因上下游引物各 0.5 μ l,2 $\times$ Mix 12.5 μ l,10 $\times$ SybrGreen I 1 μ l,灭菌蒸馏水 9.5 μ l,共 25 μ l。PCR 反应条件:94℃ 预变性 2min,94℃ 变性 30s, (β -actin 基因 61℃,VEGF 基因 60℃,HIF- α 基因 63℃) 退火 30s,

[0017] 72℃ 延伸 30s,共 40 个循环,最后 4℃ 冷却。反应在 ABI PRISM 7700 PCR 仪上进行,定量结果以 CT 值给出,计算样本的 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 值,目的基因各组最终值以内参基因为基准取相对值后再进行比较。

[0018] 表 1

[0019]

目的基因	引物序列	产物长度(bp)
β -actin	F: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC R: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	252
VEGF	F: TAGACCTCTCACCAGAAAGAC R: CAGGAATCCCAGAAACAAAAC	277
HIF- α	F: TGTCTCCATTACCTGCCTCTG R: GATTCTTCGCTTCTGTGTCTTCA	297

[0020] 统计学分析:各项指标测定结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计分析软件 SPSS20.0 及 Excel2007 进行数据分析。两组间比较采用成组设计均数 t 检验,多组间比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 检验进行均数间多重比较,而方差不齐者采用 Tamhane's T2 法进行分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

[0021] 光镜下可见血肿周围脑组织存在水肿,变性和坏死,可见大量的炎症细胞浸润。出血后 7d 与 4d 相比,脑出血组与高压氧组均可见水肿较之明显减轻,可见较多的血管样内皮细胞,但高压氧组可见更多的血管样结构和微血管。14d 至 28d,脑出血组血管样结构和微血管较多出现,而高压氧组脑组织已无水肿,可见大量分布的血管样结构和微血管,新生血管数目明显增多。假手术组未见明显血肿及上述各时段的病理改变。(见图 1)

[0022] 免疫组化结果

[0023] HIF1- α 表达:高压氧组与脑出血组在 14d、21d、28d 比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2,图 2。

[0024] VEGF 表达:高压氧组与脑出血组在 14d、21d、28d 比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2,图 3。

[0025] 表 2B 组和 C 组 HIF1- α 、VEGF 蛋白表达

[0026]

	HIF1- α					VEGF				
	4d	7d	14d	21d	28d	4d	7d	14d	21d	28d
B 组	30.39 ± 5.11	26.74 ± 4.97	16.88 ± 1.63	6.01 $\pm$ 2.65	5.70 $\pm$ 2.07	9.68 $\pm$ 2.52	22.88 ± 1.92	32.39 ± 2.08	23.41 ± 3.07	8.37 $\pm$ 4.02
C 组	32.03 ± 4.37	35.76 ± 3.70	49.74 ± 4.68	31.39 ± 2.53	20.74 ± 4.04	10.36 ± 4.05	26.43 ± 2.13	47.74 ± 5.06	63.05 ± 3.59	26.41 ± 2.55
P	$t=-0.4$ 23 $P=0.6$ 94	$t=-2.5$ 20 $P=0.0$ 65	$t=-11.$ 493 $P=0.0$ 00	$t=-11.$ 996 $P=0.0$ 00	$t=-5.7$ 37 $P=0.0$ 05	$t=-0.2$ 48 $P=0.8$ 17	$t=-2.1$ 42 $P=0.0$ 99	$t=-4.8$ 63 $P=0.0$ 08	$t=-14.$ 537 $P=0.0$ 00	$t=-6.5$ 59 $P=0.0$ 03

[0027] 免疫荧光定量 RT-PCR 结果

[0028] HIF1- α mRNA 表达

[0029] 假手术组 HIF1- α mRNA 表达值不随时间增加而改变,数值较小;在 14d、21d、28d 时间点三组比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$),高压氧组与脑出血组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

[0030] VEGF mRNA 表达

[0031] 假手术组 VEGF mRNA 表达值不随时间增加而增加,数值较小;在 21d、28d 时三组比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$),高压氧组与脑出血组比较差异均有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3。

[0032] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,效果相似,都应涵盖在本发明的保护范围内。

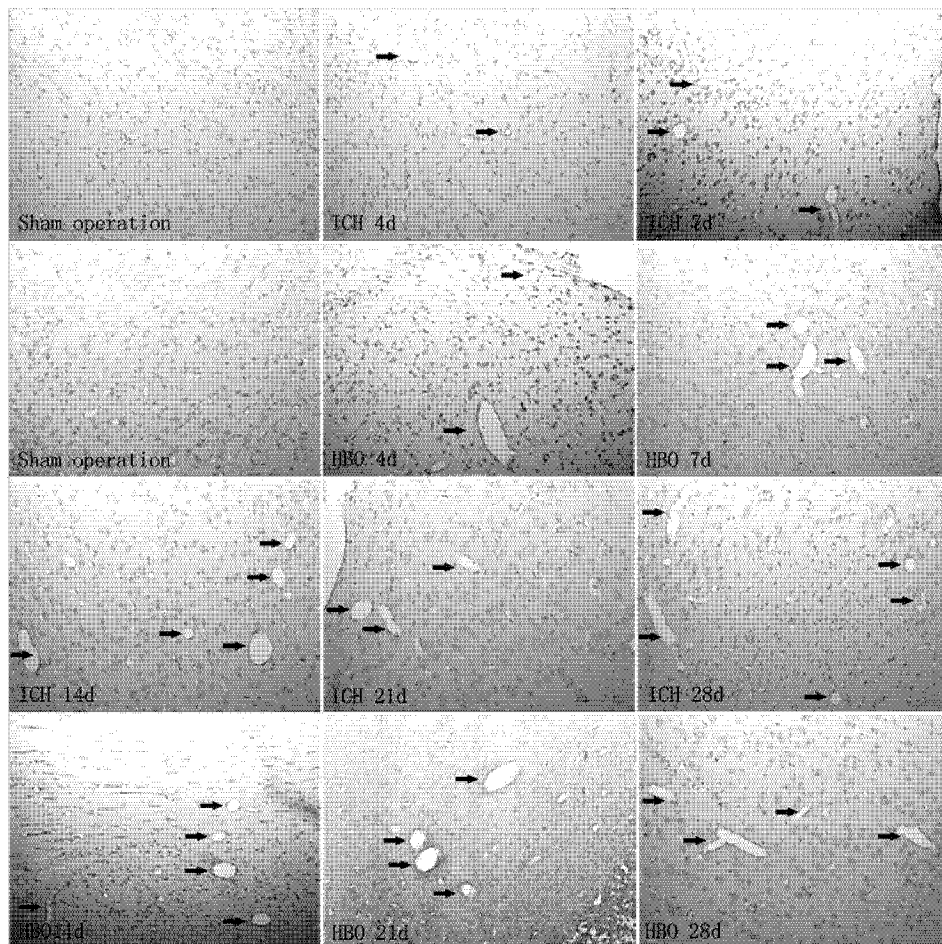


图 1

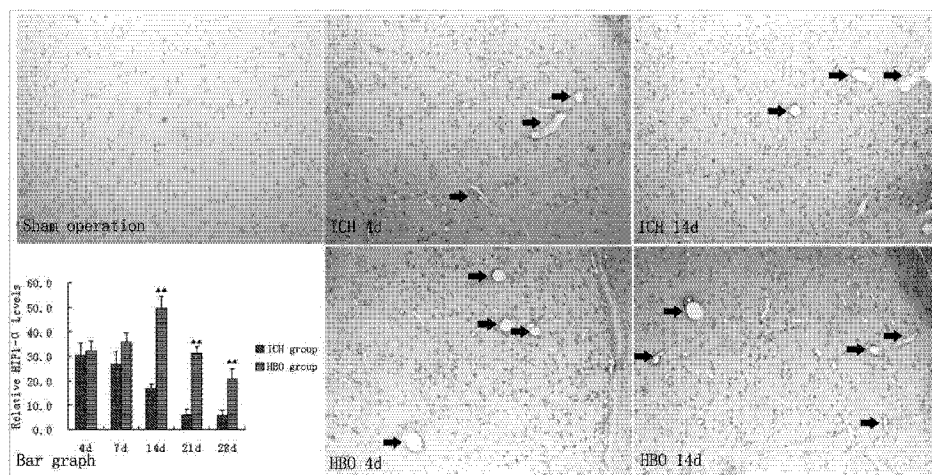


图 2

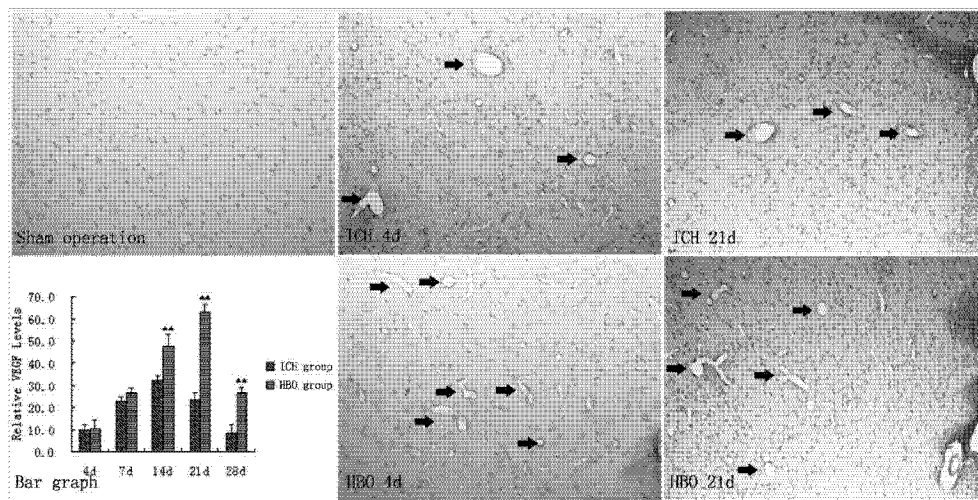


图 3

专利名称(译)	一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生影响的方法		
公开(公告)号	CN103808655A	公开(公告)日	2014-05-21
申请号	CN201410059831.6	申请日	2014-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	中南大学湘雅医院		
申请(专利权)人(译)	中南大学湘雅医院		
当前申请(专利权)人(译)	中南大学湘雅医院		
[标]发明人	彭争荣		
发明人	彭争荣		
IPC分类号	G01N21/00 G01N33/53 G01N21/78 C12Q1/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种研究高压氧对脑出血大鼠脑内血管新生影响的方法，将SD大鼠随机分为假手术组(A组)、模型组(B组)和高压氧组(C组)。采用组织切片HE染色显微镜下观察各组大鼠血肿周围脑组织新生血管形成情况；采用免疫组织化学分析方法检测各组大鼠脑内HIF1- α 、VEGF的蛋白表达含量；采用荧光定量RT-PCR方法测定各组大鼠脑组织HIF1-amRNA、VEGFmRNA的表达水平。

