



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107164451 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710378603.9

(22)申请日 2017.05.25

(71)申请人 中山大学附属第一医院

地址 510080 广东省广州市中山二路58号

(72)发明人 张亚东

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈卫

(51)Int.Cl.

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

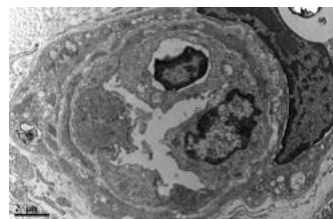
权利要求书1页 说明书2页 附图1页

(54)发明名称

一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法

(57)摘要

本发明公开了一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法。首先对阴茎海绵体组织进行免疫组化常规染色后用2~6%戊二醛固定,1~3%锇酸后固定,乙醇脱水后还氧树脂包埋并制备切片,然后用醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后电镜观察;再通过用血管内皮细胞标志物,周细胞标志物及平滑肌标志物进行免疫三重染色以进一步确定阴茎海绵体血管周细胞的分布特点。本发明所述方法操作简单,方便快捷,适用于阴茎海绵体相关疾病的研究,具有较大的应用前景。



1. 一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,先对阴茎海绵体组织进行电镜观察,再通过免疫组化染色进一步确定阴茎海绵体血管周细胞的分布。
2. 根据权利要求1所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,阴茎海绵体组织免疫组化常规染色后用2~6%戊二醛固定,1~3%锇酸后固定,乙醇脱水后还氧树脂包埋并制备切片,然后醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后电镜观察。
3. 根据权利要求2所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,所述戊二醛浓度为4%。
4. 根据权利要求2所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,所述锇酸浓度为1%。
5. 根据权利要求1所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,所述免疫组化为用血管内皮细胞标志物,周细胞标志物及平滑肌标志物进行免疫三重染色。
6. 根据权利要求5所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,所述血管内皮细胞标志物为CD146抗体。
7. 根据权利要求5所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,所述周细胞标志物为NG2抗体。
8. 根据权利要求5所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,所述平滑肌标志物为 α -SMA。
9. 根据权利要求5所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,其特征在于,阴茎海绵体石蜡切片烤片,常规脱蜡,水化后进行免疫三重染色;染色过程中抗原修复方法为高压修复法。
10. 权利要求1~9任一项所述的寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法在研究勃起功能障碍中的应用。

一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域。更具体地,涉及一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法。

背景技术

[0002] 周细胞作为微血管的构成成分,具有自分泌功能能分泌多种细胞因子,并通过与血管内皮细胞的接触和离子通道联系,在促进血管新生和维持血管稳定、调节血管舒缩等方面发挥重要作用。正常情况下,周细胞对内皮细胞有轻度抑制作用并维持内皮细胞膜的完整性;在血管生成中主要是抑制内皮细胞的生长和迁移。阴茎也是血管性器官,海绵体内也存在着丰富的微血管系统,因此对血管性ED的研究也不应只考虑海绵窦内皮细胞的功能,该考虑到周细胞在其中的作用和机制,但现阶段对于阴茎海绵体周细胞的研究较少,缺乏寻找阴茎海绵体周细胞的方法。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是克服现有上述现有技术的缺陷和不足,提供一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法。

[0004] 本发明的上述目的是通过以下技术方案给予实现的:

一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法,首先对阴茎海绵体组织进行电镜观察,再通过免疫组化染色进一步确定阴茎海绵体血管周细胞的分布。

[0005] 优选地,阴茎海绵体组织免疫组化常规染色后用2~6%戊二醛固定,1~3%锇酸后固定,乙醇脱水后还氧树脂包埋并制备切片,然后醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后电镜观察。

[0006] 更优选地,所述戊二醛浓度为4%。

[0007] 更优选地,所述锇酸浓度为1%。

[0008] 优选地,所述免疫组化为用血管内皮细胞标志物,周细胞标志物及平滑肌标志物进行免疫三重染色。

[0009] 更优选地,所述血管内皮细胞标志物为CD146抗体。

[0010] 更优选地,所述周细胞标志物为NG2抗体。

[0011] 更优选地,,所述平滑肌标志物为 α -SMA。

[0012] 优选地,阴茎海绵体石蜡切片烤片,常规脱蜡,水化后进行免疫三重染色;染色过程中抗原修复方法为高压修复法。

[0013] 同时,上述寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法在研究勃起功能障碍中的应用亦在本发明保护范围内。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

本发明所述寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法操作简单,方便快捷,适用于阴茎海绵体相关疾病的研究,具有较大的应用前景,并且本发明有效寻找到了阴茎海绵体周细胞,为

以后的研究打下基础。

附图说明

[0015] 图1为电镜下的海绵体周细胞。

[0016] 图2为海绵体周细胞免疫荧光染色。

[0017] 图3为海绵体周细胞标记物的表达图。

具体实施方式

[0018] 以下结合附图和具体实施例来进一步说明本发明。其中,附图仅用于示例型说明,表示的仅是示意图,而非实物图,不能理解为对本专利的限制;为了更好地说明本发明的实施例,附图某些部件会有省略、放大或缩小,并不代表实际产品的尺寸。

[0019] 试验动物:无特定病原体级成年雄性SD大鼠10只,购自中山大学实验动物中心,实验动物处理符合中山大学附属第一医院实验动物伦理委员会规定。

[0020] 实验用抗体:血管内皮细胞标记物CD146(Abcam,美国),抗NG2抗体(周细胞标记)及小鼠源单克隆抗大鼠 α -平滑肌激动蛋白 α -actin抗体(α -SMA,武汉博士德)。所有抗体均采用含5%山羊血清和0.05% Tween 20的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释。

[0021] 实施例1

1、SD大鼠阴茎海绵体电镜观察

(1)大鼠麻醉固定后,剪开阴茎皮肤,完整切取阴茎海绵体,PBS漂洗去除血迹并取中段免疫组化常规染色后用4%戊二醛固定,1%锇酸后固定,乙醇系列脱水,Epon 812环氧树脂包埋,LKB-III型超薄切片机切片,醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色,JEM-1200EX型透射电镜观察、摄片。

[0022] (2)结果如图1所示,电镜观察阴茎海绵体证实周细胞主要分布于白膜下微血管周围,与阴茎背神经束、阴茎背静脉伴行。海绵体动脉或阴茎背动脉的内皮细胞主要被覆平滑肌细胞,仅有少许周细胞与之重叠。

[0023] 2、SD大鼠阴茎海绵体组织免疫组化染色检查

(1)大鼠麻醉固定后,剪开阴茎皮肤,完整切取阴茎海绵体,PBS漂洗去除血迹并取中段制作阴茎海绵体冠状位连续石蜡切片。免疫组化染色采用链霉菌抗生物素蛋白过氧化物酶连结法(SP)法。免疫学染色时,石蜡切片烤片,常规脱蜡、水化后分别对血管内皮细胞标志物CD146和周细胞标志物NG2抗体及 α -SMA进行免疫组化染色。染色过程中抗原修复方法为高压修复法。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水封片后观察,检测海绵体组织中CD146、NG2抗体和 α -SMA的表达并比较。阴茎海绵体免疫组化切片首先在100倍视野下选择计数部位,然后在400倍视野下计数。每组计数5例,每例分别选取9个不重复视野计数,并拍照。

[0024] (2)免疫组化结果如图2所示:对血管内皮细胞标志物CD146,周细胞抗体NG2 和 α -SMA进行免疫组化染色,抗体抗原阳性反应呈棕色,3种抗体均有表达(如图3)。对大鼠阴茎海绵体组织的免疫三重染色证实低倍镜下内皮细胞和平滑肌细胞均匀充满于整个勃起组织,而周细胞主要位于勃起组织外周,尤其富集于阴茎海绵体白膜下。

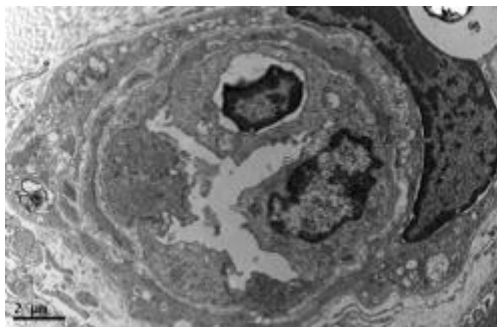


图1

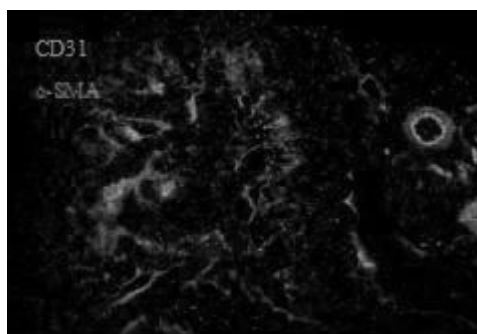


图2

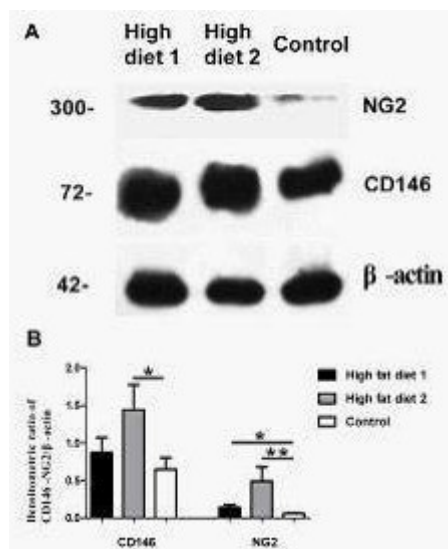


图3

专利名称(译)	一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法		
公开(公告)号	CN107164451A	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN201710378603.9	申请日	2017-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学附属第一医院		
申请(专利权)人(译)	中山大学附属第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学附属第一医院		
[标]发明人	张亚东		
发明人	张亚东		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5005 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	陈卫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种寻找阴茎海绵体血管周细胞的方法。首先对阴茎海绵体组织进行免疫组化常规染色后用2~6%戊二醛固定，1~3%锇酸后固定，乙醇脱水后还氧树脂包埋并制备切片，然后用醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色后电镜观察；再通过用血管内皮细胞标志物，周细胞标志物及平滑肌标志物进行免疫三重染色以进一步确定阴茎海绵体血管周细胞的分布特点。本发明所述方法操作简单，方便快捷，适用于阴茎海绵体相关疾病的研究，具有较大的应用前景。

