



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102980995 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201210511341. 6

(22) 申请日 2012. 12. 04

(71) 申请人 南京市妇幼保健院

地址 210004 江苏省南京市莫愁路天妃巷
123 号

(72) 发明人 潘连军 马洁桦

(74) 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
32206

代理人 顾进

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 1/30 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 首先将组织做成石蜡切片, 再通过免疫组化三步法进行染色显色。本发明根据内皮细胞内的标志蛋白提供一种检验内皮细胞凋亡的功能状态和损伤程度, 进而提供一种检测雌激素受体 ER β 对阴茎血管内皮的保护作用的方法。

1. 一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 首先将组织做成石蜡切片, 再通过免疫组化三步法进行染色显色。

2. 根据权利要求 1 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 包括如下步骤:

(一)、石蜡切片制作

(1) 固定: 选择刚刚死亡的 ER β 缺陷型动物和正常动物, 取部分阴茎中段组织, 用 PBS 冲洗, 放入固定液 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液内固定 12h;

(2) 脱水: 倒去固定液, 将组织用蒸馏水冲洗 3 次, 再用 50% 酒精冲洗 2 次, 用酒精逐级脱水: 70% 酒精 1 天, 80% 酒精过夜, 95% 酒精 3h, 无水酒精 I、无水酒精 II 各 2h;

(3) 透明: 脱水后的组织于体积比为 1:1 的无水酒精和二甲苯混合液内透明 45min, 二甲苯 I、二甲苯 II 内透明各 30min;

(4) 包埋: 恒温箱内将透明后的组织浸入石蜡, 58°C 的体积比为 1:1 二甲苯和石蜡混合液 45min, 石蜡 I、石蜡 II、石蜡 III 共 2.5h 后, 用石蜡 III 包埋组织;

(5) 切片: 包埋后的组织块经修整后, 用切片机切成 3-5 μ m 的石蜡带;

(6) 贴片: 将石蜡带在 50°C 温水中展片, 然后预处理干净的载玻片捞片, 组织带可黏在载玻片上;

(7) 烤片: 68°C 恒温箱内烤带有组织带的载玻片 2h;

(二)、免疫组化 SP 三步法

(1) 脱蜡: 脱蜡前应将沾有组织的载玻片在室温中放置 60min, 或 60°C 恒温箱中烘烤 20min, 后用二甲苯 I、二甲苯 II 浸泡, 共 25min;

(2) 水化: 脱蜡后的载玻片在无水酒精 I、无水酒精 II 各水化 2min, 下行至 95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精 I 和 70% 酒精 II 各水化 2min;

(3) 水化后的载玻片用 PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(4) 阻断: 3% H₂O₂ 去离子水或 80% 甲醇孵育冲洗后的载玻片 10min, 以灭活内源性过氧化物酶活性;

(5) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(6) 抗原修复: 载玻片置 PH 6.0、温度为 95°C 的抗原修复液中修复 15-20min, 自然冷却 20min 以上, 再用冷水冲洗缸子, 加快冷却至室温;

(7) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(8) 封闭: 向载玻片上组织滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 20min, 甩去多余液体;

(9) 滴加 I 抗 50 μ l, 室温静置 1h, 或者 37°C 1h, 或者 4°C 过夜后在 37°C 复温 45min;

(10) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(11) 滴加辣根过氧化物酶标记的 II 抗 40 ~ 50 μ l, 室温静置 1h, 或 37°C 1h;

(12) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(13) 滴加 SP 即链霉亲和素 - 过氧化物酶, 室温或 37°C 孵育 30min-1h;

(14) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(15) 显色: DAB 显色剂 5-10min, 在显微镜下掌握染色程度, 胞浆呈棕色者判定为阳性细胞;

(16) 自来水冲洗 10 分钟终止反应;

(17) 复染:苏木精复染 2min, 盐酸酒精分化;

(18) 自来水冲洗 10-15min;

(19) 常规脱水、透明、封固液封片和镜检, 其中封片方式为用中性树胶滴在组织旁边, 再用盖玻片盖上。

3. 根据权利要求 2 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 所述 PBS 为 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液, 由 NaCl 8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.63g 或 Na_2HPO_4 1.44g, 以及 KH_2PO_4 0.24g, 溶于 900ml 双蒸水中, 用盐酸调 pH 值至 7.4, 加水定容至 1L 配制而成。

4. 根据权利要求 3 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 步骤 1 中所述 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 pH 为 7.4, 其配制方法为:

(1) 0.1M 磷酸盐缓冲液: 取下述 A 液 400ml 与 B 液 80ml 混合后, 调 pH 于 7.4, 再定容至 500ml;

A 液: 0.1mol/L Na_2HPO_4 , 即 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g 加水定容至 1000ml;

B 液: 0.1mol/L NaH_2PO_4 , 即 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6g 加水定容至 1000ml;

(2) 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液: 取 20g 多聚甲醛溶于 500ml 0.1M 磷酸盐缓冲液中, 加热并搅拌约 2-3h 后溶解。

5. 根据权利要求 4 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 步骤 1 中所述贴片中的载玻片预处理方式为: a. 洗片: 用 1% HCl 浸泡载玻片过夜, 蒸馏水冲洗, 95% 酒精浸泡 2h 后擦干; b. 涂胶: 涂防脱剂, 所述防脱剂为多聚赖氨酸或 APES 及 3-氨基丙基-3-乙氧基甲硅烷, 其中多聚赖氨酸的配置方法为多聚赖氨酸即 PLL 5g 溶于蒸馏水 1000ml 中。

6. 根据权利要求 5 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 步骤 2 中所述显色剂, 其配置方法为: 在 1ml 水中加 1 滴显色剂 A, 摇匀, 然后加 1 滴显色剂 B, 摇匀, 再加 1 滴显色剂 C, 摇匀, 其中: 显色剂 A 为 DAB, 显色剂 B 为 H_2O_2 , 显色剂 C 为磷酸缓冲液。

7. 根据权利要求 6 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 步骤 2 中所述抗原修复液为 0.01M 枸橼酸缓冲液或 0.01M 柠檬酸盐缓冲液, 其中所述 0.01M 柠檬酸盐缓冲液的配制方法为: 取下述 A 液 8ml 与 B 液 42ml 混合后加水至 400ml, 调 pH 于 6.0, 再定容至 500ml;

A 液: 0.1mol/L 柠檬酸, 即 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 21.01g 加水定容至 1000ml;

B 液: 0.1mol/L 柠檬酸钠, 即 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29.41g 加水定容至 1000ml。

8. 根据权利要求 7 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 步骤 2 中所述 I 抗为 CD34、vWF, 浓度分别为 1:100 和 1:50, 抗体稀释用 0.01M PBS; 所述 II 抗浓度均为 1:800, 抗体稀释用 0.01M PBS。

9. 根据权利要求 8 所述检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法, 其特征在于: 步骤 2 中所述封固液为中性树胶、50% 缓冲甘油或液体石蜡。

一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及组织化学检测的方法,特别地,本发明涉及一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法。

背景技术

[0002] 血管内皮在阴茎的勃起过程中扮演了十分重要的角色,血管内皮功能障碍是阴茎勃起功能障碍(ED)的病理基础之一,并且,ED的发生往往早于其他伴有明显内皮损伤的心血管疾病如冠心病等,被认为是此类疾病的早期警报器。血管内皮细胞是循环血液与血管平滑肌细胞间的机械屏障,容易受到体内多种因素如高血压、高血脂、高血糖、氧化应激、高同型半胱氨酸血症、吸烟等的损伤,受损后的血管内皮细胞功能尤其是内分泌功能失调,使其分泌的多种活性物质或是与这些活性物质有关的其他物质之间的平衡被打破,从而导致内皮损伤/功能障碍。

[0003] 保护阴茎血管内皮是勃起功能障碍治疗的新途径。现有研究证实,雌激素通过直接效应(改善内皮功能、抑制血管平滑肌增殖、迁移)和间接效应(调节脂代谢、改善凝血纤溶系统功能和抗氧化作用)改善血管功能,减弱有害刺激的细胞反应,是重要的心血管保护因素,雌激素是通过其受体对心血管内皮具有保护效应,缺乏雌激素或其受体,血管内皮易受损伤。雌激素受体(estrogenreceptor, ER)包括 α 和 β 2个亚型,在血管内均有表达,近年研究发现,阴茎海绵体内也存在ER,在包括啮齿类动物、兔等多个物种的阴茎中发现有ER α 和ER β 的表达,且以ER β 为主。

[0004] 内皮细胞内具两种标志蛋白表达:CD34和vWF,其中CD34分子属于钙粘蛋白家族,是一种相对分子质量为105000-120000高度糖基化的跨膜蛋白,选择性地表达于人类及其他哺乳动物造血干细胞、祖细胞和血管内皮细胞;vWF做为内皮细胞合成和分泌的一种糖蛋白,在内皮细胞损伤时释放入血增加,内皮中vWF含量降低。在众多内皮标志蛋白中,CD34和vWF更具敏感性 and 特异性,因此CD34和vWF可以作为反映内皮细胞功能状态和损伤程度的指标。因此,如何根据内皮细胞内的标志蛋白检验内皮细胞凋亡的功能状态和损伤程度,成为检测雌激素受体保护阴茎血管内皮作用的重要问题。

发明内容

[0005] 本发明目的在于:根据内皮细胞内的标志蛋白提供一种检验内皮细胞凋亡的功能状态和损伤程度,进而提供一种检测雌激素受体ER β 对阴茎血管内皮的保护作用的方法。

[0006] 本发明采取的技术方案为:一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法,包括如下步骤:

(一)、石蜡切片制作

(1)固定:选择刚刚死亡的ER β 缺陷型动物和正常动物,取部分阴茎中段组织,用PBS冲洗,放入固定液4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液内固定12h;

(2)脱水:倒去固定液,将组织用蒸馏水冲洗3次,再用50%酒精冲洗2次,用酒精逐级

脱水 :70% 酒精 1 天,80% 酒精过夜,95% 酒精 3h,无水酒精 I、无水酒精 II 各 2h ;

(3) 透明 :脱水后的组织于体积比为 1:1 的无水酒精和二甲苯混合液内透明 45min,二甲苯 I、二甲苯 II 内透明各 30min ;

(4) 包埋 :恒温箱内将透明后的组织浸入石蜡,58℃ 的体积比为 1:1 二甲苯和石蜡混合液 45min,石蜡 I、石蜡 II、石蜡 III 共 2.5h 后,用石蜡 III 包埋组织 ;

(5) 切片 :包埋后的组织块经修整后,用切片机切成 3-5 μm 的石蜡带 ;

(6) 贴片 :将石蜡带在 50℃ 温水中展片,然后预处理干净的载玻片捞片,组织带可黏在载玻片上 ;

(7) 烤片 :68℃ 恒温箱内烤带有组织带的载玻片 2h ;

(二)、免疫组化 SP 三步法

(1) 脱蜡 :脱蜡前应将沾有组织的载玻片在室温中放置 60min,或 60℃ 恒温箱中烘烤 20min,后用二甲苯 I、二甲苯 II 浸泡,共 25min ;

(2) 水化 :脱蜡后的载玻片在无水酒精 I、无水酒精 II 各水化 2min,下行至 95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精 I 和 70% 酒精 II 各水化 2min ;

(3) 水化后的载玻片用 PBS 冲洗 2-3 次,每次 5min ;

(4) 阻断 :3% H_2O_2 去离子水或 80% 甲醇孵育冲洗后的载玻片 10min,以灭活内源性过氧化物酶活性 ;

(5) PBS 冲洗 2-3 次,每次 5min ;

(6) 抗原修复 :载玻片置 PH 6.0、温度为 95℃ 的抗原修复液中修复 15-20min,自然冷却 20min 以上,再用冷水冲洗缸子,加快冷却至室温 ;

(7) PBS 冲洗 2-3 次,每次 5min ;

(8) 封闭 :向载玻片上组织滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 20min,甩去多余液体 ;

(9) 滴加 I 抗 50 μl ,室温静置 1h,或者 37℃ 1h,或者 4℃ 过夜后在 37℃ 复温 45min ;

(10) PBS 冲洗 2-3 次,每次 5min ;

(11) 滴加辣根过氧化物酶标记的 II 抗 40 ~ 50 μl ,室温静置 1h,或 37℃ 1h ;

(12) PBS 冲洗 2-3 次,每次 5min ;

(13) 滴加 SP 即链霉亲和素 - 过氧化物酶,室温或 37℃ 孵育 30min-1h ;

(14) PBS 冲洗 2-3 次,每次 5min ;

(15) 显色 :DAB 显色剂 5-10min,在显微镜下掌握染色程度,胞浆呈棕色者判定为阳性细胞 ;

(16) 自来水冲洗 10 分钟终止反应 ;

(17) 复染 :苏木精复染 2min,盐酸酒精分化 ;

(18) 自来水冲洗 10-15min ;

(19) 常规脱水、透明、封固液封片和镜检,其中封片方式为用中性树胶滴在组织旁边,再用盖玻片盖上。

[0007] 所述 PBS 为 pH7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液,由 NaCl 8g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.63g 或 Na_2HPO_4 1.44g, 以及 KH_2PO_4 0.24g, 溶于 900ml 双蒸水中,用盐酸调 pH 值至 7.4,加水定容至 1L 配制而成。

[0008] 步骤 (一) 中所述 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 pH 为 7.4,其配制方法为 :

(1) 0.1M 磷酸盐缓冲液:取下述 A 液 400ml 与 B 液 80ml 混合后,调 pH 于 7.4,再定容至 500ml;

A 液:0.1mol/L Na_2HPO_4 ,即 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g 加水定容至 1000ml;

B 液:0.1mol/L NaH_2PO_4 ,即 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6g 加水定容至 1000ml;

(2) 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液:取 20g 多聚甲醛溶于 500ml 0.1M 磷酸盐缓冲液中,加热并搅拌约 2-3h 后溶解。

[0009] 步骤(一)中所述贴片中的载玻片预处理方式为:a. 洗片:用 1% HCl 浸泡载玻片过夜,蒸馏水冲洗,95% 酒精浸泡 2h 后擦干;b. 涂胶:涂防脱剂,所述防脱剂为多聚赖氨酸或 APES 及 3-氨基丙基-3-乙氧基甲硅烷,其中多聚赖氨酸的配置方法为多聚赖氨酸即 PLL 5g 溶于蒸馏水 1000ml 中。

[0010] 步骤(二)中所述显色剂,其配置方法为:在 1ml 水中加 1 滴显色剂 A,摇匀,然后加 1 滴显色剂 B,摇匀,再加 1 滴显色剂 C,摇匀,其中:显色剂 A 为 DAB,显色剂 B 为 H_2O_2 ,显色剂 C 为磷酸缓冲液。

[0011] 步骤(二)中所述抗原修复液为 0.01M 枸橼酸缓冲液或 0.01M 柠檬酸盐缓冲液,其中所述 0.01M 柠檬酸盐缓冲液的配制方法为:取下述 A 液 8ml 与 B 液 42ml 混合后加水至 400ml,调 pH 于 6.0,再定容至 500ml;

A 液:0.1mol/L 柠檬酸,即 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 21.01g 加水定容至 1000ml;

B 液:0.1mol/L 柠檬酸钠,即 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29.41g 加水定容至 1000ml。

[0012] 步骤(二)中所述 I 抗为 CD34、vWF,浓度分别为 1:100 和 1:50,抗体稀释用 0.01M PBS;所述 II 抗浓度均为 1:800,抗体稀释用 0.01M PBS。

[0013] 步骤(二)中所述封固液为中性树胶、50% 缓冲甘油或液体石蜡。

[0014] 本发明所述方法的结果中,棕黄色或棕褐色判定为阳性染色。免疫组化染色结果可以在 100 倍视野下按染色强度和范围进行半定量评分:0 分 = 无阳性染色,1 分 = 弱或零星阳性染色,2 分 = 中等强度阳性染色,即 <50% 的细胞呈阳性,3 分 = 强阳性染色,即 >50% 的细胞呈阳性,每组标本观察 4 张切片,每张切片观察双侧全部阴茎海绵体切面,结果取平均值。本发明所述的方法,通过检测内皮细胞标志物的情况,初步探讨了 ER β 对阴茎海绵体血管内皮的保护效应。

附图说明

[0015] 图 1 为本发明所述方法检测的正常动物的内皮细胞标志物 vWF 免疫组化结果;

图 2 为本发明所述方法检测的 ER β 缺陷型动物的内皮细胞标志物 vWF 免疫组化结果;其中:箭头所示即为 vWF 阳性部位。

具体实施方式

[0016] 以下结合具体实施方式对本发明进行详细说明。

[0017] 实施例 1

1、石蜡切片制作

(1) 固定:选择刚刚死亡的 ER β 缺陷型动物和正常动物,取部分阴茎中段组织,用 PBS 冲洗,放入固定液 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液内固定 12h;

所述 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液 pH 为 7.4, 其配制方法为:

1) 0.1M 磷酸盐缓冲液: 取下述 A 液 400ml 与 B 液 80ml 混合后, 调 pH 于 7.4, 再定容至 500ml;

A 液: 0.1mol/L Na_2HPO_4 , 即 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g 加水定容至 1000ml;

B 液: 0.1mol/L NaH_2PO_4 , 即 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6g 加水定容至 1000ml;

2) 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液: 取 20g 多聚甲醛溶于 500ml 0.1M 磷酸盐缓冲液中, 加热并搅拌约 2-3h 后溶解;

(2) 脱水: 倒去固定液, 将组织用蒸馏水冲洗 3 次, 再用 50% 酒精冲洗 2 次, 用酒精逐级脱水: 70% 酒精 1 天, 80% 酒精过夜, 95% 酒精 3h, 无水酒精 I、无水酒精 II 各 2h;

(3) 透明: 脱水后的组织于体积比为 1:1 的无水酒精和二甲苯混合液内透明 45min, 二甲苯 I、二甲苯 II 内透明各 30min;

(4) 包埋: 恒温箱内将透明后的组织浸入石蜡, 58°C 的体积比为 1:1 二甲苯和石蜡混合液 45min, 石蜡 I、石蜡 II、石蜡 III 共 2.5h 后, 用石蜡 III 包埋组织;

(5) 切片: 包埋后的组织块经修整后, 用切片机制成 3-5 μm 的石蜡带;

(6) 贴片: 将石蜡带在 50°C 温水中展片, 然后预处理干净的载玻片捞片, 组织带可黏在载玻片上;

所述载玻片预处理方式为: a. 洗片: 用 1% HCl 浸泡载玻片过夜, 蒸馏水冲洗, 95% 酒精浸泡 2h 后擦干; b. 涂胶: 涂防脱剂, 所述防脱剂为多聚赖氨酸或 APES 及 3-氨基丙基-3-乙氧基甲硅烷, 其中多聚赖氨酸的配置方法为多聚赖氨酸即 PLL 5g 溶于蒸馏水 1000ml 中;

(7) 烤片: 68°C 恒温箱内烤带有组织带的载玻片 2h;

2、免疫组化 SP 三步法

(1) 脱蜡: 脱蜡前应将沾有组织的载玻片在室温中放置 60min, 或 60°C 恒温箱中烘烤 20min, 后用二甲苯 I、二甲苯 II 浸泡, 共 25min;

(2) 水化: 脱蜡后的载玻片在无水酒精 I、无水酒精 II 各水化 2min, 下行至 95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精 I 和 70% 酒精 II 各水化 2min;

(3) 水化后的载玻片用 PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(4) 阻断: 3% H_2O_2 去离子水或 80% 甲醇孵育冲洗后的载玻片 10min, 以灭活内源性过氧化物酶活性;

(5) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(6) 抗原修复: 载玻片置 PH 6.0、温度为 95°C 的抗原修复液中修复 15-20min, 自然冷却 20min 以上, 再用冷水冲洗缸子, 加快冷却至室温;

(7) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(8) 封闭: 向载玻片上组织滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 20min, 甩去多余液体;

(9) 滴加 I 抗 50 μl , 室温静置 1h, 或者 37°C 1h, 或者 4°C 过夜后在 37°C 复温 45min;

(10) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(11) 滴加辣根过氧化物酶标记的 II 抗 40 ~ 50 μl , 室温静置 1h, 或 37°C 1h;

(12) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(13) 滴加 SP 即链霉亲和素-过氧化物酶, 室温或 37°C 孵育 30min-1h;

(14) PBS 冲洗 2-3 次, 每次 5min;

(15) 显色 :DAB 剂显色 5-10min,在显微镜下掌握染色程度,胞浆呈棕色者判定为阳性细胞 ;

所述显色剂,其配置方法为 :在 1ml 水中加 1 滴显色剂 A,摇匀,然后加 1 滴显色剂 B,摇匀,再加 1 滴显色剂 C,摇匀,其中 :显色剂 A 为 DAB,显色剂 B 为 H_2O_2 ,显色剂 C 为磷酸缓冲液 ;

(16) 自来水冲洗 10 分钟终止反应 ;

(17) 复染 :苏木精复染 2min,盐酸酒精分化 ;

(18) 自来水冲洗 10-15min ;

(19) 常规脱水、透明、封固液封片和镜检,其中封片方式为用中性树胶滴在组织旁边,再用盖玻片盖上。

[0018] 所述 PBS 为 pH7.4 、0.01M 的磷酸盐缓冲液,由 NaCl 8g, KCl 0.2g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.63g 或 Na_2HPO_4 1.44g, 以及 KH_2PO_4 0.24g,溶于 900ml 双蒸水中,用盐酸调 pH 值至 7.4,加水定容至 1L 配制而成。步骤 2 中所述 I 抗为 CD34、vWF,浓度分别为 1 : 100 和 1 : 50,抗体稀释用 0.01M PBS ;所述 II 抗浓度均为 1 : 800,抗体稀释用 0.01M PBS。

[0019] 上述实施例所述的方法结果如图 1-2 及表 1 所示,本发明可以检验内皮细胞凋亡的功能状态和损伤程度,从结果看出 ER β 缺陷型动物的阴茎海绵窦内皮细胞标志物 CD34 和 vWF 蛋白表达减少,提示海绵窦内皮细胞减少,表明雌激素受体 ER β 对阴茎血管内皮的保护作用。

[0020] 表 1 两种动物内皮细胞内标志物 CD34 和 vWF 的染色结果

	小鼠数目	CD34	vWF
正常动物	6	3.00 \pm 0.00	2.75 \pm 0.50
ER β 缺陷型动物	6	2.25 \pm 0.50	2.00 \pm 0.00

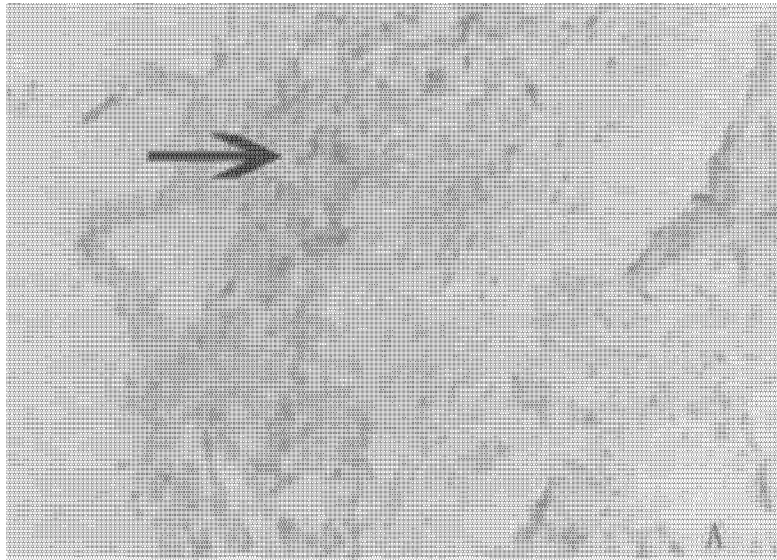


图 1



图 2

专利名称(译)	一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法		
公开(公告)号	CN102980995A	公开(公告)日	2013-03-20
申请号	CN201210511341.6	申请日	2012-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	南京市妇幼保健院		
申请(专利权)人(译)	南京市妇幼保健院		
当前申请(专利权)人(译)	南京市妇幼保健院		
[标]发明人	潘连军 马洁桦		
发明人	潘连军 马洁桦		
IPC分类号	G01N33/531 G01N1/30		
代理人(译)	顾进		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测雌激素受体对阴茎血管内皮细胞保护作用的方法，首先将组织做成石蜡切片，再通过免疫组化三步法进行染色显色。本发明根据内皮细胞内的标志蛋白提供一种检验内皮细胞凋亡的功能状态和损伤程度，进而提供一种检测雌激素受体ER β 对阴茎血管内皮的保护作用的方法。

