

视网膜内质网应激免疫组织化学抗体浓度选择的实验研究

陈小红^{1*}, 梁婉娇^{1,2*}, 黄诗舒³, 孙 晏¹, 罗 欣⁴, 赖 璐⁴, 池昭晟⁴, 陈梅珠¹, 王云鹏¹, 严伟明¹

引用: 陈小红, 梁婉娇, 黄诗舒, 等. 视网膜内质网应激免疫组织化学抗体浓度选择的实验研究. 国际眼科杂志 2023; 23(1): 32-38

基金项目: 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院院内课题杰出青年培育专项 (No.2018Q02); 福建省科技计划引导项目 (No.2020Y0076); 福建省自然科学基金项目 (No.2020J05282); 中国人民解放军南京军区福州总医院博士后课题 (No.48678)

作者单位:¹(350025) 中国福建省福州市, 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院 厦门大学附属东方医院 福建医科大学福总临床医学院;²(362200) 中国福建省晋江市医院 上海市第六人民医院福建医院;³(300384) 中国天津市, 天津医科大学眼科医院 眼视光学院 眼科研究所;⁴(350122) 中国福建省福州市, 福建医科大学

*: 陈小红和梁婉娇对本文贡献一致。

作者简介: 陈小红, 硕士, 研究方向: 眼底病; 梁婉娇, 硕士, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 严伟明, 博士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病. 742666007@qq.com; 王云鹏, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病. 34165596@qq.com

收稿日期: 2022-01-23 修回日期: 2022-12-08

摘要

目的: 探索小鼠视网膜色素变性 (RP) 模型视网膜内质网应激免疫组织化学 (IHC) 染色抗体的最适浓度, 为研究 RP 发病机制及干预措施提供相应的指标检测方法。

方法: 给予清洁级健康雄性 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 N-甲基-N-亚硝基脲 (MNU, 60mg/kg) 制备 RP 小鼠模型, 造模后第 7d 行视网膜电图 (ERG) 检测和苏木精-伊红 (HE) 染色验证造模成功, 摘取眼球并采用 IHC 染色法检测视网膜内质网应激相关蛋白 (IRE1、ATF6、PERK、GRP78、Caspase-12) 表达情况。

结果: IRE1、ATF6、PERK、GRP78、Caspase-12 蛋白均在 RP 小鼠视网膜呈阳性表达, IRE1 抗体浓度为 1:1000、ATF6 抗体浓度为 1:500 和 1:1000 (此抗体两种浓度阳性表达无差异, $P>0.05$)、PERK 抗体浓度为 1:1500、GRP78 抗体浓度为 1:200、Caspase-12 抗体浓度为 1:100 时, 阳性表达强度适宜, 且与各自其余抗体浓度相应蛋白阳性表达均有差异 ($P<0.05$)。

结论: 内质网应激相关蛋白抗体浓度 IRE1 为 1:1000、ATF6 为 1:500 和 1:1000、PERK 为 1:1500、GRP78 为 1:200、Caspase-12 为 1:100 时, 其在小鼠 RP 模型视网膜 IHC 染色阳性表达程度较适宜。

关键词: 视网膜色素变性; 内质网应激; 视网膜; 小鼠; 免疫组织化学染色

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.1.06

Experimental study on concentration selection of immunohistochemical antibodies for retinal endoplasmic reticulum stress

Xiao-Hong Chen^{1*}, Wan-Jiao Liang^{1,2*}, Shi-Shu Huang³, Yan Sun¹, Xin Luo⁴, Lu Lai⁴, Zhao-Sheng Chi⁴, Mei-Zhu Chen¹, Yun-Peng Wang¹, Wei-Ming Yan¹

Foundation items: the Outstanding Youth Training Project of the 900th Hospital of Joint Logistic of Support Force Chinese PLA (No. 2018Q02); Science and Technology Project of Fujian Province (No. 2020Y0076); Youth Project of Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2020J05282); Post-doctoral Project of Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region of Chinese People's Liberation Army (No.48678)

¹The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese PLA; Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University; Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China; ²Jinjiang Municipal Hospital; Shanghai Sixth People's Hospital Fujian Campus, Jinjiang 362200, Fujian Province, China; ³Tianjin Medical University Eye Hospital; School of Optometry and Eye Institute, Tianjin 300384, China; ⁴Fujian Medical University, Fuzhou 350122, Fujian Province, China
Co-first authors: Xiao-Hong Chen and Wan-Jiao Liang

Correspondence to: Wei-Ming Yan. The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese PLA; Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University; Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. 742666007@qq.com; Yun-Peng Wang. The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese PLA; Dongfang Hospital Affiliated to Xiamen University; Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. 34165596@qq.com

Received: 2022-01-23 Accepted: 2022-12-08

Abstract

• AIM: To explore the optimal concentration of endoplasmic reticulum stress immunohistochemical (IHC) staining antibody in mouse retinitis pigmentosa (RP) model, which provides the corresponding index detection method for studying the pathogenesis and intervention measures of RP.

• **METHODS:** Clean male C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with N-methyl-N-nitrosourea (MNU, 60mg/kg) to prepare RP mouse model. Electroretinogram (ERG) and hematoxylin-eosin (HE) staining were performed on 7d after modeling to verify the successful modeling. The expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins (IRE1, ATF6, PERK, GRP78, Caspase-12) was detected by IHC staining.

• **RESULTS:** The following proteins, including IRE1, ATF6, PERK, GRP78 and Caspase-12, were positively expressed in retina of RP mouse. The optimal concentrations of the above proteins were as follows: IRE1 antibody concentration was 1:1000, ATF6 antibody concentration was 1:500 and 1:1000 (with no difference in positive expression, $P > 0.05$), PERK antibody concentration was 1:1500, GRP78 antibody concentration was 1:200 and Caspase-12 antibody concentration was 1:100, the proteins were well expressed at the above concentrations, and the positive expressions of corresponding proteins were different from those of other antibody concentrations ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The optimal concentrations for IHC staining in different proteins of mouse RP models were as follows: the concentrations of endoplasmic reticulum stress-related protein antibodies were 1:1000 in IRE1, 1:500 and 1:1000 in ATF6, 1:1500 in PERK, 1:200 in GRP78, and 1:100 in Caspase-12.

• **KEYWORDS:** retinitis pigmentosa; endoplasmic reticulum stress; retina; mice; immunohistochemical staining

Citation: Chen XH, Liang WJ, Huang SS, et al. Experimental study on concentration selection of immunohistochemical antibodies for retinal endoplasmic reticulum stress. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(1):32-38

0 引言

应用已知抗体和抗原发生特异性结合,并通过化学反应使标记在结合后的特异性抗体上的显色剂(如荧光素、酶、金属离子和核素)显色,以确定组织细胞内抗原的存在,对其进行定位、定性及半定量研究,称为免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)^[1]。目前广泛应用于肿瘤疾病、感染疾病及药物靶向治疗等方面^[2]。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)反应主要包括三种通路,即肌醇需要酶1(inositol-requiring protein-1, IRE1)通路、转录激活因子6(activating transcription factor-6, ATF6)通路、蛋白激酶样内质网激酶(PKR-related ER kinase, PERK)通路。当发生ERS时,其上、下游多种相关信号分子亦发生相应的改变,本研究选用葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶12(cysteinylnyl aspartate specific proteinase 12, Caspase-12)作为反应ERS的上、下游分子的检测指标。

近年研究发现,多种视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)模型中内质网有异常蛋白堆积,有相应

ERS反应发生^[3-5];目前在RP动物模型的构建中,N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)诱导的RP模型已被广泛报道^[6-8]。IHC亦应用于ERS通道研究^[9-13],但其在ERS通道相关抗体使用浓度缺乏统一标准,且因实验标本不同,根据抗体说明书建议稀释比例进行IHC,其结果可能过强或较弱。因此,本研究选用MNU诱导的小鼠RP模型,应用IHC技术检测其视网膜ERS反应通路,探讨IRE1、ATF6、PERK、GRP78、Caspase-12抗体的最佳使用浓度,以期研究RP发病机制及干预措施提供相应指标的检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级、健康雄性C57BL/6J小鼠[上海昇傲生物科技有限公司, SCXK(沪)2021-0002], 6~8周龄,体质量16~20g。于室温22℃~25℃、明暗交替12h/12h的环境中适应性饲养14d,食水不限。实验动物的使用遵循视觉与眼科研究协会(Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO)相关规定,并通过伦理审查(2021-001)。

1.1.2 主要试剂与器材 戊巴比妥钠溶液(上海行知化工厂, 1%体积质量比);盐酸赛拉嗪注射液[商品名:陆眠宁,吉林省华牧动物保健品有限公司;规格:2mL:0.2g;批号:兽药字(2015)070011777];N-甲基-N-亚硝基脲(MNU,上海阿拉丁生化科技股份有限公司, N136701-1g), 4℃环境储存于惰性气体中,使用前立即溶解于含0.05%醋酸的盐水中;粉剂型抗原修复液(柠檬酸法)(福州迈新生物技术开发有限公司, MVS-0066);抗体稀释液(北京中杉金桥生物技术有限公司, ZLI-9030);小鼠二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, PV-9002);兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, PV-9001);Anti-IRE1抗体(美国 abcam, ab37073);Anti-ATF6抗体(美国 abcam, ab203119);PERK抗体(B-5)(美国 santa cruz, sc-377400);BiP(C50B12) Rabbit mAb (GRP78)(美国 Cell Signaling Technology, 3177S);Caspase-12抗体(1611)(美国 santa cruz, sc-21747)。电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司, SECURA124-1CN);组织包埋机(LEICA, EG1150);自动脱水机(LEICA, ASP300S);石蜡切片机(LEICA, RM2245);隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司, GHP-9080);光学显微镜(OLYMPUS, BX53)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 取8只C57BL/6J小鼠,采用随机分组法分为正常组(N)和造模组(M),每组4只,分别腹腔注射生理盐水和60mg/kg MNU^[14],造模后第7d时分别对小鼠进行视网膜电图(electroretinogram, ERG)检测及摘取小鼠眼球行苏木精-伊红(HE)染色组织切片,以观察到ERG呈熄灭型、HE染色组织切片上视网膜外核层感光细胞消失为小鼠RP模型造模成功。

1.2.2 ERG检测 完全暗适应2h以上,采用戊巴比妥钠(0.3mL/100g)和盐酸赛拉嗪注射液(0.01mL)联合腹腔注射麻醉小鼠,复方托吡卡胺滴眼液点眼散瞳,安装电极(记录电极置于小鼠右眼角膜中央,参考电极置于小鼠同侧颊部,接地电极插于小鼠尾部皮下)。固定小鼠于

Ganzfeld 刺激器前,运用 RETI-SCAN 视觉电生理检查系统(德国 Roland Consult 公司)进行国际临床视觉电生理学会(International Society for Clinical Electrophysiology of Vision,ISCEV)ERG 五项检测,包括暗适应 0.01 反应、暗适应 3.0 反应、暗适应 Ops 波反应、明适应 3.0 反应、明适应 Flicker 反应(明适应反应检测前进行 10min 标准光强明适应)^[15]。

1.2.3 组织切片制作 ERG 检查结束后,注射大剂量戊巴比妥钠溶液使小鼠死亡,立即摘取右侧眼球,置于混合固定液(冰乙酸、甲醛、生理盐水、75%乙醇按 1:2:7:10 比例配制)中 2h 后,用注射器在眼球角膜中央扎一小孔,放回固定液中继续固定 24h^[16]。将固定 24h 后的眼球置于自动脱水机中,经梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡后制成石蜡标本。在组织包埋机上,按瞳孔-晶状体-视神经轴方向固定眼球,进行包埋,待石蜡凝聚成块后,在旋转石蜡切片机上,每个眼球沿瞳孔-视神经轴方向切片,取经视神经连续 6 张切片,厚度为 4 μ m,摊片、捞片。

1.2.4 HE 染色 组织切片在烤片机上 70 $^{\circ}$ C 烤片 20min,脱蜡至水,HE 染色后树脂封片。光学显微镜下观察小鼠眼球组织切片结构。

1.2.5 IHC 染色 将恒温水箱 70 $^{\circ}$ C 烤片 1h 的切片经脱蜡、复水、抗原修复后,3% H₂O₂ 中室温封闭 10min,PBS 冲洗后,滴加一抗(阴性对照用 PBS 代替一抗,根据说明书及目前相关研究报道,按以下浓度稀释抗体:IRE1 1:125、1:250、1:500、1:1000、1:2000;ATF6 1:100^[17]、1:250、1:500、1:1000^[18]、1:2000;PERK 1:100^[19-20]、1:500、1:1000、1:1500;GRP78 1:100^[21-22]、1:200^[23-24]、1:500^[25];Caspase-12 1:100^[26]、1:500、1:1000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;PBS 冲洗后,37 $^{\circ}$ C 环境先后滴加增强剂、二抗,各孵育 20min;DAB 显色剂显色,苏木精复染,乙醇脱水透明封片。光学显微镜下观察,并于视乳头旁 500 μ m 处拍摄高倍镜(40 \times 10)视野照片,通过图像分析软件 Image J 对视网膜内质网应激蛋白染色阳性信号进行定量分析。

统计学分析:采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析,采用 Prism 8.0 软件制作统计图表。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验(方差齐性时)或 Dunnett's T3 检测(方差不齐时)。P<0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RP 小鼠模型造模情况 腹腔注射给药后第 7d 时,正常组小鼠视网膜各层组织结构排列整齐,未见明显变化,ERG 暗、明适应 3.0 反应均可见 b 波;而造模组小鼠视网膜外核层细胞基本消失,且 ERG 暗、明适应 3.0 反应的 b 波均消失,ERG 波形大致呈熄灭型,表明小鼠 RP 模型建立成功(图 1)。

2.2 RP 小鼠视网膜 ERS 相关蛋白 IHC 染色

2.2.1 RP 小鼠视网膜 IRE1 蛋白 IHC 染色结果 IHC 染色结果显示,IRE1 抗体浓度为 1:125、1:250、1:500 时,全视网膜(包括细胞核、细胞浆)均呈棕色;IRE1 抗体浓度为 1:1000、1:2000 时,视网膜神经节细胞层中神经节细胞呈阳性表达,内核层部分细胞呈阳性表达,外核层细胞呈绕核阳性表达,其余视网膜结构层均呈淡棕色,见图 2A。

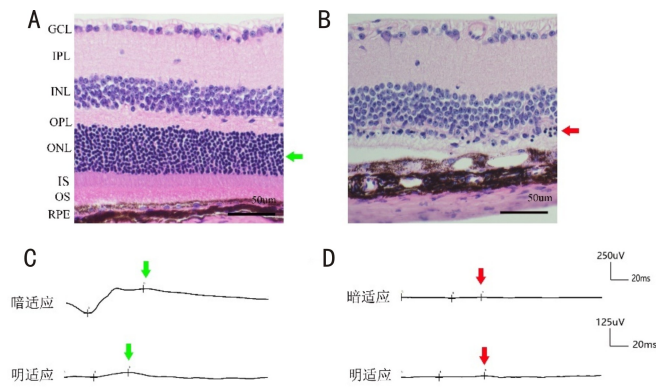


图 1 正常组和造模组小鼠视网膜形态与功能检测结果 A: HE 染色显示正常组小鼠视网膜各层形态结构正常(绿色箭头示视网膜外核层);B: HE 染色显示造模组小鼠视网膜外核层细胞凋亡(红色箭头示视网膜外核层);C: 正常组小鼠造模后第 7d ERG 暗、明适应 3.0 反应均可见 b 波振幅的代表性波形(绿色箭头示 b 波位置);D: 造模组小鼠造模后第 7d ERG 暗、明适应 3.0 反应均可见 b 波振幅消失的代表性波形(红色箭头示 b 波位置)。RPE:视网膜色素上皮层;OS:外节;IS:内节;ONL:外核层;OPL:外丛状层;INL:内核层;IPL:内丛状层;GCL:神经节细胞层。

IRE1 抗体浓度为 1:125、1:250、1:500、1:1000、1:2000 时,RP 小鼠视网膜 IRE1 阳性表达分别为(32.93 \pm 3.44)%、(34.33 \pm 2.59)%、(33.56 \pm 2.63)%、(29.89 \pm 2.77)%、(21.90 \pm 2.39)%,差异有统计学意义($F = 54.996, P < 0.001$),其中除 IRE1 抗体浓度为 1:125、1:250、1:500 时,IRE1 蛋白阳性表达两两比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),其余抗体浓度 IRE1 蛋白阳性表达两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 2B。

2.2.2 RP 小鼠视网膜 ATF6 蛋白 IHC 染色结果 IHC 染色结果显示,视网膜内节层至神经节细胞层均可见阳性表达,其中神经节细胞层、内核层、外核层为核周表达,神经节细胞层、内核层中少数细胞呈阳性表达,且表达强度随 ATF6 抗体稀释倍数增加而减弱,见图 3A。ATF6 抗体浓度为 1:100、1:250、1:500、1:1000、1:2000 时,RP 小鼠视网膜 ATF6 蛋白阳性表达分别为(33.47 \pm 2.96)%、(32.48 \pm 1.30)%、(25.27 \pm 1.07)%、(25.42 \pm 2.14)%、(13.02 \pm 1.98)%,差异有统计学意义($F = 348.948, P < 0.001$),其中除 ATF6 抗体浓度为 1:100、1:250 时和 ATF6 抗体浓度为 1:500、1:1000 时,ATF6 蛋白阳性表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),其余抗体浓度 ATF6 蛋白阳性表达两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 3B。

2.2.3 RP 小鼠视网膜 PERK 蛋白 IHC 染色结果 IHC 染色结果显示,PERK 抗体浓度为 1:100 时,全视网膜呈强阳性表达,PERK 抗体浓度为 1:500、1:1000、1:1500 时,除神经节细胞层、内核层及外核层的细胞核外,其余视网膜结构均呈阳性表达,见图 4A。PERK 抗体浓度为 1:100、1:500、1:1000、1:1500 时,PERK 蛋白阳性表达分别为(68.03 \pm 6.84)%、(38.51 \pm 3.91)%、(39.18 \pm 5.78)%、(31.90 \pm 5.76)%,差异有统计学意义($F = 153.712, P < 0.001$),其中除 PERK 抗体浓度为 1:500、1:1000 时,PERK 蛋白阳性表达差异无统计学意义($P > 0.05$),其余抗体浓度 PERK 蛋白阳性表达两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 4B。

2.2.4 RP 小鼠视网膜 GRP78 蛋白 IHC 染色结果 IHC 染色结果显示,视网膜神经节细胞层、内核层表现为绕核

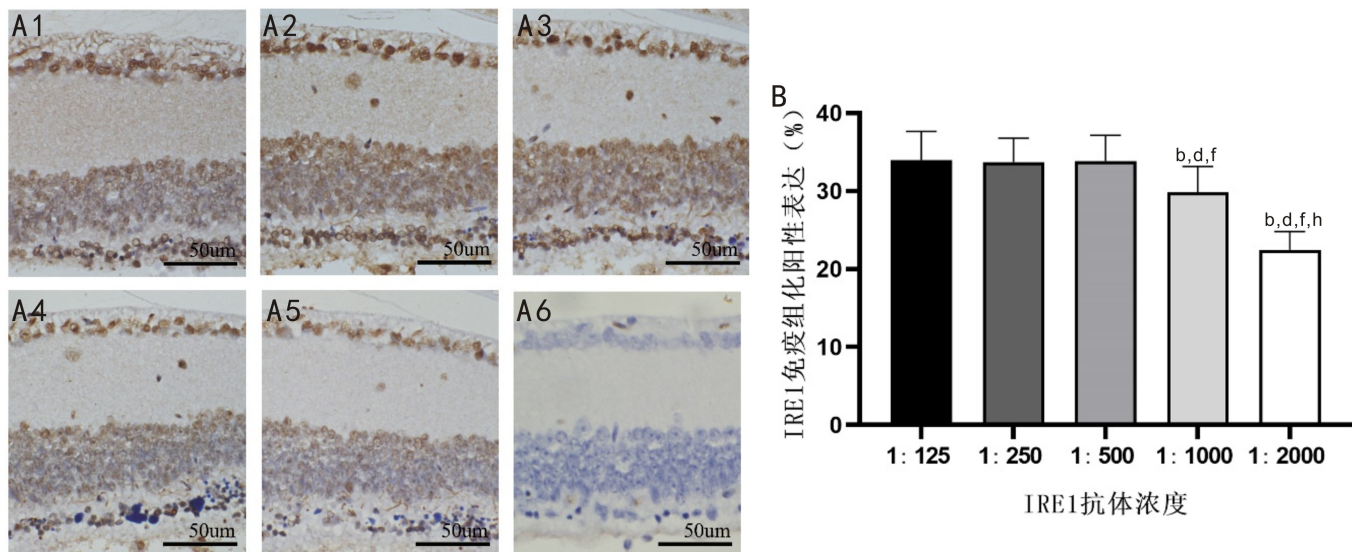


图2 RP小鼠视网膜不同浓度IRE1抗体IHC染色结果 A:IRE1不同抗体浓度IHC染色典型图,A1:1:125;A2:1:250;A3:1:500;A4:1:1000;A5:1:2000;A6:阴性对照。B:定量分析各抗体浓度IHC染色阳性表达结果,^b $P<0.01$ vs IRE1抗体浓度1:125;^d $P<0.01$ vs IRE1抗体浓度1:250;^f $P<0.01$ vs IRE1抗体浓度1:500;^h $P<0.01$ vs IRE1抗体浓度1:1000。

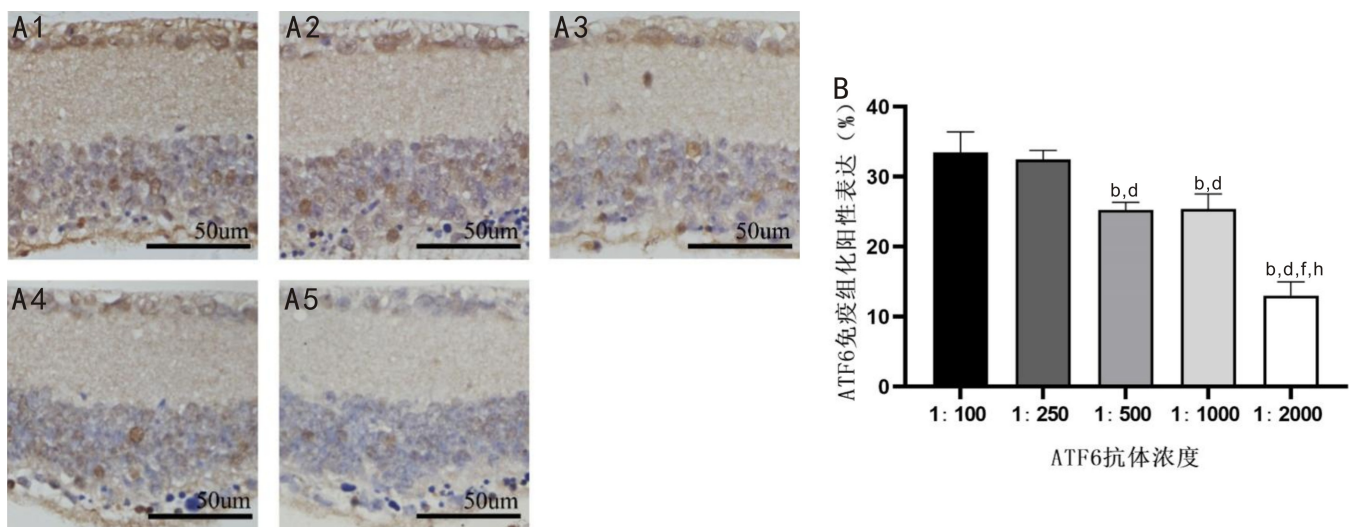


图3 RP小鼠视网膜不同浓度ATF6抗体IHC染色结果 A:ATF6不同抗体浓度IHC染色典型图,A1:1:100;A2:1:250;A3:1:500;A4:1:1000;A5:1:2000。B:定量分析各抗体浓度IHC染色阳性表达结果,^b $P<0.01$ vs ATF6抗体浓度1:100;^d $P<0.01$ vs ATF6抗体浓度1:250;^f $P<0.01$ vs ATF6抗体浓度1:500;^h $P<0.01$ vs ATF6抗体浓度1:1000。

阳性表达,其中神经节细胞层少数细胞呈阳性反应,内核层及外核层个别细胞呈阳性反应,且随抗体稀释倍数增加阳性表达减弱,见图5A。GRP78抗体浓度为1:100、1:200、1:500时,RP小鼠视网膜GRP78蛋白阳性表达分别为 $(15.32\pm 3.57)\%$ 、 $(12.75\pm 2.35)\%$ 、 $(10.75\pm 2.78)\%$,差异有统计学意义($F=12.740, P<0.001$),且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图5B。

2.2.5 RP小鼠视网膜Caspase-12蛋白IHC染色结果

IHC染色结果显示,除视网膜神经节细胞层、内核层及外核层细胞核外,其余视网膜结构均呈阳性表达,见图6A。Caspase-12抗体浓度为1:100、1:500、1:1000时,RP小鼠视网膜Caspase-12蛋白阳性表达分别为 $(24.24\pm 4.30)\%$ 、 $(14.26\pm 2.21)\%$ 、 $(12.26\pm 1.46)\%$,差异有统计学意义($F=96.978, P<0.001$),且两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图6B。

3 讨论

IHC染色通过已知一抗及相应二抗与特定目标分子

反应,再通过酶标抗体染色法,使目标分子在普通显微镜下即可直接观察其分布情况。目前RP相关研究中,常使用免疫荧光染色技术(IF)进行亚细胞器定位;然而IF染色信号需通过荧光显微镜或共聚焦显微镜显现,技术要求相对较高^[27]。内质网是细胞内细胞器的一种,负责细胞内多种蛋白的折叠、加工。ERS是由于正常内质网的内环境受到多种因素刺激后导致蛋白折叠异常、堆积,最终引起细胞功能紊乱,甚至引起细胞凋亡,造成相应疾病的产生,其中包括RP。运用IHC技术检测ERS通道相关蛋白,包括ATF6、PERK、IRE1、GRP78、Caspase-12,根据其阳性反应强度变化,可大致判断ERS三条通路在RP中的参与程度,探索其发病机制,具有简单可行性。

然而,目前关于应用IHC研究ERS相关蛋白的抗体浓度及染色方法未见详细统一报道。Crespo等^[28]于2012年探索谷氨酰胺对实验性炎性肠病大鼠ERS和细胞凋亡的影响,对结肠标本行IHC染色时,使GRP78抗体与标本4℃孵育过夜,未明确提及抗体稀释比例。Liu等^[29]在

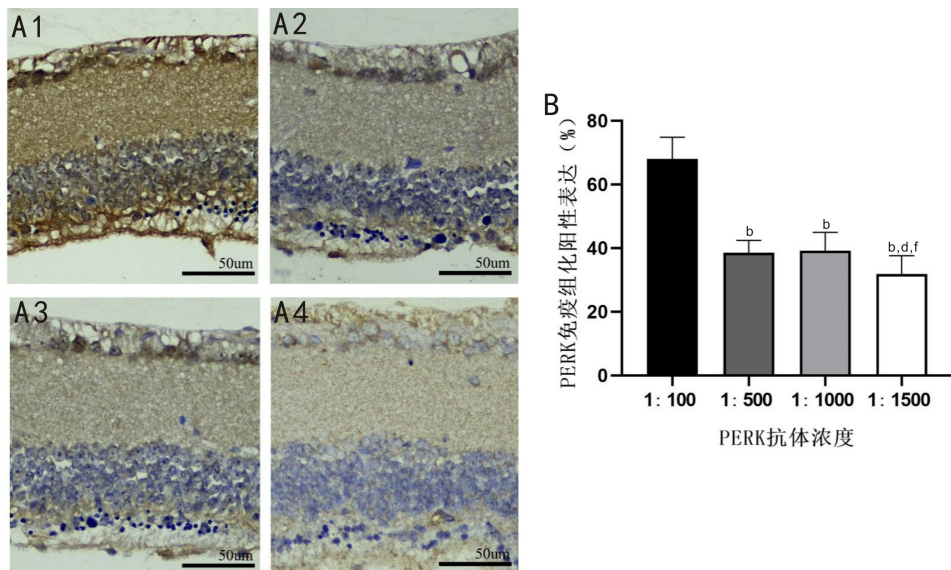


图4 RP小鼠视网膜不同浓度PERK抗体IHC染色结果 A:PERK不同抗体浓度IHC染色典型图,A1:1:100;A2:1:500;A3:1:1000;A4:1:1500。B:定量分析各抗体浓度IHC染色阳性表达结果,^b $P<0.01$ vs PERK抗体浓度1:100;^d $P<0.01$ vs PERK抗体浓度1:500;^f $P<0.01$ vs PERK抗体浓度1:1000。

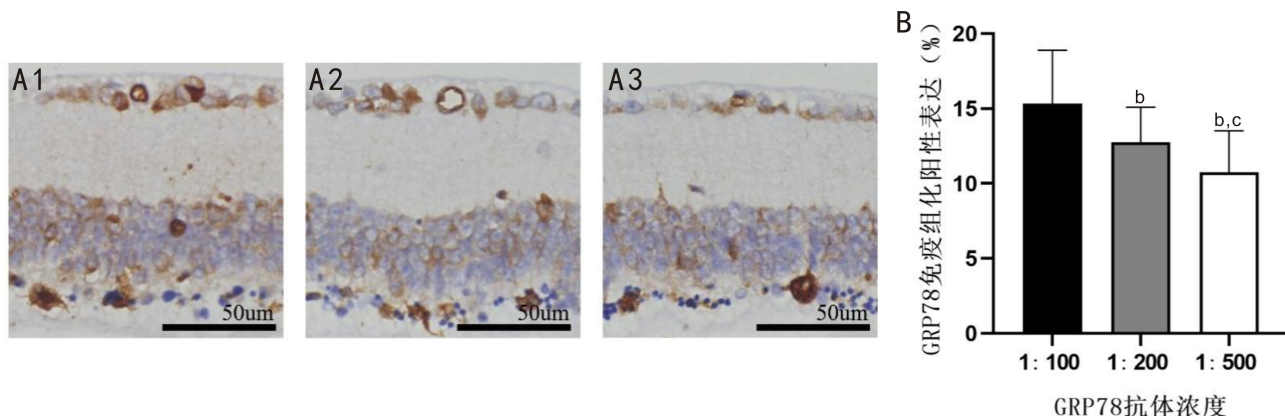


图5 RP小鼠视网膜不同浓度GRP78抗体IHC染色结果 A:GRP78不同抗体浓度IHC染色典型图,A1:1:100;A2:1:200;A3:1:500。B:定量分析各抗体浓度IHC染色阳性表达结果,^b $P<0.01$ vs GRP78抗体浓度1:100;^c $P<0.05$ vs GRP78抗体浓度1:200。

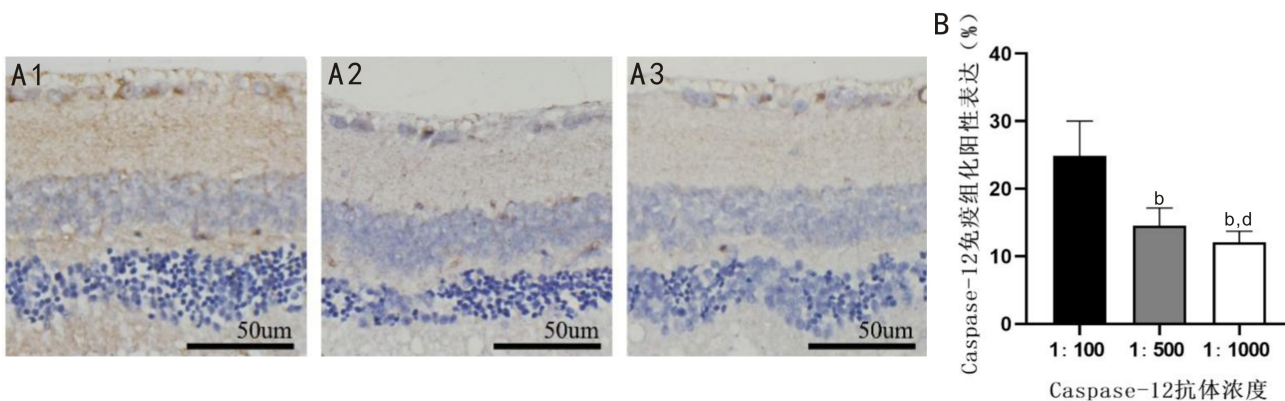


图6 RP小鼠视网膜不同浓度Caspase-12抗体IHC染色结果 A:Caspase-12不同抗体浓度IHC染色典型图,A1:1:100;A2:1:500;A3:1:1000。B:定量分析各抗体浓度IHC染色阳性表达结果,^b $P<0.01$ vs Caspase-12抗体浓度1:100;^d $P<0.01$ vs Caspase-12抗体浓度1:500。

2015年研究氟中毒成骨细胞ERS反应时,应用IHC检测氟暴露Wistar大鼠骨组织,其中GRP78、Caspase-12抗体稀释比例为1:100。2016年,Guo等^[23]研究ERS是否参与镍肾毒性机制时,应用稀释比例为1:200的GRP78抗体与氯化镍(NiCl_2)激活的肉仔鸡肾脏组织在4℃孵育过夜。Hirai等^[30]于2018年研究ER在麻风病发病机制中的意

义,对麻风病患者标本进行IHC检测,其中GRP78、PERK、IRE1 α 和ATF6抗体按1:100比例稀释,孵育时间为14h。2020年,Samanta等^[31]研究ERS与卵巢癌的相关性时,采用IHC染色检测患者标本时,GRP78、PERK、ATF6抗体孵育30~60min,未明确提及稀释比例。

不同疾病模型中,ERS反应参与程度不同,且实验组

织标本各异,因此若简单根据抗体说明书提供的 IHC 抗体稀释比例及抗体孵育时间或不同疾病、组织的相关研究数据进行实验,最终 IHC 染色结果差异较大,未能达到实验者所需的最适阳性表达。目前尚无 IHC 应用于视网膜 ERS 反应相关指标的详细研究报道,而本研究前期预实验发现 ATF6、PERK 抗体单纯根据说明书建议的稀释比例进行 IHC 染色,均未能得到较满意的 IHC 染色结果。因此,本研究针对 RP 小鼠模型,将 ERS 通路中的相关抗体根据说明书及在现有相关研究的基础上,各设置 3 个及以上稀释浓度,孵育时间均为 1h,以便后期根据其阳性表达程度,选择合适的抗体浓度检测相应指标。结果发现,IRE1、ATF6、PERK、GRP78、Caspase-12 不同抗体浓度均可在视网膜呈阳性表达,但其强弱程度不同。IRE1 抗体浓度为 1:125、1:250、1:500 时 IRE1 蛋白阳性表达无区别,且均呈强阳性,IRE1 抗体浓度为 1:1000 时阳性表达较适宜,IRE1 抗体浓度 1:2000 时内核层阳性表达明显减弱,这与麻风病组织 IHC 染色时所使用的 1:100 IRE1 抗体孵育 14h 具有明显差异^[30]。ATF6 抗体浓度为 1:100 和 1:250 时其蛋白阳性表达在视网膜各层结构均较强、无法区别,ATF6 抗体浓度为 1:500 和 1:1000 时 ATF6 蛋白阳性表达适宜,ATF6 抗体浓度为 1:2000 时其阳性表达在神经节细胞层、内核层、外核层均不显著,而麻风病组织 IHC 染色时采用 1:100 ATF6 抗体孵育 14h^[30],卵巢癌组织 ATF6 抗体(未说明抗体浓度)IHC 染色一抗孵育时间为 30~60min^[31],均与本研究不同。PERK 抗体各浓度阳性表达均较强,PERK 抗体浓度为 1:1500 时其目标蛋白阳性表达仍较适宜,本研究中 1:1500 的 PERK 抗体稀释比例远远低于麻风病组织所使用的 1:100 PERK 抗体稀释浓度,且孵育时间明显缩短^[30]。GRP78 抗体浓度为 1:200 时,其在 RP 小鼠视网膜神经节细胞层中与内核层中绕核阳性表达清晰、强度适宜,目前已有的相关研究中,GRP78 较常用的稀释比例为 1:100^[28,31],亦可见 1:200 的抗体稀释比例^[23],但其一抗孵育时间均远大于本研究抗体孵育时间。Caspase-12 抗体浓度为 1:100 时,在视网膜阳性表达较强,Caspase-12 抗体浓度为 1:500、1:1000 时,Caspase-12 蛋白阳性表达不明显,这与氟中毒成骨细胞 ERS 反应的相关研究所使用的抗体浓度相符^[29]。

本研究结果表明,小鼠 RP 模型视网膜 ERS 通路相关抗体 IRE1 抗体浓度为 1:1000、ATF6 抗体浓度为 1:500 和 1:1000、PERK 抗体浓度为 1:1500、GRP78 抗体浓度为 1:200、Caspase-12 抗体浓度为 1:100,一抗孵育时间为 1h 时,均可获得阳性表达强度较适宜的 IHC 检测结果,可在一定范围内作为后续研究 RP 中 ERS 发病机制及干预措施疗效提供具体指标检测参考。未来将在本研究基础上扩大实验动物数量、进一步探索 MNU 诱导的 RP 小鼠发病过程中视网膜 ERS 反应通路中各通路参与其发病机制的情况。

参考文献

1 丁伟,王德田.简明病理学技术.杭州:浙江科学技术出版社 2014; 133
2 成克伦.改良手工免疫组化在病理诊断中的应用.中国校医 2017;

31(2): 158-159, 161
3 Kang MJ, Chung J, Ryoo HD. CDK5 and MEK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. *Nat Cell Biol* 2012; 14(4): 409-415
4 Yu MZ, Yan WM, Beight C. Lutein and Zeaxanthin isomers reduce photoreceptor degeneration in the Pde6b^{ml0} mouse model of retinitis pigmentosa. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 4374087
5 Park JE, Tr n TXT, Park N, et al. The function of Drosophila USP14 in endoplasmic Reticulum stress and retinal degeneration in a model for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Biology (Basel)* 2020; 9(10): 332
6 Tsubura A, Yoshizawa K, Kuwata M, et al. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histol Histopathol* 2010; 25(7): 933-944
7 金玮,邢怡桥,梅海峰,等. Rhodopsin 和 recoverin 在 MNU 诱导的光感受器损伤中的表达变化. *国际眼科杂志* 2014; 14(10): 1755-1759
8 Lin FL, Lin CH, Ho JD, et al. The natural retinoprotectant chrysophanol attenuated photoreceptor cell apoptosis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mouse model of retinal degeneration. *Sci Rep* 2017; 7: 41086
9 Lie MRKL, van der Giessen J, Fuhler GM, et al. Low dose Naltrexone for induction of remission in inflammatory bowel disease patients. *J Transl Med* 2018; 16(1): 55
10 Yang KL, Zeng LT, Ge AQ, et al. The effect of Hedysarum multijugum maxim.-Chuanxiong rhizoma compound on ischemic stroke: a research based on network and experimental pharmacology. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 6072380
11 Zhao DM, Han F, Shi YX. Effect of glucose-regulated protein 94 and endoplasmic reticulum modulator caspase-12 in medial prefrontal cortex in a rat model of posttraumatic stress disorder. *J Mol Neurosci* 2014; 54(2): 147-155
12 Xiong ZY, Jiang R, Zhang P, et al. Transmission of ER stress response by ATF6 promotes endochondral bone growth. *J Orthop Surg Res* 2015; 10: 141
13 Denk B, Cordasic N, Huebner H, et al. No evidence of the unfolded protein response in the placenta of two rodent models of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Biol Reprod* 2021; 105(2): 449-463
14 Yuge K, Nambu H, Senzaki H, et al. N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina. *In Vivo* 1996; 10(5): 483-488
15 严伟明.动物视网膜色素变性及氢分子对其干预效果的研究.中国人民解放军空军军医大学 2018
16 罗灿娟,梁英杰,吴惠群,等.小鼠眼球标本固定液及制片方法的改进. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2007; 16(1): 124-125
17 Ogata S, Kameda K, Kono T, et al. Expressions of ATF6, XBP1, and GRP78 in normal tissue, atypical adenomatous hyperplasia, and adenocarcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2019; 83: 22-28
18 Yao F, Jiang DD, Guo WH, et al. FABP4 inhibitor attenuates inflammation and endoplasmic reticulum stress of islet in leptin receptor knockout rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24(24): 12808-12820
19 Pinyol R, Montal R, Bassaganyas L, et al. Molecular predictors of prevention of recurrence in HCC with sorafenib as adjuvant treatment and prognostic factors in the phase 3 STORM trial. *Gut* 2019; 68(6): 1065-1075

- 20 Shimizu A, Kaira K, Yasuda M, *et al.* Clinical and pathological significance of ER stress marker (BiP/GRP78 and PERK) expression in malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 2017; 23(1): 111-116
- 21 Zhang J, Dong XJ, Ding MR, *et al.* Resveratrol decreases high glucose - induced apoptosis in renal tubular cells via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep* 2020; 22(5): 4367-4375
- 22 Pavli M, Farnaki E, Merkourea S, *et al.* Endoplasmic Reticulum stress - associated chaperones, bip/GRP78 and calnexin are overexpressed in keratocystic odontogenic tumours. *J Oral Maxillofac Res* 2014; 5(1): e3
- 23 Guo HR, Cui HM, Peng X, *et al.* Nickel chloride (NiCl₂) induces endoplasmic reticulum (ER) stress by activating UPR pathways in the kidney of broiler chickens. *Oncotarget* 2016; 7(14): 17508-17519
- 24 Dauer P, Sharma NS, Gupta VK, *et al.* GRP78-mediated antioxidant response and ABC transporter activity confers chemoresistance to pancreatic cancer cells. *Mol Oncol* 2018; 12(9): 1498-1512
- 25 Kwon D, Koh J, Kim S, *et al.* Overexpression of endoplasmic reticulum stress - related proteins, XBP1s and GRP78, predicts poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2018; 122: 131-137
- 26 Yang YY, Shang J, Liu HG. Role of endoplasmic reticular stress in aortic endothelial apoptosis induced by intermittent/persistent hypoxia. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(23): 4517-4523
- 27 Mori H, Cardiff RD. Methods of immunohistochemistry and immunofluorescence: converting invisible to visible. *Methods Mol Biol Clifton N J* 2016; 1458: 1-12
- 28 Crespo I, San - Miguel B, Prause C, *et al.* Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis. *PLoS One* 2012; 7(11): e50407
- 29 Liu L, Zhang Y, Gu HF, *et al.* Fluorosis induces endoplasmic Reticulum stress and apoptosis in osteoblasts *in vivo*. *Biol Trace Elem Res* 2015; 164(1): 64-71
- 30 Hirai KE, de Sousa JR, Silva LM, *et al.* Endoplasmic Reticulum stress markers and their possible implications in leprosy's pathogenesis. *Dis Markers* 2018; 2018: 7067961
- 31 Samanta S, Tamura S, Dubeau L, *et al.* Clinicopathological significance of endoplasmic reticulum stress proteins in ovarian carcinoma. *Sci Rep* 2020; 10(1): 2160