

小鼠部分组织器官石蜡切片制作方法的改良

陈思怀, 李德龙, 高继业 (西南大学动物医学院, 重庆 402460)

摘要 为了克服小鼠组织器官传统石蜡切片制作方法存在组织易碎、结构不完整的缺点, 对传统石蜡切片制作进行了改良。将浸蜡前的透明步骤改为异硬脂醇与石蜡混合液处理, 替代苯类透明剂制作空肠、脾脏 2 种器官的石蜡切片, 并以切片机切片时蜡带质量和 HE 染色后镜下质量为切片制作效果的评定指标。结果表明, 2 种器官在切片机上均能切出完整、较长的蜡带, 组织块无硬化、不碎裂, 展片平整; HE 染色过程中不掉片, 染色后光镜下细胞质与细胞核染色对比清晰, 器官组织结构完整。就脾脏和空肠而言, 应用异硬脂醇与石蜡混合液替代苯类透明剂能制作出优良的石蜡切片。

关键词 石蜡切片; 异硬脂醇; 透明剂; 小鼠

中图分类号 R 361.2 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2021)11-0094-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.11.025



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Improvement of Preparation Method of Paraffin Sections of Some Tissues and Organs in Mice

CHEN Si-huai, LI De-long, GAO Ji-ye (College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460)

Abstract In order to overcome the defects of fragile tissue and incomplete structure in the traditional paraffin section preparation method of mice tissues and organs, the traditional preparation method of paraffin section was improved. Paraffin sections about jejunum and spleen were made with the mixed solution of isostearin and paraffin instead of benzene transparent agents. The quality of ribbon and microscopic observation after HE staining were selected as judgment indices. The results showed that two kinds of representative organs could be cut into long and complete wax bandes on the microtome, and flatten out with no hardening or non-fragmentation. After HE staining, the cytoplasm and nucleus were stained clearly, and the structures of organs and tissues were intact. As for jejunum and spleen, the mixture of isostearic alcohol and paraffin could be used to treat the tissues instead of benzene transparent agents to make good paraffin sections.

Key words Paraffin section; Isostearic alcohol; Transparent agent; Mice

小鼠作为实验动物, 其组织器官在大小、质地等方面不同于成年畜禽, 如小肠壁薄、肝细胞脂类丰富、脾脏小等。在开展教学或病理石蜡切片制作时, 采用传统制片方法, 以二甲苯作为浸蜡前透明剂, 容易造成切片破碎、组织分离或结构龟裂。鉴于二甲苯等苯类物质对健康的危害以及处理组织块需特定技术与经验等缺点, 许多学者报道了应用无毒的硬脂酸(十八烷酸)与石蜡的混合液替代浸蜡前二甲苯透明剂的使用, 并成功制作出优良的动物组织石蜡切片^[1-2]。但是, 该方法有以下缺点: 一是细胞内硬脂酸若未被石蜡置换完全, 容易导致染色掉片, 影响镜下观察效果; 二是硬脂酸熔点高, 与石蜡混合需较高的温度($\geq 67\text{ }^{\circ}\text{C}$)来保持熔融状态, 这使小鼠组织器官更容易硬化、脆化^[3]。异硬脂醇(异构十八烷醇)是一类 C18 饱和支链脂肪醇混合物, 常温下呈液态, 无色、无味、无毒^[4-5]。研究发现, 异硬脂醇与石蜡、乙醇相容性好, 符合浸蜡前透明剂的特征, 但目前国内外尚无应用异硬脂醇开展石蜡切片的报道。笔者选择异硬脂醇作为透明剂, 制作小鼠空肠(代表中空性器官)、脾脏(代表实质性器官)的石蜡切片, 旨在为传统石蜡切片制作方法的改良奠定基础, 为病理诊断或教学应用的石蜡切片制作提供参考。

1 材料与方

1.1 动物组织 4%甲醛固定的健康小鼠(清洁级)空肠、脾脏器官。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂有异硬脂醇(AR 级, 山东优索化工有限公司)、软蜡(48~50 $^{\circ}\text{C}$, 上海华永石蜡有限公

司)、硬蜡(56 $^{\circ}\text{C}$, Leica, USA)等; 主要仪器有石蜡切片机(Leica RM2015, 上海莱卡仪器有限公司)。

1.3 试验方法 取固定好的组织块按常规修块(实质性器官厚 1 mm, 中空性器官长 3 mm)、流水冲洗、梯度乙醇脱水(70%~100%, 每级 1.5 h), 再经异硬脂醇与软蜡的混合液(1:4)置换 2 h(混合液 I、II 2 级, 每级 1 h, 52 $^{\circ}\text{C}$), 浸透硬蜡 2 h(硬蜡 I、II 2 级, 每级 1 h, 58 $^{\circ}\text{C}$), 包埋后 5 μm 切片, 42 $^{\circ}\text{C}$ 展片, 其他步骤(脱蜡、染色、透明、封片)同传统制片法。最后, 以切片机切片时蜡带质量和 HE 染色后镜下切片质量作为改良方法的评价依据。

2 结果与分析

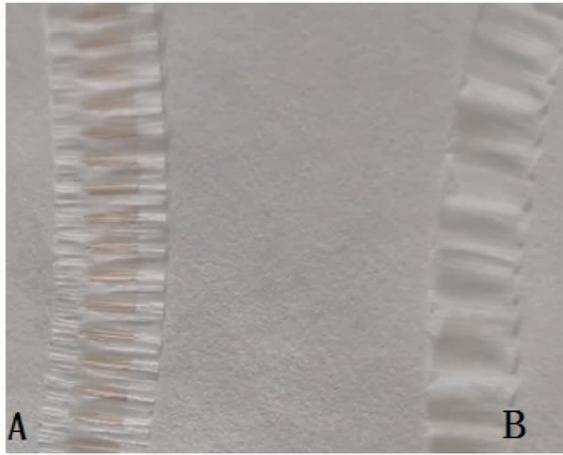
2.1 蜡带质量 2 种组织器官 12 μm 修块时均表现为软硬适中, 未出现组织块硬化碎裂和切片的严重褶缩, 表明浸蜡充分。5 μm 切片时未见蜡片破碎、压缩, 并能形成较长的连续蜡带(图 1)。蜡带在温水中展片能快速展平, 厚薄均匀, 切片中的组织完整, 与周围石蜡紧密融合, 未见分离(图 2)。

2.2 光镜下切片质量 空肠切片低倍镜下可见肠壁的黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜层 4 层结构完整; 高倍镜下可见纵切或横切的绒毛, 未见制片造成的上皮脱落, 绒毛的单层柱状上皮完整, 核质对比清晰, 绒毛表面的微绒毛(纹状缘)清楚(图 3), 其余 3 层结构未见分离, 尤其浆膜保留完整(图 4)。脾脏在低倍镜下富含平滑肌的被膜结构完好, 实质内白髓区、红髓区染色对比均清晰, 固有结构完整, 未见因制片原因造成的龟裂(图 5); 高倍镜下细胞形态正常, 白髓区的中央动脉、动脉周围淋巴鞘结构清楚; 红髓区的脾索、脾窦结构未见人为断裂与破损(图 6)。由此可见, 2 种切片的制备质量均符合教学要求和病理诊断观察要求。

基金项目 西南大学实验技术研究项目(SYJ2019016)。

作者简介 陈思怀(1975—), 男, 四川泸州人, 副教授, 硕士, 从事动物组织学与胚胎学教学与科研工作。

收稿日期 2020-10-24

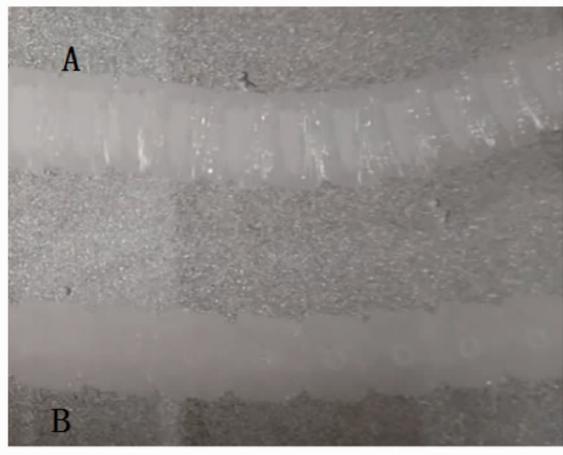


注:A.脾;B.空肠

Note: A. Spleen; B. Jejunum

图 1 2 种器官的切片蜡带

Fig. 1 Sectional wax tape of two organs

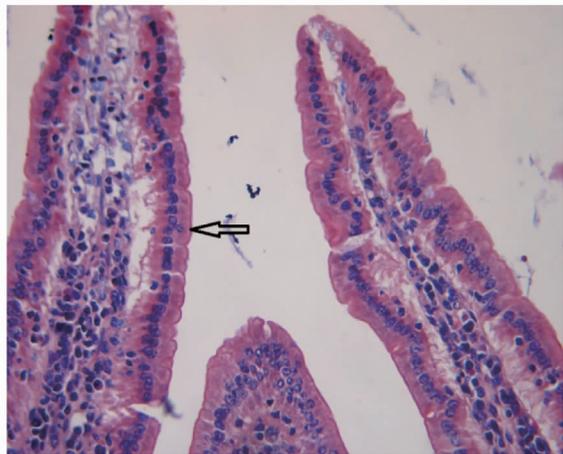


注:A.脾;B.空肠

Note: A. Spleen; B. Jejunum

图 2 2 种器官蜡带温水展片

Fig. 2 The wax strips with warm water of two organs

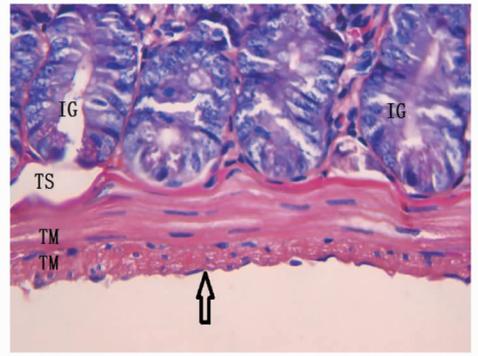


注:箭头表示纹状缘

Note: The arrow showed striate border

图 3 空肠绒毛 HE 染色结果 (400×)

Fig. 3 HE staining results of jejunum villi (400X)

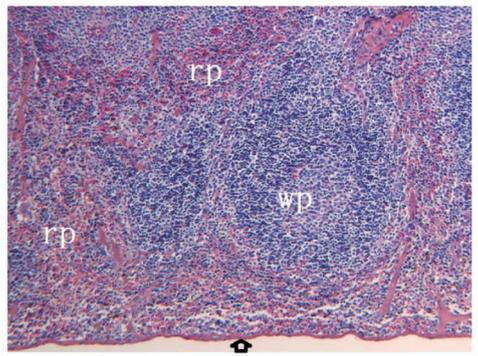


注:IG. 肠腺;TS. 黏膜下层;TM. 肌肉层;箭头示浆膜

Note: IG. Intestinal glands; TS. Submucosa; TM. Muscle layer; the arrow showed serous membrane

图 4 空肠肠壁部分结构 HE 染色结果 (400×)

Fig. 4 HE staining results of the structure of part of the jejunum intestinal wall (400×)

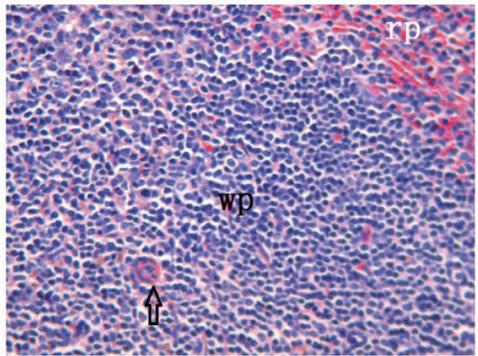


注:wp. 白髓; rp. 红髓;箭头示被膜

Note: wp. White pulp; rp. Red pulp; the arrow showed capsule

图 5 脾脏局部组织结构 HE 染色结果 (100×)

Fig. 5 HE staining results of local tissue structure of spleen (100×)



注:wp. 白髓;rp. 红髓;箭头示中央动脉

Note: wp. White pulp; rp. Red pulp; the arrow showed central artery

图 6 脾脏局部组织结构 HE 染色结果 (400×)

Fig. 6 HE staining results of local tissue structure of spleen (400×)

3 讨论

制作高质量石蜡切片需要注意制作的每个环节,在包埋前的步骤中取材的大小、合适的固定剂、脱水剂(乙醇)的处
(下转第 138 页)

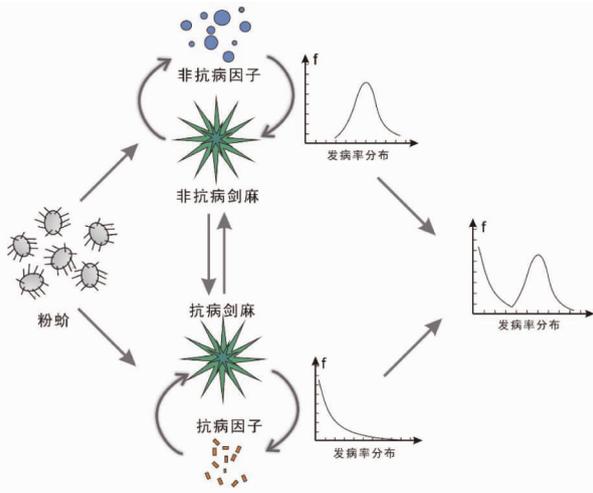


图7 剑麻紫色卷叶病双因子模型

Fig. 7 Two factor model of sisal purple leaf roll

疾,其致病机理至今没有阐明,对此也缺乏有效的防控手段。当常规的研究手段难以解开病因,通过田间传播的特点来推断其传病原因不失为一种有效的手段,在这点上剑麻有独特的优势:与生命周期短的作物不同,剑麻为多年生植物,剑麻之间的相对位置长期固定,剑麻受到周边其他剑麻影响,也影响周边别的剑麻,相互关系稳定,为分析剑麻紫色卷叶病的传播方式提供了便利。

非直接病麻对剑麻生病的影响是在直接病麻数为0的水平进行,排除了直接接触的有病剑麻对分析结果的影响。直接病麻数0水平下,剑麻发病率随非直接病麻数呈随机分布,它们间相关系数接近0,随着直接病麻数水平增加,相关性增加,在直接病麻数5水平上,相关系数为0.998,在同一个直接病麻数水平,所有非直接病麻数的增加值(斜率)十分

(上接第95页)

理时间以及透明剂的选择与处理时间均较为重要。若实质性器官太厚,会影响后续步骤的处理;若固定不好,则会影响细胞结构;脱水时间尤其是高浓度乙醇处理时间过长会导致组织块硬化,切片时易碎;浸蜡前透明处理是整个过程中最关键的步骤,传统制片法中二甲苯的透明效果较好,但需要操作者根据制片经验判断透明要求,容易造成菲薄组织(如小肠等)的浆膜透明过度,从而造成该层结构的碎裂或缺失。

为了解决传统浸蜡前苯类透明剂的健康危害、环境污染、不同样品同批次制片难、组织易透明过度等缺陷,国内外学者报道了较多的苯类透明剂替代试剂。它们主要是以松节油或含萜烯组分为代表的植物精油类^[6-8]、叔(正)丁醇与异丙醇为代表的醇类^[9-10]、汽油、Van-Clear商品试剂为代表的烷烃或烷烃衍生物类^[11-12]。虽然这些替代试剂低毒或无毒,但也存在透明速度慢、溶蜡能力弱、有刺激气味、价格昂贵以及透明时间严格等问题,因而未得到推广应用。该试验中使用的异构硬脂酸硬脂醇性质温和,与石蜡混合后处理样品,既可以置换脱水剂,又能增加石蜡的浸入时间并减少硬

接近,说明这种增加是由直接病麻数带来的,而不是非直接病麻变动所致,从另一个方面证明非直接接触有病剑麻对剑麻是否染上紫色卷叶病作用很小,紫色卷叶病是通过直接接触的有病剑麻传播的。

直接病麻数(近距离)和非直接病麻数(长距离)2种数据的区分对于剑麻这种种在畦上、且有中间作业通道的农作物合理,类似的研究方法可以应用于密集种植、多年生植物的传染病调查,如火龙果、香蕉、多年生果园等。剑麻是浅根系植物,自然生长剑麻根可以向四周扩张5m,不同畦的植物地下根可能会接触,但考虑到每年有施肥、中耕、除草和采收,加之套种假花生等植物,实际上接触可能性不大。至于在直接接触外围剑麻,它们的影响需要通过跨越直接接触剑麻,在该研究中没有考虑,希望今后的研究中能够弥补。

参考文献

- [1] 黄标,杨荣,夏李虹,等.紫色卷叶病病因·病原鉴定和抗性苗应用研究[J].安徽农业科学,2015,43(34):177-179.
- [2] 黄标,赵家流,夏李虹,等.剑麻主要病虫害监测与防控技术研究[J].安徽农业科学,2015,43(33):214-217.
- [3] 杨荣,黄标,夏李虹,等.剑麻抗病种苗的引进试种及抗病效应研究[J].安徽农业科学,2015,43(31):101-104,110.
- [4] 王桂花,吴伟怀,汪涵,等.源自剑麻紫色卷叶病病株新菠萝灰粉蚧体内植原体的分子检测与鉴定[C]//绿色植保与乡村振兴——中国植物保护学会2018年学术年会论文集.北京:中国农业科学技术出版社,2018.
- [5] 黄标,夏李虹,李江平,等.几种营养液药液及脱毒粉蚧对剑麻紫色卷叶病的影响[J].热带农业科学,2017,37(7):41-45,50.
- [6] MUSIOL G. An introduction to categorical data analysis[J]. Computational statistics & data analysis,1997,23(4):565.
- [7] 农业部人事劳动司,农业职业技能培训教材编审委员会.剑麻栽培工[M].北京:中国农业出版社,2007:35-46.
- [8] KARLSSON A. Introduction to linear regression analysis[J]. Journal of the royal statistical society; Series A,2007,170(3):856-857.
- [9] RABINOWITZ L. Mathematical statistics and data analysis[J]. Technometrics,1989,31(3):390-391.
- [10] 薛薇.统计分析与SPSS的应用[M].2版.北京:中国人民大学出版社,2008:65-80.

蜡的处理时间,因而组织块容易成功切片。

参考文献

- [1] 汤金梁,叶明福.硬脂酸硬蜡混合液及硬蜡二步浸蜡法在石蜡切片中的应用[J].第三军医大学学报,2003,25(19):1727-1730.
- [2] 郭以河,张闽峰,孟加榕,等.硬脂酸替代二甲苯在组织透明浸蜡过程中的应用[J].实用医技杂志,2008,15(9):1124-1126.
- [3] 魏永敬,汪兆亮.硬脂酸代替二甲苯透明在石蜡切片中的应用[J].西南军医,2007,9(1):57.
- [4] 张晓宇.异硬脂醇[J].精细化工,1984,1(1):74-75.
- [5] 徐步,良平.性能优异的化妆品新原料——异硬脂酸及其衍生物[J].中国化妆品,2001(3):68,70.
- [6] 李海鹤,万明辉,谭东海,等.松节油替代二甲苯在家禽组织制片中的应用[J].中国家禽,2013,35(19):51-52.
- [7] 刘浩,梁景星,钟胜华,等.环保透明剂替代二甲苯用于病理组织石蜡制片的可行性[J].深圳中西医结合杂志,2019,29(9):86-88.
- [8] 付小一,张子雯.911柔性生物制片透明脱蜡剂在石蜡制片中的应用[J].宜春学院学报,2005,27(4):113.
- [9] 杨世明,李和.正丁醇替代无水乙醇和二甲苯在制作大鼠全胚切片中的应用[J].解剖学报,2012,43(6):864-867.
- [10] 赵亚林,闫青地,冯佳佳,等.石蜡切片方法的改良[J].安徽农业科学,2017,45(32):6-8.
- [11] 李璐,吴民华,陈景锋.皮肤组织教学石蜡切片的制作技术[J].临床与实验病理学杂志,2015,31(7):827-828.
- [12] 王伟.一种针对人皮肤组织的快速,低毒石蜡切片方法[D].上海:复旦大学,2013.