



三种固定液对大、小鼠肠道组织石蜡切片质量的影响

赵玉琼¹, 李瑞生², 陈 华¹

(1. 解放军总医院医学实验动物中心, 北京 100853; 2. 解放军第 302 医院实验技术研究保障中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 对比三种固定液对大、小鼠肠道组织石蜡切片质量的影响, 优选大、小鼠肠道组织切片固定液。**方法** 选择三种常用的固定液: 10% 中性福尔马林固定液, Bouin's 固定液, 改良 Davidson's 固定液, 对 SD 大鼠和 KM 小鼠小肠组织进行固定, 常规制作石蜡切片、HE 染色, 对比观察其染色效果。**结果** 三种固定液对大、小鼠肠道组织石蜡切片质量存在影响, 单纯福尔马林固定的切片存在肠粘膜上皮脱落、坏死的假象; Bouin's 固定液和改良 Davidson's 固定液则可避免这一假象的出现, 而且切片结构更精细、清晰, 但是, HE 染色的色彩不如单纯福尔马林固定液的鲜艳。**结论** Bouin's 固定液和改良 Davidson's 固定液固定的大、小鼠肠道组织的石蜡切片质量优于 10% 中性福尔马林固定液。

【关键词】 固定液; 肠道组织; 石蜡切片; HE 染色

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0053-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.011

Comparison on rat and mice intestine slides' quality fixed with three different fixatives and embeded by paraffin

ZHAO Yu-qiong¹, LI Rui-sheng², CHEN Hua¹

(1. Animal Experimental Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Research and Technology Service Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To compare the rat and mice intestine slides quality fixed with three different fixatives and embeded by paraffin. **Methods** Three kinds of conventional fixatives were selected for the test, they are 10% neutral buffered formalin, Bouin's solution and modified Davidson's solution. SD rat's and KM mice's intestinal tissues were fixed with the three different fixatives, then embeded, sliced and stained with HE as routine rut. To observe the slides quality under microscope. **Results** Shedding and necrosis of intestine villus epithelia were observed in slides made from formalin fixed intestines, which is speculated due to the fixations. The phenomenon was not observed in Bouin's solution and modified Davidson's solution fixed tissues. And the tissue structure were more fine and clear in them. **Conclusions** The rat and mice intestine slides made from tissues fixed by Bouin's solution and modified Davidson's solution are better than from the 10% neutral buffered formalin fixed ones.

【Key words】 Fixative; Intestine; Slide; HE staining

组织的固定在石蜡切片的整个过程中起着重要作用, 固定液的种类很多, 分为单纯固定液和混

合固定液, 各种固定液的渗透强弱不同, 对组织的固定效果也不同, 从而影响切片的质量。小肠是食

[作者简介] 赵玉琼(1983-), 女, 兽医学硕士, 解放军总医院医学实验动物中心。E-mail: zhaoyuqiong@163.com。

[通讯作者] 陈华(1964-), 男, 研究员, 解放军总医院医学实验动物中心。E-mail: chenhu@301hospital.com.cn。

物消化吸收的重要部位,在小肠腔面隆起形成许多环形皱襞和细小的绒毛。

由于肠腔内存在消化功能强大的胰酶,因此,小肠也是尸溶最早出现的组织之一。以福尔马林固定液固定的肠道组织,常常出现肠绒毛固定不好,绒毛顶端出现上皮细胞脱落、甚至是大片组织坏死的现象,这可能会干扰对动物健康状态的判断以及病理结果的判定。我们以往选择复检时取肠道断端边缘,或者固定时剪开肠道的方式来避免这种现象的出现,但是,肠道断端边缘取材有时也存在剪切挤压的影响和固定效果不一的问题;剪开肠道对于观察完整肠腔结构存在影响。因此,我们选择了三种不同的固定液,对比观察对大、小鼠肠道组织切片质量的影响,以期找到适用大、小鼠肠道组织固定的方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠,4 周龄,体重 80 ~ 100 g, 12 只;清洁级雄性 KM 小鼠,四周龄,体重 18 ~ 25 g, 12 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,动物使用许可【SYXK(军)2012-0062】。

1.2 仪器和试剂

仪器:Tissue - TeK VIP 5 Jr 樱花全自动脱水机, YABO-200file 组织包埋机, YABO-200file 烤片机, Leitz 1516 组织切片机。

试剂:10% 中性福尔马林固定液,无水乙醇,冰醋酸,苦味酸,甲醛溶液(37% ~ 40%),均购自北京益利精细化学品有限公司, Harris 苏木素-伊红染色液,购自北京博益恒丰科技有限责任公司。

1.3 固定液配制与组织固定

10% 中性福尔马林固定液(批号:20121015):固定方法为 10% 中性福尔马林固定液固定 24 h 后置换 50% 新鲜固定液继续固定 24 h;

Bouin's 固定液:将苦味酸饱和水溶液、甲醛溶液(37% ~ 40%)、冰醋酸分别按照 15:5:1 的体积比例配制,固定方法为 Bouin's 液中固定 12 h 后转入 10% 中性福尔马林固定液中继续固定 24 h。

改良 Davidson's 固定液:将甲醛溶液(37% ~ 40%)、无水乙醇、冰醋酸和蒸馏水分别按照 6:3:1:10 的体积比例配制,固定方法为改良 Davidson's 液中固定 18 h 后转入 10% 中性福尔马林固定液中继续

固定 24 h。

1.4 动物血常规指标、血生化指标检测

动物经一夜禁食后,腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉,眼底静脉丛采血,取血 4 mL,其中 2 mL 血液用于血常规指标检测,以 EDTA-K2 抗凝,以血细胞分析仪(Sysmex XE2100)测定 RBC、HGB、WBC、MCV、MCH、MCHC、RDW、PLT、MPV;2 mL 血液用于血液生化指标检测,以自动生化分析仪(罗氏 cobas8000)检测 AST、ALT、ALP、BUN、T-CHO、CK、TP、LDL、HDL、TG、T-BIL、GLU、CREA、I-BIL、D-BIL。

1.5 肠道组织取材

大、小鼠麻醉条件下放血处死,剖开腹腔,对大鼠腹腔脏器做肉眼观察。取肠道组织约 5 cm(距幽门 15 cm 处),将其分为三段分别放入三种固定液中进行固定。第一段组织放入 10% 中性福尔马林固定液固定 24 h,后置换 50% 新鲜固定液继续固定 24 h;第二段组织放入 Bouin's 液中固定 12 h,后转入 10% 中性福尔马林固定液中继续固定 24 h;第三段放入改良 Davidson's 液中固定 18 h,后转入 10% 中性福尔马林固定液中继续固定 24 h。待组织固定完全后,将每段肠道分为肠道两端和中间两部分,分别进行脱水、石蜡包埋、切片、烤片和 HE 染色。光学显微镜下观察切片效果。

2 结果

2.1 动物血液学检查

动物血常规指标和血生化指标检测结果未发现异常值,所有检测指标均处于正常范围之内,动物处于健康状态。

2.2 大体解剖检查

动物腹腔脏器肉眼观察未见异常。

2.3 三种固定液下肠道组织石蜡切片 HE 染色结果

三种固定液固定的肠道组织石蜡切片的 HE 染色存在差异(图 1,彩插 2)。10% 中性福尔马林固定液固定的组织:肠道组织黏膜层,黏膜下层,肌层,浆膜层 4 层结构清晰,色彩鲜艳,透明度高,细胞核质对比明显,中央乳糜管清晰,肠腺清楚完整,整体结构有些不完整,部分肠绒毛出现脱落现象。Bouin's 液固定的组织:肠道组织黏膜层,黏膜下层,肌层,浆膜层 4 层结构清晰,细胞核质对比明显,中央乳糜管清晰,肠腺清楚完整,肠绒毛结构完整,但

是色彩较暗淡。改良 Davidson's 液固定组织:肠道组织黏膜层,黏膜下层,肌层,浆膜层 4 层结构清晰,细胞核质对比明显,整体结构完整,中央乳糜管清晰,十二指肠腺清楚完整,肠绒毛结构完整,色彩也不如单纯福尔马林固定液的组织鲜艳。

2.4 肠道两端和中间段石蜡切片 HE 染色结果

10% 中性福尔马林固定液固定的组织,在断端取材的固定效果较好,出现的异常主要为肠绒毛顶部的上皮脱落,而在中间段的组织固定效果大多不好,肠绒毛顶部上皮脱落的现象普遍存在,有的部位还出现坏死现象。Bouin's 液和改良 Davidson's 液固定的组织,肠道的两端和中间段石蜡切片的效果无明显区别。

3 讨论

固定的目的是为了防止组织的自溶与腐败,防止细胞内的酶类转变为不溶性物质,以保持原有的结构,组织固定后,均呈一定的硬化状态,增加了组织的韧性,而且不易变形,有利于后续的组织处理。

10% 中性福尔马林溶液:渗透性强,固定均匀,收缩性小,但经酒精脱水后收缩较大,甲醛不能使白蛋白和核蛋白沉淀。甲醛通过使蛋白质分子发生交联而产生固定作用。大、小鼠肠道组织经 10% 中性福尔马林固定后组织较柔软,切片可观察到肠绒毛脱落、甚至坏死的现象^[1-3]。本实验应用的为大、小鼠新鲜肠组织,血液学检查表明动物血常规和 13 项血清生化指标未见异常,大体解剖检查腹腔脏器未见异常,推测动物处于健康状态,这些肠道的异常形态不是动物本身的病变,为制片假象,可能是由于肠道内存在溶组织功能强大的胰酶,而且肠道的浆膜层、平滑肌层组织比较致密,在福尔马林溶液渗透至肠绒毛顶端之时,已经发生了尸溶作用。

Bouin's 固定液:该固定液中的冰醋酸穿透作用快,是良好的核蛋白沉淀剂,能使染色体的保存如同生活时一样,并能把未分裂的细胞核染色质沉淀成为可以染色的块状体,故细胞核染色显得清楚,使核浆颜色对比鲜明,冰醋酸对胶原纤维等组织有轻度膨胀作用,但用量大易使组织发脆,而甲醛对组织有收缩作用。两种试剂的混合使用,用以抵消彼此间的副作用^[4]。苦味酸能沉淀蛋白,也有软化组织的作用,苦味酸和醋酸配合使用能很好的保存组织结构^[5-6]。Bouin's 液组织渗透性强且渗透速

度快而均匀、组织收缩幅度小,不出现变脆现象,HE 染色组织结构清晰完整。张会卿等发现^[7],Bouin's 液固定活检的睾丸组织进行病理诊断,效果明显高于福尔马林或 95% 酒精。本实验结果表明,大、小鼠小肠经 Bouin's 液固定后组织有一定的硬度,未见肠绒毛顶部上皮细胞脱落、坏死现象,组织结构细致、清晰,切片的染色效果好,只是色彩没有单纯福尔马林溶液固定的切片鲜艳。推测可能是由于冰醋酸的快速穿透作用,使肠绒毛在死后胰酶作用之前被固定,因而保持了较好的组织结构。

改良 Davidson's 液:是一种快速固定液,组织放入后会快速变白呈不透明状,对小标本固定更为迅速。甲醛和乙醇对组织的细胞内液有轻度的收缩作用,而冰醋酸对组织的膨胀作用尤为强烈,核肿胀明显,因此三者合用抵消了甲醛和无水乙醇的收缩以及冰醋酸固定液所引起的组织膨胀和核的肿胀,并且冰醋酸能迅速固定染色质,助于染色,固定液中加入冰醋酸其作用快,固定效果均匀,能够清晰的显示核结构^[8]。盛婵等发现^[9-10],Davidson's 固定液可明显提高睾丸和眼球的切片质量。本实验结果表明,大、小鼠小肠经改良 Davidson's 液固定后,切片质量与 Bouin's 固定液效果类似,色彩鲜艳程度略好一些。

综上所述,10% 中性福尔马林固定液用于大、小鼠小肠固定,组织切片易于出现肠粘膜上皮脱落、坏死的异常结果,为固定液的渗透作用速度缺陷,不是动物自身的病理性改变。Bouin's 和改良 Davidson's 固定液均可迅速地固定大、小鼠肠道组织,避免了肠粘膜上皮脱落、坏死的制片异常,而且切片组织结构更精细、清晰,略显不足的是染色色彩不如单纯福尔马林固定液的组织切片鲜艳。

参考文献:

- [1] 郭志杰. 病理制片中固定液的选择[J]. 医护论坛. 2009, 6(6): 146.
- [2] 龚志锦,詹镭洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海:科学技术出版社, 1994: 32-36.
- [3] 方福德,周吕,丁濂,等. 现代医学实验技术全书(上册)[M]. 北京:北京医科大学. 中国协和医科大学联合出版社, 1995: 243.
- [4] 李晶晶,朱鸿,施彩虹. 三种方法对大鼠视网膜固定效果的比较研究[J]. 上海交通大学学报, 2011, 8(31): 1105-1107.
- [5] 孙海梅,尚宏伟,张立新,等. 不同固定液对大鼠脾石蜡切片 HE 染色标本的影响[J]. 中国医学装备, 2011, 8(10): 48-50.

- [6] 黄宏森,张超,郭晓珍,等. 不同固定液及固定时间对小鼠肝组织结构的影响[J]. 广州医学院学报,2007,4(35):65-68.
- [7] 张会卿,张春亭. 睾丸活检 BOUIN 氏固定液应用观察与研究[J]. 河南外科学杂志,2001,7(1):5-6.
- [8] Latendresse JR, Warbritton AR. Jonassen H, *et al.* Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid [J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(4): 524-533.
- [9] 刘桂明,刘向云,谢琛静,等. 三种固定液对眼球组织固定效果的比较研究[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(1): 57-59.
- [10] 盛婵,王辉,陆姮磊,等. Davidson's 固定液用于睾丸和眼球固定的优势[J]. 毒理学杂志. 2007, 21(4): 291.
- [修回日期]2014-10-22