

## 一种优化的大鼠视网膜组织石蜡切片制作方法

杨明<sup>1)</sup>, 唐永赢<sup>2)</sup>, 周媛<sup>2)</sup>, 李艳<sup>2)</sup>, 姜晓璇<sup>2)</sup>, 曹霞<sup>3)</sup>, 马林昆<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学第一附属医院, 云南昆明 650031; 2) 昆明医科大学第二附属医院; 3) 昆明医科大学第二附属医院中心实验室, 云南昆明 650011)

**[摘要]** **目的** 针对大鼠视网膜石蜡切片过程中易出现标本脱离及断裂分离的问题, 寻找并优化大鼠视网膜石蜡切片的制作方法并评估效果. **方法** 分别用 10%多聚甲醛固定液; 4%多聚甲醛固定液; 单独固定及使用 4%多聚甲醛、95%酒精、冰醋酸混合固定液 (FAA 固定液); 预处理后再使用 10%多聚甲醛分别固定等 4 种方法对大鼠视网膜组织进行固定, HE 染色后显微镜下进行观察. **结果** 单独使用 10%多聚甲醛以及 4%多聚甲醛固定均出现视网膜脱离及各层结构断裂分离现象, 但经 FAA 固定液预处理的视网膜切片 HE 染色后颜色鲜明均匀, 虽部分区域视网膜偶有脱离, 但不易脱片, 各层结构完整, 未出现断裂分离. **结论** 经 FAA 固定液及多聚甲醛处理过的视网膜石蜡切片固定效果明显优于单独使用多聚甲醛, 甲醛浓度对 HE 染色结果无明显影响.

**[关键词]** 视网膜; 石蜡切片; 固定方法

**[中图分类号]** R361.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 12 - 0005 - 04

## An Improved Method for Preparation of Paraffin Slices of Rat Retina

YANG Ming<sup>1)</sup>, TANG Yong - ying<sup>2)</sup>, ZHOU Yuan<sup>2)</sup>, LI Yan<sup>2)</sup>, JIANG Xiao-xuan<sup>2)</sup>, CAO Xia<sup>3)</sup>, MA Lin-kun<sup>2)</sup>

(1) *The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032*; 2) *The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011*; 3) *Central Laboratory, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011, China*)

**[Abstract]** **Objective** To solve the problem that the rat retina paraffin sections are easily exfoliated from the slides and each layer are easily separation and fracture, we need to find a way to improve the retina paraffin section method and evaluate the tissue fixation. **Methods** We used 4 fixation liquids including 10% paraformaldehyde, 4% paraformaldehyde, 4% paraformaldehyde and 95% alcohol and glacial acetic acid mixed liquid (FAA fixative solution) combined with paraformaldehyde to fix the retinal tissue, and observed the fixation efficacy under microscope after HE staining. **Results** The effects of 10% paraformaldehyde and 4% paraformaldehyde fixed samples showed moderate separation and fracture of retina, but the HE staining retinal slices pre-treated by the FAA fixative solution had bright and uniform color, although occasionally some parts of the retina were exfoliated from the slide, but it was not easy to take off, and had complete structure without separation and rupture. **Conclusion** The retina paraffin section fixed by FAA fixative solution with 4% paraformaldehyde is superior to pure paraformaldehyde, and the paraformaldehyde concentration has no obviously influence on HE staining results.

**[Key words]** Retina; Paraffin section; Tissue fixation

---

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (31160206); 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD199)

**[作者简介]** 杨明 (1984 ~), 男, 河南南阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事眼科临床工作.

**[通讯作者]** 马林昆. E-mail: mlk\_ynkm@163.com

大鼠是眼科研究中的常用动物,制备大鼠视网膜石蜡切片则是在应用大鼠进行眼科病理研究过程中经常需要进行的操作。由于大鼠眼球的结构非常精细而复杂,晶体与巩膜硬度较高,同时虹膜较软,视网膜较为疏松且层次复杂,在由外向内分为视网膜色素上皮层、视锥、视杆细胞层、外界膜、外颗粒层、外丛状层、内颗粒层、内丛状层、神经节细胞层、神经纤维层、内界膜等 10 层之间各层连接性差且收缩率各有差异。因此,在传统的切片固定过程中,视网膜的脱离及各层的分离断裂较为多见。有研究结果显示,传统的 10%福尔马林固定方法极易导致视网膜的脱离及各层分离断裂;目前国内外多采用的 4%的多聚甲醛、冰醋酸 (glacial acetic acid, FAA) 固定液的固定效果也不甚理想<sup>[1,2]</sup>。4%多聚甲醛固定液比较适用于光镜下免疫组化染色,固定效果较温和,但仍不够理想,常易导致脱片和染色不均等问题;FAA 常规固定液组织固定效果较好,能维持良好的视网膜形态和结构,但对抗原的保存较差,免疫组化染色效果不佳。综上所述,寻找一种解决视网膜脱落及各层分离断裂的固定方法是更好地开展视网膜病理研究的重要步骤。本实验试用了 4 种不同的石蜡切片固定方法后,比较了 4 种固定方法的 HE 染色结果,以期找到一种能使视网膜各层结构不脱落断裂且染色效果较好的组织切片制作方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 雌性 SD 大鼠 24 只,质量 180~200 g,由昆明医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 取材

实验大鼠用 10%水合氯醛 0.2 mL/g 腹腔注射麻醉后,采用显微有齿镊及角巩膜剪小心取出 2 侧眼球并保留视神经,分离多余的结膜组织后进行固定。

### 1.3 实验动物分组

将 24 只实验动物的 48 只眼球随机分成 A, B, C, D 等 4 组。A 组用 10%多聚甲醛固定液进行固定 24 h; B 组采用 4%多聚甲醛进行固定约 24 h; C 组用 FAA 固定液先固定 1 min 后,再用 10%多聚甲醛固定液固定 24 h; D 组用 FAA 固定液固定 10 min 后,再用 4%甲醛固定 24 h。每组各 12 只眼球,左右眼球随机分组,采用双盲法。

### 1.4 FAA 固定液配制方法

按参考文献采用 4%多聚甲醛 10 mL、95%酒精 85 mL、冰醋酸 5 mL,3 种溶液按比例混匀后作为固定液使用<sup>[3]</sup>。

### 1.5 标本制作

所有眼球标本固定结束后,剪去角膜组织,剥除晶体,取剩余眼杯进行常规脱水、透明、浸蜡和包埋,连续靠近视乳头处切片 6 片,切片厚 5  $\mu\text{m}$ ,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤片 2 h。

### 1.6 苏木精-伊红染色

取各组标本进行 HE 染色,石蜡切片脱蜡至水,苏木精-伊红浸染 10 min,水洗 5 min,1%盐酸酒精分化 5 s,水洗 10 min,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

## 2 结果

### 2.1 固定眼球外观观察

A 组用 10%多聚甲醛固定的 6 只眼球眼杯明显变形收缩,视网膜明显脱落; B 组用 4%多聚甲醛固定的 6 只眼球中有 4 只眼杯明显变形,2 只眼杯少许变形,视网膜均有脱落; C 组用 FAA 固定 1 min 后再用 10%多聚甲醛固定的 6 只眼球中,2 只眼杯少许变形,4 只眼杯基本无变形,视网膜仅见少数几处脱落; D 组用 FAA 固定 10 min 后再用 4%多聚甲醛固定的 6 只眼球中,1 只眼杯少许变形,5 只基本无变形,视网膜基本无脱落。

### 2.2 显微镜下 HE 染色结果

A 组切片 36 张,均出现明显的断裂分离,细胞聚集严重,染色不均; B 组切片 36 张,视网膜染色较鲜明,各层皆能显现,但各层结构疏松,细胞固缩聚集,细胞间有明显裂隙,部分视网膜可见分离。C 组及 D 组切片各 36 张,染色鲜明均匀,部分区域视网膜偶有脱离,但各层结构均完整,未出现断裂分离等现象; C、D 2 组 HE 染色结果无明显区别,见图 1。

## 3 讨论

多聚甲醛进行组织固定的原理是在不影响组织抗原、酶等活性的情况下,快速渗透至组织内部,使蛋白质快速凝固,对碳水化合物、糖原、核蛋白和细胞壁等起固定保护作用,并阻止细胞继续新陈代谢;但其在固定过程中,会引起组织脱水产生收缩。有研究显示,多聚甲醛浓度越大,组织固定时

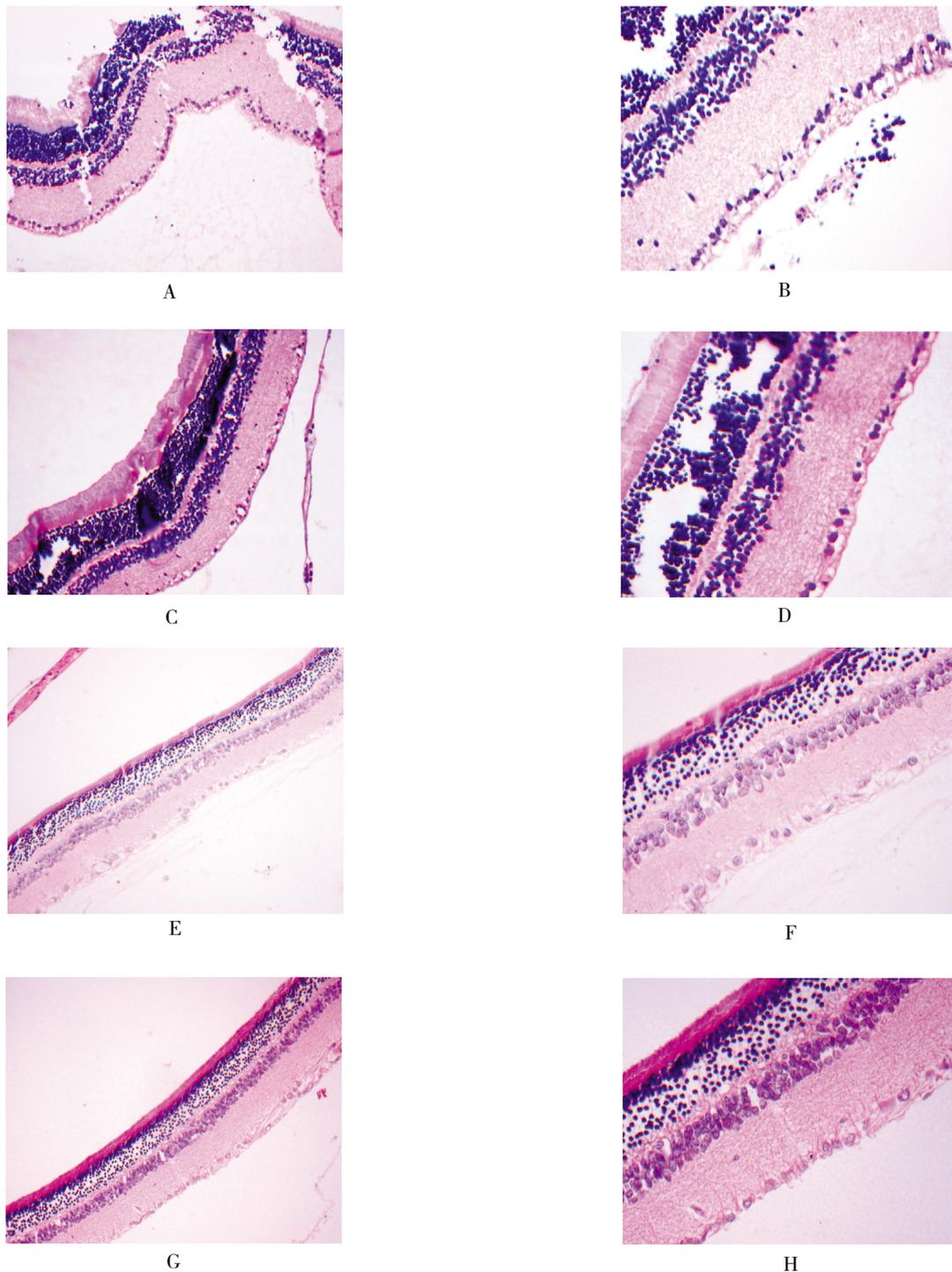


图 1 4 种固定方法下的视网膜石蜡切片

**Fig. 1 Paraffin slices of rat retina fixed with 4 different methods**

A:10%多聚甲醛固定 各层断裂明显, 细胞固缩, 排列紊乱, 分离明显 ( $\times 200$ ); B:10%多聚甲醛固定 放大后可见视网膜色素上皮层与神经细胞层分离 ( $\times 400$ ); C:4%多聚甲醛固定 视网膜各层结构疏松, 细胞间有裂隙, 断裂不明显 ( $\times 200$ ); D:4%多聚甲醛固定 视网膜各层结构疏松, 细胞间有裂隙, 断裂不明显 ( $\times 400$ ); E:FAA 固定 1 min 后, 10%多聚甲醛固定 视网膜层次清楚, 各层无明显分离 ( $\times 200$ ); F:FAA 固定 1 min 后, 10%多聚甲醛固定 视网膜层次清楚, 各层无明显分离 ( $\times 400$ ); G:FAA 固定 10 min 后, 4%多聚甲醛固定 视网膜层次清楚, 各层基本无分离 ( $\times 200$ ); H:FAA 固定 10 min 后, 4%多聚甲醛固定 视网膜层次清楚, 各层基本无分离 ( $\times 400$ ) .

的收缩作用越强<sup>[4]</sup>。由于眼球各层结构硬度及含水率各不相同,且各层间缺乏牢固连接,固定时的脱水收缩极易导致球内结构分离断裂。

本研究发现:(1)仅采用 10%多聚甲醛固定的眼杯变形明显,视网膜有明显脱离、视网膜各层断裂,细胞固缩、排列紊乱、色素上皮层与神经上皮层分离明显;4%多聚甲醛固定的眼杯有变形较小,视网膜染色清晰,视网膜各层均能显现,但各层结构疏松,细胞固缩聚集,细胞间见明显裂隙,在颗粒细胞层中尤为明显,且仍有部分区域出现视网膜分离。有文献报道采用处死后血管灌注 4%多聚甲醛同时维持球内压的固定方法可有效防止视网膜脱离及组织变形破裂,但对设备和操作要求高且耗时长<sup>[5,6]</sup>,难于批量处理。其他文献,也有使用低浓度多聚甲醛与戊二醛固定后用异丙醇脱水的方法,因标本变形主要因脱水造成,仍然难以避免视网膜脱离及各层间断裂分离的问题;(2)FAA 固定液由酒精、冰醋酸及甲醛构成,甲醛和酒精能相互协同固定并起到脱水作用。冰醋酸有较快穿透作用,能使组织轻度膨胀,能抵消酒精和甲醛对组织的收缩作用,且对细胞核的固定效果优秀<sup>[7]</sup>。眼球组织经 FAA 固定液处理后,纤维组织较多偏硬的巩膜发生软化,易于进一步脱水、浸蜡和切片,因此发生视网膜与球壁分离的机会较低;(3)本次研究结果表明 SD 大鼠正常眼球经 FAA 固定液处理 10 min 后再用 4%多聚甲醛处理 24 h 的固定效果明显优于单纯多聚甲醛处理的固定效果,该处理方法处理的视网膜无脱片现象,且染色效果良好。在实验中发现 FAA 固定液预处理时间是影响最终固定效果的关键,过短或过长的处理时间都会影响实验结果。先使用 FAA 固定 10 min 后再用 4%多聚甲醛进行固定,HE 染色下颜色鲜艳,各层结构连续,各层细胞颗粒清楚,排列整齐致密,效果可媲美 Davidson 固定液,且在保持视网膜各层结构的完整

性同时,对抗原破坏小<sup>[8,9]</sup>,相比单独使用多聚甲醛进行固定是一种简单而实用的优化。

### [参考文献]

- [1] YANG D,ZHANG M,HUANG X,et al. Protection of retinal vasculature by losartan against apoptosis and vasculopathy in rats with spontaneous hypertension [J]. *J Hypertens*,2010,28 (3):510-519.
- [2] TIAN B,LI X X,SHEN L,et al. Auto-mobilized adult hematopoietic stem cells advance neovasculation in diabetic retinopathy of mice [J]. *Chin Med J (Engl)*,2010,123 (16):2 265 - 2 268.
- [3] 凌启波编著. 实用病理特殊染色和组化技术 [M]. 广州: 广东高等教育出版社,1989:319.
- [4] 程钧,万磊,刘廷,等. 小鼠视网膜组织石蜡切片制作方法的探讨 [J]. *眼科新进展*,2009,29(3):161.
- [5] NICHOLAS G,STROUTHIDIS,JONATHAN GRIMM,et al. A comparison of optic nerve head morphology viewed by spectral domain optical coherence tomography and by serial histology [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2010,51 (3):1 464 - 1 474.
- [6] PFEFFER B A,BERNSTEIN S A,BARTELS S P,et al. P-reservation of structure and immunoreactivity at the vitreoretinal interface of the rabbit eye [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*,2009,247(2):193 - 205.
- [7] 刘正国,赵跃武,孔令非,等. 六种单固定液对动物眼球标本影响的比较 [J]. *眼科研究*,2002,20(5):443.
- [8] 张文忻,李永平,林健贤,等. 冰醋酸固定液对视网膜组织固定效果的探讨 [J]. *眼科学报*,2006,22(2): 112 - 114.
- [9] GLYN CHIDLOW,MARK DAYMON,JOHN P Met al. Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry —comparison of davidson's solution and formalin as fixatives [J]. *J Histochem Cytochem*,2011,59(10):884 - 898.

(2013 - 10 - 09 收稿)