

三种不同固定液对豚鼠眼球的固定效果比较

宋惠欣¹, 蒋文君², 毕宏生²

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81603421); 山东自然科学基金(No. ZR2014HQ024)

作者单位:¹(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学;
²(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学附属眼科医院
山东中医药大学眼科研究所 山东省中西医结合眼病防治重点实验室
山东省高校中西医结合眼病防治技术(强化)重点实验室

作者简介: 宋惠欣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障及屈光不正。

通讯作者: 毕宏生, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障及屈光不正. hongshengbi@126.com

收稿日期: 2018-01-11 修回日期: 2018-05-14

A comparative study on the effect of fixation for guinea pigs eyeballs among three different fixation solution

Hui-Xin Song¹, Wen-Jun Jiang², Hong-Sheng Bi²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81603421); National Natural Science Foundation of Shandong (No. ZR2014HQ024)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases in Universities of Shandong, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Hong-Sheng Bi. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases; Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases in Universities of Shandong, Jinan 250002, Shandong Province, China. hongshengbi@126.com

Received: 2018-01-11 Accepted: 2018-05-14

Abstract

• AIM: To compare the effect of fixation and select the optimal fixation solution and condition for PAS staining

of guinea pig eyes among three different fixation solution: 4% paraformaldehyde solution, 4% glutaraldehyde solution and Davidson solution.

• METHODS: Totally 30 healthy guinea pigs were divided into 6 groups: Group I - II were fixed in 4% paraformaldehyde solution and 4% glutaraldehyde solution for 24h, respectively; Group III-V were fixed in Davidson solution for 3, 6 and 24h, respectively; and Group VI were fixed in Davidson solution for 3h and then transferred into 10% neutral formaldehyde solution for 48h. All groups were sectioned by routine section method and undergone PAS staining, and then observed by light microscope.

• RESULTS: It was found that the group which was fixed by Davidson solution for 3h, remained the most complete structure for PAS staining (Group III). While the effect of fixation for the group which was transferred into 10% neutral formaldehyde solution for preserving for 48h after fixing in Davidson solution for 3h was also acceptable for PAS staining (Group VI). The retinal cells remained clear and in order for both groups which was mentioned above.

• CONCLUSION: The best fixation condition for PAS staining for eyes of guinea pigs is fixation in Davidson solution for 3h among these fixation conditions, while it is also suitable to transfer the eyes into neutral formaldehyde solution after fixing in Davidson solution for 3h for preserving for long periods, which is not severely reduced the effect of fixation for PAS staining.

• KEYWORDS: fixative solution; eyeball; PAS staining; Davidson solution

Citation: Song HX, Jiang WJ, Bi HS. A comparative study on the effect of fixation for guinea pigs eyeballs among three different fixation solution. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(6): 1010-1013

摘要

目的: 用过碘酸雪夫氏(Periodic Acid-Schiff, PAS)染色法比较4%多聚甲醛固定液、4%戊二醛固定液和Davidson固定液固定豚鼠眼球的固定效果, 筛选最佳眼球固定液和固定时间。

方法: 取正常豚鼠眼球分6组, 每组5只, I组眼球放入4%多聚甲醛固定液固定24h, II组眼球放入4%戊二醛固定液固定24h; III~V组眼球放入Davidson固定液分别固定3、6、24h; VI组眼球在Davidson固定液中固定3h后

转移到10%中性甲醛中再固定48h。常规制片、PAS染色、显微镜观察,比较不同固定方法对组织的固定效果。

结果:Davidson固定液固定3h的固定效果最为理想,Davidson固定液固定3h后转移到10%中性甲醛再固定48h的固定效果与Davidson固定液固定3h的固定效果接近,这两组固定液固定的眼球切片均结构完整、层次清晰,视网膜各层细胞排列整齐。

结论:Davidson固定液对豚鼠眼球的固定效果明显优于其他两种固定液,豚鼠眼球用Davidson固定液固定后,可将其转移到中性甲醛中长期保存,其固定效果不受影响。

关键词:固定液;眼球;PAS染色;Davidson固定液

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.6.07

引用:宋惠欣,蒋文君,毕宏生.三种不同固定液对豚鼠眼球的固定效果比较.国际眼科杂志2018;18(6):1010-1013

0 引言

眼球病理切片的制备对深入认识眼病的发病机制及发生、发展规律至关重要。豚鼠的眼球结构和眼发育过程与人类相似,是研究近视等多种眼科疾病最重要的模型动物之一^[1-2]。研究发现,豚鼠眼球固定、脱水过程中易发生眼球凹陷变形、皱缩,视网膜脱离等现象,使豚鼠眼球病理标本的制备变得困难,影响病理诊断和实验研究。固定液是病理切片制备的关键因素,选择合适的固定液和适当的固定时间对于制备豚鼠眼球等组织易分离的小标本的病理切片尤为重要。本实验采用过碘酸雪夫氏(Periodic Acid-Schiff, PAS)染色法对豚鼠眼球内部微细结构进行观察,比较不同固定液和固定时间对豚鼠眼球固定效果的影响,以筛选最佳眼球固定液和最佳固定时间。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取4周龄英国三色短毛豚鼠30只,购自河南康达实验动物有限公司,体质量 120 ± 10 g,适应性培养1wk,饲养温度保持 25°C 左右,控制12h/12h的昼夜规律,自由饮食。入组前对眼部疾病进行筛查,排除白内障、先天性近视、角膜疾病等常见眼部疾病。动物实验符合山东中医药大学眼科研究所动物伦理委员会标准。

1.1.2 动物分组 30只豚鼠随机分为6组,每组5只,平均体质量 125.00 ± 7.18 、 126.11 ± 11.95 、 121.83 ± 5.71 、 123.17 ± 10.32 、 118.83 ± 12.35 、 124.00 ± 7.76 g, I组4%多聚甲醛固定液固定24h、II组4%戊二醛固定液固定24h、III组Davidson固定液固定3h、IV组Davidson固定液固定6h、V组Davidson固定液固定24h、VI组Davidson固定液中固定3h后转移到10%中性甲醛中再固定48h。

1.1.3 主要仪器 眼科手术器械、眼科手术显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司),电子称,超净台(上海博讯实业有限公司),全自动脱水机、切片烘片机(德国SLEE),石蜡包埋机(浙江科迪),烘干箱(天津泰斯特),光学显微镜(尼康),刀片(LEICA)。

1.1.4 试剂 甲醛、95%乙醇、100%乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、多聚甲醛、二甲苯、冰乙酸、冰醋酸、丙酮(均

购自天津市富宇精细化工有限公司),PAS染色试剂盒(南京建成科技有限公司),4%戊二醛固定液(碧云天生物技术有限公司),复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社),盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制 (1)4%多聚甲醛固定液:多聚甲醛4g,加入0.1mol/L磷酸缓冲液80mL,加热至 60°C 左右,持续搅拌,使粉末完全溶解,加少许1mol/L NaOH澄清。待冷却后,加冰醋酸5mL、丙酮10mL,用0.1mol/L磷酸缓冲液补足至100mL^[3]。(2)Davidson固定液:体积分数为40%甲醛溶液20mL,三蒸水20mL,95%乙醇30mL,冰乙酸20mL混合^[3]。

1.2.2 取材固定 5%水合氯醛腹腔注射过量麻醉处死,用眼科镊剥取眼球,保留2mm视神经,保持眼球正常形状,用 4°C 0.9%氯化钠注射液冲洗血液,剩余步骤在显微镜下置于冰上操作,去除结膜、筋膜、眼外肌等组织,每组10只眼球,按照分组及时间浸泡于不同的固定液中(体积比为1:10)。

1.2.3 切片制备

1.2.3.1 组织脱水 将各组标本均进行以下操作:沿视神经方向切开眼球,分为左右两半,在显微镜下剔除晶状体、玻璃体等眼球内容物,切面朝下放入包埋盒。将各组标本均进行以下步骤操作:50%乙醇1h→70%乙醇1h→80%乙醇1h→90%乙醇1h→95%乙醇I 1h→95%乙醇II 1h→无水乙醇I 1h→无水乙醇II 1h→二甲苯I 20min→二甲苯II 20min→石蜡I 20min→石蜡II 45min。

1.2.3.2 石蜡包埋切片 浸蜡后的眼球切面朝下放入包埋盒, 58°C ~ 60°C 硬蜡包埋,蜡块冷却后,室温保存待切。用轮转式机切片厚约 $4\mu\text{m}$, 50°C 存放1h,选取靠近视乳头的切片。

1.2.3.3 PAS染色 (1)脱蜡:二甲苯I 10min→二甲苯II 10min→无水乙醇I 2min→95%乙醇I 2min→95%乙醇II 2min→自来水洗3min;(2)氧化:过碘酸室温8min→自来水洗4min→蒸馏水洗2次;(3)变色:雪夫试剂室温阴暗15min→自来水洗10min;(4)染核:苏木素复染1min→1%盐酸酒精分化2s→自来水洗10min→蒸馏水洗2次;(5)透明:二甲苯III 5min→二甲苯IV 5min,中性树胶封固,显微镜下观察。

2 结果

2.1 固定后眼球情况 综合固定完毕后和制片过程中的眼球固定效果进行比较,III组(Davidson固定液固定3h)、IV组(Davidson固定液固定6h)、V组(Davidson固定液固定24h)和VI组(Davidson固定液固定3h后转移到10%中性甲醛中再固定48h),这四组豚鼠眼球固定完毕后眼球外形光滑饱满,未见明显变形,且弹性较强,但切片过程中III组及VI组较容易切出完整切片,IV和V组较难切出完整切片。而I组(4%多聚甲醛)、II组(4%戊二醛)、V组(Davidson固定液固定24h)豚鼠眼球多发生后极部或者赤道部凹陷皱缩,眼球变形较严重,难以切出完整切片,见图1及表1。

2.2 PAS染色结果 将固定后的眼球进行常规切片和PAS染色后可见:I组豚鼠眼球4%多聚甲醛固定24h后,发生严重的视网膜脱离、变形、折叠和断裂,巩膜组织断裂、染色不均(图2A);II组豚鼠眼球4%戊二醛固定

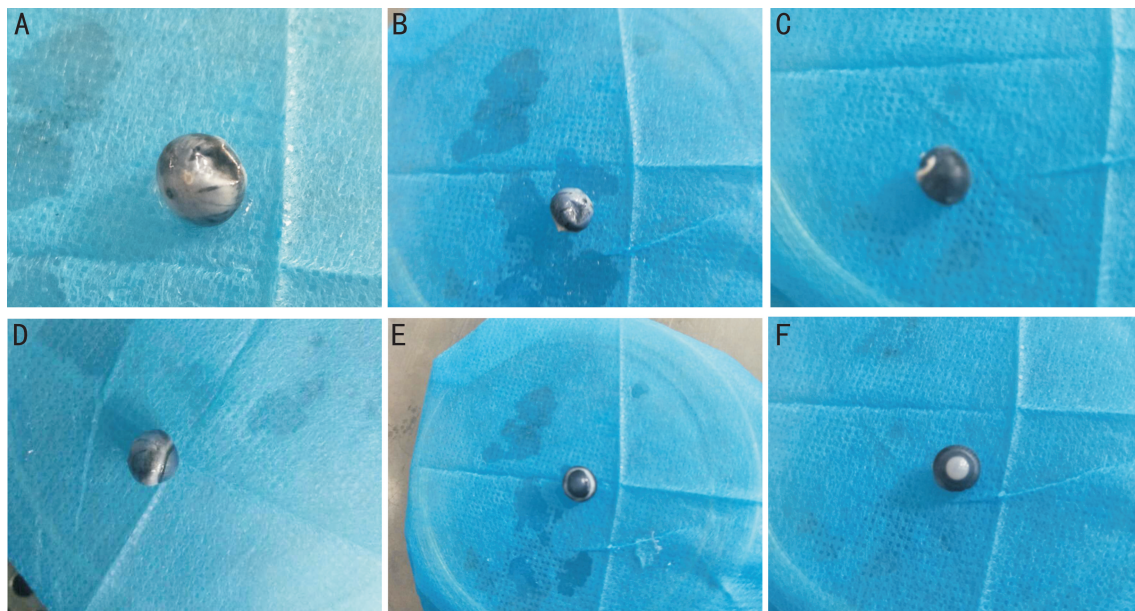


图1 各组豚鼠固定完毕后眼球形态 A: I组; B: II组; C: III组; D: IV组; E: V组; F: VI组。

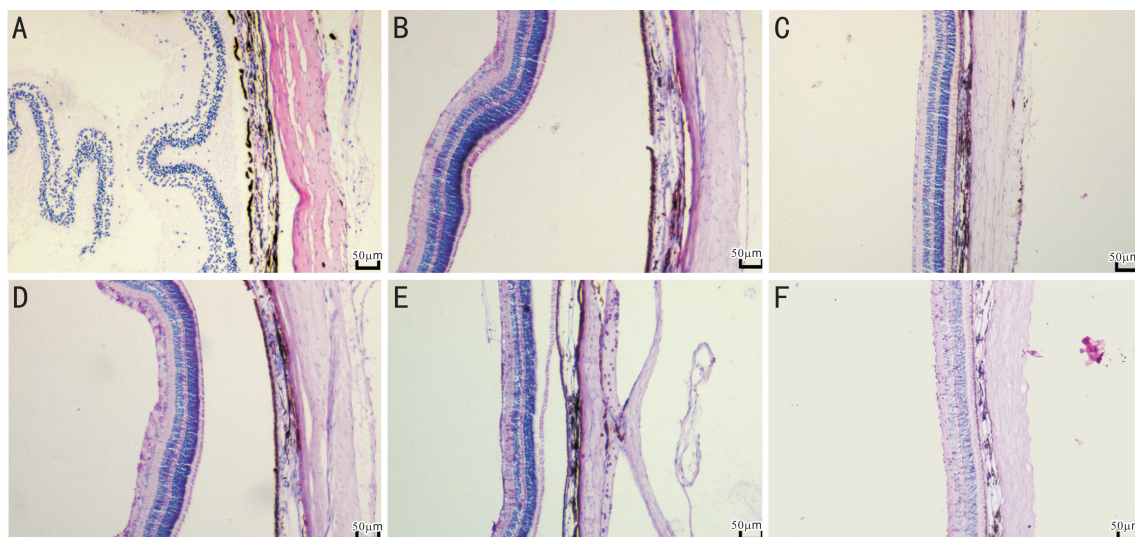


图2 各组豚鼠眼球后极部 PAS 染色图(×100) A: I组; B: II组; C: III组; D: IV组; E: V组; F: VI组。

表1 各组豚鼠眼球大体形态观察比较

组别	收缩(眼)	硬化(眼)	视网膜脱离(眼)	对切片的影响
I组	10	2	10	难切出完整切片
II组	8	3	10	难切出完整切片
III组	2	8	2	切片比较完整
IV组	5	7	6	切片较松散
V组	7	8	7	较难切出完整切片
VI组	3	7	3	切片较完整

注: I组:4%多聚甲醛固定液固定24h; II组4%戊二醛固定液固定24h; III组Davidson固定液固定3h; IV组Davidson固定液固定6h; V组Davidson固定液固定24h; VI组Davidson固定液中固定3h后转移到10%中性甲醛中再固定48h。

液固定24h后,视网膜脱离明显,部分脉络膜与巩膜发生脱离,染色可(图2B); III组豚鼠眼球Davidson固定液固定3h后,眼球内部组织完整,视网膜组织与脉络膜、巩膜紧密连接,没有视网膜脱离断裂的现象,染色均匀(图2C); IV组豚鼠眼球Davidson固定液固定6h后,视网膜与脉络膜和巩膜发生分离,细胞核染色深(图2D); V组豚鼠眼球Davidson固定液固定24h后,视网膜上皮层与外核层断

裂,视网膜整体与脉络膜分离,巩膜组织分离(图2E); VI组Davidson固定液固定3h后转移到10%中性甲醛中48h的固定效果与III组豚鼠眼球Davidson固定液固定3h极为相似,外形平坦整齐,视网膜、脉络膜和巩膜互连接紧密,没有视网膜脱离或断裂,细胞核染色清晰(图2F)。

3 讨论

视网膜由外向内分为色素上皮层、视锥、视杆细胞层、外界膜、外核层、外丛状层、内核层、内丛状层、神经节细胞层、神经纤维层、内界膜共10层,是一种层次分明,结构复杂的神经组织。由于眼球内部中空,视网膜与巩膜组织质地不同,视网膜组织十分脆弱,在组织固定和制片过程中极易发生视网膜脱离,影响制片质量和染色效果,不利于诊断和研究。固定液是直接影响组织切片质量的关键因素,离体组织需要用固定液立即固定防止组织结构破坏和细胞自溶,合适的固定液和固定时间,能够显著提高组织的固定效果^[4]。PAS染色法与苏木精和伊红(HE)染色均作为常用的组织化学染色方法。其染色原理是通过过碘酸(HIO₄)作用于含有乙二醇的化合物,使之断裂形成两个醛基,随后抓住此醛基与Schiff试剂作用而形成紫红

色化合物。广泛应用于人体和动物组织的诊断和研究,可以清楚显示糖原、中性黏多糖、肾小球基底膜系膜基质、寄生虫等细微结构,为临床诊断、分类和治疗提供了依据^[5]。

4%多聚甲醛固定液是实验研究过程中公认的普遍使用的固定液之一,适用于多种组织的固定,包括脑组织、肝组织等大组织中,有着良好的固定效果^[6-7],在眼科实验研究中也用于小鼠眼球和大鼠眼球的固定^[8-9]。研究表明,4%多聚甲醛固定液能够迅速渗透到组织内部,使蛋白质快速凝固,对碳水化合物、糖原、核蛋白等有固定保护作用,但易引起组织的脱水收缩,我们的研究显示,用其固定豚鼠眼球,容易造成眼球内部结构分离,比如视网膜与纤维血管膜脱离的情况。

戊二醛是一种饱和直链二烷基化合物,分子两端各有一个反应性能强的醛基,其性质活泼,长期以来,作为用途广泛的化学试剂,能用于多种目的的消毒、灭菌。1960年代初应用于生物组织材料的固定,其原理主要是通过戊二醛中两个活泼的醛基同胶原蛋白中的氨基酸残基作用的结果^[10]。4%戊二醛固定液,具有较强的穿透性,对微细结构的固定效果更为突出,多用于细胞组织电镜下观察固定,但一定程度上影响抗原的稳定性,通常与其他固定剂联合使用^[11]。

Davidson 固定液(又称为 Hartmann 固定液),1955年由 Moore 和 Barr 首次应用于男性良性肿瘤及相关疾病的性染色质研究中^[12],后来陆续应用于睾丸、小肠等组织的固定,取得良好的固定效果^[13-14]。近年研究发现用 Davidson 固定液对大鼠眼球进行固定,可使其眼球结构保持完整,制片质量优于以往眼球固定液^[15-16]。本研究首次采用 Davidson 固定液对豚鼠眼球进行固定,并比较其与 4%多聚甲醛固定液和 4%戊二醛固定液对豚鼠眼球的固定效果优劣,发现 Davidson 固定液固定 3h 对豚鼠眼球的固定效果最好,在 Davidson 固定液中固定 3h 后转移到 10%中性甲醛中 24h 及更长时间不影响其固定效果。Davidson 固定液中的乙醇和甲醛对组织的细胞内液有轻度的收缩作用,而冰乙酸对组织及细胞核的膨胀作用明显,因此三者合用抵消了甲醛和无水乙醇的收缩以及冰乙酸固定液所引起的组织膨胀和细胞核的肿胀,且冰乙酸能迅速固定染色质,有助于核着色^[17]。此外,也有研究认为 Davidson 固定液为快速固定液,对小标本的固定时间不宜超过 24h,如需长久的保存标本,固定 24h 后应转移至 10%甲醛中保存^[18],这与本研究的结果不谋而合。

本研究发现,Davidson 固定液对豚鼠眼球的具有良好的固定效果,以固定 3h 为最优时间,能够保持眼球外形饱满、经 PAS 染色后可见视网膜、脉络膜和巩膜组织紧密连接,减少视网膜脱离和断裂的发生率,且颜色均匀,能清晰显示视网膜各层结构;而在 Davidson 固定液固定 3h 后转移到 10%中性甲醛中继续固定 48h 不影响其固定效果。

本研究采用了 4%多聚甲醛固定液、4%戊二醛固定液和 Davidson 固定液在不同时间点对豚鼠眼球进行固定,结果表明 Davidson 固定液更适用于豚鼠眼球的固定。Davidson 固定液制作简单,对抗原破坏小,且固定迅速,经济省时,能够保持眼球内部组织结构的完整,用其固定眼球后制备的切片进行 PAS 染色,切片视网膜各层结构清晰,细胞排列整齐,红蓝对比明显,可作为豚鼠眼球固定的首选。

参考文献

- 1 李国平,吴建峰,叶翔,等. 负透镜诱导型近视豚鼠视网膜中谷氨酸及其受体的表达. 眼科新进展 2016;36(10):910-914
- 2 曾官鹏,严丽英,徐双,等. MFN1 在透镜诱导豚鼠近视模型视网膜上的表达及其意义. 眼科新进展 2016;36(1):1-3,11
- 3 王伯云,李玉松,黄高晟,等. 病理技术. 北京:人民卫生出版社 2001:67-74
- 4 罗灿娟,莫木琼,聂钊铭,等. 比较 5 种混合固定液对小鼠眼球标本制片质量和染色效果的影响. 中国卫生检验杂志 2015;25(13):2065-2067
- 5 陈锦,史炯,孟凡青,等. PAS 改良染色法及其在病理诊断中的应用. 现代肿瘤医学 2015;23(21):3069-3071
- 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. 广州医学院学报 2007;35(2):65-68
- 7 陈广斌,谢玲,林坚涛. 不同固定方法对新生大鼠脑组织切片的影响. 中国民康医学 2008;20(15):1730-1731
- 8 孙自强,王军,陈明亮,等. 小鼠眼球标本石蜡切片制作方法的改进. 河南大学学报(医学版) 2015;34(1):36-39
- 9 王春霞,于紫燕,张劲松. 大鼠视网膜标本石蜡切片的固定方法. 解剖学研究 2012;34(4):316-318
- 10 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. 上海交通大学学报(医学版) 2011;31(8):1105-1107
- 11 李天全. 生物组织固定剂戊二醛的化学和应用. 生物医学工程学报 1988;5(2):118-124
- 12 陶亚群,李贵苹,易静,等. 兼顾免疫组化和电镜样品的戊二醛-多聚甲醛混合固定液的应用. 中国细胞生物学学报 2016;38(12):1518-1522
- 13 Moore KL. The sex chromatin in benign tumours and related conditions in man. *Br J Cancer* 1955;9(2):246-252
- 14 李雷,严建燕,苏欣,等. 大鼠睾丸组织固定法的优选研究. 中国比较医学杂志 2013;23(6):20-23,80-82
- 15 赵玉琼,李瑞生,陈华. 三种固定液对大、小鼠肠道组织石蜡切片质量的影响. 中国比较医学杂志 2014;24(11):53-56
- 16 盛嫔,王辉,陆姮磊,等. Davidson's 固定液用于睾丸和眼球固定的优势. 毒理学杂志 2007;4:291
- 17 Chidlow G, Daymon M, Wood JP. Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry: comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives. *Histochem Cytochem* 2011;59(10):884-898
- 18 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 fluid. *Toxicol Pathol* 2002;30(4):524-533