

脂肪组织切片制备方法的改进

徐玉环, 徐艳峰, 刘颖, 黄澜, 于品, 韩云林, 李彦红,
赵文杰, 邓巍, 秦川, 朱华*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨脂肪组织石蜡切片及冰冻切片方法的改进。**方法** 取脂肪组织迅速固定于 10% 中性福尔马林中, 设置不同的脱水程序制备石蜡切片, HE 染色。免疫组化法观察 PPAR γ 和 ITLN1 的表达。取脂肪组织迅速固定于甲醛钙或 10% 中性福尔马林固定液中 24 h 以上, OCT 包埋, 置于 -80°C 冰箱至少 30 min, 设置冰冻切片箱体温度 -20°C , 样品头温度 -30°C , 切片后 HE 染色。**结果** 用改进方法制备的脂肪组织石蜡切片, 切面平整, 无皱褶, 无裂隙, 脂肪细胞结构完整, 染色清晰, 且对免疫组化结果无影响; 冰冻切片的改进提高了切片质量, 结构完整, 形态好, 染色清晰。**结论** 改进的脂肪组织石蜡切片和冰冻切片均可成功应用于不同实验动物, 为脂肪组织的研究提供了有力的支撑条件。

【关键词】 脂肪组织; 石蜡切片; 冰冻切片

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0079-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 01. 016

A modification of adipose tissue preparation

XU Yu-huan, XU Yan-feng, LIU Ying, HUANG Lan, YU Pin, HAN Yun-lin, LI Yan-hong,
ZHAO Wen-jie, DENG Wei, QIN Chuan, ZHU Hua*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of medical Sciences. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To improve the method of paraffin section and frozen section of adipose tissues. **Methods** The adipose tissues were collected and quickly placed in 10% neutral formaldehyde. Sections were prepared by setting different dehydration procedures. The slices were observed under microscope after Hematoxylin-Eosin staining. The expression of PPAR γ and ITLN1 in adipose tissues was detected by immunohistochemistry. For frozen sectioning, the adipose tissues were collected and quickly placed in 10% neutral formaldehyde or Calcium formaldehyde. After embedded by OCT, put in -80°C refrigerator for at least 30 minutes. Setting the temperature of frozen section cabinet to -20°C and the temperature of sample to -30°C . **Results** Following the improved methods, the slices of adipose tissues were better than before. The structural integrity and consistency of adipose tissues were preserved well, the staining was distinct, and the improved methods had no effect on immunohistochemistry results. The improvement of the frozen sectioning had greatly

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81371546)。

[作者简介] 徐玉环 (1980 -), 女, 主管技师。E-mail: yuhuanxu1109@163.com

[通讯作者] 朱华 (1971 -), 女, 主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: zhuh@cnilas.org

improved the slice quality, the adipose tissues showed complete structure and good morphology. **Conclusions** The improved methods can be successfully applied to different experimental animals, which provide a powerful condition for the study of adipose tissues.

【Key words】 Adipose tissues; Paraffin sections; Frozen sections

脂肪组织包括白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 和棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT)。白色脂肪组织和棕色脂肪组织在能量代谢中发挥着截然相反的作用。白色脂肪组织主要通过甘油三酯储存能量, 而棕色脂肪组织则通过产热消耗能量。近年来科学家们越来越重视对脂肪组织的研究。脂肪组织结构特殊, 含有较多的油脂成分, 无论是冰冻切片还是石蜡包埋制片都较其它组织困难。传统的处理方法往往不能制备出完整的切片, 影响对其组织结构的观察, 对后续研究造成困难。为了解决这一问题, 我们不断摸索, 对脂肪组织石蜡切片和冰冻切片进行了改进, 提高了脂肪组织的制片质量。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性金黄地鼠, 4 只, 4 月龄, 体重 85 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2012-0001]。SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 8 周龄, 4 只, 体重 20~25 g, 来源于军事医学科学院实验动物中心 [SCXK (军) 2012-0004]。SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 4 只, 体重 220~250 g, 购自中国食品药品检定研究院 [SCXK (京) 2014-0013]。普通级雄性日本大耳白家兔, 4 月龄, 2 只, 体重 2.5~3.0 kg, 购自北京富龙腾飞养殖中心 [SCXK (京) 2013-0004]。普通级雄性 Beagle 犬, 6 月龄, 1 只, 体重 6.0 kg, 购自北京日新科技有限公司 [SCXK (京) 2011-0007]。普通级雄性恒河猴, 2 岁龄, 1 只, 体重 3.0 kg, 购自北京协尔鑫生物资源研究有限责任公司 [SCXK (京) 2015-0011]。动物在中国医学科学院医学实验动物研究所 [SYXK (京) 2010-0030] 饲养及管理。金黄地鼠、BALB/c 小鼠脱颈椎安乐死, 其余动物戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉后股动脉放血安乐死。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 仪器及试剂

Leica ASP300S 型真空组织脱水机; Leica EG1150H + C 型智能石蜡包埋机, 樱花 IVS-410 型推拉式切片机; Leica Stainer XL 型全自动染色机;

Leica CV5030 型全自动封片机; 10% 中性福尔马林固定液、无水乙醇、二甲苯、苏木素及伊红 Y 染色液购自北京益利精细化学品有限公司; Anti-PPAR γ antibody, SIGMA-ALDRICH, 货号 SAB4502262; Anti-ITLN1 antibody, ABCAM, 货号 ab118232; 兔超敏二步法免疫组化检测试剂, 中杉金桥, 货号 PV-9001; 正常羊血清工作液, 中杉金桥, 货号 ZLI-9056。

1.3 实验方法

1.3.1 金黄地鼠脂肪组织石蜡标本的制备

脱颈椎处死金黄地鼠, 取附睾脂肪, 迅速固定于 10% 中性福尔马林固定液中, 固定液体积约为脂肪组织体积的 50 倍, 并用纱布盖住以防止脂肪组织漂浮。经彻底固定后, 常规取材 (取材厚度为 2~3 mm), 10% 中性福尔马林固定液再固定 12 h 以上。入真空组织脱水机进行脱水、透明、浸蜡。一般而言, 不同种属的实验动物有其不同的脱水条件, 同一种属的实验动物因个别脏器的不同性质, 其脱水条件也要改变。脂肪组织结构特殊, 脂肪细胞内含有较多的脂肪滴, 若按常规程序脱水, 则脱水不完全, 影响后续的制片。因此, 本实验中, 我们将金黄地鼠脂肪组织进行单独处理, 对其脱水条件也进行了改进, 改进前后的脱水条件如表 1 所示。

1.3.2 脂肪组织石蜡切片及 HE 染色

脱水后的脂肪组织, 经智能石蜡包埋机包埋制成蜡块, 推拉式切片机常规切片 (切片厚度 4 μ m), 恒温石蜡烤箱烤干后入全自动染色机染色, 全自动封片机封片。

1.3.3 脂肪组织石蜡切片免疫组化染色

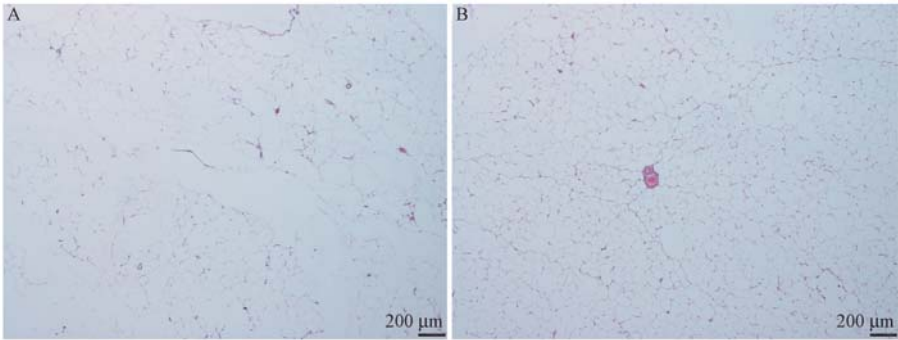
脂肪组织免疫组化染色方法参照文献^[1], 略有改变: (1) 石蜡切片脱蜡至水; (2) 微波修复; (3) 3% 双氧水封闭 15 min; (4) 正常羊血清工作液封闭 20 min; (5) 滴加用抗体稀释液稀释的一抗 (PPAR γ 稀释度为 1:50; ITLN1 稀释度为 1:200), 冰箱 4℃ 孵育过夜; (6) 滴加二抗试剂 1, 室温孵育 10 min; (7) 滴加二抗试剂 2, 室温孵育 10 min; (8) DAB 显色, 镜下观察显色程度; (9) 苏木素复染, 镜下观察细胞核染色; (10) 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

表 1 改进前后脱水程序设定的比较

Tab. 1 Comparison of the dehydration process before and after optimization

步骤 Step	浸入试剂 Reagents	时间设置范围 Duration	
		改进前 Before	改进后 After
1	4% 甲醛(10% formalin)	01:20	01:20
2	50% 乙醇(50% alcohol)	01:20	03:30
3	70% 乙醇(70% alcohol)	01:20	03:30
4	80% 乙醇(80% alcohol)	01:20	03:30
5	95% 乙醇 I(95% alcohol I)	01:20	03:30
6	95% 乙醇 II(95% alcohol II)	01:20	03:30
7	100% 乙醇 I(100% alcohol I)	01:10	03:30
8	100% 乙醇 II(100% alcohol I)	01:10	03:30
9	二甲苯 I(xylol I)	01:00	01:00
10	二甲苯 II(xylol II)	01:10	01:10
11	蜡 I(paraffin I)	01:00	01:00
12	蜡 II(paraffin II)	01:10	01:10
13	蜡 III(paraffin II)	01:20	01:20

注:改进前程序为金黄地鼠其他脏器常规脱水程序;改进后程序为本实验设定的脂肪组织脱水程序。
Note. The dehydration process of other organs before optimization. The optimized process of this experiment.



注:(A)改进前;(B)改进后。

图 1 改进前后金黄地鼠脂肪组织石蜡切片 HE 染色比较(Bar = 200 μm)

Note. (A) Before optimization. (B) After optimization.

Fig. 1 Comparison of the hamster adipose tissue paraffin sections before and after optimization by Haematoxylin and Eosin staining

1.3.4 脂肪组织冰冻切片的制备

动物安乐死后,取脂肪组织迅速固定于甲醛钙或 10% 中性福尔马林固定液中,且固定液体积约为脂肪组织体积的 50 倍,并用纱布盖住以防止脂肪组织漂浮。经彻底固定且用卫生纸吸水后,OCT 包埋,冻于冰箱 - 80℃ 至少 30 min。设置冰冻切片机箱体温度为 - 20℃,样品头温度为 - 30℃,切片厚度为 10 μm。切片后不需要再固定即可入全自动染色机染色,若需要长期保存需根据实验要求在丙酮或甲醛钙中固定 15 min,再放入冰箱 - 20℃ 保存。

2 结果

2.1 金黄地鼠脂肪组织在脱水程序改进前后 HE 染色比较

脂肪组织因其特殊的结构,按常规程序脱水,包

埋后进行切片,则切片困难且有空洞,展片时蜡片向四周扩散,染色后切片不完整。将脱水程序改进后,脂肪组织能与石蜡很好地融合在一起,切片时手感柔润,且无空洞,展片时蜡片完整,染色后切片完整,结构清晰。(见图 1)

2.2 改进后的脱水程序在其他动物脂肪组织石蜡切片中的应用

脂肪组织主要由大量群集的脂肪细胞构成,聚集成团的脂肪细胞由薄层疏松结缔组织分割成小叶。经过酒精及二甲苯的溶解成为空泡状。本研究中,我们将改进后的程序应用于小鼠,大鼠,兔,狗,猴及人脂肪组织中,制成的蜡块能顺利地切出完整的切片,经染色后可见切面平整,层次清晰,无皱褶,无裂隙,脂肪细胞结构完整,染色清晰。(见图 2)

2.3 经改进后的脱水程序制备的石蜡切片在免疫组化中的应用

经改进后的脱水程序制备的石蜡切片对免疫组化染色未见明显影响:细胞膜完整,细胞核清晰。免疫组化结果显示:PPAR γ 和 ITLN1 在正常金黄地

鼠脂肪组织中均有表达。PPAR γ 呈弱阳性表达,ITLN1 呈阳性表达。(见图 3)

2.4 脂肪组织冰冻切片与石蜡切片 HE 染色的比较

脂肪组织几乎不含水,在冰冻切片中难象其它

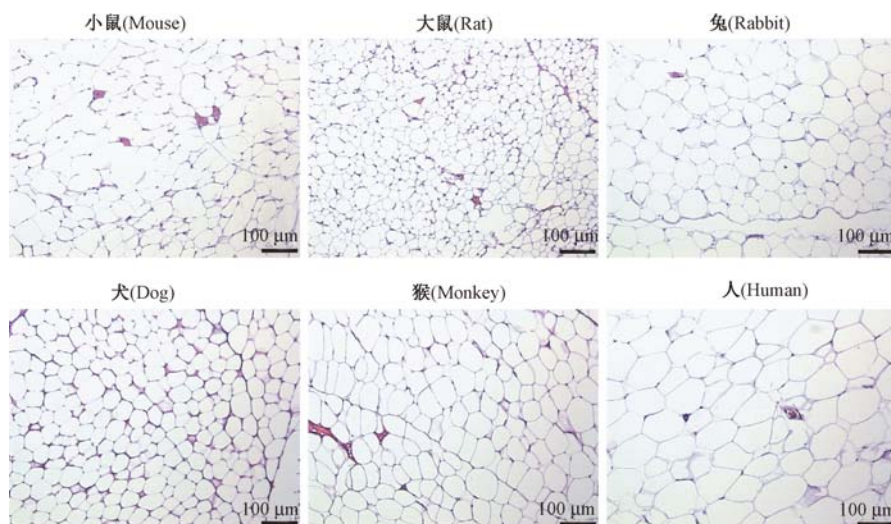


图 2 小鼠,大鼠,兔,犬,猴及人脂肪组织石蜡切片 HE 染色结果 (Bar = 100 μ m)

Fig. 2 The results of mouse, rat, rabbit, dog, monkey and human hamster adipose tissue paraffin sections by Haematoxylin and Eosin staining

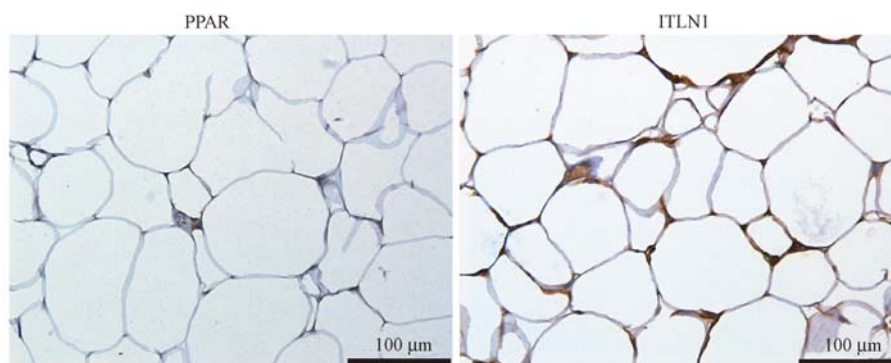
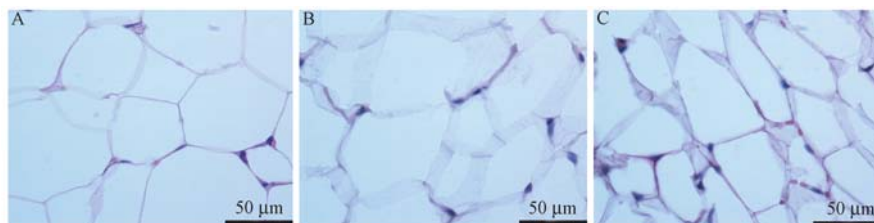


图 3 PPAR γ 和 ITLN1 在金黄地鼠脂肪组织石蜡切片中的表达 (Bar = 100 μ m)

Fig. 3 The expressions of PPAR γ and ITLN1 in hamster epididymal fat paraffin sections



注:(A)金黄地鼠脂肪组织蜡切片;(B)金黄地鼠脂肪组织冰冻切片;(C)BALB/c 小鼠脂肪组织冰冻切片。

图 4 脂肪组织冰冻切片与石蜡切片 HE 染色比较 (Bar = 50 μ m)

Note. (A) Paraffin sections of hamster adipose tissue. (B) Frozen sections of hamster adipose tissue. (C) Frozen sections of BALB/c mice adipose tissue.

Fig. 4 The comparison of frozen section and paraffin section by Haematoxylin and Eosin staining

组织一样被冻硬。经过不断摸索,我们成功制备了脂肪组织的冰冻切片。从图 4B 和图 4C 中可以看到切片结构完整,细胞间质清晰,细胞膜略厚。与冰冻切片相比,石蜡切片(图 4A)染色颜色更鲜艳,脂肪空泡更为圆润。从固定液选择上看,甲醛钙固定液处理的脂肪组织(图 4C)比 10% 中性福尔马林处理的脂肪组织(图 4B)细胞形态更好一些,细胞膜更为清晰。

3 讨论

在相当长的一段时间内,脂肪组织被单纯的认为是能量储备和调节的组织器官,直到 1994 年瘦素^[2]的发现。随着人们对脂肪组织在生命中的作用有了更深入的了解和全面的认识,脂肪生物学^[3]诞生。日益增加的肥胖症、糖尿病、动脉粥样硬化及其他相关疾病,使脂肪组织备受关注,对其功能的认识也发生了根本的转变。研究表明,脂肪细胞的分化对脂肪细胞的结构和功能变化具有重大影响^[4]。白色脂肪细胞的结构和功能紊乱可引发肥胖、胰岛素抵抗、炎症,并与多种疾病如糖尿病、肿瘤、心脑血管疾病等的发生、发展有关^[5-6]。而棕色脂肪组织不仅能御寒而且有助于改善葡萄糖的平衡,增强机体能量的消耗,从而阻止肥胖症、糖尿病等疾病的发生^[7]。

脂肪组织主要由大量群集的脂肪细胞构成,脂滴占据了整个脂肪细胞的大部分。细胞内脂滴的多少是判定脂肪细胞分化程度的重要指标。脂肪细胞内脂滴的染色方法主要有油红 O 染色和尼罗红荧光染色法^[8],这两种方法都需要冰冻切片。脂肪细胞几乎不含水,在冰冻切片中很难象其它组织一样被冻硬。本研究中,我们除了将温度调低,对脂肪组织本身也做了处理,提高了切片质量。因此在制备脂肪组织的冰冻切片时,先用甲醛钙或 10% 中性福尔马林固定液固定脂肪组织。若研究脂滴,切片前需要将脂肪组织在甲醛钙固定液中彻底固定,且先在 -80℃ 冰箱中冷冻至少 30 min,冰冻切片机机体温度调到 -20℃,样品头温度调到 -30℃,切片再用冷甲醛钙固定 15 min 后放 -20℃ 保存备用;若不研究脂滴,仅需要在 10% 中性福尔马林固定液即可,切片再用冷丙酮固定 15 min 后放 -20℃ 保存备用。

而观察细胞的基本形态和抗体的表达,可借助于石蜡切片,虽然脂质会脱去,但细胞的基本形态

不变,且能很好的保存抗原。金黄地鼠(Golden Hamster)对食源性的脂肪、胆固醇摄入较为敏感,是一种较好的脂代谢研究模型^[9],又由于附睾处脂肪体积大且形态完整,因此本研究中我们选取金黄地鼠的附睾脂肪作为实验的基本条件。脂肪组织中含有较多的油脂成分,按常规脱水程序处理,切出的片子空洞,破碎。本研究通过实验,不断摸索,利用真空组织脱水机成功制备了完整的脂肪组织石蜡切片。

过氧化物酶体增殖子激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR γ) 具有脂肪组织特异性,是白色与棕色脂肪细胞的产生和分化所必需的一种专性转录因子^[10]。肠凝集素 1 (intelectin 1, ITLN1) 是网膜脂肪组织特异性表达的脂肪细胞因子^[11]。因此本研究中,我们选取 PPAR γ 和 ITLN1 两个基因在金黄地鼠脂肪组织中的表达来验证我们的脱水条件对免疫组化染色无影响。

制备脂肪组织石蜡切片需要注意以下几点:(1) 固定:固定一定要彻底,这是制备任何病理切片都至为关键的一步,脂肪组织含有较多的油脂,有机溶剂不易渗透。固定液体积为脂肪组织体积的 50 倍,且用纱布盖住以防止脂肪组织漂浮于液体表面而固定不全。(2) 取材:改进的方法对于取材厚度和组织部位没有特别的要求,无论是白色脂肪还是棕色脂肪只要常规取材 2~3 mm 即可。取材大小也无特殊要求。(3) 脱水:脂肪易被酒精、二甲苯溶解,本实验中,我们只调整了梯度酒精的脱水程序,组织在无水乙醇和二甲苯中时间过长,组织硬脆,不易切片。

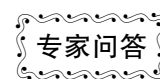
切片制片方法的选择上需要注意的几点:(1) 免疫组化,若所检测抗原不稳定,只能做冰冻切片。若所检测抗原稳定,原则上来讲,冰冻、石蜡切片均可,但用石蜡切片检测的染色效果要比冰冻切片好一些。(2) 研究目的,石蜡切片对组织细胞的定位准确。冰冻切片可能会因为冰晶的形成而破坏组织细胞的形态结构。(3) 标本保存,石蜡切片可长期保存且细胞形态结构保持良好。冰冻切片适合对新鲜组织制片且可以相对避免石蜡自发荧光的干扰。

用改进的方法制备的脂肪组织石蜡切片,结构完整,一致性好,且对免疫组化结果无影响;冰冻切片的改进提高了切片质量,结构完整,形态好,为脂肪组织的研究提供了有力的支撑条件。

参考文献:

- [1] 徐玉环,徐艳峰,刘颖等. 视网膜血管铺片技术的改进[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(5): 51-53, 50.
- [2] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(6505): 425-432.
- [3] Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, *et al.* Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology [J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(12): 1023-1031.
- [4] Mueller E. Understanding the variegation of fat: novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(3): 352-357.
- [5] Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, *et al.* Adipose tissue: the new endocrine organ [J]. Science, 2009, 34(9): 1847-1856.
- [6] Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health [J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(1): 24-36.
- [7] Castillo-Quan JL. From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokineirisin: implications for diabetes and obesity [J]. Dis Model Mech, 2012, 5(3): 293-295.
- [8] Xing Y, Yan F, Liu Y, *et al.* Matrine inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation associated with suppression of ERK1/2 phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(3): 691-695.
- [9] Wang PR, Gao Q, Ippolito M, *et al.* High fat fed hamster, a unique animal model for treatment of diabetic dyslipidemia with peroxisome proliferator activated receptor alpha selective agonists [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 427(3): 285-293.
- [10] EL-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, *et al.* Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPAR γ and C/EBP α [J]. J Biol Chem, 1999, 274(12): 7946-7951.
- [11] Yang RZ, Lee MJ, Hu H, *et al.* Identification of omentin as a novel depot specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(6): E1253-E1261.

[收稿日期] 2016-06-17



问: 检测血糖取血时, 需要注意哪些事项?

答: 1、避免噪音

DM 模型动物很容易受惊, 在取血时要保持安静, 抓取、固定等操作动作要轻柔, 尽量不要产生噪音, 避免噪音引起应激引起血糖升高。

2、提前作适应性操作

首次操作易使 DM 模型出现紧张、恐惧, 在取血前 2 d 要进行抓取等模拟操作, 使动物提前适应, 减少取血的操作应激。

3、禁止眼眶取血

由于 DM 模型血液较粘, 且大部分动物机体存在炎症或低度炎症, 组织受损后不易愈合或恢复较慢, 大鼠、小鼠等啮齿类动物 DM 模型不宜进行眼眶动静脉取血, 否则会引起眼部血管受损而加速 DM 视网膜病变和白内障的发生。

4、禁食前的采食时间相对一致化

大鼠、小鼠等啮齿类动物 DM 模型是属于自由采食, DM 模型动物的采食时间、采食的频率和每次采食的量均不一致, 在采取禁食时, DM 模型采食情况个体差异很大, 最好在采取禁食前 1~2 h 加喂一次饲料, 促使动物采食, 使动物在禁食前的采食时间相对一致化。

5、禁食时间不宜过长

T2DM 模型因自身能分泌胰岛素或有高胰岛素血症, 禁食时间过长会引起低血糖反应, 尤其是大鼠、小鼠等啮齿类动物 T2DM 模型。

(感谢浙江中医药大学动物实验研究中心 陈民利 教授的解答)