

六种固定液对小鼠角膜固定效果的比较

高洪彬^{1,2}, 林 英³, 宋向荣¹, 蔡婷峰¹, 陆丰荣¹, 刘秋英¹

(1. 广东省职业病防治院, 广东省职业病防治重点实验室, 广州, 广东 510300; 2. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院毒理学系, 广州, 广东 510515; 3. 中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 广州, 广东 510060)

【摘要】 目的 观察 6 种不同固定液固定下, 小鼠角膜的组织形态学特征并筛选出适合角膜固定的固定液。**方法** 取 60 只 NIH 小鼠眼球, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别固定于 6 种固定液中, 即 95% 乙醇、10% 中性甲醛、Bouin's 液、甲醛-乙酸固定液和 Davidson's 液。固定完成后, 标本经 80%、95%、100% 梯度酒精脱水, TO 型生物制片透明剂透明, 石蜡浸泡, 最后石蜡包埋。石蜡切片厚度均为 4 μm , 分别做 HE 染色, 显微镜下观察形态学特征并对角膜各区域厚度进行测量分析。**结果** 不同固定液固定的小鼠角膜组织形态及厚度各具特征, 而甲醛-乙酸液固定后的角膜组织细胞形态改变小。**结论** 甲醛-乙酸液固定后组织细胞形态改变小, 是比较合适的小鼠角膜固定液。

【关键词】 小鼠; 角膜; 固定液;

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0049-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671-7856. 2017. 06. 010

Comparison of the fixation effect of six types of fixatives on histology of mouse cornea

GAO Hong-bin^{1,2}, LIN Ying³, SONG Xiang-rong¹, CAI Ting-feng¹, LU Feng-rong¹, LIU Qiu-ying¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Occupational Disease Prevention and Treatment, Guangdong Province Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment, Guangzhou 510300, China;

2. Department of Toxicology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University,

Guangzhou 510515; 3. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060)

【Abstract】 Objective To observe the morphological features of mouse cornea after fixation with 6 different types of fixatives, and choose an optimal fixative suitable for fixation of mouse cornea. **Methods** 60 eyes of NIH mice were randomly divided into 6 groups, 10 eyes in each group. The eyes were respectively fixed in the 6 types of fixatives, namely, 95% ethanol, 10% neutral buffered formalin, 10% formalin, Bouin's solution, Formaldehyde-acetic acid fixative solution, and Davidson's solution. After fixation, the specimens were dehydrated with 80%, 95%, 100% gradient alcohol, and clearing was performed using TO-type histological clearing agent, then soaked in melted wax, and finally embedded in paraffin. The paraffin sections were 4 μm thick, and stained with hematoxyline and eosin. The histological features of the cornea were observed and various regions of the cornea were measured. **Results** Different fixatives showed

【基金项目】 广东省医学科学技术研究基金(编号: A2016122); 广东省职业病防治重点实验室(2012A061400007)。

【作者简介】 高洪彬(1980-), 男, 研究方向: 毒性病理学, E-mail: 869903043@QQ.com; 林英(1980-), 女, 研究方向: 眼科学, E-mail: lylytulip@126.com; 二者为并列第一作者。

【通讯作者】 高洪彬(1980-), 男, 研究方向: 毒性病理学。E-mail: 869903043@QQ.com。

different histological characteristics and thickness of the mouse cornea differently. The acetic acid-formaldehyde fixative caused least changes of the morphology and thickness of the mouse cornea. **Conclusions** It is important to consider the impact of different fixatives on the corneal tissue morphology. In order to avoid histological artifacts, formaldehyde-acetic acid fixative among the 6 examined fixatives is the most suitable for histological examination of mouse cornea.

[Key words] Mouse; Cornea; Fixative; Histology

角膜为眼球重要的组织结构,为多种实验模型的研究对象^[1-3]。在病理制片过程中,由于标本需要经过一系列的化学试剂处理,角膜的组织形态学结构将不可避免的产生一些变化^[4-6]。从而造成人工假象,并对病理学诊断造成困扰。固定液是影响病理制片质量的重要因素,为了优化角膜组织病理学观察的条件,需要相对简便、实用和可靠的固定液。本实验通过采用几种不同固定液固定下的小鼠眼球角膜,观察比较相同制片条件下不同固定液固定的小鼠角膜组织形态学特征,筛选出适合小鼠眼球固定的固定液。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

3 月龄 SPF 级雄性 NIH 小鼠 30 只(60 眼)购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证:【SCXK(粤)2013—0002】,实验动物使用许可证:【SYXK(粤)2014—0048】。饲养环境条件满足国家标准 GB14925—2010《实验动物环境及设施》的要求,给予全价营养动物饲料,伽玛射线辐照灭菌,饮水为定期检测盐酸化纯净无菌水,用饮水瓶供水。

1.2 仪器与试剂

采用的仪器包括 Thermo Excelsior ES 脱水机、Thermo Histo Star 包埋机、Thermo FN2265M0908 切片机、Leica HI1220 烘片机和 Sanyo OMT Oven MKII 型恒温烘箱、Zeiss-Scope A1 显微镜以及 Leica Application Suite 图像处理软件。甲醛溶液(37% ~ 40%)、无水乙醇、二甲苯、苦味酸、乙酸,从广州化学试剂厂购得;TO 型生物制片透明剂购置于中南化学试剂公司;PBS 缓冲液购买于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 取材:30 只 NIH 小鼠颈椎脱臼处死,取双侧眼球,共 60 只眼球。随机分为 5 组,每组 10 只,不切开眼球,分别固定于 6 种固定液中,即 95% 乙醇(A 组)、10% 中性甲醛(B 组)、10% 甲醛(C 组)、Bouin's 液(D 组)、甲醛-乙酸液(E 组)和 Davidson's 液(F 组)。

1.3.2 固定方法:采用下述固定液浸泡固定 24 h: A 组固定液由 100% 乙醇 95 mL 和蒸馏水 5 mL 配制;B 组由甲醛原液(37% ~ 40%)10 mL 和 PBS 缓冲液 90 mL 配制;C 组由甲醛原液(37% ~ 40%)10 mL 和蒸馏水 90 mL 配制;D 组由饱和苦味酸水溶液 75 mL、甲醛原液 25 mL 和冰醋酸 5 mL 配制;E 组由 10% 中性甲醛 80 mL、乙酸 20 mL 混合而成。F 组固定液由 95% 乙醇 30 mL、甲醛原液(37% ~ 40%)20 mL、乙酸 10 mL 和蒸馏水 20 mL 混合而成,浸泡固定 6 h 后移至 10% 中性甲醛溶液固定液溶液中,然后继续固定 24 h。

1.3.3 病理制片:固定标本经 80%、95%、100% 梯度酒精脱水后,TO 型生物制片透明剂透明,石蜡浸泡,最后石蜡包埋。石蜡切片厚度均为 4 μm ,采用 HE 染色。各组标本同批次在相同制片条件下处理。

1.3.4 病理组织学观察:使用显微镜进行不同固定液作用下的角膜的病理组织学观察,并对角膜中央区、旁中央区、周边区及角膜缘区使用 Leica Application Suite 图像处理软件进行厚度的测量。

2 结果

2.1 6 种不同固定液固定的小鼠眼球角膜组织形态及厚度比较

2.1.1 各组角膜厚度:不同组别固定的角膜厚度不一。E 组最厚且与小鼠角膜直接测量的结果较一致^[6],其它组别均发生了不同程度的收缩、变薄。同组别小鼠角膜从中央到周边,呈逐渐变薄趋势。

2.1.2 上皮细胞层:不同组别上皮细胞层厚度不一致。E 组最厚,F 组次之,A 组最薄。E 组镜下可见角膜上皮各层结构较整齐、层次较分明,角膜上皮表面的扁平细胞,中间层的翼状细胞及基底层的基底细胞,组织形态正常。其它组别均发生了不同程度的收缩、变薄,细胞形状也出现不同程度的压缩、变平。C、D、F 组,角膜上皮各层结构较整齐、层次较分明,角膜中间层的翼状细胞及基底层的基底细胞轻度收缩;A、B 组各角膜上皮细胞重度收缩,层次不清。

2. 1. 3 前界层：各组角膜前界层在光镜下均难于观测。

2. 1. 4 基质层：不同组别基质层厚度不一致。E 组最厚,D 组次之,A 组最薄。E 组厚度与小鼠角膜直接测量的结果较一致^[6],镜下角膜基质平整,胶原纤维均质粉红染,纤维组织间的裂隙少见;基质中见梭形的角膜细胞散在分布,细胞形态未见明显改变。除 E 组之外的其它各组,基质层不同程度收

缩、变薄。C 组角膜基质裂隙少见,A、B 组,裂隙较少,角膜细胞可见压缩变形;D、F 组角膜基质松散、裂隙明显,角膜细胞形态较正常。

2. 1. 5 后界层：各组角膜后界层在 HE 染色下均难于观测。

2. 1. 6 内皮细胞层：各组均能观测到内皮细胞层,为单层扁平细胞。各组间形态学差别不大。各组角膜厚度见表 1~2,各组角膜 HE 染色照片见图 1。

表 1 各组别角膜各层厚度(μm)
Tab. 1 The thickness of cornea in each group (μm)

组别 Groups	上皮细胞层厚度 Epithelial thickness					基质层厚度 Stromal thickness				
	中央区	旁中央区	周边区	角膜缘	平均值	中央区	旁中央区	周边区	角膜缘	平均值
A	16. 68 ± 1. 67	15. 14 ± 1. 59	12. 07 ± 1. 42	6. 00 ± 0. 40	12. 47	40. 59 ± 6. 13	38. 50 ± 4. 18	35. 71 ± 4. 88	27. 28 ± 2. 50	35. 52
B	29. 12 ± 3. 98	26. 64 ± 4. 16	22. 37 ± 3. 90	11. 67 ± 2. 38	22. 45	44. 08 ± 8. 33	41. 52 ± 6. 19	37. 12 ± 5. 01	29. 13 ± 4. 68	37. 96
C	36. 55 ± 3. 45	33. 02 ± 4. 95	28. 43 ± 4. 45	17. 47 ± 1. 55	28. 87	57. 56 ± 6. 53	57. 30 ± 3. 99	53. 87 ± 6. 74	44. 76 ± 5. 40	53. 38
D	37. 93 ± 2. 99	36. 47 ± 2. 77	33. 50 ± 4. 18	16. 43 ± 1. 15	31. 08	78. 97 ± 10. 55	71. 27 ± 10. 64	58. 35 ± 14. 58	40. 25 ± 2. 54	62. 21
E	49. 41 ± 6. 70	45. 14 ± 6. 70	41. 35 ± 6. 35	20. 68 ± 3. 70	39. 14	92. 07 ± 8. 77	89. 33 ± 8. 68	74. 27 ± 9. 04	50. 57 ± 6. 21	76. 56
F	38. 90 ± 4. 26	36. 65 ± 4. 42	34. 86 ± 7. 29	15. 38 ± 2. 09	31. 45	58. 74 ± 5. 92	57. 42 ± 6. 00	49. 20 ± 5. 22	38. 43 ± 4. 32	50. 95

表 2 各组别各区角膜厚度(μm)
Tab. 2 Thickness of different regions of the cornea in each group (μm)

组别	中央区	旁中央区	周边区	角膜缘	平均值
A	55. 24 ± 8. 40	52. 60 ± 5. 74	47. 78 ± 5. 57	33. 24 ± 2. 66	47. 22
B	73. 40 ± 6. 97	68. 11 ± 6. 18	56. 92 ± 6. 40	42. 07 ± 5. 73	60. 12
C	94. 14 ± 9. 35	90. 50 ± 9. 24	82. 28 ± 10. 00	61. 26 ± 6. 96	54. 76
D	115. 27 ± 12. 44	107. 94 ± 13. 72	92. 36 ± 14. 60	56. 59 ± 3. 10	93. 04
E	140. 18 ± 9. 12	136. 11 ± 7. 66	113. 89 ± 9. 56	71. 39 ± 7. 97	115. 39
F	97. 60 ± 9. 09	93. 98 ± 7. 07	80. 69 ± 5. 55	53. 57 ± 5. 24	81. 46

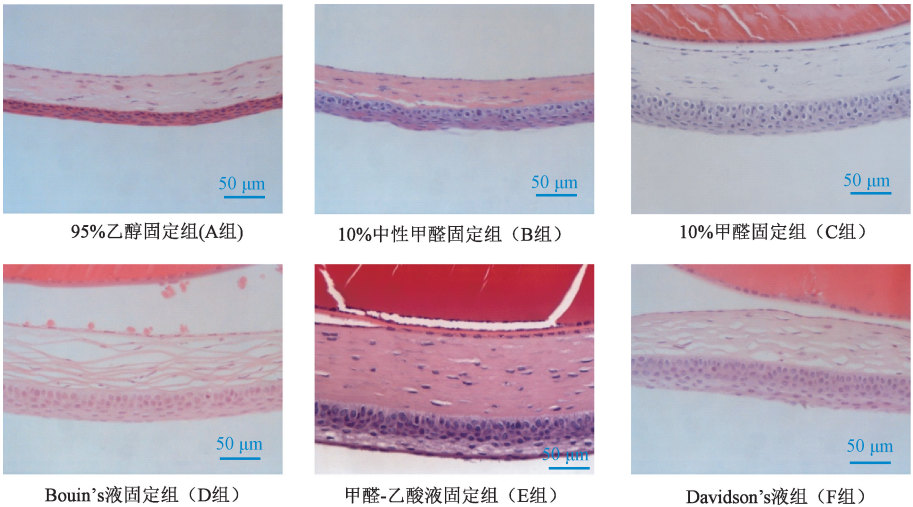


图 1 各组小鼠角膜 HE 染色照片 (标尺 = 50 μm)
Fig. 1 Histology images of the cornea fixed in different fixative solutions. HE staining. Bar = 50 μm.

3 讨论

体积分数 10% 中性甲醛及 10% 甲醛为实验室常用固定液^[7,8]。由于甲醛对组织的收缩作用,因而 10% 甲醛溶液可引起角膜组织一定程度的收缩、变形。而体积分数 10% 中性甲醛溶液,由于渗透压相对 10% 甲醛溶液更高,在固定过程中容易使角膜水份析出,因而角膜组织收缩更明显。95% 乙醇具有很强的组织收缩作用^[9],在本实验的六种固定液中,组织细胞收缩、变形的程度最严重。

Davidson's 液及 Bouin's 液对小鼠视网膜的固定效果较好^[10,11],然而在角膜的固定中,效果不理想,主要表现在角膜基质疏松、裂隙明显。这说明小鼠眼球的不同部位对固定液的收缩率不同,角膜特别是基质层组织不适合使用 Davidson's 液及 Bouin's 液固定。

甲醛-乙酸液由 10% 中性甲醛固定液及乙酸混合而成,乙酸对组织及细胞核的膨胀作用明显^[12,13],因此二者合用可抵消 10% 中性甲醛固定液的收缩以及冰醋酸固定液所引起的组织膨胀和细胞核的肿胀。组织学观察,组织细胞形态与 Hongmin Zhang 等^[14]对小鼠角膜组织未经固定直接观察的结果比较,组织细胞未见明显收缩,基质层未见明显裂隙,固定后组织细胞形态改变小。

由此可见,不同固定液固定的小鼠角膜,具有不同的形态学特征,这是进行病理组织学检查需要考虑到问题,以免因为人工假象而造成误诊。由于甲醛-乙酸固定液固定后组织细胞形态改变小,因而是比较理想的小鼠角膜固定液。

参考文献:

- [1] 吴敏,李娜,孙晓梅,等. 恒河猴和树鼩角膜内皮细胞的比较分析 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 164-168.
- [2] 邱晓岷,龚岚,陈敏洁. 兔机械性角膜上皮损伤对结膜杯状

细胞及结膜上皮细胞的作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(6): 402-405.

- [3] 陈敏洁,龚岚,邱晓岷. 兔机械性角膜上皮损伤后伤口愈合的形态学动态变化 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(1): 36-40.
- [4] Mathew JH, Goosey JD, Bergmanson JP. Quantified histopathology of the keratoconic cornea [J]. Optom Vis Sci. 2011, 88(8): 988-9997.
- [5] Wang H, Yang LL, Ji YL, et al. Different fixative methods influence histological morphology and TUNEL staining in mouse testes [J]. Reprod Toxicol, 2016, 60: 53-61.
- [6] Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, et al. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity [J]. Histopathology, 2015, 66(3): 388-397.
- [7] 梁英杰,凌启波,张威. 临床病理学技术 [M]. 出版地:人民卫生出版社, 2011: 42.
- [8] 赵玉琼,陈华. 不同固定液对大鼠肝脏组织石蜡切片质量的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(6): 486-488.
- [9] 赵宝忠,刘俊华,高俊琴,等. 乙醇类固定剂对组织细胞处理性能的实验评价 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(2): 223-225.
- [10] 高洪彬,林英,宋向荣,等. 四种固定液对小鼠视网膜固定效果的比较 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(3): 352-353.
- [11] 盛婵,王辉,陆炬磊,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
- [12] 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.
- [13] 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 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(11): 53-56.
- [14] Zhang HM, Wang LY, Xie YT, et al. The measurement of corneal thickness from center to limbus in vivo in C57BL/6 and BALB/c mice using two-photon imaging [J]. Exp Eye Res, 2013, 115: 255-262.

[修回日期]2016-12-07