

王园园,王涛,李新,等. 小鼠不同组织冰冻切片技术探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 59-63.
Wang YY, Wang T, Li X, et al. Discussion of frozen section techniques with different tissues in mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 59-63.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.09.011

小鼠不同组织冰冻切片技术探讨

王园园,王 涛,李 新,王 斌,江 魁*

(华兰基因工程有限公司,河南 新乡 455200)

【摘要】 目的 探讨实验动物小鼠不同组织冰冻切片制作的方法与技巧,提高冰冻切片质量,更好地服务于单抗药物非临床安全性评价。**方法** 采用德国徕卡 CM1950 恒温冷冻切片机,对健康 NIH 小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织进行取材、包埋、冰冻切片、HE 染色、封片。**结果** 切片无褶皱、无刀痕、无破损,镜下组织无过多冰晶,细胞形态清晰,细胞核和细胞质颜色分明,染色良好。**结论** 在制作冰冻切片时,应该从取材、包埋、速冻、温度选择、恒温冷冻切片等各个环节进行严格控制,但是,不同组织根据自身特点会存在差异,应区别对待。此外,在掌握关键性技术要点的同时还应该具有高度的责任心和耐心,制作出高质量的冰冻切片,才能更好地服务于单抗药物非临床安全性评价工作。

【关键词】 小鼠;非临床研究;冰冻切片;实验动物;新鲜组织

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 09-0059-05

Discussion of frozen section techniques with different tissues in mice

WANG Yuanyuan, WANG Tao, LI Xin, WANG Bin, JIANG Kui*

(Hualan Genetic Engineering CO., LTD., XinXiang 453500, China)

【Abstract】 Objective We explored the method and techniques of preparing frozen sections using different mice tissues as our experimental animal materials, to improve frozen section quality, and to increase the serviceability of these techniques for the non-clinical safety evaluation of monoclonal antibodies. **Methods** The heart, liver, spleen, lung, kidney, and brain tissues of healthy NIH mice were collected, embedded, frozen, and sliced using a Leica CM1950 thermostatic frozen microtome, and then stained by hematoxylin and eosin dye and sealed. **Results** The slices were observed by light microscopy, and the result show no fold, no knife marks, no damage, and no excessive ice crystals. The cell morphology was clear, with the nucleus and cytoplasm clearly colored, and staining was good. **Conclusions** In the process of making frozen slices, strict controls from the aspects of collecting, embedding, quick-freezing, temperature selection, and thermostatic frozen sectioning should be carried out. However, different tissues have differences according to their own characteristics, and should be treated differently. In addition, to prepare high-quality frozen sections, and to better serve the non-clinical safety evaluation of monoclonal antibodies, we collectively need a high sense of responsibility and patience while mastering key technical points.

【Keywords】 mice; non-clinical studies; frozen section; experimental animals; fresh tissue

冰冻切片是一种在低温条件下将生物组织快速冻结使组织达到一定硬度后进行恒温冷冻切片的实验技术^[1],与石蜡切片相比,组织不需要脱水、透明等中间环节,能较好地保存脂肪、类脂等成分,有利于组织抗原性和某些酶活性的保存,被广泛应用于免疫组化、免疫荧光、酶检测、组织定位和原位

[作者简介]王园园(1989—),女,硕士,研究方向:药物非临床安全性评价。E-mail:743561169@qq.com。

[通信作者]江魁(1986—),男,本科,助理工程师,研究方向:医药管理。E-mail:jk3395@hualan.com

杂交等研究中^[2-5]。近年来,单抗类药物因其广阔的应用前景逐渐成为新药研发领域的热点,而组织交叉反应作为评价单抗药物非临床安全性的重要手段,在药物临床前安全评价中有着非常重要的作用^[6],因此冰冻切片技术逐渐被应用到单抗类药物非临床研究中,这就要求广大病理实验技术人员能够制作高质量的冰冻切片,为药物非临床研究提供数据支持。由于不同组织中水分、质地、形态结构和成分的多样性等因素会直接影响冰冻切片的质量^[7],因此笔者分别从组织包埋、速冻方法选择、切片温度等方面对小鼠不同组织冰冻切片技术进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 NIH 小鼠 10 只,雌雄各半,20~22 g,6~7 周龄,清洁级,来源于华兰生物疫苗股份有限公司动物中心[SCXK(豫)2020-0003],在华兰基因工程有限公司动物中心屏障动物实验设施进行实验[SYXK(豫)2018-0014]。整个实验过程中遵循了实验动物福利的“3R”原则。

1.2 主要试剂与仪器

甲醛溶液、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、二甲苯、中性树胶(广州市中南化学试剂有限公司);苏木精-伊红染液(广州市秀威贸易有限公司);冰冻切片 OCT 包埋剂(日本樱花);冷冻切片机(Leica,CM1950);麦克奥迪切片扫描系统(麦克奥迪,EasyScan1SE);倒置显微镜(蔡司,Axio VertA1);脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械,XG1.DTF-1.5);pH 计(赛多利斯科学仪器,PB-10);高精密度电子天平(赛多利斯科学仪器,GL224I-1SCN)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织采集

采用颈椎脱臼法处死小鼠,然后将其浸入 75% 乙醇中 30 s~1 min,对小鼠体表进行消毒,不要让 75% 乙醇进入到小鼠口鼻耳中,将小鼠置于解剖板上,四肢固定,按照解剖顺序依次采集脾、肝、肾、心、肺、脑组织,去掉多余的脂肪、结缔组织,切取适当大小组织进行包埋。

肺和心脏采集时比较特殊,先在气管靠近头端位置剪一斜切口,取移液枪缓慢匀速灌注 200~400 μL 50% OCT 包埋剂,使 50% OCT 包埋剂置换肺泡

中的气体;用血管夹夹住气管,然后用剪刀沿胸腔后壁分离肺和心脏;心脏和肺分离后用干纱布在组织表面轻轻按压,将心腔和心、肺表面的血液和组织液拭掉;分别切取适当大小心、肺组织进行包埋。

1.3.2 组织包埋及速冻

将 OCT 包埋剂挤满包埋模具,避免产生气泡,并用记号笔在四角标上样品名称;将切好的脏器切面向下垂直放入 OCT 包埋剂中,按以下两种速冻方式处理后,-80℃ 保存或进行冰冻切片。

1.3.3 干冰/无水乙醇混合物速冻法

在塑料方盒中装入约 2/3 的无水乙醇,向无水乙醇中缓慢加入干冰,并搅拌使二者混合成糊状,将塑料方盒放入装有干冰的泡沫盒中备用;将装有组织样品的包埋模具漂浮放于干冰/无水乙醇混合物表面直至 OCT 完全凝固,将完全凝固的组织先放置干冰上一段时间,使表面的无水乙醇挥发干净,-80℃ 保存或进行冰冻切片。

1.3.4 液氮速冻法

将装有组织样品的包埋模具直接漂浮于液氮上,直至 OCT 完全凝固,-80℃ 保存或冰冻切片。

1.3.5 冰冻切片

提前开机,根据组织种类和大小的不同,调整冷冻箱温度和样品头温度,同时将刀片、镊子、毛刷等放入箱体内预冷;将样品放置在切片机箱体中 30 min 以上,使样品温度恢复至冷室温度;在样品托上挤上适量 OCT 包埋剂,将样品垂直固定在样品托上,待包埋剂完全凝固将样品托固定在样品架上,使正方形样品一角垂直于刀片;先调节样品与刀头的位置使之恰好能接触,再调节切片厚度 15~18 μm 连续修片,直至样品表面平整且暴露完全;调整切片厚度,连续切 3 刀,使刀头跟样品相适应;放下玻璃挡板并前后调节至合适位置,使切片能够顺利平展的通过挡板通道;打开玻璃挡板,用毛刷轻轻刷展切片 OCT 部分,将防脱载玻片垂直压在切片上,收取样品。

1.3.6 HE 染色

10% 中性福尔马林固定液固定 30 s,蒸馏水洗 1~2 s,苏木精染色 30 s,蒸馏水清洗 10 s,温水返蓝 10 s,蒸馏水洗 30 s,伊红染色 1~3 s,蒸馏水洗 1~2 s,80% 乙醇 1~2 s,95% 乙醇 1~2 s,无水乙醇(Ⅰ) 1~2 s,无水乙醇(Ⅱ) 1~2 s,二甲苯(Ⅰ) 2~3 s,二甲苯(Ⅱ) 2~3 s,二甲苯(Ⅲ) 2~3 s,中性树胶封固,显微镜观察拍照。

2 实验结果

2.1 组织速冻方法的选择

取适当大小健康小鼠肝组织, OCT 包埋剂包埋后, 分别采用干冰/无水乙醇混合物和液氮速冻, 结果发现, 液氮速冻的组织包埋块在切片时组织和周围的 OCT 包埋剂容易断裂, 不易形成完整切片, 干冰/无水乙醇混合物速冻时不存在这种情况, 切片效果较好。

2.2 不同组织冷冻箱温度、样品头温度和切片厚度的选择

将采集到的小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织用 OCT 包埋剂包埋后, 采用干冰/无水乙醇混合物速冻, 速冻后保存于-80℃, 或于冷冻切片机恒温箱中平衡 1 h 左右, 直接进行冰冻切片。在进行不同组织冰冻切片的过程中, 不断调整冷冻箱温度、样品头温度以及切片厚度, 直至切出无褶皱、无刀痕、无破损的较高质量的切片。

通过对不同组织冰冻切片所需冷冻箱温度、样品头温度以及切片厚度进行调整, 最终确定各脏器组织切片时最佳的冷冻箱温度、样品头温度及切片厚度(见表 1)。在这样的条件下切出来的切片无褶皱、无刀痕、无破损、质量较高, 但该结果仅供同型号的冰冻切片机参考, 该条件不是固定不变的, 仍需根据实际情况进行适当调整。

2.3 冰冻切片 HE 染色结果

在以上方法和技巧基础之上, 按照 1.3.6 所述 HE 染色条件进行小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织冰冻切片的 HE 染色, 结果切片无褶皱、无刀痕、无破

损, 镜下组织无过多冰晶, 细胞形态清晰, 细胞核和细胞质颜色分明, 染色良好(见图 1)。

3 讨论

在药物非临床研究中冰冻切片后续需要进行多种不同的分析, 对切片质量要求更高, 这也是药物非临床研究中病理技术人员的一大挑战。现有关于冰冻切片制作的文献资料更多地是针对术中标本的, 关于实验动物小鼠组织的冰冻切片制备方法报道相对较少^[7], 而且影响冰冻切片质量的因素较多, 笔者通过自身的实践, 摸索出一些提高冰冻切片质量的有效方法, 现进行以下讨论。

3.1 包埋方法对切片效果的影响

目前, 常用的包埋方法有直接包埋^[8-9]、模具包埋^[10]、浸透包埋^[11]等。黄小雨等^[12]通过对常用的 3 种包埋方法进行比较研究发现, 直接用 OCT 包埋比较快捷, 但是在切片时需要将组织周围的 OCT 包埋剂形状进行不断修整, 否则容易卷片; 浸透包埋法不仅消耗 OCT 较多, 相对耗时, 而且在复水不充分的情况下容易出现背景过高的现象; 而模具包埋时组织周围的 OCT 包埋剂形状较规则, 切片时不容易出现褶皱, 同时能有效降低成本和节约时间, 此外, 该方法特别适用于一次大量取材、分次切片的情况, 可以将组织和包埋模具一起保存。本实验同样采用的是模具包埋法进行组织包埋, 但是模具选用的是商品化的一次性冰冻切片包埋模具, 相比于黄小雨等人使用的铝箔纸在样品信息标记、样品保存等方面更方便实用。

表 1 不同组织冰冻切片的最佳冷冻箱温度、样品头温度及切片厚度

Table 1 Optimum freezing chamber temperature, sample head temperature and slice thickness of frozen sections of different tissues

组织类型 Histologic type	冷冻箱温度(℃) Freezer temperature	样品头温度(℃) Sample head temperature	切片厚度(μm) Section thickness
心 Heart	-16	-18	6~7
肝 Liver	-15	-15	6~7
肾 Kidney	-17	-16	6~7
肺 Lung	-17	-16	7~8
脾 Spleen	-15~-18	-16	6~7
脑 Brain	-16~-18	-16	6~7

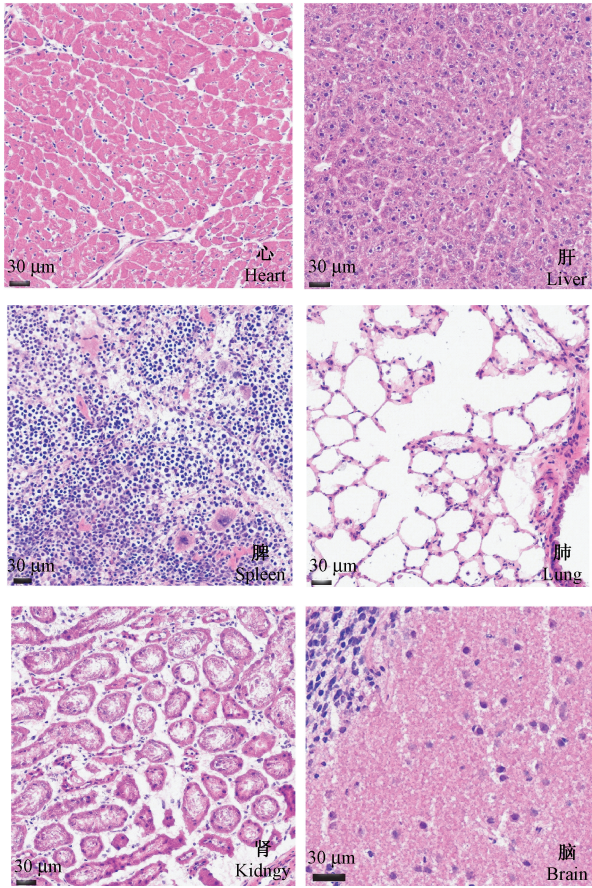


图 1 小鼠不同组织冰冻切片 HE 染色结果
Figure 1 The HE staining results of mice different tissues sections

3.2 组织速冻方法对切片效果的影响

组织速冻方法是影响冰冻切片效果的关键因素,不同的速冻方法对组织内冰晶的形成影响不一。因为组织在-1~-5℃温度范围内会有 80% 的水分被冻结,细胞液会形成冰晶,该温度范围称为最大冰晶生成带。冻结速率不同,通过最大冰晶生成带的时间是不同的,在速冻的过程中,组织内会迅速形成大量的晶核,通过最大冰晶形成带的时间短,晶核生长的时间短,进而形成小而均匀的冰晶,对细胞和组织破坏较小;相反,在缓冻的情况下,组织内形成的晶核较少,通过最大冰晶形成带的时间长,晶核生长时间相对较长,就会形成较大的冰晶,对细胞和组织造成较大的破坏^[13]。此外,梯度降温和组织表面与内部同时降温对减少冰晶形成有着至关重要的作用^[14]。因此,速冻方法选择合适的话可以大大避免组织内冰晶的形成,从而保证了组织和细胞形态的清晰性和完整性。

组织速冻方法很多,科学研究中常见的有液氮速冻、液氮/异戊烷法速冻、干冰/无水乙醇混合物

速冻等。(1)液氮速冻:将包埋后的组织直接浸入液氮速冻,该方法很容易造成过度冷冻,导致组织发脆甚至冻裂,对于初学者来说有一定难度。此外,使用液氮作为直接冷冻的冷冻剂,可能会造成白化等安全事故,因此从可操作性、技术和管理成本、安全性等因素考虑不推荐使用。(2)液氮/异戊烷法速冻:先将异戊烷用液氮预冷,再将包埋后的组织放入预冷的异戊烷中速冻^[15],该方法在速冻的时候组织周围产生的气泡较少,冷冻剂可以充分接触组织,达到较好的速冻效果。(3)干冰/无水乙醇混合物速冻:无水乙醇置于干冰中提前预冷,将干冰缓慢加入到无水乙醇至形成粘稠状液体,再将包埋后的组织放入干冰/无水乙醇混合物中速冻,在保持低温的同时能够与组织充分接触,有很好的速冻效果。该方法与液氮/异戊烷法速冻方法相比,安全性较高,易操作,但该方法适用于较小体积的组织,组织体积大的推荐采用液氮/异戊烷法速冻。本实验室对小鼠组织采用的是干冰/无水乙醇混合物速冻法,结果切片无褶皱、无刀痕、无破损,镜下组织无过多冰晶,细胞形态清晰,细胞核和细胞质颜色分明,染色良好(见 3.3)。

3.3 切片温度对切片效果的影响

切片温度是冰冻切片过程中最为关键的部分,在进行冰冻切片时根据不同组织不同情况调节冷冻箱温度和样品头温度以达到最佳的冰冻切片温度。由于小鼠不同部位的组织性质不同,最佳的冰冻切片温度(optimum cutting temperature, OCT)也会有所不同,切片时组织在与刀刃接触时,由于摩擦使组织局部温度升高发生局部融化,接着组织切片在冷冻箱被再次迅速冷冻,这中间的温度变化是冰冻切片产生皱褶和断裂的原因,同时切片的软硬和厚薄也会对皱褶产生进一步的影响。因此,想要获得高质量的冰冻组织切片,冷冻箱、刀刃、组织包埋块、OCT 包埋剂之间的温度须平衡在最佳冰冻切片温度附近。如果温度过低组织韧性会变小,变脆,切片时容易碎裂,可微调冷冻箱温度和样品头温度,稍等片刻再行切片,也可用手轻抚组织以便组织复温;温度过高会造成组织硬度不够,切片会出现堆叠、厚薄不均、搓板状现象,不易成片。

3.4 切片厚度对切片效果的影响

切片厚度也是影响切片效果的因素之一,如果切片太薄,就会造成切片容易破碎,不易成片;反之,切片太厚其断面就会有多层细胞层叠,影响组

织结构和细胞形态的观察。经过对小鼠不同组织进行多次实验,小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑组织切片厚度约为 6~8 μm ,切片效果较好,镜下观察无褶皱、厚薄均匀、细胞形态较清晰。

综上所述,在制作冰冻切片时,我们应该从取材、包埋、速冻、温度选择、恒温冷冻切片等各个环节进行严格控制,但是,不同组织根据自身特点会存在差异,应区别对待。此外,在掌握关键性技术要点的同时还应该具有高度的责任心和耐心,制作出高质量的冰冻切片,才能更好地服务于单抗药物非临床安全性评价工作。

参考文献:

[1] 李建霞,张出兰,夏晓飞,等.植物冰冻切片条件的优化及其与石蜡切片在组织化学应用中的比较[J].植物学报,2013,48(6):643-650.

[2] Hendry S, Byrne DJ, Christie M, et al. Adequate tumour cellularity is essential for accurate PD-L1 immunohistochemistry assessment on cytology cell-block specimens[J]. Cytopathology, 2020, 31(2): 90-95.

[3] 呼奶英,于佳田,别会杰,等.杏仁核快速电点燃癫痫大鼠神经元限制性沉默因子表达变化[J].中国比较医学杂志,2018,28(5):6-11.

[4] 史丽强,万强,吴燕升,等.超抗原葡萄球菌肠毒素 B 诱导 IgA 肾病小鼠模型的建立[J].中国比较医学杂志,2017,27(12):102-108.

[5] Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, et al. Cryosectioning tissues

[J]. CSH Protocols, 2008, 2008: pdb.prot4991.

[6] 余珊珊,王海学,胡晓敏,等.组织交叉反应试验在非临床安全性评价中的应用及案例分析[J].中国新药杂志,2016,25(6):634-638.

[7] 张岷,霍桂桃,屈哲,等.实验动物冰冻组织切片制备关键要点的探讨[J].药物评价研究,2019,42(7):1359-1361.

[8] 李林丰,刘禄,杨娜,等.普通胶水作为术中冰冻切片包埋剂替代品的可行性研究[J].临床医药实践,2015,24(4):319-320.

[9] 黄小丽,张培谊,唐新萍,等.用普通胶水代替进口冰冻包埋剂进行冰冻切片的探讨[J].中国医药导刊,2013,15(S1):185.

[10] 黄小雨,仲欢欢,付琳琳,等.固定组织的冰冻切片技术探讨[J].山西医科大学学报,2018,49(8):988-990.

[11] Chen XL, Chen C. Frozen section with improved HE staining for follicular morphometric analysis of mouse ovary in oestrus cycle[J]. Sheng Li Xue Bao, 2017, 69(6): 781-784.

[12] 黄小雨,刘亚萍,付琳琳,等.小鼠组织冰冻切片 3 种包埋方法效果比较[J].徐州医学院学报,2017,37(2):81-83.

[13] 李苑,王丽平,李钰金,等.水产品冻结贮藏中冰晶的形成及控制研究进展[J].食品科学,2016,37(19):277-282.

[14] 何茂章,张震,伍仲平,等.不同冻存法对肌肉冰冻切片后 HE 染色和肌球蛋白 ATP 酶染色效果的影响[J].江西农业大学学报,2016,38(3):519-523.

[15] 孙媛.女性 dystrophinopathy 的临床、病理和基因研究[D].山东:山东大学,2014.

[收稿日期] 2020-03-16