

结肠杯状细胞染色的结果比较研究^{*}

高琛琛¹ 薛晓伟² 刘玥宏³ 李利生⁴ 徐敬东¹

(1. 首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 北京 100069) (2. 北京协和医院病理科, 北京 100005)

(3. 首都医科大学宣武医院, 北京 100054) (4. 首都医科大学基础医学院机能实验中心, 北京 100069)

摘要:目的 通过对大鼠结肠切片标本染色对比卡诺液与甲醛固定液处理标本的区别。方法 将正常大鼠与便秘模型大鼠的结肠组织标本分别用卡诺液与甲醛固定液处理,制成石蜡切片标本后,用HE染液和高碘酸希尔夫阿尔新蓝染液分别进行染色,统计杯状细胞的数量和着色度对比两种固定液所固定标本的区别。结果 与甲醛固定液相比,同组标本用卡诺液固定的杯状细胞数量无显著性差异($P>0.05, n=10$),着色度显著增强($P<0.01, n=10$),但结肠组织其他细胞着色度无显著性差异($P>0.05, n=10$)。结论 在杯状细胞的形态学观察中,用卡诺液处理标本明显优于甲醛固定液。在不同实验的标本制备中,固定液的选择应根据实验研究对象的特性而确定。

关键词:卡诺液;甲醛固定液;杯状细胞;便秘模型

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0025-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.005

组织学评价和免疫组织化学特征在生理学研究
中非常重要,因而在保持组织标本完整性和紧密性
的基础上选择适当的固定方法很关键。常用的组织
固定液有卡诺液, Susa液, Helly干液, 4%多聚甲醛,
Bouin液等^[1]。研究表明,结肠杯状细胞内含有大
量的黏液颗粒,内含黏蛋白分泌入肠腔,并在黏膜
表层形成一层致密黏液层,作为肠道重要黏膜屏
障之一,与其它细胞及不同机制共同参与维持肠
道稳态^[2]。基于此,本实验通过对大鼠结肠杯状
细胞的数量、着色度的观察与分析来对比不同标
本分别用卡诺液与甲醛固定液对黏液固定和着色
度的区别。

1 材料与方法

1.1 实验动物

正常SD大鼠与便秘模型大鼠,6周龄,体质量
220~250 g, SPF级,购于首都医科大学实验动物中
心,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0001。

1.2 主要试剂

卡诺液, 甲醛固定液, HE染液, 高碘酸希尔夫
阿尔新蓝染液。

1.3 便秘模型大鼠的制备

在常规饮食、环境、周龄等其他条件相同的基
础上,将用于模型制备的大鼠以地酚诺酯(长春长红
制药有限公司,国药准字H22022037)70 mg/kg体
质量的浓度溶于1 mL生理盐水,灌胃,每日1次,持
续2周,致使其出现大便秘结,粪便数量减少,含水
量减少等便秘症状。

1.4 大鼠结肠标本的制作

将大鼠麻醉后取结肠组织,立即投入固定
液,分别用卡诺液与甲醛固定液处理后通过脱
水、透明、浸蜡、包埋等步骤得到组织蜡块,经修
整切片(4 μm)后,分别用HE染液、高碘酸希
尔夫阿尔新蓝染液染色固封得到结肠石蜡切片
标本,使用Nikon DS-U3观察结肠杯状细胞和黏
液细胞的形态学;取结肠放入质量分数为2.5%的
戊二醛(pH7.2)中固定5 min后取出组织,切成

收稿日期:2018-06-27

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81274173, 81673671和81270443);北京市自然科学基金资助项目(No. 7122017);北京市
教委科学基金资助项目(No. 201110025004, 201310025004);首都医科大学基础与临床基金资助项目(No. 2015JL1, 2014JL15)。

作者简介:高琛琛(1994—),女,硕士研究生,研究方向:结肠黏膜分泌及其调节.E-mail:chenchenir@163.com

通信作者:徐敬东(1966—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:消化道平滑肌与黏膜分泌.E-mail:xujingdong@163.com

1 mm³ 组织块继续固定。常规乙醇脱水, Epon812 环氧树脂包埋, 超薄切片 (50 nm), 醋酸双氧铀硝酸铅染色, 透射电镜 (Hitachi, HT7700 日本) 观察结肠杯状细胞和黏液细胞的超微结构并拍片。

1.5 结肠组织标本的观察与杯状细胞指标统计

1.5.1 杯状细胞的形态学观察: 通过 Nikon DS-U3 显微镜分别以×20、×100 视野观察正常大鼠与便秘模型大鼠的结肠标本, 并对比两种固定方法和染色技术处理后杯状细胞形态和杯状细胞内黏液颗粒及黏蛋白的分泌情况。通过电镜进一步观察结肠黏液层的结构特点。

1.5.2 统计指标的统计: 用 NIS-Elements BR4.10 软件, 通过颜色强度设定统计 8 个不同视野下杯状细胞的数量和着色度, 所有结果均使用 prism6.0 软件进行分析, 数据表示为均数±标准误 (Mean±SEM), $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 杯状细胞的形态学观察

光镜下, 高碘酸希尔法阿尔新蓝染液染色结肠标本上皮组织中充满大量杯状细胞, 边界清晰, 胞内布满红染的黏液颗粒, 亦可见被喷向肠腔的黏液 (见图 1, A1、A2 和 B1、B2); 用卡诺液固定、高碘酸希尔法阿尔新蓝染液染色的标本杯状细胞着色度明显强于甲醛固定液处理标本的杯状细胞 (见图 1, B1、B2 和 C1、C2); 甲醛固定液处理、HE 染色标本的杯状细胞成空泡状, 胞核被染成深蓝色, 位于细胞底部, (见图 1, D1、D2)。电镜下, 便秘模型大鼠相比于正常大鼠, 结肠黏膜表层黏液层变薄, 分子筛样^[3]作用减弱, 细菌易位, 接近甚至直接接触肠道黏膜上皮细胞, 提示便秘模型的结肠黏液层与正常相比变薄且不完整 (见图 2, A、B)。

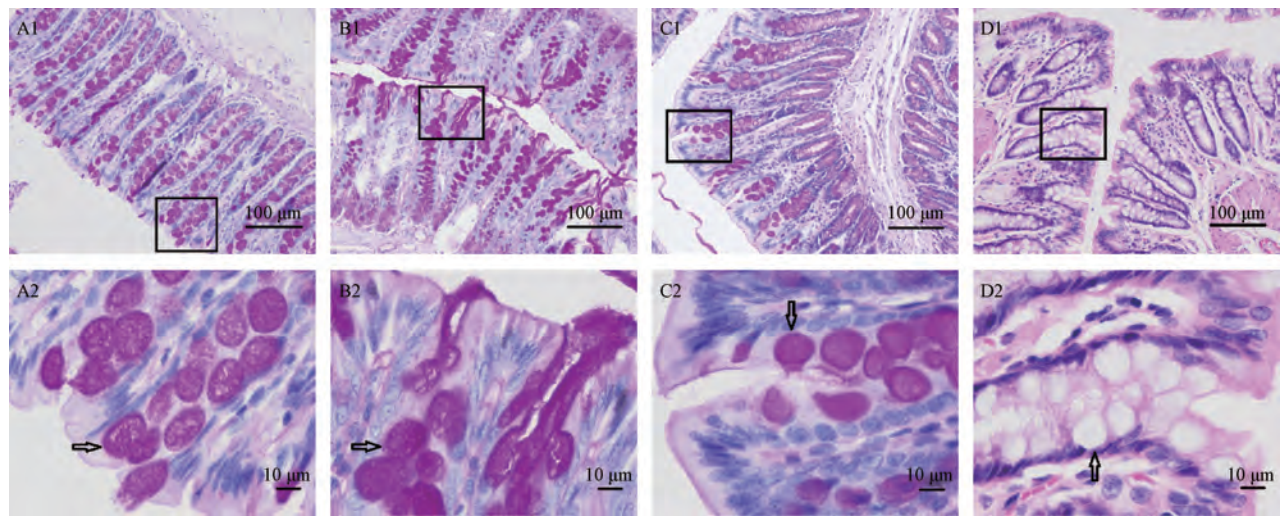


图 1 光镜下各组大鼠结肠杯状细胞形态学比较

注: A、D 和 B、C 分别为正常大鼠与便秘模型大鼠的结肠标本, A、B 和 C 为高碘酸希尔法阿尔新蓝染色, D 为 HE 染色。
A1、A2. 卡诺液固定的标本, 图示红染的黏液颗粒; B1、B2. 卡诺液固定的标本, 图示杯状细胞着色度;
C1、C2. 甲醛固定液处理的标本, 图示杯状细胞着色度;
D1、D2. 甲醛固定液处理的标本, 杯状细胞成空泡状。箭头示杯状细胞。

Fig.1 Morphological comparison of colonic goblet cells in rats under light microscope

Note: A, D and B, C were control rats and constipation model rats colon specimens, respectively. A, B and C were samples of PAS/Alcian Blue stained, and D was HE stained specimen. A1, A2. The specimens fixed with Carnoys fixative. The drawing shows red stained mucus particles fixed with Carnoys fixative. B1, B2. The specimens fixed with Carnoys fixative. The drawing shows the color intensity of the goblet cells. C1, C2. The specimens fixed with formaldehyde fixative. The drawing shows the color intensity of the goblet cells. D1, D2. The specimens fixed with formaldehyde fixative. The drawing shows vacuolar goblet cells. The arrows show the goblet cells.

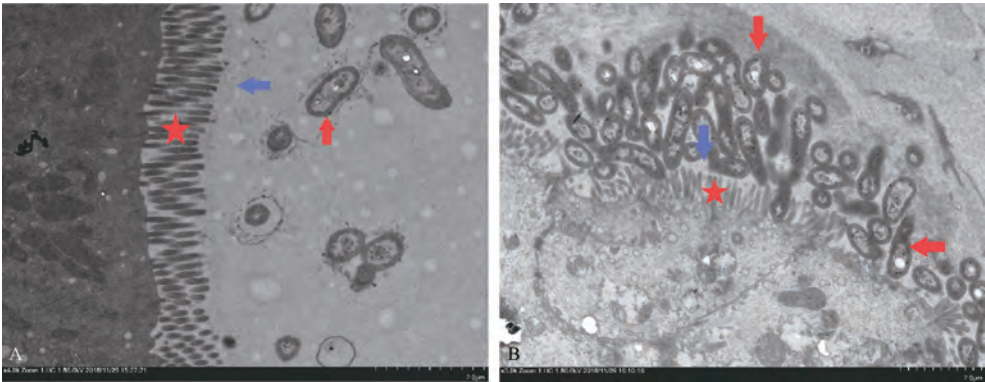


图 2 电镜下结肠黏膜和黏液层的超微结构
注:A.正常大鼠结肠标本;B.便秘模型大鼠结肠标本。★示结肠绒毛,红色箭头示细菌,蓝色箭头示结肠黏液层。

Fig.2 Ultrastructure of colon epithelial and mucin layer by electron microscope

Note: A. The tissue of control. B. The tissue of constipation. The position of colon villous is marked with red star, and the bacteria marked with the red arrows,the colon mucus layer marked with blue arrows

2.2 杯状细胞数量及着色度的比较

高碘酸希尔法阿尔新蓝染色标本中,如图 3,4 和表 1 所示,与正常大鼠相比,便秘模型大鼠的杯状细胞数量减少 13. 81%($P<0. 05$,见图 3A),而其着色度显著性增强($P<0. 001$,见图 3B)。便秘模型大鼠结肠标本中,卡诺液处理与甲醛固定液处理的标

本相比,杯状细胞数量无显著性差异($P>0. 05$,见图 4A),但着色度明显增强($P<0. 05$,见图 4B)。结果提示,卡诺液处理与甲醛固定液处理的正常大鼠结肠标本的杯状细胞数量及着色度对比结果无显著性差异,而便秘模型组杯状细胞数量无显著性差异,但是着色度有显著性差异。

表 1 正常与便秘模型大鼠结肠杯状细胞数量和着色度比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the number and color intensity of normal and constipation models colon goblet cells ($\bar{x}\pm s$)

Goblet cell	Control	Model	Model	
			Formalin	Carnoy
Number/(N/mm ²)	1 547±84. 00	1 293±51. 48 *	1 244±87. 52	1 346±51. 24
Color Intensity/%	99. 76± 2. 66	120. 30± 1. 53 ***	100. 00± 0. 82	107. 20± 2. 05 **

注:与正常组比较,* $P<0. 05$,*** $P<0. 001$.与甲醛固定液处理组比较,** $P<0. 01$
Note:compared with the control group,* $P<0. 05$,*** $P<0. 001$.Compared with the formaldehyde fixative fixed group,** $P<0. 01$

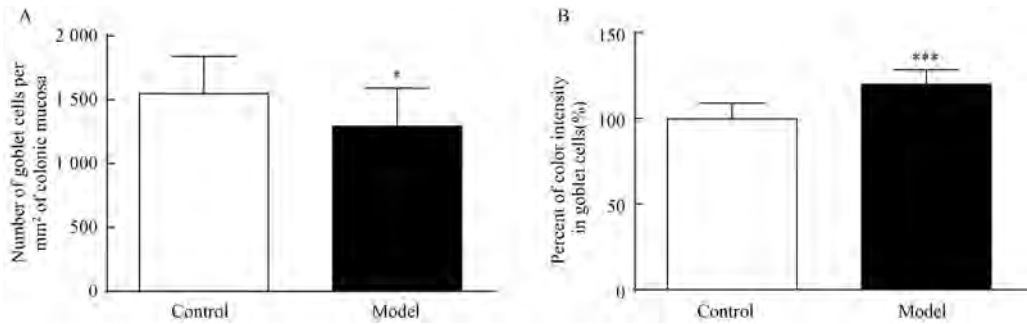


图 3 正常与便秘模型大鼠结肠杯状细胞的特征比较($\bar{x}\pm s$)

注:A.结肠陷窝内含有杯状细胞的数量对比;B.杯状细胞着色度的对比。与正常组比较,* $P<0. 05$,*** $P<0. 001$.

Fig.3 Comparison of the characteristic of colon goblet cells of normal and model rats ($\bar{x}\pm s$)

Note:A. Comparison of the number of goblet cells along colonic depth. B. Comparison of percent of color intensity in goblet cells.
Compared with the control group,* $P<0. 05$,*** $P<0. 001$.

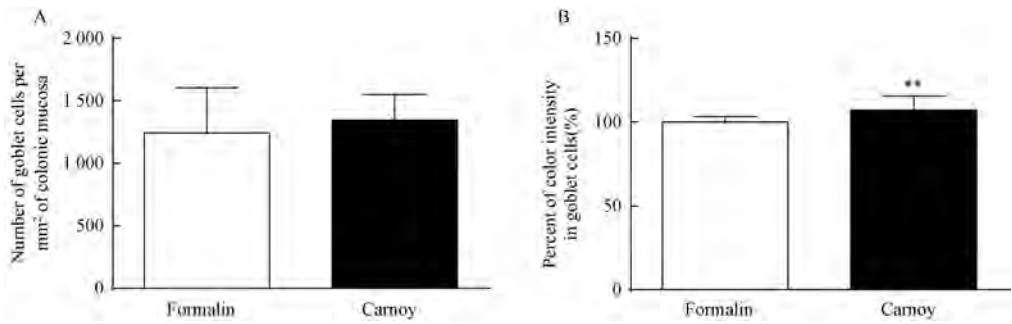


图 4 不同固定液处理的组织杯状细胞特性比较 ($\bar{x}\pm s$)

注:A.杯状细胞数量的对比;B.杯状细胞着色度的对比,与正常组比较,** $P<0.01$ 。

Fig.4 Comparison of the characteristic of colon goblet cells treated with different fixative ($\bar{x}\pm s$)

Note:A. Comparison of the number of goblet cells. B. Comparison of the percent of color intensity in goblet cells.

Compared with the control group, ** $P<0.01$.

3 讨论

肠黏膜与免疫屏障、肠道共生菌群、营养和代谢产物等相互作用共同维持肠道稳态^[4]。由肠道杯状细胞分泌的黏蛋白是肠道固有免疫第一防线黏液层的主要组成部分^[5],其中由杯状细胞分泌的黏蛋白和一些其他活性物质构成的肠道黏液层,为肠道抵御内源或外源性的刺激和微生物的侵袭提供了保障^[6],并有助于维持肠道共生菌群的平衡^[7]。因此,杯状细胞是维持肠道健康必不可少的保护者。研究表明^[8],杯状细胞黏液必须伴随水分的扩散分泌入肠腔,本实验用以制备便秘模型大鼠的地芬诺酯,可以阻滞肠黏膜上的水通道,消除肠黏膜的蠕动反射而减弱肠蠕动,并使肠内容物通过延迟,肠腔内水分的吸收增加,肠道内的水分减少,所以,便秘模型大鼠结肠杯状细胞与正常大鼠相比,不仅数量减少,而且黏液分泌减少,胞内黏液颗粒密度增高,着色度加深,结肠黏液层厚度变薄,容易引起细菌易位(如图2所示)。由此可见,杯状细胞分泌的黏蛋白对于维持肠道稳态不可或缺。另有研究表明^[9],结肠肠道杯状细胞分泌的黏蛋白主要为MUC2黏蛋白,实质为高度糖基化的糖蛋白,具有水溶性,这可能就是因为用4%多聚甲醛处理标本,致使表层黏液蛋白溶解其中,导致组织标本中的黏蛋白含量降低,使其着色度降低;而卡诺液是由无水乙醇:氯仿:冰醋酸(6:3:1)组成,其不含蒸馏水^[1],可以完整地保存了标本杯状细胞及结肠黏液层中黏液蛋白含量,因而能够看到黏膜表面红染的黏液层。因此,在

杯状细胞的形态学及黏液分泌的观察中,用卡诺液处理标本优于甲醛固定液。

综上所述,本实验通过对杯状细胞形态学观察以及数量与着色度的统计,结果提示卡诺液与甲醛固定液处理标本的差异性。从而应该注意的是,在不同实验,不同标本的制备中,对于固定液的选择应根据实验研究对象的特性而确定,同时,不可忽视应用不同固定剂处理标本,实验得到的数据可能有差异性。因此,要观察结肠黏液分泌的标本时,相较于甲醛固定、HE染色方法,卡诺液固定、高碘酸希尔夫法阿尔新蓝染色处理标本的方法更为合适。

参考文献

[1] 唐军民,李英,卫兰,等.组织学与胚胎学彩色图谱:实习用书[M].北京:北京大学医学出版社,2003.2-3.

[2] Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing[J]. Annu Rev Immunol, 2017,35:119-147.

[3] Gustafsson J K, Ermund A, Johansson M E, et al. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012,302(4):G430-G438.

[4] 刘小伟,孙瑞娟,董尔丹.肠道稳态及相关疾病研究现状与趋势[J].生理科学进展,2013,44(3):206-212.

[5] Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. Autoimmun Rev, 2014,13(1):3-10.

[6] 巫全胜,钱宁,吴曙光.药物依赖性便秘大鼠大肠杯状细胞及5-HT变化的实验研究[J].实验动物科学,2008,25(3):11-13.

[7] 刘明宏,徐敬东.内黏液层与溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J].世界华人消化杂志,2017,25(1):77-83.

[8] Garcia M A, Yang N, Quinton P M. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion [J]. J Clin Invest, 2009, **119** (9):2613-2622.

[9] Lang T, Hansson G C, Samuelsson T. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, **104** (41):16209-16214.

Comparative Investigation on the Colon Goblet Cell Staining

GAO Chenchen¹, XUE Xiaowei², LIU Yuehong³, LI Lisheng⁴, XU Jingdong¹

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China) (2. Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100005, China) (3. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100054, China)

(4. Capital Experimental Center for Basic Medical Teaching, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective In order to compare the difference between Carnoys and formaldehyde fixation solution on goblet cell in rat colon, we stained the colon specimens. **Method** The rat colon specimens of normal and constipation model rats were fixed with Carnoys or 4% formaldehyde fixative to prepare paraffin sections respectively. By means of staining with HE or PAS/Alcian Blue individually according to its protocol and counting the number and color intensity of goblet cells, we compare the difference between the two fixatives fixed specimens. **Result** The results indicate that the number of goblet cells fixed with Carnoys and the formaldehyde fixative group has no significantly different ($P > 0.05$, $n = 10$), while the color intensity of the goblet cell stained with PAS/Alcian Blue was notable enhancement compared with the formaldehyde fixative group ($P < 0.01$, $n = 10$). But the color intensity of other cells in rat colon has no significantly different ($P > 0.05$, $n = 10$). **Conclusion** These results confirmed that the treatment with Carnoys fixative was superior to formaldehyde fixative in the morphological observation of goblet cells. In the preparation of different experiments and specimens, we should choose the fixative solution depend on the characteristics of the experimental study object.

Key words: Carnoys fixative; formaldehyde fixative; goblet cell; constipation model

(上接第 24 页)

The Pathological Examination of Laboratory Rodents of Beijing in May 2018

NI Jiamin, LI Miaoxuan, ZHANG Xixi, LAI Mengyu, WU Xiaoqian,
YANG Dongming, SONG Yinjuan, LIAO Yi, YAO Jiao, DONG Haodi, ZHANG Kai,
YANG Lifeng, ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Objective To conduct pathological examination on 400 rodent laboratory animals submitted in May 2018, and make reasonable suggestions for the management of laboratory animals based on the test result. **Method** We collected hearts, livers, kidneys, lungs, spleens and intestinal tracts of 400 laboratory rats. Then we made these organs into paraffin sections or frozen sections. After HE staining, PAS staining or oil red O staining, these sections were placed under optical microscope to collect digital images and record the result. **Result** A few cases of rats, mice and guinea pigs showed hepatocellular swelling, focal inflammatory cell infiltration in lungs and hearts, and coccidia infected in intestinum crassum; no visible pathological changes in golden hamsters and hamsters. **Conclusion** The laboratory animals in this pathological examination are basically in a healthy state. A few animals need to be strengthened and improved the feeding and management conditions to ensure the laboratory animals meet the standards.

Key words: laboratory animals; pathological examination; pathological changes