

网络出版时间:2024-06-13 10:32:08 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240612.1138.026

◇技术与方法◇

基于新型固定液制备小鼠 AMD 模型和人胚胎 眼球高质量视网膜石蜡切片

孙拴桃,刘栓栓,王少军

摘要 将 C57/B6J 小鼠分别固定于传统固定液(4% 甲醛液,下同)与新型固定液中,进行石蜡切片的常规制片程序,并将新型固定液在年龄相关性黄斑变性(AMD)模型小鼠及人胚胎眼球 HE 染色石蜡切片中进行效果验证。用新型固定液处理的眼球石蜡切片质量优于传统固定液,且成功模拟了 AMD 模型小鼠视网膜各层不同时间段的变化。新型固定液在制备高质量视网膜石蜡切片方面是可行的,为后续视网膜石蜡切片的有关研究奠定了基础。

关键词 新型固定液;小鼠 AMD 模型;人胚胎眼球;视网膜;石蜡切片

中图分类号 R 774

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1095-03
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.028

眼球的病理学研究对于研究眼科相关疾病的病理学及分子机制非常关键^[1-3]。但是由于眼球结构复杂,各层组织成分构成差异大、组织间连接性差,用常规固定液及脱水流程处理的眼球标本容易出现变形、眼球各层组织分离的问题。在多年的临床病理工作实践观察中,课题组发现在制备视网膜石蜡切片时,影响眼球各层分离最大的因素为固定液的选择,种类繁多又各有一定的不足: Bouin's 固定液中的苦味酸,易爆、易引起组织发黄^[4]; Kolmer 液染色时细胞皱缩,染色较深; Verhoeff 固定液偏酸性,在脱水前,需充分洗涤标本,以保证后期的染色效果。该研究在常规技术方法上进行优化改良,提出新型的眼球专用固定液,通过与传统固定液前期在小鼠眼球中的运用进行比较,并在实验建立的小鼠年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)模型和新鲜人胚胎眼球标本上进行验证,取得了满意的石蜡切片效果。

2024-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81501090)

作者单位:中国人民解放军总医院第三医学中心眼科医学部,北京 100039

作者简介:孙拴桃,女,本科,初级病理技师;

王少军,男,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: 18311307307@163.com

1 材料与方法

1.1 实验对象 基于 8 周龄雄性正常成年 C57/B6J 小鼠 12 只,体质量 25g/只(北京维通利华实验动物公司),及其构建的 AMD 模型;妊娠终止的 16 周、20 周、24 周的新鲜人胚眼球(伦理号:2021-KY021)。

1.2 主要实验仪器与试剂 石蜡切片机 HM325、石蜡包埋机 HistoStar(美国 Thermo Fisher);显微镜 CX23(日本 Olympus)。乙醇、二甲苯、冰醋酸、石蜡、HE 染色试剂均购自北京益利精细化学品有限公司;多聚甲醛、碘酸钠购自美国 Sigma 公司。

1.3 新型固定液的配制 将 4 g 多聚甲醛粉末,加入到 100 ml pH 7.4 的 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中,持续搅拌使粉末溶解。待加热到 60 °C 左右,加少许 NaOH,调节 pH 至 7.4。冷却后,按 4% 多聚甲醛溶液:无水乙酸:无水乙醇=10:1.5:8.5 的比例依次加入冰醋酸 15 ml,无水乙醇 85 ml,混匀。

1.4 构建小鼠 AMD 模型 将 8 周龄雄性正常成年 C57/B6J 小鼠分为 2 组($n=6$),一组经尾静脉注射单剂量 35 mg/kg 碘酸钠用于构建小鼠 AMD 模型,分别于注射后 1、3、7、14、28 d 进行观察,观察结束后处死小鼠,收集其眼球,另一组留作对照组。

1.5 取材与固定 ① 小鼠及其 AMD 模型:腹腔注射过量麻药(戊巴比妥钠溶液),处死后立即摘除眼球,用 PBS 冲洗表面血渍;将其中 1 只对照组 C57/B6J 小鼠采用传统固定液固定,其余眼球放入新型固定液中,分别固定 24 h。固定结束取出眼球,在体视显微镜下,用剪刀沿着角膜缘小心剪掉角膜,去除晶状体。② 人胚胎眼球:收集孕 16 周、20 周、24 周妊娠终止的新鲜人胚胎眼球标本,将眼球放入新型固定液固定 24 h。

1.6 脱水、透明、浸蜡 去掉眼前节的眼球依次进行脱水、透明、浸蜡程序,具体步骤为 75% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、无水乙醇 I、无

水乙醇Ⅱ、二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ、石蜡Ⅰ、石蜡Ⅱ各1 h。

1.7 石蜡包埋、切片染色 浸蜡后将眼球水平面向下包埋制成蜡块。轮转式切片机 5 μm 厚度将眼球切到最大面,用镊子轻轻将蜡带放入 45 °C 展片仪里充分展片,70 °C 烤片 15 min,常规行 HE 染色,观察光镜下眼球标本的 HE 染色效果。

2 结果

如图 1 所示,传统固定液固定的眼球可以看到视网膜神经层与色素上皮层脱离,细胞间连续性差,甚至可看到空白裂隙。新型固定液固定的小鼠及其 AMD 模型标本如图 2 所示,可见正常组小鼠眼球壁各层结构完整;视网膜未见固定液性脱离、缺失,各层细胞排列紧密,细胞形态规整,细胞内结构清晰。碘酸钠组小鼠 HE 染色外核层视网膜在第 3 d 开始呈波浪状改变,局部脱落,色素上皮细胞损伤;7 d 时外核层波浪状改变明显,细胞密度开始降低,开

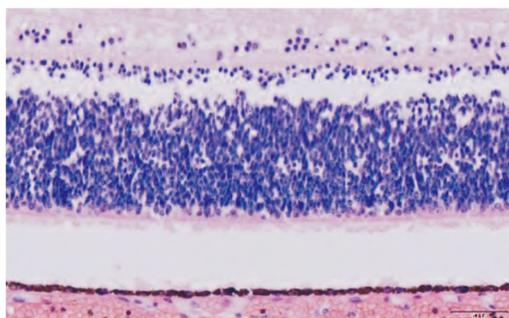


图 1 经传统固定液固定的小鼠眼球视网膜石蜡切片 HE × 400

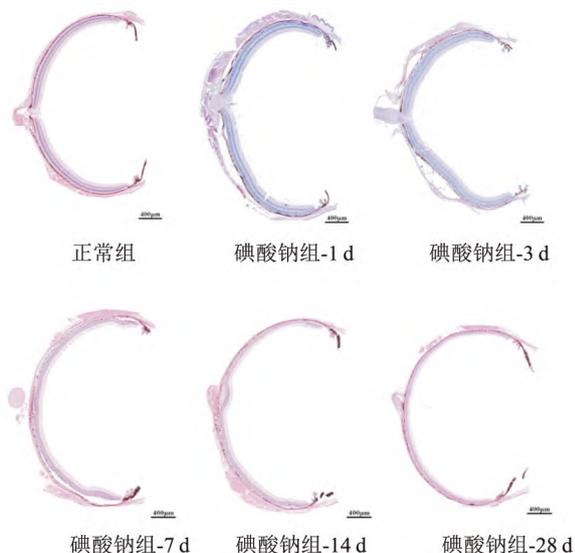


图 2 小鼠 AMD 模型正常组及实验组不同时间点
视网膜石蜡切片 HE × 200

始出现黑色沉积物;14 d 时外核层严重波浪状改变,细胞密度持续降低,黑色沉积物增多;28 d 时视网膜色素上皮层消失,外核层与内核层变薄,二者分界不清,黑色沉积物剧增。表明新型固定液可用于制作高质量的小鼠视网膜石蜡切片,并且注射碘酸钠的眼球石蜡切片成功模拟了碘酸钠对视网膜形态变化的影响。

镜下观察人胚胎眼球标本,如图 3 所示,眼球壁各层 HE 染色良好,未见视网膜脱离。在 16 周内,外核层分界不清,节细胞层清晰可见;在 20、24 周时眼球壁各层已分界清楚,内外核层、节细胞层 3 层细胞结构清晰。

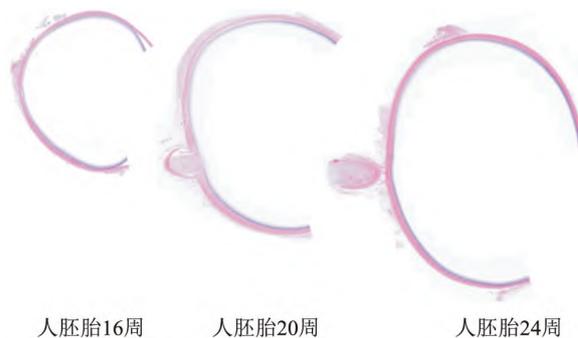


图 3 人胚眼视杯石蜡切片 HE × 200

3 讨论

小鼠眼球视网膜常用来作为研究视网膜发育或视网膜疾病的实验模型^[5-8]。但眼球组织构成复杂,各层连接性差。固定液是能否取得高质量石蜡切片的关键因素。传统固定液虽然试剂简单易得,渗透性强,收缩性小,但其经乙醇脱水后收缩性增大,易造成眼球的变形。

近年来不同学者提到最多的是 Davidson's 固定液(主要由甲醛、乙醇、冰醋酸组成)^[9-12],其原理是利用冰醋酸的膨胀作用抵消乙醇、甲醛对组织的收缩作用。但也有文献^[13]指出,Davidson's 固定液改变了视网膜的形态。

本研究在前面大量文献基础上进行优化改进,采用混合固定液,由 4% 多聚甲醛溶液、冰醋酸、无水乙醇按比例 10 : 1.5 : 8.5 构成。4% 多聚甲醛虽单独使用时,可引起组织的收缩,但渗透作用强,能较好地保护组织和细胞的形态结构;冰醋酸会使组织膨胀,但其对组织的穿透力强;乙醇可固定组织,但也对组织有收缩作用。利用 Davidson's 固定液的原理,通过摸索三者合适的比例,使多聚甲醛与乙醇对眼球的收缩作用正好抵消冰醋酸对组织的膨胀作

用。不在固定前穿孔注射固定液等对眼球进行“开窗”操作,因该操作可造成人为的视网膜损害,破坏眼球的正常结构^[11],而是采取在固定后去掉眼前节的方法,避免了人为因素引起的视网膜脱离,保持了眼球的正常形态,也利于脱水剂、透明剂、石蜡渗入眼球。

本研究初步验证了该固定液能否用于小鼠视网膜疾病模型和人类眼球相关的常规 HE 染色。注射碘酸钠的小鼠 AMD 模型、人胚胎眼球标本的 HE 染色切片均证实,该固定液不会引起组织的凹陷、萎缩和视网膜的脱落,各层组织结构清晰可见。此外,关于该固定液是否适用于免疫荧光染色,也在课题组其他发表文献^[14]中进行验证,可见细胞着色良好,定位清楚。

综上所述,通过与传统固定液比较,结合大量的科研文献,本实验室通过优化其试剂的比例而成的新型眼球固定液,改进了眼球石蜡切片技术方法。同时在注射碘酸钠的小鼠 AMD 模型、人胚眼球中得到了有效验证。再结合免疫荧光相关抗体的清晰标记,进一步证明其为制备高质量视网膜石蜡切片以及进行视网膜相关病变的研究奠定了基础。同时本实验操作简单,所需试剂为实验室常用试剂,是固定眼球组织、制作石蜡病理切片的较好方法,可在眼科领域推广应用。

所有作者声明无利益冲突。孙拴桃:数据整理、论文撰写;王少军、刘栓栓:研究指导、论文修改。

参考文献

[1] 高 嫻,何惠华.原发于眼球脉络膜后壁的 1 例平滑肌瘤临床病理分析[J].*诊断病理学杂志*, 2023, 30(7): 691-2, 695.

- [2] 米娜瓦尔·哈帕尔,地力努尔·吐尔逊江,满尔哈巴·海如拉.加兰他敏介导 Nrf2/HO-1 信号通路对慢性高血压大鼠视网膜神经节细胞损伤的保护作用[J].*现代药物与临床*, 2023, 38(8): 1850-6.
- [3] 罗 影,单 伟,张 俏.神经胶质成熟因子- β 诱导糖尿病大鼠视网膜 Müller 细胞炎症反应的机制研究[J].*天津医药*, 2023, 51(4): 387-91.
- [4] Galea L A, Sturrock S, Appu S, et al. Improving interpretation of biopsies during microsurgical testicular sperm exploration in azospermic patients: use of Davidson's fluid[J].*Pathology*, 2021, 53(6): 735-9.
- [5] 牛占宇,李建德,石永鹏,等.尾静脉注射碘酸钠对小鼠视网膜形态结构变化的影响[J].*眼科新进展*, 2021, 41(1): 18-22.
- [6] 茅佩瑶,茅希颖,陈 雪,等.碘酸钠诱导小鼠视网膜色素上皮变性模型的研究[J].*现代生物医学进展*, 2020, 20(9): 1636-41, 1662.
- [7] 李昊宇,胡秋明.年龄相关性黄斑变性小鼠模型的研究进展[J].*国际眼科杂志*, 2018, 18(9): 1616-21.
- [8] Sano H, Namekata K, Kimura A, et al. Differential effects of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma[J].*Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 75.
- [9] 严伟明,叶 倩,龙 盘,等.大鼠全眼球石蜡组织切片制作方法的改进[J].*实验动物科学*, 2022, 39(2): 87-90.
- [10] 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[J].*国际眼科杂志*, 2018, 18(6): 1010-3.
- [11] 孙 良,徐 林.三种小鼠眼球组织石蜡切片固定液固定效果的比较[J].*中国组织工程研究*, 2019, 23(34): 5492-6.
- [12] 邱 宇,高洪莲,张 磊.不同固定液固定豚鼠视网膜效果的比较[J].*滨州医学院学报*, 2022, 45(2): 158-60.
- [13] Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, et al. Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson's fixative and other fixation solutions[J].*Jpn J Ophthalmol*, 2018, 62(4): 481-90.
- [14] Wang S, Du L, Yuan S, et al. Complement C3a receptor inactivation attenuates retinal degeneration induced by oxidative damage[J].*Front Neurosci*, 2022, 16: 951491.

Preparation of high quality retinal paraffin sections of mouse AMD model and human embryonic eye based on a novel fixative

Sun Shuantao, Liu Shuanshan, Wang Shaojun

(Dept of Ophthalmology, PLA General Hospital Third Medical Center, Beijing 100039)

Abstract C57/B6J mice were fixed in traditional fixative (4% formaldehyde solution, the same below) and novel fixative respectively, and the routine procedure of paraffin section preparation was performed, as well as the novel fixative was validated in HE-stained paraffin sections of the eyes of mice and human embryos in the age-related macular degeneration (AMD) model. Compared with the traditional fixative, the quality of the paraffin sections treated with the novel fixative was better than that of the traditional fixative, and successfully simulated the changes of the retinal layers of AMD mice at different time periods. The novel fixative is feasible for the preparation of high-quality retinal paraffin sections, which lays the foundation for subsequent studies on retinal paraffin sections.

Key words novel fixative; mouse AMD model; human embryonic eye; retina; paraffin section