文章编号:1000-5404(2011)15-1649-02

技术方法

石蜡包埋制作猫眼球切片方法的改良

张祥令,苏 敏,黄 悦,胡 蓉,李 红,许爱萍 (550004 贵阳,贵阳医学院组织学与胚胎学教研室)

[摘要] **目的** 探讨和改良石蜡包埋制作猫眼球切片方法。**方法** 取健康猫眼球10只,AFA(甲醛-乙醇-冰醋酸)固定液固定,乙醇梯度脱水,氯仿透明,石蜡包埋制作眼球切片,厚度7 μm,HE染色,观察并记录。**结果** ①石蜡包埋的猫眼球不变形,外观无明显收缩,结构完整,可获得整个眼球;②HE染色切片观察,眼球壁各层结构清晰,角膜、角膜缘、巩膜静脉窦、睫状肌等组织结构完整,视网膜无明显剥离,层次清楚,各层细胞排列整齐、容易辨认。**结论** 采用此方法对猫眼球进行石蜡包埋,可获得较满意的眼球组织切片。

[关键词] 眼球;石蜡包埋;改良;猫
[中图法分类号] R361.2 [文献标志码] B

眼球的结构外形近似球体,外层巩膜是致密的结缔组织,内层视网膜很柔软,容易剥离脱落,眼球腔中还有一个很硬的晶状体,其制作过程在组织学上是难点[1-2]。一般认为,制作眼球不宜用石蜡切片,因其可使眼球结构变硬变脆,因此常用火棉胶包埋切片[3]。传统用火棉胶包埋时,费时至少要3个月,试剂易燃、毒性强、成本高,不能连续切片,切片较厚。而常规石蜡包埋切片,眼球易变硬变脆变形,视网膜容易剥离,不利于教学切片补充和组织病理学诊断[4-6]。本室通过反复实验,不断改良石蜡包埋制作切片技术,尤其是在固定剂、脱水剂、透明剂等方面进行改良,取得满意效果,在保证获得高质量眼球切片的同时,还较显著地缩短了实验时间,为眼球切片的制作提供了较好的方法。

1 材料与方法

1.1 取材固定

用50 ml注射器由耳缘静脉注入空气栓塞致死实验健康成年猫(雄性,18月龄,体质量2.5~3.5 kg,3只,购买于贵阳医学院实验动物中心),速取眼球,小心除去周围的结缔组织,投入垫有脱脂棉的AFA固定液(20%甲醛40 ml,95%乙醇60 ml,冰醋酸5 ml)进行固定,间隔6 h换同等量AFA固定液固定,共固定18 h。

1.2 脱水透明

乙醇梯度脱水:70%乙醇和80%乙醇各12 h,90%乙醇和95%乙醇各10 h,100%乙醇液体和半乙醇半氯仿中各8 h,在透明剂氯仿中过夜直至包埋;脱水时,严格控制不同梯度乙醇的浓度,进入下一步乙醇时用滤纸吸干,使组织脱水更彻底。

1.3 浸蜡包埋

石蜡和氯仿按1∶1比例混合浸蜡2 h,纯蜡(1)1.5 h,纯蜡(2)1.5 h,包埋成蜡块,室温冷却待切。包埋时,石蜡要处于半溶状态,严格控制包埋机温度56~60 ℃,有利于标本浸蜡。

1.4 切片

用徕卡轮转式切片机切片7 μm,用徕卡贴片机40 ℃展片,40 ℃温箱烤片4 d。

1.5 染色及观察

常规HE染色,化蜡,染色,上行,二甲苯透明,中性树胶封片。用传统火棉胶包埋猫眼球切片进行对比[3]。

2 结果

2.1 肉眼观察

经过上述改良的方法进行石蜡包埋,眼球不变形,外观收缩不明显,结构完整,可获得整个眼球(图1);切片容易,获得较薄的石蜡切片,厚度约7 μm。眼球角膜从前至后5层(角膜上皮、前界层、角膜基质、后界层、角膜内皮)结构排列整齐(图2)。

2.2 HE染色观察

眼球角膜从前至后5层(角膜上皮、前界层、角膜基质、后界层、角膜内皮)结构排列整齐(图2);而传统火棉胶包埋的眼球切片较厚,角膜上皮多层细胞重叠,界限不清楚(图3)。

眼球切片完整,眼球壁各层结构清晰,巩膜静脉窦、睫状肌、角膜缘上皮等组织结构完整(图4);视网膜无明显剥离、层次清楚,各层细胞排列整齐,从外向内可清晰辨认色素上皮层、视细胞层、双极细胞层、节细胞层4层细胞(图5)。而传统方法制作的切片较厚,可辨认4层细胞,但每层细胞轮廓不清(图6)。

3 讨论

眼球切片制作是组织切片技术上的难题,传统用火棉胶包埋,需要一个长时间的火棉胶浸制过程,使用滑动切片机切片,不能连续切片,染色要在培养皿进行片染,染色后使用捞片方法,其制作较为困难复杂,存在周期较长、材料要求特殊、易燃、有毒性等缺点,获得的切片较厚,也不利于眼球壁组织结构的观察[1-6]。为了解决这一系列的问题,本实验室采用改良的石蜡切片制作方法获取眼球切片,取得了满意的效果。本方法在整个过程仅用10 d左右,相比传统的火棉胶包埋法所需3个月的时间,大大缩短了实验的进程,提高

[基金项目] 贵州省自然科学基金[黔科合J字(2006)2082]
[通信作者] 苏 敏,电话:(0851)6908567,E-mail:summ30@163.com

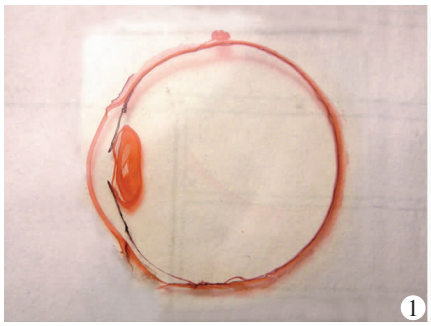
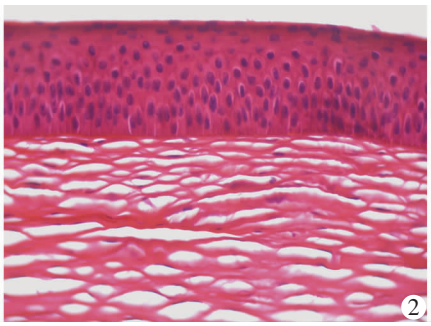
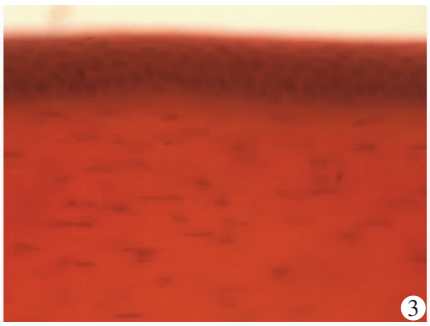




图1 改良法石蜡包埋眼球切片肉眼观察眼球 （HE）

图2 改良法石蜡包埋眼球切片光镜观察角膜上皮 （HE ×400）

图3 传统火棉胶包埋眼球切片光镜观察角膜上皮 （HE ×400）

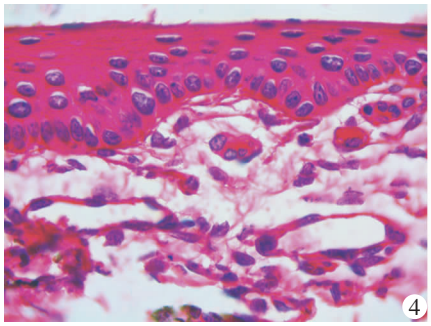
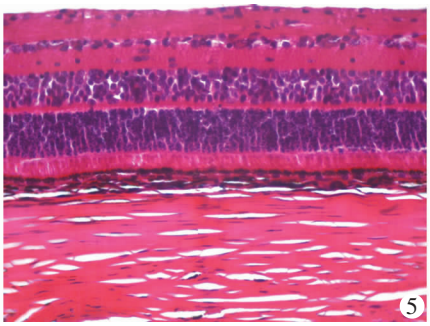
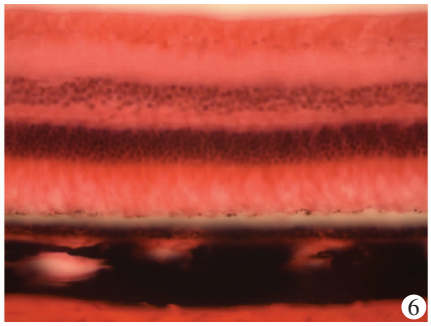




图4 改良法石蜡包埋眼球切片光镜观察角膜缘上皮 （HE ×1 000）

图5 改良法石蜡包埋眼球切片光镜观察视网膜 （HE ×400）

图6 传统火棉胶包埋眼球切片光镜观察视网膜 （HE ×400）

了效率。其次，本实验均使用常规试剂，较为容易获得，不需特殊的保存，使用方便；获得的切片较薄约7 μm，与传统火棉胶包埋切片的15～20 μm相比，镜下结构重叠现象不明显，尤其是角膜缘上皮清晰可见，针对现在干细胞生物学特性的研究热点，可有效进行角膜缘干细胞的原位定位定性研究，显示更清晰。本方法的改良主要有以下几个方面：①对固定液进行改良。经过反复实验，调整AFA固定液各成分浓度比例（20%的甲醛40 ml，95%乙醇60 ml，冰醋酸5 ml），结果证实AFA固定液较为温和，猫眼球经固定后组织收缩不明显，固定仅需18 h，相对传统方法固定所需5 d左右，明显缩短了固定时间。②对脱水剂进行改良。脱水剂乙醇从低浓度到高浓度直至无水乙醇，浓度梯度差越小越好，可减少细胞收缩，防止细胞收缩变形[7-8]。脱水时间3 d左右，而传统方法脱水入4%、8%、12%、16%、20%、25%、30%火棉胶脱水每缸至少需要1周或更长的时间[9]；③透明剂的改良。透明剂用氯仿代替二甲苯或苯，氯仿透明收缩较小，它有透明和浸蜡双重作用，更有利于保持组织结构的正常形态特点。④石蜡包埋时，严格控制石蜡温度处于56～60 ℃，有利于眼球浸蜡充分，不易变脆；如果用熔点低的石蜡，不利于组织粘片，故建议使用硬蜡较为理想，但石蜡始终处于半溶状态进行浸蜡是防止组织变脆的关键；另外，包埋时间仅约5 h，与传统方法用25%火棉胶包埋需1 d相比也节约了时间。因此，本实验室经过反复实验所改良的石蜡包埋制作眼球切片方法，不仅缩短了实验时间，而且可获得较薄（10 μm以下）的组织切片。由于对制作方法进行改良，在获取教学切片和科研切片上均可取得较好的效果。

参考文献：

[1] Nishi O, Nishi K, Hikida M. Removal of lens epithelial cells following loosening of the junctional complex[J]. J Cataract Refract Surg, 1993, 19(1): 56-61.

[2] 兰淼，张伟，朱少君，等. 大鼠眼部晶状体标本石蜡切片的改良制作方法[J]. 陕西医学杂志，2008，37(12)：1592，1622.

[3] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1998：32-34.

[4] 彭希平，乔从进. 眼球教学切片制作方法的改进[J]. 山西医科大学学报，2002，33(2)：171.

[5] 苏菁. 用石蜡包埋制作眼球及全眼眶的方法和体会[J]. 临床与实验病理学杂志，2001，17(4)：360.

[6] 易少华，陈晓瑞，邓伟年，等. 大鼠眼球标本石蜡切片的制作方法[J]. 临床与实验病理学杂志，2005，20(3)：359.

[7] 王翠菊，孙晓冬，李静. 石蜡包埋眼球大切片的制作方法与改进[J]. 诊断病理学杂志，2007，14(4)：313.

[8] 付霞，刘金华，梁秀就. 大鼠眼球标本石蜡切片的改良制作方法[J]. 眼科新进展，2007，27(6)：417-419.

[9] 罗灿峤，梁英杰，吴惠群，等. 小鼠眼球标本固定液及制片方法的改进[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2007，16(1)：124-125.

（**收稿**：2011-03-17；**修回**：2011-04-19）

（编辑 吴培红）