技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1856-03

石蜡包埋与切片染色对大鼠脊髓腰膨大体积的影响

林菁艳[1],彭 彬[2],杨正伟[2],闵 苏[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016;2.川北医学院形态定量研究所,南充 637000)

【摘 要】目的:研究石蜡包埋和切片染色对大鼠脊髓腰膨大皱缩程度的影响。方法:4%多聚甲醛经心脏灌流固定后取大鼠脊髓腰膨大(L_{4-6}),称重、测量长度并以比重法测定其密度。重量除以密度即可得到固定后体积。将腰膨大均分为6段,随机抽取其中一段用石蜡包埋。垂直于脊髓长轴方向切取厚度为14 μm的连续切片。按等距随机原则每15张抽取一张切片,第一张切片在第1~15张中随机抽取。选中的切片HE染色,用VIS体视学设备测定切片面积(A)和染色后厚度(h)。A乘以切片厚度(H=14 μm)即可得到包埋后脊髓腰膨大的体积;A乘以h即可得到切片染色后腰膨大的体积。用包埋后和切片染色后腰膨大的体积除以其包埋前的体积,即为石蜡包埋和切片染色后组织的皱缩系数。结果:组织固定后体积为(96.80±13.85) mm^2,石蜡包埋后体积为(60.19±19.15) mm^2,切片染色后体积为(42.97±16.02) mm^2。石蜡包埋后和切片染色后脊髓的皱缩系数分别为62.9%±20.5%和44.8%±16.6%。结论:石蜡包埋和切片染色后脊髓组织明显皱缩。形态学定量研究必需考虑到组织皱缩对结果的影响。

【关键词】石蜡切片;染色;体视学

【中国图书分类法分类号】R322.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-11

Effects of paraffin embedding and section-staining on contractin coefficient of spinal cord in rats

LIN Jing-yan, et al

(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of paraffin embedding and section-staining on the contraction of rat spinal cord. *Methods*: After fixed by 4% paraformaldehyde through heart perfusion, the lumber intumescentia (L_{4-6}) of rats were separated and weighed. Afterwards, their length and density were also measured, thus the volume can be calculated. Then the lumbar intumescentias were divided into 6 sections equally, and one section was randomly selected and embedded by paraffin, and serially sectioned (14 μm). According to the systematic random sampling principles, sections were sampled per 15 sections, and the first section was chosen from the first 15 sections randomly. These sections were stained by hematoxylin and eosin. The area and thickness of each section was measured

作者介绍:林菁艳(1979-),女,讲师,博士,研究方向:疼痛诊疗与研究。现工作单位:川北医学院附属医院麻醉科。

通讯作者:闵 苏,女,教授,E-mail: minsu89011068@yahoo.com.cn。

光镜下类似于假复层鳞状上皮,与其基底的纤维包囊结合形成与正常皮肤类似的自体复合皮。实验结果显示,用该方法在体内构建自体复合皮是可行的,具有操作简单、费用低廉、耗时较短等优点。如果在细胞培养体系中加入表皮生长因子,细胞数量的扩增速度会加快,耗时将进一步缩短。

作者最近利用所形成的自体复合皮覆盖实验动物创面,结果显示创面的上皮化比对照组显著加速,创面愈合时间明显缩短(将作后续报道)。本研究结果为大面积烧创伤创面的覆盖和预构具有双侧上皮的皮瓣提供了新的治疗思路。

参 考 文 献

[1] Mansbridge J N.Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine[J]. Curr Opin Biotechnol, 2009, 20(5): 563-567.

[2] Theoret C.Tissue engineering in wound repair: the three "R"s-repair, replace, regenerate[J]. Vet Surg, 2009, 38(8): 905-913.

[3] Krimmel M, Hoffmann J, Reinert S.Cleft palate fistula closure with a mucosal prelaminated lateral upper arm flap[J].Plast Reconstr Surg, 2005, 116(7): 1870-1872.

[4] Ahn K M, Kim M J, Lee J H. Prelaminated fasciomucosal flap using tongue mucosa in a rat model[J].J Reconstr Microsurg, 2003, 19(3): 195-201.

[5] Schuringa M, Hartman E, Ruhé P, et al.Pedicled prelaminated capsular flaps for coverage of skin defect in a rat model[J].J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009, 62(2): 230-234.

[6] 焦向阳,刑 新,郭恩覃.利用组织工程的方法预制含双面表皮的游离皮瓣[J].中华显微外科杂志,1999,22(1):262-264.

(责任编辑:关蕴良)

by VIS stereological system. Thus, the volumes of spinal cord after embedding and section-staining can be calculated. Compared with their initial volumes after fixation, the contration coefficient could be calculated. *Results*: The volumes of the lumbar intumescentia after fixation, embedding and section-staining were (96.80 ± 13.85) mm^2, (60.19 ± 19.15) mm^2 and (42.97 ± 16.02) mm^2 respectively. And the contration coefficient after embedding and section-staining were 62.9% ± 20.5% and 44.8% ± 16.6% respectively. *Conclusion*: The spinal cord contracts obviously after paraffin embedding and section-staining. These changes should not be ignored when morphometric studies are done.

【Key words】Paraffin section; Staining; Stereology

体视学形态计量研究中，定量研究形态结构的度量特征（如：体积、面积、长度、直径、厚度等）时，需借助组织切片来观察。通过在切片上叠加一定的体视学探针，估计所测结构的相对量——体积分数、表面积密度和长度密度等，然后将相对量乘以器官的体积，即能得到待测结构的总量（即绝对量）[1]。而如此估计待测结构的总量，是基于一个重要的假设：组织在制作切片的整个过程中从固定、脱水、包埋、切片、染色等各个环节待测结构的体积不发生变化。而实际情况并非这样。石蜡包埋的切片会造成明显的组织皱缩[2]，在切片染色过程中的各步骤也会对组织的体积产生一定程度的影响。目前，尚未见有关石蜡包埋和切片染色对脊髓体积改变程度的报道。因此，人们在研究中常常都被迫接受前述的假设，因此可能造成研究结果不够准确。在本研究中，我们拟运用体视学的原则方法和体视学设备对脊髓组织固定后、石蜡包埋后以及切片染色后这 3 个阶段体积的变化进行测量，以期得到切片处理过程中的皱缩系数，为体视学定量研究提供新的确切的资料。

1 材料与方法

1.1 动物取材与处理

12 只健康成年 SD 大鼠，雌雄不拘，体重 250 ~ 350 g。4%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后，仰卧固定，迅速开胸，暴露心脏，以灌注针刺入心尖，同时剪开右心耳，生理盐水经灌注针灌入。待流出的液体清亮无血后再灌注 4%多聚甲醛，以肝脏和颈部僵硬作为灌注固定成功的标志。立即翻转大鼠，取脊髓腰膨大（L_{4-6}）部分，经 4%多聚甲醛过夜、70%乙醇过夜、80%乙醇过夜、95%乙醇过夜及 100%乙醇 2 h 脱水固定后，将腰膨大均分为 6 份，随机抽取其中一段置入二甲苯，直至组织块变得半透明后石蜡包埋。

包埋后的组织块垂直于脊髓长轴方向制作厚度（H）14 μm 的连续切片，按等距随机原则，间距 15 张抽取一张切片，第一张切片从前 15 张切片中随机抽取[3]。按此方法每只动物共抽取 8 ~ 11 张切片。选中的切片行 HE 染色，在 VISIOPHARM 软件的 NewCAST 系统下测量其横截面积及厚度。

1.2 密度与体积测定

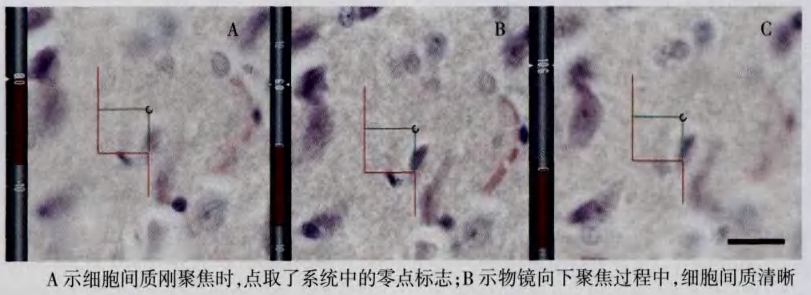
70%乙醇固定后分别测量腰膨大的长度（cm）、重量（g，AND HR-120 型电子天平测量，精度 0.1 mg）及其密度（g/cm^3）。以其重量除以密度即为固定后腰膨大的体积（V）。

密度具体测量方法如下：事先用超纯水和无水乙醇配制不同浓度的乙醇溶液，由于浓度不同，其比重亦不同（比重梯度为：0.005 g/cm^3）。将待测脊髓腰膨大部分放入乙醇溶液中，观察其浮沉情况：若在溶液中悬浮（既不浮出溶液表面也不沉入溶液器皿的底部），此时乙醇溶液的比重即为腰膨大的比重[4]。

1.3 体视学方法

1.3.1 腰膨大横截面积的估计　NEW CAST 系统 4 倍物镜下，随机叠加测点，每个测点代表的面积（ap）为 176 243.14 μm^2，分别计数各切片中落在组织上的测点总数，以测点总数 × ap 即为该切片上脊髓横断面的面积（a）[5~7]。同时分别计数落在脊髓灰质和白质内的测点数，以计算灰质和白质的比例。

1.3.2 切片厚度的测定　在 × 100 油镜（Olympus，数值孔径 1.40，最终放大倍数为 × 2 240）下观察脊髓横断面，从中随机在灰质中抽取 2 个视野，白质中抽取 1 个视野，测定其厚度。厚度测定方法如下：在随机抽取的视野中，叠加 1 个光学体



A 示细胞间质刚聚焦时，点取了系统中的零点标志；B 示物镜向下聚焦过程中，细胞间质清晰聚焦，测试棒显示厚度为 6.0 μm；C 示细胞间质刚不聚焦时；测试棒显示厚度为 10.6 μm

图 1　示切片厚度测量方法 × 2 240（标尺示 20 μm）

视框,对切片自上向下聚焦,当细胞间质刚开始聚焦的时候点取系统中零点的标志,继续向下聚焦,当细胞间质刚好不聚焦时记录系统中测试棒所显示的厚度,即为该视野中切片的厚度(见图 1)。以测得的各视野厚度,经灰质白质面积比校正后,计算得到该切片的平均厚度(h)。

1.4 皱缩系数(Contraction coefficient,CC)的估计

包埋后体积(V_E)=a×H×切片总张数×6

切片染色后体积(V_S)=a×h×切片总张数×6

包埋后的皱缩系数(CC_E)=V_E/V×100%

切片染色后的皱缩系数(CC_S)=V_S/V×100%

1.5 统计学处理

所有数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS11.5 软件进行分析。重复测量的方差分析检验固定后、包埋后和切片染色后腰膨大的体积是否存在显著性差异。

2 结 果

2.1 固定后脊髓腰膨大的密度和体积

经 70%乙醇固定后,脊髓腰膨大的密度约为 0.959 g/cm³,腰膨大的重量为(0.093±0.013)g,则腰膨大体积为(96.80±13.85)mm³。

2.2 体视学测量结果

腰膨大横截面面积为(4.62±1.68)mm²。灰质平均厚度为(9.10±0.73)μm,明显薄于白质平均厚度(10.71±0.92)μm(P=0.000)。脊髓灰质和白质的面积比约为 1:1,故而切片染色后经灰质白质面积比校正后的脊髓平均厚度为(9.90±0.81)μm。包埋后和染色后腰膨大体积较固定后显著降低(见表1)。包埋后的皱缩系数为 62.9%±20.5%,切片染色后的皱缩系数为 44.8%±16.6%,即:包埋过程使脊髓腰膨大体积缩小了 37.1%±20.5%,而切片染色使其皱缩了 55.2%±16.6%。

表 1 形态定量研究结果($\bar{x}\pm s$, n=12)

	密度(g/cm³)	切片厚度(μm)	横截面积(mm²)	体积(mm³)	皱缩率(%)
固定后	0.959	-	-	96.80±13.85	-
包埋后	-	14	4.62±1.68	60.19±19.15*	62.9±20.5
染色后	-	9.90±0.81	4.62±1.68	42.97±16.02*	44.8±16.6

注:*P<0.05,与固定后相比

3 讨 论

现有资料均表明:石蜡包埋会引起明显的组织皱缩,且石蜡包埋的肾组织还存在皱缩不均现象[2]。本研究也发现,脊髓腰膨大白质与灰质皱缩程度亦不一样,灰质皱缩程度明显大于白质,这可能是由于灰质结构较白质疏松,主要由各种神经细胞和含水量较丰富细胞间质构成,而白质则是由各种胶质细胞和致密的神经纤维构成,因此灰质的皱缩较白质明显。

已有资料表明,Bouin 液固定和乙醇脱水对组织的体积影响不大,并推测不同固定液对实质器官的影响与其相似[8]。而石蜡包埋引起组织皱缩是较为明显的。不同组织的皱缩是不一样的,本研究采用神经系统作为对象,比较了低级中枢——脊髓皱缩情况,结果与之前研究结果相似。但之前的研究主要比较的是参照空间中某种粒子或结构的体积变化,本研究则从整体的角度比较了参照空间在石蜡包埋和切片染色整个过程中体积的变化,与之前的结果相比:参照空间的体积皱缩无论是包埋后(平均 37.1%)还是染色后(平均 55.2%)较其中的某种粒子的皱缩(最大 27.3%)更为显著,其原因可能还是与组织致密程度有关。

由此可见,石蜡包埋和染色过程均会造成明显的组织皱缩,且构成不同的组织其皱缩程度亦不一样。由于尚不能分别估计新鲜状态下或固定后灰质和白质的体积,故不能精确计算灰质和白质分别皱缩的程度。本研究虽然只得出了灰质白质平均的皱缩系数,但亦说明采用石蜡作为包埋介质,会造成参照空间体积的显著缩小,在形态定量研究过程中,必须考虑到皱缩的结果影响,必要时可以皱缩系数对结果进行校正。

参 考 文 献

[1] 成令忠,钟翠平,蔡文琴. 现代组织学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003.34-39.

[2] 代小思,康 健,杨正伟. 放大倍数和包埋介质对肾组织形态定量研究的影响[J].中国体视学与图像分析, 2004,9(4): 203-205.

[3] West M J,Slomianka L, Gundersen H J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in thesubdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionators[J]. Anat Rec,1991,231(4):482-497.

[4] Weast R C,Astle M J, Beyer W H. CRC Handbook of Chemistry and Physics[M]. 66th edition. Florida:CRC Press,Inc.1985.D-228,D-262.

[5] Zhang R D,Wen X H,Kong L S,et al. A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis[J].Reproduction,2002,124(1):95-105.

[6] Yang Z W,Kong L S, Guo Y,et al. Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment:a morphometric study[J].Asian J Androl,2006,8(3):289-299.

[7] Peng B,Wang Y P,Shang Y,et al.Effect of vasectomy via inguinal canal on spermatogenesis in rabbits[J].Asian J Androl,2008,10(3):486-493.

[8] 赵圆宇,王亚平,杨正伟.固定与脱水对睾丸、附睾尾和眼球的密度与体积的影响[J].川北医学院学报, 2006,26(1): 4-7.

(责任编辑:关蕴良)