

大鼠视网膜、视神经冰冻切片适宜厚度探索

韩宏艳, 李艳, 熊帅, 杨琪瑶, 李贇婷, 曹霞
(昆明医科大学第二附属医院, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 针对大鼠眼球冰冻切片难度高, 各研究对眼球冰冻切片厚度差异较大的问题, 探索大鼠视网膜、视神经冰冻切片适宜的厚度. **方法** 将 24 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 使用传统的石蜡切片行 HE 染色做对照, 分别对不同厚度的冰冻切片做 HE 染色和 FITC-lectin 荧光染色进行观察 (5 μm 、6 μm 、8 μm 、10 μm 、12 μm 、15 μm , $n=8$). **结果** 视网膜冰冻切片 HE 染色显示 6 μm 和 8 μm 的大鼠视网膜各层细胞可看到完整细胞, 密疏适宜, 胞核清楚, 核膜光滑完整, 神经纤维层厚度均匀; 6 μm 视神经冰冻切片 HE 染色显示视神经纤维排列密集、规则, 染色均匀; 免疫组化染色结果显示 5 μm 、6 μm 和 8 μm 的大鼠视网膜冰冻切片 FITC-lectin 荧光染色后层次清晰, lectin 阳性细胞呈绿色分枝状, 在神经节细胞及内网状层清晰可见, 亦可在外网状层看到少量绿色 lectin 阳性细胞, 10 μm 及 15 μm 的大鼠视网膜由于各层细胞重叠严重, 无法看到绿色 lectin 阳性细胞. 6 μm 的视神经冰冻切片 FITC-lectin 荧光染色显示清晰可见的活化小胶质细胞, 胞体变肥大, 突起缩短, 呈阿米巴样变化. **结论** 6 μm 的视神经冰冻切片以及 6~8 μm 的视网膜冰冻切片, 可以得到重复性切片, 也可以达到理想的免疫组化染色效果.

[关键词] 视网膜; 视神经; 冰冻切片; 厚度

[中图分类号] R361⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0025-06

Exploration on Suitable Thickness of Rat Retina and Optic Nerve Frozen Sections

HAN Hong-yan, LI Yan, XIONG Shuai, YANG Qi-yao, LI Yun-ting, CAO Xia
(The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To explore the suitable thickness of rat retina and optic nerve frozen sections. **Methods** 24 female SD rats were randomly divided into 3 groups ($n=8$) in the experiments. Different thickness (5 μm , 6 μm , 8 μm , 10 μm , 12 μm , 15 μm) frozen sections of the retina and optic nerve of SD rats were made for HE staining and FITC lectin fluorescent staining, and the traditional paraffin section of the HE staining were used as control. **Results** 6 μm and 8 μm frozen sections of retina HE staining showed clear integrity retinal cells, appropriate cell density, clear nuclear membrane and homogeneous thickness of nerve fiber layer. 6 μm frozen section of optic nerve HE staining showed nerve densely arranged, rules, dyeing uniformity. Immunohistochemistry staining results showed clear retina layers, and lectin-positive cells were green branched, clearly visible in the ganglion cell and inner plexiform layer. A few green lectin positive cells could also be seen in the outer plexiform layer. However, the green lectin positive cells can not be seen clearly due to serious overlapping layers of 10 μm and 15 μm frozen sections. The 6 μm frozen section of optic nerve lectin staining results showed microglia activated, amoeba-like changes, cell body became hypertrophy and protuberant shortened. **Conclusion** The 6-8 μm frozen section of retina and 6 μm optic nerve were suitable for HE and immunohistochemistry staining.

[Key words] Retina; Optic nerve; Frozen section; Thickness

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2013FB107, 2013FB150)

[作者简介] 韩宏艳 (1982~), 女, 山西长治市人, 在读硕士研究生, 主要从事神经免疫学研究工作. 李艳和韩宏艳对本文有同等贡献.

[通讯作者] 曹霞. E-mail: ynsfcaocao@126.com

在对眼科疾病（如糖尿病性视网膜病变、青光眼等）的研究中，视网膜视神经是常见的研究对象。大鼠因其晶体大而韧、巩膜硬、虹膜软，视网膜疏松、对光敏感，常作为眼底疾病方面研究的实验动物^[1]。但因其眼球构造复杂，各部分组织的软硬度悬殊，且各层间连接性差，致使得制作冰冻切片难度较高^[2]。冰冻切片的厚度对实验结果影响较大，太厚或太薄都不利于结果的观察。我们查阅文献发现研究中视网膜、视神经冰冻切片厚度范围从 4 μm 至 40 μm 不等^[3-5]。梁亮等^[6]在实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠眼部模型中使用 4 μm 的冰冻切片可以清晰看到视网膜；Wittig D 等人^[4]则在其研究中使用 40 μm 厚度的大鼠视网膜研究间充质干细胞，这给众多研究者带来了一定的困惑，那么视网膜、视神经冰冻切片厚度究竟多少才利于结果的观察，为了了解大鼠视网膜、视神经冰冻切片适宜厚度，为后续研究奠定基础，笔者以石蜡切片 HE 染色结果为对照，对大鼠视网膜、视神经不同厚度冰冻切片进行了 HE 染色及特定蛋白免疫荧光染色，从细胞层次、密度、染色效果等方面观察了不同厚度视网膜、视神经的病理及免疫组化结果，以期选择出合适的切片厚度以便进行后续实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组 健康、雌性 SD 大鼠 24 只，体质量 190 ~ 210 g，由昆明医科大学实验动物中心提供。动物随机分为 3 组，分别做 5 μm 石蜡切片 HE 染色；冰冻切片 HE 染色及荧光染色厚度为 5 μm 、6 μm 、8 μm 、10 μm 、12 μm 、15 μm ，每组 8 只。

1.1.2 取材及固定 (1) 取实验大鼠，碘伏消毒腹部，用 10% 水合氯醛 0.2 mL/100 g 腹腔注射（0.4 g/kg，即 4 mL/kg，约 0.8 mL/只）。待大鼠角膜反射消失，仰卧位无法自行转体，呼吸深慢时即麻醉成功。(2) 麻醉成功后，将大鼠置于手术台上，侧卧位固定大鼠头部，剥开眼睑，用剪刀分离大鼠眼周围软组织，眼科弯镊从角膜巩膜缘游离球结膜，分离球后组织，采用显微有齿镊及角巩膜剪小心取出眼球并保留约 5 mm 的视神经，对侧眼球同样。(3) 将取出的眼球小心分离多余的结膜组织，每组研究按不同的方法进行固定。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片 (1) 石蜡切片制作：①所有眼球

标本固定结束后，从固定液中取出眼球。用锋利刀片沿视轴方向在眼球一侧做一次矢状剖切，切去一侧部分眼球壁，再小心剥离晶状体，室温脱水，整个眼球依次浸入体积分数为 70%、80%、90%、95%、100% I、100% II 乙醇中各 1 h，二甲苯 I、二甲苯 II 中各 30 min 透明。混合石蜡 I（硬脂酸与软蜡体积比 3:7）2 h，混合石蜡 II（硬脂酸与软蜡体积比 2:8）1 h，软蜡 1.5 h，硬蜡 1.5 h；②浸蜡后的眼球，水平切面朝向包埋盒底，58 ~ 60℃ 硬蜡包埋，蜡块冷却后，室温保存待切；③用轮转式切片机制片，连续靠近视乳头处切片 6 片，切片厚 5 μm ，40 ~ 46℃ 水浴、展片，60℃ 烤片 3 h 以上。(2) 石蜡切片苏木精 - 伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色：①取出烤好的切片，二甲苯脱蜡 2 次，每次 5 min，然后放入无水乙醇 I 3 min、II 3 min、95% 乙醇 I 3 min、95% 乙醇 3 min、80% 乙醇 3 min、70% 乙醇 3 min 再放入蒸馏水 3 ~ 5 min；②放入苏木素 - 伊红染液中染色 5 ~ 10 min，水洗后放入 1% 盐酸酒精分色 3 ~ 10s，镜下观察染色合适后，水洗蓝化 15 ~ 30 min（注意换水）；③将玻片放入 0.5% 伊红液 10 ~ 30 s、70% 乙醇 2 min、80% 乙醇 2 min、90% 乙醇 2 min、95% 乙醇 2 min、无水乙醇 I 2 min、II 2 min 脱水；再放入二甲苯 I 5 min、II 5 min。用中性树脂封片。盖片要选大于组织块的面积，如漏出一部分不久将会褪色，所用树脂浓度要适当，树脂封固时不能有气泡。

1.2.2 冰冻切片 (1) 冰冻切片制作：将甲基纤维素浸泡的眼球再用蒸馏水冲洗后，将眼球水平方向置于速冻台上，分次于眼球周围滴加适量包埋剂 OCT，待冷冻后切片，冷冻温度控制在 (-20 ± 2) ℃，切片厚度，5 μm 、6 μm 、8 μm 、10 μm 、12 μm 、15 μm 。(2) 冰冻切片 HE 染色：①取出制作好的冰冻切片，蒸馏水冲洗 3 次，5 min/次；②放入苏木素 - 伊红染液中染色 5 ~ 10 min，流水洗后放入 1% 盐酸酒精分色 3 ~ 5 s，镜下观察染色合适后，流水冲洗蓝化 15 ~ 30 min（注意流水不得直接冲洗于组织上）；③将玻片放入 0.5% 伊红液 10 ~ 30 s、70% 乙醇 2 min、80% 乙醇 2 min、95% 乙醇 2 min、无水乙醇 I 2 min、II 2 min 脱水；再放入二甲苯 I 5 min、II 5 min；而后用中性树脂封片。盖玻片要选大于组织块的面积，如漏出一部分不久将会褪色，所用树脂浓度要适当，树脂封固时不能有气泡。(3) 冰冻切片 FITC-lectin 荧光染色：①前处理：将制作好的切片晾干后使用 PBS 冲洗 3 次，5 min/次；②封闭：使用新鲜配制的

5%正常小牛血清室温下封闭 30 min; ③去除血清后, 加入与 FITC (绿色荧光) 结合的 lectin (1:100, Sigma), 37℃下避光孵育 1 h; ④PBS 漂洗 3 次, 5 min 每次, 每个标本上加入 DAPI 染料 (1:10 000) 常温下避光染核 10 min; ⑤反应后 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min. 封片后荧光显微镜下观察拍照.

2 结果

2.1 石蜡切片视网膜、视神经 HE 染色结果

大鼠视网膜分为 10 层, 神经纤维层 (retinal nerve fiber layer, RNFL)、神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL)、内核层 (inner nuclear layer INL)、内网状层 (inner plexiform layer, IPL)、外核层 (outer nuclear layer, ONL)、外网状层 (outer plexiform layer, OPL)、色素细胞层 (retinal pigment epithelium, RPE) 以及内外界膜和视杆细胞视锥细胞层.

对大鼠视网膜、视神经进行常规 5 μm 的石蜡切片, 可看到视网膜层次清晰, 神经节细胞呈单层排列, 整齐密集, 胞核清楚, 核膜光滑完整, 神经纤维层厚度均匀 (图 1A-C); 视神经纵切片视神经纤维排列密集、规则, 染色均匀, 少量胶质细胞均匀分布 (图 1D-F).

2.2 冰冻切片视网膜 HE 染色结果

对大鼠视网膜进行 HE 染色后发现: 5 μm 的大鼠视网膜层次清晰, 神经节细胞呈单层排列整齐, 各层细胞可看到完整形态, 但神经纤维层容易断裂 (图 2A). 6 μm 和 8 μm 的大鼠视网膜神经节细胞呈单层排列整齐, 各层细胞可看到完整细胞, 密疏适宜, 胞核清楚, 核膜光滑完整, 神经纤维层厚度均匀 (图 2B、C). 10 μm 的大鼠视网膜神经节细胞呈单层排列, 但内核层及外核层细胞重叠, 染色容易偏深, 不易观察 (图 2D). 12 μm 和 15 μm 的大鼠视网膜可看到神经节细胞结构模糊, 形态不规则, 内核层及外核层细胞重叠更严重, 染色更深, 无法观察单个细胞形态, 而且较容易脱片 (图 2E、F).

2.3 冰冻切片视神经 HE 染色结果

大鼠视神经的直径大约 1 mm 左右, 制作成石蜡切片后不容易被切到. 笔者取不同厚度的视神经作矢状位切片并做 HE 染色, 观察视神经的变化: 不同厚度的大鼠视神经纵切片均可看到视神经纤维排列密集、规则, 染色均匀, 少量胶质细胞均匀分布 (图 3A-D), 只是不同厚度的视神经

HE 染色着色上有偏差, 8 μm 和 10 μm 的视神经着色偏深 (图 3C-D).

2.4 视网膜 FITC-lectin 荧光染色结果

使用结合 FITC 的 lectin 标记小胶质细胞, 正常情况下 lectin 阳性视网膜小胶质细胞主要位于神经节细胞层 (RGC) 及内网状层 (IPL), 少量位于外网状层 (OPL), 内外核层与视网膜下腔较少, 且呈现为静息形态 (胞体较小).

对大鼠视网膜进行 FITC-lectin 荧光染色后发现: 5 μm 、6 μm 和 8 μm 的大鼠视网膜层次清晰, lectin 阳性细胞呈绿色分枝状, 在神经节细胞及内网状层清晰可见, 亦可在外网状层看到少量绿色 lectin 阳性细胞 (图 4A、B、C). 10 μm 及 15 μm 的大鼠视网膜由于内核层及外核层细胞重叠严重, 甚至无法区分外网状层和色素细胞层, 因此无法看到绿色 lectin 阳性细胞 (图 4D、4E).

2.5 视神经 FITC-lectin 荧光染色结果

笔者对 6 μm 大鼠视神经进行 FITC-lectin 荧光染色后发现: 神经纤维清晰可见, 单个细胞染色均匀, 从不同的放大倍数上可清晰看到活化的小胶质细胞, 胞体变肥大, 突起缩短, 呈阿米巴样变化 (图 5).

3 讨论

冰冻切片可以比较好的保存组织上的蛋白和抗原^[6]. 不同的组织对切片的厚度要求不一样, 如脑组织的就不能太薄^[7], 尤其是观察神经元时, 厚度可达 10~15 μm 甚至 40 μm , 但是太厚容易脱片, 肾病的一般 2~3 μm , 肿瘤的也不要超过 5 μm , <5 μm 的属于超薄切片^[8,9]. 根据不同组织及实验目的选择不同厚度的冰冻切片是极为必要的.

为了探讨视神经损伤后的视神经及视网膜的形态变化, 从而进一步研究免疫及各类作用在损伤过程中的影响, 需要明显而清晰的病理染色结果来支持, 但过往文献中对视网膜及视神经冰冻切片厚薄描述不一, 从 4 μm 到 40 μm 不等, 为了清晰观察视网膜、视神经的结构及细胞形态变化、以及神经纤维的形态变化, 笔者在本研究中以大鼠视网膜、视神经的常规厚度 5 μm 石蜡切片为对照, 选择了厚度分别为 5 μm 、6 μm 、8 μm 、10 μm 、12 μm 、15 μm 的视网膜冰冻切片与之比较. HE 染结果显示厚度为 6 μm 和 8 μm 的大鼠视网膜神经节细胞呈单层排列整齐, 各层细胞可看到完整细胞, 密疏适宜, 胞核清楚, 核膜光滑完整; 10 μm 、12 μm 和 15 μm 的大鼠视网膜所示神经节

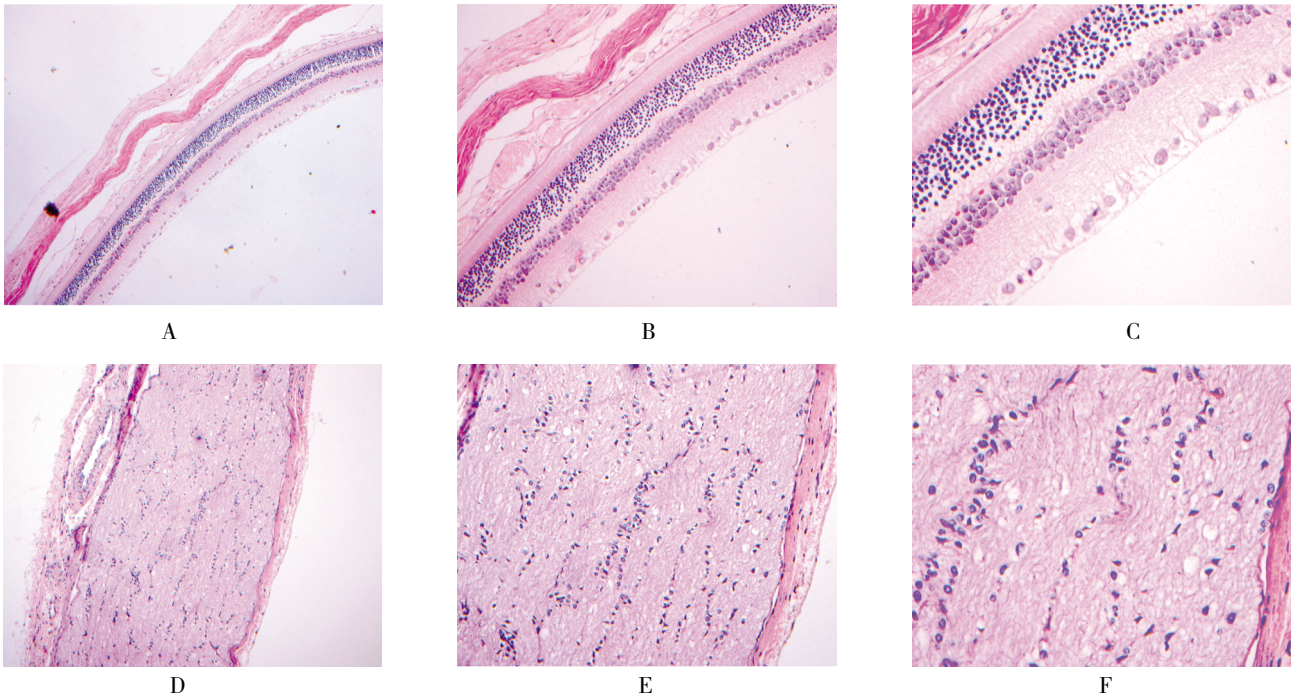


图 1 石蜡切片视网膜、视神经 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining results of paraffin section of the retina and optic nerve

A:5 μm 视网膜 × 100; B:5 μm 视网膜 × 200; C:5 μm 视网膜 × 400; D:5 μm 视神经 × 100; E:5 μm 视神经 × 200; F:5 μm 视神经 × 400.

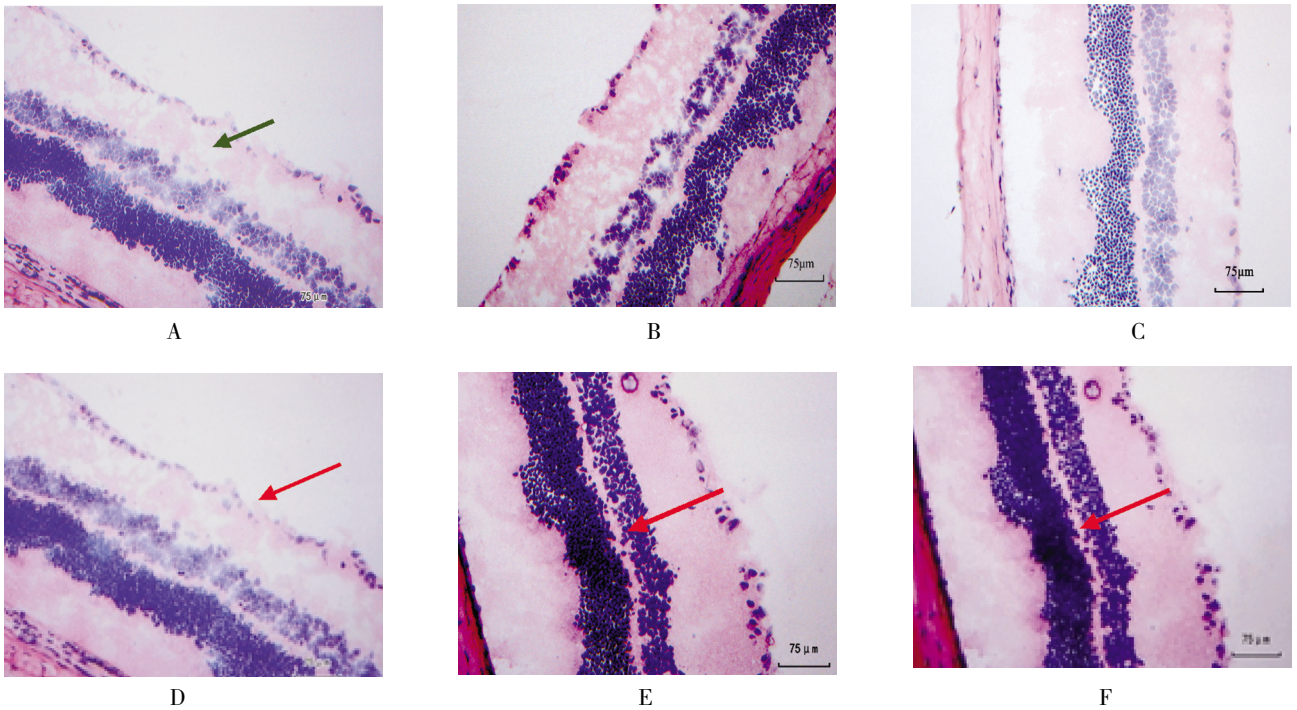


图 2 冰冻切片视网膜 HE 染色结果 × 200 (←为重叠部分、←为断裂部分)

Fig. 2 HE staining results of frozen sections of retina X200 (←overlap, ←broken part)

A:视网膜 5 μm; B:视网膜 6 μm; C:视网膜 8 μm; D:视网膜 10 μm; E:视网膜 12 μm; F:视网膜 15 μm.

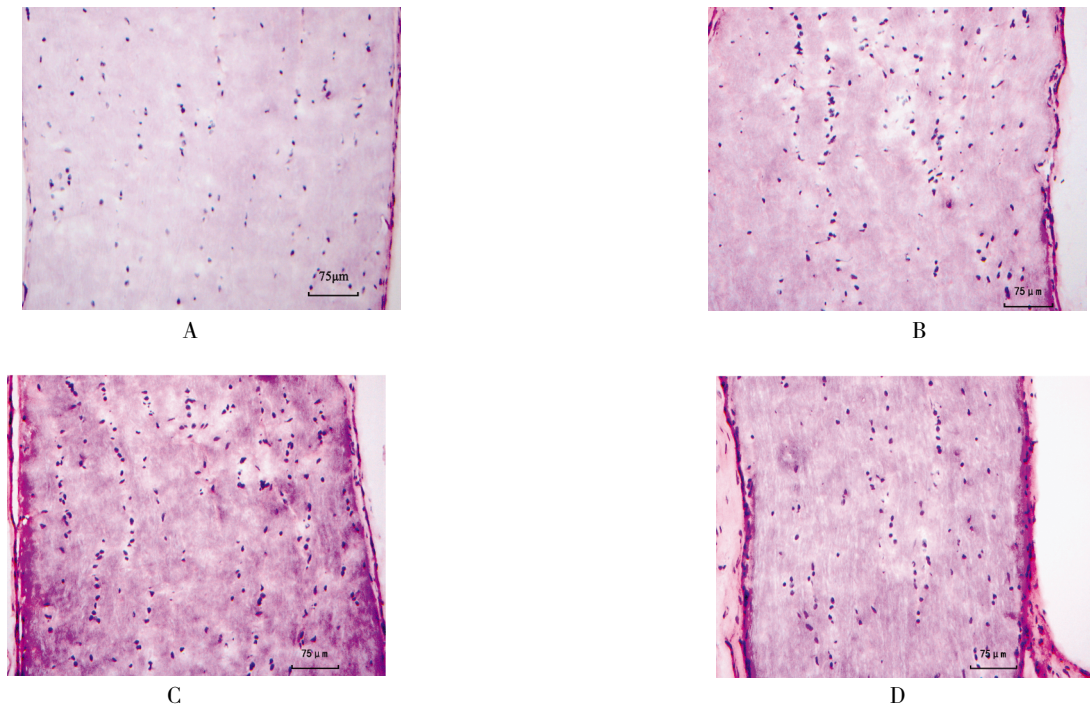


图 3 冰冻切片视神经 HE 染色结果 (×200)

Fig. 3 HE staining results of frozen sections of optic nerve (×200)

A:视神经 5 μm; B:视神经 6 μm; C:视神经 8 μm; D:视神经 10 μm.

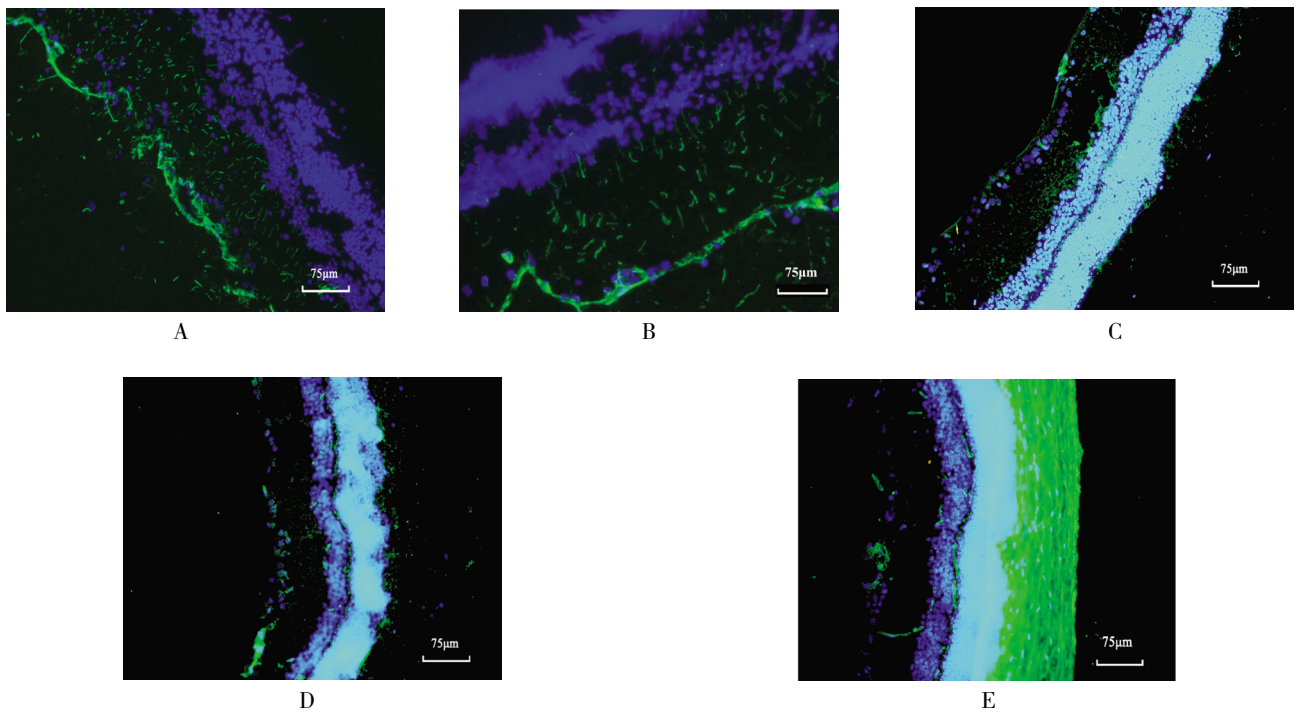


图 4 冰冻切片视网膜 lectin 荧光染色结果 (×200)

Fig. 4 Frozen section results of lectin fluorescent staining on retina (×200)

A:视网膜 5 μm; B:视网膜 6 μm; C:视网膜 8 μm; D:视网膜 10 μm; E:视网膜 15 μm.

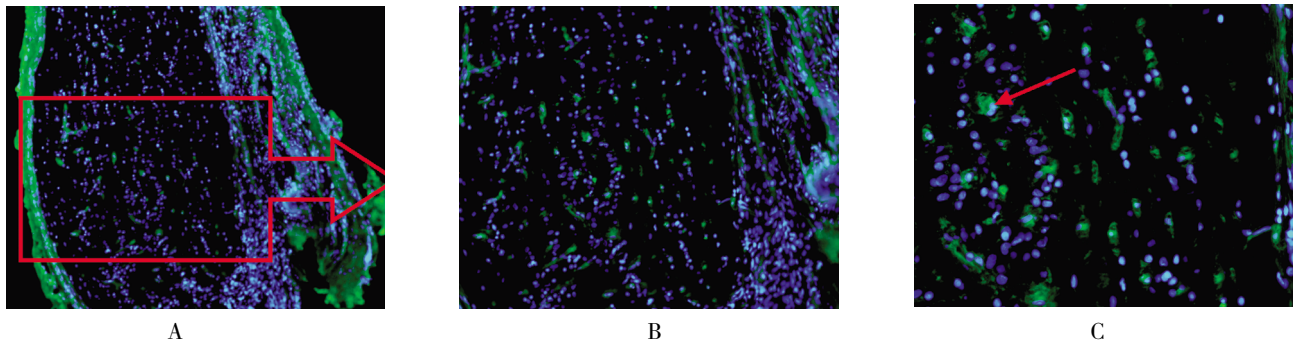


图 5 冰冻切片视神经 lectin 荧光染色结果 (←为小胶质细胞)

Fig. 5 Frozen section results of lectin fluorescent staining on optic nerve (← microglia)

A:6 μm 视神经 ×100; B:6 μm 视神经 ×200; C:6 μm 视神经 ×400.

细胞结构模糊,形态不规则,内核层及外核层细胞重叠严重、染色深,无法观察单个细胞形态,而且较容易脱片。同时选择 5 μm、6 μm、8 μm、10 μm、15 μm 的视网膜冰冻切片进行免疫组织化学 FITC-lectin 荧光染色, FITC-lectin 能标记视网膜及视神经上的小胶质细胞,呈现明亮的黄绿色荧光,是目前应用最为广泛的荧光素。笔者从结果上也可看到厚度为 5 μm、6 μm、8 μm 的大鼠视网膜层次清晰, lectin 阳性细胞呈绿色分枝状,在神经节细胞及内网状层清晰可见,亦可在外网状层看到少量绿色 lectin 阳性细胞,而 10 μm 及 15 μm 的大鼠视网膜由于内核层及外核层细胞重叠严重,甚至无法区分外网状层和色素细胞层,因此无法看到绿色分枝状 lectin 阳性细胞,对于观察小胶质细胞的活化状态造成严重阻碍。

比较各组结果,笔者发现厚度为 6~8 μm 的视网膜切片,视网膜完整,无明显断裂及脱片现象, HE 染色结果各层结构清晰,颜色鲜艳对比清晰,细胞结构完整,可较好地分辨及观察视网膜各层的形态结构,同时该厚度的荧光染色切片,可以较好的观察到单层细胞(尤其是神经节细胞层)及 lectin 阳性细胞的形态位置,有助于准确进行阳性细胞计数。

笔者选择厚度为 5 μm、6 μm、8 μm、10 μm 的视神经冰冻切片进行 HE 染色观察视神经的变化:不同厚度的大鼠视神经纵切片均可看到视神经纤维排列密集、规则,染色均匀,少量胶质细胞均匀分布,只是不同厚度的视神经 HE 染色着色上有偏差,8 μm 和 10 μm 的视神经着色偏深。然后我们对 6 μm 的视神经做荧光染色,可清晰地观察到活化的小胶质细胞形态。结论:鉴于大鼠视神经标本直径只有 0.64 mm 的特殊性^[10],笔者的研

究结果显示 6 μm 的视神经冰冻切片以及 6~8 μm 的视网膜冰冻切片,既可以得到重复性切片,也可以达到更理想的免疫组化染色效果。

[参考文献]

- [1] 李云琴,田润. 大鼠外伤性视神经损伤模型的建立[J]. 眼科新进展,2011,31(10):934-936.
- [2] 刘晓兰,刘燕,宋月晗,李峰. 冰冻切片制作体会及常见问题[J]. 现代生物医学进展,2010,10(14):2737-2741.
- [3] 梁亮,王红,彭晓燕,等. IL-17在实验性自身免疫性葡萄膜炎大鼠模型眼部的表达[J]. 眼科研究,2010,28(4):315-318.
- [4] WITTIG D,JSZAI J,CORBEIL D,et al. Immunohistochemical localization and characterization of putative mesenchymal stem cell markers in the retinal capillary network of rodents[J]. Cells Tissues Organs,2013,197(5):344-359.
- [5] 化静,房婷,刘迷迷,等. 移植预处理后组织的冰冻切片制作方法[J]. 江苏医药,2013,39(3):269-271.
- [6] DOT C,PARIER V,BEHAR-COHEN F,et al. Influence of age on healing processes after Argon photocoagulation in C57bl/6j mice[J]. Mol Vis,2009,1(5):670-684.
- [7] 李小媚,张楠楠,王冬梅,等. 大鼠生后早期脑内小胶质细胞形态学研究[J]. 神经解剖学杂志,2010,26(6):625-632.
- [8] SIMIC D,SIMUTIS F,EULER C,et al. Determination of relative Notch1 and gamma secretase-related gene expression in puromycin-treated microdissected rat kidneys[J]. Gene Expr,2013,16(1):39-47.
- [9] 李慧,黄景阳,袁中瑞. 提高脑组织冰冻切片质量的几点体会[J]. 中国免疫学杂志,2012,28(11):1019-1022.
- [10] GELLRICH N C,SCHIMMING R,ZERFOWSKI M,et al. Quantification of histological changes after calibrated crush of the intraorbital optic nerve in rats[J]. Br J Ophthalmol,2002,86(2):233-237.

(2014-08-12 收稿)