

不同固定液对海马卵巢冰冻切片HE染色质量的影响

马菁菁, 杨燕菁*, 贾彬茜, 崔培, 孙金辉*

天津农学院, 水产学院, 天津

收稿日期: 2022年2月10日; 录用日期: 2022年2月23日; 发布日期: 2022年3月14日

摘要

海马是世界上极其短缺的珍贵药源性海洋硬骨鱼类, 具有独特的雄性育儿机制和性腺结构。解析海马性腺的组织学结构对提高海马人工养殖的效率具有重要意义。冰冻组织切片相比石蜡切片具有快捷、操作简便等优点, 然高质量冰冻切片的制片易受多重因素影响, 其中固定液是影响后续HE染色的关键因素之一。本实验比较了8种常用固定液对海马卵巢冰冻切片HE染色的影响。结果显示, 冰醋酸固定的卵巢组织结构清晰、细胞核边界分明, 核质比高, 且卵黄颗粒亦着色明显, 是一种较为理想的海马卵巢冰冻切片固定液。

关键词

海马, 卵巢, 冰冻切片, HE染色, 固定液

Influence of Different Fixatives on HE Staining in Frozen Sections of Seahorse Ovary

Jingjing Ma, Yanjing Yang*, Chengqian Jia, Pei Cui, Jinhui Sun*

Fisheries College, Tianjin Agricultural University, Tianjin

Received: Feb. 10th, 2022; accepted: Feb. 23rd, 2022; published: Mar. 14th, 2022

Abstract

Seahorse is a kind of precious marine medicinal teleosts with special father's rearing pattern and

*通讯作者。

文章引用: 马菁菁, 杨燕菁, 贾彬茜, 崔培, 孙金辉. 不同固定液对海马卵巢冰冻切片 HE 染色质量的影响[J]. 水产研究, 2022, 9(1): 20-25. DOI: 10.12677/ojfr.2022.91003

gonadal structure. Analyzing the histological structure of seahorse gonads is significant of improvement in efficiency of artificial breeding. Compared with paraffin section, frozen section has a fast and simple operation, while the quality of which is susceptible to multiple factors. The fixative is a key factor for Hematoxylin-Eosin (HE) staining. In our study, we chose 8 kinds of fixatives for the frozen section of seahorse ovary and compared the quality of HE stain, results showed that glacial acetic acid fixation was an ideal fixative for frozen sections of seahorse ovary stained with HE, which displayed a clear tissue structure with distinct nuclear boundary, high nucleo-plasmic contrast and bright-coloured yolk granules.

Keywords

Seahorse, Ovary, Frozen Section, HE Stain, Fixative

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

海马隶属海龙科, 是世界上极其短缺的珍贵药源性海洋硬骨鱼类, 素有“南方人参”的美誉[1]。全球每年的海马交易量高达 2000 多万只, 市场供不应求带来的过度捕捞以及环境的日趋恶化使海马自然资源已近枯竭, 自 2004 年起我国已把海马纳入二级重大保护动物体系, 至 2019 年世界自然保护联盟 IUCN 已将 44 种海马录入了《濒危物种红色名录》[2], 因此人工养殖已成为实现海马资源可持续利用的重要途径。

相较于大多数硬骨鱼类, 海马在繁殖过程中采取雄性卵胎生策略, 雌海马将成熟的卵母细胞注入雄海马育儿袋中, 卵母细胞在育儿袋中受精并完成胚胎发育过程[3]。雌海马的卵巢呈双生殖脊规则排列, 而雄海马精巢含有独特的中央生精腔[4], 其独特的繁育方式和性腺结构使海马的人工养殖技术遇到了瓶颈。现阶段我国的海马养殖普遍面临着种质退化、繁殖效率低、幼体成活率低等问题, 海马性腺的组织学结构的研究是解析海马的繁育机制的前提。

组织学中最常用的方法为切片标本制备。冰冻切片是一种在低温条件下将生物组织快速冻结并达到一定硬度后进行恒温冷冻切片的实验技术[5]。相较于石蜡切片制片环节复杂繁多、实验周期较长等缺点, 冰冻切片不需要经过浸蜡、脱蜡等中间环节, 制片快捷, 操作步骤简单, 组织内的 DNA、RNA、蛋白质、脂类等的完整性和生物活性保留程度较好, 避免了在石蜡繁琐制片过程中组织分子水平物质的断裂及降解风险, 因此冰冻切片的制片广泛应用于免疫组化、免疫荧光、酶检测、组织定位和原位杂交等后续实验中[6]。然而冰冻切片的制备难度大、要求高, 制片质量受多重因素影响, 其中切片固定是影响 HE 染色质量的关键因素之一。本文通过比较 8 种常用固定液短时固定海马卵巢冰冻切片 HE 染色的质量, 探讨不同固定液对海马卵巢冰冻切片制片效果的影响, 为海马卵巢发育的研究奠定了基础。

2. 材料和方法

2.1. 材料

6 个月大的雌性线纹海马购买于厦门小澄水产科技有限公司, 水温 23℃、盐度 24‰, 暂养两周后取新鲜卵巢组织。

2.2. 方法

2.2.1. 冰冻切片的制备

使用 MS-222 麻醉剂麻醉性成熟雌性线纹海马后取其卵巢组织, 将卵巢组织置于载有 OCT 的锡箔纸包埋盒中平衡 2~5 min, 将包埋盒置于液氮中速冻, 盒口高于液氮面, 至整个 OCT 包埋剂凝固后放入 -80℃ 冰箱储存待用。

冰冻切片(Thermo HM525)工作温度调至 -22℃, 将 OCT 包埋组织块置于冰冻切片内 20~30 min 平衡温度后进行连续切片、贴片, 切片厚度为 10 μm。切片 37℃ 烘干 30 min, -80℃ 储存待用。

2.2.2. 冰冻切片的固定

将 -80℃ 贮存的切片取出后于室温放置 5 min。选取 8 种常用的固定液: ① 95%乙醇; ② 乙醚酒精(乙醚:乙醇 = 1:1); ③ 10%甲醛; ④ 冰醋酸; ⑤ AF 液(95%乙醇:40%甲醛 = 9:1); ⑥ Davidson's 液(10%甲醛:95%乙醇:冰醋酸:水 = 2:3:1:3); ⑦ 4%多聚甲醛; ⑧ 丙酮, 用滴片覆盖的方式分别固定切片 1 min。

2.2.3. HE 染色

固定后的切片于摇床上用蒸馏水摇洗 2 min。苏木精染色液染色 5 min, 自来水漂洗 1 min; 分化液分化 20s, 自来水漂洗 1 min; 返蓝液浸泡 5s, 自来水漂洗 2 min; 经 70%、95%乙醇梯度脱水各 2 min 后置于伊红中染色 1 min。

2.2.4. 切片透明及封片

将 HE 染色后的切片依次经 70%乙醇脱水 30s、80%乙醇脱水 1 min、95%乙醇脱水 5 min, 二甲苯透明 5 min 后更换新鲜二甲苯再透明 5 min, 用中性树脂封片。

3. 结果与分析

Table 1. The comparison of HE staining qualities in frozen sections of seahorse ovary with 8 fixatives

表 1. 8 种固定液对海马卵巢冰冻切片 HE 染色效果的比较

固定液	组织清晰度	细胞收缩度	细胞核染色	细胞质染色	核质对比	卵黄颗粒染色
95%乙醇	较差	轻微收缩	较差	鲜艳	较差	较差
乙醚酒精	较差	轻微收缩	差	鲜艳	差	好
10%甲醛	差	轻微肿胀	差	鲜艳	差	较差
冰醋酸	清晰	轻微收缩	鲜艳	鲜艳	好	好
AF 液	差	轻微收缩	差	鲜艳	差	差
Davidson's 液	较差	轻微收缩	较差	鲜艳	较差	较差
4%多聚甲醛	差	轻微收缩	差	鲜艳	差	差
丙酮	差	明显收缩	差	鲜艳	差	好

在显微镜下比较 8 种不同固定液处理的冰冻切片的 HE 染色效果, 结果如表 1 所示, 八种固定液均能达到快速固定的要求, 但染色效果各有差异。在细胞形态方面, 除了丙酮引起细胞明显收缩外, 其它 7 种固定液对细胞形态改变不大, 仅有轻微的收缩或肿胀。细胞质的着色效果在 8 种固定液中均呈现鲜艳的粉红色。经冰醋酸固定的细胞核结构清晰、颜色鲜艳, 细胞核与细胞质颜色分明, 95%乙醇和

Davidson's 液固定的细胞核边缘着色模糊、核质对比度较差, 乙醚酒精、10%甲醛、AF 液、4%多聚甲醛和丙酮固定的切片细胞核染色呈暗灰色, 边缘界限模糊, 结构不清。在卵黄颗粒着色方面, 冰醋酸、乙醚酒精和丙酮的固定效果最佳, 成熟卵母细胞的整个卵黄颗粒着色均匀、色彩艳丽, 95%乙醇、10%甲醛、AF 液和 4%多聚甲醛固定的卵黄颗粒着色不均或着色效果差, Davidson's 液固定的卵黄颗粒着色过于饱和而呈黑红色且脱落明显。综合卵巢内各时期的卵母细胞、滤泡细胞以及鞘细胞的 HE 染色效果(图 1), 经冰醋酸固定的冰冻切片结构清晰、HE 染色效果最佳。

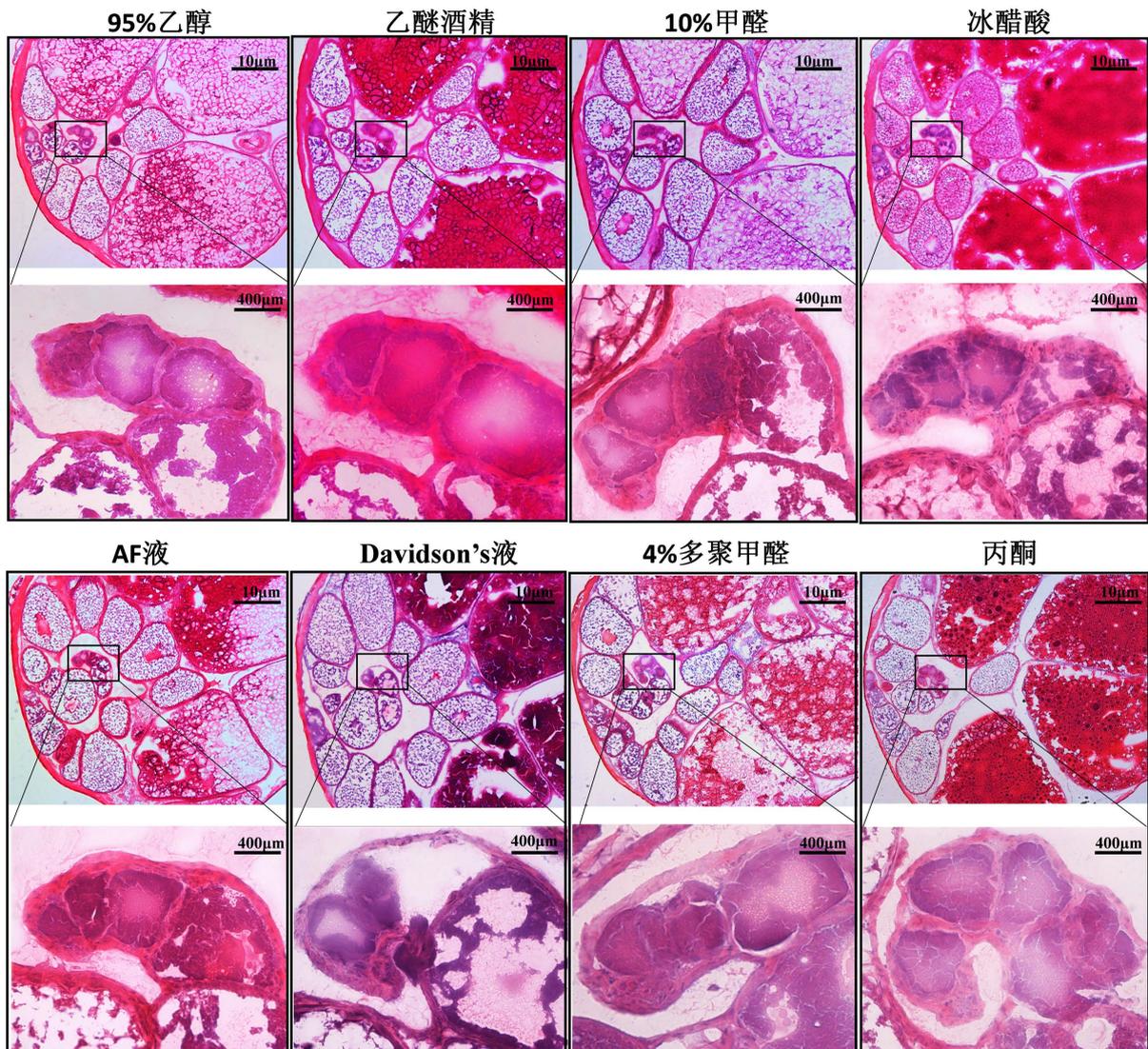


Figure 1. The HE staining in frozen sections of seahorse ovary with 8 fixatives

图 1. 8 种固定液固定的海马卵巢冰冻切片 HE 染色效果

4. 讨论

冰冻切片具有制备快捷、流程简单等优点, 但其制作要求高、难度大, 易受多重因素影响, 新鲜组织速冻切片后应及时固定以抑制或破坏组织细胞内的各种活性酶, 防止组织自溶和腐败, 从而维持组织细胞与正常的生活时的结构相似[7]。理想的固定液具有渗透性强、对细胞形态影响小、能较好并均匀地

固定球蛋白、白蛋白、核蛋白、核酸、糖、脂类等物质。冰冻切片固定液的选择通常与组织的类型密切相关,不同的组织结构差异较大,孙丽萍等[8]对人体卵巢组织的切片 HE 染色效果进行比较发现 AF 固定液的固定效果最好;刘天雪[9]等发现经 Davidson's 固定液固定的大鼠睾丸组织染色后的结构清晰度明显优于其它固定液;梁艳清[10]等对大鼠和小鼠的脊髓、神经、肝等器官进行冰冻切片的固定液评估时,发现 4%多聚甲醛的综合固定效果最佳;此外,乙醚酒精也在多个物种多个组织中被认定为最适合冰冻切片固定后用于 HE 染色的固定液[11] [12]。在我们对海马卵巢冰冻切片 HE 染色质量进行评估的过程中,我们发现冰醋酸固定的卵巢组织结构清晰,核质着色分明,核质对比度高,卵黄颗粒色彩鲜艳,而其它 7 种固定液的细胞核及核质对比度均劣于冰醋酸,这可能与卵巢的独特结构相关。

卵巢组织不同于普通的上皮组织、肌肉组织,其内含不种时期的卵母细胞、滤泡细胞、鞘细胞等,其中 I 时相卵母细胞细胞核致密,II、III 时相卵母细胞内开始出现皮质小泡、卵黄颗粒,而 IV、V 时相卵母细胞中充满了卵黄颗粒[4],因此,适用于海马卵巢冰冻切片的固定液在细胞核蛋白及脂类的固定上要求较高。乙醇虽可沉淀各类蛋白,但核蛋白沉淀后可溶于水,不仅使细胞核着色不佳,还会在组织表面形成一层蛋白膜,阻碍固定液和染色液的渗入,从而影响整个染色效果,因此 95%乙醇、乙醚酒精(乙醚:乙醇 = 1:1)、AF 液(95%乙醇:40%甲醛 = 9:1)、Davidson's 液(10%甲醛:95%乙醇:冰醋酸:水 = 2:3:1:3)对海马卵巢冰冻切片的核染色浅、边界模糊,核质比差;甲醛是通过“桥联”的形式使蛋白形成不溶性的聚合物,并不能沉淀细胞中的蛋白质,且渗透较慢,所以 10%甲醛和 4%多聚甲醛对 I 时相卵母细胞细胞核和卵黄颗粒着色欠佳;丙酮可沉淀蛋白、穿透力强,故对卵黄颗粒着色明显,但核固定欠佳,且细胞整体呈明显收缩状态;冰醋酸不仅具有穿透力强,可快速沉淀蛋白,还可沉淀染色质,故其细胞核边界清晰,色彩鲜艳,核质比高,且卵黄颗粒亦着色明显,是一种较为理想的海马卵巢冰冻切片固定液。

5. 结论

本实验通过比较海马卵巢冰冻切片经 8 种固定液固定后的 HE 染色效果,发现冰醋酸固定液的卵巢组织核质边界清晰、色彩鲜艳、对比度高,且卵黄颗粒亦着色明显,是一种较为理想的海马卵巢冰冻切片固定液。

基金项目

本研究受国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项“水产养殖生物性别和发育的分子基础与调控机制”项目(2018YFD0900200)和天津市科技计划项目技术创新引导专项基金(21YDTPJC00340)共同资助。

参考文献

- [1] 吕军仪,孙燕燕,王晓红,等. 海马的生物学特征与生态习性[J]. 水产科技, 2001(3): 32-33.
- [2] 韩松霖. 中国海马的分类、资源、利用与保护[D]: [硕士学位论文]. 桂林: 广西师范大学, 2013.
- [3] Hoffman, E.A., Mobley, K.B. and Jones, A.G. (2010) Male Pregnancy and the Evolution of Body Segmentation in Seahorses and Pipefishes. *Evolution*, **60**, 404-410. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01117.x>
- [4] Otsukahiroyasu, Y. and Akagawa, I. (2009) Occurrence, Gonad Morphology and Maturity of Japanese Seahorse Hippocampus Mohnikei in Matsushima Bay, Japan. *Journal of the College of Marine Science & Technology Tokai University*.
- [5] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 34-35.
- [6] Padykula, H.A. and Herman, E. (1955) The Specificity of the Histochemical Method for Adensine Triphosphatase. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **3**, 170-95. <https://doi.org/10.1177/3.3.170>
- [7] 管桂杰,李淑莲,代海平. 应用恒温冰冻切片机制作微小组织切片的体会[J]. 牡丹江医学院学报, 2011, 32(1): 70.

- [8] 孙丽萍. 五种不同固定液对冰冻切片染色质量的影响[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 95.
- [9] 刘天雪. 不同固定液和时间对大鼠睾丸组织病理学制片质量的影响[J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 83-86.
- [10] 梁艳清. 六种固定液对冰冻切片苏木精 - 伊红染色效果的比较[J]. 解剖学研究, 2012, 34(2): 159-160.
- [11] 董愉, 梁英杰, 吴惠群, 等. 不同固定液对不同组织冷冻切片 HE 染色效果的探讨[J]. 临床医学工程, 2011, 18(10): 1584-1585.
- [12] 张睿, 牛云超, 于晶, 等. 不同固定液对新鲜组织冰冻切片染色效果的影响[J]. 民营科技, 2017(9): 51.