

## 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

刘天雪, 付新录, 梁 十, 黄芝瑛\*

中山大学药学院药物安全性评价中心, 广东 广州 510006

**摘要:** **目的** 探讨不同固定液和固定时间对大鼠睾丸组织病理学制片质量的影响。**方法** 选用雄性 SD 大鼠 12 只, 取两侧睾丸组织, 共 24 例标本。每例标本分别用不同的固定液 (10%中性福尔马林溶液、30%Davidson 固定液及 FAA 固定液) 固定不同的时间 (24、48 h) 后, 进行脱水、包埋、切片、HE 染色。用 LEICA DM5000B 普通光学显微镜观察。**结果** 3 种固定液固定 24 h 后, 可见 30% Davidsons 固定液组睾丸组织的异常变化程度低于 10%中性福尔马林组和 FAA 组; 固定时间对睾丸组织有一定程度的影响: 固定 24 h 的异常变化程度低于固定 48 h。**结论** 30% Davidson 固定液组 SD 大鼠睾丸组织病理学变化程度最小; 固定时间不宜超过 24 h。

**关键词:** 固定液; 固定时间; 大鼠睾丸; 毒性病理; HE 染色

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)01-0083-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.015

## Effects of different fixatives and fixation time on testis histopathology of rats

LIU Tian-xue, FU Xin-lu, LIANG Shi, HUANG Zhi-ying

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of different fixatives and fixation time on testis histopathology of rats. **Methods** A total of 24 testis tissue samples were collected from 12 male rats. Every specimen was for dehydration, embedding, sectioning, and HE staining after fixing for 24 or 48 h in different fixatives (10% neutral buffered formalin, 30% Davidsons fixative, and FAA fixative), then the tissues were observed by LEICA DM5000B ordinary optical microscopy. **Results** The testis histopathology changes by 30% Davidsons fixative were less than those by 10% neutral buffered formalin and FAA fixative after fixed for 24 h; The fixation time had a certain effect on testis tissue: histopathology change of 24 h was less than that of 48 h. **Conclusion** Abnormal change of testis histopathology in rats in 30% Davidsons fixative was minimized; Fixation time should not be more than 24 h.

**Key words:** fixatives; fixation time; testis of rats; toxicological pathology; HE staining

动物组织的病理学检查是毒理学试验结果评价的一个重要组成部分, 随着石蜡切片、免疫组化等在病理检查中的普遍应用及 GLP 的实施, 对动物脏器组织切片的制作要求越来越严格, 不同的固定液和固定时间都会影响制片的质量<sup>[1]</sup>, 从而影响病理学工作者对试验结果的判断分析, 造成不必要的人为偏差。所以选择合适的固定液和固定时间可以保证动物组织结构的完整性, 便于充分地进行病理诊断。睾丸是药物毒性研究中的雄性性器官之一, 具有产生精子和分泌雄性激素等重要功能。睾丸由实质和间质构成<sup>[3]</sup>, 其中实质占大部分, 主要为卷曲的曲细精管, 曲细精管上皮又包含生精细胞和支持

细胞。由于常规的固定方法易造成曲细精管结构缺失, 不利于病理学诊断, 故有必要选择合适的固定液和固定时间对睾丸组织进行固定, 确保组织结构的完整性。为此, 作者采用 3 种不同类型的固定液及不同的固定时间对 SD 大鼠睾丸组织进行固定后制片, 并通过光学显微镜镜下观察, 以此综合确定合适的固定液和固定时间。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

德国 TP1020 全自动组织脱水机, 德国 EG1160 石蜡包埋机, 德国 RM2155 电动轮转切片机, LEICA DM5000B 普通光学显微镜, 甲醛 (批号 20120501,

收稿日期: 2015-05-12

作者简介: 刘天雪, 男, 中山大学药学院。Tel: 15521294711 E-mail: 1013713864@qq.com

\*通信作者 黄芝瑛, 男, 研究员, 中山大学药学院。E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn

天津永大化学试剂有限公司), 95%乙醇(批号 20130810, 天津大茂化学试剂厂), 冰乙酸(批号 20101008, 天津百世化工有限公司), 磷酸二氢钠(批号 20130418, 天津市大茂化学试剂厂), 磷酸氢二钠(批号 20130418, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 标本预处理

雄性 SD 大鼠 12 只, 每只动物取睾丸组织, 共 24 例标本。每例标本经不同固定液和固定时间处理后取材。

1.3 固定方法

10%的福尔马林固定液、FAA 固定液、30% Davidson 固定液分别固定 24 h 和 48 h 后更换到 10% 中性福尔马林溶液中。

1.4 病理制片

常规脱水、浸蜡、包埋、切片(厚度 3 μm)和 HE 染色后, 光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 不同固定液对睾丸组织病理学变化的影响

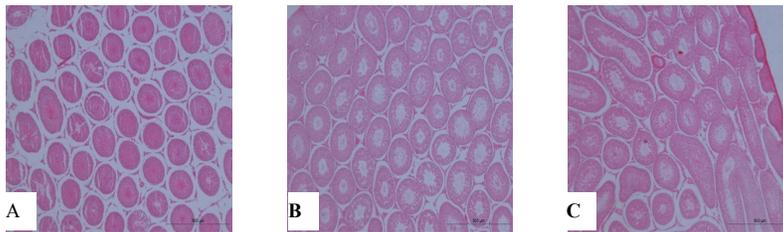
镜下结果显示: ①固定 24 h 后 10%福尔马林组睾丸间质可见较大空隙, 精子生发层排列整齐, 细胞分级较明显, 部分生精小管可见裂隙(图 1-A, 图 2-a); 30% Davidson 固定液组睾丸间质可见少量空隙, 精子生发层分级清晰(图 1-B, 图 2-b); FAA 固定液组生精小管内精子生发层局部断裂, 精子生发层细胞分级尚清晰, 被膜下生精小管萎缩, 嗜酸性增强(图 1-C, 图 2-c)。

2.2 不同固定时间对睾丸组织病理学变化的影响

镜下结果显示: ①在 10%福尔马林中固定 24 h 组睾丸间质可见较大空隙, 精子生发层排列整齐, 分级较明显, 部分生精小管可见裂隙(图 3-A, 图 4-a); 固定 48 h 组睾丸间质可见明显间隙, 生精小管收缩明显, 精子生发层各级细胞较明显(图 3-B, 图 4-b); ②在 30% Davidson 固定液中固定 24 h 组睾丸间质可见少量空隙, 精子生发层分级清晰(图 3-C, 图 4-c); 固定 48 h 组睾丸间质可见少量间隙, 生精小管收缩不明显, 精子生发层各级细胞清晰可见(图 3-D, 图 4-d); ③在 FAA 固定液中固定 24 h 组睾丸生精小管内精子生发层局部断裂, 各级细胞分级不明显, 被膜下生精小管萎缩, 嗜酸性增强(图 3-E, 图 4-e); 固定 48 h 组睾丸间质可见少量间隙, 部分生精小管内精子生发层断裂, 被膜下生精小管萎缩, 嗜酸性增强(图 3-F, 图 4-f)。

3 讨论

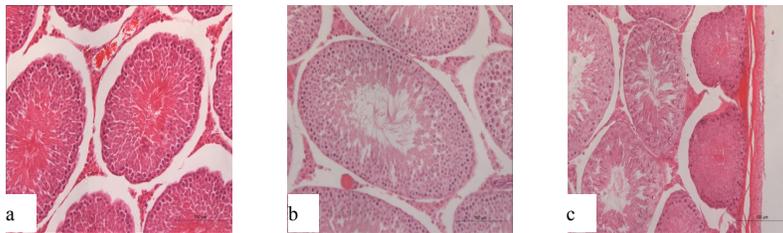
组织固定的目的<sup>[4]</sup>在于保持组织细胞的形态结构、杀灭组织内的细菌、增强组织的硬度, 同时可提高折光率以便光学显微镜下的观察。目前常用的固定方法包括: ①物理学方法, 如低温冷冻, 干冰冰冻真空脱水, 石蜡渗入法; ②化学方法, 采用各种化学溶液作固定液, 使组织细胞进入固定状态。这是国内最常用的方法, 也是组织病理学检查中石蜡切片制作最常用的固定方法。



A-10%福尔马林固定液; B-30% Davidsons 固定液; C-FAA 固定液

图 1 3 种不同的固定液固定 24 h 后 SD 大鼠睾丸组织病理学变化 (HE 5.0 × 10)

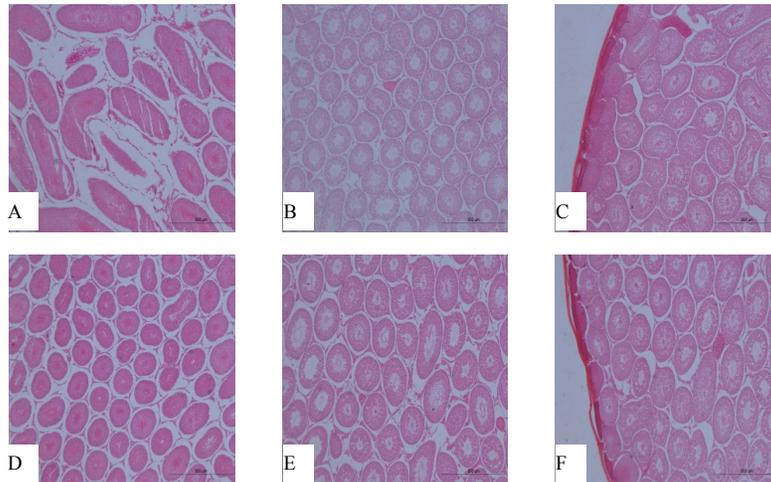
Fig. 1 Histopathological changes of testis after fixed for 24 h by three kinds of fixatives in SD rats (HE 5.0 × 10)



a-10%福尔马林固定液; b-30% Davidsons 固定液; c-FAA 固定液

图 2 3 种不同的固定液固定 24 h 后 SD 大鼠睾丸组织病理学变化 (HE 20.0 × 10)

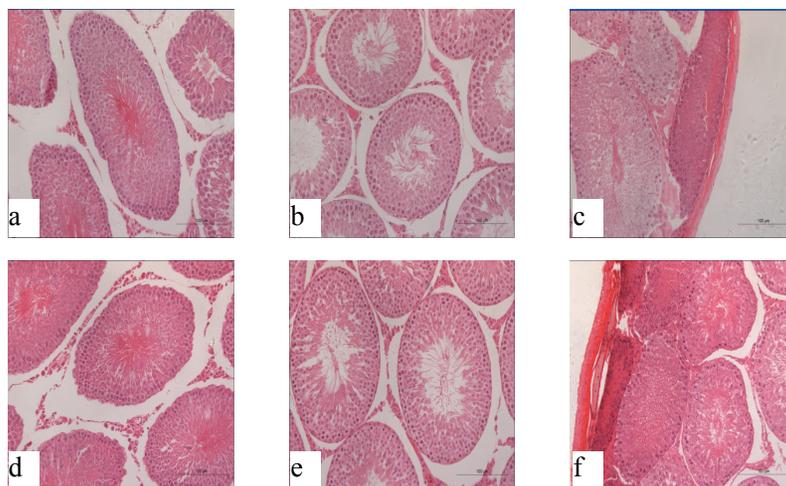
Fig. 2 Histopathological changes of testis after fixed for 24 h by three kinds of fixatives in SD rats (HE 20.0 × 10)



A- 10%福尔马林固定液固定 24 h; B- 30% Davidson 固定液固定 24 h; C- FAA 固定液固定 24 h; D- 10%福尔马林固定液固定 48 h; E- 30% Davidson 固定液固定 48 h; F- FAA 固定液固定 48 h  
补

图3 同种固定液分别固定 24 h、48 h 后 SD 大鼠睾丸组织病理学变化 (HE 5.0 × 10)

Fig. 3 Histopathological changes of testis after fixed 24 and 48 h by same fixatives in SD rats (HE 5.0 × 10)



a- 10%福尔马林固定液固定 24 h; b- 30% Davidson 固定液固定 24 h; c- FAA 固定液固定 24 h; d- 10%福尔马林固定液固定 48 h; e- 30% Davidson 固定液固定 48 h; f- FAA 固定液固定 48 h

图4 同种固定液分别固定 24 h、48 h 后 SD 大鼠睾丸组织病理学变化 (HE 20.0 × 10)

Fig. 4 Histopathological changes of testis after fixed for 24 h and 48 h by fixatives in SD rats (HE 20.0 × 10)

固定过程中组织结构的保存效果受多种因素的影响,如固定液种类、温度、固定时间以及固定后处理方法等。因此选择最合适的固定条件有助于最大程度的保证组织的完整性。

固定液的种类直接影响组织保存和固定的效果<sup>[5]</sup>,10%中性福尔马林固定液由甲醛、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠及蒸馏水按一定比例组成,其主要利用甲醛使蛋白质分子发生交联聚合而产生固定作用,也是目前化学试剂固定组织中应用最多的方法之一;30% Davidson 固定液则由 10%中性福尔马林溶液、冰醋酸、95%乙醇及蒸馏水依据比例配制而

成,2002 年 Latendresse 等<sup>[6]</sup>进行了改良 Davidsons 固定液与 Bouins 液对大鼠睾丸固定的对比研究,结果显示改良 Davidsons 固定液引起的曲细精管萎缩不明显,形态也更清晰,FAA 固定液又称标准固定液,由甲醛、冰醋酸、70%乙醇按比例配成,有文献报道<sup>[7]</sup>,FAA 固定液固定睾丸后对形态学观察效果比较好。本研究通过上述 3 种固定液对 SD 大鼠睾丸组织病理学变化的影响发现:30% Davidsons 固定 24 h 后睾丸间质出现少量空隙、精子生发层分级清晰,10%中性福尔马林和 FAA 组睾丸间质空隙较大,精子生发层较为完整,生精小管出现不同程

度的裂隙或萎缩,此结果与 Latendresse 的研究结果类似,说明 Davidsons 固定液对于睾丸固定具有更好地优势(图 1、2)。

固定时间的长短对病理组织的完整性也有很大的影响<sup>[8]</sup>。固定时间不足固定液无法完全渗入组织内部、标本固定不均匀,固定时间过长则会使组织扭曲变脆,影响后续取材制片。本研究通过在同一种固定液中对 SD 大鼠睾丸分别固定 24、48 h 后观察发现:固定时间对 SD 大鼠睾丸组织具有一定程度的影响,同一种固定液固定 24 h 或 48 h 后均可见睾丸间质出现间隙,48 h 组还可见生精小管出现裂隙或收缩,精子生发层部分断裂(图 3、4)。

综上所述,本试验条件下,SD 大鼠睾丸组织分别在 3 种固定液中固定 24 h 和 48 h 后:① 30% Davidsons 固定液固定 24 h 可更好地保持睾丸组织的形态结构,变化程度较小;②固定时间对睾丸组织的病理学变化具有一定程度的影响,固定 24 h 比 48 h 更能保持睾丸组织结构的完整性。

#### 参考文献

- [1] 乔秀林. 不同固定液和固定时间对大肠癌淋巴结免疫组化染色的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(5): 504-505.
- [2] 王庆利. 药物生殖研究的考虑要点, 中国科学技术协会第十届年会 [C]. 2008.
- [3] 刘桂明, 刘向云, 徐滢雯, 等. 睾丸组织固定法优选研究 [J]. 生殖与避孕杂志, 2009, 29(3): 198-199.
- [4] 李宝林. 组织固定的作用和体会[J]. 青岛医学院学报, 1985, 3(39): 100-102.
- [5] 张丽荣, 朱筱娟, 杨绍娟, 等. FineFix 固定液与福尔马林固定液对组织保存及固定的比较 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(5): 573-575.
- [6] Latendresse J R. Fixation of testes and eyes using a modified davidson's fluid: comparison with bouins fluid and conventional davidsons fluid [J]. *Toxicol Pathol.*, 2002, 30(4): 524-533.
- [7] 李 铮, 黄华梅, 卢用湄. 三种固定液对 Feulgen 反应显示 DNA 的比较 [D]. 广东解剖学通报, 1995, 17(2): 131-132.
- [8] Moran M M, Siegel R J, Said J W, *et al.* Demonstration of myoglobin and CK-M in myocardium. Comparison of five fixation methods and three immunohistochemical techniques [J]. *Histochem Cytochem*, 1985, 33(11): 1110-1115.