

## 实验动物冰冻组织切片制备关键要点的探讨

张 頔, 霍桂桃\*, 屈 哲, 吕建军, 杨艳伟, 李 琛, 陈旭林, 高苏涛, 林 志\*

中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全性评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

**摘要:** 目的 探讨实验动物组织冰冻切片制备的关键要点和注意事项, 以提高切片质量。方法 采用美国赛默飞世尔恒温式冷冻切片机, 对30例SD大鼠和30例食蟹猴的皮肤、肌肉、乳腺、卵巢、子宫、胃、大肠、甲状腺、肝脏、肾脏、脾脏、淋巴结、脑、脂肪等新鲜组织进行常规冰冻切片取材、包埋、切片、染色后封片。结果 镜下检查组织切面平整, 细胞形态完整、清晰, 染色良好。结论 不同组织需要区别对待, 制作优良的冰冻切片就需要对取材、组织速冻、温度选择、组织包埋、切片、固定等多个环节进行严格谨慎地操作。

**关键词:** 病理技术; 冰冻切片; 制片方法; 实验动物

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 07-1359-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.07.018

## Discussion on key points of freezing sectioning technology of experimental animals

ZHANG Di, HUO Guitao, QU Zhe, LV Jianjun, YANG Yanwei, LI Chen, CHEN Xulin, GAO Suta, LIN Zhi

National Center for Safety Evaluation of drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

**Abstract: Objective** To improve the quality of slices, we explore the key points and consideration of freezing sectioning of experiment animals. **Methods** A total 30 SD rats and 30 cynomolgus monkey specimens of skin, muscle, mammary gland, ovary, uterus, stomach, intestine, thyroid, liver, kidney, spleen, lymph node, brain and fat, etc. were trimmed, embedded, sectioned and staining for routine freezing sections by Thermo low temperature cryostat microtome. **Results** Under microscope, the sections were smooth, and the cell morphology was complete, clear and well stained. **Conclusion** The different tissues need to be treated differently. To make fine frozen sections, it is necessary to operate strictly and carefully, including tissues preparation, quick freezing, selection of temperature, embedding, slicing and fixing.

**Key words:** pathologic technology; frozen sections; specimen preparation; experimental animal

冰冻切片是指在低温条件下促使组织迅速地冷冻至一定的硬度而能够进行组织切片的一种方法<sup>[1]</sup>。随着新药研发以及单抗类药物组织交叉反应在我国药物临床前安全性评价中的广泛应用,越来越多的毒性病理学家需要对组织进行冰冻切片并染色分析,因此这就要求病理实验技术人员能够掌握冰冻切片技术,制作良好的冰冻切片,因为切片质量的好坏直接决定了病理结果的判定,为最终实验数据的科学性和准确性提供支持。然而,由于各种组织中所含水分的不同、质地软硬的差异以及组

织中形态结构和成分的多样性等因素,都会影响冰冻切片的质量,因此笔者根据工作中积累的经验分别对取材、组织温度选择、组织包埋以及冰冻组织切片和切片的固定等进行探讨。

### 1 材料和方法

采用美国赛默飞世尔恒温式冷冻切片机,实验组织材料为药物安全评价研究实验动物SD大鼠和食蟹猴的新鲜组织标本各30例,其中包括皮肤、肌肉、乳腺、卵巢、子宫、胃、大肠、甲状腺、肝脏、肾脏、脾脏、淋巴结、脑、脂肪等组织,所有组织均新鲜切

收稿日期: 2019-01-21

基金项目: 国家科技重大专项(2015ZX09501007-004); 重大新药创制(2015ZX09501004-002)

第一作者: 张 頔, 女, 学士, 主管技师, 研究方向为毒性病理学技术。Tel: (010) 67872233 E-mail: skystar.night@163.com

\*通信作者: 林 志, 博士, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: linzhi@nifdc.org.cn

霍桂桃, 女, 博士, 副研究员。研究方向为毒性病理学技术。Tel: (010) 67872233 E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

除,未加任何处理。

新鲜组织直接液氮速冻,之后采用不同的温度(详见讨论部分表1)进行切片,2遍冷丙酮固定,苏木素染色,盐酸酒精分化,伊红染色,脱水透明,中性树胶封片。

## 2 结果

所有冰冻切片无过度收缩和肿胀,无过多冰晶形成,无脱片现象。组织切面完整,厚薄均匀,镜下组织结构完整,细胞形态清晰,细胞核与细胞浆染色良好。

## 3 讨论

病理学技术是病理诊断的重要基石,制片质量的好坏直接影响了毒性病理学家做出正确的诊断。尽管人医病理学中关于冰冻组织切片的制作的文献资料非常丰富,但是人医中更多地是在手术标本冰冻切片的制备,偏重于术中的快速诊断,需要控制制备时间不能过长。然而,药物毒性研究中需要处理的是动物组织,在时间上无特殊要求,但是对于制片的质量要求更高,因为切片后续需要进行多种不同的分析,包括组织化学染色、荧光染色、原位杂交等。因此,制备高质量的冰冻切片是药物毒性研究中病理技术人员的挑战。实验动物组织的冰冻切片制备方法的有关资料相对较少,且影响冰冻切片质量的因素众多,笔者通过多年的实践,摸索出提高动物组织冰冻切片质量的可行方法。

### 3.1 取材的注意事项

首先,新鲜组织应避免遇水,切忌用生理盐水浸泡或用湿纱布包裹。因为水分较多时会导致冰冻切片产生空洞和冰晶,影响切片的质量<sup>[2]</sup>。因此,取材时所用的器械等需要擦拭干净,如果本身组织所含水分很多的时候,可以选择使用滤纸将水吸干。比如,水分含量较多的脑组织取材时可以用干纱布在组织的表面轻轻地按压<sup>[3]</sup>。其次,取材时需要避免取到脂肪组织等,如淋巴结等需要将周围的脂肪组织剔除干净。最后,对于组织的取材厚度也是需要注意的,通常组织的厚度不超过3 mm<sup>[1,4]</sup>。

### 3.2 组织的速冻与温度选择

速冻是冷冻切片的关键,因为只有速冻才能减少组织内的冰晶。最好的办法是将组织放入液氮内冷冻<sup>[2]</sup>,但要注意避免过冻,隔2~3 s就要拿出来看一下,只要有4/5的组织已经冻住即可,否则就会过冻,以致引起组织发脆或冷冻头与组织分离。此外,也可在切片机内速冻。切片机的急冻装置可以在几分钟内将工作室中的组织冷冻台温度下降至-50~-60℃度<sup>[1]</sup>。当冷冻组织取好后,先将速冻开

关打开,再在冷冻头上放适量的包埋剂,最后放上组织,进行速冻。

冷冻温度及时间也要有所控制,冷冻温度-19~-20℃为宜,冷冻时间应严格控制不能过长,要随时观察,以刚刚冻上即止为宜。为避免冻过,可在即将全部冻上时即移出冷冻台,在切片时先将表面未冻上的组织切下弃掉,选取刚刚冻好的组织为宜。如不小心冷冻过了,补救方法是将组织移出冷冻台回暖或用手热敷,这对冷冻过度的组织有明显改善<sup>[5]</sup>。各种组织中甲状腺是最容易冻过,造成切片干脆而无法成片,所以在选择温度和时间控制上尤为重要。

速冻冰冻切片中最为关键的部分就是切片的冷冻的温度。温度过低会导致组织过硬,切片时组织碎裂。如果组织已经变脆,可等几分钟后在切片,或者用手触摸组织以帮助组织复温。反之,如果温度过高时,会造成组织硬度不够,切片时不容易成片,产生搓板状、梯田状厚薄不均、破碎或粉末状现象<sup>[6]</sup>。不同组织器官需要不同的温度,根据本课题组工作实践和经验对动物不同组织所需温度见表1。

表1 动物不同组织器官合适的冰冻切片温度

Table 1 Suitable frozen section temperatures for different tissues and organs of animals

合适的温度	组织器官
-20~-25℃	乳腺、卵巢、子宫
-18~-20℃	胃、肠道
-15℃左右	甲状腺、肝、肾、脾脏
-18~-20℃	淋巴结、脑
-23~-25℃	皮肤、纤维、肌肉组织
-35℃以下	脂肪组织
-12~-17℃	已固定的组织

### 3.3 组织的包埋

合成胶水和OCT都具有黏稠性,因此它们可以直接填塞于冰冻头上的螺旋缝内,以及组织与冰冻头之间的缝隙内,从而使得组织牢固地固定在冰冻头上。实验室最常用的是OCT包埋剂。包埋组织时可在组织的周边多挤一些OCT,使得展片或出刀时减少组织褶皱的形成,也不会切片过程中直接对组织造成挤压。此外,OCT中的小气泡应尽量去除。

如果是微小组织的包埋,可先滴加少量的包埋剂在冷冻头上,等凝结后修平,再将微小组织放在包埋剂上,补加少量包埋剂。也可以包埋时将多个小组织平整地排放在同一平面上,表面滴加适量的包埋剂。囊壁类组织需要立着包埋时,可将几条囊

壁紧靠一起卷成U字形,这样使得囊壁组织保持侧立,切片时组织平面完整。

### 3.4 切片以及冰冻切片的固定

进行冰冻切片前,需要做好准备工作,比如刀片锋利,提前放置于刀架上,并调节合适的角度。切片时用力要均匀,速度一致。最重要的是调节好抗卷板与切片刀锋之间的距离,以避免组织污染以及切片褶皱。最好提前将抗卷板调节到合适的位置,固定好后就不再扭动。此外,再切片时需要随时清洁防卷板。贴片的动作要轻巧、快,用力均匀,使得切好的组织能迅速在干净的载玻片上贴附。切片厚度一般为5  $\mu\text{m}$ ,脂肪组织可稍厚一些8~10  $\mu\text{m}$ 。

囊壁组织较薄,所以容易卷曲、折叠,取材时先将囊壁样组织切成3 mm×10~15 mm的长条后,卷曲成U型<sup>[3,5]</sup>。在组织托上放置适量的OCT包埋剂,将卷曲好的囊壁组织放入包埋剂中,轻压使组织保持侧立状态,全程注意避免产生气泡。

淋巴结中细胞较丰富,纤维结缔组织较少,因此冰冻时温度不能过低,否则切片容易碎裂,切片不成形<sup>[6]</sup>。淋巴结的切片温度一般在-18~-20℃。如果冰冻过度导致组织变脆,处理办法与甲状腺组织一样,即促使组织升温。

脑组织质软,水份较多,容易形成冰晶,所以是进行冰冻切片最难的组织。因此,首先选用不含水分的OCT包埋剂。其次,温度控制是关键,通常在-18~-20℃,冷冻时间要短,不超过2 min<sup>[3]</sup>。液氮骤冷法速冻脑组织效果最好,但是操作时需要注意,以避免脑组织冰冻不均匀造成破裂。常用的方法是在脑组织周围裹上适量的OTC胶,然后直接在样品上浇液氮,或者将样品连带样品托一起放入液氮中。此外,脑组织在切片中要注意先慢后快。先慢切脑组织以减少刀片的切力,组织片不容易卷曲。后快切脑组织使得切出的脑组织片迅速离开刀片而与载玻片贴合紧密。

含脂肪较多的组织通常质地较软,因此冷冻温度必需低,时间也要长,一般温度为35℃以下,时间8~10 min,等组织冷冻稍硬之后才能切片,并可适宜增加切片厚度6~8  $\mu\text{m}$ ,切片时进刀要快,染色时不宜加热,否则宜造成切片粘连、脱片等<sup>[3,7]</sup>。

皮肤表皮较硬,皮下结缔组织及脂肪组织较软,故皮肤组织不同成分使得整体的质地软硬不一。通常将温度控制在-23~-25℃。时间上需要考虑皮下脂肪组织,必须等整体冷冻到达一定硬度后才能切片。皮肤包埋时为侧立状态,这样才能组

织全层(表皮、真皮和皮下组织)切面完整。

### 3.5 冰冻切片的固定

常用的固定剂为75%丙酮/25%无水乙醇混合液和冷丙酮。值得注意的是,丙酮和无水乙醇混合液会不适用于人CD4或CD8抗原的染色。两种不同的固定剂固定方法略有不同。通常情况下,75%丙酮/25%无水乙醇混合液室温孵育5 min,然后放入PBS缓冲液中。如果使用丙酮固定,在固定前室温先风干冷冻切片0.5~4 h。风干后的切片再放入4℃丙酮内孵育10 min,然后风干,最后放入PBS缓冲液中。此外,对于胰腺组织常用的方法还有2遍冷丙酮固定,即4℃丙酮内孵育10 min后,风干15 min(也可以用流动风如扇子、电风扇等加速风干)。再重复采用4℃丙酮内孵育10 min后,染色前风干20 min。通常2遍冷丙酮固定的组织细胞形态良好,切片贴片好。

## 4 小结

近年来,随之药物安全评价技术的发展,越来越多的研究项目需要制作冰冻切片,进行免疫组织化学染色或荧光染色等,因此制备优良的冰冻切片是病理技术人员的挑战。冰冻切片因为缺乏脱水的处理过程,所以细胞形态结构会与正常有差异。因此,从取材、组织速冻以及温度选择、组织包埋、切片、冰冻切片的固定等均需要严格控制操作步骤以及注意事项。不同组织器官具有不同的形态特点,制备冰冻切片时存在差异。总之,制作一张完整、质优的快速冰冻切片需要高度的责任心,要掌握关键性技术操作要领,制备出质优的切片,才能为明确病理诊断提供较为便利的客观条件,更好地为临床前药物安全性评价工作服务。

## 参考文献

- [1] 吴艳霞. 冰冻切片的制作方法分析 [J]. 吉林医学, 2009, 30(6): 493-494.
- [2] 包翠芬, 刘霞, 穆长征, 等. 比较三种防冰晶法对切片保存效果的影响 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(1): 122-123.
- [3] 杨秀静, 滕孝静. 冰冻切片技术经验探讨 [J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(23): 2002-2004.
- [4] 寇雪梅, 赵玉莹, 朱卫国, 等. Leica CM1900低温恒冷冰冻切片机的试用体会 [J]. 黑龙江医学, 2014, 38(7): 804-805.
- [5] 许平, 王筱臻, 陈奎生, 等. 快速冰冻切片制备方法的改进 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(2): 241-242.
- [6] 汪育苗. 术中快速冰冻切片的制作方法 & 体会 [J]. 北京口腔医学, 2011, 19(1): 52-53.
- [7] 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): 1019-1031.