

冰冻切片的H&E和LFB染色技术的优化及其在自身免疫疾病中的应用

覃朝燕¹ 王婷婷¹ 石昌杰¹ 杜昌升^{1,2*}

(¹上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092;

²新药研究国家重点实验室, 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要 该文旨在探讨基于冰冻切片样品进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色和快蓝(luxol fast blue, LFB)染色方法的优化及其在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)组织病理分析中的应用。取正常及EAE建模后的C57BL/6小鼠脊髓样品各5份, 每份脊髓样品一分为二, 分别制成冰冻切片和石蜡切片样品, 通过设置不同优化条件对这两组切片进行H&E和LFB染色, 比较两组切片染色的结果。石蜡切片经过H&E染色和LFB染色后细胞的形态结构和组织结构清晰, 冰冻切片H&E染色和LFB染色后细胞结构清晰度几乎和石蜡切片一致, 进一步将该方法应用于分析 β -arrestin2基因敲除对于小鼠EAE发生中的病理变化, 发现能够很好地重复出基因敲除加重EAE疾病这一现象。冰冻切片染色优化后, 基于冰冻切片进行H&E染色和LFB染色可以达到石蜡切片类似的效果, 并且实验过程简洁快速, 大大缩短了实验时间, 提高了效率, 可以较好地应用于分析自身免疫疾病病理变化, 该优化方法将在自身免疫疾病特别是多发性硬化动物模型的研究中有广泛的应用。

关键词 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 冰冻切片; 石蜡切片; 苏木素-伊红染色; 快蓝染色

The Optimization of H&E and LFB Staining Technique of Frozen Sections and Its Application in Autoimmune Diseases

Qin Chaoyan¹, Wang Tingting¹, Shi Changjie¹, Du Changsheng^{1,2*}

(¹Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract This study was designed to investigate the optimization of hematoxylin-eosin (H&E) staining and luxol fast blue (LFB) staining in the frozen sections and application of histopathological analysis in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Five spinal cord samples were prepared from normal C57BL/6 mice and EAE mice, and each of the sample was divided into two halves for frozen embedding and paraffin embedding relatively. In the optimized conditions, results of the H&E staining and LFB staining between frozen sections and paraffin sections were compared. In paraffin sections, a fine morphology and structure of the cells were observed in H&E

收稿日期: 2015-04-23 接受日期: 2015-07-06

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2014CB541903、2012CB910404)、自然科学基金委面上项目(批准号: 31171348、31371414)、上海市教委科研创新项目(批准号: 14zz042)、新药研究国家重点实验室开放基金(批准号: SIMM1302KF-09)和中央高校基本科研业务费专项资金资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-659861041, E-mail: duchangsheng@gmail.com

Received: April 23, 2015 Accepted: July 6, 2015

This work was supported by the National Key Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Grant No.2014CB541903, 2012CB910404), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31171348, 31371414), the Shanghai Municipal Education Commission (Grant No.14zz042), the State Key Laboratory of Drug Research (Grant No.SIMM1302KF-09) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities

*Corresponding author. Tel: +86-21-659861041, E-mail: duchangsheng@gmail.com

网络出版时间: 2015-08-19 16:47:56 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150819.1647.003.html>

and LFB staining. In frozen sections, the clarity of the cells structure which was stained by H&E and LFB was almost identical with paraffin sections. The methods of H&E and LFB staining based on frozen sections were further applied to analyze the pathological changes in EAE model, and found it could repeat the known phenomena that β -arrestin2 knockout reduced EAE pathogenesis. After optimizing, staining methods based on frozen sections can achieve a similar fine performance to paraffin sections. In addition, the procedure of frozen sections production was simple and fast. Furthermore, the staining was more time-saving efficient than paraffin sections. The optimizing methods were also could be preferably applied to analyze pathological changes of autoimmune disease, which would have a wide range of applications in the study of autoimmune diseases, especially in an animal model of multiple sclerosis.

Keywords experimental autoimmune encephalomyelitis; frozen sections; paraffin sections; hematoxylin-eosin; luxol fast blue

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是一种中枢神经系统(central nervous system, CNS)炎性脱髓鞘自身免疫疾病^[1]。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)与多发性硬化症有相似的临床症状和病理特征,是被广泛应用于人类疾病研究的动物模型,在MS及EAE发生过程中,抗原致敏的T细胞穿过血脑屏障进入中枢,诱发对自身髓鞘抗原的免疫原性,造成CNS病灶部位出现脱髓鞘现象^[2-3]。因此,CNS部位的免疫细胞浸润及脱髓鞘的发生是判断MS以及EAE严重程度的两大经典病理指标,广泛应用于EAE疾病分析。

目前,绝大多数研究仍然沿用取EAE小鼠脊髓只做石蜡切片进行苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色和快蓝(luxol fast blue, LFB)染色,分别来评价EAE小鼠CNS部位的免疫细胞浸润及脱髓鞘的程度。在EAE的研究中,除了用到H&E和LFB染色来观察中枢浸润细胞外,往往还会用到冰冻切片法进行免疫荧光染色来确定中枢浸润细胞的类群。由此,一个实验需要制备多种组织切片,而且石蜡切片在制片、染色过程中步骤多、时间长,会破坏抗原的免疫原性,较难进行免疫荧光染色^[4-5]。相应地,冰冻切片则是直接在骤冷条件下将组织包埋,完整地保存了抗原的免疫原性,在免疫荧光染色中占有优势。冰冻切片如果在H&E染色和LFB染色中能准确判断组织病理症状,替代石蜡切片,则可大大缩短实验时间、提高效率 and 节省实验成本。

本文利用髓鞘少突胶质糖蛋白MOG₃₅₋₅₅免疫C57BL/6小鼠建立EAE模型,再取脊髓样品制备冰冻切片和石蜡切片,之后分别进行H&E染色和LFB染色通过对比分析,发现冰冻切片染色后细胞结构和形态均接近石蜡切片的结果,可以较好地评价

EAE小鼠脊髓组织病理切片中的免疫细胞浸润和脱髓鞘情况。

1 材料与方法

1.1 材料

8周龄C57BL/6雄性小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司;MOG₃₅₋₅₅由吉尔生化有限公司合成;弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)购自Sigma公司;百日咳毒素(pertussis toxin, PTX)购自Calbiochem公司;结核菌素(mycobacterium tuberculosis, MT)购自BD公司;冰冻包埋液NEG 50™购于Thermo公司;苏木素溶液和伊红B液购自上海虹桥乐翔医用试剂有限公司;结晶紫购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 EAE模型建立

取8周龄小鼠进行EAE诱导^[6]。CFA中添加MT至终浓度为5 g/L,之后与浓度为2 g/L的MOG₃₅₋₅₅溶液等体积混合后于振荡器上充分振荡成为MOG₃₅₋₅₅乳剂。每只小鼠脊柱背部两侧皮下各注射0.1 mL MOG₃₅₋₅₅乳剂,然后每只小鼠腹腔注射100 ng PTX,48 h后每只小鼠腹腔加注100 ng PTX。小鼠经MOG₃₅₋₅₅免疫后,每日按照EAE症状评分标准对小鼠进行功能评分^[7],直至MOG₃₅₋₅₅免疫后第37 d。

1.3 动物取材及病理切片染色

1.3.1 动物取材 小鼠经EAE建模后第37 d,腹腔注射10%水合氯醛100 μ L麻醉,麻醉后立即暴露心脏,经左心室插管,快速灌注生理盐水4 min,并加灌不少于25 mL 4%多聚甲醛固定,完整取出脊髓,放入4%多聚甲醛中4 °C固定过夜。

1.3.2 石蜡切片制备 石蜡包埋^[8-9]:固定后的小鼠脊髓进行石蜡包埋,将包有脊髓和石蜡的铅块放至

冷冻台上冷冻(-10℃); 石蜡块4℃保存。石蜡切片机进行切片, 切片厚度5 μm, 贴于有明胶包被的载玻片上, 37℃烤片过夜, 之后收集于载玻片盒中, 4℃保存。然后按照常规方法将石蜡切片脱蜡复水。石蜡切片H&E染色参考文献[10]。用伊红B液处理切片30 s, 在常规石蜡H&E染色方法上对石蜡切片进行染色。石蜡切片LFB染色: 石蜡常规LFB染色之后, 伊红B液处理1 min, 0.1%结晶紫复染1 min, 最后按照传统方法对石蜡切片进行脱色封片。

1.3.3 冰冻切片制备 采用冰冻切片法^[11-13]制备切片。固定脱水好的小鼠脊髓用NEG 50™进行冰冻切片包埋, 液氮速冻, 于-80℃保存。冰冻切片机进行切片, 切片厚度为12 μm, 将切片贴在有明胶包被的载玻片上, 37℃烤片过夜, 以备染色用。冰冻切片H&E染色: 冰冻块切片后苏木素室温染色1 min; 自来水洗; 0.1%盐酸乙醇分色1~2 s; 温水(50℃)反蓝; 伊红B液染色5~6 s; 75%乙醇漂洗6 s; 95%乙醇漂洗1 min, 2次; 100%乙醇漂洗1 min, 2次; 二甲苯I处理1 min; 二甲苯II处理1 min, 中性树胶封片。冰冻切片LFB染色: 95%乙醇固定1 min; 0.1% LFB溶液60℃染色20 min; 95%乙醇漂洗; 自来水漂洗; 0.05%碳酸锂溶液染色1~2 s; 70%乙醇漂洗10 s, 2次; 自来水漂洗观察; 重复步骤: 0.05%碳酸锂溶液染色1~2 s, 70%乙醇漂洗10 s, 2次, 至白质蓝色、灰质无色并反差明显。70%乙醇漂洗1~2 s; 伊红B液染色1 min; 自来水漂洗; 0.1%结晶紫染色1 min; 自来水漂洗; 95%乙醇漂洗1 min, 2次; 100%乙醇漂洗1 min, 2次; 二甲苯I处理1 min; 二甲苯II处理1 min, 中性树胶封片。

1.4 数据统计

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 11.0统计软件进行分析, 运用Student's *t*-test检验确定两组数据差异, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 EAE小鼠评分

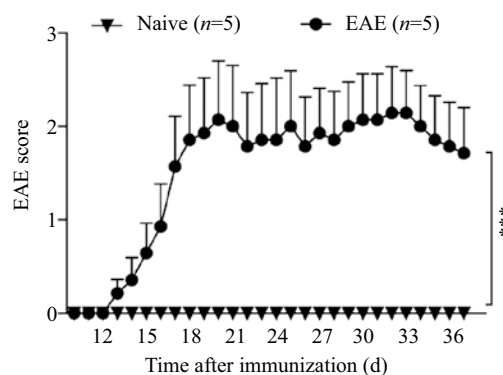
为了保证所建立的EAE模型的正确性, 我们监测了建模小鼠的疾病评分, 发现给予MOG₃₅₋₅₅诱导的小鼠第13 d开始出现疾病评分升高的症状, 随后症状得到明显加强, 直至疾病进入平台期, 在后期症状有所回落(图1), 整个疾病评分完全符合EAE发病规律, 说明小鼠建模成功, 其组织可以进一步用于后续实验。

2.2 EAE小鼠和Naive小鼠脊髓组织冰冻切片与石蜡切片H&E染色比较

C57BL/6雄性小鼠在MOG₃₅₋₅₅免疫37 d后, 将EAE小鼠和Naive小鼠脊髓完整取出, 每根脊髓一分为二, 对其进行石蜡切片和冰冻切片的制备, 取中腰段脊髓横切面进行H&E染色。冰冻切片中, Naive小鼠脊髓染色中未见空泡状改变, 几乎没有炎性细胞的浸润, 而在EAE小鼠的脊髓染色中发现脊髓白质有大量的炎性细胞浸润, 并且出现空泡状改变, 在脊髓内小血管周围有大量的炎性细胞环绕(图2A), 这一结果与石蜡切片染色相一致(图2B)。分别对冰冻切片组和石蜡切片组每只小鼠10个脊髓切片进行炎性细胞浸润数的统计, 发现石蜡切片组和冰冻切片组H&E染色结果与各自的Naive对照差异显著(图2C), 两种方法均可以准确地反映出EAE小鼠与Naive小鼠的病理差异。

2.3 EAE小鼠和Naive小鼠脊髓组织冰冻切片与石蜡切片LFB染色比较

EAE小鼠在MOG₃₅₋₅₅免疫第37 d后取脊髓, Naive小鼠脊髓作为对照, 每根一分为二对其进行石蜡切片和冰冻切片的制备, 中腰段脊髓横切面进行LFB染色, 冰冻切片中可观察到Naive小鼠中脊髓白质完整, 未见空泡状改变, 而EAE小鼠脊髓白质中出现了大小不等的片状脱髓鞘区域(图3A), 该现象与石蜡切片一致(图3B)。分别对每组5只小鼠, 每只小鼠10个脊髓切片进行脱髓鞘百分比的统计。EAE小鼠脊髓病理切片与Naive小鼠脊髓病理切片脱髓鞘区域和空泡状改变百分比之间应有显著性差异, 这个显著性差异在冰冻切片和石蜡切片上均可以统计得到



*** $P < 0.001$, 与正常小鼠组比较。

*** $P < 0.001$ vs relative Naive controls.

图1 MOG诱导EAE模型小鼠和正常对照小鼠的EAE评分
Fig.1 EAE score of MOG-induced EAE in C57BL/6 mice and Naive controls

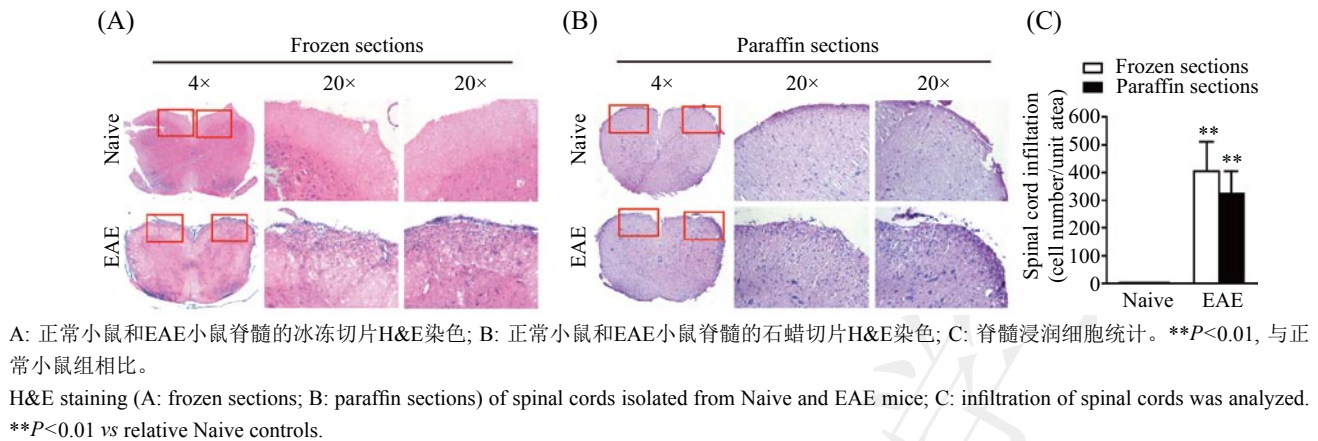


图2 正常小鼠和EAE小鼠脊髓的冰冻切片以及石蜡切片的H&E染色
Fig.2 The H&E staining of spinal cords isolated from Naive and EAE mice

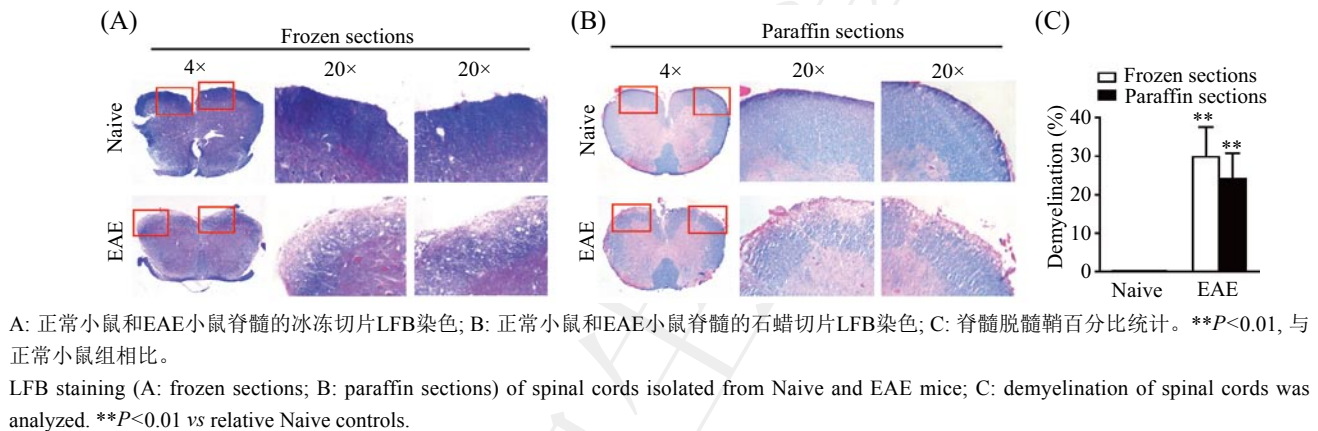


图3 正常小鼠和EAE小鼠脊髓的冰冻切片以及石蜡切片的LFB染色
Fig.3 The LFB staining of spinal cords isolated from Naive and EAE mice

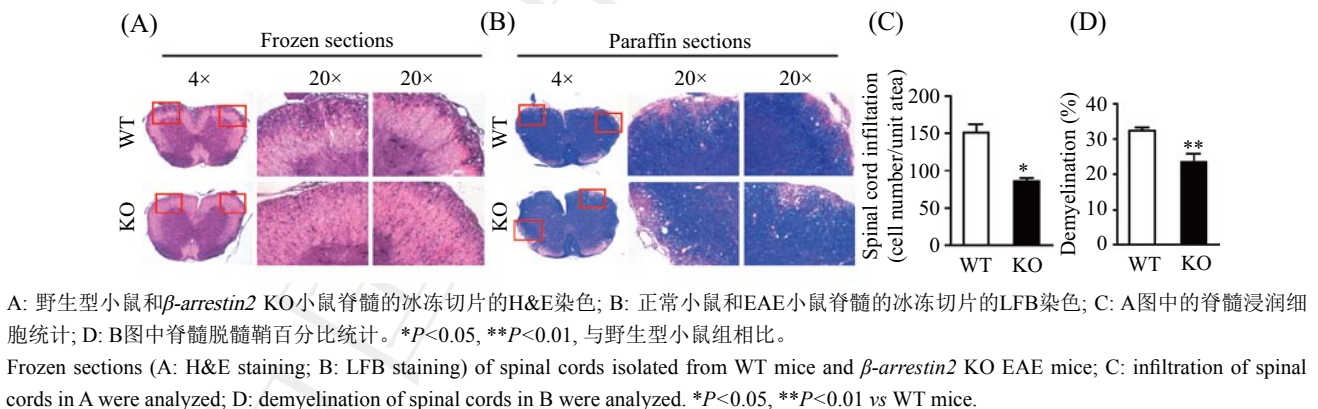


图4 EAE建模后的野生型小鼠和 β -arrestin2 KO小鼠脊髓冰冻切片的H&E染色和LFB染色
Fig.4 Frozen sections of spinal cords isolated from WT and β -arrestin2 KO EAE mice

(图3C), 两种切片方法都可以准确地诊断出EAE小鼠脱髓鞘区域较Naive小鼠多, 空泡状改变也较多。无论是石蜡切片还是冰冻切片的LFB染色结果均符合小鼠中枢炎性细胞的H&E染色结果以及小鼠的评分结果。

2.4 β -arrestin2基因敲除(KO)小鼠与WT小鼠脊髓冰冻切片H&E和LFB染色

在细胞水平上, β -arrestin2 KO小鼠抑制Foxp3⁺CD4⁺T细胞向Foxp3⁺CD4⁺调节性T细胞的转变, 从而使得Foxp3⁺CD4⁺调节性T细胞数量减

少, 进而加重EAE的发病^[14]。在冰冻切片染色上可以看出, β -arrestin2 KO小鼠中枢浸润细胞较WT小鼠多(图4A), 与WT小鼠相比, β -arrestin2 KO小鼠脱髓鞘区域增大(图4B), 与前人报道的 β -arrestin2 KO小鼠加重EAE疾病的结果相一致, 由此进一步证明了冰冻切片在EAE的组织病理鉴定中的可应用性。

3 讨论

石蜡切片不仅用于观察正常细胞组织的形态结构, 也是病理学和法医学等学科用以观察、研究及判断细胞组织的形态变化的主要方法, 目前也已相当广泛地用于其他许多学科领域的研究中。但石蜡切片法具有实验周期较长、接触二甲苯等有机溶剂较多等缺点, 导致抗原的隐蔽, 造成组织内抗原性的丧失, 从而不利于原位免疫荧光染色。虽然有报道称可以用高压加热抗原修复后再进行免疫荧光染色, 但是在免疫荧光染色时, 由于石蜡切片需要经过一系列的脱水、复水等操作, 导致抗原的隐蔽、丧失, 会出现较多的假阳性结果和非特异性染色^[15-16], 而冰冻切片则能够很好地进行免疫荧光的染色。

冰冻切片是利用低温把组织迅速冷冻到达一定的硬度, 利用恒温切片机进行切片的一种方法。冰冻切片最先应用于临床病理诊断, 随后日渐被大多数研究学者所接受。它是一种节省试剂、减少污染、省时快速的制片方法, 其不经过脱水和透明等步骤, 在操作的过程中减少了对组织固定、脱水、包埋等中间环节, 组织没有收缩, 维持原有形态, 尤其是在免疫组织荧光染色中, 能较好地保存组织抗原的免疫原性, 在科研实验中有着不可取代的地位, 因此在科研以及临床工作中的应用较为广泛。

在自身免疫疾病的研究中, 特别是多发性硬化的研究中, 分析脊髓病灶部位的免疫细胞浸润及脱髓鞘是判断严重程度的重要病理指标。与此同时, 通过免疫荧光的方法则可以轻松分析病灶部位不同的细胞类群变化情况, 如脊髓中GFAP⁺星形胶质细胞(astrocyte)、Iba1⁺的小神经胶质细胞(microglia), 都需要用到免疫荧光染色。而目前这两类分析分别是基于石蜡切片和冰冻切片来完成的, 而如上文所述, 石蜡切片无法得到较好的免疫荧光染色结果, 由此本文尝试使用冰冻切片来完成病理分析的H&E和LFB染色并取得了较好的效果。冰冻切片的LFB染色在分化效果上没有达到石蜡切片LFB染色效果的

原因可能有: 其一, 切片性质的差异可能会导致出现这样的结果, 冰冻切片比石蜡切片要厚, 而且冰冻切片的组织较石蜡切片组织少了固定、脱水、包埋等处理, 组织没有收缩, 可能使得冰冻切片较石蜡切片着色更容易和牢固, 这在H&E染色中冰冻切片伊红着色时间短, 但是却比石蜡切片着色深得到证明; 其二, 切片在0.05%碳酸锂溶液分化时间的长短会直接影响分化的效果, 在0.1% LFB液中孵育的时间长短和孵育温度高低则决定LFB染料的着色程度, 间接对LFB分化效果造成影响, 在碳酸锂溶液中的分化时间长短可以通过肉眼或者显微镜观察灰质和白质的颜色进而决定染色实验是否继续, 冰冻切片LFB染色在碳酸锂溶液中的分化时间是一次1~2 s, 然后两次70%乙醇漂洗10 s, 如此反复直到能够观察到白质蓝色、灰质无色并反差明显。在0.1% LFB液中孵育的时间过长和孵育温度过高都有可能使得切片在碳酸锂溶液中分化不完全, 后续我们会适当减短孵育时间或者用适当降低孵育温度与稍微延长孵育时间的组合来改善冰冻切片的LFB染色, 使得冰冻切片的LFB染色效果更加接近石蜡切片的LFB染色效果。冰冻切片染色不仅可以大大缩短实验时间, 提高效率, 节省实验成本, 而且制备一种冰冻切片即可完成所有实验, 对于每只小鼠只能做一种切片分析而言, 还可以提高小鼠组织的使用效率。通过对以前报道的现象的验证, 发现本方法可以很好地重现 β -arrestin2基因敲除小鼠加重EAE疾病的结果, 提示本方法在自身免疫疾病及动物模型的研究中有着广泛的应用价值。

参考文献 (References)

- 1 Birk K, Ford C, Smeltzer S, Ryan D, Miller R, Rudick RA. The clinical course of multiple sclerosis during pregnancy and the puerperium. Arch Neurol 1990; 47(7): 738-42.
- 2 Harkiolaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, et al. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. Immunity 2009; 30(3): 348-57.
- 3 Krishnamoorthy G, Saxena A, Mars LT, Domingues HS, Mentel R, Ben-Nun A, et al. Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. Nat Med 2009; 15(6): 626-32.
- 4 Fukase Y. Immunohistochemical staining of human teeth, and production of monoclonal antibodies against cementum. J Osaka Dent Univ 1997; 31(1/2): 1-9.
- 5 Mullink H, Henzen-Logmans SC, Tadema TM, Mol JJ, Meijer CJ. Influence of fixation and decalcification on the

- immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(11): 1103-9.
- 6 Wang L, Du C, Lv J, Wei W, Cui Y, Xie X. Antiasthmatic drugs targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 alleviate central nervous system inflammatory cell infiltration and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2011; 187(5): 2336-45.
- 7 Wei W, Du C, Lv J, Zhao G, Li Z, Wu Z, *et al.* Blocking A₂B Adenosine receptor alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibition of IL-6 production and Th17 differentiation. *J Immunol* 2012; 190(1): 138-46.
- 8 Chi V, Chandy KG. Immunohistochemistry: Paraffin sections using the Vectastain ABC kit from vector labs. *J Vis Exp* 2007; (8): 308.
- 9 Kucherenko MM, Marrone AK, Rishko VM, Yatsenko AS, Klepzig A, Shcherbata HR. Paraffin-embedded and frozen sections of *Drosophila* adult muscles. *J Vis Exp* 2010; 10.3791/2438.
- 10 任成林, 王爱华, 苏杰. 不同苏木素-伊红染色液在组织石蜡切片中的应用. *畜牧兽医杂志*(Ren Chenglin, Wang Aihua, Su Jie. The application of different hematoxylin-eosin solution in tissue paraffin slice. *J Anim Sci*) 2006; 25(6): 29-30.
- 11 Davis DA, Pellowski DM, William Hanke C. Preparation of frozen sections. *Dermatol Surg* 2004; 30 (12 Pt 1): 1479-85.
- 12 Shoimer I, Warman L, Kurwa HA. Preparation of Mohs micrographic surgery frozen sections: Three new pearls leading to a simplified, more-effective process. *Dermatol Surg* 2013; 39(8): 1279-82.
- 13 Tada M, Shinohara Y, Kato I, Hiraga K, Aizawa T, Demura M, *et al.* Preparation and observation of fresh-frozen sections of the green fluorescent protein transgenic mouse head. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39(2): 31-4.
- 14 Zhang Y, Liu C, Wei B, Pei G. Loss of beta-arrestin 2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis with reduced number of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Immunology* 2013; 140(4): 430-40.
- 15 张翠薇, 刘勇, 张旭, 马跃荣. 肾活检标本冰冻切片与石蜡切片免疫荧光染色结果的比较. *泸州医学院学报*(Zhang Cuiwei, Liu Yong, Zhang Xu, Ma Yuerong. Comparative study of immunofluorescence staining of renal biopsy samples using frozen sections and paraffin sections. *Journal of Luzhou Medicine College*) 2013; 36(1): 31-4.
- 16 张燕, 陈剑, 刘海静, 陆敏. 石蜡切片免疫荧光法在肾病穿刺组织中的应用. *北京大学学报(医学版)*(Zhang Yan, Chen Jian, Liu Haijing, Lu Min. Use of paraffin sections for immunofluorescence staining in renal biopsy. *Journal of Peking University, Health Sciences*) 2011; 43(6): 900-2.