

技术与方法

两种方法制备的脑组织切片激光共聚焦显微镜 成像效果的比较研究

李贵苹¹ 朱晓娜² 易 静¹ 杭 勤^{1*}¹上海交通大学医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025;²上海交通大学医学院解剖学与组织胚胎学系, 上海 200025)

摘要 该文比较研究了振动切片法与冰冻切片法制作的脑组织切片的质量及其激光共聚焦显微镜成像的效果。振动切片法通过灌流固定、取小鼠脑、琼脂糖包埋后利用振动切片机连续冠状切片。冰冻切片法通过蔗糖脱水、OCT包埋液氮骤冷后利用冰冻切片机连续冠状切片。制备的脑组织切片进行免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察成像效果。结果表明, 与冰冻切片相比, 振动切片法简单快速, 且制片质量较高, 脑组织切片无冰晶形成, 抗原免遭破坏, 组织结构较完整, 更适用于脑组织样品的激光共聚焦显微镜的成像观察。

关键词 脑组织; 振动切片; 冰冻切片; 激光共聚焦显微镜

Comparison of Vibratome and Frozen Sections of Brain Tissue in the Quality and Image of Confocal Laser Scanning Microscopy

Li Guiping¹, Zhu Xiaona², Yi Jing¹, Hang Qin^{1*}¹Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiaotong UniversitySchool of Medicine, Shanghai 200025, China; ²Neuroscience Division, Department of Anatomy,

Histology and Embryology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract We studied the quality of vibratome sections and frozen sections of brain tissues and evaluated the imaging quality of these two sections with laser scanning confocal microscope (LSCM), respectively. Brain tissues of 6- to 8-week-old mice (CD1) were fixed by perfusion and then embedded in low-melting agarose, sliced on a vibratome, or embedded in OCT compound, sliced on a freezing microtome. The vibratome sections and the frozen sections were demonstrated by immunofluorescence staining and observed by confocal laser scanning microscopy. The results showed that compared with frozen sections, vibratome sections of brain tissues offered distinct advantages: easier embedding approaches, higher quality of brain tissues sections, better structural integrity of tissue sections, and superior image quality of confocal laser scanning microscopy.

Keywords brain tissues; vibratome section; frozen section; confocal laser scanning microscopy

激光共聚焦扫描显微镜具有高灵敏度及能够观察空间结构的独特优点, 可对厚切片进行断层扫描, 同时配合大视野图像拼接功能, 可对较大的组织

切片进行成像, 突破了普通荧光显微镜视野小及不能深度扫描的局限。在脑组织切片研究中, 由于不同层面或同一层面细胞种类和分布不相同, 往往需

收稿日期: 2015-06-11 接受日期: 2015-09-29

*通讯作者。Tel: 021-63846590-776402, E-mail: hangqinwang@126.com

Received: June 11, 2015 Accepted: September 29, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776402, E-mail: hangqinwang@126.com

网络出版时间: 2015-11-06 18:20:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151106.1820.008.html>

要断层扫描及大视野图像拼接, 以获取脑组织切片的完整信息。为了利用激光共聚焦显微镜采集高质量的脑组织切片图像, 除了需要优化免疫荧光过程的各种条件外, 还必须重视脑组织样品切片本身的质量。

目前, 制作脑组织切片主要有石蜡切片、冰冻切片和振动切片。石蜡切片的制作需要组织脱水、透明、包埋等步骤, 对抗原的损害较大, 制作过程较繁琐, 且切片厚度较薄, 因此用于激光共聚焦显微镜成像的脑组织切片一般不采用石蜡切片^[1]。冰冻切片制作也存在诸多问题, 如易形成冰晶、易脱片、裱片时极易出现气泡、褶皱等^[2], 严重影响后续免疫组化过程以及图像采集质量。而振动切片技术方法简单、快速, 能使组织比较完整保留, 多用于新鲜组织切片和组织电生理学等研究^[3]。由于该方法只能制作厚切片, 在普通的免疫组织化学实验中并不常用, 虽然激光共聚焦显微镜技术的发展极大地促进了振动切片在免疫组织化学实验中的应用, 但关于振动切片的资料仍然较少, 也没有研究对冰冻切片和振动切片进行系统的比较。因此, 本实验比较研究了用振动切片法和冰冻切片法制作脑组织切片, 以提高用于激光共聚焦显微镜成像的脑组织切片质量。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂有: 多聚甲醛(MERCK公司)、液氮、OCT冰冻切片包埋剂(美国樱花公司)、琼脂糖(国药集团化学试剂有限公司)、山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司)、兔源抗GFAP特异性一抗(Milipore公司)、兔源抗PV特异性一抗(Milipore公司)、鸡源抗MAP2特异性一抗(Milipore公司)、Alexa Fluor[®] 555标记的山羊抗兔IgG(Invitrogen公司)、Alexa Fluor[®] 647标记的山羊抗鸡IgG(Invitrogen公司)、DAPI(碧云天生物技术研究)、Neuro Trace[®] 640/660 Deep-Red Fluorescent Nissl Stain(Invitrogen公司)、苏木素及伊红染液(台湾贝索公司)。

主要仪器有: 冰冻切片机(美康HM550)、全自动振动切片机(莱卡VT1000S)、LSM710激光共聚焦显微镜(蔡司)。

1.2 实验动物

由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供的

SPF级6~8周龄CD1品系成年小鼠8只, 随机分成两组(冰冻切片组及振动切片组), 每组各4只。

1.3 实验方法

1.3.1 取材及脑片标本制备 采用3.5%水合氯醛麻醉小鼠后, 剪开胸腔, 暴露心脏, 将输液针刺入左心室, 打开输液阀, 在右心房上剪一小口, 使血液和灌洗液可以排出。灌入约50 mL于4 °C预冷的生理盐水, 以冲洗血液。换4 °C预冷的4%多聚甲醛继续输液, 待小鼠抽搐停止后, 再持续输5 min多聚甲醛, 即可将小鼠体内各脏器充分固定。灌注结束后, 开颅取出海马部位脑组织, 置于4%多聚甲醛固定液中固定24 h。

将脑组织分为两组: 冰冻切片组及振动切片组。冰冻切片组: 将固定的小鼠脑组织放入20%蔗糖溶液中浸泡过夜, 待其沉底后, 换成30%蔗糖溶液浸泡过夜, 待脑组织沉底后用OCT包埋剂包埋脑组织, 置于液氮罐内冷冻后取出, -20 °C复温, 然后放入冰冻切片机切片, 厚度为30 μm, 再将切片置入装有0.01 mol/L PBS的24平板孔中, 4 °C保存备用。振动切片组: 将固定的小鼠脑组织用3%低熔点琼脂糖包埋, 待琼脂糖凝固后, 将脑组织固定于振动切片机上, 将脑组织调整为冠状位, 调节刀片角度, 修整组织块, 切片厚度为30 μm, 调节切片速度和振幅, 连续切片。再将获得的切片置入装有0.01 mol/L PBS的平板孔中, 4 °C保存备用。

1.3.2 免疫荧光组织化学染色 取出脑片, 用10%山羊血清室温封闭30 min。山羊血清用一抗稀释液配置, 一抗稀释液为含终浓度0.3% Triton X-100的0.1 mol/L PBS, 0.3%去污剂Triton X-100可使细胞膜穿孔, 促进抗体渗入细胞。封闭结束后, 吸去封闭液, 每孔加入300 μL一抗(1:1 500稀释), 4 °C孵育过夜, PBS代替两种抗体作为阴性对照。加入二抗(1:300稀释)及Neuro Trace染料(1:500稀释, 二抗稀释液为0.1 mol/L PBS), 室温孵育2 h。二抗孵育结束前10 min加入DAPI, 继续孵育。除血清封闭以外, 其余步骤完成后均需用PBS-T洗3次, 每次10 min, 封闭、抗体孵育及漂洗步骤均在摇床上进行, 最后将脑片铺展在玻片上。

1.3.3 激光共聚焦显微镜观察成像 大视野图像拼接: 利用Tile Scan图像拼接功能, 共拼图20×24张, 可得到整张脑切片图像。拍摄物镜为20×。Z轴扫描成像: 利用Z-step功能对脑片Z轴断层扫描, 间隔

为1.5 μm , 共扫描30 μm , 拍摄物镜为40 \times 。

1.3.4 HE染色 取出脑片, 将脑片铺展在玻片上, 晾干。待脑片贴牢后, 置于苏木素染液中染色4 min, 水冲洗1 min, 显微镜下观察颜色, 用分色液(含0.5%浓盐酸的95%酒精)分色, 用75%酒精、85%酒精各洗涤5 min, 用伊红染液染色15 s, 分别用95%酒精I、95%酒精II、100%酒精I、100%酒精II、二甲苯I、二甲苯II漂洗各5 min, 再用中性树胶封片, 在光镜下观察成像。

1.4 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示, 采用*t*检验比较两组间差异的显著性, 用SPSS 17.0软件进行统计分析。 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

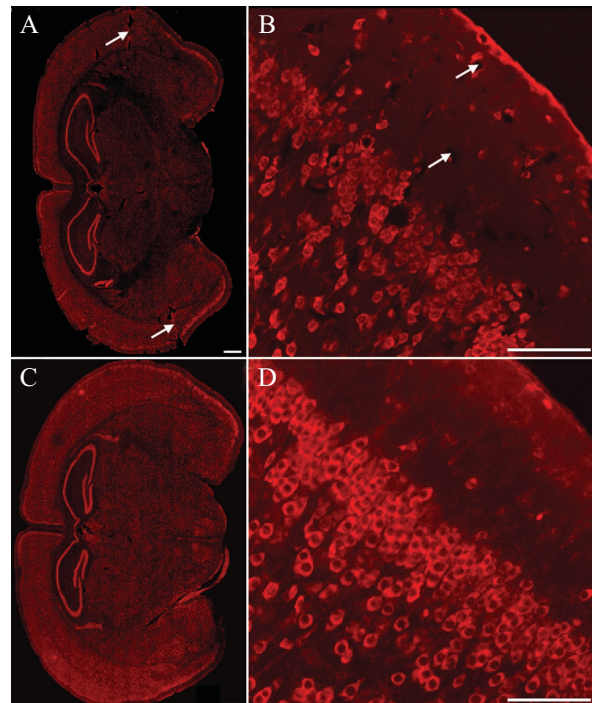
2.1 两种脑组织切片制备过程比较

冰冻切片制备过程中为防止冰晶的形成, 通常在脑组织固定后需要用20%、30%梯度浓度的蔗糖溶液依次脱水, 为使脱水彻底, 此步骤往往需要过夜甚至几天。同时液氮速冻对操作者的技术要求也较高, 若操作不当, 超低温的冷冻常使脑组织发生脆冻裂。而振动切片脑组织固定后用琼脂糖包埋, 待琼脂糖凝固后即可直接切片, 样品准备时间只需10~20 min, 不需要经过梯度浓度蔗糖溶液脱水、液氮速冻等步骤, 操作简单, 节省时间和费用。

2.2 两种脑组织切片质量比较

Neuro Trace荧光尼氏染色液(Neuro Trace Fluorescent Nissl Stain)可以标记神经元细胞中的尼氏小体(Nissl body), 显示脑或脊髓的基本神经结构。脑切片Neuro Trace荧光尼氏染色液染色, 在激光共聚焦显微镜下观察, 用Tile Scan图像拼接功能对整张脑片成像。统计每组小鼠脑切片中组织破裂个数, 结果发现, 冰冻切片经液氮速冻的脑组织容易冻裂, 导致脑组织切片出现裂缝及破损, 而振动切片脑组织结构较

完整($P<0.01$, 图1A和图1C, 表2)。为比较两种脑组织切片结构完整性, 每组脑切片选择24个视野采集图像, 统计空白区域百分比, 空白区域百分比是指每高倍视野中的空洞区域占总视野的面积比, 相同部位切片的空白区域百分比越大, 表示空洞面积越大, 结果显示, 冰冻切片易产生冰晶, 特别是富含水分的皮层区有较多空洞产生, 而振动切片几乎没有空洞产生($P<0.01$, 图1B和图1D, 表2)。冰冻切片方法中蔗糖脱水后会导致脑组织收缩, 选取两种切片相同



A: 冰冻切片, 箭头所示为裂缝及破损, 标尺=500 μm ; B: 冰冻切片皮层区, 箭头所示为冰晶导致的空洞, 标尺=100 μm ; C: 振动切片, 标尺=500 μm ; D: 振动切片皮层区, 标尺=100 μm 。

A: frozen section, scale bar=500 μm . The arrows represented scratches. B: cortical area of frozen section, scale bar=100 μm . The arrows represented the hole caused by ice crystal. C: vibratome section, scale bar=500 μm . D: cortical area of vibratome section, scale bar=100 μm .

图1 脑组织振动切片与冰冻切片尼氏染色的比较

Fig.1 Comparison between vibratome and frozen sections of brain tissue with fluorescent nissl staining

表1 两种脑组织切片制备方法的比较

Table 1 Comparison between vibratome and frozen sections of brain tissue

方法 Method	冰冻切片 Frozen section	振动切片 Vibratome section
Procedures	Tissue fixation, over night sucrose incubation, OCT compound embedding, liquid nitrogen freezing, tissue slicing	Tissue fixation, agarose embedding, tissue slicing
Time cost	More than 2 days	Under an hour
Slicing temperature	Under -20°C	$0\sim 37^{\circ}\text{C}$

表2 两种脑组织切片质量比较

Table 2 Comparison of the quality between vibratome and frozen sections of brain

组别 Group	组织破裂个数($n=4$) Number of scratches ($n=4$)	空白面积百分比(% , $n=24$) Percentage of blank area (% , $n=24$)	神经元胞体面积(μm^2 , $n=200$) Area of neuron soma (μm^2 , $n=200$)
Frozen section	2.83±2.14	8.1±2.1	157.73±16.26
Vibratome section	0.33±0.52*	0.48±0.27*	194.97±20.93*

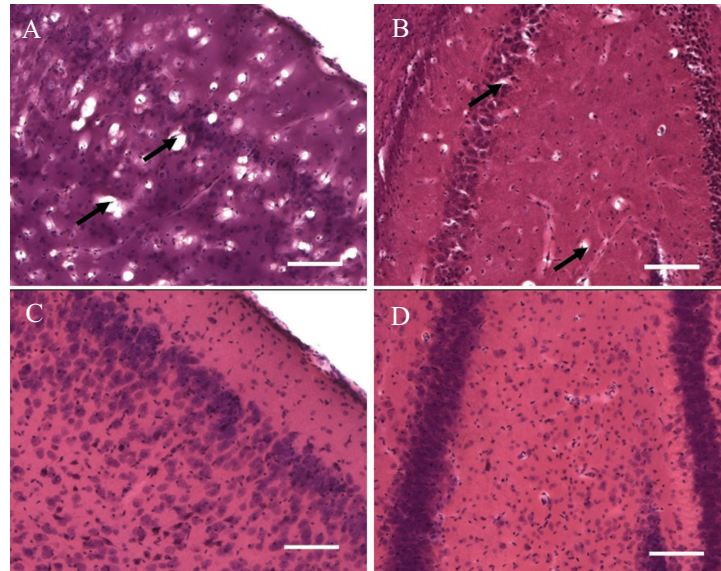
* $P<0.01$, 与冰冻切片组比较。* $P<0.01$ vs frozen sections group.A: 冰冻切片皮层区; B: 冰冻切片海马区; C: 振动切片皮层区; D: 振动切片海马区。箭头所示为冰晶导致的空洞, 标尺=100 μm 。A: cortical area of frozen sections; B: hippocampus area of frozen sections; C: cortical area of vibratome sections; D: hippocampus area of vibratome sections. The arrows represented the hole caused by ice crystal. Scale bars=100 μm .

图2 脑组织振动切片与冰冻切片HE染色的比较

Fig.2 Comparison between vibratome and frozen sections of brain tissue with HE staining

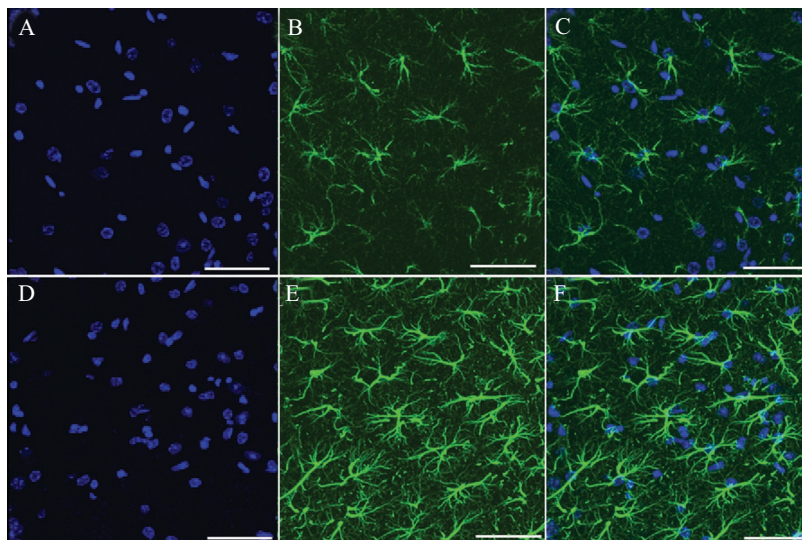
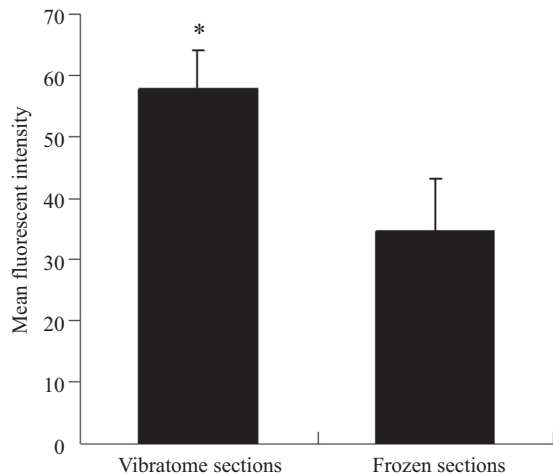
A: 冰冻切片, DAPI染色。B: 冰冻切片, GFAP免疫荧光染色, GFAP阳性细胞呈绿色荧光。C: 冰冻切片, DAPI和GFAP荧光染色重叠。D: 振动切片, DAPI染色。E: 振动切片, GFAP免疫荧光染色。F: 振动切片DAPI和GFAP荧光染色重叠。标尺=50 μm 。A: frozen sections with DAPI staining. Nucleus appeared to be blue fluorescence. B: frozen sections with GFAP immunohistochemistry staining. GFAP positive cells appeared to be green fluorescence. C: DAPI and GFAP was merged in frozen section. D: vibratome sections with DAPI staining. E: vibratome sections with GFAP immunohistochemistry staining. F: DAPI and GFAP was merged in vibratome section. Scale bars=50 μm .

图3 脑组织振动切片与冰冻切片GFAP免疫荧光染色的比较

Fig.3 Comparison of vibratome and frozen sections of brain tissue with GFAP immunohistochemistry staining



* $P < 0.01$, 与冰冻切片组比较。

* $P < 0.0$ vs frozen sections group.

图4 两种脑组织切片GFAP抗原平均荧光强度比较

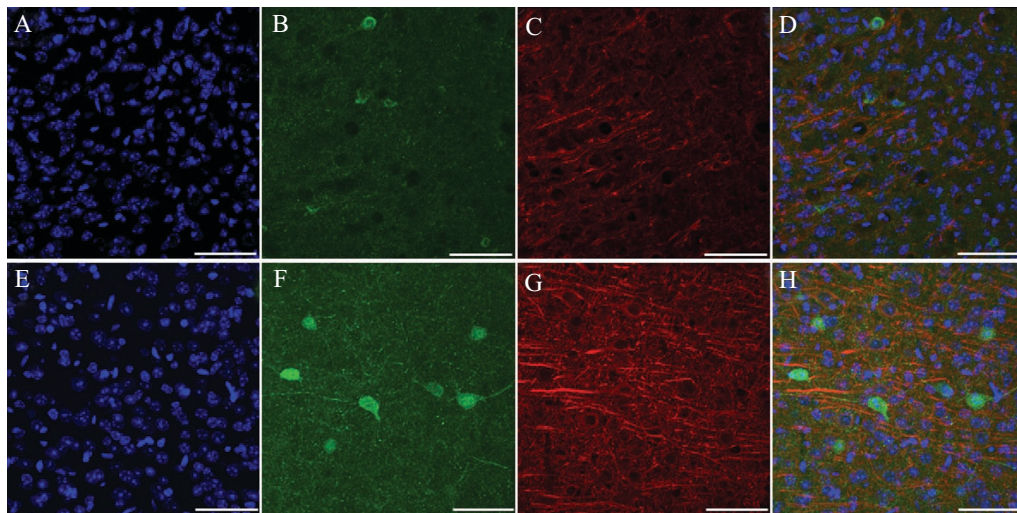
Fig.4 Comparison of mean fluorescent intensity between frozen and vibratome sections of brain tissue

部位采集图像, 每组脑切片随机测量200个神经元胞体面积, 冰冻切片组与振动切片组神经元胞体面积分别为 $157.73 \pm 16.26 \mu\text{m}^2$ 、 $194.97 \pm 20.93 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$), 表明振动切片由于无需脱水, 镜下所见细胞比冰冻切片的大, 更能反应脑组织的活体状态(图1C和图1D, 表2)。为验证尼氏荧光染色的结果, 本文对两种

方法制备的脑片进行HE染色, 结果与荧光染色结果相符(图2)。

2.3 GFAP免疫荧光染色

胶原原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)仅存在于星形胶质细胞中, 是星形胶质细胞的标志分子, 因此可利用GFAP的特异性抗体来检测星形胶质细胞。脑切片用DAPI和GFAP特异性抗体染色, 在激光共聚焦显微镜下观察, 选取脑组织空洞较少, 结构较完整的海马区域, 用Z-step功能对相同部位Z轴扫描成像, 同样条件下, 冰冻切片组与振动切片组平均荧光强度分别为 34.72 ± 8.33 、 57.60 ± 6.42 ($P < 0.01$)。结果表明, 与冰冻切片相比, 振动切片省去了脱水、冷冻等前处理过程, 减少了对抗原的损伤, 星形胶质细胞免疫荧光染色后, 细胞结构更完整, GFAP抗原平均荧光强度更高, 抗原检测更准确(图3和图4)。本研究同时检测了两组脑组织切片中神经元标志分子微管相关蛋白质2(microtubule-associated protein 2, MAP2)及中间神经元标志分子微清蛋白(parvalbumin, PV)的表达, 结果也表明, 与冰冻切片相比, 振动切片免疫荧光染色后, 神经元及中间神经元细胞结构更完整, 抗原平均荧光强度更高,



A: 冰冻切片, DAPI染色。B: 冰冻切片, PV免疫荧光染色, PV阳性细胞呈绿色荧光。C: 冰冻切片, MAP2免疫荧光染色, MAP2阳性细胞呈红色荧光。D: 冰冻切片, DAPI、GFAP和MAP2荧光染色重叠。E: 振动切片, DAPI染色。F: 振动切片, PV免疫荧光染色。G: 振动切片, MAP2免疫荧光染色。H: 振动切片, DAPI、GFAP和MAP2荧光染色重叠。标尺=50 μm 。

A: frozen section with DAPI staining. Nucleus appeared to be blue fluorescence. B: frozen section with PV immunohistochemistry staining. PV positive cells appeared to be green fluorescence. C: frozen section with MAP2 immunohistochemistry staining. MAP2 positive cells appeared to be red fluorescence. D: DAPI, PV and MAP2 was merged in frozen section. E: vibratome section with DAPI staining. F: vibratome section with PV immunohistochemistry staining. G: vibratome section with MAP2 immunohistochemistry staining. H: DAPI, PV and MAP2 was merged in vibratome section. Scale bars=50 μm .

图5 脑组织振动切片与冰冻切片PV和MAP2免疫荧光染色的比较

Fig.5 Comparison of vibratome and frozen sections of brain tissue with PV and MAP2 immunohistochemistry staining

抗原检测更准确(图5)。

3 讨论

目前,用于激光共聚焦显微镜成像的脑组织切片方法主要是冰冻切片法,然而脑组织富含水分,在冰冻切片的制作过程中极易形成冰晶,破坏组织抗原。常用的防冰晶法有两种:高渗透压(20%~30%的蔗糖)脱水法和液氮骤冷法^[4]。包翠芬等^[5]认为,液氮骤冷法效果更好。但我们的研究发现,液氮骤冷法也不能完全避免脑组织冰晶的形成,特别是在富含水分的皮层区,并且快速超低温的冷冻极易使脑组织因冰冻不均匀而破裂,导致脑组织切片不完整。经过反复摸索,我们将蔗糖脱水后的脑组织用OCT包埋后,置于液氮中慢慢冷冻约1~2 min,待OCT全部凝固后取出,可以减少脑组织冻裂的发生。与冰冻切片相比,振动切片方法简单快速,不需要对脑组织脱水、冷冻,固定后用琼脂糖包埋直接切片,不会形成冰晶造成组织结构的破坏,组织也不会因蔗糖脱水而收缩,更能反映脑组织的活体状态。漂片法染色后裱片也可以避免褶皱、气泡以及脱片的问题,能很好地进行三维成像及大视野图像拼接。

传统观点认为,振动切片法制片的组织没有冷冻,较冰冻切片软,主要适宜制备厚组织切片^[6]。为了追踪神经纤维的走行,用于神经组织研究的切片要求有一定厚度,因此振动切片主要适用于显示神经系统抗原分布及鉴别神经元类型等研究^[7]。本研究用振动切片机制备较薄的(30 μm)的脑组织切片,与同样厚度的冰冻切片进行比较,发现用振动切片机制备高质量的较薄的切片首先要将组织固定充分,如小鼠脑组织需要灌注固定15~20 min,然后进行后固定过夜。同时与制备厚切片相比,在制片过程中切片的速度要慢、振动频率要相对大一些。

由于一般显微镜不能观察厚切片,因此振动切片在普通免疫组织化学技术中并不常用。而激光共聚焦显微镜具有深度识别力和纵向分辨力,可以对几十微米甚至几百微米厚的组织切片进行断层扫描,实现对细胞或组织内部断层扫描成像,大大促进了振动切片在组织切片免疫荧光技术中的应用,如脾脏、淋巴组织、子宫等^[8]。随着先进振动切片机

的不断普及以及显微镜技术的不断发展,相信振动切片技术未来将为科研和临床提供更好的服务。

综上所述,与冰冻切片相比,振动切片方法简单快速,获得的切片中脑组织结构更完整,抗原检测准确性更高,更适用于激光共聚焦显微镜技术对荧光标记的脑组织切片样品进行三维成像观察及大视野图像拼接。

参考文献 (References)

- 1 边 玮. 激光共聚焦显微镜样品制备方法(二)——组织切片样品. 电子显微学报(Bian Wei. Methods of sample preparation for laser scanning confocal microscopy(2)-sample of tissue section. Journal of Chinese Electron Microscopy Society) 2010; 29(4): 399-402.
- 2 李 慧, 黄景阳, 袁中瑞. 提高脑组织冰冻切片质量的几点体会. 中国免疫学杂志(Li Hui, Huang Jingyang, Yuan Zhongrui. Tricks for improving brain frozen section. Chinese Journal of Immunology) 2012; 28(11): 1019-22.
- 3 刘 挺, 王栋栋. LeicaVT1200S振动切片机的使用和维护. 生命科学仪器(Liu Ting, Wang Dongdong. The operation and maintenance of Leica VT1200S vibratome. Life Science Instruments) 2011; 9(4): 27-8.
- 4 姚斌伟, 高亚兵, 董摇霖, 乔思默, 左红艳, 王丽峰, 等. 脑组织灌注固定脱水后去除冰晶方法的建立及其在微波辐射致脑损伤中的应用. 军事医学(Yao Binwei, Gao Yabing, Dong Yaoji, Qiao Simo, Zuo Hongyan, Wang Lifeng, et al. Establishing a method of anti-ice crystal in dehydrated brain tissue after affusion fixation and its application in brain injury induced by microwave radiation. Military Medical Sciences) 2011; 35(5): 394-6.
- 5 包翠芬, 刘 霞, 穆长征, 李淑玲. 冰冻切片几种防冰晶方法的比较. 中国误诊学杂志(Bao Cuifen, Liu Xia, Mu Changzheng, Li Shuling. Comparison of three methods for anti-ice crystal in frozen section. Chinese Journal of Misdiagnostics) 2006; 6(17): 3310-1.
- 6 敖 然, 吴美延, 赵 慧, 周 莉, 陈爱军. 胚胎脑片免疫荧光组织化学双重漂染技术在神经元发生研究中的应用. 中国组织化学与细胞化学杂志(Ao Ran, Wu Meiyang, Zhao Hui, Zhou Li, Chen Aijun. Application of immunofluorescence double staining technology for embryo brain slices to the study of neurogenesis. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry) 2011; 20: 80-4.
- 7 Selever J, Kong JQ, Arenkiel BR. A rapid approach to high-resolution fluorescence imaging in semi-thick brain slices. J Vis Exp 2011; 53: e2807.
- 8 Abdelaal HM, Kim HO, Wagstaff R, Sawahata R, Southern PJ, Skinner PJ. Comparison of vibratome and compresstome sectioning of fresh primate lymphoid and genital tissues for in situ MHC-tetramer and immunofluorescence staining. Biol Proced Online 2015; 17(1): 2.