

# 透明时间对草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的影响\*

李影, 唐蓓, 曾瑛  
(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331)

**摘要:**【目的】探索不同透明时间对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的影响,并筛选出最佳透明时间。【方法】应用石蜡切片技术对草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织进行切片,经苏木精-伊红染色后通过显微摄影来观察每类组织在不同透明时间的切片完整率和细胞完整性。【结果】草鱼腹腔脂肪组织在连续两次透明时间分别为3,1 min的条件下,切片完整率为88.33%,脂肪细胞形态完整且细胞膜无破碎;背部肌肉组织在连续两次透明时间分别为10,8 min的条件下,切片完整率为93.33%,肌细胞形态完整无破损,且肌间脂肪细胞界限明显。【结论】石蜡切片的制作效果取决于组织特性,草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片连续两次的最佳透明时间分别为3,1 min和10,8 min。

**关键词:**透明时间;脂肪组织;肌肉组织;石蜡切片;草鱼

**中图分类号:**Q2-3

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2019)04-0040-04

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是中国重要的淡水经济鱼类。目前,随着人工养殖的迅速发展,草鱼肌肉组织和腹腔肠系膜周围的脂肪积聚过多,直接影响了草鱼肉制品的品质和动物的生产力<sup>[1-2]</sup>。因此,有必要从形态学的角度对草鱼脂肪组织与肌肉组织中细胞形态学特点进行研究。石蜡切片是组织形态学研究最常用的方法,它不仅被用于观察正常组织细胞的形态结构,而且也是病理学、医学等学科用以研究、观察及判断组织细胞形态变化的主要方法,并且该方法也已相当广泛地被用于其他许多学科领域的研究中。在石蜡切片制作过程中,鉴于不同物种不同组织的细胞组成和生理生化特点各异,因而对它们处理的方法不能一概而论,制作条件也会有所不同。尤其是脂肪组织中脂肪细胞体积较大,细胞内脂类含量多,单位体积内细胞数量少——若在该组织的石蜡切片制作过程中透明环节处理不当,易出现碎片、断片、脱片等情况,导致不能观察到组织细胞的真实形态。因此,有必要建立一种标准的鱼类脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作方法。本研究根据草鱼脂肪组织和肌肉组织的生理生化特点,经过反复实验,对影响草鱼脂肪组织和肌肉组织石蜡切片制作效果的关键环节即透明进行探索,优化和改进其中的某些过程,并筛选出最佳的脂肪组织切片和肌肉组织切片制作程序,从而为鱼类脂肪组织、肌肉组织形态学研究提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和主要试剂

实验用健康草鱼1尾,体质量约1.5 kg,购于重庆市北碚区歇马养鱼场。多聚甲醛、乙醇、二甲苯、石蜡、苏木素、伊红、浓盐酸、冰醋酸、纯甘油、中性树胶等试剂均购自重庆塞米克生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 脂肪组织和肌肉组织石蜡切片的制作 以丁香酚对实验鱼进行麻醉,解剖获取背部肌肉组织和腹腔脂肪组织,以pH为7.2的磷酸盐缓冲液冲洗掉表面血液后,用眼科剪将上述组织剪成0.2 cm<sup>3</sup>左右小块,以质量分数为4%的多聚甲醛溶液固定24 h后冲洗,再将获取的各组织用体积分数由低到高的乙醇溶液进行连续脱水,然后在25℃条件下,以小鼠(*Mus musculus*)肝脏透明时间作对照<sup>[3]</sup>,依据脂肪组织和肌肉组织的细胞学特点按照透明时间递减原则对各组织进行透明。透明过程采用二甲苯二次透明法,即先将组织放在V<sub>二甲苯</sub>:V<sub>乙醇</sub>=

\* 收稿日期:2017-10-26 修回日期:2019-05-20 网络出版时间:2019-07-15 12:30

资助项目:国家自然科学基金(No. 30800843);重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2016jcyjA1085)

第一作者简介:李影,女,教授,博士,研究方向为动物脂肪发育生物学,E-mail: xiaoying86@hotmail.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190715.1230.010.html>

1:1的二甲苯-无水乙醇透明液中进行预透明,再以体积分数为100%的二甲苯进行透明。透明完成后将组织置于包埋皿内进行石蜡包埋,最后将每个组织进行连续横向切片,每个处理切取100张切片,切片厚度为4 μm。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)染色后计算切片的完整率 按照常规石蜡切片染色方法<sup>[3]</sup>在25℃条件下,对切片进行HE染色,然后肉眼观察结合Nikon Ds-Ril数码显微系统对切片进行观察和完整率统计。切片上组织连贯、无明显碎片,记为切片完好;切片上组织散在成碎片、切片不完整、显微镜下几乎见不到完整的细胞记为切片不完整。

每个处理随机计数60张切片,切片完整率计算公式为“切片完整率= $\frac{\text{完整切片个数}}{\text{总切片个数}} \times 100\%$ ”。

1.2.3 细胞形态观察 利用Nikon Ds-Ril数码显微系统对不同处理的各组织石蜡切片进行观察、拍照。

1.2.4 数据处理 各组石蜡切片均来自同一尾草鱼,实验的每个处理重复5次。采用SPSS 21.0软件对切片完整率进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和多重比较(LSD)。当 $p < 0.05$ 时,分析结果具有统计学意义。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 透明时间对脂肪组织和肌肉组织石蜡切片完整率的影响

由表1可知,透明时间长短对草鱼腹腔脂肪组织石蜡切片完整率有直接影响。在连续两次透明时间均为20 min条件下,切片的完整率很低,仅为3.33%。随着透明时间的减少,切片完整率逐渐增加,均高于对照处理,差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。特别地,在连续两次透明时间分别为3,1 min的条件下,切片完整率达88.33%,明显高于其他连续两次透明时间条件下的切片完整率,且差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。

表1 包埋前不同透明时间对草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织石蜡切片完整率的影响

Tab. 1 Effects of different transparent time on the slices' integrity rate of abdominal adipose tissue and muscle tissue in grass carp before embedded

| 处理  | 透明次序 | 透明试剂     | 腹腔脂肪组织   |                         | 背部肌肉组织   |                         |
|-----|------|----------|----------|-------------------------|----------|-------------------------|
|     |      |          | 透明时间/min | 切片完整率/%                 | 透明时间/min | 切片完整率/%                 |
| 对照  | 第1次  | 二甲苯-无水乙醇 | 20       | 3.33±1.67 <sup>a</sup>  | 20       | 15.00±5.27 <sup>a</sup> |
|     | 第2次  | 二甲苯      | 20       |                         | 20       |                         |
| 处理1 | 第1次  | 二甲苯-无水乙醇 | 10       | 8.33±2.64 <sup>b</sup>  | 15       | 36.67±2.64 <sup>b</sup> |
|     | 第2次  | 二甲苯      | 10       |                         | 10       |                         |
| 处理2 | 第1次  | 二甲苯-无水乙醇 | 5        | 25.00±3.03 <sup>c</sup> | 10       | 93.33±4.25 <sup>c</sup> |
|     | 第2次  | 二甲苯      | 3        |                         | 8        |                         |
| 处理3 | 第1次  | 二甲苯-无水乙醇 | 3        | 88.33±3.12 <sup>d</sup> | 6        | 23.33±6.01 <sup>a</sup> |
|     | 第2次  | 二甲苯      | 1        |                         | 4        |                         |

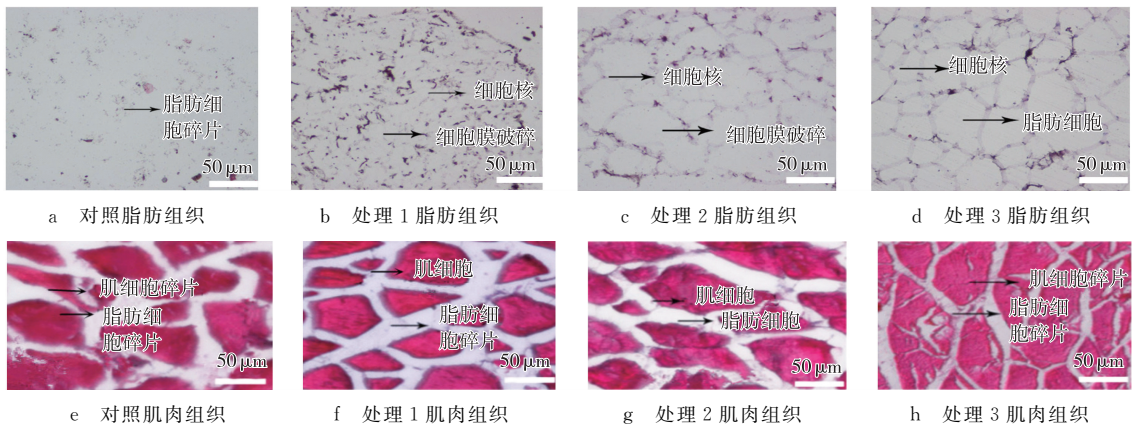
注:上标不同字母表示同列数据的差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )

不同透明时间下,草鱼肌肉组织石蜡切片的完整率有所不同(表1)。在连续两次透明时间均为20 min条件下,切片完整率仅为15.00%。把连续两次透明时间分别减少为15,10 min后,切片的完整率有所增加,与前者相比差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),但仍未达到理想值。当连续两次透明时间分别减少到10,8 min时,切片完整率达到了93.33%,远远高于连续两次透明时间均为20 min时的切片完整率,两者差异具有统计学意义( $p < 0.05$ )。然而在此基础上继续缩短两次透明时间分别为6,4 min时,切片完整率下降到23%,与对照相比差异无统计学意义。

### 2.2 透明时间对脂肪组织和肌肉组织石蜡切片细胞形态的影响

从图1a可以看出,整个视野内腹腔脂肪组织切片无完整的细胞存在,细胞结构被严重破坏;从图1b中则可见一定的细胞轮廓,但细胞形态不完整,大部分细胞仍以碎片形式存在;图1c显示脂肪细胞形态趋于完整,破碎的细胞较少;而图1d中所观察到的细胞形态完整且细胞膜无破碎。总之,草鱼腹腔肠系膜脂肪组织经石蜡切片HE染色后,脂肪细胞呈中空透明,被完整的细胞膜包绕,同时,细胞核多处于细胞膜边缘,被苏木精染成蓝色。

图 1e 显示,背部肌肉石蜡切片中肌肉细胞部分完整,部分出现碎片,且肌肉细胞间的脂肪细胞轮廓不清晰呈碎片状;图 1f 中的肌肉细胞形态完整,但该切片中极少见到完整的脂肪细胞,大部分脂肪细胞间无明显界限,细胞膜断裂,细胞以碎片形式存在;图 1g 则显示肌肉组织细胞形态完整无破损,且肌间脂肪细胞界限明显,大量完整的细胞轮廓清晰可见;而在图 1h 中,大部分肌肉细胞呈现出空洞,肌间脂肪细胞完全破碎。



注:对照及处理 1~3 对应的具体透明条件见表 1

图 1 草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织经不同透明时间所做横向切片在显微镜下的形态

Fig. 1 Morphology of abdominal tissue and muscle tissue treated at different transparent time and sliced transversely

### 3 讨论

石蜡切片的制作过程是由取材、固定、脱水、透明、透蜡、切片等一系列连续制作过程组成,其中透明环节是切片制作过程中关键的一步。本研究选用透明剂为二甲苯,该试剂折光率为 1.497,透明力强。运用二甲苯进行的组织透明必须在严密观察下进行——如果透明时间过短,则透明不彻底,石蜡难于浸入组织;透明时间过长,则组织硬化变脆,不易切出完整切片<sup>[4]</sup>。在本研究中,让草鱼腹腔脂肪组织达到最佳透明效果的操作为:用二甲苯与乙醇混合液透明 3 min,然后用二甲苯透明 1 min。在上述透明条件下,切片的完整率达到了 88%,在显微镜下观察到的脂肪细胞形态完整且细胞膜无破碎,脂肪细胞呈中空透明,被完整的细胞膜包绕。背部肌肉组织透明的时间比腹腔脂肪组织更长。在用二甲苯与乙醇混合液透明 10 min 然后用二甲苯透明 8 min 的操作条件下,切片完整率达到了 93%,背部肌肉组织细胞形态完整无破损,且肌间脂肪细胞界限明显,大量完整的细胞轮廓清晰可见。另外,也有研究表明,绵羊(*Ovis aries*)卵巢组织透明时间为二甲苯与乙醇混合液 40 min、二甲苯 40 min<sup>[5]</sup>,大鼠(*Rattus norvegicus*)脑组织两次二甲苯的透明时间各为 10 min<sup>[6]</sup>,由此都得到了制作效果良好的组织切片。与其他研究者所得结果比较,本研究中草鱼脂肪组织的透明时间略短,这是由草鱼脂肪组织的特性所决定的。脂肪组织单位面积内的细胞数量少且体积大,细胞中含有大量的脂滴(主要是甘油三酯和胆固醇)<sup>[7]</sup>,二者都极易溶于二甲苯及乙醇,故透明时间相对较短。如果透明时间过长,甘油三酯完全溶解,组织变脆变硬,得到的切片就会有脱片和细胞膜破碎的情况。相对于草鱼腹腔脂肪组织,背部肌肉组织透明时间要更长才能取得较好的切片效果,但与肝脏组织、眼球晶状体组织相比较,该组织透明时间也有所缩短。这是因为草鱼背部肌肉组织中大部分为肌细胞,同时也存在一定量的肌间脂肪细胞。肌细胞中细胞质主要为肌浆,肌浆内含有丰富的肌纤维、线粒体,还含有少量颗粒状的糖原、肌红蛋白及高尔基体、内质网等。同样地,背部肌肉组织透明时间过长,会导致肌细胞出现空洞等问题,但透明时间过短则二甲苯不能完全地浸入组织,导致组织切片的折光率不佳。魏艳华等人<sup>[8]</sup>以有脂肪组织的乳腺组织为实验材料,环保透明液 3 道各 5 min 制作出了完整切片。本研究与之差异之处在于,一方面是由于使用材料不同,本实验选用的是草鱼脂肪组织,而魏艳华等人用的是乳腺组织,组织中仅有部分脂肪细胞;另一方面,选用的透明试剂也有所不同,本实验选用的是二甲苯,而魏艳华等人用的是环保透明液。

总之,本研究利用石蜡切片和 HE 染色法对草鱼腹腔脂肪组织和背部肌肉组织进行了初步探索,通过大量实验,获得了较为满意的结果,成功地摸索出这两种组织石蜡切片 HE 染色的最佳方案,为草鱼腹腔脂肪细胞和背部肌肉细胞的进一步研究奠定了实验基础。

## 参考文献:

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture 2014. opportunities and challenges [EB/OL]. [2017-10-26]. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015007040>.
- [2] CRUZ-GARCIA L, SANCHEZ-GURMACHES J, BOU-RAOUI L, et al. Changes in adipocyte cell size, gene expression of lipid metabolism markers, and lipolytic responses induced by dietary fish oil replacement in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2011, 158(4): 391-399.
- [3] 安利国, 邢维贤. 细胞生物学实验教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.  
AN L G, XING W X. Cell biology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [4] 杨媛媛, 夏羽, 李静, 等. 小鼠早期胚发育的全程组织切片观察 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2011, 39(4): 14-18.  
YANG Y Y, XIA Y, LI J, et al. The whole developmental process of mouse preimplantation embryonic oocyte with tissue section observation [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2011, 39(4): 14-18.
- [5] 李海军, 于泊洋, 段云娇, 等. 绵羊卵丘-卵母细胞复合体石蜡切片技术的改良 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1543-1550.  
LI H J, YUB Y, DUAN Y J, et al. A modified paraffin-section technique for ovine cumulus-oocyte complexes [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(8): 1543-1550.
- [6] 褚迎欣, 张树波, 高晓增, 等. 高质量大鼠脑组织连续石蜡切片的制作方法 [J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(4): 527-528.  
CHU Y X, ZHANG S B, GAO X Z, et al. Preparation of high-quality successive paraffin sections of rat brain tissue [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2016, 37(4): 527-528.
- [7] WU J L, ZHANG J L, DU X X, et al. Evaluation of the distribution of adipose tissues in fish using magnetic resonance imaging (MRI) [J]. Aquaculture, 2015, 448: 112-122.
- [8] 魏艳华, 曾铮. 脂肪组织常规制片的改进 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2015(4): 467.  
WEI Y H, ZENG Z. Modification of normal paraffin sections in adipose tissue [J]. Journal of Clinical Experimental Pathology, 2015(4): 467.

## Animal Sciences

## Effects of Different Transparent Time on the Paraffin Section's Quality of Abdominal Adipose Tissue and Muscle Tissue in Grass Carp

LI Ying, TANG Bei, ZENG Ying

(College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** [Purposes] This study aimed to explore the effects of different transparent time on the paraffin section's quality of abdominal adipose tissues and back muscle tissue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), and to screen the best transparent time to make paraffin section of the two kinds of tissues. [Methods] The abdominal adipose tissue and back muscle tissue of grass carp were sliced through the technology of paraffin section, and stained through HE staining. After that, the integrity rate of slices was calculated and the cell morphology was observed. [Findings] The best successive transparent time was 3, 1 min for adipose tissue of grass carp. Under such transparent conditions, the integrity rate of slices was 88.33%, and the intact membrane and adipocytes were observed by using microscopy. After two consecutive transparent time of 10, 8 min, the integrity rate of slices reached 93.33%, and muscle cells were intact without damaged, and the boundaries between intermuscular adipocytes was well-defined. [Conclusions] The making procedure of paraffin sections is determined by tissue characteristics. For the adipose tissue, the best consecutive transparent time is 3, 1 min, and for the muscle tissue, the best consecutive transparent time is 10, 8 min.

**Keywords:** transparent time; adipose tissue; muscle tissue; paraffin section; grass carp

(责任编辑 方 兴)