

微小鸡胚颅面部组织定位包埋方法的研究

王舒婷, 曹 阳, 孙晋虎, 李丽楚

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:31060167); 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科自0991118); 广西卫生厅重点科研课题(编号:桂卫重200928)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学口腔医学院口腔颌面外科

作者简介: 王舒婷(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 口腔疾病的诊断和治疗。E-mail: 359687405@qq.com

通讯作者: 孙晋虎(1969-), 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 口腔颌面部肿瘤的综合治疗, 唇腭裂治疗和口腔颌面部整形研究。E-mail: jinhu-sun@sohu.com

[摘要] **目的** 探讨微小鸡胚颅面部组织定位包埋方法, 以利于颅面部冠状面切。**方法** 在常规石蜡包埋技术的基础上, 经透明、浸蜡后将标本在包埋框注入石蜡时用显微镊将微小鸡胚颅面部组织夹持起后, 按照所需包埋方向迅速放入 L 形包埋模, 在包埋模内石蜡稍凝结时抽出显微镊, 待包埋组织的石蜡基本凝固时将包埋框注满石蜡, 至蜡块完全凝固后取出。**结果** 采用此法包埋的微小鸡胚颅面部组织包埋方向好且能够较好地定位, 完全显示颅面部的各个突起, 左右对称, 透明度好。**结论** 经此法包埋的微小鸡胚颅面部组织具有较好地定位性, 经组织切片染色后能清晰地观察鸡胚颅面部的组织形态, 为以微小鸡胚颅面部作为动物模型进行鸡胚颅面部形态发育的研究奠定了组织学技术基础。

[关键词] 微小鸡胚; 颅面部; 石蜡包埋; 定位

[中图分类号] R 361.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)04-0295-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.04.02

Study on the locating embedding methods of the miniature chicken embryo craniofacial tissue WANG Shu-ting, CAO Yang, SUN Jin-hu et al. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the locating embedding methods of the miniature chicken embryo craniofacial tissue. **Methods** On the base of routine paraffin section techniques, the specimen that was cleared and infiltrated was put into the embedding box, stuffing with paraffin. And the miniature chicken embryo craniofacial tissue was hold up with the microscopic tweezers, put it into L-shaped embedding mold rapidly according to the needed direction. Then the tweezers were removed when the paraffin starts to condense, and the embedding mold was filled with paraffin when it mainly coagulates until it completely solidified, then the paraffin block was removed. **Results** This method made the embedding direction of the miniature chicken embryo craniofacial tissue turning out good, as well as good locating and displaying of each craniofacial prominence, and the specimen was more symmetrical and transparent. **Conclusion** Embedded by this method, the miniature chicken embryo tissue craniofacial part has a good positioning. After the tissue sections are staining, its morphology can be clearly observed. The miniature chicken embryo craniofacial part can be used as an animal model to study its morphogenesis, which lays the foundation for the histological techniques.

[Key words] Miniature chicken embryo; Craniofacial part; Paraffin embedding; Locating

鸡胚组织材料因其取材方便快捷、研究周期短、环境条件要求低、价格低廉、经济方便等原因被广泛应用于肿瘤、血管生成、药理、微生物流行病学^[1-4]以及发育生理学^[5-7]等方面的研究, 进行微小鸡胚颅面部组织的形态发育组织切片的研究时要求严格的

组织包埋技术, 而良好微小鸡胚颅面部组织包埋是切片及进行后续研究的关键, 然而应用传统的包埋技术容易造成组织移位及包埋面转向严重, 导致切片失败。本文在以往研究的基础上, 探讨微小鸡胚颅面部组织的定位包埋方法, 以期获得良好的组织

包埋标本。

1 材料与方法

1.1 材料 新鲜鸡种蛋、恒温孵化箱、体式显微镜、恒温水浴箱、自动组织包埋机、显微镊、L形包埋模及不同熔点切片石蜡等。

1.2 方法

1.2.1 取材与固定 新鲜鸡种蛋在 37.8 ℃ 和 65% 相对湿度的孵化箱内孵化到达 24 期。在体式显微镜下,将胚体取出,移入盛有蒸馏水的培养皿中,将鸡胚洗净,截取鸡胚头颈部(须掌握正确的截取位置,见图 1,2)后,4% 中性多聚甲醛固定 4~8 h。

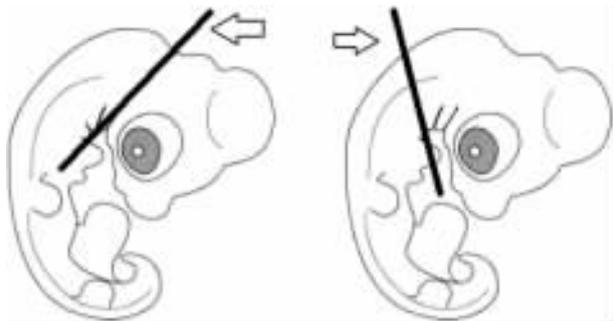


图 1 错误截取位置

图 2 正确截取位置

1.2.2 脱水与透明 将标本经流水冲洗后,纤维纸包裹置于塑料包埋盒中进行梯度脱水和透明,75% 乙醇(45 min)、85% 乙醇(30 min)、95% 乙醇 I (30 min)、95% 乙醇 II (30 min)、无水乙醇 I (30 min)、无水乙醇 II (30 min)、1:1 无水乙醇二甲苯 II (20 min)、二甲苯 I (20 min)、二甲苯 II (20 min)。

1.2.3 浸蜡 将经脱水透明后的标本在恒温水浴箱温度为 60~62 ℃ 时按照如下步骤浸蜡:熔点为 54~56 ℃ 石蜡(60 min),熔点为 56~58 ℃ 石蜡(60min),熔点为 58~60 ℃ 石蜡(60 min)。

1.2.4 包埋 (1)将打开的组织包埋盒置于自动组织包埋机操作台上。(2)打开包裹标本的纤维纸,将纤维纸整理平整平铺于包埋盒的底部。(3)确认微小鸡胚组织的头面部及所需包埋的方向后将组织面部朝向包埋盒的底部,此时纤维纸上粘附的蜡稍有凝固可将组织固定而使其不移动方向。(4)将显微镊尖端稍预热,沾取极少量的蜡液后迅速移至组织周围,融化部分组织底部蜡后轻轻夹持微小鸡胚组织上部的后脑部分,将组织提起和纤维纸分离。(5)在包埋模内注入蜡液(深度大约 4~5 mm,没过组织上 3 mm 为宜),显微镊垂直将组织轻轻放入蜡液内,维持数秒待蜡液稍凝结时松开显微镊,轻轻按压组织上部使其更加稳固地与蜡液底部接触,

微调左右倾斜方向使其无偏斜包埋。(6)待包埋模内蜡液凝固但不完全变硬时注入蜡液充满整个包埋模,记录编号贴好标签。(7)待蜡块完全凝固后置冰箱冷却后取出蜡块,包埋完毕。

2 结果

经过此方法包埋的鸡胚颅面部组织标本可以获得较好的颅面方向定位,较之前的包埋方法优势在于组织包埋后无漂浮,位置固定良好,包埋方向正确,无偏斜。石蜡组织切片完整无皱缩,贴片恰当,组织与石蜡接触良好,无分离现象,连续切片效果好。HE 染色后低倍镜下可见鸡胚颅面部两侧对称无偏斜,各部分结构清晰。眼、前脑、上颌突、下颌突等各部分突起清晰可见(图 3a)。高倍镜下观察组织细胞染色清晰,核质分明,细胞核无固缩,透明度高(图 3b)。

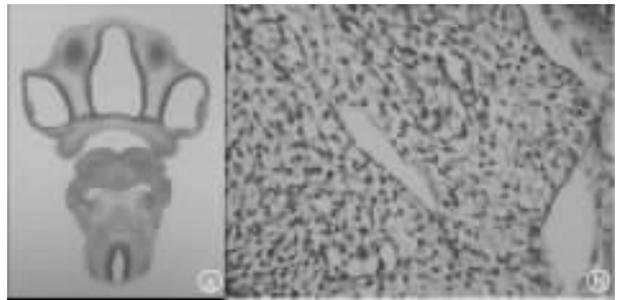


图 3 a: HH24 期鸡胚组织冠状切后 HE 染色(10×4)

b: HH24 期鸡胚组织冠状切后 HE 染色(10×40)

3 讨论

3.1 关于微小鸡胚组织颅面部定位包埋方法的研究,目前尚未介绍相关报道。本研究方法中从取材、固定、脱水透明、浸蜡到包埋每一步都至关重要,任何环节出现问题都将影响到制片的质量。取材是整个包埋过程中最关键的步骤。由于鸡胚组织在 24 期时标本较小(约 1~2 mm),因此必须在体式显微镜下采用显微镊操作,以免在操作过程中损伤组织标本。截取鸡胚组织颅面部时一定要熟悉此期鸡胚组织的解剖结构^[8]。鸡胚发育到此阶段时头部与身体呈卷曲状,鸡胚躯干将所需包埋面完全挡住,必须截取颅面部从而显露包埋面,而此时颅面部各突起比较接近,在截取时易于将下颌突以下截掉(如图 1 所示),导致切片后显示鸡胚颅面部下部缺失,因此应在下颌突以下截取(如图 2 所示)才能保持鸡胚颅面部的完整性。采用本研究的取材方法能够使组织标本完整无损伤,正确显露包埋面,以利于后续组织包埋。

3.2 固定液的选择及固定时间对标本也有一定的

影响^[9]。实验选用组织学与病理学中最常用的固定液(4%中性多聚甲醛磷酸盐固定液),此液体可迅速均匀地渗入组织细胞内,稳定细胞组织结构,保持细胞正常形态。传统的固定时间一般为3~24 h,本研究发现采用新鲜配制的4%中性多聚甲醛磷酸盐固定液,4~8 h组织固定完全,并且固定后能够保持一定的硬度和弹性,保存组织细胞内的抗原性,在以后的脱水、透明、浸蜡等过程中可以避免组织发生较大的扭曲和变形。

3.3 组织脱水及透明的时间也至关重要^[10]。乙醇脱水力强,在脱水中可继续硬化组织,是一种优良的脱水剂。但是高浓度的乙醇使组织强力收缩和过度硬化,导致制片失败,因此,在脱水过程中一般从低浓度乙醇开始,然后逐步递增其浓度。二甲苯对组织的透明力强、作用快。本研究发现采用上述方法脱水、透明后组织变形程度较大,组织较脆,切片时组织不完整。本研究在以前的研究基础上,经过多次实验研究,采用逐级脱水即可达到脱水要求,脱水后组织收缩较小,透明良好,浸蜡完全。透明过程中每步透明20 min后组织能够全部被二甲苯充分充填,硬度适宜,组织呈半透明状。

3.4 传统的石蜡包埋方法目前仍在使用,但此方法仅适用于较大的标本,随着内窥镜检查和吸针检查技术的发展,许多活检标本因体积微小在包埋过程中容易丢失、漂浮及出现组织深浅不一,因此这类标本不适用于传统的包埋方法。针对此种标本,赵晓东等^[11]采用伊红对标本染色,解决了微小组织不易识别和容易丢失的问题。Britten等^[12]采用树脂包埋技术,可以很好地避免了微小组织应用传统石蜡包埋方法的弊端。然而,本研究针对的是微小鸡胚组织颅面部,标本要求方向性十分严格,必须保持鸡胚组织的颅面部朝向包埋后的切片方向,任何偏斜移位都会导致后续的切片失败,因此上述此方法并不适合本研究标本。梁忠泉等^[13]采用石蜡预包埋方法包埋微小组织,此方法改进后可应用本研究标本,但是与本研究方法相比则操作较为繁复,且标本暴露时间较长、温度变化较大而导致组织易变干变脆,不利于后期组织切片。经多次反复实验研究,我们探索出了适合此类微小组织且具有较好组织标本方向定位的包埋方法。

3.5 综上所述,采用本研究方法不仅可使微小鸡胚颅面部无损伤,而且能够按照所需的方向包埋。包埋后的组织利于组织切片、染色和后续实验操作。该操作技术步骤简单、操作便捷、易掌握,为以微小鸡胚颅面部组织为模型的研究提供了良好的实验技术方法。

参考文献

- 1 Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008,130(6):1119-1130.
- 2 Samkoe KS, Clancy AA, Karotki A, et al. Complete blood vessel occlusion in the chick chorioallantoic membrane using two-photon excitation photodynamic therapy: implications for treatment of wet age-related macular degeneration [J]. *J Biomed Opt*, 2007, 12(3): 034025.
- 3 Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane(CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2007,59(11):1162-1176.
- 4 Sakuta H, Suzuki R, Noda M. Retrovirus vector-mediated gene transfer into the chick optic vesicle by in ovo electroporation [J]. *Dev Growth Differ*,2008,50(6):453-457.
- 5 Sweetman D, Rathjen T, Jefferson M, et al. FGF4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos[J]. *Dev Dyn*,2006,235(8):2185-2191.
- 6 Song Y, Hui JN, Fu KK, et al. Control of retinoic acid synthesis and FGF expression in the nasal pit is required to pattern the craniofacial skeleton[J]. *Dev Biol*,2004,276(2):313-329.
- 7 Higashihori N, Song Y, Richman JM. Expression and regulation of the decoy bone morphogenetic protein receptor BAMBI in the developing avian face[J]. *Dev Dyn*,2008,237(5):1500-1508.
- 8 Ruth B, Mark O. The atlas of chick development[M]. Academic Press,2005:273-284.
- 9 Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques[M]. Ancienne Edition,2008:324-326.
- 10 王伯运,李玉松,黄高昇,等.病理学技术[M].北京:人民卫生出版社,2000:77-80.
- 11 赵晓东,舒红,姜卫国,等.微小活检组织的石蜡包埋及切片的制作方法[J].中国医科大学学报,2010,39(1):76-77.
- 12 Britten KM, Howarth PH, Roche WR. Immunohistochemistry on resin sections;a comparison of resin embedding techniques for small mucosal biopsies[J]. *Biotech Histochem*,1993,68(5):271-280.
- 13 梁忠泉,袁昌隆,刘梦海.微小组织预包埋技术[J].临床军医杂志,2006,34(3):369-370.

[收稿日期 2013-01-15][本文编辑 刘京虹 吕文娟]