

脊髓组织存放时间对冰冻组织切片免疫荧光的影响*

何祥¹, 胡悦², 蒋玲¹, 刘树春¹

(1. 贵州省人民医院 麻醉科, 贵州 贵阳 550002; 2. 成都市双流区第一人民医院 麻醉科, 四川 成都 610200)

[摘要] 目的: 研究脊髓组织在4%多聚甲醛固定液中的存放时间对冰冻切片抗原 NeuN 表达的影响。方法: 固定于4%多聚甲醛中1年、3月、2月、1月、2周、1周及24 h的脊髓组织, 在相同的条件下制作冰冻切片, 通过对神经元核抗原(NeuN)的免疫荧光的检测, 观察脊髓组织标本在4%多聚甲醛中的固定时间对 NeuN 表达的影响。结果: 在脊髓前角 NeuN 的表达中, 组织固定1月、2月、3月及1年的 NeuN 阳性率与新鲜标本及组织固定1周、2周比较呈现显著性下降($P < 0.05$); 在脊髓后角 NeuN 的表达中, 组织固定2月、3月及1年的 NeuN 阳性率与新鲜标本相比呈现显著性下降($P < 0.05$), 同时组织固定1年的 NeuN 阳性率与组织固定1周相比也呈现显著性下降($P < 0.05$); 在脊髓中央管 NeuN 的表达中, 组织固定3月、1年的 NeuN 阳性率与新鲜标本及组织固定1周相比呈现显著性降低($P < 0.05$), 在脊髓组织整体 NeuN 的表达中, 组织固定3月及1年的 NeuN 阳性率与新鲜标本及组织固定1周、2周比较呈现显著性下降($P < 0.05$), 同时组织固定2月与新鲜组织及组织固定1周比较呈现显著性下降($P < 0.05$)。结论: 在同样的环境和条件下, 冰冻切片的组织标本越新鲜, 其抗原的表达越强。

[关键词] 冰冻切片术; 免疫荧光测定; 脊髓, 组织

[中图分类号] R329.2; R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)09-1007-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.09.004

Effect of Storage Time of Spinal Cord Tissue on Immunofluorescence of Frozen Tissue Sections

HE Xiang¹, HU Yue², JIANG Ling¹, LIU Shuchun¹

(1. Department of Anesthesiology, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Shuangliu, Chengdu 610200, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of storage time of spinal cord tissue in 4% paraformaldehyde fixation solution on the expression of antigens NeuN in frozen sections. **Methods:** Spinal cord tissues fixed at 4% paraformaldehyde for 1 year, 3 months, 2 months, 1 week and 24 h were made into frozen sections under the same conditions. The effect of fixed time of spinal cord tissue in 4% paraformaldehyde on the expression of (NeuN) was observed by immunofluorescence detection of neuronal nuclear antigen (NeuN). **Results:** In the expression of NeuN of the anterior horn of spinal cord, the positive rate of NeuN in tissue fixed for 1 month, 2 months, 3 months and 1 year was significantly lower than that of fresh specimen and tissue fixation for 1 week and 2 weeks ($P < 0.05$). In the expression of NeuN of the posterior horn of spinal cord, the positive rate of NeuN in tissue fixed for 2 months, 3 months and 1 year was significantly lower than that of fresh specimens ($P < 0.05$). At the same time, the positive rate of NeuN in 1 year of tissue fixation was significantly lower than that of 1 week of tissue fixation ($P < 0.05$). In the expression of NeuN of the central canal of spinal cord, the positive rate of NeuN in tissue fixed for 3 months and 1 year was significantly lower than that in fresh specimens and tissue fixation for 1 week ($P < 0.05$). In the expression of NeuN of spinal cord tissue as a whole, the positive rate of NeuN in tissue fixed for 3 months and 1 year was significantly lower than that in

*[基金项目] 贵州省卫计委科学技术基金项目(gzwbkj2018-1-018)

网络出版时间: 2018-09-20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180920.1149.022.html>

fresh specimen and tissue fixation for 1 week and 2 weeks ($P < 0.05$). At the same time, two months of tissue fixation showed a significant decrease compared with fresh tissue and tissue fixation for 1 week ($P < 0.05$). **Conclusion:** Under the same environment and conditions, the fresher the frozen sections are, the stronger the antigen expression is.

[**Key words**] frozen section; immunofluorescence; spinal cord, tissue

冰冻切片是一种在低温条件下使组织快速冷却到一定硬度,然后进行切片的方法,常用于术中病理诊断依据^[1-4]。与石蜡切片相比,冰冻切片的制作不经脱水、透明、浸蜡等步骤,对组织抗原的破坏性小,具有方便快捷等优点,常用于免疫组织化学、免疫定位、原位杂交等研究。组织在冷冻过程中,由于含水量、冷冻时间及温度等的影响,制作的冰冻切片可发生冰晶形成、切片皱褶、切片脱落、染色欠佳等问题,组织标本存放条件也会对组织内的抗原产生一定影响。本实验着重研究组织切片存放条件对免疫荧光检测抗原的影响,为制作高质量的冰冻切片提供实验依据。如今,在脑和脊髓组织的冰冻切片制作时,常常使用4%多聚甲醛固定后再经梯度蔗糖脱水后进行冰冻切片^[5-8],然而,组织存放在多聚甲醛里的时间,以及切好的冰冻切片存放时间对其抗原表达是否会有影响,还未见过具体报道,因而,本实验探索组织存放最佳时间对提高冰冻切片质量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与分组

健康成年SD大鼠T10~T12段脊髓标本,根据在4%多聚甲醛中固定时间分为1年组、3月组、2月组、1月组、2周组、1周组及新鲜组(3 d内),共7组($n=6$)。

1.2 方法

1.2.1 取材与固定 SD大鼠用生理盐水100 mL心脏灌注至无血后,继以4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定、取材,组织块换至新鲜固定液。将脊髓从固定液中取出,换至10%蔗糖溶液中浸泡24 h,沉底后换至20%的蔗糖溶液中浸泡24 h,沉底后换至30%的蔗糖溶液中浸泡24 h。

1.2.2 包埋 从冰冻机中取出包埋托,除净表面冰霜,用干纱布擦干,滴加0.3 cm厚包埋剂,然后将取材的组织放在包埋剂上。包埋后在组织周围进一步补充包埋剂,尽量将组织包在其中。将包埋好的组织放入冰冻机的冷冻台上冷冻。根据脊髓

组织将温度控制在 $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。组织冻好后,进行切片、贴片。切片厚度为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。切好的切片放入 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温烤箱中2 h烤干,备用。

1.2.3 免疫荧光 将组织用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,每次5 min,滴入5%正常山羊血清,置入湿盒中孵育30 min,加入一抗NeuN抗体(中杉金桥,ZM0352) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h,PBS漂洗3次,每次5 min。之后滴入山羊抗小鼠二抗工作液Cy3-594(jackson,115-165-146), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1 h,PBS漂洗3次,每次5 min;阴性对照不加一抗。DAPI复染细胞核,置于荧光显微镜下观察并拍照(Leica AF6000 cell station)。将细胞核(DAPI染色,蓝色荧光)和神经元胞体(NeuN染色,红色荧光)分别拍照,然后叠加上述图片得到重叠图片(Merged),用于计数NeuN阳性表达细胞。

1.3 统计学分析

采用免疫荧光定量分析,NeuN阳性率=NeuN阳性表达的细胞数/细胞总数(%),其中计数细胞核(DAPI染色)个数为细胞总数。采用单因素方差分析,对1年、3月、2月、1月、2周、1周及新鲜(3 d内)的脊髓标本中免疫荧光NeuN阳性率进行统计分析,结果以均数 \pm 标准差表示。应用SPSS 20.0统计软件进行统计学处理,计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脊髓前角NeuN阳性率

随着组织固定时间的延长,大鼠脊髓前角NeuN阳性率有逐渐下降趋势($P < 0.05$),见表1。与新鲜标本比较,组织固定1月、2月、3月及1年的NeuN阳性率下降;与组织固定1周相比,组织固定1月、2月、3月及1年的NeuN阳性率下降;与组织固定2周相比,组织固定1月、2月、3月及1年的NeuN阳性率下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);组织固定1周、2周及新鲜标本之间的NeuN阳性率比较无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

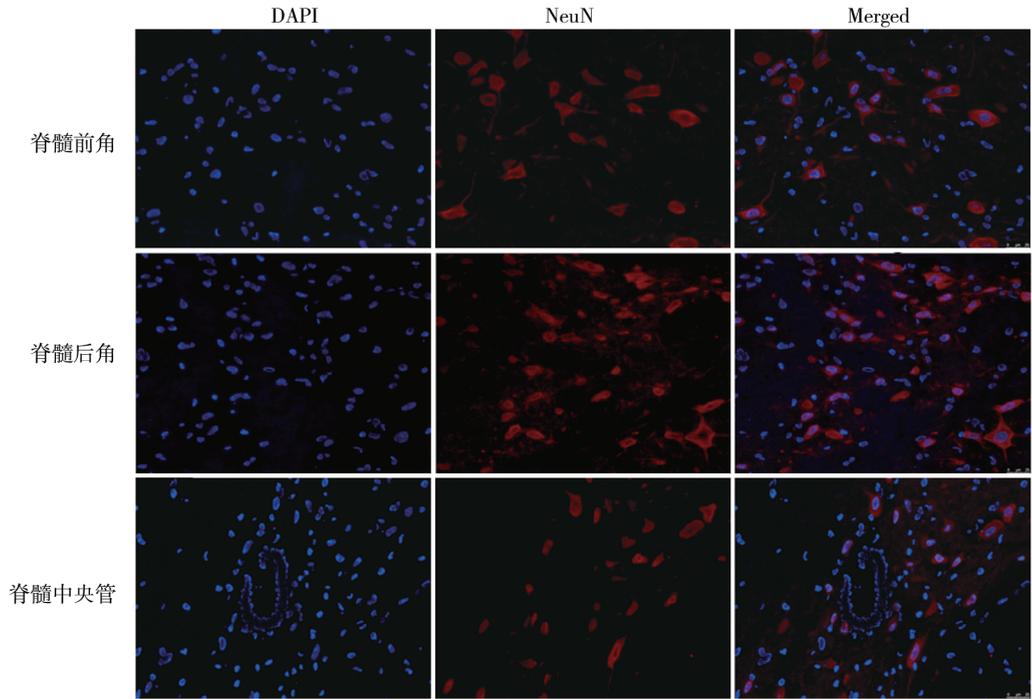


图 1 不同部位脊髓组织标本 NeuN 阳性率

Fig. 1 Positive rate of NeuN in different parts of spinal cord

2.2 脊髓后角 NeuN 阳性率

由表 1 可见,随着组织固定时间的延长,大鼠脊髓后角 NeuN 阳性率有逐渐下降趋势 ($P < 0.05$)。与新鲜标本比较,组织固定 2 月、3 月及 1 年的 NeuN 阳性率下降;与组织固定 1 周比较,组织固定 1 年的 NeuN 阳性率下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);其余各组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.3 脊髓中央管 NeuN 阳性率

表 1 可见,随着组织固定时间的延长,大鼠脊髓中央管 NeuN 阳性率有逐渐下降趋势 ($P < 0.05$)。与新鲜标本比较,组织固定 3 月及 1 年的 NeuN 阳性率下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

与组织固定 1 周比较,组织固定 3 月及 1 年的 NeuN 阳性率下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);其余各组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.4 脊髓总 NeuN 阳性率

随着大鼠脊髓组织固定时间的延长,组织中 NeuN 阳性率逐渐下降 ($P < 0.05$)。与新鲜标本比较,组织固定 2 月、3 月及 1 年的 NeuN 阳性率下降;与组织固定 1 周比较,组织固定 2 月、3 月及 1 年的 NeuN 阳性率下降;与组织固定 2 周相比,组织固定 3 月及 1 年的 NeuN 阳性率下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);其余各组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。此外,实验中还发现,1 年的标本其组织完整性差,破损严重。

表 1 不同固定时间大鼠脊髓组织中 NeuN 阳性率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Positive rate of NeuN in spinal cord of rats at different fixation time

组别	脊髓前角	脊髓后角	脊髓中央管	脊髓组织
1 年组	7.679 2 ± 1.836 8 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	10.159 2 ± 3.134 9 ⁽¹⁾⁽²⁾	8.523 1 ± 0.877 8 ⁽¹⁾⁽²⁾	8.714 2 ± 1.665 1 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
3 月组	9.222 9 ± 1.694 0 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	19.113 9 ± 0.871 1 ⁽¹⁾	13.927 4 ± 2.825 7 ⁽¹⁾⁽²⁾	14.467 2 ± 1.003 5 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
2 月组	12.674 0 ± 1.081 8 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	19.951 4 ± 2.364 2 ⁽¹⁾	15.789 1 ± 5.282 9	16.895 3 ± 2.011 7 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
1 月组	11.823 5 ± 2.331 0 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	20.276 3 ± 11.658 8	18.200 2 ± 13.305 4	17.354 1 ± 4.921 7
2 周组	20.662 2 ± 1.236 9	33.846 6 ± 6.672 3	18.122 6 ± 2.135 4	26.367 4 ± 2.469 1
1 周组	23.310 8 ± 1.823 6	38.812 4 ± 4.013 0	26.160 1 ± 2.712 2	30.991 7 ± 1.932 7
新鲜组	22.722 2 ± 4.212 8	31.306 1 ± 2.378 7	27.150 5 ± 4.786 3	27.242 4 ± 1.576 9

⁽¹⁾与新鲜组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 1 周组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与 2 周组比较, $P < 0.05$

3 讨论

冰冻切片是一种借助低温冷冻快速将活体组织冻结至一定硬度,然后进行切片的病理实验技术,目前常用于临床病理诊断中。同时,冰冻切片由于其抗原破坏性小,组织无明显收缩,保存了脂肪、类脂及各种酶的活性、灵敏性高^[9],在免疫组化/荧光实验中也广泛被应用,在科研实验中有着不可取代的地位。要制作高质量的冰冻切片,需要在取材、冰冻、切片及染色的每一个环节都充分掌握其技术要领,控制好各个操作步骤。冰冻切片质量的好坏直接影响实验结果,因此,制作高质量的冰冻切片是获得优质实验结果的关键。

免疫组化/荧光成败的关键因素之一是抗原决定簇是否充分暴露,经甲醛固定的组织常引起蛋白质空间结构的改变而导致抗原决定簇的封闭。多聚甲醛属甲醛低分子聚合物,它在组织固定过程中与蛋白多肽链氨基酸侧链的功能基团,使蛋白多肽分子间形成醛键,蛋白质不再发生改变,保存原位,使得大多数抗原决定簇被封闭^[10]。1982年 Mullen^[11]等首次发现对神经元特异的单克隆抗体,将该抗原命名为 NeuN (neuron-specific nuclear protein)。目前,该抗体广泛用于神经生物学、发育生物学、干细胞研究等领域的研究。NeuN 是一种可溶性核蛋白,其免疫反应在神经元分化成熟后即开始出现,特异性结合 NeuN 的单克隆抗体可以与脊椎动物神经系统几乎所有部位的成熟神经细胞核发生免疫反应,包括脊髓、大脑皮质、海马等^[12-17]。由于 NeuN 可以作为胚胎和成年动物的中枢和周围神经系统中神经元的识别标志^[18,19],因此,本实验使用 NeuN 的抗原表达情况来检测冰冻切片组织固定时间对抗原的破坏程度。本实验发现,随着脊髓组织固定时间的延长,其抗原表达下降,尤其是脊髓前角。研究显示,多聚甲醛质量分数越大,固定时间越久,对组织的固定收缩作用越强,对组织的损伤越大^[20]。本实验通过对比组织固定时间,发现被封闭的抗原决定簇随着时间的增加而增加,从而使冰冻切片免疫荧光抗原表达下降,进而证明了用于冰冻切片的组织标本不宜在固定液中太长时间。

综上,本实验研究结果表明,制作优质的脊髓组织冰冻切片,在 4% 多聚甲醛固定液中固定一月以内,进行免疫荧光染色,效果较好。

4 参考文献

- [1] PRAYSON R A. Accuracy of frozen section in determining meningioma subtype and grade[J]. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2018, 35.
- [2] ABBAS S A, IKRAM M, TARIQ M U, et al. Accuracy of frozen sections in oral cancer resections, an experience of a tertiary care hospital[J]. *Jpma the Journal of the Pakistan Medical Association*, 2017, 67(5): 806.
- [3] PARK J Y, LEE S H, KIM D, et al. Clinicopathologic factors that influence the use and accuracy of frozen section diagnosis for mucinous ovarian tumors[J]. *Gynecologic Oncology*, 2016, 141: 56-56.
- [4] WANG X, LI J, FAN Y, et al. Analysis of factors affecting the results of frozen section examination in breast cancer[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2017, 12(4):473-476.
- [5] LIU W, TIAN F, KURATA T, et al. Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice[C]. 2nd international neural regeneration symposium, 2012:1183.
- [6] HAN S, ARNOLD S A, SITHU S D, et al. Rescuing vasculature with intravenous angiopoietin-1 and $\alpha v\beta 3$ integrin peptide is protective after spinal cord injury[J]. *Brain*, 2010, 133(4):1026-1042.
- [7] BARBOUR H R, PLANT C D, HARVEY A R, et al. Tissue sparing, behavioral recovery, supraspinal axonal sparing/regeneration following sub-acute glial transplantation in a model of spinal cord contusion[J]. *BMC neuroscience*, 2013, 14(1):106.
- [8] MURADOV J M, HAGG T. Intravenous infusion of magnesium chloride improves epicenter blood flow during the acute stage of contusive spinal cord injury in rats[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2013, 30(10):635-640.
- [9] PORTIANSKY E, BARBEITO C, EJ, ZUCCOLILLI G, et al. Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging[J]. *Experimental Neurology*, 2006, 202(2):519-521.
- [10] 郝瑗. 化妆品防腐剂中的甲醛和多聚甲醛[J]. *中国化工贸易*, 2011, 03(10):105-105.
- [11] HANDMAN E, HOCKING R E. Stage-specific, strain-specific, and cross-reactive antigens of *Leishmania* species identified by monoclonal antibodies[J]. *Infection & Immunity*, 1982, 37(1):28.
- [12] MULLEN R J, BUCK C R, SMITH A M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates[J]. *Development*, 1992, 116(1): 201-211.

- [13] HUTTNER H B, BERGMANN O, SALEHPOUR M, et al. The age and genomic integrity of neurons after cortical stroke in humans[J]. *Nature Neuroscience*, 2014, 17(6): 801–803.
- [14] MAXEINER S, GLASSMANN A, KAO H T, et al. The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron-specific splicing regulator, Rbfox3[J]. *Histochemistry & Cell Biology*, 2014, 141(4): 43–55.
- [15] SOYLEMEZOGLU F, ONDER S, TEZEL G G, et al. Neuronal nuclear antigen (NeuN): A new tool in the diagnosis of central neurocytoma[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2003, 199(7): 463–468.
- [16] SARNAT H B, NOCHLIN D, BORN D E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system[J]. *Brain Dev*, 1998, 20(2): 88–94.
- [17] WOLF H K, BUSLEI R, SCHMIDTKASTNER R, et al. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1996, 44(10): 1167–1171.
- [18] KORZHEVSKII D ě, GILEROVICH E G, ZIN' KOVA N N, et al. Immunocytochemical detection of brain neurons using the selective marker NeuN[J]. *Neuroscience & Behavioral Physiology*, 2006, 36(8): 857–859.
- [19] MORIN L P, HEFTON S, STUDHOLME K. Neurons Identified by NeuN/Fox-3 immunoreactivity have a Novel Distribution in the Hamster and Mouse Suprachiasmatic Nucleus[J]. *Brain Research*, 2011, 1421(1): 44–51.
- [20] 李晶晶, 朱鸿, 施彩虹. 三种方法对大鼠视网膜固定效果的比较研究[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2011, 31(8): 1105–1107.
(2018-06-15 收稿, 2018-08-23 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 乐 萍

(上接第 1006 页)

- [13] 张敏, 李莉, 黄家宇, 等. 腺苷蛋氨酸配伍美洛昔康治疗膝骨关节炎的实验研究[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(18): 2142–2146, 2152.
- [14] ATTUR MG, DAVE M, CIPOLLET TA, et al. Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor-Potential for pharmacological intervention[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(51): 40307–40315.
- [15] 张敏. 一种治疗骨性关节炎的复方制剂的研究与开发[D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2016.
- [16] 伍胤杰, 李传印, 张光贤, 等. 肠道病毒 71 型灭活疫苗生产中氢氧化铝佐剂制备工艺优化[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(9): 1022–1027.
- [17] 吴朝花, 姜丰, 苏菊, 等. 氧化苦参碱微球体外累积释放百分率的影响因素[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(6): 674–678.
(2018-07-12 收稿, 2018-08-26 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 冉海勇