

用改进石蜡切片法观察大鳞副泥鳅皮肤虹彩细胞

欧志杰 边芳芳 杨瑞斌 杨学芬

华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室/
淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,武汉 430070

摘要 以大鳞副泥鳅为研究对象,针对常规石蜡切片无法观察到鱼类皮肤虹彩细胞的不足,固定液改用10%中性福尔马林,脱水前使用1.5%琼脂糖对组织进行预处理,染色使用3%伊红。结果发现:大鳞副泥鳅新鲜皮肤组织选用10%中性福尔马林进行固定,在梯度脱水前用1.5%琼脂糖对组织进行预处理,并用3%伊红进行染色,即可以得到组织结构完整、虹彩细胞清晰的皮肤组织切片。表明改进后的石蜡切片法可以用于鱼类皮肤虹彩细胞观察。

关键词 石蜡切片;大鳞副泥鳅;皮肤;虹彩细胞;方法改进

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0121-05

色素细胞是包含色素颗粒以及反光物质的一类细胞,它们广泛分布于鱼类、两栖动物以及爬行动物等脊椎动物的皮肤中^[1-3],鱼类的色素细胞分成4类:黑色素细胞、黄色素细胞、红色素细胞以及虹彩细胞^[4]。目前国内外有关鱼类皮肤虹彩细胞的分布多从电镜水平进行观察^[3,5],却少有通过组织切片对鱼类皮肤虹彩细胞的分布进行观察的报道。此外,在采用常规石蜡切片观察鱼类皮肤色素细胞种类和分布的研究中,虽然可以看到黑色素细胞,却无法观察到虹彩细胞及其数量分布。这可能是作为虹彩细胞胞体内反光板主要成分的鸟嘌呤溶于弱酸和弱碱^[6-7],导致了虹彩细胞结构的破坏。笔者以大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)为对象,通过对常规石蜡切片方法进行改进,优化出一种能够用于鱼类皮肤虹彩细胞观察的石蜡切片技术,旨在为后续鱼类皮肤色素细胞的形态及分布规律研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用15尾野生大鳞副泥鳅来源于湖北省黄石市阳新北煞湖。平均体质量为(12.51±2.40)g,平均体长为(11.59±0.74)cm。试验开始

前用MS-222(280 mg/L)对大鳞副泥鳅进行麻醉后取背部皮肤,组织大小约1 cm×1 cm×(0.2~0.3)cm,取样后经固定液固定后用于石蜡切片,切片厚度6 μm,所得切片最后用组织切片扫描仪(Panoramic MIDI)进行扫描,虹彩细胞的细节则在油镜下用荧光显微镜(Imager A2)进行显微摄影观察。

1.2 常规石蜡切片

3尾鱼的背部皮肤用于常规石蜡切片,具体操作过程参考王伯沄^[8]操作规程。

1.3 固定液的选择

上述常规石蜡切片中无法观察到虹彩细胞的分布,推测是由于固定过程中鸟嘌呤溶解于偏酸性的Bouin液中。因此,本试验改用10%中性福尔马林对3尾鱼的背部皮肤进行固定,固定的时间和后续的脱水、透明、浸蜡操作以及染色过程均和常规石蜡切片一致。

1.4 用伊红染液对切片进行染色

用10%中性福尔马林固定的皮肤组织所制得的切片可以观察到类似虹彩细胞的细胞形态,但却被苏木精染成类似细胞核一样的紫蓝色,无法区分是细胞核还是虹彩细胞,因此,切片用常规伊红进行染色。具体的染色过程如下:二甲苯Ⅰ脱蜡10 min→二甲苯Ⅱ脱蜡5 min→无水乙醇洗去二甲

收稿日期:2018-02-01

基金项目:农业部财政专项“西藏重点水域渔业资源与环境调查”;农业公益性行业专项(201403012)

欧志杰,硕士研究生。研究方向:鱼类生态学。E-mail: 935105073@qq.com

通信作者:杨瑞斌,博士,副教授。研究方向:水产健康养殖。E-mail: rbyang@mail.hzau.edu.cn

苯 1 min × (2 次) → 95% 乙醇 1 min → 90% 乙醇 1 min → 85% 乙醇 1 min → 自来水洗 2 min → 伊红染色 30 s → 自来水洗 30 s → 85% 乙醇脱水 20 s → 90% 乙醇 30 s → 95% I 乙醇 1 min → 95% II 乙醇 1 min → 无水乙醇 I 2 min → 无水乙醇 II 2 min → 二甲苯 I 2 min → 二甲苯 II 2 min → 二甲苯 III 2 min → 中性树脂封片。

1.5 用稀释的伊红染液对切片进行染色

切片在伊红染色后可以观察到虹彩细胞,但由于着色太深,无法清晰地观察其分布特征。因此,试验在本文“1.4”所使用的常规伊红染液的基础上用95%乙醇进行稀释。试验设置了7个不同体积分数的伊红染液:80%(即95%乙醇与常规伊红染液的体积比是2:8,后面的体积分数以此类推)、40%、20%、10%、5%、3%、1%。然后用7个不同体积分数的伊红对切片进行染色,具体的染色过程参照本文试验“1.4”。

1.6 脱水前的组织预处理

皮肤组织切片3%伊红染色后,可以清晰地观察到虹彩细胞,但由于组织收缩卷曲、碎裂,无法很好地观察到虹彩细胞在皮肤的分布。因此,试验在组织梯度脱水前,对9尾被10%中性福尔马林固定过的大鳞副泥鳅的背部皮肤用1.5%琼脂糖进行包埋,然后切成小粒(厚度约0.4~0.5 cm)。由于厚度变厚,需要对脱水和浸蜡时间进行调整,调整的方法参考王伯云^[8]对于厚度0.4~0.5 cm的组织所设置的一般脱水和浸蜡时间范围。同时,为了进一步探索出鱼类皮肤合适的脱水和浸蜡时间,又在该时间范围内设置了3个处理组,每个处理组3尾鱼:80%乙醇、95%乙醇I和II、100%乙醇I和II(①每一步均为120 min;②每一步均为180 min;③每一步均为240 min)→二甲苯I 60 min → 二甲苯II 60 min → 蜡I(①60 min;②90 min;③120 min) → 蜡II(①120 min;②180 min;③240 min) → 包埋。切片的染色过程参考本文试验“1.4”,使用体积分数为3%伊红对切片进行染色。

1.7 对比虹彩细胞在改进前后的观察效果

分别对3尾通过常规石蜡切片法以及方法改进后所制作的大鳞副泥鳅背部皮肤切片中可观察到的虹彩细胞数量进行计数。每尾鱼连续选取5张背部皮肤切片,每张切片在20×10倍放大倍数下随机选取6个视野,然后对每个视野中的虹彩细胞数量进行计数。利用SPASS 24对改进前后统计的虹彩细胞数量进行单因素方差分析,设定差异性显著水平

为0.05。

2 结果与分析

2.1 石蜡切片观察结果

通过常规石蜡切片所得到的大鳞副泥鳅皮肤切片,能够清晰地辨别出分布在表皮层的黏液细胞的细胞核、细胞质以及其细胞形态(图版I-1)。此外,分布在真皮层的黑色素细胞也能被清楚地辨别,然而却无法从皮肤中看见虹彩细胞的细胞轮廓及其分布位置(图版I-14)。

2.2 固定液对虹彩细胞观察的影响

试验用鱼类皮肤组织学观察常用固定液—10%中性福尔马林对鱼类皮肤进行固定,然后进行石蜡切片。结果显示,在大鳞副泥鳅的真皮层中出现类似虹彩细胞的细胞轮廓,但却被苏木精染成类似细胞核一样的紫蓝色(图版I-2),无法区分是细胞核还是虹彩细胞。

2.3 用伊红染液对虹彩细胞观察的影响

皮肤切片经过常规伊红染液进行染色后,可以看见虹彩细胞的细胞形态,但由于着色过深,其细胞膜和细胞质均被染色,因此,不易看清虹彩细胞在皮肤的分布(图版I-3、I-15)。

2.4 不同体积分数的伊红对虹彩细胞观察的影响

使用不同体积分数的伊红进行染色后,观察到随着伊红体积分数的逐渐降低,皮肤切片中的虹彩细胞的细胞轮廓逐渐清晰(图版I-4~10)。但用1%伊红对切片进行染色时,由于体积分数过低,不易区分皮肤的各层结构,因此,不利于观察虹彩细胞在皮肤的分布。然而,当切片用3%伊红进行染色时,不但能够清晰地看见虹彩细胞,而且还能分清皮肤的各层结构。

2.5 脱水前的组织预处理对组织结构完整性的影响

10%中性福尔马林固定的鱼类皮肤,经乙醇脱水后都出现不同程度的收缩卷曲和碎裂(图版I-2~10),从而影响了虹彩细胞在皮肤的分布观察。因此,为了保持皮肤原有的形态,试验用1.5%琼脂糖对组织进行包埋,并进一步探究了该鱼类皮肤的最适脱水和浸蜡时间。结果表明,大鳞副泥鳅的皮肤组织在处理组②和③表现出不同程度的收缩和碎裂(图版I-11~12)。然而,在处理组①,即在80%乙醇、95%乙醇I和II、100%乙醇I和II分别梯度脱水120 min,然后在二甲苯I和二甲苯II分别透明60 min,最后蜡I浸蜡60 min,蜡II浸蜡120

min,能够得到组织结构完整,虹彩细胞清晰的皮肤切片(图版Ⅰ-13、Ⅰ-16)。

2.6 对比虹彩细胞在方法改进前后的观察效果

为了进一步对比虹彩细胞在方法改进前后的观察效果,本试验分别对使用常规石蜡切片法以及改进石蜡切片法制作的大鳞副泥鳅背部皮肤切片中的虹彩细胞数量进行了生物统计。结果表明,常规石蜡切片法和改进石蜡切片法可观察到的虹彩细胞平均数量分别为 0 ± 0 、 29 ± 4.80 个,改进后的方法相对于常规方法在可观察的虹彩细胞数量方面差异显著($P<0.05$)。因此,改进后的方法相对常规方法在观察虹彩细胞方面具有明显的优点。

3 讨 论

3.1 常规石蜡切片观察鱼类皮肤虹彩细胞的不足

本试验通过对大鳞副泥鳅皮肤进行常规石蜡切片,虽然能够在光镜下清晰地观察到黑色素细胞在真皮层的分布以及表皮黏液细胞的显微结构,但是却无法从切片中观察到虹彩细胞,这可能与皮肤组织在长时间固定过程中,虹彩细胞胞体内的鸟嘌呤溶解于偏酸性的Bouin液中,从而在胞内形成了空洞,并且在后续的HE染色过程中伊红染料充满了整个细胞质,以致无法从被染成红色的纤维结缔组织中辨别出来。

3.2 染液种类的选择及其浓度对虹彩细胞观察的影响

使用10%中性福尔马林对鱼类皮肤进行固定,虽然可以在切片中观察到类似虹彩细胞的细胞形态,但由于其被苏木精染成类似细胞核一样的紫蓝色,因此无法区分是细胞核还是虹彩细胞,这可能是因为鸟嘌呤作为核酸组成单位的基本成分之一^[9],同样具有和碱性染料结合的性质,因此也能够被苏木精染成紫蓝色。

当皮肤切片用常规的伊红染液进行染色时,虽能看到虹彩细胞的细胞轮廓,但由于着色太深,并不能看清虹彩细胞在皮肤的分布,这可能是由于虹彩细胞的细胞膜和细胞质着色过深,掩盖了反光板所反射出的银光,从而影响了虹彩细胞的观察。然而当切片使用浓度降低的伊红进行染色时,虹彩细胞的细胞形态逐渐变得清晰,这可能是由于虹彩细胞胞体内反光板所反射出的银光亮度超过了细胞膜和细胞质的着色深度,从而提高了皮肤虹彩细胞的清晰度。

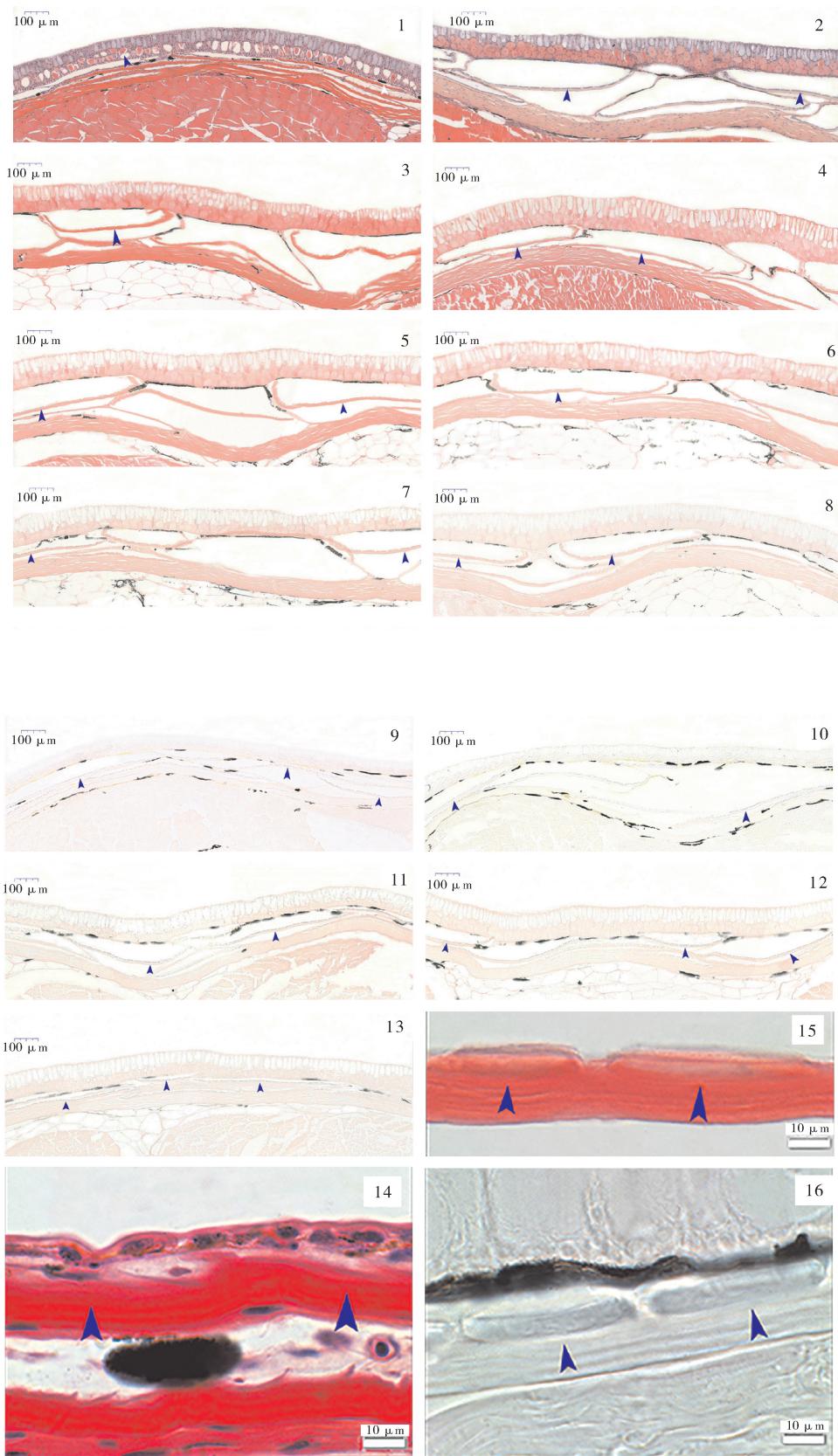
3.3 脱水前的预处理对组织完整性的影响

10%中性福尔马林固定的鱼类皮肤,试验都出现了不同程度的收缩卷曲和组织碎裂,这可能是因为甲醛水溶液渗透能力强,经乙醇脱水后会导致明显的组织收缩^[10],此外,脱水和浸蜡时间也可能影响皮肤结构的完整性。固定的皮肤组织经1.5%琼脂糖进行包埋后,然后按照处理组①的脱水和浸蜡时间进行操作,最后可以得到虹彩细胞清晰、结构完整的皮肤切片。然而,当按照处理组②和③的脱水和浸蜡时间进行操作时,大鳞副泥鳅的皮肤出现不同程度的收缩、碎裂,这可能是因为乙醇的穿透速度快,对组织有较明显的收缩和脆化作用,此外,浸蜡时间过长,也容易造成组织块脆硬^[10],因此,合理控制组织的脱水和浸蜡时间有利于虹彩细胞分布位置的观察。

本试验通过选用10%中性福尔马林对组织进行固定、脱水前用1.5%琼脂糖对组织进行预处理,以及使用3%的伊红对切片进行染色,从而有效地观察鱼类皮肤虹彩细胞。改进后的组织切片方法,有助于鱼类皮肤色素细胞特别是虹彩细胞的形态及分布规律研究。

参 考 文 献

- [1] KINDERMANN C, HERO J M. Pigment cell distribution in a rapid colour changing amphibian (*Litoria wilcoxii*) [J]. *Zoomorphology*, 2016, 135(2): 1-7.
- [2] KURIYAMA T, MIYAJI K, SUGIMOTO M, et al. Ultrastructure of the dermal chromatophores in a lizard (Scincidae: *Plestiodon latiscutatus*) with conspicuous body and tail coloration [J]. *Zoological science*, 2006, 23(9): 793-799.
- [3] ZARNESCU O. Ultrastructure of the skin melanophores and iridophores in paddlefish, *Polyodon spathula* [J]. *Micron*, 2007, 38(1): 81-84.
- [4] 谢从新.鱼类学[M].北京:农业出版社,2010:33-35.
- [5] HIRATA M, NAKAMURA K, KANEMARU T, et al. Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish [J]. *Developmental dynamics an official publication of the American association of anatomists*, 2003, 227(4): 497-503.
- [6] ROHRLICH S T, RUBIN R W. Biochemical characterization of crystals from the dermal iridophores of a chameleon *Anolis carolinensis* [J]. *Journal of cell biology*, 1975, 66(3): 635-645.
- [7] 顾翼东.化学词典[M].2版.上海:上海辞书出版社,2003:237.
- [8] 王伯泓.病理学技术[M].北京:人民卫生出版社,2000:61-95.
- [9] 王镜岩.生物化学(上)[M].北京:高等教育出版社,2002:478-481.
- [10] 刘世新.实用生物组织学技术[M].北京:科学出版社,2004:52-56.



图版 I Plate I

1. 皮肤中的黏液细胞(蓝色箭头)和黑色素细胞(白色箭头) 100×
2. 类似于虹彩细胞的细胞轮廓(蓝色箭头) 100×
3. 常规伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
4. 80%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
5. 40%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
6. 20%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
7. 10%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
8. 5%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
9. 3%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
10. 1%伊红染色下的虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
11. 经处理组③处理后的皮肤虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
12. 经处理组②处理后的皮肤虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
13. 经处理组①处理后的皮肤虹彩细胞(蓝色箭头) 100×
14. 无法观察到虹彩细胞的皮肤切片 1 000×
15. 细胞膜和细胞质着色过深的虹彩细胞(蓝色箭头) 1 000×
16. 皮肤切片中清晰的虹彩细胞(蓝色箭头) 1 000×
1. The mucous cell (blue arrow) and melanophore (white arrow) in the skin 100×
2. The profiles of the cells similar to iridophores (blue arrow) 100×
3. Iridophores under normal eosin staining (blue arrow) 100×
4. Iridophores under 80% eosin staining (blue arrow) 100×
5. Iridophores under 40% eosin staining (blue arrow) 100×
6. Iridophores under 20% eosin staining (blue arrow) 100×
7. Iridophores under 10% eosin staining (blue arrow) 100×
8. Iridophores under 5% eosin staining (blue arrow) 100×
9. Iridophores under 3% eosin staining (blue arrow) 100×
10. Iridophores under 1% eosin staining (blue arrow) 100×
11. The iridophores in the skin under treatment group ③ (blue arrow) 100×
12. The iridophores in the skin under treatment group ② (blue arrow) 100×
13. The iridophores in the skin under treatment group ① (blue arrow) 100×
14. Iridophores can not be observed in skin slice 1 000×
15. The cell membrane and cytoplasm of iridophores are overcolored (blue arrow) 1 000×
16. The clear iridophores in skin slice (blue arrow) 1 000×

图版 I 大鱗副泥鰌皮肤组织学观察

Plate I The histological observation of *Paramisgurnus dabryanus* skin

Improved paraffin section method for observing iridophores in skin of *Paramisgurnus dabryanus*

OU Zhijie BIAN Fangfang YANG Ruibin YANG Xuefen

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding Certificated by Ministry of Agriculture/Freshwater Aquaculture
Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract The iridophores in the fish skin could not be observed by traditional paraffin section method, so *Paramisgurnus dabryanus* was used to improve the method in this experiment. The fixative was changed to 10% neutral formalin. Moreover, 1.5% agarose was used to pretreat the skin before dehydration, and 3% eosin was used to stain the skin. The results showed that fixing the skin of *P. dabryanus* by 10% formalin, pretreating by 1.5% agarose before dehydration and staining with 3% eosin, could get the slices with intact organizational structure and clear iridophores. Therefore, the improved paraffin section method could be used to observe iridophores in the fish skin.

Keywords paraffin section; *Paramisgurnus dabryanus*; skin; iridophores; improved method

(责任编辑:边书京)