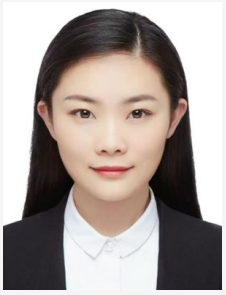
DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2025.053



刘翼天，北京中医药大学助理研究员，医学博士，加州大学洛杉矶分校联合培养博士。长期致力于针灸作用规律和机制研究，发现电针防护围产期尼古丁暴露诱发子代肺发育不良的具体机制；同时聚焦于针灸与人工智能学科交叉研究，探索阈下抑郁智能评估与针刺对治疗阈下抑郁的效应。主持国家自然科学基金青年项目1项、北京航空航天大学重点实验室项目1项、校级课题2项，参与国家级课题1项，指导大学生创新创业项目5项，在*Biochem Biophys Res Commun*、*J Pain Res*等国际期刊及中文核心期刊发表论文30余篇（其中SCI论文8篇），参加国际会议2次，在国际会议作学术报告1次，参编教材2部。入选北京中医药大学针灸推拿学院“针道青年英才计划”，现担任中国针灸学会实验针灸分会青年委员。

大鼠胎儿期肺组织固定方法的探索

刘力瑜，稚　波，刘小玄，方　洋，张　玲，郭亭廷，全　烨，李鹤文，刘翼天
（北京中医药大学针灸推拿学院，北京 100029）

[摘要]　目的　基于胎鼠独特的肺组织生理结构和现有的大鼠肺组织固定方法，探索胎鼠肺组织病理学研究所需的取材与固定方法。**方法**　对6只妊娠20.5 d的成年SD大鼠实行剖宫产，获得胎鼠。在每只孕鼠所产胎鼠中选取4只体重、生命体征与呼吸状态相近的健康存活胎鼠，按照随机数表法随机分为直接取肺浸润组、气管内灌注后取肺浸润组、胎鼠整体浸润组和气管内灌注后胎鼠整体浸润组。为系统对比分析不同固定方法下肺组织的解剖形态，对4组胎鼠的肺组织样本进行取材、灌注和固定处理后，观察各组肺组织的大体形态；经过石蜡切片及苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色后，在光学显微镜下观察肺整体、肺泡和肺支气管的组织学形态。**结果**　胎鼠直接取肺浸润组的肺门不清晰、肺组织分叶不明显、形状不规则，肺内空腔小，肺泡与肺支气管皱缩。气管内灌注后取肺浸润组的肺门清晰，肺组织分叶明显、形状规则，肺内空腔大，肺泡与肺支气管饱满。胎鼠整体浸润组与气管内灌注后胎鼠整体浸润组均能看到肺脏、心脏和皮肤等器官，肺组织分叶明显、形状不规则，肺叶边缘有破损。其中胎鼠整体浸润组胎鼠胸廓扁平，肺内空腔小，肺泡与肺支气管皱缩；而气管内灌注后胎鼠整体浸润组胎鼠胸廓饱满，肺内空腔大，肺泡与肺支气管较饱满。**结论**　气管内灌注后取肺浸润法在胎鼠肺组织原始形态还原度及石蜡切片、染色和组织病理学观察与分析等方面皆优于直接取肺浸润法、胎鼠整体浸润法和气管内灌注后胎鼠整体浸润法，且该方法中包埋、切片和染色等操作流程简便、耗材节省。因此，对于大鼠胎儿期的肺组织病理学观察，推荐使用气管内灌注后取肺浸润法进行固定。

[关键词] 大鼠；胎儿期；肺组织；固定方法
[中图分类号] R-332　[文献标志码] A　[文章编号] 1674-5817(2025)04-0432-07

Exploration of Rat Fetal Lung Tissue Fixation Methods

LIU Liyu, JI Bo, LIU Xiaoxuan, FANG Yang, ZHANG Ling, GUO Tingting, QUAN Ye, LI Hewen, LIU Yitian
(School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)
Correspondence to: LIU Yitian (ORCID: 0000-0001-8133-320X), E-mail: lytbucm@163.com

[ABSTRACT]　Objective　This study explores the methods of lung tissue extraction and fixation required for pathological studies of fetal rats, based on the unique physiological structure of fetal rat lung tissue and existing lung tissue fixation techniques for adult rats. **Methods**　Six pregnant adult SD rats at 20.5 days of gestation were subjected to cesarean section to obtain fetal rats. Four healthy fetal rats with similar body weight, vital signs, and respiratory status were selected from each pregnant rat, and they were randomly divided into the following groups using a random number table: direct lung infiltration group, lung

[基金项目] 国家自然科学基金项目“基于胎盘11β-HSD2调节胎儿糖皮质激素探讨电针防护孕期尼古丁暴露诱发子代肺发育不良的机制”（82305419）

[第一作者] 刘力瑜（2000—），硕士研究生，研究方向：针灸对机体的调衡作用。E-mail：1540618356@qq.com
[通信作者] 刘翼天（1991—），博士，助理研究员，研究方向：针灸对机体的调衡作用。E-mail：lytbucm@163.com。ORCID：0000-0001-8133-320X

infiltration group after intratracheal infusion, whole-body infiltration group of fetal rats, and whole-body infiltration group after intratracheal infusion of fetal rats. To systematically compare and analyze the anatomical morphology under different fixation methods, lung tissues from four groups of fetal rats were harvested, perfused, and fixed, and the gross morphology of lung tissues in each group was observed. Paraffin sections were prepared and stained with Hematoxylin-Eosin (H&E). The histological morphology of the whole lung, alveoli, and bronchi was further examined under optical microscopy. **Results** In the direct lung infiltration group, the hilar structures were unclear, lung lobation was indistinct, the shape was irregular, lung cavities were small, and alveoli and bronchi were shrunken. In the lung infiltration group after intratracheal infusion, the hilar structures were clear, lobation was pronounced, the shape was regular, lung cavities were large, and alveoli and bronchi were full. Both the whole-body infiltration group and whole-body infiltration group after intratracheal infusion of fetal rats exhibited visible lungs, hearts, skins, and other organs. The lung tissues of both groups showed obvious lobulation, irregular shape, and damage at the margins of lung lobes. In the whole-body infiltration group, the thoracic cavities of the fetus were flattened, lung cavities were small, and alveoli and bronchi were shrunken. In the whole-body infiltration group after intratracheal infusion of fetal rats, the fetal thoracic cavities were full, lung cavities were large, and alveoli and bronchi were relatively full. **Conclusion** The lung infiltration after intratracheal infusion method for fetal rat lung tissue fixation outperforms direct lung infiltration, whole-body infiltration of fetal rats, and whole-body infiltration after intratracheal infusion of fetal rats in terms of preservation of the lung tissue's original morphology, paraffin sectioning, staining, and pathological observation and analysis. The embedding, sectioning, and staining processes are also simple and save consumables. Therefore, intratracheal infusion followed by lung infiltration method is recommended for fixation in histopathological observation of fetal rat lung tissue.

[Key words] Rats; Fetal stage; Lung tissue; Fixation methods

大鼠的肺发育始于胚胎早期，在胎儿期已经发育形成原始肺泡，肺泡上皮细胞已部分分化为Ⅰ型肺泡细胞和Ⅱ型肺泡细胞，可以支持早产大鼠的气体交换[1]。胎鼠肺组织的病理学检查是研究支气管肺发育不良、呼吸窘迫综合征、肺炎等疾病的重要手段，对于生命早期呼吸系统疾病的诊断以及胚胎毒理学、病理学的研究具有重要意义[2-3]。

石蜡切片及苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色是肺组织病理学检查中常用的方法，包括取材、固定、脱水、染色等步骤。已有的研究发现，不同的固定方法会影响后续的操作过程和最终的观察结果[4-5]。目前胎鼠肺组织的固定方法主要采用直接取肺浸润法和胎鼠整体浸润法[6-7]，但是前者在取肺过程中容易出现脏器塌陷、肺组织撕裂的问题，后者则存在气体难以排出、固定液渗透困难的问题。因此，亟需建立一种操作简便、能减轻胎鼠肺组织损伤并提高肺组织固定和脱水效率的固定方法。成年大鼠的肺组织固定方法主要有直接取肺浸润法、气管内灌注法和经循环系统灌注法等[8]。气管内灌注法是在大鼠开胸前将固定液从气管灌注到肺组织中，不仅能避免脏器塌陷，还可以使固定液充盈肺泡腔并排出肺内气体，从而充分固定肺组织[9]。但是胎鼠肺组织稚嫩、体积小且易碎，对于气管内灌注法能否用于胎鼠肺组织固定尚不清楚。经循环系统灌注法需要开胸暴露心脏[10]，剪开右心耳，从左心室注射生理盐水，至流出液澄清后注射固定液。该方法虽然可以保持肺泡的完整性，但由于胎鼠的脏器过小，难以进行心脏灌注操作。因此，本研究基于胎鼠生理结构的特殊性，尝试采用气管内灌注法固定胎鼠肺组织，并将该法细分为气管内灌注后取肺浸润法和气管内灌注后胎鼠整体浸润法两种方式，同时将其与目前常用的直接取肺浸润法和胎鼠整体浸润法作对比，从操作流程、肺组织整体形态、肺泡及肺支气管形态等多个角度进行综合评价，旨在为优化胎鼠肺组织的固定方案提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用SPF级雌性SD大鼠6只（10周龄，体重200~250 g），雄性大鼠2只（10周龄，体重300~350 g）。所有大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司［SCXK（京）2021-0011］，质量合格证号为No.11001 1241111005434；饲养于北京中医药大学动物实验中心

屏障环境动物房内［SYXK（京）2023-0011］，大鼠可自由活动、饮水和进食，12 h明暗交替，排除饮食、环境等可能对实验动物产生影响的因素。适应性饲养1周后，每日18：00将雌鼠与雄鼠按照3∶1合笼，次日7：00制备阴道涂片，于光学显微镜下观察精子，将发现精子当日记为妊娠第0.5天。妊娠第0.5~20天，将雌、雄鼠分笼饲养且不限制其饮食、活动。实验中遵守动物实验“替代、减少、优化（replacement，reduction，refinement，3R）”伦理原则且予以人道主义关怀，通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审批（审批号：BUCM-2024120403-4278）。雌鼠在麻醉剖宫取材后采用腹主动脉放血，急性大失血法安乐死；雄鼠在戊巴比妥钠麻醉后，采用颈椎脱臼法安乐死。

1.2 主要试剂与仪器

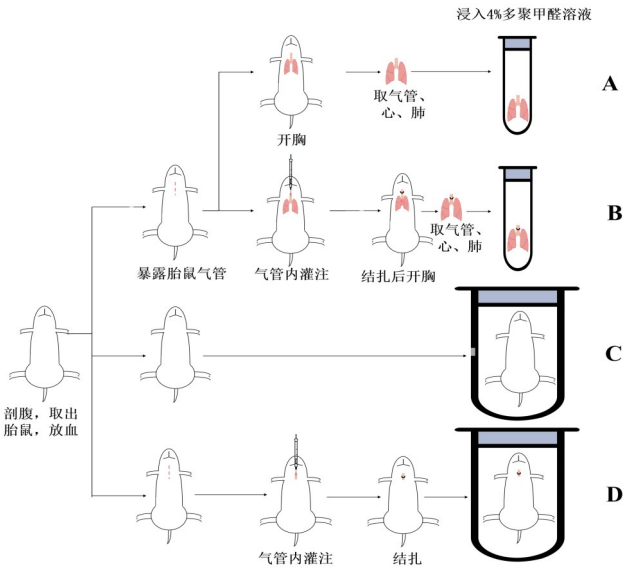
一次性使用末梢采血针（型号30G、批号2306119）购自天津华鸿科技股份有限公司；4%多聚甲醛溶液（批号GP2410310）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；无水乙醇（批号KDIEH057）购自北京伊诺凯科技有限公司；二甲苯（批号C16545166）和病理级切片石蜡（批号P815422）购自麦克林生化科技股份有限公司；苏木精（批号GR3434190-6）和伊红（批号1079515-4）染色液购自艾博抗（上海）贸易有限公司；超白粘附载玻片（批号80312-3161）和标准级显微镜盖玻片（批号80340-3610）购自江苏世泰实验器材有限公司；石蜡包埋机（型号EG1150H）和超薄切片机（型号RM2245）购自德国Leica公司；正置研究级显微镜（型号BX60）购自日本Olympus公司；组织切片扫描仪（型号Pannoramic MIDI）购自匈牙利3DHISTECH公司。

1.3 实验分组及操作

妊娠第20天，使用2%戊巴比妥钠（0.2 mL/100 g）腹腔注射麻醉孕鼠，进行剖宫取材。在每只孕鼠所产胎鼠中选取4只体重、生命体征与呼吸状态相近的健康存活胎鼠，按照随机数表法将其分为直接取肺浸润组、气管内灌注后取肺浸润组、胎鼠整体浸润组和气管内灌注后胎鼠整体浸润组，每组各6只，共24只。4组胎鼠肺组织的取材、灌注及固定流程如图1所示。

1.3.1 直接取肺浸润法

参考石恒捷等[6]的胎鼠肺组织固定方法进行操作。将胎鼠埋入冰屑内进行低温麻醉，该过程中胎鼠不直接接触冰面。至胎鼠足部反射消失后，使用Y15201弯尖镊轻柔固定胎鼠头部，用75%酒精棉球擦拭面颊区域，使面静脉丛充盈，用一次性使用末梢采血针刺破面静脉，进行面颊放血。放血后，用弯尖镊逐层剥开胎鼠胸壁，直至暴露胸骨，使用Y15103直型整形剪剪断胎鼠胸部前方、侧方和后方的肋骨，小心剪断与心脏、肺脏连接的胸部筋膜后，使用弯尖镊夹持气管下方约3 mm，轻柔地将胎鼠气管、心脏和肺脏完整取出，放入充满4%多聚甲醛溶液的2.5 mL冻存管中固定。固定24 h后，使用弯尖镊小心剥离心脏与肺脏间的筋膜，夹起心脏，用整形剪剪断心脏与肺脏连接的血管，将气管和肺组织用PBS缓慢冲洗2遍，浸入盛有30%蔗糖溶液的冻存管中，4 ℃保存，每2 d更换一次蔗糖溶液直至组织完全沉到管底。



注：A，直接取肺浸润法；B，气管内灌注后取肺浸润法；C，胎鼠整体浸润法；D，气管内灌注后胎鼠整体浸润法。

Note: A, direct lung infiltration method; B, lung infiltration method after intratracheal infusion; C, whole-body infiltration method of fetal rats; D, whole-body infiltration method after intratracheal infusion of fetal rats.

图1 胎鼠肺组织四种固定方法的流程示意图

Figure 1 Flowchart of four fixation methods for fetal rat lung tissues

1.3.2 气管内灌注后取肺浸润法

参考尚宏伟等[9]的成年大鼠肺组织固定方法进行操作。同1.3.1节对胎鼠进行麻醉和放血。放血后，用医用胶带将胎鼠仰卧位固定于鼠板上，在颈部正中使用弯尖镊逐层剥开颈部皮肤和肌肉，找到气管，使用弯尖镊小心夹断气管周围的肌肉和筋膜，在气管背侧方穿过一根用生理盐水浸润过的手术缝合线。使用0.5 mL一次性无菌胰岛素注射器抽取0.3 mL 4%多聚甲醛溶液，注射器针头朝向胎鼠胸部，与气管夹角呈15°

进针，刺入气管约5 mm（避免戳破气管），用器械打结法在针尖上方约2 mm处打单结以固定气管和注射器针头。缓慢且匀速地将4%多聚甲醛溶液从气管注入肺组织，观察到胎鼠胸廓充盈后停止注射。缓慢抽离注射器针头，立即在原单结基础上用同样方法结扎气管，同1.3.1节进行取肺及后续的固定操作。

1.3.3 胎鼠整体浸润法

参考高瑨[7]的胎鼠肺组织固定方法进行操作。胎鼠麻醉和放血方法同1.3.1节。放血后将胎鼠整体放入10 mL充满4%多聚甲醛溶液的冻存管中固定。72 h后，留取胎鼠锁骨至肋骨下缘的胸段部位，切除其余组织，用PBS将截取部位冲洗2遍，浸入盛有30%蔗糖溶液的冻存管中，4 ℃保存，每2 d更换一次蔗糖溶液直至组织完全沉到管底。

1.3.4 气管内灌注后胎鼠整体浸润法

参考尚宏伟等[9]的成年大鼠肺组织固定方法，改良后进行操作。胎鼠麻醉和放血方法同1.3.1节。放血后，同1.3.2节方法行气管内灌注。后续切取及固定胸廓的操作同1.3.3节。

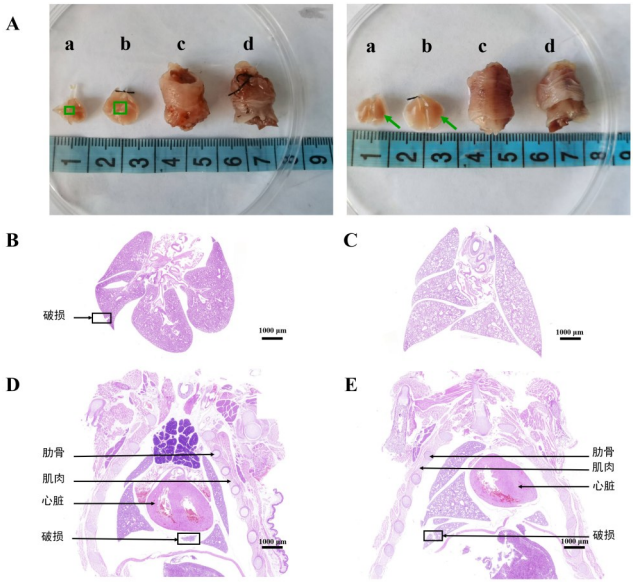
1.4 石蜡切片及HE染色

固定后的组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明及浸蜡处理后包埋成蜡块，制作成4 μm厚的切片，切片经脱蜡后行HR染色，染色后脱水、封片行镜下观察，使用配备×10目镜和×1物镜，以及×10目镜和×20物镜的光学显微镜观察切片。观察时，先在低倍镜（×10）下找到有典型特征的区域，再切换到高倍镜（×200）观察细胞形态和组织结构。使用组织切片扫描仪，以逐行扫描的方式对切片进行扫描，将扫描分辨率设置为0.27 μm/pixel，以获取高清晰度的切片图像用于后续分析和记录。

2 结果

2.1 胎鼠肺脏的大体观察比较

上述4种方法制备的组织经固定后，肉眼观察胎鼠肺脏与胸廓的大体形态。如图2A所示，直接取肺浸润组的肺叶皱缩、形状不规则，肺门处轮廓模糊，肺内残留的血液较多；气管内灌注后取肺浸润组的肺叶饱满、形状规则，肺门处轮廓清晰，肺内残留的血液较少；胎鼠整体浸润组与气管内灌注后胎鼠整体浸润组在大体观察下均未能看到肺脏，但能观察到胎鼠胸段脱水固定后的形态，其中，前者胸廓扁平、皮肤皱褶较少，后者胸廓充盈、皮肤褶皱较多。



注：A，胎鼠肺组织在四种固定方法下的大体观察结果，左图为冠状面仰卧位，右图为冠状面俯卧位；B~E为胎鼠肺组织在四种固定方法下的HE染色结果，其中B为直接取肺浸润法，C为气管内灌注后取肺浸润法，D为胎鼠整体浸润法，E为气管内灌注后胎鼠整体浸润法。绿色框内为肺门，绿色箭头所示为肺内血管，黑色箭头所示为肋骨、肌肉、心脏和肺脏破损处。

Note: A, comparison of fetal rat lung tissue morphology under gross observation using four fixation methods. The left image shows the coronal view in the supine position, while the right image displays the coronal view in the prone position. B-E show the HE staining results of fetal rat lung tissues under four fixation methods. B, direct lung infiltration method; C, lung infiltration method after intratracheal infusion; D, whole-body infiltration method of fetal rats; E, whole-body infiltration method after intratracheal infusion of fetal rats. The green boxes indicate the lung hilum, the green arrows indicate intrapulmonary blood and the black arrows indicate the ribs, muscles, heart, and sites of lung damage.

图2 四种固定方法下的胎鼠肺组织形态比较

Figure 2 Comparison of fetal rat lung tissue morphology using four fixation methods

2.2 低倍镜下胎鼠肺组织形态比较

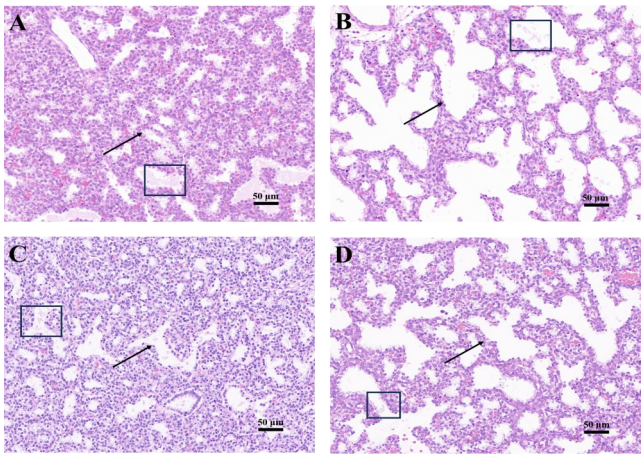
在×10光学显微镜下，4组大鼠胎儿期肺组织的HE染色切片均能观察到肺实质和肺间质。两组取肺浸润法获得的肺组织切片较为清晰、直观，气管内灌注后取肺浸润组（图2C）比直接取肺浸润组（图2B）观察到的肺组织更加完整、饱满，分叶更加明显，肺叶内的空腔更大；两组整体浸润固定法中，除肺组织外还能观察到心脏、肋骨、肌肉等其他组织器官，肺小叶较明显，肺叶的相对位置和形状差异较大，肺实质边缘存在少量破损，胎鼠整体浸润组（图2D）相较于气管内灌注后胎鼠整体浸润组（图2E），肺叶中的空腔较小。

2.3 高倍镜下胎鼠肺泡形态比较

在×200光镜下，直接取肺浸润法（图3A）与胎鼠整体浸润法（图3C）制备的切片中肺泡结构萎缩，边缘模糊不清，间隔增厚，腔内有杂质沉积；气管内灌注后取肺浸润法（图3B）与气管内灌注后胎鼠整体浸润法（图3D）制备的切片中肺泡较饱满，边缘清晰，间隔较薄，肺泡内杂质较少。

2.4 肺支气管组织学观察结果的比较

四种固定方法处理的标本肺支气管形态观察结果如图4所示：直接取肺浸润组（图4A）与胎鼠整体浸润组（图4C）的肺支气管管腔狭小且形状不规则，管壁单层柱状上皮细胞排列密集、紊乱，且细胞间有重叠现象；气管内灌注后取肺浸润组（图4B）与气管内灌注后胎鼠整体浸润组（图4D）的肺支气管管腔较大，管壁单层柱状上皮细胞排列较整齐，且与气管内灌注后胎鼠整体浸润组相比，气管内灌注后取肺浸润组管腔形状呈圆形且更加规则，管壁上皮细胞分布更加均匀，无细胞重叠现象。相较其他三组，气管内灌注后取肺浸润组的肺支气管形状饱满，单层柱状上皮细胞排列规律。

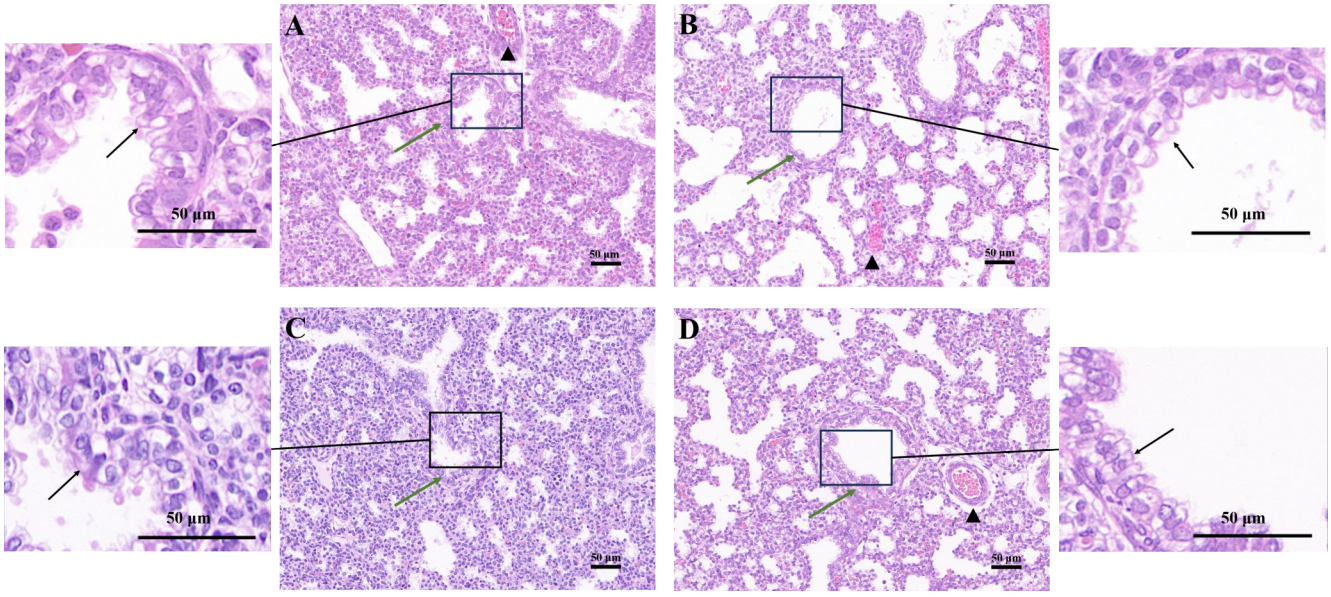


注：A，直接取肺浸润组；B，气管内灌注后取肺浸润组；C，胎鼠整体浸润组；D，气管内灌注后胎鼠整体浸润组。箭头指示为肺泡，框内为肺泡腔内杂质。

Note: A, direct lung infiltration group; B, lung infiltration group after intratracheal infusion; C, whole-body infiltration group of fetal rats; D, whole-body infiltration group after intratracheal infusion of fetal rats. Arrows indicate alveoli, and boxes show impurities in the alveolar lumina.

图3 四种固定方法下的胎鼠肺泡HE染色结果（×200）

Figure 3 Results of HE staining of fetal rat alveoli using four fixation methods (×200)



注：A，直接取肺浸润组；B，气管内灌注后取肺浸润组；C，胎鼠整体浸润组；D，气管内灌注后胎鼠整体浸润组。绿色箭头指示为肺支气管；黑框指示被放大区域内为单层柱状上皮细胞；三角形处为肺组织内的血管。

Note: A, direct lung infiltration group; B, lung infiltration group after intratracheal infusion; C, whole-body infiltration group of fetal rats; D, whole-body infiltration group after intratracheal infusion of fetal rats. The green arrows indicate bronchi of lung, the boxed areas highlight the monolayer columnar epithelial cells and the triangular regions indicate the blood vessels within the lung tissue.

图4 四种固定方法下的胎鼠肺支气管HE染色结果（×200）

Figure 4 Results of HE staining of fetal rat lung bronchi usng four fixation methods (×200)

3 讨论

组织固定是制作高质量病理切片的关键步骤之一，在组织病理学的研究中具有重要意义[11]。放血是组织取材及固定前的常用操作，它不仅可以减少血液对组织的污染和对染色的干扰，也可以大大减轻实验动物的痛苦[12]。胎鼠常用的取放血方式为断头放血法[13]，但是该方法会导致颈部血管内的血液随气管进入肺部，造成血液污染肺组织。因此，有研究先对大鼠进行气管下1/3处结扎，再在气管上1/3处断头放血以防止血液进入肺部，而后在结扎处下方进行气管内灌注[14]。但是胎鼠的气管短小，气管壁和血管壁较薄，先结扎后放血易划破气管和血管，使血液流入肺部，并导致后续灌注困难，所以本研究选择在与颈内静脉和颈外静脉连接的面静脉丛处先行放血，避免血液污染气管及肺泡腔。

肺部的空腔结构在胚胎期已经形成，它是肺脏进行气体交换的基础[15-17]。在生理状态下，气体交换由膈肌、肋间肌等呼吸肌的收缩和舒张协同实现：当呼吸肌收缩时，胸腔容积增加，胸腔内相对于体外大气压形成负压，肺部扩张；当呼吸肌舒张时，胸腔容积减小，胸腔负压回升，使肺部收缩。在死亡或开胸后，呼吸肌的功能丧失，胸腔内压接近外部大气压，胸腔容积减小、压力增加，肺泡塌陷伴间隔聚拢性增宽，肺支气管皱缩，肺内的组织结构难以区分。当肺泡内外压力达到平衡时，肺内气体无法排出，残留的气体会影响肺脏的固定和脱水效果[18]。因此，我们假设通过气管内灌注，可以使死亡胎鼠的肺脏再次充盈，并使组织固定液充分渗透，从而排出肺内气体，维持肺泡的原始形态。本研究结果显示，与未灌注组相比，灌注组的肺脏形态更加饱满，肺泡与肺支气管形态更规则、充盈，边缘更清晰。与我们的设想一致，在开胸前灌注固定液，可在肺组织未变形时尽可能维持肺部的充盈，同时从针头与气管的空隙中排出气体，从而更好地保持肺组织的生理形态。因此，灌注法比胎鼠整体浸润法更能保留原始胎鼠的肺组织结构，适用于组织病理学检查。

由于胎鼠脏器的大小、厚度和韧度均有别于成年鼠，为避免取材时损伤器官，有研究将肺脏保留在原位，取材时连同胸段一起切开[6]。取成年大鼠的肺脏时通常先断开锁骨和胸前的肋骨，暴露肺脏与心脏，而后将气管、心脏和肺脏一同取出[19-20]。但是胎鼠的肺脏非常娇嫩，仅截断胸前的肋骨容易因拉扯而使肺脏破损或变形。本研究为保护稚嫩的胎鼠肺脏，改进了取肺方法，即剪断胎鼠胸前方、侧方、后方的肋骨，小心剥离与肺脏连接的胸部筋膜，而后取出胎鼠的气管、心脏和肺脏。结果显示，此方法取出的肺组织经浸润固定后，表面有少量破损，但与整体浸润组的破损差异不明显，且在灌注方式相同的情况下，取肺浸润组与整体浸润组的肺泡形态均无明显差异，但是前者肺支气管形态及管壁细胞更清晰，且后者在切片时存在肺组织定位困难、实验耗材用量多的缺点。由此证明，本次研究所用的胎鼠肺脏取材方法不会破坏肺组织形态，且气管内灌注后取肺浸润组的肺组织整体形态更清晰完整。

虽然本研究中气管内灌注后取肺浸润组肺组织的整体形态、肺泡和肺支气管结构以及染色效果最优，但是该方法依然存在局限性：（1）可能会造成肺部伪影[21]，掩盖对肺炎的诊断，所以不适用于新生儿肺炎研究的动物模型；（2）应对胎鼠气管内灌注的固定液进行优化，例如固定液的种类、灌注量和灌注时间等，以减少阅片时的杂质污染。相信随着更多精细化实验试剂和耗材的出现，以及对动物及其胚胎发育的进一步了解，将会制备出更加符合人类健康研究的实验胎肺动物模型。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审查（批准文号：BUCM-2024120403-4278）。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Beijing University of Chinese Medicine (Approval No. BUCM-2024120403-4278). All experimental processes were conducted in accordance with relevant laws, regulations, and rules on laboratory animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

刘力瑜负责实施研究、初稿写作；

嵇波负责监督指导、提供行政及技术支持；

刘小玄、方洋、张玲、郭亭廷、全烨和李鹤文参与动物实验及实验方法设计；

刘翼天负责研究项目管理及写作核修。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

[1] WARBURTON D, EL-HASHASH A, CARRARO G, et al. Lung organogenesis[J]. Curr Top Dev Biol, 2010, 90: 73-158. DOI: 10.1016/s0070-2153(10)90003-3.

[2] SHI H J, ZHANG S J, LAI F P, et al. The establishment and severity assessment of ultrasound-guided prenatal broncho-

pulmonary dysplasia model in rat[J]. Sci Rep, 2024, 14(1):18133. DOI:10.1038/s41598-024-69051-w.

[3] PEERS DE NIEUWBURGH M, HUNT M, CHANDRASEKARAN P, et al. Chronic hypoxia in an Extrauterine Environment for Neonatal Development impairs lung development[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2025, 72(4): 441-452. DOI: 10.1165/rcmb.2024-0012OC.

[4] QU W S, YIN J Y, WANG H M, et al. A simple method for the formalin fixation of lungs in toxicological pathology studies [J]. Exp Toxicol Pathol, 2015, 67(10): 533-538. DOI: 10.1016/j.etp.2015.08.002.

[5] 马嘉昕, 王亚恒, 董伟, 等. 实验大小鼠心脏固定方法的优化[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2):84-90. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.011.
MA J X, WANG Y H, DONG W, et al. Optimization of cardiac fixation methods in experimental rats and mice[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 84-90. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-7856.2023.02.011.

[6] 石恒捷, 吕国荣, 赖芳萍, 等. 产前支气管肺发育不良胎鼠模型构建及其严重程度的超声评估[J]. 中国超声医学杂志, 2023, 39(9): 1060-1063. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0101.2023.09.033.
SHI H J, LÜ G R, LAI F P, et al. Construction of fetal rat model of prenatal broncho-pulmonary dysplasia and ultrasonographic evaluation of its severity[J]. Chin J Ultrasound Med, 2023, 39(9): 1060-1063. DOI: 10.3969/j. issn. 1002-0101.2023.09.033.

[7] 高瑕. 小鼠肺发育观察及地塞米松对胎鼠肺发育的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2021. DOI: 10.27366/d. cnki. gtyku. 2021.001335.
GAO X. Observation of lung development in mice and theeffect of dexamethasone on lung development in fetal mice[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2021. DOI: 10.27366/d.cnki.gtyku.2021.001335.

[8] 李文, 张思良, 王冬梅, 等. 小鼠开胸前气管内灌注肺制样方法体重依赖灌注量的探讨[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(27):102-105. DOI: 10.3969/j.issn.1671-1815.2018.27.017.
LI W, ZHANG S L, WANG D M, et al. Discuss on the weight-dependent perfusion volume of mice in the preparation of lung samples by intratracheal infusion before opening the chest[J]. Sci Technol Eng, 2018, 18(27):102-105. DOI: 10.3969/j.issn.1671-1815.2018.27.017.

[9] 尚宏伟, 王兴翠, 曾晓蓓, 等. 一种大鼠肺组织固定方法的新尝试[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1999, 8(1): 60, 69. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.1999.01.015.
SHANG H W, WANG X C, ZENG X B, et al. A new attempt of lung tissue fixation in rats[J]. Chin J Histochem Cytochem, 1999, 8(1): 60, 69. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.1999.01.015.

[10] STACEY M T, JOSEPH B, WILLIAM J J, et al. Air-inflation of murine lungs with vascular perfusion-fixation[J]. J Vis Exp, 2021 (168):10.3791/62215. DOI: 10.3791/62215.

[11] MARK R W. The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology-An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory[J]. Semin Diagn Pathol, 2019, 36(5): 303-311. DOI: 10.1053/j.semdp.2019.06.003.

[12] 张金月, 惠敏, 道力给艳, 等. 医学实验动物采血方式及检前因素对生化指标的影响[J]. 医学理论与实践, 2024, 37(9):1480-1483. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2024.09.011.
ZHANG J Y, HUI M, DAO L G Y, et al. Effects of blood collection methods and pre-examination factors on biochemical indexes in medical experimental animals[J]. J Med Theory Pract, 2024, 37(9):1480-1483. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2024.09.011.

[13] LEARY S, UNDERWOOD W, ANTHONY R, et al. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 Edition[M]. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2020.

[14] 尚宏伟, 李宝红, 王兴翠, 等. 大鼠肺组织制片方法的改进[J]. 首都医科大学学报, 1999, 20(2): 127-128. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.1999.02.018.
SHANG H W, LI B H, WANG X C, et al. Improvement of the method of making slices of rat lung tissue[J]. J Cap Med Univ, 1999, 20(2): 127-128. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.1999.02.018.

[15] MATT U, HEROLD S. Traffic jam in lung capillaries: inter-organ communication impedes gas exchange after acute kidney injury[J]. J Clin Invest, 2025, 135(10): e192917. DOI: 10.1172/JCI192917.

[16] DHANYA M, NICOLA P S. Lung development[J]. Semin Pediatr Surg, 2015, 24(4): 152-155. DOI: 10.1053/j. sempe dsurg.2015.01.011.

[17] MICHELE G, CHIARA G, WILLIAM W S, et al. Current definitions of the breathing cycle in alveolar breath-by-breath gas exchange analysis[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2023, 325(5): R433-R445. DOI: 10.1152/ajpregu. 00065.2023.

[18] KUPPEVELT T H, ROBBSESOM A A, VERSTEEG E M, et al. Restoration by vacuum inflation of original alveolar dimensions in small human lung specimens[J]. Eur Respir J, 2000, 15(4):771-777. DOI: 10.1034/j.1399-3003.2000.15d23.x.

[19] 苏杭, 嵇波, 赵国桢, 等. 电针"足三里"或"阳陵泉"对围产期尼古丁暴露新生鼠肺功能和组织形态的影响[J]. 中国针灸, 2019, 39(6): 632-636. DOI: 10.13703/j.0255-2930.2019.06.017.
SU H, JI B, ZHAO G Z, et al. Effect of electroacupuncture at "Zusanli" (ST 36) and "Yanglingquan" (GB 34) on perinatal nicotine-exposure-induced lung function and morphology of neonatal rats[J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2019, 39(6): 632-636. DOI: 10.13703/j.0255-2930.2019.06.017.

[20] 郝莉霞, 卢蓉, 马霞霞, 等. 香叶木素对胎粪诱导的新生大鼠急性肺损伤的作用及其机制探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(5): 384-390. DOI: 1674-5817(2020)05-0384-07.
HAO L X, LU R, MA X X, et al. Effect of diosmetin on acute lung injury induced by meconium and its mechanism in neonatal rats[J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(5): 384-390. DOI: 1674-5817(2020)05-0384-07.

[21] BRABER S, VERHEIJDEN K T, HENRICKS P J, et al. A comparison of fixation methods on lung morphology in a murine model of emphysema[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(6): L843-L851. DOI: 10.1152/ajplung. 00192.2010.

（收稿日期：2025-04-03 修回日期：2025-06-04）
（本文编辑：周培）

[引用本文]
刘力瑜, 嵇波, 刘小玄, 等. 大鼠胎儿期肺组织固定方法的探索[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(4): 432-438. DOI: 10.12300/j. issn. 1674-5817.2025.053.
LIU L Y, JI B, LIU X X, et al. Exploration of rat fetal lung tissue fixation methods[J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(4): 432-438. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.053.