



实验病理标本前期处理应注意的若干问题

李建瑛, 刘江伟, 许 琴, 张东辉, 赵红艳, 是文辉,
李佳佳, 董 翔, 马 娜, 许永华

(兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 实验病理技术中标本的取材、固定以及后续的制片染色, 对病理诊断结果的可靠性、真实性有很大的影响, 本文对动物实验病理制片关键步骤中易出现的问题及对策进行探讨。

【关键词】 实验病理; 组织固定; 切片制作; 病理诊断

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0066-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.014

Several issues should be mentioned before pathological specimen processing

LI Jian-ying, LIU Jiang-wei, XU Qin, ZHANG Dong-hui, ZHAO Hong-yan,
SHI Wen-hui, LI Jia-jia, DONG Xiang, MA Na, XU Yong-hua

(Animal Experiment Department, Lanzhou Military District Urumqi General Hospital, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Experimental pathology is an important part of life science research associated with animal experiment. Acquisition and fixation of optimum specimen and subsequent section of paraffin embedded tissue and dyeing are key factors playing important role in reliability, authenticity of pathological diagnosis. This paper summarizes the problems encountered in pathological section making of animal experiment and it correspond solutions.

【Key words】 Experimental pathology; Tissue fixation; Section making; Pathological diagnosis

近几年随着病理技术大力发展, 在医学领域成果倍出。笔者从事动物实验病理技术多年, 发现部分科研人员对病理技术不了解, 缺乏病理基础知识, 甚至得出错误结论, 造成人为的损失, 其共性是轻视了病理组织标本的前期处理, 这是一个在病理工作中十分关键的步骤, 根据笔者多年工作经验对该问题谈谈体会。

1 取材前的准备工作

1.1 取材器械准备

准备一支 HB 铅笔, 一套取材器械, 包括: 组织

剪、无齿镊、刀柄及一次性手术刀片。标本取材的编号一定要用铅笔标注清晰。取材器械要锋利, 尤其是手术刀片要定期更换。

1.2 固定液的选择

固定液需根据标本制作的需要而选择不能一概而论。常用固定液有以下几种: ①甲醛: 一般作为固定剂使用的 10% 甲醛是用水和 40% 甲醛 (9: 1) 混合而成, 实际上是 4% 的甲醛溶液^[1]。②中性甲醛: 是最常用的固定液之一, 固定效果好, 为免疫组织化学最常用的固定液, 对组织穿透性好, 组织收缩小。③多聚甲醛: 该固定液适用于动物灌注固

[基金项目]

[作者简介] 李建瑛 (1977 -), 女, 实验师, 本科, 专业: 实验病理学技术。Email: 1610801584qq.com。

[通讯作者] 许永华 (1956 -), 女, 主任技师, 研究方向: 医学实验动物学。Email: xyh821023@sina.com。

定取材,也可用于组织标本的较长时间保存,也可用于光镜及免疫组织化学实验。④戊二醛($C_5H_8O_2$)电镜固定液:戊二醛固定液的优点是对糖原、糖蛋白、微管内质网和细胞基质等有较好的固定作用。一般戊二醛的 pH 为 4.0~5.0 贮存时间过长时 pH 会下降,当 pH 降至 3.5 以下就不能使用,戊二醛原液应在冰箱保存^[2]。

1.3 固定标本容器的选择要合适

有时标本瓶口过小,等到修材时,无法取出标本从而引起由于过度牵拉而导致组织形态结构的破坏;有时出现标本大小与固定液容积比例不合适,固定液过少而造成组织渗透不全固定不完全^[2-3]。

2 取材

2.1 阴性对照组标本的取材

动物实验中均有阴性对照组,在动物实验病理中一定要取 3~5 只,排除其个体差异。标本的取材一定要正规,不能随意对待标本。

2.2 组织标本的取材

主要取之于活组织检查标本、动物模型组织标本、解剖标本均为新鲜组织夹取标本用无齿镊,以免对组织造成人为损伤。如机体死亡 2 h 以上的组织可能有不同程度的自溶,其抗原可能发生变性消失或严重弥漫现象,因此尽快固定处理以免影响免疫组织化学标记效果。防止人为因素的影响:切取组织时应用锋利的刀剪,刀刃宜薄、并足够长。一般标本切取的组织块厚约 0.2~0.3 cm,根据情况可略作调整,大小以 $1.5 \times 1.5 \times 0.2 \sim 0.3$ cm 为宜,用于免疫组织化学染色的组织以 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.2$ cm 为好,不要太大以免浪费试剂。取材时间应尽可能短:原则上应尽快取材,如:胃、肺、肠、脑组织、脊髓等组织要先固定再取材因组织薄软、含水量多等特点所以最好先固定再取材。注意特殊情况:取材应避免过多的坏死组织或凝血块,组织块上如有血液、粘液粪便等到污物应先用水冲洗干净再取材。

2.3 标本初步固定后的修材

修材切取组织时不宜过度用力,否则会挫伤或挤压组织引起组织结构的变形和损伤,取材组织大小 $1.5 \times 1.5 \times 0.2 \sim 0.3$ cm 为宜,

2.4 特殊取材

由于电镜电子束穿透能力的限止,必须把标本切成厚度小于 0.1 μm 以下的薄片才适用,(1)取材动

作应迅速(争取在 1 min 内)投内固定液;(2)所取组织的体积要小,一般不超过 $0.2 \times 0.2 \times 0.3$ cm;(3)操作最好在低温($0 \sim 4^\circ\text{C}$)下进行,因固定剂的渗透能力较弱以降低酶的活性防止细胞自溶,还可能由于污染微生物在组织内繁殖使细胞微结构遭受破坏。(4)将取材的组织放在洁净的卡片纸上,滴一滴冷却的固定液用新的锋利刀片垂直往下切,然后用牙签或镊子将组织移至盛有冷固定液的小瓶中^[4]。

3 组织固定

3.1 标本固定要及时充分

良好的组织学切片取决于及时充分的组织固定,组织固定不良或不及时在以后的标本制备过程中则无法加以纠正,也无法切出优质的切片,固定液的量是我们常忽略的问题,组织与固定液的比例至少是 1:10,所以一些大的标本应取材后再固定或固定一段时间后更换固定液。固定的容器宜相对要大,并且能加盖封闭,防止组织与容器粘连或固定液挥发而产生固定不良,瓶底常垫以棉花防止组织标本与容器粘连使固定剂不能均匀渗入组织块,若为脏器标本体积较大时应切开脏器,平铺固定,实质器官取成小块组织固定^[5]。固定不及时或不当引起自溶出现细胞核质着色较浅轮廓不清以及程度不等的条状发白区现象。标本无论大小离体后 30 min 内立即固定。固定组织时固定液量要足量,一般应为组织块总体积的 5~10 倍,也可达 15~20 倍。最好固定 24 h 后再取材。

3.2 组织固定方法

大多数组织采用浸泡法固定,即体外固定。动物取材尤其是对比较娇嫩的组织如:脑积液、内耳及视网膜等,最好采用灌注法固定,即通过血管将固定液灌注到所要固定的组织。一般大动物可通过动脉或静脉导管灌注,小动物可直接用注射针插入心室或主动脉,在固定前先用生理盐水把血液冲洗干净然后再进行灌注固定^[3]。

4 病理切片

石蜡切片:其优点是组织结构保存良好,在病理诊断和回顾性研究中有较大的实用价值能连续切组织结构清晰,抗原定位明确。冰冻切片:是免疫组织化学染色中最常用的一种方法,其最突出的优点是能够较完好的保存多种抗原的免疫活性尤其是细胞表面抗原应采用冰冻切片。超薄切片:电

镜取材,切取 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织数块,置于镧醛固定液,4℃ 过夜,锇酸处理。丙酮梯度脱水,环氧树脂浸透、包埋、聚合,光学显微镜下进行组织块修整,超薄切片,铜网捞片,在透射电镜扫描电镜下观察并照片,用于观察微生物或病毒形态及细胞器结构^[6]。

5 染色

组织切片要经过烘烤使其与玻璃片粘帖牢固,一般捞片后在空气中略微干燥后即烤片,一般在 60℃ 左右烤箱内烤 30 min。免疫组化染色则需要先在 HE 制片基础上放在 37℃ 恒温箱过夜,这样减少染色中脱片现象。皮肤组织应及时烤片。石蜡切片必需经过脱蜡后才能染色,脱蜡前切片要经烘烤组织切片脱蜡应完全彻底,脱蜡不净是影响染色不良的重要原因^[7]。苏木精染色要充分,应根据染片的多少和液体的新鲜来确定时间;盐酸酒精分化要适当,必要是应在镜下观察,返蓝要充分这样细胞核会更清晰;伊红染色不宜过长,切片经伊红染后,水洗时间要短。切片经过染色后,通过从低浓度到高浓度各级酒精脱水。低浓度酒精对伊红有分化作用,切片经过低浓度时间要短快速,向高浓度时逐步延长脱水时间,脱水要彻底,如脱水不彻底会造成切片发雾,在显微镜下组织结构模糊不清。染色后必须经二甲苯处理透明才能用树胶封片,如透明不充分切片会出现结构模糊不明^[8]。染色后进行封片,在封片时树胶不能太稀或太稠,也不能滴太多或太少,太稀或太少切片容易出现空泡。HE 染色结果:因细胞核呈兰色,细胞浆呈淡红色,颜色鲜艳,细胞核浆对比明显清晰。

6 讨论

在多年的病理技术工作中发现许多实验人员

对病理技术了解不深,不严格按照规定操作流程处理标本,不慎重随意性大。针对这个问题,我们加强了对实验人员的病理基础知识培训,在病理工作的配合方面取得了良好效果。

另外在人员少工作量大的情况下,坚持病理技术人员参与动物实验制度。掌握实验进展,指导实验人员共同制订病理工作计划。

我们还坚持严格执行病理医生取材制度。在工作中注意实验人员、技术人员、病理工作人员多方紧密合作完成实验病理工作。通过以上工作保证动物实验病理诊断的准确性,维护其“金标准”地位。

参考文献:

- [1] 郭志杰. 病理制片中固定液的选择[J]. 实用医技杂志, 2009,6(6):146.
- [2] 王伯云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 人民卫生出版社,北京;2000年(第一版):61-76.
- [3] 王晓鸿,曹婉维. 制作优质 HE 病理组织切片的要素[J]. 中国实用医药, 2011,6(6):135.
- [4] 刘桦,卢鹤翔. 影响病理切片制作的因素及质量控制[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2005,8(12):1339.
- [5] 张同海. 病组织标本前期处理常见问题[J]. 实用医技杂志, 2006,13(19):145.
- [6] 赖英荣,钟觉民,罗灿峒. 活体组织 HE 制片程序探讨[J]. 实用医技杂志,2007,14(12):1532.
- [7] 张新新,付红霞,李艳丽. 日常病理切片技术的几点体会[J]. 临床合理用药,2010,3(2):8.
- [8] 胡双庆. 有关影响常规病理制片质量几个问题的探讨[J]. 中国社区医师,2010,12(229):103.

[修回日期]2015-06-25