

使用环保组织处理试剂的应用体会

戴军¹, 谢敏浩², 沈海燕¹, 王铁生¹, 吴军², 赵菁¹

关键词: 组织固定液; 脱蜡; 中性胶

中图分类号: R 446.8 文献标识码: B

文章编号: 1001-7399(2009)02-0219-02

为了保护和改善健康, 避免病理职业性危害, 我们使用国产绿色产品, 替代甲醛、苯类等试剂进行了病理标本制备相关研究, 效果良好, 现介绍如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 我院 2005~2008 年的手术标本 24 825 例。醇性

收稿日期: 2008-09-09 修回日期: 2008-12-22

项目基金: 江苏省科技厅社会发展课题 (BE2008633)

作者单位: 江苏省原子医学研究所¹ 附属医院、² 卫生部核医学重点实验室, 无锡 214063

作者简介: 戴军, 男, 副主任医师。Tel (0510) 85508840 E-mail daijun1959@163.com

谢敏浩, 男, 研究员。Tel (0510) 85508857 E-mail xsmh0704@sina.com

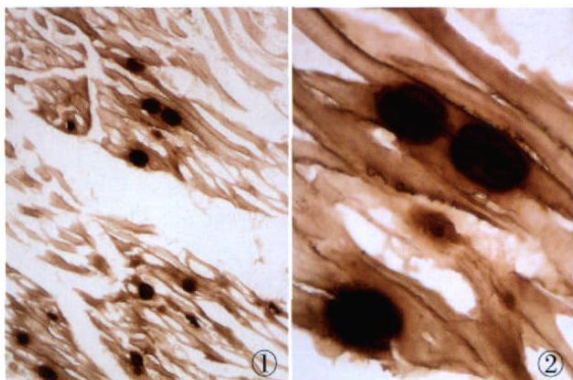


图 1.2 运动终板呈棕红色, 椭圆形

沉淀物质^[4]。由于酶活性在石蜡切片中不易保持, 通常是用液氮冷冻, 本试验使用 OCT 包埋冰冻切片, 是因为其渗透性好、方便易行等优点, 并且 OCT 已在病理科普遍使用, 这样就简化了原方法的制片过程, 不影响酶的活性, 从而不影响最终染色效果; Karnovsky-Roots 孵育液易变质, 所以各个试剂配置好了放在 4℃ 冰箱保存, 需要时再依次加入, 配置好的孵育液如不用, 需放在低温下保存; 实验共计切片 300 张左右, 少量预试验证明当孵育时间大于 24 h 时, 运动终板略有膨胀^[5], 较原方法时间略有缩短, 效果反而好。

本方法应注意以下几点: (1) 取材于兔小腿中上 1/3

组织固定液 (将醇性组织固定原液 1 份加 95% 乙醇 4 份混合后即可使用); 无毒脱蜡及透明液 (非芳香烃); 中性快干封片胶 (非芳香烃) (无锡公司); 免疫组化染色的抗体及配套试剂 (福州迈新公司)。全自动组织脱水机 (常州中威公司 TSJQ 型脱水机)。

1.2 方法 离体新鲜组织直接置于固定液中, 量是标本体积的 5 倍以上。大标本或空腔标本需要切开, 标本固定过夜后取材。在全自动组织脱水机中进行脱水、透明、浸蜡等处理。详细步骤如下: (1) 醇性固定工作液 2 h (新鲜标本 4 h)。 (2) 95% 乙醇 1 h。 (3) 无水乙醇 1 h。 (4) 无水乙醇 1 h。 (5) 无水乙醇 1 h。 (6) 无毒透明脱蜡液 20 min。 (7) 无毒透明脱蜡液 20 min。 (8) 无毒透明脱蜡液 20 min。 (9) 石蜡 1 h 20 min。 (10) 石蜡 1 h 20 min。 (11) 石蜡 1 h 20 min。次日上午 8:00 包埋、切片及 HE 染色后镜检。其中 24 825 例送检标本中有 620 例进行了免疫组化染色。

2 结果

醇性固定液固定的标本与甲醛固定液固定的标本相比, 组织切片无龟裂、染色略蓝, 色彩鲜艳, 细胞结构清晰, 同时

处, Goers^[3] 已证实, 运动终板在等长肌纤维肌束的中 1/3 处排成一行, 形成终板带; (2) 孵育液 pH 值对染色效果有影响, Kamovsky 和 Roots^[1] 认为, pH 值在 5.0 染运动终板效果最好, 形成的沉淀不易扩散; 配置试剂时要准确, 试剂要新鲜配制, 新鲜的试剂为亮绿色, 如果有浑浊则不能用; (3) 所用器皿用蒸馏水洗净、烘干; (4) 冰冻切片粘于载玻片后要充分晾干, 否则容易掉片, 本试验采用清洁液洗制的切片。

本方法还可做运动终板的定性和定量研究, 对病理诊断和科研有一定的帮助。

参考文献:

- [1] Kamovsky M J, Roots L A. "Direct coloring" thiocholine method for cholinesterase [J]. Histochem Cytochem, 1964, 12: 219-221.
- [2] Kanum an PM, Soo K C. Motor innervation of the trapezius muscle a histochemical study [J]. Head Neck, 1996, 18(3): 254-258.
- [3] Goers C. Structural organization of the motor nerve endings in mammalian muscle spindles and other striated muscle fibers [J]. Am J Physiol Med, 1959, 38(2): 166-172.
- [4] 凌启波. 实用病理特殊染色和组化技术 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1989: 292.
- [5] 樊中征. 临床肌肉病理学 [M] // 吴士文, 等译. 北京: 人民军医出版社, 2007: 10.

因为标本收缩率较小,组织细胞间隙等人工现象比甲醛固定的标本大为减少(图1、2、4、5)。甲醛固定标本做免疫组化染色,部分抗体需抗原预修复程序,而醇性固定液固定的标本,则无需抗原预修复程序,而且背景清晰。(图3、6)

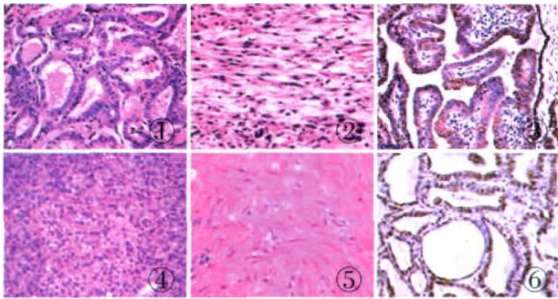


图1 甲状腺腺(非甲醛固定) 图2 多形性横纹肌肉瘤(非甲醛固定) 图3 甲状腺乳头状癌 CK19表达, SP法(非甲醛固定) 图4 甲状腺腺(甲醛固定) 图5 平滑肌瘤(甲醛固定) 图6 甲状腺乳头状癌 CK19表达, SP法(甲醛固定)

无毒透明脱蜡液和中性快干封片胶是非芳香烃物质,使用方法和效果与其他试剂相同,且无苯类溶剂的毒性,快干封片胶固化迅速,避免了切片间相互粘连。

3 讨论

常规使用的甲醛固定液易挥发,具有高刺激性和腐蚀性^[1]。国内外医学研究确认,人体接触甲醛时,会引发过敏反应、慢性呼吸道疾病和肿瘤的发生;长期使用苯类试剂,会导致骨髓抑制,白细胞数量减少。国内职业病统计表明,男性患肿瘤的机率比非接触人员高6.8倍,女性则高9倍。2004年6月15日世界卫生组织正式宣布甲醛为致癌物质,提醒人们要重视甲醛、二甲苯的致癌性。

目前,使用绿色环保的替代产品正方兴未艾。虽然国外已有使用甲醛、苯类等绿色替代产品进行病理制片的相关报道^[3,4],但是国内却鲜有报道。为此,我们使用国产醇性固定液、无毒透明脱蜡液及中性快干胶,以解决长期以来甲醛、苯类危害病理工作者身体健康的难题。醇性固定液固定的标本与甲醛固定标本相比,HE染色组织形态无明显差

异,同时对提高免疫组化染色质量也具有现实意义。

针对甲醛的高毒性、致癌性,国内外学者进行了多年研究,如在甲醛溶液加入添加剂以减少甲醛的挥发,向组织标本表面喷洒特殊溶液以分解甲醛,但效果仍不理想,即使加强通风,并不能完全清除其危害,本科使用绿色产品全面替代甲醛、苯类试剂后,从根本上杜绝了有害试剂对室内外环境的污染。使用绿色替代品对组织标本固定、透明效果符合制片技术要求^[5],与甲醛、苯类制备标本相比,细胞结构清晰,收缩间隙等人工现象大为减少,由于长期习惯观察甲醛固定的标本,使用初期可能需要有个适应过程。使用醇性组织固定液尚需注意以下几点:(1)大体标本固定后色泽变化轻微,较甲醛固定稍软,取材时刀具需锋利。(2)经醇性固定液固定的组织,蛋白之间不发生交联,避免了甲醛固定导致的抗原决定簇隐蔽现象,抗原无需修复,简化了免疫组化染色程序,缩短了染色时间。(3)醇性组织固定液可能导致标本中红细胞血红蛋白轻度外渗,用于肾穿等标本时应予注意。

因为不同的固定液其固定结果略有差异,故更换固定液可能要有个摸索适应的过程。但是从保护环境和改善医务人员身体健康的角度来考虑,避免病理职业性危害,使用绿色环保的替代品是大势所趋。

参考文献:

- [1] 蒋学之,张瑞稳,王耘兰. 甲醛接触人员肿瘤死亡流行病学[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1990, 8: 261-264.
- [2] Stanta G, Mucelli S P, Petreia F, et al. A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteinic analysis in human archive tissues[J]. Diagn Mol Pathol 2006 15: 115-123
- [3] Iesunm A, Babli T, Vaspolb D, et al. Microwave processing and ethanol-based fixation in forensic pathology[J]. Am J Forensic Med Pathol 2006 27: 178-182
- [4] Acton A, Harvey T, Grow M W. An examination of non-formalin-based fixation methods for xenopus embryos[J]. Dev Dyn 2005 233: 1464-9
- [5] 孟奎,马恒辉,石群立,等. 病理质量控制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(5): 439-440.

· 简 讯 ·

《病理学试题库(含软件)》已发行

由南昌大学第一附院梅金红、万红萍教授主编,人民卫生出版社出版的《病理学试题库(含软件)》现已发行。该题库有各类试题5347题,解剖图、大体图746幅,是一个多层次、立体式融教学、实践、考试为一体的多功能软件。该题库软件分为学生版与教师版,学生版既有纸质材料,又配有光盘,主要用于学生自测、自考、自学。教师版包括建题库、备题库、抽题库三大部分,可让教师轻松建题、备题、抽题。该题库应用范围广,可适用于各类医学院校学生及各层次病理

学医务人员的使用。此题库为南昌大学高国兰、龚洪翰、魏云峰教授任总主编的《临床医学试题库系列丛书(含软件)》之一,该丛书的出版得到已故著名医学教育家、资深院士裘法祖教授的充分肯定和高度评价,并亲自为丛书作序。相关信息,请点击南昌大学一附院网站查询(<http://www.jyyfy.com>)。

《病理学试题库(含软件)》学生版定价39.00元,教师版定价480.00元,免费邮寄,多购从优。联系人:王琳娜;地址:南昌市永外正街17号,南昌大学第一附属医院,邮编330006 联系电话:13879196968 0791-8692582或8693825。