

八种脱钙液对骨组织制片后HE染色质量影响的实践探究

方皓¹, 云杰苗², 王雄², 袁滋铎³, 林俞辰³, 陶子春¹, 薛逢贵⁴, 胡爱华^{5*}

¹海南医学院急诊创伤学院, 海南 海口

²海南医学院第一临床学院, 海南 海口

³海南医学院基础医学与生命科学学院, 海南 海口

⁴海南医学院第一附属医院病理科, 海南 海口

⁵海南医学院基础医学与生命科学学院形态学实验室, 海南 海口

收稿日期: 2021年10月2日; 录用日期: 2021年10月28日; 发布日期: 2021年11月4日

摘要

目的: 该文旨在比较运用八种骨组织脱钙液后, 病理制片的HE染色效果, 以找到一种更加高效, 综合效果更好的方法应用于临床工作当中。方法: 选取家兔股骨骨干部分24份, 修成1.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm的骨块, 平均分成A、B、C、D、E、F、G、H八组, 分别用A、B、C、D、E、F、G、H八种脱钙液在常温下进行脱钙处理, 记录脱钙过程的时间, 最后比较八组样本的染色质量。结果: G组(JYBL-II脱钙液)脱钙时间24 h, 时间最短, F组(JYBL-III脱钙液)染色效果最好。D组(福尔马林-甲酸溶液)、E组(Krajian改良Evan-Krajian脱钙液)及G组(JYBL-II脱钙液)染色效果欠佳。A组(10%硝酸溶液)、B组(5%甲酸溶液)、C组(Richmon Gelfonud-Hill脱钙液)和H组(JYBL-I脱钙液)染色效果一般。结论: 在八种脱钙液中, 骨组织制片后HE染色质量及效果最好的为JYBL-III脱钙液。

关键词

骨组织, 脱钙液, 制片, HE染色

Practical Exploration of the Effect of Eight Kinds of Decalcification Solutions on the Quality of HE Staining after Bone Tissue Slices

Hao Fang¹, Jiemiao Yun², Xiong Wang², Ziduo Yuan³, Yuchen Lin³, Zichun Tao¹, Fenggui Xue⁴, Aihua Hu^{5*}

*通讯作者。

文章引用: 方皓, 云杰苗, 王雄, 袁滋铎, 林俞辰, 陶子春, 薛逢贵, 胡爱华. 八种脱钙液对骨组织制片后 HE 染色质量影响的实践探究[J]. 临床医学进展, 2021, 11(11): 4889-4896. DOI: 10.12677/acm.2021.1111718

¹College of Emergency Trauma, Hainan Medical University, Haikou Hainan

²The First Clinical College of Hainan Medical University, Haikou Hainan

³School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou Hainan

⁴Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

⁵Morphology Laboratory, School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou Hainan

Received: Oct. 2nd, 2021; accepted: Oct. 28th, 2021; published: Nov. 4th, 2021

Abstract

Objective: This article aims to compare the HE staining effects of pathological slices after using eight kinds of bone tissue decalcification solutions, in order to find a more efficient and comprehensive method for clinical work. **Methods:** Twenty-four parts of femur diaphysis of rabbits were selected to form 1.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm bone blocks, which were evenly divided into eight groups A, B, C, D, E, F, G and H and treated with eight kinds of decalcification solutions A, B, C, D, E, F, G and H respectively at room temperature. The process of decalcification was recorded, and the staining quality of the samples in the eight groups was compared. **Results:** The decalcification time of group G (JYBL-II decalcification solution) was 24 hours, the shortest time, and the staining effect of group F (JYBL-III decalcification solution) was the best. The staining effect of group D (formalin-formic acid solution), group E (Krajian modified Evan-Krajian decalcification solution) and group G (JYBL-II decalcification solution) was not good. The staining effects of group A (10% nitric acid solution), group B (5% formic acid solution), group C (Richmon Gelfonud-Hill decalcification solution) and group H (JYBL-I decalcification solution) were average. **Conclusion:** Among the eight kinds of decalcification solutions, the best quality and effect of HE staining after bone tissue preparation is JYBL-III decalcification solution.

Keywords

Bone Tissue, Decalcification Solution, Preparation, HE Staining

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

骨组织作为人体最为坚硬的特殊组织，标本制作过程相对复杂、技术要求较高，其标本制作的每一步都对最后的成片质量具有很大影响，尤以脱钙这一环节最为重要，所选脱钙液将直接影响到脱钙后 HE 染色的效果。在日常工作中，海南医学院第一附属医院乃至海南省多家医院病理科一般均使用 10% 硝酸溶液进行脱钙，但制片效果一般，因强酸性脱钙液易使组织酸化，抗原性受到破坏，组织不适宜做免疫组化和分子病理，HE 染色时胞核等组织着色不均匀，颜色欠鲜艳，对比度较差，组织细胞结构和细胞核等欠清晰，从而影响病理学诊断；并且，临床一般要求常规片 4 天出结果，因此，探索出一种更加高效，综合效果更好的脱钙液具有重要意义[1]。本研究通过实验比较了八种脱钙液的脱钙效果，为病理科医生在日常制片等方面提供相应的参考和依据，现报告如下。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

选取海南医学院实验动物中心同一只 2.2 公斤成年家兔的股骨骨干样本平均切分为 24 份，平均分为 A、B、C、D、E、F、G、H 八组各 3 份。确保各组骨组织无差异。

2.2. 制备脱钙液

以临床医院病理科老师及文献提供的信息为参考，用 10% 硝酸为脱钙液进行家兔股骨组织的标本制作作为参照组，选取了中国协和医科大学出版社的《实用现代病理学技术》第一版一书中所提 5% 甲酸、Richmon Gelfonud-Hill 脱钙液等八种脱钙液，配制如下：

- 1) A 组脱钙液(10% 硝酸溶液)：浓硝酸 10 ml 加蒸馏水 90 ml；
- 2) B 组脱钙液(5% 甲酸溶液)：甲酸 5 ml 加蒸馏水 95 ml；
- 3) C 组脱钙液(Richmon Gelfonud-Hill 脱钙液)：
浓甲酸 10 ml，浓盐酸 8 ml，蒸馏水 82 ml；
- 4) D 组脱钙液(福尔马林 - 甲酸溶液)：
甲酸 50 ml，甲醛 5 ml，蒸馏水 45 ml；
- 5) E 组脱钙液(Krajian 改良 Evan-Krajian 脱钙液)：
80% 甲酸 100 ml，95% 乙醇 100 ml，醋酸钠 20 g，三氯醋酸 1 g 加蒸馏水 100 ml；
- 6) F 组脱钙液(JYBL-III 脱钙液)：
甲酸 50 ml，甲醛 10 ml，蒸馏水 40 ml；
- 7) G 组脱钙液(JYBL-II 脱钙液)：
盐酸 20 ml，甲酸 30 ml，甲醛 20 ml，蒸馏水 30 ml；
- 8) H 组脱钙液(JYBL-I 脱钙液)：
盐酸 8 ml，甲醛 5 ml，甲酸 12 ml，蒸馏水 75 ml。

2.3. 处理方法

2.3.1. 材料与仪器

八种脱钙液、基本实验操作器械，如：手术刀、剪刀、镊子等、石蜡包埋机、石蜡切片机、生物组织脱水机、摊烤片机、显微镜等。

2.3.2. 脱钙方法

首先取新鲜离体家兔股骨骨干部分 24 份，修成 1.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm 的骨块，在常温下用 10% 中性福尔马林固定 24 h。然后分别将 3 份置于八种脱钙液中(每瓶脱钙液为 100~200 mL)，在相同温度下浸泡一段时间(一般为 24 h)后，检测是否到达脱钙终点[2]。(采用两条标准：1) 用一次性 5 ml 头针能够无阻力地穿过，且明显软化。2) 取 5 ml 标本脱钙瓶中需检测的脱钙液与 1 ml 的 5% 草酸钙溶液混合摇匀，如液体混浊说明仍有钙质，如放置 5 min 后仍无沉淀，表示已脱钙完全[3]。

2.3.3. 脱钙后标本处理

标本脱钙完成以后，对其进行自来水冲洗 12 h，之后进入常规脱水包埋程序；如尚未到达脱钙终点，则需流水冲洗 30 min，再脱钙 12 h，重复此步骤直至到达脱钙终点为止。需要注意的是，若骨块距离第一条标准相差甚远，则更换脱钙液并流水冲洗后，继续浸泡相同时间周期再行检测。所有标本脱钙完成后常规脱水，高熔点石蜡包埋切片，苏木精-伊红染色，全自动封片机封片后镜下观察。

2.4. HE 染色效果评判标准

显微镜下切片骨组织结构完整、染色清晰。细胞核呈蓝紫色，颜色鲜明，与细胞质层次分明，对比明显，判断为良好，达不到以上标准则视为欠佳[3]。

3. 结果

3.1. 比较八种脱钙液的脱钙时间

A、B、C、D、F 及 H 组脱钙时间一致，为 72 h，G 组脱钙时间最短，为 24 h，E 组脱钙时间最长，为 336 h，推荐作为密皮质骨脱钙使用，见表 1。

Table 1. Comparison of the decalcification time and HE staining effect of the eight groups of tablets
表 1. 八组制片的脱钙时间及 HE 染色效果对比

| 脱钙液 | 脱钙时间 | 染色结果 | 染色特点 |
|-------------------------------------|-------|------|---------------------|
| A 组脱钙液(10%硝酸溶液) | 72 h | 良好 | 骨细胞保留较好 |
| B 组脱钙液(5%甲酸溶液) | 72 h | 良好 | 骨细胞保留较好，骨单位骨板清晰 |
| C 组脱钙液(Richmon Gelfonud-Hill 脱钙液) | 72 h | 良好 | 破骨细胞清晰 |
| D 组脱钙液(福尔马林 - 甲酸溶液) | 72 h | 欠佳 | |
| E 组脱钙液(Krajian 改良 Evan-Krajian 脱钙液) | 336 h | 欠佳 | |
| F 组脱钙液(JYBL-III 脱钙液) | 72 h | 良好 | 中央管、骨单位骨板、骨小管、骨陷窝清晰 |
| G 组脱钙液(JYBL-II 脱钙液) | 48 h | 欠佳 | |
| H 组脱钙液(JYBL-I 脱钙液) | 72 h | 良好 | 骨单位骨板清晰 |

3.2. 比较八组制片的染色效果

D、E 及 G 组染色效果欠佳，F 组(JYBL-III 脱钙液)染色效果最好，剩余其他组染色效果一般，见表 1，染色图片具体见图 1~8。

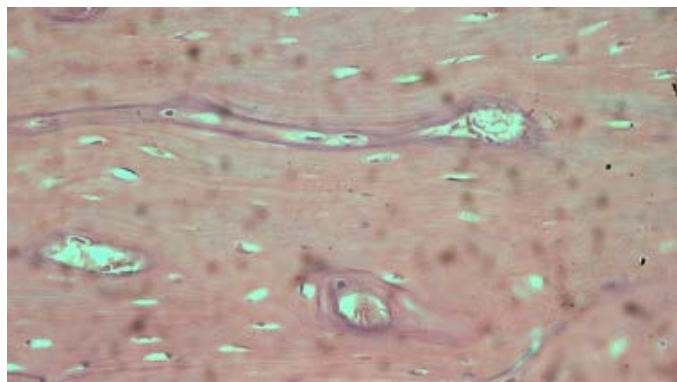


Figure 1. 10% nitric acid solution
图 1. 10% 硝酸溶液

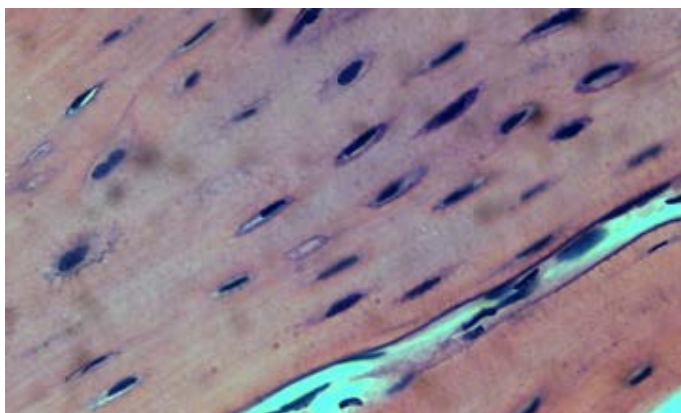


Figure 2. 5% formic acid solution
图 2. 5% 甲酸溶液

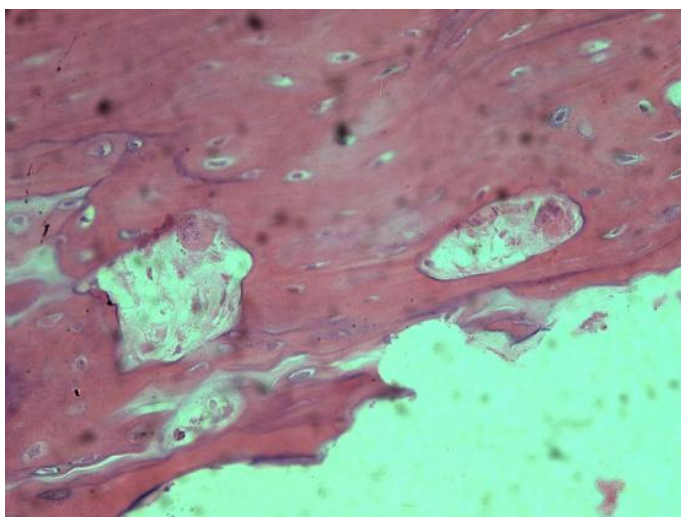


Figure 3. Richmon Gelfonud-Hill decalcification solution
图 3. Richmon Gelfonud-Hill 脱钙液

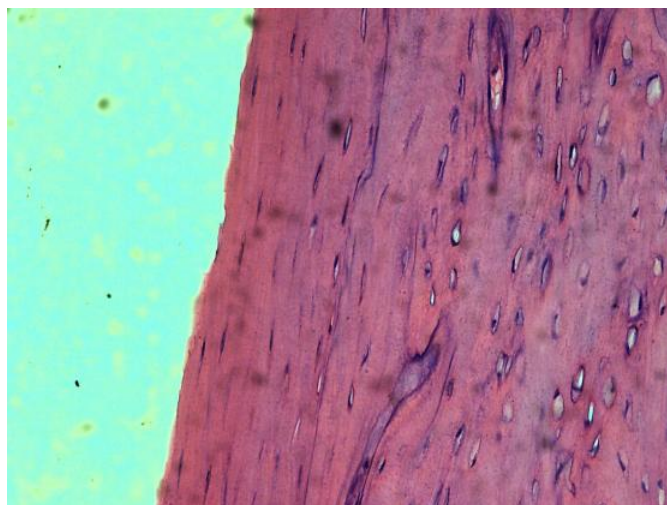


Figure 4. Formalin-formic acid solution
图 4. 福尔马林 - 甲酸溶液

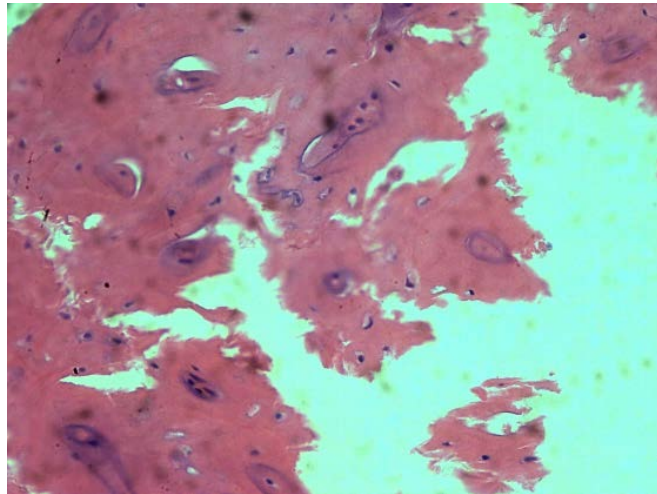


Figure 5. Krajian's modified Evan-Krajian decalcification solution
图 5. Krajian 改良 Evan-Krajian 脱钙液

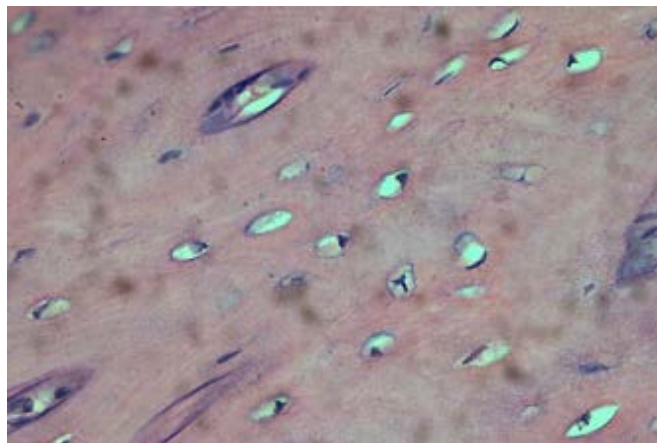


Figure 6. JYBL-II decalcification solution
图 6. JYBL-III 脱钙液

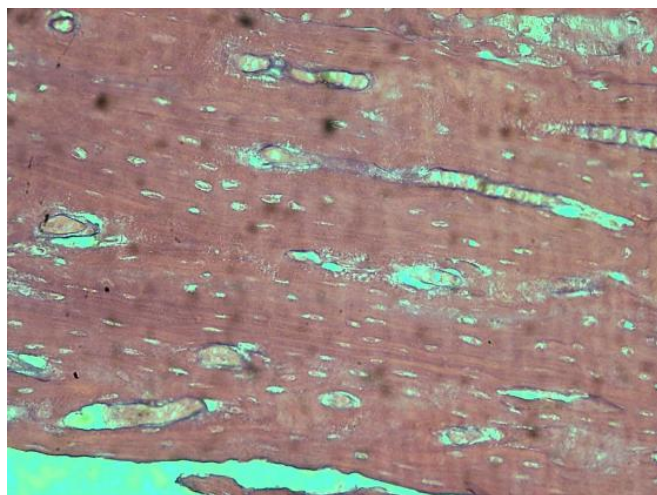


Figure 7. JYBL-II decalcification solution
图 7. JYBL-II 脱钙液

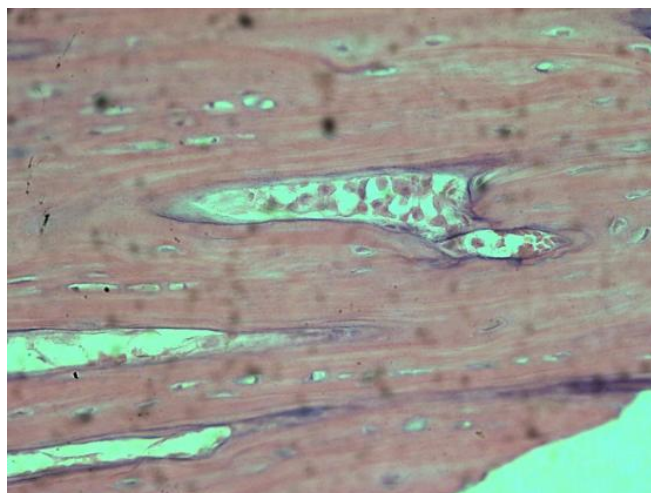


Figure 8. JYBL-I decalcification solution
图 8. JYBL-I 脱钙液

3.3. 综上所述

不同种类的脱钙液对脱钙及染色效果有较大的影响, 综合效果最好的脱钙液为 JYBL-III 脱钙液(甲酸 50 ml, 甲醛 10 ml, 蒸馏水 40 ml)。

4. 讨论

骨组织为坚硬的一种特殊组织, 它致密、坚硬, 含大量的钙盐, 钙盐一般遇酸后溶解组织才会变软[4]。脱钙就是将骨组织里的钙盐与胶原纤维分离[5], 同时能避免脱钙液对骨组织结构的影响, 使脱钙后的组织变得相对柔软和疏松, 可以进行石蜡切片, 并能制出组织结构清晰完整的切片[6]。常用的脱钙剂主要包括单纯酸类、混合酸类、螯合剂等[7]。强酸性脱钙液易使组织酸化, 抗原性受到破坏, 不适宜做免疫组化和分子病理。螯合剂是一种比较温和的脱钙剂, 但对组织的渗透性差作用慢, 不适于病理学标本制作。脱钙过程最重要的就是确定脱钙终点, 如果脱钙不完全, 则更极易造成切片的碎裂甚至损坏刀具, 对骨组织的制片需要一定的技巧和经验, 要把握好每个技术细节, 才能真正达到骨组织制片的最佳效果。实验过程中采用全自动脱水机等设备, 保证了部分条件一定, 降低非相关因素对实验的影响, 从而保证了最终实验效果具有科学性。

本研究从八种脱钙液脱钙的时间、HE 染色效果两方面比较发现, G 组脱钙液(JYBL-II 脱钙液)的脱钙时间最短, 为 24 h, A、B、C、D、F、H 组脱钙液脱钙的时间为 72 h, E 组脱钙液脱钙的时间为 336 h, F 组标本的染色效果是最好的。F 组脱钙液(JYBL-III 脱钙液)的成分有甲酸 50 ml, 甲醛 10 ml, 蒸馏水 40 ml。甲酸对骨组织脱钙较温和, 且组织的损伤较小, 同时对细胞核染色效果好, 但作用较弱, 脱钙速度慢。而甲醛既是良好的固定剂, 又兼具穿透速度快, 脱钙能力强的特点, 可以在抗酸侵蚀的同时加强对组织的固定。因此, 这两种物质按比例进行混合使用能更大程度上缩短脱钙过程、减少组织破坏, 实现较好的染色效果。

基金项目

校级大学生创新创业课题(X201911810104)。

参考文献

- [1] 张婉仪, 阮君, 丘展龙. 骨组织病理制片三种脱钙液比较[J]. 吉林医学, 2014, 35(10): 2083-2084.

- [2] 祁宏枝, 罗添友, 唐涛. 不同成份脱钙液对骨组织脱钙效果的比较[J]. 成都医学院学报, 2020, 15(3): 349-352.
- [3] 王德田, 董建强. 实用现代病理学技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2012: 197-198.
- [4] 李玉莲, 徐晓艳. 临床病理检验中不同骨组织脱钙液效果的比较[J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(10): 996-997.
- [5] 李锐, 金玉兰, 等. 两种盐酸脱钙液对骨髓 HE 及免疫组化染色的影响[J]. 中国组织工程研究, 2017, 52(8): 86-89.
- [6] 章爱梅, 程小爱, 林怡. 快速病理组织脱钙新方法[J]. 中国农村卫生, 2017(17): 39.
- [7] 杜洪, 金荣. 三种不同脱钙液在骨组织石蜡切片中的应用比较[J]. 甘肃医药, 2016, 35(5): 368-370.